

201015034A

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)

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)

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		
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	-----	15
武田 伸一		
2. エクソン51スキップ治療の有効性と 欠失変異パターンとの関連	-----	23
岡田 尚巳		
3. <i>mdx52</i> を用いたエクソン51スキップでの投与方法 および最適投与用量の検討	-----	27
永田 哲也		
4. DMDに対する遺伝子治療に関する研究	-----	31
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	-----	33
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	-----	35
中林 哲夫		
7. 臨床治験の準備に関する研究	-----	39
村田 美穂		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	43

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
	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 准教授
	中林 哲夫	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター 臨床研究支援室 室長
	村田 美穂	国立精神・神経医療研究センター 病院 神経内科診療部 部長

研究要旨

1. エクソン 51 スキップの最適投与用量を検討するため、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、モルフォリノの単回投与を行い、用量依存的にエクソン 51 スキップの誘導効率は増加すること、経尾静脈投与では全身の骨格筋に比較的均等かつ高率にエクソン 51 スキップを誘導可能なことを示した。体表面積換算では、ヒトの治療用量は 25-30 mg/kg と推定された。
2. 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、情報発信、国際共同治験の準備及び患者組み入れを行った。
3. 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、評価機器を導入した。評価者の訓練・認定も併せて推し進めた。
4. 人工核酸を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに対する治験の計画、そしてエクソン 51 スキップ治療を目標とした治験の実施を行うために、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。
5. 製薬企業と協力し 2'-O-MePS を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に関して、規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。さらに該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として 23 年 1 月より治験を開始した。

6. AVI Biopharma 社 AVI-4658 の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。さらに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 社より国内交渉権を獲得しオーファンドラッグ申請の準備を行っている。

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 Duchenne 型筋ジストロフィー(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。近年、DMD に対する新規治療法としてエクソン・スキップ治療が注目されている。これまでに我々は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド(AON)を用いて DMD に対するエクソン・スキップ治療の前臨床的研究を行い、その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(筋ジストロフィー犬)に全身投与し、エクソン 6 と 8 をスキップさせてイン・フレーム化することに成功した。その結果、全身骨格筋でジストロフィン発現の回復により筋機能が改善し副作用は認められなかった(Yokota et al, *Ann Neurol*, 2009)。しかし、筋ジストロフィー犬と同じ変異を持つ DMD 患者は稀であることから、エクソン・スキップの対象となる患者が DMD 患者の約 13%と最も多いエクソン 51 に注目した。これまで、エクソン 51 を含む遺伝子欠失を有する患者が比較的軽症であることがエクソン 51 スキップの妥当性の根拠として挙げられていた。そこで、我々が作出に参画したジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてエクソン 51 スキップの

妥当性を検証することとした。更に、内外におけるエクソン 51 スキップ臨床治験の現況を充分調査して、DMD 患者レジストリーを構築し、臨床評価体制を整備する。その上で、内外の研究/医療機関や製薬企業とも協力してエクソン 51 スキップの臨床治験を行うことを本研究の目的とした。

エクソン51スキップを臨床の場において、より効率的に行うための基礎となる研究を*mdx52*マウスを用いて行なった(永田分担研究者)。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、機能評価法についても検討した(木村分担研究者)。エクソン51スキップ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プを起こすと考えられる欠失について検討した(岡田分担研究者)。

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、欠失の調査および情報発信を行った。(武田/村田/大澤分担研究者)。実際に、国際共同治験を開始するに当たり、規制当局と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。その後、患者組み入れも行った。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* を用いたエクソン 51 スキップでの投与方法および最適投与量の検討

① 5週齢のmdx52マウスを用いた。モルフォリノの設計は、エクソン51のイントロン・エクソン境界部に設計・合成した。1回量のモルフォリノは、生理食塩水100 μ lに溶解させ、全身投与した。

② mdx52マウスを対象に、モルフォリノ40-320 mg/kgを、尾静脈経由で1回全身投与し、2週間後に全身から筋肉を採取した。エクソン51スキップの誘導効率は、RT-PCRを用いて評価した。

③ mdx52マウスを対象に、モルフォリノ320 mg/kgを、経尾静脈、経皮下、経腹腔内のいずれかの方法で全身投与し、2週間後に全身から筋肉を採取した。エクソン51スキップの誘導効率は、RT-PCR、免疫組織化学染色法を用いて評価した。

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

解析には、AVI社が公表しているDMD患者を対象にしたモルフォリノの全身投与試験(Phase Ib/II)の結果を用いた。欠失変異パターンで分類したDMD患者の内訳は、エクソン49-50が6名、エクソン48-50が4名、エクソン47-50が1名、エクソン45-50が6名であった。(1)1回投与用量と免疫染色により求めたジストロフィン陽性線維数との比較(2)アンチセンス・オリゴヌクレオチド累積投与量とジストロフィン陽性線維数との比較(3)欠失変異パターンとジストロフィン陽性線維数との関連、をそれぞれ検討した。

続いて、ジストロフィン遺伝子のエクソン45-50欠失、エクソン46-50欠失、エクソン48-50欠失をそれぞれ有する3種類のDMD患者由来の不死化線維芽細胞株をCORIELL社(NJ, USA)より購入した。それらの線維芽細胞株に対して、レトロウイルスを用いてMyoD-GFPを発現させた後、FACSにてGFP陽性細胞を回収し、分化培地で筋管細胞に分化させた。モルフォリノを培地に添加し、48時間後に全RNAを回収し、RT-PCRによる解析を行った。モルフォリノ配列は臨床治験

に用いられている30merを使用した。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 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、昨年度に引き続き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>)運営に関与し、広く国内全体の患者で、今回のエクソン51スキップの対象患者の検索を行った。

② 情報発信

患者、家族、医療者に本疾患及びその治療法等について正確な情報を発信するために、HPからの発信の他に、筋ジストロフィー公開講座を開催した。

4. 臨床評価方法の確立

国内において人工核酸を用いた臨床治験を行なうためには、国際的な評価方法を導入して、更に標準化する必要がある。そこで、人工核酸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。標準的な定量的筋力評価法であるCQMSの導入と評価者の訓練・認定を推し進めた。

5. 「遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備」

① 臨床評価方法の検討

Duchenne型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、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。米国国立衛生研究所(NIH)の臨床試験登録データベース

(<http://www.clinicaltrials.gov/>) に登録されている Duchenne 型筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験について、選択・除外基準、対象年齢層、有効性評価項目、症例数、対照群の設定、試験デザイン及び実施国について調査した。

② 臨床の実施体制の検討

Duchenne 型筋ジストロフィーは、運動機能及び心肺機能を主症状とし、その臨床症状は多義に渡る。このため、臨床試験で得られた成績の臨床的意義を評価するために必要な、主要評価項目及び副次評価項目についても検討し、その実施体制を整備する。

6. 製薬企業との交渉

臨床治験を行う上で最も重要である GMP レベルの人工核酸の供給先として 2'-O-methylphosphorothioate (2'-O-MePS) の製造企業であるオランダの Prosensa 社、ならびに提携先であるグラクソ・スミスクライン(GSK)社との交渉が必要と考えた。また、もう一つの GMP レベルの人工核酸の供給先であるモルフォリノの製造企業である AVI Biopharma 社と秘密保持契約を結び、DMD 治療薬 AVI-4658 の非臨床安全性試験を入手し昨年度に引き続き、評価した。それに基づき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を介しての交渉を推進した。

C. 研究成果

1. *mdx52* を用いたエクソン 51 スキップでの投与方法および最適投与用量の検討

① モルフォリノの経尾静脈投与による、用量漸増試験

RT-PCR 解析では、用量依存的にエクソン 51 スキップを誘導可能なことが実証された。RT-PCR 解析では、80, 160, 320 mg/kg 投与では、それぞれ、8%、25%、35%の割合でエクソン 51 スキップを誘導できた。ジストロフィン免疫組織化学染色では、RT-PCR と同様に、80 mg/kg から用量依存的にジストロフィン陽性線維の割合

