

200917002A

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事業)

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成22(2010)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事業)

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成22(2010)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	-----17
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	-----26
3. Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた <i>mdx52</i> 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	-----29
4. 培養細胞でのエクソン・スキップの有効性の検証 中村 昭則	-----32
5. 臨床治験の準備に関する研究 村田 美穂	-----35
6. 「治験に関する準備」研究 中林 哲夫	-----37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----40
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----41

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

研究代表者	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
研究分担者	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
	中林 哲夫	国立精神・神経センター 病院 治験管理室 医長

研究要旨

1. デュシェンヌ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。近年有望とされる分子治療にエクソンスキッピングがあるが、一部の変異を持つ患者に適用が限られる欠点があった。我々は、モルフォリノ(PMOs)と呼ばれるアンチセンスオリゴ (AO) 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 Multiple-exon skipping の手法を開発した。同手法により、これまでエクソンスキッピングの適用外と考えられていた筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) のジストロフィン発現回復及び病態の改善にはじめて成功した。さらに新たに開発された細胞膜透過性のペプチド付加型モルフォリノ (PPMO) によるカクテルアンチセンスをデザインし、筋ジス犬の心筋を含む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。加えて、エクソン 6 及びエクソン 8 に対するアンチセンスシーケンスをスクリーニングしたところ、単一のエクソンをスキッピングする目的においても、カクテルを用いることにより効率の上昇が認められた。

2. 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。皮膚生検により線維芽細胞を採取し、筋分化制御因子である MyoD 遺伝子を用いて筋細胞に変換し PMO による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を確認した。この研究により、エクソン・スキップの臨床応用の際に前提となる *in vitro* エクソン・スキップ法を確立することができた。

3. ジストロフィン遺伝子エクソン 52 欠失マウス (*mdx52* マウス) を対象に、エクソン 51 を標的に 15 種類のアンチセンス配列を設計し、筋注によりスキップ効率を

比較した結果、エクソン 51 の 5'および 3'スプライスサイトを同時に標的にした場合に、スキップ効率が最も高かった。至適配列を有するアンチセンス・モルフォリノを、*mdx52* マウスに経静脈的に投与し 2 週間後に解析したところ、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が野生型の 10-40%まで回復し、筋機能の改善を認めた。続いて、エクソン 45-50 欠失を有する DMD 患者由来の線維芽細胞を対象に、*in vitro* の系でエクソン 51 スキップを誘導した結果、ヒトにおいてもエクソン 51 の 5'および 3'スプライスサイトを同時に標的にした場合に最も高いスキップ効率が得られることがわかった。

4. Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する、エクソン・スキップ治療を臨床応用するための基盤整備として、国際共同治験の準備を行った。国際共同の臨床研究グループ(CINRG)の正式メンバーの承認を得て、共通評価機器の輸入を開始した。昨年度に開始したデータベースについても検討を継続し治験を行う際の患者リクルートに関するシステムの確立をはかった。DMD の臨床治験を進める臨床的な基盤が整いつつある。

5. 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・スキップ治療を目標とした治験の実施を計画するために、当該疾患を対象とした国内外の開発の動向を調査した。その上で、Duchenne 型筋ジストロフィーを対象とした臨床開発の問題点を評価し、必要な対策と体制整備について検討した。

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でも *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(Yokota, et al. *Ann Neurol*, 2009)。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。

しかし、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エンドリ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、心筋のエクソンスキッピング治療を試みた(横田分担研究者)。

次に、本質的に筋ジス犬と同じ遺伝子変異を持つDMD患者さんが見い出された。そこで、*in vitro* exon skippingの検証を進めた(中村分担研究者)。また、エクソン・スキップを更に多くのDMD患者さんに届けるためにexon51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)。

これらの方法を臨床に応用するためには臨床評価の方法を確立することが重要である(村田分担研究者)。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なった(以上、武田/中林分担研究者)。

B. 研究方法

1. 新世代モルフォリノを用いたエクソン 6/8 スキップ

犬 DMD 遺伝子のエクソン 6 及びエクソン 8 に対するアンチセンス薬として、25 mer のモルフォリノをそれぞれ 10 種デザインし、それぞれについて単一及び 2 種類のアンチセンスのカクテルとして、筋ジス犬由来の骨格筋および線維芽培養細胞へのトランスフェクションを行った。エクソンスキッピング効率は、RT-PCR 法、

cDNA シーケンシング、及びウェスタンブロットティング法により確認した。さらに、効果の高かったアンチセンスのカクテルについて、筋ジス犬の骨格筋に対し 120-600 μ g のモルフォリノ及びピボモルフォリノのカクテルを局所投与した。投与後 2 週間後にジストロフィン発現量及び組織像の評価を行なった。

2. 患者線維芽細胞でのスキップ治療の有効性の確認

筋ジス犬で得られた結果を直接応用することができる DMD 患者さんを国内に見出した。MLPA 法でジストロフィン遺伝子のエクソン 7 欠失と診断された DMD 患者(DMD8772)より、当センター倫理審査委員会の承認を経て、皮膚生検により線維芽細胞、末梢血よりリンパ球を採取した。DMD8772 のリンパ球は EBV により芽球化した。線維芽細胞に筋細胞への転換を企図してレトロウイルスを用いて MyoD-IRES-GFP 遺伝子を導入し、FACS で GFP 陽性細胞集団を回収した。これらを 2%ウマ血清を含む分化培地で培養して筋分化を誘導し筋管を得た。CXMD₁ の全身投与に用いた PMO アンチセンス (Ex6A, Ex6B, Ex8A)、及び *in silico* で予測したエクソン 8 に存在するスプライシング促進モチーフのうち、イヌ/ヒト間で配列が共通した領域を標的とした PMO アンチセンス (Ex8G, Ex8I, Ex8K) を設計した。複数の PMO アンチセンスを混合してカクテルとして用いた。Ex6A, Ex6B (または hEx6B), Ex8A からなる 3 カクテル、及び 3 カクテルに Ex8G, Ex8I または Ex8K のいずれかを加えた 4 カクテルとして、それぞれのアンチセンスの濃度の合計が 30 μ M、並びにトランスフェクション試薬である Endo-Porter R の濃度が 6 μ M となるよう培地に添加し、36-72 時間経過後に回収した。トランスフェクション後の細胞を RT-PCR、Western blot、免疫染色により評価した。

3. *mdx52* マウスを用いたエクソン 51 スキップ

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 51 において、5'および3'スプライスサイト(それぞれ 51A, 51D)や ESEfinder3.0 ソフトにより同定した exonic splicing enhancer(ESE)を標的とする 25mer のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(AO)を 13 種類設計した。さらに、臨床治験に用いられている PRO051(mA20) および AVI4658 (mB30) に対応する 20mer と 30mer の AO を 2 種類設計した。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(8 週齢)の前脛骨筋に、単独あるいは 2 種類の PMO(計 1.25nmols)を 1 回投与し、2 週間後に RT-PCR, ジストロフィン免疫染色, ウェスタンブロットによる解析を行ない、最適な AO 配列を決定した。次に 8 週齢の *mdx52* マウスを対象に、最適化した配列を持つ PMO (合計 1000nmols) を、1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与し、最終投与の 2 週間後に筋機能, 病理, 毒性を検討した。続いて、CORIELL(New Jersey, USA)より購入したジストロフィン遺伝子のエクソン 45-50 欠損を有する Duchenne 型筋ジストロフィー由来の線維芽細胞株に対して MyoD による筋分化誘導後、ヒトに対して設計した AO 配列を用いてエクソン 51 スキップの効果を検討した。

4. エクソン・スキップの現況

(1) 諸外国の研究の現況

09/10 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。特に、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health: NIH)の臨床試験登録データベース(<http://www.clinicaltrials.gov/>)に登録されている Duchenne 型筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験について、選択・除外基準、対象年齢層、有効性評価項目、症例数、対照群の設定、試験デ

ザイン及び実施国について調査した。

(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なう必要がある。

5. 臨床評価方法の確立

エクソン・スキップ治療は米国などとの共同研究をもとに進めていくことを念頭に置いている。国際共同医師主導治験では、共通の評価法を用いることが治験を円滑に進めていくのに必要不可欠である。我々は米國小児医療センターを中心とした 11 カ国 23 施設で構成されている国際共同神経筋疾患臨床研究グループである、The Cooperative International Neuro-muscular Research Group (CINRG, <http://www.cinrgresearch.org/>)へ正式に加入することが国際共同治験を円滑に進めていくのに有用と考え、その準備を行なった。

6. エクソン・スキップの対象となる DMD 患者のリクルート

エクソン・スキップ治療は患者それぞれの遺伝子変異に基づく、テーラーメイド医療の典型ともいえる方法であり、臨床情報と遺伝子変異情報を併せた患者データベースの構築はエクソン・スキップ治療の対象となる患者のリストアップにおいて非常に重要な役割を担うものである。昨年度に開始した国立精神・神経センター病院でのデータベース構築を展開していった。さらに 2009 年 7 月より全国規模のジストロフィノパチーデータベースである Registry of Muscular Dystrophy (REMUDY, <http://www.remudy.jp>)が稼動をはじめたが、REMUDY の計画に参加するとともに、国立精神・神経センター病院データベースとの連携を進めていくこととした。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮については、国立精神・神経センターの小型動物倫理委員会あるいは中型動物倫理委員会における事前の承認を受けるとともに、動物の苦痛を最小限にとどめるための鎮痛剤の使用、及び必要最低限の動物の使用により実験を行なった。また、アンチセンスのスクリーニングにおいては、培養細胞による代替法を用いた。CINRG参加とCQMS機器の輸入に関して国立精神・神経センター倫理委員会への申請を行ない承認を得た。患者データベースについては昨年度までに倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究成果

1. 新世代モルフォリノを用いたエクソン 6/8 スキップ

1) 細胞実験によるスクリーニング解析
筋ジス犬より得られた骨格筋および線維芽培養細胞へのトランスフェクションによる解析では、エクソン 6 及びエクソン 8 に対する最適なアンチセンス配列、及びカクテルのコンビネーションの解析を行った。計 30 μ g のモルフォリノをトランスフェクトした検討では、エクソン 6 に対しては Ex6A 及び Ex6B と名づけたモルフォリノのカクテルにおいて、もっとも効率の高いエクソンスキッピングが認められた。また、エクソン 8 に対しては、Ex8A 及び Ex8G と名づけたモルフォリノのカクテルにおいて、もっとも効率の高いエクソンスキッピングが認められた。

2) 局所投与による解析

細胞実験の結果に基づき、Ex6A, Ex6B, Ex8A, Ex8G を含む 4 オリゴのアンチセンスモルフォリノ及びビボモルフォリノのカクテルを筋注し、我々が以前報告した Ex6A, Ex6B, Ex8A の 3 オリゴとエクソン 6-8 のマルチスキッピングの効率を比較した。その結果、新たに見出した 4 オリゴカクテルは骨格筋において広範なジ

ストロフィン発現を誘導し、陽性線維の割合は約 7 割に達した。ウェスタンブロット解析では、3 オリゴカクテルの約 3 倍のジストロフィン発現が認められ、発現レベルは正常犬の骨格筋とほぼ同じレベルに達した。

2. 患者線維芽細胞でのスキップ治療の有効性の確認

DMD8772 の変異形式を詳細に分析するために、ゲノム上での欠失断端解析を行なった。その結果イントロン 6 から 7 にかけて 50.4kb の欠失を認めた。DMD8772 由来線維芽細胞に筋分化制御因子である MyoD 遺伝子を導入し、FACS にて MyoD-GFP 陽性線維芽細胞を回収した。その後、分化培地にて癒合し多核で長軸方向に伸長した筋管への分化を確認し、ジストロフィン, myosin heavy chain などの筋特異的タンパク質の発現を認めた。ジストロフィン mRNA の発現は分化誘導開始後から漸増していたが、タンパク質レベルで十分な発現を確認するには約 2 週間の培養を要した。筋管に分化した DMD8772 由来の MyoD 導入線維芽細胞に対し、PMO アンチセンスを 3 及び 4 カクテルで投与した。いずれの細胞でもインフレームとなった mRNA が検出され、スキップ効率は 3 カクテルよりも 4 カクテルの方が優れていた。ジストロフィンタンパク質も両者の細胞で発現していたが、発現量は 3 カクテルよりも 4 カクテルで増加していた。PMO アンチセンスに対するスキップ効率やジストロフィン発現量は、CXMD₁ と比較しても DMD8772 で 3 カクテル, 4 カクテル間で類似した傾向を呈し、また Ex8G, Ex8I, Ex8K のいずれかを含む 4 カクテルの間では、スキップ効率、ジストロフィン発現量ともに大きな差は認めなかった。

3. mdx52 マウスを用いたエクソン 51 スキップ

1) 筋注による至適 AO 配列の検討

単一 PMO の投与においては、エクソン 51 の 3' スプライスサイトを標的に設計した 51D の投与により、RT-PCR で 50-55% 程度のスキップ効率が確認され、臨床治験で用いられている配列よりも効果が高かった。次に単独投与時にスキップ効率が高かった 2 種類の AO 配列の組み合わせ投与を 13 パターン試みた結果、エクソン 51 の 5' および 3' スプライスサイトを同時に狙った 2 種類の AO (51A プラス 51D) 投与した際の RT-PCR によるスキップ効率は 75% 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 50% 程度と最も高かった。

2) 配列至適化 PMO の全身投与

モルフォリノ 51A プラス 51D の *mdx52* マウスへの静脈投与後、全身の骨格筋で野生型の 10-40% 程度の短縮型ジストロフィンの発現回復を認めた。治療後の *mdx52* マウス (治療群) の筋病理標本では未治療の *mdx52* マウス (未治療群) と比べて筋ジストロフィー変化は改善し、中心核線維の割合は有意に減少していた。また、治療群では未治療群と比べて血清 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。血液検査と肝・腎の病理では明らかな毒性は認めなかった。

3) DMD 由来線維芽細胞株に対するエクソン 51 スキップ

MyoD 変換後の線維芽細胞を対象に、*in vitro* でエクソン 51 スキップを誘導した結果、マウス同様にヒトにおいても、エクソン 51 の 5' および 3' スプライスサイトを同時に標的にした場合に高いスキップ効率が得られた。

4. エクソン・スキップの現況

1) 諸外国の現状

(a) 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、2-0-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 2007 年 12 月発表された結果によれば、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。現在、皮下注による投与を行ない、筋力評価での改善を患者の一部に認めている。今後、長期投与に移行すると見られている。

(b) 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 スキップの臨床治験が進行していることが伝えられている。彼らは AVI 社から 30mer の Morpholino(AVI4658)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を検証した。Lancet Neurology に 2009 年 10 月に発表された結果によれば、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。現在、静注による投与の治験(escalating dose)に移行している。治験自体は終了していないが、プレスリリースによれば静注でも有効性が確認され、現時点での静注による有害事象は観察されなかった。

しかし、依然としてエクソン 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 の欠失による 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、良性型である 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

われる。

(c)米国における取り組み

米国においても、幾つかの臨床治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、オランダの venture company である Prosenza とライセンス契約を結んだ GSK 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。

NIH の臨床試験登録データベースに登録されている Duchenne 型筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験は、2010年2月1日現在で12試験が存在した。

長期投与3試験を除く9試験（第I相：1試験、第I/II相：3試験、第II相：3試験、第II/III相及び第III相：1試験）の約半数（4/9試験）が、安全性評価を主目的とした試験であった。

有効性評価を目的とした5試験の主要評価項目は、6分歩行検査、心機能評価、呼吸機能評価であったのが各1試験、そしてジストロフィン発現であったのが2試験であった。また、これら5試験の対象年齢層は、小児を対象としたのが2試験、小児及び成人を対象としたのが3試験であった。

2) AVI社との研究打ち合わせ

AVI社とは2007年9月 Children's National Medical Center の Eric Hoffman 教授を含めて直接交渉することにより、信頼関係を築くことができた。以来、2008年10月、2009年9月それぞれ我が国で clinical trial を行なうための直接の打診があった。しかし、それらは2008年の場合には我々の体制が充分整わず、しかも AVI 社側の担当者が突然交代したため、進展が頓挫した。2009年に打診された内容について

は、提案内容そのものに問題があったため、これも陽の目を見ることはなかった。現在は、日本側の製薬系 venture 企業が中立となって AVI 社との交渉を進めているが、両社とも経営基盤は盤石とは言えず、予断を許さない状態にある。

5. 臨床評価方法の確立

CINRG 共通評価機器である CQMS 機器の輸入に関する国立精神・神経センター倫理委員会の申請・承認を得た。そのうえで CINRG への加入の準備を進め、CINRG 本部からの正式メンバーとして正式に承認を得た。2009年11月米國小児医療センターで開催された CINRG 年次総会に参加し、今後の治験の開発の進め方などに関する情報交換を行った。2009年12月より CQMS 機器の輸入を開始した。具体的には定量的筋力評価機器、呼吸機能評価機器、階段やそれに付随する機器群である。現在も輸入手続きを継続しており来年度には機器の輸入が完了して、システムのセットアップが完了出来る見込みとなった。

6. エクソン・スキップの対象となる DMD 患者のリクルート

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、全国規模のレジストリー・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 な臨床情報と遺伝子情報を中心とするレジストリーをスタートした。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を中心とし、筋ジストロフィー協会と協力して、全国的なレジストリーを立ち上げることができた。2009年末の段階で既に300名近く

の患者さんに登録頂いている。

患者データベース: エクソン 51 番スキップ対象患者 (エクソン 50 ないし 52 の単独欠失、エクソン 48~50、エクソン 49~50、エクソン 45~50 欠失例が 16 名 (15 歳未満 14 名)、エクソン 53 番スキップ対象患者が 13 名 (15 歳未満 8 名)、エクソン 45 番スキップ対象患者が 4 名 (15 歳未満 3 名)、エクソン 44 番スキップ対象患者が 4 名 (15 歳未満 2 名) であった。

D. 考察

1. 新世代モルフォリノを用いたエクソン・スキップ

本研究では、DMD 遺伝子のエクソン 6 及びエクソン 8 に対するアンチセンスの配列をスクリーニングすることにより、エクソンスキッピングによるジストロフィン発現の導入効率を大幅に改善することに成功した。今後、同カクテルの全身投与による効果を検討するため、静注による連続投与を行う計画である。本研究により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 患者の約 90% を対象に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 95% 以上の患者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。

2. 培養細胞におけるエクソン・スキップの検証

ヒト細胞を用いたエクソン・スキップの *in vitro* アッセイにおいては、これまでにリンパ芽球細胞や線維芽細胞を用いた報告があるが、これらは単独のエクソンを標的としており、今回の結果からはジストロフィン発現量が少ないためにマルチエクソン・スキップに用いる細胞としては適切でないことが示唆された。ジストロフィン発現量の多い筋芽細胞を用いることが出来ない場合、比較的低侵襲で得られる線維芽細胞を用いた MyoD 導入による筋分化誘導が代替手法として有用であった。これまでモデル動物に用いられたアンチセンス配列を、同様の変異形式を有する DMD 患者細胞に直接用いた報告はなく、我々はモデル動物に用いられた PMO アンチセンスが、スキップ効率とジストロフィンの発現に関してそのまま DMD 患者細胞においても有効である例を示した。このことは、CXMD_J に対する全身投与で有効であった PMO アンチセンスが、ヒト個体においても機能することを示唆しており、今後 DMD 患者における *in vivo* マルチエクソン・スキップを実施する上で根拠になると思われた。

一方、*in vitro* アッセイの最も大きな意義は、これで臨床治験を行なうための技術的な準備が整ったところにある。

3. *mdx52* マウスを用いたエクソン 51 スキップの検証

我々は *mdx52* マウスを用いた実験により、エクソン 51 の 5' および 3' スプライスサイトを同時に狙った 2 種類の AO (51A プラス 51D) 投与時に、最も高い効率でエクソン 51 スキップを誘導できること、PMO

の静脈投与により全身の骨格筋に短縮型ジストロフィンが発現回復し、筋機能は改善することを示した。今後さらに臨床標本を用いて網羅的な解析を行なうことで、より治療効果の高い配列の予測と検証を行なうことが期待される。

4. エクソン・スキップの現況

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
- (5) プロトコールの準備とマニュアルの作成
- (6) 規制当局(PMDA)との相談と認承
- (7) GMP レベルのモルフォリノの供給
- (8) 対象患者さんの培養細胞を用いた *in vitro* exon skip 検定

この内、(1)(2)(3)(4)(8)について顕著な成果を挙げることができた。有効性に関する最も大きな問題は、筋ジストロフィーで障害される主要な臓器である心筋における 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。

安全性試験については、本年度特に米国の努力により極めて大きな進歩が認められた。共同研究者である Eric Hoffman 教授の努力による所が大きいが、米国防省からの予算、各 Fund からの供出金により rodent と primate における AVI4658 を中心とした毒性試験は、ほぼ終了したと考えられる。

今後の最も大きな問題は、AVI Biopharma 社から GMP レベルのモルフォリノ供給を受ける交渉に十分な進展がみ

られないことである。この点については、治験管理室等との連携を更に深めて進展を企したい。

5. 臨床評価方法の確立

希少疾病の多施設国際共同治験を進めていくには言語の問題、共通評価方法の確立など様々な問題点が存在することが今回の検討を通して明らかになったが、今年度の検討でそれらの問題点をクリアできる見通しが立った。来年度もこのシステムの構築をすすめていき、エクソン・スキップ治療の臨床治験が施行可能な状況を確認していききたい。

患者データベース：現在までの知見で推定されているほぼ同じ頻度でエクソン・スキップ治療の対象となり得る患者が存在することが判明した。ホット・スポットとされるエクソン 50 付近の欠失を有する患者は当センターの患者でも多数存在し、特にエクソン 51 スキップ治療対象者も多く存在することが判明した。今後は当センターのデータベースに加えて、REMUDY を通した患者のリクルートも可能となり、両者を並立させることでエクソン・スキップ治療の対象患者のリクルートを円滑に施行できる基盤が確立した。

6. 臨床治験への展開

今回の調査により、Duchenne 型筋ジストロフィーの臨床試験の問題点については以下であると考えられる。

- ・希少疾患であり、国内外での開発自体が少ない
- ・有効性の主要評価項目についても、標準的な症状評価の指標が十分に確立していない
- ・有効性評価の代替え指標についても十分に確立していない
- ・国内外で既承認のアンチセンス・モルフォリノが存在しないため、作用機序が

類似する化合物からも、安全性の推測が困難である

以上の検討結果を踏まえて、アンチセンス・モルフォリノの開発対象候補の国内での治験の導入にむけて、現在は以下の対策を行なっている。

①非臨床試験成績の充足性評価

臨床試験の開始時期は ICH(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)M3 ガイドライン^{1) 2)}に従い、非臨床試験成績を充足させ、開発対象の化合物の安全性を評価しなければならない。現在、アンチセンス・モルフォリノの開発対象候補の開発企業(海外企業)が実施済みである非臨床試験成績の充足性を評価すべく、当該領域の専門家確保に努めている。

②試験計画の企画・立案

神経筋疾患の世界的研究組織である The Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG) に参画し、平成 21 年 11 月に同組織により開催された年次総会に参加した。これにより、筋ジストロフィー研究の最近の動向を把握するとともに、各種症状評価尺度の主要評価項目としての妥当性についても検討した。国内試験での利用のために、症状評価尺度の信頼性及び妥当性に関する公表論文の内容についても、引き続き評価していく。

Duchenne 型筋ジストロフィー患者の母集団の数は、他領域の疾患と比較しても極めて小さい。このため、臨床試験の規模に大きな制限が発生する。今後も、承認申請時の臨床データパッケージを見据えた開発ストラテジーを十分に検討していく。

③治験実施のための体制整備

Duchenne 型筋ジストロフィーが希少疾患であることより、治験を医師主導で行なわざるを得ない可能性もある。この可能性を考慮して、当センター内での事務

局機能を向上させることの整備にも着手している。

E. 結論

1. DMD 遺伝子のエクソン 6 及び 8 を標的とする新たなアンチセンスの配列及びカクテルの組み合わせを *in vitro* においてスクリーニングした。新たに見出したカクテルにおいては、筋肉内投与において、ほぼ正常犬と同等のジストロフィン発現を誘導することに成功した。

2. 国内で筋ジス犬と同等の遺伝子変異を持つ DMD 患者さんを見出した。皮膚生検により得た線維芽細胞を筋細胞に変換した上で、エクソン・スキップを行ない、ジストロフィンの発現をみた。この研究を通じて、臨床治験を開始するための *in vitro* エクソン・スキップ法を確立することができた。

3. 現在進行中の DMD を対象にしたエクソン 51 スキップ治療の妥当性が示された。さらに、DMD 由来の細胞においてもエクソン 51 の 5'および 3'を標的にした場合に、臨床治験で用いられている mA20 あるいは mB30 よりも高い効率でエクソン 51 スキップを誘導できた。

4. 承認申請を目的とした Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床試験については、その臨床評価方法も十分に確立していない状況である。その方法を検討するとともに、希少疾病であるため臨床試験の規模と数にも制限があるため、海外の開発状況を絶えず把握し、開発ストラテジーの立案を慎重に検討していく必要がある。

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. Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H: Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens, *J. Poult. Sci.* 46: 95-99, 2009
2. Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S: Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. *Muscle Nerve*, 40: 815-826, 2009
3. Cui R, Duan XL, Anderson GJ, Qiao YT, Yu P, Qian ZM, Yoshida K, Takeda S, Guo P, Yang ZL, Chang YZ: Age-dependent expression of hephaestin in the brain of ceruloplasmin-deficient mice. *J Trace Elem Med Biol.* 23: 290-299, 2009
4. Guo P, Cui R, Chang YZ, Wu WS, Qian ZM, Yoshida K, Qiao YT, Takeda S, Duan XL: Hecpudin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides.* 30: 262-266, 2009
5. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K: Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther.* 20: 1013-1021, 2009
6. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A: CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal.* 3: 135-145, 2009
7. Nakamura A, Takeda S: Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy, *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
8. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 17: 4798-4811, 2009
9. 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.* 65: 667-676, 2009
10. 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.* 11: 373-381, 2009
11. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23: 1907-1919, 2009
12. 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
13. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura K.I, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y. and 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, 16:383-91, 2009

14. Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S: Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 47:1049-56, 2009

【欧文著書】

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)

<和文>

【和文著書】

1. 青木 吉嗣, 武田 伸一: 研修医のための神経内科診療, 新興医学出版社, 東京, 2010, pp248-252
2. 鈴木 友子, 武田 伸一: 骨格筋, 炎症・再生医学事典, 朝倉書店, 東京, 2009, pp453-456

【和文総説】

1. 武田 伸一: モルフォリノをもちいた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 臨床神経学, 49: 856-858, 2009
2. 武田 伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療—エクソン・スキッピングを中心に—, 神経治療学, Vol.26, No.6, 715-718, 2009
3. 永田 哲也, 武田 伸一: 筋ジストロフィーとエクソン・スキッピング, 生物の科学, 遺伝, Vol.63, No.5, 84-89, 2009
4. 鈴木 友子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーに対する先端治療法の開発, ゲノム医学, Vol.9, No.3, 195-198, 2009
5. 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, vol.15, No.1, 2009

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Potential of muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.12, 2009
2. Takeda S: The dystrophic dogs as an excellent animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.10, 2009
3. Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.4, 2009
4. Miyagoe-Suzuki Y, Motohashi N, Yada E, Segawa M, Wang B, Harano C, Masuda S, Yoshida M, Takeda S: Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.3, 2009
5. Takeda S: Exon skipping , Panel introductions and Project summaries : Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6.26, 2009
6. Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
7. Takeda S : Significance of the dystrophin-glycoprotein complex that connects the cytoskeleton to the basal lamina. Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, 6.6, 2009
8. Takeda S: Plenary Lecture: Advances of Molecular Therapy Research on Dystrophin-deficient Muscular Dystrophy. 8th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Mumbai, India,

5.23, 2009

【国際学会】

1. Segawa M, Wang B, Harano C, Suzuki Y, Matsuda R, Takeda S: Generation and muscle differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice. (poster) Keystone Symposia: Stem cell differentiation and dedifferentiation. , Keystone Resort, Keystone, Colorado, February 15 - 20, 2010
2. Imamura M, Takeda S: Searching for Loss of Imprinting of the ϵ -Sarcoglycan Gene in Cells of ϵ -Sarcoglycan Partial Knockout Mice. Poster, The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, San Diego, USA, 12.10, 2009
3. Takeda S: Rodent vs. "Large Animal" models, Animal models assessment session, Bringing down barriers-translational medicine in inherited neuromuscular diseases, TREAT-NMD NIH International Conference, Brussels, Belgium, 11.18, 2009
4. Yokota T, Takeda S: PMO and PPMO in the dystrophic dog. CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) annual meeting, Washington D.C., USA, 11.7, 2009
5. Nakamura A, Kobayashi M, Yuasa K., Yugeta N, Takeda S: The opening of pulmonary respiration resulted in muscle degeneration of diaphragm in canine X-linked muscular dystrophy. Poster, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
6. Ito N, Among BN, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Neuronal nitric oxide synthase is an essential mediator for muscle hypertrophy, International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 7.29, 2009
7. Yada E, Harano C, Motohashi N, Segawa M, Wada MR, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adultmdx mice, 7th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Barcelona, Spain, 7.9, 2009
8. Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S. Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy for muscular dystrophy using normal primates. American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 鈴木 友子、武田 伸一: Molecular and cellular mechanisms of mechanosensing nNOS regulates skeletal muscle mass, 第32回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
2. 岡田 尚巳: Development of AAV vector production system and therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: 熊本大学グローバルCOEリエゾン ラボ研究会, 熊本, 11.11, 2009
3. 鈴木 友子, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 鈴木 直輝: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は骨格筋の可塑性の制御因子である, 第17回日本運動生理学会大会シンポジウムV: 骨格筋の可塑性, 東京, 7.26, 2009
4. 武田 伸一: 筋疾患のトランスレーショナルリサーチ (基礎から臨床へ), シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」, 第52回日本神経化学学会大会, 伊香保, 6.24, 2009
5. 武田 伸一: 遺伝子治療と再生医療, 筋ジストロフィーの遺伝子治療~エキソンスキッピングを中心に, 第27回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009
6. 中村 昭則: DMD に対するアンチセンス・モルフォリノを用いたエクソン・

