Institute of SCIENCE TOKYO

Press Release

2025 年 5 月 22 日
東京科学大学

# デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する新規核酸医薬技術を開発

## ～核内送達を高めた二本鎖型核酸で治療効果の向上を実証～

**【ポイント】**

〇デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は根本的な治療法が未確立の遺伝性筋疾患であり、アンチセンス核酸（ASO）を用いたエクソンスキッピング療法が一部の患者に適用されています。

〇現在の治療薬は PMO を用いた ASO に限定されており、さらなる効果向上が求められています。

〇本研究では、DNA および LNA を基本骨格とする SSO に、核内送達を高める新技術「ヘテロ二本鎖核酸（HDSSO）」を初めて適用しました。

〇HDSSO は従来型 SSO に比べ高いエクソンスキッピング活性を示し、相補鎖構造と活性との関連も明らかにしました。

〇この技術は LNA ベース以外の SSO にも応用可能と考えられ、脂質やペプチドを用いた薬物送達技術との併用による標的指向性の向上も期待されます。

〇本成果は、スプライシング制御を目的とする幅広いアンチセンス核酸医薬の開発に貢献すると期待されます。

**【概要】**


核酸医薬は、従来の低分子化合物や抗体医薬では制御が困難な RNA を標的とすることが可能な、有望な医薬技術です。特にデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいては、スプライシングの制御を目的とした**アンチセンス核酸**（用語 1）医薬品が複数承認されています。一方で、これらの承認薬は**ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー**（**PMO**、用語 2）と呼ばれる核酸分子に限定されており、血中滞留性の短さや速やかな腎排泄といった薬物動態上の課題から、さらなる活性の向上が望まれています。

我々の研究室ではこれまでに、アンチセンス核酸の効果を大幅に向上させるヘテロ 2 本鎖核酸（HDO）技術を開発しており、PMO を用いた HDO 技術も新たに開発しました。そして、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの動物モデルである **mdx マウス**（用語 3）においても有効であることを報告しています。

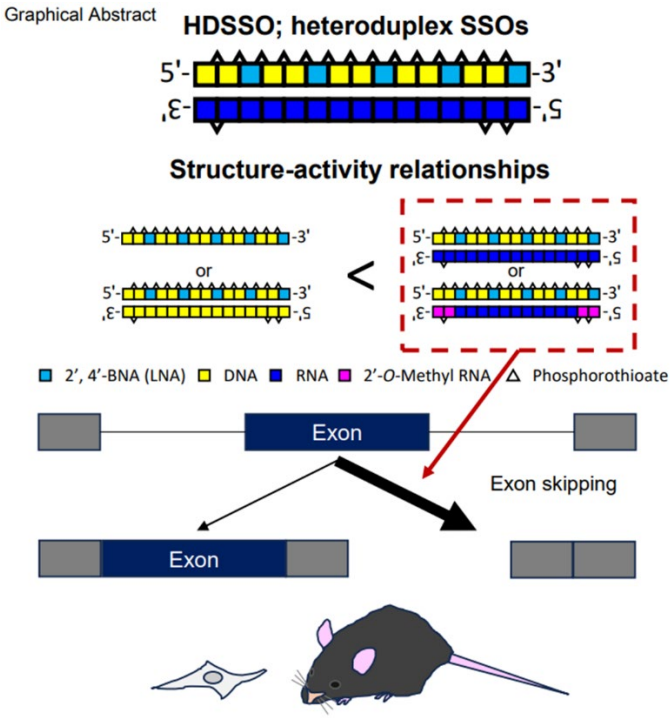
今回、東京科学大学 脳神経病態学分野の横田隆徳名誉教授、長谷川樹里非常勤講師、核酸・ペプチド創薬治療研究センターの吉岡耕太郎特任講師らの研究グループは、大阪大学 大学院薬学研究科 生物有機化学分野の小比賀聡教授、下剛典大学院生（研究

当時）らのグループとの共同研究により、HDO 技術を応用し、モルフォリノ核酸（PMO）とは異なる DNA および糖鎖化学修飾（LNA）を基本骨格とする**スプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO：Splice-switching oligonucleotide**、用語 4）の活性向上手法を検討しました。

まず、in vitro アッセイを用いて、多様な核酸化学修飾や鎖長の HDSSO 分子を設計し、エクソンスキッピング活性への影響を評価した結果、エクソンスキッピング活性を向上させる HDSSO 構造を同定しました。また、細胞内動態の解析から、HDO 技術により核内への取り込みが増加し、相補鎖核酸の安定性の違いが核内移行効率に影響を与えることが明らかになりました。

さらに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスを用いた in vivo 実験においても、HDO 技術により高いエクソンスキッピング活性が示されました。

本研究は、HDO 技術の応用により LNA ベースの SSO の活性を向上させうることを示したものであり、その成果は、国際科学誌「*Molecular Therapy - Nucleic Acids*」において、2025 年 3 月 11 日にオンライン版で発表されました。




LNA ベースの SSO では、Single や相補鎖 DNA の HDSSO よりも相補鎖 RNA かつ 5’/3’ 末端のみ PS 修飾の HDSSO でよりエクソンスキッピング活性が高く、mdx マウスでもその効果が見られた。

**●背景**

核酸医薬を用いたプレ-mRNA のスプライシングの調節は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）や脊髄性筋萎縮症（SMA）を含む多くの遺伝性疾患に対する有望な治療戦略であり、まれな突然変異や遺伝性疾患に対する個別化治療である「n-of-1 療法」にも応用が可能です。具体的には、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）と呼ばれるアンチセンス核酸医薬は、プレ-mRNA の標的領域に結合し、スプライシング因子の結合を阻害することで、mRNA の編集を通じてタンパク質発現を調節します。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、X 染色体劣性遺伝の疾患であり、ジストロフィン遺伝子の異常によってジストロフィン蛋白質が産生されず、筋肉の変性や壊死が徐々に進行する難治性の病気です。近年では、異常のあるジストロフィン遺伝子内のエクソンを「読み飛ばす（エクソンスキッピング）」ことで、短縮型ながらも機能を有するジストロフィン蛋白を産生させる**エクソンスキッピング療法**（用語 5）が、一部の遺伝子変異を有する DMD 患者に対して実施されるようになりました。

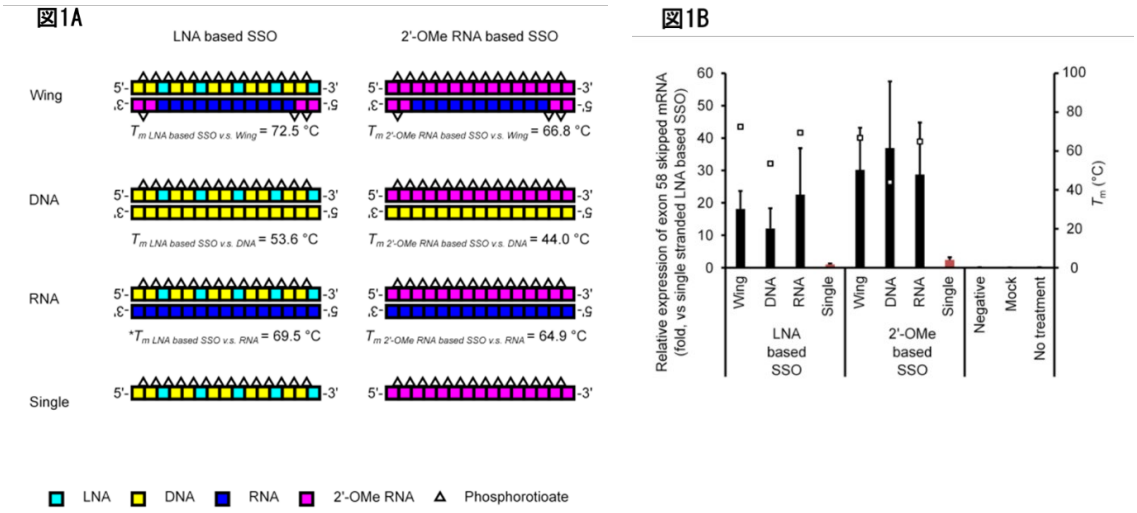
この療法に用いられるのが、アンチセンス核酸（ASO）の一種である SSO です。日本国内でも複数の SSO が承認されていますが、さらなる効果の向上が求められています。加えて、近年の研究では、ペプチドや低分子との結合などを通じた SSO の標的組織・細胞への送達効率の向上が注目されています。

そこで我々は、独自に開発した新規核酸医薬技術であるヘテロ二本鎖核酸（HDO）技術の、核内への高い送達性に着目し、この HDO 技術を応用した SSO（HDSSO）の開発を進めることにしました。一方で、PMO や 2’OMe RNA と相補鎖を組み合わせた HDSSO の報告はあるものの、糖鎖化学核酸（LNA）を基本骨格とする SSO への HDO 技術の応用は未報告であり、その構造設計と活性との関係も明らかではありませんでした。

そこで本研究では、エクソンスキッピング効率を高めるために必要な核内への効率的送達を実現することを目的として、DNA および糖鎖化学修飾（LNA）を基本骨格とする核酸を用いた HDSSO の開発に取り組みました。具体的には、まず in vitro アッセイにより相補的オリゴヌクレオチドの最適化を行い、その後、最適化した HDSSO を DMD モデルマウスである mdx マウスに投与し、その治療効果を検討しました。

**●研究成果**

まず、HDSSO 技術が LNA ベースの SSO および 2’-OMe RNA ベースの SSO に応用可能かを検討しました。ジストロフィン遺伝子を標的とした各 SSO に対して、相補鎖として DNA、RNA、または 2'-OMe RNA ホスホロチオエート修飾（Wing）を含む 3 種類を設計し（図 1A）、1 本鎖 SSO（Single）と HDSSO のエクソンスキッピング活性を in vitro で比較しました。



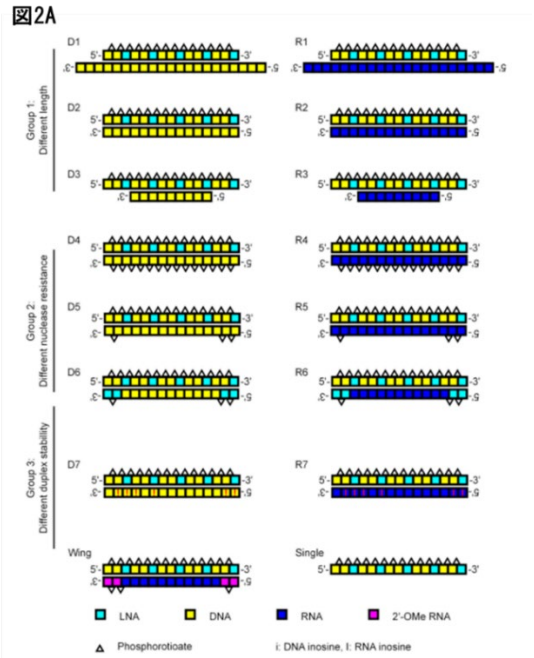


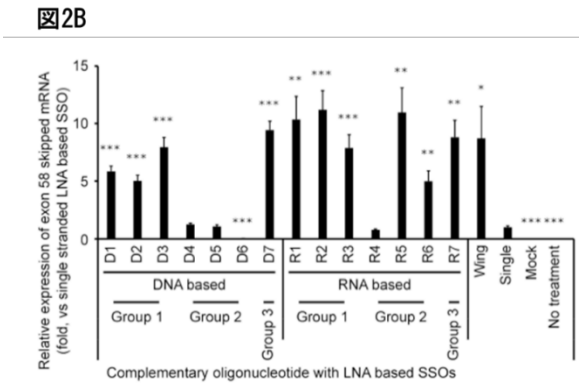


LNA ベースと 2'OMe RNA ベースの SSO を二本鎖にした HDSSO では、いずれも Single よりもエクソンスキッピング活性が高かった。

その結果、HDSSO はいずれのベースでも Single よりも高い活性を示しました（図 1B）。また、相補鎖の融解温度（Tm）測定では、DNA 鎖の結合安定性が最も低い結果となりました。

次に、相補鎖の構造が HDSSO の活性に与える影響を評価しました。



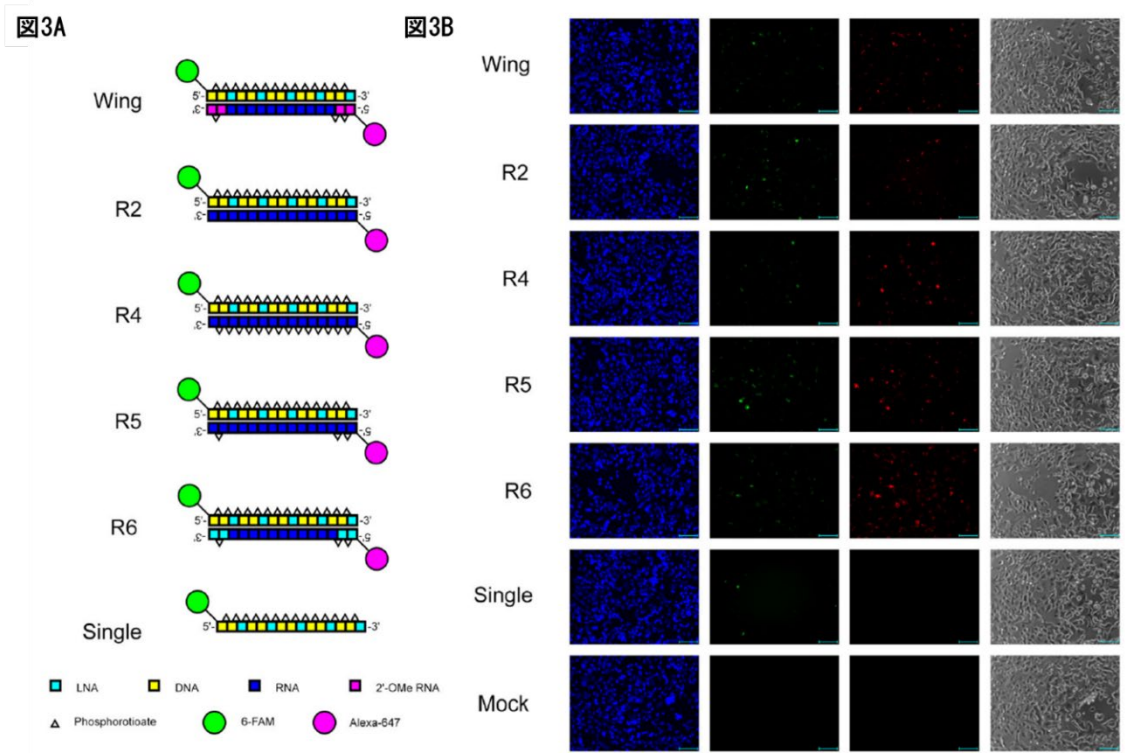

LNA ベースの SSO で、相補鎖 DNA と相補鎖 RNA を設定し、グループ 1 では長さの比較、グループ 2 では PS 結合、LNA 修飾の有無の比較、グループ 3 では相補鎖中のグアニンをシトシンに変更、さらに wing 構造をそれぞれ比較した。

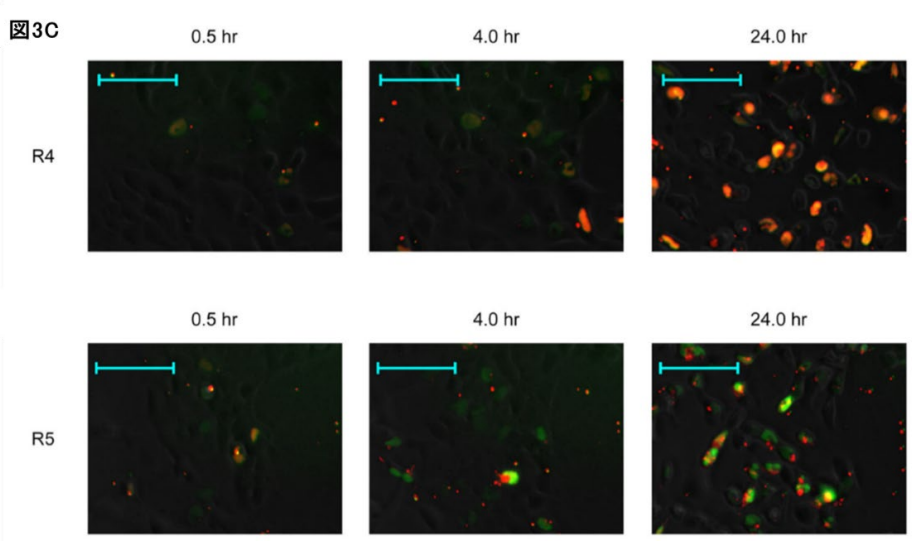
**グループ 1** では、長さの異なる DNA、または RNA 相補鎖（9〜21 mer）を用いた HDSSO を比較し、DNA ベースでは 9 mer (D3) が最も高い活性を示しました (図 2A、2B)。RNA ベースでは明確な差はありませんでした。

**グループ 2** では、PS 結合や LNA 修飾の有無を変えた相補鎖を設計し、活性を評価しました。全 PS 修飾の R4 や D4 は低活性でしたが、5'/3'末端のみ PS 修飾の R5 は高い活性を維持し、LNA を加えた R6 は中程度の活性を示しました（図 2B)。

**グループ 3** では、相補鎖中のグアニンをイノシンに置換（G>I）した D7/R7 を設計しました。G>I 置換により、HDSSO の結合親和性（Tm 値）が低下すると考えましたが、DNA ベース HDSSO では活性が上昇しましたが、RNA ベースでは有意な変化は見られませんでした。

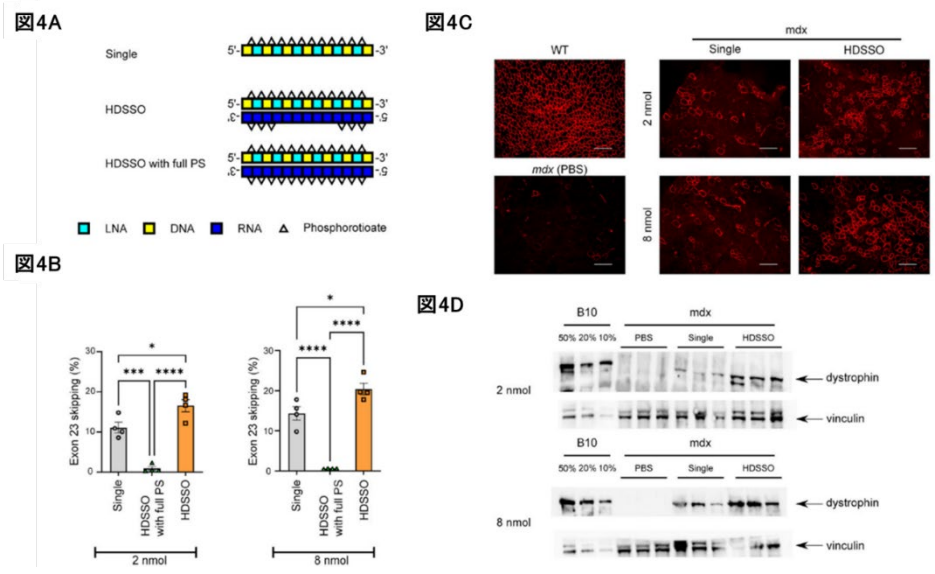
次に、細胞内での HDSSO 挙動を評価するため、グループ 2 の相補鎖 R4〜R6 とコントロールとして wing、R2、Single を用いて、SSO および相補鎖を蛍光標識してタイムラプス観察を行いました（図 3A、3B)。導入 30 分後には全ての HDSSO で核内に両蛍光が確認されました。活性の高い R2 や R5 を含む HDSSO では、時間経過とともに赤色蛍光（相補鎖由来）が減少し、相補鎖が核内から消失したと推測されました。一方、R4 を含む HDSSO では赤色蛍光が長時間残存し、相補鎖の排出・分解の遅れが活性低下の一因と考えられました（図 3C)。






SSO に緑色、相補鎖に赤色の蛍光標識を付けて細胞内にトランスフェクションし、30 分おきに 24 時間後まで観察した。図 3B の 24 時間後の画像では、特に効果のあった R2、R5 で緑色蛍光を発現する細胞がより多く見られ、核内での赤色蛍光がより少なかった。

最後に、R5 設計に基づいた HDSSO を用いて in vivo 評価を行いました。mdx マウスの変異に合わせて SSO 配列を再設計し、R5 相補鎖の HDSSO および全 PS 結合の HDSSO（full PS）を投与しました（図 4A）。筋注後、HDSSO は full PS より高いエクソンスキッピング活性を示し、Single よりも効果的でした（図 4B）。IHC 解析では HDSSO のジストロフィン蛋白質の発現増加が確認され（図 4C）、ウエスタンブロッティングでも HDSSO が Single より高い発現を示しました（図 4D）。



mdx マウスの変異に合わせて SSO の配列を再設計し、R4、R5 配列を基にした HDSSO、Single を 2、8nmol の量でそれぞれ mdx マウスに投与した。In vivo アッセイで効果の高かった R5 配列を基にした HDSSO で最もエクソンスキッピング活性が高く、ジストロフィン蛋白質の発現も多くみられた。

本研究により、HDSSO の活性は相補鎖の種類、長さ、修飾に大きく依存すること、また細胞内での相補鎖の挙動が活性に影響することが明らかとなりました。さらに、in vivo においても HDSSO の優れたエクソンスキッピング効果が確認されました。

**●今後の展開**

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、依然として有効な治療法が確立されていない遺伝性疾患であり、新たな核酸医薬の開発が期待されています。本研究では、核内送達を効率化するヘテロ 2 本鎖核酸（HDO）技術を DNA および LNA ベースの SSO に初めて応用し、優れたエクソンスキッピング活性を示す HDSSO 構造を同定しました。また、相補鎖の構造と活性の関係性も明らかにし、細胞内で高い活性を示す設計指針を得ることができました。

この HDSSO 技術は、LNA ベースの SSO に限らず、他の核酸修飾にも応用可能と考えられます。さらに、現在注目されている脂質やペプチドを用いた薬物送達技術と併用することで、標的臓器への送達性の向上も期待されます。

以上より、本技術は筋組織に限らず、多様な標的組織におけるスプライシング制御型治療法の基盤となりうるものであり、アンチセンス核酸医薬の幅広い応用に貢献すると期待されます。

**【用語説明】**

（1） **アンチセンス核酸（ASO）**：核酸医薬の 1 種であり、標的の遺伝子の RNA などに作用する。具体的には ASO は天然の核酸及び様々な化学修飾が施された 1 本鎖の核酸構造を基本構造として、標的の RNA 等と結合し、標的 RNA を分解、または立体障害をきたすことで、RNA の制御を行う。

（2） **ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）**：核酸は生体内でヌクレアーゼにより分解されやすく、化学修飾を施した核酸医薬が開発されているが、細胞毒性も問題となっている。PMO は核酸類似の人工化合物であるモルフォリン環を持ち、ホスホロジアミデート結合をしていることでヌクレアーゼ耐性が高く細胞毒性が低い利点があるが、電荷をもたないため、細胞膜透過性が低く組織移行性が低いことが課題である。

（3） **mdx マウス**：X 染色体上にあるジストロフィン遺伝子のエクソン 23 に点突然変異を持っており、ジストロフィン蛋白質が作られないため、デュシェンヌ型

筋ジストロフィーのモデルマウスとなっている。

(4) **スプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO：Splice-switching oligonucleotide）**：アンチセンス核酸（ASO）の作用機序のうち、プレ-mRNA の標的領域に結合し、プレ-mRNA のスプライシング因子の結合を阻害することで、mRNA を調整し、その後の蛋白発現を調整する。

(5) **エクソンスキッピング療法**：成熟した mRNA になる前の未熟な RNA に作用して、異常なエクソンを翻訳させないようにして（エクソンスキッピング）、正常よりも少し短いながら正常に機能する標的蛋白質を作らせる治療法である。

**【論文情報】**

掲載誌：*Molecular Therapy - Nucleic Acids*

論文タイトル：Effect of chemical modification on the exon skipping activity of heteroduplex oligonucleotides.

著者：Takenori Shimo, Juri Hasegawa（共著者）, Kotaro Yoshioka, Yusuke Nakatsuji, Kotomi Aso, Keisuke Tachibana, Tetsuya Nagata, Takanori Yokota, and Satoshi Obika

DOI：https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/fulltext/S2162-2531(25)00022-8

**【研究者プロフィール】**

長谷川 樹里（ハセガワ ジュリ） Juri Hasegawa
東京科学大学 大学院医歯学総合研究科
脳神経病態学分野（脳神経内科） 非常勤講師
研究領域：神経内科学、核酸医薬

吉岡 耕太郎（ヨシオカ コウタロウ） Kotaro Yoshioka
東京科学大学 総合研究院
核酸・ペプチド創薬治療研究センター（TIDE センター） 特任講師
脳神経病態学分野兼担
研究領域：神経内科学、核酸医薬

横田 隆徳（ヨコタ タカノリ） Takanori Yokota
東京科学大学 大学院医歯学総合研究科
脳神経病態学分野（脳神経内科） 名誉教授
研究領域：神経内科学、核酸医薬

下 剛典（シモ タケノリ） Takenori Shimo
大阪大学 大学院薬学研究科 生物有機化学分野　大学院生（研究当時）
研究領域：生物有機化学、核酸化学

小比賀 聡（オビカ サトシ） Satoshi Obika
大阪大学 大学院薬学研究科
生物有機化学分野　教授
研究領域：生物有機化学、核酸化学

**【お問い合わせ先】**

（研究に関すること）
東京科学大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野　特任講師
吉岡 耕太郎（ヨシオカ コウタロウ）
TEL：03-5803-5234　FAX：03-5803-0169　E-mail：kotanuro@tmd.ac.jp

（報道取材申し込み先）
東京科学大学 総務企画部 広報課
取材申し込みフォーム：https://forms.office.com/r/F3shqsN7zY
Email: media@adm.isct.ac.jp
TEL: 03-5734-2975　FAX: 03-5734-3661