



Duchenne 型筋ジストロフィー症 における exon-skipping 療法

信州大学医学部小児医学講座

樋口 司

Duchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) は4歳頃に発症し, 進行性に筋力が低下して10代で自立歩行が不可能となり, 20代には呼吸不全または心不全で死に至るX連鎖劣性遺伝疾患である。原因はジストロフィン遺伝子の変異のために筋細胞内のジストロフィン蛋白が欠損していることによって, 筋細胞そのものが壊れていくことによる。常に機械的なストレスに曝されている筋細胞膜 (筋鞘膜と呼ばれる) は外側に基底膜, 内側にアクチン網を形成することで, 保護されている。ジストロフィン蛋白はN末にアクチン結合ドメインを, C末にジストログリカン結合ドメインをもって, N末で細胞内アクチンに結合し, C末ではジストログリカンを介して細胞膜および基底膜と連絡し (図1), 機械的なストレスからこれらを守る働きをしている。そのためジストロフィンの欠損しているDMDでは筋鞘膜が脆弱となるため機械的ストレスによって筋壊死を起こしやすくなる。

ジストロフィン遺伝子はヒトの遺伝子の中でも最大のものの一つであり, トータル14 kb, 79 exonがX染色体短腕のおよそ2.3 Mbの範囲に存在している。本症の3分の2の患者ではジストロフィン遺伝子の単数または複数の exonの欠損が認められる。近年開発されたMLPA法という exon欠失/重複を検出する検査法は本症の診断において最も有効であり, DMDは以前に比べて簡単に診断できるようになった。DMDの軽症型とされるのがBecker型筋ジストロフィー症 (BMD) であり, 同じジストロフィン遺伝子の異常によって生じるが, 寿命はほぼ平均なものと著明な違いがある。DMDではジストロフィン蛋白がほとんど発現されていないのに対し, BMDでは不完全ながらジストロフィン蛋白の発現を認める。またBMD患者の85%においてジストロフィン遺伝子にやはり exon単位の欠失を認める。多少の例外はあるものの, 両者の違いはジストロフィン遺伝子が non-sense 変異になるか, missense 変異になるかの違いであると言われている (in-flame 仮説)。つまり, BMDでは欠失した全 exonの合計塩基数が3の倍数のために (in-flame 変異: 図2 A), 欠失してもその exon以降のコードンの読み枠はずれないので翻訳は最後まで進み短縮型ジストロフィン蛋白が産生されることになる。

その結果アクチンと細胞膜を繋ぐというジストロフィン本来の働きは最低限果たせるため, 筋収縮が保たれ筋細胞の破壊も激烈ではない。これに対しDMDでは欠失した exonの合計塩基数が3の倍数でないために, ジストロフィン mRNAの途中で stop コドンが生じて (out of flame 変異: 図2 B), 蛋白のC末端 (ジストログリカン結合ドメイン) が形成されずアクチンと細胞膜とを繋ぐことができない。その結果, 筋鞘膜が脆弱となり最終的には筋細胞の破壊が生じる。

そこで, 最近ではアンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を筋細胞に導入して欠失している exonの隣接 exonを不活化することで, mRNAに含まれない exonの合計塩基数を3の倍数に調節 (DMDの out-of-flame 変異を in-flame に変換) して, 表現型をBMDにして治療しようとする試みがなされ, これを exon-skipping 療法と呼んでいる¹⁾。図2 Bでは exon3の欠失のために exon4に stop コドンが生じているが, 図2 CのようにAONを投与して exon4を不活化すると, 両 exonでの欠失塩基数は3の倍数となり, exon5以降は in-flame になる。欠失している exonが複数の場合でも最終的に欠失塩基数を3の倍数に調節しさえすれば in-flame にできる。これをジストロフィン遺伝子で行うことで, 3'末端まで stop コドンなしに翻訳されて短縮型ジストロフィンが産生されるので, 臨床的にはBMDとなって筋力のある程度保ったまま長期生存することが可能になる。

実際にAONをヒトに投与した報告では, 筋細胞内のジストロフィン蛋白が産生され, 筋力も回復することが確認されている。またAONの投与方法も検討されてきており, 筋注だけでなく phosphothioate AON や morpholino (phosphorodiamidate) AON などの開発によってウイルスベクターなどを用いない静脈内投与でも, 筋細胞内で十分に効力を発揮することが確かめられている²⁾³⁾。さらにDMD患者の exon欠失の約60%が集中しているとされる exon45-55の間

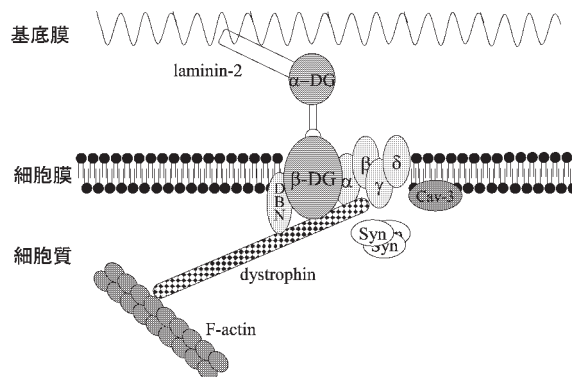


図1 ジストロフィンおよび関連蛋白の細胞内構造
(文献5より引用, 一部改変)

α -DG: α -dystroglycan, β -DG: β -dystroglycan, DBN: dystrobrevin, α : α -sarcoglycan, β : β -sarcoglycan, γ : γ -sarcoglycan, δ : δ -sarcoglycan, Cav-3: caveolin-3, Syn: syntrophin

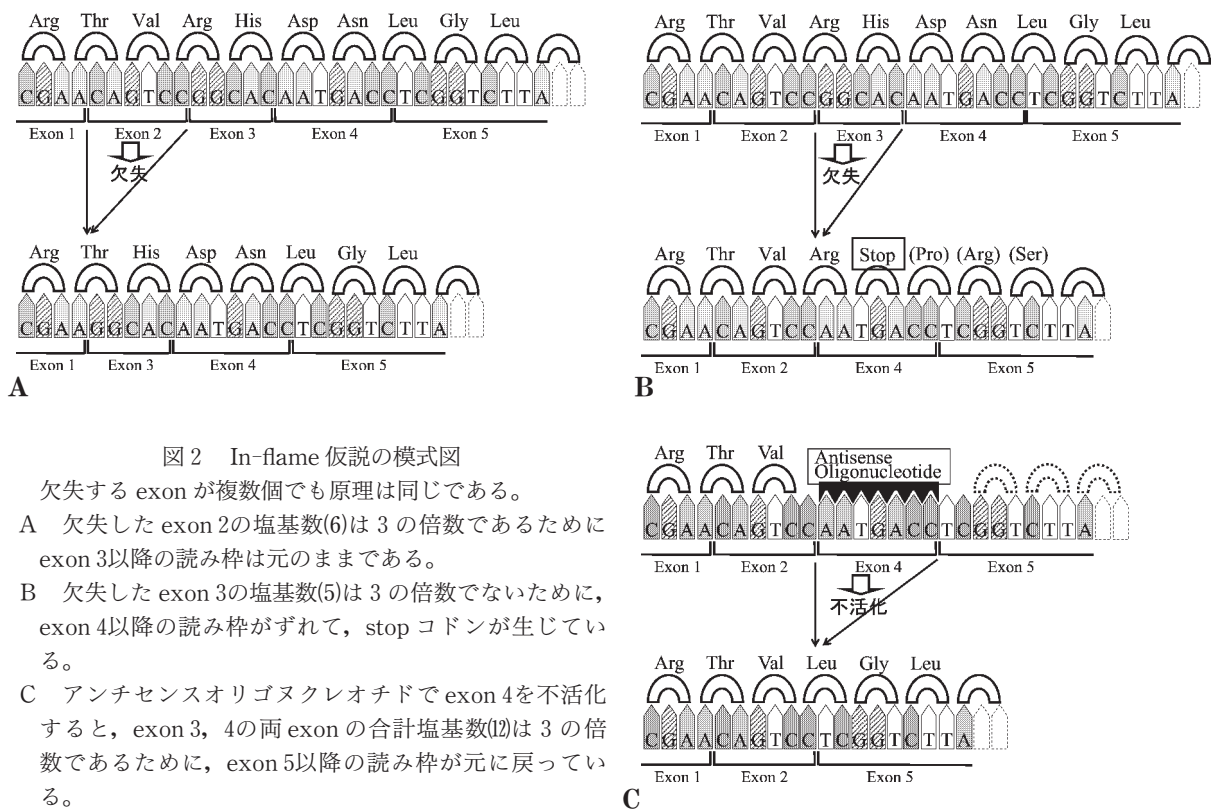


図2 In-frame 仮説の模式図

欠失する exon が複数個でも原理は同じである。

- A 欠失した exon 2 の塩基数(6)は 3 の倍数であるため、exon 3 以降の読み枠は元のままである。
- B 欠失した exon 3 の塩基数(5)は 3 の倍数でないために、exon 4 以降の読み枠がずれて、stop コドンが生じている。
- C アンチセンスオリゴヌクレオチドで exon 4 を不活化すると、exon 3, 4 の両 exon の合計塩基数(12)は 3 の倍数であるため、exon 5 以降の読み枠が元に戻っている。

では 2 種類の AON を使い分けるまたは同時投与することで、この間に生じる全ての exon 欠失に対応できるようなことも考えられている⁴⁾。

現在は exon 欠失に対応しての exon-skipping 療法が始められているが、上記のような好発部位以外の欠失では AON がオーダーメイドになるため、コストがかかると思われる。また DMD の約 3 分の 1 を占めると考えられる点変異症例でも同様に変異 exon と、もし変異 exon が in-frame でなければその隣接 exon をも標的とした exon-skipping を行えば短縮型ジストロフィンが産生できることになり、表現型を BMD に

することが可能である。ただしこの場合は点変異を見つけるために全 exon のシーケンスが必要となり、もちろん AON はオーダーメイドになるため、労力とコストがかかる難点がある。

従来はウイルスベクターなどを用いた遺伝子導入などが盛んに検討されていたが、ジストロフィンが巨大遺伝子という点で困難があった。今後症例を重ねて安全性や有効性、長期効果について検討していく必要があるが、exon-skipping 療法は治療法がなかった DMD において、画期的かつ有望な治療法であると言える。

文 献

- 1) van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooij AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhardt PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Eng J Med* 357: 2677-2686, 2007
- 2) Alter J, Lou F, Rabinowitz A, Yin H, Rosenfeld J, Wilton SD, Partridge TA, Lu QL: Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophin pathology. *Nat Med* 12: 175-177, 2006
- 3) Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, Sakaeda T, Saura R, Okumura K, Matsuo M: Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 59: 690-694, 2006
- 4) Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, Moizard M-P, Voelckel M-A, Calemard LM, Bouisseau P, Blayau M, Philippe C, Cossée M, Pagès M, Rivier F, Danos O, Garcia L, Claustres M: 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. *Hum Mutation* 28: 196-202, 2007
- 5) 沖永剛志: 肢帯型筋ジストロフィー. *小児内科* 35増刊号 小児疾患診療のための病態生理 2: 908-912, 2003