

かにした。本研究はエクソン 45 から 55 までの 11 個のエクソンを欠いた短縮型のジストロフィンが機能を有することを示し、さらに動物モデルを用いてエクソン 45-55 マルチエクソン・スキップの有用性を明確にした最初の報告である。以上の結果により、欠失変異を有する DMD 患者の 60%以上が治療対象となることから、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し、用いることでより効率的な骨格筋での短縮型ジストロフィンの発現や心筋での発現を目指すことが必要である。

E. 結 論

mdx52 マウスを用いたアンチセンス核酸の全身投与により、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、臨床症状として示されていたエクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの有用性の根拠になると思われる。

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
- 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^{2+} 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^{2+} 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 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
- 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

【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

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 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) 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 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^{2+} 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 Ca^{2+} 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—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
- 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

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, 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

筋線維へのモルフォリノ人工核酸取り込み機構の解明

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

我々は、エクソン 52 欠損 *mdx* (*mdx52*) マウスを対象に、アンチセンス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、さらに、より対象患者を増やすことを目的に、エクソン 45-55 全てのエクソンをスキップさせるマルチエクソン・スキップを試み、短縮型ジストロフィンが発現し、筋機能が回復することを明らかとしてきた。代表的な人工核酸であるモルフォリノは、安全性が高く臨床応用に適すると考えられるが、より効率的にエクソン・スキップを誘導し、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 以外の筋疾患に応用することを考えると、モルフォリノがジストロフィン欠損筋あるいは非ジストロフィン欠損筋に取り込まれる機構の解明が必要である。*mdx52* マウスを対象にした研究により、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。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。

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) は出生男児 3,500 人に 1 人の高頻度で発症し、発症者の 3 分の 1 が突然変異のため、遺伝相談が必ずしも有効ではない。これまでも根治的な治療法の開発が待ち望まれてきたが、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。これまでに我々は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を用いて DMD に対するエクソン・スキップ治療の前臨床的研究を行い、その安全性と有効性を示してきた。まず、エクソン・スキップ

の対象となる患者が DMD 患者の中で最も多いエクソン 51 に注目した。我々はエクソン 52 欠失 *mdx* (*mdx52*) マウスを対象に、アンチセンス核酸・モルフォリノ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。現在はエクソン 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 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ことから、*mdx52* マウスに対して細胞膜透過性が

高いピボ・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した。その結果、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となった。

しかし、代表的人工核酸であるモルフォリノの経静脈投与では、いまだ治療用量の決定に至っていない。我々はこれまでに、野生型マウスに高用量（640mg/kg）のモルフォリノを経静脈全身投与してもエクソン・スキップを誘導できないこと、筋再生の活発な 5 週齢の *mdx52* マウスに対してモルフォリノを投与した場合に、ジストロフィン陽性線維の発現レベルは有意に高くなる事を明らかにしている。そこで、本研究ではモルフォリノを用いたエクソン・スキップ治療を DMD 以外の筋疾患に応用することを目的に、モルフォリノがジストロフィン欠損筋あるいは非ジストロフィン欠損筋に取り込まれる機構の解明を目指す。

B. 研究方法

既報告を参考にアンチセンス配列を以下の様に設計し、Gene Tools 社に合成を委託した。

51D : TTGTTTTATCCATACCTTCTGTTTG

① *mdx52* マウスと C57BL/6J（野生型）マウスを対象に、モルフォリノ（80-640 mg/kg）を 1 回経尾静脈全身投与した。2 週間後に骨格筋を採取し RT-PCR 解析を行った。

② *mdx52* マウスを対象に（3-32 週齢）、モルフォリノ 10 μ g を前脛骨筋に局所投与し、2 週間後に骨格筋を採取しジストロフィン陽性線維の割合を免疫組織化学法により評価した。以下、*mdx52* マウスを対象にした。5 週齢を day 0 と定めた。

③ Day 0 にモルフォリノ 10 μ g を前脛骨筋に局所投与し、day 0-7 までプロモデオキシウリジン（BrdU）（0.8 mg/ml）含有水を自由経口摂取させた。Day 14 に前脛骨筋を採取して凍

結筋切片を作成し、免疫組織化学法を用いて（BrdU）/ジストロフィン/DAPI の三重染色を行った。

④ Day 0 にカルジオトキシシン（CTX）（10 μ M、100 μ l）を前脛骨筋に局所投与し、同期的筋再生を誘導した。

Day 1-5 のいずれかに、同期的筋再生を誘導させた前脛骨筋にモルフォリノ 10 μ g を筋注し、その 2 週間後にウエスタンブロット法によりジストロフィン発現レベルを評価した。同期的筋再生誘導後の筋線維におけるジストロフィンや各種筋分化マーカーの発現を RT-PCR 法および免疫組織化学法により解析した。

⑤ Day 4 にモルフォリノ 320 mg/kg を経尾静脈全身投与し、1 時間後に前脛骨筋を採取した。筋線維内のモルフォリノの局在を *in situ* hybridization 法により評価した。

⑥ 野生型マウスを対象に、CTX 投与 2 日～6 日後のいずれかにモルフォリノ 320mg/kg を経尾静脈全身投与し、2 週間後に前脛骨筋を採取し、RT-PCR でエクソン 51 のスキップ効率を評価した。

C. 研究成果

① *mdx52* および野生型マウスを対象に、モルフォリノ（80-640 mg/kg）を 1 回全身投与し 2 週間後に骨格筋を採取し RT-PCR 解析を行ったところ、*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たが、野生型マウスではエクソン・スキップを誘導できなかった。

② *mdx52* マウスを対象に、モルフォリノ 10 μ g を、筋再生が最も活発な 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は他の時期と比べて有意に高いことがわかった。

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 *mdx52* マウスでは、同期的筋再生を誘導さ

せた前脛骨筋に、モルフォリノ 10 µg 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、小径で胎児型ミオシン重鎖陽性の筋線維を多数認めた。

⑤Day 4 の前脛骨筋では、小径再生線維の核内には、未処置の *mdx52* 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。

⑥CTX 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。

D. 考 察

ジストロフィン陽性線維のうち、BrdU 陽性の小径線維は、実験開始後に DNA 合成 S 期を通過した幼弱な再生線維であり、プロモデオキシウリジン陰性の大径線維は、実験開始時に既に同時期を通過していた成熟筋線維であると考えられる。ジストロフィン欠損筋では、特に筋変性の際に、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、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。

E. 結 論

mdx52 マウスを対象にした研究により、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プロモデオキシウリジンにより 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。

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, 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
- 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
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，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

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

GFP ベクターを用いたエクソン・スキップの検討

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。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 の探索等を実施することが簡便化される。今回、EGFP ベクターとヒトおよびマウスのジストロフィンの遺伝子をもちいて、splicing とモルフォリノによる skipping を検討したので報告する。

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。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 の探索等を実施することが簡便化される。

B. 研究方法

Sazani P. (Nucl. Acid Res., 2001) を参考にして pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) を直鎖化し、EGFP開始78塩基の部位に850塩基のヒト β -globin (HBB) intron2を図1のように挿入した。次に、目的となるヒトおよびマウスのジストロフィンの exon およびその前後に位置する intron を両側とも300bpにわたり、Cloning した。そのインサートを Takara Infusion HD を用いて HBB intron2 の425bpの位置に挿入した。図2はマウスの exon53 とその前後に位置するマウス intron52 およびマウス intron53 を挿入し

た場合の図である。表1が今回、作製したジストロフィンベクターである。

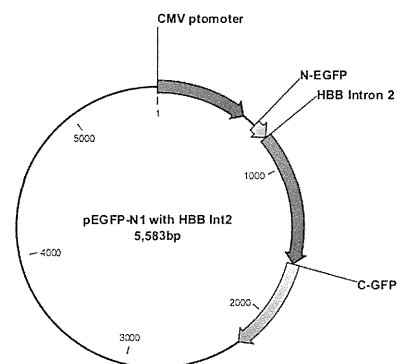


図1 HBB intron2を導入したpEGFP-N1

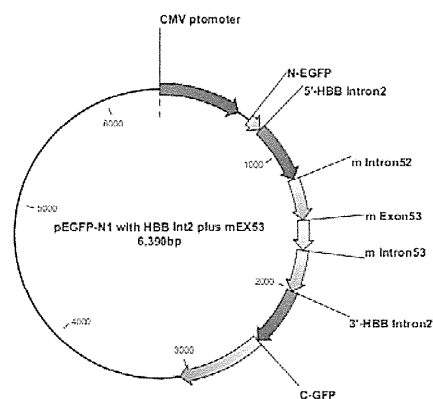


図2 図1のベクターにマウス exon53 および intron52/53 を導入したベクター

表1 作成したジストロフィンベクター

Exon	Intron
h53	h52/53
m53	m52/53
h51	h50/51
m51	h50/51

pEGFP-N1 with HBB Int2はsplicingされて蛍光を発するか検討するために、ベクター2 μ gをC2C12およびSH-Sy5yにnucleofector IIにて導入し、その後、蛍光の有無を観察した。また、RNAレベルでもスキッピングが起こっているかどうかを併せて確認している。さらに、ジストロフィン遺伝子を導入したベクターも同じく、C2C12およびSH-Sy5yに導入し、mRNAレベルでスキッピングを確認した。さらに、ベクターを導入した細胞に表に示したエクソンをスキップさせるモルフォリノ核酸(PMO)を6 μ MのEndo-Porterで導入し、実際に蛍光が起こるか検討した。

C. 研究成果

pEGFP-N1 with HBB Int2 は今回用いた細胞内で、自然に splicing されて蛍光を発した。mRNA での確認でも splicing が確認された。また、ジストロフィン遺伝子を導入したベクターでも intron 部分が splicing されて、EGFP の N 末および C 末の間に、ジストロフィンの exon 部分のみが残った mRNA が検出された。今回、作成した四種類とも 90%以上がジストロフィンエクソンのみの mRNA であった。更に、PMO を導入した場合にはジストロフィンの exon 部分がスキップして、EGFP のみの mRNA が観察された。

D. 考察

今回作成したベクターでは、ジストロフィンの intron および HBB の intron 部分は splicing されて、細胞内で自然に exon のみになっていた。また PMO 投与により intron および標的 exon がスキップした mRNA 産物が得られた。ただ、ベクターを導入した場合、発現 mRNA

が非常に多いため、今後、skipping を見るためにはスクリーニングの際には PMO の濃度を増量する等の工夫が必要と考えられた。現在、ルシフェラーゼを用いても、アッセイ系を構築しており、今後、より簡便化を目指す。

E. 結論

ヒト及びマウスの exon51 および 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 PMO によりエクソンのスキッピングが起こることが証明された。

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
(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・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

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

アンチセンス核酸を用いた、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対するエクソン・スキップ治療の臨床試験において、有効性のバイオマーカーとしてジストロフィンの発現が有用であることが認識されているが、これを免疫蛍光染色によって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 (スペクトリン等) 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定量手法が提唱されている。この応用可能性について、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および 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。

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対するエクソン・スキップ治療の有効性は、最終的には臨床的な改善として示される必要があり、具体的には 6 分間歩行距離などの歩行・運動機能評価が最適であると認識されている。しかし、開発の早期相で、投与量・投与期間に制限があり、臨床的な改善から評価することが困難なフェーズにおいては、サロゲートマーカーとしてジストロフィンタンパク質の発現をもって、有効性の評価とすることも受け入れられている。ジストロフィンタンパク質はウェスタンブロット (WB) または免疫蛍光染色 (IF) で検出することが一般的である。WB で検出された化学発光シグナルの強度は、正常サンプルと比較した定量が可能であるが、一定のジストロフィン発現量がない場合、特に IF で視野にわずかなジストロフィン発現しか確認できない場合、WB で

検出されない場合がある。そのため、IF での定量が重要となるが、IF におけるジストロフィンの蛍光シグナルは、筋肉切片の厚さや、筋細胞膜以外の非特異的蛍光シグナルで変動し、定量が困難な場合が多い。近年、筋細胞膜に共発現するスペクトリンなど、DMD の病態に左右されず、常に発現するタンパク質の蛍光シグナルを画像解析ソフトウェアで認識し、このシグナルを基準として切片の条件、撮影位置などの影響を受けずに定量を行う手法が報告された¹⁾。本手法では正常、DMD 患者、および正常と比較してジストロフィン発現量が低下した Becker 型筋ジストロフィー (BMD) 患者、それぞれのジストロフィンの発現量を、WB と相関をもって評価可能であることが示されている。しかし、エクソン・スキップによるジストロフィンは、ある領域に集簇して発現することが多く、BMD のように観察領域内で一律に発現量が低下してい

る状態とは異なっている。そのため本手法で BMD での発現が定量可能であっても、エクソン・スキップ治療でのジストロフィン発現が定量可能であるかは明らかでない。そこで本手法がエクソン・スキップ治療の有効性評価に応用可能であるかを検討した。

B. 研究方法

ヒトにおけるエクソン・スキップ治療後の骨格筋検体の入手は困難であるため、DMD モデルマウス (*mdx52*) 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。染色方法の概要は以下のとおりである。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。

1. 凍結骨格筋標本を 7 μ m に薄切する。
2. 一次抗体反応 (ラット抗ラミニン抗体、マウス抗ジストロフィン抗体)
3. 二次抗体反応 (Alexa488 抗マウス IgG 抗体、Alexa568 抗ラット IgG 抗体)
4. 封入

また、サンプルの撮影方法は以下のとおりである。

1. コンフォーカル顕微鏡 (TCS-SP5, Leica) で正常サンプルを撮影し、ジストロフィン・ラミニンともに、シグナルが飽和しないゲインを設定する。
2. 以降の撮影は、ジストロフィン・ラミニンの両チャンネルとも、正常サンプルで設定したゲインのまま行う。
3. 1 サンプルあたり無作為に 5 箇所撮影する。

取得した画像の解析方法は以下のとおり。

1. Metamorph ソフトウェア ver7.7

(Molecular devices) を用いて、ラミニンの蛍光強度が、測定者の設定した閾値以上の領域を二値化する。

2. 二値化領域のうち、非連続なピクセルを収縮で消去してから、再度膨張させマスク領域とする。
 3. マスク領域をそれぞれの画像に重ねて、マスク領域のみの蛍光強度を測定する。
- さらに、画像取得から解析までの行程が、測定者の変更による影響を受けるかを評価するために、サンプル撮影以降の工程を別々の測定者で二重に実施した。

C. 研究成果

1 枚の切片からは、ラミニン抗体の蛍光シグナル、およびジストロフィン抗体の蛍光シグナルの 2 つが共に得られる。定量されたそれぞれの蛍光シグナルは、ラミニンのシグナルから作成された同一面積のマスク領域に基づいている。従って、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 / ラミニン比が求められる。正常サンプルで得られたジストロフィン / ラミニン比を基準とした場合に、治療サンプル 1 および 2 の比率、ならびに測定者 1 と 2 による結果を以下に示す。

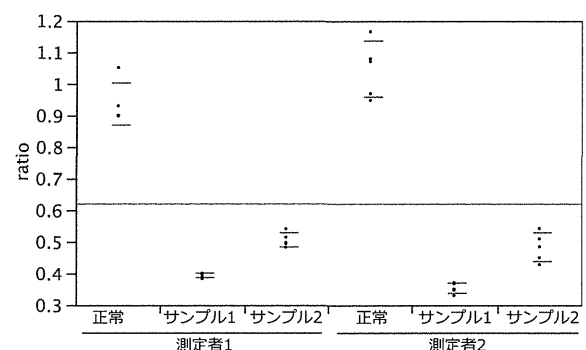


図. 正常マウス、モルフォリノ投与 *mdx52* マウス (サンプル 1 および 2) 由来骨格筋の、二重免疫蛍光染色後のジストロフィン / ラミニン蛍光強度比。測定者 1 および 2 による多重測定結果。

治療サンプル 1 は 2 と比較して、目視による蛍光強度、および RT-PCR でのスキップ効率

のいずれにおいても低く、今回の定量結果で得られたジストロフィン／ラミニン比の傾向と一致していた。それぞれの測定者で得られた正常、サンプル1および2のジストロフィン／ラミニン比の平均値は互いに有意差を認めた (Tukey's HSD test, $p < 0.05$)。また、各測定者間の比較では、正常サンプルにおいて有意差を認めるものの、サンプル1および2においては有意差を認めなかった。正常サンプル撮影時のゲイン設定は測定者の裁量に委ねられているため、測定者間での比率に差が生じた可能性があるが、サンプル間での差は各測定者ともに一致した傾向を示し、本手法の再現性が確認された。

D. 考 察

今回の検討により、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は、正常者、DMD/BMD 患者間だけでなく、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、以下のサンプルを比較することにより評価することが想定されている。

- A) 陽性コントロール (別途用意した正常者またはジストロフィノパチーが否定された患者由来骨格筋)
- B) 投与前サンプル (アンチセンス核酸投与開始前の被験者由来骨格筋)
- C) 投与後サンプル (アンチセンス核酸投与終了後の被験者由来骨格筋)

A)を基準として算出された B)および C)の比率の変化を、投与に反応したジストロフィン発現の増加として評価が可能と考えられる。また、コホート間で投与量を漸増した場合の用量反応関係の算出にも応用可能と考えられる。

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としている (ラミニンは

DMD で発現が変動するとの報告が一部あるため)。また、エクソン 51 スキップ治療薬であるモルフォリノ製剤 Eteplirsen (AVI-4658) の臨床試験で得られた被験者の検体について、本手法による定量を試みた報告では、従前の方法で定量した場合と同様の結果が得られたとの事である²⁾。しかし、今回の早期探索的臨床試験はエクソン 53 スキップであり、アンチセンス核酸の配列が異なること、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。

E. 結 論

二重免疫蛍光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も応用可能であり、臨床試験においても適用可能であることが示唆された。

参考文献

1. Taylor LE, et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.* 38:591-601, 2012
2. Arechavala-Gomez V, et al., *Nat Rev Neurol.* 8:469, 2012

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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