が増大し、320 mg/kg では 15-20%程度であった。

② モルフォリノの全身投与方法の違いによるエクソン 51 スキップ誘導効率の比較

mdx52 マウスを対象にした経尾静脈投与では、全身の骨格筋で 15-25%程度のエクソン 51 スキップを誘導できた。一方、経皮下投与では、傍脊柱筋で約 20%、その他の骨格筋では 5-15%程度のエクソン 51 スキップを誘導できた。腹腔内投与では、横隔膜では約 25%、腹筋では約 15%、その他の骨格筋では 5%程度のエクソン 51 スキップを誘導できた。一方、心筋では、投与方法の違いによらず、明らかなエクソン 51 スキップの誘導を確認できなかった。

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

① 治験結果に基づいた、欠失変異パターンとエクソン 51 スキップ効率との関係
1 回投与用量の増加とともに、ジストロフィン陽性線維数は増加する傾向を認めた。しかしながら、1 回投与用量が同じでも症例ごとにジストロフィン陽性線維数には大きなばらつきがあり、また、ジストロフィン陽性線維数とウエスタンブロットで評価したジストロフィン発現レベルは必ずしも相関しなかった。

本研究の対象患者 17 名全てを対象に、総投与量とジストロフィン陽性線維数の回帰直線を作成したところ、決定係数 (R^2) は 0.44 であった。エクソン 49-50 欠失、48-50 欠失、45-50 欠失を有する DMD 患者群それぞれに対して、同様の検討を行ったところ、 R^2 は 0.76、0.82、0.85 であった。エクソン 49-50 欠失変異を有する患者ではジストロフィン陽性線維の発現数が高く、エクソン 48-50 およびエクソン 45-50 欠失では低い傾向を認めた。

② DMD 患者由来線維芽細胞株に対するエクソン 51 スキップ

筋芽細胞に分化させた DMD 由来の線維芽細胞株を対象にした RT-PCR では、エ

クソン 45-50 欠失細胞株では 30-45% のエクソン 51 スキップを誘導できた。エクソン 46-50 欠失、エクソン 48-50 欠失線維芽細胞株を対象にした RT-PCR では、エクソン 51 スキップの誘導効率は 20-30% であった。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 対象患者のリクルートと患者数の把握

REMUDY への参加患者数はこの 1 年でほぼ倍増し、2010 年 11 月現在で 612 人となっている。遺伝子異常について情報が不十分な場合は順次検索し、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）をリストアップした。

② 情報発信

モルフォリノをはじめとする今後開発が期待されている新規治療法を適切な患者に適切に届けるためには、患者、家族、医療者、さらには国民全体に、本疾患および、その治療法等について正確な情報を知っていただくことが非常に重要である。すでに、NCNP および REMUDY の HP を用いての情報発信も行っているが、可能な限り、双方向の情報確認にするために、公開講座を開催している。本年度は 2010 年 6 月 26 日に第 7 回筋ジストロフィー公開講座を行った。療養、呼吸器の使い方、今後の治療法開発等に多くの質問が寄せられ、本公開講座の重要性に再認識された。

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）を導入した。また評価者の技術の国際的標準化も必要なため、PT2 人を CINRG の総会に派遣し、訓練・認定を受けた。

5. 遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

① 臨床評価方法の検討

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、2011 年 3 月 1 日現在で 15 試験が存在した。開発対象である化合物は、エクソン・スキップを機序とする PRO044、AVI-4658、PTC124、そして GSK2402968 が登録され、エクソン・スキップ以外の機序を有する化合物としては idebenone 及び ACE-031 が登録されていた。有効性及び安全性の検討を目的とした試験が 13 試験登録され、安全性の検討を目的とした試験が 2 試験登録されていた。2 重盲検法で計画された全ての 6 試験が、プラセボ対照試験であった。対象の年齢層は、小児対象の試験が 3 試験、小児及び成人（非高齢者）対象の試験が 1 試験、そして小児及び成人（非高齢者及び高齢者）を対象とした試験が 11 試験登録されていた。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。

② 臨床の実施体制の検討

有効性及び安全性の検討を目的とした試験 13 試験の主要評価項目及び副次評価項目の詳細は確認できなかったが、運動機能（6 分間歩行検査）、心機能検査そして呼吸機能検査が主要評価項目として設定されていた。

6. 製薬企業との交渉

臨床治験を推進する為に、昨年度まで前臨床試験を推進したばかりでなく、DMD 患者レジストリーを立ち上げ、国際的に標準的な DMD 患者臨床評価系の導入を開始し、DMD 患者細胞を用いた *in vitro* エクソン・スキップ法を確立した。その結果、モルフォリノと同様にエクソン 51 スキップを誘導する GMP レベルの 2'-O-MePS 製剤の開発を進めている

Prosensa/GSK 社から、国際共同二重盲検プラセボ対照試験(phase IIb/III)の申し入れがあった。同社と秘密保持契約を結ぶとともに、非臨床安全性試験を評価し、日本での臨床治験が可能かどうか検討した。その結果、2'-O-MePS を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に参加を決意した。主任研究者は医学専門家として規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行うなど主体的な役割を担った(指定番号:(22薬)第237号 医薬品の名称:GSK2402968)。次に、Placebo を control とした二重盲検試験について、企業治験として PMDA の承認と医療機関における治験審査委員会(NCNP 治-144)の承認を受けた。国際共同治験の一環として該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として23年1月より治験を開始した。筋ジストロフィーに対する治験は20年ぶりであり、精神・神経・筋疾患の分野では、同時進行型の国際共同治験に参画することは初めてである。

これと並行して昨年度に引き続き、AVI-4658 の非臨床安全性試験を評価し、臨床治験のための充足性や安全性および有効性を検討した。さらに2010年8月には製薬系 venture 国内企業であるノーベルファーマ社と共にシアトルの AVI Biopharma 社を訪問、日本での臨床治験実施体制を説明するとともに、AVI 社の全身投与による治験の結果について意見の交換を行った。その結果、AVI 社より日本での治験に対してノーベルファーマ社が独占交渉権を持つことができた。現在、オーファンドラッグ申請の準備を進めている。ただ、AVI 社およびノーベルファーマ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。そのような状況下でも我々は、モルフォリノを用いて本研究を継続して推進する必要性があると考えている。それは、2'-O-MePS が6mg/kgの皮下投与でも蛋白尿等の副作用を認めたのに対し、モルフォリノは安全性の観点で利点があり、高

用量の投与が可能であることが挙げられる。今後、国際コンソーシアムに参加して、エクソン・スキップに関わる世界の有力な研究者と共同して AVI Biopharma 社と交渉を進める治験への道筋も検討していく必要があると考えている。

D. 考察

1. *mdx52* を用いたエクソン 51 スキップでの投与方法および最適投与用量の検討
現在、DMD 患者を対象に、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの全身投与によるエクソン 51 スキップの治験が進行中であるが、最適な治療用量と投与方法については未だ検討段階にある。今回の経尾静脈投与による用量漸増試験では、エクソン 51 スキップの誘導効率は、mRNA およびジストロフィン・タンパク質ともに用量依存的に増加することを示した。この結果を受けて、*mdx52* マウスを対象に 320 mg/kg/wk の用量で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの反復投与を行い、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、マウスの筋機能が改善することを示した。これらのことから、DMD 患者の筋機能改善に必要な治療用量は、体表面積換算では 25-30 mg/kg と推定された。さらに現在進行中のエクソン 51 スキップの治験では、経静脈あるいは経皮下の2種類の投与経路が用いられている。今回我々は、経尾静脈投与では、経皮下投与の場合と比べて、全身の骨格筋に比較的均等かつ高率にエクソン 51 スキップを誘導可能なことを示した。腹腔内投与については、骨格筋ごとのエクソン 51 スキップ誘導効率の差が大きく、全体としてエクソン 51 スキップ誘導効率は、経静脈あるいは経皮下投与に比べて劣る傾向を認めた。これらの結果から、全身投与経路としては、経静脈投与が最も優れるが、DMD の治療の際にはアンチセンス・オリゴヌクレオチドを反復投与する必要があることから、投与がより簡便な経皮下投与は、状況により有用な投与方法になり得ると考えられた。DMD の主な

