

全性評価について議論された内容をまとめた「核酸医薬品の非臨床安全性評価の課題」

C. 研究成果

現時点では、核酸医薬品の第 I 相試験開始に必要な非臨床試験項目及び実施時期については、明確な指針が示されていない。上述の資料より現時点では第 I 相試験開始前までに実施すべき試験として下記が考えられた。

1. 反復投与毒性試験

- 原則 2 種類のは乳動物（1 種はげっ歯類）で、臨床試験の期間と同じか、あるいはそれを越えるべき（ICH S6）
- ヒトと異なる動物種では on-target の毒性評価が困難で、一種類の適切な動物を用いた試験もやむを得ない（製薬協）
- アンチセンスによる急性炎症反応の評価のため、サイトカイン、補体活性、血液凝固、炎症性タンパクの測定が有用かもしれない（製薬協）
- mRNA をターゲットとした場合、標的タンパク質の産生に要する時間を考慮し、遅発的・蓄積的作用を考慮すべき（製薬協）

2. 遺伝毒性試験

- ICH S2 ガイドラインの標準的な組合せによって実施する

3. 局所刺激性試験

- 単回／反復投与毒性試験に組み込んで評価できる場合もあり

4. 免疫毒性試験

- ガイドラインからは第 I 相試験開始前までに実施すべきか明確でないが、実施したほうが望ましい

5. 安全性薬理試験

- コアバッテリー（中枢神経、心血管、呼吸器）試験が必要（ICH S6）

6. トキシコキネティクス試験

7. 薬物動態試験

- 薬物代謝、血漿タンパク質結合データおよび全身曝露データは臨床試験開始前に行われるべき（ICH M3R2）
- 有効成分（未変化体）としての濃度推移の検討が望ましい（製薬協）

D. 考 察

希少疾病医薬品（オーファン薬）であることのみならず、本邦では承認前例のないアンチセンス核酸医薬品であること、更に DMD という疾患の特殊性とその症状の進行を抑制する有効な治療薬がないことなどから、この種の医薬品の開発がこれまでの医薬品開発の考え方にどこまで従う必要があるのか判断が難しい点がある。したがって、前述すべき試験を軸に、本当に実施すべき非臨床安全性試験については、臨床試験開始にあたっては医薬品医療機器総合機構（PMDA）の対面助言を受けることが本治療薬の開発を進めるための重要なステップと考えられる。現在、本治療薬の開発においては、薬事戦略対面助言を活用しながら進めている。

E. 結 論

希少疾病医薬品であり、かつ本邦では承認前例のないアンチセンス核酸医薬品の臨床試験開始にあたっては PMDA の対面助言を受けることが本治療薬の開発を進めるための重要なステップと考えられる。

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) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Baba Y, Watanabe S, Takeda S, Okada T: Robust long-term transduction of common

- marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9. *Mol Ther-Nucleic Acids*. (in press)
- 2) Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Morita H, Nakajima T, Ozawa T, Aida I, Yonemochi Y, Higuchi S, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Ishihara T, Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Yatomi Y, Nagai R, Komuro I: Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy - Prospective multicenter cohort study. *Int J Cardiol*. 2013 1.17, [Epub ahead of print]
 - 3) Ito T, Ogawa R, Uezumi A, Ohtani T, Watanabe Y, Tsujikawa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H, Fukada SI: Imatinib attenuates dystrophic condition in severe mouse dystrophy and inhibits both proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. *Neuromuscul Disord*, 23:349-356, 2013
 - 4) Tremblay JP, Xiao X, Aartsma-Rus A, Barbas C, Blau HM, Bogdanove AJ, Boycott K, Braun S, Breakefield XO, Bueren JA, Buschmann M, Byrne BJ, Calos M, Cathomen T, Chamberlain J, Chuah M, Cornetta K, Davies KE, Dickson JG, Duchateau P, Flotte TR, Gaudet D, Gersbach CA, Gilbert R, Glorioso J, Herzog RW, High KA, Huang W, Huard J, Joung JK, Liu D, Liu D, Lochmüller H, Lustig L, Martens J, Massie B, Mavilio F, Mendell JR, Nathwani A, Ponder K, Porteus M, Puymirat J, Samulski J, Takeda S, Thrasher A, Vandendriessche T, Wei Y, Wilson JM, Wilton SD, Wolfe JH, Gao G: Translating the genomics revolution: the need for an international gene therapy consortium for monogenic diseases. *Mol Ther*, 21: 266-268, 2013
 - 5) Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med*, 19:101-106, 2013
 - 6) Relucio J, Menezes MJ, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Colognato H: Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia*, 60:1451-1467, 2012
 - 7) Yokota T, Nakamura A, Nagata T, Saito T, Kobayashi M, Aoki Y, Echigoya Y, Partridge T, Hoffman EP, Takeda S: Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther*, 22:306-315, 2012
 - 8) Yamaguchi M, Ogawa R, Watanabe Y, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Yamamoto H, Takeda S, Fukada S: Calcitonin receptor and Odz4 are differently expressed in Pax7-positive cells during skeletal muscle regeneration. *J Mol Histol*, 43:581-587, 2012
 - 9) Yuasa K, Takeda S, Hijikata T: A conserved regulatory element located far downstream of the gls locus modulates gls expression through chromatin loop formation during myogenesis. *FEBS Lett*, 586:3464-3470, 2012
 - 10) Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, Duguez SMR, Nagaraju K, Hoffman EP, Partridge T, Takeda S: Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:13763-13768, 2012
 - 11) 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. *Mol Ther*, 20:1384-1392, 2012

【欧文著書】

- 1) Miyagoe-Suzuki Y, Fukada S, Takeda S: Muscle Satellite Cells and Duchenne Muscular Dystrophy. Muscular dystrophy, InTech-Open Access Company, Croatia, 333-348, 2012

<和文>

【和文著書】

- 1) 木村円, 武田伸一: 筋ジストロフィー (ジストロフィノパチー), 今日の神経疾患治療指針第2版, 医学書院, 776-779, 3.15, 2012

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

- 1) Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Neuronal nitric oxide synthase is an essential mediator for mechanical load-induced muscle hypertrophy. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', Tokyo, Japan, JA Kyosai building, Conference hall, Tokyo, 9.8, 2012
- 2) Takeda S: nNOS is an essential mediator for mechanical load-induced muscle hypertrophy. Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. Federation of American Societies for Experimental Biology, Lucca, Italy, 8.15, 2012
- 3) Takeda S: Treatment of Muscular Dystrophy. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center, Kyoto, 6.7, 2012

【国際学会】

- 1) Imamura M, Takeda S: An R441Q mutation of the WWP1 gene causes WWP1 degradation in skeletal muscle of chicken muscular dystrophy. The American Society for Cell Biology 2012 Annual Meeting, San Francisco, USA, 12.17, 2012
- 2) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H,

Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Strategy for efficient generation of DMD model marmoset with rAAV-mediated transduction. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.29, 2012

- 3) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin J-H, Okada T, Takeda S: Effective transgene expression in non-human primate muscle with AAV type9 vectors following immune suppression. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.29, 2012
- 4) Hayashita-Kinoh H, Okada H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective transfer of morpholino into muscle cells by using AAV empty capsids. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.28, 2012
- 5) Nishiyama T, Segawa M, Ito N, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Myogenic Differentiation of Human iPS Cells Using Growthfactors and Small Molecules In Defined Serum-free Medium. ISSCR, Yokohama, Japan, 6.14, 2012
- 6) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Hosoyama-Ohshima S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate into myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
- 7) Kimura E, Nakamura H, Hayashi YK, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Nishino I, Kawai M, Takeda S: Current status of patient registration in Japan: REMUDY - Infrastructure for new drug development to treat muscular dystrophy. The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian

- Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
- 8) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Motohashi Y, Takeda S: Myogenic Transduction and Cell Surface Marker Selection of DMD Fibroblasts for Exon Skipping Assay. The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
 - 9) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Strategy for rAAV-mediated transduction of common marmoset skeletal muscle to generate NHP DMD model. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.19, 2012
 - 10) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Okada T, Takeda S: rAAV8/9-Mediated Muscle Transduction with Tacrolimus in Non-Human Primate. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.19, 2012
 - 11) Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S: rAAV9-Mediated Microdystrophin Gene Transfer with Immune Tolerance Induction Improves Dystrophic Phenotype of Canine X-Linked Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.17, 2012
 - 12) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Shimizu-Motohashi Y, Takeda S: Myogenic transduction and cell surface marker selection of DMD fibroblasts enable stable dystrophin mRNA expression for exon skipping assay. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.17, 2012
 - 13) Aoki Y, Nagata T, Nakamura A, Saito T, Tanihata J, Duguez S, Nagaraju K, Hoffman E, Partridge T, Yokota T, Takeda S: Demonstration of systemic exon 45-55 multiple skipping in dystrophic mdx52 mice. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.16, 2012
- <国内>
- 【特別講演・シンポジウム】
- 1) 武田伸一：筋ジストロフィーの分子治療薬の発展と医薬品承認に向けた課題。バイオロジクスフォーラム第10回学術集会，江戸川区，1.17, 2013
 - 2) 武田伸一：ここまで来た筋ジストロフィーの治療研究，臨床試験まで到達した筋ジストロフィーの治療法。第66回国立病院総合医学会，神戸，11.16, 2012
 - 3) 武田伸一：筋ジストロフィーの病理像－筋萎縮と筋肥大の新たな分子機構。第29回小児神経筋疾患懇話会，千代田区，8.25, 2012
 - 4) Takeda S: Gene Therapy for Neuromuscular Disorders. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会，熊本，6.28, 2012
 - 5) 鈴木友子, 武田伸一：筋ジストロフィーとiPS細胞－筋ジストロフィーの再生医療の実現化を目指して－。第54回日本小児神経学会総会，札幌，5.17, 2012
- 【一般学会】
- 1) 笠原（仁田原）優子，喜納（早下）裕美，千代智子，岡田尚巳，武田伸一：炎症を伴った筋ジストロフィーモデルマウスの作製と病態解析。第85回日本生化学会大会，福岡，12.16, 2012
 - 2) 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は過負荷によって活性化され，細胞内Ca²⁺濃度の制御を介して筋肥大を促進する。第85回日本生化学会大会，福岡，12.15, 2012
 - 3) 笠原（仁田原）優子，喜納（早下）裕美，千代智子，岡田尚巳，武田伸一：IL-10欠損筋ジストロフィーモデルマウスの作製と炎症病態解析。第35回日本分子生

