

Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S. Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients. J Neurol. 2013;260(12):3023-3029.

- 3) 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. 2013;8(1):60.

3. その他、特記事項
なし

II 学会発表

1. 玉浦明美, 太幡真紀, 清水玲子, 小牧宏文, 木村 円, 尾方克久, 中込和幸, : 疾患レジストリーと連携した臨床試験ネットワーク事務局における CRC の役割. 第 34 回 日本臨床薬理学会学術総会, 東京, 12.4, 2013
2. 木村 円, 林由起子, 中村治雅, 森まどか, 竹内英実, 米本直裕, 清水玲子, 小牧宏文, 西野一三, 川井 充, : 希少疾患レジストリー : 国際協調と臨床開発における役割-Remudy の現状と目指すもの. 第 34 回 日本臨床薬理学会学術総会, 東京, 12.6, 2013
3. 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏文, : Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験. 第 31 回日本神経治療学会総会, 文京区, 11.22, 2013
4. 清水玲子, 小牧宏文, 木村 円, 尾方克久, 玉浦明美, : 筋ジストロフィー臨床試験ネットワークの患者登録制度と連携した研究支援. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会, 仙台, 11.22, 2013

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

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・治験推進研究事業))
平成 25 年度 分担研究報告書

希少疾患の臨床試験における被験者についての調査

研究分担者	村田 美穂	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 病院 神経内科診療部 部長
研究協力者	清水 玲子	独立行政法人国立精神・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 流動研究員
	太幡 真紀	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 病院 臨床研究推進室 CRC

研究要旨

早期探索的臨床試験では通常小児を被験者とする事は少なく、また未だ人に未投与である薬剤の治験に参加するということは、患児や保護者にとっては大きな決断と推察される。当院においてアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を用いたエクソン・スキップ治療について早期探索的臨床試験を行っているが、その臨床試験の対象者は、特定のジストロフィン遺伝子変異を持った小児である。患児とその家族に対するアンケート調査を行い、今回の患者組み入れの問題点を明らかにし、今後の希少疾患に対する臨床試験に役立てる。

A. 研究目的

治療法の選択肢が少ない希少疾患の患者とその保護者にとっては、新薬への期待は非常に大きい。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、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 53 スキップの早期探索的臨床試験が当センターにて実施されおり、臨床試験は未成年の患者を対象としている。患者や保護者においては人に未投与の薬剤に対する臨床試験に参加する決断は容易ではなかったと推察される。今回我々は被験者と保護者に対してアンケート調査を行い、同臨床試験に参加にあたっての不安や期待、今後に対する希望について調査を行った。

B. 研究方法

当院で行われているエクソン 53 スキップの早期探索的臨床試験に参加している患者および保護者に対してアンケート調査を行った。被験者と家族は別々に行い、家族に対してはアンケートフォームへの記入を依頼した。被験者に対しては iPad® を使用したアンケートを別に作成し、保護者を介さずに自らの意思で記入できるようにできるだけ配慮して調査を行った。

(倫理面への配慮)

国立精神・神経医療研究センター倫理委員会への申請を行って了承を得た後、保護者と本人の同意を得た上でアンケート調査を行った。

C. 研究成果

エクソン53スキップの早期探索的臨床試験の被験者10名のうち6名の同意を得てアンケート調査を行った。

D. 考察

保護者のアンケート調査からは、早期探索的試験であるため、今まで人に投与されたことはなく、また薬効が必ずしも期待できない投与量であることを説明されているにもかかわらず、保護者に対してのアンケートでは参加を決断することを迷ったか、という質問に対しては、「全く迷わない」4名、「あまり迷わない」1名に対して、「少し迷った」「迷った」という項目は各1名が選択しており、積極的に試験に参加を決定していた。また、新しい薬に不安を抱きつつも、効果があるかもしれないという期待の方が勝っていることも、記載からうかがえた。保護者からは、参加に当たって被験者となる患児と話し合ったか、という質問については、「よく話し合った」5名、「あまり話をしていない」1名「全く話をしていない」0名であったのに対し、患児のアンケートにおいては、「この治験の参加は誰が決めましたか」という質問に対しては「両親が決めた」3名に対して、「自分で決めた」2名、「両親と自分で決めた」1名と、いう結果であった。年齢的な要素も大きいと考えられるが、小児であっても自分で決めて参加している、という意識を持っている被験者の存在が明らかになった一方で、保護者は話し合っただけで決めたと考えていても、必ずしもその通りではないということも推察された。

E. 結論

希少疾患の臨床試験においては保護者の期待も大きく、被験者が未成年であると保護者の意向は強く反映されやすいが、一方で自らの意思で理解して参加していると考えている被験者も存在する。同意取得の際にはその点に十分留意して被験

者と保護者それぞれに対して説明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

- 1) Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Mult Scler*.2014 Feb 18 [Epub ahead of print]
- 2) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12) e83036[in process]
- 3) Mizuta I, Takafuji K, Ando Y, Satake W, Kanagawa M, Kobayashi K, Nagamori S, Shinohara T, Ito C, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Kanai Y, Murayama S, Nakagawa M and Toda T. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *Journal of Human Genetics* 2013;58:711-719
- 4) Furusawa Y, Mukai Y, Kawazoe T, Sano T, Nakamura H, Sakamoto C, Iwata Y, Wakita M, Nakata Y, Kamiya K, Kobayashi Y, Sakamoto T, Takiyama Y, Murata M. Long-term effect repeated lidocaine injections into the external oblique for upper camptocormia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013;19(3): 350-354
- 5) Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK,

Noguchi S, Nishino I, Murata M.
Respiratory dysfunction in patients severely
affected by GNE myopathy (distal
myopathy with rimmed vacuoles)

Neuromuscul Disord 2013;23:84-88

- 6) Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H,
Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M,
Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, , Takeda
S: Prednisolone improves walking in
Japanese Duchenne muscular dystrophy
patients. *J Neurol*. 2013
Dec;260(12):3023-9. doi:
10.1007/s00415-013-7104-y. Epub 2013
Sep 22.

II 学会発表

< 国外 >

- 1) Murata M, Hasegawa K, Fukasaka J, Kochi
K, Kanazawa I, T. The Japan Zonisamide on
PD Study Group Zonisamido improves
wearing-off in Parkinson's disease: A
nation-wide randomized, double-blind study
17th International Congress of Parkinson's
Disease and Movement Disorders Sydney,
Australia, June 16-20,2013
- 2) Furusawa Y, Shimizu Y, Kawabata Y,
Kobayashi K, Noda T, Yamamoto T, Murata
M. Validation of the questionnaire for
impulsive-compulsive disorders
(QUIP)-Japanese version in Parkinson's
disease 17th International Congress of
Parkinson's Disease and Movement
Disorders Sydney, Australia, June
16-20,2013
- 3) Yamamoto T, Oda C, Satoh M, Nakayama
K, Murata M. The reliability of screening
methods for dysphagia in patients with
Parkinson's disease. 17th International
Congress of Parkinson's Disease and
Movement Disorders Sydney, Australia,
June 16-20,2013
- 4) Murata M, Tamaura A, Ohata M,
Yamamoto T, Furusawa Y, Mukai Y, Sasaki
H, Hosokawa K, Sakamoto T. Establishment of
matching system for Parkinson disease

clinical trials in Japan. The 11th
International Conference on Alzheimer's &
Parkinson's Disease Florence, Italy, March
6-10,2013

- 5) Toda T, Satake W, Yamamoto M, Hattori N,
Murata M, Japanese PD Gene Consortium,
Japan. Japanese 2nd GWAS identifies strong
association at a novel risk locus and
MCCC1 for parkinson's disease. The 11th
International Conference on Alzheimer's &
Parkinson's Disease Florence, Italy, March
6-10,2013

< 国内 >

1. 玉浦明美, 太幡真紀, 清水玲子, 小牧宏
文, 木村 円, 尾方克久, 中込和幸, 武田
伸一: 疾患レジストリーと連携した臨床
試験ネットワーク事務局における CRC
の役割. 第 34 回 日本臨床薬理学会学術
総会, 東京, 12.4, 2013
2. 木村 円, 林由起子, 中村治雅, 森まど
か, 竹内英実, 米本直裕, 清水玲子, 小
牧宏文, 西野一三, 川井 充, 武田伸一:
希少疾患レジストリー: 国際協調と臨床
開発における役割-Remudy の現状と目指
すもの. 第 34 回 日本臨床薬理学会学術
総会, 東京, 12.6, 2013
3. 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏
文, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロ
フィーに対するエクソン 53 スキップに
よる早期探索的臨床試験. 第 31 回日本神
経治療学会総会, 文京区, 11.22, 2013
4. 清水玲子, 小牧宏文, 木村 円, 尾方克久,
玉浦明美, 武田伸一: 筋ジストロフィー
臨床試験ネットワークの患者登録制度と
連携した研究支援. 日本人類遺伝学会 第
58 回大会, 仙台, 11.22, 2013
5. 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
る多施設共同治験の経験. 第 116 回日本
小児科学会学術集会, 広島, 4.19, 2013

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

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・治験推進研究事業))
平成 25 年度 分担研究報告書

DMD に対するエクソン・スキップ治療薬開発に関する最近の動向

研究分担者 永田 哲也 独立行政法人国立精神・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
遺伝子治療モデル動物開発室 室長

岡田 尚巳 独立行政法人国立精神・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
遺伝子治療技術開発室 室長

研究要旨

DMD に対するエクソン・スキップ治療薬では、エクソン 51 を対象とした開発が先行しており、2'-OMe による drisapersen の第 3 相、及び PMO による eteplirsen の第 2b 相試験が進行中である。エクソン 53 スキップ治療薬の開発にあたり参考とすべきこれらの開発動向について調査した。Drisapersen は主要エンドポイントである 6 分間歩行テスト (6MWT) において 48 週投与の時点で有意な改善を示さなかったものの、長期投与及び高用量投与では、今後有望な結果が望める可能性も示唆された。一方 eteplirsen は 6MWT で有意な歩行距離延長効果を示したものの、症例サイズ、ジストロフィン発現などの代理エンドポイントの解釈をめぐり、審査当局との見解一致に至らず早期の申請は見送られた。しかしその後の議論を経て申請に向けた道筋が提示され、今後の開発が加速すると考えられた。エクソン・スキップ治療薬が承認される可能性については予断を許さない状況にあるが、本治験薬の開発においても先行薬の開発動向を注視し、今後の開発戦略立案に活用していくことが必要である。

A. 研究目的

DMD に対するエクソン・スキップ治療薬については、エクソン 51 を対象とした開発が先行している。オランダの Prosensa Therapeutics 社が 2006 年より 20-mer の 2'-OMe (PRO051)、米国の AVI BioPharma 社が 2008 年より 30-mer の PMO (AVI-4658) の臨床試験に着手している。Prosensa 社は GlaxoSmithKlein (GSK) 社との共同開発を進め、PRO051 について drisapersen と命名、また AVI 社は社名変更により Sarepta Therapeutics 社となり、AVI-4658 を eteplirsen と命名し臨床試験を開始している。本研究において開発中の NS-065/NCNP-01 は平成 23 年 (2011 年) に正

式に開発を決定しているが、当時 drisapersen は第 3 相、eteplirsen は第 2b 相試験を実施中であった。平成 25 年 (2013 年) は、この時点で進行中であったそれぞれの臨床試験についての結果が公表され、今後の開発戦略に大きな動きが生じた年であった。我々が開発を進めるエクソン 53 スキップ治療薬は対象エクソンが異なるもの、その薬理作用、安全性等については先行する drisapersen, eteplirsen と極めて類似する点が多く、開発戦略をたてる上でこの 2 つの動向は重要な位置づけにある。また FDA, EMA 等が提示するエクソン・スキップ治療薬に対する見解は、日本国内で薬事承認を取得する上でも留意すべきと考え

られ、この様な観点から本研究では海外を中心としたエクソン・スキップ治療薬の開発状況について、特に 2013 年から 2014 年にかけての動きを概観して報告する。

B. 研究方法

主に学術文献、製薬企業による発表資料、及び規制当局から示された見解等を中心に調査を行った。また海外での学術集会における意見交換等を通して情報収集を行った。

C. 研究成果

1. Drisapersen の開発状況

これまで drisapersen は、EU、米国、オーストラリア、日本においてオーファンドラッグ指定を、また 2013 年 6 月には、対象疾患の重篤性、及びそれまでに得られていた第 2 相試験 (DMD114117) の結果を踏まえ、FDA より Breakthrough Therapy Designation を受けている⁽¹⁾。皮下投与による長期投与と無作為化二重盲検比較を目的とした第 3 相試験 (DMD114044) は 2010 年 12 月に開始され、結果は 2013 年 9 月に公表された⁽²⁾。日本を含めグローバルで 186 名 (drisapersen 125 名、プラセボ 61 名) が参加した大規模試験であったが、primary endpoint である 48 週投与時点での 6 分間歩行テスト (6MWT) で有意な改善は示さなかった (両群の平均値の差 10.33 m, $p=0.415$)。最も多く報告された有害事象は、注射部位反応 (drisapersen 78%、プラセボ 16%)、腎臓に関する有害事象 (無症候性蛋白尿など、drisapersen 46%、プラセボ 25%) であった。その他 48 週投与時点では CK 値の低下 ($p<0.001$)を除いては、secondary endpoint においてもプラセボ群に対して投与群で有意な改善は認められなかった。ただし 7 歳以下のサブグループ解析では、有意ではないものの 6MWT において 21m の歩行

距離延長効果が認められた。ジストロフィン発現についての詳細な解析結果は本稿執筆時点では公表されていない。2014 年 1 月に、GSK 社と Prosensa 社は開発に関する一切の権利を GSK 社から Prosensa 社に返還することに合意し、2009 年に開始した両者の共同開発が終了することを発表した⁽³⁾。しかし同時期に Prosensa 社が公表した DMD114044 における 96 週延長投与試験の暫定解析結果では、プラセボ 48 週投与後に実薬 48 週を投与されたプラセボ/遅延投与群 ($n=31$) に対して、実薬を 96 週投与された継続投与群 ($n=52$) は、6MWT において 49m の歩行距離延長作用を認めた⁽⁴⁾。またプラセボ対照・用量比較試験である DMD114876 試験の結果が 2014 年 3 月に公表された⁽⁵⁾。本試験では 24 週の実薬またはプラセボ投与に引き続いて全例で 24 週の休薬を行うが、プラセボ群に比較して高用量投与群 (6 mg/kg) では、統計的有意差はないものの筋機能と 6 分間歩行距離の安定・改善が 24 週投与終了の時点で認められ、その後 24 週の経過観察期間にもこの改善は維持された。以上のことから Prosensa 社は、drisapersen は第 3 相試験の一次エンドポイントで有意な改善は示せなかったものの、病状が進行していない若年での治療開始が有利なこと、長期間の投与により治療効果の差が現れやすいこと、高用量の投与により病状の進行抑制と長期間の治療効果維持が期待できることが示唆され、投与計画及び評価方法の見直しにより、有望な結果が望めるとしている。またこれまでに試験に参加した被験者から、同薬の投与再開に対する要望も強いことから、Prosensa 社は 2014 年内に drisapersen の再投与が可能となるよう、米国及び EU の当局に対して折衝中であることを明らかにしている⁽⁶⁾。

2. Eteplirsen の開発状況

2012 年に開始された第 2b 相試験 Study 201 は、30 mg/kg/週 投与群 (4 例)、50 mg/kg/週 投与群 (4 例)、及びプラセボ投与群 (4 例) 間における 24 週間の無作為化二重盲検試験を実施し、その後 study 202 として、プラセボ群は 2 例ずつ 30 または 50 mg/kg/週投与群に移行し、全例がオープンラベルでの長期安全性・有効性観察試験として投与を継続するというデザインで実施された。この長期投与試験は本稿執筆時においても進行中であるが、48 週時点での結果は 2013 年 7 月に公表された⁽⁷⁾。その結果、投与期間が長期にわたるほどジストロフィンの発現は増加し(30 及び 50 mg/kg 投与群で、筋線維中のジストロフィン陽性率はそれぞれ 52%及び 43%)、6MWT においては有意な改善が認められた (両群の平均値の差 67.3 m, $p \leq 0.001$)。重篤な有害事象は認められなかった。そのため Sarepta 社はこれらの試験結果に基づいた新薬承認申請 (New Drug Application: NDA) の可能性を FDA に対して打診してきたが、2013 年 11 月、FDA は現状の第 2b 相試験の結果に基づく申請は時期尚早であるとの見解を示した⁽⁸⁾。FDA が提示した主な論点は、臨床的有効性の代理バイオマーカーと位置づけているジストロフィンタンパク質の定量方法について疑義があり、現状の定量方法では承認申請のための代理エンドポイントとして採用することは困難であること、また DMD 患者の自然経過歴に関してベースラインの 6MWT が 350m 以上の患者では病状の進行が緩やかなことが明らかとなったため、この条件に合致する第 2b 相試験の被験者については有効性の解釈に慎重にならざるを得ないことをあげている。また直前に、drisapersen が 6MWT においてエンドポイントを達成できなかったことを引用し、6MWT が被験者の意欲や理解力に依存する評価方法であることを踏まえ、その他の評価項目を充実させる必要性や、ステロイド等の普及により DMD の治療環境が変化しつつあることを踏まえ、自然経過歴の解釈にも困難

さが伴うことなどを指摘し、検証的臨床試験のデザインを今度も議論していく必要性に触れている。この FDA の見解に市場は落胆、Sarepta 社の株価は 65%下落し eteplirsen の早期承認を期待する楽観論は沈静化した。しかしその後も継続中の study 202 において、継続投与群は遅延投与群に比べて最大 65m の歩行距離延長を認めており、また重篤な有害事象も発生していない⁽⁹⁾。そして FDA との議論を継続した Sarepta 社は、2014 年 4 月までに承認申請を行うための条件について FDA と合意に至り、次のような試験の追加を表明している。①ヒストリカルコントロールを用いたオープンラベルでの検証的試験、②7-16 歳の歩行可能患者を対象とした試験、③7 歳未満の患者、及び歩行不能など病状の進行した患者に対する安全性とバイオマーカーの探索試験。さらに FDA は、エクソン 51 以外の 53、45 などを標的とするその他のアンチセンス治療薬候補について二重盲検化プラセボ対照試験を実施した場合、それらの結果は eteplirsen の有効性を確認するための重要なデータとして考慮することも明らかにした。Sarepta 社はこれらに対応するための試験計画を早急に作成し、2014 年内に eteplirsen の NDA を目指すとしている⁽¹⁰⁾。

3. エクソン 51 以外を標的とする治療薬の開発状況

Prosensa 社は 2'-OMe アンチセンスについて、現在エクソン 44 が第 2 相、エクソン 45 と 53 が第 1 相、並びにエクソン 52 と 55 について前臨床段階としている。また Sarepta 社は PMO アンチセンスについて、エクソン 45, 53, 50 及び 44 について前臨床段階、エクソン 52, 55, 8 について探索段階であることを明らかにしている。一方、国内でも 2013 年 2 月に第一三共株式会社が ENA (2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)を用いたエクソン 45 スキップ治療薬の開発を表明しており、4 年以内を目処に proof of concept の取得を目指すとしている⁽¹¹⁾。

D. 考 察

以上のように 2013 年～2014 年にかけては、エクソン・スキップ治療薬の開発において大きな変化が見られた。Drisapersen 及び eteplirese の試験結果の解釈については、最適な投与量の設定、組み入れ被験者の年齢、及び評価項目の設定など様々な論点を含んでいるが、特に発現したジストロフィンの測定方法の妥当性、及び運動能力を大きく改善するに足りるジストロフィンの発現量について、今後十分な検討がなされる必要があると考えられる。Drisapersen に関して、第 3 相試験で主要エンドポイントを達成できなかったことは、同薬の開発プロジェクトにおいて大きな後退ではあるものの、投与設計の見直しで有望な結果が期待できることも明らかになった。ただし今後投与量を増すためには、現在の投与経路である皮下投与の見直しもありうると考えられた。また eteplirsen をめぐる Sarepta 社と FDA との議論は、エクソン・スキップ治療薬の開発という枠組のみならず、希少疾病医薬品の開発をめぐる状況と重ねあわせて解釈する必要がある。特にヒストリカルコントロールを活用しようとする動きは、難治性・希少性疾患の薬剤開発における申請データパッケージにおいても、二重盲検ランダム化比較試験を原則とする従来のある方が転換する可能性を示唆しており、今後の動向が注目される。さらに 51 以外のエクソン・スキップ治療薬についても、FDA がその開発を加速させる方向性を示したことで、エクソン 51 スキップ治療薬の成否を見極めつつ、各社が開発を加速させる状況が到来するものと考えられる。本研究で開発を進める NS-065/NCNP-01 は、エクソン 53 スキップ治療薬の開発においてはグローバルでも先行していると考えられるが、以上の様な状況を注視しつつ今後の開発を進めていく必要があると考えられた。

E. 結 論

海外を中心に先行しているエクソン 51 スキップ治療薬の開発においては、2013 年～2014 年にかけて主要 2 社の開発戦略が大きく変動した。エクソン・スキップ治療薬が承認される可能性については、未だ予断を許さない状況にあるが、エクソン 53 スキップ治療薬の開発においては先行薬の開発動向を注視し、今後の開発戦略立案に活用していくことが必要である。

参考文献

- (1) GlaxoSmithKline. GlaxoSmithKline's drisapersen (previously GSK2402968/PRO051) to receive Food and Drug Administration Breakthrough Therapy designation for potential treatment of patients with Duchenne Muscular Dystrophy. http://www.gsk.com/media/press-releases/2013/glaxosmithkline_s-drisapersen--previously-gsk2402968-pro051--to-.html
- (2) GlaxoSmithKline. GSK and Prosensa announce primary endpoint not met in Phase III study of drisapersen in patients with Duchenne Muscular Dystrophy. <http://www.gsk.com/media/press-releases/2013/gsk-and-prosensa-announce-primary-endpoint-not-met-in-phase-iii-.html>
- (3) GlaxoSmithKline. Prosensa regains rights to drisapersen from GSK and retains rights to all other programmes for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD). <http://www.gsk.com/media/press-releases/2014/prosensa-regains-rights-to-drisapersen-from-gsk-and-retains-righ.html>
- (4) Prosensa_Therapeutics. Prosensa Reports Initial Findings from the Further Clinical Data Analyses of Drisapersen for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. <http://ir.prosensa.eu/releasedetail.cfm?ReleaseID=819800>

- (5) Prosensa_Therapeutics. Drisapersen treatment for Duchenne muscular dystrophy (DMD): results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of two doses for 24 weeks, followed by a 24-week post-treatment period. MDA Clinical Conference, Chicago, IL, USA; March 16–19, 2014
- (6) Prosensa_Therapeutics. Prosensa Provides Update on Drisapersen.
<http://ir.prosensa.eu/releasedetail.cfm?ReleaseID=844414>
- (7) Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, et al., Ann Neurol. Eteplirsén for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. 2013
- (8) Sarepta_Therapeutics. Sarepta Therapeutics Announces FDA Considers NDA Filing for Eteplirsén Premature in Light of Recent Competitive Drug Failure and Recent DMD Natural History Data.
<http://investorrelations.sarepta.com/phoenix.zhtml?c=64231&p=irol-newsArticle&ID=1875187>
- (9) Sarepta_Therapeutics. REALIZING THE POTENTIAL OF RNA-BASED TECHNOLOGY. 34th Cowen and Company Annual Health Care Conference, Boston, MA, USA; March 4, 2014
- (10) Sarepta_Therapeutics. Sarepta Therapeutics Announces Plans to Submit New Drug Application to FDA for Eteplirsén for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy by Year End 2014.
<http://investorrelations.sarepta.com/phoenix.zhtml?c=64231&p=irol-newsArticle&ID=1920025>
- (11) 第一三共株式会社. 独自技術を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー核酸医薬の開発について.
<http://www.daiichisankyo.co.jp/news/detail/005165.html>

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

【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 Oct 3;168(3):1900-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.12.058. Epub 2013 Jan 17.
- 2) Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Fukada SI, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Ohtsuka Y, Katanosaka Y, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T: Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. Hum Mol Genet. 2013 Aug 1;22(15):3003-15. doi: 10.1093/hmg/ddt157. Epub 2013 Apr 4.
- 3) 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. 2013 May 28, 2e95. Doi: 10.1038/mtna.2013.21.
- 4) Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Initial Pulmonary Respiration Causes Massive Diaphragm Damage and Hyper-CKemia in Duchenne Muscular

- Dystrophy Dog. Sci Rep. 2013 Jul 15;3:2183. doi: 10.1038/srep02183.
- 5) Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S: Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. Hum Mol Genet. 2013 Dec 15;22(24):4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
 - 6) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nishiyama A, Okada H, Takeda S, Okada T: Dystrophic *mdx* mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Hum Mol Genet. 2014 Mar 24. [Epub ahead of print]
 - 7) Ishibashi H, Motohashi H, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K: Efficient embryo transfer in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) with a reduced transfer volume: a non-surgical approach with cryo-preserved late-stage embryos. Biol Reprod, 2013 May 9;88(5):115. doi: 10.1095/biolreprod.113.109165. Print 2013 May.
 - 8) Ishibashi H, Motohashi H, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K: Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset. Reproductive Biology, 2013 Jun;13(2):139-44. doi: 10.1016/j.repbio.2013.02.002. Epub 2013 Mar 13.
 - 9) Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T, Tanihata J, Nozohourmehrabad A, Panesar D, Miskew B, Aoki Y, Yokota T.: Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic *mdx* and *mdx52* mice. PLoS One. 2013 Jul 24;8(7):e69194. doi: 10.1371/journal.pone.0069194. Print 2013.
 - 10) Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S.: Necroptosis Drives Motor Neuron Death in Models of Both Sporadic and Familial ALS., Neuron. 2014 Mar 5;81(5):1001-8. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.011. Epub 2014 Feb 6.
- 【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, 2013
- 【和文著書】
- 1) 永田哲也, 武田伸一: エクソン・スキップ. 筋疾患診療ハンドブック, 中外医学社, pp187-191, 2013
- II 学会発表
<国外>
【特別講演・シンポジウム】
なし
- 【国際学会】
- 1) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective Transduction of Common Marmoset with rAAV1 and 9 To Generate NHP Model of Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013
 - 2) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells That Can Differentiate To Form Myogenic Cells Is Enhanced by Expressing IL-10 in Dog with Duchenne Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual

meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013

- 3) Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with Trans-Placental rAAV9-Microdystrophin Transduction. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

なし

【一般学会】

- 1) 笠原優子, 喜納裕美, 千代智子, 岡田浩典, 岡田尚巳, 武田伸一: 骨髄間質細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の基盤研究. 第34回日本炎症・再生医学会, 京都, 7.3, 2013
- 2) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Generation of muscular dystrophy NHP model with rAAV 1 and 9-mediated transduction of common marmoset. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 7.4, 2013
- 3) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Anti-inflammatory therapeutic approach using multipotent mesenchymal stromal cells for the treatment of duchenne muscular dystrophy. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 7.4, 2013
- 4) Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Immune tolerance induction by transplacental transmission of rAAV-microkystrophin in canine X-linked muscular dystrophy. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 7.4, 2013
- 5) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin J-H, Okada T, Takeda S: rAAV8/9-mediated muscle transduction with tracrolimus in non-human primates. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 7.4, 2013
- 6) 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 岡田尚巳, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 第一回 MatriCell フォーラム, 三重, 9.7, 2013
- 7) 永田哲也, 青木吉嗣, 武田伸一: モルフォリノ・アンチセンス核酸が筋形質膜から取り込まれる機序についての検討. 第14回運動器科学研究会, 東京, 9.13, 2013
- 8) 坂 翔太, 笠原優子, 積田奈々, 山本和弘, 水本秀二, 千代智子, 谷端 淳, 三宅紀子, 岳 鳳鳴, 小林身哉, 中山 淳, 佐々木克典, 福嶋義光, 松本直通, 菅原一幸, 野村義宏, 古庄智己, 武田伸一, 岡田尚巳: デルマタン4-O-硫酸基転移酵素1欠損型エーラスダンロス症候群モデルマウスの病態解析. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9.13, 2013
- 9) 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一朗, 千代智子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一, 戸田達史: 2種類のフクチン欠損マウス用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9.13, 2013
- 10) 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 岡田尚巳, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 9.21, 2013
- 11) 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: Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin の機能的役割の解明. 第68回日本体力医学会, 東京. 9.21-23, 2013
- 12) 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏文, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン53 スキップによる早期探索的臨床試験. 第31回日本神経治療学会総会, 文京区, 11.22, 2013

【その他】

- 1) 岡田尚巳：アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター作製法の開発と筋疾患遺伝子治療への応用。国立成育医療研究センター所内セミナー，東京都世田谷区，7.26, 2013
- 2) 岡田尚巳：AAVベクター作製法の開発と神経筋疾患遺伝子細胞治療への応用。タカラバイオ研究所所内セミナー，滋賀，9.20, 2013
- 3) 岡田尚巳：AAVベクター製造法の開発と臨床展開に向けた課題。医薬品医療機器総合機構セミナー，東京，1.14, 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

- 1) 武田伸一，永田哲也，他：「アンチセンス核酸」（日本新薬と共願）2013年9月5日出願 出願番号：特願 2013-184193（特願 2012-531987 の分割出願）
- 2) 岡田尚巳，笠原優子，武田伸一：移植用幹細胞及びその製造方法（MSC 調製方法と移植効率向上に関する特許）特願 2013-108408、2013年5月22日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, <u>Komaki H</u> , Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, <u>Takeda S</u>	Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients.	<i>J Neurol.</i>	260	3023-9	2013
Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, <u>Komaki H</u> , Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, <u>Takeda S</u> , Kawai M	Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy).	<i>Orphanet J Rare Dis.</i>	19	[Epub ahead of print]	2013

Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients

Fumi Takeuchi · Naohiro Yonemoto · Harumasa Nakamura · Reiko Shimizu · Hirofumi Komaki · Madoka Mori-Yoshimura · Yukiko K. Hayashi · Ichizo Nishino · Mitsuru Kawai · En Kimura · Shin'ichi Takeda

Received: 21 August 2013/Revised: 5 September 2013/Accepted: 6 September 2013/Published online: 22 September 2013
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract We evaluated the long-term efficacy of prednisolone (PSL) therapy for prolonging ambulation in Japanese patients with genetically confirmed Duchenne muscular dystrophy (DMD). There were clinical trials have shown a short-term positive effect of high-dose and daily PSL on ambulation, whereas a few study showed a long-term effect. Especially in Japan, “real-life” observation was lacking. We utilized the national registry of muscular dystrophy in Japan for our retrospective study. We compared the age at loss of ambulation (LOA) between patients

in PSL group and those in without-PSL group. Out of 791 patients' in the Remudy DMD/BMD registry from July 2009 to June 2012, 560 were matched with inclusion criteria. Of the 560, all were genetically confirmed DMD patients, 245 (43.8 %) of whom were treated with PSL and 315 (56.2 %) without PSL. There was no difference between the two groups regarding their mutational profile. The age at LOA was significantly greater (11 month on average) in the PSL group than in the without-PSL group (median, 132 vs. 121 months; $p = 0.0002$). Although strictly controlled clinical trials have shown that corticosteroid therapies achieved a marked improvement in ambulation, discontinuation of the drug due to intolerable side effects led to exclusion of clinical trial participants, which is considered as unavoidable. In our study, patients were not excluded from the PSL group, even if they discontinued the medication shortly after starting it. The results of our study may provide evidence to formulate recommendations and provide a basis for realistic expectations for PSL treatment of DMD patients in Japan, even there are certain limitations due to the retrospectively captured data in the registry.

F. Takeuchi · H. Komaki
Department of Child Neurology, National Centre Hospital,
National Centre of Neurology and Psychiatry, 4-1-1
Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

N. Yonemoto · R. Shimizu · H. Komaki ·
Y. K. Hayashi · I. Nishino · E. Kimura (✉) · S. Takeda
Translational Medical Centre, National Centre of Neurology and
Psychiatry, 4-1-1, Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8551,
Japan
e-mail: enkimura@ncnp.go.jp

H. Nakamura · M. Mori-Yoshimura
Department of Neurology, National Centre Hospital, National
Centre of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi,
Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

R. Shimizu
Tokyo Women's Medical University, 8-1, Kawada-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Present Address:
Y. K. Hayashi
Department of Neurophysiology, Tokyo Medical University,
6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan

M. Kawai
Higashi-Saitama National Hospital, 4147, Kurohama, Hasuda,
Saitama 349-0196, Japan

Keywords Duchenne muscular dystrophy ·
Prednisolone · Walking · National registry · Natural
history

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a rare disease linked to the X-chromosome that affects 1 in 5,000–6,000 newborn males [1]. The disorder follows a progressive course of muscle weakness and also involves cardiac and respiratory muscles. DMD is caused by mutations in the

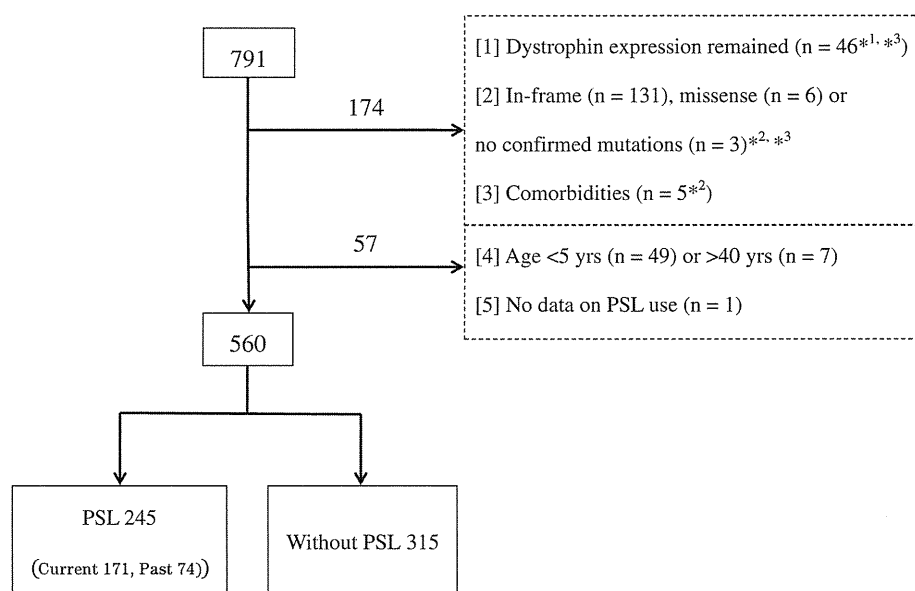
DMD gene, which results in severe reduction or complete elimination of the dystrophin protein. Although the molecular origins of DMD have been known for several years, there is still no curative treatment for the disease. It has been nearly four decades since the potential benefits of glucocorticoids (GCs) for DMD were first reported by Drachman et al. [2]. In the years since, several randomised controlled trials (RCTs) have concluded that GCs increase short-term muscle strength and improve muscle function (from 6 months to 2 years) [3–7] with frequent but not severe adverse effects [6]. In contrast, the long-term benefits and adverse events of GCs have not yet been assessed by an RCT [4], although non-RCTs have suggested functional benefits for over 5 years in some GC-treated patients [8–17]. However, these studies were conducted in small numbers of patients. While PSL has been available for DMD patients since 1990s, there has been very little literature regarding the regimens of PSL for DMD in Japan. Some Japanese experts have a vague idea that the adequate dose could be lower than the one recommended (0.75 mg/kg/day) based on their expert experiences. Deflazacort has not been available yet in Japan [18]. We used a large national registry of DMD patients in Japan to conduct a retrospective study on the long-term clinical efficacy of PSL therapy for maintenance of unassisted ambulation in DMD patients.

Methods

In 2009, we developed a national registry of Japanese DMD/BMD patients (Remudy) in collaboration with the Translational Research in Europe-Assessment and Treatment of Neuromuscular Diseases (TREAT-NMD) Network of Excellence [19, 20]. The Remudy database includes

clinical and molecular genetic data as well as all required items for the TREAT-NMD global patient registry. The database includes male Japanese DMD/BMD patients throughout Japan whose genetic status has been confirmed by genetic analysis. The registry data includes age at registration, birth date, area of residence, features of the muscle biopsy, genomic mutations, complicating diseases, PSL use (present use, past use or never), present functional mobility, age at LOA, cardiac function, respiratory function, spinal surgery, serum CK level, family history of DMD etc., but does not include PSL regimes (dose, age at commencement and duration), side effects of PSL or physiotherapy. All these data were confirmed by three molecular and two clinical curators in Remudy. In this study, we used the registry data compiled from July 2009 to June, 2012 to compare the clinical course of DMD between patients with and without PSL therapy. Patients were excluded for any of the following reasons: (1) dystrophin expression remained on muscle biopsy by immunohistochemistry test; (2) in-frame, missense or unconfirmed mutation of *DMD* gene by mutation screenings; (3) comorbidities, such as adrenal hypoplasia or nephrotic syndrome; (4) current age ≤ 5 years or ≥ 40 years (because PSL therapy for DMD was not common before the 1990s) or (5) missing data on PSL use (Fig. 1). We compared the age at LOA between PSL group of patients, which was comprised of both current and past PSL-treated patients, and without-PSL group, which was comprised of patients who had never been treated with PSL (steroid naïve). The primary outcome measure was ‘independent walking’ defined as ‘unsupported walking indoors’ [11], which is one of the standardized items in the TREAT-NMD global registry format. Because LOA was not well defined in several previous studies, there is no clear consensus on the

Fig. 1 Selection of DMD patients from the Remudy database for this study. *1: These 46 patients included out-of-frame mutations ($n = 7$) and nonsense mutations ($n = 7$). *2: Three patients met (2) and (3) of our exclusion criteria. *3: Twenty-three patients met (1) and (2) of our exclusion criteria. *DMD* Duchenne muscular dystrophy, *PSL* prednisolone, *Remudy* Registry of Muscular Dystrophy



definition of LOA [11]. The Kaplan–Meier method was used to analyse the age at LOA, and the log-rank test was used to compare differences between PSL group and without-PSL group. We used age at LOA as a primary outcome because the database did not contain information on the initiation or duration of PSL treatment [21]. We set 5 years as the start time for PSL therapy. We used the Cox regression model to perform univariate and multivariate analyses to assess the effect of PSL. A covariate selected for adjustment was area of residence because the registrants varied in number and frequency of PSL treatment among 6 geographical areas. In addition, we considered family history of DMD as another covariate for adjustment because it might have influenced the patients' decisions to accept PSL treatment. We calculated hazard ratios (HRs) and their 95 % confidence intervals (CIs). Statistical significance was defined as a two-sided p value <0.05 . The software, SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), was used to perform all statistical analyses. We also searched the PubMed database, reviewed related studies on the long-term effect of GCs on preservation of ambulation, and compared these previous results to those reported in the present study.

Results

Demographics

Of the 791 patients (from 147 hospitals, with 228 doctors' cooperation) in the Remudy database, 174 were excluded because they met at least 1 of the exclusion criteria, and dystrophin expression remained on muscle biopsy tissue was observed in 46 patients. One hundred and forty patients were excluded by *DMD gene* mutation screening, 131 had in-frame mutations, 6 had missense mutations and 3 did not show mutations detectable with standard methods (MLPA, exonic sequencing). Five had comorbid diseases, such as nephrotic syndrome and adrenodysplasia. We also excluded 57 patients because 49 were <5 years old, 7 were ≥ 40 years old and there was missing data on the use or non-use of PSL for 1 patient. After removing patients who fulfilled at least 1 exclusion criterion, the final group for analysis included 560 genetically confirmed DMD patients (Fig. 1).

Baseline characteristics are presented in Table 1. The mean current age of the 560 patients was 15.4 years, and the median current age was 14.0 years (interquartile range, 9–20 years). Of the 560 patients included, 245 (43.8 %) were in PSL group, and 315 (56.2 %) were in without-PSL group. The PSL group included 74 patients who had been treated with PSL in the past and 171 patients were currently on PSL (Fig. 1). Table 1 also presents the features of the *DMD gene* mutations in the PSL group and without-PSL

Table 1 Patient characteristics

	Total	PSL		Without-PSL		Total <i>n</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
		245	100.0	315	100.0	560
Mutation	Exon del/dup	183	74.7	230	73.0	413
	Frame shift or small del/ins	21	8.6	26	8.3	47
	Nonsense	29	11.8	41	13.0	70
	Others	12	4.9	18	5.7	30
Family history	Yes	60	24.9	110	34.9	170
	No	185	75.1	205	65.1	390
Region	Hokkaido and Tohoku	17	9.6	13	4.1	30
	Kanto	148	60.4	87	27.6	235
	Chubu and Tokai	33	13.5	73	23.2	106
	Kansai	25	10.2	62	19.7	87
	Chugoku and Shikoku	14	5.7	23	7.3	37
	Kyusyu and Okinawa	8	3.3	57	18.1	65
Year of birth	2001–2010	87	35.5	106	33.7	193
	1991–2000	131	53.5	120	38.1	251
	1981–1990	24	9.8	60	19.0	84
	1971–1980	3	1.2	29	9.2	32

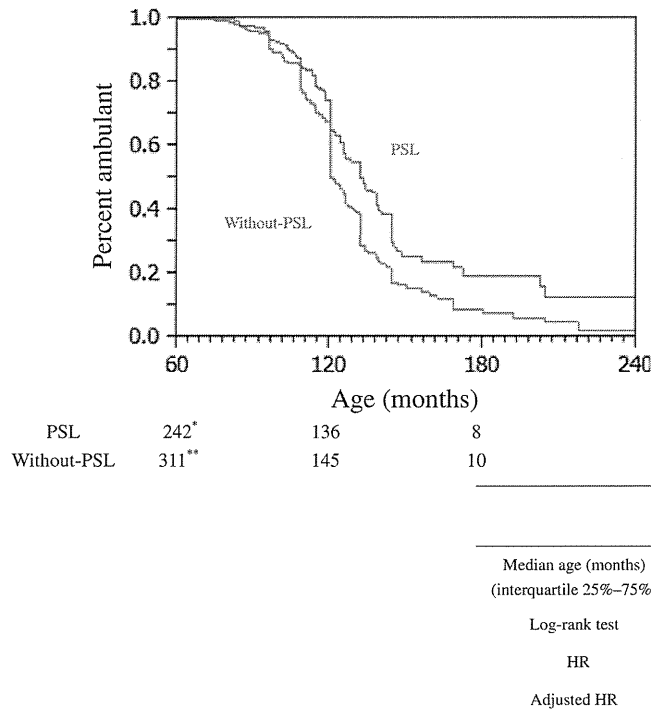
PSL prednisolone, *del* deletion, *dup* duplication, *ins* insertion

group. Mutations included exon deletions or exon duplications (PSL patients: 183/245, 74.7 %; without-PSL patients: 230/315, 73.0 %); small frame shifts, deletions or insertions (PSL: 21/245, 8.6 %; without-PSL: 26/315, 8.3 %) and nonsense mutations (PSL: 29/245, 11.8 %; without-PSL: 41/315, 13.0 %). There was no difference in the mutation type distribution between the 2 groups. On the other hand, the geographic distribution of the 2 groups was significantly different, between 12 and 63 % of patients received PSL. We also presented distribution of the year-of-birth (per decade) in both PSL group and without-PSL group. The patients (PSL group and without-PSL group) were distributed in 2001–2010 (87/245, 35.5 %; 106/315, 33.7 %), 1991–2000 (131/245, 53.5 %; 120/315, 38.1 %), 1981–1990 (24/245, 9.8 %; 60/315, 19.0 %) and 1971–1980 (3/245, 1.2 %; 29/315, 9.2 %) respectively.

Outcome

Of the 560 patients, we excluded three patients from the PSL group and four from the without-PSL group because ambulation status was unknown. Finally, 553 patients, 242 in the PSL group and 311 in without-PSL group were included in the analysis. LOA was reported in 190 of the 311 patients in without-PSL group and 123 of the 242

Fig. 2 Time to loss of ambulation in the PSL group and without-PSL group determined by the Kaplan–Meier method. *Three patients in the PSL group and. **Four patients in the without-PSL group were excluded because their ambulation status was unknown. The PSL group had 242, 136 and 8 ambulant patients at 60, 120 and 180 months of age, respectively. The without-PSL group had 311, 145 and 10 ambulant patients at 60, 120 and 180 months of age, respectively. PSL prednisolone, HR hazard ratio



patients in PSL group. The median age at LOA was 121 months (10.1 years, interquartile range: 120–126 months) for the patients in without-PSL group and 132 months (11.0 years, interquartile range: 126–138 months) in PSL group (Fig. 2). The HR for without-PSL group versus PSL group was 0.67 (95 %CI: 0.53–0.83, $p = 0.0004$), and the adjusted HR was 0.64 (95 %CI: 0.50–0.82, $p = 0.0005$).

Discussion

To our knowledge, this is one of the largest studies worldwide on the long-term effects of PSL therapy on prolongation of independent walking ability in DMD and also the first study in Japan (Table 2). Historically, most DMD patients lose the ability to walk between 9 and 11 years of age [22], but recent improvements in care may have increased the age at LOA slightly even without the administration of steroids. In our study, the median age at LOA in patients who were never treated with PSL (without-PSL group) was 10.1 years. In a recent natural history study of 371 DMD boys, those on any steroid regimen for >6 months walked significantly longer (median age at LOA 12.0 years) than those on any regimen for <6 months or never on steroid (10.0 years) [23], which is quite similar to those without-PSL in our study. According to previous studies, patients receiving GC treatment were able to ambulate 2–5 years longer than those not treated with GCs [8, 23]. In the current study, patients treated with PSL were

able to ambulate 11 months (0.9 years) longer on average than those without PSL, and the extension was relatively modest as compared to previous studies (Table 2). This may be due to one or several of the following factors: differences in ethnic origin of the treated population: small size of some of the previous studies: differences in the clinical definitions of DMD, different definitions of ambulation, variations in PSL regimens, and most importantly duration of treatment. First, previous studies only have been conducted in small numbers of patients (129 patients at most [12]), whereas the sample size in our study was 560 patients. On the other hand, Ricotti et al. [24] performed a prospective observational study in 360 patients, but their study did not compare a GC-treated group to a non-treated group. Second, the genetic and molecular criteria used to define DMD have varied between studies (Table 2). In the Leiden *DMD* mutation database, 9 % of the mutations did not follow the reading-frame rule [25]. A diagnosis based on a purely molecular genetic approach may not accurately distinguish DMD from Becker muscular dystrophy and milder dystrophinopathies, especially in young children with no family history of DMD. In these patients, a muscle biopsy can help verify dystrophin expression to confirm the existence and severity of a functional mutation in the *DMD* gene [26]. Using *DMD* gene analysis only, previous studies may have included subjects with a milder phenotype (residual dystrophin expression) with longer prolongation of independent ambulation regardless of GC treatment history. To improve the precision of diagnosis in our study, we

Table 2 Related studies on long-term effect of GC on preservation of ambulation

Study design	Treated Non-treated Numbers	Criteria		Definition of loss of ambulation	Loss of ambulation			
		DMD gene analysis	Muscle biopsy		Treated Control Median age (Years)	Prolonged ambulation, (Years)		
Our study	Ret	245 (P) 315	Exclude in-frame, missense, not confirmed mutations	Exclude residual Dys	Unable to walk, unsupported indoors	11.0 10.1	0.9	
Ricotti [24]	Pro	360 (Pi191, Pd169)	Include DMD mutation	or both	Include Dys (–)	NorthStar Ambulatory Assessment	Pi12.0, Pd14.5 –	2.5 ^a
Merlini [13]	Pro	4 (P + D) 3	Out of frame in 3 patients		Include Dys (–)	10 m and 6 min walk	16–18 ^b –	–
Bach [15]	Ret	17 (P16, D1) 117	Unknown		Include Dys (–)	Wheelchair dependence	10.8* 9.7*	1.1
Straathof [11]	Ret	35 (Pi) 0	Unknown		Unknown	Unable to walk, unsupported indoors	10.8 –	–
Houde [10]	Ret	37 (D) 42	Include deletions		Include Dys (–)	Can no longer walk even with help	11.5* 9.6*	1.9
King [12]	Ret	91 (P36 D25) 68	Exclude BMD-like mutation and phenotype		Unknown	Functional walking without orthoses or any assistive device	12.5* 9.2*	3.3
Pradhan [14]	Pro	15 (P) 19	Include deletions		Unknown	Chair-bound stage	14.0* 11.0*	3.0
Biggar [9]	Ret	40 (D) 34	Include deletions	and or	Include consistent with DMD	Unable to walk independently	– ^c 9.8*	3–5 ^c
Balaban [8]	Ret	30 (P18, D12) 19	Unknown		Unknown	Unable to walk 30 feet on a level floor	P10.6–12.4*, D10.9–12.9* 8.9–9.9*	–
Yilmaz [16]	Pro	66 (P) 22	Unknown		Unknown	Loss of independent walking ability	10.0* 8.6*	1.4

Pro Prospective study, *Ret* Retrospective study, *D* Deflazacort, *P* Prednisolone (Prednisone); *Pi* Intermittent Prednisolone, *Pd* daily prednisolone, *Dys* dystrophin expression

^a Comparison between Pd and Pi

^b 4 Treated patients (age 16–18) were fully ambulant, able to fast walk 10 m, and to perform the 6MWT; three of them were still able to climb stairs

^c All treated boys could walk 10 m at 10 years of age, 25 (81 %) of 31 at 12 years, 13 (76 %) of 17 at 15 years and two of six boys walked independently at 18 years of age

* Mean age, years

excluded all patients who had any residual dystrophin expression in muscle tissue. However, 303 patients in our study were diagnosed as having DMD only based on *DMD gene* analysis. Of the 303 patients, 125 (28 treated in the past, 97 currently being treated) were in PSL group (50.0 % of 250), and 178 were in without-PSL group (56.5 % of 315). Therefore, some patients with milder phenotype may have been included in both groups. Third, PSL regimes (dose, age at commencement and duration) in our study may possibly have differed from those in related studies. A few previous studies only enrolled patients treated with GC for >1 [4] or >2 [8] years before LOA. Strictly controlled clinical trials have shown a more marked improvement in ambulation. However, discontinuation of the drug due to intolerable side effects leads to exclusion of clinical trial participants, while in our study patients were not excluded from PSL group, even if they discontinued the medication shortly after starting it. The American Academy of Neurology [27] and the Cochrane review [6] evaluated all RCTs on the use of GCs in DMD and concluded that PSL administered at 0.75 mg/kg/day was effective. However, a broadly accepted GC dose–response relationship has not been defined [6]. Therefore, a large-scale prospective study using strict criteria has been started very recently to determine the optimal regime in DMD (FOR-DMD) [28].

Our study is limited because all data is retrospectively captured by the registry. The registry items does not include detailed information of PSL regimes (dose, age at commencement and duration), physiotherapy, or other additive treatments such as creatine [29, 30]. Although we adjusted for family history and area of residence in the multivariate analysis, there was still some possibility of residual confounding between the two groups, such as progression of the attitude of “the standards of DMD care” by the decades. There was no item regarding the side effects of long-term PSL administration. Thus, we did not conclude that the benefits of PSL treatment outweigh the risks. The most frequent adverse effect of long-term GC treatment was a reduction in a patient’s height [6]. Weight gain was the second most frequent adverse event and the reason most often cited for discontinuing treatment [17]. However, weight gain in GC-treated DMD patients was a multifactorial effect due to pharmacological effects of GC and patients immobility, because weight gain generally was more pronounced in non-ambulatory patients [31].

However, our observational study showed actual clinical setting of GCs therapy in Japan (“real life” data). The result of our study could provide evidence to formulate recommendations and base realistic expectations for steroid treatment of DMD patients in Japan. The residential variation in PSL use, depending on the geographical region of Japan, probably due to differing practices among

hospitals and doctors, suggested that PSL therapy for the DMD patients had not been standardised in Japan [18]. Clinical practice guidelines for DMD in Japan will be published by the end of 2013. (<http://www.neurology-jp.org/link/index.html>, accessed August 12th, 2013). Finally, our data presents the first large outcome study of DMD patients in an Asian country. Recently, well conducted natural history studies for DMD have been reported from Europe and North American countries [23, 32]. Considering feasibility of global clinical trials for DMD, it appears relevant to obtain natural history data in non-western DMD patient populations. This study could add important information of the “real life” of DMD patients.

Acknowledgments We are grateful to the patients, families and muscular dystrophy support groups, especially the Japanese Muscular Dystrophy Association, and clinicians for their cooperation in establishing the national Registry of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (Remudy) in Japan. We also thank Dr. Fujii, Dr. Matsumura and Ms. Sato for useful comments on the manuscript. The authors would like to thank Enago (<http://www.enago.jp>) for English language editing. Remudy is operated in collaboration with the TREAT-NMD alliance. This study was supported by an Intramural Research Grant for Neurological and Psychiatric Disorders of the NCNP (23-4).

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical standard Approval of the study was given by the National Centre of Neurology and Psychiatry, Ethics Committee involved in the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, Flanigan KM, al-Dahhak R, Gastier-Foster J, Kneile K, Dunn DM, Duval B, Aoyagi A, Hamil C, Mahmoud M, Roush K, Bird L, Rankin C, Lilly H, Street N, Chandrasekar R, Weiss RB (2012) Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 71:304–313
- Drachman DBTK, Myer E (1974) Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 14:1409–1412
- Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, King W, Signore L, Pandya S, Florence J, Schierbecker J, Robison J, Kaiser K, Mandel S, Arfken C, Gilder B (1989) Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne’s muscular dystrophy. *N Engl J Med* 320:1592–1597
- Angelini C, Pegoraro E, Turella E, Intino MT, Pini A, Costa C (1994) Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17:386–391
- Rahman MM, Hannan MA, Mondol BA, Bhoumick NB, Haque A (2001) Prednisolone in Duchenne muscular dystrophy. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 27:38–42