

2009 17020A

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)

アデノ随伴ウイルスを用いた
デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
遺伝子変異集積領域のエクソン・スキップ治療

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)

アデノ随伴ウイルスを用いた
デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
遺伝子変異集積領域のエクソン・スキップ治療

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	
アデノ随伴ウイルスを用いたデュシェンヌ型 筋ジストロフィーに対する遺伝子変異集積領域の エクソン・スキップ治療	----- 1
武田 伸一	
II. 分担研究報告	
1. DMD遺伝子変異集積領域における ブロック・スキップ治療法の開発	----- 11
武田 伸一	
2. ベクター系を応用した 新規アンチセンス分子送達担体の開発	----- 19
岡田 尚巳	
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 53 スキッピングの試みに関する研究	----- 23
永田 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 27

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)
総括研究報告書

アデノ随伴ウイルスを用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
遺伝子変異集積領域のエクソン・スキップ治療

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 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
永田哲也 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

従来、アンチセンス・モルフォリノを用いた DMD に対するエクソン・スキップ治療の前臨床的研究を実施し、その安全性と有効性を示してきた。本研究では従来の技術をさらに発展させ、心筋への送達と長期間の発現に効果的な 9 型 AAV を応用し、頻度の高い遺伝子欠失を対象としたエクソン・スキップ治療の臨床応用に向けた技術基盤を構築することを目的とする。ジストロフィン遺伝子の変異の多くはエクソン 45-55 に集中しているため、エクソン 53 スキップやブロックスキップ等、この領域の欠失や遺伝子変異に対する取り組みを推進した。また、心筋への移行に有利なアンチセンス分子の担体として、安全で心筋への導入効率が高い 9 型 AAV を応用し、改変 U7 snRNA や中空粒子によるアンチセンス分子送達効果を検証した。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)における遺伝子変異の多くはジストロフィン遺伝子の遺伝子変異集積領域であるエクソン 45-55 に集中している。アンチセンス・モルフォリノによるエクソン・スキップ治療が期待されているが、頻度の高い欠失をインフレーム化する基盤技術が確立していないことや心筋への導入や作用時間が不十分であることが課題である。本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長期間の発現が期待できる 9 型アデノ随伴ウイルス(AAV)を応用し、臨床応用を目指した検討を行った。

B. 研究方法

1. エクソン 53 スキッピング

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 53

において、5'および 3'スプライスサイト(それぞれ 53A, 53D) 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 21 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 5 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。

2. 変異集積領域におけるブロックスキップ

エクソン 52 を含む小さなイン・フレーム欠失を誘導するため、まずエクソン 50-53 ブロック・スキップを行い、随時スキップの範囲を拡大し、最終的にエクソン 45-55 ブロック・

スキップの安全性と有効性を検証した。

・AO 配列の設計：マウス・ジストロフィン遺伝子のエクソン 45, 46,47,48,49,50,52,54,55 の各エクソンを標的にして、5'および 3'スプライスサイトと ESEfinder3.0 により予測したスプライシング促進モチーフを中心に 25 mer の AO を 6-8 種類ずつ設計した。エクソン 51 および 53 を標的にした AO については、エクソン 51 あるいは 53 の単独エクソン・スキップを目的に設計した AO 配列各 14 種類ずつを用いた。

・C2C12 細胞株を用いたブロック・スキップ：C2C12 細胞株を 2%ウマ血清を含む分化培地で筋分化誘導し、筋管を得た。モルフォリノのトランスフェクションにおいては、異なるアンチセンス配列を有するモルフォリノを複数混合してカクテルとして用いた。モルフォリノの濃度が 30 μ M, トランスフェクション試薬である Endo-Porter® の濃度が 6 μ M となるよう細胞培養液に添加し、48 時間後に回収した。トランスフェクション後の細胞を用いて、エクソン・スキップの様式を RT-PCR により評価した。

・Mdx52 マウスを用いた筋注によるブロック・スキップ：8 週齢の *mdx52* マウスの前脛骨筋に、エクソン 45-55 (エクソン 52 は除く) の各スプライシング促進モチーフを標的とする 10 種類の AO (計 12.5 nmoles) を筋注し、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った。