- 物学会, 福岡, 12.14, 2012
- 4) 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は過負荷によって活性化され, 細胞内Ca²⁺濃度の制御を介して筋肥大を促進する. 第35回日本分子生物学会, 福岡, 12.13, 2012
 - 5) 矢嶋浩, 鈴木友子, 武田伸一, 川上潔: Six4およびSix5二重変異による筋再生の促進. 第35回日本分子生物学会, 福岡, 12.11, 2012
 - 6) 清水玲子, 小牧宏文, 玉浦明美, 細井薫, 大澤真木子, 武田伸一: 国際共同神経筋疾患臨床試験グループ (CINRG) における多施設共同治験. 日本人類遺伝学会第57回大会, 新宿区, 10.26, 2012
 - 7) 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, 細胞内Ca²⁺濃度の制御を介して筋肥大を促進する. 第67回日本体力医学会大会, 岐阜, 9.16, 2012
 - 8) 谷端淳, 永田哲也, 齊藤崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: hDystrophin Δ 45-55の機能的役割の解明. 第67回日本体力医学会, 岐阜, 9.14, 2012
 - 9) 西山尚志, 中村美穂, 伊藤尚基, 南成祐, 村山久美子, 田中章仁, 櫻井英俊, 後藤雄一, 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11回日本再生医療学会総会, 横浜, 6.13, 2012
 - 10) 木村円, 中村治雅, 林由起子, 森まどか, 小牧宏文, 西野一三, 川井充, 武田伸一: 筋ジストロフィー患者登録システム Remudyの現状と課題. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.24, 2012
 - 11) 永田哲也, 青木吉嗣, 武田伸一: mdx及びmdx52マウスを用いたin vivoおよびin vitroでのエクソン・スキップ効率の検討. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.24, 2012
 - 12) 青木吉嗣, 永田哲也, 中村昭則, 齊藤崇,

谷端淳, Hoffman E, Partridge T, 横田俊文, 武田伸一: エクソン 45-55 スキップ治療によりDMDモデルマウスの筋病理と筋力は回復する. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.23, 2012

【その他】

- 1) 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する研究の現況: 新たな治療のステージへ. 第12回ハッピースマイルクラブ例会NPO「デュシェンヌ型筋ジストロフィー研究・治療開発支援機構」, 神戸, 3.2, 2013
- 2) 武田伸一: 筋ジストロフィーの核酸医薬開発. 大阪大学未来戦略機構第一部門超域イノベーション博士課程プログラム, 大阪大学大学院薬学研究科共同開催, 大阪, 3.14, 2013
- 3) 武田伸一: 筋ジストロフィーの分子治療について. 日本神経学会市民公開講座, 徳島, 1.20, 2013
- 4) 武田伸一: 疾患特異的iPS細胞を活用した筋骨格系難病研究. 疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究事業平成24年度全体報告会, 京都, 1.30, 2013
- 5) 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. 文部科学省再生医療の実現化プロジェクト(第2期)平成24年度成果報告会, 千代田区, 1.18, 2013
- 6) 永田哲也, 武田伸一: Duchenne型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法臨床治験への歩み. 精神・神経疾患研究開発費平成24年度筋ジストロフィー合同班会議, 千代田区, 1.11, 2013
- 7) 伊藤尚基, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素により誘起されるCa²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 精神・神経疾患研究開発費平成24年度筋ジストロフィー合同班会議, 千代田区, 1.11, 2013
- 8) 石浦章一, 小穴康介, 古戎道典, 永野花奈子, 趙一夢, 大澤奈摘, 大間陽子, 高橋正紀, 西野一三, 武田伸一: 筋強直性ジストロフィー治療薬のハイスループッ

- トスクリーニング。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.8, 2012
- 9) 倉岡睦季，木村円，中村昭則，永田哲也，岡田尚巳，武田伸一：Duchenne型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDjの血清オステオポンチン値は産出前から増加する。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.6, 2012
- 10) 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，西江敏和，増田千明，岡田尚巳：AAVベクターを用いた筋ジストロフィー犬への遺伝子導入と免疫寛容誘導法。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.6, 2012
- 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による重症DMDモデルdkoマウスに対する治療効果の検討—。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.6, 2012
- 12) 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。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.6, 2012
- 13) 深田宗一郎，山口賢彦，渡邊洋子，大谷拓史，Ma Yuran，上住聡芳，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—カルシトニン受容体による骨格筋幹細胞維持機構。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.5, 2012
- 14) 伊藤尚基，Urs Rugg，工藤明，鈴木友子，武田伸一：神経型一酸化窒素合成酵素により誘起されるCa²⁺シグナルが筋肥大を促進する。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.5, 2012
- 15) 二川健，河野尚平，山下結衣，安倍知己，平坂勝也，近藤茂忠，真板綾子，埜中征哉，武田伸一，長野圭介，奥村裕司：寝たきりや無重力による筋萎縮のメカニズムとその治療法の開発。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.5, 2012
- 16) 平坂勝也，池田千佳，春名真里江，前田翼，安倍知紀，宇都宮健郎，越智ありさ，真板綾子，近藤茂忠，奥村裕司，武田伸一：加齢による筋萎縮におけるミトコンドリア内カルシウム取り込み機構。国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議，千代田区，12.5, 2012
- 17) 齊藤崇，青木吉嗣，横田俊文，永田哲也，中村昭則，谷端淳，Stephanie M. R.

