

20114011A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成24 (2012) 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	----- 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	----- 13
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	----- 23
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	----- 29
永田 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

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、最小限の種類のアнтиセンス分子で、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。今年度は、C2C12 は正常のジストロフィン遺伝子を有するため、エクソン 52 欠失変異を有する *mdx52* マウス由来の筋芽細胞株を樹立した。SV40 温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子のヘテロ変異 (Tegtmeyer, 1975) と *H-2K^b* プロモーターを有する *H-2K^b-tsA58* マウス (Jat et al., 1991) と *mdx52* マウスを交配させ、作出した *H-2K^b-tsA58/mdx52* マウスの長趾伸筋から筋衛星細胞を単離し、*H-2K^b-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を選別した。これを用いて、エクソン 45-55 におけるスキップを効果的に誘導可能なアンチセンス配列を検証した。

さらに、対象患者の多い 44、45、50、51、55 について、従来の報告よりも効果的な塩基配列のスクリーニングを行った。エクソン 44、45、50、51、55 に対して、数十種類のアンチセンスをデザインし、ヒト横紋筋肉腫由来細胞を用いて、スキッピング活性を検証した。

2. 心筋 DDS 担体の開発

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。U7snRNA 発現のために必須の最小構成は 350bp と短く、ひとつの AAV ベクターゲノム上にターゲット配列の異なる複数の U7snRNA 発現カセットを搭載することも可能である (Goyenvalle et. al., 2012)。一方で、RNU7 遺伝子上流にエンハンサー配列を配置する事で snRNA の発現量が変化する (Brun et. al., 2003)。さらに、AAV ベクターゲノム中の 2 つある ITR のうち、一方の TRS エlement を欠損した scAAV をベクタープラスミドに用いることで、AAV ベクターによる遺伝子導入・発現効率を向上することができる。こ

れらを元に、今回はスキップの効率を高めることを目的とした U7snRNA 発現 AAV ベクタープラスミドを改変した。

また、改変 U7snRNA のスキップ効率を簡便に評価するために、エクソン 45-50 欠失があるヒト DMD 患者由来の 5017 細胞の不死化を行った。

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、筋ジストロフィーにおいて、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の評価した。

C. 研究成果

1. エクソン 45-55 スキップ

H-2K mdx52 筋管細胞を対象にしたシングルエクソン・スキップを検証したところ、ピボ・モルフォリノ核酸 45A、46A、47A、48A、49A、50A、51A、54A、55A (いずれも 1 μ M) はそれぞれ、30-50% の効率で標的としたシングルエクソンのスキップを誘導できた。一方、53A (1 μ M) のスキップ効率は 20% 程度であった。一方、*H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にした、エクソン 45-55 ブロック・スキップでは、計 0.1-3.0 μ M のピボ・モルフォリノ核酸カクテル投与により、用量依存的にエクソン 45-55 ブロック・スキップを誘導できることを RT-PCR および直接シーケンスにより確認した。特に、同カクテルを 3 μ M で投与した場合には、エクソン 45-55 ブロック・スキップを 100% の効率で誘導できた。同カクテル投与後、明らかな細胞毒性は認めなかった。

さらに、対象患者の多い 44、45、50、51、55 についてまず効果的な塩基配列のスクリーニングを行った結果、エクソン 44、45、50、55 に対しては従来の報告の配列よりも効果的な塩基配列を決定した (特許出願中)。エクソン 51 に関しては既報告の配列が最も効率良くスキッピングを起こした。

2. 心筋 DDS 担体の開発

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。界面活性剤の種類によっては細胞毒性を示すものがあるが、様々な界面活性剤のなかでも Pluronic F68 を用いると細胞毒性を示さず、また中空粒子中にモルフォリノを取り込むことが可能であることが明らかになった。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、中空粒子と PluronicF68 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。

モルフォリノの送達に AAV 中空粒子が利用可能であることが明らかになったことから、他の低分子化合物について AAV 中空粒子の薬剤送達系としての有用性を検証した。抗体医薬の送達を念頭に、蛍光標識タンパク質(また siRNA)の取り込みを検討した。蛍光標識タンパク質として Alexa-488 標識 BSA または Alexa-488 標識抗ラット IgG 抗体を用いた。いずれもモルフォリノを中空粒子に取り込ませる際と同条件で中空粒子への取り込みが可能であり、さらに細胞への送達も確認された。

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。さらに、①U7snRNA 発現カセットの繰り返し、②上流の c5-12 エンハンサー、③ITR の scAAV 化、の 3 種類の工夫を加えた AAV ベクタープラスミドを構築した。スキップ効率を向上させる目的でエクソン 51 を標的とする snRNA の発現カセットを AAV ベク

タープラスミドへの搭載許容サイズの限界付近まで繰り返しで搭載させ、合計 11 個の snRNA 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。このプラスミドを用いて AAV ベクターを作製し、MyoD を用いて筋分化させたヒト線維芽細胞 WI-38 に感染させてエクソン 51 スキップを確認した。一方、繰り返し配列の上流に既知の骨格筋特異的な合成プロモーターである c5-12 のエンハンサーエレメントを配置した AAV ベクタープラスミドを新たに構築した。併行して、scAAV の基本コンストラクトを構築した。

一方で、上記ツールを用いたスキップの効率を簡便に評価する事を目的として、ヒト DMD 患者由来の 5017 細胞に SV40 LargeT 抗原発現プラスミドを導入し、不死化 DMD 細胞株(5017-T 株)を樹立した。

生体での効果や安全性を検証するため、筋ジス犬において、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)。筋ジス犬を用いた胎児期 AAV 導入実験においては、AAV ベクターを羊水内に直接投与した場合と母体に全身投与した場合の双方において胎児での AAV 感染が成立した。胎児期に AAV 感染が成立することにより、処置を行った犬は AAV に対して免疫寛容を獲得しており、治療遺伝子の長期発現とともに、呼吸循環および運動機能の改善効果を確認した。

D. 考察

遺伝子変異集積領域における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・スキップの実用化に向け、さらに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詳細に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心筋などの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応用した臨床研究を推進中である。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。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・スキップを検討中である。

E. 結論

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。本研究の結果は、変異集積領域に変異を有する様々な DMD 患者を対象にしたブロック・スキップ治療の可能性を示唆している。また、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することが必要である。さらに、長期的な有効性や安全性が確立した時点で、アンチセンス配列を AAV ベクターに搭載し長期発現療法を続けるストラテジーが有効と期待される。

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】

- Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K :Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy*. (in press)
- Ono Y, Masuda S, Nam H, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci*. 125:1309-1317, 2012
- Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*. 20:168-177, 2012
- Koo T, Okada T, Athanasopoulos T, Foster H, Takeda S, Dickson G: Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med*. 13:497-506, 2011
- Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S: Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-3664, 2011
- Wang B, Miyagoe-Suzuki Y, Yada E, Ito N, Nishiyama T, Nakamura M, Ono Y, Motohashi N, Segawa M, Masuda S, Takeda S: Reprogramming efficiency and quality of induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages. *PLoS Curr*. 2011 Oct 27;3:RRN1274
- Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogawa R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H: Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development*. 138:4609-4619, 2011

8. Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*. 478:127-131, 2011
 9. Kondo H, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Sorimachi H, Takeda S, Noda M: MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *J Cell Biochem*. 112(12):3525-30, 2011
 10. Shin JH, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama 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*. 18:910-919, 2011
 11. Masamizu Y, Okada T, Kawasaki K, Ishibashi H, Yuasa S, Takeda S, Hasegawa I, Nakahara K: Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience*. 193:249-258, 2011
 12. Hoffman EP, Bronson A, Levin AA, Takeda S, Yokota T, Baudy AR, Connor EM : Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle progress in exon skipping and stop codon read through. *Am J Pathol*. 179:12-22, 2011
 13. Takano H, Fujii Y, Yugeta N, Takeda S, Wakao Y: Assessment of Left Ventricular Regional Function in Affected and Carrier Dogs with Duchenne Muscular Dystrophy Using Speckle Tracking Echocardiography. *BMC Cardiovasc Disord*. 11:23, 2011
 14. 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*. 76: 3042-3053, 2011
 15. Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, Wilton SD, Wolff JA, Wooddell CI, Xiao X, Tremblay JP: Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther*. 19: 830-840, 2011
 16. Takahashi H, Kanasaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Takahashi H: Reactive gliosis of astrocytes and Müller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*. 47: 119-130, 2011
 17. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K : Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. *PLoS One*. 30; 6(3):e18388, 2011
 18. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S : Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet*. 20:1787-1799, 2011
- 【欧文著書】
1. Yokota T, Takeda S: Antisense oligo-mediated multiple skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy (ed. by Duan D). Muscle gene therapy, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, *Springer Science + Business Media*, USA, pp299-312, 2011
 2. Nagata T, Takeda S: The frontier of antisense oligonucleotide induced therapy (ed. by Takeda S). Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic

- marker of muscular dystrophy, *IGAKU-SHOIN Ltd.*, Japan, pp56-67, 2011
3. Okada T, Takeda S: Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Viral Gene Therapy (ed. by Ke Xu), InTech*, pp225-240, 2011

<和文>

【和文著書】

1. 青木吉嗣, 武田伸一: デュシエンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法. 神経疾患最新の治療 2012-2014, 南江堂, 東京 pp48-53, 2012

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Advances in molecular and cell therapy of Duchenne muscular dystrophy. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 3.24, 2012
2. Takeda S: Molecular mechanism of muscle hypertrophy –NO/peroxynitrite-induced activation of TRPV1-. University of Geneva, Geneva, Switzerland, 3.21, 2012
3. Takeda S: Neuromuscular disorders; Current status of treatment of muscular dystrophy in Japan. The Korean Child Neurology Society Meeting, Seoul, Korea, 10.22, 2011
4. Takeda S: TREAT-NMD Task Force Meeting. Task Force-Regional Feedback, Freiburg, Germany, 6.7, 2011
5. Takeda S: Isolation and characterization of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. 4th International congress of Myology, Lille, France, 5.11, 2011

【国際学会】

1. Takeda S: Neuromuscular disorders; Current status of treatment of muscular dystrophy in Japan. The Korean Child Neurology Society Meeting, Seoul, Korea, 10.22, 2011

2. N Ito, K. Akira, Y Suzuki, U Ruegg, S Takeda: nNOS is an essential mediator for mechanical overload-induced muscle hypertrophy. International Conference On Muscle Wasting, Ascona, Switzerland, 9.20, 2011
3. Wang B, Ito N, Ono Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: TGF- β and BMP signals limit reprogramming of aging fibroblasts from dystrophin-deficient mdx muscle. International society for stem cell research, 9th Annual meeting, Toronto, Canada, 6.17, 2011
4. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S: Immune tolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin transduction. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.21, 2011
5. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Takeda S: Mechanism of uptaking Morpholino into dystrophin-deficient muscle fibers. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
6. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
7. Ono Y, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Identification of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle, development and regeneration, EMBO conference series, Wiesbaden, Germany, 5.13, 2011
8. Aoki Y, Nagata T, Shimizu Y, Takeda S:

Challenges for antisense oligonucleotide-based therapeutics, in particular for exon 51-skipping in Duchenne muscular dystrophy. 4th International conference on modeling, simulation and applied optimization. Kuala Lumpur, Malaysia, 4.21, 2011

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 武田伸一：筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線. 革新的バイオ医薬品：研究開発と評価科学の最新動向, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3.29, 2012
2. 武田伸一：特別講演：筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療の現状と未来. 第 17 回信州遺伝子治療研究会, 長野, 1.20, 2012
3. 武田伸一：筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法の現状と未来. 第 2 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム, 東京, 1.19, 2012
4. 武田伸一：臨床研究の推進を担うトランスレーショナル・メディカルセンター (TMC). 国立精神・神経医療研究センター 山梨大学連携講演会, 山梨, 11.28, 2011
5. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する新たな治療へ. 第 60 回兵庫県神経疾患懇話会, 神戸, 10.01, 2011
6. 武田伸一：モルフォリノオリゴヌクレオチドによる 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臨床応用, 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 5.29, 2011
7. 武田伸一：骨格筋の幹細胞と再生の分子機構, 第 3 回シグナルネットワーク研究会, 東京, 5.27, 2011
8. 武田伸一：デュシェンヌ型に対するエクソンスキップ治療. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011

【一般学会】

1. 伊藤尚基, 工藤 明, 鈴木友子, 武田伸一：骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素

(nNOS)は過負荷によって活性化され, タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.16, 2011

2. 小林千浩, 谷口(池田)真理子, 金川 基, 游 智傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一, 戸田達史：SVA レトロトランスポゾン挿入による病的 exon-trapping と福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.14, 2011
3. 中村美穂, 西山尚志, 鈴木友子, 武田伸二：Duchenne 型筋ジストロフィーの症候性キャリアからの iPS 細胞の樹立. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011
4. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: AVV empty capsids mediate effective nuclear transportation of morpholino in the muscle cells. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.17, 2011
5. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin JH, Okada T, Takeda S: Effective transgene expression in non-human primate muscle with AVV type9 vectors following immune suppression. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.17, 2011
6. Okada H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Hohjoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Disruption of common marmoset dystrophin mRNA to generate non-human primate DMD model. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.16, 2011
7. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Nishiyama A, Okada T, Takeda S: Dystrophic mdx mice are severely compromised with cardiac and respiratory dysfunction by genetic ablation of anti-inflammatory cytokine IL-10. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.15, 2011
8. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K: Protein-anchoring therapy for

- delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.15, 2011
9. 今村道博, 松本大和, 稲葉由美, 万年英之, 武田伸一: Effect of a Point Mutation in the WWP1 Gene Associated with Chicken Muscular Dystrophy on Mouse Muscle Expressing Mutated WWP1 Transgene. 第63回日本細胞生物学会大会, 北海道, 6.28, 2011
 10. 宮崎大吾, 中村昭則, 福島和宏, 吉田邦広, 武田伸一, 池田修一: Matrix Metalloproteinase (MMP) -2 欠損による骨格筋再生障害とそのメカニズムの解明. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011
 11. 中村昭則, 小林正典, 池田修一, 武田伸一: 筋ジストロフィー犬横隔膜におけるジストロフィー変化の二段階制御機構. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011
 12. 永田哲也, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン53スキッピングの試み. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011
 13. 吉村俊朗, 伊藤美佳子, 片岡英樹, 福留隆泰, Eric Krejci, 岡田尚巳, 武田伸一, 本村政勝, 辻野 彰, 吉村俊祐, 耕田智子, 中田るか, 徳田昌紘, 福田 卓, 大野欽司: コリンエステラーゼ阻害剤投与マウスとCollagenQ欠損マウスにおける運動終板微細構造の比較. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011
 14. 中村治雅, 大矢 寧, 森まどか, 小牧宏文, 本吉慶史, 松村 剛, 西野一三, 村田美穂, 武田伸一, 川井 充: 筋ジストロフィー患者登録 (REMUDY) 希少疾病の治療に向けて. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011
 15. 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノ人工核酸が筋線維に取り込まれる機構の解明. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011
- 【その他】
1. 武田伸一: 産官学連携医療クラスタープラン (TMC). 精神・神経疾患研究開発費「独立行政法人国立精神・神経医療研究センターにおける経営戦略企画に関わる研究」(主任研究者 藤崎清道) 平成23年度 企画戦略室活動報告会(平成23年度 研究開発費発表会), 東京, 3.5, 2012
 2. 岡田尚巳: 筋ジストロフィーモデルマウスモセットの開発. 精神・神経疾患開発費神経・筋疾患の解明のための霊長類モデル開発に関する研究 平成23年度班会議, 東京, 12.21, 2011
 3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発. 再生医療の実現化プロジェクト平成23年度成果報告会, 文部科学省科学技術委託事業・再生医療の実現化プロジェクト(研究代表者 武田伸一), 東京, 12.9, 2010
 4. 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 伊藤尚基, 武田伸一: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定の試み. 精神・神経疾患研究開発費「精神・神経疾患のiPS細胞を用いた診断・治療法の開発に関する戦略的研究」(主任研究者 荒木敏之) 平成23年度班会議, 東京, 12.6, 2011
 5. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川 基, 游智 傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一: 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/細胞病態および治療に関する研究 - SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー -. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」(主任研究者 西野一三) 平成23年度班会議, 東京, 12.5, 2011
 6. 木村 円, 林 由起子, 中村治雅, 森 まどか, 小牧宏文, 西野一三, 川井 充, 武田伸一: Remudy 患者情報登録部門の現状と課題. 精神・神経疾患研究開発費「遺伝性神経・筋疾患における患者登録システムの構築と遺伝子診断システムの確立

- に関する研究」(主任研究者 木村 円)
平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
7. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田直子, 岡田尚巳: Duchenne 型筋ジストロフィー・モデル犬 CXMDJ における疾患重症度と修飾因子の解析. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 8. 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: ベクターを用いた筋ジストロフィー犬免疫寛容誘導療法と機能解析. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 9. 武田伸一, 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 中村美穂, 伊藤尚基: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 10. 二川 健, 河野尚平, 安倍知紀, 越智ありさ, 近藤茂忠, 平坂勝也, 真板綾子, 奥村裕司, 東 端晃, 埜中征哉, 武田伸一: 筋萎縮における機械的ストレス感知機構の解明ーミトコンドリアを介した無重カストレスの感知機構ー. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 11. 上住聡芳, 深田宗一郎, 山本直樹, 武田伸一, 土田邦博: 間葉系前駆細胞による筋再生制御機構の解析. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 12. 福田恵一, 林地のぞみ, 湯浅慎介, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 液性因子による変性骨格筋の再生療法の開発ーG-CSF によるデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する有効性の検討ー精神・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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 13. 深田宗一郎, 山口賢彦, 米田智廣, 小久保博樹, 小川 遼, 上住聡芳, 伊藤尊仁, 辻川和丈, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸二: 骨格筋幹細胞移植実現を目指した基盤的研究ーHesr1/3 を介した骨格筋幹細胞の未分化性維持機構ー. 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 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 14. 橋戸和夫, 岸 宗一郎, 小牧宏文, 青木吉嗣, 武田伸一: 血清 microRNA 測定による筋ジストロフィー新規診断法の確立ーDuchenne 型筋ジストロフィー患者血清を用いた筋特異的 microRNA の量的変化ー. 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 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 15. 谷口(池田) 真理子, 小林千浩, 金川 基, 游 智傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一, 戸田達史: SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー. 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 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 16. 武田伸一, 青木吉嗣, 永田哲也, 横田俊文, Terence Partridge: 新規アンチセンス治療法開発に向けた筋線維への核酸取り込み機構の解明. 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 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 17. 横田俊文, 青木吉嗣, 永田哲也, 中村昭

- 則, 齊藤 崇, Kanneboyina Nagaraju, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: エクソン 45-55 マルチ・スキッピングによるジストロフィン発現誘導と治療法の開発. 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 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
18. 関根光雄, 横内 瑛, 岡庭夏己, 正木慶昭, 原川太郎, 鈴木 真, 山田剛史, 山田 研, 大窪章寛, 清尾康志, 青木吉嗣, 永田哲也, 武田伸一: 遺伝子制御機能を持つ人工核酸の創出. 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 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 19. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川 基, 遊 智傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一, 戸田達史: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 20. 木村 円, 中村治雅, 林由起子, 松田 悠, 後藤加奈子, 森 まどか, 小牧宏文, 西野一三, 武田伸一, 川井 充: 筋ジストロフィー患者情報登録制度 Remudy の紹介. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 21. 青木吉嗣, 横田俊文, 永田哲也, 谷端 淳, 齊藤 崇, 中村昭則, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: モルフォリノを用いたエクソン 45-55 ブロックスキップにより Duchenne 型筋ジストロフィーマウスの筋病理と筋機能は改善する. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 22. 鈴木友子, 中村美穂, 西山尚志, 伊藤尚基, 武田伸一: 筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞の樹立と筋分化誘導実験—進捗状況と問題点—. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 23. 武田伸一: 筋ジストロフィー研究の最前線, 第 7 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, 7.13, 2011
 24. 武田伸一: 筋ジストロフィー疾患患者からの特異的 iPS 細胞の樹立とその問題点, 平成 23 年度文部科学省科学技術試験研究委託事業, 再生医療の実現化プロジェクト 第 4 回夏のワークショップ, 大阪, 7.8, 2011
 25. 永田哲也: 筋ジストロフィー治療研究の進歩. 第 8 回筋ジストロフィー市民公開講座, 東京, 7.2, 2011
 26. 武田伸一: 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. 第 47 回 日本筋ジストロフィー協会 九州ブロック福岡大会, 福岡, 6.11, 2011
 27. Wang B, Ito N, Ono Y, Kawaguchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Impact of age on the generation and re-differentiation of iPSCs derived from mdx muscle at different ages. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.10, 2011
 28. 笠原優子, 喜納裕美, 岡田浩典, 岡田尚巳, 武田伸一: IL-10 欠損 mdx マウスの作出と病態解析. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.9, 2011
 29. 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔への遺伝子導入と免疫寛容の誘導. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.9, 2011
 30. 武田伸一: 筋ジストロフィーの治療の最前線. 国際医療福祉大学大学院, 東京, 4.27, 2011
 31. 岡田尚巳: 遺伝子治療基盤技術の開発と応用. NCNP てんかんセンターリサーチカンファランス, 東京, 4.14, 2011
 32. 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 23 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, 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

成立特許

1) 米国特許

特許番号：US7988957B2

2011年8月2日成立

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
(Gene introduction efficiency enhancer)」

出願

1) 岡田尚巳, 千代智子, 武田伸一

薬剤取り込み増強剤

特願 2012-078035, 2012年3月29日

出願

2) 武田伸一, 伊藤尚基, ウルスルーグ, 鈴木友子

筋肥大を促進する物質又は因子のスクリーニング法

特願 2011-200716, 2011年9月24日

出願

3) 武田伸一, 中村昭則, 小林正典, 岡田尚巳

筋ジストロフィーの病態および治療評価のための分子マーカー

特願 2011-142312, 2011年6月27日

出願

4) 岡田尚巳, 武田伸一, 喜納裕美

薬剤送達粒子及びその製造方法

特願 2011-092252, 2011年4月18日

出願

5) 武田伸一, 永田哲也, 他2名

アンチセンス核酸

特願 2011-288040, 2011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 C2C12 筋管細胞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、C2C12 筋管細胞は正常の DMD 遺伝子を有するため、同細胞で効果を検証したアンチセンス核酸カクテルを *mdx52* マウスに直接適用できないとの問題があった。そこで今回我々は、*mdx52* マウスと同様のエクソン 52 欠失変異を有する *H-2Kb-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を新たに樹立した。さらに、同細胞株を対象に、エクソン 45-55 ブロック・スキップを効果的に誘導可能なピボ・モルフォリノ核酸カクテルを見出した。今後は、ピボ・モルフォリノ核酸カクテルを *mdx52* マウスに *in vivo* 投与し、筋機能の改善および毒性について検討する予定である。

