

201224104B

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)

未熟終止コドンの抑制による

筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立

平成22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 松田 良一

平成25 (2013) 年 5月

はじめに

リードスルー薬物による治療法は、mRNAの翻訳機構に干渉することで正常機能タンパク質の発現を回復させる試みとして国際的に注目されている。本治療法は遺伝子治療や核酸医薬によらず、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィン回復のための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。ベッカー型症例の知見から、正常量の20%に相当するジストロフィンを合成させることができれば筋ジストロフィーの進行を遅延させ、患者様のQOLの向上と延命を図ることが期待できるため、人類福祉への直接的還元として大きく寄与するものと考えられる。

本研究「未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立」では、リードスルー誘起物質の探索と有機化学的展開から薬物候補を増やし、モデル動物や患者様由来細胞を用いた薬効薬理試験を実施した。研究事業を完了し、以下の研究成果を得たので報告する。

- ・ ネガマイシン類似低分子化合物#2は患者様由来細胞でも効果を確認し、#3と#4についてモデル動物で治療効果を確認した。
- ・ 生体内での顕著なリードスルー活性を示すネガマイシン誘導体TCP112やTCP126等の合成に成功した。
- ・ 経口吸収性に優れ、臨床使用の実績から安全性も担保されている抗菌剤から新規に複数の薬物候補を特定した。
- ・ アルベカシンを筋ジストロフィーモデルマウスに投与することで、生化学的・免疫組織化学的・運動機能解析学的に治療効果を認め、患者様由来ヒト筋細胞においても最大32%のジストロフィン発現回復を確認した。治療の科学的証拠を得るため、アルベカシンについて医師主導治験を準備した。
- ・ 通常は皮膚を透過しないアミノグリコシドや抗がん剤の経皮投与方法を開発した。

本研究実施にあたり、平成24年度厚生労働省科学研究費「障害者対策総合研究事業」のご援助を頂いたことに深く感謝致します。

平成25年5月13日 研究代表者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）
交付額平成22～24年度 40,227,000円也（うち間接経費 6,513,000円）

目次

I. 総合研究報告

未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の

臨床応用基盤の確立 松田良一1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表21

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況24

III. 研究成果の刊行物・別刷25

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

未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立
研究代表者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科 教授

研究要旨

ナンセンス変異はDNAに1塩基置換が生じ、アミノ酸コードが終止コドンに変化して機能的タンパク質が作られなくなる点突然変異である。この変異は全ての遺伝子にランダムに起こりうるため、重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。リードスルー療法は、薬物によりナンセンス変異を抑制し、翻訳を進行させて機能的タンパク質分子を作らせることで症状の改善を目指すものである。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は未だ有効な治療法が確立していない重篤な遺伝性筋疾患であり、一刻も早い臨床応用の実現が喫緊の課題となっている。リードスルー誘起物質はナンセンス変異の種類とその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くの候補物質を特定し、個々の患者様に最適なリードスルー誘起物質を選択かつ併用できるようにすることが求められている。

本研究の目的は、リードスルー誘起薬物候補を増やし、モデル動物や患者様由来ヒト筋細胞を用いた薬効薬理試験と安全性薬理試験を実施することで、薬開発コンセプトの実現性を確保し、その臨床応用基盤を固めることにある。

本研究事業において、有益なリードスルー作用をもつ薬物候補として、ネガマイシン類似低分子化合物#2,#3,#4、ネガマイシン誘導体TCP-112,TCP-126,N-3、既存の抗菌薬剤数種を特定することに成功した。また通常は皮膚を透過しないアミノグリコシドや抗がん剤の経皮投与方法を開発した。アルベカシンについて、治療の科学的証拠を得るため医師主導治験を平成25年度に始める準備をした。

分担研究者

斎藤加代子（東京女子医科大学附属遺伝子 医療センター 教授）
A. 研究目的

ナンセンス変異はDNAの塩基が1つ置換し、アミノ酸コードが終止コドンに変化する点突然変異である。ナンセンス変異の結果、未熟終止コドン (Premature Termination Codon) と呼ばれる異常な終止コドンが生じ、本来の翻訳終結部位より上流でタンパク質の生産が中断するため、適切な機能をもつ完全なタンパク質が合成されない。この変異は全ての遺伝子にランダムに起こりうるため、重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。遺伝性疾患のおよそ12%を占めるナンセンス変異型遺伝性疾患の種類は2,400種を超えることが明らかにされている。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy: DMD) は未だ有効な治療法が確立されず、対症的治療法に限定されている重篤な遺伝性筋疾患である。その発症頻度や臨床経過から、難病の中でも特に過酷な疾患として知られ、患者は20~30歳で呼吸筋や心筋まで筋の変性・壊死が進展した結果、呼吸不全又は心不全により死亡するのが通常である。DMDのナンセンス変異症例は本邦において患者数の19%を占めており、機能的な全長ジストロフィンタンパク質が合成されないために遺伝子欠損症状を呈し、進行性の筋力低下と筋萎縮を示している。この未熟終止コドンを薬物により抑制して翻訳を進行させ、正常機能を有するタンパク質分子の発現を回復させることで症状の改善を目指す治療法がリ

ードスルー療法である。本療法では、薬物によって翻訳機構に干渉し、生得のジストロフィン遺伝子を活かして正常機能タンパク質の発現を回復させるため、遺伝情報を変更したり体内に遺伝物質を導入することが無い。ジストロフィンタンパク質の発現自体が正常に制御されることで、その治療効果は大きくかつ副作用は少ないことが考えられるため、ナンセンス変異型筋疾患の有効かつ迅速な選択肢としてリードスルー療法は注目されている。本療法は、遺伝子治療や核酸医薬によらず、ナンセンス変異症例の包括的治療が可能な、独創的かつ斬新な概念に基づくものである。

これまでに薬物候補としてアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンや低分子化合物アタルレンなどが研究代表者ら以外から報告されている。ゲンタマイシンを用いた幾つかの治験が行われているが、その重篤な聴覚毒性や腎毒性のために制限があり、いずれも治療効果は低いのが現状である。しかしながらナンセンス変異の抑制による治療戦略の妥当性を支持する結果は得られており、投与前から少量のジストロフィンをもつ患児に対しての半年間の投与では、15%程度のジストロフィンの発現回復が見られている。また、2007年にSweeneyらが80万種の低分子化合物群から同定したアタルレンは、良好な忍容性が確認されたものの、後期第II相臨床試験において治療の有効性に関する科学的証拠が

得られずにその開発は中断している。そのため、現在まで国内外で承認されたナンセンス変異を抑制する薬剤は存在せず、その確立が喫緊の課題となっている。

リードスルー誘起物質は未熟終止コドンの種類とその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くの候補物質を特定し、個々の患者様に適したものを見出すことが求められている。そのため、独自のリードスルー活性解析系として作成したデュアルレポーター遺伝子導入マウス系統 (READマウス) やナンセンス変異型DMDのモデル動物 (mdxマウス), ナンセンス変異型DMD患者様由来筋細胞を用いて、これまでに特定した薬物候補の誘導体と既に上市されている薬剤のリードスルー誘起物質としての薬効評価を行い、薬開発コンセプトの実現性を確保し、その臨床応用基盤を固めることが本研究の目的である。

B. 研究方法

リードスルー活性の定量的検出系として、mdxマウスを用いることは不都合が多い。指標となるジストロフィンが巨大分子 (427KDa) であるためイムノブロットでの転写効率も低く、しかもその存在量は他の筋タンパク質に比べて少ないためである。そこで生体内でのリードスルー活性解析における薬効評価を定量化かつ効率化する目的で、 β ガラクトシダーゼ遺伝子とル

シフェラーゼ遺伝子を直列に並べ、mdxマウスエクソン23の未熟終止コドンを含む27塩基配列を挟んで繋いだデュアルレポーター遺伝子を作り、これをサイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーターにつないだコンストラクト (mdxマウスのエクソン23の未熟終止コドン前後12mer周辺配列を含む27mer) をマウス受精卵に導入し、TAA, TAG, TGAの3種類の未熟終止コドンをそれぞれ含む3系統のREADマウスを構築した。作出されたREADマウス全身切片のX-gal染色では、横隔膜を含む骨格筋や心筋での強い発現を確認しており、通常は β ガラクトシダーゼのみを翻訳するが、リードスルーが起きるとルシフェラーゼも翻訳され、ルシフェリン-ガラクトシダーゼとルシフェリンを用いてルミノメータにより測定することで、両酵素活性の比でリードスルー活性を表すことができる。このマウスを用いることで投与経路・量と標的組織別感受性 (リードスルー活性と薬物動態) を同時に評価できるため、単に薬効のみならず重篤な副作用をもたない薬物候補を特定することが可能である。またリードスルー誘起物質の投与経路毎ごとの薬効・動態を効率的かつ定量的に検討できる点でも独創性と優位性を示している。

薬効評価は、これまでに特定した薬物候補の誘導体や既に上市されておりリードスルー誘起活性が見込まれる薬剤等をREADマウスに一週間以上連日皮下投与し、投与終了時に大腿部/下腿部骨格筋組織抽出液のルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性をルミノメータで定量した。リードスルー誘起活性はルシフェラーゼ活性/ β -ガラクトシダーゼ活性として算出し評価した。同様に、リードスルー誘起活性を見出した薬物候補について、投与の経路・用量・間隔・期間の最適化について評価した。

特定したリードスルー誘起薬物候補については、mdxマウスへの4週間以上の投与を行い、生化学的・免疫組織化学的な薬効評価と運動機能回復試験を行った。具体的に、血清クレアチンキナーゼ活性、免疫組織化学やInGelWestern法によるジストロフィンタンパク質の蓄積といった臨床指標を用いた解析や、自発運動量・握力・疲労度の運動能力測定や、等尺性収縮張力、単収縮張力、強縮張力、筋力減衰率を指標とした機能回復について段階的に評価した。また患者様由来筋細胞を用いてそのジストロフィン発現回復を評価した。

患者様由来筋細胞については、研究協力者として神戸学院大学の松尾雅文教授と神戸大学の竹島泰弘特命教授、ネガマイシン

誘導体合成については、東京薬科大学の林良雄教授を加え研究を遂行した。

【分担】DMDを疑いMultiplex PCR法にてジストロフィン遺伝子の欠失・重複のスクリーニングが既に施行された253例のうち、変異が同定されなかった26例、変異エクソンの境界が明らかでなかった5例、計31例につきMLPA法を施行した。MLPA法では全79エクソンをカバーするプローブミックスP034およびP035/DMD (FALCO)を用いた。MLPA法でも異常を認めなかった9例については、全エクソンのダイレクトシーケンスあるいは生検筋組織mRNAから作成したcDNAのダイレクトシーケンスを行った。

【分担】確定診断のため筋生検を行ったDMD症例(c.9188C>T, R2982X)の骨格筋由来の初代筋細胞より培養筋細胞を樹立した。正常対照は、human skeletal muscle myoblast (Lonza社)を用いた。培養筋細胞をそれぞれ 1×10^4 cells/cm²に播種し、薬物候補#2を12日間投与した。予備実験の結果から100 μ g/mlを最適濃度とした。分化1~12日目におけるdystrophinと β -dystroglycanの発現をSensiTek HRP (ScyTek Laboratories)を用いて検出した。1次抗体はdys2 (Novocast), β -dystroglycan (Vector Laboratori-

es) を用い、ヘマトキシリン液で核染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施する動物実験はすべて東京大学教養学部実験動物委員会および東京大学動物実験委員会の承認を得ている。動物愛護の観点に配慮しつつ科学的観点に基づく適正な動物実験を実施するため、目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減、安全性評価に関する動物実験代替法の活用を徹底し実施を図っている。また、実験実施者の教育訓練等を通じて安全確保及び健康保持、自主管理の周知徹底とその情報公開を行い、施設及び設備における実験動物の飼養・保管・輸送についても適切な方法で維持管理し、適正な動物実験が実施されることに相当の注意を払い監督した。

患者様由来筋細胞培養は、検体採取時に神戸大学や東京女子医科大学の倫理委員会の承認を受けると共に患者様より文書同意を取得済みである。倫理的・法的・社会的問題に関わる全ての指針を遵守すること

で、研究が適正に推進されるよう十分に配慮した。

C. 研究結果/D. 考察

【分担】 MLPA法を施行した31例のうち、Multiplex PCR法にて既に欠失が判明していた5例は、MLPAによって欠失エクソンはより広範囲であったことが全例で証明された。Multiplex PCR法で異常がなかった26例中7例にMLPAによって新たな変異がみつかった(欠失3例、重複4例)。MLPAでも変異を検出しなかった症例のうち、3例に対して全エクソンダイレクトシーケンス、生検筋組織の得られていた14例に対してはcDNAのダイレクトシーケンスを施行し、ナンセンス変異9例(TGA:6例, TAG:1例, TAA: 2例)、ミスセンス変異1例、微小欠失4例、スプライシング異常3例を検出した。MLPA法は全エクソンをカバーして欠失・重複が一度に検出できる大変有用な方法であり、firstスクリーニングに適していると思われた。ダイレクトシーケンスによりナンセンス変異が検出できた症例の多くが(6/9)リードスルー誘導治療に最も適したストップコドン(PTC)のTGAを有しており、将来的な治療適応が期待された。微小変異の状態と臨床的重症度にdiscrepancyのある症例もあり、遺伝子診

断の精度向上は病態・治療法解明のヒントにもつながると思われた。

【分担】培養筋細胞は分化培地3日頃より融合し、次第に多核の細胞形態へ分化した。3~7日目に、様々な方向を向いていた細胞が一定の方向に配列した。10日目には核も連珠状に配列し帯状の筋管細胞へと分化した。分化培地3日目まではDMD患者筋細胞にdystrophin陽性細胞を認めないが、10,12日目にはdystrophinが染色された。 β -dystroglycanは0日目より陽性細胞を認めたが、薬物候補#2投与後、 β -dystroglycan陽性細胞が経時的に増加した。患者筋細胞は適切な培養条件で正常筋細胞に準じて増殖、分化した。dystrophin陽性細胞が7日目以降に発現、10日目以降で更に多くの陽性細胞が観察されており、in vitroにおける患者筋細胞の至適培養日数は10日以上12日未満と考えられた。薬物候補#2の適正量を至適期間投与したことでdystrophinタンパク合成が進み筋管細胞質中にdystrophinが発現したと考察され、本研究により薬物候補 100 μ g/mlの至適投薬日数はin vivoの培養日数と同期間の10日以降12日未満と結論した。Dystroglycan (MIM ID *128239)はdystrophinの関連蛋白(dystrophin-associated glycoprotein 1)の一つであり α -dystroglycanと β -

dystroglycanの2量体から構成される。 β -dystroglycanは筋細胞膜を貫通し細胞膜の裏打ちタンパク質であるdystrophinと結合してdystrophin-glycoprotein複合体(DGC)を構成する。DMDではdystrophinタンパクと筋漿膜の壊死により細胞外マトリックスの連結機能が障害されることでdystroglycanは低下すると考察される。本検討では β -dystroglycanは患者筋細胞において治療前より陽性細胞を認め、治療により陽性細胞の増加を認めた。Dystrophinの欠失ではDGCも完全には発現しないことで細胞骨格が緩み、タンパク分解が生じていたが薬物候補#2のリードスルー作用でdystrophinの合成が進み、DGCによる筋細胞骨格骨格の構築作用も構成されたと考えられる。

ヒト由来細胞にREADマウスで用いたコンストラクトを導入した培養系においてはアタルレンより高い効果を示したため、薬物候補#3については低毒性化と薬効の増強を目指し、末端官能基と不飽和結合部に着目した、活性発現に寄与する部位の特定を試みた。薬物候補#3のオレフィン部幾何異性体として、オレフィン体のメチルエステル部位をエチルエステル化、メチルエステル部位を1炭素伸長、不飽和結合部位を飽和結合へと変換、オレフィン部をシクロパン環に誘導、エステル部位をモノエステル

体へと変換（ネガマイシンのヒドラジンユニットと類似構造），ヒドラジン構造をアミド構造に変換，左翼カルボン酸部位と右翼エステル部位の位置を交差，ヒドラジド構造部位のメチルエステルのうち一方／全てをカルボン酸に変換したもの等々を合成した。READマウスにより薬効評価したところ，メチルエステルは活性発現に大きく関与していないこと，オレフィン部位はヒドラジド部位との共役構造をとることで活性発現に寄与している可能性があること，左翼ユニットのカルボン酸が活性発現に寄与している可能性があることを見出した。

研究代表者らが活性を見出した未承認抗生物質ネガマイシンの誘導体合成研究から，抗菌活性を示さないにも関わらず，(+)-ネガマイシンと同等あるいはそれ以上のリードスルー誘起作用を有する複数の誘導体の創製に成功した。5-deoxy-3-epi-negamycinや3-leucyl-5-deoxy-3-epi-negamycinは天然から単離されているにも関わらず，活性不明の化合物であった。グラムスケールの合成後にその薬効をREADマウスによる高次薬理評価したところ，リードスルー促進活性を示すことを発見するとともに，READマウスで用いたコンストラクトをサル腎臓由来COS7細胞に導入した培養系において薬効評価を行った。その結果，更なる構造活性相関研究からより強

力なTCP-112やTCP-126の創製にも成功した（特許出願済）。これらはネガマイシンが本来有している抗菌活性をほとんど示さず，薬効分離が進んだ化合物と位置づけられる。リードスルー治療では薬物の長期投与が必要となることから，耐性菌を生じやすい薬剤の使用には限界があり，この点からもネガマイシン誘導体は優れた潜在性を有していると言える。両者については，mdxマウスへ4週間連日投与し，ジストロフィン回復筋線維と血清クレアチンキナーゼ活性による薬効評価を継続中である。

ネガマイシン分子の立体構造に類似した薬物候補#2は，内服によっても活性を示し，SPF施設における単回・反復投与／回復試験による結果も良好である。DMD患者筋細胞を用いた薬効検証を行ったところ，ジストロフィタンパク質の発現回復と β -ジストログリカンタンパク質の発現促進が確認された。また，ネガマイシンの立体配位形成に適合する薬物候補#3と#4をREADマウスに皮下投与したところ，両者共に既知のリードスルー誘起物質であるゲンタマイシンやネガマイシンと同等以上のリードスルー活性を示した。次にmdxマウスへ3週間連日投与（50mg/kg/day）することで，それぞれ16.2%，18.8%のジストロフィン回復筋線維を確認した。さらに，血清クレアチンキナーゼ活性は，薬物候補#3や

#4を投与することでおよそ半分の値にまで有意に減少した。

薬物候補#4については内服によっても用量依存的な活性を示し、mdxマウスにおける握力測定からも改善傾向を示す結果を得たことから、SPF施設において急性・亜急性毒性を検討したところ、単回・反復投与共に体重、臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析において異常はみられず、安全性が極めて高いことを確認した。現在、製剤化を目指した溶解性・安定性・吸収性といった理化学的性状の改善を行っている。

動物用医薬品および飼料添加物として承認されているマクロライド系抗菌薬タイロシンにリードスルー活性があることを確認したことから、マクロライド系抗菌薬のリードスルー誘発物質としての薬効評価に重点的に取り組み、数多く存在する誘導体の網羅的探索から動物用医薬品16員環マクロライドの半合成物チルミコシンに際立った時間依存性のリードスルー誘起活性を見出した。マクロライド系抗菌薬は比較的副作用が少なく、細胞内への浸透性が高いという特長を持つため、薬効を発揮する上での利点がある。加えて、同様の作用機序を持ち、違う構造をもつ抗菌剤からも有益なリードスルー誘起活性を示す既存抗菌薬を特定した（特許申請準備中）。mdxマウスに

4週間連日皮下・経口投与することにより、ジストロフィンの発現回復やクレアチンキナーゼ活性の低下、筋組織の大小不同や結合組織の減少等の筋変性の軽減を確認した。本薬剤は経口吸収性に優れ、確立した安全性をもつ承認薬であるため、用途変更することで迅速な実用化が見込まれる。実地臨床上の弱点は、苦味が強いこととその強い匂いにより服薬コンプライアンスの維持が困難になり、不規則な服薬をすることで耐性菌の発生を助長してしまうことが指摘されている。軽視されがちではあるが、遺伝性筋疾患の場合、対象患者が低年齢のため深刻な問題である。またアミノグリコシドに代表される既知のリードスルー誘起物質は、経口・経皮投与による吸収が不可能であるため、筋疾患治療に用いる場合には筋崩壊が進行している組織にさらに障害を与える筋肉内や静脈内投与しか方法がなく、治療に伴う疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため化学的に皮膚透過促進処理をすることで、通常は皮膚を透過しない薬物に対する経皮投与を可能にする方法を既に確立している。その適用拡大を意図し、アントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質アドリアマイシン（ドキシソルビシン）を用いた経皮投与による抗がん作用を検討した。エールリッヒ腫瘍細胞を移植したヘアレスマウスに3週間連日抗がん剤を投

与し、その後取り出した腫瘍組織の大きさと重さを比較した。その結果、経皮投与された抗がん剤の皮膚からの浸透を確認し、経皮投与による有意な抗腫瘍効果も確認した。更に体重増加率から皮下投与に比べ安全性が高いことも示唆された。後述するアミノグリコシド系抗菌剤アルベカシンについても、皮下投与と同効率の経皮投与が可能なることを示す結果を得ている。本経皮吸収型薬物送達法の適用を検討することで、遺伝性筋疾患における長期投与中の在宅医療や嚥下困難な患者にとっても利便性の向上を提供できるだけでなく、初回通過効果や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化を提供できる点で魅力的である。

カナマイシン類抗生物質群の探索から、ジベカシンの1位アミノ基に(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基を導入することで減毒化した抗生物質、アルベカシンに強力なリードスルー活性があることを見出した。アルベカシンは1973年に微生物化学研究会によって合成され、1990年に抗メシチリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)薬として日本と韓国で上市されている承認薬であり、小児への適応も追加承認されている薬剤である。それ故、オフラベルユース(適応外使用)の要件を満たすことで早期に臨床の場に送り込める薬物となりうる。アルベカシンをmdxマウスに

2~3週間連日皮下投与することにより、ジストロフィンの発現回復、臨床指標であるクレアチンキナーゼ活性の低下、及び筋組織の大小不同や結合組織の減少等の筋変性の軽減、さらには握力、等尺性収縮による張力、筋疲労耐性のいずれも回復傾向にあったことを確認した。未熟終止コドンの抑制によりジストロフィンタンパク質の発現を誘導することで、日常活動での筋収縮による筋損傷を軽減し、過剰な炎症反応が抑制されていることが示唆される。またDMD患者由来の培養筋細胞を2週間処理することでジストロフィンの発現促進が見られ、その発現量は正常対照の最大32%に達することも確認した。両者ともリードスルー効果が最も得にくいことが示唆されているTAAナンセンス変異を有しているにも係わらず、DMDより症状の穏やかなベッカー型症例によく似たジストロフィンの発現様式がみられ、治療の有効性を支持する成績が得られた。そこで、薬事承認の取得に向けた開発をアルベカシンの製造販売を行っている大手製薬企業に要請したが、患者数が少なく採算性が取れないとの理由から実施協力を得ることができなかった。DMDは進行性の致死性疾患であり、一日も早く薬事承認を取得することが患者の治療に必須と判断し、適応外使用による医師主導型治験(プラセボ対照無作為化試験)として本剤

の開発に着手することとした。実施については日本小児神経学会から推薦を受け、日本医師会で実施する治験推進研究事業の「治験の計画」に参加が認められた。なお、治験薬提供者からも当該治験に対する協力の了解を得ており、本剤の製造販売業者からも治験薬提供者に対する薬剤及び非臨床試験成績の開示等の内諾を得ている。医薬品医療機器総合機構との対面助言に基づき、治験に関する評価項目の設定と実施体制の構築を行い、治験計画を確定することで医師会治験センター支援の下で医師主導治験の実施を計画している。

「アルベカシン1用量とプラセボの無作為化二重盲検比較試験」において現在までに検討した評価項目は、【有効性】ジストロフィン発現と身体機能障害の進行抑制に関わる有効性の証明、主要評価：筋生検によるジストロフィンタンパク質発現量、副次評価：ジストロフィン発現（量・有無・割合）、機能評価：動作機能障害度：North Star Ambulatory Assessment, 時間機能検査：6分間歩行, 10m 歩行(m/s), 階段の登りに要する時間, 仰臥位からの立ち上がりに要する時間, 徒手筋力検査：膝屈筋及び伸筋, 肘屈筋及び伸筋の合計, 定量的筋力検査：Hand hold dynamometerによる筋力検査, 活動量計による運動強度, 画像診断：IH MRSによ

る脂肪量評価, バイオマーカー（クレアチンキナーゼ, アルドラーゼ）, 【安全性】一般検査：診察・問診, 身体計測, バイタルサイン, 心機能検査：12誘導心電図, 心エコー 左室駆出率及び左室内径短縮率, 肺機能検査：スパイロメータ, ピークフローメータ, 努力性肺活量, %肺活量, 1秒量, 1秒率, 最大呼気流速, 最大咳嗽流速, 聴覚検査：純音聴覚検査, 歪成分耳音響放射検査, 聴性脳幹反応, 平衡感覚検査：注視眼検査・非注視眼検査, 臨床検査：血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査・ビタミンK分画及びB類, 抗ジストロフィン抗体, 有害事象（自覚症状, 他覚所見）である。

副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン）は、対処療法として現在大多数の患児に投与されている。アルベカシンとの併用療法を鑑み、副腎皮質ステロイドとの相乗効果を検討したところ、mdxマウスへの4週間の投与では有意な治療効果は認められなかった。

E. 結論

DMDは医療需要の高い重篤な遺伝性筋疾患である。しかも正常量の20%に相当するジストロフィンの回復によって病態進行の遅延とQOLの向上や延命が期待できる。そのため、ナンセンス変異に起因する全ての

疾患の包括的薬学療法ともなるリードスルー療法は、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける迅速かつ有効な選択肢と考えられる。本研究で特定し薬効薬理試験を行っているネガマイシン誘導体、アルベカシン、マクロライド系抗菌薬等々はリードスルー療法を確立するための重要な薬物候補である。リードスルー誘起物質は、ナンセンス変異の種類およびその周辺配列に対する特異性が異なる。したがって、より多くの治療薬候補物質を特定し、個々の患者様に最適な治療戦略を選択かつ併用できるようにすることが求められている。それ故、出来る限り薬物候補を増やし、その臨床応用基盤を固めることを今後も目指していくつもりである。また、既承認薬から特定したアルベカシン以外の治療薬候補の相乗（増強）効果や減毒効果を狙った併用療法の可能性を検討することで、アルベカシンのリードスルー治療薬としての承認可能性を追求すると共に、先行するアルベカシンと同様の手法で開発を進めることで、可及的速やかに臨床応用の実現と治療法の向上が得られると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe K, Fujiyama T, Mitsutake R, Watanabe M, Tazaki Y, Miyazaki

T, and Matsuda R. Fabrication of growth factor array using an inkjet printer. In “Cell and Organ Printing”. Ringeisen BR, Spargo BJ, and Wu PK ed., pp 203-222. Springer 2010

Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, and Matsuda R. Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. 50th Anniversary Symposium “Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy” Takeda S. ed., National Center of Neurology and Psychiatry, pp93-102, 2011

Wada E, Kikkawa N, Yoshida M, Date M, Higashi T, and Matsuda R: Effects of dietary phosphate on ectopic calcification and muscle function in mdx mice. In “Muscular Dystrophy” In Tech d.o.o. Croatia. pp.217-234, 2012

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K,

- Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J. Biochem.* 147: 463-470, 2010
- Nagata Y, Honda Y, and Matsuda R. FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation. *Cell Struct. Funct.* 35: 63-71, 2010
- Shima A, Pham J, Blanco E, Barton ER, Sweeney HL, and Matsuda R. IGF-I and vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. *Exp. Cell Res.* 317: 356-366, 2011
- Tokura Y, Nakayama Y, Fukada SI, Nara N, Yamamoto H, Matsuda R, and Hara T. Muscle injury-induced thymosin {beta}4 acts as a chemoattractant for myoblasts. *J. Biochem.* 149: 43-48, 2011
- Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, and Matsuda R. Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol. Cell Biochem.* 350: 1-11, 2011
- Wagatsuma A, Shiozuka M, Kotake N, Kawachi T, Honda Y, Mabuchi K, Matsuda R, and Yamada S: Pharmacological inhibition of HSP90 activity negatively modulates myogenic differentiation and cell survival in C2C12 cells. *Mol. Cell Biochem.*, 358: 265-280, 2011
- Aoki R, Sato H, Katsura T, Utsugi K, Koizumi H, Matsuda R, and Maki A. Relationship of negative mood with prefrontal cortex activity during working memory tasks: An optical topography study. *Neurosci. Res.* 70: 189-196, 2011
- Taguchi A, Nishiguchi S, Shiozuka M, Nomoto T, Ina M, Nojima S, Matsuda R, Takahashi Y, Nonomura Y, Kiso Y, Yamazaki Y, Yakushiji F,

- and Hayashi Y: Identification of negamycin analogs with reathrough activity for Duchenne muscular dystrophy chemotherapy. ACS Med. Chem. Lett. 3: 118-122, 2012
- Sato H, Aoki R, Katsura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation of within-individual fluctuation of depressed mood with prefrontal cortex activity during verbal working memory task: optical topography study. J. Biomed. Opt., 16: 126007, 2012
- Aoki R, Sato H, Katura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation between prefrontal cortex activity during working memory tasks and natural mood independent of personality effects: An optical topography study. Psychiatry Res. 212: 79-87, 2013
- Shiozuka M, Nonomura Y, and Matsuda R: Transdermal delivery of adriamycin to transplanted Ehrlich ascites tumor in mice. Submitted
- 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一 経皮吸収型薬物送達の新展開, 生体の科学 61: 636-640, 2010
- 塩塚政孝, 松田良一 筋ジストロフィーに対するリードスルー治療, 生体の科学 62: 134-137, 2011
- 塩塚政孝, 松田良一 ストップコドン読み飛ばしによる遺伝疾患の治療-デュシェンヌ型筋ジストロフィーを中心に, BRAIN and NERVE 63: 1253-1260, 2011
2. 学会発表
- 吉川奈美子, 松田良一, 小暮敏博, 塩塚政孝, Mdxマウス骨格筋の異所的石灰化, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)
- 島亜衣, Burton ER, Sweeney HL, 松田良一, ビタミンCとIGF-Iは低温におけるマウス骨格筋細胞分化を回復させる, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)
- 塩塚政孝, 我妻玲, 川本忠文, 佐々木博之, 野々村禎昭, 松田良一, 皮膚外用剤を用いたナンセンス変異型遺伝性疾患の新しい治療法, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

塩塚政孝, 我妻玲, 吉田瑞子, 野々村禎昭, 松田良一, ナンセンス変異を抑制する分子による筋ジストロフィーマウスの機能回復, 日本動物学会第81回大会 (2010)

吉田瑞子, 石井亜紀子, 伊達宗宏, 和田英治, 和田圭司, 松田良一, 高カルシウム食餌は筋ジストロフィーマウスの筋崩壊を抑制する, 日本動物学会第81回大会 (2010)

島亜衣, エリザベス・バートン, リー・スウィニー, 松田良一, IGF-IとビタミンCは低温におけるマウスおよびヒト骨格筋細胞分化を促進する, 日本動物学会第81回大会 (2010)

長田洋輔, 松田良一, スフィンゴシン-1-リン酸によって媒介される筋衛星細胞活性化, 日本動物学会第81回大会 (2010)

Kikkawa N, Ohno T, Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, and Matsuda R. Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. The Ottawa conference on New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle (2010)

Shima A, Barton ER, Sweeney HL, Matsuda R, Mouse and human skeletal muscle cells differentiate in

a temperature-dependent manner. The 15th International congress of World Muscle Society (2010)

Shiozuka M, Wagatsuma A, Yoshida M, Nonomura Y, and Matsuda R. Pharmacological nonsense suppression leads to the restoration of dystrophin in mdx mice. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting (2010)

田口晃弘, 伊奈真友子, 野本貴雄, 山崎有理, 薬師寺文華, 塩塚政孝, 松田良一, 高橋良和, 野々村禎昭, 林良雄, デュシェンヌ型筋ジストロフィー克服を目指したネガマイシン誘導体開発研究, 第9回バイオテクノロジー国際会議若手研究者発表大会 (2010)

田口晃弘, 伊奈真友子, 山崎有理, 薬師寺文華, 塩塚政孝, 松田良一, 野々村禎昭, 林良雄, 5-epi-ネガマイシンの合成と生物活性, 第54回日本薬学会関東支部大会 (2010)

伊奈真友子, 田口晃弘, 野本貴雄, 山崎有理, 薬師寺文華, 塩塚政孝, 松田良一, 野々村禎昭, 林良雄, リードスルー活性を有するネガマイシン誘導体の合成研究, 第54回日本薬学会関東支部大会 (2010)

