

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)

アンチセンス・モルフォリノによる
Duchenne型筋ジストロフィーの
エクソン・スキップ治療に向けた臨床応用研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 伸 一

平成20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- アンチセンス・モルフォリノによる Duchenne 型筋ジストロフィーのエクソン・スキップ治療に向けた臨床応用研究 ----- 1
武田 伸 一

II. 分担研究報告

1. エクソン・スキッピングの臨床応用への見通し ----- 19
武田 伸 一
2. 筋再生能を促進する分子の探索 ----- 29
鈴木 友子
3. DMD 遺伝子エクソン 45-55 欠失症例の骨格筋障害に関する検討 ----- 33
中村 昭 則
4. Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた *mdx52* に対する
ジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの試みに関する研究 ----- 37
岡田 尚 巳
5. アンチセンス・カクテルによる筋ジストロフィー犬のエクソン・スキップ治療 ----- 43
横田 俊 文

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)
総括研究報告書

アンチセンス・モルフォリノによる Duchenne 型筋ジストロフィーのエクソン・スキップ治療に向けた臨床応用研究

主任研究者	武田 伸一	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長
分担研究者	鈴木 友子	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	中村 昭則	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	岡田 尚巳	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	横田 俊文	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 客員研究員

研究要旨

1. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、最も高頻度に見る致死性の筋疾患である。本研究ではアンチセンスオリゴ (AO) のカクテルを用いて筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) のジストロフィン発現を回復させることを目指した (Multi-exon skipping)。3 種の Phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) のカクテルを伏在静脈より導入したところ、横隔膜を含む全身の骨格筋においてジストロフィンの広範な発現が認められるとともに運動機能や筋病理像の改善が認められた。本研究によりはじめて例証された Multi-exon skipping は DMD 患者の 9 割以上に適用できる可能性がある。(以上、横田)
2. Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) の前脛骨筋への局所投与により、マウス・ジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスプライス・ドナーとアクセプターを標的に設計した PMO の組み合わせがエクソン 51 スキッピングに最適であることが判明した。最適の PMO を用いて 8 週齢の *mdx52* マウスに 1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与した結果、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、筋病理では筋肥大を中心としたジストロフィー変化が改善した (以上、岡田)
3. 無症候性あるいは軽微な骨格筋症状を呈する 3 家系、3 例について共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正することができれば、多くの DMD に対して新たな治療法となる可能性がある。(以上、中村)
4. 世界各国で、進行中あるいは計画中であるエクソン・スキッピングによる clinical trial について情報の収集を行い、オランダ及び英国で局所的な投与が行われ、有効な結果が得られたことが明らかになった。我が国で臨床治験を行うためには、GMP レベルの Morpholino を用いる必要があるが、世界で唯一、GMP レベルでの

Morpholino 生産設備を持つ AVI 社との間で研究打ち合わせを持つことができた。更に、エクソン・スキップを用いた臨床治験を行うためには、臨床評価系を確立する必要がある。そこで、既に先進的な取り組みを続けている CINRG との交流を深めた。最後に、ジストロフィン遺伝子のエクソン 6/8 スキップの候補となるエクソン 7 単独欠失の患者さんを見出した。今後、エクソン・スキップ治療の均てん化のためには、全国レベルでの DMD 患者さんの登録システムを構築することが極めて重要である。(以上、武田)

5. 骨格筋幹細胞である筋衛星細胞と side population (SP)細胞の相互作用を調べ以下の点を明らかにした。1) 骨格筋由来 SP 細胞は移植した筋衛星細胞の増殖と筋組織内での拡散を促進した。2) 骨格筋由来 SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、SP 細胞は間葉系細胞に特徴的な遺伝子を発現しており、MMP-2 や MMP-23 等のプロテアーゼを特異的に発現していた。これらの分子は細胞の移動を促進していると考えられた。内因性の SP 細胞も筋再生時、筋衛星細胞の増殖や移動を促進する事により、筋再生過程を促進していると考えられた。その分子メカニズムを検討し、低下している筋ジストロフィー筋の筋再生能を高めることができれば、アンチセンスモルフォリノ治療の効果を相乗的に上げうると期待される。(以上、鈴木)

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である DMD は発症頻度が高いが(出生男児 3,500 人に 1 人)、母体の卵細胞における突然変異が多いため(発症者の約 3 分の 1)、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。そこで、ジストロフィン分子の中央のロッド部分は繰り返し構造から成るため、ある程度欠損を生じてても in frame であれば機能回復を望むことができる点に着目したエクソン・スキップ治療が注目されている。しかし、この方法には、対象が、ジストロフィン遺伝子の特有のエクソン欠失を示す DMD 患者に留まり、しかも遺伝子異常ごとにアンチセンス配列を検討し有効性と安全性を実証する必要があるという欠点があった。ところが、最近我々は米国・国立小児医療センターとの共同研究により、元来スプライス変異のためエクソン 7 をスキップしている筋ジストロフィー犬について、アンチセンス・

モルフォリノを全身的に投与してエクソン 6 及び 8 を強制的にスキップすることにより横隔膜を含む全身の骨格筋や心筋でジストロフィンの発現が回復し、筋ジストロフィーの臨床症状が改善することを観察した。しかも、その間、血液・血清学的にも異常をみることはなかった。複数のエクソンを同時にスキップすることにより臨床症状の改善をみたことから、エクソン・スキップ治療の対象となる DMD 患者の範囲が拡大し、少なくとも遺伝子欠失例の 80% がカバーできることになった。DMD におけるジストロフィン遺伝子の異常は、エクソン 4 5 ~ 5 5 に集中しており、ホットスポットと呼ばれている。そこで我々が開発してきた筋ジストロフィー犬を用いてジストロフィン遺伝子エクソン 6 と 8 のスキップ治療の有効性と安全性を確立して、臨床治験につなげるのみならず、我々が開発保存に参加してきたジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠損した mdx52 マウス、DMD 由来の培養筋細胞を用いてエクソン 51 をスキップするための前臨床試験を行ない、臨床における治療を実現したい。DMD に対して臨床治験を行うことは、DMD 患者・家族に対し、大きな喜びと福音を与えるのみならず、他の遺伝

子性疾患に対しても治療の可能性を拓く。

実際に Duchenne 型筋ジストロフィーに対して、エクソン・スキッピングによる治療を進めるためには、遺伝子と表現型の関連を明らかにする必要がある。原則的に out of frame 型の変異は、重症の Duchenne 型の臨床例を呈し、in frame 型の変異は軽症の becker 型の臨床例を呈するとされる。しかし、in frame 型の遺伝子欠失例症例についても、詳細に検討してみると必ずしも Becker 型の臨床例ではなく、重症の Duchenne 型症例を示すことが観察される。そこで、ジストロフィン遺伝子の変異について詳細に検討し、無症候型あるいは極めて軽微な臨床例を見出すことができれば、それは治療の目標として極めて重要である。但し、そのとき、遺伝子型のみでなく、mRNA 及び蛋白質のレベルで欠失を確認し、臨床型と比較することが極めて重要である。我々は臨床的に極めて軽微な経過を辿る 3 家系、3 症例を経験し、共通してジストロフィン遺伝子エクソン 45-55 を見出したので詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 筋ジストロフィー犬に対するエクソン・スキッピング

アンチセンス薬として、骨格筋培養細胞及び局所投与によりジストロフィンの発現回復効率が最も高いと考えられた 3 種類の配列の AO を用いた。3 頭の若令 (2-5 ヶ月令) の筋ジス犬に対し 120-200 mg/Kg の PMOs を週 1 回もしくは 2 週おきに伏在静脈より 5-22 週の間投与を続けた。最終投与 2 週間におけるジストロフィン発現量及び組織像、MRI や運動試験などによる臨床症状の評価、さらに血液、組織検査による毒性試験を行った。

2. mdx52 マウスを用いたエクソン・スキッピング

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスをモデル動物として用い、エクソン 51 スキッピングの効果を検討した。マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 51 のスプライス・ドナーとアクセプター、exonic splicing enhancer (ESE) を中心に、エクソン 51 に対して網羅的に 25 mer の PMO を設計した。8 週齢の *mdx52* マウスの前脛骨筋に、単独あるいは 2 種類の PMO (計 1.25 nmoles) を 1 回投与し、2 週間後に RT-PCR、ジストロフィン免疫染色、ウエスタンブロットによる解析を行い最適な PMO 配列の組み合わせを決定した。最適の PMO (計 1000 nmoles) を、8 週齢の *mdx52* マウスに 1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与した。最終投与の 2 週間後に、剖検で採取した腓腹筋、前脛骨筋、大腿四頭筋、三角筋、上腕三頭筋、腰部傍脊柱筋、肋間筋、横隔膜、心筋についてジストロフィンの発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで検討した。

3. ジストロフィン遺伝子に変異を持ちながら軽微な症例の検索

症例 1、2 は各々 26 歳、36 歳に心不全症状で発症したが、骨格筋症状はなかった。症例 3 は 59 歳で四肢筋力低下を発症し、69 歳で初診。各症例の骨格筋・心筋障害について、初診時と症例 1 は 28 歳時、症例 2 は 40 歳時、症例 3 は 76 歳時と比較した。また、症例 1 の生検骨格筋・心筋について Western blot 法及び免疫組織化学を用いて検討した。

4. 臨床治験への見通し

4-1. 諸外国の研究の現状

07/08 年に出版された論文の検索及び、研究集会への参加により、諸外国での研究の進展状況を知る。

4-2. AVI 社との研究打ち合わせ

現在 GMP レベルでの Morpholino 設備を持つ施設は、世界中でも AVI 社に限られている。そ

ここで、Morpholino の臨床応用を図るためには、AVI 社との研究打ち合わせを行う必要がある。

4-3. 臨床評価系の導入

国内において Morpholino を用いた臨床治験を行うためには、既に諸外国で行われている臨床評価系を国内に導入する必要がある。そこで、Morpholino を用いた実験について、共同研究先である米国 Washington D.C. の Children's National Medical Center の Eric Hoffman 博士が主宰している研究集会に出席することとした。

4-4. エクソン・スキップの対象となる DMD 患者のリクルート

臨床治験を行うためには、エクソン・スキップの対象となる患者を見出す必要がある。

(1) エクソン7欠失患者

筋ジス犬で得られた結果を直接応用することができるが、これまでの検索で、対象となる患者は極めて少ないことが予想される。

(2) エクソン51スキップの対象患者

これまでの検索から、エクソン51スキップの対象患者は、ジストロフィン遺伝子のエクソン50欠失、52欠失、48-50欠失、45-50欠失など遺伝子欠失によるDMD例の約20%に達すると考えられる。

5. アンチセンス・モルフォリノの治療効果を高めるための工夫

5-1. 細胞の調整

GFPトランスジェニックマウス及びmdxマウスの骨格筋をコラゲナーゼで消化し、単核細胞を調整し、筋衛星細胞特異的抗体であるSM/C-2.6とCD45, CD31, Sca-1抗体を用いてセルソーターを用いて筋衛星細胞を分離した。SP細胞はヘキスト33342色素とCD31, CD45で染色し、FACS VantageSE (BD) でソーティングした。

5-2. 細胞移植と解析

mdxマウスおよびNOD/Scidマウス前脛骨筋

にシリンジを用いて筋衛星細胞と骨格筋由来SP細胞を共移植あるいは単独移植した。移植後筋凍結切片をジストロフィン抗体、GFP抗体、抗Ki67抗体、抗ラミニン抗体等で染色することで移植効率を評価した。

5-3. 遺伝子発現解析

骨格筋由来SP細胞、筋芽細胞、マクロファージからRNAを調整し、アフィメトリクスGeneChipで解析した。さらにreal time PCR法でSP細胞特異的遺伝子発現の経時的変化を調べた。

5-4. migration assay

細胞の移動能を見る為にtranswell assayとwound healing assayを行なった。

(倫理面への配慮)

マウス及び筋ジス犬を用いた実験は、実験計画書を神経研究所小型動物あるいは中型動物実験倫理問題検討委員会へ提出し、承認を得、同研究所の定める小型実験動物あるいは中型実験動物倫理指針に従って実験を行った。

C. 研究成果

1. 筋ジストロフィー犬に対するエクソン・スキッピング

1-1. 発現解析

ジストロフィン特異的抗体を用いた免疫染色及びウエスタンブロット法により、横隔膜、食道、胸鎖乳突筋、尺側手根伸筋、前脛骨筋、大腿二頭筋を含む全身の骨格筋において広範なジストロフィン及び α -サルコグリカンなど同結合タンパクの回復が認められた。発現レベルは最大で正常犬の50%に達し、多くの組織において、治療効果があると考えられる10-20%を上回った。

1-2. 組織像

変性、再生の指標である中心核はPMO投与犬において大幅に減少しており、筋変性像や浸潤細胞も著明に減少していた。

1-3. 機能評価

T2 強調 MRI 像において、主に筋変性に伴う炎症像を反映すると考えられる高信号領域は PMO 投与犬において大幅に減少していた。また、走行試験及び重症度を表す臨床スコアにおいても、PMO 投与グループにおいて大幅な改善が見られた。さらに血算、生化学などの血液検査及び組織学試験において毒性を示す兆候は認められなかった。

2. mdx52 マウスを用いたエクソン・スキッピング

2-1. PMO の局所投与

ESE を標的にした 1.25 nmoles の PMO を単独で投与した場合に、mRNA レベルで 25% のスキッピング効率と野生型の 18% に相当するジストロフィンの発現が得られた。そこで、Wilton らの報告を参考に、合計 1.25 nmoles の 2 種類の PMO を同時に投与したところ、スプライス・ドナーおよびアクセプターを標的にした組み合わせで、mRNA レベルでの最高のスキッピング効率 (72%) とジストロフィンの発現 (野生型の 21%) が得られた。

2-2. PMO の全身投与

スプライス・ドナーおよびアクセプターを標的にした PMO を 7 回投与後、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、ジストロフィン陽性線維の割合は、三角筋と大腿四頭筋と腓腹筋では 60% 以上、横隔膜では約 20~30%、前脛骨筋では 15% 程度、心筋 2% 未満であった。また、三角筋、腓腹筋、大腿四頭筋でのジストロフィンの発現は、野生型の 30% 以上であった。筋病理では筋肥大を中心としたジストロフィー変化が改善した。

3. ジストロフィン遺伝子に変異を持ちながら軽微な症例の検索

骨格筋障害の進展は症例 1、2 では見られず、症例 3 では軽度に進行したが ADL は保たれていた。心機能は症例 1、2 では薬剤により安定し、症例 3 では著変はなかった

ゲノム DNA を用いた PCR による検索では、3 症例に共にエクソン 45-55 の欠失が見出された。骨格筋から抽出した mRNA を用いて行った RT-PCR 及び産物のシーケンス分析の結果ではエクソン 44 から 56 へのスキップが確認された。又、蛋白質レベルに関しては、症例 1 の骨格筋・心筋の dystrophin の蛋白質量は正常の約 60% であり、dystrophin 関連蛋白質の染色性は比較的保たれていた。大変興味深いことに、骨格筋と心筋の発現量はほぼ同じであり、ジストロフィン遺伝子の 5' 端付近の欠失によって生ずる X-linked deleted cardiomyopathy の場合とは異なっていた。尚、ゲノム DNA レベルにおける詳細な deletion map については、信州大学医学部第 3 内科の吉田邦広准教授により検討が行われている。

4. 臨床治験への見通し

4-1. 諸外国の現状

2007 年 6 月オランダで開催された TREAT-NMD による臨床評価に関する meeting、前日にオランダで開催された DMD 患者の registration を進めるための DPP (Duchenne Parent Project) の meeting 及び同年 10 月イタリアのシシリー島で開催された World Muscle Society の年次総会に参加、並びに 2007 年 4 月~2008 年 3 月に発刊された Journal からの論文情報を総合すると、エクソン・スキップを用いた臨床治験に関して次のような進展が認められた。

(1) オランダにおける clinical trial

Van Dentekom 博士を中心とする研究グループは、オランダにおいて、2-O-メチル antisense oligonucleotides (AO) を用いてジストロフィン遺伝子のエクソン 51 スキップについて、局所的投与による有効性と安全性を検証した。NEJM に 12 月発表された結果に依れば、高い有効性が観察され、局注に伴う有害事象は観察されなかった。オランダのグループは、引き続き全身投与法を目指している。

(2) 英国における clinical trial

英国では、F. Muntoni を Principal investigator としてエクソン 51 スキップの準備が進行していることが伝えられている。彼らは 30 mer の Morpholino を用いてエクソン 51 スキップを企図している。彼らは AVI 社から Morpholino の供給を受けているので、我々の研究の直接の競合相手である。彼らも局所治療で有効性と安全性の実証ができれば、全身投与に進むと考えられる。

しかし、エクソン 51 スキップについては一つ懸念がある。それは例えばエクソン 48-50 の欠失 DMD の場合、エクソン 51 のスキップによってインフレーム化するため、エクソン 48-51 に相当する部分を欠失した短縮型のジストロフィンが合成されることになる。しかし、データ・ベースに戻ってエクソン 48-51 欠失例 DMD の表現型を調べてみると、その多くは Duchenne 型であると登録されており、Becker の比率は必ずしも高くない。データ・ベースには、遺伝子レベルの欠損のみが記載されていることが多く、mRNA 及び蛋白質レベルでの検索が必要であることは言うまでもないが、留意すべき事項であると思われる。

(3) 米国における取り組み

米国においても、幾つかの臨床試験の試みが進行している。一つはオランダのグループと同じ 2-0-メチル AO を用いた方法であり、Prosenza という会社を介して準備が進められている。AVI 社も又、英国で進行中の trial を米国でも実施する計画があると聞く。従って、Children's National Medical Center と共に、試験を目指している我々もエクソン・スキップの標的を明瞭にして研究を進めていく必要がある。

4-2. AVI 社との研究打ち合わせ

2008 年 9 月 29 日米国ワシントン州シアトルのシータック空港において、AVI 社及びこれまで共に研究を進めてきた Children's National Medical Center の Eric Hoffman 教授、clinical

trial において幾たびも principal investigator を勤めている Paula Clemens 博士と研究打ち合わせを行った。AVI 社の研究者並びに経営陣とは、これまで研究集会等で何度も顔を合わせているが、今回は極めて濃厚な discussion を行った。研究打ち合わせの席で我々が明らかにした結果は以下の通りである。

- ① 筋ジストロフィー犬におけるジストロフィン遺伝子のエクソン 6/8 スキップ
- ② ジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠損した mdx 52 マウスを用いたエクソン 51 のスキップ
- ③ 例外的に無症候性の表現型を取る症例を参考に、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 をスキップする予報的な試み。

殊に③については、エクソン・スキップにより極めて軽微な phenotype に変換できる可能性があること、しかも同じ核酸医薬品を極めて多くの DMD 患者(遺伝子欠損を示す DMD 患者の最大限 63%) に対し、応用できる可能性があることから、非常に多くの関心を引きつけることができた。その結果として、我々が考えているエクソン 6/8 スキップ、及びエクソン 51 スキップの臨床試験に向けて、基本的な合意が得られたものと考えている。

4-3. 臨床評価系の導入

基礎研究において、進展が認められるエクソン・スキップを実際の臨床場面において行うためには、臨床評価法が確立していることが必須である。Morpholino を用いた研究に関する共同研究の相手先である Eric Hoffman 教授は、臨床評価のための研究グループ Cooperative International Neuromuscular Research Group(CINRG)を 1999 年に設立し、世界各国との協調を深めている。そこで、2008 年 3 月 8 日、ワシントン DC で行われた CINRG の meeting 及び、それに前後して行われた clinical evaluator のトレーニング・コースについて、臨床試験を推進するためのメンバーである国立精神・神経センター武蔵病院の試験

管理室長、小児神経科医師2名、理学療法士1名と共に参加した。既に臨床評価を行うための method は、定量的な筋力測定法である quantitative muscle testing (GMT) を中心に確立しており、なるべく早く日本に導入することが我が国で臨床治験を行う上で必須である。

4-4. 臨床治験を行うための DMD 患者のリクルート

(1) エクソン7欠失患者

筋ジストロフィー協会の集会等を通じて、幅広く筋ジストロフィー患者・家族の皆さんと交流を深める内、国内にエクソン7の単独欠失の DMD 患者さんが健在で、エクソン・スキッピングによる治療に強い関心をお持ちであることが判明した。

(2) エクソン51スキップの対象となる DMD

エクソン51スキップの対象となる患者さんは、欠失のスペクトラムが広いために数多く見出された。将来的にエクソン・スキップ治療の均てん化のためには、全国規模の registration システムを準備することが肝要である。ヨーロッパで治療を進めるための準備の主体となっている Treat-NMD では、患者さん発の minimum な情報を中心とする registration を start しようとしている。これらの成果を日本国内で幾たびか啓蒙した結果、厚生労働省による精神・神経疾患研究委託費による研究班会議を中心とし、筋ジストロフィー協会と協力して、全国的な registration を立ち上げることで一致をみた。

5. アンチセンス・モルフォリノの治療効果を高めるための工夫

5-1. SP細胞を筋衛星細胞と共移植すると、筋衛星細胞による筋線維再生能を著しく上げた。また、SP細胞は筋衛星細胞の増殖と移動を促進していた。

5-2. 筋芽細胞やマクロファージに比べてSP細胞で特異的に発現する遺伝子を明らかにした。その中にMMP-2, MMP-23等のプロテアーゼが

数多く含まれていた。

5-3. MMP-2はin vitroおよびin vivoにおいて筋衛星細胞の移動を促進した。増殖の促進効果は無かった。

D. 考察

1. ジストロフィン遺伝子のエクソン 6/8 スキップについて

本研究では、新規のアンチセンス・カクテル投与を用いることにより、中型の動物モデル(犬)における全身の筋ジス治療をはじめて実現した。これにより、ヒトにおいてアンチセンス治療が適用可能な DMD 患者の割合が最大で 90% 以上に高まるのみならず、短縮型ジストロフィンタンパクの機能を最適化するために、患者の変異パターンに応じてエクソンスキッピングの標的エクソンを複数選択する展望を描くことができる。

2. ジストロフィン遺伝子エクソン 51 のスキップについて

我々が *mdx52* マウスにおいてエクソン 51 に関して得たスキッピング効率は最大 72% であり、Arechavala-Gomezら *Humanized DMD* マウスを用いて示したスキッピング効率 (22%) よりも高い可能性がある。今後は、高いスキッピング効率を生かして、ロタロッドや筋張力測定により治療後の *mdx52* マウスの筋機能評価を行う予定である。

3. ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失例は軽微な臨床経過をとる

無症候性あるいは軽微な臨床型を呈する 3 家系については、共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。フランスから報告されたエクソン 45-55 を示す 15 家系についても、年齢は様々であるが、全ての例で臨床型は軽微であった。Leiden の DMD データ・ベースに戻って検索してみると、エ

クソン 45-55 欠失は 97%が軽症型の Becker と記載されていた。従って、エクソン 45-55 欠失例が少なくとも軽微な経過を辿ることは確実のように思われる。そこで、エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正できれば、多くの DMD を良性の表現型に修正できる。なぜ、エクソン 45-55 欠失例が軽微な臨床型を呈するののかに関しては、今後の詳細な検討が必要であるが、欠失によって、ロット・リピート数は減少するものの個々のリピートの構造は完全に保たれていることが関連している可能性がある。3 例のうち、2 例について治療可能ではあるが、心筋障害が認められた点については、二つの可能性がある。

① 遺伝子欠失によって、心筋におけるジストロフィンの発現調節領域が欠損している可能性

② エクソン 45-55 欠失によって生じた短縮型ジストロフィンの機能が骨格筋では充分であるが、心筋では不十分な可能性

この内、①については現在信州大学で進められているゲノム DNA レベルでの遺伝子欠失範囲の同定によって答えが得られる可能性がある。

次のステップとして、我々はエクソン 52 欠失マウスを用いて、エクソン 45-55 スキッピングが可能であることを mRNA レベルで確認し、更に検討を進めている。エクソン 45-55 のスキッピングを実現することは、臨床的に軽症化を明瞭に企図できるだけでなく、エクソン 45-55 が Dchenne 型の遺伝子変異のホット・スポットに一致することから、遺伝子欠失による Duchenne 症例の最大 63%を同じ核酸医薬品により治療できるとの可能性を生むことになる。

4. 臨床治験への見通し

Antisense Morpholino を用いたエクソン・スキッピングを臨床で行うための要項を以下のように列挙することができる。

(1) 有効性試験

(2) 安全性（毒性）試験

(3) 臨床治験を行うための準備（臨床評価）

(4) 対象となる DMD 患者のリクルート

この内、(1) (3) (4) について顕著な成果を挙げることができた。有効性試験の結果については、筋ジス犬について分担研究者の横田が、mdx52 マウスについて同じく分担研究者の岡田が詳述する。今後の問題は、筋ジストロフィーで障害される心筋における Morpholino の取り込みが低いことであろう。これについては、PPMO (peptide conjugated Morpholino) の使用により改善を見込むことができると考えられる。

一方、臨床評価については、米国を主体とした CINRG に参画することにより、一定の基準で評価する手がかりが得られたところである。又、エクソン・スキップの対象患者については、更に準備を加速する必要があるだろう。殊に皮膚線維芽細胞を用いた筋細胞への変換、筋細胞の mRNA を用いた deletion の範囲の同定、及び同細胞を用いたエクソン・スキップを積極的に推進する必要がある。将来的な治療の均てん化のためには registration のシステムが必要であることは言うまでもない。

最も大きな問題は、安全性（毒性）試験が進んでいないことである。一つには安全性試験を行うには莫大な資金を要することがネックとなっている。第二には、どのエクソン・スキップを優先するのか、その候補を絞り込むことが肝要である。第三には、そのための国際協調を欠かすことができない。AVI 社及び主要な提携先である Children's National Medical Center との協議を更に深める必要がある。

5. モルフォリノによる治療効果を高めるための工夫

筋ジストロフィーに対するアンチセンスモルフォリノの治療効果を高めるためには、骨格筋の再生能が維持されている必要がある。

我々は筋再生に中心的な役割を果たす筋衛星細胞や壊死繊維の除去を行なうマクロファージ等の炎症性細胞の他に、Side Population 細胞と呼ばれる細胞が筋芽細胞の増殖や移動を促進する事で筋再生を促進している事を見いだした。その分子機構を明らかにすれば、筋ジストロフィー筋の再生促進治療の応用が期待される。

E. 結論

1. ジストロフィン遺伝子のエクソン 6 及び 8 を標的としたアンチセンス PMO を混合投与することにより CXMD₁ の全身骨格筋におけるジストロフィン発現及び筋機能の改善に成功した。同手法は DMD 患者の 9 割以上に適用できる可能性がある。

2. PMO を用いた *mdx52* マウスに対するエクソン 51 スキッピングにより、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が認められたことから、ジストロフィン遺伝子欠失を有する DMD 患者の約 20% に対してエクソン 51 スキッピングが有効な治療法となる可能性がある。

3. 臨床的に無症候性あるいは軽微な経過を辿る 3 家系について、共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出し、エクソン・スキッピング治療の目標となることを明らかにした。

4. 2007/8 年に発表された論文及び世界各地で開かれた研究集会に参加することにより、エクソン・スキップを用いた臨床治験に関する情報収集に努めた。

5. 世界で唯一、GMP レベルでの Morpholino 生産設備を有する AVI 社との打ち合わせを進めた。

6. Morpholino を用いた臨床治験を行うについ

て、先進的な取り組みを早くから進めている CINRG との交流を進めた。

7. 国内において、Morpholino を用いてエクソン・スキッピングを行うに当たり、対象となり得る DMD 患者さんを見出した一方で、こうした試みを全国に展開する上で重要となる registration の確立を図った。

8. 骨格筋 SP 細胞は未分化な間葉系細胞であると考えられ、産生するサイトカインや MMPs 等は筋衛星細胞の増殖や移動を促進し、筋再生を促進していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Urasawa N, Wada MR, Machida N, Yuasa K, Shimatsu Y, Wakao Y, Yuasa S, Sano T, Nonaka I, Nakamura A, Takeda S. Selective vacuolar degeneration in dystrophin deficient canine Purkinje fibers despite preservation of dystrophin-associated proteins with overexpression of Dp71. *Circulation*. (in press)
2. Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med*. (in press)
3. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K.

- Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*. 2008 Feb;22(2): 477-87.
4. Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 Jan 9; 9(1): 1
 5. So-ichiro FUKADA, Yukiko Yamamoto, Masashi Segawa, Kenta Sakamoto, Mari Nakajima, Masaki Sato, Daisuke Morikawa, Akiyoshi Uezumi, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda, Kazutake Tsujikawa, Hiroshi Yamamoto CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin $\alpha 2$ upon transplantation to dy3k/dy3k mice *Exp Cell Res*. 2008 Jan 1; 314(1): 193-203.
 6. Fukada SI, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells In Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10): 2448-59.
 7. Hirasaka K, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T. Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2007, Oct;56(10): 2511-22.
 8. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Ohshima S, Howell JM, Nakamura A, Hijikata T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther*. 2007 Sep;14(17): 1249-1260.
 9. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada SI, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4; 117(9): 2468-2476.
 10. Ikemoto M, Fukada SI, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR, Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Autologous Transplantation of SM/C-2.6 (+) Satellite Cells Transduced with Micro-dystrophin CS1 cDNA by Lentiviral Vector into mdx Mice. *Mol Ther*. 2007 Aug 28; 15(12): 2178-85.
 11. Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda SI. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jun 28;8(1): 54.
 12. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I.

- Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 2007 Jan 29; 176(3): 329-41.
13. Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K. & Ozawa, K. Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. *Mol Ther.* (in press)
 14. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K. & Ozawa, K. Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med.* (in press)
 15. Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H. & Kume, A. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* (in press)
 16. Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kobayashi, E. and Morita, T. Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems. *Urology* 70: 1230-1236, 2007.
 17. Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K. & Ozawa, K. Interleukin-10 Expression Mediated by an Adeno-Associated Virus Vector Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circ Res*, 2007.
 18. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K. & *Ozawa, K. Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-536, 2007.
 19. Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K. & Xiao, S. Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp Mol Med* 39: 170-175, 2007.
 20. Nakata, M., Okada, T., Ozawa, K. & Yada, T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 1046-1051, 2007.
 21. Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S. & Ozawa, K. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model.

Int J Mol Med 19: 75-79, 2007.

22. Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M. & Ozawa, K. Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120: 278-284, 2007.
23. Toshifumi Yokota, William Duddy, Terence Partridge: Optimizing exon skipping therapies for DMD *Acta Myol* 2008, In Press
24. Toshifumi Yokota, Ed Pistilli, William Duddy, Kaneboyina Nagaraju: Potential of exon skipping therapy for DMD *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 831-42, 2007

【欧文総説】

1. Naoki Suzuki, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Future Neurology*. January 2007, Vol. 2(1), 87-96.
2. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S (2007) Side Population (SP) cells and skeletal muscle differentiation. Recent advances of skeletal muscle differentiation, *Reserach Signpost*
3. Okada, T. Vector-producing mesenchymal stem cells for cancer gene therapy. *Gene Therapy and Cancer Research Focus*. (in press)

4. Okada, T. and Ozawa, K. Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008.

<和文>

【和文著書】

1. 武田伸一 : 筋ジストロフィー治療法研究の進歩 ころの健康科学研究の現状と課題 II .3.3: 315-327, 2007
2. 武田伸一 : ジストロフィン欠損における新たな分子態小児神経学の進歩 第36集, 132-138, 2007

【和文総説】

1. 湯浅勝敏、土方貴雄、武田伸一 : 筋ジストロフィーの遺伝子治療における骨格筋への遺伝子デリバリー *Drug Delivery System* 22(2): 140-147, 2007
2. 本橋紀夫、武田伸一 : 筋肉の再生 *THE BONE* 21(4): 61-64, 2007
3. 辛鎮洪、武田伸一 : 筋ジストロフィーの治療戦略 *BRAIN and NERVE* 59(4): 415-424, 2007
4. 武田伸一 : 国立精神・神経センターにおける筋ジストロフィー研究の成果 週刊社会保障, No.2426: 31, 2007
5. 西山章代、武田伸一 : 骨格筋への *in vivo* 遺伝子導入 バイオテクノロジージャーナル, 7:

183-187, 2007

6. 岡田尚巳、武田伸一：
遺伝子導入「筋ジストロフィー現在と未来」
Clinical Neuroscience 26(2): 204-206,
2008.
7. 岡田尚巳：
癌幹細胞の同定法
がんの浸潤・転移研究ハンドブック
(in press)

II. 学会発表

<国外>

1. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:
rAAV Type 8-Mediated Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of α -Sarcoglycan Deficient Mice
10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy in Seattle, WA, May 30-Jun 3, 2007
2. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:
Distinct Transduction Profiles in the Dystrophic Dogs with rAAV Serotype 8
10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy in Seattle, WA, May 30-Jun 3, 2007
3. Noki Suzuki, Norio Mtohashi, Yuko Miyagoe-Suzuki, Tetsuhiko Yoshimura, Yasuto Itoym, Masashi Aoki, Shin'ichi Takeda:
Nitric oxide production results in disuse-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal nitric oxide synthase
7th Japanese-French Workshop
“Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy”, 8-9 June 2007
4. Shin'ichi Takeda:
AAV vector-mediated approaches to dystrophic dogs
7th Japanese-French Workshop
“Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy”, 8-9 June 2007
5. Shin'ichi Takeda:
Pre-clinical evidence from animal models-What preclinical evidence is needed from animal models to proceed to clinical trial: grip strength, exercise: physiological measurements?
Treat-NMD workshop for “Outcome measures for experimental studies in Duchenne muscular dystrophy” in Naarden (Amsterdam)-The Netherlands, Jun-30-July 1, 2007
6. Shin'ichi Takeda:
Molecular signature of quiescent satellite cells and their potential as a therapeutic tool for muscular dystrophy (July-15)
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007
Skeletal muscle Satellite and Stem Cells
7. Yuko Miyagoe-Suzuki, Norio Motohashi, Akiyoshi Uezumi, Erika Yada, So-ichiro Fukada, Kazuhiko Imaizumi, Shin'ichi Takeda:
Co-transplantation of muscle-derived side population (SP) cells with myoblasts promoted the muscle regeneration (July-17)
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007

Skeletal muscle Satellite and Stem Cells

8. Erika Yada, Norio Motohashi, Makoto Miyagishi, Chika Harano, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda:
Hdac1l regulates differentiation of satellite cells (July-16)
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007
Skeletal muscle Satellite and Stem Cells
9. Yoshimura, M.; Nakamura, A.; Kobayashi, M.; Takeda, S.:
Deflazacort induced severe skeletal muscle wasting and inguinal herniation in normal Beagle dogs
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
10. Partridge, T., Yokota, T., Lu, Q., Hoffman, E., Alter, J., Takeda S., Kobayashi, M., Nakamura, A.:
Systemic delivery of morpholino oligonucleotides to skip mutations in the dystrophin gene of the mouse and dog
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
11. Miyagoe-Suzuki, Y.; Miyamoto, K.; Saito, F.; Matsumura, K.; Many, H.; Endo, T., Takeda, S:
POMGnT1-null myoblasts poorly proliferate in vitro
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
12. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Akinori Nakamura, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:
Transduction profile and immune response in the dystrophic dogs with rAAV serotype 8
The XV Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, The Netherlands, October 27 – 30, 2007
13. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ich Takeda:
Extensive α -sarcoglycan expression by intramuscular and intravenous administration of rAAV type 8
The XV Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, The Netherlands, October 27 – 30, 2007
14. Shin'ichi Takeda:
Muscle stem cells in muscle regeneration, Symposium "From transcription factor to gene therapy",
Medical Research Center for Ischemic Tissue Regeneration, Pusan National University, Pusan, Korea, Nov.8, 2007
15. Shin'ichi Takeda:
Progress in gene therapy approaches to dystrophin deficient Duchenne muscular dystrophy (DMD),
Symposium "Advances in Gene Therapy", at Medical Research
Institute, Pusan National University Hospital, Pusan, Korea, Nov.9, 2007

16. Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda:
MRI imaging, Clinical trial endpoints
discussions,
Annual Meeting Muscular Dystrophy
Programs, Washington DC, March 2008
17. Yoshitugu Aoki, Shin'ichi Takeda:
Multi-exon skipping, Pre-clinical discussion
of potential interventions,
Annual Meeting Muscular Dystrophy
Programs, Washington DC, March 2008
18. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M.,
Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H.,
Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K.,
and Ozawa, K.:
AAV vector-mediated sustained expression
of prostacyclin synthase ameliorates obesity
in Zucker fatty rats.
American Society of Gene Therapy' s 10th
Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May
30-June 3, 2007.
19. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita,
T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and
Ozawa, K.:
Retroviral producing mesenchymal stem
cells for tumor tracking and therapeutic gene
amplification as systemic suicide cancer
gene therapy.
American Society of Gene Therapy' s 10th
Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May
30-June 3, 2007.
20. Shin-ichi Muramatsu, Hiroko Nishida, Yuko
Nara, Naomi Takino, Sayaka Asari, Mika
Kodera, Wei-zhong Xiao, Yasuo Sasaki,
Satoru Kikuchi, Takashi Matsushita, Takashi
Okada, Minako Hoshi, Imaharu Nakano,
Keiia Ozawa:
AAV8 Vectors Transduce Oligodendrocytes
Efficiently.
American Society of Gene Therapy' s 10th
Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May
30-June 3, 2007.
21. Akihiro Kume, Takasahi Matsushita,
Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe,
Takashi Okada, Keiia Ozawa:
Long-Term Efficacy of a
Self-Complementary Adeno-Associated
Virus Vector for Phenylketonuria Gene
Therapy.
American Society of Gene Therapy' s 10th
Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May
30-June 3, 2007.
22. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M.,
Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H.,
Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K.,
and Ozawa, K.:
Sustained expression of prostacyclin
synthase by an intramuscular injection of an
AAV vector attenuates obesity in Zucker
fatty rats.
The 13th Annual meeting of Japan Society
of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
23. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita,
T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and
Ozawa, K.:
Tumor tracking and therapeutic gene
amplification by using retroviral
vector-producing mesenchymal stem cells
for reinforcement of suicide cancer gene
therapy.
The 13th Annual meeting of Japan Society
of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
24. Toshifumi Yokota, Qi-long Lu, Terence
Partridge, Akinori Nakamura, Shin'ichi

Takeda, Eric Hoffman:

Antisense morpholino injection restores extensive dystrophin expression to potentially therapeutic levels in canine muscular dystrophy in vivo Gordon Research Conference in Il Ciocco, Italy, May, 2007

<国内>

1. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療、
神経難病と難病ネットワーク -あきら
めないで治療とケア-
第27回日本医学会総会, 大阪, 4.7,
2007
2. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する治療の現状と
未来
第43回筋ジストロフィー協会埼玉県大
会, 埼玉, 4.29, 2007
3. 中村昭則、武田伸一：
筋ジストロフィー-1, 筋ジストロフィー
犬を用いた Duchenne 型筋ジストロ
フィーの心筋傷害の発症機序の解明
第48回日本神経学会総会, 名古屋,
5.16-17, 2007
4. 大島幸子、武田伸一：
筋ジストロフィー-2, rAAV を用いた犬
骨格筋への遺伝子導入効果の検討,
第48回日本神経学会総会, 名古屋,
5.16-17, 2007
5. 宮本香織、花岡和則、遠藤玉夫、鈴木友
子、武田伸一：
ラミニンと α -dystroglycan の結合は骨格
筋衛星細胞の増殖に必須である,
第5回幹細胞シンポジウム, 兵庫県, 5.17
~19, 2007
6. 矢田英理香、本橋紀夫、宮岸真、原野千
加、鈴木友子、武田伸一：
HDAC11 は筋衛星細胞の分化制御因子で
ある 第28回日本炎症・再生医学会 平
成19年8月2-3日
7. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田
宗一郎、今泉和彦、鈴木友子、武田伸一：
骨格筋 Side population (SP) 細胞は筋衛
星細胞による筋再生を促進する
第28回日本炎症・再生医学会 平成19
年8月2-3日
8. 宮本香織、花岡和則、遠藤玉夫、鈴木友
子、武田伸一：
ラミニンと α -dystroglycan の結合は骨
格筋衛星細胞の増殖に必須である
第5回幹細胞シンポジウム 平成19年5
月17日~19日
9. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田
宗一郎、今泉和彦、鈴木友子、武田伸一：
骨格筋 Side Population (SP) 細胞は筋
衛星細胞による筋再生を促進する
第5回幹細胞シンポジウム 平成19年5
月17日~19日
10. 矢田英理香、本橋紀夫、宮岸真、原野千
加、鈴木友子、武田伸一：
HDAC11 は筋衛星細胞 (骨格筋幹細胞) の
分化制御因子である
第5回幹細胞シンポジウム 平成19年5
月17日~19日
11. 増淵菜弥、宮本香織、花岡和則、遠藤玉
夫、鈴木友子、武田伸一：
ジストログリカンの糖鎖修飾は筋衛星細
胞の増殖に必須である
第30回日本分子生物学会年会 平成19
年12月11日~15日

12. 鈴木友子：
不動化に伴う筋萎縮の分子構造 第1回
学際的に痛みを考える会国際フォーラム：
シンポジウムⅡ 「不動化と廃用に伴う痛みのメカニズムと治療」平成19
年12月1日愛知医科大学
5. 内堀亮介、岡田尚巳、松下卓、卜部匡司、
水上浩明、久米晃啓、小澤敬也：
ベクター産生型間葉系幹細胞の開発と癌
治療への応用。
第5回幹細胞シンポジウム 2007年5月
17日-19日、淡路

班会議、シンポジウム等

1. 鈴木友子、武田伸一：
骨格筋間葉系幹細胞の同定と筋衛星細胞
との相互作用
日本横紋筋肉腫研究グループ (JRSG) 第
8回研究会 平成20年1月26日
2. 武田伸一、本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理
香、深田宗一郎、福島和広、今泉和彦、鈴木友子：
骨格筋Side Population (SP) 細胞は筋衛
星細胞による筋再生を促進する
厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋
ジストロフィーに対する治療研究を臨床
に展開するための統括的研究 平成19年
度 研究班会議 平成19年12月5日(水)～6
日(木)
3. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田
宗一郎、福島和弘、今泉和彦、鈴木友子、
武田伸一：
骨格筋 Side population (SP) 細胞は筋
衛星細胞による筋再生を促進する
第2回筋ジストロフィー治療研究会
4. 高橋明男、小林正典、中村昭則、武田伸
一：
MRIを用いた筋ジストロフィー犬の骨
格筋障害の非侵襲的評価、平成19年度厚
生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋
ジストロフィーに対する治療研究を臨床
に展開するための統括的研究

6. 内堀亮介、岡田尚巳、伊藤孝幸、卜部匡
司、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也：
ベクター産生型間葉系幹細胞の開発と自
殺遺伝子療法への応用。
第66回日本癌学会学術総会 2007年10
月3日-5日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)
分担研究報告書

エクソン・スキッピングの臨床応用への見通し

分担研究者 武田 伸一
国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

1. 世界各国で、進行中あるいは計画中であるエクソン・スキッピングによる clinical trial について情報の収集を行い、オランダ及び英国で局所的な投与が行われ、有効な結果が得られたことが明らかになった。
2. 世界で唯一、GMP レベルでの Morpholino 生産設備を持つ AVI 社との間で研究打ち合わせを持つことができた。
3. エクソン・スキップについて、臨床治験を行うためには、臨床評価系を確立する必要がある。そこで、既に先進的な取り組みを続けている CINRG との交流を深めた。
4. エクソン・スキップの対象について、エクソン 6/8 スキップの候補となる患者さんを見出した。今後、エクソン・スキップ治療の均てん化のためには、全国レベルでの DMD 患者さんの登録システムを構築することが極めて重要である。

A . 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である DMD は発症頻度が高いが（出生男児 3,500 人に 1 人）、母体の卵細胞における突然変異が多いため（発症者の約 3 分の 1）、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。そこで、ジストロフィン分子の中央のロッド部分は繰り返し構造から成るため、ある程度欠損を生じてても in frame であれば機能回復を望むことができる点に着目したエクソン・スキップ治療が注目されている。しかし、この方法には、対象が、ジスト

ロフィン遺伝子の特有のエクソン欠失を示す DMD 患者に留まり、しかも遺伝子異常ごとにアンチセンス配列を検討し有効性と安全性を実証する必要があるという欠点があった。ところが、最近我々は米国・国立小児医療センターとの共同研究により、元来スプライス変異のためエクソン 7 をスキップしている筋ジストロフィー犬について、アンチセンス・モルフォリノを全身的に投与してエクソン 6 及び 8 を強制的にスキップすることにより横隔膜を含む全身の骨格筋や心筋でジストロフィンの発現が回復し、筋ジストロフィーの臨床症状が改善することを観察した。しかも、その間、血液・血清学的にも異常をみることはなかった。複数のエクソンを同時にスキップすることにより臨床症状の改善をみたことから、エクソン・スキップ治療の対象となる DMD 患者の範囲が拡大し、少なくとも遺伝