

201015013A

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)

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成23(2011)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エンヌ型 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	----- 9
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	----- 15
岡田 尚巳	
3. Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた ジストロフィン遺伝子エクソン 53 スキップの試みに 関する研究	----- 19
永田 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

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

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・神経医療研究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・神経医療研究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・神経医療研究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、この領域の欠失に対する取り組みを、前年度に引き続き推進した。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、安全で心筋への送達効率が高い 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システムを検証した。

A. 研究目的

我々は、アンチセンス・モルフォリノを用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー (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、安全性と有効性を示してきた。まず、ジストロフィン遺伝子のエクソン 6 および 8 を標的としたモルフォリノを、スプライス変異を有する筋ジストロフィー犬(筋ジス犬)に全身投与し、エクソン 6 と 8 を同時にスキップさせイン・フレーム化に成功した。この際、全身骨格筋でジストロフィン発現の回復と筋機能の改善が確認され、副作用はみられなかった(Yokota et al, *Ann Neurol*, 2009)。また、*mdx52* マウスを用いてエクソン 51 スキップにより臨床症状が改善することを明らかにした(Aoki, Mol

Ther, 2010)。さらに、*mdx52* マウスを用いて、エクソン 45-55 の遺伝子変異集積領域をスキップさせる可能性を証明した。これらを根拠として、対象患者の多いエクソン 51 スキップ治療法の臨床試験を実施するための体制作りを推進している。

ただし、遺伝子変異集積領域であるエクソン 45-55 を効果的にスキップさせる技術は、未だ確立されていない。また、現行のモルフォリノを用いた治療方法では、心筋への導入効率および作用時間が不十分であり、将来的に高い臨床的効果を得るためにはこれらの課題を克服することが必要である。そこで、安全で心筋への導入効率が高い 9 型アデノ随伴ウイルス(AAV)に着目し、これを応用したベクターや中空粒子を構築し、エクソン・ス

スキップの誘導とその治療効果を検証することとした。

## B. 研究方法

### 1. エクソン 45-55 スキップ

昨年度までに、我々はエクソン 45-55 にてマルチエクソン・スキッピングが可能であることを細胞およびマウスを用いて証明した。ただし、全てのエクソンを標的とするモルフォリノを同時に投与すると、オフ・ターゲット効果が強くなることが予想された。そのため、最小限のエクソンを標的とするアンチセンスで、広範囲のスキッピングを効果的に誘導する条件を、マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて検討した。

### 2. 心筋 DDS 担体の開発

煩雑で効率の低い従来技術を大きく改良し、高純度 AAV ベクターや中空粒子の作製・精製技術を新たに開発した(Okada et al, *Hum Gene Ther*, 2009)。その技術を応用し、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を作製し、アンチセンス分子を心筋に高い効率で送達する新たな手法の開発を推進した。今年度は新たに効率的にモルフォリノを中空粒子に取り込ませる手法を開発し、培養細胞の系で蛍光標識モルフォリノの細胞内導入効率を検証した。また、核内局在化と持続的な効果を目的として、改変 U7snRNA に結合したアンチセンス配列を発現させる 9 型 AAV ベクターを構築した。さらに、9 型 AAV ベクターの生体内での動態を検証するため、*mdx* マウスに小型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを投与し、心筋や全身骨格筋への送達効果や免疫応答を検討した。また、筋ジス犬においても、胎児期に小型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを投与し、免疫寛容の誘導や呼吸循環機能を評価した。

## C. 研究成果

### 1. エクソン 45-55 スキップ

マウス筋芽細胞 C2C12 を用い、広範囲のスキッピングを効果的に誘導する条件を検討したところ、5 種類のアンチセンスを組み合わせるだけで 10 個のエクソンのマルチ・スキップが誘導できることが確認できた。

### 2. 心筋 DDS 担体の開発

界面活性剤を用い、効率的にモルフォリノを中空粒子に取り込ませることに成功した(特許出願中)。また、改変 U7snRNA に結合したアンチセンス配列を発現させる 9 型 AAV ベクターを構築し、ヒト培養細胞の系でスキップの誘導を確認した。*mdx* マウスに短縮型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを静脈内投与し、心筋において一年半以上発現が持続することや、線維化の予防による心機能改善効果を証明した(Shin et al, *Gene Ther*, in press)。また、筋ジス犬においても、胎児治療による長期発現と呼吸循環機能の改善効果を確認した(投稿準備中)。

## D. 考察

遺伝子変異集積領域におけるエクソン 53 や複数エクソンをスキップさせるための基盤的技術が開発できた。ただし、複数のエクソンをスキップさせるブロック・スキップの取り組みに関しては、アンチセンスの配列、組合せ、投与方法を最適化し、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。アンチセンス分子を効果的に標的組織に送達するための手段として、9 型 AAV を応用したベクターや中空粒子は有効と考えられた。

次の研究段階として、患者由来の線維芽細胞を培養し筋分化を誘導後、ベクター系を用いてエクソン・スキップを誘導し、有効性や安全性を検証する予定である。既に予備的検討として、患者由来の線維芽細胞を用い、MyoD を用いた筋分化誘導とスキップの検証を実施した(Saito et al, *PLoS One*, 2010)。さらに、ブロック・スキップによる臨床治験を念頭に、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

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

##### I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M. : Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl] ribonucleosides using oxa-michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides. *J Org Chem*. 2011, (in press)
2. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda SI : Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet*. (in press)
3. Shin J.H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther*. (in press)
4. Nakamura A, Takeda S : Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol*. (in press)
5. Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H: SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapses. *J Neurochem*. 116: 1122-1137, 2011
6. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab*. 13: 170-182, 2011
7. Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, Partridge T : The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*. 19: 9-15, 2011
8. Yokota T, Hoffman E, Takeda S : Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol*. 709: 299-312, 2011
9. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res*. 316: 3087-3092, 2010
10. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther*. 18, 1995-2005, 2010
11. Kanagawa M, Omori Y, Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Post-translational Maturation of Dystroglycan Is Necessary for Pikachurin Binding and Ribbon Synaptic Localization. *J Biol Chem*. 285: 31208-31216, 2010

12. Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M : Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 294: 95-101, 2010
13. Sugita H, Takeda S: Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86: 748-56, 2010
14. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One.*; 5(8). pii: e12239, 2010
15. 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. *Neuroreport.* 21: 447-451, 2010
16. Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanesaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K: Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res.* 316: 2932-2944, 2010
17. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H : Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol.* 176: 2414-2424, 2010

【欧文著書】

1. Okada T, Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, Gene Therapy and Regulation (ed. by Roger Bertolotti), *World Scientific, NJ.* 2010, 5(1), pp113-123.
2. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal. *Mechanosensing Biology (ed. Masaki Noda)*, Springer Japan, pp1-219,

2010

<和文>

【和文著書】

1. 武田伸一：筋ジストロフィーの新しい治療戦略。神経治療学，Vol.27, No.6, pp788-790, 2010
2. 鈴木友子, 武田伸一：筋ジストロフィーモデルマウス。完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック，株式会社羊土社，pp378-393, 2011

【和文総説】

1. 小林正典, 武田伸一：筋ジストロフィーのエクソン・スキップによる分子治療。医学のあゆみ (in press)
2. 鈴木友子, 武田伸一：筋ジストロフィー。総合リハビリテーション, Vol.39, No.1, pp25-29, 2011
3. 岡田尚巳：筋疾患の遺伝子治療, *BIO Clinica*, 26(4), 28-32, 2011
4. 青木吉嗣, 武田伸一：デュシェンヌ型筋ジストロフィーのエクソン・スキッピング療法。神経難病の最新治療法[第1部], 難病と在宅ケア, Vol.16, No.6, pp6-9, 2010
5. 清水裕子, 武田伸一：筋ジストロフィーの分子治療。—遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望—, 遺伝子診療学(第2版) 68巻 増刊号 8, pp650-653, 2010

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Treatment in Muscular Dystrophy: Exon Skipping. 10th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Auckland, New Zealand, 2.26, 2010
2. Takeda S: Advances in Molecular Therapy Research for Muscular Dystrophy. Lecture for Neurologists in Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.8, 2011
3. Takeda S: Antisense oligos therapy for muscular dystrophy. Lecture at the

Symposium of the Rehabilitation, Yansei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.7, 2011

4. Takeda S: Molecular and cellular control of muscle satellite cells, 2010 FASEB Summer Research Conference Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Arizona, USA, 7.19, 2010

#### 【国際学会】

1. Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori M, Ooya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY-DMD/BMD patient registry in Japan. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
2. Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
3. Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S : Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
4. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
5. Yokota T, Saito T, Urasawa N, Nagata T, Nakamura A, Kole R, Sazani P, Partridge T, Takeda S, Hoffman E : Multiple exon-skipping using cell-penetrating

morpholinos for dystrophic dogs. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010

6. Hoffman E , Yokota T, Lu QL, Partridge T, Takeda S : Systemic anti-sense in DMD: Progress, and hurdles facing clinical implementation of exon-skipping. The Ottawa conference on new directions in biology & disease of skeletal muscle, Ottawa, Canada, 5.6, 2010

#### <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エクソン・スキップ治療. 厚生労働科学研究費 成果発表シンポジウム, 埼玉, 10.23, 2010
2. 武田伸一：特別講演 筋ジストロフィーに対する治療は、どこまで近づいているのか. 世界筋学会熊本開催記念・筋ジストロフィー治療市民公開講座, 熊本, 10.11, 2010
3. 武田伸一：特別講演 筋ジストロフィーに対する新しい治療戦略. 第121回信州小児臨床談話会, 松本, 10.2, 2010
4. 武田伸一：The significance of exons skipping therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Japan-Canada Joint Mini-Symposium; "Translational Neuroscience; current topics and future perspectives", Neuro 2010 (第33回日本神経科学大会, 第53回日本神経化学会大会, 第20回日本神経回路学会大会合同大会), 神戸, 9.2, 2010
5. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する新たな治療の展開. 愛媛大学プロテオ医学研究センター学術講演会, 松山, 8.30, 2010
6. 武田伸一：独立行政法人国立精神・神経医療研究センターと筋ジストロフィーの治療法開発, 精神・神経疾患研究開発費「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班」(主任研究者:川井充)平成22年度 ワークショップ, 東京, 8.7, 2010



7. 武田伸一：筋ジストロフィー症の新しい治療戦略. 第28回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.15, 2010
8. 武田伸一：Advances of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. 第16回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.1, 2010
9. 永田哲也：シンポジウム Antisense Oligos for Muscular Dystrophy アンチセンスオリゴを用いた筋ジストロフィーの治療. 第51回日本神経学会総会, 東京, 5.21, 2010
10. 武田伸一：Duchenne型筋ジストロフィーに対する分子治療学の進歩. 第52回日本小児神経学会総会, 福岡, 5.21, 2010

【その他】

1. 武田伸一：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, 平成23年度臨床研究推進研究中間・事後評価委員会, 東京, 2.16, 2011
2. 武田伸一：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23年度臨床研究推進研究中間・事後評価委員会, 東京, 2.16, 2011
3. 武田伸一：病態解析に基づく新規筋ジストロフィー治療薬の開発, 精神・神経疾患研究開発費平成22年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.7, 2011
4. 永田哲也, 武田伸一：Duchenne型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法—臨床治験への歩み—, 精神・神経疾患研究開発費平成22年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.7, 2011
5. 武田伸一, 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 中村昭則, 永田哲也：モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.14, 2010
6. Yokota T, Nakamura A, Urasawa N, Kole R,

- Sazani P, Nagata T, Hoffman E, Takeda S, Partridge T. : Efficacy of Systemic Exon Skipping Therapy for Dystrophic Dogs Using a Cell-Penetrating, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
7. 武田伸一：DMD筋ジストロフィーの最新治療. 第7回筋ジストロフィーのピアカウンセラー養成講座—デュシェンヌ型を中心として—, 東京, 10.31, 2010
  8. 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 永田哲也, 武田伸一：モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 第5回筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010
  9. 武田伸一：近未来に迫った筋ジストロフィー治療, 第30回全国筋ジストロフィー東京浅草大会～平成22年度患者と家族の研修会～, 東京, 10.8, 2010
  10. 武田伸一：筋ジストロフィー研究の最前線. 第6回国立精神・神経医療研究センター神経内科短期臨床研修セミナー, 東京, 7.14, 2010
  11. 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. 社団法人日本筋ジストロフィー協会 第47回全国大会, 新宿, 5.16, 2010
  12. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する治療法の開発を目指して. 鍋島陽一教授退職記念シンポジウム, 京都, 5.9, 2010
  13. 武田伸一：TMC(トランスレーショナル・メディカルセンター)について. 平成22年度国立精神・神経医療研究センター病院 新採用者オリエンテーション, 東京, 4.1, 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

成立特許

日本国特許

特許番号：4588634

登録日：2010年9月17日

発明者：岡田尚巳、小澤敬也

発明の名称：「遺伝子導入効率増強剤および

商業的パッケージ」

武田伸一, 永田哲也ら: アンチセンス核酸 特  
願 2010-196032, 平成 22 年 9 月 1 日出願

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

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・神経医療研究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

マウスとマウス細胞株を対象にした検討により、エクソン 45-55 ブロック・スキップの実現可能性が示唆されたが、エクソン 45-55 の各エクソンを全て標的に設計した 11 種類の AO カクテルを投与する手法では、予期せぬ効果やコストの増大が懸念される。そこで我々は、C2C12 細胞株を対象に、5 種類のエクソンを標的に設計した AO カクテルを用いて、エクソン 45-55 ブロック・スキップを誘導できることを実証した。必要な AO の種類を半減することにより、安全性が向上するとともに、臨床応用におけるコストを大幅に削減する効果が期待される。

A. 研究目的

現在、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) を対象に、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) の全身投与による、ジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの国際共同治療が行われている。しかしながら、単一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が少なく、しかもそれぞれの遺伝子変異に応じた AO が必要にな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。ただし、多くの種類の AO が必要となるために、オフ・ターゲット効果による予期せぬ効果やコストの増大が懸念される。

そこで今回我々は、スキップさせる範囲のうち一部のエクソンを標的にして、その場合でもエクソン 45-55 ブロック・スキップを誘導できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

・AO 配列の設計：

ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 の 5' および 3' スプライスサイトを標的に 25 mer の AO を計 22 種類設計した。AO の合成には、モルフォリノ人工核酸を用いた。

・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、筋芽細胞を得た。異なる AO 配列を有するモルフォリノ人工核酸を複数混合して最終濃度が 30 $\mu$ M となるように AO カクテルを調整した。トランスフェクション試薬である Endo-Porter® を、最終濃度が 6  $\mu$ M となる様に添加した筋芽細胞の培養上清中に、AO カクテルを投与した。48 時間培養後に筋芽細胞を回収し、全 RNA を抽出後、RT-PCR を行い、エクソン・スキップの誘導パターンとエクソン 45-55 ブロック・スキップの誘導効率を評価した。

C. 研究成果

1. C2C12 細胞株を用いたブロック・スキップ

プ：

最初に、エクソン 45 および 55 の 5' と 3' スプライスサイトを標的にした AO カクテルを 4 種類 (45A + 55A、45A+55D、45D+55A、45D+55D) 調整し、それぞれを C2C12 細胞株に投与したが、45A + 55A でエクソン 54 がスキップしたバンドが得られたのみで、エクソン 45-55 スキップは誘導できなかった。続いて、同様にエクソン 45 および 55 の 5' と 3' スプライスサイトを標的にした AO カクテルを 5 種類 (45A + 45D + 55A、45A + 45D + 55D、45A + 55A + 55D、45D + 55A + 55D、45A + 45D + 55A + 55D) 調整し、それぞれを C2C12 細胞株に投与したところ、エクソン 45-55 スキップは誘導できなかったが、エクソン 47、49、54 の一部あるいは全部がスキップしたバンドが確認できた。そこで、エクソン 45-55 のなかで、イン・フレーム・エクソンであるエクソン 47、48、49 に着目し、エクソン 45、47、48、49、55 を標的にした AO カクテル (45A + 47A + 48A + 49A + 55A) を C2C12 細胞株に投与した。この結果、エクソン 45-55 ブロック・スキップの誘導を示唆するバンドを 5~10% の割合で検出できた。このバンドを直接シーケンシングしたところ、エクソン 45-55 ブロック・スキップの誘導が確認できた。

#### D. 考察

我々はこれまでにエクソン 45-55 ブロック・スキップが実現可能であることを細胞およびマウスを用いて証明した。しかしながら、エクソン 45-55 の各エクソンを標的に設計した 11 種類の AO カクテルを投与するこれまでの手法では、予期せぬ毒性とコストの増大が懸念された。

今回我々は、C2C12 細胞株を対象に、エクソン 45-55 の中で、5 種類のエクソンを標的に設計した AO カクテルを用いて、エクソン 45-55 ブロック・スキップを誘導できることを実証した。本成果は、エクソン 45-55 ブロック・スキップの安全性の向上に役立つばかり

か、必要な AO の種類を半減することによりコストを大幅に減らす効果が期待できる。

さらに使用する AO の種類を減らすため、現在、3 種類程度のエクソンを標的に設計した AO カクテルを用いて、45-55 ブロック・スキップの検証を続けている。今後、最適化した AO カクテルを、ジストロフィン遺伝子エクソン 52 欠失マウスの前脛骨筋に筋注し、十分量のジストロフィンを発現回復させたうえで、筋機能の改善および毒性について検討することを予定している。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、AO カクテルをマウスに全身投与して安全性の評価を実施することや、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 細胞株を対象に、5 種類のエクソンを標的に設計した AO カクテルを用いて、エクソン 45-55 ブロック・スキップを誘導できることを実証した。AO カクテルの種類と配列をさらに至適化することにより、安全で低コストの 45-55 ブロック・スキップの実用化が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M. : Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl] ribonucleosides using oxa-michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides. *J Org Chem.* 2011, (in press)

2. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda SI : Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet.* (in press)
3. Shin J.H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther.* (in press)
4. Nakamura A, Takeda S : Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol.* (in press)
5. Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H: SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapses. *J Neurochem.* 116: 1122-1137, 2011
6. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 13: 170-182, 2011
7. Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, Partridge T : The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 19: 9-15, 2011
8. Yokota T, Hoffman E, Takeda S : Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol.* 709: 299-312, 2011
9. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res.* 316: 3087-3092, 2010
10. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2005, 2010
11. Kanagawa M, Omori Y , Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Post-translational Maturation of Dystroglycan Is Necessary for Pikachurin Binding and Ribbon Synaptic Localization. *J Biol Chem.* 285: 31208-31216, 2010
12. Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M : Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 294: 95-101, 2010
13. Sugita H, Takeda S: Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86: 748-56, 2010
14. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One.*; 5(8). pii: e12239, 2010
15. 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. *Neuroreport.* 21: 447-451, 2010
16. Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanesaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K: Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res.* 316: 2932-2944, 2010
17. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H : Genetic background affects properties of satellite cells and mdx

phenotypes. *Am J Pathol.* 176: 2414-2424, 2010

【欧文著書】

1. Okada T, Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, Gene Therapy and Regulation (ed. by Roger Bertolotti), *World Scientific, NJ.* 2010, 5(1), pp113-123.
2. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal. *Mechanosensing Biology* (ed. Masaki Noda), Springer Japan, pp1-219, 2010

<和文>

【和文著書】

1. 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療戦略. 神経治療学, Vol.27, No.6, pp788-790, 2010
2. 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデルマウス. 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック, 株式会社羊土社, pp378-393, 2011

【和文総説】

1. 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーのエクソン・スキップによる分子治療. 医学のあゆみ (in press)
2. 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィー. 総合リハビリテーション, Vol.39, No.1, pp25-29, 2011
3. 青木吉嗣, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーのエクソン・スキッピング療法. 神経難病の最新治療法[第1部], 難病と在宅ケア, Vol.16, No.6, pp6-9, 2010
4. 清水裕子, 武田伸一: 筋ジストロフィーの分子治療. 一遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望一, 遺伝子診療学(第2版) 68巻 増刊号 8, pp650-653, 2010

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Treatment in Muscular Dystrophy: Exon Skipping. 10th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Auckland, New Zealand, 2.26, 2010
2. Takeda S: Advances in Molecular Therapy Research for Muscular Dystrophy. Lecture for Neurologists in Gangnam Severance Hospital, Yansei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.8, 2011
3. Takeda S: Antisense oligos therapy for muscular dystrophy. Lecture at the Symposium of the Rehabilitation, Yansei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.7, 2011
4. Takeda S: Molecular and cellular control of muscle satellite cells, 2010 FASEB Summer Research Conference Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Arizona, USA, 7.19, 2010

【国際学会】

1. Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori M, Ooya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY-DMD/BMD patient registry in Japan. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
2. Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
3. Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S: Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
4. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH,

- Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
5. Yokota T, Saito T, Urasawa N, Nagata T, Nakamura A, Kole R, Sazani P, Partridge T, Takeda S, Hoffman E : Multiple exon-skipping using cell-penetrating morpholinos for dystrophic dogs. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
  6. Hoffman E , Yokota T, Lu QL, Partridge T, Takeda S : Systemic anti-sense in DMD: Progress, and hurdles facing clinical implementation of exon-skipping. The Ottawa conference on new directions in biology & disease of skeletal muscle, Ottawa, Canada, 5.6, 2010
5. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療の展開. 愛媛大学プロテオ医学研究センター学術講演会, 松山, 8.30, 2010
  6. 武田伸一: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センターと筋ジストロフィーの治療法開発, 精神・神経疾患研究開発費「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班」(主任研究者: 川井充)平成 22 年度 ワークショップ, 東京, 8.7, 2010
  7. 武田伸一: 筋ジストロフィー症の新しい治療戦略. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.15, 2010
  8. 武田伸一: Advances of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. 第 16 回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.1, 2010
  9. 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する分子治療学の進歩. 第 52 回日本小児神経学会総会, 福岡, 5.21, 2010

#### <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エクソン・スキップ治療. 厚生労働科学研究費 成果発表シンポジウム, 埼玉, 10.23, 2010
  2. 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する治療は、どこまで近づいているのか. 世界筋学会熊本開催記念・筋ジストロフィー治療市民公開講座, 熊本, 10.11, 2010
  3. 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する新しい治療戦略. 第 121 回信州小児臨床談話会, 松本, 10.2, 2010
  4. 武田伸一: The significance of exons skipping therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Japan-Canada Joint Mini-Symposium; "Translational Neurosciences; current topics and future perspectives", Neuro 2010 (第 33 回日本神経科学大会, 第 53 回日本神経化学学会大会, 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会), 神戸, 9.2, 2010
- ##### 【その他】
1. 武田伸一: 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, 平成 23 年度臨床研究推進研究中間・事後評価委員会, 東京, 2.16, 2011
  2. 武田伸一: 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 23 年度臨床研究推進研究中間・事後評価委員会, 東京, 2.16, 2011
  3. 武田伸一: 病態解析に基づく新規筋ジストロフィー治療薬の開発, 精神・神経疾患研究開発費平成 22 年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.7, 2011
  4. 永田哲也, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法—臨床治験への歩み—, 精神・神経疾患研究開発費平成 22 年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.7, 2011
  5. 武田伸一, 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊

文, 中村昭則, 永田哲也:モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.14, 2010

6. Yokota T, Nakamura A, Urasawa N, Kole R, Sazani P, Nagata T, Hoffman E, Takeda S, Partridge T. : Efficacy of Systemic Exon Skipping Therapy for Dystrophic Dogs Using a Cell-Penetrating, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
7. 武田伸一: DMD 筋ジストロフィーの最新治療. 第7回筋ジストロフィーのピアカウンセラー養成講座—デュシェンヌ型を中心として—, 東京, 10.31, 2010
8. 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 永田哲也, 武田伸一:モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 第5回筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010
9. 武田伸一: 近未来に迫った筋ジストロフィー治療, 第30回全国筋ジストロフィー東京浅草大会 ~平成22年度患者と家族の研修会~, 東京, 10.8, 2010
10. 武田伸一: 筋ジストロフィー研究の最前線. 第6回国立精神・神経医療研究センター神経内科短期臨床研修セミナー, 東京, 7.14, 2010
11. 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. 社団法人日本筋ジストロフィー協会 第47回全国大会, 新宿, 5.16, 2010
12. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療法の開発を目指して. 鍋島陽一教授退職記念シンポジウム, 京都, 5.9, 2010
13. 武田伸一: TMC (トランスレーショナル・メディカルセンター) について. 平成22年度国立精神・神経医療研究センター病院 新採用者オリエンテーション, 東京, 4.1, 2010

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許

武田伸一, 永田哲也ら: アンチセンス核酸 特願 2010-196032, 平成22年9月1日出願

### 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

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

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

研究要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン・スキップ治療の効果を高めるため、アンチセンス分子を効率よく心筋や骨格筋に送達する担体の開発を、前年度に引き続き推進した。まず、煩雑で効率の低い従来技術を大きく改良し、高純度 AAV ベクターや中空粒子の作製・精製技術を新たに開発した。その技術を応用し、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を作製し、アンチセンス分子を心筋に高い効率で送達する新たな手法の開発を推進した。今年度は新たに効率的にモルフォリノを中空粒子に取り込ませる手法を開発し、培養細胞の系で蛍光標識モルフォリノの細胞内導入効率を検証した。また、核内局在化と持続的な効果を目的として、改変 U7snRNA に結合したアンチセンス配列を発現させる 9 型 AAV ベクターを構築した。さらに、9 型 AAV ベクターの生体内での動態を検証するため、*mdx* マウスや筋ジストロフィー犬に 9 型 AAV ベクターを投与し、心筋や全身骨格筋への送達効果や免疫応答を検討した。改変 U7 snRNA 発現 AAV ベクターや AAV 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、臨床応用が期待される。

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・スキップ治療の有効性が期待されているが、心筋への導入効率や作用時間が不十分であることが、より高い臨床的効果を得るための大きな課題である。本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時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、アンチセンス分子送達担体の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 改変 U7 snRNA

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、ヒト線維芽細胞 WI-38 を MyoD を用いて筋分化誘導し、同様にスキッピングの誘導を検証した。

## 2. モルフォリノ含有 AAV 中空粒子

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、これを蛍光標識した。

筋分化誘導後のヒト線維芽細胞に導入し、細胞内動態を検証した。次に、中空粒子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、9 型 AAV ベクターの生体内での動態を検証するため、*mdx* マウスに小型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを投与し、心筋や全身骨格筋への送達効果や免疫応答を検討した。また、筋ジストロフィーにおいても、胎児期に小型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを投与し、免疫寛容の誘導や呼吸循環機能を評価した。

## C. 研究成果

### 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。また、MyoD を用いて筋分化誘導したヒト線維芽細胞 WI-38 においても、スキッピングの確認できた。

### 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。蛍光標識した粒子は、細胞内に導入後、核膜周囲に集積することが観察された。また、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たところ、蛍光標識モルフォリノは界面活性剤の濃度に依存して中空粒子内に取り込まれた。さらに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、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。一般的なモルフォリノ導入試薬である Endo-Porter を使用すると高い細胞毒性が観察されたが、中空粒子を用いた場合には、明らかな細胞毒性は認められなかった。

*mdx* マウスに短縮型ジストロフィン発現 9 型 AAV ベクターを静脈内投与した場合、心筋において一年半以上発現が持続し、線維化の予防による心機能改善効果が確認された (Shin et al, *Gene Ther*, in press)。また、筋ジストロフィーを用いた胎児導入実験においても、免疫寛容の誘導による長期発現とともに、呼吸循環および運動機能の改善効果を確認した(投稿準備中)。

#### D. 考察

現在、英国において、核酸類似物質であるモルフォリノを用いたエクソン・スキップ療法の臨床試験が行われており、米国でも臨床試験を念頭に、前臨床試験による安全性評価が開始されている。ただし、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効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

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た。治療に用いる際には、まず中空粒子を用いた人工核酸によって、候補となるアンチセンス配列の有効性と安全性を検証し、評価が定着した時点でその配列を AAV ベクターに搭載するストラテジーが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Shin J.H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther*. (in press)
2. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One*.; 5(8). pii: e12239, 2010
3. 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. *Neuroreport*. 21: 447-451, 2010

【欧文著書】

1. Okada T, Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, *Gene Therapy and*

Regulation (ed. by Roger Bertolotti), *World Scientific, NJ*. 2010, 5(1), pp113-123.

<和文>

【和文総説】

1. 岡田 尚巳 : 筋疾患の遺伝子治療, *BIO Clinica*, 26(4), 28-32, 2011

II 学会発表

<国外>

【国際学会】

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K : rAAV8-mediated protein-anchoring therapy for targeting collagen Q-tailed acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
2. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Induction of oral immunotolerance to rAAV9-microdystrophin in canine X-linked muscular dystrophy. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
3. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 岡田 尚巳 : Attractive features of AAV vectors and methods for efficient production. 第16回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.2, 2010
2. 岡田 尚巳 : Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. 遺伝子治療研究奨

励賞講演, 第16回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.1, 2010

【一般学会】

1. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Okada T, Takeda S : rAAV9-microdystrophin-mediated oral immunotolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy. The 16th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tochigi, 7.3, 2010
2. Ishii A, Okada H, Kinoh H, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S: Feasibility study of adeno-associated virus (AAV) vector-mediated gene therapy for muscular dystrophy: Efficacy and safety of AAV serotype 2, 8, and in normal primate. The 16<sup>th</sup> Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tochigi. 7.1, 2010

【その他】

1. 岡田 尚巳: 遺伝子治療基盤技術の開発と神経筋疾患治療への応用. 国立精神・神経センター病院ニューロサイエンスセミナー, 国立精神・神経医療研究センター, 東京, 1.31, 2011
2. 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 子, 千代 智子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児遺伝子導入と機能解析. 第5回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

成立特許

日本国特許

特許番号: 4588634

登録日: 2010年9月17日

発明者: 岡田尚巳, 小澤敬也

発明の名称: 「遺伝子導入効率増強剤および商業的パッケージ」