

デュシェンヌ型筋ジストロフィー治療の最前線

第一部 エクソンスキッピング

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さん、ご家族、そして看護・治療に関わるみなさんへ。私ギュンター・ショイヤーブランドはドイツの生化学者です。現在デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子治療として最も有効と考えられているエクソンスキッピングという方法について、最新の研究成果をご紹介します。今後は、筋肉へのジストロフィン遺伝子の導入、幹細胞の応用、ユートロフィンのアップレギュレーション、その他の薬物治療の可能性などエクソンスキッピング以外の治療法についての最新の情報や、筋ジストロフィーの診断方法についても順次ご紹介する予定です。

情報は学会などで新しい報告があれば、その都度更新します。ここではデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療についての研究成果を発表しますが、私は医師ではありませんので患者さんのケアや医学的管理に関わることは他の資料を参照していただきたく存じます。

この報告は当初英語で発表しましたが、その後ドイツ語に翻訳され、またメキシコ人のベッカー型筋ジストロフィー患者である **Ricardo Rojas** によってスペイン語にも翻訳されます。この報告は生化学や遺伝学の専門家ではない方たち、研究室で行われていることを分かっていたくために書いたものです。

これらの研究は様々な研究所でチームとして行われたものですが、本稿では簡潔を期すため研究所の責任者の名前だけを記しています。参加されているのは博士号を持った大学教授などですが、敬称は省略させていただきました。

重要な参考文献は巻末にリストし、カッコ内の番号で本文から検索できるように記載しました。

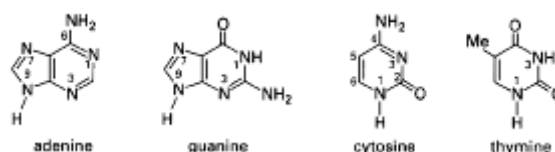
エクソンスキッピングやその他のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの研究に関してのご質問は、電子メール gscheuerbrandt@t-online.de にて英語などで受け付けております。



遺伝子からたんぱく質が作られる

デオキシリボ核酸 (DNA) という遺伝物質からなる機能的な単位のことを、**遺伝子**といいます。その構造は 1953 年に James Watson と Frances Crick によりねじ曲がった梯子のような形をしていることが発見され、二重らせん構造と呼ばれています。

はしごの棧にあたるそれぞれの横棒は、4 種類の**塩基**、すなわちアデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C) という小さな分子が 2 つずつ組み合わさってできています。これらの塩基を**遺伝文字**といいます。横木を作ることのできる組み合わせは決まっており、**塩基対**とよばれる A-T または G-C の組み合わせでなくてはなりません。4 種類の塩基の化学式は図のようになってます。



たとえば一方の DNA が GGCTTAATCGT という塩基の配列を持っているとすれば、それに向かいあう DNA は対応する (相補的な) 塩基配列をもつことになります。A が T に対応し、G が C に対応すると、下の様な組み合わせができあがります。



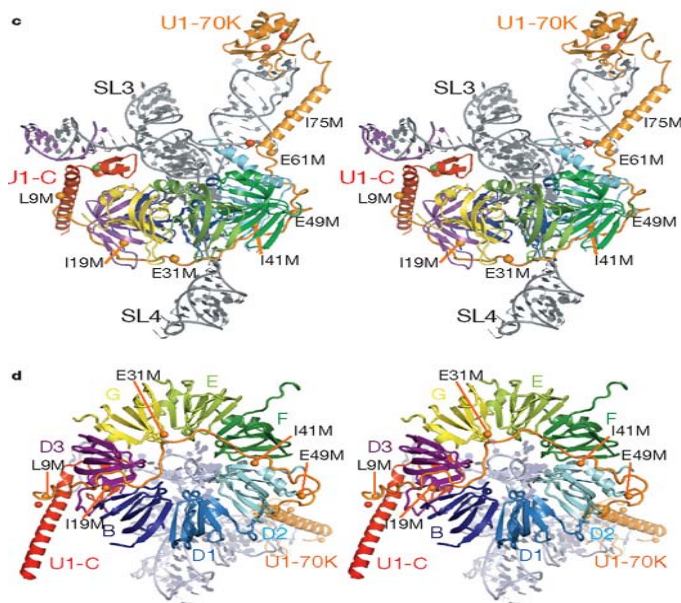
このような塩基の配列が**遺伝情報**で、生物の生命維持、発達に必要不可欠で、さらに次の世代へと受け継がれていくものです。

遺伝子の大部分は生体内で**タンパク**合成のための指令を出します。細胞の中にある核では、活性化された遺伝子が発現し、次の段階の遺伝物質である**プレメッセンジャーリボ核酸 (pre-mRNA)** に**転写**されます。遺伝子の中で、このようにタンパク合成の情報を担う部分を**エクソン**といいます。一方それよりも大きな、直接タンパクをコードしていない部分があり、これを**イントロン**といいます。イントロンはかつて「不要な遺伝子」と考えられていましたが、今では遺伝子の活動をコントロールする重要な情報を含んでいることがわかってきています。

RNA では、DNA の塩基である T の代わりにウラシル (U) という塩基が使われます。

核の中で転写された **pre-mRNA** は、次にイントロンが取り除かれ、タンパク情報を持った**エクソン**のみから成る**メッセンジャーRNA (mRNA)** になります。この過程を**スプライシング**といいます。

mRNA は合成されると核を出て、細胞質でタンパクを合成する場所である**リボソーム**に移動します。**スプライス部位**というのはエクソン内にある特定の配列で、**pre-mRNA** からイントロンを正しく取り除くために重要です。スプライシングはたくさんのタンパクと小さな RNA から成る**スプライソーム**により行われます。



細胞の働きについて科学でどのくらい解明されたかを示す一例として、ヒトのスプライソソームの 5 通りの構造のうちの一つを立体図で示します。U1 snRNP と呼ばれるこの小さな複合体の構造は、2009 年 3 月 26 日に Nature 誌に発表されました (1)。この U1 複合体は、10 個のタンパクと 1 個の RNA からできています。左の図を左眼で、右の図を右眼で凝視してみてください。左右の図の間に立体図が見えてくるでしょう。オレンジの線で示した U1C-70K がエクソンとイントロンの境界を判断するのに最も重要で、スプライシング反応

を制御する部分です。

この図は概念図です。実際には色がついているわけではなくて、全てが灰色のゼリーのように見えるのです。この最新の研究結果から、現代科学でものごとがどのように説明されているかという一例を見ていただきました。実際のエクソンスキッピングにも、これと類似した複合体である U7 snRNA という物質が使われているのです。(16 ページ)

遺伝コード. 遺伝文字の情報がタンパクに翻訳される過程について説明します。タンパクはアミノ酸からできていますが、mRNA の塩基は 3 つで一組のコドンとよばれる暗号になっていて、それぞれ 20 種類のアミノ酸をコードしています。例えば、GUU はバリン、AGC はセリン、AUG はメチオニン、CCA はプロリン、UUU はフェニルアラニン、GCA はアラニン、GCG はアラニンというアミノ酸を示しています。4 種類の遺伝文字 3 つの順列なので 64 のコドンがありますが、このうち 3 つは例外で、何もアミノ酸をコードしていません。

多くのアミノ酸は 2 つ以上の RNA コードに対応しています。コドンは句読点で区切られていませんから、どこから読み始めるのかを示す記号が必要です。これを読み取り枠 (reading frame) といって、必ず AUG から始まる決まりになっています。読み取り枠が 1 塩基または 2 塩基ずれてしまったら、その後続くコドンは意味が変わってしまい、全く別のアミノ酸を作り出してしまいます。このことは、エクソンスキッピング治療のしくみを理解するのに重要な点です。

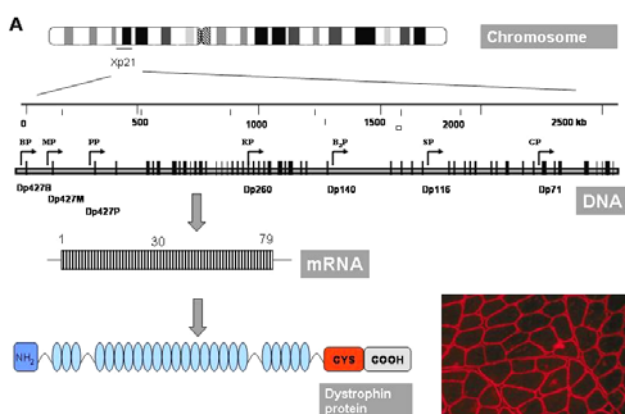
リボソームでは、mRNA の遺伝コードの読み取りと翻訳が行われ、たくさんの、何千ものアミノ酸がつながってタンパクが作られます。上に述べたコドンの 3 つの例外というのは UAA、UAG、UGA で、これらは停止コドンと呼ばれ、タンパクの合成を終了させる合図になっています。

RNA からタンパクが作られるまでの過程を、生体内で実際に行われるのと同じ速度で再現した動画を、下記で見ることができます。Ctrl キーを押しながらアドレスをクリックするとリンクします。画面右下にある HQ ボタンの右側のボタンをクリックするとフルスクリーン表示になります。音声も聞くことができます。

www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM&feature=related

ジストロフィン遺伝子とタンパク

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは 3500 出生に 1 人の割合で男の子だけに発症します。女性は保因者となって、息子に発症する確率は 2 分の 1 になります。時々家族歴のない家系に突然発症することもあります。この病気を完治させる方法はまだ見つかっていませんが、**ジストロフィン遺伝子**という、現在知られている 20,488 のヒトの遺伝子のなかで最も大きな遺伝子の変異によって起こることが分かっています。次の図はこの遺伝子が X 染色体のどこに位置するかを示したものです。その DNA は 2,220,223 文字からできていて、**79 のエクソン**と、タンパクの合成開始に関する指令を出す 7 つのプロモーターという部分を持っています。スプライシングにより mRNA は 11,058 文字、DNA の 0.5% のサイズになります。リボソームでこの mRNA の情報は 3685 のアミノ酸に翻訳され、トランスファー RNA (tRNA) と呼ばれる別の RNA によってタンパク合成部位に運ばれて、**ジストロフィンタンパク**ができあがります。

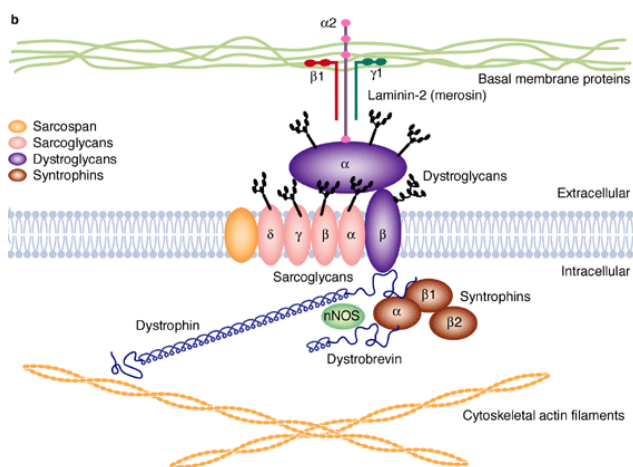


ジストロフィンタンパクは棒のような形をしていて、ちょうつがいのような連結部によって 4 つに分けられる 24 のアミノ酸のくりかえしからできています。両端の部分を N 末端、C 末端といい、またシステインやイオウを多く含む部分もあります。右端に示したのは、細胞膜のジストロフィンタンパクを蛍光抗体法で染色した筋肉の顕微鏡写真です。

ジストロフィン遺伝子・ジストロフィンタンパクの大きさ. ジストロフィン遺伝子の二重らせん構造の大きさは、0.75mm です。これが細胞の核の中では、他の 2 万個のヒトの遺伝子とあわせて 0.01mm の大きさに圧縮されてしまっています。ジストロフィンタンパクは遺伝子よりもさらに小さく、125nm (1mm=100 万ナノメートル) しかありません。8000 個のジストロフィンタンパクを一行に並べても、たった 1 ミリメートルにしかありません。1 グラムの筋肉の中には、1140 億のジストロフィンタンパクが入っているのです。

ジストロフィンの役割. ジストロフィンには筋肉の細胞を壊れにくくする役割を持っています。筋細胞の細胞膜の内側にあつて、ジストロフィンタンパクの C 末端は細胞膜の他のタンパクと

結合し、ジストロフィン・グリコプロテイン複合体を作っています。一方の N 末端は筋細胞の内部にある、細胞が収縮するための構造とつながっています。ジストロフィンタンパクの中央



部分のアミノ酸は図のようにねじれた形になっていて、筋肉が収縮したり引き伸ばされたりするたびにバネのように伸縮して、緩衝材の役割をしています。このようにジストロフィン、アクチン-ミオシンによる筋肉の収縮により生じる機械的なエネルギーから、細胞膜や周りの結合組織、腱などにバランスよく伝え、過度の衝撃が加わらないように調節する役割を担っています。

ジストロフィンの役割はこれだけではありません。ジストロフィン・グリコプロテイン複合体の構造は、他の多くのタンパクの細胞内での配置を決めるために重要です。さらに細胞内外でのカルシウムイオンの濃度を調節し、細胞の成長にも関与しています。このような複雑な細胞内の伝達物質については、まだ解明されていないことも多いのです。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんは、筋線維のなかに全く、あるいはほんの少ししかジストロフィンがないのです。ジストロフィンは筋細胞の構造を保つ役割を担っているため、これがなくなると細胞膜が壊れて、多量のカルシウムイオンが筋線維の中に流れ込んでしまいます。過度のカルシウムはカルペインやプロテアーゼといったような、筋肉を壊したりアポトーシスと呼ばれる細胞死のプログラムを起動させる酵素を活性化します。その結果炎症と似たような反応が起こります。すなわち線維芽細胞が活性化されて線維化が起こります。すると組織が癒痕化して、筋細胞が再生されにくくなり、年長のデュシェンヌ型筋ジストロフィーにみられるような症状を来します。

進行がより緩徐なベッカー型筋ジストロフィーの患者さんでは、ジストロフィンの量が正常より少なく、大きさも正常より短いのです。このような不完全なジストロフィンは正常ほどしつかりとは機能しませんが、何とかその役割を果たしています。

ジストロフィンがなくなると困るのは体を動かす骨格筋だけではありません。心臓の筋肉が弱ると心筋症をおこします。血管の平滑筋が弱ると血流の増加に対応できなくなって呼吸などの問題が起こりますし、消化管の平滑筋の障害により腸の動きが悪くなることもあります。たった一つの遺伝子の異常で、体の色々なところが異常を来すのです。

エクソンスキッピング

研究の使命. 5歳で 30kg の健康な男子の筋肉は約 12kg で、この中に 1500 兆個のジストロフィン分子が含まれています。5歳のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患児には、6kg しか筋肉がなくて、ジストロフィンはほとんど含まれていません。これは遺伝子に異常があつて、正しく

ジストロフィンタンパクを合成できないからです。残っている筋肉を正常に動かすためには、正常の 30%のジストロフィンさえあればいいと言われていています (2)。筋肉の量が 6kg だとすれば、必要なジストロフィン は 200 兆個です。完全に正常なジストロフィンタンパクでなくて、少し短くても、働きさえすれば構わないのです。

エクソンスキッピング、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子治療。 1990 年代半ばに、オランダのライデン大学の **Gertjan van Ommen** が大きな副作用を起こさずに遺伝子治療を長期にわたって奏功させるにはどうすればよいかを説明してくれました。これが**エクソンスキッピング**と呼ばれる治療法で、この 15 年間日本のみならずオーストラリア、英国、アメリカ合衆国などで複数のグループによって研究されていて、マウスやイヌによる動物実験を経て、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんにも実際に試みられています。

エクソン 51 のスキッピングに関しては、局所または全身投与による臨床試験がライデン大学、ルーバン大学、ゲーテブルグ大学で行われています。オランダの **Prosensa 社**、アメリカの **AVI BioPharma 社** が MDEX コンソーシウムの指揮下で協力しています。Van Ommen のほかに、オランダでは **Judith van Deutekom** や **Annemieke Aartsma-Rus** らのグループや、イギリスでは **Kate Bushby** や **Francesco Muntoni** らのグループがこの研究を行っています。

エクソンスキッピングの直訳は「エクソンの読み飛ばし」です。エクソンは遺伝子のタンパクをコードする部分です。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんの多くは、エクソンがいくつかなくなっていたり、重複していたり、あるいは遺伝文字が間違っていたりします。これにより遺伝子からのタンパクの合成が妨げられて、ジストロフィンタンパクが作れなくなるのです。これらの間違いを正してやれば、つまり異常のあるエクソンを読み飛ばしてその先のエクソンへつなげることができれば、またタンパクが作れるようになるのです (3)。

このような読み飛ばしのために用いられるのが**アンチセンスオリゴヌクレオチド (AO)** です。これは 20 から 30 個の塩基からなる小さな遺伝物質で、異常のあるエクソンに相補的に作られて結合するように作られており、これを読み飛ばすことができます。AO はオーストラリアのペースで **Steve Wilton** らによって 79 個全てのエクソンに対応するものが作成されており (4)、オランダのライデンでも **Annemieke Aartsma-Rus** らによって 39 種類のエクソンに対する AO が作られています。AO は目的とするエクソンの翻訳を妨げ、他のエクソンには作用しないという特異性を持っています。

デュシェンヌ型からベッカー型筋ジストロフィーに変化させる。 変異およびその治療のためのエクソンスキッピングによって失われた部分のエクソンがコードしていたはずのアミノ酸は、新しく作られるジストロフィンからは失われることとなります。なのでこの治療で作られるようになるジストロフィン は正常のものより短いけれども、筋細胞を守る機能はいくらか残っているのです。そのため病気の症状は軽くなり、筋肉の変性のスピードもゆっくりになり、寿命

ものびて一部では正常と同じくらい長生きできる人もできます。デュシェンヌ型筋ジストロフィーはこうして、より軽症のベッカー型筋ジストロフィーと同じような症状を呈するようになります。

完治というわけではない。 この治療により症状はかなり軽快しますが、治療をしても病気が完治するわけではありません。いづれか症状は残りますが、ある程度の有効性がある治療法であることは確かです。異常のある遺伝子はこの治療をしても正常になるわけではありませんが、その遺伝子をうまく読み取ってなるべく症状を軽くするための方法です。

動物実験。 エクソンスキッピングは筋ジストロフィーのマウスやイヌで試され、成功しています。筋肉に AO を局所投与したり、さらには静脈投与をして、心臓や肺を含む全身の筋肉にいきわたるように試みました。全身投与の多くの例で、筋肉の機能の大きな改善が得られました。もっとも重要な論文として、mdx マウスに AO を静脈投与した 2005 年の **Terence Partridge** らの報告を挙げておきましょう (5)。

ジストロフィン遺伝子の変異。 ジストロフィンの変異にはどのようなものがあるのかを調べた報告は数多くあります。最も大規模なものとしては、2006 年に **Annemieke Aartsma-Rus** らがライデン大学に登録されている 4700 人の遺伝子変異のデータをまとめています (6)。それによると、1 つ以上のエクソンの欠失が **72%** を占めています。1 つ以上のエクソンの重複は **7%** に見られました。点変異といって 1 文字単位の小さな欠失や挿入が **20%** に認められ、残りの **1%** はまれな変異、たとえばスプライス部位の異常や遺伝子の大きな構造変化などによるものでした。

著者らは 91% の例で読み枠ルールが当てはまると結論しています。読み枠ルールというのは、遺伝文字の読み枠がずれてしまう **out-of-frame** の変異はデュシェンヌ型、ずれの生じない **in-frame** の変異はベッカー型の筋ジストロフィーを起こすというものです。そしてこのルールの例外のように見える場合でも、**mRNA** レベルで調べてみるとこのルールに従うと言われています。しかし多くの例では、通常の遺伝子検査の段階では **mRNA** の配列までは分かりません。エクソンスキッピング治療を行う前には組織の培養実験をして、この治療により **in-frame** の **mRNA** が作られるかどうかを確認することが望ましいようです。

エクソンスキッピングの適応。 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状は多くの患者さんで共通していますが、遺伝子変異は大きなジストロフィン遺伝子の様々な場所で起こりえるため、人によって病気の原因は異なります。従ってエクソンスキッピング治療はどのような遺伝子異常を持っているかによって異なってきます。オーダーメイド治療が必要ということです。患者さんごとに、遺伝子異常の場所や種類に応じた AO が必要になりますが、多くの場合いくつかの条件が合えば共通の AO を使うことができるのです。

Annemieke Aartsma-Rus らは、2008年3月11日までの時点でライデン大学に登録されていた遺伝子欠失、点変異、または重複をもつデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象に、1つまたは2つのエクソンスキッピング治療の対象になるかどうかを検討しました。登録されていた4770人から、エクソンスキッピングの対象となる120のグループが抽出されました。そのうち人数の多かった上位8グループを示します。

Rank	Exon to be skipped	% of all patients
1	51	13.0
2	45	8.1
3	53	7.7
4	44	6.2
5	46	4.3
6	52	4.1
7	50	4.0
8	43	3.8
1-8		51.2%

下記のホームページからはこのリストの全体をみることができます。

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/121645168/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

また2009年3月には論文として発表されています(7)。

この短いリストに示したように、患者さん全体の13%はエクソン51のスキッピングが必要です。エクソン51用のAOは最も多くの患者さんのための治療薬となる可能性があります。そのためオランダとイギリスの科学者は、できるだけ早くこれに該当する患者さんに薬を届けるために、エクソン51を読み飛ばす薬の開発に力を注いできました。オランダのProsensa社はエクソン51のスキッピングが成功すれば、グループ2~8のためのエクソンスキッピングも開発する意向を示しています。この優先リストにあるすべてのエクソンスキッピングが可能になれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんの半分以上を治療することができます。

2つ以上のエクソンスキッピング。デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、読み枠を正常にするために2つ以上のエクソンを読み飛ばさなければならないこともあります。

理論的には、エクソン45から55までの11個のエクソンを読み飛ばすことができれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの63%にあたる患者さんをベッカー型の軽い症状に変えることができると考えられていました(8)。

Annemieke Aartsma-Rus らは健常人、エクソン48-50の欠失またはエクソン46-50の欠失を持つデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者2名の筋芽細胞を培養して、これら11個のエクソンを読み飛ばすことができるかどうか実験しました。11個のエクソンに対応する2' O-メチルAO全てを加えたものなど様々な組み合わせを試してみました。すると目標としたエクソンが全て読み飛ばされたものから、一部のmRNAが低い濃度で検出されるものなどがでてきて、11個の標的エクソンをうまく読み飛ばすことはできませんでした。長いイントロンによって短いエク

ソンのスプライシングが規則的に行われなかったのが原因の一つとして考えられました。

著者らは、この方法は理論的には非常に軽症のベッカー型筋ジストロフィーの状態を作り出すのに有効であるはずだが、現在の技術ではうまく 45-55 の全てのエクソンを読み飛ばすことはできなかつたと結論しています (9)。

筋ジストロフィーのイヌの治療には2つのエクソンを同時に読み飛ばす必要があり、この試みがヒトのデュシェンヌ型筋ジストロフィーの複数のエクソンスキッピングに道を拓いてくれるかもしれません。イヌでの3つのエクソンスキッピングに成功した報告は2009年3月に発表されており、これについて少し述べます (10)。この成功は患者さんやご家族から非常に期待を寄せられました。しかしこの報告ではエクソンを2つか3つ読み飛ばすことは技術的に可能だということを示しているにとどまり、45-55 の11個のエクソンをうまく読み飛ばすにはまだ至っていないのが現実です。

イヌにおける複数のエクソンスキッピング。ワシントンの Children's National Medical Center の **Eric Hoffman** と **Terence Partridge**、東京の General Animal Research Facility の **Takeda** らは筋ジストロフィーの CXMD ビーグル犬にモルフォリノアンチセンスオリゴ (AO) の混合物を投与して、複数のエクソンスキッピングに成功しました (10)。Mdx マウスは非常に症状が軽症ですが、このイヌは臨床症状があり、しかも体格がマウスよりも大きいため実際の人間の患者により役立つ情報が得られると考えられます。またマウスよりイヌの方が寿命が長いいため、投与後長期間の経過観察も可能になります。

このイヌでは、ジストロフィン遺伝子のエクソン7のスプライシング部位に変異があるため mRNA からエクソン7が失われ、それ以降の読み枠がずれた結果、すぐ後に停止コドンが出現してタンパクの合成が止まってしまう。この前後のエクソン6からエクソン8をスキップすれば、読み枠はずれずに不完全ながらもジストロフィンタンパクが合成できるはずです。

生きたイヌに投与するまでに、これらのイヌから採取された筋芽細胞での予備試験を行いました。エクソン6と8の内部にある配列と、エクソン6とイントロン6、エクソン8とイントロン8の境目にある配列をターゲットにして4種類のAOを作成しました。培養された細胞に取り込ませるために、電気的に中性のモルフォリノではなく電荷をもった 2'O-メチル AO を用いました。4種類のAO全ての混合物や、単独のものなどさまざまな組み合わせを試しました。

この実験の結果、筋芽細胞が筋管とよばれる組織に発育した4日後に、mRNA のエクソン5の次にエクソン10の始まりがつながっていることが分かりました。不思議なことに、欠失していたエクソン7と、AOによりスキップされたエクソン6と8のみならず、AOが結合していないはずのエクソン9も読み飛ばされていたのです。なぜこのようなことが起こったのかは分かりません。しかしエクソン9を読み飛ばしても幸い読み枠は保たれていたため、この治療の効果に悪影響はありませんでした。発育した筋管からはジストロフィンタンパクが検出されました。単独のAOでの実験ではエクソン8とイントロン9の境界に対するAOはこの読み飛ばしに関与しないことが示されたので、実際のイヌには3種類のAO、すなわち Ex6A、Ex6B、

EX8Aのみを投与しました。

次に、3種類のAOの混合物を0.5mgまたは1.2mgずつ前脛骨筋に局所注入する実験を行い、生後6ヶ月と生後5年のイヌにそれぞれ投与しました。今回は2'O-メチルAOとモルフォリノをそれぞれ試しました。注射部位の周りでは、61~83%のmRNAでエクソン6、7、8、9が抜けていました。1.2mgのモルフォリノ投与により、ほぼ正常に近い量のジストロフィンタンパクが出現し、2'O-メチルAOでも同様の結果でした。ジストロフィンをもつ細胞の構造は有意に改善していて、若いイヌの方が5歳のイヌよりもより高い効果を得ました。

このように、筋肉の質によって作られるジストロフィンの量が変わるということは、エクソンスキッピング治療は可能な限り早期に行うのが望ましいということです。もう一つの注意点は、培養細胞ではエクソン6に対するAOだけでエクソン6-9のスキッピングが起こったのに対し、実際の局所注入試験ではこの現象はみられず、全領域に対するAOが必要だったことです。AOが有効かどうかのスクリーニングでは、培養試験の結果を鵜呑みにはできないことが分かりました。

全身投与の実験は、東京のタケダシンイチらが3匹の生後2ヶ月のイヌの足の静脈に3種類のモルフォリノ混合物を注射して行いました。1匹目は120mg/kg、週1回を5週間、2匹目は同じ量を2週間に1回、全部で11回、5ヵ月半かけて投与され、3匹目は200mg/kg週1回を7週間投与されました。最終の注射から2週間後、筋肉を検査しました。

3匹とも正常の50%までのジストロフィンが作られていましたが、いくつかの筋肉、特に心臓の筋肉ではほんの少ししかジストロフィンが作られませんでした。最も大量の投薬を受けたイヌでは、平均して正常の26%の量のジストロフィンが検出され、これだけあれば筋肉の機能を保つことができます。新しく作られたジストロフィンはmRNAのエクソン6、7、8、9に相当するアミノ酸が欠けていました。つまり、もともと欠損しているエクソン7と、スキッピングで飛ばされたエクソン6、8のみならず、なぜかエクソン9も読み飛ばされていたのです。

治療を受けないイヌでは時間とともに筋肉の破壊が進みますが、治療を受けたイヌはいくつかの筋肉の機能検査で治療後も状態が安定していることが確認されました。このように、全身投与による治療は筋肉の破壊を食い止めることができます。核磁気共鳴検査(MRI)によって筋肉の構造を調べました。この検査は、筋生検のような体に傷をつける検査と同じくらい有益な情報を、痛みを伴わずに得ることができる検査です。エクソンスキッピング治療のあとの経過観察のための検査として、今後ますます有用性が増すことでしょう。

このように、モルフォリノアンチセンスオリゴ(AO)による治療は人間と似たからだの構造をもつ大型の哺乳類でも有効性が示されました。この薬品は毒性がなく、免疫反応も起こしません。しかし効果が長続きしないため繰り返しの投与が必要です。裏を返せば、もし問題が生じた場合には治療を中断することもできます。AOはジストロフィン遺伝子がプレmRNAに転写される筋肉のような組織でのみ効果を発揮します。

私のウェブサイトで、この治療を受けたイヌの画像が見られます。

<http://www.duchenne-information.eu/home-en.htm>

重複へのエクソンスキッピングの応用. 1つ以上のエクソンの重複によって読み枠がずれてしまうタイプの変異は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの約7%に見られます。原理的には、重複したもとの遺伝子には触れずに、余分の遺伝子だけ読み飛ばすことができれば正常と同じ mRNA が作られ、エクソンスキッピング治療によって根本治療ができるはずですが。

しかし現実にはそう単純にはいきません。もとの遺伝子と、重複した遺伝子を AO が見分ける方法がないからです。**Annemieke Aartsma-Rus** らは重複をもつデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋肉細胞を培養して研究をしました(11)。

この試験管内の実験では、重複したエクソン 45 の一方のみを読み飛ばすことに成功し、筋線維のうちの80%が2日後には正常のジストロフィンを持つようになりました。一方で、エクソン 44 の重複をもつ兄弟の筋肉を用いた実験では、2つあるエクソン 44 のうち片方だけを読み飛ばすことはできませんでした。しかしこの場合には2つのエクソン 44 に加えてエクソン 43 も飛ばしてしまえば読み枠のずれを解消することができます。さらに大きなエクソン 52-62 の重複にも挑戦しましたが、うまくいきませんでした。

エクソン 8-11 の重複をもつ患者さんの家族からの要望に応じて、**Annemieke** は治療の難しさを以下のように説明しました。「必要なのはエクソン 8-11 を認識する AO ですが、この AO はもともとのエクソンと、重複による余分のエクソンを見分けることができません。すると読み飛ばされるのはもともとのエクソン 8 のみの場合、重複したエクソン 8 のみの場合、それに両方のエクソン 8 がスキップされる場合と3通りの可能性があります。エクソン 9 についても同じことが言えます。そうすると、組み合わせによって読み枠のずれが生じたり生じなかったりとならばらになって、治療の効果が薄まってしまいます。AO の量を増やしても状況は変わりません。何とかうまく手はないかと試行錯誤していますが、欠失の場合と同じように単純にはいきません。大きな重複を持つ患者さんに、エクソンスキッピングが適切な治療法なのかどうか、またそうだとすればどういう場合に有効なのか、まだ分かっていないのです。」

点変異に対するエクソンスキッピング治療. 点変異というのは、遺伝子の1つまたは数個の文字が別のものに置き換わってしまう変異です。変異により1文字挿入されたり抜けたりするだけで、読み枠がずれてしまいます。あるいは、1文字入れ変わっただけで読み枠はずれなくても、そこにコードされるアミノ酸が変わってしまう場合もあります。その変化がジストロフィンタンパクの構造を変えるほどのものでなければ、何の症状も出ないこともあります。逆に**停止コドン**のような、その後のタンパク合成を止めてしまうコドンが生じるとデュシェンヌ型筋ジストロフィーが発症します。将来的には、このような停止コドンの生じるタイプはすでに臨床試験が始まっている PTC124 という新薬により治療が可能になるでしょう。もし停止コドンのできたエクソンが丸ごと抜け落ちて読み枠のずれを起こさない場所であれば、スキッピングで読み飛ばしてしまうこともできるでしょう。またそのエクソンのみ読み飛ばすと読み枠がずれてしまうのであれば、その前後のエクソンも一緒に読み飛ばして、枠がずれないようにしてや

ればよいのです（12）。

まれな変異に対するエクソンスキッピング。エクソンとイントロンの境目にあるスプライス部位といわれる部分の変異がある場合にも、エクソンスキッピングを応用することができます。例としてまた **Annemieke Aartsma-Rus** の話を引用します。アルゼンチン出身のトーマスという患者さんは、イントロン 46 のはじめにある塩基が A から T に変異したために比較的軽症のデュシェンヌ型筋ジストロフィーを発症しました。その理由を彼女はこう説明しています。

「この変異によって mRNA を作る時に自然のエクソンスキッピングが起こり、エクソン 46 が自動的に読み飛ばされているのでしょう。このスプライス部位は正常ではこのエクソンを活性化させる働きをしていますが、変異によって働きが強く抑制されてしまったのでしょう。この患者さんでは mRNA を調べればエクソン 46 のスキップが見つかるはずですが、しかしこれは仮説ですから、筋肉の mRNA を調べてみないことにはどの程度エクソン 46 が読み飛ばされているかはわかりません。完全なスキッピングではなくて部分的に翻訳されているのなら、トーマスはジストロフィンの量は少ないけれども症状が穏やかであることの説明がつきます。もし mRNA を調べてエクソン 46 が全く見当たらないなら、エクソン 46 の欠失が読み枠のずれを引き起こしているため、エクソン 45 を一緒に読み飛ばせば改善すると予想されます。」

私の息子にエクソンスキッピングは適応できますか？世界中のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さん、ご家族からこの質問が寄せられています。エクソンスキッピングは変異の種類により異なる治療法なので、まずはどのような変異を持っているのか調べる必要があります。MLPA 法(multiplex ligation-dependent probe amplification)という検査で、患児や母系のご家族のジストロフィン遺伝子の 79 個のエクソンの異常をスクリーニングすることができます。

知られている変異(欠失、重複、点変異など)が見つければ、ジストロフィン mRNA に含まれる 79 のエクソン、13990 塩基(文字)について調べることもできます。Leiden Muscular Dystrophy Pages というウェブサイトから、この塩基配列をダウンロードできます。

www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html

この配列を見ると、ある遺伝子異常が読み枠のずれを起こすかどうか、症状としてデュシェンヌ型になるのかベッカー型になるのかといった情報が得られます。

エクソンの端のほうの配列を見ることで、読み枠のずれを修正するためにどのエクソンを飛ばすのが適切か調べることもできます。この報告の最後のページに、エクソン 50 の欠失による読み枠のずれをエクソン 51 のスキッピングにより修正する場合の詳しい説明を載せています。同様にして、あなた方の息子さんにどのようなエクソンスキッピングが必要かを知ることができます。

ただこの作業を実行するには経験が必要です。Annemieke Aartsma-Rus は博士論文で、変異が分かったときにどのエクソンをスキップすればよいかという一覧表を作っており、ウェブサイトで見ることができます。

www.dmd.nl/gt

上記のサイトで“applicability”をクリックして下さい。10 個ほど抜粋します。

Deleted exons	Exon(s) to skip
40 – 43	44
43 – 45	46
43 – 50	51
43 – 52	53
44	43 or 45
44 – 50	43+51
46 – 47	45
46 – 52	45+53 or 53+54
48 – 50	51
51 – 53	50

興味深いことに、ジストロフィン遺伝子には「ホットスポット」と呼ばれる変異しやすい部分があります。変異の半分がエクソン 45 から 53 のいずれかの欠失で、20%がエクソン 2 から 20 に分布しているのです。

ご理解いただきたいのは、このリストはこの治療を行えば必ずデュシェンヌ型の重篤な症状がベッカー型筋ジストロフィーの軽度の症状に変わることを保証するものではないということです。ここで述べられているのは、理論的にこのような読み飛ばしをすれば読み枠のずれが修正されるはずだということだけのことです。前に述べたように「読み枠ルール」にはさまざまな例外があって、必ずしもこれらのエクソンを読み飛ばすだけでベッカー型のジストロフィンが作られるとは限らないのです。これについて **Terence Partridge(13)**と **Eric Hoffman(14)**が詳しく書いています。

すべての例外について、なぜ起こるのかまで解明されているわけではありません。例えば、欠失は必ずしもエクソンの内部で起こるとは限らず、大部分をエクソンとエクソンの間にあるイントロンが占める場合もあります。このような欠失の断端を見つけるには通常の遺伝子検査では不十分で、同じような欠失であっても切れ端は人により異なるかもしれません。イントロンは遺伝子の制御に重要な役割を果たしているため、イントロンの有無によって違った症状を引き起こすかもしれません。一方ジストロフィタンパクの中にも重要な部分とそうでない部分があります。いくつかの欠失はエクソンスキッピングで読み枠を修正しても、出来上がったタンパクにおいて構造上重要な部分が失われ、正常に機能しないかもしれません。

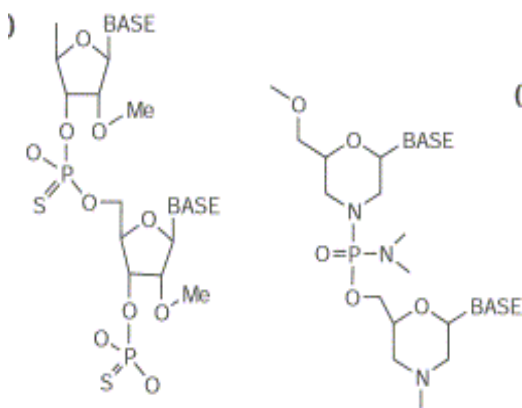
このように、エクソンスキッピングは筋ジストロフィーの症状を和らげるために有効である場合もありますが、一人ひとりの患者さんの治療においては何が起こるか分からないという面もあるのです。

エクソンスキッピングに用いられる様々な治療薬。 現在アンチセンスオリゴは AO と略されるのが一般的で、合成されたヌクレオチドであるモルフォリノなどを含む様々なアンチセンス化合物のことを指します。

動物実験や臨床試験では 2 種類の化学的に安定化された AO が用いられました。細胞内には核酸を壊す酵素があるため、AO にあらかじめ壊れにくくするための処理をしておく必要があるのです。

オランダの研究者らは **2'O-メチルフォスフォロチオエート** という物質を使いました。これはリボースの 2 つ目の CO にメチル基(炭素と 3 つの水素の結合したもの)が付いていて、P に結合する酸素のうち 1 つがイオウ (S) に置き換わった構造をしています。**モルフォリノ** は英国の研究者らが使ったもので、リンに結合する酸素原子の 1 つが 2 つのメチル基の付いた窒素 (N) から成るジメチルアミドに、リボース全体がモルフォリノリングという 4 つの炭素原子と酸素原子、窒素原子を 1 つずつ持つ構造に置き換わっています。化学式は下のようになります。(示してあるのは 2 塩基)

<2'O-メチル AO> <モルフォリノ AO>



オランダの治験に用いられた 2'O-メチル AO は **PRO051** と呼ばれ、下のような 20 の遺伝文字を表しています。

UCUUUACGGUAGAAGGAACU

英国の治験に用いられたモルフォリノは **AVI-4658** といって、下線で示したようにオランダの AO と同じ配列を含む 30 文字からできています。

GAUCUUUACGGUAGAAGGAACUACAACCUC

いずれの AO もエクソン 51 の内部にあるエクソン-スプライシング-エンハンサー配列 (ESE) とその周囲の配列に相補的に作られて、ここに結合するようになっています。この配列は正常なスプライシングに重要で、ここを AO によって阻害されるとこのエクソンは mRNA に転写されなくなり、読み飛ばされることとなります。

これらの AO の化学的な構造はかなり大きく複雑です。例えば 2'O-メチル PRO051 は 699 個の原子から、モルフォリノ AVI-4658 は 1000 個以上の原子からできています。このようにデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に用いられる薬剤は、いわゆる普通のお薬と化学的に異なっていて、製造するのも難しく、高価になってしまうのです。

最近オランダの研究者らはマウスのエクソン 23 のスキッピング実験で、2'O-メチルとモルフォリノの AO を比較検討しました (15)。その結果 mdx マウスの治療では、局所および全身投与において、2 種類の AO で効果に差があることが示されました。ただこの差は人間のエクソンに対する AO を hDMD というヒトのジストロフィン遺伝子を持つマウスに投与する場合にはほとんど目立たなくなります。ここから分かることは、あるエクソンの読み飛ばしにはモルフォリノのほうが効率がよく、別のエクソンの読み飛ばしには 2'O-メチルの方がよいということが起こりえるということです。いずれにせよこのことは動物実験からの類推にすぎず、13-15 ペ

ージでの Kate Bushby のインタビューでも詳しく述べられています。

科学者と知り合いになろう。ここで何人かの、エクソンスキッピングの研究者たちを紹介しましょう。Annemieke の写真をまずお見せします。彼女の仕事についてはすでにいくつか挙げましたが、彼女とは頻繁に e メールを交換していて、とてもよい研究仲間です。



2 種類の新しい AO. 現在デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に、これまで挙げた 2 種類の AO よりも有効かもしれない新しい AO が開発されています。1 つはペプチドと呼ばれる短いアミノ酸の鎖が後ろにつながったもので、もう 1 つはタンパクのような骨格を持っています。

ペプチド抱合型核酸によるエクソンスキッピング. モルフォリノ型 AO の問題点の 1 つに、心臓の筋肉には届きにくいということがありました。これを解決するために、オクスフォード大学の **Matthew Wood** らはオレゴン州の AVI BioPharma との共同研究で、mdx マウスのエクソン 23 のスキッピング実験において、モルフォリノ AO の末尾にペプチドと呼ばれる短いアミノ酸の鎖をつけたものを使用しました。

様々なペプチドの組み合わせを試した結果、このマウスのエクソン 23 に対する 25 塩基のモルフォリノ AO に対して 2 つのペプチドを付けたペプチド抱合型モルフォリノ AO が完成しました。mdx マウスはエクソン 23 の変異で停止コドンが出現し、タンパク合成をとめてしまうため筋肉にジストロフィンがありません。このエクソンを読み飛ばすことで、ジストロフィンの合成が再開されました。

ここで付加されたペプチドの 1 つは B-ペプチドといって AO が細胞膜を通過するのを助けるもので、もう 1 つは筋特異的ペプチド (MSP) といって AO が寄り道せず特に筋肉組織にたどり着きやすくするためのペプチドです。B ペプチドは 14 個、MSP は 7 個のアミノ酸でできています。興味のある方のために、筋ジストロフィーマウスに投与された薬剤の実際の構造を略号で示しておきましょう。

RXRRBRRXRRBRXB-ASSLNIA-
GGCCAAACCUCGGCUUACCUGASAU

これを週 1 回 6mg/kg、3 回全身投与された mdx マウスでは、骨格筋だけでなく心筋でも高いレベルのジストロフィンが出現し、筋肉細胞のジストロフィン関連タンパクによる複合体がよみがえり、血中の CK の値が正常化し、筋肉の機能も大幅に改善しました (16)。

この報告の完成する直前に、オクスフォードの **Kay Davies** の研究チームにいる **Auréli**

Goyenville から連絡がありました。ジストロフィン遺伝子のみならずユートロフィン遺伝子という別のタンパクの遺伝子にも異常をもつダブルノックアウトマウスがいて、これはデュシェンヌ型筋ジストロフィーのような症状を示すのですが、このマウスにペプチド抱合型モルフォリン AO を投与したところ、症状が大幅に改善したということです。

ペプチド核酸によるエクソンスキッピング。もう 1 つの新しい AO である、ペプチド核酸 (PNA) によるエクソンスキッピングも現在研究が進んでいます。DNA や RNA はリン酸と糖からなる骨格を持っていますが、PNA の骨格はペプチドでできています。これは水溶性で、化学的に安定ですが、簡単に変化させることができ、DNA や RNA の塩基を立体的に正しい配置で持たせることができるので、他の AO と同じように機能することができます。

Michael Gait らは英国ケンブリッジ大学で、mdx マウスのエクソン 23 に対する PNA を、イオウ原子を含むチオエーテル架橋によりペプチドと結合させました。25 単位の抗マウス 23PNA に対して最も効率のよい構造は、PNA-Internalization peptide(Pip2b)と命名された下記のようなものでした。

RAhxRRAhxRRAhxRIHILFQNdRRMKWHK β AlaC

この PNA-AO をわずか $5 \mu\text{g}$ 筋肉内投与するだけで、生後 8 週の mdx マウスにおいて注射された筋肉にたくさんのジストロフィンを持つ筋線維がみられるようになりました。AVI 社と共同して、全身投与に関する研究が進行中です (17)。

遺伝子組み込みによるエクソンスキッピング

第一段階：パリの Institut de Myologie の **Luis García** と **Aurélie Goyenville**(写真：現在はオクスフォード大学に所属) らは、エクソンスキッピング療法を遺伝子治療と組み合わせ、筋肉に AO を作る遺伝子を組み込んで自分自身で作らせることにより、何回も AO を注射しなくてよい方法を考えました。筋肉に AO を作らせるための遺伝情報をもった、**U7-snRNA** と命名された物質を注入するのです。U7-snRNA は細胞の核にある小さな RNA で、スプライシング因子と同じような構造をしています。

彼らは mdx マウスのエクソン 23 のスキッピングに必要な 2 つの AO に当たる配列の相補的 DNA を付け加えることによって U7-snRNA の遺伝子組換えを行いました。この短い snRNA は遺伝子から作ることができます。この組換え U7 遺伝子は、U7 SD23/BP22 および対照とともにアデノ関連ウイルス 2 型 (AAV) の DNA に組み込まれました。この輸送のためのベクターはまずマウスの筋肉に局所投与され、その後血管内投与



による全身投与が行われました。筋細胞では、入ってきた DNA は RNA に転写され、エクソンスキッピングを誘導し、その結果遺伝子の読み枠のずれが修正されてエクソン 23 を持たないジストロフィンタンパクが合成されました。このジストロフィンタンパクは治療を受けた筋線維の 80%で確認され、細胞内で正常のタンパクと同じ位置ではたらき、1 年以上有害な免疫反応も見られませんでした。

Mdx の筋肉で見られる過剰な筋肉の破壊と線維化の過程は停止しました。全身治療を受けた mdx マウスにトレッドミルなどで身体的な負荷をかけてみましたが、筋肉への障害は見られなくなっていました (19)。

U7 遺伝子組込みの技術は、次に臨床症状をもつゴールデンレトリバー GRMD 犬に応用されました。このイヌはエクソン 7 のスプライス部位に変異があり、エクソン 6 と 8 のスキッピングにより治療することができます。そこでエクソン 6、7、8 に対して相補的な配列を持った U-7 ベクターを筋肉に注射してから 2 ヶ月後に調べてみると、ほとんど正常と同じ量の短いジストロフィンが作られるようになっていました。駆血をして 1 本の足にだけ血管内投与をしたところ、6 ヶ月後にもまだたくさん新しいジストロフィンが作られていました。

第 2 段階: その後、**Aurélie Goyenvalle** はオクスフォードの **Kay Davies** の研究室でさらに新しい技術を生み出しました。この方法によると、エクソンスキッピングは新たな、そして「普遍的な」U7snRNA ベクターによって引き起こされるのです。この U7snRNA は、読み飛ばしたいエクソンに対応する塩基配列に加えて、heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1/A2(hnRNP)と呼ばれるタンパクに結合する部位を持っています。このタンパクは、エクソン断端のスプライセオソームの近くに来ると、特定のエクソンのスプライシングを邪魔する性質があつて、結果的に pre-mRNA を作る段階でそのエクソンを読み飛ばしてしまうのです。このようなエクソンスキッピングの方法は、これまでの AO によって引き起こされるのではなく、すべてのエクソンに対して共通する「普遍的な」タンパクによって起こるのです。

これまでの AO がエクソンスキッピングの種類ごとに 1 つ 1 つ承認を得るための長々とした手続きを経なければならなかったのに対し、この方法では相補的な DNA に加えてたった 1 つの「普遍的な」タンパクでさまざまなスキッピングをさせることが可能です。

エクソン 49 と 50 の欠失を持つ実際のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんから取られた筋芽細胞を用いたエクソン 51 のスキッピングの実験は既に成功しています。最も効果の高かったのは、A1(U7ex51-AON-A1)と命名されたタンパク結合部位をもつ U7snRNA でした。これにより筋芽細胞では正常とほぼ同量のジストロフィンタンパクが作られるようになりました。オランダの研究者らはヒトのジストロフィンをもつ組換え mdx マウスにこれを筋肉注射し、54%の確率でエクソンスキッピングが起こることを示しました。

この技術により、これまで読み飛ばすのが難しかったエクソンもスキップできるようになることが期待されます。ベクターを用いたこの方法は、2 個以上の U7snRNA を用いることで複数のエクソンスキッピングに可能性を開いてくれるかもしれません。

このような多機能 U7snRNA に関する論文が、最近 Molecular Therapy 誌に”Enhanced exon-skipping induced by U7snRNA carrying a splicing silencer sequence: promising tool for DMD therapy”という表題で発表されました。

オーダーメイド治療と規制

米国食品医薬局（**FDA**）、欧州医薬品庁（**EMA**）などの医薬品管理当局は、一般的な医薬品の承認には次のような手続きが必要としています。

まず、**非臨床試験**では、試験管内や動物実験で薬の安全性、薬効薬理、化学的組成などを評価します。

臨床試験(治験)第1相では 20～100 人の健康なボランティアにおいて、ヒトに対する安全性を評価します。

臨床試験第2相では 100～500 人の患者さんに投与して、最適な投与量、安全性、有効性を評価します。**臨床試験第3相**では 1000～5000 人の患者さんにおいて、長期投与での安全性や効果を確認します。

これら3つの治験にかかる費用は、1つの薬につき 5 億ドルともいわれており、新薬が開発されてから承認されるまでに 15 年もかかってしまうこともあります。

このような承認の手続きは、エクソンスキッピングのような患者さん一人ひとりに合わせた治療が生まれる前に制定されたものです。個人用に作られたデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬をこのような方法で承認するには多くの問題があります。

例えば、AO の毒性を評価するための第1相試験では、正常な人のジストロフィン遺伝子に読み枠のずれを起こすような薬品を投与することになり、患者さんには有益な作用であっても正常のボランティアにとっては危険な薬ということになってしまいます。このように、従来の意味での薬の毒性というものが、この治療には当てはまりません。もう1つの大きな問題は、**off-target** 効果といわれるもので、ジストロフィン以外の遺伝子でスキッピングが生じるかもしれないということです。

さらに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに特有の問題もあります。患者さんの筋肉は痛んでいて、その傷口から薬が細胞質、さらには核へと到達して効果を発揮します。そのため健常人では現れない副作用が、患者さんでは起こりうるかもしれません。このような理由で、通常の健常人ボランティアによる第1相試験があまり意味をなしません。

ワシントン DC の **Eric Hoffman** らは最近連邦防総省から 250 万ドルの研究費を与えられ、英国の臨床試験で用いられた AVI のエクソン 51 に対する AO の毒性についてマウスやサルを用いて調べています。

エクソンスキッピングの承認における別の問題点として、何億ドルもの費用と、治験にかかる歳月をどうするかということがあります。1つ1つの AO の配列は、ほんの少しの患者さんにしか使うことができません。多くの場合、治験に必要とされる人数の患者さんが存在しないのです。

もし現在進行中のエクソンスキッピングの治験が副作用をこの先も起こさないと確認されれば、当局は塩基配列の異なる同じ種類の AO を一括して承認してくれると期待されます。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんには、あまり残された時間がないのです。そのため多くの方は、長期投与により起こりうるかもしれない副作用のリスクを甘んじて受け入れる覚悟をしています。承認までの手続きを短縮することで、より多くの患者さんが手遅れになる前に、すべての筋肉が壊れてしまう前に、治療を受けるチャンスが生まれるのです。

この報告はワシントン DC の Children's Medical Center の Eric Hoffman による論文に基づいています (13)。

治験

さてついに、エクソン 51 のスキッピング治療についての 4 つの治験を紹介しましょう。2 つは局所治療で、あまり重要でない筋肉が用いられています。これではすべての筋肉の修復はできず、臨床的な効果を期待することはできません。他の 2 つは全身投与で、AO を血管内に投与しています。彼らには少し筋肉の機能的な改善が見られるかもしれません。

