

200817006A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 伸 一

平成21(2009)年 3月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 伸 一

平成21(2009)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
武田伸一 ----- 1

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
武田 伸一 ----- 18
2. 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
横田 俊文 ----- 29
3. 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
岡田 尚巳 ----- 32
4. *Mdx52*マウスを用いたDMD遺伝子exon 45-55 skippingの
検討
中村 昭則 ----- 36
5. 臨床治験の準備に関する研究
村田 美穂 ----- 38
6. 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
三好 出 ----- 41

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	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
	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
	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
	村田 美穂	国立精神・神経センター病院 第二病棟部 部長
	三好 出	国立精神・神経センター病院 治験管理室長

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。我々は、アンチセンスオリゴ (AO) のひとつであるモルフォリノ (PMOs) のカクテルをデザインし、複数のエクソンを同時に読み飛ばす Multi-exon skipping の手法を開発することにより、筋ジストロフィー犬 (CXMD₁) におけるジストロフィン発現の回復、及び病態の改善にはじめて成功した。
2. 筋ジストロフィー筋のジストロフィン遺伝子変異に相当するエクソン7欠失患者さんを見い出し検討を進めた。
3. 線維芽細胞、変換筋芽細胞、リンパ芽球を用いた *in vitro* エクソン・スキッピング法を確立し、同方法を用いてエクソン7欠失を有する DMD 患者さんから得られた検体によるエクソン6/8スキップに成功した。
4. 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・ドナとアクセプタを標的に設計した 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を確認した。これらの PMO 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、筋病理と筋機能が改善した。明らかな毒性は認めなかった。
5. 新しく開発された細胞膜透過性の高いペプチド付加型のモルフォリノ (PPMO) によるカクテルアンチセンスをデザインし、筋ジストロフィー犬の心筋を含め全身におけるジストロフィンの発現導入にはじめて成功した。本研究によりはじめて例証された Multi-exon skipping は DMD 患者の約9割に対して適用できる可能性がある。

6. DMD 遺伝子 exon 45-55 欠失例は骨格筋障害が軽微である。そこで、mdx52 マウスに対し、morpholino による exon 45-55 skipping を検討した結果、実現可能であることを示した。Exon 45-55 skipping は多くの DMD に対する新規治療法となる可能性がある。

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 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 45-55 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、臨床試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。

そこで、ジストロフィン遺伝子の exon 6/8 及び、exon 51 のスキップを行なうために DMD 患者さんをリクルートし、治療に進む前に in vitro exon skipping を進める（武田分担研究者）。次に、exon 6/8 スキップの対象者が見い出されたので入院して頂き、検索を行なった（村田分担研究者）。更に、exon 51 のスキップの基礎となる研究を mdx52 マウスを用いて行なった（岡田分担研究者）。

一方、モルフォリノについては、これまでの検討で、幾つか限界があることも明らかになっている。一つは、心筋に対する有効性が低いことである。それについては、新たに開発された細胞膜透過性の高いペプチド付加型 PPMO (AVI バイオファーマ社) 及びオクタグアニジンドリンマー付加型のピボモルフォリノ

(GENE-TOOL社)によるカクテルアンチセンスをデザインし、心筋のエクソン

モルフォリノに関するもう一つの限界は、エクソン・スキップ療法そのものが、遺伝子変異が異なるたびに別のアンチセンス配列を準備するテーラーメイド治療に留ることである。その点について我々は、DMD 遺伝子 exon 45-55 の欠失例の骨格筋障害が軽微であることを報告した。DMD 遺伝子 exon 45-55 は遺伝子変異のホットスポット全域に相当し、DMD の約 60%が集積する。そこで、exon 52 欠損マウス (*mdx52*) を用いて exon 45-55 skipping の可能性について検討した (中村分担研究者)。

最後に、稀少疾病に対して臨床治験を進める上で、留意すべき事項についても検討を行った (以上、武田/三好分担研究者)。

B. 研究方法

1. 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 15%に達すると考えられる。

2. 培養細胞を用いた *in vitro* exon skipping

(1) 筋ジス犬を用いた study

*In vitro*解析の対象として、筋ジス犬の末

スキッピング治療を試みた (横田分担研究者)

梢血リンパ球、皮膚線維芽細胞および初代筋芽細胞を用いた。また、皮膚線維芽細胞から MyoD により誘導した筋芽細胞を得るために、線維芽細胞に対して MyoD-IRES-eGFP をコードしている MSCV をトランスフェクションし、FACS を用いて GFP 陽性細胞を分取した。これらの細胞において、exon 6 を標的とする 2 種類の PMO と exon 8 を標的とする 1 種類の PMO カクテルで 48 時間のトランスフェクションを行った後に、RT-PCR を行い、exon skipping の効率を細胞の間で比較した。

(2) 生検より得られた線維芽細胞、変換筋芽細胞、リンパ芽球培養を用いた study

筋ジス犬で得られた研究成果を基に、DMD 患者さんの細胞を用いて、ジストロフィン遺伝子エクソン 6/8 のスキップを試みた。

3. *mdx52* マウスを用いたエクソン 51 スキップの検討

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・ドナとアクセプタ、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。次にこの PMO の組み合わせ (計 1000 nmoles) を、8 週齢の *mdx52* マウスに毎週計 7 回尾静脈投与を行い、最終投与の 2 週間後に、筋機能、病理、毒性について検討した。

4. PRMO 及び vivo Morpholino を用いた exon skipping の検討

アンチセンス薬として、骨格筋培養細胞及び PMO の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 カクテルを用いた。3 頭の若令 (2-6 ヶ月令) の筋ジス犬に対し 120-600 µg の PPMO およびビボモルフォリノの単回の局所投与を行った。また、PPMO のカクテルを伏在静脈からの静脈投与および大腿動脈から導入した心臓カテーテル投与 (12 mg/kg) することにより、心筋を含め全身におけるジストロフィンの発現導入を試みた。さらに、投与 2 週間におけるジストロフィン発現量及び組織像、心電図の評価、及び血液、組織検査による毒性試験を行った。

5. exon45-55 スキップの試み

マウス DMD 遺伝子の premature mRNA を標的に、exon 52 を除く exon 45-55 の exonic splicing enhancer に対する morpholino を 10 種類設計し、8 週齢の *mdx52* マウスの前脛骨筋に各 morpholino を 12.5 nmoles を投与した。2 週間後に RT-PCR、ウエスタンブロット、ジストロフィン免疫組織化学を行った。

C. 研究成果

1. 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 DMD

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。

そこで、患者さん及び家族から informed consent を得た上で、国立精神・神経センター倫理委員会に対し、①患者さんの入院 ②リンパ球を用いた遺伝子

診断の確認 ③皮膚生検の実施 ④生検材料を用いた線維芽細胞、MyoD による変換筋芽細胞、リンパ芽球の培養 ⑤同細胞を用いた in vitro エクソン 6/8 スキッピングの申請を行った。これが承認を受けたため、平成 20 年 11 月国立精神・神経センター病院に患者さんに入院して頂いた上で、以上の検索を実施に移した。

(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 DMD 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、正確な遺伝子診断を背景として全国規模の DMD 患者登録を行なう必要がある。そこで平成 20 年度から、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川井班の発足をみた。更に遺伝子診断並びに登録システムの維持のためには恒常的な経費を要することから DMD 登録を、国立精神・神経センターの事業とすることが決定されている。

2. 培養細胞を用いた in vitro exon skipping

(1) 筋ジス犬を用いた study

筋ジス犬の初代筋芽細胞と皮膚線維芽細胞において、exon 6 を標的とする 2 種類の PMOs と exon 8 を標的とする 1 種類の PMO により in-frame 産物が検出されたが、RT-PCR により検出されたジストロフィン cDNA の 20%未満であった。線維芽細胞を用いた skipping では nested RT-PCR が必要であったが、skipping のパターンは両細胞間でほぼ同等であった。Exon 8 を標的とした検討では 1 種類の PMO では効果的が不十分であったことから、さらに 1 種類の PMO を設計し、計 4 種類の PMO カクテルを用いて培養細胞の導入を行なった。その結果、初代筋芽細胞および線維芽細胞において skipping の効率

を上げることができた。また、MyoD により転換された筋芽細胞に対して、3 個または4 個のPMOカクテルによるトランスフェクションを行った結果、初代筋芽細胞と同等の skipping 効率を得ることができた。末梢血リンパ球については、ジストロフィンの発現は確認できたものの、skipping の誘導は確認できなかった。

