

- 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: 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

二：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
 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
 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 iPSC 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 iPSC 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
(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

霊長類を用いた予備的安全性試験

研究分担者 永田 哲也
国立精神・神経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

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 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。

A. 研究目的

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、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、霊長類を用いた予備的安全性試験を実施する。

B. 研究方法

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。

C. 研究成果

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。

D. 考察

以上の結果から、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。

E. 結論

エクソン 53 を標的としたエクソン・スキップ治療薬を 20mg/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。今後、今後反復毒性試験等を実施する。

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. 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ヨナ

- 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
(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

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

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

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 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、半減期 1 時間前後で減少し、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。

A. 研究目的

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。今後、早期探索的臨床試験を実施するにあたって必要なエクソン 53 スキップ治療薬の薬物動態および薬物代謝について検討した。

B. 研究方法

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。

C. 研究成果

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 100 mg/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 (50 ng/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、 $AUC_{0-\infty}$ 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 20 mg/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 20 mg/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 (0.5 $\mu\text{g/g}$ tissue) 未満および約 300 $\mu\text{g/g}$ 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 300 mg/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。

D. 考察

以上の結果より、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、半減期 1 時間前後で減少し、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。

E. 結論

エクソン 53 スキップ治療薬の薬物動態を明らかにした。

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. 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, 7.17, 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, 7.17, 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ーマセットの開発。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
(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

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

研究分担者 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

エクソン 53 を対象としたデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン・スキップ治療薬の開発において、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。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (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。我々はエクソン 53 スキップにより症状の改善が期待できる DMD 患者に対し、同作用を有する治療薬の開発を進めている。当該治療薬の安全性・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学的検討を通して、DMD 治療薬としての有用性を推定する早期探索的臨床試験の実施に先立ち、治験実施計画書骨子を作成する。

B. 研究方法

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。

C. 研究成果

治験の対象者、計画、評価項目などについて以下の骨子を作成した。

1. 対象

ジストロフィン遺伝子の DNA 診断により、ジストロフィン遺伝子エクソン 53 スキッピング作用によりジストロフィンの産生が期待される歩行可能なデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者

1.1 選択基準

以下の条件を全て満たす場合のみ、治験の組み入れ対象とする。

- 1) DNA 配列に基づき、ジストロフィン・エクソン 53 のスキッピングによって修正可能なアウトオブフレーム欠失 (43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52、52) を有している患者
- 2) ジストロフィン・エクソン 53 の DNA 配列決定により、PMO との二重鎖形成を損なう可能性がある DNA 多型性が存在しない患者。
- 3) 同意取得時において年齢が 5 歳以上 16 歳未満の男性の患者
- 4) 本治験の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、本人の自由意思による文書同意 (又はアセント) および代諾者の文書同意が得られた患者
- 5) 1 年以上の生存が見込まれる患者
- 6) 筋生検においてジストロフィン陽性筋線維が 5% 未満である患者
- 7) 自力歩行が可能な患者
- 8) 努力性肺活量 (FVC) が予想値の 50% 以上の患者
- 9) 12 誘導心電図において QTc が 450msec 未満の患者 (なお、脚ブロックが認められる場合は QTc が 480msec 未満の患者)
- 10) 十分な主要臓器能を保持している患者

者。検査値は登録日前の2週間以内の値とする。

白血球数、ヘモグロビン、AST、ALT、血清総ビリルビン、血清クレアチニン

1.2 除外基準

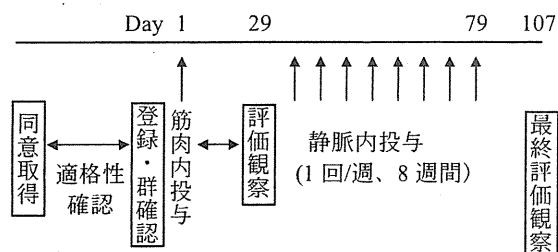
以下のいずれかに該当する患者は本治験の対象としない。

- 1) 本剤の効果が期待出来ない付加的なジストロフィン遺伝子のエクソン欠失を有している患者
- 2) 前脛骨筋が欠如あるいは著しく萎縮している患者
- 3) 心エコー検査による左心室駆出率 (EF) が 35%未満あるいは短縮率が 30%未満の患者
- 4) 治験薬の投与開始前3ヶ月以内に手術を受けた患者および治験期間中に手術を受ける予定の患者
- 5) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体で陽性である患者
- 6) 免疫不全または自己免疫疾患を有する患者
- 7) 治療が必要な心筋症を有する患者
- 8) 治療が必要な肝疾患を有する患者
- 9) 治療が必要な腎疾患を有する患者
- 10) 活動性又はコントロール不能な感染症を有する患者
- 11) 治験薬の投与開始前3ヶ月以内に他の治験薬または試験薬の投与を受けた患者
- 12) 重篤な薬剤過敏症の既往歴のある患者
- 13) その他、治験責任 (分担) 医師が本治験の対象として不適当と判断した患者

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

- 1) ジストロフィンの発現
- 2) 治療効果の観察
 - ・ 6分間歩行距離
 - ・ 床上起き上がり時間
 - ・ 階段4段昇降
 - ・ 10メートル歩行/走行
 - ・ North Star 歩行評価
 - ・ 血清CK値
 - ・ 呼吸機能 (FEV, FVC, MIP, MEP, PCF, PF)
 - ・ 筋MRI

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

各投与量 Level 2例

2.5 用法・用量

2.5.1 投与量及び投与方法

- ・ 筋肉内投与：同意取得後、被験者の下肢に合わせた固定装具を作成する。投与日に固定装具を装着し下肢を固定した後、前脛骨筋の投与部位皮下に局所麻酔を投与し、1.5cm間隔で2点の刺青を入れる。被験者登録管理者から指定された投与量に従い、筋電図電極付き注射針 (26G) を用いて、2点間を結ぶ直線に沿って均等な間隔で4箇所を選び希釈調整された治験薬 200 μL ずつ4箇所に筋肉内に投与する。
- ・ 静脈内投与：筋肉内投与4週間の観察後、有効性評価及び安全性評価を行い、安全性に問題がないことが確認された被験者に対して、被験者登録管理者から指定された投与量を量り、生理食塩水 100mL に混和した液を1時間掛

けて静脈内に投与する。

2.5.2 投与期間及び投与スケジュール

Day 1 に筋肉内投与を行い、4 週間の観察を行う。その後 Day30、37、44、51、58、65、72 及び 79 に静脈内投与を行い、最終投与日の 4 週間の観察期間をもって終了する。なお、静脈内初回投与 (Day30) 及び最終投与 (Day79) 時に、投与前、投与開始 30 分後、投与終了直後、投与終了 15 分後、30 分後、1 時間後、3 時、8 時間後及び 24 時間後の被験薬の血中薬物を測定する。また、Day37、44、51、58、65、72 及び 79 の静脈投与前の被験薬の血中薬物を測定する。

2.6 増量計画

各投与量群で 2 例の投与を行い、最終観察日 (Day107) の安全性評価で問題がない場合、次の投与量群に移行する。

投与量群	エクソン 53 スキップ治療薬		登録症例数
	筋肉内投与量	静脈内投与量	
Level 1	0.3mg/body	_mg/kg (未定)	2
Level 2	0.9mg/body	_mg/kg (未定)	2
Level 3	0.9mg/body	_mg/kg (未定)	2

3. 観察・検査

3.1 観察・検査項目

- 1) 病歴、一般所見 (身長、体重、脈拍、体温、血圧等)、神経学的検査を含めた理学的所見、自覚症状
- 2) 血液検査 (白血球、白血球分画、赤血球、血小板、ヘモグロビン)
- 3) 生化学検査 (TP、Alb、T-Bil、AST、ALT、 γ -GTP、ALP、LDH、LDH isozyme、BUN、Cr、Na、K、Cl、CRP、TC、TG、CK、CK-MB、BNP、心筋トロポニン T 定性)
- 4) 免疫学的検査 (HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体)
- 5) 検尿 (pH、尿蛋白、尿糖、尿ウロビリノーゲン、 $\alpha 1$ -マイクログロブリン、尿潜血、尿沈渣)
- 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 (ジストロフィン、 α -サルコグリカン、神経型一酸化窒素合成酵素、ヘマトキシリン-エオジン染色)
- 14) 血漿中の被験薬の濃度
- 15) 24 時間累積尿排泄量

D. 考察

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、及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、及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及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 50 mg/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、効力薬理試験及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。

E. 結論

エクソン 53 を対象とした DMD のエクソン・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の早期探索的臨床試験を計画し、その実施に先立ち、治験実施計画書骨子を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

実現可能性のための患者調査

研究分担者 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

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

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、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、エクソン 51 スキップの治験が開始されており、我々もその国際共同治験に参画している。次のエクソン・スキップの候補は、全 DMD 患者の約 8%が対象となるエクソン 53 とされているが、まだ治験は行われていない。今回は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。

B. 研究方法

当院小児神経科に受診歴のあるデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者 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。

(倫理面への配慮)

本研究は診療録などを用いて情報収集した後方視的研究であり、倫理委員会の申請は行っていない。

C. 研究成果

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

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

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

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hoffman EP, Bronson A, Levin AA, <u>Takeda S</u> , Yokota T, Baudy AR, Connor EM	Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle progress in exon skipping and stop codon read through.	<i>Am J Pathol.</i>	179	12-22	2011
Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, <u>Takeda S</u> , Wilton SD, Wolff JA, Wooddell CI, Xiao X, Tremblay JP	Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD.	<i>Mol Ther.</i>	19	830-840	2011
Takahashi H, Kanesaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, <u>Takeda S</u> , Takahashi H	Reactive gliosis of astrocytes and Müller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice.	<i>Mol Cell Neurosci.</i>	47	119-130	2011

Review

Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy Muscle

Progress in Exon Skipping and Stop Codon Read Through

Eric P. Hoffman,* Abby Bronson,*
Arthur A. Levin,[†] Shin'ichi Takeda,[‡]
Toshifumi Yokota,* Andreas R. Baudy,*
and Edward M. Connor*

From the Research Center for Genetic Medicine and the Office of Investigational Therapeutics, the Children's National Medical Center, and the Department of Integrative Systems Biology, George Washington School of Medicine and Health Sciences, Washington, District of Columbia; Santaris Pharma A/S,[†] San Diego, California; and the Department of Molecular Therapy,[‡] National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan*

The identification of the Duchenne muscular dystrophy gene and protein in the late 1980s led to high hopes of rapid translation to molecular therapeutics. These hopes were fueled by early reports of delivering new functional genes to dystrophic muscle in mouse models using gene therapy and stem cell transplantation. However, significant barriers have thwarted translation of these approaches to true therapies, including insufficient therapeutic material (eg, cells and viral vectors), challenges in systemic delivery, and immunological hurdles. An alternative approach is to repair the patient's own gene. Two innovative small-molecule approaches have emerged as front-line molecular therapeutics: exon skipping and stop codon read through. Both approaches are in human clinical trials and aim to coax dystrophin protein production from otherwise inactive mutant genes. In the clinically severe dog model of Duchenne muscular dystrophy, the exon-skipping approach recently improved multiple functional outcomes. We discuss the status of these two methods aimed at inducing *de novo* dystrophin production from mutant genes and review implications for other disorders. (*Am J Pathol* 2011, 179:12–22; DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.050)

Dystrophin Replacement: From the Outside, or Inside?

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common neuromuscular disease and affects all world populations equally. The cause of this genetic disease is loss of a single protein, dystrophin, in all types of muscle (ie, skeletal, cardiac, and smooth) and in neurons.^{1,2} The loss of protein function is the consequence of mutations in the large *DMD* gene. The gene contains 79 exons distributed over 2.3 million bp of genetic real estate on the X chromosome; however, only approximately 14,000 bp (<1%) is used for translation into protein (coding sequence).³ The 99.5% of intronic junk must be spliced out of the 2.3 million bp initial heteronuclear RNA transcript to lead to the mature 14,000 bp mRNA that includes all key information for dystrophin protein production. Patients with DMD have mutations in the gene that prevent the appropriate construction of the mRNA and/or the production of the dystrophin protein, and all patients with DMD show marked dystrophin deficiency in their muscle.⁴

During the past 25 years since gene and protein identification, dozens of innovative experimental therapeutic approaches for DMD have emerged; many are transitioning to clinical trials. These include slowing the progression of the disease by immune modulators (eg, steroids

Supported by The Foundation to Eradicate Duchenne, CureDuchenne, the Department of Defense (Congressionally Directed Medical Research Program; grant W81XWH-09-1-0599), and grants from the National Institutes of Health (R24HD050846; P50AR060836).

Accepted for publication March 21, 2011.

Disclosures: A.A.L. is employed by Santaris Pharma A/S, which develops oligonucleotide therapeutics for diseases other than DMD; is a consultant on a fee-for-services basis for Prosensa; was formerly in a consulting relationship with AVI BioPharma; and is shareholder in Isis Pharmaceuticals, which is an oligonucleotide therapeutics company not presently working on DMD.

Address reprint requests to Eric P. Hoffman, Ph.D., Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, 111 Michigan Ave NW, Washington, DC 20010. E-mail: ehoffman@cnmcresearch.org.