A. 研究目的

DMD 遺伝子変異が原因のデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) を対象に、アンチセンス核酸を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験が進行中であるが、治療対象は欠失変異を有する患者の 13%にすぎない。臨床データベース解析では、DMD 遺伝子変異のホットスポット全域を狙ったエクソン 45-55 ブロック・スキップ治療により、欠失変異を有する患者の 63%以上を治療対象とし、骨格筋症状を極めて軽微にすることが期待される。我々はこれまでにマウス C2C12 筋管細胞を用いて、エクソン 45-55 スキップを誘導するのに最適な 11 個のアンチセンス配列を見出しているが、C2C12 筋管細胞は正常の DMD 遺伝子を有するため、同細胞で効果を検証したアンチセンス核酸カクテルを *mdx52* マウスに直接適用できないとの問題があった。

今回我々は、*mdx52* マウスと同様のエクソン 52 欠失変異を有する *H-2Kb-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を新たに樹立する。さらに、同細胞株を対象に、細胞膜透過性が高いピ

ボ・モルフォリノ核酸の複数組み合わせ (カクテル) 投与により、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証する。

B. 研究方法

・アンチセンス配列の設計：

マウス DMD 遺伝子の premature mRNA を標的に、エクソン 52 を除いた各エクソンの exonic splicing enhancer (ESE) に対して 25 mer のアンチセンス配列 10 種類 (45A、46A、47A、48A、49A、50A、51A、53A、54A、55A) を設計した。ピボ・モルフォリノ核酸の合成は Gene Tools 社 (Philomath, OR) に委託した。

・*H-2K^b-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株の樹立：

SV40 温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子のヘテロ変異 (Tegtmeyer, 1975) と *H-2K^b* プロモーターを有する *H-2K^b-tsA58* マウス (Jat et al., 1991) と *mdx52* マウスを交配させた。作出した *H-2K^b-tsA58/ mdx52* マウ

スの長趾伸筋から筋衛星細胞を単離し、*H-2K^b-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を選別した。

・*H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にした、シングルエクソン・スキップ：

H-2K mdx52 筋芽細胞株を2%ウマ血清分化培地で培養し、筋管細胞に分化させた。エクソン45-55領域に含まれる各シングルエクソンを標的に設計したピボ・モルフォリノ核酸を最終濃度が1 μ Mとなるように分化培地中に添加し、48時間培養した。筋管細胞を回収し、全RNAを抽出後、RT-PCRを行った。2.0%アガロースゲル電気泳動法を行い、シングルエクソン・スキップの効率をImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) により評価した。

・*H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にした、エクソン45-55ブロック・スキップ：

H-2K mdx52 筋管細胞を対象に、計10種類のピボ・モルフォリノ核酸を等量ずつ含むカクテル(45A+46A+47A+48A+49A+50A+51A+53A+53A+54A+55A)を最終濃度が0.3-3.0 μ Mとなるように分化培地中に添加し、48時間培養した。筋管細胞から全RNAを抽出しRT-PCRを行った。2.0%アガロースゲル電気泳動法によりエクソン・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。エクソン45-55がスキップしたと予想されるバンドを切り出し、直接シーケンスを行った。

C. 研究成果

1. *H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にした、シングルエクソン・スキップ：

ピボ・モルフォリノ核酸45A、46A、47A、48A、49A、50A、51A、54A、55A(いずれも1 μ M)はそれぞれ、30-50%の効率で標的としたシングルエクソンのスキップを誘導できた。一方、53A(1 μ M)のスキップ効率は20%程度であった。

2. *H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にした、エクソン45-55ブロック・スキップ：

計0.1-3.0 μ Mのピボ・モルフォリノ核酸カクテル投与により、用量依存的にエクソン45-55ブロック・スキップを誘導できることをRT-PCRおよび直接シーケンスにより確認した。特に、同カクテルを3.0 μ Mで投与時には、エクソン45-55ブロック・スキップを100%の効率で誘導できた。同カクテル投与後、明らかな細胞毒性は認めなかった。

D. 考察

今回我々は、DMDを対象にしたエクソン45-55スキップ治療を将来臨床応用することを目標に、*H-2K mdx52* 筋管細胞を対象にエクソン45-55スキップの誘導効果および予備的安全性を評価した。本研究で開発されたアンチセンス核酸カクテルを用いて複数の最大11個のエクソンを同時にスキップさせる治療技術は、DMDを対象にした遺伝子治療や幹細胞移植治療などの新規治療法開発を促進するばかりか、DMD以外の遺伝性神経・筋疾患に応用できる可能性が高い。

今後は、我々が見出したピボ・モルフォリノ核酸カクテルを*mdx52*マウスの前脛骨筋に筋注し、十分量のジストロフィンが発現回復するかどうかを検討する。さらに、同カクテルを*mdx52*マウスに反復全身投与し、筋機能の改善効果および毒性について検討する予定である。

E. 結論

新たに樹立した*H-2K mdx52*筋芽細胞株を対象に、エクソン45-55の各エクソン・スプライシング促進配列を標的に設計した10種類のピボ・モルフォリノ核酸カクテルの投与により、エクソン45-55ブロック・スキップを効果的に誘導できることを実証した。

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. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K :Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy*. (in press)
2. Ono Y, Masuda S, Nam H, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci*. 125:1309-1317, 2012
3. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*. 20:168-177, 2012
4. Koo T, Okada T, Athanasopoulos T, Foster H, Takeda S, Dickson G: Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med*. 13:497-506, 2011
5. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S: Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-3664, 2011
6. Wang B, Miyagoe-Suzuki Y, Yada E, Ito N, Nishiyama T, Nakamura M, Ono Y, Motohashi N, Segawa M, Masuda S, Takeda S: Reprogramming efficiency and quality of induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages. *PLoS Curr*. 2011 Oct 27;3:RRN1274
7. Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogawa R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H: Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development*. 138:4609-4619, 2011
8. Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*. 478:127-131, 2011
9. Kondo H, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Sorimachi H, Takeda S, Noda M: MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *J Cell Biochem*. 112(12):3525-30, 2011
10. Shin JH, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama 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*. 18:910-919, 2011
11. Masamizu Y, Okada T, Kawasaki K, Ishibashi H, Yuasa S, Takeda S, Hasegawa I, Nakahara K: Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience*. 193:249-258, 2011
12. Hoffman EP, Bronson A, Levin AA, Takeda S, Yokota T, Baudy AR, Connor EM : Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle progress in exon skipping and stop codon read through. *Am J Pathol*. 179:12-22, 2011
13. Takano H, Fujii Y, Yugeta N, Takeda S, Wakao Y: Assessment of Left Ventricular Regional Function in Affected and Carrier Dogs with Duchenne Muscular Dystrophy

Using Speckle Tracking Echocardiography. *BMC Cardiovasc Disord.* 11:23, 2011

14. 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.* 76: 3042-3053, 2011
15. Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, Wilton SD, Wolff JA, Wooddell CI, Xiao X, Tremblay JP: Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther.* 19: 830-840, 2011
16. Takahashi H, Kanasaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Takahashi H: Reactive gliosis of astrocytes and Müller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice. *Mol Cell Neurosci.* 47: 119-130, 2011
17. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K : Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. *PLoS One.* 30; 6(3):e18388, 2011
18. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S : Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet.* 20:1787-1799, 2011

【欧文著書】

1. Yokota T, Takeda S: Antisense oligo-mediated multiple skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy (ed. by Duan D). Muscle gene therapy, Methods and Protocols, Methods in Molecular

Biology, *Springer Science + Business Media*, USA, pp299-312, 2011

2. Nagata T, Takeda S: The frontier of antisense oligonucleotide induced therapy (ed. by Takeda S). Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy, *IGAKU-SHOIN Ltd.*, Japan, pp56-67, 2011
3. Okada T, Takeda S: Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Viral Gene Therapy (ed. by Ke Xu)*, *InTech*, pp225-240, 2011

<和文>

【和文著書】

1. 青木吉嗣, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法. 神経疾患最新の治療 2012-2014, 南江堂, 東京 pp48-53, 2012

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Advances in molecular and cell therapy of Duchenne muscular dystrophy. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 3.24, 2012
2. Takeda S: Molecular mechanism of muscle hypertrophy –NO/peroxynitrite-induced activation of TRPV1-.University of Geneva, Geneva, Switzerland, 3.21, 2012
3. Takeda S: Neuromuscular disorders; Current status of treatment of muscular dystrophy in Japan. The Korean Child Neurology Society Meeting, Seoul, Korea, 10.22, 2011
4. Takeda S: TREAT-NMD Task Force Meeting. Task Force-Regional Feedback, Freiburg, Germany, 6.7, 2011
5. Takeda S: Isolation and characterization of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. 4th International

congress of Myology, Lille, France, 5.11, 2011

【国際学会】

1. Takeda S: Neuromuscular disorders; Current status of treatment of muscular dystrophy in Japan. The Korean Child Neurology Society Meeting, Seoul, Korea, 10.22, 2011
2. N Ito, K. Akira, Y Suzuki, U Ruegg, S Takeda: nNOS is an essential mediator for mechanical overload-induced muscle hypertrophy. International Conference On Muscle Wasting , Ascona, Switzerland, 9.20, 2011
3. Wang B, Ito N, Ono Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: TGF- β and BMP signals limit reprogramming of aging fibroblasts from dystrophin-deficient mdx muscle. International society for stem cell research, 9th Annual meeting, Toronto, Canada, 6.17, 2011
4. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S: Immune tolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin transduction. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.21, 2011
5. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Takeda S: Mechanism of uptaking Morpholino into dystrophin-deficient muscle fibers. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
6. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
7. Ono Y, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y,

Takeda S: Identification of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle, development and regeneration, EMBO conference series, Wiesbaden, Germany, 5.13, 2011

8. Aoki Y, Nagata T, Shimizu Y, Takeda S: Challenges for antisense oligonucleotide-based therapeutics, in particular for exon 51-skipping in Duchenne muscular dystrophy. 4th International conference on modeling, simulation and applied optimization. Kuala Lumpur, Malaysia, 4.21, 2011

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 武田伸一: 筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線. 革新的バイオ医薬品: 研究開発と評価科学の最新動向, 日本薬学会第132年会, 札幌, 3.29, 2012
2. 武田伸一: 特別講演: 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療の現状と未来. 第17回信州遺伝子治療研究会, 長野, 1.20, 2012
3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法の現状と未来. 第2回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム, 東京, 1.19, 2012
4. 武田伸一: 臨床研究の推進を担うトランスレーショナル・メディカルセンター (TMC). 国立精神・神経医療研究センター 山梨大学連携講演会, 山梨, 11.28, 2011
5. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療へ. 第60回兵庫県神経疾患懇話会, 神戸, 10.01, 2011
6. 武田伸一: モルフォリノオリゴヌクレオチドによる 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臨床応用, 日本薬剤学会第26年会, 東京, 5.29, 2011

7. 武田伸一：骨格筋の幹細胞と再生の分子機構，第3回シグナルネットワーク研究会，東京，5.27, 2011
8. 武田伸一：デュシェンヌ型に対するエクソスキップ治療，第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.19, 2011

【一般学会】

1. 伊藤尚基，工藤 明，鈴木友子，武田伸一：骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)は過負荷によって活性化され，タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している．第34回日本分子生物学会年会，横浜，12.16, 2011
2. 小林千浩，谷口(池田)真理子，金川 基，游 智傑，小田哲也，久我 敦，倉橋浩樹，横田俊文，武田伸一，戸田達史：SVA レトロトランスポゾン挿入による病的 exon-trapping と福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー．第34回日本分子生物学会年会，横浜，12.14, 2011
3. 中村美穂，西山尚志，鈴木友子，武田伸一：Duchenne 型筋ジストロフィーの症候性キャリアからの iPS 細胞の樹立．第34回日本分子生物学会年会，横浜，12.13, 2011
4. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: AVV empty capsids mediate effective nuclear transportation of morpholino in the muscle cells. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会，福岡，7.17, 2011
5. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin JH, Okada T, Takeda S: Effective transgene expression in non-human primate muscle with AVV type9 vectors following immune suppression. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会，福岡，7.17, 2011
6. Okada H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Hohjoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Disruption of common marmoset dystrophin mRNA to generate non-human primate DMD model. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会，福岡，7.16, 2011
7. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H,

- Nishiyama A, Okada T, Takeda S: Dystrophic mdx mice are severely compromised with cardiac and respiratory dysfunction by genetic ablation of anti-inflammatory cytokine IL-10. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会，福岡，7.15, 2011
8. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K: Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会，福岡，7.15, 2011
9. 今村道博，松本大和，稲葉由美，万年英之，武田伸一：Effect of a Point Mutation in the WWP1 Gene Associated with Chicken Muscular Dystrophy on Mouse Muscle Expressing Mutated WWP1 Transgene. 第63回日本細胞生物学会大会，北海道，6.28, 2011
10. 宮崎大吾，中村昭則，福島和宏，吉田邦広，武田伸一，池田修一：Matrix Metalloproteinase (MMP) -2 欠損による骨格筋再生障害とそのメカニズムの解明．第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.19, 2011
11. 中村昭則，小林正典，池田修一，武田伸一：筋ジストロフィー犬横隔膜におけるジストロフィー変化の二段階制御機構．第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.19, 2011
12. 永田哲也，青木吉嗣，清水裕子，中村昭則，武田伸一：アンチセンス・モルフォリンによるジストロフィン遺伝子エクソン53スキッピングの試み．第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.19, 2011
13. 吉村俊朗，伊藤美佳子，片岡英樹，福留隆泰，Eric Krejci，岡田尚巳，武田伸一，本村政勝，辻野 彰，吉村俊祐，栢田智子，中田るか，徳田昌紘，福田 卓，大野欽司：コリンエステラーゼ阻害剤投与マウスとCollagenQ欠損マウスにおける運動終板微細構造の比較．第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.18, 2011
14. 中村治雅，大矢 寧，森まどか，小牧宏