しかしこれら 4 つの研究の主な目的は、「安全かどうか」ということです。結局は、治療により期待通り寿命が延びたとすれば、その分長期投与が必要となるのです。

この薬の開発に欠かせないステップは、うまくいくかどうか分かりません。エクソン 51 のスキッピングの対象となる患者さんをたくさん集めることが重要ですが、多くの患者さんや家族にとっては、わざわざ治験センターに出向くほどの価値があると思われなくてもいいかもしれません。22 ページのインタビューで、**Kate Bushby** がこれについて詳しく述べています。

オランダにおける局所でのエクソンスキッピング。初めてのヒトでのエクソンスキッピングは、2006 年 1 月から 2007 年 3 月にかけてオランダのライデン大学病院において、**Judith van Deutekom**、**Jan Verschuuren** および **Prosensa Therapeutics BV** 社のもとで行われました。この治験は原則を示すためにのみデザインされ、患者さんに治療効果をもたらすことまでは期待されていませんでした。前脛骨筋(すねの筋肉)にエクソン 51 に対する 2'O-メチル AO である PRO051 という薬剤が局所投与されました。



この化学的な修飾をうけた AO は、オランダの研究者らによる非臨床試験においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋線維の培養細胞のみならず、さまざまな変異をもつ mdx や hDMD といったマウスのモデルで局所あるいは全身投与され、効果を挙げていました。

4 名のオランダ人患者がこの治験に参加しました。年齢は 10 歳から 13 歳で、ジストロフィン遺伝子のエクソン 50、52、48-50、49-50 がそれぞれ欠失していました。治療は一人ずつ行われ、前の患者でよい結果が出た場合にのみ次の患者に進むという方法が取られました。すねの

1.5cm 程度の部分に局所麻酔をし、1 回に 0.8mg の PRO051 を生理食塩水で溶解したものが投与されました。

4 週間後、注射した場所の筋肉を生検し、mRNA とジストロフィンタンパクを調べました。ほとんどすべて、最高で 94% の筋線維に新しいジストロフィンタンパクができていて、その量はそれぞれ正常の 33%、35%、17%、25% でした。効果のあった筋肉は体のごく一部であったために、参加した患者さんの臨床症状の改善は得られませんでした。これは患者さんも家族も始めから了承していたことです。

この実験により初めて、エクソンスキッピングがマウスやイヌだけでなく、ヒトでも可能であることが示されました。さらに、もしこの治療ができるようになれば、なるべく多くの筋細胞が残されている状態、つまり診断直後から治療を開始すべきであることが推測されました。



Judith van Deutekom, PhD

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者に対する初めてのエクソンスキッピング治療は、2007 年 12 月 27 日の *New England Journal of Medicine* に Eric Hoffman の解説付きで掲載されました (18)。

初めての全身投与の治験。 2008 年 7 月から 2009 年 1 月の間に、Prosensa 社はゲーテブルグとルーベンで 5 歳から 15 歳の 12 名のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象に PRO051 皮下投与によるエクソン 51 のスキッピング治療を行いました。

マウスの実験では、皮下投与すると薬剤は全身に分布し、心臓や肺を含むすべての筋肉に行き渡るとされていました。投与をうけた 4 人は初回の投与に引き続いて週 1 回、4 回の投与を受けました。これは投与量を調べる試験で、0.5~10mg/kg/回の範囲が調べられました。この結果は 2009 年の夏にデータがそろそろ予定ですが、2009 年 3 月の時点では重篤な副作用の報告はありませんでした。

皮下投与の利点は、反復投与が必要になっても毎回医療機関を受診せずすむことです。

Prosensa Therapeutics BV 社は最初の 2 件の治験のために臨床で使える質のよいエクソン 51 の AO をグラム単位で手に入れました。エクソン 43、44、45、46、50、52 および 53 をスキップするための AO も用意されています。Prosensa 社の次の目標は、2009/2010 年に始まるエクソン 44 のスキッピングのための AO です。

Judith van Deutekom は、「これまでの治験の準備、進行、結果に我々は満足しています。とくに重篤な副作用が見られなくてよかった。この治験で得られた情報が第 2、3 相試験にうまくつながることを期待しています。」と話しています。

英国での局所投与試験。 2008 年の下半期に、英国では MDEX コンソーシウムによって、ロン

ドン帝国大学の **Francesco Muntoni** とニューキャッスルの **Kate Bushby** のもとでエクソンスキッピングの治験が行われました。MDEX コンソーシウムは保健省の支援する団体で、9つの研究団体と慈善団体である Muscular Dystrophy Campaign、 ActionDuchenne、 Duchenne Parents Support Group などから資金援助を受けています。

8種類のリノアミン AO が正常とデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者およびヒトジストロフィン組換えマウスの筋肉の培養細胞に投与されました。その結果オーストラリアのパースの **Steve Wilton** とロンドンの **Dominic Wells** の作ったリノアミンである AO H51A が、最も長期の臨床的効果が期待できることが示されました。このリノアミン AO はオレゴン州ポートランドの AVI BioPharma 社で作られ、AVI-4658 と命名されています (20)。



12歳から18歳の7人のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者が治験に参加しました。始めの2人は0.09mgのリノアミン AO を0.9mlの生理食塩水に溶解し片足の短指伸筋に9箇所に分けて筋肉注射されました。反対の足の同じ部位には対照として生理食塩水が注射されました。他の5人はその10倍量である0.9mgのAOを同様にして投与されました。投与前と投与後30日目に筋生検を含む検査を行いました。

2009年1月のプレスリリースで、AVIはこの治療によるジストロフィンの産生は薬剤の投与量と相関する、つまりたくさん投与したほうが多くのジストロフィンが作られたと発表しました。重篤な副作用は見られませんでした。この結果は論文として投稿準備中です。

英国での初めての全身投与. この治験の予備試験として最も重要な動物実験は、mdx マウスの尻尾の静脈から週1回×7回のAO投与を行い、正常の50%の大きさのジストロフィンがつけられたというものでした。このジストロフィンは14週間以上保たれていることが分かっています (21)。

英国で3つの監督機関である MHRA、GTAC、GOSH から2008年8月から11月にかけて許可が下りて、2009年初頭に2人の患者さんが AVI-4658AO の静脈内投与を受けました。全体で16人の、まだ自立歩行のできる、エクソン51のスキッピング治療の適応があるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんが4人×4組に振り分けられ、毎週1回の注射を12週間受ける予定です。治療は順番に行われ、前の患者で何か起これば次からの患者への投与はすぐに中止されます。うまくいけば、2009年の後半にすべての患者の治療が終了する予定です。

この治験も投与量を変化させる試験で、始めの患者は0.5mg/kgと大変少ない量で、徐々に増やして最後の患者さんでは4.0mg/kgまで投与する予定です。30kgの10歳児であれば、治験終了までに1.44gのAOを投与されることになります。他の病気に対する臨床試験の結果から、AOは300mg/kg/日まで副作用をみることなく投与できることが分かっています。この試験の目

のは、薬剤の安全性と耐性を確認することと、筋肉の機能や強度を調べることです。最も少ない量で、副作用なく効果が上がることが期待されています。

AO が本当に到達しているかどうか、ジストロフィンが作られているかどうかといった判断のためには繰り返して筋生検を施行したいところですが、治験の後には 1 回しか施行することができません。生検には上腕二頭筋が用いられる予定です。

AVI BioPharma はこの治験のスポンサーで、**Francesco Muntoni** は英国の Medical Research Council から 130 万ドルの研究資金を得ています。

Kate Bushby へのインタビュー

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン 51 のスキッピング治療

このインタビューは 2009 年 3 月 21 日にキプロスで行われた Mediterranean Society of Myology の第 9 回学術集会の際に行いました。

質問：デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者に対するエクソン 51 のスキッピング治療が局所投与あるいは全身投与の形で行われています。オランダの Prosensa 社はライデン、ルーベン、ゲーテブルグで、アメリカの AVI BioPharma は先生が中心メンバーを務められている MDEX コンソーシウムと共同でロンドンやニューキャッスルで治験を行っています。フライブルグ小児病院の Rudolf Korinthenberg 教授は、ドイツ国内 10 施設で行われる次の重要な治験で、Prosensa または AVI に協力するつもりだと話しておられました。

Kate: Rudolf 教授らが中心となる TREAT-NMD ネットワークは、産業界の関心の高さに非常に満足しています。もし将来彼らのチームを通して研究が可能になれば素晴らしいと思います。

質問：企業が保健省などの公共性のある資金から独立することになると、のちに収益上の問題が生じることはありませんか？

Kate: 新薬の開発に製薬企業と公的資金団体が協力することはよくあります。これにより迅速な開発が可能になるのです。



Professor Kate Bushby, MD.

質問：私は上司である Horst Köhler の報告書を作成したことでドイツの功労賞を頂いたので、国内の政府高官と話をする立場にあります。彼らに 100 人のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療には 200 万ユーロが必要になると説明しましたが、正攻法では必要な援助を受けるのに何年もかかってしまいそうです。

Kate:そうですね、公的資金を得るのは時間がかかりますし、製薬会社のほうも共同研究をするに当たって公的な資金援助を前提とすることがあります。ご存知のようにエクソスキッピングは主に **Prosensa** と **AVI** が実施しています。彼らは技術開発をしていますし、現行の治験にも協力すると決めています。この協力関係から、将来の治験への展望が拓けることを期待しています。

質問： **AVI** のプレスリリースで、先生がたの局所療法の治験が終了し、結果も出ていると読みましたが。

Kate:原稿はできています。現在投稿中ですので、もうすぐ出版されるでしょう。

質問：結果はよかったですよね？2007年の **New England Journal of Medicine** に掲載されたオランダの報告よりもよい結果でしたか？

Kate:ええ、結果はこの治療法を支持するものでした。方法の違いがあるのでオランダの報告と比較するのは難しいのですが。例えば私たちは治療前後で同じ短指伸筋から生検をしました。片足にはアンチセンスの薬を、反対の足には生理食塩水を注射することで、対照をつくりました。背景のジストロフィンタンパクの量を知るために対照を設定するのは非常に重要です。治療後に見られるジストロフィンが対照より多いということをはっきりさせなくてはなりませんから。低濃度では結果は思わしくありませんでしたが、10倍量ではかなりよい結果が得られました。筋線維の中にかなりの量のジストロフィンが検出されたのです。

質問：次の治験は全身投与ですが、もう始まっていますね。昨年11月にロンドンで開かれた **ActionDuchenne** の集会での **Francesco Muntoni** の発言から、8月ごろには結果がでるのではとの印象を持ったのですが、今の時点で何かいえることはありますか？

Kate:治験終了は8月より後になりますが、今年中に結果が出ればと思っています。今までに2人が注射を受けています。なので何かを結論するにはまだ時間が必要ですね。

質問：全ての筋肉で薬が効いていることを示すために生検を繰り返すのですか？

Kate:いいえ、それは無理です。評価は二頭筋の1回の生検のみで行います。これを治療前と比較するのです。

質問：筋肉の機能の向上は期待できそうですか？

Kate:分かりません。ただ治療により筋肉が障害を受けていないかどうかを確かめるために、機能と強度に関する検査を行います。でもこれは効果判定のための治験ではないのです、12週間しか投与できないのですから。

質問：その後はどうなりますか、別の臨床試験を計画されているのですか？

Kate:はい、次はプラセボ(偽薬)を用いて効果判定をする対照試験になります。

質問：オランダのチームと共同して2種類の薬を同時に試験することはできませんか？

Kate:学問的には大変意味のある治験だと思いますが、製薬会社が同意しないでしょう。自社の治験を独立して終了させたいと考えているでしょうから。

質問：共同研究することでプラセボを投与される患者の数を減らすことができますか？

Kate:その可能性はありますが、研究のデザインによります。どちらの薬も完成して発売された後にその差が検討される可能性のほうが高いでしょうね。

質問：オランダのグループは2種類の薬の効果はほぼ同じだと発表しましたが。

Kate:試験管内やマウスの実験ではそうでしたが、ヒトではどうなるか分かりませんね。答えはまだないのです。いずれにせよ、どちらの薬にも可能性があるということによかったですね。

質問：オランダからは次のエクソンのリストが出ていますが、AVI はプレスリリースで次はエクソン 50 をやる、などとは言わないのですか？

Kate:そのようになると思います。患者さんのデータから、次にどのエクソンをスキップするべきかを検討しているとは話していました。

質問：ライデンの Annemieke Aartsma-Rus らがそのような仕事をしていますが？

Kate:私たちのリストは TREAT-NMD の国際的な記録に基づいているので少し内容が異なります。現在 TREAT-NMD のリストには 30 カ国から 8500 名以上の登録者がいます。すべての登録患者さんが治験に興味をもっていると思われ、基本的な診療情報も得ることができます。TREAT-NMD のウェブサイトから包括的な情報が得られるように今整備しています。

質問：次の治験にはまた認可が新たに必要ですか？

Kate:どんな治験にも認可は必要です。局所投与から全身投与までは非常にスムーズでした。新しい技術と新しい薬品のときは、初めての治験よりも早く認可されました。2回目の、全身投与のときのほうが簡単に済みました。

質問：次のステップにもうまく進めそうですか？

Kate:ええ、やりやすくなっているはずですよ。展望がなければそもそも初めから認可が下りなかったはずですよ。一直線に次の治験へと進んでいくことが重要です。この秋に TREAT-NMD が企画している会議で、アンチセンス治療に関する規制について EMEA と FDA と話し合う予定です。

質問：話し合いは行われているわけですね。手ごたえはどうですか？

Kate:説明はしていますが、どうなるかは何とも・・・彼らにも協力するつもりがあるのは確かです。

質問：承認を決定するのは誰なのですか？

Kate:非常に優秀な薬理学者や小児科医です。彼らは経験も豊富です。以前脊髄筋萎縮症について議論したときに知りました。

質問：AVI は米国での治験は考えなかったのですか？

Kate:米国での計画はあると思います。今まで米国の FDA は欧州 EMEA よりもこの問題に関して否定的だったので。

質問：それで2つの治験を英国で行っているのですね。

Kate:それも理由の1つです。

質問：次の治験では、英国以外の患者も参加できますか？

Kate:現在の治験では、毎週注射に来院しなければならないので国外からの参加は難しいと思

ます。血液検査も多いですし、家族は施設の近くに住まなくてはなりません。効果判定試験まで進めば、国外に複数の拠点を作ったほうがいいかもしれません。拠点として TREAT-NMD はいくつかの候補を挙げています。PTC の治験で、治験に参加するにはややこしいことがたくさんあることが分かりました。家族はそのために住居を移すなど、生活が停止してしまうような大仕事なのです。彼らにとっても参加するのは容易なことではありません。

質問：私のもとには世界中から要望が届いています。シベリアやアルゼンチンからも治験にいられて欲しいと。

Kate:想像はつきます。しかし治験はあくまで治験だということも理解してもらわねばなりません。効果判定の試験では、偽薬を投与されるかもしれないのです。何の役にも立たないかもしれないし、予期されない副作用が出現するかもしれません。治験というのは本当に大変な仕事なのです。

質問：私は必ず、治験に参加しても直接お子さんの利益にはならないかもしれませんという説明をします。それでも私と連絡を取っている方たちには、レポートを届けるようにしています。私の英語、ドイツ語よびスペイン語のメーリングリストには、1000 以上のアドレスが登録されていて、なにか有益な情報があればいち早く伝わるようにしています。

Kate:治験に参加している人には、多大な負担を強いていると言った方がいいかもしれません。かれらの犠牲があつてこそ、承認された薬の恩恵を他の人たちが受けることができるのです。参加を頂いている患者さんやご家族には本当に感謝しています。治療が進歩することを心から願っています。

質問：エクソン 51 のスキッピングを起こす治療薬はいつごろ完成すると思われますか？昨年 7 月にフィラデルフィアで Gerard Platenburg に同じ質問をしたときには、4 年くらいかなと言っていました。

Kate:そのくらいでしょうね。ただの憶測ですが。

質問：すべてのエクソンがスキップできるようになれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの 83%を治療することができます。しかしユートロフィンの活性化など他の治療法の可能性もありますし、それらをエクソンスキッピングと組み合わせることもありえますね。

Kate:そのような組み合わせは治療効果を増幅させると思います。標的となる患者の数が少ないエクソンのスキッピングに用いられる薬に関しては、もし一般企業ができないのであれば至適

な研究者や財団が協力してくれるかもしれません。

質問：モルフォリノは2'O-メチルよりも高価ですよね？

Kate:どちらも高価です。Genzyme社はまれな神経筋疾患であるポンペ病の治療薬を年間何千ドルという価格で販売しています。エクソスキッピングも同じように高価な治療になるかどうか、それは分かりません。もし全身投与ですばらしい結果が出れば、個人の研究者なども参加してくれるかもしれません。でもそれほどでもなければ、あまり期待できません。PTC124は違います、これは小さな分子で、製造する側は作りたがるでしょう。

質問：PTC124はたった15%の患者にしか適応がありませんが、本当に効いているのですか？

Kate:わかりません。治験が終わるのを待つしかありません。

質問：ベッカー型の患者さんとお話することもあります。彼らはデュシェンヌ型の患者さんからみれば目標とする状態ですが、薬物療法で彼らを助けることもできるかもしれませんか？

Kate:それはそうですね。彼らだって症状の改善を望んでいるのですから。

質問：ありがとうございました。このインタビューの読者であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんに締めくくりの言葉をいただけますか？

Kate:今まで長い間、進行中の治験があるというお話をあなた方にできる日を心待ちにしていました。この疾患に関して、新しい時代が拓かれようとしています。

さいごに

世界中の友人へ：始めに申し上げたように、この報告および以前に書いた報告は、患者さんやご家族にこの病気の進行を止めるためにどのようなことが行われているのかをよりよく理解していただくためのものです。なるべく平易に書いたつもりですが、ご理解いただけただけでしょうか。病気のことを理解しようとして、すでに基本的な知識をお持ちの方も多いでしょう。もし分かりにくいことがあれば、医学や生物学の専門家に尋ねる事ができる方もいらっしゃるでしょう。そうでなければ、私に英語、フランス語、ドイツ語、スペイン語、イタリア語のいずれかでeメールを下されば、お返事いたします。

科学研究。 この報告を最後までお読みいただければ、治療を見つけるために研究者たちができる限りのことをできる限り迅速に進めていることをお分かりいただけるでしょう。1986/1987

年にジストロフィンタンパクとその遺伝子が発見された時には、私たちはすぐにでも治療が可能になるだろうと期待したものでした。しかし 20 年以上経った今でも、病気の進行を遅らせる方法すら開発途中です。この病気のみならず、のう胞性線維症やガンといったほかの遺伝子による病気の治療も、当初予想されていたよりも難しいことが分かってきています。実際のところ、私たちのデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、あまりまれでない遺伝性疾患としては遺伝子治療が可能になる初めての病気となるかもしれないのです。

かつて Annemieke Aartsma-Rus と話した際に、彼女は「デュシェンヌ型筋ジストロフィーは私たちが治療法を見つける手助けをしてくれる」と話していました。そこで私は彼女の言葉をこの病気に関わる人たちに届けますと言いました。すると彼女は、これは Gert-Jan van Ommen の引用だと明かしてくれたのです。Ommen は「この病気は治されたがっている」と言ったのだということです。そのような現象は実際あるのです、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの筋細胞は傷ついて穴だらけで、治療薬である AO が容易に目的の場所にたどり着けるようになっています。正常の筋肉にこの薬剤を作用させるのは、もっと難しかったです。

遺伝子診断. これまでにお読みいただいたように、エクソンスキッピングは変異ごとに異なる治療法です。患者さんが治療の恩恵を受けるには、まず正確にどのような変異があるのかを調べなくてはなりません。MLPA 法は欠失の場所を調べる手段として患者さんのみならず、女性の保因者診断にも広く用いられています。ある家系の患者さんがこれまでに知られていない変異を持っていたり、調べることができなくても、患者さんのお母さんや親戚の女性に MLPA 法を行うことで遺伝子の欠失を見つけることができます。これは遺伝カウンセリングや出生前診断に有用なことです。保因者である可能性のある女性が検査を受けて保因者でないことが確認できれば、出産のときに余計な不安を持たなくて済みます。

登録. デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんは、居住する国のデータバンクに医療情報を登録していただくと、国際的なネットワークを通じて TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry)やDuchenne Connect (www.duchenneconnect.org)と連携することができます。これらを通じてまれな遺伝子変異に対する治療の治験参加者を募ったり、治療や研究に関する最新の情報を提供することができます。

奇跡の治療薬には気をつけて. 長期的に見て安全で効果のある治療法は、厳密な科学的手法によってのみ開発されます。インターネットで、何十万円もするような高価な「奇跡の治療法」が多く提供されていますが、お子さんのために購入される前に必ずその奇跡を起こした方に確認してください。何人のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんが実際にその治療でよくなったのか、彼らはどのような方法で何と診断されていたのか、治療後どのくらいの量のジストロフィンが増えたのか、筋肉の機能はどれほど回復したのか、そしてどの専門誌にその治療法が掲載されたのか、といったようなことです。もし価値がありそうだと思われたら、なぜ他の

患者さんはその治療を受けていないのかをよく考えてみて下さい。金銭トラブルや薬品による副作用には、十分注意して下さい。

執筆活動についての評価. 私の書いてきたものに対して、ドイツ首相である **Horst Köhler** からわが国の勲章である功労賞が授与され、2月5日に我々の住むシュヴァルツヴァルトで **Gundolf Fleischer** 大臣によるすばらしい授賞式が行われました。この機会に120名あまりの出席者に対して、ドイツ国内のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんやご家族の置かれている環境や、オランダとドイツでエクソスキッピングに関する共同研究が企画されていることなどについて説明をしました。いまでは12名の政府高官とやり取りをされていて、首相とその妻である **Eva Luise Köhler** は稀有疾患についての仕事をしていますし、保健省の高官である **Ulla Schmidt** や **Annette Schavan** とも連絡があります。この臨床試験に必要な2百万ユーロを調達するのは簡単なことではありませんが交渉は続いていますし、5月16日にボーフムで行われる親の会では **Prosensa** の新社長である **Hans Schikan** と共同研究の詳細について打合わせをする予定です。



3月21日にはイタリアのGaetano-Conte-Academiy of Naplesから2009年の社会的研究に対する賞をいただきました。式はキプロスでのMediterranean Society of Myologyの学術集会で行われるので、ここではエクソン51のスキッピングについて私が患者さんにどのような説明を行っているかについて講演しました。このスライドは私のウェブサイトから見られるようにしています。www.duchenne-information.eu ダウンロードすることもできます。スライドは詳しく、動画も多いのでぜひご覧下さい。

イラストを入れたこと. 今回初めて本文中にイラストを入れました。私たちのデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に尽力されている **Annemieke**、**Aurélie**、**Judith**、**Kate** らはみな女性で、この世界には女性の研究者が多いようです。彼女らを身近に感じていただけるように顔写真を掲載しました。

ここで、3人の子供と写っているととても特別な女性の写真をお見せしましょう。彼女は **Pat Furlong**、米国 Parent Project Muscular Dystrophy (PPMD) の会長で、フィラデルフィアでのミーティングの際に取った写真です。彼女のことをよくご存知の方もいらっしゃるでしょうが、彼女はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの研究を推し進めるために多大な努力をされています。ここに大きな感謝を捧げます。



最後に、最も難しいこの質問に対する私なりの考えをお話します。

どうしてうちの子がこんな病気になってしまったのですか？私のところにはこの切実な質問が世界中から寄せられます。私はこの答えを専門に学んだわけではありませんが、何とかお答えしようと努力しています。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエイズのような新しい病気ではありません。ヒトだけでなくマウス、ラット、ネコ、イヌ、ウマなど他の動物にもみられ、恐らくすべての筋肉をもつ動物に起こりえるのでしょう。ですから私たち人間が祖先から分かれるより以前から、この病気はあったはずで、これは進化の途中で起きた事故です。変異、すなわちランダムな遺伝子の変化がなければ、私たちは動物の祖先からヒトへと進化することもなかったのです。進化の役に立つ「有益な」変異もありますが、多くは病気や死につながる「有害な」変異なのです。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの変異は、病気にかかったあなたや、その遺伝子をあなたに受け渡したかもしれないお母さんに対する罰なんかではありません。変異というのは細胞が分裂する際に、ちょっとした間違いでたまたま起こるものなのです。あなたがたには何の責任もないのです。

ここは宗教的な話をする場ではありませんが、一言だけ加えさせて下さい。自然は誰かを意図して傷つけようなどとは思っていません。自然が気まぐれに生み出した変異は多くの有益な進化をもたらし、この世でいちばん複雑な、人間の脳を発達させました。その結果、この脳がデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療を生み出す能力を持つことになったのです。この報告は、そのことをあなたに伝えるために書いたのです！

ドイツの黒い森から

Gunter Scheuerbrandt, PhD

ウェブサイト：www.duchenne-information.eu

日本語訳：神戸大学医学部大学院医学研究科小児科

山内裕美子

日本語監訳：神戸大学医学部大学院医学研究科小児科

松尾雅文

参考文献

- (1) Pomeranz-Krummel DA, Oubridge C, Leung AKW, Li J, Nagai K. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* 2009; 458; 475-480), Query CC. Spliceosome subunit revealed. *Nature* 2009; 458; 418-419.
- (2) Neri M, Torelli S, Brown S, Ugo I, Sabatelli P, Merlini L, Spitali P, Rimessi P, Gualandi F, Sewry C, Ferlini A, Muntoni F. Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromusc. Disorders* 2007; 17: 913-8.
- (3) van Ommen GJ, van Deutekom JT, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10; 140-149.
- (4) Wilton SD, Fall AM, Harding PL, McClorey G, Coleman C, Fletcher S. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. *Molecular Therapy* 2007; 15; 1288-96.
- (5) Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, Jadoon A, Bou-Gharios G, Partridge T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102; 198-203.
- (6) Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, Fokkema IF, van Ommen G-JB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that conform the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 2006; 135-144.
- (7) Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen G-J, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations; *Human Mutation* 2009; 30; 293-299.
- (8) Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202.
- (9) Van Vliet L, de Winter C, van Deutekom JCT, van Ommen G-JB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2008; 9; 105
- (10) Yakota T, Lu Q, Partridge, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, and Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of Neurology* 2009; 65; published online DOI: 10.1002/ana.21627.
- (11) Aartsma-Rus A, Janson AAM, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2007; 8; 43.
- (12) Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447; 87-91. Comment: Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense. *Nature* 2007; 447, 42-43.

(13) Yakota T, Takeda S, Lu Q-L, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman, EP. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology, exon skipping brakes new ground. Archives of Neurology, 2009; 66; 32-38.

(14) Yokota T, Duffy W, Partridge T. Optimizing exon skipping therapies for DMD. Acta Myologica 2007; 26; 179-184.

(15) Heemskerk HA, de Winter CL, de Kimpe SJ, van Kuik-Romeijn P, Heuvelmans N, Platenburg GJ, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT, Aartsma-Rus, A. *In vivo* comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy skipping. J. of Gene Medicine 2009; 11; 257-266.

(16) Yin H, Moulton HM, Scow Y, Boyd C, Boutilier J, Iverson P, Wood MJA. Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restores systemic muscle and cardiac dystrophin

expression and function. Human Molecular Genetics 2008; 17; 3909-3918.

(17) Ivanova GD, Arzumanov A, Abes R, Yin H, Wood MJA, Lebleu B, Gait MJ. Improved cell-penetrating peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle. Nucleic Acid Research 2008; 20; 6318-6428.

(18) Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. N Engl J Med 2007; 357; 2677-86. Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. N Engl J Med 2007; 357; 2719-22.

(19) Goyenvalle A, Vulin A, Fougereousse F, Leturcq F, Kaplan J-C, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 2004; 306; 1796-99.

私たちのポスターチャイルド

5歳のクリスチアンは、1985年、4歳のときにCK値によるスクリーニングテストでデュシェンヌ型筋ジストロフィーと診断されました。

世界には彼と同じ病気をもつ男の子が約50万人もいます。私たちの仕事を彼らに捧げます。



エクソン 51 スキッピングの詳細

オランダでの局所治療の治験では、エクソン 51 のスキッピングが行われました。ここではエクソン 50 の欠失した患者さんで、エクソン 51 のスキッピングによりどのように読み枠が保たれるのかを詳しく説明します。

エクソン 49 の終わりから、エクソン 52 のはじまりの部分にかけて、正常のジストロフィン遺伝子の配列を示します。エクソン 50 には 29 個、51 には 52 個の三つ組みコドンが含まれていますが一部省略しています。三つ組みのコドンの下に、それぞれが意味するアミノ酸の略号を示します。(実際のアミノ酸はリボソームで作られ、RNA コドンにくっついているわけではありません)コドンは句読点なく並んでいるのですが、ハイフン (-) は読み枠、縦の棒はエクソンの区切りを分かりやすくするために示しています。隠れた停止コドンとなる UGA を赤で示します。エクソン 50 は最後の三つ組みコドンの始めの塩基のあとで終わっていて、エクソン 51 の始めにある青色で示した CU とつながって UCU となります。

```

End Exon 49 | Start Exon 50
--CAG-CCA-GUG-AAG | AGG-AAG-UUA-GAA---AUU-GGA-GCC-U | CU-CCU-ACU-CAG-ACU-
  Gln pro val lys | arg lys leu glu   ile gly ala ser |   pro thr gln thr

      隠れた停止コドン
--GUU-ACU-CUG-UG-ACA-CAA---AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---
  Val thr leu val  thr gln   lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu

End Exon 51 | Start Exon 52
---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
  met ile ile lys  gln  lys | ala thr  met gln asp leu
```

エクソン 50 が遺伝子または mRNA から欠失すると、エクソン 49 のあとにすぐエクソン 51 が始まります。このためエクソン 51 の読み枠は 1 塩基分右にずれます。そうすると 8 個のまちがったアミノ酸につづいて先ほど赤で示した停止コドンが現れ、ジストロフィンの合成が途中で停止します。作りかけのジストロフィンは破壊されて、デュシェンヌ型筋ジストロフィーが発症します。

```

End Exon 49 | Start Exon 51
---CAG-CCA-GUG-AAG | CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA-
  gln pro val lys | leu leu leu arg leu leu

      停止コドン
      アンチセンスオリゴヌクレオチド
UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU
-CUC-UGG-UGA-CAC AAG---AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
  leu trp STOP!

End Exon 51 | Start Exon 52
---AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G | GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU---
```

エクソンスキッピングに用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドである AON PRO051 を青で示します。これがワトソン-クリックの塩基の組み合わせに従ってエクソン 51 の 20 塩基

と結合すると、変異した mRNA、つまりこの場合エクソン 50 を含まない mRNA においてエクソン 51 を読み飛ばすようになります。

もし、欠失したエクソン 50 に加えて、スキッピングによりエクソン 51 も飛ばすことができると、エクソン 52 がエクソン 49 に続くこととなります。この場合読み枠は移動せず、3 つ組みコドンが保たれます。

End Exon 49 | Start Exon 52
---CAG-CCA-GUG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
gln pro val lys | ala thr met gln asp leu

この場合停止コドンは出現しませんが、エクソン 50 とエクソン 51 にコードされていた 77 のアミノ酸がもとのタンパクから抜け落ちる形になります。そのため不完全なジストロフィンが合成され、重症のデュシェンヌ型ではなくベッカー型筋ジストロフィーのような症状を来たします。