

核酸医薬開発における 筋ジストロフィーモデル犬

日本大学 生物資源科学部 獣医学科

越後谷 裕介

はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、ジストロフィン遺伝子の変異に起因するジストロフィン蛋白質の欠損が原因で発症する進行性の遺伝性筋疾患である。DMD患者は全身性の筋力低下および骨格筋の変性・壊死を主病変とし、心不全または呼吸不全のため死亡する。現在有効な治療法はないが、マウスやイヌなどのDMDモデル動物を用いた前臨床試験によって、アンチセンス核酸の一つであるphosphorodiamidate morpholino oligomer（PMOまたはモルフォリノ）を用いたエクソン・スキッピング療法がジストロフィンの発現回復を可能にする有望な治療法として期待されている。本稿では、我々が報告したエクソン・スキッピングの応用技術、ペプチド抱合型PMO介在性マルチエクソン・スキッピングの治療効果を中心に¹、核酸医薬開発における筋ジストロフィーモデル犬の有用性について概説する。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）

X連鎖性劣性遺伝様式をとるDMDは新生男児の約3,500人に1人と最も発生頻度が高い筋ジス

トロフィーである。全長2.2 Mbpからなるヒト最大のジストロフィン遺伝子では、様々な部位に欠失や重複、点変異など異なるタイプの変異が生じる。多くの変異でジストロフィン蛋白質をコードするアミノ酸の読み枠がずれるout-of-frame変異が生じるため、DMD患者の骨格筋では筋細胞の構造維持に重要なジストロフィン蛋白質が産生されない。ジストロフィンの欠損によりDMD患者は進行性の筋力低下と筋線維の変性・壊死を特徴とする重篤な経過をとり30歳前後で死に至る。人工呼吸器の普及によって呼吸不全により死亡する患者数が減少している一方、心不全はDMDの主要な死因の一つとなっている²。患者へはコルチコステロイドや心不全治療薬などの対症療法のみであり、有効な治療法は確立されていない。

筋ジストロフィー犬の特徴

DMD研究の多くはジストロフィン欠損モデルマウスを用いて行われてきた³。しかし、現在利用可能なDMDモデルマウスは患者の特徴である進行性の筋力低下や重篤な骨格筋変性、心機能障害を示さず、致死的経過をとらない。また、ヒトとは大きく



図1 ビーグル系統の筋ジストロフィーモデル犬：Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan, CXMD_J (写真：国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長 武田 伸一先生 提供)

異なる解剖学的・生理学的特徴がDMDの病態解明および治療効果の評価を困難にしているため、DMDにおける大型動物モデルの必要性が高まっている⁴。このような中で、自然発症例のゴールデンレトリバーから確立された筋ジストロフィーモデル犬 (Golden Retriever Muscular Dystrophy, GRMD)、および国立精神・神経医療研究センターにてGRMDの凍結性液を用いて作出されたビーグル系統の筋ジストロフィー犬 (Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan, CXMD_J：図1) は患者と類似した症状を示す疾患モデルとして、DMDの病態および治療研究に大きく貢献している⁵。ジストロフィン欠損の自然発症例は他の犬種においても報告されているが⁴、コロニーとして確立されているモデルはGRMDおよびCXMD_Jのみである。本国におけるビーグル種のCXMD_JはGRMDの約半分のサイズのため飼養管理が容易であり、病態解析に適した重症度を示すため研究における有用性が

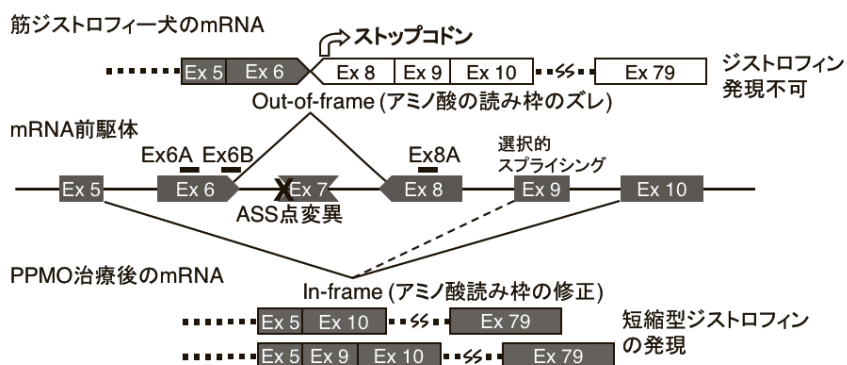


図2 筋ジストロフィー犬のジストロフィン遺伝子変異とPPMO介在性マルチエクソン・スキッピングによるジストロフィン発現誘導
本モデル犬ではイントロン6のacceptor splice site (ASS) 上の点変異が原因となり、アミノ酸の読み枠を形成するエクソン7が除去されるため、ジストロフィンが産生されない。PPMOカクテル薬 (Ex6A、Ex6BおよびEx8A) はエクソン6と8を同時にスキップし、機能的な短縮型ジストロフィンの発現を誘導する。

高い。

両筋ジストロフィー犬はジストロフィン遺伝子イントロン6のacceptor splice site上に点変異を持つため、アミノ酸の読み枠形成に必要なエクソン7がRNAスプライシング過程で除去され、ジストロフィン蛋白質が産生されない (図2)。筋ジストロフィー犬はマウスモデルと異なり、生後間もない時期から骨格筋における筋線維の壊死と再生を特徴とする組織学的変化が認められ、成長に伴う全身性の筋力低下や筋萎縮、関節拘縮、呼吸異常などDMDと類似した症状を顕著に示す⁴。特に若齢期から心筋ブルキンエ線維における空胞変性や心臓刺激伝導系の異常、左心室肥大および線維化などDMD患者に認められる心臓病変を示すため、筋ジストロフィー犬はジストロフィン欠損による心機能障害を理解する上で重要なモデルとして位置づけられる⁶。

また、筋ジストロフィー犬ではMRIや心機能検査をはじめ獣医療において確立された検査法が適応できるため、開発された治療法の有効性をより正確に評価できるという大きな利点がある。

DMD治療法開発における筋ジストロフィー犬

DMDの本質的治療戦略は全身骨格筋および心筋においてジストロフィン蛋白質を発現回復させることである。根治的治療法としてウイルスベクターによるマイクロジストロフィン療法や幹細胞移植治療、ゲノム編集による遺伝子治療がDMDモデルマウスおよび筋ジストロフィー犬を用いて検討されているが、克服すべき課題が多い⁷。一方、アンチセンス核酸を用いたエクソン・スキッピング療法は、上記治療法における免疫応答や倫理面の問題を解決し、全身骨格筋におけるジストロフィン発現を誘導

できるため最も臨床応用に近い技術として精力的に研究が進められている。エクソン・スキッピングでは、アンチセンス核酸がRNA前駆体のスプライシングに関わる領域に結合し、変異エクソンまたは変異周囲のエクソンを除去（スキップ）するように作用するため、アミノ酸の読み枠が修正され、機能的な短縮型ジストロフィンの発現が誘導される。このような短縮型ジストロフィンは、アミノ酸の読み枠が保持される変異（in-frame変異）を持つ軽症型ジストロフィン異常症（ベッカー型筋ジストロフィー：BMD）患者や、復帰突然変異によりアミノ酸の読み枠が回復した少数のジストロフィン陽性リバータント筋線維において発現しており⁸、エクソン・スキッピング療法の開発コンセプトとなっている。

筋ジストロフィー犬におけるエクソン・スキッピングの有効性は、国立精神・神経医療研究センターの武田 伸一先生およびアルバータ大学の横田 敏文先生らによって初めて報告されている⁵。ジストロフィンの蛋白質コード領域を回復させるために2つのエクソンを同時に除去する必要がある筋ジストロフィー犬は、エクソン・スキッピングの応用技術である複数のエクソンを対象としたマルチエクソン・スキッピング法の開発に最も適したモデル動物である。また上述したように、筋ジストロフィー犬は骨格筋障害をはじめ、DMDで

見られるような心筋障害を顕著に示すことから、マルチエクソン・スキッピングを含む新たな治療法の有効性において、DMD患者への外挿性が高いモデルとして注目されている。

筋ジストロフィー犬を用いたマルチエクソン・スキッピング療法の開発

有効性および安全性において最も臨床応用に近いPMOを用いたマルチエクソン・スキッピング療法が筋ジストロフィー犬の全身骨格筋においてジストロフィンの発現を回復させ、運動機能を改善させたという報告は、DMD治療研究における大きな進展であった⁵。従来の一つのエクソンを対象とするシングルエクソン・スキッピングは全DMD患者の約64%を対象にできる一方、マルチエクソン・スキッピングは、欠失変異を持つ患者の約90%、重複変異患者の約80%、点変異患者の約98%に適応できる⁹。また、ジストロフィンの機能はエクソンの構成（ジストロフィン蛋白質の構造）に影響されるため、選択的に複数のエクソンを除去するマルチエクソン・スキッピングでは、より機能的な短縮型ジストロフィンの産生が可能となり、治療効果の増進が期待されている⁹。このように大きな可能性を持つマルチエクソン・スキッピングの効果が筋ジストロフィー犬を用いて実証された一方、PMOを用いたマルチエクソン・スキッピングにお

ける新たな課題が明らかとなった。すなわち、PMOは生体内において効率的に複数のエクソンをスキップすることが難しいこと、および心筋ではPMOの効果が制限され、ジストロフィンの発現回復が認められないことが明らかとなった。これらの問題を解決すべく、我々はアルギニン、6-アミノヘキサン酸および β -アラニンから構成される細胞透過性ペプチドを付加したPMO（peptide-conjugated PMO：PPMO）による新たなマルチエクソン・スキッピング療法の開発を筋ジストロフィー犬において試みた¹。

PPMO介在性マルチエクソン・スキッピングの治療効果

本研究で我々はまずエクソン7を欠損する筋ジストロフィー犬のmRNAからジストロフィン産生を誘導するため、エクソン6とエクソン8を同時にスキップできるPPMOを設計した（図2）。エクソン6に対する2種類のPPMOとエクソン8に対する1種類のPPMOの計3つのPPMOをカクテル剤として筋ジストロフィー犬の静脈内または冠状動脈内に投与し、骨格筋および心筋におけるジストロフィン発現、組織学的寛解、心機能、PPMOの体内動態および安全性についての評価を行った。

PPMOカクテルを静脈内投与した筋ジストロフィー犬の骨格筋では、エクソン6および8がスキップされたジストロフィンmRNA

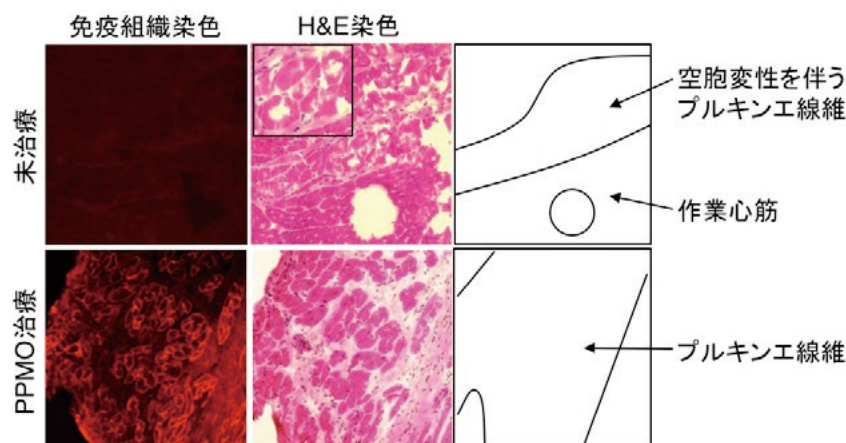


図3 PPMOカクテルを全身投与した筋ジストロフィー犬のプルキンエ線維におけるジストロフィン発現回復および空胞変性の寛解
連続切片による同一プルキンエ線維による解析。左図：ジストロフィン抗体による免疫組織染色、中央図：H&E染色（挿入図はプルキンエ線維における空胞変性の拡大図）、右図：模式図。

の発現が全身で認められると共に、ジストロフィン蛋白質の発現回復および筋線維の回復指標（変性筋線維数の間接的指標）である中心核筋線維数の減少が確認された。PPMOを冠状動脈内または静脈内投与した筋ジストロフィー犬の心筋において、通常のPMO治療では誘導されなかったジストロフィン蛋白質の発現回復が広域に認められた。また、プルキンエ線維内の空胞変性がジストロフィン発現に伴い有意に改善されることが筋ジストロフィー犬を用いた本研究によって初めて明らかとなった（図3）。心電図検査では、PPMO治療後の本モデル犬において、DMD患者で見られるようなQ波の異常増高およびQ/R比の増加が心筋におけるジストロフィンの発現誘導によって改善されることが明らかとなっている。このPPMOの治療学的効果は、静脈内投与された複数のPPMOが本モデル犬の心筋において骨格筋と同様

の濃度で検出されたことによって裏付けられている。PPMOはその高い細胞透過性による副作用が懸念されているが、PPMOを頻回全身投与した筋ジストロフィー犬の経時的な血液生化学検査からは明らかな毒性は認められなかった。

以上から、筋ジストロフィーモデル犬を用いた本研究によって、PPMO介在性マルチエクソン・スキッピングが明らかな毒性を示すことなく、心臓におけるジストロフィン発現を誘導し、刺激伝導系異常を改善する新たなDMD治療法になることが示された。

おわりに

本稿では、筋ジストロフィーモデル犬の特徴と我々の最新研究を例に、本モデル犬を用いた前臨床試験における成功例を紹介した。核酸医薬のみならず新たな医療技術の確かな効果を患者へ届けるためには、大型モデル動物における有効性・安全性

評価が強く求められる。このような中で、筋ジストロフィーモデル犬の担う役割は極めて大きく、DMD根治に向けた研究への更なる貢献が期待される。

引用文献

1. Echigoya, Y. *et al.* Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 4213-4218 (2017).
2. Nakamura, A. X-Linked Dilated Cardiomyopathy: A Cardiospecific Phenotype of Dystrophinopathy. *Pharmaceuticals (Basel)* 8, 303-20 (2015).
3. Rodrigues, M., Echigoya, Y., Fukada, S.I. & Yokota, T. Current Translational Research and Murine Models For Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis* 3, 29-48 (2016).
4. Yu, X., Bao, B., Echigoya, Y. & Yokota, T. Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping. *Am J Transl Res* 7, 1314-31 (2015).
5. Yokota, T. *et al.* Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 65, 667-76 (2009).
6. Yugeta, N. *et al.* Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc Disord* 6, 47 (2006).
7. Shimizu-Motohashi, Y., Miyatake, S., Komaki, H., Takeda, S. & Aoki, Y. Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: from discovery to clinical trials. *Am J Transl Res* 8, 2471-89 (2016).
8. Echigoya, Y. *et al.* Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic mdx and mdx52 mice. *PLoS One* 8, e69194 (2013).
9. Echigoya, Y. & Yokota, T. Skipping Multiple Exons of Dystrophin Transcripts Using Cocktail Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther* 24, 57-68 (2014).

（日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照）