

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. —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. 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

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 スキップ治療の有効性と欠失変異パターンとの関連

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

現在、DMD を対象に、人工核酸の全身投与による、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験が行われている。我々は、エクソン 51 スキップ治療の最適な対象 Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)患者を選別するため、AVI 社が実施したモルフォリノの全身投与試験 (Phase Ib/II) の結果を解析した。さらに DMD 患者由来線維芽細胞株を用いて *in vitro* 検定を行い、併せて解析した。その結果、ジストロフィン遺伝子の欠損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 スキップ治療効果の向上が期待される。

A. 研究目的

AVI Biopharma 社が実施したモルフォリノの全身投与試験 (Phase Ib/II) および Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)患者由来線維芽細胞株を用いた *in vitro* 検定の結果を解析することにより、エクソン 51 スキップを誘導するのに最適な対象を選別する。

B. 研究方法

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 で GFP 陽性細胞を回収し、分化培地で筋管細胞に分化させた後、モルフォリノ (最終濃度 10 μ M) 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 30 mer を使用した。

C. 研究成果

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とは、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、投与総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の結果、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。

D. 考察

現在、DMD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、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験が行われているが、十分な筋機能改善は未だ得られていない。

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、投与総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、1回投与用量および累積投与用量のいずれについても、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、エクソン51スキップの対象となるDMD患者の中でも、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。

E. 結論

本研究成果により、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スキップ治療効果の向上が期待される。

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 16th 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」

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

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

研究分担者 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

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。

A. 研究目的

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 スキップに用いるアンチセンス・オリゴヌクレオチドの治療用量および全身投与方法の最適化を目的とする。

B. 研究方法

1. 5 週齢の *mdx52* マウスを用いた。既報告を参考に、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (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し、Gene Tools 社に合成を委託した。1 回量のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、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、既報告を参考に、アンチセンス・オリゴヌクレオチド 40-320 mg/kg を、尾静脈経由で 1 回全身投与し、2 週間後に腓腹筋、大腿四頭筋、前脛骨筋、上腕三頭筋、傍脊柱筋、腹筋、横隔膜、心筋を採取した。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、アンチセンス・

オリゴヌクレオチド 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 週間後に腓腹筋、大腿四頭筋、前脛骨筋、上腕三頭筋、傍脊柱筋、腹筋、横隔膜、心筋を採取した。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。

C. 研究成果

1. モルフォリノの経尾静脈投与による、用量漸増試験 (エクソン 51 スキップ誘導効率の比較)

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。特に、腓腹筋サンプルを用いた RT-PCR 解析では、40 mg/kg では 2-3%程度のエクソン 51 スキップを誘導できたのみであったが、80, 160, 320 mg/kg 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。

D. 考察

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。

アンチセンス・オリゴヌクレオチド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。

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【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. 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.* 2010;18:1995-2005.

【欧文図書】

なし

2. 学会発表

【国際学会】

1. 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
2. Tomimitsu H, Arai A, Murayama K, Shimizu J, Suzuki N, Nagata T, Aoki M, Mizusawa H, Tanaka K, Nishino I.: DMRV and GNE mutations: genotype-phenotype correlation in 100 Japanese patients. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.13, 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

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

3. 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

H. 知的財産権の出願・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

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 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

【一般学会】

【その他】

1. 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, 平成 22 年度精神・神経疾患研究開発費 筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.7, 2011
2. 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・

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施行された。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：ジストロフィノパチーの遺伝子治療開始にあたり、エクソンスキッピング療法の対象となる患者数と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ジストロフィノパチー患者（DMD、または Becker 型筋ジストロフィー(BMD)）43 人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：年齢は 5 歳～33 歳(平均：16.8 歳)までの 43 人（DMD：34 人、BMD：9 人）であった。MLPA 法は全例に施行し、5 人が欠失・重複とも認めなかった。5 人中 4 人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、1 人には 1 塩基の欠失を認めた。他 38 人は MLPA 法で確定診断された。その内訳は表 1 に示す。確定診断された 38 人のうち、治験参加可能な遺伝子異常をもつ患者は 7 人いたが、いずれも歩行機能を喪失していたため、現行の治験には適応外であった。現在、歩行可能な患者は 43 人中 18 人(5 歳～13 歳)でおり、心筋障害、呼吸障害は認めなかった。

