

201317078A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 伸一

平成26(2014)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 - NS-065/NCNP-01 の非臨床試験の検討・実施経過 について - 武田 伸一	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 被験者由来細胞を用いたNS-065/NCNP-01の <i>in vitro</i> アッセイ 木村 円、永田 哲也	----- 15
2. ヒト骨格筋検体におけるジストロフィン発現の二重 蛍光免疫染色による定量的評価 小牧 宏文	----- 21
3. エクソン45-55を欠失した短縮型ジストロフィンの 機能解析 岡田 尚巳、谷端 淳	----- 25
4. メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーに対するエク ソン・スキップの検討 永田 哲也	----- 31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 37

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))
平成 25 年度 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
- NS-065/NCNP-01 の非臨床試験の検討・実施経過について -

研究代表者	武田 伸一	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 部長
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
	小牧 宏文	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 病院 小児神経診療部 医長
	木村 円	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 早期・探索的臨床試験室 室長

研究要旨

核酸医薬品を用いた DMD に対するエクソン 53 スキップ治療薬 (NS-065/NCNP-01) の開発にあたり、当該治験薬の臨床試験開始前に必要な非臨床試験の実施項目・時期については、未だ十分な指針が整備されている状況ではなく、規制当局との対面助言等の過程を踏むことが重要と考えられる。今回、実際に PMDA との薬事戦略相談対面助言を実施し、科学的な議論を経て臨床試験開始前に必要な実施項目について合意を得て、当該非臨床試験を実施した。薬事戦略相談制度を活用した結果、今のところ開発プロジェクトは順調に進捗しており、本治験薬のような新規性の高い医薬品で、かつ希少疾患を対象とする場合、当局との対話を重ね、開発計画へ反映させることの重要性が確認された。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対するエクソン 53 スキップ治療薬 (NS-065/NCNP-01) の早期探索的臨床試験を実施するにあたり、当該治験薬に求められる非臨床安全性評価の内容については、医療技術実用化総合研究事業において昨年度までに検討したところである。その結果、

現時点では核酸医薬品の第 1 相試験開始に必要な非臨床試験項目及び実施時期について明確な指針は整備されておらず、先行薬等の試験内容と規制当局の対応を注視しつつ、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との対面助言等のプロセスを踏むことが重要という結論が得られた。このような検討結果を踏まえ、本研究課題の最終年度である

今年度は、実際に PMDA との薬事戦略相談
対面助言を経て、非臨床試験パッケージの
最終内容を決定し、これらの非臨床試験を
実施した経過についてとりまとめ、DMD に
対するエクソン・スキップ治療薬に求めら
れる非臨床試験の計画から実施までの過程
について検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センター（以下、
NCNP）病院、同トランスレーショナル・メ
ディカルセンター、及び同神経研究所に所
属する担当者、並びに共同開発企業である
日本新薬株式会社（以下、日本新薬）の担
当者からなる作業部会の検討経過に基づく。

C. 研究成果

1. 非臨床データ収集前の事前検討と薬 事戦略相談対面助言実施まで

NCNP と日本新薬の共同研究を通して見出
された、エクソン 53 スキップを誘導するモ
ルフォリノ核酸については、細胞を用いた
臨床における有効性を踏まえ、NCNP が主
導でfirst-in-human 試験を実施することに
ついて 2011 年に両者の間で基本合意に至り、
2013 年に医師主導型早期探索的臨床試験と
して投与開始を目指すこととした。しかし
以下のような被験物質及び対象疾患の特殊
性から、FIH 治験開始までに必要な非臨床
データ、治験実施計画書並びに開発戦略等
について PMDA と見解のすり合わせが必要
と判断した。

- 核酸医薬品全般に対して第 1 相前に求
められる非臨床試験についての明確な
指針がない
- 動物を用いた毒性試験は標的遺伝子の
配列がヒトと異なるため解釈が困難で
ある
- 正常人を対象とした第 1 相試験は標的

遺伝子のフレームシフト変異を誘導す
るため困難である

- 対象のエクソン欠失パターンを有する
DMD 患者は少数で組み入れ数には限
界がある

また以下の点から、本プロジェクトは
PMDA が実施する薬事戦略相談の趣旨に合
致すると判断した。

- 研究機関が主体となって見出された有
望なシーズであること
- 比較的新しいカテゴリーの医薬品であ
り品質・安全性の担保に関する知見が
十分蓄積されていないこと

• 難病・希少疾病を対象としていること
そこで、2011 年 8 月に開催された、独立行
政法人医薬基盤研究所主催 橋渡しセミナー
「薬事戦略相談事業について」における
個別面談に参加し、本開発プロジェクトが
薬事戦略相談の趣旨に合致するかについて
相談を行った。その結果、相談内容や論点
の整理、資料内容の確認のため、事前面談
の実施を勧められたことから、同年 9 月に
薬事戦略相談事前面談を実施した。ここで
の相談内容は以下のとおりである。

- 医師主導の早期探索的臨床試験による
開発戦略の妥当性について
- 早期探索的臨床試験のプロトコル案
を踏まえた、推奨される非臨床試験パ
ッケージについて
- 治験薬に求められる品質について

その結果、上記の内容で対面助言を実施す
ることについて合意が得られ、同年 12 月に
薬事戦略相談対面助言（戦 P2）の実施に至
った。

2. 非臨床試験に先立つ薬事戦略相談対 面助言の実施

2011 年 12 月に実施した薬事戦略相談対面
助言（戦 P2）において、我々からは以下の
相談を行った。

- 非臨床安全性データパッケージの妥当

性について

- 非臨床安全性試験に用いる被験物質の品質について

これに対する PMDA 側の指摘事項は以下のとおりであった。

- 提示された非臨床安全性データパッケージが適切に実施され、安全性が確認された場合には早期探索的臨床試験の実施は可能と考える。
- 提示された品質の被験物質を非臨床試験で使用することは受け入れ可能と考える。ただし、安定した製造法の担保、off-target 効果の有無の確認、各不純物の暴露量等について、今後留意する必要がある。
- 予定されている雄性カニクイザルを用いた 1 2 週間間歇（週 1 回）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（安全性薬理試験を含む）並びに遺伝毒性試験が適切に実施されるために、当該試験計画が確定した時点で改めて事前面談等において議論することが適切と考える。

我々はこれらの指摘に以下の方針で対応することとした。

- 非臨床試験での定量法は目的に合わせたバリデーションを実施してデータの信頼性確保に努める。
- 不純物含有量の少ない原薬を安定して製造し、また不純物プロファイルの変動が生じないようにロット管理を徹底する。
- 指摘された雄性カニクイザルを用いた 12 週間間歇投与毒性試験及び 4 週間回復性試験等の計画が確定した時点（2012 年 6 月）で薬事戦略相談事前面談（戦前 33）を実施し、当該試験計画について議論を行う（その結果、機構側の意見を踏まえ、ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験を追加した）。

3. 実施した非臨床試験の内容

以上の議論を踏まえ、以下のような非臨床試験を実施した（現時点では知財管理上、具体的内容・結果について開示不可能なものが含まれるため主なものを示す）。

薬効薬理試験

- DMD 患者由来細胞でのエクソン 53 スキッピング活性
- ヒト横紋筋肉腫細胞株におけるエクソン 53 スキッピング活性

薬物動態試験

- サル単回静脈内投与後の血漿中濃度
- サル及びマウスにおける静脈内投与後の組織分布
- タンパク結合試験
- *in vitro* および *in vivo* 代謝試験
- サル及びマウスにおける単回静脈内投与後のマスバランス

毒性試験

- サル及びマウスにおける静脈内投与急性毒性試験
- サル静脈内投与反復毒性試験
- 遺伝毒性試験
- 安全性薬理試験

4. 早期探索的臨床試験の実施まで

以上の非臨床試験の結果が 2013 年初頭までに得られるとともに、また同時期までに早期探索的臨床試験のプロトコル最終案がまとまったことから、2 回目の薬事戦略相談対面助言（戦 P44）を 2013 年 3 月に実施し、最終的な早期探索的臨床試験のプロトコルを確定した。その後 NCNP 治験審査委員会の承認を経て、治験届出を行い、2013 年 6 月に被験者組み入れを開始した。

D. 考察

昨年度までの検討では、核酸医薬品全般に求められる非臨床試験については、試験項目及び実施時期について明確な指針が整備されていないことが明らかとなり、PMDA

との対面助言等のプロセスを踏むことが重要であることを報告した。今回、実際に薬事戦略相談対面助言を経て、早期探索的臨床試験実施に必要な非臨床データパッケージについて、科学的な議論を通して具体的な方針を決定することができた。特に、対象疾患や被験物質の特殊性について理解を共有したうえで、質の高い試験計画を作成するための議論を行えた点、相談者の主張に対する受入可否だけでなく、新たな選択肢や方向性、また今後注意が必要な箇所について、積極的な見解提示・コメントが得られた点などは大いに有用であった。DMDに対する治療薬の開発は、希少疾患であること、及び臨床的有効性の検証方法が十分に確立されていないことなど、治験の実施に際しての困難さを伴い、また核酸医薬品自体も比較的新しいカテゴリーに分類されるため、安全性・品質を適切に検証する方法に不確実性が存在する。本治療薬の開発プロジェクトでは当初スケジュールのとおり2013年に被験者への投与を開始することができたが、これは薬事戦略相談制度を活用した当局との対話により、上記の課題に適切に対処し、開発計画の進捗に反映させた結果と考えられた。

E. 結論

核酸医薬品を用いた DMD に対するエクソン・スキップ治療薬の開発にあたり、臨床試験の開始前に求められる非臨床試験の実施項目・時期については、未だ十分な指針が整備されている状況ではなく、規制当局との対面助言等の過程を踏むことが重要と考えられる。今回、実際に PMDA との薬事戦略相談対面助言を実施し、科学的な議論を経て臨床試験開始前に必要な実施項目について合意を得て、当該非臨床試験を実施した。その結果、開発プロジェクトは順調に進捗し、本治療薬のような新規性の高い

医薬品で、かつ希少疾患を対象とする場合、当局との対話を重ね、開発計画へ反映させることの重要性が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

【欧文原著・総説】

- 1) 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]
- 2) Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, 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 Dec;260(12):3023-9. doi: 10.1007/s00415-013-7104-y. Epub 2013 Sep 22.
- 3) 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.
- 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) 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.
- 6) Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S: Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep*. 2013;3:2142. doi: 10.1038/srep02142.
- 7) Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda S, 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 Apr 19;8(1):60. [Epub ahead of print]
- 8) Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Capsaicin mimics mechanical load-induced intracellular signaling events: Involvement of TRPV1-mediated calcium signaling in induction of skeletal muscle hypertrophy. *Channels (Austin)*. 2013 May-Jun;7(3):221-4. doi: 10.4161/chan.24583. Epub 2013 Apr 12.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Rayavarapu S, Coley W, Cakir E, Jahnke V, Takeda S, Aoki Y, Grodish-Dressman H, Jaiswal JK, Hoffman EP, Brown KJ, Hathout Y, Nagaraju K: Identification of disease specific pathways using *in vivo* SILAC proteomics in dystrophin deficient *mdx* mouse. *Mol Cell Proteomics*. 2013 May;12(5):1061-73. doi: 10.1074/mcp.M112.023127. Epub 2013 Jan 7.
- 13) Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I. Rapidly progressive scoliosis and respiratory deterioration in Ullrich congenital muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(9):982-988.
- 14) 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*. 2013 Apr;23(4):349-356.
- 15) 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.* 2013 Feb;21(2): 266-268. doi: 10.1038/mt.2013.4.No abstract available
- 16) Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Molecular basis of muscle hypertrophy and atrophy: potential therapy for muscular dystrophy. *J Sports Med Phys Fitness.* 2(2)179-184, 2013
- 17) Saito T, Ishigaki K, Murakami T, Sato T, Kajino S, Takeda S, Osawa M: Identification of a Duplication Breakpoint in the DMD Gene Using Array Comparative Genomic Hybridization. *Journal of Tokyo Women's Medical College.* 2013;83(1):E20-E24.
- 18) 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.* 2013 Jan;19(1):101-106. 2
- 【和文原著・総説】
1. 齊藤崇, 武田伸一: 選択的スプライシングを調節するアンチセンス医薬品の開発について. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45(1)23-32, 2014
 2. 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
 3. 伊藤尚基, 武田伸一: 神経型一酸化窒素により誘起される TRPV1 を介した Ca²⁺シグナルは骨格筋肥大を促進する. 月刊実験医学, 31 (6) 901-904, 2013
 4. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 筋疾患へのサテライト細胞の利用. 生体の科学, 64(2)162-167, 2013
 5. 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 TRPV1 を介した Ca²⁺シグナルは骨格筋肥大を促進する重要な因子である. 月刊「実験医学」 Current Topics, in press
- II 学会発表
 <国外>
 【特別講演・シンポジウム】
1. Takeda S: Exon Skipping Approach To Duchenne Muscular Dystrophy. The 12th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting, Xian, China 6.7, 2013
 2. Takeda S: The molecular mechanism of muscle hypertrophy; roles of nNOS/NO, peroxynitrite and TRPV1. EMC 2013 42nd European Muscle Conference, Amsterdam, Netherland, 9.21, 2013
 3. Takeda S: Exploratory Study of Exon 53 Skipping Drug NS-065/NCNP-01 in Duchenne Muscular Dystrophy. Action Duchenne 12nd International Conference, London, UK, 11.8 2013
- 【国際学会】
1. Imamura M, Takeda S: Analysis of Interaction of WWP1 E3 Ubiquitin Protein Ligase with Dystrophin-Associated Glycoproteins. The 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 12.14-18
 2. Ito N, Kudo A, Suzuki Y, U Ruegg, Takeda S: Activation of calcium signalling through TRPV1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal

- muscle hypertrophy. EMBO Workshop Molecular mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease, Ascona, Switzerland, 9.18, 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
 4. 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
 5. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective Transduction of Cannon 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
 3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新しい治療薬を目指して. 第9回医学生・若手医師のための小児科診療最前線～新生児医療から高度先端医療・移植医療まで～, 大阪, 7.6, 2013
 4. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するアンチセンス核酸医薬品の開発. 第29回日本DDS学会学術集会, 京都, 7.4, 2013
 5. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療法開発のストラテジー. 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたストラテジー, 品川区, 4.26, 2013
 6. 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, タワーホール船堀, 1.17, 2013

【一般学会】

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 武田伸一: The molecular mechanism of muscle hypertrophy; roles of TRPV1 筋肥大の分子機構: TRPV1 を中心に. The 91st Annual meeting of the Physiological Society of Japan 第91回日本生理学会大会, 3.17, 2014
2. 武田伸一: 医薬品関連・薬事戦略相談を受けて - モルフォリノ核酸: デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の治療, PMDA 薬事戦略フォーラム, 全社協・灘尾ホール, 千代田区, 11.19, 2013
1. 掛井基徳, 永瀬 香, 立石智則, 武田伸一: 電子申請システムを用いた倫理申請課題の年次・終了報告管理. 第34回日本臨床薬理学会学術総会, 東京, 12.4, 2013
2. 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
3. 木村 円, 林由起子, 中村治雅, 森まどか, 竹内芙実, 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
4. 伊藤尚基, 工藤 明, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素により誘起されるCa²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 第36回分子生物学会, 神戸, 12.4, 2013
5. 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
6. 古庄 知己, 岳 鳳鳴, 坂 翔太, 積田 奈々, 笠原 優子, 岡田尚巳, 水本 秀二, 小林 身哉, 中山 淳, 三宅 紀子, 野村 義宏, 江良 択実, 簗持 淳, 石川 真澄, 涌井 敬子, 福嶋 義光, 松本 直通, 菅原 一幸, 佐々木 克典, 武田伸一: デルマタン 4-O- 硫酸基転移酵素 (D4ST1) 欠損による Ehlers-Danlos 症候群 (DDEDS) の疾患モデルの構築と検証. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会, 仙台, 11.20, 2013
 7. 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
 8. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 日本生理人類学会第 69 回大会, 京都, 10.27, 2013
 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: 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
 10. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) により誘起される Ca²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 9.22, 2013
 11. 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
 12. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一郎, 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
20. 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
 21. 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
- 【その他】
1. 武田伸一: 筋ジストロフィー治療薬の開発. 第 13 回東大病院臨床試験セミナー, 東京, 3.28, 2014
 2. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療開発を目指した研究の進展. アステラス製薬研究本部内セミナー, 筑波, 3.27, 2014
 3. 武田伸一: 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題 ヒアリング, 東京, 3.19, 2014
 4. 武田伸一: H25 年度成果発表会の報告と H26 年度の計画. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究 平成 25 年度骨格筋カンファレンス第 2 回, 東京, 2.18, 2014
 5. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療の時代へ. 熊本大学神経内科 神経・骨格筋セミナー, 熊本大学医学部附属病院, 熊本, 2.14, 2014
 6. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療の時代へ. 八雲病院 院内講演会, 国立病院機構 八雲病院, 函館, 2.6, 2014
 7. 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
 8. 松坂恭成, 岸宗一郎, 小牧宏文, 大矢寧, 青木吉嗣, 武田伸一, 橋戸和夫: 血清 microRNAs を用いた筋ジストロフィーに対する新規バイオマーカーの確立. 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平成 25 年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.10, 2014
 9. 武田伸一, 永田哲也, 齊藤 崇, 谷端淳, 増田 智, 福田昂一, 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. 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平成 25 年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.10, 2014
 10. 武田伸一: 成果目標と実績. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究成果報告会, 東京, 12.20, 2013
 11. 鈴木 仁, 亀山俊樹, 齊藤 崇, 増田智, 永田哲也, 前田 明, 武田伸一, 塚原俊文: DMD 遺伝子における稀少スプライシング産物の解析と治療法へのアプローチ. 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 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.10, 2013
 12. 関根光雄, 正木慶昭, 石井陽大, 山本恵士, 宮坂隆太, 岡庭夏己, 山田剛史, 大窪章寛, 清尾康志, 谷端 淳, 永田哲也, 武田伸一: 化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発—塩基部位と糖部位を同時に化学修飾した 2' -O-MCE RNA を用いる筋ジス

- トロフィー治療薬の開発－. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
13. 武田伸一，青木吉嗣，横田俊文，中村昭則，Terence Partridge，永田哲也：モルフォリノ核酸が筋形質膜から取り込まれる機序の解明－難治性筋・神経疾患に対する画期的核酸医薬品の開発を目指して－. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 14. 横田俊文，越後谷裕介，Joshua Lee，Joshua Kim，永田哲也，齊藤 崇，谷端淳，増田 智，青木吉嗣，William Duddy，Vincent Mouly，武田伸一：ヒト DMD 遺伝子に対するエクソン 45-55 スキッピング. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 15. 武田伸一，永田哲也，齊藤 崇，谷端淳，増田 智，福田昂一，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. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 16. 松坂恭成，岸宗一郎，小牧宏文，大矢寧，青木吉嗣，武田伸一，橋戸和夫：血清 microRNA を用いた筋ジストロフィーに対する新規バイオマーカーの確立. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 17. 武田伸一，倉岡陸季，木村 円，永田哲也，岡田尚巳：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. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 18. 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－筋衛星細胞に対する G-CSF の作用機序の解明－. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.10, 2013
 19. 武田伸一，笠原優子，喜納裕美，倉岡陸季，千代智子，岡田浩典，今川究，菌田啓之，立花克彦，岡田 尚巳：骨髄間質細胞を応用した DMD に対する細胞移植療法の基盤研究. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者：武田伸一)平成 25 年度班会議，東京，12.9, 2013
 20. 深田宗一郎，Ma Yuran，渡邊陽子，大谷拓史，村上聡，上住聡芳，山元 弘，鈴木友子，武田伸一：骨格筋再生メカニ

- ズムに基づいた移植細胞創成技術の開発。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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者:武田伸一)平成25年度班会議,東京,12.9,2013
21. 上住聡芳, 深田宗一朗, 上住 円, 山本直樹, 武田伸一, 土田邦博: 間葉系前駆細胞の表現型の制御機構。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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者:武田伸一)平成25年度班会議,東京,12.9,2013
 22. 武田伸一, 伊藤尚基, Urs Ruegg, 鈴木友子: Ca²⁺シグナルによって誘起される mTOR の活性化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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者:武田伸一)平成25年度班会議,東京,12.9,2013
 23. 二川 健, 安倍知己, 内田貴之, 下田いちか, 越智ありさ, 中尾玲子, 真板綾子, 平坂勝也, 近藤茂忠, 武田伸一: Unloading-mediated signal transduction in skeletal muscle. 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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者:武田伸一)平成25年度班会議,東京,12.9,2013
 24. 平坂勝也, 前田 翼, 坂下禎宏, 春名真理江, 真板綾子, 近藤茂忠, 谷山茂人, 橘 勝康, 武田伸一, 二川 健: 老化による筋萎縮のメカニズム: MuRF1 ノックアウトマウスを用いた解析を中心に。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 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者:武田伸一)平成25年度班会議,東京,12.9,2013
 25. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一朗, 千代智子, 鈴木友子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一: 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/細胞病態および治療に関する研究〜2種類のフクチン欠損マウスを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。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 23-5「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」(主任研究者:西野一三)平成25年度班会議,東京,12.6,2013
 26. 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セッション「この一年間の進捗状況報告: 施設選定」。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「筋ジストロフィーの治験拠点整備, 包括的診療ガイドラインの研究」(主任研究者:小牧宏文)平成25年度班会議,東京,11.30,2013
 27. 武田伸一, 永田哲也: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップ治療薬による早期探索的臨床試験。平成25年度厚生労働科学研究費補助金における研究課題に係る実地調査,東京,11.13,2013
 28. 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 弓削田直子, 千代智子, 増田千明, 岡田尚巳, 武田伸一: AAV ベクターを用いた DMD に対する遺伝子治療と免疫寛容誘導。第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会,有馬,11.2,2013

29. 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 岡田尚巳, 今村道博, 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 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
30. 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 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
31. Janek Hyzewicz, 倉岡睦季, 谷端淳, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: Proteomic and carbonylation profile analysis of *mdx* mouse skeletal muscle following light endurance exercise. 第 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
32. 伊藤尚基, Urs Ruegg, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca²⁺シグナルが筋肥大を促進する. 第 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
33. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一朗, 千代智子, 鈴木友子, 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を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 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
34. 武田伸一: 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題 平成 25 年度第 1 回運営委員会, 東京, 10.23 2013
35. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療法の開発—骨格筋の萎縮と肥大の新たな分子機構を中心として. 武田薬品工業株式会社先端科学研究所 講演会, 神奈川, 9.30 2013
36. 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
37. 武田伸一: アンチセンス核酸医薬による神経筋疾患の治療. みずほインベストメントコンファレンス東京, 東京, 9.10, 2013
38. 武田伸一: 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 拡大運営委員会, 東京, 8.26, 2013
39. 武田伸一: 国立精神・神経医療研究センターの取り組み 希少疾患の臨床開発. 平成 24 年度 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 (臨床研究基盤整備推進研究事業)「国民・患者への臨床研究・治験の普及啓発に関する研究」(佐藤班) 班会議, 埼玉, 8.8, 2013
40. 武田伸一: エクソン・スキップに関する臨床試験の動向. 第 2 回筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク (MDCTN) ワークショップ, 横浜, 7.27, 2013
41. 武田伸一: 核酸医薬品の開発、薬物複合体合成技術. (独) 科学技術振興機構研究開発戦略センター「バイオ医薬品等の次世代医薬品、生産技術のに関するワークショップ」, 東京, 7.18, 2013
42. 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 25 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, 国立精神・神経医療研究センター, 小平, 4.1, 2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許登録
- 1) 武田伸一、永田哲也、渡辺直樹、佐藤洋平, 「アンチセンス核酸」, 特許第

5363655号、平成25年9月13日登録

- 2) 武田伸一、谷端 淳、鈴木直樹、鈴木友子、「ユートロフィン遺伝子発現増強物質のスクリーニング」、特許第5250810号、平成25年4月26日登録

出願

- 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調整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

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))
平成 25 年度 分担研究報告書

被験者由来細胞を用いた NS-065/NCNP-01 の *in vitro* アッセイ

研究分担者 木村 円 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 早期・探索的臨床試験室 室長

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

研究要旨

エクソン 53 スキップ治療薬である NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験 (NCNP/DMT01) プロトコールでは、組み入れ基準のひとつとして「被験者由来細胞における NS-065/NCNP-01 の *in vitro* アッセイの結果、ジストロフィン mRNA でのエクソン 53 スキップ及びジストロフィンタンパク質の発現が確認されている患者」を設定している。これは被験者の細胞を用いて *in vitro* で事前に検証することで、治療薬の有効性、及び被験者の適格性を判定することを目的としている。組み入れ予定者全例の線維芽細胞を用いて解析を行ったところ、今回組み入れられた 3 つの欠失パターン全て、また組み入れ予定者全例において所要の結果を確認した。新規のエクソン・スキップ治療薬の開発を進める上で、治療薬の有効性評価・被験者の適格性評価において *in vitro* アッセイが重要な役割を果たすことが確認できた。

A. 研究目的

エクソン 53 スキップ治療薬である NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験 (NCNP/DMT01) プロトコールでは、組み入れ基準のひとつとして「被験者由来細胞における NS-065/NCNP-01 の *in vitro* アッセイの結果、ジストロフィン mRNA でのエクソン 53 スキップ及びジストロフィンタンパク質の発現が確認されている患者」を設定している。エクソン・スキップを目的としたアンチセンス核酸は、適応となる変異形式を有する被験者に対してのみ有効性をもたらず、健常人または適応とならない変異形式を有する DMD 患者に対しては、mRNA のフレームシフト変異を誘導する。そのため特に健常人にとっては正常なジストロフィンの発現を阻害し、有害な作用をもたらすこととなる。被験者の細胞を用いて *in vitro* で治療薬の有効性

を確認することは、有効性の観点のみならず、被験者の適格性判定の観点からも重要なため、本基準が設定されている。本研究の昨年度までに、患者由来線維芽細胞を用いた *in vitro* アッセイ手法について検討を行い、被験者スクリーニングに用いることのできる評価方法を確立した。その概要は皮膚由来線維芽細胞にレトロウイルスによる MYOD 遺伝子の導入を行い筋管細胞に分化させ、その後治療薬を添加して評価を行うものである。今年度は NCNP/DMT01 試験において、組み入れ予定となった 10 名の被験者に対し、当該アッセイを適用して組み入れの適格性判定を行ったのでその概要について報告する。

B. 研究方法

NCNP/DMT01 試験は GCP 基準で計画され、平成 25 年 5 月に国立精神・神経医療研究セン

ター治験審査委員会の承認を受けた。医薬品医療機器総合機構に対する治験届出を同月に行い、30日調査の終了後の被験者リクルートを開始した。参加に同意が得られた被験者から、組み入れスクリーニング検査の一環として投与前骨格筋検体を採取するための筋生検と同時に、線維芽細胞を分離するための皮膚生検を実施した。皮膚生検の実施から、平均して1か月間の培養を経て、必要な量の線維芽細胞を確保した。分離した線維芽細胞については以下のスケジュールで処理を行った。

- 1日目 線維芽細胞の播種 (3.4 × 10⁶ cell/T225 フラスコ) × 3 枚
- 2日目 レトロウイルスのトランスフェクション(増殖培地 27 mL + ウィルス液 3 mL, ポリブレン 8 µg/mL)
- 3日目 ウィルス除去 (培地交換)
- 7日目 (分化0日目)FACS(FACS Area, BD)で FITC 蛍光強度が平均以上の集団を回収後、24 ウェルプレートに 9.4 × 10⁴ cell/ウェル で播種、分化培地で培養
- 14日目 (分化7日目) NS-065/NCNP-01 添加 (0 µM, 10 µM) , RT-PCR と WB 用にそれぞれ最低3 ウェルずつ
- 16日目 (分化9日目) NS-065/NCNP-01 除去 (分化培地の交換)
- 21日目 (分化14日目) 細胞回収
回収した細胞の処理は以下のとおり

RT-PCR :

RNeasy mini kit (Qiagen)にて total RNA を精製し、OneStep RT-PCR kit(Qiagen)で RT-PCR 反応を行う。被験者の変異に応じて、エクソン 44 または 46 に設計したフォワードプライマーを用い、エクソン 54/55 境界に設計したリバースプライマーを共通して用いる。生成された RT-PCR 産物は experion DNA 1k Analysis kit (Bio-rad)で電気泳動を行い評価する。

mRNA シーケンス :

RT-PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動

し、2つのバンド(エクソン 53 あり/なし)をそれぞれ切り出す。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega)を用いて各バンドを精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Life technologies)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、生成物を BigDye Terminator 精製キットを用いて精製後、ABI 3130XL(Applied biosystems)にてキャピラリー電気泳動を行う。

ウェスタンブロット :

CompleteMini (Roche)を添加した RIPA buffer(Thermo Scientific)で細胞を溶解してライセートを回収する。NuPage LDS sample buffer を添加して、NuPage Novex 3-8% Tirs-Acetate Gels で電気泳動 (SDS-PAGE) し、Immobilone-P メンブレン (Millipore) に EzBlot(ATTO) を用いてセミドライ・トランスファーを行う。TBS-T(Takara)で溶解した 2% ECL prime blocking agent (GE healthcare) を用いて 4°C オーバーナイトでブロッキングを行い、NCL-DYS1 (Leica biosystems) 1:200, NCL-DES-DER II (Leica biosystems)1:20000 で室温 60 分の一次抗体反応を行う。メンブレンを洗浄後、Goat Anti-mouse IgG (BIO-RAD)1:2600 で室温 10 分の二次抗体反応を行う。洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE healthcare)で化学発光させ、LAS 4000mini (GE Healthcare)にて撮影する。

C. 研究成果

1. RT-PCR

組み入れ予定被験者のエクソン欠失パターンは、エクソン 45-52 欠失、48-52 欠失、49-52 欠失の 3 パターンであった。用いたプライマーセットにより、それぞれの RT-PCR で認められるべき生成物の長さは以下のとおりである。

欠失部位	45-52	48-52	49-52
53 あり	424 bp	579 bp	765 bp
53 なし	212 bp	367 bp	553 bp

各被験者において、治験薬が 0 μ M ではエクソン 53 ありのバンドしか認められなかったが、10 μ M ではエクソン 53 なしのバンドが検出された。

2. mRNA シーケンス

エクソン 53 スキップが生じて、エクソン 53 なしと推定される RT-PCR 生成物のシーケンス解析を実施した場合、DMD 遺伝子のエクソン 54 の 3' 側に接続するエクソンは、被験者の欠失パターンに応じて、以下のとおりとなることが予想される。

欠失部位	45-52	48-52	49-52
接続	Exon 44	Exon 47	Exon 48

RT-PCR 生成物を精製しシーケンス解析を行ったところ、各被験者においてエクソン 53 なしと考えられたバンドのシーケンスは、上記の予想と一致し、エクソン 53 スキップが生じていることが確認できた。

3. ウェスタンブロット

エクソン 53 スキップの結果、mRNA がインフレームに修正されて生成される短縮形ジストロフィンの分子量は、それぞれ以下のとおりと予想される。

欠失部位	45-52	48-52	49-52
分子量	371 kDa	389 kDa	397 kDa

各被験者において、治験薬が 0 μ M では、マーカーの最上部 (250 kDa) と正常対照 (427 kDa) の間と考えられる該当位置にシグナルは検出されなかったが、10 μ M では該当する位置にシグナルが検出され、ジストロフィンタンパク質の生成が確認された。

D. 考察

組み入れ予定 10 名に対しては、平成 25 年 7 月より適格性スクリーニング検査を開始し、その際に採取した細胞を用いてコホート 1 の被験者より投与スケジュールに従って順次アッセイを実施し、各被験者の投与開始予定

時期までに結果を入手した。1 例あたりの所要期間は平均して 5-6 週間を要した。最終的に、組み入れ予定者全例において *in vitro* でのエクソン 53 スキップとジストロフィンタンパク質の発現が確認され、翌平成 26 年 3 月までにコホート 2 及び 3 も含めた全例について終了した。エクソン 53 スキップの対象患者を選定するにあたり、ジストロフィン遺伝子の欠失領域がエクソン 52 で終わる、またはエクソン 54 から始まるアウトオブフレーム欠失で、かつエクソン 53 スキップにより、欠失領域の一端がエクソン 53 のインフレーム欠失となる患者は本治験薬の治療対象となりうる。理論的には多くのパターンが考えられるが、実際に報告されている症例は、エクソン 10-52⁽¹⁾、19-52⁽²⁾、42-52⁽³⁾、43-52⁽⁴⁾、45-52⁽⁵⁾、47-52⁽⁵⁾、48-52⁽⁶⁾、49-52⁽⁷⁾、50-52⁽⁸⁾ および 52⁽⁹⁾ 欠失の 10 パターンである。このうち、患者細胞を用いた *in vitro* でのエクソン 53 スキップによりジストロフィン発現が確認できているのは、我々の自験例も含めエクソン 45-52、48-52 および 52⁽¹⁰⁾ 欠失の 3 パターンである。また、エクソン 53 スキップと同質のジストロフィンが発現していると考えられる、欠失領域の一端がエクソン 53 のインフレーム欠失症例は軽症な BMD であることが予想される。該当する症例として、エクソン 42-53⁽¹¹⁾、45-53⁽¹¹⁾、47-53⁽¹²⁾、48-53⁽¹³⁾、49-53⁽¹⁴⁾、50-53⁽¹⁵⁾ および 52-53⁽¹¹⁾ 欠失が報告されているが、実際に短縮形ジストロフィンの産生、または臨床的に BMD であると確認されているのは、エクソン 42-53、45-53、47-53、48-53 および 52-53 欠失の 5 パターンである。エクソン 49-53 および 50-53 欠失は、ジストロフィン産生について記載がないが、臨床的には DMD と報告されている^(14,15)。特に今回の被験者に含まれるエクソン 49-52 欠失は、治験薬に反応した場合 49-53 のインフレーム欠失となるが、これまでのところ同欠失におけるジストロフィン産生が報告された例がないため、今回の結果は *in vitro* ではあるが、49-53 インフ

レーム欠失によるジストロフィンの生成が初めて確認された事例と考えられる。*in vitro* アッセイは、MLPA 等から得られる変異情報のみでは、エクソン・スキップによるジストロフィンタンパク質の発現を担保できない可能性を考慮して実施したものであるが、結果としては組み入れ予定者 10 名全員でジストロフィンタンパク質の発現が認められた。このことは、今後エクソン 53 スキップの次相試験を計画する際に有用な知見と考えられる。また、これまで検討されていない新規のエクソンに対するエクソン・スキップ治療薬の開発を進める場合には、治験薬の有効性評価・被験者の適格性評価において *in vitro* アッセイが重要な役割を果たすことが確認できた。

E. 結 論

エクソン 53 スキップ治療薬である NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験において、被験者の組み入れ基準として設定した *in vitro* でのエクソン 53 スキップ及びジストロフィンタンパク質の発現について、組み入れ予定者全例の線維芽細胞を用いて解析を行った。その結果組み入れられた 3 つの欠失パターン全て、また組み入れ予定者全例において所要の結果を確認した。新規のエクソン・スキップ治療薬の開発を進める上で、治験薬の有効性評価・被験者の適格性評価において *in vitro* アッセイが重要な役割を果たすことが確認できた。

参考文献

- (1) White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):240-6.
- (2) Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Human mutation.* 2009;30(12):1657-66.
- (3) Hodgson S, Hart K, Abbs S, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Journal of medical genetics.* 1989;26(11):682-93.
- (4) Yuge L, Hui L, Bingdi X. Detection of gene deletions in Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using CDNA probes and the polymerase chain reaction method. *Life sciences.* 1999;65(9):863-9.
- (5) Taylor PJ, Maroulis S, Mullan GL, et al. Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Journal of medical genetics.* 2007;44(6):368-72.
- (6) Janssen B, Hartmann C, Scholz V, et al. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005;6(1):29-35.
- (7) Saillour Y, Cossee M, Leturcq F, et al. Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Human mutation.* 2008;29(9):1083-90.
- (8) Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, et al. Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Human genetics.* 2002;110(5):418-21.
- (9) Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2005;7(3):317-26.
- (10) Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet.* 2003;12(8):907-14.
- (11) Anthony K, Cirak S, Torelli S, et al. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials. *Brain.* 2011;134(Pt 12):3547-59.
- (12) Torelli S, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, et al. Absence of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a pathological marker for the diagnosis of Becker