

200917002B

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

総合研究報告書

(平成19年度～平成21年度)

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

総合研究報告書

(平成19年度～平成21年度)

研究代表者 武田伸一

平成22(2010)年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 33

### III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 37

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)  
総合研究報告書

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	鈴木 友子	国立精神・神経センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長 (19 年度)
	中村 昭則	国立精神・神経センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	岡田 尚巳	国立精神・神経センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長 (20-21 年度)
	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
	村田 美穂	国立精神・神経センター 病院 第二病棟部 部長
	三好 出	国立精神・神経センター 病院 治験管理室長 (19-20 年度)
	中林 哲夫	国立精神・神経センター 病院 治験管理室 医長 (21 年度)

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<sub>1</sub>) 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。本研究により、初めて実証された multi-exon skipping は DMD 患者の 90% 以上に適用できる可能性がある (*Ann. Neurol*, 2009)。

2. 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 (論文準備中)。

3. エクソン 6/8 スキップの候補となるエクソン 7 欠失を示す DMD 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（論文準備中）。

4. 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（論文投稿中）。

5. 無症候性あるいは軽微な骨格筋症状を呈する 3 家系、3 例について共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正することができれば、多くの DMD に対して新たな治療法となる可能性がある。そこで、*mdx52* マウスに対し、モルフォリノによる exon45-55 skipping を行い、実現可能であることを示した。エクソン 45-55skipping は、多くの DMD 患者に対する新規治療法として適用できる可能性がある。

6. 世界各国で、進行中あるいは計画中的であるエクソン・スキッピングによる clinical trial について情報の収集を行なった。オランダ及び英国で局所的な投与が行なわれ、有効な結果が得られたことを背景に、皮下投与（オランダ）、静脈投与（英国）による、全身治療の治験が開始されている。我が国で臨床治験を行うためには、GMP レベルの Morpholino を用いる必要があるが、世界で唯一、GMP レベルでの Morpholino 生産設備を持つ AVI 社との間で研究打ち合わせを持つことができた。

7. 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なった。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。20 年度に開始したデータベースについても検討を継続し、治験を行な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

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である DMD は発症頻度が高いが（出生男児 3,500 人に 1 人）、母体の卵細胞における突然変異が多いため（発症者の約 3 分の 1）、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。そこで、ジストロフィン分子の中央の

ロッド部分は繰り返し構造から成るため、ある程度欠損を生じてても *in frame* であれば機能回復を望むことができる点に着目したエクソン・スキップ治療が注目されている。しかし、この方法には、対象が、ジストロフィン遺伝子の特有のエクソン欠失を示す DMD 患者に留まり、しかも遺伝子異常ごとにアンチセンス配列を検討し有効性と安全性を実証する必要があるという欠点があった。

ところが、最近我々は米国・国立小児医療センターとの共同研究により、元来スプライス変異のためエクソン 7 をスキップしている筋ジ

ストロフィー犬について、アンチセンス・モルフォリノを全身的に投与してエクソン6及び8を強制的にスキップすることにより横隔膜を含む全身の骨格筋や心筋でジストロフィンの発現が回復し、筋ジストロフィーの臨床症状が改善することを観察した。しかも、その間、血液・血清学的にも異常をみることはなかった。複数のエクソンを同時にスキップすることにより臨床症状の改善をみたことから、エクソン・スキップ治療の対象となるDMD患者の範囲が拡大し、少なくとも遺伝子欠失例の80%がカバーできることになった。

DMDにおけるジストロフィン遺伝子の異常は、エクソン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。

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デ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。

モルフォリノに関するもう一つの限界は、エクソン・スキップ療法そのものが、遺伝子変異が異なるたびに別のアンチセンス配列を準備するテーラーメイド治療に留ることであ

る。その点について我々は、DMD遺伝子exon 45-55の欠失例の骨格筋障害が軽微であることを報告した。DMD遺伝子exon 45-55は遺伝子変異のホットスポット全域に相当し、DMDの約60%が集積する。そこで、exon 45-55 skipping が共通した目標となりうることから、exon 52欠損マウス (*mdx52*) を用いてexon 45-55 skippingの可能性について検討した。

更に、研究を進める過程で、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。最後に、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。そこで、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。

## B. 研究方法

### 1. 筋ジストロフィー犬に対するエクソン・スキップ

#### (1) PMOによるスキップ

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

#### (2) 新世代モルフォリノによるスキップ

3頭の若齢(2-6ヶ月令)の筋ジス犬に対し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なった。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(12mg/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。更に、投与2週間におけるジストロフィン発現量及び組織像、心電図の評価、及び血液、組織検

査による毒性試験を行なった。

## 2. *mdx52* マウスを用いたエクソン・スキップ

### (1) 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 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 25mer 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 1.25nmol) 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ない最適な PMO 配列の組み合わせを決定した。最適の PMO (計 1000nmol) を、8 週齢の *mdx52* マウスに 1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与した。最終投与の 2 週間後に、剖検で採取した腓腹筋、前脛骨筋、大腿四頭筋、三角筋、上腕三頭筋、腰部傍脊柱筋、肋間筋、横隔膜、心筋についてジストロフィンの発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで検討した。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。

### (2) エクソン 45-55 スキップ

マウス *DMD* 遺伝子の premature mRNA を標的に、exon52 を除く exon45-55 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 12.5nmol 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なった。

## 3. 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。

### (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。

### (3) ジストロフィン遺伝子に変異を持ちながら軽微な臨床症候を示す症例

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

### (4) 臨床治験のためのレジストリーの構築

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。平成 20 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。更に、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>) が稼動を始めたが、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。

## 4. 培養細胞を用いた *in vitro* exon skipping

### (1) 筋ジス犬を用いた検討

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

#### (2) 生検材料を用いた検討

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。CXMD<sub>1</sub>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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

## 5. 臨床治験への見通し

### (1) 諸外国の研究の現状

07~10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う必要がある。

## 6. 臨床評価系の導入

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。

### (倫理面への配慮)

マウス及び筋ジス犬を用いた実験は、実験計画書を神経研究所小型動物あるいは中型動物実験倫理問題検討委員会へ提出し、承認を得、同研究所の定める小型実験動物あるいは中型実験動物倫理指針に従って実験を行なった。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. 筋ジストロフィー犬に対するエクソン・スキップ

#### (1) PMO によるスキップ

##### a. 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、横隔膜、食道、胸鎖乳突筋、尺側手根伸筋、前脛骨筋、大腿二頭筋を含む全身の骨格筋において広範なジストロフィン及び  $\alpha$ -サルコグリカンなど同結合タンパク質の発現回復が認められた。発現レベルは最大で正常犬の 50% に達し、多くの組織において、治療効果があると考えられる 10-20% を上回った。

##### b. 組織像

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

##### c. 機能評価

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

#### (2) 新世代モルフォリノを用いたエクソン 6/8 スキップ

##### a. 細胞実験によるスクリーニング解析

筋ジストロフィー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  $\mu$ 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。

##### b. 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射し、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。ウエ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. *mdx52* マウスを用いたエクソン・スキップ

#### (1) エクソン 51 スキップ

##### a. 局所投与

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

## b. 全身投与

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

### (2) exon45-55 スキップの試み

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

## 3. 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 DMD 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。

そこで、患者さん及び家族から informed consent を得た上で、国立精神・神経センター倫理委員会に対し、①患者さんの入院 ②リンパ球を用いた遺伝子診断の確認 ③皮膚生検の実施 ④生検材料を用いた線維芽細胞、MyoD による変換筋芽細胞、リンパ芽球の培養 ⑤同細胞を用いた in vitro エクソン 6/8 スキッピングの申請を行なった。これが承認を受けた

ため、平成 20 年 11 月国立精神・神経センター病院に患者さんに入院して頂いた上で、以上の検索を実施に移した。

### a. 臨床評価

呼吸機能では肺活量は 2180ml と年齢標準と比較するとやや低下していたものの、夜間の低酸素血症、高炭酸ガス血症は認めなかった。側わんもごく軽度認めるのみであった。心機能は心臓超音波検査にて左室駆出率は 18%と著明に低下しており、び慢性の壁運動低下を認めた。血漿脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は 148pg/ml (正常 18.4 以下) と高値を示していた。骨格筋 MRI ではほとんどの筋がほとんど脂肪置換していたが、後頸骨筋は比較的保たれていた。

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

### (2) エクソン 51 スキップの対象となる DMD 患者

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 registry を start しようとしている。これらの成果を日本国内で幾たびか啓蒙した結果、厚生労働省による精神・神経疾患研究委託費による研究班会議を中心とし、筋ジストロフィー協会と協力して、全国的な registry を立ち上げることで一致をみた。

更に、その方針の下、平成 20 年度から、厚生労働省による精神・神経疾患研究委託費による研究班川井班の発足をみた。遺伝子診断並びに登録システムの維持のためには恒常的な経費を要することから DMD 登録を、国立精神・神経センターの事業とすることが決定されて

いる。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。

### (3)ジストロフィン遺伝子に変異を持ちながら軽微な症例の検索

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

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

## 4. 培養細胞を用いた *in vitro* exon skipping

### (1) 筋ジストロフィンをを用いた検討

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

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

### (2) 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イムとなった 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、CXMD<sub>1</sub> 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) 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。

## 5. 臨床治験への見通し

### (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'-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思われる。

#### 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。

### (2) AVI 社との研究打ち合わせ

2007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なった。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 を行なった。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。

AVI 社とは 2007 年 9 月直接交渉することにより、信頼関係を築くことができて以来、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、計画が頓挫した。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。

## 6. 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 で行なわれた CINRG の meeting 及び、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。

そこで、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。次に、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なった。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。

## D. 考察

### 1. ジストロフィン遺伝子のエクソン 6/8 スキップについて

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

更に、第 2 段階として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の機能を最適化するための標的エクソンを複数選択してデザインする展望を描くことができる。

## 2. ジストロフィン遺伝子エクソン51のスキップについて

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

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

無症候性あるいは軽微な臨床型を呈する 3 家系については、共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。フランスから報告されたエクソン 45-55 を示す 15 家系についても、年齢は様々であるが、全ての例で臨床型は軽微であった。Leiden の DMD データベースに戻って検索してみると、エクソン 45-55 欠失は 97%が軽症型の Becker と記載されていた。従って、エクソン 45-55 欠失例が少なくとも軽微な経過を辿ることは確実のように思われる。そこで、エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正できれば、多くの

DMD を良性の表現型に修正できる。なぜ、エクソン 45-55 欠失例が軽微な臨床型を呈するのかに関しては、今後の詳細な検討が必要であるが、欠失によって、ロット・リピート数は減少するものの個々のリピートの構造は完全に保たれていることが関連している可能性がある。3 例のうち、2 例について治療可能ではあるが、心筋障害が認められた点については、二つの可能性がある。

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

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

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

第 2 段階として、我々はエクソン 52 欠失マウスを用いて、エクソン 45-55 スキッピングが可能であることを mRNA レベルで確認している。エクソン 45-55 のスキッピングを実現することは、臨床的に軽症化を明瞭に企図できるだけでなく、エクソン 45-55 が Dchenne 型の遺伝子変異のホット・スポットに一致することから、遺伝子欠失による Duchenne 症例の最大 63%を同じ核酸医薬品により治療できるとの可能性を生むことになる。

## 4. 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<sub>1</sub> 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、これで臨床試験を行なうための技術的な準備が整ったところにある。

## 5. 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な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) 臨床試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。

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。

## 6. 臨床評価方法の確立

希少疾病の多施設国際共同試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試験が施行可能な状況を確認していききたい。

## 7. 臨床試験への展開

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試験の導入にむけて、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<sup>1) 2)</sup>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. ジストロフィン遺伝子のエクソン 6 及び 8 を標的としたアンチセンス PMO を混合投与することにより CXMD<sub>1</sub> の全身骨格筋におけるジストロフィン発現及び筋機能の改善に成功した。同手法は DMD 患者の 9 割以上に適用できる可能性がある。

2. 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。

3. *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。

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

5. *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。

6. 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。

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

8. 臨床治験を行なうに当たって、重要なポイントの一つである臨床評価に関しては、米国を中心とした CINRG と連携して準備を進めることとした。

9. 臨床治験の対象となる DMD 患者さんについては、厚生労働省研究班と国立精神・神経セ



ンターによる REMUDY により registry を確立する方針とした。

#### 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. 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: Hepcidin, 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
  15. 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
  16. 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
  17. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanasaki 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
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. Murata M: Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 1: S17-S20, 2009
  23. 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
  24. 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
  25. 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
26. 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
  27. 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
  28. 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
  29. 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
  30. 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
  31. 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
  32. 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
  33. 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
  34. 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
  35. 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
  36. 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 <math>\alpha</math>2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res.* 314:193-203, 2008
  37. 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.
38. 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
39. Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T & Hattori N: LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J Hum Genet* 53: 1012-1015, 2008
40. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K: Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*. 2008 Feb;22(2): 477-87.
41. Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S: Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 Jan 9; 9(1): 1
42. Fukada SI, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells In Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10): 2448-59.
43. Hirasaka K, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T: Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2007, Oct;56(10): 2511-22.
44. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Ohshima S, Howell JM, Nakamura A, Hijikata T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther*. 2007 Sep;14(17): 1249-1260.
45. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada SI, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4; 117(9): 2468-2476.
46. Ikemoto M, Fukada SI, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR, Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Autologous Transplantation of SM/C-2.6 (+) Satellite Cells Transduced with Micro-dystrophin CS1 cDNA by Lentiviral Vector into mdx Mice. *Mol Ther*. 2007 Aug 28; 15(12): 2178-85.
47. Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda SI: Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jun 28;8(1): 54.
48. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto