

ブ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なうことは、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

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。

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。

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なうためには、既に諸外国で行な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、共同研究相手先である米国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

臨床治験を行なうためには、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。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

(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、2-0-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。

(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。

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。

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 月に続き、2009 年 11 月にワシントン DC で行なわれた CINRG の meeting に参加し、それに前後して行なわれた 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・神経センター病院の治験管理室長、小児神経科医師 1 名、理学療法士 1 名と共に参加した。既に臨床評価を行なうための method は、定量的な筋力測定法である quantitative muscle testing (QMT) を中心に確立しており、日本にも既に機器の一部導入が完了している。今後、機器導入完了次第、機器の稼働に向けて準備を行なう。

4. 臨床治験を行なうための 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。

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
- (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。米国国防省からの予算、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。

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掛かりが得られた。現在、評価法の導入の最終段階まで到達している。

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。

E. 結論

- 1. ヨーロッパを中心にエクソン 51 スキップに関する臨床治験が進行している。
- 2. 臨床評価系に関して、先進的な取り組みを早くから進めている。CINRG との交流を深め、既に一部の機器を導入した。
- 3. DMD 患者さんのレジストリーについて

も、厚生労働省研究班の努力により整備が進んでいるので、残された問題は、GMP レベルのモルフォリノの入手のみとなっている。

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: Hepsidin, 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. 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
 11. 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

【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, Ampong 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. 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
3. 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
4. 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
 5. 武田 伸一: 難治性筋疾患の病態機序ーCK 発見から 50 年ー治療の時代へ, 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
 6. 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 スキップの前臨床研究, 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: 筋ジストロフィー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
- 【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, 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
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: 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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ノ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

17. 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

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

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

研究要旨

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、筋ジストロフィー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。本研究により示された Multi-exon skipping は DMD 患者の約9割に適用できる可能性がある。

A. 研究目的

DMD はジストロフィンの欠損により生ずる遺伝性筋疾患である。前年度までに我々はモルフォリノのカクテルによるマルチエクソンスキッピングを開発し筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) の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) によるアンチセンスオリゴのカクテルをデザインし、心筋におけるジストロフィンの発現回復に成功した。本年度においては、アンチセンスオリゴの配列を最適化し、さらに発現効率を高めることを目標に、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詳細にスクリーニングした。

B. 研究方法

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、筋ジストロフィー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、及びウエ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、筋ジストロフィー犬の骨格筋に対し120-600 µg のモルフォリノ及びビ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った。実験動物に対する動物愛護上の配慮については、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。

C. 研究成果

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ピ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。

D. 考察

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A0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A0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

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。本研究により示されたマルチエクソンスキッピングは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. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP. *Arch Neurol*. 2009; 66:32-38.

2. Efficacy of systemic morpholino exon skipping in Duchenne dystrophy dogs. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman EP. *Ann Neurol*. 65(6):667-76

3.

II. 学会発表

なし

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

研究分担者 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

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。本研究の結果は、現在臨床治験が進行中の DMD を対象にしたエクソン 51 スキップ治療の妥当性を示す一方、標的配列を至適化することでさらに高い効果が期待できることを示唆していると考えられた。

A. 研究目的

Mdx52 マウスに対して phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) を全身投与することにより、エクソン 51 スキップを誘導させるアンチセンス配列の至適条件を検討し、短縮型ジストロフィンの発現と骨格筋機能の改善効果を検証した。

B. 研究方法

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 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 25 mer 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 20 mer と 30 mer 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 1.25 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 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 1000 nmoles) 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。

C. 研究成果

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。

D. 考察

現在、オランダとイギリスにおいて、DMD を対象にしたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの臨床試験が行われており、米国でも前臨床的試験による安全性評価が実施され臨床試験が開始されようとしている。DMD を対象にした臨床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る。そこで、動物モデルを用いてエクソン 51 スキップを誘導し、筋機能の改善の有無を検討することは極めて重要である。

今回我々は *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うことで、より治療効果の高い配列の予測と検証を行うことが期待される。

E. 結論

本研究の成果により、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、臨床試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。このことから、臨床試験に用いる AO 配列を再検討することによって、さらに高い効果が得られる可能性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[欧文原著]

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.

Ohshima, S., Shin, J.H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T. and Takeda, S. Transduction efficiency and immune response with AAV8 vector in dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-91, 2009.

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.

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.

[欧文図書]

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. 学会発表

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

Kasahara Yuko, Hiromi Kinoh, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima, Michiko Maeda, Akinori Nakamura, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda

Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells
American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

Jin-Hong Shin, Sachiko Ohshima, Hiromi Kinoh, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda
Electrocardiographic and pathologic improvement of mdx heart by transduction with rAAV9-microdystrophin
American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

Akiko Ishii, Jin-Hong Shin, Yuko Katakai, Fumiko Ono, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda
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

Kasahara Yuko, Hiromi Kinoh, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda
Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in animal model
The 15th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Toyonaka, July 9-11, 2009

Akiko Ishii, Jin-Hong Shin, Yuko Katakai, Fumiko Ono, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda
Effective adeno-associated virus-mediated gene expression in skeletal muscle of normal primate
The 15th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Toyonaka, July 9-11, 2009

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

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

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治療研究合同発表会
平成21年10月31日, 岡山

武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 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
平成21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21年12月4日, 東京

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、平成21年11月11日, 熊本

H. 知的財産権の出願・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

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

培養細胞でのエクソン・スキップの有効性の検証

研究分担者 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

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 遺伝子を用いて筋管に変換し 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。

A. 研究目的

ジストロフィン欠損により発症する Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対し、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いたエクソン・スキップのヒトへの応用が進みつつあるが、今のところ一つのエクソンを標的としたスキップが主流であり、対象となる遺伝子変異形式は限定される。対象患者数を拡大するためには、複数のエクソンを対象としたマルチエクソン・スキップが重要である。筋ジストロフィーモデル犬 (CXMD_J) は mRNA レベルでジストロフィン遺伝子のエクソン 7 を欠失するが、これはエクソン 6 および 8 のスキップによりインフレームとなるため、マルチエクソン・スキップに適したモデル動物である。我々は CXMD_J に対する Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) アンチセンス投与により、エクソン 6/8 のマルチエクソン・スキップを誘導し、ジストロフィンの発現と臨床的な改善を報告した (Yokota, et al. Ann Neurol, 2009)。そこで我々は CXMD_J と同様にエクソン 7 を欠失した DMD 患者細胞を用いて、イヌに投与した PMO アンチセンスの有効性を検証した。

B. 研究方法

筋ジストロフィー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。CXMD_J 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。

C. 研究成果

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プレームとなった 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、CXMD₇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。

D. 考察

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、CXMD₇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。

E. 結論

1. 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。
2. 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。
3. 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. 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.
2. Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology* 29: 494-501, 2009.
3. 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.

II. 学会発表

<国内>

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. 平成 21 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(武田班), 12.4, 2009
2. 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犬治療. 平成 21 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(武田班), 12.3, 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

「 臨床治験の準備に関する研究 」

研究分担者 村田美穂 国立精神・神経センター病院第二病棟部長

研究要旨 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。

A. 研究目的

国際共同医師主導治験を円滑に進めていくには基礎研究レベルの準備に加えて、臨床レベルの準備が不可欠である。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臨床的な基盤を整備することが本研究の目的である。

B. 研究方法

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。我々は米国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 Neuromuscular 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、その準備を行った。

患者データベース: 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>)が稼働をはじめたが、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)

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. 研究結果

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月米国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。20

09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。

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

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・スキップ治験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。

E. 結論

エクソン・スキップ治療の実現には基礎研究と臨床研究の両面からのアプローチが必要であり、今後もエクソン・スキップ治療の基盤となる臨床面からのアプローチを進めていく。また本研究は希少疾患の国際共同治験を進めていくためのモデルとなりうるものであると考えた。

F. 健康危険情報 省略

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

「治験に関する準備」研究

研究分担者 中林哲夫 国立精神・神経センター 治験管理室医長

研究要旨: 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

現在、アンチセンス・モルフォリノは、医薬品として国内外のいずれでも承認されていない。本研究の目的は、既に特定したアンチセンス・モルフォリノの開発対象候補について、国内での治験への導入における問題点を評価し、必要な対策について検討することである。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。

D. 考察と現在の対応状況

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