- Duguez, Kanneboyina Nagaraju, Eric P. Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: アンチセンスによるmdx52 マウスのエクソン45-55 スキップ治療. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012
- 18) 横田俊文, 永田哲也, 越後谷裕介, 中村昭則, 浦澤延幸, 小林正典, 齊藤崇, 青木吉嗣, Ashkan Nozohourmehrabad, Dharminder Panesar, Merryl Rodrigues, Ryszard Kole, Peter Sazani, Terence Partridge, Eric P. Hoffman, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィー新生仔犬に対するエクソン・スキッピング治療の効果. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012
- 19) 関根光雄, 鈴木真, 横内瑛, 岡庭夏己, 正木慶昭, 原川太郎, 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—筋ジストロフィー治療薬としての 2'-O-修飾RNAおよび構造改変したU1snRNAの創成. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012
- 20) 木村円, 林由起子, 森まどか, 中村治雅, 清水玲子, 小牧宏文, 西野一三, 川井充, 武田伸一: Remudy 患者情報登録の現状. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 23-4「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 24 年度班会議, 千代田区, 11.30, 2012
- 21) 武田伸一: 神経型一酸化窒素(nNOS)により誘起されるTRPV1 を介したCa²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 公益財団法人先端医療振興財団 医薬品開発研究グループセミナー, 神戸, 11.29, 2012
- 22) 竹内芙美, 米本直裕, 木村円, 中村治雅, 清水玲子, 小牧宏文, 森まどか, 林由起子, 西野一三, 川井充, 武田伸一: DMDに対するステロイド治療. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 23) 木村円, 中村治雅, 林由起子, 森まどか, 清水玲子, 小牧宏文, 西野一三, 川井充, 武田伸一: なぜ患者登録が必要か? 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 24) 齊藤崇, 永田哲也, 谷端淳, 増田智, 本橋裕子, 青木吉嗣, 横田俊文, 武田伸一: エクソン重複を有するDMD患者細胞に対するマルチ・エクソン・スキップによるジストロフィン発現誘導の検討. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 25) 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 田山学, 岡田尚巳, 武田伸一: Duchenne型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDJの血清オステオポンチンは, 誕生時から特徴的に増加する. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 26) 笠原優子, 喜納裕美, 岡田浩典, 千代智子, 坂翔太, 岡田尚巳, 武田伸一: 骨髄間質細胞を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の基盤研究. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 27) 林地のぞみ, 湯浅慎介, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一, 福田恵一: G-CSFを用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療法の開発. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3,

2012

- 28) 清水玲子, 小牧宏文, 玉浦明美, 細井薫, 大澤真木子, 武田伸一 : 国際共同神経筋疾患臨床試験グループ (CINRG) での多施設共同治験の経験. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 29) 武田伸一 : 臓器別誘導法の現状と今後の展望ー骨格筋ー. 再生医療の実現化プロジェクト 第5回夏のワークショッププログラム, 浜松, 9.13, 2012
- 30) 武田伸一 : Duchenne型筋ジストロフィーに対する分子治療の進歩. 第4回熱中神経内科セミナー, 京都, 7.28, 2012
- 31) 武田伸一 : 筋疾患治療の現状と未来. 旭化成ファーマ(株)社内講演会, 静岡, 7.13, 2012
- 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24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, 小平市, 4.1, 2012

特願 2012-043092, PCT/JP2012/084295, 2012年12月27日PCT出願

- 5) 武田伸一, 永田哲也, 他 : アンチセンス核酸. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2012-531987, PCT/JP2011/070318, 米国, 欧州, 中国, 韓国, オーストラリア, カナダ, インド, ロシアにPCT指定国移行手続き中
- 6) 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. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2011-092252, PCT/JP2012/060229, 2012年4月16日PCT出願
- 7) 岡田尚巳, 武田伸一, 千代智子 : 遺伝子取り込み増強剤. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2012-088035, PCT出願手続き中

2. 実用新案登録
なし

3. その他、特記事項
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

出願

- 1) 武田伸一, 伊藤尚基, Urs Rugg, 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. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2011-200716, 2011年9月24日国内出願, 2012年3月21日PCT出願
- 2) 武田伸一, Urs Rugg, 鈴木友子, 伊藤尚基 : 筋増加剤, 及び筋増加物質のスクリーニング方法. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2012-063182, 2012年3月21日国内出願, PCT出願手続き中
- 3) 武田伸一, 伊藤尚基, Urs Rugg, 鈴木友子 : 筋増加剤及びそれを含む医薬組成物. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2013-015927, 2013年1月30日出願
- 4) 武田伸一, 永田哲也, 他 : アンチセンス核酸. 国立精神・神経医療研究センター,

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

エクソン 53 スキップによる DMD 治療薬の
早期探索的臨床試験のプロトコール作成について

研究分担者 永田 哲也
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 室長

研究要旨

エクソン 53 スキップによる Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 治療薬の早期探索的臨床試験のプロトコール (治験実施計画書) を作成した。治験薬についてこれまでに得られた非臨床試験の結果、単施設で組み込み可能な被験者数、および想定される最長投与期間・最高投与量などを考慮した。また、先行する類薬の臨床試験結果等も参考にしつつ検討を行った。医薬品医療機器総合機構との相談を経て、最終的に治験届として提出予定のプロトコール概要について報告する。

A. 研究目的

エクソン 53 スキップによる Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 治療薬の開発は、平成 21 年度より製薬企業との共同研究を開始し、平成 23 年度までには開発候補物質を特定するに至った。同年度より、当時の検討に基づいて計画された早期探索的臨床試験 (proof of concept、以下 POC 試験) の骨子を踏まえ、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との薬事戦略対面助言を実施し、臨床試験実施までに求められる非臨床試験の内容を確認した。平成 24 年度には、追加された非臨床試験結果に基づいて、治験薬の特性に関する新たな知見が集積されるとともに、また臨床試験実施にあたって組み入れ可能な症例数、投与方法、投与期間等についてより詳細な分析・検討が行われた。これらの検討を通じて、平成 25 年度内に早期探索的臨床試験を開始するために、プロトコール (治験実施計画書) の内容をほぼ最終案としてまとめたのでこれを報告する。

B. 研究方法

主に以下の資料等に基づき、国立精神・神経医療研究センター内に設置されたプロトコール検討委員会が治験実施計画書の作成に向けた検討を行った。

1. 被験薬の非臨床試験成績
2. 開示されている類薬の非臨床試験・臨床試験結果
3. DMD に関する患者統計、診療ガイドライン等の文献

POC の主評価項目は安全性、副次的評価項目は治療薬によるジストロフィン発現および薬物動態とした。計画書案は PMDA との薬事戦略対面助言に資料として提出し、PMDA との相談を経て必要な修正が行われた。

C. 研究成果

プロトコール作成に係る検討内容については、現時点では全て開示できない事項も含まれるため、主要な論点とその検討結果について以下に示す。

1. 投与方法に関する検討

平成 24 年度末現在、エクソン・スキップによる DMD 治療薬として 2 剤の治験が進行している。GlaxoSmithKline (GSK) 社と Prosensa 社が共同開発中の Drisapersen (PRO051, GSK2402968) は 2'O-メチル製剤のエクソン 51 スキップ治療薬として、現在日本も含め世界 23 カ国で第Ⅲ相試験が進行中である。副作用としてタンパク尿を認めるが、48 週間投与の結果、6 分間歩行距離の延長が報告されている^a。また Sarepta therapeutics 社が開発中の Eteplirsen (AVI-4658) はモルフォリノ製剤のエクソン 51 スキップ治療薬で、現在米国で第Ⅱa相試験が進行中である。これまで投与された被験者数は Drisapersen より少ないものの臨床的に有意な副作用は認めず、74 週投与の時点で 6 分間歩行距離の延長が報告されている^b。用法は、Drisapersen は皮下投与、Eteplirsen は静脈内投与として、週 1 回全身投与となっている。我々の開発候補物質はモルフォリノ製剤ではあるが、配列は異なるため first in human 試験である。これまでモルフォリノ製剤については重篤な副作用は報告されていないこと、また臨床的有効性が確認されている投与経路・方法としては、いまのところ静注による複数回投与が必要であることから、実際の投与経路に即した薬物動態データの収集が重要と考えられた。局所投与および単回投与も試験デザインのひとつとして検討されたが、以上を踏まえ、本 POC は、静注による複数回投与を行うこととした。

2. 投与量に関する検討

a

<http://cureduchenne.com/blog/drisapersen-treatment-for-duchenne-muscular-dystrophy-results-of-a-randomized-double-blind-placebo-controlled-clinical-trial/>

b

http://investorrelations.sareptatherapeutics.com/p_hoenix.zhtml?c=64231&p=irol-newsArticle&ID=1803701

初回投与量は、サルを用いた毒性試験、DMD 患者細胞を用いた薬効試験等の成績から、無毒性量 (NOAEL)、推定最小薬理作用量 (MABEL) を算出し、これらに基づいた複数的手法により、安全面から適切な用量を検討した。その結果、動物種間の体表面積換算係数および安全係数、ならびに類薬である Eteplirsen で確認されている安全性等を考慮して、初回投与量は 1.25 mg/kg と算出された。本初回投与量に公比 4 を適用し、低用量群からそれぞれ 1.25, 5, 20 mg/kg のコホートを設定した。低用量のコホートから投与を開始し、同一被験者に反復静脈内投与を行い、当該コホートにおける安全性を確認後、次コホートへの投与を開始するデザインとした。

3. 投与期間に関する検討

モルフォリノ製剤である Eteplirsen の PI/IIa 試験では、12 週間、週 1 回の静脈内投与により、10 mg/kg 群は 4 例中 3 例、20 mg/kg 群は 4 例中 3 例で、ウェスタンブロットによる評価でジストロフィンタンパク質の発現増加が確認された⁽¹⁾。本治療薬が同じくモルフォリノ製剤であることから、薬効が同じであると仮定した場合、投与量 10~20 mg/kg、投与期間 12 週間であれば、同様の有効性が期待できると考えられた。投与量に関する前項の検討結果も踏まえて、本 POC で投与される最大用量は 20 mg/kg とした。なお Eteplirsen のプラセボ群に対する臨床的有効性 (歩行機能の改善) は、30 mg/kg/週、週 1 回 24 週投与で、初めて確認できたことが報告されており⁽²⁾、このことから 20 mg/kg、週 1 回 12 週投与では、ジストロフィンタンパク質の発現が確認できる可能性はあるが、臨床的な改善までは見込めないと考えられる。

4. ジストロフィン遺伝子の変異と組み入れ基準に関する検討

現在多くの DMD 患者は MLPA 法によるエクソン欠失または重複についての検査を受けて

いるため、これらの検査結果に基づいてエクソン 53 スキップの適否を判断することを想定した。しかしながら、ゲノム上のエクソンコピー数変化以外の、MLPA 法で同定出来ない変異を有する場合を想定し、被験者由来細胞を用いた *in vitro* アッセイで、治験薬の有効性（エクソン 53 スキップ、ジストロフィン発現）を確認できた場合に、最終的な組み入れ基準を満たすとした。なおこの点は、エクソン・スキップ治療は適応となる変異を有する患者のみに有効性を示し、正常者または適応外の変異を有する患者にとっては有効性を示さないという特性を踏まえ、被験者の適格性判定を倫理的に行うという観点も考慮したものである。またエクソン 53 には SNPs が存在することが報告されているため、被験薬の標的配列に SNPs が存在した場合に評価が困難になる可能性を考慮し、エクソン 53 に遺伝子多型が含まれる場合は組み入れ除外とすることとした。

5. 歩行不能 DMD 患者の組み入れに関する検討

本 POC 試験で所要の目的（安全性、ジストロフィン発現）が達成され、次相試験に進む場合、次相試験ではジストロフィン発現のみならず、歩行機能などの臨床的な改善が評価項目となるため、これらの評価に適した歩行可能な被験者は、次相試験に組み込まれることが適切と考えられた。当センターに通院実績のあるエクソン 53 スキップ適応 DMD 患者で、さらに心機能・呼吸機能が、治験に参加可能な程度まで維持できている患者数について精査した結果を踏まえ、本 POC では歩行不能者を原則として組み入れることとした。なお先行する Drisapersen の試験成績からは、歩行可能者と歩行不能者の間において、薬物動態プロファイルが異なる可能性は少ないこと^(3,4)、また Eteplirsen の試験成績からは、歩行可能者と歩行不能者を組み込んだ局所投与試験で、両群にジストロフィンタンパク質の発現が確

認できた被験者が含まれていたことが報告されている⁽⁵⁾。以上のことから、治験薬の安全性とジストロフィン発現を評価項目とする本 POC では、歩行不能者を原則として組み入れることによる試験デザイン上の問題点はないものと判断した。

D. 考察

以上を踏まえて作成された本 POC 試験のプロトコール概要は以下のとおりである。

主な選択基準

- 5 歳以上 18 歳未満の DMD 男児であること
- エクソン 53 スキップでイン・フレームに修正可能な変異を有すること（欠失エクソンの例：43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52）
- 原則として歩行不能であること
- 前脛骨筋からの生検が可能であること
- *in vitro* アッセイによりジストロフィン発現が確認できること

主な除外基準

- エクソン 53 に DNA 多型を有する
- 重度の心不全、呼吸不全を有する
- これまで他の治験薬の投与を受けている

デザイン

単一施設非盲検試験

投与量群

点滴静注、週 1 回 12 週間

- コホート 1 (1.25 mg/kg) 3 例
- コホート 2 (5 mg/kg) 3 例
- コホート 3 (20 mg/kg) 3~4 例

主な観察・検査項目

- 安全性（有害事象および副作用）
- ジストロフィンタンパク質の発現（免疫蛍光染色、ウェスタンブロット）
- エクソン 53 をスキップしたジストロフィン mRNA（RT-PCR、シーケンス）

- 被験薬の血漿中／尿中濃度

E. 結論

本稿で報告したプロトコールは、PMDA に対する治験届として提出される予定であるが、今後の審査過程により変更が生じる可能性がある。審査が予定どおり終了した場合、平成 25 年度内の試験開始が予定されている。また承認後の試験計画概要については、臨床試験登録サイトで公開されることとなっている。

参考文献

1. Cirak S, *et al.*, *Lancet*. 378:595-605, 2011
2. Mendell JR. RESULTS AT 62 WEEKS OF A PHASE IIB EXTENSION STUDY OF THE EXON-SKIPPING DRUG ETEPLIRSEN IN PATIENTS WITH DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY (DMD) - European Neuromuscular Centre (ENMC) Workshop Presentation, 2012
3. GlaxoSmithKline. Result Summary for DMD114673, 2012
4. GlaxoSmithKline. Result Summary for DMD114118, 2012
5. Kinali M, *et al.*, *Lancet Neurol*. 8:918-28, 2009

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

< 英文 >

【欧文原著】

- 1) Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Morita H, Nakajima T, Ozawa T, Aida I, Yonemochi Y, Higuchi S, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Ishihara T, Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Yatomi Y, Nagai R, Komuro I: Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy - Prospective multicenter cohort study. *Int J Cardiol*. 2013 1.17, [Epub ahead of print]
- 2) Yokota T, Nakamura A, Nagata T, Saito T, Kobayashi M, Aoki Y, Echigoya Y, Partridge T, Hoffman EP, Takeda S: Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther*, 22:306-315, 2012
- 3) Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, Duguez SMR, Nagaraju K, Hoffman EP, Partridge T, Takeda S: Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:13763-13768, 2012

II 学会発表

< 国外 >

【特別講演・シンポジウム】

- 1) Nagata T: Exon skipping approach; exon 45-55 skipping. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', Tokyo, Japan, JA Kyosai building, Conference hall, Tokyo, 9.7, 2012

【国際学会】

- 1) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Motohashi Y, Takeda S: Myogenic Transduction and Cell Surface Marker Selection of DMD Fibroblasts for Exon Skipping Assay. The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
- 2) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Shimizu-Motohashi Y, Takeda S: Myogenic transduction and cell surface marker selection of DMD fibroblasts enable stable dystrophin mRNA expression for exon skipping assay. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.17, 2012
- 3) Aoki Y, Nagata T, Nakamura A, Saito T, Tanihata J, Duguez S, Nagaraju K, Hoffman E, Partridge T, Yokota T, Takeda S: Demonstration of systemic exon 45-55

multiple skipping in dystrophic mdx52 mice. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.16, 2012

<国内>

【一般学会】

- 1) 谷端淳, 永田哲也, 齊藤崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: hDystrophin Δ 45-55 の機能的役割の解明. 第 67 回日本体力医学会, 岐阜, 9.14, 2012
- 2) 永田哲也, 青木吉嗣, 武田伸一: mdx 及び mdx52 マウスを用いた in vivo および in vitro でのエクソン・スキップ効率の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.24, 2012
- 3) 青木吉嗣, 永田哲也, 中村昭則, 齊藤崇, 谷端淳, Hoffman E, Partridge T, 横田俊文, 武田伸一: エクソン 45-55 スキップ治療により DMD モデルマウスの筋病理と筋力は回復する. 第 53 回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.23, 2012

【その他】

- 1) 永田哲也, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法臨床治験への歩み. 精神・神経疾患研究開発費平成 24 年度筋ジストロフィー合同班会議, 千代田区, 1.11, 2013
- 2) 倉岡睦季, 木村円, 中村昭則, 永田哲也, 岡田尚巳, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDj の血清オステオポンチン値は産出前から増加する. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5 「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.6, 2012
- 3) 齊藤崇, 青木吉嗣, 横田俊文, 永田哲也, 中村昭則, 谷端淳, Stephanie M. R. Duguez, Kanneboyina Nagaraju, Eric P. Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: ア

ンチセンスによる mdx52 マウスのエクソン 45-55 スキップ治療. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5 「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012

- 4) 横田俊文, 永田哲也, 越後谷裕介, 中村昭則, 浦澤延幸, 小林正典, 齊藤崇, 青木吉嗣, Ashkan Nozohourmehrabad, Dharminder Panesar, Meryll Rodrigues, Ryszard Kole, Peter Sazani, Terence Partridge, Eric P. Hoffman, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィー新生仔犬に対するエクソン・スキッピング治療の効果. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5 「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012
- 5) 関根光雄, 鈴木真, 横内瑛, 岡庭夏己, 正木慶昭, 原川太郎, 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—筋ジストロフィー治療薬としての 2'-O-修飾 RNA および構造改変した U1snRNA の創成. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5 「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.5, 2012
- 6) 齊藤崇, 永田哲也, 谷端淳, 増田智, 本橋裕子, 青木吉嗣, 横田俊文, 武田伸一: エクソン重複を有する DMD 患者細胞に対するマルチ・エクソン・スキップによるジストロフィン発現誘導の検討. 第 7 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 7) 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 田山学, 岡

田尚巳，武田伸一：Duchenne型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDJの血清オステオポンチンは，誕生時から特徴的に増加する．第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会，鎌倉，11.3, 2012

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：アンチセンス核酸．国立精神・神経医療研究センター，特願 2012-043092，PCT/JP2012/084295，2012年12月27日PCT出願
- 2) 武田伸一，永田哲也，他：アンチセンス核酸．国立精神・神経医療研究センター，特願 2012-531987，PCT/JP2011/070318，米国，欧州，中国，韓国，オーストラリア，カナダ，インド，ロシアにPCT指定国移行手続き中

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

ヒトジストロフィンのエクソン 53 における一塩基多型の検討

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

アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を用いたエクソン・スキップ治療においては、効果的なスキップを起こす配列が非常に重要である。一方で、ヒトゲノムには一塩基多型が存在しており、その多型が標的配列に存在する場合はスキップの障害となりうる。今回、我々はエクソン 53 スキップ治療薬開発にあたり、ヒトジストロフィン・エクソン 53 の一塩基多型の有無を検索した。その結果、3 か所に一塩基多型を認め、我々が標的とする配列部位にも一塩基多型が存在することが判明した。今後、臨床試験を実施する際には、被験者のエントリー時にエクソン 53 のシークエンスを行い、一塩基多型を検索する必要があると考えられた。

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。治験薬の標的領域に一塩基多型 (SNP) が存在した場合、スキップ効率の低下が予想される。今回はヒトジストロフィン・エクソン 53 での SNP を検討した。

B. 研究方法

下記データベースにてヒトジストロフィン・エクソン 53 に対する検索を行った。

dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)

JSNP (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)

THE SNP CONSORTIUM (<http://snp.cshl.org/>)

C. 研究成果

上記データベースを用いて検索したところ、ヒトジストロフィン・エクソン 53 においては下記の 3 か所に SNP が報告されている。

rs200571671 c.7716G>A
(NM_004006.2) 頻度 0.0006%

rs1801188 c.7728C>T
(NM_004006.2) 頻度 0.2001%

rs72466581 c.7820A>T
(NM_004006.2) 頻度 記載なし

上記 SNP のうちの一つは、治験薬の標的部位に存在する。

D. 考察

開発中のエクソン 53 スキップ治療薬に対して被験者の pre-mRNA と二重鎖を作る際に問題となる SNP が判明した。一塩基の違いで結

合能が 20 倍程度落ちることが予測されるために、頻度自体は少ないが、臨床試験で効果を見るうえで、この多型を持つ被験者は除外する必要がある。これ以外にも、頻度の低い多型が存在する可能性も除外できないために、被験者のエントリー時にエクソン 53 のシーケンスを行い、一塩基多型を検索する必要があると考えられた。

E. 結論

ヒトジストロフィン・エクソン 53 において、3 か所に一塩基多型を認め、我々が標的とする配列部位にも 1 か所に一塩基多型が存在した。臨床試験を実施する際には、被験者のエントリー時にエクソン 53 のシーケンスを行い、一塩基多型を検索する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

- 1) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Baba Y, Watanabe S, Takeda S, Okada T: Robust long-term transduction of common marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9. *Mol Ther-Nucleic Acids*. (in press)
- 2) Baba Y, Satoh S, Otsu M, Sasaki E, Okada T, Watanabe S: In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explants culture. *Biochimie*, 94:2716-2722, 2012
- 3) 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. *Mol Ther*, 20:1384-1392, 2012

【欧文著書】

- 1) Okada T: Efficient AAV vector production system: Towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. In *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (ed. by Francisco Martin), InTech, Croatia, 429-449, 2012

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

- 1) Okada T: AAV vector-mediated micro-dystrophin transduction with immune-modulation to improve DMD phenotype, 9th Japanese-French Symposium for, 'muscular dystrophy' Tokyo, Japan, JA Kyosai building, Conference hall, Tokyo, 9.7, 2012

【国際学会】

- 1) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Strategy for efficient generation of DMD model marmoset with rAAV-mediated transduction. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.29, 2012
- 2) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin J-H, Okada T, Takeda S: Effective transgene expression in non-human primate muscle with AAV type9 vectors following immune suppression. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.29, 2012
- 3) Hayashita-Kinoh H, Okada H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective transfer of morpholino into muscle cells by using AAV empty capsids. Japan Society of Gene Therapy 2012 18th Annual meeting, Kumamoto, Japan, 6.28, 2012
- 4) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Hosoyama-Ohshima S, Okada H,

Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate into myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012

- 5) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Strategy for rAAV-mediated transduction of common marmoset skeletal muscle to generate NHP DMD model. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.19, 2012
- 6) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Okada T, Takeda S: rAAV8/9-Mediated Muscle Transduction with Tacrolimus in Non-Human Primate. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.19, 2012
- 7) Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S: rAAV9-Mediated Microdystrophin Gene Transfer with Immune Tolerance Induction Improves Dystrophic Phenotype of Canine X-Linked Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.17, 2012

<国内>

【一般学会】

- 1) 笠原(仁田原)優子, 喜納(早下)裕美, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: 炎症を伴った筋ジストロフィーモデルマウスの作製と病態解析. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 12.16, 2012
- 2) 笠原(仁田原)優子, 喜納(早下)裕美, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: IL-10欠損筋ジストロフィーモデルマウスの作製と炎症病態解析. 第35回日本分子生

物学会, 福岡, 12.14, 2012

- 3) 本橋秀之, 岡田浩典, 岡田尚巳, 石橋英俊: 非ヒト霊長類における卵巣ガラス化保存および未成長卵母細胞の体外培養. 第57回日本生殖医学会, 長崎, 11.8-9, 2012
- 4) 本橋秀之, 岡田浩典, 岡田尚巳, 石橋英俊: マーモセット卵巣組織凍結保存および未成長卵母細胞への遺伝子導入. 第105回日本繁殖生物学会大会, 筑波, 9.5, 2012

【その他】

- 1) 増田千明, 岡田尚巳: ウイルスベクターを用いたアルツハイマー病モデルマーモセットの開発. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費「神経・筋疾患の解明のための霊長類モデル開発に関する研究」(主任研究者: 関和彦) 平成24年度班会議, 小平市, 1.8, 2013
- 2) 岡田浩典, 岡田尚巳: AAVベクターを用いた遺伝子改変マーモセットの作出と筋疾患モデル動物の開発. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費「神経・筋疾患の解明のための霊長類モデル開発に関する研究」(主任研究者: 関和彦) 平成24年度班会議, 小平市, 1.8, 2013
- 3) 倉岡睦季, 木村円, 中村昭則, 永田哲也, 岡田尚巳, 武田伸一: Duchenne型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDjの血清オステオポンチン値は産出前から増加する. 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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24年度班会議, 千代田区, 12.6, 2012
- 4) 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, 西江敏和, 増田千明, 岡田尚巳: AAVベクターを用いた筋ジストロフィー犬への遺伝子導入と免疫寛容誘導法. 国立精神・神経医

療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 22-5「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 24 年度班会議, 千代田区, 12.6, 2012

- 5) 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 田山学, 岡田尚巳, 武田伸一: Duchenne型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDJの血清オステオポンチンは, 誕生時から特徴的に増加する. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012
- 6) 笠原優子, 喜納裕美, 岡田浩典, 千代智子, 坂翔太, 岡田尚巳, 武田伸一: 骨髄間質細胞を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の基盤研究. 第7回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 鎌倉, 11.3, 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

出願

- 1) 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. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2011-092252, PCT/JP2012/060229, 2012 年 4 月 16 日PCT出願
- 2) 岡田尚巳, 武田伸一, 千代智子: 遺伝子取り込み増強剤. 国立精神・神経医療研究センター, 特願 2012-088035, PCT出願手続き中

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

症例集積性向上のための検討

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 Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者全体の 9.9% 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。当センターでは現在エクソン 53 スキップ薬の開発を行っており、プロトコルの概要が決まり、来年度に医師主導治験を開始する見込みとなっている。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を調べるとともに、患者レジストリー、治験ネットワークを用いた症例集積性の向上に関する方策を検討した。

B. 研究方法

当院小児神経科に受診歴のある DMD 患者 207 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

207 名のうち 21 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: 6 名、49-52 欠失: 3 名、50-52 欠失: 2 名、52 欠失: 4 名であった。患者の年齢は 0~4 歳: 2 名、5~12 歳: 12 名、13~20 歳: 7 名であった。歩行可能患者は 12 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 II 相、第 III 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治験の継続は困難であり、筋ジストロフィー患者レジストリー

(REMUDY) を用いた患者リクルート、今年度設立した希少疾病の治験ネットワークである筋ジストロフィー臨床試験ネットワークを用いた症例組み入れを検討する必要がある。REMUDY に登録されているジストロフィノパチー患者は 1200 名近く、筋ジストロフィー臨床試験ネットワークで把握されている DMD 患者数は約 1500 名であり、それぞれを有効に活用することによって、今回のような遺伝子変異に特定された希少疾病の臨床試験における症例組み入れを効率よく行うことが可能となることが期待される。

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

I 論文発表

なし

II 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし