

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-4658 (オリゴヌクレオチド) の非臨床安全性試験を評価

AVI-4658 (オリゴヌクレオチド) の非臨床安全性試験を評価し、第 I 相試験開始のための充足性を検討した。評価対象資料は AVI Biopharma 社と秘密保持契約を結んだ上で入手した AVI-4658 の非臨床安全性試験成績資料及びその後更新された Mount Rainier Database より検索した追加資料 (同年 3 月 16 日入手) とした。AVI-4658 は希少疾病医薬品 (オーファン薬) であることのみならず、本邦では承認前例のないアンチセンス核酸医薬品である。DMD という疾患の特殊性とその症状の進行を抑制する有効な治療薬がないことなどから、この種の医薬品の開発がこれまでの医薬品開発の考え方にどこまで従う必要があるのか判断が難しい点がある。その為、該当する安全性評価ガイドラインが問題となる。核酸医薬品に関しては、ICH S6 ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(平成 12 年 2 月 22 日医薬審第 326 号) が適用されるものと考えられた。

評価した結果は秘密保持契約の都合上、掲載できないが、一部未実施、または非公開の可能性があり、今後、最終報告書の入試の必要性がある。これまでに実施された非臨床安全性試験のいくつかの問題点についても、当該試験実施機関に内容確認が必要であるとともに、臨床試験開始にあたっては医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の対面助言を受けることが AVI-4658 の治験を進めるための重要なステップと考えられた。

## 3. 国内製薬企業との提携

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なかった上、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、製薬系 venture 企業である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膠腫治療薬 NPC-08 の治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。

## 4. 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。2009 年 11 月にワシントン DC で行なわれた CINRG の meeting に参加し、さらに前後して行なわれた clinical evaluator のトレーニング・コースについて、臨床治験を推進するためのメンバーである国立精神・神経センター病院の治験管理室長、小児神経科医師 1 名、理学療法士 1 名と共に参加した。既に臨床評価を行なうための method は、定量的な筋力測定法である quantitative muscle testing (QMT) を中心に確立しており、日本にも既に機器の一部導入が完了している。今後、機器導入完了次第、機器の稼働に向けて準備を行なう。

#### D. 考察

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 AVI-4658 を中心とした毒性試験は、ほぼ終了したと考えられた。この点については、共同研究者である Eric Hoffman 教授の努力による所が大きい。しかし前述の通り、まだデータが不十分なのか公開されていないだけであるのか不明な部分が存在する。現在、入手できる AVI Biopharma 社の資料からは限界があり、今後、最終報告書の入手と試験内容の確認を行う必要がある。

一方、臨床評価については、米国を主体とした CINRG に参画することにより、一定の基準で評価する手掛かりが得られた。現在、評価法の導入の最終段階まで到達している。

現在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による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したい。

#### E. 結論

1. 欧米を中心にエクソン 51 スキップに関する臨床治験が進行している。
2. AVI-4658 の非臨床安全性試験を評価した。現在、我々に公開されている情報では、治験を開始するにあたって試験が足りない可能性が示唆された。最終報告書の入手と試験内容の確認を行う必要がある。
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。

#### 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). 9<sup>th</sup> 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, 8<sup>th</sup> 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
  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  $\epsilon$ -Sarcoglycan Gene in Cells of  $\epsilon$ -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

【国際学会】

- Research. Barcelona, Spain, 7. 9, 2009
- 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】

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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】

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 15<sup>th</sup> 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 mesenchymal stromal cells in dog, Japan Society of Gene Therapy The 15<sup>th</sup> 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 回筋ジストロフィー協会全国大会, 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

患者由来細胞を用いた Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer の有効性試験

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 51 において、5'および 3'スプライスサイト (それぞれ 51A, 51D) や ESEfinder3.0 ソフトにより同定した exonic splicing enhancer (ESE) を標的とする 25 mer のアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を 13 種類設計した。さら