考察：平成 22 年に施行開始された治験には、

該当エクソンの欠失をもつ患者は存在したものの、歩行機能を喪失後であり、治験の適応外であった。元々希少疾患であることに加え、現行の治験の適応基準は、歩行距離、起立時間の制限も厳しく、運動機能の保たれている低年齢に絞られているため、適応患者は予想よりもはるかに少ない。現在、臨床の場でできることは、対象となる治療開始を目標にステロイド療法や理学療法を適切に行い、できるだけ長期に歩行機能を維持していくことである。

結論：エクソンスキッピング療法のさらなる開発をまち、日々ステロイド療法と理学療法を行い全身状態を維持している。今後早期の治療開発が切望される。

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	人数		重複	人数		その他	人数	
	DMD	BMD		DMD	BMD		DMD	BMD
1-63	1		2	3		点変異	3	1
1-17	1		2-7	1	1	1塩基欠失	1	
3-7		1	3-6		1			
8-18	1		35-51		1			
8-9	1							
19-50	2							
19-52	1							
34-44		1						
44	3							
45	3							
45-50	2							
45-48		1						
45-52	1							
45-49		2						
46-47	1							
45-78	1							
46-50	2							
48-52	1							
49-52	1							
50	1							
51	2							
51-54	1							
合計	26	5	合計	4	3	合計	4	1

()内の人数は BMD 患者数。

表2：エクソン 51 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	患者数	歩行可能	歩行不能
45	3	0	3
50	1	0	1
51	2	0	2
52	0	0	0
45-50	2	0	2
49-50	0	0	0
合計	7	0	7

厚生労働省科学研究費補助金
(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

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

分担研究者 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の臨床応用が予定されている。平成21年度は臨床応用前に患者細胞を用いて本当にエクソン・スキップが起こることを証明した。22年度は、エクソン・スキップされた細胞の機能を評価することを試みた。また、先行してアンチセンス 2'-O-methyl RNA を使用した国際協同治療に参加中である。

A. 研究目的

エクソン・スキップされた患者細胞が、正常な機能を持つか評価することにより、治療効果の予測を可能とする。

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 (ベッカ一型)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10 μ MのPMOをEndo-Porterにてトランスフェクションした。形態的に筋管細胞になっていることを確認後、7日目にその細胞に対し、塩化カリウム(KCl)を最終濃度30mMとなるように滴下し、脱分極を誘導した。

C. 研究結果

①正常コントロールの線維芽細胞(Cont cell)、②DMD患者由来(dy遺伝子のエクソン50に欠損)の線維芽細胞(DMD cell)、③②の細胞にPMO(B30)をトランスフェクションした細胞(Treated DMD cell)にKCl添加後の収縮率を比較した。収縮率は、KCl添加前後の細胞直径の差をもとに算出し、比較した。

添加後5秒でTreated DMD cell、DMD cell、cont cellの収縮率はそれぞれ40、35、27%であった。また30秒後では、それぞれ25、22、19%であった。

D. 考察

Lees らはジストロフィンの発現量が多いほど、脱分極による細胞の収縮率が良いこと報告している(Lees D, et al. Experiment cell reseach 218, 401-404).

我々の結果でTreated DMD cellの収縮率が一番高く、次いでDMD cell、Cont cellの順であった。この結果は細胞の分化度が細胞によって違い、また、ジストロフィンの発現量が少ないことによる

ため、予想した結果とはちがうことになったと考えられる。個体数を増やして検討する必要がある。

E. 結論

治療の有効性の細胞レベルでの検討を試みたが、現在のところ、細胞レベルでの評価ができるほどの結果は出ていない。

参考文献

A. G. 研究発表

木村重美 筋ジストロフィー、筋強直ジストロフィー、小児科診療ガイド 中山書店 (in press)

1. 論文発表

1. Shiho Namano, Shiro Ozasa, Kowashi Yoshioka, Isao Fujii, Kouichi Mitsui, Keiko Nomura, Hirofumi Kosuge, Fumio Endo, Makoto Matsukura, Shigemi Kimura. Sigemi. Checking exon-skipping events in candidates for clinical trials of morpholino. *Pediatr Inter* (in press)

2. Mamiko Yukihara, Kaori Ito, Osamu Tanoue, Koichi Goto, Taku Matsushita, Yoko Matsumoto, Masako Masuda, Shigemi Kimura,* Ryuichi Ueoka**, Effective Drug Delivery System for Duchenne Muscular Dystrophy Using Hybrid Liposomes Including Gentamicin along with Reduced Toxicity. *Biol. Pharm. Bull* (in press)

2. 学会発表

1) Novel Mutation in Splicing Donor of Dystrophin Gene First Exon in a Patient With Dilated Cardiomyopathy but No Clinical Signs of Skeletal Myopathy 第15回世界筋学会(熊本) 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3 第52回
日本小児神経学会(熊本) 2009年5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))
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

分担研究者 独立行政法人国立精神・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
中林 哲夫

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。

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、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、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 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 (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。

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。

C. 研究結果

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(表 1)。

表1 臨床試験登録データベース (NIH) に登録された企業主導の臨床試験 (2011年3月1日現在)

開発相	試験数	計画症例数		主目的		試験デザイン		対照群の設定	
		最小	最大	有効性/安全性	安全性	非盲検	二重盲検	非対照	プラセボ対照
Phase I/II	2	12	24	2	0	2	0	2	0
Phase II	8	21	88	7	1	5	3	5	3
Phase II/III	2	165	174	2	0	1	1	1	1
Phase III	3	122	180	2	1	1	2	1	2

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 (表 1) 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。

D. 考察

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²⁾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、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、これまでに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、Duchenne 型筋ジストロフィー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²⁾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り、全世界的な国際共同治験とし

て実施される傾向がある。Duchenne 型筋ジストロフィー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、Duchenne 型筋ジストロフィー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、Duchenne 型筋ジストロフィーの診療においては、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³⁾、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¹⁾に対する充足性の評価を、平成 21 年度に既に実施²⁾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。

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

1. 中林哲夫: 抗うつ薬の課題と未来. 医学のあゆみ. 236(10): 916-922, 2011

2. 中林哲夫: 向精神薬の臨床試験. in press
3. 中林哲夫: プラセボ効果. in press
4. 中林哲夫: 向精神薬の治験の進め方 -抗うつ薬の臨床試験を中心に-.樋口輝彦・不安・抑うつ臨床研究会編. 向精神薬開発の現状と課題. 東京. 41-52, 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ドダンス」について. 薬食審査発021

9第4号

- 2) 中林哲夫: 平成22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
- 3) The Cooperative International Neuromuscular Research Group
homepage: online available at <http://www.cinrgresearch.org/>

「 臨床治験の準備に関する研究 」

研究分担者 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長

研究要旨 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。新規治療法の臨床応用を見据え、今後より一層、患者、家族、医療関係者、国民全体により正確な情報発信が重要である。

A. 研究目的

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臨床的な基盤を整備する。

（倫理面への配慮）

患者データベースについてはすでに倫理委員会の承認を得ている。治験参加についてはIRBの承認を得て進めた。

B. 研究方法

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スキッピング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。

3) 国際共同治験への参加

モルフォリノの臨床治験のための基盤整備を進めていたが、GlaxoSmithKline社により、エクソン51スキッピングを誘発させるアンチセンスオリゴヌクレオチドであるGSK9681による国際共同治験が開始された。我々は我が国の本治験の中核施設として、わが国での進行方法等について詳細な検討を行った。

C. 研究結果

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を用いて野情報発信も行っているが、出るだけ、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今回は、筋ジストロフィーの包括的ケアと筋疾患センターの概要（NCNP小児神経科小牧宏文医長、REMUDYの現状について