

201224112A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田伸一

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成25(2013)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. エクソン45-55スキップの <i>mdx52</i> を用いた検討	----- 17
武田 伸一	
2. 筋線維へのモルフォリノ人工核酸取り込み機構の解明	----- 27
永田 哲也	
3. GFPベクターを用いたエクソン・スキップの検討	----- 33
岡田 尚巳	
4. エクソン・スキップ治療後のジストロフィン発現の 二重免疫蛍光染色による定量的評価	----- 37
小牧 宏文	
5. 患者由来細胞を用いた <i>in vitro</i> での エクソン・スキップ評価手法の確立	----- 41
木村 円	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

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
	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
	木村 円	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター 臨床研究支援部 早期・探索的臨床試験室長

研究要旨

1. ジストロフィン遺伝子の変異集積領域であるエクソン 45-55 全てのエクソンのスキップが可能となれば、欠失変異を有する DMD 患者の 60%以上が治療の対象となるだけでなく、臨床例より症状の劇的な改善が期待される。今回は、このピボ・モルフォリノ核酸カクテルを *mdx52* マウスに投与したところ、エクソン 45-55 がスキップされた短縮型ジストロフィンの発現が認められ、筋機能も有意に回復することが明らかとなった。
2. モルフォリノを用いた効率的なエクソン・スキップの誘導、及び DMD 以外の筋疾患への応用を図るためには、モルフォリノが筋に取り込まれる機構の解明が必要である。*mdx52* マウスを用いた検討により、モルフォリノは筋再生の活発な時期に効率的に取り込まれること、ジストロフィン欠損筋では胎児型ミオシン重鎖が陽性の幼若線維に効率よく取り込まれることが示された。さらに、同期的筋再生誘導により、非ジストロフィン欠損筋（正常筋）にもモルフォリノが取り込まれたことから、ジストロフィン欠損の有無によらず、DMD 以外の筋再生を有する疾患に応用できる可能性が示された。
3. アンチセンス核酸を用いたエクソン・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。エクソン・スキップを可視化または定量化できれば、効果的な配列のスクリーニングやエクソン・スキップを誘導する compound の探索などが簡便化される。EGFP ベクターとヒト及びマウスのジストロフィン遺伝子を用いて、スプライシングを評価できる系を構築し、モルフォリノ投与によるスキップを可視化できた。
4. DMD に対するエクソン・スキップ治療では、有効性のバイオマーカーとしてジストロフィン発現の評価が重要であり、これを免疫蛍光染色で定量的に評価する手法の確立が必要である。筋細胞にジストロフィンと共局在するタンパク質との二重免疫蛍光染色により、筋細胞膜に限定したジストロフィンのシグナルを正確に定量する手法が提唱されており、この応用可能性について

て、エクソン・スキップを誘導した DMD モデルマウス検体を用いて検討した。その結果、目視によるジストロフィンの発現状態及び RT-PCR による有効性と相関をもって定量的評価が可能であった。二重免疫蛍光染色によるジストロフィン発現の評価は、エクソン・スキップ治療の臨床試験においても適用可能であることが示唆された。

5. DMD に対するアンチセンス核酸を用いた臨床試験の実施に際しては、被験者への投与前に被験者由来細胞を用いて、被験薬の有効性（mRNA における標的エクソンのスキップ、及びジストロフィンタンパク質の発現）を確認することが必要である。複数の患者皮膚由来線維芽細胞に *MYOD* 遺伝子を導入して筋管細胞に分化させ、アンチセンス核酸を投与して評価を行った。mRNA でのスキップとジストロフィンの発現を確認し、臨床試験における被験者の適格性確認として、*in vitro* でアッセイを実施する評価手法が確立できた。

## 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、有効性及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用いて、ジストロフィン回復を確認した。本研究では、エクソン 53 スキップ治療薬の開発において、早期探索的試験に必要な薬理薬効試験・薬物動態試験、また将来の薬事承認に必要な基礎的なデータの確保、さらにエクソン・スキップの応用及び拡大を狙った基盤的データの収集を目的としている。

本年度は、薬理薬効試験や早期探索臨床試験に必要な *in vitro* assay のシステムを確立し（木村）、さらに早期探索的臨床試験でエクソン・スキップの評価に必要な染色及び解析法の確立をマウスモデルによる系で行った（小牧）。今後のエクソン・スキップの展開を考え、モルフォリノの筋線維への取り込み機構の解析（永田）、エクソン 53 スキップ対象患者にも応用可能なエクソン 45-55 スキップのモデル動物による証明（武田）、さらにはエクソン・スキップのスクリーニン

グの簡易化を目指した GFP ベクターによる可視化の試み(岡田)を行ったので下記に報告する。

## B. 研究方法

### 1. エクソン45-55スキップの *mdx52* を用いた検討

マウス *Dmd* 遺伝子のエクソン 52 を除いたエクソン 45-55 に対してビボ・モルフォリノ核酸を設計し、局所投与では 5 週齢のマウス前脛骨筋に 1.5 $\mu$ g、全身投与では、12mg/kg を 2 週間隔で計 5 回投与した。最終投与の 2 週間後に検体を採取した。採取した筋は RT-PCR 解析、免疫組織化学染色(IHC)、ウエスタンブロット(WB)のサンプルとして用いた。全身投与実験では血清 CK 及び筋機能評価も行った。

### 2. 筋線維へのモルフォリノ人工核酸取り込み機構の解明

筋線維におけるモルフォリノの取り込みを解析するために以下の実験を行った。

- ① *mdx52* と野生型マウスに、モルフォリノ (80-640 mg/kg) を 1 回経尾静脈全身投与。
- ② 3~32 週齢の *mdx52* マウスに対してモルフォリノ 10  $\mu$ g を前脛骨筋に局所投与。
- ③ モルフォリノを局注した *mdx52* マウスにプロモデオキシウリジン(BrdU) (0.8 mg/ml) を経口投与
- ④ Day0にCTXを用いて同期的筋再生を誘導し、Day1-5にモルフォリノを局所投与
- ⑤ モルフォリノを全身または局所投与したマウスの筋を *in situ* hybridization法により評価
- ⑥ 正常マウスにCTXを用いて同期的筋再生を誘導し、時期を変えてモルフォリノを全身投与

### 3. GFPベクターを用いたエクソン・スキップの検討

pEGFP-N1のEGFPの中にヒト $\beta$ -globin (HBB) イントロン2を挿入した。さらにヒト及びマウスのジストロフィン遺伝子のエクソン/

イントロンをクローニングして挿入した。今回は4種類のベクターを構築し、各種細胞に導入し、mRNAレベルでスプライシングを評価した。さらにベクターを導入した細胞にモルフォリノを投与し、実際に蛍光が起こるか検討した。

### 4. エクソン・スキップ治療後のジストロフィン発現の二重免疫蛍光染色による定量的評価

*mdx52* マウスにアンチセンス核酸としてモルフォリノを局所投与し、エクソン・スキップ後にジストロフィン発現が誘導された骨格筋検体として用いた。この治療サンプルと正常マウス骨格筋サンプルを比較した。染色方法は、報告されている方法を一部改変し、スペクトリンに代えてラミニンをコントロールタンパク質とした。正常サンプルと治療サンプルを一回の工程で同時に染色した。

### 5. 患者由来細胞を用いた *in vitro* でのエクソン・スキップ評価手法の確立

DMD 患者由来線維芽細胞にレトロウイルスまたはレンチウイルスを用いて *MYOD* 遺伝子を導入した。いずれも *MYOD* 遺伝子とともに IRES 配列を挟んで ZsGreen1 蛍光タンパク質をマーカーとして組み込んだ。レトロウイルスによる系ではウイルス導入 5 日後に FACS を用いて ZsGreen1 陽性細胞を *MYOD* 発現細胞として回収、筋分化を誘導し、またレンチウイルスによる系では、24 時間ウイルス導入を行ったあと、FACS による選択は行わず筋分化を誘導した。いずれも筋分化誘導開始 7 日目にアンチセンス核酸を添加し、その後分化開始 14 日目まで培養してから、RT-PCR、WB で評価した。

## C. 研究成果

### 1. エクソン45-55スキップの *mdx52* を用いた検討

ビボ・モルフォリノカクテルを投与した前脛骨筋ではエクソン 45-55 が欠失した

mRNA の発現が認められた。IHC で 45-55 が欠損していると考えられるジストロフィンが発現していた。ジストロフィン陽性線維は 60%であった。ジストロフィン・糖タンパク質複合体の各分子の発現回復も IHC、WB で確認した。全身投与の場合、心筋を除く全身でジストロフィンの発現が IHC、WB により認められ、その発現の程度は正常マウスの 10%であった。HE 染色でも組織の改善を認めた、治療群では血清 CK の減少が認められ、筋機能も有意に回復していた。

## 2. 筋線維へのモルフォリノ人工核酸取り込み機構の解明

- ① *mdx52* マウスでは用量依存的にエクソン・スキップ効率は上昇し、野生型はエクソン・スキップを誘導できなかった。
- ② *mdx52* マウスでは 4-5 週齢に局所投与した場合に、ジストロフィン陽性線維の割合が有意に高かった。
- ③ ジストロフィン陽性線維には、BrdU 陽性の小径筋線維と、BrdU 陰性の大径筋線維の 2 種類あることがわかった。
- ④ 同期的筋再生をさせた前脛骨筋に、モルフォリノを day 4 に局所投与した場合に、ジストロフィン発現レベルは約 25%と有意に高く、その発現は小径で胎児型ミオシン重鎖陽性の筋線維で多数認めた。
- ⑤ 小径再生線維の核内には、未処置のマウスの核内と比べて、20 倍以上モルフォリノが存在することが分かった。
- ⑥ CTX 投与による同期的筋再生誘導後では、野生型マウスにおいても、モルフォリノ全身投与でエクソン・スキップを誘導できた。

## 3. GFP ベクターを用いたエクソン・スキップの検討

ジストロフィン遺伝子を導入したベクターでは、イントロン部分がスプライシングされて、EGFP の N 末及び C 末の間に、ジストロフィンのエクソン部分のみが残った mRNA が検出された。今回、作成した 4 種

類とも 90%以上がジストロフィンエクソンのみの mRNA であった。さらに、モルフォリノを投与した場合にはジストロフィンのエクソン部分がスキップして、EGFP のみの mRNA が観察された。

## 4. エクソン・スキップ治療後のジストロフィン発現の二重免疫蛍光染色による定量的評価

1 枚の切片から、ラミニン抗体の蛍光シグナル、及びジストロフィン抗体の蛍光シグナルを定量し、同一面積のマスキ領域に基づいたジストロフィンのラミニンに対する相対的な蛍光強度 = ジストロフィン / ラミニン比を求めた。正常サンプル、治療サンプル 1、及び 2 の間における比率を算出し、また、測定者 1 と 2 による比較も行った。治療サンプル間では、目視による蛍光強度、及び RT-PCR で得られたスキップ効率と傾向が一致していた。また、測定者間の比較では、測定者毎のサンプル間における比率の関係では差を認めず、本手法の再現性が確認された。

## 5. 患者由来細胞を用いた *in vitro* でのエクソン・スキップ評価手法の確立

エクソン 48-52 欠失、及びエクソン 51-55 欠失 DMD 患者由来線維芽細胞を用いて検討を行った。レトロウイルスを用いた系を両者に適用し、*MYOD* 遺伝子の発現を *ZsGreen1* 陽性で確認するとともに、FACS で回収後の細胞を多核で幅の広い筋管細胞に分化させた。アンチセンス投与後、濃度依存性に RT-PCR でのエクソン・スキップ活性の上昇、及び WB でのジストロフィンのシグナルを検出した。次に、エクソン 51-55 欠失 DMD 患者由来線維芽細胞にレンチウイルスの系を適用した。ウイルスのトランスフェクション後に FACS による選択を行わずに筋分化を誘導し、*ZsGreen1* 陽性を目視で確認、分化誘導後は長軸方向に伸長し、多核となり形態的には筋管細胞となった。回収した細胞では RT-PCR、WB でそ

れぞれスキップとジストロフィン発現が確認され、レトロウイルスの系と同様の結果が得られた。

## D. 考 察

### 1. エクソン45-55スキップの *mdx52* を用いた検討

本研究は、*mdx52* マウスを対象に、局所投与ならびに全身投与において *Dmd* 遺伝子の変異集積領域であるエクソン 45-55 までの10個のエクソンを読み飛ばすことに初めて成功しただけでなく、産生された短縮型ジストロフィンが機能を有することを明らかにした最初の報告である。この結果は、欠失変異を有する DMD 患者の 60%以上が治療対象となる可能性を示している。今後は、より安全で有効性の高いアンチセンス核酸を開発することで、骨格筋さらには心筋での短縮型ジストロフィンの発現を目指すことが必要である。

### 2. 筋線維へのモルフォリノ人工核酸取り込み機構の解明

ジストロフィン陽性線維のうち、BrdU 陽性の小径線維は、投与後に DNA 合成 S 期を通過した幼弱な再生線維であり、BrdU 陰性の大径線維は、投与後に既に成熟していた筋線維であると考えられる。ジストロフィン欠損筋では、筋変性の際に、形質膜の透過性が亢進してモルフォリノ等の小分子が受動的に形質膜を通過すると考えられてきた。一方、我々が初めて指摘した幼弱な再生線維へのモルフォリノ取り込みは、能動的機序に基づく可能性があることを示唆している。野生型マウスを用いた実験では、同期的筋再生誘導により、モルフォリノが取り込まれたことから、ジストロフィン欠損の有無によらずモルフォリノ治療を DMD 以外の筋再生を有する疾患に応用できる可能性を示した。

### 3. GFP ベクターを用いたエクソン・スキップの検討

今回作成したベクターでは、ジストロフィン及び HBB のイントロン部分はスプライシングされて、細胞内でエクソンのみになっていた。またモルフォリノ投与によりイントロン及び標的エクソンがスキップした mRNA 産物が得られた。しかし、ベクターを導入した場合、発現 mRNA が非常に多いため、今後、スキッピングを観察するにはモルフォリノの濃度を増量する等の工夫が必要と考えられた。

### 4. エクソン・スキップ治療後のジストロフィン発現の二重免疫蛍光染色による定量的評価

二重免疫蛍光染色によるジストロフィン発現の定量的評価手法が、エクソン・スキップ治療後に出現するジストロフィタンパク質の定量にも応用可能であることが示唆された。実際の臨床試験では、陽性コントロール、投与前サンプル、及び投与後サンプルの3検体の間での、ジストロフィンシグナル比を検討することになると思われる。なお、今回の検討はマウスにおけるエクソン・スキップの結果であり、実際にヒト検体での評価では、ラミニンに代えてスペクトリンを使用すること、エクソン 53 のスキップ効率に差がある可能性があることなどを考慮して、慎重に本評価手法の確立を進めていく必要がある。

### 5. 患者由来細胞を用いた *in vitro* でのエクソン・スキップ評価手法の確立

DMD 患者由来線維芽細胞にレトロウイルス及びレンチウイルスを用いて *MYOD* 遺伝子を導入し、筋分化を誘導する手法により、アンチセンス核酸の有効性を *in vitro* で検証することが可能であった。実際の臨床試験における活用では、初回投与開始時期を踏まえた、臨床試験のスケジュールにおける細胞採取時期の設定、及び細胞の増殖速度やウイルスの力価を踏まえた、レトロウイルスとレンチウイルスの使い分けについて考慮した上で適用する必要があると考えら



れる。

## E. 結論

1. *mdx52* マウスに対するアンチセンス核酸の全身投与で、エクソン 45-55 のブロック・スキップの可能性が示唆されただけでなく、エクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの機能性を証明した。

2. モルフォリノは筋再生の活発な時期に効率的に筋線維に取り込まれること、ジストロフィン陽性線維はBrdUにより2種類に分類できること、ジストロフィン欠損筋ではモルフォリノは胎児型ミオシン重鎖が陽性の幼若線維に効率よく取り込まれることが示された。

3. ヒト及びマウスのエクソン 51 及び 53 のジストロフィンのエクソン・スキップを可視化できるベクターを構築した。またそれらがスプライシングによりイントロン配列が除去され、さらにモルフォリノによりエクソン・スキップが起こることが証明された。

4. 二重蛍光免疫染色によるジストロフィン発現の評価は、DMD マウスモデルにおいてエクソン・スキップ治療により発現したジストロフィンの定量に応用可能であり、臨床試験においても適用可能であることが示唆された。

5. 被験者由来線維芽細胞に *MYOD* 遺伝子を導入し、筋管細胞に分化させて *in vitro* でアンチセンスの評価を行った。本手法によるエクソン・スキップの評価を患者由来細胞を用いて行ったところ、mRNA でのスキップとジストロフィンタンパク質の発現を確認することが出来た。

## 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) 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) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Yamashita S, Kimura E, Tawara N, Sakaguchi H, Nakama T, Maeda Y, Hirano T, Uchino M, Ando Y : Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 39:406-16, 2013
- 14) Uchino M, Yamashita S, Uchino K, Mori A, Hara A, Suga T, Hirahara T, Koide T, Kimura E, Yamashita T, Ueda A, Kurisaki R, Suzuki J, Honda S, Maeda Y, Hirano T, Ando Y : Muscle biopsy findings predictive of malignancy in rare infiltrative dermatomyositis. *Clin Neurol Neurosurg*. 115:603-6, 2013
- 15) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H : Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling

- Miyoshi Myopathy In Vitro. *PLoS One*. 8:e61540, 2013
- 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
- 2) 木村円: Remudyによる患者登録『筋疾患のみかた, 考えかた』中外医学社, 2013
- 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) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Takeda S: Treatment of Muscular Dystrophy. The 11th Annual Meeting of
- 16) Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda SI, Kawai M : Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet J Rare Dis*. 8:60, 2013
- 17) Yamashita S, Uchida Y, Kojima S, Sakaguchi H, Kimura E, Maeda Y, Uchino M : Heatstroke in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 33:685-687, 2012
- 18) Yamashita S, Sakaguchi H, Mori A, Kimura E, Maeda Y, Hirano T, Uchino M : Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*. 45:426-428, 2012
- 19) Sakaguchi H, Yamashita S, Hirano T, Nakajima M, Kimura E, Maeda Y, Uchino M : Myasthenic crisis patients who require intensive care unit management. *Muscle & nerve*. 46:440-442, 2012
- 20) Ikeda T, Kimura E, Hirano T, Uchino M : The association between dermatomyositis and papillary thyroid cancer: a case report. *Rheumatol Int*. 32:959-961, 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
- 2) Miyagoe-Suzuki Y, Fukada S, Takeda S: Muscle Satellite Cells and Duchenne Muscular Dystrophy. Muscular dystrophy, InTech-Open Access Company, Croatia,

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。バイオリ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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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及び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) 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及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
- 7) 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
- 8) 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  $\text{Ca}^{2+}$  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
  - 9) 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  $\Delta$  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
  - 10) 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及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
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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 及び 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
  - 14) 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  $\text{Ca}^{2+}$  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) 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
- 9) 岡田浩典, 岡田尚巳: AAVベクターを用いた遺伝子改変マウス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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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ー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ー. 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
- 14) 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
- 15) 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ー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
- 16) 伊藤尚基, Urs Ruegg, 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Ca<sup>2+</sup>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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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, Merryll 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
- 21) 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及び構造改変した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
- 22) 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
- 23) 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Ca<sup>2+</sup>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
- 24) 竹内美美, 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
- 25) 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
- 26) 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, 武田伸二: 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 武田伸一: 臓器別誘導法の現状と今後の展望—骨格筋—. 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 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 Ruegg, 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 Ruegg, 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 Ruegg, 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, 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

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 45-55 スキップの *mdx52* を用いた検討

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

アンチセンス核酸を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験が進行中であるが、治療対象は欠失変異を有する Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者の 13%にすぎない。一方で、ジストロフィン遺伝子の変異集積領域であるエクソン 45-55 全てのエクソンをスキップさせることができれば欠失変異を有する DMD 患者の 60%以上が治療の対象となるだけでなく、臨床例より症状の劇的な改善が期待される。我々はこれまでに *mdx52* マウスと同様のエクソン 52 欠失変異を有する *H-2Kb-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を用いた研究により、エクソン 45-55 のマルチエクソン・スキップを効果的に誘導し得るピボ・モルフォリノ核酸カクテルを見出した。そこで今回は、このピボ・モルフォリノ核酸カクテルを *mdx52* マウスに投与したところ、エクソン 45-55 がスキップされた短縮型のジストロフィンの発現が認められ、筋機能も有意に回復することが明らかになった。

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は発症頻度が高いが (出生男児 3,500 人に 1 人)、母体の卵細胞における突然変異が多いため (発症者の約 3 分の 1)、遺伝相談が必ずしも有効ではない。そこで、筋ジストロフィー患者・家族・団体からの強い要請を背景として、社会的にも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきた。しかし、根本治療として期待されている遺伝子治療と幹細胞移植治療については実現のために克服すべき課題が多い。近年、DMD に対する新規治療法としてエクソン・スキップ治療が注目されている。我々はエクソン 52 欠失 *mdx (mdx52)* マウスを対象に、アンチセンス人工核酸の反復全身投与によるエクソン 51 スキップの効果を検証し、DMD 患者を対象に、エクソン・スキップ治療を実施することの意

義を示した。現在、アンチセンス核酸を用いたエクソン 51 スキップの国際共同治験が進行中であるが、治療対象は欠失変異を有する患者の 13%にすぎない。一方で、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 は遺伝子変異の集積領域であり、この領域のマルチエクソン・スキップ治療により、欠失変異を有する患者の 60%以上を治療対象とし、骨格筋症状を極めて軽微にすることが期待される。実際、臨床症状としてエクソン 45-55 が欠失している患者では若干の心筋症状が認められるものの、骨格筋ではほぼ無症状であることから臨床症状の劇的な改善が期待できる。

これまでに我々は、*mdx52* マウスと同様のエクソン 52 欠失変異を有する *H-2Kb-tsA58 (H-2K) mdx52* 筋芽細胞株を新たに樹立しており、同細胞株を用いて、エクソン 45-55 の各エクソンを標的としてマルチエクソン・スキップを効果的に誘導可能なピボ・モ

ルフォリノ核酸を見出した。

今回我々は、*mdx52* マウスに対して細胞膜透過性が高いビボ・モルフォリノ核酸の複数組み合わせ（カクテル）投与により、エクソン 45-55 マルチエクソン・スキップが *in vivo* で誘導できるかを検証する。

## B. 研究方法

### 1. アンチセンス配列の設計

マウス DMD 遺伝子の premature mRNA を標的にエクソン 52 を除いた各エクソンの exonic splicing enhancer (ESE) に対して 25mer のアンチセンス配列 10 種類を設計した。ビボ・モルフォリノ核酸の合成は Gene Tools 社 (Philomath, OR) に委託した。

### 2. アンチセンス核酸の投与

**局所投与:** 5 週齢の *mdx52* マウス前脛骨筋に 36 $\mu$ l の生理食塩水に溶解した 1.5 $\mu$ g のビボ・モルフォリノカクテルを投与した。2 週間後に前脛骨筋を採取した。

**全身投与:** 5 週齢の *mdx52* マウスを対象に、12mg/kg のビボ・モルフォリノカクテルを 2 週間に 1 度、計 5 回、尾静脈より全身投与し、最終投与の 2 週間後に全身の骨格筋・心筋を採取した。

両投与実験で得られた筋は、RT-PCR 解析、組織学的解析、免疫組織化学染色、ウエスタンブロットのサンプルとして用いた。また、全身投与実験では最終投与 2 週間後に尾静脈より採血を行い、筋損傷の指標である血清クレアチンキナーゼ値を測定した。さらに、TREAT-NMD の指標に則り、グリップテスト、トレッドミル、ロータロッドを行い、筋機能を評価した。

## C. 研究成果

**局所投与:** ビボ・モルフォリノカクテルを投与した前脛骨筋ではエクソン 45-55 が欠

失し、エクソン 44 と 56 が結合した mRNA の発現が認められた。実際、ジストロフィンエクソン 57 を認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を行うと、投与した前脛骨筋ではその発現は同定されるが、エクソン 50 を認識する抗体ではその発現は同定されなかった。また、投与した前脛骨筋では 60% 近いジストロフィン陽性線維が認められた。さらに、*mdx52* マウスでは発現が消失しているジストロフィン・糖タンパク質複合体の各分子の発現が、局所投与を受けた骨格筋では、その発現が回復していたことを免疫組織化学染色、ウエスタンブロットで確認した。

**全身投与:** ビボ・モルフォリノカクテルを尾静脈より全身投与すると、心筋を除く全身の骨格筋にジストロフィンの発現が免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティングにより認められ、その発現の程度は正常マウス (BL6) の 10% であった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析を行ったところ、*mdx52* マウスで認められるような中心核線維や筋線維の大小不平等の筋病理所見も、治療した *mdx52* マウスでは減少し、BL6 マウスに類似した病理所見であった。また、治療したマウスでは *mdx52* マウスと比較して血清クレアチンキナーゼ値の有意な減少が認められ、グリップテスト、トレッドミル等による筋機能も有意に回復していた。また、全体を通して明らかな毒性を示す所見は認められなかった。

## D. 考 察

我々は、*mdx52* マウスを対象に、局所投与ならびに全身投与において DMD 遺伝子の変異集積領域であるエクソン 45-55 までの 10 個のエクソンを読み飛ばすことに初めて成功しただけでなく、産生された短縮型のジストロフィンが機能を有することを明ら