- スキッピング治療—前臨床試験の成果と臨床応用への展開, 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 5.28, 2009
7. 武田 伸一: 難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ, モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.21, 2009
 8. 武田 伸一: 遺伝子治療の夢と現実, 第 6 回日本神経学会生涯教育講演セミナー, 仙台, 5.19, 2009
- 【一般学会】
1. 伊藤 尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤 明, 鈴木 友子, 武田 伸一: Neural nitric oxide synthase is an essential mediator for early stage of muscle hypertrophy, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
 2. 瀬川 亮, 王 博, 原野 千加, 鈴木 友子, 松田 良一, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と筋分化条件の検討, 第 32 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
 3. 笠原 優子, 喜納 裕美, 西山 章代, Jin-Hong Shin, 大島 幸子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植治療, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 10.26, 2009
 4. 岡田 尚巳, 喜納 裕美, 笠原 優子, 岡田 浩典, 武田 伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009
 5. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 永田 哲也, 中村 昭則, 武田 伸一: 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, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009
 6. Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S: Effective AAV8 vector-mediated microdystrophin transduction of skeletal muscles in normal primate, Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009
 7. Kasahara Y.N, Kinoh H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama SO, Maeda MW, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesencymal stromal cells in dog, Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009
 8. 中村 昭則, 小林 正典, 武田 伸一: 筋ジス犬新生仔劇症型の病態機序に関する検討, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009
 9. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: Mdx52 を用いた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, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009
 10. 永田 哲也, Diane Re, 永井 真貴子, Serge Przedborski, 阿部 康二: 運動ニューロンを障害する変異 SOD1 アストロサイト由来の液性因子の解析, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009
- 【その他】
1. 高橋 明男, 小林 正典, 八幡 由美子, 北 秀樹, 市川 慎一, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: イヌ血清 CRP 値を用いた早期妊娠診断および胎仔数との関連性, 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 (武田班), 12.4, 2009
 2. 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, 今村 道博, 武田 伸一: ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子の同定と発症機序の解明, 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 (武田班), 12.4, 2009

3. 武田 伸一, 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 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(武田班), 12.4, 2009
4. 山元 弘, 深田 宗一郎, 森川 大亮, 伊藤 尊仁, 山口 賢彦, 辻川 和丈, 鈴木 友子, 武田 伸一: mdx の病態・機能に与える遺伝背景の影響, 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(武田班), 12.4, 2009
5. 上住 聡芳, 深田 宗一郎, 山元 弘, 山田 治基, 武田 伸一, 土田 邦博: 骨格筋に内在する間葉系前駆細胞の解析, 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(武田班), 12.4, 2009
6. 裏出 良博, 有竹 浩介, 鎌内 慎也, 林 正裕, 永田 奈々恵, 小林 正典, 中村 昭則, 武田 伸一: 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 D2 をターゲットとした筋ジストロフィーの2次炎症軽減と尿中代謝物を対象とした病態進行マーカーの開発~, 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(武田班), 12.4, 2009
7. 武田 伸一, 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 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(武田班), 12.4, 2009
8. 武田 伸一, 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 永田 哲也, 大澤 真木子: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 第4回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
9. 橋戸 和夫, 水野 英哉, 伊藤 尚基, 青木 吉嗣, 山本 和広, 関口 正幸, 中村 昭則: 筋ジストロフィーの新たな診断ツールに関する検討 ~血中 microRNA の有用性~, 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(武田班), 12.3, 2009
10. 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: 新世代モルフォリノによる筋ジストロフィー治療, 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(武田班), 12.3, 2009
11. 若尾 義人, 高野 裕史, 藤井 洋子, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: Speckle Tracking Echocardiography を用いた CXMDJ 犬および保因犬の左室心筋局所機能評価, 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(武田班), 12.3, 2009
12. 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 第4回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
13. 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 大澤 真木子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 第4回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
14. 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理

- 香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子, 武田 伸一: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
15. 武田 伸一: RNA splicing を標的とした神経筋疾患の治療戦略, 厚生労働省化学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班, 平成 21 年度ワークショップ, 東京, 7.31, 2009
16. 武田 伸一: 筋ジストロフィーの治療研究の進歩, 筋ジストロフィーという病気をもっと知ろう, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー集学的治療と均てん化に関する研究 (神野班), 特別講演, 平成 21 年度第一回筋ジストロフィーに関する市民公開講座, 名古屋, 7.18, 2009
17. 中村 昭則: エクソンスキッピング治療, 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構築に関する研究 (川井班), 平成 21 年度ワークショップ, 埼玉, 7.18, 2009
18. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリンによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 第 13 回 3 施設合同研究発表会, 東京, 6.16, 2009
19. 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 46 回筋ジス協会全国大会, 東京, 5.17, 2009

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

エクソン・スキッピングの臨床応用への見通し

研究分担者 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. エクソン 51 スキップの臨床治験について情報の収集を行ない、オランダ及び英国で局所的及び全身投与が行なわれつつあることが明らかになった。
2. エクソン・スキップについて、臨床治験を行なうためには、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、評価機器の導入を開始した。
3. 厚生労働省研究班の努力により DMD 患者レジストリーの構築が進められている。

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(*Ann Neurol*, 2009)。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。

一方、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