(2) DMD 患者検体を用いた検討

平成 20 年 11 月、末梢リンパ球を用いた遺伝子診断によりエクソン 7 欠失を確認できた DMD 患者さん 1 名について、センター病院に入院して頂き、以下の検索を行なった。

a. 臨床評価

呼吸機能では肺活量は 2 1 8 0 ml と年齢標準と比較するとやや低下していたものの、夜間の低酸素血症、高炭酸ガス血症は認めなかった。側わんもごく軽度認めるのみであった。心機能は心臓超音波検査にて左室駆出率は 1 8 % と著明に低下しており、び慢性の壁運動低下を認めた。血漿脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は 148pg/ml (正常 18.4 以下) と高値を示していた。骨格筋 MRI ではほとんどの筋がほとんど脂肪置換していたが、後頸骨筋は比較的保たれていた。

b. 局所麻酔のもと左上腕より皮膚を採取、直ちに培養を開始し、約 1 ヶ月で皮膚由来の線維芽細胞初代培養を確立することができたので、MyoD 変換筋芽細胞の作成も試みた。一方、リンパ球を EB ウイルスにより芽球化した。

c. in vitro exon skipping

以上の方法で得られた線維芽細胞、変換筋芽細胞、リンパ芽球を用いて、筋ジストロフィーのデータを参考に 4 種類の PMO による exon skipping を試み、RT-PCR 上、比較的高い効率で目的とする products が得られた。

3. mdx52 マウスを用いたエクソン 51

スキップの検討

(1) PMO の局所投与

エクソン 51 の ESE を標的に設計した Enh1 および英国グループが設計した B30 の投与により、RT-PCR で 30%前後のスキップ効率を得られた。Wilton らの報告を参考に、スプライス・ドナーおよびアクセプターを標的にした 2 種類のモルフォリノの組合せ (モルフォリノ A+D) を投与したところ、RT-PCR によるスキッピング効率は 66%であり、ウエスタン・ブロットでのジストロフィンの発現も、野生型の約 40%と高い効率でスキッピングを認めた。

(2) PMO の全身投与

モルフォリノ A+D の mdx52 マウスに対する全身投与では、全身の骨格筋で野生型の 10-50%のジストロフィンの発現回復を認めた。治療後の mdx52 マウスでは、筋病理の筋ジストロフィー変化が改善し、未治療の mdx52 マウスと比べて血清 CK 値、長趾伸筋の筋張力、両前肢の握力およびトレッドミルを用いた持続走行時間が有意に改善した (各 n = 4)。血液検査と肝・腎の病理所見では毒性は認めなかった。

4. PPMO 及び vivo Morpholino を用いた exon skipping の検討

(1) 発現解析

ジストロフィン特異的な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、全身投与後の骨格筋および心筋において広範なジストロフィン及び nNOS、 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。発現効率は、心筋を含めたすべての組織において、静脈投与と心カテーテル投与のどちらともほぼ同レベルであった。PPMO 及びビボモルフォリノのアンチセンスカクテルによるジストロフィン発現効率は、これまで用いられてきた PMO と比較し 10 倍以上に達した。

また、発現の持続期間においても、ともに PMO よりも長く、投与後 8 週において広範な発現が認められた。

(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顕著に減少していた。

(3) 機能評価

心電図検査により筋ジスト犬に特徴的に認められる異常 Q 波の大きさを測定したところ、非投与の対象動物と比較して、顕著な低下が認められた。

(4) 毒性試験

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。

5. exon45-55 スキップの試み

RT-PCR で exon 45-55 欠失に相当する増幅産物を認め、exon 44 と 56 が直接結合していることを塩基配列で確認した。ウエスタンブロットでは、正常マウスジストロフィン量の約 1% が検出された。免疫組織化学ではジストロフィン陽性線維は約 5% であった。

D. 考察

1. 臨床治験へ

DMD 患者さんに対してモルフォリノを用いたエクソン・スキッピングを進めるためには、exon 6/8 スキップと exon 51 スキップについては異なった方針で進めることが必要である。即ち、exon 6/8 スキップについては、稀な遺伝子変異を対象としており、これまで見いだされた患者さんも 1 人であることから、臨床研究として実施する。一方、exon 51 スキップについては、対象となる患者さんも多いことから、医薬品としての認証を目的として治験を行なうこととした。

a. 臨床研究について

今年度までの検討で、遺伝子診断の確定

した exon 7 欠失による DMD 患者さんについて、in vitro での exon skipping に成功したので、局所投与を行なうことができるかどうか検討を開始した。実施のためには、患者さんの informed consent の取得を前提として、臨床側との十分な相談、GLP 準拠施設での毒性試験が必要である。

b. 臨床試験について

exon 51 スキップについて、これまでモデル動物で行なわれてきた Antisense Morpholino を用いたエクソン・スキッピングを臨床治験として行なうために必要な事項を以下のように列挙することができる。尚、この過程は、現在 translational research と呼ばれている。

- (1) 実験動物を用いた有効性試験
- (2) 実験動物を用いた安全性（毒性）試験
- (3) Pharmacodynamics
- (4) GMP グレードの PMO の供給
- (5) 対象となる DMD 患者のリクルート
- (6) 臨床評価
- (7) 臨床治験のためのプロトコル作成
- (8) 薬事相談

毒性試験及び Pharmacodynamics に関しては、09 年 2 月から米国と共同で GLP 施設における検討が開始された。対象となる DMD 患者のリクルートに関しては、exon 6/8 の場合と異なって、exon 51 skip の場合には、対象となる患者数が多いことから、委託費による研究班及び国立精神・神経センターの事業として進展すれば比較的容易に実現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。国立精神・神経センターの倫理委員会からも CINRG への参画について基本的な了承が得られているので、CINRG を構成する最も主要な要素の一つである定量的筋力評価(CQMS)の輸

入が早く実現するように努力したい。

臨床治験のためのプロトコルの作成と薬事相談に関しては、本研究が先進医療特区（スーパー特区）課題として採択されたことから一層の進展が期待される。

最後に最も困難であると考えられるのは、治験実施のために欠かすことのできない GMP グレードのモルフォリノを入手することである。それは GMP グレードのモルフォリノの生産設備を持つ AVI Biopharma が特許を有しているため、その使用について多く制約をかけていることによる。そこで、国内有数の Venture 企業を介して AVI Biopharma 社との接触に努めている他、モルフォリノに頼らない人工核酸化合物の可能性に着目して、国内・外の有力な製薬企業との共同研究を模索し、幾つか候補が得られている。

一方、臨床研究ばかりでなく、臨床治験を行なう場合でも、まず、患者さん由来の培養細胞を用いて *in vitro* skipping を実現する必要がある。筋ジス犬の皮膚線維芽あるいは MyoD により転換した筋芽細胞は初代筋芽細胞と同様に exon 6-8 の skipping が誘導され、その効率はほぼ同等であったことから、皮膚線維芽細胞を用いた *in vitro* 解析は初代筋芽細胞の代用となりうると思われる。一方、筋ジス犬の末梢血リンパ球では exon skipping は誘導されなかったが、Exon 45-50 の欠失を持つ DMD 患者のリンパ芽球細胞では exon 51 の skip が誘導されたことから、細胞の成熟度がトランスフェクションの効率に影響している可能性がある。何れにしても、これらの方法を更に成熟させて臨床治験の実現に向けて努めたいと考えている。

2. mdx52 マウスを用いた前臨床試験

DMD を対象にしたオランダの Leiden データベースによる解析では、エクソン 51 スキップによりアウト・オブ・フレーム

変異をイン・フレーム化しても、DMD となる可能性が高いことが示唆されていた。今回我々は *mdx52* マウスを用いた実験で、スプライス・ドナおよびアクセプタを標的にした 2 種類のモルフォリノの組合せを全身投与することにより、全身の骨格筋で 10-50% 程度のジストロフィンの発現が回復すれば、筋機能が改善することを初めて示した。今回の成果により、現在、オランダ、英国、日本/米国で計画されている DMD を対象にしたエクソン 51 スキップの臨床治験を行うためのモデル動物での proof of concept が得られたと言える。Leiden データベースは登録された症例数が非常に多いため、遺伝子型と臨床型との関連を調べる目的に世界中で用いられているが、主としてゲノム DNA の変異パターンと臨床型との関連を記載しているため、イントロンの変異あるいはスプライシンの過程で生じる変異を見逃す可能性がある点で問題がある。臨床型との関連を厳密に調べるには個々の症例で mRNA の変異パターンを調べる必要がある。

3. モルフォリノの持つ問題点の克服

(1) 次世代モルフォリノの使用について

本研究では、細胞膜透過性の高い新世代アンチセンス・カクテル投与を用いることにより、中型の動物モデル（犬）においてはじめて心筋を含む全身のジストロフィン発現の導入に成功した。今後、治療効果をより長期にわたって調べるため、2 週間隔の連続投与を行う計画である。本研究により新世代型のモルフォリノのカクテル投与方法を確立することが出来れば、DMD 患者のうち約 90% を対象に、心臓を含めた全身の治療が実現できる可能性がある。しかも、DMD 患者のそれぞれの遺伝子変異のパターンに応じて、エクソンスキッピングにより生ずる短縮型

のジストロフィンタンパクの機能を最適化するための標的エクソンを複数選択してデザインする展望を描くことができる。

(2) exon45-55 スキップについて

例として、同遺伝子のエクソン 45-55 欠損 (In-frame) 例の患者では、大きな領域の欠損にもかかわらずその大部分が軽症あるいはほぼ無症状であり、エクソン 45-55 間のより小さな In-frame 変異パターンのいずれよりも軽症患者の割合が多い。我々は同領域 (11 エクソン) をカバーする AO カクテルをデザインし、すでにマウス生体内においてこれらのエクソンスキップによるジストロフィン発現導入に成功した (Aoki *et al.*, *Unpublished*)。同手法は大きな治療効果が期待できるのみならず、カクテルとして単一の薬と認められれば、臨床応用のために必要とされる AO 配列の個別の毒性試験の障壁が取り除かれ、しかもジストロフィン欠損患者全体の 60% 以上に適用できる可能性がある。今後は、最適な morpholino の組合せを決定し、mdx52 マウスへの全身投与を検討する必要がある。

E. 結論

1. exon 6/8 スキップについては、臨床研究としての実施を目指して、国内で見いだされた exon 7 欠失患者さんを対象に検討を進めた。

2. 線維芽細胞、変換筋芽細胞、リンパ芽球を用いた in vitro エクソン・スキッピングを確立した。

3. exon 51 スキップについては、臨床治療を行なうために、GLP 施設での毒性試験と Pharmacodynamics の検討、GMP グレードのモルフォリノの供給、対象となる DMD 患者のリクルート、臨床評価の確立、臨床治験プロトコルの作成、薬事相談について検討を進めた。

4. mdx52 マウスを用いた PMO 投与実験

で、エクソン 51 スキップにより全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、明らかな毒性なく筋機能が改善することを示した。

5. ジストロフィン遺伝子のエクソン 6 及び 8 を標的とした細胞膜透過性の高い新世代型のアンチセンスモルフォリノ (PPMO) のカクテル投与により、筋ジストロフィーにおいて心臓を含む全身のジストロフィン発現及び心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。

6. Mdx52 マウスを用いてエクソン 45-55 スキッピングが実現可能であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E: Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*. 2009; in press
2. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J*, 2009, in press
3. Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP: A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon

- skipping breaks new ground. *Arch Neurol* 66: 32-38, 2009
4. Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, Takeda S, Ikeda S:
Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45-55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet.* 54: 127-130, 2009
 5. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanasaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S:
Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech Dev* 126: 107-116, 2009
 6. Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T:
Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet.* 18: 621-31, 2009
 7. Sekiguchi M, Zushida K, Yoshida M, Maekawa M, Kamichi S, Yoshida M, Sahara Y, Yuasa S, Takeda S, Wada K:
A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain* 132: 124-135, 2009
 8. Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S:
Transduction Efficiency and Immune Response Associated With the Administration of AAV8 Vector Into Dog Skeletal Muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009
 9. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H:
Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res*: 314: 3232-3244, 2008
 10. Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T:
MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct.* 33: 163-169, 2008
 11. Katsumata O, Honma T, Sanda M, Kamata A, Takeda S, Kondo H, Sakagami H:
Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res.* 1234:44-49, 2008
 12. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.* 173: 781-791, 2008
 13. Sato K, Yokota T, Ichioka S, Shibata M, Takeda S:
Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol.*

- 27:30-36, 2008
14. Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S: Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther.* 19: 719-730, 2008
 15. Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, Ueda H, Urasawa N, Koyama J, Yazaki Y, Yazaki M, Sakai T, Haruta S, Takeda S, Ikeda S: Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Clin Neurosci.* 15: 757-763, 2008
 16. Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H: Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through {beta}-synemin, {alpha}-dystrobrevin and actin. *J Cell Sci.* 121: 2062-2074, 2008
 17. Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishibori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H: The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 582: 2212-2218, 2008
 18. 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* 117: 2437-2448, 2008
 19. 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.* 10: 702-713, 2008
 20. 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.* 22: 477-487, 2008
 21. 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.* 9: 1, 2008
 22. Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H: CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin α2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res.* 314:193-203, 2008
 23. Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral Vector-Producing Mesenchymal Stem Cells for Targeted Suicide Cancer Gene Therapy. *J Gene Med.* (in press)
 24. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholeslami K, Nomoto T,

- Muramatsu S, 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* 16: 474-480, 2008.
25. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16: 383-391, 2009
26. 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* 10: 368-374, 2008
27. Murata M: Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 1: S17-S20, 2009
28. Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T & Hattori N: LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J Hum Genet* 53: 1012-1015, 2008

【和文原著】

1. 北秀樹, 中村昭則, 市川慎一, 八幡由

美子, 小林正典, 弓削田直子, 武田伸二: 筋ジストロフィー犬(CXMD₁)の飼育管理における胃内カテーテル投与方法およびハンド・フィーディング法の有用性, 実験動物技術 43: 17-24, 2008

【著書】

1. Okada T, Takeda S: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in A Guide to Human Gene Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), *World Scientific*, NJ.(in press)
2. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S: Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation Editors: Kunihiko Tsuchida and Shin'ichi Takeda. Research Signpost 378/661(2) Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India, 2008

【総説】

1. 矢田英理香, 武田伸一: iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療の展望 難病と在宅ケア in press, 2009
2. 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療. 総合リハビリテーション 36: 1043-1049, 2008
3. 齊藤崇, 武田伸一: 高齢者の筋ジストロフィー/多発性筋炎のケア Modern Physician: 28, 656-660, 2008
4. 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一: ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの治療法開発 医学のあゆみ 226: 379-383, 2008
5. 武田伸一:

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療 財団法人 精神・神経科学振興財団 News Letter No.3, 2008

6. 吉村まどか, 武田伸一:
筋ジストロフィー・ミオパチー 総合臨床 57: 606-608, 2008
7. 深田宗一朗, 鈴木 友子, 武田 伸一:
筋ジストロフィーの治療とケア: 筋衛星細胞の維持 活性化と自己複製の制御機構. 難病と在宅ケア 14: 50-52, 2008
8. 岡田尚巳:
間葉系幹細胞を利用した癌遺伝子治療 最新医学 63 巻 12 号、64-71、2008
9. Okada T, Ozawa K:
Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008
10. 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* 30: 121-127, 2008

11. 学会発表

<国外>

1. Imamura M, S. Takeda:
Analysis of Allele-Specific Expression of the Mouse ϵ -Sarcoglycan Gene, 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 13-17 December, 2008
2. Takeda S:
Characterization of adult progenitor cells in skeletal muscle, 8th International Conference, The biology of stem cells, Institut des Cordeliers, Paris, France, 27-

28th November 2008

3. Takeda S:
Management of DMD in Japan, Seminar at Santhera Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, 26 November 2008
4. Takeda S:
The 1st Scientific Council Meeting of the Institute Myology, University Pierre et Marie Curie Paris 6, Pitie-Salpetriere Hospital, France, 4 November 2008
5. Takeda S:
The significance of multi-exon skipping of the dystrophin gene by Morpholino treatment, Oligonucleotide-directed splicing: Therapeutic Strategies, Cold Spring Harbor Laboratory, 14-17 October 2008
6. Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Orima H, Takeda S:
Noninvasive evaluation of necrotic change in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) by fat-suppressed T2-weighted imaging. 13th International Congress of the World Muscle Society, Newcastle Gateshead, UK, 29 September-2 October, 2008
7. Takeda S:
Muscle progenitor cells in skeletal muscle: their functions and potencies in therapy. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle development and regeneration, First EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 9.24-29, 2008
8. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Endo T, Takeda S:
Abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan results in poor proliferation and limited migration of muscle satellite cells. 6th International

- Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2008. June 11, 2008. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA
9. Shin JH, Ohshima S, Yuko K, Okada T, Takeda S:
Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated microdystrophin transduction in mdx mice. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 13, 2008.
 10. Ohshima S, Shiin JH, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S:
Effective Transduction of Dystrophic Dogs with rAAV Serotype 8, Oral abstract session, 11th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 5.28-6.1, 2008
 11. Yokota T, Lu QL, Partridge TA, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman EP:
Body-wide Restoration of Dystrophin Expression and Amelioration of Pathology in Dystrophic Dogs Using a Morpholino Cocktail Presentation of the top abstracts, special plenary session, 11th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 5.28-6.1, 2008
 12. Takeda:
Characterization of adult progenitor cells in skeletal muscle, Plenary Lectures, Myology 2008, Marseille, France, 5.26-30, 2008
 13. Nakamura A, Takeda S:
MRI imaging, Clinical trial endpoints discussions, Annual Meeting Muscular Dystrophy Programs, Washington DC, March, 2008
 14. Suzuki Y, Ito M, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K:
Recombinant extracellular matrix protein expressed in a limited number of cells propagates to the target organ throughout the body using its nascent tissue-targeting signal. 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland Aug 23-27, 2008
 15. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA Nov 15-19, 2008
 16. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
rAAV8-mediated protein anchoring of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. The ASCG 48th annual meeting, San Francisco LA, USA, Dec 13-17, 2008
- <国内>
1. 本橋 紀夫, 矢田 英理香, 鈴木 友子, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と骨格筋への分化誘導法の検討, 第 8 回日本再生医療学会総会, 東京, 3.5, 2009
 2. Takeda S:
The advance of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy, 50th Anniversary Symposium. Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker

- of Muscular Dystrophy, Tokyo, 1.10, 2009
3. 武田 伸一, 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田 尚巳:
9 型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2009
 4. 武田 伸一, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則:
mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの前臨床研究 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2009
 5. 大野 欽司, 伊藤 美佳子, 鈴木 優美, 岡田 尚巳, 武田 伸一, 福留 隆泰, 吉村 俊朗, Eric Krejci:
Protein anchoring therapy による終板 acetylcholinesterase 欠損症治療 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究、研究班会議, 東京, 12.15, 2009
 6. 武田伸一:
nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである、シンポジウム、メカニカルストレスに対する筋・骨格系の応答の分子機構、第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12.12, 2008
 7. 伊藤尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一:
神経型一酸化窒素合成酵素は Akt シグナルを介して筋肥大の進行を制御している、一般口頭発表 2T13-5. ポスター発表 2P-0338. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、12.10, 2008
 8. 武田 伸一, 矢田 英理香, 本橋 紀夫, 鈴木 友子:
mdx マウスからの iPS 細胞の樹立とその筋分化能の検討、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」(主任研究者: 武田伸一) 平成 20 年度班会議, 東京, 12. 4, 2008
 9. 横田俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge, 小林 正典, 浦澤 延幸, 中村 昭則, Ryszard Kole, Peter Sazani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田 伸一:
アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィーの試み。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」(主任研究者: 武田伸一) 平成 20 年度班会議, 東京, 12.3-4, 2008
 10. 武田伸一, 青木吉嗣, 横田俊文, 齊藤 崇, 中村昭則:
mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの前臨床研究。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」(主任研究者: 武田伸一) 平成 20 年度班会議, 東京, 12.3-4, 2008
 11. 裏出良博, 有竹浩介, 林正裕, 鎌内慎也, エリザベス・コー・三田村, 永田 奈々恵, 武田伸一, 中村昭則:
筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発-プロスタグランジン D 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減療法の開発。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」(主任研

- 究者：武田伸一）平成 20 年度班会議，東京，12.3-4, 2008
12. 万年英之，松本大和，笹崎晋史，藤原哲，市原伸恒，菊池建機，中村昭則，武田伸二：
ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子に関する検討-WWPI 関連蛋白質に対する発現解析。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」（主任研究者：武田伸一）平成 20 年度班会議，東京，12.3-4, 2008
13. 高橋明男，中村昭則，小林正典，武田伸一：
筋ジストロフィーの確立・維持と病態解析-筋ジストロフィー犬新生子劇症型の病態機序に関する検討-。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」（主任研究者：武田伸一）平成 20 年度班会議，東京，12.3-4, 2008
14. 吉田幹晴，谷端淳，本橋紀夫，矢田英理香，Matthias Mueller，武田伸一：
BL/6 マウス骨格筋のグリセリンによる再生誘導と脂肪細胞。厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」（主任研究者：砂田芳秀）平成 20 年度班会議東京，12. 15, 2008
15. 関口 正幸，和田 圭司，山本 和弘，高橋 明男，吉田 幹晴，武田伸一：
ジストロフィン欠損マウス情動行動異常に対する治療研究-モルフォリノオリゴヌクレオチド脳内投与による行動異常の軽減。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」（主任研究者：武田伸一）平成 20 年度班会議東京，12. 3, 2008
16. 武田伸一，辛 鎮洪，笠原 優子，喜納裕美，岡田 尚巳：
9 型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 平成 20 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、研究班会議 平成 20 年 12 月 3 日、東京
17. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する分子治療の展望，第 62 回国立病院総合医学会，11.22.2008
18. 辛 鎮洪，笠原 優子，喜納 裕美，岡田 尚巳，武田伸一：
9 型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 第 3 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会平成 20 年 10 月 25 日、山梨
19. 矢田 英理香，本橋 紀夫，鈴木 友子，武田伸一：
Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立とその筋分化能の検討，第 3 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会，山梨，10. 25, 2008
20. 武田伸一：
筋ジストロフィー研究の進歩：ラボ・ベンチからベッド・サイドへ，第 17 回なにわ脳神経内科懇話会（なにわ会），大阪，10.11, 2008
21. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する新たな治療の進歩，第 16 回阪神小児神経疾患研究会，大阪，7.19, 2008
22. 中村昭則，武田伸一：
モルフォリノを用いた筋ジストロフィーに対する新しい治療，第 5 回筋ジストロフィー市民公開講座，東京，

- 6.14.2008
23. Kasahara Y, Nishiyama A, Shin JH, Ohshima S, Okada T, Takeda S: Myogenic differentiation of mesenchymal stem cell and cell therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008.
 24. 辛鎮洪, 大島幸子, 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一: Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated microdystrophin transduction in mdx mice, 第 14 回日本遺伝子治療学会, 6.13, 2008
 25. 武田伸一: 筋ジストロフィーの治療に向けて, 筋ジストロフィー協会神奈川県総会, 横浜, 6.8.2008
 26. 武田伸一: Gene Therapy for Muscular Dystrophy, 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.28.2008
 27. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する分子治療の現況, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究科, 東京, 5.20.2008
 28. 武田伸一: 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, 第 45 回日本筋ジストロフィー協会全国大会, 東京, 5.18.2008
 29. 増渕菜弥, 宮本香織, 和田倫子, 花岡和則, 遠藤玉夫, 鈴木友子, 武田伸一: alpha-ジストログリカンの O-マンノース型糖鎖修飾は骨格筋幹細胞の増殖と移動に重要である, 第 6 回幹細胞シンポジウム, 東京, 5.16.17.2008
 30. 青木吉嗣, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノによ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, 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16.2008
 31. 福島和広, 宮崎大吾, 本橋紀夫, 吉田邦広, 中村昭則, 鈴木友子, 武田伸一, 池田修一: 骨格筋再生における matrix metalloproteinase (MMP)-2, -9 の役割の検討. 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日, 横浜
 32. 宮崎大吾, 福島和広, 中村昭則, 吉田邦広, 武田伸一, 池田修一: ジストロフィン遺伝子 (DMD) exon 45-55 欠失例の臨床的, 分子遺伝学的検討. 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日, 横浜
 33. 中村昭則, 小林正典, 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法の検討, 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16.2008
 34. 八幡由美子, 北秀樹, 小林正典, 市川慎一, 中山隆幸, 大島幸子, 辛鎮洪, 齊藤崇, 弓削田直子, 岡田尚巳, 中村昭則, 武田伸一: 新生子筋ジストロフィー犬の呼吸筋障害の検討. 第 55 回日本実験動物学会総会, 第 42 回日本実験動物技術者公開総会 2008 年 5 月 15-17 日, 仙
 35. 岡田尚巳: AAV ベクターの作製と筋疾患遺伝子治療への応用 第 14 回日本遺伝子治療学会学術集会 平成 20 年 6 月 13 日, 札幌
 36. 岡田尚巳: AAV ベクター作製法の工夫と筋疾患遺伝子治療への応用 日本医科大学ハイテクリサーチセンターセミナー 平成 20 年 6 月 23 日, 東京
 37. 岡田尚巳: 生活習慣病・神経筋疾患に対する細胞遺伝子治療の開発 第 12 回小児分子内分泌研究会 平成 20 年 7 月 5 日, 小

樽

38. 岡田尚巳:
骨髄間質細胞を用いたがん遺伝子治療第7回遺伝子治療シンポジウム「幹細胞の機能制御と難病治療への応用」
平成21年1月30日, 大阪
39. 大澤真木子, 斉藤崇, 青木吉嗣, 横田俊文, 中村昭則, 武田伸一:
Duchenne型筋ジストロフィーの臨床研究に向けた antisense oligonucleotideを用いたエクソン・スキッピングのインビトロ解析。平成20年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーの臨床試験実施体制に構築に関する研究 平成20年12月5日, 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし