

200918042A

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：臨床研究・予防・治療技術開発研究事業)

モルフォリノを用いたDuchenne型筋ジストロフィー
に対するエクソン5 1スキップ治療の臨床応用

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：臨床研究・予防・治療技術開発研究事業)

モルフォリノを用いたDuchenne型筋ジストロフィー
に対するエクソン5 1スキップ治療の臨床応用

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	
モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに 対するエクソン 51 スキップ治療の臨床応用	----- 1
武田 伸一	
II. 分担研究報告	
1. エクソン 51 スキッピングの臨床応用への見通し	----- 17
武田 伸一	
2. 患者由来細胞を用いた Phosphorodiamidate Morpholino Oligomerの有効性試験	----- 27
岡田 尚巳	
3. エクソン 51 スキップ治療の対象となる 最適な欠失変異パターンの検索 および mdx52 を用いた高容量及び反復投与の検討	----- 31
永田 哲也	
4. DMDに対する遺伝子治療に関する研究	----- 35
大澤 真木子	
5. 筋疾患の臨床治療に向けて、 患者細胞を用いて事前に治療効果を検討する研究	----- 37
木村 重美	
6. 「遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備」 研究	----- 39
中林 哲夫	
7. 臨床治験の準備に関する研究	----- 43
村田 美穂	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

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：臨床研究推進研究事業)
総括研究報告書

モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに対する
エクソン 51 スキップ治療の臨床応用

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
	大澤 真木子	東京女子医科大学 小児科 教授
	木村 重美	熊本大学大学院生命科学研究部 準教授
	中林 哲夫	国立精神・神経センター 病院 治験管理室 医長
	村田 美穂	国立精神・神経センター 病院 第二病棟部 部長

研究要旨

1. モルフォリノの有効性と安全性を評価するため、患者由来細胞やマウスを用いて検証を行った。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。
2. 臨床データベースの情報を基にエクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンを明らかにした。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、モルフォリノの反復投与を行い、反復投与でエクソン 51 スキップ治療の安全性を確認した。

3. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する、モルフォリノを用いたエクソン 51 スキップ治療を臨床応用するための基盤整備として、対象患者の把握、評価の準備を行った。
4. 国際共同治験グループの CINRG に参加し、CINRG の評価機器である、CQMS の導入を進めた。わが国独自の評価指標として動作解析を選定し、評価方法の確立を進めた。
5. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 51 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。
6. オーフアンドラッグ薬の実績のある国内製薬企業を介して AVI Biopharma 社と協議中である。

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である DMD は発症頻度が高いが (出生男児 3,500 人に 1 人)、母体の卵細胞における突然変異が多いため (発症者の約 3 分の 1)、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。そこで、ジストロフィン分子の中央のロッド部分は繰り返し構造から成るため、ある程度欠損を生じてても 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でジストロフィンの発現が回復し、筋ジストロフィーの臨床症状が改善することを観察した。しかも、その間、血液・血清学的にも異常をみることはなかった (Yokota, et al. *Ann Neurol*, 2009)。

ただし、筋ジストロフィーと同等のエクソン 7 欠失をもつ患者は少ないと考えられる。遺伝子異常が集積するホットスポット領域を検討した結果、特にエクソン 51 をスキップの標的とした場合、対象となる患者数は欠失をもつ DMD の約 19% と最も多いことが判明した。そこで、我々が開発に携わったエクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてエクソン 51 を標的に設計したモルフォリノの静脈投与を行ったところ、全身の骨格筋にジストロフィンが発現し、筋機能が改善することを証明した。本研究ではエクソン 51 スキップに用いるモルフォリノの開発に必要な安全性、有効性の検定法の標準化を図ること、米国と協力して国際共同

臨床治験を推進し、安全性と有効性を検証することを目的とする。

そこでエクソン・スキップを更に多くのDMD患者さんに届けるためにエクソン51のスキップの基礎となる研究を*mdx52*マウスを用いて行なった(岡田分担研究者)。また患者由来細胞を使いヒト細胞でのエクソン51のスキップを評価した(木村分担研究者)。エクソン51スキッピング対象となる欠失はいくつか存在する。その中で効率的にスキッピングを起こすと考えられる(永田分担研究者)。

また臨床治験に向けて患者のリクルートが必要である。患者数の把握、欠失の調査及び現在の機能の評価を行った(村田/大澤分担研究者)。臨床治験を開始後、患者の臨床評価が必要である。日本独自ではなく国際的な評価方法を導入し、確立することが必要となる。(武田/村田分担研究者)

最後に、稀少疾病に対して臨床治験を進める上で、留意すべき事項についても検討を行なった。さらに当センターで臨床治験を進める上で基盤整備が重要である。必要な体制についても検討した。

(以上、武田/中林分担研究者)。

B. 研究方法

1. *mdx52* マウス及び患者由来細胞を用いたエクソン 51 スキップの検討

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。続いて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51スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索および*mdx52*を用いた高容量及び反復投与の検討

Leiden 大のデータベースおよび既存の文献をもとにエクソン 51 スキップによりイン・フレーム化した結果、症状の改善効果が高いと見込まれる欠失変異を検索した。また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。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握

我々はDuchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療を進めるために、昨年度より、国立精神・神経センター病院での患者レジストリーの構築を始めた。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>)が稼働をはじめたので、REMUDY計画に参加し、広く国内全体の患者で、今回のエクソン51スキッピングの対象患者の検索を行った。

4. 臨床評価方法の確立

国際共同治験にも対応できることを念頭におき、米國小児医療センターを中心とした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/>) へ正式に加入し、国際基準の評価が可能となるよう CQMS 機器導入の準備を進めた。また当院独自の評価項目の選定を行った。

(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。

5. 遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

①非臨床試験成績の充足性の評価
基礎研究段階にある医薬品候補の化合物については、臨床試験への移行条件として、ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) M3 ガイドライン¹⁾に定められた条件を充足する必要がある。既に、エクソン 51 スキップ治療の開発候補となる化合物については特定しているために、ICH M3 ガイドライン¹⁾に従った非臨床試験の充足性の評価は、非臨床試験の実施条件も含め高度な専門的知識を要するため、CRO (Contract Research Organization) の協力のもと評価を行うこととした。

②臨床データパッケージの検討
筋ジストロフィーを対象とした臨床試験を実施する場合、当該疾患が希少疾患であるために、症例数確保が最大の問題である。実行可能性を検討するために、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調査した。具体的には、米国立衛生研究所 (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。現段階では、エクソン 51 スキップ治療の開発候補となる化合物を特定しているが、当該化合物以外を用いた臨床試験についても調査対象とした。

6. 国内製薬企業との打ち合わせ

臨床治験に向けて国内製薬企業との共同で進めることが、今後、国内での製品化等を念頭に置いた場合、重要となる。また AVI Biopharma 社との交渉も製薬企業を介した場合により円滑に進むと考えられる。そこで、オーファン薬で実績のある国内製薬企業との打ち合わせを考えた。

C. 研究成果

1. *mdx52* マウス及び患者由来細胞を用いたエクソン 51 スキップの検討

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。

②DMD 患者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。

2. エクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索および mdx52 を用いた高容量及び反復投与の検討

①高い治療効果が期待できる欠失とスキップ領域の検討

Leiden 大のデータベースおよび既存の文献をもとにエクソン 51 スキップによりイン・フレーム化した結果、症状の改善効果が高いと見込まれる欠失変異を検索した。その結果、エクソン 45-50、48-50、49-50、50、47-50、52 欠失変異を有する DMD 患者は、患者数が多く、治療により臨床型の改善が見込める点で、治療対象として適当であることが分かった。

②mdx52 を用いた高容量及び反復投与での安全性の検討

ジストロフィン遺伝子エクソン 52 を欠失させた mdx52 マウスを対象に、計 320 mg/kg のモルフォリノを1週間ごとに計7回反復投与したところ、血液検査および肝・腎・肺・筋の病理では明らかな毒性を示唆する所見を認めなかった。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握

当院データベース内で、エクソン 51 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）であった。REMDY は引き続き参加を広く募っており、遺伝子検索が未実施の患者も多く、今後も対象患者の検索を進めていく。

4. 臨床評価方法の確立

国際共同治験にも対応可能な評価方法として、CINRG 共通評価機器である CQMS 機器（定量的筋力評価機器、呼吸機能評価機器、階段等）の導入を進めた。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。

わが国独自の取り組みとして、継続的かつ客観的な指標により評価可能であること、ADL に直結することから、歩行を主とする動作解析を加えることとし、動作解析システム（三次元動作分析装置・UM-CAT II、フォースプレート・UM-FPG 及び分析ソフト・キネアナライザー）を導入した。現在、本機器により、患者の歩行・立ち上がり動作評価について、検討中である。

5. 遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

① 非臨床試験成績の充足性の評価

特定したエクソン 51 スキップ治療の開発候補となる化合物の開発会社との秘密保持契約のもと、非臨床試験について、実施条件及びその成績について調査し、ICH M3 ガイドライン¹⁾ に従った充足性について評価を開始した。現段階でも調査を継続しているが、検討内容については秘密保持の範囲であるため、本報告書での掲載は行わない。

② 臨床データパッケージの検討

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試験であり、残り2試験についてはジストロフィン発現であった。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。

6. 国内製薬企業との打ち合わせ

AVI Biopharma 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、2008 年の場合には我々の体制が充分整わず、しかも AVI Biopharma 社側の担当者が突然交代したため、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 企業ノーベルファーマ社が仲介となって AVI Biopharma 社との交渉を進めている。ノーベルファーマ社はウイルソン病等の希少疾患の治療薬や悪性神経腫瘍治療薬 NPC-08 の試験を手掛けるなどオーファンドラッグ薬の経験が豊富である。既にシアトル郊外の AVI Biopharma 社の工場に視察及び本社で協議を行っている。ただ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。

D. 考察

1. *mdx52* マウス及び患者由来細胞を用いたエクソン 51 スキップの検討
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、確認した。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。

2. エクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索および *mdx52* を用いた高容量及び反復投与の検討

今回、我々は、エクソン 51 スキップの臨床試験を施行する準備段階として、臨床試験の組み込み対象として適当な欠失変異のパターンを明らかにできた。マウスを対象にした全身反復投与実験は、高容量のモルフォリノの安全性を示唆している。今後、機能回復を期待する為に、より高容量のモルフォリノの臨床試験も選択肢になりうると考えられた。以上の成果により、我々はエクソン 51 スキップの臨床試験を行うにあたり、重要な基礎情報を得ることができた。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握

エクソン 51 スキップによる対象患者は

欠失をもつ DMD の約 19%ともっとも多い。今後、治験を進めるに当たっては、安全かつ、最高の効果をえるために、年齢、筋症状の重症度のほか、心・肺・知的機能等を考慮して、患者選定を進めていく必要がある。来年度はこれらについての評価も進める予定である。

4. 臨床評価方法の確立

評価方法については、CINRG のシステムの導入についてはめどがたったため、今後、実際に運用して、基礎データの蓄積が必要である。

またわが国独自の評価項目として導入した歩行・立ち上がり動作評価については短時間で最も効率的に評価しうる指標の選定が必要である。

5. 遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

① 非臨床試験成績の充足性の評価

特定したエクソン 51 スキップ治療の開発候補となる化合物は、海外では既に臨床開発の段階に入っている。海外の実施国においては、ICH M3 ガイドライン²⁾と実施国の規制要件を満たしているものと考えられるが、本邦での実施においては国内ガイドラインに従った実施が必要となる。今後の臨床試験の実施に向けて、非臨床試験成績の充足性については引き続き評価を行っていく。

② 臨床データパッケージの検討

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える。

- ・ 希少疾患であり、国内外での開発自体が少ない
- ・ 有効性の主要評価項目についても、標準的な症状評価の指標が十分に確立していない
- ・ 有効性評価の代替え指標についても

十分に確立していない

- ・ 国内外で既承認のアンチセンス・モルフォリノが存在しないため、作用機序が類似する化合物からも、安全性の推測が困難である

特定したエクソン 51 スキップ治療の開発候補となる化合物の臨床試験を想定した場合には、末梢筋の機能の評価が必要から、これに由来した指標を選択する必要がある。海外で実施中の臨床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、筋ジストロフィーの発現が用いられているが、特定した化合物の臨床試験の参考になるのは、6分歩行検査及び筋ジストロフィーの発現について検討した3試験のみに限定される。つまり、検証的試験を計画するための参照試験の成績が得られていないだけでなく、指標としての使用経験も少ない状況ではある。国立精神・神経センターは、神経筋疾患の世界的研究組織である The Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG) にも参画しているが、同研究グループでも有効性評価指標の確立についてはこれまで数々の議論が行われている。これらの議論や公表論文も踏まえて、国内臨床試験で選択していく有効性評価指標については引き続き検討していく。

筋ジストロフィーの臨床開発においては、症例数確保の問題だけでなく、以上の有効性評価指標の決定にかかわる問題もある。現在は、開発ストラテジーを決定するために、臨床データパッケージの構成について検討中である。

③ 治験実施のための体制整備

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験は、当該疾患が希少疾患であることから、症例数の確保が困難である。また、エクソン 51 スキップ治療は、治療標的が限定されていることから、さらに対象患者数

は限定される。このため、臨床試験の実施は、被験者候補の実数を把握するためにも、国内単独もしくは国際共同に関わらず、遺伝子治療レジストリーを構築することが実行可能性を向上させると考える。現在、既に構築を行った筋ジストロフィーの登録システムの精度について検討している。

臨床試験の実施が、企業主導もしくは医師主導のいずれで行うかについても検討している。医師主導治験を実施するためには、薬事専門家の獲得も含め、事務局機能を強化する必要がある。開発ストラテジーの決定とともに、必要な体制についても整備していく。

6. 臨床治験への展開

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、ノーベルファーマ社の協議の推移を見守りつつ、治験管理室等との連携を更に深めて進展を企図したい。

E. 結論

1. 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、臨床治験で用いられている mA20 あるいは mB30 よりも高い効率でエクソン 51 スキップを誘導できた。このことから、臨床治験に用いる 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。

2. データベースや文献からエクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンを明らかにし、アンチセンスを反復投与した場合の有効性及び安全性を明らかにした。

3. 対象患者の把握と評価指標の選定・

機器の準備を行った。今後もこれらを進め、基礎研究の確立と同時に治験に進めるよう、準備を進める。

4. 承認申請を目的とした Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床試験については、その臨床評価方法も十分に確立していない状況である。その方法を検討するとともに、希少疾病であるため臨床試験の規模と数にも制限があるため、海外の開発状況を絶えず把握し、開発ストラテジーの立案を慎重に検討していく必要がある。また AVI-4658 に関しては臨床試験の実施に向けて、非臨床試験成績の充足性については引き続き評価を行っていく必要がある。

5. オーファンドラッグ薬の実績のある国内製薬企業を介して AVI Biopharma 社と協議中である。

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: Hepsidin, 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

17. Kimura S, et al. : A 2-bp deletion in exon 74 of the dystrophin gene does not clearly induce muscle weakness. Brain Dev. 31, 169-172, 2009
18. Nicolino N, Kimura S, et al.: Clinical Outcomes after Long-term Treatment with Alglucosidase Alfa in Infants and Children with Advanced Pompe Disease. Genet.Med.11, 210-219, 2009
19. Kimura S, et al. A case report of myoclonic epilepsy with ragged-red fibers without increased lactate levels. Pediatr. Neurol., 41,46-8, 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
6. 中林 哲夫, 中村 治雅, 岡本 長久: 本邦における国際共同治験の現状と課題 —抗うつ薬開発の最近の動向—, 臨床精神神経薬理. 13: 255-263, 2010

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

9. Kimura S : Importance of checking exon skipping events prior to clinical trials using systemically delivered antisense morpholino in Duchenne muscular dystrophy patients. 第14回世界筋学会, ジュネーブ スイス, 9. 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COE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ンによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 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
 11. 木村 重美: エクソンスキッピング誘導による治療の臨床応用に向けて, 適正アンチセンスと適応患者のスクリーニング法の確立 その 2 第 51 回日本小児神経学会, 鳥取, 5. 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 宗一朗, 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 宗一朗, 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 Szani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田 伸一: 新世代モルフォリンによる筋ジストロフィー犬治療, 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：臨床研究推進研究事業)
分担研究報告書

エクソン51スキッピングの臨床応用への見通し

研究分担者 武田 伸一
国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

1. エクソン 51 スキップの臨床治験について情報の収集を行ない、オランダ及び英国で局所的及び全身投与の詳細を入手し分析した。
2. AVI Biopharma 社 AVI-4658 の非臨床安全性試験を入手し、国内での治験に向けて充足性を検討および評価した。
3. オーフアンドラッグ薬の実績のある国内製薬企業を介して AVI Biopharma 社と協議中である。
4. エクソン・スキップについて、臨床治験を行なうためには、臨床評価系を確立が必須であり、既に先進的な取り組みを続けている CINRG との交流を深め、評価機器の導入を開始した。

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である DMD は発症頻度が高いが(出生男児 3,500 人に 1 人)、母体の卵細胞における突然変異が多いため(発症者の約 3 分の 1)、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。そこで、ジストロフィン分子の中央のロッド部分は繰り返し構造から成るため、ある程度欠損を生じて in frame であれば機能回復を望むことができる点に着目したエクソン・スキップ治療が注目されている。しかし、この方法には、対象が、ジストロフィン遺伝子の特有のエクソン欠失を示す DMD 患者に留まり、しかも遺伝子異常ごと

にアンチセンス配列を検討し有効性と安全性を実証する必要があるという欠点があった。ところが、最近我々は米国・国立小児医療センターとの共同研究により、元来スプライス変異のためエクソン7をスキップしている筋ジストロフィー犬について、アンチセンス・モルフォリノを全身的に投与してエクソン6及び8を強制的にスキップすることにより横隔膜を含む全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、筋ジストロフィーの臨床症状が改善することを観察した。しかも、その間、血液・血清学的にも異常をみることはなかった(Yokota, et al. *Ann Neurol*, 2009)。複数のエクソンを同時にスキップすることにより臨床症状の改善をみたことから、エクソン・スキップ治療の対象となる DMD 患者の範囲が拡大し、少なくとも遺伝子欠失例の 80%がカバーできることになった。

エクソン51スキップの対象は、欠失をも

つ DMD 患者の約 19%と最も多い。我々はこれまでにエクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてエクソン 51 スキップの安全性と有効性を確認した。本研究では米国 AVI Biopharma 社と協力してエクソン 51 スキップの国際共同臨床治験を実施することを目的とする。

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-4658 (オリゴヌクレオチド) の非臨床安全性試験を評価

AVI Biopharma 社と秘密保持契約を結び、DMD 治療薬 AVI-4658 (オリゴヌクレオチド) の非臨床安全性試験を入手および評価し、第 I 相試験開始のための充足性を検討した。高度な専門的知識が必要なため、CRO (Contract Research Organization) と共に評価を行った。

3. 国内製薬企業との打ち合わせ

本研究課題が我が国の将来の産業振興に関わるスーパー特区に関連している以上、産官学での連携を念頭に置く必要がある。そこで、将来の核酸医薬品としての製品化等を念頭に置いて、オーファン薬で実績のある国内製薬企業との打ち合わせが必要と考えた。

4. 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 CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) 年次総会に出席した。

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、Prosenza 社の 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 スキップの臨床治験を進め、局所的投与では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ことを明らかにしている (NEJM, 2007)。現在、皮下注による全身投与を行ない、筋力評価、歩行距離での改善を患者の一部に認めている。今後、Prosenza 社とライセンス契約を結んだ世界的製薬企業 GSK が中心となり長期皮下投与を含めた大規模治験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 AVI-4658 を用いたエクソン 51 スキップの臨床治験が行われている。Lancet Neurology に 2009 年 10 月に発表された結果によれば、局所的なジストロフィンの発現が観察され、局注に伴う有害事象は観察されなかった。現在、0.5mg/kg~20mg/kg の投与量を用いた静注による治験 (Dose ranging study) が行われている。12 週間毎週投与の protocol であるが、現時点での静注による有害事象は観察されていない。

(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、AVI Biopharma 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・