

DMDのエクソン・スキップ治療開発におけるBMD自然歴研究の意義

中村 昭則[†]第74回国立病院総合医学会
(2020年10月17日 於 新潟)

IRYO Vol. 76 No. 1 (35-39) 2022

要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) とベッカー型筋ジストロフィー (BMD) はDMD遺伝子変異に起因した疾患である。DMDはアミノ酸の読み取り枠がずれる変異によりジストロフィンが欠損するが、BMDはアミノ酸の読み取り枠が保たれる変異であるため不完全ながらもジストロフィンが産生され、骨格筋症状はより軽い。エクソン・スキップ治療は両者の変異の特徴の違いをアンチセンス薬により実現させた方法である。しかし、BMDでは重症から無症候性の症例があるほか、若年で心不全を発症する例もありその表現型は多様である。遺伝子変異の部位、パターンまたは範囲がその表現型に関連している可能性があるが、詳細が不明であり、エクソン・スキップ治療効果をあらかじめ知り得る手段はない。そこで、BMDの遺伝子型と表現型の関連を明らかにするため筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク加盟の22医療機関の共同で自然歴研究を実施し、遺伝子変異が確定した305名について解析をした。発生頻度の高い変異はエクソン45-57,45-48,45-49,45-55,3-7,45-53の欠失であった。車椅子使用者の割合はエクソン3-7欠失で60%と最も高く、使用開始年齢17.8歳であった。次いでエクソン45-49欠失で57.1%、使用開始年齢31.6歳、45-47,45-53,45-48の各欠失と続いた。%努力肺活量はエクソン3-7欠失で最も低く、次いで45-53,45-49の欠失の順であった。左室駆出率はエクソン3-7および45-53の欠失で正常値以下であった。中枢神経障害はエクソン45-55欠失でみられなかったが、それ以外の変異で約20%に認められた。以上から遺伝子型と表現型に関連があることが示唆されたことから、エクソン・スキップ治療の開発に有用な情報が提供できる可能性がある。

キーワード BMD, DMD遺伝子, ジストロフィン, エクソン・スキップ治療, 自然歴

はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は2から5歳で易転倒性、歩様の異常などで発症し、進行性に筋萎縮・筋力低下を示す疾患である。一部の患者では精神発達障害やてんかんなどの中枢神経障害も併発する。進行期には呼吸不全や心筋症による心不全をおこす予後不良の疾患である。DMDの原

因遺伝子はDMD遺伝子であり、アミノ酸の読み取り枠がずれる (アウト・オブ・フレーム) 欠失や重複などの変異により筋形質膜に局在するジストロフィンが欠損する。この結果、筋の壊死・変性が生じ、筋萎縮や筋力低下をきたす。一方、DMD遺伝子のアミノ酸の読み取り枠が保たれる (イン・フレーム) 変異の場合には不完全ながらもジストロフィンが産生されるためベッカー型筋ジストロフィー

国立病院機構まつもと医療センター 臨床研究部 [†]医師
著者連絡先: 中村昭則 国立病院機構まつもと医療センター 臨床研究部 〒399 長野県松本市村井町南2-20-30
e-mail: anakamu@shinshu-u.ac.jp
(2021年3月15日受付, 2021年10月15日受理)

Significance of BMD Natural History Study for the Development of Exon-skip Therapy for DMD
Akinori Nakamura, NHO Matsumoto Medical Center
(Received Mar. 15, 2021, Accepted Oct. 15, 2021)

Key Words: BMD, DMD gene, dystrophin, exon-skip therapy, natural history

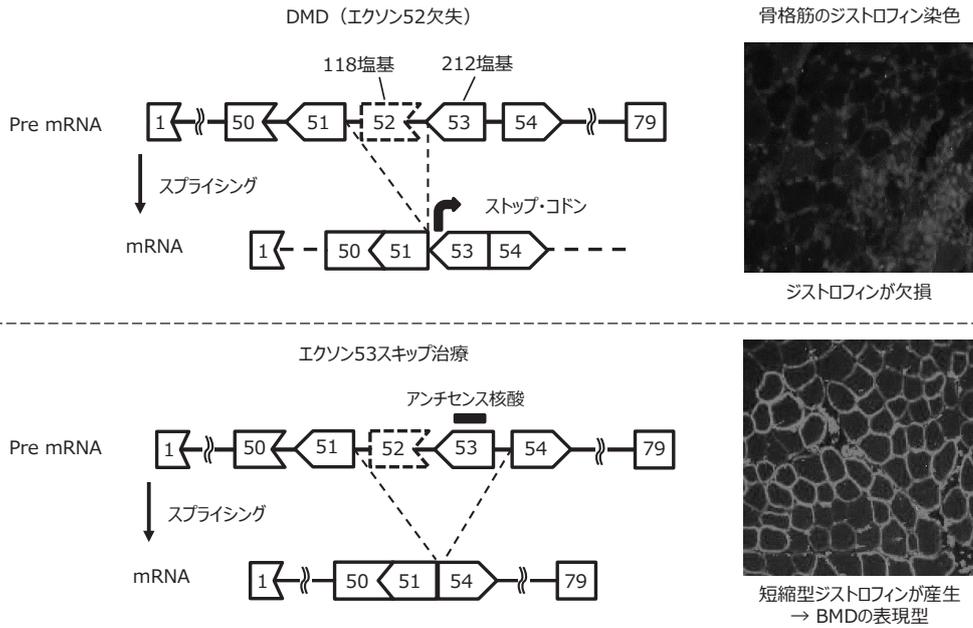


図1. DMDに対するエクソン・スキップ治療の原理

アンチセンス核酸：標的とするRNAに相補的に結合する17～22塩基からなる一本鎖の人工核酸
 スプライシング：DNAから転写直後の前駆体RNA（Pre mRNA）からイントロン（エクソン間にある塩基は配列）を切断除去し、エクソンのみからなる成熟型RNA（mRNA）になる過程
 ストップ・コドン：対応するアミノ酸がなく、最終産物であるタンパク質の生合成を停止させるために使われている3つの塩基配列（コドン）のこと

(BMD) となる¹⁾。

DMDに対しては呼吸管理の進歩やリハビリテーションの積極的な導入などにより寿命が大幅に延長したが、根治療法がないためさまざまな治療薬の開発が行われてきた。この中で臨床応用まで進んだ治療法にアンチセンス薬（人工核酸）を用いたエクソン・スキップ治療がある。この治療法はDMD遺伝子のアウト・オブ・フレーム変異に対して、スプライシング時に変異のある前後のエクソンをアンチセンス薬で読み飛ばすことでイン・フレーム化し、ジストロフィンの発現を回復させている²⁾。この結果、DMDがBMDの表現型に転換されることになるが、BMD患者の一部では重篤な心筋症を呈する症例や、DMDに類似の重症例から無症候性例もあり、表現型がきわめて多様である。この多様性にはDMD遺伝子変異の部位、変異のパターンや範囲も関連している可能性はあるが、その詳細はわかっていない。そこで、DMDに対するエクソン・スキップ治療の開発にはBMDの臨床像と遺伝子型との関連を明らかにすることが必要であると考え³⁾、BMD患者の遺伝子変異および診療の情報を収集して解析を行う自然歴調査研究を実施した。

エクソン・スキップ治療の原理と課題

エクソン・スキップ治療の原理をエクソン52欠失例で説明する（図1）。エクソン52は118個の塩基対からなり、これが3の倍数ではないことから欠失するとメッセンジャーRNA（mRNA）ではアミノ酸の読み取り枠がずれてアウト・オブ・フレームとなる。この結果、エクソン53内でストップ・コドンが生じてジストロフィンは産生されずDMDとなる。そこで、アンチセンス薬（人工核酸）を用いて212塩基対からなるエクソン53をスプライシング時に読み飛ばすようにすると、欠失する塩基対の総和が330と3の倍数となるためアミノ酸の読み取り枠が修正されイン・フレームとなる。欠失した遺伝子がコードしているアミノ酸は欠損するもののジストロフィン自体は産生されるために、症状が改善することが期待される。

このエクソン53スキップ治療が適用できるアウト・オブ・フレーム変異は、エクソン52,45-52,47-52,48-52,49-52の欠失の計5種類がある。しかし、治療によりこれらの変異をイン・フレーム化した場合の各々の表現型が一様に改善し得るかについては

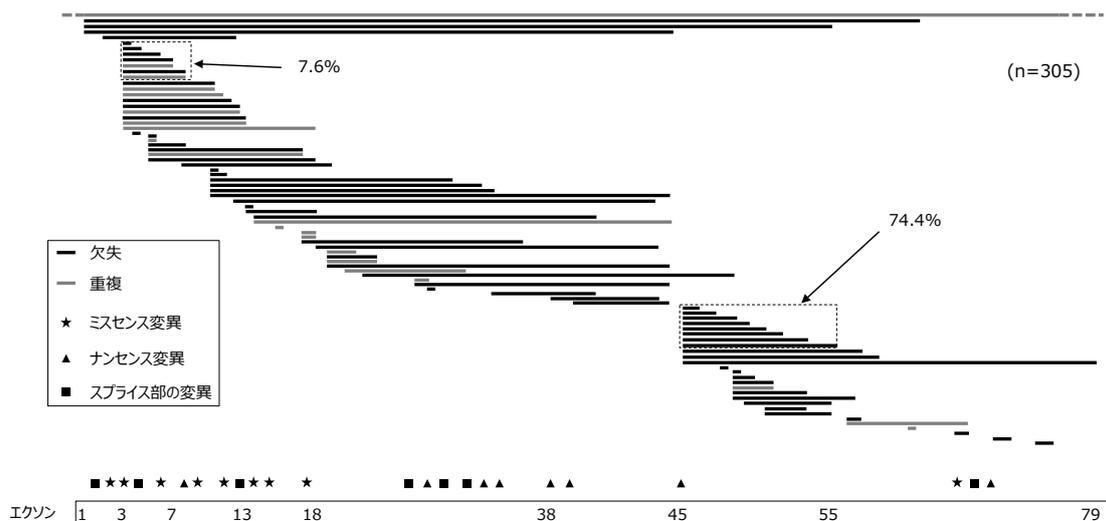


図2 BMD患者のDMD遺伝子変異の分布

ミスセンス変異：コドン内の塩基の置換によって本来とは異なったアミノ酸残基が合成され、異常なタンパク質が産生されてしまう変異のこと
 ナンセンス変異：アミノ酸のコドンを終止コドンに変えてしまう変異のこと

詳細なデータがない。治療後の表現型をもつBMDが比較的重症な経過を示すのであれば、期待するほどの治療効果が得られない可能性もある。そこでBMDの自然歴研究を通して遺伝子型と表現型についての情報を把握し、治療戦略に反映させることが必要になると考えられる。

方 法

2018年度より筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク (MDCTN) に加盟している全国22施設の協力のもとBMD自然歴研究を計画・実施した。調査対象は分子遺伝学的検査によりDMD遺伝子変異が同定されたBMD患者とした。患者本人もしくは代諾者の同意取得後に臨床調査個人票を用いてDMD遺伝子変異情報、臨床および検査情報を匿名化して収集した。主な調査項目は、患者の年齢、遺伝子変異、初発症状、車椅子使用開始年齢、血清クレアチンキナーゼ値、%努力肺活量、人工呼吸器利用状況、心エコー検査所見 (左室拡張末期径、左室駆出率)、知的能力障害・発達障害、痙攣・てんかん、および精神障害の有無とその種類とした。

結 果

1. 本邦のBMD患者の実態

本調査に319名が登録され、うち遺伝子変異未記載例1名、遺伝子変異が特定できなかった13名を除外し305名を解析に組み入れた。調査時年齢は1歳から80歳と幅広く、平均年齢30.5歳、中央値28歳であった。遺伝子変異の種類は欠失が82%と最も多く、次いで重複7%、スプライス部の変異5%、ナンセンス変異3%であった。初発症状は筋症状が57%と最も多く、次いで未発症高クレアチンキナーゼ血症33%、中枢神経障害 (痙攣、精神発達遅滞、学習障害など) 6%、心筋障害 (急性心不全、心電図異常など) 3%であった。診断時の血清クレアチンキナーゼ値は若齢診断例で高く、高齢診断例で低い傾向にあった。診断時の%努力性肺活量と年齢との間に相関関係はみられなかったものの、若齢で低値を示す例が少なくなかった。この中で非侵襲的陽圧換気療法を受けた患者は26名、気管切開下陽圧換気療法を受けた患者は7名であった。診断時の左室拡張末期径は一般に成長にともない20歳くらいまで増大するが、10歳台であっても55 mmを超える例が存在し、20から40歳台で55 mmを超えていた例も少なくなかった。診断時の左室駆出率は年齢にともない減少傾向を認めたが、10歳頃から低下した例もあるほか、

表 1 発生頻度の高い遺伝子変異とその表現型

	エクソン45-47欠失	エクソン45-48欠失	エクソン45-49欠失	エクソン45-55欠失	エクソン3-7欠失	エクソン45-53欠失
人数 [人]	69	40	14	12	10	9
年齢 [歳] (調査時平均年齢 [歳])	1~81 (36.4)	13~73 (38.5)	13~76 (39.4)	1~49 (26.8)	6~69 (30.4)	15~61 (39.7)
車椅子使用車の割合 [%] (使用開始時の平均年齢 [歳])	31.8 (40.7)	25.0 (48.1)	57.1 (31.6)	0 (-)	60.0 (17.8)	44.4 (45.3)
血清クレアチンキナーゼ平均値 [U/L]	2520.6	1336.8	1871.0	1184.2	2583.8	2461.0
%努力肺活量平均値 [%]	95.3	93.9	90.4	94.7	72.2	95.0
非侵襲的陽圧換気または気管切開下陽圧換気療法を受けている割合 [%]	0	7.5	21.4	0	40	22.2
左室拡張末期径平均値 [mm]	47.4	50.6	43.8	49.9	50.1	49.1
左室駆出率平均値 [%]	54.8	52.9	58.8	59.4	47	48.5
心不全の割合 [%]	8.7	15.4	14.3	16.7	20	11.1
中枢神経障害合併の割合 [%]	16.7	20.0	21.4	0	0	22.2

20から30歳台で著明に低下していた症例も存在していた。心不全症状は全体の14.7%に認められ、心不全治療は46%が受けており、治療開始平均年齢は30.2歳であった。中枢神経障害は、痙攣発作が8.6%、知的能力障害・発達障害が21.7%、精神障害が11.8%であった。

2. 本邦のBMD患者の遺伝子変異と表現型との関連

BMD患者305名の遺伝子変異をDMD遺伝子上にプロットした(図2)。DMDの欠失の第1ホットスポットとされるエクソン45から55内の変異は全欠失の74.4%を占め、第2スポットであるエクソン3から9内の欠失は7.6%であった。

発生頻度の高い上位6位までの遺伝子変異すべて欠失であり、その範囲はエクソン45-57(69名)、45-48(40名)、45-49(14名)、45-55(12名)、エクソン3-7(10名)、およびエクソン45-53(9名)であった。各変異について調査時年齢、車椅子使用者の割合および車椅子使用開始時年齢、血清クレアチンキナーゼ平均値、%努力肺活量平均値、非侵襲的陽圧換気または気管切開下陽圧換気療法を受けている割合、左室拡張末期径平均値、左室駆出率平均値、心不全の割合、中枢神経障害合併の割合についてまとめた(表1)。調査時年齢には、エクソン45-55欠失が他と比較して若い集団となったが、その他は概ね同じような年齢の集団であった。車椅子使用者の割合はエクソン3-7欠失が60%と最も高

く、平均使用開始年齢は17.8歳であった。次いでエクソン45-49欠失例が57.1%、使用開始年齢が31.6歳であり、45-47,45-53,45-48の各欠失と続いた。前述のようにエクソン45-55欠失は他の変異と比べて若干若い集団であったものの49歳まで歩行可能であり他の変異と比較して軽症であると考えられる。血清クレアチンキナーゼの平均値については、エクソン3-7欠失が最も高く、エクソン45-55欠失では最も低かった。%努力肺活量の平均値はエクソン3-7欠失で最も低く、これを反映して非侵襲的陽圧換気または気管切開下陽圧換気療法を受けている割合が最も高く、次いで45-53,45-49欠失の順であった。左室拡張末期径の平均値については各変異間の差はなかったが、左室駆出率の平均値はエクソン3-7および45-53欠失で正常値以下であった。中枢神経障害の合併については、エクソン45-55欠失では認めなかったが、その他の変異で20%前後に認められた。

考 察

本研究における登録者数は、計画当初250例を見込んでいたがそれを大きく超える319例が登録された。本調査時点で神経・筋疾患患者登録システム「Remudy」に登録されているBMD患者数は407名であり、その約8割の症例のデータが収集できたことになる。

今回のBMDの自然歴後ろ向き研究では、初発症

状、歩行不能年齢などの骨格筋障害、呼吸機能（%努力肺活量）、心機能（左室駆出率、ほか）、中枢神経障害に関する幅広い項目を調査した。本邦におけるBMDの実態を明らかにする中で、とくにBMDの初発症状として中枢神経障害の発生頻度が予想を超えて高く、てんかんや知的能力障害・発達障害が主徴になっている症例が存在していることが明らかになった。実際に、痙攣発作は一般人の有病率（0.8%）の約10倍、知的能力障害・発達障害は一般人の有病率（1%）の約20倍であった。これらの中枢神経障害は偶発的に併発しものではなく、本疾患の一症状として認識される必要があり、DMDと同様にBMDにおいても中枢神経障害に焦点を当てた調査研究に加えて社会的支援が将来的に必要であることを示唆している。

遺伝子変異の種類については、DMDに比して欠失およびスプライス部位の変異が多かったが、DMDと同様に欠失および重複例が多く、DMD患者の遺伝子変異の分布に非常に類似していた⁴⁾。発生頻度の高い遺伝子変異はホット・スポット内の変異（欠失）であったが、遺伝子変異の間で骨格筋障害や心筋障害の程度が異なっていることが明らかになった。遺伝子型と表現型との関連性に関する情報は、DMDのエクソン・スキップ治療の開発にきわめて重要な意義を持つと考えられる。また、頻度の少ない変異についても臨床像、自然経過についての詳細な検討が必要である。現在、エクソン53を標的としたスキップ治療薬ビルトラルセンが臨床応用されている⁵⁾。この治療薬によりイン・フレーム化した遺伝子型をもつBMDは本研究内にエクソン45-53欠失が9名、48-53欠失が2名、52-53欠失が1名いたことから、現在詳細な解析を行っている。

今回の研究の限界として後方視的なデータの収集であるために調査項目によっては欠測値が少なからずみられたことと、筋力の定量的データが収集できなかったことが挙げられる。そこで、自然歴前向き研究では後ろ向き研究で用いた臨床調査個人票の見直しを行い、さらに筋力の定量的評価法として標準化された運動機能評価を組み入れて実施している。

おわりに

昨今、DMDに対する治療開発が盛んになっているが、その中心であるエクソン・スキップ治療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療は症状の軽減化、すなわちBMDの表現型を目指す方法となっている。今回の後ろ向き調査研究では、BMD自然歴の一端を明らかにすることはできたと考えているが、まだ全貌を明らかにするには至ってはならず、長期にわたる前向き研究が必要である。また、これまで十分な患者のケアができていないことや、専門医療機関の診療方針もさまざまであることを踏まえ、BMDの診療ガイドラインが望まれる。BMDの重症化因子が明らかになることで予防医学への展開が期待されるとともに、重症の経過を示す遺伝子変異を持つBMDに対してはDMDと同様に治験対象とすることが可能になるとと思われる。

著者の利益相反：本論文発表内容に関連して申告なし。

【文献】

- 1) Tuffery-Giraud S, Beroud C, Leturcq F, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 2009 ; **30** : 934-45.
- 2) Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology* 2009 ; **29** : 494-501.
- 3) Nakamura A. Moving toward successful exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet* 2017 ; **62** : 871-6.
- 4) Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet* 1995 ; **57** : 22-33.
- 5) Komaki H, Takeshima Y, Matsumura T, et al. Viltolarsen in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Ann Clin Transl Neurol* 2020 ; **7** : 2393-408.