

# Duchenne 근디스트로피의 치료에 대한 고찰

연세대학교 의과대학 신경과학교실

박형준 최영철

## Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: A Comprehensive Review

Hyung Jun Park, MD, Young-Chul Choi, MD, PhD

*Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disorder due to the loss of dystrophin in muscle fiber. The deficiency of dystrophin produces severe progressive muscle degeneration which leads to progressive muscle weakness. Affected patients usually become unambulatory in their early teens, and suffer a respiratory failure before 20 years of age. In an attempt to improve quality of life and extend life span of DMD patients, various treatments have been challenged; corticosteroid trial, rehabilitation, cardiac and pulmonary managements, orthopedic interventions, and nutritional support. However, only corticosteroid therapy and non-invasive ventilation have shown a salutary effect on the clinical course of DMD. Recently, a better understanding of the DMD pathophysiology has provided the scientific basis for new treatment modalities including cell and molecular therapy. Although previous clinical trials have demonstrated the limitation and possibility of new therapies, antisense-mediated exon skipping technology is now emerging as a promising approach to restore dystrophin expression. This article summarizes the current challenges and recommendations of treatment approaches in DMD patients.

J Korean Neurol Assoc 30(4):257-266, 2012

**Key Words:** Cell therapy, Corticosteroids, Duchenne muscular dystrophy, Gene therapy

### 서 론

Duchenne 근디스트로피(DMD)는 근육섬유의 디스트로핀(dystrophin)결핍으로 인해 발생하는 성염색체열성 근육질환이다. 디스트로핀단백질은 근육섬유의 근육속막(sarcolemma)아래에 위치하여 주변 단백질들과 함께 디스트로핀-당단백질 복합체(dystrophin-glycoprotein complex)를 형성하고 다음의 기능을 담당한다.<sup>1</sup> 첫째, 세포외바탕질(extracellular matrix)과 세포질세포골격(cytoplasmic cytoskeleton)을 결합시켜서 근육섬유가 수축하거나 늘어날 때 세포막을 강화시킨다. 둘째, 세포외바탕질의 신호를 근육섬유 내부로 전달한다. 셋째, 신경단위의 산화질

소합성효소(nitric oxide synthase)와 관련하여 근육 내의 미세순환(microcirculation)을 조절한다. DMD 환자들은 3세 전후에 하지 근위부의 근력저하가 시작되고, 10대가 되면 독립보행이 어려워져서 20대 중후반에 호흡부전이나 심근병증으로 사망하게 된다.<sup>1</sup> DMD의 발병률은 출생남아 3,500명당 1명꼴로 근디스트로피 중에서 가장 높다.<sup>2</sup> 이것은 디스트로핀유전자가 79개의 엑손(exon)을 갖는 2.4Mb의 DNA로 크기가 다른 유전자들에 비해 90배 이상 큰 것과 관련이 있다.<sup>3</sup> DMD환자의 진단은 면역조직화학염색이나 웨스턴블롯검사(Western blot)를 통해 디스트로핀단백질의 발현여부를 확인하거나 유전자이상을 직접 규명하여 이루어진다.<sup>1</sup> 각각의 장단점이 있지만, 단백질의 발현의 확인을 위해서는 근육생검이 필요하므로 최근에는 일차적으로 유전자검사법을 사용한다. 유전자검사법으로는 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR), 서던블롯검사(Southern blotting), 다발중합효소연쇄반응(multiplex PCR), 복합증폭프로브교배법(multiplex amplifiable probe hybridization, MAPH), 복합결찰의존프로브증폭법(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

Received July 6, 2011 Revised August 22, 2011

Accepted August 22, 2011

\* Young-Chul Choi, MD, PhD

Department of Neurology, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea

Tel: +82-2-2019-3323, 3320 Fax: +82-2-3462-5904

E-mail: ycchoi@yuhs.ac

등이 있다. 특히 MLPA방법은 비교적 간단한 검사방법임에도 DMD환자의 55-65%가 갖는 결손(deletion)이나 5-10%가 갖는 중복(duplication)돌연변이를 찾을 수 있고, 보인자에 대한 진단도 가능하여 널리 사용된다. 그러나 DMD 환자의 20-30%가 갖는 점돌연변이(point mutation), 미세삽입(microinsertion), 미세결손(microdeletion) 등의 작은 변이는 확인할 수가 없다. 현재까지 DMD 환자의 원인돌연변이를 복구시키는 치료법은 없다. 다만 수명연장과 삶의 질 개선을 위해서 약물치료와 증상완화 치료법이 시행되고 있다. 그러나 디스트로핀유전자가 발견된 이후로 현재까지 유전자결합을 교정하기 위한 세포치료 및 분자치료를 위한 연구가 진행되고 있어서 향후 긍정적인 치료법의 개발이 기대된다. 본 종설에서는 DMD 환자에 대한 현재의 치료 권고사항과 새롭게 시도되는 세포 및 분자치료의 가능성과 한계점을 정리하였다.

## 본 론

DMD의 치료법을 접근방법에 따라서 증상완화치료와 약물 치료 그리고 세포치료와 분자치료로 나누어 정리하였다.

### 1. 증상완화치료(palliative therapy)

환자에게 실질적으로 삶의 질 향상 및 생명 연장을 제공하는 치료법이다.

#### 1) 운동과 물리치료

DMD 환자를 위한 적절한 운동의 종류와 강도 및 빈도는 아직 정해지지 않았다.<sup>4</sup> 일부 학자들은 보행가능 시기까지 준최대(submaximal) 강도의 유산소운동의 필요성을 강조하지만, 다른 학자들은 과도한 근육사용이 근육괴사를 초래한다고 주장한다. 일반적으로 수영은 물의 부력 때문에 적은 힘으로도 유산소운동과 호흡운동을 같이 할 수 있어서 DMD 환자에게 추천되고 있다. 그러나 운동 후 하루 이내에 미오글로빈뇨(myoglobinuria)나 심한 근육통이 발생한다면 과도한 운동이기 때문에 운동량을 줄여야 한다. 또한 일주일에 4-6일 정도의 신전운동(stretching exercise)은 관절의 구축을 예방하고 구축의 정도를 감소시켜준다.

#### 2) 척추측만증(scoliosis)의 관리

DMD 환자에서 척추측만증은 일반적으로 보행이 불가능해진 후에 나타나서 폐를 압박하고 호흡기능을 감소시킨다. 척추측만증은 스테로이드치료를 받지 않은 DMD 환자의 90%에서 관찰된다.<sup>5</sup> 후방척추융합술은 척추측만증을 갖는 DMD 환자에

서 척추를 펴주어서 통증을 완화시키고 폐활량이 늘려준다.<sup>5,6</sup> 후방척추융합술의 적응증은 스테로이드 복용여부에 따라서 달라진다. 스테로이드치료를 받지 않은 환자에서는 보행이 불가능하고, 척추의 성장이 끝났으며, 콕의 각도(Cobb's angle)가 20도 이상인 경우가 적응증이 된다.<sup>5,7</sup> 그러나 스테로이드치료를 받는 환자에서는 척추의 성장여부와 상관없이 척추측만증이 계속 진행하거나, 척추골절 및 통증이 있는 경우가 적응증이 된다. 후방척추융합술을 위해서는 최소 2달 이내에 호흡기와 심장에 대한 평가를 하고 수술 전후의 관리가 필요하다.

### 3) 호흡관리

초기 호흡장애 때 야간 저환기(nocturnal hypoventilation)로 환자들은 악몽, 주간 졸림, 두통, 불면증, 아침의 혼돈상태 등을 호소한다. 그러나 대부분의 DMD 환자는 객담배출이 어려워지고 지속적인 기침이나 폐렴을 보일 때까지 호흡장애를 느끼지 못한다. 따라서 초기 호흡장애 증상에 관심을 갖고 주기적인 호흡기능의 평가와 관리가 필요하다(Table 1). 실제로 호흡장애가 있는 DMD 환자에서 비침습양압환기(non-invasive positive pressure ventilation) 또는 기침보조기(assisted cough device)는 삶의 질을 향상시켜준다.<sup>8</sup> 효과적인 객담제거가 안되면 무기폐와 폐렴의 위험이 있기 때문에, 객담제거에 어려움을 겪은 적이 있거나 최고기침유량(peak cough flow)이 270 L/min 또는 최대 호기압(maximal expiratory pressure)이 60 cmH<sub>2</sub>O보다 낮으면 기침보조기를 사용한다. 수면무호흡이 있다면 야간 비침습양압환기를 사용하게 되는데, 사용시기 결정을 위해서 수면다원검사도 도움이 된다. 각성 시에도 P<sub>CO2</sub>의 값이 50 mmHg를 초과하거나 산소포화농도가 92% 이하가 되면 주간 비침습양압환기 사용이 필요하다. 지속적인 기계환기가 필요하게 되면 기관절개술을 시행한다. 단순히 호흡근육 약화뿐만 아니라 척추측만증이나 흡인폐렴에 의한 이차문제에 의해서도 호흡장애가 생길 수 있다. 따라서 모든 DMD 환자는 폐구균백신과 독감백신접종 및 호흡기감염이나 척추측만증에 대한 적극적인 치료가 필요하다.

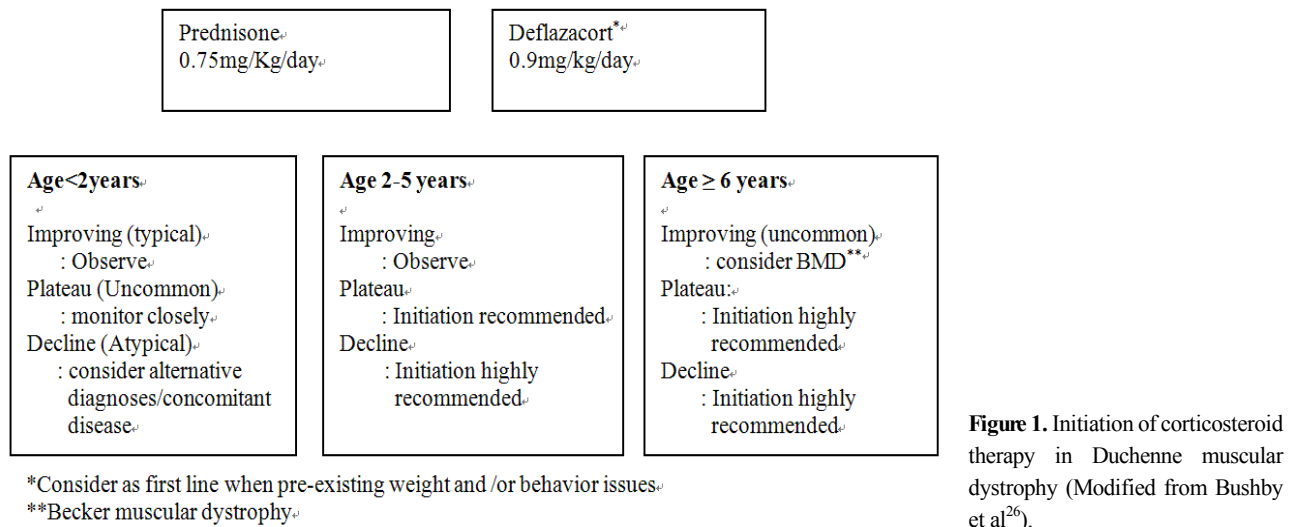
### 4) 심장관리

주로 동반되는 심장질환은 심근병증과 부정맥이다.<sup>9</sup> 심근병증은 현재 DMD 환자의 가장 높은 사망원인이다.<sup>10</sup> 심부전의 증상은 초기에는 수면장애, 피로, 체중감소, 구역, 복부통증, 일상생활의 장애로 나타난다. 그러나 DMD 환자는 기본적인 근골격계 문제가 있어서 위의 증상들을 심근병증으로 인식하지 못해서 심부전이 진행된 후 갑작스럽게 발견하는 경우가 대부분이다.<sup>9</sup> 심근병증이 진행된 후 치료하게 되어서 예후가 좋지 않다.

**Table 1.** Respiratory assessment of DMD patients (Modified from Bushby et al.)<sup>71</sup>

Patients status	Recommended measurements	Frequency
Ambulatory and age 6 yr older	1. Sitting FVC	At least annually
Non-ambulatory	1. Oxyhemoglobin saturation by pulse oxymetry 2. Sitting FVC 3. Peak cough flow 4. Maximum inspiratory and expiratory pressures	At least every 6 mon
Non-ambulatory and any of the following: - Suspected hypoventilation - FVC < 50% predicted - Current use of assisted ventilation	1. Awake end-tidal CO2 level by capnography	At least annually

FVC; forced vital capacity.



**Figure 1.** Initiation of corticosteroid therapy in Duchenne muscular dystrophy (Modified from Bushby et al<sup>26</sup>).

따라서 정기적인 심장기능에 대한 검진이 필요하다. 정기검진으로 심초음파검사와 심전도검사를 처음 진단 시, 10세 이전까지는 2년에 한 번씩, 10세 이후로는 매년 한 번씩 시행하는 것이 필요하다.<sup>11</sup> 심근병증의 약제로 엔지오텐신전환효소억제제를 일차치료제로 사용하고, 베타차단제 및 이노제를 이차치료제로 사용한다. DMD 환자의 대부분이 동성빈맥(sinus tachycardia)을 갖지만 뚜렷한 원인 없이 갑자기 나타난 경우에는 좌심실기능을 포함하여 심장기능에 대한 재평가가 필요하다.

