

<シンポジウム 5—2> 難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ

モルフォリノをもちいた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療

武田 伸一

(臨床神経, 49 : 856—858, 2009)

Key words : Duchenne型筋ジストロフィー, ジストロフィン, エクソン・スキッピング, 筋ジストロフィー犬

はじめに

筋ジストロフィーは「骨格筋の変性, 壊死を主病変とし, 臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患である」と定義される. 筋ジストロフィーの原因遺伝子の多くは筋細胞膜のタンパク質, 中でもジストロフィン・糖タンパク質複合体 (dystrophin-glycoprotein complex ; DGC) の構成分子をコードしており, この複合体が骨格筋膜の安定性に重要である事を示唆する. デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はこの DGC の中心分子であるジストロフィンが欠損することで発症し, ジストロフィンの欠損が不完全なばあいはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) の表現型をとる. DMD は, X-染色体連鎖性遺伝形式をとり, 筋ジストロフィーの中でもっとも頻度が高く, 新生男児 3,500 人に 1 人の割合で発症する. 2~5 歳時に歩行異常で気付かれ, 進行性の筋力低下のため 11 歳前後に独立歩行が不可能になり, 以後呼吸不全や心不全で死亡にいたる. 最近, 呼吸管理の進歩により, 約 10 年間寿命が延長しているが, 有効とみとめられている治療はステロイドと脊椎変形に対する対症的手術治療, 呼吸補助のみであり, 未だ筋変性・壊死を阻止する決定的な治療法はない.

Anti-sense oligonucleotides (AOs) による エクソン・スキッピング

人工的に合成された短い核酸化合物である AOs をもちいておこなわれるエクソン・スキッピング誘導療法では, pre mRNA から mRNA へのスプライシング過程で, 遺伝子変異を持つ, あるいはその近傍のエクソンを人為的にスキップさせて, アウト・オブ・フレーム変異をイン・フレーム変異に変換することを企図する. 誘導されるジストロフィンは, 正常なジストロフィンのタンパク質構造を一部欠くことになるが, actin 結合ドメインや cysteine-rich-domain などの重要なドメインは保存される.

現在, 筋ジストロフィーのモデル動物をもちいた in vitro および in vivo での研究や臨床治験に使用されている代表的な AOs には, 2'-O-methyl phosphorothioate antisense oligori-

bonucleotide (2OMeAO), phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO あるいはモルフォリノ) がある. とくに, モルフォリノは, スクレアーゼなど生体内の酵素により分解を受けずに, 免疫応答を誘導しないモルフォリノ環構造を持つ核酸類似人工化合物である. しかも, 塩基間の分子距離を維持するように設計されており, 標的 pre mRNA に対し非常に強い配列特異的結合を可能にしている一方, 電荷を持たないため, 細胞膜の通過性が低い点が課題として指摘されていた.

モデル動物であるジストロフィン欠損の mdx マウスに対し週 1 回, 3 週間にわたり尾静脈よりモルフォリノの全身投与をおこなった群において, 大部分の骨格筋で約 25% の筋線維がジストロフィン陽性になり, 7 週連続投与した群では, とくに大腿四頭筋や腓腹筋で 70% 以上の陽性線維がみとめられた. さらに筋張力の改善, 中心核線維数の減少, 血清クレアチン・キナーゼ (CK) 値が低下する一方, 毒性や副作用はみとめられなかった.

最近, 国立精神・神経センターでコロニーを確立した DMD のモデル動物である筋ジストロフィー犬, CXMD₁ に対してモルフォリノの筋肉内局所および全身投与がおこなわれた. 筋ジストロフィー犬は, ジストロフィン遺伝子のイントロン 6 のスプライス・サイトに点変異を持ち, エクソン 7 をスキップしてエクソン 8 にストップ・コドンを生ずるため, ジストロフィンを発現していない. そこで, アミノ酸の読み枠を修正するためにエクソン 6 および 8 を標的とした合計 3 種類の AOs をカクテルにして投与をおこなった (Fig. 1). モルフォリノ投与筋ジストロフィー犬では, 心筋を除く全身骨格筋においてジストロフィンの発現が広範に回復し, 血清 CK 値も軽減し, 病理組織学所見も改善した. また, モルフォリノ非投与の筋ジストロフィー犬と比較し, 投与筋ジストロフィー犬では骨格筋の MRI で, 筋の変性や壊死の改善が示唆され, 運動機能をはじめとする臨床症状の改善もみとめられた. 一方で, 血液検査や諸臓器の病理組織学上, 副作用の徴候はまったくみとめられず, モルフォリノおよび発現誘導されたジストロフィンに対する免疫反応は観察されなかった. 本研究により, 複数のエクソンを同時にスキップすることが可能になったことから, エクソン・スキッピングの対象となる DMD 患者さんが拡大し, 遺伝子欠失による DMD の約 80% に達したことが特筆さ

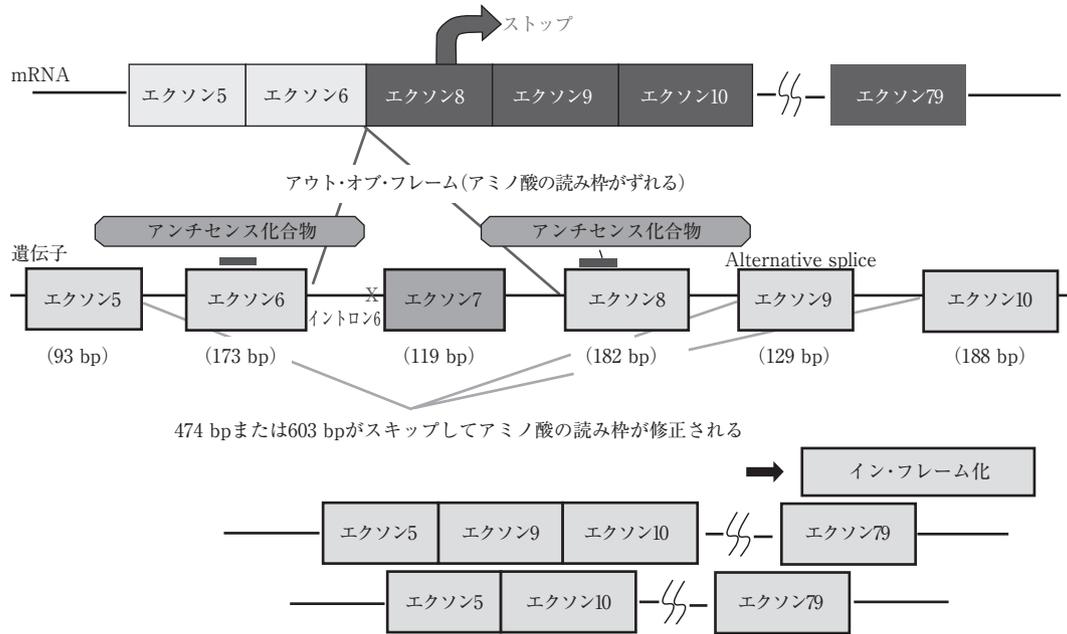


Fig. 1 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキッピングのストラテジー

れる。

エクソン・スキッピング治療の今後の見通しと問題点

現在、DMD 患者に対するエクソン・スキッピング治療研究として、オランダやイギリスで、エクソン 51 を標的とした 20MeAO やモルフォリノの全身投与が進められている。また、本邦では米国 Children's National Medical Center と共同で、DMD 患者に対する臨床治験を検討中であり、今後の研究結果が期待される。エクソン 51 をスキップさせることにより治療効果がえられると予想される患者の割合は、遺伝子欠失による DMD 患者の約 16% である。ただし、これまでの研究結果からエクソン・スキッピング治療を臨床応用するために解決しなければならない問題点も明らかとなった。

1つのエクソンを標的としたシングル・エクソン・スキッピングは、治療対象となる患者数にかぎりがあり、しかもそれぞれの遺伝子変異に応じた AOs が必要となる(テーラーメイド治療)。そのため複数の AOs を混合して広範囲のエクソンをスキップさせるマルチ・エクソン・スキッピング療法が期待されている。この手法は、シングル・エクソン・スキッピング療法よりも比較的多くの DMD 患者をカバーすることができる。たとえば、エクソン 45-55 の欠損患者のうち 94% が軽症の BMD と報告されていることから、DMD のホットスポット変異として知られているエクソン 45-55 の範囲内に大小の欠失を持つ DMD 患者に対してエクソン 45-55 をまとめてスキップする共通した治療が考えられる。

一方、これまで検討されてきた 20MeAO やモルフォリノ

では、心筋での効率性は低いことが指摘されている。近年、ペプチドの血清中や細胞内での安定性の増加、物質のエンドソームでのトラップの減少および核酸の細胞内への取り込みを増加させる目的で、モルフォリノに細胞膜透過性ペプチド (CPPs) であるアルギニン、6-アミノヘキサン酸、および/または β -アラニンを付加した peptide-linked PMO (PPMO) が開発された。

結 論

ジストロフィン欠損による DMD 患者に関しては呼吸不全、心不全対策の発展にともない寿命が延長しているものの、疾患の本態に根ざした治療はいまだ確立されておらず、治療法の開発が急務である。近年、欧米では DMD 患者に対する臨床治験が開始され、その動きが日本にもおよびようとしている。DMD に対する治療研究で開発された技術は、筋ジストロフィーの他の病型のみならず、多くの遺伝性神経・筋疾患にも応用が期待される。

文 献

- 1) van Deutekom JC, et al: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. N Engl J Med 2007; 357: 2677—2686
- 2) Yokota T, et al: Efficacy of systemic morpholino exon skipping in duchenne dystrophy dogs. Ann Neurol 2009; 65: 667—676

Abstract**Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy by using antisense Morpholino**

Shin'ichi Takeda, M.D., Ph.D.

Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience
Translational Medical Center, National Center of Neurology and Psychiatry

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by the lack of dystrophin protein at the sarcolemma. Exon skipping by antisense oligonucleotides is a novel method to restore the reading frame of the mutated *DMD* gene, and rescue dystrophin production. We recently reported that systemic delivery of Morpholino antisense oligonucleotides targeting exon 6 and 8 of the canine *DMD* gene, efficiently recovered functional dystrophin proteins at the sarcolemma of dystrophic dogs, and improved performance of affected dogs without serious side effects (Yokota et al., *Ann Neurol.* 65 (6): 667-676, 2009). To optimize therapeutic antisense Morpholinos for more frequent mutations of the *DMD* gene, we designed antisense Morpholinos targeting exon 51 of the mouse *DMD* gene, and injected them separately or in combination into the muscles of mdx52 mice, in which exon 52 has been deleted by a gene targeting technique (Araki et al., 1997). We also tried systemic delivery of antisense Morpholino to skip exon 51 in mdx52 mice. It is important to verify the effectiveness and side effects of antisense Morpholino in experimental animal models such as dystrophic dogs or mdx52 mice, before clinical trials in DMD patients.

(Clin Neurol, 49: 856—858, 2009)

Key words: Duchenne muscular dystrophy, Dystrophin, Exon skipping, Dystrophic dog