に、臨床試験に用いられている PRO051(mA20)および AVI4658 (mB30) に対応する 20 mer と 30 mer の AO を 2 種類設計した。マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 52 を欠失した *mdx52* マウス (8 週齢) の前脛骨筋に、単独あるいは 2 種類の PMO (計 1.25 nmoles) を 1 回投与し、2 週間後に RT-PCR、ジストロフィン免疫染色、ウエスタンブロットによる解析を行い、最適な AO 配列を決定した。次に 8 週齢の *mdx52* マウスを対象に、最適化した配列を持つ PMO (合計 1000 nmoles) を、1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与し、最終投与の 2 週間後に筋機能、病理、毒性を検討した。続いて、CORIELL 社(NJ, USA)より購入したジストロフィン遺伝子の



エクソン45-50欠損を有するDuchenne型筋ジストロフィー由来の線維芽細胞株に対してMyoDによる筋分化誘導後、ヒトに対して設計したAO配列を用いてエクソン51スキップの効果を検討した。

### C. 研究成果

#### 1. 筋注による至適 AO 配列の検討

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

#### 2. 配列至適化PMOの全身投与

モルフォリノ51Aプラス51Dの*mdx52*マウスへの静脈投与後、全身の骨格筋で野生型の10-40%程度の短縮型ジストロフィンの発現回復を認めた。治療後の*mdx52*マウス(治療群)の筋病理標本では未治療の*mdx52*マウス(未治療群)と比べて筋ジストロフィー変化は改善し、中心核線維の割合は有意に減少していた。また、治療群では未治療群と比べて血清CK値、長趾伸筋の筋張力、両前肢の握力およびトレッドミルを用いた持続走行時間が有意に改善した。血液検査や病理検査では明らかな毒性は認めなかった。

#### 3. DMD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。

### D. 考察

現在、オランダとイギリスにおいて、DMDを対象にしたジストロフィン遺伝子エクソン51スキップの臨床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ようとしている。DMDを対象にした臨床データベースによる解析では、エクソン51スキップによりイン・フレーム化しても、DMDとなる可能性が高いことが示唆される。そこで、動物モデルを用いてエクソン51スキップを誘導し、筋機能の改善の有無を検討することは極めて重要である。

今回我々は*mdx52*マウスを用いた実験により、エクソン51の5'および3'スプライスサイトを同時に狙った2種類のAO(51Aプラス51D)投与時に、最も高い効率でエクソン51スキップを誘導できること、PMOの静脈投与により全身の骨格筋に短縮型ジストロフィンが発現回復し、筋機能は改善することを示した。今後さらに臨床標本を用いて網羅的な解析を行うことで、より治療効果の高い配列の予測と検証を行うことが期待される。

### E. 結論

本研究の成果により、現在進行中のDMDを対象にしたエクソン51スキップ治療の妥当性が示された。さらに、DMD由来の細胞においてもエクソン51の5'および3'を標的にした場合に、臨床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。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[欧文原著]

Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K. Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuro Report* (in press)

Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S., Ozawa, K. Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther*, 20:1013-1021, 2009.

Ohshima, S., Shin, J.H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T. and Takeda, S. Transduction efficiency and immune response with AAV8 vector in dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009.

Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K. Retroviral Vector-Producing Mesenchymal Stem Cells for Targeted Suicide Cancer Gene Therapy. *J Gene Med* 11:373-381, 2009.

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K.I., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y. and Ozawa, K. Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther*, 16:383-391, 2009.

[欧文図書]

Okada, T., Takeda, S.: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in *A Guide to Human Gene Therapy* (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ.(in press)

### 2. 学会発表

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

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

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

Akiko Ishii, Jin-Hong Shin, Yuko Katakai, Fumiko Ono, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda  
Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy for muscular dystrophy using normal primates  
American Society of Gene Therapy 12<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

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

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

岡田尚巳, 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 武

田伸一：AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療，日本人類遺伝学会第 54 回大会，東京，9.24，2009

笠原優子、喜納裕美、西山章代、Jin-Hong Shin、大島幸子、岡田尚巳、武田伸一：MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植治療，第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，10.26，2009

喜納裕美、岡田浩典、笠原優子、岡田尚巳、武田伸一：9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入  
第 4 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会  
平成 21 年 10 月 31 日、岡山

武田伸一、喜納裕美、弓削田直子、岡田浩典、笠原優子、岡田尚巳：9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔・新生仔への遺伝子導入  
平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究、研究班会議  
平成 21 年 12 月 4 日、東京

岡田尚巳  
Development of AAV vector production system and therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy  
熊本大学グローバルCOEリエゾンラボ研究会、平成 21 年 11 月 11 日、熊本

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他，特記事項  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)  
分担研究報告書

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

研究分担者 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

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、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの反復投与を行い、エクソン 51 スキップ治療の安全性を確認した。併行して、DMD 由来の細胞を用いて、エクソン 51 スキップを高率に誘導することが可能なアンチセンス配列の探索を進めている。本年度の研究により、臨床治験の実施に重要な基礎情報が得られた。

A. 研究目的

エクソン 51 スキッピングに用いるアンチセンス・オリゴヌクレオチド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、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。

B. 研究方法

高い治療効果が期待できる欠失とスキップ領域の検討を行う。

筋ジストロフィーモデルマウスを対象に、臨床治験に用いるアンチセンス・オリゴヌクレオチドを反復あるいは高容量で投与し、効果および安全性を検討する。

転写因子である MyoD を導入して筋管に分化させた DMD 由来線維芽細胞株を用いて、治験に用いられているアンチセンス配列よりも、高率にエクソン 51 スキップを誘導できる配列をスクリーニングす

る。モルフォリノ濃度は 10  $\mu$ M, Endo-Porter® の濃度は 6  $\mu$ M となるよう細胞培養液に添加し、48 時間後に回収し、RT-PCR を行う。

C. 研究成果

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。

2. 臨床治験に用いるアンチセンス・オリゴヌクレオチドを反復あるいは高容量で投与した場合の、効果および安全性の検討

筋ジストロフィーモデルマウスの1種である、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 のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを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. DMD 由来細胞を用いたアンチセンス配列のスクリーニング

RT-PCR により評価したエクソン・スキップ効率は、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2種類の組み合わせ投与では約 50%であり、臨床治験に用いられている配列の約 35%を大きく上回ることが判明した。

### D. 考察

現在、オランダとイギリスにおいて、DMD を対象にしたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの臨床治験が行われている。我々は、mdx52 マウスを対象にエクソン 51 スキップを行った結果、全身の骨格筋にジストロフィンの発現が回復し、筋機能が改善することを示した。本成果により、エクソン 51 スキップの臨床治験を行う意義が明確にされた。

今回我々は、エクソン 51 スキップの臨床治験を施行する準備段階として、臨床治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、比較的高容量のアンチセンス・オリゴヌクレオチドの安全性を示唆している。以上の成果により、我々はエクソン 51 スキップの臨床治験を行うにあたり、重要な基礎情報を得ることができた。

DMD 由来の細胞を用いた実験により、アンチセンスの組み合わせ投与は、臨床治験に用いられている配列よりも高率にエクソン

51 スキップを誘導できる可能性を明らかにした。将来、我が国から新規のアンチセンス配列を提案することを目標に配列のスクリーニングを継続する方針である。

### E. 結論

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安全性を明らかにした。エクソン 51 スキップを高率に誘導できる新規アンチセンス配列の探索を進めた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

[欧文原著]

- 1) 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

[欧文図書]

なし

#### 2. 学会発表

- 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) 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

- 3) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他, 特記事項

なし

要旨：本邦でも Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)患者に対するエクソンスキッピング療法の治験実施が検討されている。このような状況を踏まえ、当該患者を診療する医療機関は治験への参加体制を整備する必要がある。そのためには対象エクソン欠失患者の抽出と当該患者の運動機能などの状況を把握することが必須である。

目的：東京女子医科大学小児科通院中の患者が、ただちに治験に参加できる状況を整えるため、エクソンスキッピング療法の対象となるエクソン欠失患者数、また当該患者の運動機能を把握する。

方法：東京女子医科大学小児科に現在も通院中の DMD、または Becker 型筋ジストロフィー(BMD)と診断された患者を対象に診療録を元に後方視的に検討した。ジストロフィン遺伝子の欠失・重複は MLPA 法を用いて確認を行い、MLPA 法で確定診断に至らなかった患者についてはジストロフィン遺伝子の全シーケンスを行った。

結果：現在東京女子医科大学小児科に通院中の DMD/BMD 患者は 4 歳～30 歳までの 35 名 (DMD:32 名、BMD:3 名) だった。MLPA 法は全例に施行し 4 名で欠失・重複とも認めなかった。4 名中 3 名についてはジストロフィン全シーケンスを行い点変異が確認された。1 名は現在検査中である。31 名については MLPA 法で確定診断が可能であった。その内訳は表 1 に示す。確定診断がついた 34 名のうち、エクソン 44 から 55 のいわゆるホットスポット領域周辺に標的エクソンを有するエクソンスキッピング療法対象患者は 18 名いた (表 2)。現在車椅子を利用せず、歩行可能な患者は 36 名中 10 名であった。10 名の内、

先述のエクソンスキッピング療法対象エクソン欠失患者は 4 名 (3 歳～10 歳) でいずれも心筋障害、呼吸障害は認めていない。

考察：現在も患者の症状は進行しつつづけているが、歩行可能な DMD 患者として、ホットスポット領域周辺に標的エクソンを有するエクソンスキッピング療法適応患者は 4 名いた。4 名は 3 歳から 10 歳まででいずれも心筋障害や呼吸器障害は呈していない。エクソン 51 スキップを標的とした治験が開始された場合にも、当科から参加可能な患者が存在した。

結論：エクソンスキッピング療法の治験参加のために、筋力低下、呼吸機能維持に効果があると考えられているステロイド療法の実施を留保している患者も存在する。早期の治験開始が望まれる。

研究発表：村上てるみ、「筋ジストロフィーの遺伝子治療導入に向けての運動機能評価に関する検討」厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーの臨床試験実施体制構築に関する研究」研究班班会議 (主任研究者：川井充) 2008. 12. 5

文献：大澤真木子他。筋ジストロフィーの自然経過. 小児リハビリテーション II. 岩田 力他 (編)、医歯薬出版・東京 67-96, 1991

表1：当科で経過観察中の患者のMLPA法結果のまとめ

欠失エクソン	人数	重複エクソン	人数	点変異	人数
1-63	1	2	3		3
1-17	1	2-7	1	合計	3
3-7	1	3-6	1		
8-18	1	35-51	1	不明	1
18-19	1	合計	6		
19-50	1				
19-52	1				
44	3				
45	3				
45-50	2				
46-47	1				
46-50	2				
48-52	1				
49-52	1				
50	1				
51	3				
51-54	1				
合計	25				

表2：エクソンスキッピング療法対象患者の内訳

欠失しているエクソン	スキッピングするエクソン	患者数	歩行可能	歩行不能
del45_45	44	3	1	2
del46_47	45	1	1	0
del44_44	45	3	0	3
del51_51	50	3	0	3
del19_50	51	2	0	2
del45_50	51	2	0	2
del50_50	51	1	1	0
del19_52	53	1	0	1
del48_52	53	1	0	1
del49_52	53	1	1	0



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  
研究分担者 木村 重美 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

**研究要旨** デュシェンヌ筋ジストロフィーに対してアンチセンス・モルフォリノによるエクソン・スキッピング誘導法を用いた治療が予定されている。本研究では臨床応用前に患者細胞を用いて本当にエクソン・スキップが起ることを確認した。このことは動物実験で成功している治療がヒトでも効果があることを示唆している。

#### A. 研究目的

デュシェンヌ筋ジストロフィー (DMD) に対してアンチセンス モルフォリノ (PMO) を使用して、エクソン・スキッピングを誘導する治療法を実現するために、臨床治療前に実際に患者細胞を用いて目的通りのエクソン・スキッピングが起ることを解析することが目的である。

#### B. 研究方法

熊本大学の臨床研究・医療技術の倫理委員会の承認後、正常コントロールの線維芽細胞と、ジストロフィン (dy) 遺伝子のエクソン51をスキップすることにより欠損パターンが in frame (ベッカー型) となる DMD 患者 (dy 遺伝子のエクソン45-50, 48-50, 49-50, 50に欠損) より、インフォームド・コンセントを得て、線維芽細胞を採取した。その細胞に筋分化に誘導可能な MyoD 遺伝子を発現することができるアデノウイルス (AdCAGMyoD) を 20MOI で感染させて筋細胞に分化させた。感染後 4 日目に PMO をトランスフェクションした後、7 日目に RNA を分離し、Nested RT-PCR を施行した。文献 (V. ARECHAVALA-GOMEZA, et al. *HUMAN GENE THERAPY* 18:798-810, 2007) を参考に B30 はエクソン・エンハンサー部位に相補的なシークエンス、I25 はエクソン・ドナー部位に相補的なシークエンスをもつ PMO を作製した。

#### C. 研究結果

##### 1. トランスフェクション法の検討

End-porter が一番効率もよく、安定してバンドが確認された。

##### 2. dy 遺伝子の各欠損パターンによる検討

B30 は安定してエクソン 51 がスキップしたバンドを認めた。I25 は各欠損パターンで違ったバンドの出現のパターンを認めた。エクソン 51 をスキップしたバンド以外に長いバンド (L) のバンドと短いバンド (S) を認めた。S と L をシークエンスして解析した結果、エクソン 51 の一部が含まれており、潜在性のエクソン・ドナーを認めた。いずれも out-of-frame であった。また、B30 と I25 の両方

をトランスフェクションするとエクソン 51 をスキップする効率が上がる傾向にあった。

#### D. 考察

潜在性のエクソン・ドナーが出来る可能性があることより、PMO のシークエンスをデザインする際、そのアンチセンスの 5' 側に潜在的なスプライシング・ドナーの存在を調べておく必要がある。今後、タンパクレベルの検討とジストロフィンが発現することにより細胞レベルでどのように変化するか検討する。

#### E. 結論

患者細胞を使用して、臨床応用前にその PMO が適正であるか、また個々の患者で実際にエクソン・スキップが誘導されるか解析できるシステムを構築した。このシステムはテーラーメイド治療を実現するには重要である(この研究は論文投稿中である)。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Nicolino N., 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)
- 3) Kimura S., et al. A case report of myoclonic epilepsy with ragged-red fibers without increased lactate levels. *Pediatr. Neurol.*, 41,46-8(2009).

##### 2. 学会発表

- 1) 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) 2009 年 9 月
- 2) 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) 2009 年 5 月

平成21年度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51スキップ治療の臨床応用（H21-臨床研究一般-015）」

#### 分担研究報告書

「遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備」研究

研究分担者 中林哲夫 国立精神・神経センター 治験管理室医長

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

#### A. 研究目的

現在、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・スキップ治療の治療薬は、医薬品としては、国内外のいずれでも承認されていない。本研究の目的は、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検討し、国内の治験への導入可能性と、治験実施のために必要な対策について検討することである。

#### B. 研究方法

##### 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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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。

## C. 研究結果

### 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<sup>1)</sup>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。

## D. 考察

### 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<sup>2)</sup>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

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では、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、筋ジストロフィン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ン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。

## E. 結論

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

## F. 研究発表

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

## G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

### 【引用文献】

- 1) 食品局審査管理課長: 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について. 薬食審査発0219第4号
- 2) GUIDANCE ON NONCLINICAL SAFETY STUDIES FOR THE CONDUCT OF HUMAN CLINICAL TRIALS AND MARKETING AUTHORIZATION FOR PHARMACEUTICALS M3(R2), available online at [http://www.pmda.go.jp/ich/m/step5\\_m3r2\\_10\\_02\\_19e.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/m/step5_m3r2_10_02_19e.pdf)