**5) 보조기사용**

보행이 가능한 시기에 수면 중 단하지보조기(ankle-foot orthoses)를 착용하면 아킬레스건의 단축을 방지하여 삶의 질을 높여준다.<sup>12,13</sup> 보행이 불가능한 시기라도 단하지보조기를 사용한 발의 기형 및 구축을 늦춰준다. 장하지보조기(knee-ankle-foot orthoses)의 사용도 DMD 환자에서 관절의 구축을 줄여서 환자의 보행을 돕긴 하지만 실질적인 보행시기의 연장의 근거는 아직 없다.<sup>14</sup>

**6) 식이**

DMD 환자는 적은 운동량 때문에 비만이 되기 쉽다. 특히 스테로이드치료를 받는다면 체중증가가 더욱 심해져서 칼슘 및 비타민D의 보충과 칼로리조절과 저염식단이 필요하다.<sup>8</sup> 연하곤란이 있을 때는 비디오투시검사(video-fluoroscopy)를 통한 평가가 필요하며 구강섭취가 곤란하다면 위조루술(gastrostomy)이 필요하다.

**2. 약물치료**

**1) 스테로이드**

스테로이드는 현재까지 연구된 약제들 중 근력약화의 진행을 늦추고 척추측만증의 유병률을 감소시키며 폐 기능을 유지시켜 주는 유일한 약제이다.<sup>15-18</sup> 심부전에도 효과가 있다는 보고도 있으나 연구가 더 필요하다.<sup>17,19</sup> 스테로이드치료는 DMD 환자의 근력변화를 향상기, 안정기, 감소기로 구분할 때 안정기에 시작한다(Fig. 1). 안정기는 일반적으로 4-8세 사이에 수개월 나

타난 후 감소기로 전환되기 때문에 병력청취와 시간측정검사 (timed testing)<sup>20,21</sup> 등을 통해 주의 깊게 관찰해야 한다. 스테로이드를 향상기 때부터 사용하자는 주장도 있으나, 조기사용 시 장점이 단점보다 많다는 보고는 없다. 프레드니손(prednisone) 0.75 mg/kg 또는 데플라자코르트(deflazacort) 0.9 mg/kg을 매일 사용시 대조군보다 효과가 있었다.<sup>22-24</sup> 그러나 프레드니손을 1.5 mg/kg사용할 경우와 0.75 mg/kg 사용할 경우는 큰 차이가 없었다.<sup>25</sup> 또한 프레드니손을 0.3 mg/kg로 감량하였을 때 근력향상은 감소하지만 대조군 보다 여전히 효과적이었다.<sup>8</sup> 이를 토대로 프레드니손 0.75 mg/kg용량으로 치료를 시작하였다가 부작용이 있을 시 0.3 mg/kg까지 감량하는 것이 권고되고 있다(Fig. 2).<sup>26</sup> 스테로이드를 중단시점에 대한 지침은 없으나, 대체로 보행이 가능한 시기 동안만 사용한다. 그러나 몇몇 학자들은 보행이 불가능한 시기에도 스테로이드를 계속 사용하면 상지 근력 유지 해주고, 척추측만증 진행감소와 심폐능력 감소를 지연시킨다고 보고하였다.<sup>17</sup> 따라서 중단시점에 대한 추가 연구가 필요하다. DMD 환자에서 스테로이드 치료효과의 기전이 일부 알려져 있다(Table 2).<sup>15</sup> 이러한 효과에도 불구하고 스테로이드는 부작용이 잘 알려진 약제이므로 치료를 시작하기 전에 환자와 가족들에게 이에 관한 충분한 설명이 필요하다.

2) 다른 약제들

크레아틴(creatine)은 mdx 생쥐(mouse)를 이용한 실험에서 근

육괴사를 줄이고, 근육재생을 증가시키는 효과를 보였으나, 사람을 대상으로 한 무작위 대조연구에서는 효과가 없었다.<sup>27</sup> 보조효소Q10(coenzyme Q10), 카르니틴(carnitine), 글루타민(glutamine), 아르지닌(arginine), 페린도프릴(perindopril), 로사탄(losartan) 등의 약제도 동물실험에서 가능성을 보여서 임상시험을 했거나 진행 중이지만 아직 그 효과가 입증된 것은 없다.<sup>8,26</sup>

3. 세포치료 및 유전자치료

1) 세포치료

근육줄기세포인 위성세포(satellite cell)는 근육세포의 기저판(basal lamina) 아래에 발현이 정지된 상태로 존재한다. 근육이 손상되면 위성세포가 활성화되어 근육모세포(myoblast)로 분화되고 다시 근육세포로 분화되어 근육재생이 이루어진다. 그러나 위성세포는 수가 한정되어 있어 나이가 증가함에 따라서 감소한다.<sup>28</sup> 특히 DMD 환자는 근육의 괴사와 재생이 일찍부터 반복되기 때문에 위성세포는 조기에 소실되어 근육재생능력이 사라진다.<sup>29</sup> 세포치료란 손상된 근육에 근육세포로 발현 가능한 전구세포(precursor cell)를 주입함으로써 결핍된 단백질이나 유전자를 제공하거나 재생능력을 높이는 것을 일컫는다. 그러나 아직까지 사람을 대상으로 기대할만한 치료효과를 얻지는 못하고 있다. 세포치료를 위한 이상적인 전구세포의 특징을 Table 3에 정리하였다.

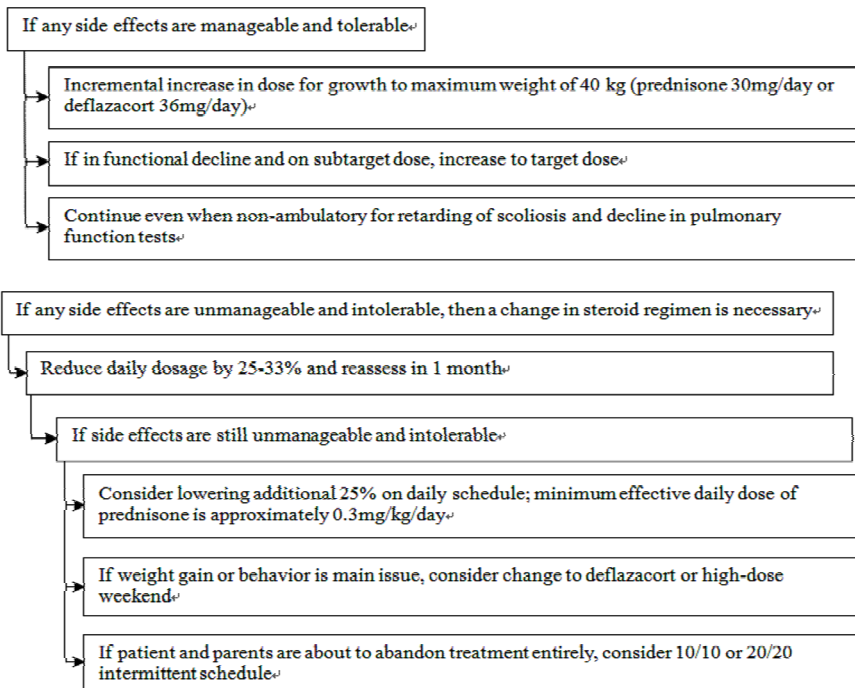


Figure 2. Management of corticosteroid therapy in Duchenne muscular dystrophy (Modified from Bushby et al<sup>26</sup>).

(1) 근육모세포(myoblast)

근육 내에 존재하는 위성세포를 사용하는 것이 가장 이상적이지만 현재는 가능하지 않다. 따라서, 위성세포가 분화되어 생기는 근육모세포로 많은 실험을 하고 있다. 정상 디스트로핀을 갖는 근육모세포를 주입 후 mdx 생쥐의 근육세포에서 디스트로핀이 발현되었다.<sup>30</sup> 그러나 이를 근거로 시행한 임상시험에서는 의미 있는 결과를 얻지 못하였다.<sup>31,32</sup> 실패의 원인으로 첫째 근육모세포의 생체 내 생존율이 낮아 대부분 주입 후 하루 만에 죽는다.<sup>33</sup> 이러한 현상에는 괴사(necrosis), 세포자멸사(apoptosis) 및 비특이 면역반응이 관여하는 것으로 추정된다. 둘째, 근육모세포를 근육주사로 주입하면 확산되는 범위가 제한적이다.<sup>34</sup> 확산 범위를 넓히기 위한 방법으로 동맥에 근육모세포를 주입하는 방법을 시도하였으나 내피혈관장벽을 통과하지 못하였다.<sup>35</sup>

(2) 골격근 내의 다른 줄기세포

근육에는 위성세포를 제외하고도 근육으로 발현할 수 있는 근육유래줄기세포(muscle-derived stem cell), 근육측모집단세포(muscle side population cell), 근육내피세포(myogenic endothelial cell) 등의 줄기세포가 존재한다. 이들 중 세포치료에 가장 유망한 세포는 중간혈관모세포(mesoangioblast)와 AC133+ 세포이다. 중간혈관모세포는 근육뿐만 아니라 많은 기관의 말초혈관 및 모세혈관주변에 존재한다. 이 세포는 정상적으로도 모세혈관의 수축력조절 및 혈관생성을 담당하고 있어서 혈관장벽을 투과하여 근육까지 도달하는 확산능력이 매우 높다. mdx 생쥐와 골든리트리버근디스트로피개(golden retriever muscular dystrophy dog)에서 렌티바이러스(lentivirus)를 매개체(vector)로 최소디스트로핀(mini-dystrophin) 또는 미세디스트로핀(micro-dystrophin)을 중간혈관모세포에 주입한 후 동맥주사 하였을 때 근력이 향상되었으며,<sup>35,36</sup> 이에 따른 제1차 임상시험이 계획되고 있다. AC133+ 세포는 CD133<sup>+</sup>의 표지인자를 갖는 근육과 말초혈액에 존재하는 줄기세포로 그 기능은 아직 밝혀지지 않았다. 그러나 엑손 스킵핑(exon skipping) 방법으로 디스트로핀을 발현시킨 DMD 환자의 AC133+ 세포를 mdx 생쥐에 동맥주사 하였을 때 mdx 생쥐의 근육에서 사람의 디스트로핀이 발현되었다.<sup>37</sup> 그러나 AC133+ 세포를 순수하게 모으는 것이 힘들고 시험관내(in vitro)에서 증식이 잘되지 않는 한계점이 있다.

(3) 골수 또는 혈액에서 유래된 줄기세포

골격근 내 줄기세포는 근육조직검사를 하여 줄기세포를 얻어야 하기 때문에 침습적이며 근육질환이 진행된 상태에서는 좋은 줄기세포를 얻기 힘들다. 그래서 골수와 혈액의 줄기세포를 이용하게 되었다. 실제로 12세 DMD 환자가 골수이식을 받은

후 근육생검을 하였더니 전체 근육세포의 0.5%에서 공여자의 핵이 발견되었다는 보고가 있다.<sup>38</sup> 그러나 이들 줄기세포는 근육세포로의 발현율이 매우 낮다. mdx 생쥐에게 골수유래의 줄기세포를 이식했을 때 줄기세포가 근세포로 되는 양도 적고,<sup>39</sup> 분화된 근육세포 내 디스트로핀의 발현율도 낮았다.<sup>40</sup>

(4) 다른 기관의 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)

근육 이외의 다른 기관에 존재하는 중간엽줄기세포도 세포치료에 사용할 수 있다. 이 세포는 여러 장기에서 얻을 수 있고 시험관내에서 쉽게 증식시킬 수 있지만 근육세포로 분화하는 비율은 낮다. 그러나 근육세포로 분화되지 않더라도 세포외바탕질분자(extracellular matrix molecule)를 생산하거나 염증을 감소시켜 근육을 재생시킬 수 있기 때문에 가능성은 열려있다.<sup>41,42</sup>

(5) 다능줄기세포(pluripotent stem cell)

배아줄기세포(embryonic stem cell)는 모든 세포로 분화가 가능하기 때문에 초기 세포치료 연구부터 많은 관심을 받아왔다. 그러나 이 세포의 이용에는 몇 가지 어려운 점이 있다. 첫째, 모든 조직으로 분화가 가능한 배아줄기세포를 근육세포로만 선택 발현시켜야 한다. 둘째, 높은 분화능력 때문에 종양으로 발현될 수도 있다. 셋째, 사람의 배아를 사용하는 연구는 윤리적인 문제가 있다. 윤리적 문제를 피하기 위해서 체세포에서 인위적으

**Table 2.** Several hypotheses on the biologic effect of corticosteroid for muscular dystrophy

Altering the mRNA levels of structural, signaling and immune response genes
Reducing cytotoxic T-lymphocyte
Lowering calcium influx and concentration
Increasing laminin expression and myogenic repair
Retarding muscle apoptosis and cellular infiltration
Enhancing dystrophin expression
Affecting neuromuscular transmission
Protecting against mechanically induced fiber damage
Slowing the rate of skeletal muscle breakdown

**Table 3.** The characteristics of the ideal candidate for cell therapy

Be expandable in vitro without losing stem cell properties.
Be immune-privileged.
Be systemically-deliverable, as the majority of the skeletal muscles in the body are affected.
Survive, proliferate and migrate upon arrival within host muscle.
Differentiate into muscle fibers either to repair damaged fibers or to replace fibers.
Reconstitute the satellite cell pool with functional stem cells.
Be capable of expressing dystrophin once they have contributed to muscle.
Lead to improvement in muscle strength.

