

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。

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: 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スキップ治療の臨床応用, 日本薬学会第 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, 柘田智子, 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

【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. 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
3. 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
4. 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

5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
 11. 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
 12. 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. 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
 14. 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
 15. 武田伸二, 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 - 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

エクソン 51 スキップ適応患者数の推計

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 Duchenne 型筋ジストロフィー(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。DMD 患者のうちエクソン 51 スキップが適応となる変異を有する患者数は、施設ごとまたは患者レジストリーごとに報告された例はあるが、日本国内の総数を試算した報告はない。我々は国内外の DMD 患者数に関する文献を調査し、これらより推計された患者数より、現在我が国でエクソン 51 スキップの適応となる 5-9 歳及び 10-14 歳の患者数は、それぞれ 28-71 人、47-99 人と試算した。しかし経験的な発症率より推計されるそれぞれの年齢の適応患者数 88-122 人及び 95-131 人に及ばないことから、診断体制の充実により、未だ捕捉されていない適応患者を見出すことができるものと考えられた。

A. 研究目的

現在、DMD エクソン 51 スキップの治験として GlaxoSmithKlein 社の GSK2402968 が、国内で Phase III を実施中である。国外では歩行不能な被験者を対象とした Phase I、投与間隔と用量の探索を目的とした Phase II が開始されている。エクソン 51 スキップ適応 DMD 患者は、DMD 患者の中で最多とされているが、日本国内での総患者数について試算した報告はない。本研究では治験の推進に資するための基礎資料として、その試算を試みた。

B. 研究方法

論文及び統計調査より以下の項目を抽出し、これに基づき試算を行った。

1. 日本の出生男児数¹⁾
2. 米国の DMD/BMD 患者の有病率²⁾
3. 日本の年齢階級別男性人口³⁾
4. DMD/BMD 患者のうちエクソン 51 スキップが適応となる患者の割合^{4,5)}

C. 研究成果

1. 発症率に基づく、出生男児中の DMD 患者数の推計

経験的な DMD の発症率は、出生男児 3000-3500 人に一人とされている。そこで 1998-2007 年に出生し、2012 年に 5 歳から 14 歳を迎える男児の集団を抽出し¹⁾、上記の発症率を当てはめて患者数を推計した。

年齢(2012年時点)	出生男児数	最小推計患者数 (1/3500)	最大推計患者数 (1/3000)
5	559,847	160	187
6	560,439	160	187
7	545,032	156	182
8	569,559	163	190
9	576,736	165	192
5-9 歳小計		803	937
10	592,840	169	198
11	600,918	172	200
12	612,148	175	204
13	604,769	173	202
14	617,414	176	206
10-14 歳小計		865	1,009

2. 有病率に基づく、男性人口中の DMD/BMD 患者数の推計

文献 2 は 2007 年時点でのアイオワ州、アリゾナ州及びコロラド州、並びにニューヨーク州（一部）での、5-9 歳、10-14 歳、15-19 歳及び 20-24 歳の男性人口に占める DMD/BMD 患者の有病率を報告している。国内外ともに、国レベルの集団で DMD/BMD 患者の有病率を報告した例はなく、おそらく本報告が最も大規模なものの一つと考えられた。そこで本報告を我が国の年齢階級別男性人口（2010 年）に当てはめ³⁾、患者数を推計した。

年齢階層	米国4州の1万人あたり有病率		日本の年齢階級別男性人口(百万人)	日本の推計患者数	
	最小	最大		最小	最大
5-9	0.90	1.90	2.861	257	544
10-14	1.40	2.50	3.032	424	758
15-19	1.60	2.50	3.109	497	777
20-24	0.80	1.10	3.266	261	359

3. 推計患者集団中のエクソン 51 スキップ適応患者数の試算

DMD/BMD 患者集団におけるエクソン 51 スキップ適応例の割合は 11%~13%と報告されている^{4,5)}。当面エクソン 51 スキップの治験の対象者は 5 歳以上の歩行可能な DMD 患者であり、また 15 歳以上の DMD 患者では 93% が車椅子を使用しているとの報告もあることから²⁾、ここでは 5-9 歳及び 10-14 歳の患者集団を対象に、上述の割合を当てはめて適応患者数を推計した。

推計根拠	年齢階層	DMD 推計患者数		51 スキップ適応者数	
		最小	最大	最小 (11%)	最大 (13%)
発症率	5-9	803	937	88	122
	10-14	865	1,009	95	131
有病率	5-9	257	544	28	71
	10-14	424	758	47	99

D. 考察

1. 小児における DMD 患者数の推計

経験的に知られている DMD の発症率に基づく推計患者数と、有病率に基づく推計患者数は大きく異なった。これは全ての発症者が患者として捕捉されることがないという診断バ

イアスの影響と考えられた。また確定診断には遺伝子変異解析についての高度な技術が要求されるため、今回の推計にあたっては少なくとも米国と我が国の診断技術が同水準であることが前提となる。また出生数に基づく患者数の推計では、我が国の少子化を反映して、直近ほど推計患者数が減少していく傾向が認められた。

2. エクソン 51 スキップ適応患者数の推計

当面エクソン 51 スキップの治験で適応となるのは、5 歳以上の歩行可能な DMD 患者であるため、本研究では特に 5-9 歳及び 10-14 歳の年齢階級に着目して試算を行った。しかし今後、歩行不能患者に対する治験も実施されることから、試算においては 15 歳以上の患者についても考慮する必要があると思われる。エクソン 51 スキップ治療の至適開始年齢と考えられる 5-9 歳、及び一部も治療対象となりうる 10-14 歳の推計患者数は、有病率に基づき全国でそれぞれ 28~71 人、47~99 人と推計された。一方発症率に基づけば、それぞれ 88~122 人、95~131 人となることから、技術的、地域的な要因により現状では補足されない患者がいる可能性が示唆される。今後、筋ジストロフィーの診断体制を充実させることで、治療が可能な DMD 患者をより多く見いだすことが可能と考えられた。

E. 結論

国内外の DMD 患者数に関する文献を調査し、これらより推計された患者数より、現在我が国でエクソン 51 スキップの適応となる 5-9 歳及び 10-14 歳の患者数は、それぞれ 28~71 人、47~99 人と試算した。しかし経験的な発症率より推計されるそれぞれの年齢の適応患者数 88~122 人及び 95~131 人に及ばないことから、診断体制の充実により、未だ捕捉されていない適応患者を見出すことができるものと考えられた。

文献

- 1) 厚生労働省 人口動態統計
- 2) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Prevalence of Duchenne/Becker muscular dystrophy among males aged 5-24 years - four states, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Oct 16;58(40):1119-22.
- 3) 総務省統計局 日本の統計
- 4) Takeshima Y, *J Hum Genet.* 2010
- 5) Aartsma - Rus A, *Hum Mutat.* 2009

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. 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
3. 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
4. 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

5. 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

【欧文著書】

1. 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

II 学会発表

<国外>

【国際学会】

1. 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
2. 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

<国内>

【一般学会】

1. 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, 7.16, 2011

2. 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, 7.16, 2011
3. 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
4. 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
5. 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

【その他】

1. 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
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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
6. 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

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, 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

3) 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

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

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

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

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。

A. 研究目的

アンチセンス核酸を用いた Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する治療を最適化し、同治療法を他の遺伝性筋疾患に発展させることを目的とする。具体的には、モルフォリノがジストロフィン欠損筋形質膜あるいは非ジストロフィン欠損筋形質膜から取り込まれる機序の解明を行う。同様の手法を用いて、他のアンチセンス核酸(2'-O-MePS)についても、取り込み機序の解明を行う。さらに、これらの基盤研究成果を応用して、DMD あるいは他の筋疾患のモデルマウスを対象にアンチセンス核酸を用いた非臨床研究を行い、その有用性を検証する。

B. 研究方法

材料:

既報告を参考にアンチセンス配列を以下のように設計し、Gene Tools 社に合成委託した。

51D: TTGTTTTATCCATACCTTCTGTTTG

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。

C. 研究成果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M: Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl]ribonucleosides Using Oxa-Michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides. *J Org Chem.* 76: 3042-3053, 2011

【欧文著書】

1. 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

II 学会発表

<国外>

【国際学会】

1. 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
2. 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>

【一般学会】

1. 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
2. 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, 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許
出願
1) 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 に対する遺伝子治療に関する研究

研究分担者 大澤 真木子
東京女子医科大学 小児科 教授

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：東京女子医科大学小児科通院中の患者が、ただちに治験への参加、もしくは治療が開始された時点で治療を速やかに導入するため、エクソン・スキッピング療法の対象となるエクソン欠失患者数、また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 DMD、または Becker 型筋ジストロフィー(BMD)と診断された患者 49 名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：平成 24 年 3 月末現在、東京女子医科大学小児科に通院中の DMD/BMD 患者は 6 カ月～33 歳までの 49 名 (DMD : 38 名、BMD : 11 名) だった。MLPA 法は全例に施行し 8 名で欠失・重複とも認めなかった。8 名中 6 名についてはジストロフィン全シーケンスを行い 5 名には点変異が確認され、1 名には 1 塩基の欠失を認めた。1 名については現在検査を勧めている段階である。他 41 名については MLPA 法で確定診断が可能であった。その内訳は表 1 に示す。確定診断がついた 38 名のうち、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

いたため治験参加はかなわなかった。現在車椅子を利用せず、歩行可能な患者は 49 名中 17 名であり、心筋障害、呼吸障害は認めていない。1 名については 6 ヶ月時での診断のため独歩可能かどうかについては不明である。

考察：平成 22 年に施行された治験には、該当エクソンの欠失をもつ患者は存在したものの、歩行機能を喪失した後であったため、残念ながら治験に参加することはできなかった。現在も患者の症状は進行しつづけているが、歩行可能な患者は 17 名存在しており、承諾をえてステロイド療法などを行い本格的な治療開始まで歩行機能を維持し、心機能・呼吸機能を良好に保つよう留意している。

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	4	1
1-17	1		2-7		1	1 塩基欠失	1	
3-7		1	3-6		1	検査未		1
8-18	1		35-51		1			
8-9	1		19-52	1				
19-50	2		44		1			
19-52	1		56	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							
2-7	1							
8-15	1							
合計	28	5	合計	5	4	合計	5	2

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
研究分担者 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(DMD)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されつつある。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が、細胞条件等の結果が不安定であるため、この研究には不向きと考えた。今後 iPS 細胞を筋分化して細胞評価をしたいと考えている。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試験に参加中である。

A. 研究目的

エクソン・スキップされた患者細胞が、機能的に回復する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

私たちは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 (ベッカー型)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。また、当大学・発生医学研究所・幹細胞誘導分野の江良拓実教授(主任研究者)が「ヒト疾患由来iPS細胞の樹立とそれを用いた病態解析および治療法の研究」のタイトルで、臨床研究・医療技術の倫理委員会の承認を得て、iPS細胞バンクを作製している。私はその研究協力者でもある。今年度は患者又は代諾者より、インフォームド・コンセントを得て線維芽細胞よりiPS細胞を作製した。作製方法はセンダイウイルスベクターを用いて、外来因子フリーで作製した。現時点ではそれらの細胞を培養中で、まだ、細胞評価には至っていない。今後の実験計画を述べる。

iPS細胞をembryo bodyに分化させ、自己拍動させ、その細胞にモルフォリノを導入して、治療の評価をする。具体的には、1. 拍動 - 外部刺激なしの状態での拍動回数(時間当たり)、継続時間 2. 電気刺激による拍動変化の有無 3. 磁気刺激による拍動変化の有無 4. バッチクランプ法による細胞内外での電気量比較を予定している。

まず、DMDと非DMDのiPS細胞より得られたembryo bodyにおいて機能的な差を見いだす。その後、モルフォリノを投与して、治療効果の判定に用いる。

C. 研究結果

正常コントロールとジストロフィン遺伝子のエクソン45-50, 48-50の欠損、点突然変異にてストップコドンを生じた変異を持つiPS細胞を作製した。

D. 考察

昨年度に私達は、線維芽細胞を筋分化させmyotubeを脱分極して収縮させ、細胞の機能を観察することにより、エクソン・スキップの治療効果を判定することを試みたが、明らかな有意の差はなかった。ヒトの骨格筋は常に動いているため、常に動いている細胞で、治療の評価をすることが大切と考え、今回の研究に至っている。

E. 結論

DMD由来のiPS細胞を作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano, Shiho et al. Checking exon-skipping events in candidates for clinical trials of morpholino *Pediatr Inter* 2011 53, 524-529
- 2) Mamiko Yukihiro, et al. Effective Drug Delivery System for Duchenne Muscular Dystrophy Using Hybrid Liposomes Including Gentamicin along with Reduced Toxicity. *Biol Pharm Bull*. 2011 34, 712-6
- 3) 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)

2. 学会発表

- 1) 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 プライトン
- 2) 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) 2011年5月27日

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

研究分担者 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

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン 51 スキップ治療の有効性及び安全性を検討するための治験を計画し、実施のための体制整備を行うために、国内外の開発の動向を調査した。そして、臨床試験の計画及び実施に関わる課題について検討した。

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、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エクソン 51 スキップ治療の有効性及び安全性を検討するための治験を計画し、そして実施のための体制整備を行うために、国内外の開発の動向を調査し、具体的課題を抽出することである。

B. 研究方法

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. 研究結果

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(表1)。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