死因は心不全であることから、心筋に対するエクソン 51 スキップの誘導は、今後の大きな課題である。

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

AVI 社の臨床治験の解析の結果、1 回投与用量の増加とともに、ジストロフィン陽性線維数は増加する傾向を認めた。また、総投与量とジストロフィン陽性線維数の間には正の相関傾向を認め、特にエクソン 49-50 欠失変異を有する DMD 患者では正相関を認めた。以上の結果は、用量依存的にジストロフィン陽性線維数の出現率が高くなる可能性を強く示唆している。一方で、ジストロフィン遺伝子の欠失変異パターンとジストロフィン陽性線維数との関係を解析したところ、エクソンの欠失範囲が狭い変異を有する DMD 患者ほど、ジストロフィン陽性線維の数が多い傾向があることがわかった。また、異なる欠失変異を有する DMD 患者由来の線維芽細胞株を対象にしたエクソン 51 スキップの *in vitro* 検定でも、治験結果と同様に、欠失変異が異なれば、エクソン 51 スキップの誘導効率が異なっていた。この結果は、理論上はエクソン 51 スキップの対象となる DMD 患者であっても、変異パターンにより、治療効果が異なる可能性を示唆している。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 対象患者のリクルートと患者数の把握

REMUDY の協力を得て、比較的順調に進行している。このなかで、やや年長の患者で数年以上前に他施設で DMD と説明されたが筋生検の詳細不明かつ MLPA 法では異常なしで、本人は患者登録への参加を希望しているが不能という患者が 10 例程度存在することが明らかになった。稀少疾患であること、ご本人の研究への参加意志があることから、本人の大きな経済負担な

く確定診断をつける道筋を確保することが必要と考えた。

② 情報発信

今回は特に双方向性に留意して、質問コーナーを開設したが、非常に好評であった。毎回公開講座は反響が大きく、今後も継続するとともに、記録集を出版していく必要もあると考えている。より良い状態で新たな治療法に参加するためには、現在の状況をよりよく維持する必要がある。今回の公開講座でも一部示したが、当院での筋ジストロフィー患者に対する包括的ケアについて、国内外に一層広めていく必要がある。

4. 臨床評価方法の確立

評価方法については、CINRG のシステムの導入が完了し、さらに評価者の技術訓練および CINRG 本部からの認定も受けた。今後、CINRG 本部と連携して、実際に運用を開始する。その上で、基礎データの蓄積していく。

5. 遺伝子治療レジストリーの構築・治療に関する準備

本研究では、筋ジストロフィーを対象とした臨床試験（医師主導治験も含む）を実施するための体制を整備するために、当該領域の医薬品開発の動向を調査した。特に、実施体制の整備には、臨床評価方法が大きく関連する、昨年度に引き続きその動向を調査した。調査内容と現在の臨床試験実施体制の整備状況について考察する。

① 臨床評価方法の検討

今回の調査により、DMD の臨床試験の問題点については以下であると考える。

- ・ 希少疾患であり、これまでも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、安全性についても探索的に検討が行われている段階である

以上の問題点はあるが、一方、近年は、DMDを対象とした医薬品開発では、複数のエクソン・スキップを機序とする化合物（PRO044、AVI-4658、PTC124、そしてGSK2402968）が開発されている。その有効性の検討も、昨年度の調査で確認された動向と異なり、プラセボ対照試験として実施されているものが多く存在するようになっている。またこの場合、一定の被験者数（計画症例数）を担保する必要がある、全世界的な国際共同治験として実施される傾向がある。DMDは希少疾患であるが、開発ストラテジーの動向は年々大きく変化しており、常時これらの動向を把握する必要がある。

② 治験実施のための体制整備

近年は、DMDを対象とした医薬品開発では、複数のエクソン・スキップを機序とする化合物（PRO044、AVI-4658、PTC124、そしてGSK2402968）が開発されているが、国内外で既承認のモルフォリノが存在しないため、安全性についても探索的に検討が行われている段階であることは前項でも説明した。関連して、有効性及び安全性の観点から考察する。安全性に関しては、関連情報を絶えず収集し、これに対応できる実施体制を整備していく必要があることは言うまでもない。有効性に関しては、臨床試験の目的に応じて主要評価項目が異なるのは当然であるが、DMDの診療においては、運動能力、筋力そして心肺機能等が治療の標的症状となることから、得られた成績の臨床的意義を検討するにもこれらを含み多義に評価していく必要がある。これらの包括的評価方法についても開発が進められており、当センターにおいてもこれらの評価法を実施することを可能とする体制を準備している。今回、説明した企業主導の臨床試験以外にも、筋ジストロフィーを対象とした医師主導治験の準備も行い、既に治験届出を提出しており、有効性に関す

る包括的評価方法の実施体制の整備も最終段階に入っている。

③ その他の検討事項

開発を検討中であるエクソン 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。本化合物については、ICH（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use）M3 ガイドラインに対する充足性の評価を、平成 21 年度に引き続き実施した。詳細の説明は守秘に関わるため省略する。

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。

6. 臨床治験への展開

エクソン 51 スキップの臨床治験について準備を進めた結果として、2'-O-MePSを用いた国際共同治験については開始する目処が立った。一方、モルフォリノを用いた治験についても国内交渉権を獲得し準備を進めているが、我々がモデルマウスを用いて明らかにしてきた至適投与量と英国を中心に進められてきた第 2 相の臨床試験で用いられてきた最大投与量（20mg/kg）の間に大きな差があることが明らかになった。後者では少なくとも 12 週間までの連続投与では臨床的な有効性が確認されなかったために、更に高用量の治験が計画され、我が国でも、それに準じた治験の実施を検討している。

E. 結論

1. エクソン 51 スキップを全身の骨格筋で誘導するための最適な投与用量は 320 mg/kg であること、最適な投与経路は経尾静脈投与であることを明らかにした。

2. ジストロフィン遺伝子の欠失パターンが異なれば、エクソン 51 スキップによる治療効果が異なる可能性が示唆された。引き続き、DMD 患者を対象にした治験結果の詳細な解析を行い、併せて、患者由来細胞を用いた *in vitro* の実験を積み重ねることにより、エクソン 51 スキップ治療の最適化を図れる可能性がある。

3. 臨床治験開始に向けての基盤整備を行ってきた。今回の国際共同治験の進行を見ながらこれまでの基盤整備の検証を行う必要がある。

4. 承認申請を目的とした DMD 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。

5. 製薬企業と協力し 2'-O-methylated phosphorothioate (2'-O-MePS)を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に関して、規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。さらに該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として23年1月より治験を開始した。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 社より国内交渉権を獲得しオーファンドラッグ申請の準備を行っている。

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, Kanasaki 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
 18. Ishigaki K, Mitsuhashi S, Kuwatsuru R, Murakami T, Shishikura K, Suzuki H, Hirayama Y, Nonaka I, Osawa M : High-density areas on muscle CT in childhood-onset Pompe disease are caused by excess calcium accumulation. *Acta Neuropathol* 120:537-543, 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, Yonsei 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 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

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

1. エクソン 51 スキップの第 2 相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行われた全身投与の詳細を入手し分析した。
2. 製薬企業と協力し 2'-O-MePS を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に関して、規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。さらに該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として 23 年 1 月より治験を開始した。
3. AVI Biopharma 社 AVI-4658 の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。さらに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 社より国内交渉権を獲得しオーファン準備の準備を行っている。
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、評価機器を導入した。評価者の訓練・認定も併せて推し進めた。

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 Duchenne 型筋ジストロフィー(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。近年、DMD に対する新規治療法としてエクソン・スキップ治療が注目されている。これまでに我々

は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド(AON)を用いて DMD に対するエクソン・スキップ治療の前臨床的研究を行い、その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 をスキップさせてイン・フレーム化することに成功した。その結果、全身骨格筋でジストロフィン発現の回復により筋機能が改善し副作用は認められなかった(Yokota et al, *Ann Neurol*, 2009)。しかし、筋ジス犬と同じ変異を持つ DMD 患者は稀であることから、エクソン・スキップの対象となる患者が DMD

患者の約 13%と最も多いエクソン 51 に注目した。これまで、エクソン 51 を含む遺伝子欠失を有する患者が比較的軽症であることがエクソン 51 スキップの妥当性の根拠として挙げられていた。そこで、我々が作出に参画したジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてエクソン 51 スキップの妥当性を検証することとした。更に、内外におけるエクソン 51 スキップ臨床治験の現況を充分調査して、DMD 患者レジストリーを構築し、臨床評価体制を整備する。その上で、内外の研究/医療機関や製薬企業とも協力してエクソン 51 スキップの臨床治験を行うことを本研究の目的とした。

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

10/11 年に出版された論文の検索及び、研究会への参加により、諸外国での研究の進展状況を知る。

2. Prosenza/GSK との交渉

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、国内外の企業との連携を念頭に置く必要がある。その為、臨床治験を行う上で最も重要である GMP レベルの人工核酸の供給先として 2'-O-methylphosphorothioate (2'-O-MePS) の製造企業であるオランダの Prosenza 社、ならびに提携先であるグラクソ・スミスクライン(GSK)社とも交渉が必要と考えた。

3. AVI Biopharma 社との交渉

昨年度、もう一つの GMP レベルの人工核酸

の供給先であるモルフォリノの製造企業である 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た。それに基づき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を介しての交渉が必要と考えた。

4. 臨床評価系の導入

国内において人工核酸を用いた臨床治験を行なうためには、国際的な評価方法を導入して、更に標準化する必要がある。そこで、人工核酸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。標準的な定量的筋力評価法である CQMS の導入と評価者の訓練・認定を推し進めた。

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 社と提携先の世界的製薬企業 GSK とで 2'-O-MePS antisense oligonucleotides (AO) を用いて全身投与による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施行した。12 名の DMD 患者を対象に、PRO-051 を 0.5~6 mg/kg の用量で、1 週間ごとに計 5 回経皮下全身投与後、容量依存的に骨格筋におけるジストロフィンの発現回復を確認した。その後、全症例で 6 mg/kg での 24 週間の延長試験を行い、10 名で 6 分間歩行の改善を確認した (NEJM, 2011)。一部の患者で蛋白尿が認められた。Prosenza/GSK は、6 分間歩行での改善を受けて、より大規模な無作為化

二重盲検プラセボ対照試験(phase IIb/III)を計画した。18カ国で国際共同治験としてDMD患者180人を対象にPRO-051を6 mg/kgの用量で、1週間ごとに計48回経皮下全身投与するようデザインされている。

(2) 英国における clinical trial

英国では、モルフォリノであるAVI-4658を用いたエクソン51スキップを用いた全身投与による第2相の臨床治験が施行された。2010年10月に熊本で行われたThe 15th World Muscle Society Congressでその結果が発表された。19名のDMD患者を対象に、AVI-4658を0.5~20 mg/kgの用量で、1週間ごとに計12回経静脈全身投与での試験を行ったAVI-4658でも容量依存的に骨格筋でのジストロフィンの発現回復を認めたが、6分間歩行の改善は認めなかった。明らかな毒性は認めなかった。一方で6分間歩行の改善を認めなかったことから、AVI社は、動物モデルを用いた毒性試験よりモルフォリノのより高容量投与での安全性を確認した。今後、50~100 mg/kgのレンジで用量漸増試験を行う計画がある。

2. Prosenza/GSK との交渉

臨床治験を推進する為に、昨年度まで前臨床試験を推進したばかりでなく、DMD患者レジストリーを立ち上げ、国際的に標準的なDMD患者臨床評価系の導入を開始し、DMD患者細胞を用いた*in vitro* エクソン・スキップ法を確立した。その結果、モルフォリノと同様にエクソン51スキップを誘導するGMPレベルの2'-O-MePS製剤の開発を進めているProsenza/GSK社から、国際共同二重盲検プラセボ対照試験(phase IIb/III)の申し入れがあった。同社と秘密保持契約を結ぶとともに、非臨床安全性試験を評価し、日本での臨床治験が可能かどうか検討した。その結果、2'-O-MePSを用いたエクソン51スキップの国際共同治験に参加を決

意した。主任研究者は医学専門家として規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行うなど主体的な役割を担った(指定番号:(22薬)第237号医薬品の名称:GSK2402968)。次に、Placeboをcontrolとした二重盲検試験について、企業治験としてPMDAの承認と医療機関における治験審査委員会(NCNP治-144)の承認を受けた。国際共同治験の一環として該当するDMD患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として23年1月より治験を開始した。筋ジストロフィーに対する治験は20年ぶりであり、精神・神経・筋疾患の分野では、同時進行型の国際共同治験に参画することは初めてである。

3. AVI Biopharma 社との交渉

昨年度に引き続き、AVI-4658の非臨床安全性試験を評価し、臨床治験のための充足性や安全性および有効性を検討した。評価対象資料はAVI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および2010年中旬に終了した第2相臨床治験に関する秘密保持契約の許、評価対象とした。2010年8月には製薬系venture国内企業であるノーベルファーマ社と共にシアトルのAVI Biopharma社を訪問、日本での臨床治験実施体制を説明するとともに、AVI社の全身投与による治験の結果について意見の交換を行った。その結果、AVI社より日本での治験に対してノーベルファーマ社が独占交渉権を持つことができた。現在、オーファンドラッグ申請の準備を進めている。ただ、AVI社およびノーベルファーマ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。

そのような状況下でも我々は、モルフォリノを用いて本研究を継続して推進する必要性があると考えている。それは、2'-O-MePS

が6mg/kgの皮下投与でも蛋白尿等の副作用を認めたのに対し、モルフォリノは安全性の観点で利点があり、高用量の投与が可能であることが挙げられる。今後、国際コンソーシアムに参加して、エクソン・スキップに関わる世界の有力な研究者と共同して AVI Biopharma 社と交渉を進める治験への道筋も検討していく必要があると考えている。

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においてその有効性を検討するに当たり、臨床評価法が確立していることが必要不可欠である。人工核酸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。2011 年 3 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 2 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導入が完了している。今後、機器の稼働に向けて準備を行なう。

D. 考察

エクソン 51 スキップの臨床治験について準備を進めた結果として、2'-O-MePS を用いた国際共同治験については開始する目処が立った。精神・神経・筋の医療分野では、新薬に関する世界同時進行型の国際共同治験が行われることは我が国で初との評価を

受けている。一方、モルフォリノを用いた治験についても国内交渉権を獲得し準備を進めているが、我々がモデルマウスを用いて明らかにしてきた至適投与量と英国を中心に進められてきた第 2 相の臨床試験で用いられてきた最大投与量(20mg/kg)の間に大きな差があることが明らかになった。後者では少なくとも 12 週間までの連続投与では臨床的な有効性が確認されなかったために、更に高用量の治験が計画され、我が国でも、それに準じた治験の実施を検討している。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、評価法の導入が終了している。また評価者の訓練・認定を推し進めた。

E. 結論

1. 欧米を中心にエクソン 51 スキップに関する第 2 相臨床治験が完了した。
2. 製薬企業と協力し 2'-O-methylated phosphorothioate (2'-O-MePS)を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に関して、規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。さらに該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として 23 年 1 月より治験を開始した。
3. 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 社より国内交渉権を獲得しオーファンドラッグ申請の準備を行っている。
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、評価機器を導入した。評価者の訓練・認定も併せて推し進めた。

F. 健康危険情報

なし