로 유도되었지만 배아줄기세포와 비슷한 특징을 갖는 다능줄기세포(induced pluripotent stem cell)가 주목을 받고 있다. 쥐의 배아줄기세포를 mdx 생쥐에 이식하였을 때 종양의 발현 없이 안착하였다는 보고가 있다.<sup>43</sup> mdx 생쥐에서 위성세포와 유사하게 유도시킨 다능줄기세포로 골격근을 재생시켰다는 보고도 있다.<sup>44</sup>

2) 분자치료

분자치료는 질병의 원인이 되는 분자적 결손을 교정하는 치료방법을 일컫는다.<sup>1</sup> 이를 위해서는 원인유전자의 규명과 병태생리학에 대한 연구가 선행되어야 하고, 잠재적 위험성 때문에 치료의 위험성과 이득을 평가하여 이루어져야 한다. 이러한 점에서 원인유전자가 알려져 있지만, 예후가 몹시 불량하고 완치법이 없는 DMD는 분자치료연구의 좋은 대상이어서, 초기부터 현재까지 꾸준히 연구되고 있다. DMD의 유전자 교정을 포함하여 전령RNA (messenger RNA, mRNA)의 전사 및 번역단계의 조절, 유사단백질의 과발현, 근육성장억제유전자의 억제 등 다양한 측면에서 연구가 되고, 실제로 엑손 스킵 방법은 제3차 임상시험이 시행되고 있다.

(1) 유전자치료

유전자치료는 손상된 디스트로핀유전자를 직접 교정하는 가장 이상적인 치료로 분자치료 연구가 시작된 1990년대부터 큰 관심을 받아왔다. 그러나 심한 면역반응과 중증복합면역결핍(severe combined immunodeficiency)으로 인한 사망 예가 보고되면서 그 위험성 역시 알려져 있다. 디스트로핀유전자의 크기 때문에 인트론(intron)을 뺀 후 엑손(exon)만을 조합한 상호보충 DNA (complementary DNA)인 전장디스트로핀DNA (full-length dystrophin DNA)를 사용하는 것이 정상 디스트로핀단백질의 발현을 이끌어내는 최상의 치료방법으로 알려져 있다. 그러나 전장디스트로핀DNA도 11 kb로 크기 때문에 비록 부분적인 기능만 갖더라도 크기가 작은 유전자를 만들어 주입하는 방법들이 많이 연구되고 있다. 예를 들어 디스트로핀유전자에서 막대영역(rod domain)의 스펙트린 유사반복(spectrin-like repeat)은 원래는 24번 반복되는 형태이다. 이 반복되는 구조로 줄여 최소 디스트로핀으로 만들 수 있고, 다시 C말단부(C-terminal part)를 제외하면 미세디스트로핀을 만들 수 있다. 유전자치료는 유전자를 생체 내로 주입하는 방법에 따라 바이러스를 매개하는 방법과 바이러스 매개 없이 직접 주입하는 방법으로 나누어진다.

ㄱ. 바이러스를 매개하는 방법

바이러스의 인체에 대한 감염력을 이용하는 방법으로 다양한

바이러스매개체를 사용 가능하나 아데노바이러스(adenovirus)와 아데노관련바이러스(adeno-associated virus, AAV)와 레트로바이러스(retrovirus)가 주로 연구되었다. 그러나 아데노바이러스는 일반적인 사람의 절반에서 아데노바이러스 캡시드(adenoviral capsid)에 대한 중화항체가 있어서 효용성이 떨어지고, AAV와 레트로바이러스에 비해 면역반응이 심하게 유발되기 때문에 최근에는 AAV와 레트로바이러스가 주로 사용된다. AAV중 근육유전자치료에는 AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9이 주로 이용된다. 미세디스트로핀을 AAV1이나 AAV2를 이용하여 mdx 생쥐의 근육에 주사하였을 때 치료받은 근육의 80% 이상에서 디스트로핀이 관찰되는 결과가 보고되었다.<sup>45</sup> 그러나 작은 설치류와 달리 큰 포유류와 사람에서는 다양한 면역반응으로 인해 발현율이 낮았다. 실제로 AAV 매개체를 이용하여 미세디스트로핀을 주입했던 여섯 명의 DMD 환자에서 골격근 내의 디스트로핀단백질의 발현을 확인할 수 없었다.<sup>46</sup> AAV를 이용한 유전자치료는 수정된 디스트로핀의 삽입 외에도 엑손스킵현상을 유발시키거나 미오스타틴(myostatin)의 억제 유전자를 삽입하는 방법도 있다. 그러나 AAV를 매개로 한 치료는 아직 동물실험에서만 효과를 보였고, 수정된 유전자를 장기간 발현시키는 방법과 캡시드(capsid)의 인체면역반응에 대한 연구도 부족하여 더 많은 근거가 필요하다. 레트로바이러스의 일종인 렌티바이러스를 이용하여 미세디스트로핀을 삽입하는 방법도 활발히 연구되고 있다. 이 방법도 mdx 생쥐를 대상으로 하는 실험에서는 고무적인 치료성적을 보였지만, 개나 사람을 대상으로 한 연구는 아직 없고 종양유발의 가능성도 이야기되고 있다. 또한 렌티바이러스는 세포치료에도 사용되는데 환자에서 채취한 줄기세포에 정상 또는 수정된 유전자를 삽입한 후 이를 숙주에 재주입하는 과정에서 많이 사용된다. mdx 생쥐와 골든리트리버근디스트로피개를 대상으로 한 실험에서 그 가능성을 보여 주었다.<sup>36,47</sup>

ㄴ. 직접 주입하는 방법

수정된 유전자를 직접 주입하면 바이러스의 캡시드나 단백질로 인한 면역반응을 피할 수 있고, 유전자 크기를 바이러스에 맞게 조절하지 않아도 된다는 장점이 있다. 그러나 이 방법에도 유전자가 크면 클수록 숙주세포로 삽입능력이 떨어지기 때문에 가능한 작은 유전자를 사용하는 것이 유리하다. 직접 주입하는 가장 단순한 방법은 DNA를 플라스미드(plasmid)형태로 만들어서 근육 내로 주입하는 방법이다. 플라스미드형태의 전장디스트로핀DNA를 DMD 또는 Becker 근디스트로피(BMD)환자에게 주입하였던 제1차 임상시험에서 비록 디스트로핀단백질의 발현은 증가되었으나 그 발현율이 너무 낮았다.<sup>48</sup> 발현율을 높이

기 위한 방법으로 화학요법과 물리적 접근법이 사용된다. 그러나 화학요법은 아직까지는 생체실험에서 너무 낮은 효율성을 보이고 있어서 본고에서는 언급하지 않겠다. 물리적 접근법으로 두 가지 방법이 알려져 있다. 우선 유체역학압력(hydrodynamic pressure)을 이용하는 방법이다. 고무줄로 혈류를 차단하여 혈관 내 압력이 높아지면 일시적으로 혈관의 내피에 통로가 만들어져 정맥 내로 주입한 DNA가 근육 속으로 잘 퍼진다.<sup>49</sup> mdx 생쥐와 골든리트트리버근디스트로피개를 대상으로 했던 실험에서 효과와 안정성을 확인하였으나 발현율은 역시 떨어졌다. 두번째로 전기천공법(electroporation)이 있다. 전기장을 사용하면 플라즈미드를 근육 내로 많이 이동시킬 수 있다.<sup>50</sup> 전기 자극은 세포막의 투과력을 높여주어서 한시적으로 플라즈미드가 세포 내로 이동할 수 있는 통로를 만들어준다. 그러나 이러한 통로를 통해 칼슘이 유입되어 단백질분해효소(protease)를 활성화시킬 수도 있다.<sup>51</sup> 따라서 적당한 전압을 선택하는 것이 중요하다. 이 방법을 이용하였을 때 mdx 생쥐와 골든리트트리버 근디스트로피개에서 효과를 확인하였다.<sup>52,53</sup> 또한 렌티바이러스와 마찬가지로 유체역학압력과 전기천공법을 사용하여 줄기세포에 유전자를 주입하는 생체 밖(ex vivo) 유전자치료로도 응용될 수 있다. 그러나 아직 낮은 효율성 때문에 직접주입방법을 널리 사용하지 않는다.

(2) 약물치료

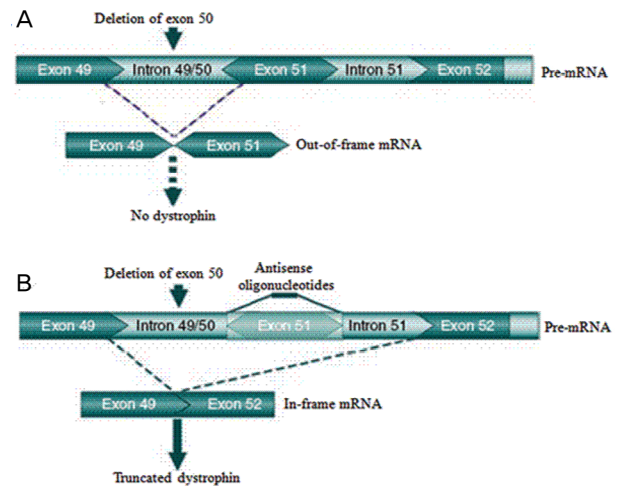
1. 정지코돈 번역초과(stop codon read-through) 방법

DMD 환자의 약 10-15%는 과오 돌연변이(missense mutation)로 인해 미성숙정지코돈(stop codon)이 생겨서 발병한다. 몇몇 약제들을 사용하였을 때 미성숙정지코돈이 무시되고 전령RNA(mRNA)의 번역(translation)이 계속되는 현상이 발견되었는데, 이런 현상을 정지코돈 번역초과(stop codon read-through)라고 한다. 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계열의 항생제인 겐타마이신(gentamicin)은 미성숙정지코돈을 인식하면 40S 리보솜 소단위와 결합하여 이 현상을 유발한다. 특히 미성숙정지코돈과 정상정지코돈 주위의 다른 염기배열을 인식하여서 주로 미성숙정지코돈이 있는 곳에서만 선택적으로 일어난다.<sup>54</sup> mdx 생쥐에 겐타마이신을 주었을 때 디스트로핀이 발현된 근육섬유가 20% 이상 증가하는 것을 확인하였다.<sup>55</sup> 그러나 임상시험에서는 몇몇 환자에서만 디스트로핀단백질 발현이 증가되었고 변화가 없는 환자도 있었다.<sup>56,57</sup> 아타루렌(ataluren, PTC124)은 60S 리보솜 소단위에 결합한다는 것을 제외하고는 겐타마이신과 유사한 작용을 한다. 아타루렌은 mdx 생쥐를 대상으로 한 시험에서 겐타마이신보다도 높은 디스트로핀단백질의 발현율을 보여서 제2차 임상시험이 시행되었다. 그러나 실험군과 대조군 사이에

차이가 없었기 때문에 실험은 중단되었다.<sup>58</sup> 결국 두 약품 모두 mdx 생쥐에서는 좋은 효과를 보였으나 사람에서는 그렇지 못하였다. 특히 겐타마이신은 독성도 있기 때문에 실용화되기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

2. 엑손 스킵핑(exon skipping)방법

BMD는 DMD와 같은 유전자 이상으로 생기는 상동질환이다. DMD형은 유전자의 결손이 번역해독틀(translational reading frame)을 이동시켜 아웃오브프레임 전령 RNA (out-of-frame mRNA)를 만들어 조기에 전사가 종결됨으로써 디스트로핀단백질이 형성되지 않는다. 반면 BMD형에서는 결손이 번역해독틀을 이동시키지 않아 인프레임 전령 RNA (in-frame mRNA)가 만들어지므로 비록 비정상적이지만 디스트로핀단백질이 형성되어 증상이 경미하게 된다. 이 점에 착안하여 DMD 환자의 전전령 RNA (pre-mRNA)의 특정한 엑손에 올리고핵산염(oligonucleotide)을 결합시킴으로써 해당부위의 발현을 막아 아웃오브프레임 전령RNA를 인프레임 전령 RNA로 전환시키는 엑손 스킵핑방법이 고안되었다(Fig. 3). 전전령 RNA의 특정 인트론이나 엑손에 결합하여 발현을 막는 작은 수정된 RNA나 DNA를 안티센스올리고핵산염(anti-sense oligonucleotide)이라고 부른다. 현재 2'-O- methyl-phosphorothioate (2OMP)와 phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO)라는 두 종류의 안



**Figure 3.** Example of exon skipping in Duchenne muscular dystrophy. (A) The absence of exon 50 in the dystrophin gene leads to an out-of-frame transcript creating a premature stop codon in exon 51, thus aborting dystrophin synthesis during translation. (B) The exon skipping using an antisense oligonucleotide targeting exon 51 allows the synthesis of an internally deleted but functional dystrophin (Modified from van Deutekom et al<sup>60</sup>).

티센스올리고핵산염이 연구되고 있다. 2OMP는 약 20개의 뉴클레오티드(nucleotide)로 구성되고, 올리고핵산염에서 산소를 황으로 바꾸거나 히드록실기(hydroxyl group)를 메틸화시켜서 만들어진다.<sup>59</sup> 이러한 수정으로 2OMP는 핵산분해효소(nuclease)에 대한 저항성이 높고 RNA에 대한 결합력이 높다. 엑손51에 작용하는 2OMP인 PRO051/ GSK2402968를 이용한 제1단계와 제2단계 임상시험에서 모든 환자들은 심한 부작용이 없었고, 근육에서 디스트로핀단백질의 발현이 증가된 것을 확인하였다.<sup>60</sup> 이를 바탕으로 제3단계 임상시험이 이루어지고 있다.<sup>58</sup> PMO는 간단히 morpholino라고 부르기도 하며, 올리고핵산염에서 리보스(ribose)를 morpholine ring으로 치환해서 생물학적으로 안정화시킨 것이다. 엑손51에 작용하는 PMO인 AVI-4658을 사용한 제1단계와 제2단계 임상시험에서 피하투여와 정맥투여 모두 디스트로핀단백질이 발현되었고, 용량을 증량하면 보다 넓은 부위에서 발현되는 것을 확인하였다.<sup>58</sup> 모든 환자에서 심각한 부작용은 없었다. 이를 바탕으로 현재보다 용량을 증량시킨 제2단계 임상시험을 준비하고 있다. 그러나 PMO는 세포 내에서 분해가 되지 않아 핵 내에 쌓일 수 있기 때문에 장기간 치료의 독성은 아직 확실하지 않다.<sup>61</sup> 결합펩타이드(conjugated peptide)를 사용하여 PMO의 사용량을 늘리지 않고 세포 내로의 투입량 증가시키는 방법도 보고되고 있어 앞으로 좋은 결과를 기대하고 있다.

㉔. 유트로핀(utrophin)의 과발현

인체에는 구조와 기능이 유사한 유사단백질이 존재하고 이들은 원래의 단백질이 부족할 때 기능을 대체할 수 있다. 유트로핀은 디스트로핀과 80%의 염기배열을 공유하고 있는 유사단백질이나, 성인근육에서는 신경근이음부와 근힘줄 이음부에만 존재한다.<sup>62</sup> 그러나 DMD 환자와 mdx 생쥐에서는 유트로핀이 근육속막에 과발현된다.<sup>63</sup> 또한 mdx 생쥐에서 유트로핀을 두 배에서 세 배로 발현 증가시키면 임상양상이 정상 쥐와 비슷하게 호전되었다.<sup>64</sup> 이는 유트로핀의 발현 증가가 잠재적인 DMD치료 방법이 될 수 있음을 의미한다. 아직 유트로핀을 충분히 발현시키는 약제가 없기 때문에 mdx 생쥐를 대상으로 여러 약제들을 실험하고 있다. 그러나 mdx 생쥐에서 유트로핀 발현을 증가시켜서 디스트로핀결핍에 의한 증상을 모두 없애지진 않는다.<sup>65</sup> 또한 유트로핀은 디스트로핀이 갖는 산화질소합성효소(nitric oxide synthase)를 고정시키는 기능이 없다는 보고도 있다.<sup>66</sup> 그러나 유트로핀 과발현으로 DMD의 일부 증상을 개선시킬 수 있다.

㉕. 미오스타틴(myostatin)의 억제

미오스타틴은 근섬유의 성장을 억제하고 근육전구세포(myogenic precursor cell)의 증식 및 분화를 억제한다. 따라서 이 분자를 억제하면 근육의 성장과 재생을 촉진시킬 수 있다. 실제로 mdx 생쥐에서 미오스타틴을 억제하였을 때 근육의 비대와 근력향상 등 다양한 표지가 개선되었다.<sup>67,68</sup> 최근에 근디스트로피 환자를 대상으로 미오스타틴에 대한 항체의 일종인 MYO-029의 제1차와 제2차 임상시험이 진행되었다. 환자들에서 피부발진을 제외하고는 부작용은 없었으나 용량이 부족해서 인지 근력향상은 없었다.<sup>69</sup> 이 밖에도 최소 네 개의 제약회사에서 현재 미오스타틴 억제제에 대한 임상시험이 진행 중이다.<sup>70</sup>

㉖. 근섬유 재생의 자극

정상적으로 근육이 손상되면 위성세포가 분열하면서 근육재생이 일어난다. 그러나 약 50-60번의 세포분열 후에는 위성세포도 분열능력을 잃게 된다. 이러한 근육전구세포에서 분열능력의 소실을 막아 세포재생을 유지하게 하려는 연구도 진행 중이다.

㉗. 섬유화의 억제

DMD는 근육섬유의 감소와 함께 근육 내에 결합조직이 증가한다. 과도한 섬유화는 근육의 기능을 더욱 악화시키며, 이를 억제시킴으로써 근육의 기능을 향상시키려는 연구도 진행되고 있다.

**결 론**

현재까지 DMD는 근본적인 치료가 불가능한 병이다. 스테로이드의 사용과 보조호흡기의 사용은 환자의 기대수명을 적어도 50%는 늘려 주었다.<sup>71</sup> 이외에도 환자와 가족 그리고 의사를 포함한 전문가 집단들이 합병증의 조기 진단과 치료, 보조기의 사용, 재활치료 등을 상호협력적인 방법으로 접근해 나간다면 좀 더 삶의 질이 높아지고 생명이 연장될 수 있다. 세포 및 분자치료의 연구는 임상시험단계에서 많은 제한 점들을 갖고 있으나 다양한 기전을 대상으로 다양한 약제 및 유전자, 세포를 가지고 연구가 계속되고 있다. 엑손 스킵핑 방법과 같이 상당히 발전된 결과를 보여주었던 연구도 있기 때문에 가까운 시일 내에 DMD 환자의 치료에 가시적인 성과가 있을 것으로 기대한다.

**REFERENCES**

1. Sinnreich M. *Disorders of voluntary muscle*. 8th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2009;205-229.

2. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
3. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
4. Eagle M. Report on the muscular dystrophy campaign workshop: exercise in neuromuscular diseases Newcastle, January 2002. *Neuromuscul Disord* 2002;12:975-983.
5. Sussman M. Duchenne muscular dystrophy. *J Am Acad Orthop Surg* 2002;10:138-151.
6. Velasco MV, Colin AA, Zurakowski D, Darras BT, Shapiro F. Posterior spinal fusion for scoliosis in duchenne muscular dystrophy diminishes the rate of respiratory decline. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32:459-465.
7. Heller KD, Wirtz DC, Siebert CH, Forst R. Spinal stabilization in Duchenne muscular dystrophy: principles of treatment and record of 31 operative treated cases. *J Pediatr Orthop B* 2001;10:18-24.
8. Ciafaloni E, Moxley RT. Treatment options for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Treat Options Neurol* 2008;10:86-93.
9. American Academy of Pediatrics Section on Cardiology and Cardiac Surgery. Cardiovascular health supervision for individuals affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Pediatrics* 2005;116:1569-1573.
10. Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* 2002;12:926-929.
11. Bushby K, Muntoni F, Bourke JP. 107th ENMC international workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscular Disord* 2003;13:166-172.
12. Hyde SA, FLYtrup I, Glent S, Kroksmark AK, Salling B, Steffensen BF, et al. A randomized comparative study of two methods for controlling Tendo Achilles contracture in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2000;10:257-263.
13. McDonald CM. Limb contractures in progressive neuromuscular disease and the role of stretching, orthotics, and surgery. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 1998;9:187-211.
14. Bakker JP, de Groot IJ, Beckerman H, de Jong BA, Lankhorst GJ. The effects of knee-ankle-foot orthoses in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: review of the literature. *Clin Rehabil* 2000;14:343-359.
15. Moxley RT 3rd, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2005;64:13-20.
16. Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve* 2007;36:424-435.
17. Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord* 2006;16:249-255.
18. Houde S, Filiatrault M, Fournier A, Dube J, D'Arcy S, Berube D, et al. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatr Neurol* 2008;38:200-206.
19. Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2008;18:365-370.
20. Florence JM, Pandya S, King WM, Robison JD, Signore LC, Wentzell M, et al. Clinical trials in Duchenne dystrophy. Standardization and reliability of evaluation procedures. *Phys Ther* 1984;64:41-45.
21. Brooke MH, Griggs RC, Mendell JR, Fenichel GM, Shumate JB, Pellegrino RJ. Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. *Muscle Nerve* 1981;4:186-197.
22. Griggs RC, Moxley RT 3rd, Mendell JR, Fenichel GM, Brooke MH, Pestronk A, et al. Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. *Arch Neurol* 1991;48:383-388.
23. Mesa LE, Dubrovsky AL, Corderi J, Marco P, Flores D. Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial. *Neuromuscul Disord* 1991;1:261-266.
24. Biggar WD, Politano L, Harris VA, Passamano L, Vajsar J, Alman B, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord* 2004;14:476-482.
25. Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, et al. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1989;320:1592-1597.
26. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010;9:77-93.
27. Escolar DM, Buyse G, Henricson E, Leshner R, Florence J, Mayhew J, et al. CINRG randomized controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2005;58:151-155.
28. Renault V, Thornell LE, Eriksson PO, Butler-Browne G, Mouly V. Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* 2002;1:132-139.
29. Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 12):2299-2308.
30. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest* 1994;93:586-599.
31. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992;356:435-438.
32. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1995;333:832-838.
33. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144:1113-1122.
34. Moens PD, Van-Schoor MC, Marechal G. Lack of myoblasts migration between transplanted and host muscles of mdx and normal mice. *J Muscle Res Cell Motil* 1996;17:37-43.
35. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:255-267.
36. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle

- function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;444:574-579.
37. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvalle A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 2007;1:646-657.
  38. Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2002;110:807-814.
  39. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 2005;309:314-317.
  40. Dell'Agnola C, Wang Z, Storb R, Tapscott SJ, Kuhr CS, Hauschka SD, et al. Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 2004;104:4311-4318.
  41. Meng J, Adkin CF, Arechavala-Gomez V, Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. The contribution of human synovial stem cells to skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord* 2010;20:6-15.
  42. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion Rde N, Paris E, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol* 2010;260:75-82.
  43. Darabi R, Baik J, Clee M, Kyba M, Tupler R, Perlingeiro RC. Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2009;220:212-216.
  44. Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, et al. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 2010;24:2245-2253.
  45. Wang B, Li J, Qiao C, Chen C, Hu P, Zhu X, et al. A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice. *Gene Ther* 2008;15:1099-1106.
  46. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2010;363:1429-1437.
  47. Bachrach E, Li S, Perez AL, Schienda J, Liadaki K, Volinski J, et al. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3581-3586.
  48. Romero NB, Braun S, Benveniste O, Leturcq F, Hogrel JY, Morris GE, et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004;15:1065-1076.
  49. Wolff J, Lewis DL, Herweijer H, Hegge J, Hagstrom J. Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol* 2005;24:202-208.
  50. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4262-4267.
  51. Gissel H, Clausen T. Excitation-induced Ca<sup>2+</sup> influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol Scand* 2001;171:327-334.
  52. Chapdelaine P, Moisset PA, Campeau P, Asselin I, Vilquin JT, Tremblay JP. Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development. *Protein Eng* 2000;13:611-615.
  53. Pichavant C, Chapdelaine P, Cerri DG, Bizario JC, Tremblay JP. Electrotransfer of the full-length dog dystrophin into mouse and dystrophic dog muscles. *Hum Gene Ther* 2010;21:1591-1601.
  54. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* 2000;6:1044-1055.
  55. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375-381.
  56. Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, Escolar DM, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001;49:706-711.
  57. Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmuller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* 2003;27:624-627.
  58. Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 2011;19:830-840.
  59. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002;1:347-355.
  60. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007;357:2677-2686.
  61. Adams AM, Harding PL, Iversen PL, Coleman C, Fletcher S, Wilton SD. Antisense oligonucleotide induced exon skipping and the dystrophin gene transcript: cocktails and chemistries. *BMC Mol Biol* 2007;8:57.
  62. Karpati G. Utrophin muscles in on the action. *Nat Med* 1997;3:22-23.
  63. Mizuno Y, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J Neurol Sci* 1993;119:43-52.
  64. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 1998;4:1441-1444.
  65. Miura P, Jasmin BJ. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol Med* 2006;12:122-129.
  66. Li D, Bareja A, Judge L, Yue Y, Lai Y, Fairclough R, et al. Sarcolemmal nNOS anchoring reveals a qualitative difference between dystrophin and utrophin. *J Cell Sci* 2010;123:2008-2013.
  67. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J* 2005;19:543-549.
  68. Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 2002;52:832-836.
  69. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2008;63:561-571.
  70. Lee SJ. Speed and endurance: you can have it all. *J Appl Physiol* 2010;109:621-622.
  71. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol* 2010;9:177-189.