

20114022B

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

総合研究報告書

(平成 21 年度～平成 23 年度)

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

総合研究報告書

(平成21年度～平成23年度)

研究代表者 武田 伸一

平成24 (2012) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 29
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 33

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))
総合研究報告書

モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに対する
エクソン 51 スキップ治療の臨床応用

研究代表者	武田 伸一	国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長
研究分担者	岡田 尚巳	国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	永田 哲也	国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長
	大澤真木子	東京女子医科大学 小児科 教授
	木村重美	熊本大学大学院生命科学研究部 准教授
	中林 哲夫	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター 臨床研究支援室 室長
	村田 美穂	国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科診療部 部長

研究要旨

1. エクソン 51 スキップの最適投与用量を検討するため、ジストロフィン遺伝子エクソン 52 欠失マウス(*mdx52* マウス)を対象に、モルフォリノの単回投与を行い、用量依存的にエクソン 51 スキップの誘導効率は増加すること、経尾静脈投与では全身の骨格筋に比較的均等かつ高率にエクソン 51 スキップを誘導可能なことを示した。体表面積換算では、ヒトの治療用量は 25-30 mg/kg と推定された。さらにモルフォリノ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. ジストロフィン遺伝子の欠失パターンが異なれば、エクソン 51 スキップによる治療効果が異なる可能性が示唆された。引き続き、DMD 患者を対象にした治験結果の詳細な解析を行い、併せて、患者由来細胞を用いた *in vitro* の実験を積み重ねることにより、エクソン 51 スキップ治療の最適化を図れる可能性がある。
3. 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・スキップについて、臨床治験を行なうためには、臨床評価系を確立が必須であり、既に先進的な取り組みを続けている CINRG との交流を深め、評価機器を導入した。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. 人工核酸を用いた DMD に対する治験の計画、そしてエクソン 51 スキップ治療を目標とした治験の実施を行うために、当該疾患を対象とした国内外の開発の動向を調査した。その上で、DMD を対象とした臨床開発の問題点を評価し、必要な対策と体制整備について検討した。
6. 製薬企業と協力し 2'-O-MePS を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に関して、規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行った。さらに該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として 23 年 1 月より治験を開始し、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。

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は発症頻度が高いが (出生男児 3,500 人に 1 人)、母体の卵細胞における突然変異が多いため (発症者の約 3 分の 1)、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。近年、DMD に対する新規治療法としてエクソン・スキップ治療が注目されている。これまでに我々は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AON) を用いて DMD に対するエクソン・スキップ治療の前臨床的研究を行い、その安全性と有効性を示してきた。まず、ジストロフィン遺伝子のエクソン 6 および 8 を標的としたモルフォリノを、スプライス変異を有する筋ジストロフィー犬 (筋ジス犬) に全身投与し、エクソン 6 と 8 をスキップさせてイン・フレーム化することに成功した。その結果、全身骨格筋でジストロフィン発現の回復により筋機能が改善し副作用は認められなかった (Yokota et al, *Ann Neurol*, 2009)。しかし、筋ジス犬と同じ変異を持つ DMD 患者は稀であることから、エクソン・スキップの対象となる患者が DMD 患者の約 13% と最も多いエクソン 51 に注目した。これまで、エクソン 51 を含む遺伝子欠失を有する患者が比較的軽症であることがエクソン 51 スキップの妥当性の根拠として挙げられていた。そこで、我々が作出に参画したジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてエクソン 51 スキップの妥当性を検証すること

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

B. 研究方法

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

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

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

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

④ *mdx52* マウスを対象に、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)。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. エクソン51スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索

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

続いて、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-50 欠失、エクソン 46-50 欠失、エクソン 48-50 欠失をそれぞれ有する 3 種類の DMD 患者由来の不死化線維芽細胞株を CORIELL 社(NJ, USA)より購入した。それらの線維芽細胞株に対して、レトロウイルスを用いて MyoD-GFP を発現させた後、FACS にて GFP 陽性細胞を回収し、分化培地で筋管細胞に分化させた。モルフォリノを培地に添加し、48 時間後に全 RNA を回収し、RT-PCR による解析を行った。モルフォリノ配列は臨床試験に用いられている 30 mer を使用した。

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 対象患者のリクルートと患者数の把握

我々はDuchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療を進めるために、全国規模のジストロフィノパチーデータベースである Registry of Muscular Dystrophy (REMUDY, <http://www.remudy.jp>) 運営に関与し、広く国内全体の患者で、今回のエクソン51

スキップの対象患者の検索を行った。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に、HPからの発信の他に、筋ジストロフィー公開講座を開催した。

③ 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試験を行なうためには、国際的な評価方法を導入して、更に標準化する必要がある。そこで、人工核酸を用いた実験について、共同研究相手先である米国 Washington D.C.の Children's National Medical Center の Eric Hoffman 博士が主宰している研究集会 CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group)年次総会に出席した。標準的な定量的筋力評価法である CQMS の導入と評価者の訓練・認定を推し進めた。

5. 「遺伝子治療レジストリーの構築・試験に関する準備」

① 臨床評価方法の検討

DMD を対象とした臨床試験を実施する場合、当該疾患が希少疾患であるために、症例数確保が最大の問題である。実行可能性を検討するために、筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験について調査した。米国国立衛生研究所 (NIH) の臨床試験登録データベース (<http://www.clinicaltrials.gov/>) に登録さ

れている DMD を対象とした企業主導の臨床試験について、選択・除外基準、対象年齢層、有効性評価項目、症例数、対照群の設定、試験デザイン及び実施国について調査した。

② 臨床の実施体制の検討

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

6. 製薬企業との交渉

臨床治験を行う上で最も重要である GMP レベルの人工核酸の供給先として 2'-O-methylphosphorothioate (2'-O-MePS) の製造企業であるオランダの Prosensa 社、ならびに提携先であるグラクソ・スミスクライン(GSK)社との交渉が必要と考えた。また、もう一つの GMP レベルの人工核酸の供給先であるモルフォリノの製造企業である AVI Biopharma 社と秘密保持契約を結び、DMD 治療薬 AVI-4658 の非臨床安全性試験を入手し、評価した。それに基づき将来の核酸医薬品としての製品化等を念頭に置いて、オーファン薬で実績のある国内製薬企業を介しての交渉を推進した。

C. 研究成果

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

① モルフォリノの経尾静脈投与による、用量漸増試験

RT-PCR 解析では、用量依存的にエクソン 51 スキップを誘導可能なことが実証された。RT-PCR 解析では、80, 160, 320 mg/kg 投与では、それぞれ、8%、25%、35%の割合でエクソン 51 スキップを誘導でき

た。ジストロフィン免疫組織化学染色では、RT-PCR と同様に、80 mg/kg から用量依存的にジストロフィン陽性線維の割合が増大し、320 mg/kg では 15-20%程度であった。

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

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

③ *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. エクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索

① 治験結果に基づいた、欠失変異パターンとエクソン 51 スキップ効率との関係
1 回投与用量の増加とともに、ジストロ

フィン陽性線維数は増加する傾向を認めた。しかしながら、1回投与用量が同じでも症例ごとにジストロフィン陽性線維数には大きなばらつきがあり、また、ジストロフィン陽性線維数とウエスタンブロットで評価したジストロフィン発現レベルは必ずしも相関しなかった。

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

② DMD患者由来線維芽細胞株に対するエクソン51スキップ

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

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 対象患者のリクルートと患者数の把握

REMUDYへの参加患者数はこの3年で大幅に増加して、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毎年開催した。最終年度は第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治療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クエンスを含む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。また年次総会毎に評価スタッフの技術の国際的標準化も必要なため、PT2 人を CINRG の総会に派遣し、訓練・認定を受けた。最終年度の 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。

6. 製薬企業との交渉

臨床治験を推進する為に、初年度に前臨床試験を推進した。また DMD 患者レジストリーを立ち上げ、国際的に標準的な DMD 患者臨床評価系の導入を開始し、DMD 患者細胞を用いた *in vitro* エクソン・スキップ法を確立した。その結果、モルフォリノと同様にエクソン 51 スキップを誘導する GMP レベルの 2'-O-MePS 製剤の開発を進めている Prosensa/GSK 社から、国際共同二重盲検プラセボ対照試験(phase IIb/III)の申し入れがあった。同社と秘密保持契約を結ぶとともに、非臨床安全性試験を評価し、日本での臨床治験が可能かどうか検討した。その結果、2'-O-MePS を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験に参加を決意した。主任研究者は医学専門家として規制当局(PMDA)と薬事相談を行い、オーファンドラッグ申請を行うなど主体的な役割を担った(指定番号：(22薬)第237号 医薬品の名称：GSK2402968)。次に、Placebo を control とした二重盲検試験について、企業治験として PMDA の承認と医療機関における治験審査委員会(NCNP 治-144)の承認を受けた。国際共同治験の一環として該当する DMD 患者のリクルートを開始し、既に同意の得られた患者を対象として23年1月より治験を開始した。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。

これと並行して、AVI-4658 の非臨床安全性試験を評価し、臨床治験のための充足性や安全性および有効性を検討した。

さらに 2010 年には製薬系 venture 国内企業であるノーベルファーマ社と共にシアトルの AVI Biopharma 社を訪問、日本での臨床治験実施体制を説明するとともに、AVI 社の全身投与による治験の結果について意見の交換を行った。その結果、AVI 社より日本での治験に対してノーベルファーマ社が独占交渉権を持つことができた。現在、オーファンドラッグ申請の準備を進めている。ただ、AVI 社およびノーベルファーマ社とも経営基盤は盤石とは言えず、予断を許さない状態にある。そのような状況下でも我々は、モルフォリノを用いて本研究を継続して推進する必要性があると考えている。それは、2'-O-MePS が 6mg/kg の皮下投与でも蛋白尿等の副作用を認めたのに対し、モルフォリノは安全性の観点で利点があり、高用量の投与が可能であることが挙げられる。今後、国際コンソーシアムに参加して、エクソン・スキップに関わる世界の有力な研究者と共同して AVI Biopharma 社と交渉を進める治験への道筋も検討していく必要があると考えている。

D. 考察

1. *mdx52* を用いたエクソン 51 スキップでの投与方法および最適投与用量の検討
現在、DMD 患者を対象に、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの全身投与によるエクソン 51 スキップの治験が進行中であるが、最適な治療用量と投与方法については未だ検討段階にある。今回の経尾静脈投与による用量漸増試験では、エクソン 51 スキップの誘導効率、mRNA およびジストロフィン・タンパク質ともに用量依存的に増加することを示した。この結果を受けて、*mdx52* マウスを対象に 320 mg/kg/wk の用量で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの反復投与を行

い、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、マウスの筋機能が改善することを示した。これらのことから、DMD患者の筋機能改善に必要な治療用量は、体表面積換算では 25-30 mg/kg と推定された。さらに現在進行中のエクソン 51 スキップの治験では、経静脈あるいは経皮下の 2 種類の投与経路が用いられている。今回我々は、経尾静脈投与では、経皮下投与の場合と比べて、全身の骨格筋に比較的均等かつ高率にエクソン 51 スキップを誘導可能なことを示した。腹腔内投与については、骨格筋ごとのエクソン 51 スキップ誘導効率の差が大きく、全体としてエクソン 51 スキップ誘導効率は、経静脈あるいは経皮下投与に比べて劣る傾向を認めた。これらの結果から、全身投与経路としては、経静脈投与が最も優れるが、DMD の治療の際にはアンチセンス・オリゴヌクレオチドを反復投与する必要があることから、投与がより簡便な経皮下投与は、状況により有用な投与方法になり得ると考えられた。DMD の主な死因は心不全であることから、心筋に対するエクソン 51 スキップの誘導は、今後の大きな課題である。さらに我々は、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。

2. エクソン 51 スキップ治療の対象となる最適な欠失変異パターンの検索

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

3. 対象患者のリクルートと患者数の把握および情報発信

① 対象患者のリクルートと患者数の把握
REMUDY の協力を得て、比較的順調に

進行している。このなかで、やや年長の患者で数年以上前に他施設でDMDと説明されたが筋生検の詳細不明かつMLPA法では異常なしで、本人は患者登録への参加を希望しているが不能という患者が10例程度存在することが明らかになった。稀少疾患であること、ご本人の研究への参加意志があることから、本人の大きな経済負担なく確定診断をつける道筋を確保することが必要と考えた。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 情報発信

今回は特に双方向性に留意して、質問コーナーを開設したが、非常に好評であった。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、今後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。

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、CINRG本部と連携して、実際に運用を開始する。その上で、基礎データの蓄積していく。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稀少疾患であるため、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の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。

6. 臨床治験への展開

エクソン 51 スキップの臨床治験については 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、モルフォリノを用いた治験についても国内交渉権を獲得し準備を進めているが、我々がモデルマウスを用いて明らかにしてきた至適投与量と英国を中心に進められてきた第 2 相の臨床試験で用いられてきた最大投与量 (20mg/kg) の間に大きな差があることが明らかになった。後者では少なくとも 12 週間までの連続投与では臨床的な有効性が確認されなかったために、米国で新たな第 2 相の臨床試験(高用量投与)が行われた。我が国でも、それに準じた治験の実施を検討したい。

E. 結論

1. エクソン 51 スキップを全身の骨格筋で誘導するための最適な投与用量は 320 mg/kg であること、最適な投与経路は経尾静脈投与であることを明らかにした。またモルフォリノ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. ジストロフィン遺伝子の欠失パターンが異なれば、エクソン 51 スキップによる治療効果が異なる可能性が示唆された。

引き続き、DMD 患者を対象にした治験結果の詳細な解析を行い、併せて、患者由来細胞を用いた *in vitro* の実験を積み重ねることにより、エクソン 51 スキップ治療の最適化を図れる可能性がある。

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

4. 承認申請を目的とした DMD に対する臨床試験については、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。

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. 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]ribo nucleosides 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, Kanesaki 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
21. Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H: SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapses. *J Neurochem.* 116: 1122-1137, 2011
22. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 13: 170-182, 2011
23. Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, Partridge T : The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 19: 9-15, 2011
24. Yokota T, Hoffman E, Takeda S : Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol.*

- 709: 299-312, 2011
25. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res.* 316: 3087-3092, 2010
 26. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2005, 2010
 27. Kanagawa M, Omori Y , Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Post-translational Maturation of Dystroglycan Is Necessary for Pikachurin Binding and Ribbon Synaptic Localization. *J Biol Chem.* 285: 31208-31216, 2010
 28. Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M: Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 294: 95-101, 2010
 29. Sugita H, Takeda S: Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86: 748-56, 2010
 30. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One.*; 5(8). pii: e12239, 2010
 31. Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K: Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuroreport.* 21: 447-451, 2010
 32. Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanasaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K: Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res.* 316: 2932-2944, 2010
 33. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H : Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol.* 176: 2414-2424, 2010
 34. Ishigaki K, Mitsuhashi S, Kuwatsuru R, Murakami T, Shishikura K, Suzuki H, Hirayama Y, Nonaka I, Osawa M : High-density areas on muscle CT in childhood-onset Pompe disease are caused by excess calcium accumulation. *Acta Neuropathol* 120:537-543, 2010
 35. Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12: 143-152, 2010
 36. Yokota T, Takeda S, Lu QL *et al.* A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol-Chicago* 66:32-38, 2009
 37. Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H: Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens, *J. Poult. Sci.* 46: 95-99, 2009
 38. Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S: Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. *Muscle Nerve*, 40: 815-826, 2009
 39. Cui R, Duan XL, Anderson GJ, Qiao YT, Yu P, Qian ZM, Yoshida K, Takeda S, Guo P, Yang ZL, Chang YZ: Age-dependent expression of hephaestin in the brain of

- ceruloplasmin-deficient mice. *J Trace Elem Med Biol.* 23: 290-299, 2009
40. Guo P, Cui R, Chang YZ, Wu WS, Qian ZM, Yoshida K, Qiao YT, Takeda S, Duan XL: Heparin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides.* 30: 262-266, 2009
 41. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K: Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther.* 20: 1013-1021, 2009
 42. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A: CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal.* 3: 135-145, 2009
 43. Nakamura A, Takeda S: Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy, *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
 44. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 17: 4798-4811, 2009
 45. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E: Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol.* 65: 667-676, 2009
 46. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23: 1907-1919, 2009
 47. Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S: Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009
 48. Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K : Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med* 11: 373-381, 2009
 49. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura K.I, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y. and Ozawa K : Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16: 383-391, 2009
 50. Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S. Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 47:1049-1056, 2009
 51. Kimura S, et al. : A 2-bp deletion in exon 74 of the dystrophin gene does not clearly induce muscle weakness. *Brain Dev.* 31, 169-172, 2009
 52. Nicolino N, Kimura S, et al.: Clinical Outcomes after Long-term Treatment with Alglucosidase Alfa in Infants and Children with Advanced Pompe Disease. *Genet.Med.*11, 210-219, 2009

53. Kimura S, et al. A case report of myoclonic epilepsy with ragged-red fibers without increased lactate levels. *Pediatr. Neurol.*, 41,46-8, 2009

【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
4. Okada T, Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, *Gene Therapy and Regulation (ed. by Roger Bertolotti), World Scientific, NJ*. 2010, 5(1), pp113-123.
5. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal. *Mechanosensing Biology (ed. Masaki Noda)*, Springer Japan, pp1-219, 2010

<和文>

【和文著書】

1. 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
4. 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療戦略. *神経治療学*, Vol.27, No.6, pp788-790, 2010
5. 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデルマウス. *完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック*, 株式会社羊土社, pp378-393, 2011
6. 青木吉嗣, 武田伸一: 研修医のための神経内科診療, 新興医学出版社, 東京, 2010, pp248-252
7. 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋, 炎症・再生医学事典, 朝倉書店, 東京, 2009, pp453-456
8. 中村昭則, 武田伸一: ジストロフィン異常症. *内科学症例図説*, 朝倉書店, pp 575-577, 2009
9. 中村昭則, 武田伸一: Duchenne型筋ジストロフィー. TOPICS 治療研究の現状, 埜中征哉監修, 小牧宏文編集, *小児筋疾患診療ハンドブック*, 診断と治療社, pp93-98, 2009

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
6. Takeda S: Treatment in Muscular Dystrophy: Exon Skipping. 10th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Auckland, New Zealand, 2.26, 2010
7. Takeda S: Advances in Molecular Therapy Research for Muscular Dystrophy. Lecture for Neurologists in Gangnam Severance Hospital, Yansei University College of Medicine, Soul, Korea, 2.8, 2011
8. Takeda S: Antisense oligos therapy for muscular dystrophy. Lecture at the Symposium of the Rehabilitation, Yansei University College of Medicine, Soul, Korea, 2.7, 2011
9. Takeda S: Molecular and cellular control of muscle satellite cells, 2010 FASEB Summer Research Conference Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Arizona, USA, 7.19, 2010
10. Takeda S : Gene Transfer Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). 9th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (AOMC), Seoul , Korea, 3. 26, 2010
11. Takeda S: Potential of muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9. 12, 2009
12. Takeda S: The dystrophic dogs as an excellent animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9. 10, 2009
13. Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7. 4, 2009
14. Miyagoe-Suzuki Y, Motohashi N, Yada E, Segawa M, Wang B, Harano C, Masuda S, Yoshida M, Takeda S: Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7. 3, 2009
15. Takeda S: Exon skipping , Panel introductions and Project summaries : Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6. 26, 2009
16. Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy . 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
17. Takeda S: Significance of the dystrophin-glycoprotein complex that connects the cytoskeleton to the basal lamina. Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, 6. 6, 2009
18. Takeda S: Plenary Lecture: Advances of Molecular Therapy Research on Dystrophin-deficient Muscular Dystrophy. 8th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Mumbai, India, 5.23, 2009

【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
 9. Kimura S: Efficient Conversion of Embryonic Stem Cells into Myogenic Lineage Using an Inducible Gene Expression System *in vivo*. 29 Octobe 2011 ESGCT, イギリス ブライトン
 10. Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori M, Ooya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY-DMD/BMD patient registry in Japan.15the International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
 11. Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
 12. Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S : Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
 13. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: