

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 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。

## B. 研究方法

### 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。

### 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。

### 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. 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。

## C. 研究成果

### 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イ島で開催されたWorld Muscle Societyの年次総会に参加、並びに2007年4月~2008年3月に発行された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た。

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ション化するため、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'-O-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、治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。

## 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。

## 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、臨床治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治験管理室長、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. 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

一協会と協力して、全国的な registration を立ち上げることで一致をみた。

#### D. 考察

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、筋ジストロフィー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。

## E. 結論

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。

## 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. 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, Kanesaki H, Kudo A, Manya 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  $\alpha$ 2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res.* 314:193-203, 2008
  23. 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

#### 【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(CXMD<sub>1</sub>)の飼育管理における胃内カテーテル投与法およびハンド・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: Kunihiro 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. 深田宗一郎, 鈴木友子, 武田伸二: 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

#### II. 学会発表

<国外>

1. Imamura M, S. Takeda:  
Analysis of Allele-Specific Expression of the Mouse  $\epsilon$ -Sarcoglycan Gene, 48<sup>th</sup> 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, 8<sup>th</sup> International Conference, The biology of stem cells, Institut des Cordeliers, Paris, France, 27-28<sup>th</sup> November 2008
3. Takeda S:  
Management of DMD in Japan, Seminar at Santhera Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, 26 November 2008
4. Takeda S:  
The 1<sup>st</sup> 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. 6<sup>th</sup> 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, 11<sup>th</sup> 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, 11<sup>th</sup> 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

<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治療の試み. 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, 武田伸一:  
ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子に関する検討-WWP1 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:  
筋ジストロフィー犬コロニーの確立・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回阪神小児神経筋疾患研究会, 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, 仙台
- H. 知的所有権の出願・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

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

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

**研究要旨**

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 (CXMDJ) 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。さらに、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。

**A. 研究目的**

DMD はジストロフィン遺伝子の変異により生ずる遺伝性筋疾患である。前年度までに我々は AO のカクテルをデザインし、複数のエクソンを同時にスキップさせる手法を開発することにより、筋ジストロフィー犬 (CXMD<sub>J</sub>) の全身骨格筋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が、心筋においては発現の回復は限られていた。そこで、我々は、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デンドリマー付加型のピボモルフォリノ (GENE-TOOLS 社) によるカクテルアンチセンスをデザインし、心筋のエクソンスキッピング治療を試みた。

**B. 研究方法**

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) の筋ジストロフィー犬に対し 120-600 µg の PPMO およびピ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 週間後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。

**C. 研究成果**

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、 $\alpha$ -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 及びピ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。

## D. 考察

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。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 of the 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。

## E. 結論

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、筋ジス犬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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

1. 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* 2009; 66:32-38

2. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman EP:  
Efficacy of systemic morpholino exon skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol. In Press.*
3. 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.* 2008; 27:30-36.

## II. 学会発表

1. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E:  
Body-Wide Restoration of Dystrophin Expression and Amelioration of Pathology in Dystrophic Dogs Using a Morpholino Cocktail. American Society of Gene Therapy 2008, Boston, MA, USA

- ## H. 知的所有権の出願・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

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

分担研究者 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

**研究要旨**

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。

**A. 研究目的**

*mdx52* マウスに対して Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) を投与し、エクソン 51 スキッピングによるジストロフィンの発現回復、効果、毒性を検証した。

**B. 研究方法**

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。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。

**C. 研究成果**

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が得られた。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。

#### D. 考察

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スキップの臨床治療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。

#### E. 結論

*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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

##### <英文>

##### 【原著】

1. 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: 73-91, 2009
2. 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)
3. 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
4. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholslami 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.
5. 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

6. 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

#### 【総説】

1. Okada T, Ozawa, K: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008.
2. 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.

#### 【図書】

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)

#### <和文>

##### 【総説】

1. 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フィーの治療法開発 *医学のあゆみ* 226巻5号、379-383、2008
2. 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

#### II. 学会発表

##### <国外>

1. Shin J, Ohshima S, Yuko K, Okada T, Takeda S:

Electrocardiographic improvement of *mdx* heart by transduction with rAAV9-*microdystrophin*. American Society of Gene Therapy 11<sup>th</sup> Annual Meeting, Boston, MA, USA, May 30, 2008.

2. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective transduction of dystrophic dogs with rAAV serotype 8. American Society of Gene Therapy 11<sup>th</sup> Annual Meeting, Boston, MA, USA, June 1, 2008
3. 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
4. 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
5. 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
6. Shin J, Ohshima S, Kasahara Y, 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
7. Kasahara Y, Nishiyama A, Shin J, 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

8. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Transduction efficiency and immune response with rAAV8 in dog skeletal muscle. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008
9. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K: rAAV8-mediated protein anchoring therapy for congenital defect of collagen Q. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008

#### <国内>

1. 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
2. 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
3. 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 回小児分子内分秘研究会 平成 20 年 7 月 5 日、小樽
4. 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

#### 班会議、シンポジウム等

1. 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
2. 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 平成 20 年 12 月 15 日、東京
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 平成 21 年 1 月 9 日、東京
4. 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

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他、特記事項  
なし

*Mdx52* マウスを用いた *DMD* 遺伝子 exon 45-55 skipping の検討

分担研究者 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

**研究要旨**

*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**

我々は、*DMD* 遺伝子 exon 45-55 が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する。

**B. 研究方法**

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**

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**

*mdx52* マウスを用いて exon 45-55 skipping が可能であることを mRNA レベルとジストロフィンの発現回復で確認した。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**

*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**

**I. 論文発表**

<英文>

1. Nakamura A, et al. 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

II. 学会発表

<国内>

青木吉嗣, 武田伸一, 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、  
筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床  
に展開するための統括的研究

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし