

201122098A

厚生労働科学研究費補助金

(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))

エクソン53を標的とした
デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の開発

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

(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))

エクソン53を標的とした
デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の開発

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		
エクソン 53 を標的としたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療薬の開発	-----	1
武田 伸一		
II. 分担研究報告		
1. RD細胞および対象患者細胞を用いた薬理薬効試験	-----	15
武田 伸一		
2. 霊長類を用いた予備的安全性試験	-----	25
永田 哲也		
3. エクソン53スキップ治療薬の薬物動態および薬物代謝の検討	-----	29
岡田 尚巳		
4. 早期探索的臨床試験に向けた治験実施計画書骨子の作成	-----	33
村田 美穂		
5. 実現可能性のための患者調査	-----	37
小牧 宏文		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	41

厚生労働科学研究費補助金
(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))
総括研究報告書

エクソン 53 を標的としたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の開発

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	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
	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
	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
	小牧 宏文	国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部 医長

研究要旨

1. デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン 53 を標的としたエクソン・スキップ治療薬を開発するにあたり、ヒト由来横紋筋肉腫細胞(RD 細胞)および、エクソン 53 スキップの治療対象となる DMD 患者由来細胞を用いて薬理薬効試験を行い、EC50(スキッピング活性が 50%になる濃度)を算出した。
2. DMD に対するエクソン 53 を標的としたエクソン・スキップ治療薬 20 mg/kg/day を雄 3 匹のカニクイザルに 1 週間に 1 回、4 週間間歇静脈内投与して、その反復投与毒性を調べた。投与期間中、いずれの動物においても一般状態、体重および摂餌量に異常は認められなかった。心電図検査、血液学的検査および血液生化学的検査において、異常は認められなかった。剖検、器官重量および病理組織学的検査においても、いずれの動物にも異常は認められなかった。
3. DMD に対するエクソン 53 を標的としたエクソン 53 スキップ治療薬をラット、マウスおよびサルにエクソン 53 スキップ治療薬を静脈内投与して、体内動態を検討した。エクソン 53 スキップ治療薬の血漿中濃度は、ラット・サルにおいて投与後、1 時間前後の半減期で減少し、24 時間後には定量下限となった。分布容積は小さいと考えられた。マウスによる投与では大腿四頭筋で DMD モデルマウスでより高濃度で観察された。
4. エクソン 53 を対象とした DMD に対するエクソン・スキップ治療薬の開発において、当該治療薬の安全性・効果の観察、薬物動態学的検討を行うために、対象となる DMD 患者に対して早期探索的臨床試験を実施する。本研究では当該試験の実施に先立ち、治験実施計画書骨子を作成した。
5. 当院通院患者におけるエクソン 53 スキップ対象者の頻度や年齢分布について調査を行った。エクソン 53 スキップ対象者は DMD 患者全体の 9.5%であり、従来指摘されている頻度とほぼ同様であった。希少疾病に対する治験を行うには、患者登録、施設ネットワークなどを通じた患者集積性の向上が必要である。

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。アンチセンス・オリゴヌクレオチド(AO)を用いたエクソン・スキップ治療は、遺伝性筋疾患である DMD に対する新規治療法として注目されている。我々は、筋ジストロフィー犬に対して、モルフォリノ AO の全身投与実験を行い、エクソン・スキップが筋ジストロフィーに対して有効な治療となり得ることを示した(Yokota et al. *Ann Neurol*, 2009)。次に、対象となる患者数が全 DMD の約 13%と最も多いエクソン 51 スキップについて、エクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスを用いてモルフォリノ AO の静脈投与を行い、エクソン 51 スキップの有用性を検証した(Aoki et al. *Mol Ther*, 2010)。我々の知見に基づき欧米で、エクソン 51 スキップの治療が実施され、我々も含めた国際共同治療が開始された。次の対象エクソンは、全 DMD 患者の約 8%を占めるエクソン 53 であるが、エクソン 53 スキップに関する治療はまだ行われていない。我々は、ヒト筋細胞においてエクソン 53 スキップを起こす効果的な塩基配列を決定した(特許申請中)。マウスでも筋注で効果的な塩基配列を決定しており、*mdx52* マウスに静脈投与を行い、有効性および安全性を検討している。また、エクソン 53 スキップの対象 DMD 患者の皮膚線維芽細胞を採取しており、ジストロフィン回復

を確認した。現在、エクソン 53 に関して、有効と考えられる配列でのモルフォリノ AO を国内企業との協力で合成した。本研究では合成したモルフォリノ AO を用いて薬理薬効試験・薬物動態試験・モデル動物を使った詳細な副作用を検討し、早期探索的試験の実施を目的とする。

エクソン53スキップを治験薬として開発するのに必要な横紋筋肉腫細胞(RD細胞)および患者由来細胞を用いて薬理薬効試験を実施した。本格的な非臨床試験を開始するにあたり、本治験薬の霊長類を用いた予備的安全性試験および薬物動態および薬物代謝について検討した。特に安全性試験では問題は認められず、また今後必要になる本治験薬の薬物動態および代謝に関する情報を得られた。今後、早期探索的臨床試験を実施するための非臨床試験の計画策定には、治験概要を決定する必要がある。そこで早期探索的臨床試験に向けた治験実施計画書骨子を作製した。最後に、臨床治療に向けて患者のリクルートが必要である。患者数の把握、対象欠失の調査を行った。

B. 研究方法

1. RD細胞および対象患者細胞を用いた薬理薬効試験

① 横紋筋肉腫株化細胞(RD細胞)におけるスキッピング活性

RD細胞にエクソン53スキップ治療薬を nucleofector にて導入し、3日後に RT-PCR 法によりスキッピング効率を測定した。

② 対象患者細胞におけるスキッピング活性およびタンパク質発現

エクソン53スキップの治療対象となる DMD 患者(エクソン48-52欠失)の線維芽細胞株に対して、レトロウイルスを用いて MyoD-GFP を発現させた後、FACS で GFP 陽性細胞を回収し、分化培地で筋管細胞に分化させた後、エクソ

ン53スキップ治療薬およびエンドポーターを培地に添加し、48時間後に全RNAを回収し、RT-PCRによる解析を行った。また、導入72時間後にジストロフィンタンパク質の発現を検出した。コントロールとして従来報告された他の塩基配列を用いた。

2. 霊長類を用いた予備的安全性試験

エクソン53スキップ治療薬20 mg/kg/dayを雄3匹のカニクイザルに1週間に1回、4週間間歇静脈内投与した。対照群(雄3匹)には媒体であるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を同様に投与した。また、ホルター心電計を用いて心電図に及ぼす影響を検討するとともに、薬物動態検討のための試料を採取した。

3. エクソン53スキップ治療薬の薬物動態および薬物代謝の検討

ラット、マウスおよびサルにエクソン53スキップ治療薬を静脈内投与して、体内動態を検討した。

4. 早期探索的臨床試験に向けた治験実施計画書骨子の作成

DMDに対するエクソン51スキップの臨床試験に関する既報の論文、およびICH M3 ガイドライン アプローチ4に基づき治験実施計画を立案した。

5. エクソン53スキップ対象者の頻度や年齢分布についての調査

当院小児神経科に受診歴のあるDMD患者190名のカルテを後方視的に検討した。MLPA法、ないしはmultiplex PCR法を用いたジストロフィン遺伝子解析の結果から、エクソン53スキップ対象者(エクソン10-52、43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52、52欠失を有する患者)を抽出した。

C. 研究成果

1. RD細胞および対象患者細胞を用いた薬理薬効試験

① RD細胞におけるスキッピング活性
エクソン53スキップ治療薬によるEC50(スキッピング効率が50%になる濃度)は3.4 μ mol/Lであった。

② 対象患者細胞におけるスキッピング活性およびタンパク質発現
エクソン53スキップ治療薬によるEC50は2.3 μ mol/Lであった。また10 μ mol/L投与群においてジストロフィンタンパク質の産生が検出された。

2. 霊長類を用いた予備的安全性試験

投与期間中、死亡は認められず、いずれの動物においても一般状態、体重および摂餌量に異常は認められなかった。投与1および22日に実施した心電図検査、投与4週の血液学的検査および血液生化学的検査において、いずれの動物にも異常は認められなかった。投与期間終了時の剖検、器官重量および病理組織学的検査において、いずれの動物にも異常は認められなかった。

3. エクソン53スキップ治療薬の薬物動態および薬物代謝の検討

① ラットにおける血漿中濃度

雄性ラットにエクソン53スキップ治療薬を4、20および100mg/kg単回静脈内投与した後の血漿中未変化体濃度は、各用量とも1時間以下の半減期で減少し、投与後8時間に定量下限(50ng/mL)未満になった。投与量間で半減期および分布容積に差はなく、AUC_{0-∞}は投与量に比例した。

② サルにおける血漿中濃度

雄性カニクイザルにエクソン53スキップ治療薬を20mg/kg間歇静脈内投与(週1回投与の1および3回目)した後の血漿中未変化体濃度は、いずれも約1時間の半減期

で減少し、投与24時間後に定量下限(50 ng/mL)未満となった。分布容積は小さいと考えられた。1回目と3回目の投与で同様の推移を示したことから、週1回反復投与による動態への影響は小さいと考えられた。

③ サルにおける筋肉および腎臓中濃度
雄性カニクイザルにエクソン53スキップ治療薬を20mg/kg間歇静脈内投与(週1回投与の4回目)した24時間後の筋肉および腎臓での未変化体濃度は、それぞれ定量下限(0.5µg/g tissue)未満および約300µg/g tissueであった。

④ *mdx*マウスにおける筋肉中濃度
*mdx*マウスにエクソン53スキップ治療薬を300mg/kg単回静脈内投与した後、1時間における大腿四頭筋中未変化体濃度は野生型マウスと比較して高濃度であった。

4. 早期探索的臨床試験に向けた治験実施計画書骨子の作成

早期探索的臨床試験に向けて治験実施計画書骨子を作成した。作成した項目を下記に示す。

1. 対象患者の選択基準および除外基準
2. 治験の計画
 - 2.1 治験のデザイン
事前登録方式による単一施設非盲検試験
 - 2.2 評価項目
 - 2.2.1 有効性評価項目
 - 2.2.2 安全性評価項目
 - 1) 有害事象
 - 2) 副作用
 - 3) 臨床検査
 - 2.2.3 薬物動態
 - 1) 血漿中濃度
 - 2) 尿中排泄率
 - 2.3 治験実施期間
平成25年10月～平成27年4月
 - 2.4 症例数

全6例

2.5 用法・用量

2.5.1 投与量および投与方法

- ・筋肉内投与
- ・静脈内投与

投与量は非臨床試験に基づいて決定する。

3. 観察・検査

3.1 観察・検査項目

- 1) 病歴、一般所見、神経学的検査を含めた理学的所見、自覚症状
- 2) 血液検査
- 3) 生化学検査
- 4) 免疫学的検査
- 5) 検尿
- 6) 12誘導心電図
- 7) 心エコー
- 8) MRI
- 9) 6分間歩行
- 10) 10m歩行
- 11) 筋力検査
- 12) 肺機能検査
- 13) 筋生検
- 14) 血漿中の被験薬の濃度
- 15) 24時間累積尿排泄量

5. エクソン53スキップ対象者の頻度や年齢分布についての調査

190名のうち18名がエクソン53スキップ対象者であった。内訳はエクソン45-52欠失:6名、48-52欠失:5名、49-52欠失:2名、50-52欠失:2名、52欠失:3名であった。患者の年齢は0~4歳:2名、5~12歳:10名、13~20歳:5名であった。歩行可能患者は8名であった。

D. 考察

1. RD細胞および対象患者細胞を用いた薬理薬効試験

エクソン53スキップ治療薬投与で十分なスキッピング効率が観察された。またEC50も算出された。明らかな細

胞毒性は観察されなかった。従来報告されていた他の塩基配列よりも高い効果が確認された。今後はオフターゲット効果について検討する。

2. 霊長類を用いた予備的安全性試験

本試験条件下においてエクソン 53 スキップ治療薬投与による影響は一般所見・検査所見および剖検所見で認められなかった。エクソン 53 スキップ治療薬はこの投与量では問題ないと考えられた。今後、投与量を増量させた上、毒性が出現する最低濃度を算出する必要がある。またこのデータを下に早期探索的臨床試験に必要な非毒性試験を ICH ガイドラインに則って計画し、実行していく。

3. エクソン53スキップ治療薬の薬物動態および薬物代謝の検討

エクソン53スキップ治療薬の血漿中濃度は、ラット・サルにおいて投与後、1時間前後の半減期で減少し、24時間後には定量下限となった。分布容積は小さいと考えられた。マウスによる投与では大腿四頭筋でDMDモデルマウスでより高濃度で観察された。

4. 早期探索的臨床試験に向けた治験実施計画書骨子の作成

エクソン 53 スキップ治療薬の早期探索的臨床試験の実施にあたっては、非臨床試験を通じた安全性の検討を踏まえて、治療効果の観察、治療効果を予測するマーカーの探索、および薬物動態的検討を通して DMD 治療薬としての有用性を早期に推定することを目的としている。本研究で立案した実施計画骨子は、被験薬の筋肉内注射と静脈内注射を、期間を隔てて同一の被験者に対し行う。これは被験者数を増加させることなく、単回投与によるジストロフィン発現の検出、およ

び静脈内投与まで予測し得ない個々の被験者に生じる副作用の予見、ならびに週 1 回計 8 週間の連続投与によるジストロフィン産生の確認および次相の臨床試験計画立案のための情報収集を可能とするものである。なお安全性を確保するために、筋肉内投与後 4 週間の観察期間を通じた評価で問題がないと判断された被験者のみ、経静脈投与を行うこととなっている。また経静脈投与における投与量は、今後の非臨床試験の結果により決定することとしているが、現段階では最大でも 50mg/kg を超えないものと推定している。今後得られる安全性試験、効力薬理試験および薬物動態試験の結果を踏まえ、最終的な実施計画を作成する予定である。

5. エクソン53スキップ対象者の頻度や年齢分布についての調査

エクソン 53 スキップ対象者は DMD 患者全体の 9.5% であり、従来指摘されている頻度とほぼ同様であった。早期探索的臨床試験、第二相、第三相試験という展開を考えると今回把握できた患者数のみでは不十分であることは明白であり、DMD 患者レジストリー(REMUDY)を用いた患者リクルート、現在構築を行っている筋ジストロフィー臨床試験ネットワークを用いた多施設共同治験への展開を前向きに検討すべきと考える。

E. 結論

1. ヒト由来横紋筋肉腫細胞(RD 細胞)および、エクソン 53 スキップの治療対象となる DMD 患者由来細胞を用いて薬理薬効試験を行い、EC50(スキッピング活性が 50%になる濃度)を算出した。
2. エクソン 53 を標的としたエクソン・スキップ治療薬を 20 mg/kg/day を雄 3 匹のカニクイザルに 1 週間に 1 回、4 週間間歇静

脈内投与した結果、被験物質投与による影響はいずれの動物にも認められなかった。

3. エクソン 53 スキップ治療薬のラット・サル・マウスにおける薬物動態を明らかにした。
4. エクソン 53 を対象とした DMD に対するエクソン・スキップ治療薬の開発において、当該治療薬の安全性・効果の観察、薬物動態学的検討を行うために、対象となる DMD 患者に対して早期探索的臨床試験を実施する。本研究では当該試験の実施に先立ち、治験実施計画書骨子を作成した。
5. 希少疾病に対する治験を行うには、患者登録、施設ネットワークなどを通じた患者集積性の向上が必要である。

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: 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]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, Kanasaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Takahashi H: Reactive gliosis of astrocytes and Müller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*. 47: 119-130, 2011
 17. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K: Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. *PLoS One*. 30; 6(3):e18388, 2011
 18. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S: Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet*. 20:1787-1799, 2011
- 【欧文著書】
1. Yokota T, Takeda S: Antisense oligo-mediated multiple skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy (ed. by Duan D). Muscle gene therapy, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, *Springer Science + Business Media*, USA, pp299-312, 2011

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

<和文>

【和文著書】

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

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

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

population in activated satellite cells. 4th International congress of Myology, Lille, France, 5.11, 2011

【国際学会】

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

- therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
7. Ono Y, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Identification of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle, development and regeneration, EMBO conference series, Wiesbaden, Germany, 5.13, 2011
 8. Aoki Y, Nagata T, Shimizu Y, Takeda S: Challenges for antisense oligonucleotide-based therapeutics, in particular for exon 51-skipping in Duchenne muscular dystrophy. 4th International conference on modeling, simulation and applied optimization. Kuala Lumpur, Malaysia, 4.21, 2011

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 武田伸一：筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線。革新的バイオ医薬品：研究開発と評価科学の最新動向，日本薬学会第 132 年会，札幌，3.29, 2012
2. 武田伸一：特別講演：筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療の現状と未来。第 17 回信州遺伝子治療研究会，長野，1.20, 2012
3. 武田伸一：筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法の現状と未来。第 2 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム，東京，1.19, 2012
4. 武田伸一：臨床研究の推進を担うトランスレーショナル・メディカルセンター (TMC)。国立精神・神経医療研究センター 山梨大学連携講演会，山梨，11.28, 2011
5. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する新たな治療へ。第 60 回兵庫県神経疾患懇話会，神戸，10.01, 2011
6. 武田伸一：モルフォリノオリゴヌクレオチドによる Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソンスキップ治療の臨床応用，日本薬学会第 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: Distruption 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, 栢田智子, 中田るか, 徳田昌紘, 福田 卓, 大野欽司: コリンエステラーゼ阻害剤投与マウスと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. 岡田尚巳: 筋ジストロフィーモデルマーマモセットの開発. 精神・神経疾患開発費 神経・筋疾患の解明のための霊長類モデル開発に関する研究平成23年度班会議, 東京, 12.21, 2011
 3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発. 再生医療の実現化プロジェクト平成23年度成果報告会, 文部科学省科学技術委託事業・再生医療の実現化プロジェクト(研究代表者 武田伸一), 東京, 12.9, 2010
 4. 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 伊藤

- 尚基, 武田伸一: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定の試み. 精神・神経疾患研究開発費「精神・神経疾患の iPS 細胞を用いた診断・治療法の開発に関する戦略的研究」(主任研究者 荒木敏之) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.6, 2011
5. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川基, 游智 傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一: 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/細胞病態および治療に関する研究 - SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー -. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」(主任研究者 西野一三) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.5, 2011
 6. 木村 円, 林 由起子, 中村治雅, 森まどか, 小牧宏文, 西野一三, 川井 充, 武田伸一: Remudy 患者情報登録部門の現状と課題. 精神・神経疾患研究開発費「遺伝性神経・筋疾患における患者登録システムの構築と遺伝子診断システムの確立に関する研究」(主任研究者 木村 円) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 7. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田 直子, 岡田尚巳: Duchenne 型筋ジストロフィー・モデル犬 CXMDJ における疾患重症度と修飾因子の解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 8. 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: ベクターを用いた筋ジストロフィー犬免疫寛容誘導療法と機能解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 9. 武田伸一, 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 中村美穂, 伊藤尚基: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 10. 二川 健, 河野尚平, 安倍知紀, 越智ありさ, 近藤茂忠, 平坂勝也, 真板綾子, 奥村裕司, 東 端晃, 埜中征哉, 武田伸一: 筋萎縮における機械的ストレス感知機構の解明 - ミトコンドリアを介した無重力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
(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))
分担研究報告書

RD細胞および対象患者細胞を用いた薬理薬効試験

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

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン53を標的としたエクソン・スキップ治療薬を開発するにあたり、ヒト由来横紋筋肉腫細胞(RD細胞)および、エクソン53スキップの治療対象となるDMD患者由来細胞を用いて薬理薬効試験を行い、EC50(スキッピング活性が50%になる濃度)を算出した。

A. 研究目的

エクソン・スキップ治療は、原因遺伝子が同定されているにも拘わらず治療法のない重症の遺伝性筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する新規治療法として注目されている。現在、我々は全 DMD 患者の約 8%が対象となるエクソン 53 スキップに関する治験を計画している。そこで現在、開発しているエクソン 53 スキップ治療薬で早期探索的試験を行うために、薬理薬効試験を行った。

B. 研究方法

1. 横紋筋肉腫株化細胞(RD細胞)におけるスキッピング活性

RD細胞にエクソン53スキップ治療薬を nucleofectorにて導入し、3日後にRT-PCR法によりスキッピング効率を測定した。

2. 対象患者細胞におけるスキッピング活性およびタンパク質発現

エクソン 53 スキップの治療対象となる DMD 患者(エクソン 48-52 欠失)の線維芽細胞株に対して、レトロウイルスを用い

て MyoD-GFP を発現させた後、FACS で GFP 陽性細胞を回収し、分化培地で筋管細胞に分化させた後、エクソン 53 スキップ治療薬およびエンドポーターを培地に添加し、48 時間後に全 RNA を回収し、RT-PCR による解析を行った。また、導入 72 時間後にジストロフィンタンパク質の発現を検出した。コントロールとして従来報告された他の塩基配列を用いた。

C. 研究成果

1. RD細胞におけるスキッピング活性
エクソン53スキップ治療薬によるEC50(スキッピング効率が50%になる濃度)は3.4 $\mu\text{mol/L}$ であった。

2. 対象患者細胞におけるスキッピング活性およびタンパク質発現

エクソン 53 スキップ治療薬による EC50 は 2.3 $\mu\text{mol/L}$ であった。また 10 $\mu\text{mol/L}$ 投与群においてジストロフィンタンパク質の産生が検出された。

D. 考察

以上の結果から、エクソン 53 スキップ治療薬投与で十分なスキッピング効率が観察された。また EC50 も算出された。明らかな細胞毒性は観察されなかった。従来報告されていた他の塩基配列よりも高い効果が確認された。今後はオフターゲット効果について検討する。

E. 結論

本研究成果により、エクソン 53 スキップ治療薬投与で十分なスキッピングが確認できた。今後、このデータを下に非毒性試験および早期探索的試験の計画を作製する。

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]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 Rugg, 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，