

特集

遺伝性神経変性疾患のゲノム医療

佐橋 健太郎* 勝野 雅央**

内容紹介

選択的に中枢神経系細胞の一群が侵される変性疾患において、病態メカニズムの解明に至らないケースであっても、中心となる原因遺伝子や疾患修飾遺伝子の同定を通じ、その由来遺伝子産物である RNA、タンパク質への直接的な治療アプローチが可能となる。脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) は、下位運動ニューロンが進行性に変性・脱落する予後不良の遺伝性疾患である。

近年、SMA に対し、アンチセンス核酸や低分子化合物による mRNA 治療、アデノ随伴ベクターによる遺伝子補充療法が確立され、臨床試験において運動機能・寿命に対する明確な改善効果が示されている。特に核酸医薬に関しては、SMA での非臨床・臨床両研究の実績をもとに神経変性疾患に対する治療法開発を加速させ、ゲノム医療の一翼を担っている。

本稿では、核酸治療を中心に SMA 疾患修飾療法について紹介したい。

はじめに

遺伝情報はゲノムの DNA 塩基配列で規定され、タンパク質コード遺伝子では DNA 二本鎖のセン

ス鎖が鋳型となり、配列情報が一本鎖 mRNA 前駆体へと転写される。前駆体はスプライシングを含む RNA プロセッシングにより mRNA となり、核内から細胞質に移動し、コドンがアミノ酸に変換され、タンパク質合成 (翻訳) が起こる。神経変性疾患の多くは孤発性で原因遺伝子が不明であり、根治療法が確立されておらず、生命・機能予後が不良である。

一方、病因となる異常タンパク質・RNA や、遺伝性疾患における原因遺伝子の同定を通じ、標的治療法開発への展開が進められており、その成功のひとつに、脊髄性筋萎縮症の RNA 標的治療と遺伝子治療があげられる。

I. 脊髄性筋萎縮症

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) の 95~98% は、*SMN1* 遺伝子のホモ接合型欠失を含む機能欠失変異を原因とする単一遺伝子疾患であり、ほとんどが *SMN1* mRNA 前駆体のエクソン 7 相当部分のゲノム配列を欠損している。常染色体劣性遺伝形式をとり、欠失の保因者の頻度は、欧米、アジア人種では約 50 人に 1 人と高率であり、発症は出生約 1 万~2 万人に 1 人とされ、乳児死亡最多の遺伝性疾患である。脳幹や脊髄の下位運動ニューロンが障害され、体幹や上下肢の近位筋優位に筋力低下・筋萎縮や球麻痺、呼吸筋麻痺がもたらされる。

神経学的所見として、舌や手指の線維束性収縮・振戦、筋緊張低下、腱反射減弱がみられるのが特徴である。発達成長期に運動機能が悪化しや

—Key words—
脊髄性筋萎縮症, スプライシング, 疾患修飾療法,
アンチセンス核酸, 遺伝子治療, 低分子化合物

* Kentaro Sahashi : 名古屋大学医学部附属病院脳神経内科

** Masahisa Katsuno : 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学

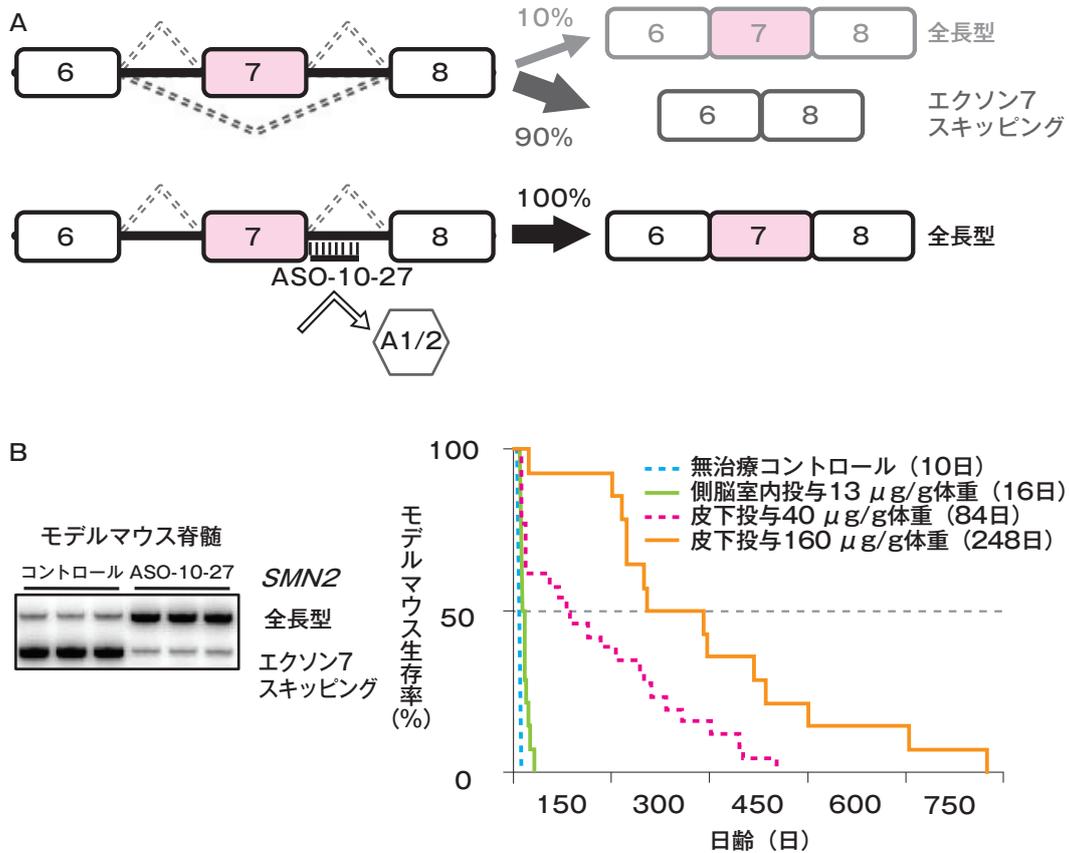


図1 *SMN2* を標的とした核酸治療開発

A: *SMN2* mRNA スプライシング様式(点線)と ASO によるスプライシング是正。ASO-10-27 はイントロン7部分に塩基対結合し、スプライシング抑制トランス因子 hnRNPA1/2 タンパク質の RNA 結合を阻害。四角部分はエクソン、太線はイントロン

B: (左)マウス側脳室内投与 ASO-10-27 による脊髄 *SMN2* スプライシング是正。(右) ASO-10-27 によるモデルマウス延命効果。括弧内日数は生存期間中央値

(文献5より一部改変)

すく、進行に伴い関節拘縮や脊柱変形を合併しやすい。

発症年齢、獲得運動機能により I~IV 型に型分類され、重症の I 型は全体の 6 割を占め、6 カ月齢までに、筋緊張低下、哺乳力や啼泣の減弱、喘鳴などで気づかれ、定頸、寝返りが困難で座位不能である。拘束性換気障害が進行し、1 歳前後で死亡あるいは人工換気管理下となる。II 型は 6~18 カ月齢時に運動発達遅滞で発症し、座位保持を獲得するが立位不能である。成長に伴い、関節拘縮、側弯が著明になり、呼吸機能が低下する。III 型は 18 カ月齢以降に下肢近位筋の筋力低下で発症し、歩行を獲得するが進行により次第に困難

になる。成人期に発症する IV 型では、運動機能の低下の進行は相対的に緩徐であり、通常呼吸機能は保たれる。

SMA は *SMN1* 遺伝子産物である SMN タンパク質(全長型)の欠乏により発症する。進化上、ヒトのみが *SMN1* 重複遺伝子である *SMN2* を有するが、*SMN1* に比し、アミノ酸置換を伴わない一塩基相違(c.840C>T)が、選択的スプライシングによるエクソン7のスキッピングを起こすため、全長型 mRNA の割合が中枢神経系では大幅に減少する(図1)。そのため *SMN2* より、主に切断型 SMN タンパク質(SMNΔ7)の産生につながるが、SMNΔ7 は自身の細胞内局在の異常をきたし、ま

た不安定化により容易に分解される。よって *SMN2* は、*SMN1* 欠失下の全長型 SMN 不足を補填できないが、限定量であるが全長型 SMN を産生するため、疾患修飾因子として働き、*SMN2* コピー数が多いほど軽症化する傾向にある。I 型の 7 割は *SMN2* を 2 コピー、II 型では 8 割が 3 コピー、III 型は通常 3 あるいは 4 コピー、IV 型の多くは 4 コピー以上を有するが、病型間のコピー数の重複もみられ、他の疾患修飾遺伝子の存在が示唆されている。

SMN はすべての真核細胞に発現し、胎生期も含め発達の細胞生存に不可欠であり、*SMN1* 遺伝子は動物種間で保存されている。SMN は、スプライシング反応に携わる低分子リボ核タンパク質 U snRNP の会合や、mRNA 軸索輸送に関わり、SMN 欠乏に伴うスプライシング障害や、軸索内の局所的翻訳障害によるアクチン動態障害などの SMA 病態が提唱されているが、運動ニューロン変性機序は十分に解明されていない。

その一方、SMA では SMN 標的治療介入が可能であり、治療上、SMN 発現回復が必要かつ十分と認められており、スプライシング制御アンチセンス核酸や低分子化合物、遺伝子治療用ウイルスベクターを用いた治療法の確立につながっている。さらに、これら疾患修飾薬に加え、気道クリアランス維持や呼吸補助を含む医療的ケア、ロボットスーツを用いた四肢運動機能の改善療法といったリハビリテーション向上の恩恵もあり、SMA 予後が今後大きく改善することが見込まれている。

II. 治療法開発

1. 核酸医薬

(1) ヌシネルセン

一本鎖アンチセンス核酸(antisense oligonucleotide: ASO)は、DNA、RNA をベースとした、化学修飾された五炭糖、ホスホジエステル結合を有する人工核酸である。生体内核酸に比し、RNA 結合性、ヌクレアーゼ抵抗性、タンパク質結合性が増強され、高い薬理効果、薬物動態(細胞・組織内分布、半減期)、生物学的利用能を獲得することに成功し、

また抗炎症作用など生体における忍容性の確保も得られている。

ASO は、核内・細胞質にて RNA と配列特異的にワトソン・クリック塩基対を形成し、RNase H1 誘導性 RNA 分解や、RNA プロセシング制御(スプライシング、ナンセンス変異依存分解など)、RNA 転写・翻訳制御を介し、RNA 発現コントロールを可能とする。スプライシング制御 ASO は、標的 RNA 結合により、RNA 結合タンパク質や U snRNP といったスプライシングトランス因子の RNA への結合阻害や、RNA 高次構造への作用を通じて効果を発揮する。ASO は一般的に、その大きさや電荷により血液脳関門を通過できないため、中枢神経系に対しては直接投与する必要がある。脳脊髄液内投与された ASO は急速に中枢神経系全体に分布し、ニューロン、グリア細胞内に取り込まれ蓄積する。ASO の投与方法や化学修飾が、ASO 分布、薬理効果を左右するが、中枢神経系での低い ASO 代謝活性や、標的がニューロンなど分裂終了細胞であることも、中枢神経系での薬理効果の長期持続に貢献すると考えられる¹⁾。

SMA に対し、2'-MOE ホスホロチオエート修飾核酸 ASO を用いた、*SMN2* スプライシング治療開発研究が進められ、無細胞スプライシングアッセイ系や培養細胞系におけるスクリーニングにより、*SMN2* mRNA 前駆体イントロン 7 配列の +10-27 位に塩基対形成し、エクソン 7 のスプライシングを効率よく是正する ASO-10-27 が同定された(図 1)。

ASO-10-27 は、スプライシング抑制トランス因子 *hnRNP A1/2* タンパク質のイントロン 7 への結合を阻害し、エクソン 7 組込みを増加させる。続いてモデルマウスへの脳室内投与により、中枢神経組織において *SMN2* 導入遺伝子スプライシングの高い持続的是正が得られ、組織中有効核酸濃度上、単回投与が浸透圧ポンプを用いた持続投与より優れており、濃度半減期は 5 カ月以上と長期であった。また、マウス運動機能、運動器病理および生存期間の改善が示された(図 1)²⁻⁴⁾。さらに、カニクイザルへの腰部髄腔内投与の非臨床安全性薬理試験が行われ、中枢神経系全体の神経細胞へ

の ASO 取り込みが確認され、組織中 50% 効果濃度 (EC50) と各臓器への影響を指標に、臨床試験の投与量が決定されている。

一方、ASO 末梢投与により著明なマウス延命が示され(図 1)、細胞非自律的な脊髄運動ニューロンの変性抑制が認められたことにより、SMA の末梢病態が新たに注目されている^{5,6)}。また、全身状態悪化が *SMN2* スプライシング効率と SMN 発現低下をきたす SMA 進行病態も見出されている^{7,8)}。

非臨床試験に続き、ASO-10-27 (薬剤名ヌシネルセン) は、I 型乳幼児、II～III 型小児患者対象の臨床試験(第 III 相 ENDEAR 試験, CHERISH 試験)で、生命予後、運動機能獲得に対し高い有効性を示し、複合筋活動電位の振幅増加も認められており、中枢神経系の SMN 回復治療が支持された^{9,10)}。また、剖検中枢神経組織における有効 ASO 濃度、*SMN2* スプライシングの改善および脊髄運動ニューロン中の ASO 取り込み、SMN 発現誘導が確認されている^{11,12)}。

ヌシネルセンは 2016 年に、SMA 初の疾患修飾薬としてすべての SMA 患者に対し、米国を端緒に、EU、日本と各国で順次承認され、1.1 万人以上の患者に投与されている。さらに、*SMN2* を 2～3 コピー有する発症前乳児を対象とした介入試験により、早期投与開始のより早急かつ高い治療効果が示され¹³⁾、発症前を含む早期治療のための新生児遺伝子スクリーニング整備の重要性が唱えられている。

ヌシネルセン投与の有害事象として、腰椎穿刺に伴う発熱、頭痛、背部痛、嘔吐があげられるが重篤ではない。また核酸化学修飾に起因する作用として、血小板減少、凝固異常、腎毒性などの注意喚起が成されているが、臨床試験では増加は認められておらず、安全な投与実行性が証明されている^{14,15)}。

(2)ヌシネルセン開発後の課題

ヌシネルセン開発以前は、I 型の生命予後が不良であったことより、現時点の成人患者の多くは II～III 型の進行例である。5 歳以降の思春期発達の運動機能の悪化リスクが高く、また身体発

達・成長に対応できず、関節拘縮、側弯が進行し、II 型は 20 歳までに半数が座位不能となり、III 型は 10 歳までに半数が自力歩行不能となる。II 型成人患者では、骨格筋の高度萎縮、脂肪置換、線維化に加え、四肢関節拘縮、脊柱変形、呼吸・嚥下機能低下による著しい ADL (activities of daily living) 低下がみられやすい。しかし長期経過のもと、多様な症状や重症度を呈する成人期における機能予後などの包括的な把握、追跡は十分にされていない。また治療法開発により、SMA 予後が改善し、今後、成人移行例の増加が予想されるが、長期進行例、高度機能低下例対象の比較試験は行われていない。治療 SMA の 1/3 を成人患者が占めており、治療有益性と治療に伴う合併症リスクの実臨床での検証を通じ、SMA の成人期適正治療に関するエビデンス創出が求められている。

成人 SMA 用の信頼性の高い臨床評価項目のコンセンサスはないが、運動機能評価スケール上、経年的スコア変化が乏しいことより、成人期での比較的安定的な臨床経過が示唆されている。成人 SMA に対するヌシネルセン治療効果に関しては、観察研究にて、特に III 型のスコア改善が報告されているが¹⁶⁾、現行運動機能評価スケールでは、患者個々の臨床的意義のある変化が認識できないケースがあり、またスコアが、関節拘縮、側弯、脊柱固定術、呼吸管理の有無に左右される問題もみられる。慢性進行例では、ADL がきわめて低く、低いスコアの推移や、スコアに反映されるほどの効果が得られにくいことが指摘され、治療効果の見極めのためにも、重症度や薬効判定のためのバイオマーカーの開発が課題である。

軸索マーカーであるニューロフィラメント (neurofilament: NF) の発現上昇は運動ニューロン障害を反映するとされ、I 型乳幼児患者、発症前乳児にて髄液・血中 NF の異常高値が見出されている。またヌシネルセン治療による早急な減少が認められ、重症度、治療反応のマーカー候補として注目されている^{13,17)}。これに対し、II～III 型思春期・成人患者の NF ベースライン値は正常域にあり、治療による有意な NF 変化も認められていない。よって急性な進行を呈する I 型乳幼児期と

異なり、Ⅱ～Ⅲ型成人期は緩徐長期経過のもと、軸索障害マーカー上昇が捉えられない高度の神経変性プロセス後であるため、治療の臨床的効果も限定的となる可能性が示唆される。

一方、生理的 SMN 発現は生後早期までは高く、成人期では低いことが判明しており¹²⁾、Ⅱ～Ⅲ型後期の SMN 必要量の低い背景においては、進行抑制の観点からの SMN 回復治療の評価も重要と考えられる。さらにⅠ型以外の、遅発型の本邦ヌシネルセンレジメンの成人患者に対する有効性確認のためにも、長期継続的な治療効果あるいは限界についての包括的調査が必要である。

2. 遺伝子補充療法

アンチセンス核酸は、内因性 SMN2 mRNA に標的作用するのに対し、直接的な SMN 誘導方法として、ウイルスベクターを用いた外因性の遺伝子補充(導入)療法が開発されている。アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)はパルボウイルス科の非病原性の小型線状一本鎖 DNA ウイルスであり、エンベロープを有さない。クラスリン依存的エンドサイトーシスにより宿主細胞内に移行し、エンドソーム、ライソゾームを經由し核内に入り、カプシド破壊により脱殻し、ゲノムが遊離する。ウイルスゲノムは二本鎖を形成し、宿主染色体ゲノムへの組み込み、あるいは独立して環状エピソームゲノムとなり、遺伝子発現をもたらす。AAV は、複製開始、パッケージング、組み込みに必要な末端逆位配列(inverted terminal repeats: ITR)と、ウイルス増殖に必要な複製、組み込み遺伝子 *rep*、カプシド形成遺伝子 *cap* を有する。

遺伝子治療用の組替え AAV ベクターは、*rep/cap* 遺伝子の除去により、エピソームゲノム形成能を保持するが、染色体ゲノム組み込み、複製、パッケージング機能を欠損しており、非増殖性、低い伝播性となり発がん性がない。機序は不明であるが、末梢投与 AAV は血液脳関門を通過でき、非分裂細胞である神経細胞における長期遺伝子発現を可能とする。カプシドタンパク質形質の違いによる組織指向性により血清型が分かれば、特に AAV9 型は中枢神経系に効率的に遺伝子導入を

可能とし、肝臓、骨格筋、心臓、肺と広範に分布する。

SMA 治療用 AAV は、自己相補型 AAV9 ベクタープラットフォームのもと、転写速度が増加した改変 ITR に置換され、CMV エンハンサーとチキン β アクチンプロモーター下ヒト SMN cDNA (配列非開示)を有し(AVXS-101) (図 2)、強力かつ速やかな SMN 発現能を獲得している。新生仔マウスへの AAV9 ウイルスの静脈内注射により、頸髄から腰髄にかけて高効率の運動ニューロン中の分布が確認され、心臓、骨格筋、後索にも高い集積がみられている。一方、成体マウスへの静脈内注射では、脊髄においては大部分がアストロサイトに取り込まれ、下位運動ニューロンの低い導入効率が判明している¹⁸⁾。

新生仔モデルマウスの治療研究をもとにヒト静注量が決定されており(1.1×10^{14} vg/kg)、6 カ月齢未満のⅠ型や SMN2 を 2~3 コピー有する発症前乳児を対象としたオープン化単一群試験(第Ⅲ相 STRIVE 試験, SPRINT 試験: PNCr, NeuroNEXT の自然歴データ)で、用量依存的な運動マイルストーン達成、延命が示されている。ヌシネルセンに続き、2 歳未満の患者に限定し、遺伝子治療(薬剤名オナセムノゲン アベパルボベク)が、2019 年に米国、続いて日本、EU にて承認を受け、単回の静脈内投与という利便性を有する。

末梢組織において SMN 発現誘導は限定期間とされるが、副作用として、肝機能障害、発熱、血小板減少、嘔吐が主にみられ、投与 1 週間以内に生じやすく、また心筋トロポニン I の一過性増加も報告されている。なお肝機能障害に関して、CD8 陽性 T リンパ球による炎症機序が見出されており、投与前からのステロイド(プレドニゾロン)の継続傾向投与により軽減される。また投与後に抗 AAV9 抗体価上昇がみられるため、免疫原性の中和機能による治療阻害や有害反応惹起の懸念により、AVXS-101 の再投与を含む効果的な AAV ベクター遺伝子治療上、大きな問題となる。AAV は 2 歳前後以降で感染しやすく、抗 AAV9 抗体陽性例(>1:50)は遺伝子導入効率に関わる

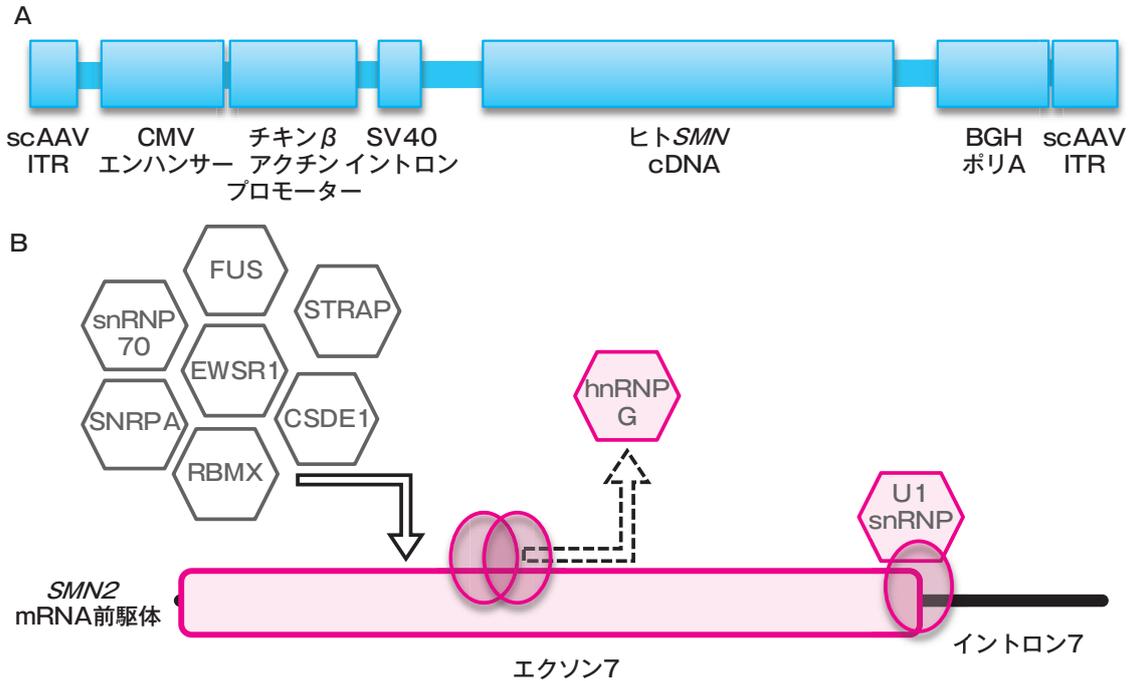


図2 SMN 回復治療戦略

A：自己相補型組換え AAV9 ベクター， AVXS-101 のゲノム構造。内因性 *rep/cap* 遺伝子がヒト *SMN* cDNA 配列に置換

B：SMN-C クラス化合物(楕円)の， *SMN2* エクソン7 スプライシング是正機序。*SMN2* mRNA 前駆体への化合物結合による， U1 snRNP 結合促進および， RNA 結合タンパク質の結合阻害(点線矢印)・誘導(実線矢印)を介した， エクソン7 の組み込み増加

(文献 21 より引用)

可能性があるため，治療対象外とされている。

ニューロン導入効率，抗 AAV 抗体産生，また治療効果度の点より早期治療が重要であるが，高度麻痺や呼吸不全を呈する重症例への効果，SMN 発現誘導や臨床的効果の持続性，SMN 高持続発現の忍容性や遺伝毒性リスク¹⁹⁾ についての長期検証課題が残っている。

3. 低分子化合物

エクソン6，7，8，イントロン6，7およびホタルルシフェラーゼのコード配列から成る，*SMN2* ミニジーンレポーターコンストラクトを恒常発現する HEK293H 細胞を用いて，*SMN2* スプライシングを改善する低分子化合物(約2万種化合物のライブラリ利用)のハイスループットスクリーニングが施行され，レポーター発現上昇のみられた約2千ものヒット化合物が検出された。

続いて，RT-qPCR，RT-PCR，再レポーターアッ

セイおよび効力，医薬品化学上の追加検証が行われ，効率的に *SMN2* スプライシング是正，SMN 発現を誘導する経口投与可能な化合物(SMN-C クラス)が同定された。効果は，患者皮膚線維芽細胞，iPS 細胞由来分化運動ニューロンにおいて用量依存的に示され，オフターゲットの遺伝子発現やスプライシングへの影響はごく限られていた。モデルマウスへの新生仔期からの腹腔内注射と続く経管投与により，中枢神経系，骨格筋組織での *SMN2* スプライシング是正および，運動も含めた発達と寿命の改善が示され²⁰⁾，臨床試験へ展開している。

SMN-C クラス化合物はP-糖タンパク質やBRCP 基質ではないため，高い細胞内取り込み能を有し，構造上，塩基性減少や脂溶性調整により薬物動態が改良され(定常状態分布容積縮小，分布向上)，リン脂質症，hERG チャンネル相互作用

といった副作用が抑制されている。モノオキシゲナーゼである FMO1, FMO3 により主に分解され、FMO3 活性が高い 2 カ月齢以降に投与適応とされる。また、代謝物の活性がないことが確認されている。作用機序として、SMN2 エクソン 7 の 5' スプライス部位-U1 snRNA 相互作用部位や、エクソン 7 内スプライシングエンハンサー配列への直接結合による U1 snRNP 結合促進、スプライシングトランス因子である RNA 結合タンパク質 (hnRNPG など) のエクソン 7 の結合制御が、SMN2 スプライシング制御の選択性に寄与することが報告されている (図 2)²¹⁾。

候補選択的スプライシング修飾剤 (薬剤名リスジプラム) の非臨床試験では、薬物の、中枢神経系と骨格筋の組織中濃度と血清中濃度の高い相関および良好な組織浸透、かつ効率的な SMN 発現誘導が確認されている。また経口リスジプラムの臨床試験は、乳児から成人にわたり、関節拘縮・側弯合併例を含む症状・運動機能が異なる幅広い患者層に対し、臨床的意義のある生命予後、運動機能獲得の有効性および安全性を示している (第 II / 第 III 相, I 型乳児対象 FIREFISH 試験, 小児~成人対象 SUNFISH 試験)。これら 2 試験の結果をもとに、2020 年に米国, EU にて承認を受けている。1 日 1 回の経口投与薬であり、主な副作用として、発熱, 下痢, 発疹があげられている。リスジプラムの組織中濃度は、腎, 脾, 肝, 肺, 骨髄, 脾で高く、末梢効果および下位運動ニューロン変性以外の病態検証, 中枢神経系・末梢病態を反映する疾患バイオマーカーの開発が望まれる。

おわりに

近年、薬物動態および薬力学的に優れた ASO が開発され、標的 RNA スプライシング制御や分解の効能により、核酸治療研究における有用性が高くなっている。特に 2'-MOE/ホスホロチオエート修飾核酸が、中枢神経組織内での効率的かつ持続的な遺伝子発現制御を可能にし、同時に高い生体忍容性・安全性を獲得する特徴が明らかとなっている。さらに明確な臨床的効果をもたらしたヌシネルセン治療研究の経験より、ASO を用いた

中枢神経病態治療への活用の際、基礎研究成果から比較的迅速に臨床試験に結びつき、創薬につながることを期待できる。

Duchenne 型ジストロフィーの ASO 医薬開発の成功も続き、現在さまざまな予後不良の遺伝性神経変性・筋疾患に対し、ASO による RNA 分子標的治療の臨床試験が行われており、核酸治療がゲノム医療として筆頭のひとつに立っていると見える。また、中枢神経系に対する遺伝子治療や低分子化合物による選択的スプライシング制御治療についても、今後 SMA における長期的な効果・安全性などに関するリアルワールドエビデンスの蓄積が、ゲノム医療開発を推進する重要な役割を担うことが期待される。

利益相反

本論文に関して、筆者らが開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Bennett CF, et al : Antisense oligonucleotide therapies for neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 2019 ; **42** : 385-406.
- 2) Hua Y, et al : Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 2010 ; **24** : 1634-1644.
- 3) Passini MA, et al : Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2011 ; **3** : 72ra18.
- 4) Rigo F, et al : Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2014 ; **350** : 46-55.
- 5) Hua Y, et al : Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 2011 ; **478** : 123-126.
- 6) Hua Y, et al : Motor neuron cell-nonautonomous rescue of spinal muscular atrophy phenotypes in mild and severe transgenic mouse models. *Genes Dev* 2015 ; **29** : 288-297.
- 7) Sahashi K, et al : TSUNAMI : an antisense method to phenocopy splicing-associated diseases in animals. *Genes Dev* 2012 ; **26** : 1874-1884.
- 8) Sahashi K, et al : Pathological impact of SMN2 mis-splicing in adult SMA mice. *EMBO Mol Med* 2013 ; **5** : 1586-1601.
- 9) Finkel RS, et al : Nusinersen versus Sham Control in

- Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017 ; **377** : 1723-1732.
- 10) Mercuri E, et al : Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2018 ; **378** : 625-635.
 - 11) Finkel RS, et al : Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen : a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 2016 ; **388** : 3017-3026.
 - 12) Ramos DM, et al : Age-dependent SMN expression in disease-relevant tissue and implications for SMA treatment. *J Clin Invest* 2019 ; **129** : 4817-4831.
 - 13) De Vivo DC, et al : Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy : Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord* 2019 ; **29** : 842-856.
 - 14) Wadman RI, et al : Drug treatment for spinal muscular atrophy type I. *Cochrane Database Syst Rev* 2019 ; **12** : CD006281.
 - 15) Wadman RI, et al : Drug treatment for spinal muscular atrophy types II and III. *Cochrane Database Syst Rev* 2020 ; **1** : CD006282.
 - 16) Hagenacker T, et al : Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy : a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *Lancet Neurol* 2020 ; **19** : 317-325.
 - 17) Olsson B, et al : NFL is a marker of treatment response in children with SMA treated with nusinersen. *J Neurol* 2019 ; **266** : 2129-2136.
 - 18) Foust KD, et al : Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 2009 ; **27** : 59-65.
 - 19) Nguyen GN, et al : A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat Biotechnol* 2021 ; **39** : 47-55.
 - 20) Naryshkin NA, et al : Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 2014 ; **345** : 688-693.
 - 21) Sivaramakrishnan M, et al : Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Commun* 2017 ; **8** : 1476.