

201114022A

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 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))

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	
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 武田 伸一	----- 1
II. 分担研究報告	
1. エクソン51スキッピングの臨床応用 武田 伸一	----- 15
2. エクソン51スキップ適応患者数の推計 岡田 尚巳	----- 25
3. <i>mdx52</i> を用いたエクソン 51 スキップでの 最適治療時期の検討 永田 哲也	----- 31
4. DMDに対する遺伝子治療に関する研究 大澤 真木子	----- 35
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 木村 重美	----- 39
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 中林 哲夫	----- 41
7. 臨床治験の準備に関する研究 村田 美穂	----- 45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51

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. モルフォリノ人工核酸のジストロフィン欠損筋線維への取り込み機構には、筋形質膜の脆弱性に伴う受動的な取り込み機構と、幼弱な筋再生線維の能動的な取り込み機構の2種類あることを示した。本研究成果は、Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対するアンチセンス核酸治療を筋再生の活発な小児期に行うことで、最大の治療効果が得られることを示唆する。
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を開始し、実施した。今後、歩行不能患者を対象とした臨床治験も計画している。
3. DMD に対する、モルフォリノを用いたエクソン・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、国際共同臨床研究への参加を行った。新規治療法の臨床応用を見据え、今後は患者、家族、医療関係者、国民全体に対し、より一層正確な情報発信が重要である。
4. エクソン・スキップの臨床評価系の確立のため、既に先進的な取り組みを続けている CINRG よりスタッフを招き、評価者の訓練、並びに施設及び機器の認定を終了した。
5. 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、希少疾患であるために臨床試験の実施が困難である領域であるにも関わらず、臨床的意義を評価可能であると思われる運動機能が主要評価項目に設定される等、急速な発展を遂げている。今後の臨床試験の計画においては、各開発相の目的に応じてより適切な主要評価項目を検討していくことが急用であると考えられた。

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スキップ臨床試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スキップの臨床試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合において、より効率的に行うために取り込み機構や投与時期を検討する必要がある。*mdx52*マウスを用いて行なった。また患者由来細胞をiPS細胞化してエクソン51のスキップを評価するためにiPS細胞を作製した。

また臨床試験に向けて患者のリクルートが必要である。昨年に引き続き患者数の把握、欠失の調査および情報発信を行った。さらに、今後エクソン51スキップの臨床試験を推し進めるにあたり国内での患者数の推計を行った。この結果、より診断体制を整えれば捕捉されていない適応患者を見出す可能性が示唆された。

規制当局と薬事相談を行い、国際共同試験を7人の患者で開始した。今後、患者の臨床評価が必要であり、日本独自ではなく国際的な評価方法を導入し、確立した。

最後に、稀少疾病に対して臨床試験を進める上で、国内外の開発の動向を調査し、具体的課題を抽出した。

B. 研究方法

1. *mdx52* を用いたエクソン51スキップでの最適治療時期の検討

材料：

既報告を参考にアンチセンス配列を設計し、Gene Tools社に合成委託した。

対象には *mdx52* マウスを用いた (3-32 週齢)。

方法：

1. モルフォリノ 10 μ g を前脛骨筋に局所投与し、2週間後に骨格筋を採取しジストロフィン陽性線維の割合を免疫組織化学法により評価した (n=36)。
2. 5週齢を day 0 と定めた。Day 0 にモルフォリノ 10 μ g を前脛骨筋に局所投与し、day 0-7 までプロモデオキシ

ウリジン (0.8 mg/ml) 含有水を自由経口摂取させた。Day 14 に前脛骨筋を採取して凍結筋切片を作成し、免疫組織化学法を用いてプロモデオキシウリジン/ジストロフィン/DAPI の三重染色を行った。

2. Prosensa/GSK との臨床治験の展開

本研究課題は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おり、国内外の企業との連携を念頭に置く必要がある。臨床治験をより進めていく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-methyl phosphorothioate (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)社とも交渉した。

3. 臨床治験の準備に関する研究

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>) の運営に関与し、広く国内全体の患者において今回のエクソン51スキッピングの対象患者の検索を行った。また、病院内のデータベースの整備を行った。

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、HPから発信の他に筋ジストロフィー公開講座を開催した。

3)Newcastle 大学およびTREAT-NMD によって行われるdysferlinopathyに対する自然歴国際共同研究に参加し、3年間にわたりコホート内の評価パラメーターの変化を特定し、筋ジストロフィーの評価法を明確にする。

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・治験ネットワークの CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group)からスタッフを招いて、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・認定を行った。

5. 「遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備」

① 開発動向の調査

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験の実施状況を、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health, 以下、NIH) の臨床試験登録データベース (<http://www.clinicaltrials.gov/>) を使用し調査した。調査対象の臨床試験は、企業が実施した試験に限定し、開発相及び実施国の限定は行わなかった。調査内容は、試験デザイン、開発相、試験開始年、試験規模 (目標症例数)、投与期間、対象年齢層、実施国とした。本調査は、2011年6月30日時点の登録情報を基に行った。

② 臨床評価方法に関する調査

「B. ① 開発動向の調査」結果をもとに、各臨床試験での主要評価項目及び副次評価項目について調査した。

C. 研究成果

1. *mdx52* を用いたエクソン 51 スキップでの最適治療時期の検討

mdx52 マウスの前脛骨筋における中心核線維は、3週齢前後から出現し、4-5週齢で増加率が最大であった。*mdx52* マウスの前脛骨筋にモルフォリノ人工核酸を筋注後のジストロフィン陽性線維の割合は、4-5週齢時にモルフォリノ人工核酸を筋注した場合に約45%と最高であり、6-32週齢では約20%程度である

のと比べて有意に高かった。BrdU を用いた実験では、ジストロフィン陽性の筋線維には、BrdU 陰性な大径筋線維と BrdU 陽性な小径再生線維の 2 種類あることがわかった。

2. Prosensa/GSK との臨床治験の展開

2011 年 1 月より Prosensa/GSK と GSK2402968 を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験を開始した (指定番号: (2 2 薬) 第 2 3 7 号)。患者登録システムの整備により当センター担当の患者がスムーズに世界に先駆けてエントリーが完了し、治験が開始された。すでに大部分の患者では 48 週の投与が終了している。投与が具体的内容については、Prosensa/GSK と秘密保持契約の関係上、現時点では公表できない。一方で GSK2402968 の適応拡大を目指して、Prosensa/GSK と交渉した結果、現在は歩行可能者のみに投与されているが、今後、歩行不能となった患者を対象とした臨床治験を計画することとなった。目的としては、呼吸機能及び残存した上肢機能への効果の評価である。

3. 臨床治験の準備に関する研究

1) 対象患者のリクルートと患者数の把握
REMUDY への参加患者数は順調に増加しており、2012 年 2 月現在で 876 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 13 人、エクソン 48-50 9 人、エクソン 49-50 20 人、エクソン 45-50 欠失 17 人、うち 15 歳未満 38 人) 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然るべき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おいてもらうことが非常に重要である。

既に NCNP および REMUDY の HP を用いて

情報発信を行っているが、双方向での情報確認とするために公開講座を開催している。本年度は 2011 年 7 月 2 日に第 8 回筋ジストロフィー公開講座を行った。今回は「筋ジストロフィー治療研究の進歩」(NCNP 神経研究所遺伝子疾患治療研究部 永田哲也室長)、「筋ジストロフィーといわれたら - 筋ジストロフィーの基礎知識と病院の利用の仕方」(NCNP 病院神経内科 森まどか医師)、「筋ジストロフィーの呼吸リハビリテーション・停電への備え - 人工呼吸器・吸引器をお使いの方へ」(NCNP 病院リハビリテーション科 小林庸子医長)の 3 講演を行い、特に災害対策については東日本大震災に際して NCNP が培ったノウハウを領付した。2010 年度に好評であった「先生に質問！」コーナーも継続し、例年通り定員 100 名に対して 120 名の参加者があった。

3) 国際共同臨床研究への参加

国際共同臨床研究である dysferlinopathy natural history study への参加が決定した。当センター及び 13 の共同研究施設の患者 150 人の多施設評価から、dysferlinopathy 治験の評価指標について、3 年にわたって 6 ヶ月毎に定量的シーケンスを含む MRI、医師及び理学療法士による定量的運動機能及び筋力評価、臨床検査を行う。アジアからは NCNP のみが参加しており、参加を通じて筋ジストロフィー治療に役立つ臨床評価項目の確立を行う。既に MRI および理学評価の品質管理として、英国およびフランスでの講習受講を終了した。遺伝子診断が参加要項であるため dysferlin 遺伝子診断のセットアップが終了し、25 名程度の患者の遺伝子解析を開始した。

また同様に、国際共同治験である米国の筋ジストロフィー臨床研究基盤整備グループ CINRG と協調した dystrophinopathy/肢帯型筋ジストロフィーに対するリシノプリル + CoQ10 の国際共同治験の開始が予定されており、本邦では当センターのみ参加する。共同研究者の小牧医師を中心として患者の組み入れを行っている。

4.臨床評価方法の確立

臨床治験が世界規模で展開されている現状を踏まえ、エクソン・スキップの有効性を検討する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 CINRG を 1999 年に設立し、世界各国との協調を深めている。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。2012 年 2 月に CINRG スタッフを招いて、今後の運用に対して機器や当院スタッフの研修レベルについて認証を受けた。

5.遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

① 筋ジストロフィーを対象とした開発
企業による筋ジストロフィーを対象とした臨床開発は 7 化合物で行われていることが確認された。7 化合物のうち 4 化合物 (PRO044、AVI-4658、PTC124 及び GSK2402968) はエクソン・スキップを作用機序とし、残り 3 化合物 (MYO-029、idebenone 及び ACE-031) は各々異なる作用機序を有していた。

② 臨床評価方法の検討

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験は 18 試験が確認され、主目的別には、8 試験が有効性評価 (NCT00758225、NCT01027884、NCT01037309、NCT01153932、NCT01254019、NCT01480245、NCT01462292、NCT01396239)、9 試験が安全性評価 (NCT00104078、NCT00758225、NCT00592553、NCT00759876、NCT00847379、NCT01009294、NCT01247207、NCT01099761、NCT01239758)、そして 1 試験が薬物動態評価 (NCT01128855) であった。有効性評価が主目的であった 8 試験のうち、6 試験が無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験 (以下、プラセボ対照試験) であった。

有効性評価を主目的としたプラセボ対照 7

試験の主要評価項目は、2 試験 (NCT01254019 及び NCT01462292) が運動機能 (6 分間歩行検査)、4 試験 (NCT00654784、NCT01027884、NCT01037309、NCT01396239) が代替指標 (左室機能、% 最大呼気量、ジストロフィン発現) による評価が行われ、残り 1 試験 (NCT01153932) の評価方法は不明であった。また、運動機能 (6 分間歩行検査) による有効性評価が行われたプラセボ対照試験は 2 試験 (NCT01254019 及び NCT01462292) とともに国際共同治験として実施されていた。

D. 考察

1. *mdx52* を用いたエクソン 51 スキップでの最適治療時期の検討

エクソン・スキップ治療に用いられる AO の中で、安全性と水溶性が高いモルフォリノ人工核酸は、臨床応用に適すると考えられるが、正常筋線維への取り込み効率が著しく低く、最適な治療用量の設定が難しいとの課題があった。今回、我々は、ジストロフィン陽性線維の発現を指標にして、モルフォリノ人工核酸を筋注したマウスに BrdU を投与することにより、モルフォリノ人工核酸が筋線維に取り込まれる機構には、2 種類あることを示した。BrdU 陰性の大径筋線維は、所謂 leaky な筋形質膜を有すると考えられ、モルフォリノ人工核酸は筋線維に受動的に取り込まれている可能性がある。一方、今回新たに見い出した、BrdU 陽性の小径再生線維へのモルフォリノ人工核酸の取り込みは、能動的な取り込み機構による可能性がある。モルフォリノ人工核酸の取り込み機序の解明につながる本成果により、DMD を対象にしたエクソン・スキップ治療を実施する最適な時期は、筋再生が活発な 5-10 歳程度と推察される。今後、核酸が筋線維に取り込まれる機序をより詳細に解明することができれば、アンチセンス核酸を用いた治療法を DMD 以外の遺伝性筋疾患に応用できる可能性が高い。

2. Prosensa/GSK との臨床治験の展開

エクソン 51 スキップの臨床治験については 2'-O-MePS を用いた国際共同治験を開始し、大部分の患者では治験を終了した。精神・神経・筋疾患分野で、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。今後、歩行不能な患者でも施行予定である。

3.臨床治験の準備に関する研究

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。情報提供のため、本年度より情報誌「Remudy通信」の発行頻度を年4回に増やし、情報発信を行った。

2)市民講座による情報発信は、前年度に引き続き双方向性に留意し、質問コーナーを継続して好評であった。講演の感想も概ね好評であり、市民公開講座の参加後に医療の必要性に気づいて当院外来を受診する患者が毎年数名程度おり、本年も筋疾患外来に3名ほど、講座参加者の受診があった。より詳細な、あるいは希少な筋ジストロフィーへ対応するため、来年度はグループ討議も導入予定である。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。また毎回、抄録をNCNPホームページに掲載して役立ててもらっている。

3)国際共同臨床研究への参加

dysferlinopathy natural historyは筋疾患に対する定量MRIおよび定量的筋力・機能評価指標を筋ジストロフィーの自然歴に即して有効性を判定する画期的な試みである。標準化を行うことで日常臨床の見直しも必要と考えている。

4.臨床評価方法の確立

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。これまでに評

価を用いる機器の導入が完了し、招聘したCINRGスタッフにより評価者の訓練ならびに施設及び機器の認定も終了した。今後、DMDの臨床治験に使用していく予定である。

5.遺伝子治療レジストリーの構築・治験に関する準備

医薬品開発が活発な疾患領域は、臨床試験の実施数から、国内外とも、がん、中枢神経系、そして循環器領域であることが指摘されている。中枢神経系疾患では、2005年から2011年に開始された臨床試験数(第II相及び第III相)は、大うつ病性障害202試験と最多で、次に統合失調症173試験であったと報告されている。筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験は2005年以降に開始されるようになり、大うつ病性障害及び統合失調症と比較すると、臨床試験の実績から考えて、臨床評価方法は絶えず検討が必要な疾患領域と言える。

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験には、以下の特徴が挙げられる。

- ・ 2005年から2010年までは、安全性評価を主目的とした臨床試験が多かった
- ・ 欧米では試験が開始された2005年から既にプラセボ対照試験が実施されていた
- ・ 2010年までは代替指標により有効性評価が行われていたが、2011年になり運動機能(6分間歩行)による有効性評価が行われるようになった

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験の臨床評価方法としては、筋ジストロフィーは希少疾患であるため、臨床試験の実施が困難である疾患であるが、代替指標による評価から真のアウトカムに近い運動機能を評価を主要評価項目とする試験に移行する傾向があることは、急速な発展がみられていると言える。近年は、運動機能及び心肺機能を組み合わせた複合評価指標の開発も行われており、臨床的意義の観点から薬効評価としてより適切な有効性評価指標を検討していく必要があると

考える。また、今後の臨床試験の計画にあたっては、開発相に応じた試験の目的から、いずれの有効性評価指標を選択していくかは規制当局との協議により決定していく必要があると考える。

E. 結論

1. モルフォリノ人工核酸のジストロフィン欠損筋線維への取り込み機構には、筋形質膜の脆弱性に伴う受動的な取り込み機構と、幼弱な筋再生線維の能動的な取り込み機構の2種類あることが示された。
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を開始し、実施した。今後、歩行不能患者を対象とした臨床治験も計画している。
3. 臨床治験開始に向けての基盤整備を行ってきた。今後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. エクソン・スキップの臨床評価系の確立のため、既に先進的な取り組みを続けている CINRG よりスタッフを招き、評価者の訓練、並びに施設及び機器の認定を終了した。
5. 承認申請を目的とした DMD に対する臨床試験については、希少疾患であるために臨床試験の実施が困難である領域であるにも関わらず、臨床的意義を評価可能であると思われる運動機能が主要評価項目に設定される等、急速な発展を遂げている。今後の臨床試験の計画においては、各開発相の目的に応じてより適切な主要評価項目を検討していくことが急用であると考えられた。

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
19. Nakano S et al. : Checking exon-skipping events in candidates for clinical trials of morpholino. *Pediatr Inter*. 53:524-529,2011
20. Yukihiro M et al. : Effective Drug Delivery System for Duchenne Muscular Dystrophy Using Hybrid Liposomes Including

Gentamicin along with Reduced Toxicity.
Biol Pharm Bull. 34:712-716, 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
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

<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
2. 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)
3. 中林哲夫: プラセボ効果. 精神医学キーワード事典, 中山書店, 東京 pp650-652, 2011

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

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
9. Kimura S: Efficient Conversion of Embryonic Stem Cells into Myogenic Lineage Using an Inducible Gene Expression System *in vivo*. 29 October 2011 ESGCT, イギリス ブライトン

<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, 枡田智子, 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 CollargenQ 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
 16. 木村重美: 小児の筋疾患の治療の指標としてのアクチグラフ. 第53回日本小児神経学会, 横浜, 5.27, 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・神経疾患研究開発費「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 - ミトコンドリアを介した無重カストレスの感知機構 -. 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 - 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 - 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, 武田伸一: 骨格筋幹細胞移植実現を目指した基盤的研究 - Hesr1/3 を介した骨格筋幹細胞の未分化性維持機構 -. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対する

- 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—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—. 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, 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: 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
4. 実用新案登録
なし
5. 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

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. 欧州を中心に行われた 2'-O-methyl phosphorothioate (2'-O-MePS)を用いたエクソン 51 スキップに関する第 2 相臨床治験延長試験(48 週)の情報を入手し、分析した。
2. 米国で行われたエクソン 51 スキップの新たな第 2 相臨床治験(PMO 高用量投与)の情報を入手し、分析した。
3. 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を開始し、実施した。今後、歩行不能患者を対象とした臨床治験も計画している。
4. エクソン・スキップの臨床評価系の確立のため、既に先進的な取り組みを続けている CINRG よりスタッフを招き、評価者の訓練、並びに施設及び機器の認定を終了した。

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。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

2011/2012 年に出版された論文の検索及び、研究集会への参加により、諸外国での研究の進展状況を知る。

2. Prosensa/GSK との臨床治験の展開

本研究課題は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おり、国内外の企業との連携を念頭に置く必要がある。臨床治験をより進めていく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-methyl phosphorothioate (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)社とも交渉した。

3. 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、さら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・治験ネットワークの CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) からスタッフを招いて、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・認定を行った。

C. 研究成果

1. 諸外国の研究の現状

(1) オランダにおける clinical trial

昨年、報告したように、Prosensa 社と提携先の GSK とで 2'-O-MePS (GSK2402968) を用いた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が施行されたが、その延長試験について新たな情報を入手した。昨年まで 6 mg/kg での 24 週までの延長試験が行われたが、現在は 48 週まで延長されている。最も問題になったのは腎機能である。α1 マイクログロブリンの上昇が全例で、92% に蛋白尿が見られた。また全例で注射部位に発赤等の反応が見られた。しかし、いずれも軽症であった。また一部で腎肝機能の上昇を認めたが、進行性ではなかった。12 週の時点で 6 分間歩行で認めた改善は、48 週の時点でも観察された。今後も延長試験は継続される予定であり、効果および腎障害の経過を注意深く観察することとしている。

(2) 英国/米国における clinical trial

昨年、報告したように英国での AVI-4658 (モルフォリノ) の第 2 相の臨床治験 (0.5~20mg/kg) では用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が機能的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により AVI-4658 のより高用量投与での安全性を確認した上で、米国で新たに 30mg/kg および 50mg/kg の 24 週間の投与を実施した。30mg/kg の 24 週間投与では十分量のジストロフィン陽性線維が観察された。また 30mg/kg および 50mg/kg では蛋白尿も含めて明らかな毒性は見られていない。現在も我々は、モルフォリノを用いて本研究を継続する必要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るからである。

2. Prosensa/GSK との臨床治験の展開

2011 年 1 月より Prosensa/GSK と GSK2402968 を用いたエクソン 51 スキップ

の国際共同治験を開始した (指定番号 : (22 薬)第237号)。患者登録システムの整備により当センター担当の患者がスムーズに世界に先駆けてエントリーが完了し、治験が開始された。すでに大部分の患者では48週の投与が終了している。投与が具体的内容については、Prosensa/GSK と秘密保持契約の関係上、現時点では公表できない。一方で GSK2402968 の適応拡大を目指して、Prosensa/GSK と交渉した結果、現在は歩行可能者のみに投与されているが、今後、歩行不能となった患者を対象とした臨床治験を計画することとなった。目的としては、呼吸機能及び残存した上肢機能への効果の評価である。

3.臨床評価系の導入

臨床治験が世界規模で展開されている現状を踏まえ、エクソン・スキップの有効性を検討する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 CINRG を1999年に設立し、世界各国との協調を深めている。ここ数年来、臨床治験を推進するためのメンバーである国立精神・神経医療研究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名を派遣し体制を整えてきた。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。2012年2月に CINRG スタッフを招いて、今後の運用に対して機器や当院スタッフの研修レベルについて認証を受けた。

D. 考察

2'-O-MePS を用いたエクソン51スキップの第2相臨床治験の延長試験(48週)の情報を入手した。48週でも有効性が確認されてい

る。副作用としては腎障害が上げられる。現時点では進行性ではない。今後、延長試験は継続される予定で、経過を注意深く見ていく必要がある。一方、モルフォリノの至適投与量決定の為に米国で行われていた新たな第2相の臨床治験の情報も一部入手した。今回の投与量(30mg/kg および50mg/kg)では安全性が確認された。30mg/kg で24週投与では十分なジストロフィンの発現が確認されており、今後、臨床評価も含めた結果について期待したい。

エクソン51スキップの臨床治験については2'-O-MePS を用いた国際共同治験を開始し、大部分の患者では治験を終了した。精神・神経・筋疾患分野で、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。今後、歩行不能な患者でも施行予定である。

一方、臨床評価については、米国を主体とした CINRG に参画することにより、一定の基準で評価する手掛かりが得られた。これまでに評価を用いる機器の導入が完了し、招聘した CINRG スタッフにより評価者の訓練ならびに施設及び機器の認定も終了した。今後、DMD の臨床治験に使用していく予定である。

E. 結論

1. 欧州を中心に行われた 2-O-methyl phosphorothioate (2'-O-MePS)を用いたエクソン51スキップに関する第2相臨床治験延長試験(48週)の情報を入手し、分析した。
2. 米国で行われたエクソン51スキップの新たな第2相臨床治験 (PMO 高用量投与)の情報を入手し、分析した。
3. 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を開始し、実施した。今後、歩行不能患者を対象とした臨床治験も計画している。
4. エクソン・スキップの臨床評価系の確立