3.新規アンチセンス分子送達担体の開発

まず、核内局在化と長期的な導入効果を目的として、アンチセンス配列を改変 U7 small nuclear RNA(snRNA)に結合し、これを発現する 9 型 AAV ベクターを構築した。U7snRNA は真核生物の核内にみられる低分子 RNA の一つであり、Sm タンパク質との結合により U7 snRNP を形成し、ヒストン pre-mRNA の 3' 末端のプロセッシングに関与する。興味深いことに、Sm タンパク質結合領域をコンセンサ

ス配列である Sm-opt に改変した U7 snRNA は、U7 RNA 量の増加と共に、核集積効率が向上する。この改変 U7 snRNA にアンチセンス分子を挿入すると、人為的に選択的 RNA スプライシングを誘導することが知られている。今回はこの U7snRNA の特性を利用し、効率よくスキッピングを誘導するためのアンチセンス発現カセットを構築した。

マウス U7 プロモーターによる snRNA の発現には、転写開始位置から 62-44bp 上流に存在している proximal sequence element (PSE: TCACCCTCATCGAAAGTGG) および 203-194bp 上流にある distal sequence element (DSE: GCATAGCCTT) が必須 (Jacobs et al., 1999) である。本研究ではこれらの配列を含め、マウス Rnu7 遺伝子 (Gene ID: 19866) プロモーター領域の DSE から 20bp 上流までのシークエンスを含めて用いた。また、標的効率を高めるため、splicing silencer 配列として知られている、heterogenous ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) の結合領域を付加した。以上の工夫によってアンチセンス配列は snRNP として核に集積し、高い効率でエクソン・スキップを誘導することが期待される。Pol II による遺伝子の転写の終了には snRNA 配列の終端から 14-27bp 下流の 3' box terminator sequence (3' box: GTCTACAATGAAAG) が必須 (Jacobs et al., 1999, Egloff et al., 2008) であるため、Rnu7 遺伝子の 3' box から 20bp 下流までのシークエンスを配置した。

まず今年度は、マウス U7snRNA にアンチセンス配列および hnRNPA1 結合領域を付加した発現カセットを搭載する AAV ベクタープラスミドを構築した。アンチセンス配列としては、ジストロフィン遺伝子エクソン 51 のエキソン・スキップ療法臨床治験に用いられている PRO051 (mA20) に対応する 20 塩基を用いた。これをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、RT-PCR 法によってスキッピング効率を検証した。

また、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV

の中空粒子を作製し、これを用いてモルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討した。蛍光標識モルフォリノを界面活性剤と超音波の処理にて中空粒子に取り込ませた。限外濾過膜を用いて界面活性剤を除去し濃縮した。このモルフォリノ含有中空粒子をヒト横紋筋肉腫細胞株 RD に投与し、24 時間後に蛍光顕微鏡にて蛍光を確認した。さらに副反応を検証するため、マーカー遺伝子発現 9 型 AAV ベクター(AAV9-luciferase, AAV9-GFP; 1×10^{13} v.g./site)を生後一日齢新生仔正常犬の前脛骨筋や心筋に局所投与した。さらに、AAV9-luciferase(1×10^{13} v.g./body)を新生仔正常犬の外頸静脈から経静脈的に全身投与した。

C. 研究成果

1. エクソン 53 スキッピング

単一 PMO の投与においては、エクソン 53 の 3' スプライスサイトを標的に設計した 53D と 53A またはアクセプターサイトから 27-70bp 内側に設計された AO の組み合わせを使用すると RT-PCR で 50-55% 程度のスキップ効率が確認された。また免疫染色でも同様にジストロフィンの発現が確認された。

2. 変異集積領域におけるブロックスキップ

(1) C2C12 細胞株を用いたブロック・スキップ：エクソン 50-53 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計した計 4 種類のモルフォリノをカクテルにして投与した結果、エクソン 50-53 スキップが誘導できた。

同様に、エクソン 48-53 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計した計 6 種類のモルフォリノをカクテルにして投与した結果、やはりエクソン 48-53 スキップが誘導された。

次に、エクソン 45 および 55 の 5' スプライスサイトのみを標的にしたモルフォリノ・カクテル (45A+55A) を投与した場合に、スキップ効率は 2-3% 程度であったが、エクソン 45-55 スキップが誘導できた。続いて、45A+55A に加えてエクソン 46-54 の各スプラ

イシング促進モチーフを標的に設計したモルフォリノ (計 11 種類) をカクテルにして投与した結果、エクソン 45-55 スキップの誘導が確認できた。

(2) *Mdx52* マウスを用いたブロック・スキップ： *Mdx52* マウスを対象に、C2C12 細胞株により同定した AO 配列を用いて筋注によりブロック・スキップを誘導した結果、エクソン 50-53 スキップでは 30% 程度、エクソン 48-53 スキップでは 2-3% 程度のスキップ効率が得られた。

エクソン 45 および 55 の 5' スプライスサイトのみを標的にしたモルフォリノ・カクテル (45A+55A) を筋注した場合、スキップ効率は 1% 未満であった。続いて、45A+55A に加えてエクソン 46-54 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計したモルフォリノ (計 10 種類) をカクテルにして投与した結果、50% を凌ぐ高い効率でエクソン 45-55 スキップを誘導することができたが、ジストロフィン免疫染色におけるジストロフィン陽性線維の割合は 5% 未満、ウエスタンブロットにおけるジストロフィンの発現レベルは野生型マウスの 1% 未満であった。

3. 新規アンチセンス分子送達担体の開発

(1) 改変 U7 snRNA：改変型 U7snRNA にエクソン 51 スキップに必要なアンチセンス配列の発現カセットを搭載した AAV ベクタープラスミドを構築した。これをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、RT-PCR 法によってスキッピング効率を検証したところ、ほぼ完全にエクソン 51 がスキップしていることが証明された。

(2) モルフォリノ含有 AAV 中空粒子：イオン交換法を用いて、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を精製した。モルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討するため、中空粒子と蛍光標識モルフォリノを様々な比率にて混合し、界面活性剤や超音波の処理によって中空粒子に取り込ませた。さらに、

限外濾過膜を用いて界面活性剤を除去し濃縮に成功した。このモルフォリノ含有中空粒子を横紋筋肉腫細胞株 RD に投与したところ、24 時間後から、核内に強い蛍光が認められ、4 日間以上持続した。この結果から、9 型 AAV の中空粒子は、筋細胞の核内に効率よくモルフォリノを送達することが可能であると考えられた。この際、明らかな細胞毒性は認められなかった。

(3) 9 型 AAV 副反応：9 型 AAV ベクターを新生仔正常犬の骨格筋・心筋内に局所投与あるいは経静脈的に全身投与したところ、投与 2 週後に免疫染色にて局所投与による遺伝子発現を確認したが、経静脈的投与による発現は微弱であった。両者の場合とも、ベクター投与に伴う特記すべき副反応は認められなかった。

D. 考察

1. 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 スキップの臨床治験が行われており、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治験が開始されている。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 53 スキップによりイン・フレーム化する変異は 3 番目に多く、今後臨床応用される可能性が高いと考えられる。今回我々は *mdx52* マウスを用いた実験により、エクソン 53 でもエクソンスキッピングの効果があることが確認できた。今後、*mdx52* を使用し 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、筋機能は改善するかを検討する。さらに、ヒト MyoD 変換線維芽細胞を使用し、ヒト細胞での効果についても検討する。

2. 今回我々は、C2C12 細胞を用いて候補となる AO 配列を選定した後、*mdx52* マウスを対象にした筋注実験によりエクソン 50-53、48-53、45-55 スキップが *in vivo* においても実

現可能であることを初めて示した。C2C12 細胞あるいは *mdx52* マウスを用いた実験では、同一の AO 配列を用いてブロック・スキップを誘導した場合でも、スキップ効率が異なる可能性が示唆された。その原因として、C2C12 細胞は正常の筋細胞膜を有するが *mdx52* マウスはジストロフィー変化のある筋細胞膜を持つこと、*in vitro* 実験では AO 同士が培地の中でヘテロダイマーを形成しアンチセンスとしての活性が低下する可能性があること、*in vitro* 実験においては細胞への AO 導入にエンドポーターが必要であること、などが考えられる。

今後、AO の配列、組合せ、投与方法を最適化し、十分量のジストロフィンを発現回復させたいうえで、筋機能の改善および毒性について検討することが求められる。さらに、ブロック・スキップによる臨床治験を実施することを念頭に、ヒト DMD 由来の線維芽細胞株を用いたブロック・スキップの検証を計画中である。

3. 現行のモルフォリノを用いた治療技術では、心筋への導入効率および作用時間が不十分であり、これらを克服することが高い臨床的效果を得るために求められている。

本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時間の発現が期待できる 9 型 AAV を応用し、アンチセンス分子送達担体の開発を検討した。改変 U7 snRNA を構築し、アンチセンス分子をベクターから発現させた結果、高い効率でエクソン 51 がスキップした。また、モルフォリノ含有 AAV 中空粒子を用いた方法でも、核内への集積が認められた。今後、モデル動物や患者検体由来の線維芽細胞を用いて、両者の担体の有効性と安全性を前臨床的に検証することで、臨床応用に向けた課題の抽出と解決が期待される。

E. 結論

本研究の結果は、今後、施行されるであろう

DMDを対象にしたエクソン53スキップ治療の可能性を示唆していると考えられた。また、C2C12細胞株およびmdx52マウスを用いて、エクソン45-55スキップの実現可能性を示した。9型AAVを応用した改変U7 snRNA発現ベクターや中空粒子は、エクソン・スキップ治療に必要なアンチセンス分子の次世代担体として有望と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

[欧文原著]

1. Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12: 143-152, 2010
2. Yokota T, Takeda S, Lu QL *et al.* A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol-Chicago* 66:32-38, 2009
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. Nakamura A, Takeda S: Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
 15. 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: 383-391, 2009
 16. 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* 47:1049-1056, 2009
4. 中村 昭則, 武田 伸一: Duchenne 型筋ジストロフィー. TOPICS 治療研究の現状, 埜中征哉監修, 小牧宏文編集, 小児筋疾患診療ハンドブック, 診断と治療社, pp93-98, 2009

【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

2. 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S : Gene Transfer Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). 9th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (AOMC), Seoul , Korea, 3. 26, 2010
2. 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
3. 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
4. Takeda S: Exon skipping therapy toward

[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
3. 中村 昭則, 武田 伸一: ジストロフィン異常症. 内科学症例図説, 朝倉書店, pp 575-577, 2009

- Duchenne muscular dystrophy . Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7. 4, 2009
5. 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
 6. Takeda S: Exon skipping, Panel introductions and Project summaries : Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6. 26, 2009
 7. Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
 8. 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
 9. 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. 武田 伸一:筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発. 第9回日本再生医療学会総会, 3. 19, 2009
2. 武田 伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する分子治療の進歩. 第 32

- 回日本分子生物学会年会, 12. 10, 2009
3. 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
 4. 武田 伸一 : Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療法の開発 エクソン・スキッピング法を中心に. 微生物化学研究所, 9. 16, 2009
 5. 武田 伸一:筋ジストロフィーに対する治療を目指して—エクソン・スキッピングを中心に—. 生研センターイノベーション研究 夏の勉強会, 徳島大学, 9. 25, 2009
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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 C O E リエゾンラボ研究会, 熊本, 11.11, 2009
 12. 岡田 尚巳:ベクター産生型骨髄間質細胞を利用した遺伝子治療. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 3. 30, 2010
- 【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: 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. 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 筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1. 9, 2010
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 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. 中村 昭則, 武田 伸一: 筋ジストロフィー治療の現況. エクソン・スキッピング治療を中心に, 第 5 回筋ジストロフィーのピアカウンセリング養成講座, 東京, 11. 8, 2009
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 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
 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
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事業)
分担研究報告書

DMD 遺伝子変異集積領域におけるブロック・スキップ治療法の開発

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

マウス由来の C2C12 細胞株およびジストロフィン遺伝子エクソン 52 欠失マウスを対象に、遺伝子欠失変異の集積するエクソン 45-55 領域に含まれる、エクソン 50-53、エクソン 48-53、エクソン 45-55 を標的にしたブロック・スキップの誘導法を検討した。今後、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの配列、組合せ、投与方法を最適化し、十分量のジストロフィンを発現回復させたうえで、筋機能の改善効果および安全性を検証することにより、臨床応用が期待される。

A. 研究目的

現在、DMD を対象にしたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの臨床治験が行われている。しかしながら、1つのエクソンを標的にしたエクソン・スキップは、治療対象となる患者数に限りがあり、しかもそれぞれの遺伝子変異に応じた AO が必要となるためテーラーメイド治療に留まるという問題があった。そのため複数の AO を混合して広範囲のエクソンをスキップさせるブロック・スキップ療法が期待されている。仮に、ジストロフィン欠失変異の集中するエクソン 45-55 領域を標的にしたエクソン 45-55 ブロック・スキップを行うことができれば、対象患者数が欠失を有する DMD の 63%と拡大するのみならず、イン・フレーム化により軽症 Becker 型筋ジストロフィーに表現型を修正できる可能性がある。

ジストロフィン遺伝子変異が集積するエクソン 45-55 領域を標的に、C2C12 細胞株および *mdx52* マウスを用いて、ブロック・スキップを誘導する至適なアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) 配列を決定した。さらに、AO 配列を *mdx52* マウスに対して全身投与し、

筋機能の改善および毒性の有無について検証を行った。

B. 研究方法

エクソン 52 を含む小さなイン・フレーム欠失を誘導するため、まずエクソン 50-53 ブロック・スキップを行い、随時スキップの範囲を拡大して、最終的にはエクソン 45-55 ブロック・スキップの安全性と有効性を検証する。

・AO 配列の設計：マウス・ジストロフィン遺伝子のエクソン 45,46,47,48,49,50,52,54,55 の各エクソンを標的にして、5'および 3'スプライスサイトと ESEfinder3.0 により予測したスプライシング促進モチーフを中心に 25 mer の AO を 6-8 種類ずつ設計した。エクソン 51 および 53 を標的にした AO については、エクソン 51 あるいは 53 の単独エクソン・スキップを目的に設計した AO 配列各 14 種類ずつを用いた。

・C2C12 細胞株を用いたブロック・スキップ：C2C12 細胞株を 2%ウマ血清を含む分化培地で筋分化誘導し、筋管を得た。モルフォリノ

のトランスフェクションにおいては、異なるアンチセンス配列を有するモルフォリノを複数混合してカクテルとして用いた。モルフォリノの濃度が 30 μM 、トランスフェクション試薬である Endo-Porter® の濃度が 6 μM となるよう細胞培養液に添加し、48 時間後に回収した。トランスフェクション後の細胞を用いて、エクソン・スキップの様式を RT-PCR により評価した。

・ *Mdx52* マウスを用いた筋注によるブロック・スキップ: 8 週齢の *mdx52* マウスの前脛骨筋に、エクソン 45-55 (エクソン 52 は除く) の各スプライシング促進モチーフを標的とする 10 種類の AO (計 12.5 nmoles) を筋注し、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った。

C. 研究成果

1. C2C12 細胞株を用いたブロック・スキップ: エクソン 50-53 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計した計 4 種類のモルフォリノをカクテルにして投与した結果、エクソン 50-53 スキップが誘導できた。

同様に、エクソン 48-53 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計した計 6 種類のモルフォリノをカクテルにして投与した結果、やはりエクソン 48-53 スキップが誘導された。

次に、エクソン 45 および 55 の 5'スプライスサイトのみを標的にしたモルフォリノ・カクテル (45A+55A) を投与した場合に、スキップ効率は 2-3% 程度であったが、エクソン 45-55 スキップが誘導できた。続いて、45A+55A に加えてエクソン 46-54 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計したモルフォリノ (計 11 種類) をカクテルにして投与した結果、エクソン 45-55 スキップの誘導が確認できた。

2. *Mdx52* マウスを用いたブロック・スキップ: *Mdx52* マウスを対象に、C2C12 細胞株に

より同定した AO 配列を用いて筋注によりブロック・スキップを誘導した結果、エクソン 50-53 スキップでは 30% 程度、エクソン 48-53 スキップでは 2-3% 程度のスキップ効率が得られた。

エクソン 45 および 55 の 5'スプライスサイトのみを標的にしたモルフォリノ・カクテル (45A+55A) を筋注した場合、スキップ効率は 1% 未満であった。続いて、45A+55A に加えてエクソン 46-54 の各スプライシング促進モチーフを標的に設計したモルフォリノ (計 10 種類) をカクテルにして投与した結果、50% を凌ぐ高い効率でエクソン 45-55 スキップを誘導することができたが、ジストロフィン免疫染色におけるジストロフィン陽性線維の割合は 5% 未満、ウエスタンブロットにおけるジストロフィンの発現レベルは野生型マウスの 1% 未満であった。

D. 考察

今回我々は、C2C12 細胞を用いて候補となる AO 配列を選定した後、*mdx52* マウスを対象にした筋注実験によりエクソン 50-53、48-53、45-55 スキップが *in vivo* においても実現可能であることを初めて示した。C2C12 細胞あるいは *mdx52* マウスを用いた実験では、同一の AO 配列を用いてブロック・スキップを誘導した場合でも、スキップ効率が異なる可能性が示唆された。その原因として、C2C12 細胞は正常の筋細胞膜を有するが *mdx52* マウスはジストロフィー変化のある筋細胞膜を持つこと、*in vitro* 実験では AO 同士が培地の中でヘテロダイマーを形成しアンチセンスとしての活性が低下する可能性があること、*in vitro* 実験においては細胞への AO 導入にエンドポーターが必要であること、などが考えられる。

今後、AO の配列、組合せ、投与方法を最適化し、十分量のジストロフィンを発現回復させたいうえで、筋機能の改善および毒性について検討することが求められる。さらに、ブロック・スキップによる臨床治験を実施する

ことを念頭に、ヒト DMD 由来の線維芽細胞株を用いたブロック・スキップの検証を計画中である。

E. 結論

C2C12 細胞株および mdx52 マウスを用いて、エクソン 45-55 スキップの実現可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

< 欧文 >

[欧文原著]

1. Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12: 143-152, 2010
2. Yokota T, Takeda S, Lu QL *et al.* A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol-Chicago* 66:32-38, 2009
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. Nakamura A, Takeda S: Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy, *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
3. 中村 昭則, 武田 伸一: ジストロフィン異常症. 内科学症例図説, 朝倉書店, pp 575-577, 2009
4. 中村 昭則, 武田 伸一: Duchenne 型筋ジストロフィー. TOPICS 治療研究の現状, 埜中征哉監修, 小牧宏文編集, 小児筋疾患診療ハンドブック, 診断と治療社, pp93-98, 2009

【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

2. 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S : Gene Transfer Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). 9th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (AOMC), Seoul , Korea, 3. 26, 2010
2. 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
3. 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
4. Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy . Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7. 4, 2009
5. 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
6. Takeda S: Exon skipping, Panel introductions and Project summaries : Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6. 26, 2009
7. Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
8. 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
9. 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. 武田 伸一:筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発. 第9回日本再生医療学会総会, 3. 19, 2009
2. 武田 伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する分子治療の進歩. 第32回日本分子生物学会年会, 12. 10, 2009
3. 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
4. 武田 伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療法の開発 エクソン・スキッピング法を中心に. 微生物化学研究所, 9. 16, 2009
5. 武田 伸一:筋ジストロフィーに対する治療を目指して—エクソン・スキッピングを中心に—. 生研センターイノベーション研究 夏の勉強会, 徳島大学, 9. 25, 2009
6. 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
7. 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 回日本神経化学会大会, 伊香保, 6. 24, 2009
8. 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
 9. 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
 10. 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. 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 筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1. 9, 2010
 2. 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
 3. 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
4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 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. 中村 昭則, 武田 伸一: 筋ジストロフィー治療の現況. エクソン・スキッピング治療を中心に, 第 5 回筋ジストロフィーのピアカウンセリング養成講座, 東京, 11. 8, 2009
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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