

< Symposium 14-2 > 今開かれる筋ジストロフィー治療の扉

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ誘導療法

武田 伸一¹⁾

要旨：重篤な遺伝性筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対しては、アンチセンス・オリゴヌクレオチド（AON）をもちいたエクソン・スキップ治療の実用化が期待されている。われわれはこれまでモルフォリノ核酸をもちいて、マウスおよびイヌのDMDモデル、ならびに患者由来細胞における同手法のproof-of-concept studyを報告してきた。これらの成果をもとに国内製薬企業との共同研究を進め、DMD遺伝子のエクソン53スキップ治療薬の開発に着手し、2013年より同薬の医師主導治験を開始するにいたった。また福山型先天性筋ジストロフィーへの応用、AONの取り込み機構などについても研究を進め、AONの応用可能性を探索する試みについても取り組んでいる。

（臨床神経 2014;54:1071-1073）

Key words：デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ジストロフィン、エクソン・スキップ、アンチセンス・オリゴヌクレオチド

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy; DMD）はジストロフィン遺伝子（DMD 遺伝子）の異常によりジストロフィンが欠損する X 連鎖性の遺伝性筋疾患であり、進行性の筋線維変性・壊死により致死的な経過を辿る。現状では原因療法が存在せず、遺伝子治療や幹細胞移植治療が検討されてきたが、現在もっとも実用化に近いとされているのがアンチセンス・オリゴヌクレオチド（AON）をもちいたエクソン・スキップ治療である。

筋ジストロフィーモデル動物における
proof-of-concept study

DMD 遺伝子は 79 エクソンから成り、遺伝子変異がフレームシフトをきたすばあいはジストロフィンが欠損するが、インフレーションのばあいは構造の一部を欠くものの機能するジストロフィンが発現する。これはジストロフィンが省略可能なくりかえし構造を有するためである。そのため表現型は一般的にフレームシフトで重症、インフレーションで軽症となり、臨床的にはそれぞれがDMDおよび軽症型のBecker型筋ジストロフィーに相当する。そのためmRNAをインフレーションに誘導することが治療戦略となり、例としてエクソン52欠失に対しては、エクソン53（または51）も欠失させることでインフレーションとなる（Fig. 1）。これを実現するのがAONによるスプライシングへの介入であり、標的エクソンのpre-mRNAにあるexonic splicing enhancer領域に相補的なAONの存在下では、標的エクソンは前後のイントロンとともに切り出される。AONは核内移行性とヌクレアーゼ耐性を獲得するための

修飾が施されており、われわれはおもにphosphorodiamidate morpholino oligomer（PMO）をもちいた検討をおこなってきた。とくにエクソン51スキップはもっとも多くのDMD患者に適応となるが、われわれはエクソン52欠失モデルマウスmdx52をもちいることで、本手法の有効性をin vivoではじめて示した¹⁾。また中型動物での有効性、および複数エクソンを標的とするマルチエクソン・スキップについて、エクソン7欠失モデルイヌ（CXMD_I）においてその有効性を報告するとともに²⁾³⁾、エクソン7欠失DMD患者細胞でもイヌモデルと同じ手法でジストロフィンの回復を示し、動物モデルで有効なAONを直接ヒトへ応用できる可能性を示した⁴⁾。さらにマルチエクソン・スキップの可能性を追求し、適応症例の拡大と治療効果の向上が期待できるエクソン45-55スキップの有効性についても報告している⁵⁾。

エクソン53スキップ治療薬の開発

以上のような状況を背景に本手法の臨床応用への期待が高まったことから、先行してエクソン51スキップを誘導するAONの治験が欧米を中心に開始された。しかしDMD患者の変異形式は多様なため、最多となるエクソン51スキップ対象患者でも全体の13%程度であり、他の変異形式の患者に対しては別のエクソンを標的とする治療薬の開発が必要となる。そのためわれわれはエクソン51に次いで対象患者数が多いとされる、エクソン53を標的とした治療薬の開発に着手することとした。エクソン53スキップの対象患者は海外および日本国内で8~9%と試算されており、また当時、国内外のアカデミアおよび製薬企業において同エクソンを対象とした治療薬の開発は着手されていない状況であった。国立精神・神経

¹⁾ 国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナル・メディカルセンター〔〒187-8551 東京都小平市小川東町4-1-1〕
（受付日：2014年5月23日）

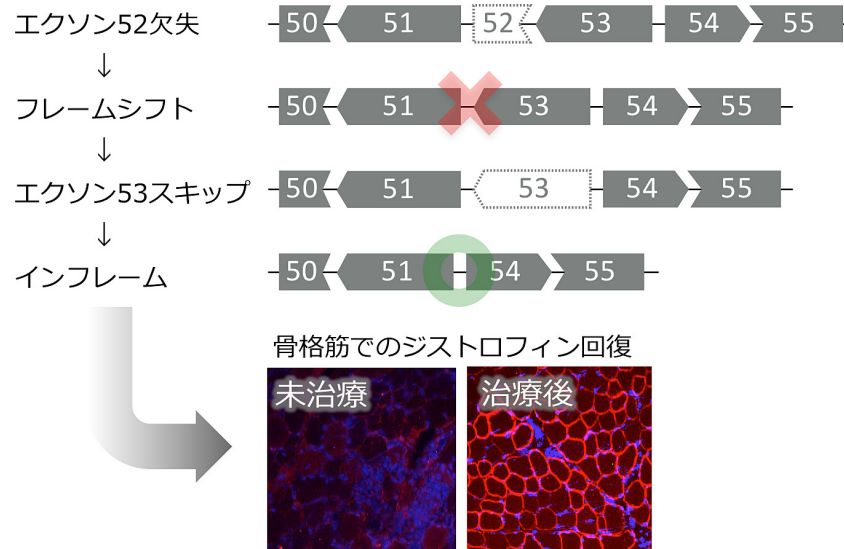


Fig. 1 DMDに対するエクソン 53 スキップの治療戦略.

エクソン 52 を欠失した DMD 遺伝子ではエクソン 51 とエクソン 53 が接続した mRNA が生成され、フレームシフトによりジストロフィンが発現しない。エクソン 53 を標的とするアンチセンス・オリゴヌクレオチドの存在下では、エクソン 53 が前後のイントロンとともに切りだされ（スキップされ）、エクソン 51 とエクソン 54 の接続によりインフレームに修正される。その結果構造の一部を欠くものの機能するジストロフィンが骨格筋に発現する。

医療研究センターは日本新薬株式会社と 2009 年よりエクソン・スキップに関する共同研究を開始しており、エクソン 53 スキップ治療薬の薬事承認に向けた開発について 2011 年に基本合意し、2013 年のファースト・イン・ヒューマン試験開始を目標とした。実際の開発過程においてはヒト細胞株をもちいて有効配列を探索後、患者細胞をもちいて当該配列によるエクソン 53 スキップとジストロフィン発現を確認した。並行して非臨床試験を実施し薬効・薬理、薬物動態、毒性について解析をおこない、医薬品医療機器総合機構との薬事戦略相談制度を活用して臨床試験プロトコルを確定させ、2013 年よりエクソン 53 スキップ治療薬 NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験を医師主導治験として開始した。

AON の応用可能性拡大に向けて

われわれは DMD 以外の遺伝性筋疾患に対しても AON の応用を可能とするための基盤的研究についても取り組んできており、その一例が福山型先天性筋ジストロフィー（Fukuyama congenital muscular dystrophy; FCMD）への応用である。FCMD の原因はフクチン遺伝子（FKTN）への SVA（Sine-VNTR-Alu）型レトロトランスポゾンの挿入変異であり、挿入された SVA レトロトランスポゾンは、最終エクソンに存在する潜在的スプライス供与部位を活性化させ、同配列内にあるスプライス受容部位との間でスプライシングを生じ、mRNA の末端部にはエクソン・トラッピングと呼ばれる SVA レトロトランスポゾン配列の付加が生じ異常フクチンが産生される。われわれ

と神戸大学戸田達史教授のグループは、マウスモデルおよび患者細胞において、潜在的スプライス供与部位および受容部位を標的とした AON を適用することで、SVA トランスポゾンの付加を抑制して正常フクチンの産生を誘導できたことを報告している⁶⁾。また DMD における PMO の筋線維への取り込み機構は、ジストロフィン欠損に起因する筋形質膜の透過性亢進に由来するとの仮説が提唱されていたが、このことは DMD 以外の筋疾患に PMO を応用する際、筋線維への取り込み効率を向上させるうえでの課題になると考えられていた。われわれは筋分化の過程にある幼弱な再生筋線維が PMO を取り込みやすいとの仮説を立て、カルジオトキシンによる同期的筋再生を誘導した正常マウスで検証したところ、ジストロフィン陽性であっても初期再生筋線維では効率的に PMO が取り込まれることをみいだした。そこで DMD 以外の遺伝性筋疾患への応用として、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーモデルマウスにエクソン・スキップを試みたところ、標的エクソンのスキップとメロシンの回復がみとめられ、筋再生が活発な病態に対し PMO をもちいた治療法が応用できる可能性が示唆された⁷⁾。

おわりに

本稿ではわれわれがおこなってきた DMD に対するエクソン・スキップ研究の進展について概説した。ジストロフィン遺伝子の発見以来 DMD に対する多くの治療法が提唱されてきたが、近年エクソン・スキップの臨床試験が多数開始され

るにいたり原因療法が現実のものとなってきた。長期的な有効性、安全性についてはこれからの評価を待つ必要があるものの今後の進展が期待される。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業・組織や団体受託研究・共同研究費：日本新薬株式会社

文 献

- 1) Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, et al. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther* 2010;18:1995-2005.
- 2) Yokota T, Lu QL, Partridge T, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 2009;65:667-676.
- 3) Yokota T, Nakamura A, Nagata T, et al. Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther* 2012;22:306-315.
- 4) Saito T, Nakamura A, Aoki Y, et al. Antisense PMO found in dystrophic dog model was effective in cells from exon 7-deleted DMD patient. *PLoS One* 2010;5:e12239.
- 5) Aoki Y, Yokota T, Nagata T, et al. Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:13763-13768.
- 6) Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, et al. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011;478:127-131.
- 7) Aoki Y, Nagata T, Yokota T, et al. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet* 2013;22:4914-4928.

Abstract

Exon Skipping Approach to Duchenne Muscular Dystrophy

Shin'ichi Takeda, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Translational Medical Center, National Center of Neurology and Psychiatry

Exon skipping therapy by antisense oligonucleotide is a promising approach to Duchenne muscular dystrophy (DMD). We have reported the proof-of-concept studies using morpholino on mice or dog DMD model and on patient derived cells. Based on these results, we had promoted collaborative research with a Japanese pharmaceutical company and encouraged development of DMD gene exon 53 skipping drug, then finally started an investigator-initiated clinical trial from 2013. Furthermore, we are addressing exploratory researches to expand the possibility of AON; such as, an application of AON to Fukuyama congenital muscular dystrophy, and an elucidation of AON uptake mechanism.

(*Clin Neurol* 2014;54:1071-1073)

Key words: Duchenne muscular dystrophy, dystrophin, exon skipping, antisense-oligonucleotides