- 伊奈真友子, 野本貴雄, 塩塚政孝, 田口晃弘, 西口茂信, 山崎有理, 薬師寺文華, 木曾良明, 野々村禎昭, 松田良一, 林良雄, リードスルー活性を有するネガマイシン誘導体N3の合成と生物活性評価, 第29回メディシナルケミストリーシンポジウム (2010)
- Ina M, Nomoto T, Shiozuka M, Taguchi A, Yamazaki Y, Yakushiji F, Kiso Y, Nonomura Y, Matsuda R, and Hayashi Y. Synthesis and biological evaluation of dipeptidic antibiotics(+)-Negamycin and its derivatives for Duchenne muscular dystrophy chemotherapy. 5th International Peptide Symposium (2010)
- 塩塚政孝, 吉田瑞子, 野々村禎昭, 松田良一: 筋ジストロフィーの症状改善を目指したナンセンス変異の薬理的抑制, 日本動物学会第82回大会 (2011)
- 野々村禎昭, 大日方昂, 塩塚政孝, 松田良一: ニワトリ胚胸筋発生におけるプログラム細胞死, 日本動物学会第82回大会 (2011)
- 和田英治, 吉田瑞子, 伊達宗宏, 松田良一: リン摂取がmdxマウスに及ぼす影響, 日本動物学会第82回大会 (2011)
- 大橋和也, 長田洋輔, 松田良一: 筋衛星細胞活性化に関する情報伝達系と温熱刺激の影響, 日本動物学会第82回大会 (2011)
- 長田洋輔, 大橋和也, 松田良一: 上皮細胞成長因子による筋衛星細胞の活性化はスフィンゴシン-1-リン酸を媒介する, 日本動物学会第82回大会 (2011)
- 和田英治, 吉田瑞子, 伊達宗宏, 古寺敏子, 松田良一: リン食摂取がmdxマウス異所的石灰化と筋機能に与える影響, 第11回 東京大学生命科学シンポジウム (2011)
- 大橋和也, 長田洋輔, 松田良一: 筋衛星細胞活性化刺激の探索とその情報伝達系の研究, 第11回 東京大学生命科学シンポジウム(2011)
- Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, and Hara T: Ectopic expression of Lhx2 in muscle satellite cells inhibits

their myotube differentiation. 第34
回分子生物学会年会 (2011)

Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong
S, Wagatsuma A, Nonomura Y, and
Matsuda R: Novel
chemotherapeutic agents for
readthrough of nonsense mutations
in muscular dystrophy. Gordon
Research Conference (2011)

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M,
Yoshida M, Nonomura Y, and
Matsuda R: Arbekacin as a
therapeutic readthrough induce for
treatment of nonsense
mutation-mediated Duchenne
muscular dystrophy. The American
Society for Cell Biology 51st Annual
Meeting (2011)

Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, and
Hara T: Ectopic expression of Lhx2
in muscle satellite cells inhibits
their myotube differentiation. The
American Society for Cell Biology
51st Annual Meeting (2011)

Wada E, Yoshida M, Date M, Higashi
T, and Matsuda R: Effects of Dietary
Phosphate on Ectopic Calcification
and Muscle Function in mdx Mice.
The American Society for Cell
Biology 51st Annual Meeting (2011)

Ohashi K, Nagata Y, and Matsuda R:
PI3K and Akt play an essential role
for quiescent myogenic cell
activation. The American Society
for Cell Biology 51st Annual
Meeting (2011)

Wada E, Yoshida M, Date M, and
Matsuda R: Effects of Dietary
Phosphate on Extensive Ectopic
Calcification in mdx Mouse Skeletal
Muscle and Muscle Function. 16th
World Muscle Society (2011)

Taguchi A, Shiozuka M, Yamazaki Y,
Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y:
Development of (+)-Negamycin
Derivatives with Potent
Readthrough Activity for Duchenne
Muscular Dystrophy Chemotherapy,
第48回ペプチド討論会 (2011)

Taguchi A, Ina M, Shiozuka M, Sakurai Y, Hiroshima M, Kamiya M, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y: Development of Readthrough Peptidomimetics from Dipeptidic Antibiotics (+)-Negamycin for Duchenne Muscular Dystrophy Chemotherapy, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2011)

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Date M, Nonomura Y, and Matsuda R: Arbekacin as a therapeutic readthrough induce for treatment of nonsense mutation-mediated Duchenne muscular dystrophy. The 11th Annual Scientific Meeting of the AOMC, 2012

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Date M, Nonomura Y, and Matsuda R: Arbekacin suppress nonsense mutations in mouse model and human cells of Duchenne muscular dystrophy. The 5th New directions in biology and

disease of skeletal muscle meeting, 2012

Nagata Y, Ohashi K, Matsuda R: Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell activation. Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells FASEB Science Research Conferences, 2012

Eiji Wada E, Yoshida M, Date M, Nagata Y, Nonaka I and Matsuda R: Dietary phosphate intake and exercise-induced stress induce severe muscle necrosis in adult mdx mice. World Muscle Society, 2012

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Takeshima Y, Taguchi A, Hayashi Y, Yakushiji F, Yamazaki Y, Yoshida M, Nonomura Y, and Matsuda R: Recent progress on readthrough research -Arbekacin and Negamycin-related compounds as promising readthrough-drug. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012