

201317078B

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

総合研究報告書

(平成23年度～平成25年度)

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

総合研究報告書

(平成23年度～平成25年度)

研究代表者 武田 伸一

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
武田 伸一	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 43
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 45

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 23～25 年度 総合研究報告書

エクソン 53 を標的としたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の開発

研究代表者	武田 伸一	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
	村田 美穂 (平成 23 年度)	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
	木村 円 (平成 24, 25 年度)	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

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) にする画期的な新薬として、核酸医薬品を用いたエクソン・スキップ治療の実用化が期待されている。すでにエクソン 51 スキップ治療薬の臨床開発は進行しているが、DMD 患者における遺伝子変異形式は患者毎に多様なため、エクソン 51 スキップの対象患者の割合は全体の 13% である。そのため他の変異形式を有する患者に対して、新たなエクソンを対象とする治療薬の開発が求められている。我々はこのような状況を鑑み、エクソン 51 に次いで対象患者数が多いエクソンの一つであるエクソン 53 を対象とした開発に着手することとした。日本新薬株式会社と 2009 年より共同研究を開始し、エクソン 53 スキップ治療薬の承認に向けた臨床開発について 2011 年に基本合意し、2013 年の臨床試験開始を目標とした。本研究課題は平成 23 年度に採択され、同治療薬開発に係る非臨床試験の実施、被験者組み入れ及び有効性評価等に係る技術的課題の検討、並びにエクソン・スキップの応用範囲拡大を目指した探索的研究等を目的として実施した。具体的には(1)エクソン 53 スキップ治療薬の非臨床試験に係る検討、(2)臨床試験におけるスクリーニング及び有効性評価方法等に係る検討、(3)エクソン・スキップの探索的技術開発に係る検討、に分類される。最終年度を迎え、開発を進めてきたエクソン 53 スキップ治療薬 (NS-065/NCNP-01) の早期探索的臨床試験は、PMDA との薬事戦略相談を経て 2013 年 5 月に治験計画届出を行い、同年 10 月には第 1 例への投与を開始した (UMIN CTR: 000010964, ClinicalTrials.gov: NCT02081625)。当初予定していた 2013 年の臨床試験開始に至り、全体としてほぼ所期の目的を達成したと考えられる。本治療薬の開発プロジェクトは、国産初のモルフォリノ核酸による医薬品である点など高い新規性を有し、またエクソン 45-55 のマルチスキップ (Aoki Y, et al., *PNAS*. 2012)、モルフォリノ核酸取り込み機構の解明 (Aoki Y, et al., *Hum Mol Genet*. 2013) など学術的に重要な成果も得られた。以上、本研究課題では、エクソン 53 スキップ治療薬の実用化を目指し、早期探索的臨床試験開始に向けた技術的課題の検討を行って来た。実施最終年度に当該臨床試験の開始に至り、今後は臨床試験の進捗に伴い生じると予想される、新たな技術的課題に取り組むための検討を継続していく。

A. 研究目的

重篤な遺伝性筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対しては、画期的な新薬として核酸医薬品を用いたエクソン・スキップ治療の実用化が期待されている。我々はこれまでに、厚生労働科学研究費補助金の支援によりDMD遺伝子のエクソン51スキップを誘導するモルフォリノ核酸を用いた、新規治療薬の臨床応用に取り組んできたところである（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）「モルフォリノを用いたDuchenne型筋ジストロフィーに対するエクソン51スキップ治療の臨床応用」平成21～23年度）。当該エクソンを標的とした治療薬開発は、2'-OMe核酸を用いたエクソン・スキップ治療薬の国際共同治験が開始され、当該試験に国立精神・神経医療研究センター（以下、NCNP）も参画するに至り、一定の成果を収めた。またこの過程においては、治験の対象となる被験者を把握するための患者レジストリーの整備、DMD患者に対する治療効果の標準的な臨床評価手法（CINRG）の導入、DMDモデルマウスなどを用いた至適投与時期・投与量の検討など、核酸医薬品を用いたエクソン・スキップ治療の臨床応用を目指すための基盤整備、応用技術開発のための知見が得られた。一方、DMD患者における遺伝子変異形式は患者毎に多様な形式を取るために、エクソン51スキップの対象となる患者の割合は全体の13%である。そのためその他の変異形式を有する患者に対しては新たなエクソンを対象とする治療薬の開発が不可欠となる。我々はこのような状況を踏まえ、エクソン51に次いで対象患者数が多いエクソンの一つであるエクソン53を対象とした治療薬の開発に着手

することとした。エクソン53スキップの対象患者は、海外及び日本国内で8～9%を占めると試算されており、また開発に着手した時点では、国内外のアカデミア及び製薬企業において同エクソンを対象とした治療薬開発は開始されていないことがわかった。NCNPはパートナーとなる製薬企業として日本新薬株式会社（以下、日本新薬）と2009年より共同研究を開始しており、エクソン53スキップ治療薬の薬事承認に向けた開発について2011年に基本合意し、2013年の臨床試験開始を目標とした。本研究課題は平成23年度に採択され、同治療薬開発に係る非臨床試験の実施、被験者組み入れ及び有効性評価等に係る技術的課題の検討、並びにエクソン・スキップの応用手法拡大を目指した探索的研究等を目的として実施してきた。一方、本治療薬を用いた臨床試験のデザイン・プロトコルの検討、被験者組み入れ、モニタリング・監査、データマネジメント等、治験関連業務の遂行に関しては、翌平成24年度に採択された医療技術実用化総合研究事業「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」を活用し、エクソン53スキップ治療薬の開発プロジェクトを相互に補完しつつ実施してきたところである。本総合報告書では平成23年度から平成25年度までに個別に報告した研究内容を、(1)エクソン53スキップ治療薬の非臨床試験に係る検討、(2)臨床試験におけるスクリーニング・評価方法等に係る検討、(3)エクソン・スキップの探索的技術開発に係る検討、と大きく3項目に分類し、研究実施期間全体を通じた総括として報告する。

B. 研究方法

各研究内容に応じて以下の方法で実施した。なお倫理面の配慮について、モデル動物等を用いた検討については「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び国立精神・神経医療研究センター神経研究所「組換え DNA 実験安全規程」／「組換え DNA 実験内部規則」を遵守し、同センター小型実験動物倫理問題検討委員会の承認を得た計画に沿って実施した。また患者細胞・組織を用いた検討については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、同センター倫理委員会の承認を得た計画に沿って実施した。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 (NCNP/DMT01) に係る被験者検体を用いた検討については、同センター治験審査委員会の承認を受けて実施した。

1. エクソン 53 スキップ治療薬の非臨床試験に係る検討

非臨床試験の計画作成にあたっては、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の担当者からなる作業部会において、その内容及び実施計画について検討を行った。またこの過程において、非臨床試験の内容を議論する前提となる治験実施計画書の骨子についても合わせて検討を行った。医薬品医療機器総合機構（以下、PMDA）との薬事戦略相談を経て、実施内容についての詳細なすり合わせを行い、最終的な臨床試験の内容を確定した。予備的に実施した非臨床における検討では、薬理薬効試験において

DMD患者由来細胞及びヒト横紋筋肉腫細胞株を、並びに薬物動態試験及び毒性試験においてマウス、ラット及びサルを試験内容に応じて用いた。

2. 臨床試験におけるスクリーニング及び有効性評価方法等に係る検討

臨床試験で組み入れ可能な被験者数を予測するための、DMD患者の集積情報に関する予備調査に際しては、NCNP病院小児神経科に受診歴のあるDMD患者の診療録等を後方視的に検索して検討を行った。また治験薬の被験者由来細胞における事前有効性評価、及びエクソン53スキップに対する適格性判定を目的とした *in vitro* アッセイ手法の検討に際しては、NCNP バイオバンクまたは民間の細胞レポジトリーに登録されているDMD患者細胞を用いて検討を行った。検討により確立した方法を用いて、臨床試験開始後の被験者由来細胞を用いて、組み入れ適格性に関するスクリーニングを行った。また治験薬投与によるジストロフィン発現評価の一つとして計画している二重蛍光免疫染色手法の検討に際しては、初めにエクソン・スキップを誘導したモデルマウスを用いた予備検討を行い、次にNCNP バイオバンク由来のDMD/BMD患者及び正常対照由来骨格筋検体を用いて検討を行った。

3. エクソン・スキップの探索的技術開発に係る検討

GFP ベクターを用いたエクソンスキップ評価系の検討に際しては、ヒト及びマウスのDMD遺伝子のうち、標的とするエクソンとイントロンの一部を挿入したpEGFPベクターを作成し、これをC2C12細胞に導入して評価した。エクソン45-

55 スキップに関する検討は、エクソン 52 欠失マウス (*mdx52*) を用いて行い、アンチセンス核酸としてモルフォリノ核酸、及びピボ・モルフォリノ核酸 (Gene-Tools 社) を実験条件に応じて局所または全身投与し、骨格筋及び心筋サンプルを採取して解析した。さらにエクソン 45-55 を欠失した短縮形ヒトジストロフィンの機能解析に際しては、同領域を欠失させた DMD 遺伝子が CAG プロモータ下に発現するトランスジェニックマウスを作出し、ジストロフィン欠損マウス (*mdx* マウス) と交配させて機能解析に用いた。モルフォリノ核酸の取り込み機構に関する検討に際しては、*mdx52* マウス及び *mdc1A* マウスに対し、モルフォリノ核酸を実験条件に応じて局所または全身投与して解析を行った。同期的筋再生の誘導が必要な条件においてはカルジオトキシンを局所投与してこれを誘導した。DMD 以外の遺伝性筋疾患に対するエクソン・スキップ治療の応用可能性の検討に際しては、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (MDC1A) のモデルマウスである *dy3k/dy3k* マウスを用いて検討した。

C. 研究成果

1. エクソン 53 スキップ治療薬の非臨床試験に係る検討

1.1 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

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。

1.2 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 月に実施され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 12 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、ロットを用いた中枢神経系安全性薬理試験を追加した）。

またこの際に提出した早期探索的臨床試験プロトコールの骨子案概要は以下のとおりであり、被験薬の筋肉内注射と静脈内注射を、期間を隔てて同一の被験者に対し行うものであった。なお本骨子は、最終的に確定・公表されている本治療薬の早期探索的臨床試験プロトコールとは異なることに留意されたい。

- ・ 目的：治験薬の安全性及び薬物動態の評価、治療効果を予測するマーカーの探索を通して DMD 治療薬としての有用性を早期に推定する
- ・ 治験のデザイン：事前登録方式による単一施設非盲検試験
 - (i)組み入れ基準を満たした被験者に対して、筋肉内局所投与を単回行う。
 - (ii)4 週間経過後に安全性の評価を行い、問題が認められない場合、静脈内全身投与を週 1 回、8 回を行う。
 - (iii)最終投与から 4 週間経過後に最終評価観察を行う。
- ・ 評価項目：
 - (a)有効性
 - ・ ジストロフィンの発現
 - ・ 6 分間歩行距離
 - ・ 床上起き上がり時間
 - ・ 階段 4 段昇降
 - ・ 10 メートル歩行／走行
 - ・ North Star 歩行評価
 - ・ 血清 CK 値
 - ・ 呼吸機能（FEV, FVC, MIP, MEP, PCF, PF）
 - ・ 筋 MRI
 - (b)安全性
 - ・ 有害事象／副作用
 - ・ 臨床検査
 - (c)薬物動態

- ・ 血漿中濃度
- ・ 尿中排泄率

1.3 実施した非臨床試験の内容

上記の議論を踏まえ、以下の非臨床試験計画を実施した（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）。またこの結果を踏まえて計画した早期探索的臨床試験プロトコルの最終案では、DMD 患者細胞を用いた薬効試験、サルを用いた毒性試験等の成績から、推定最小薬理作用量（MABEL）、無毒性量（NOAEL）等を算出し、安全面から適切な初回投与量を決定した。

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

1.4 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

ー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。

2. 臨床試験におけるスクリーニング及び有効性評価方法等に係る検討

2.1 DMD 患者の集積情報に関する予備調査

NCNP 病院に受診歴のある DMD 患者においては、平成 23 年年度時点で 190 名のうち 18 名（9.5%）がエクソン 53 スキップ対象者であった。内訳はエクソン 45-52 欠失：6 名、48-52 欠失：5 名、49-52 欠失：2 名、50-52 欠失：2 名、52 欠失：3 名であった。患者の年齢は 0~4 歳：2 名、5~12 歳：10 名、13~20 歳：5 名であった。歩行可能患者は 8 名であった。なおその後の追跡調査により、平成 24 年度では 207 名のうち 21 名（9.9%）が該当することが明らかとなった。

2.2 患者／被験者細胞を用いたエクソン 53 スキップ治療薬の *in vitro* アッセイ

本アッセイでは線維芽細胞に MYOD 遺伝子を導入し、筋管細胞に分化させて用いた。MYOD の導入はレトロウイルス（pRetro-X expression system, Clontech）またはレンチウイルス（pLenti-X expression system, Clontech）を用いた。いずれの発現ベクターにも、MYOD 遺伝子とともに IRES 配列を挟んで ZsGreen1 蛍光タンパク質をマーカーとして組み込んだ。レトロウイルスによる系ではウイルス導入 5 日後に FACS を用いて ZsGreen1 陽性細胞を MyoD 発現細胞として回収し、これを

分化培地で培養して筋分化を誘導した。レンチウイルスによる系では、24時間ウイルス導入を行ったあと、FACSによる選択は行わず分化培地に交換して筋分化を誘導した。いずれも筋分化誘導開始7日目にアンチセンス核酸を最大10 μ Mの濃度で48時間添加し、その後分化開始14日目まで培養して回収した。回収した細胞はRT-PCRおよびウェスタンブロット(WB)で評価した。RT-PCRによる活性の評価は自動電気泳動装置(Experion, Bio-rad)を用いて、目的のエクソンがスキップされたPCR産物が、全体のPCR産物に占める割合で評価した。レトロウイルスを用いた系では、FACSで回収後の細胞は全てZsGreen1陽性であり、MYODが共発現しているものと考えられた。その後、多核で幅の広い筋管細胞に分化した。アンチセンス投与後、濃度依存性にRT-PCRでのエクソン・スキップ活性は上昇した。またWBでもジストロフィンのシグナルを検出した。レンチウイルスを用いた系では、ウイルスのトランスフェクション後にFACSによる選択を行わずに筋分化を誘導した。アッセイ開始時点で播種した線維芽細胞のうち、レンチウイルス感染後にZsGreen1が目視で確認できる細胞は30-50%であったが、分化誘導後は長軸方向に伸長し、多核となり形態的には筋管細胞となった。回収した細胞ではRT-PCR, WBでそれぞれスキップとジストロフィン発現が確認され、レトロウイルスの系と同様の結果が得られた。以上の検討結果から、NS-065/NCNP-01の早期探索的臨床試験の被験者由来細胞に対しては、レトロウイルスを用いた系を使用することとした。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。

RT-PCRでは治験薬添加群においてエクソン53をスキップしたと考えられるバンドが検出され、これらのバンドシーケンス解析では、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たエクソンであることが確認された。またウェスタンブロット解析では、治験薬添加群において、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に応じて、相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。結果としてNCNP/DMT01試験の組み入れ予定被験者全例において、エクソン53スキップとジストロフィンの生成が確認できた。

2.3 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

ヒトにおけるエクソン・スキップ治療後の骨格筋検体は入手不可能なため、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て予備検討を行った。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。ラミニンをコントロールタンパク質として、正常サンプルと治療サンプルを一回の工程で以下のとおり同時に染色した。

染色

- 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

撮影

- ⑤ 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。

- ⑥ 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。
- ⑦ 1 切片あたり無作為に 5 領域撮影する。

画像解析

- ⑧ 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。
- ⑨ 二値化領域のうち、非連続なピクセルを画像演算命令 erode で消去してから、画像演算命令 dilate で拡張させてマスク領域とする。
- ⑩ マスク領域をそれぞれの画像を重ねて、マスク領域のみの蛍光強度を測定する。

本手法では、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 つが同時に得られる。定量されたそれぞれの蛍光シグナルは、ラミニンから作成された同一面積のマスク領域に基づくため、相対的な蛍光強度比（ジストロフィン／ラミニン比）が求められる。正常サンプルの比率を基準とした場合に、治療サンプルの比率はその 3-4 割程度であり、目視で認められる蛍光強度の印象と一致していたため、本手法は臨床試験におけるジストロフィン定量法として応用可能と考えられた。そこで本手法をヒト検体において検討した。染色方法の概要は以下のとおりで、マウスに対する方法を一部改変して Taylor らの方法(Taylor LE, Neuropathol Appl Neurobiol. 2012)に従った。

染色

- ① 凍結骨格筋標本を 10 μ m に薄切す

る。

- ② 一次抗体反応（マウス抗スペクトリン抗体、ウサギ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 抗ウサギ IgG 抗体）
 - ④ 封入
- #### 撮影

- ⑤ TCS-SP5 で正常サンプルを撮影し、ジストロフィン・スペクトリンともに、シグナルが飽和しないゲインを設定する。
- ⑥ 以降の撮影は、ジストロフィン・スペクトリ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。
- ⑦ 1 切片あたり無作為に 4 領域以上撮影する。

画像解析

- ⑧ Adobe Photoshpo を用いて、スペクトリン画像かに認められる非特異的領域をマスクする二値化画像を作成する。
- ⑨ Metamorph ソフトウェアを用いて、非特異的領域をスペクトリン・ジストロフィン両画像から消去する。
- ⑩ Morphological gradient 等の画像演算命令を用いて、スペクトリン画像から筋線維膜だけを抽出するアルゴリズムを適用する。
- ⑪ 抽出された領域をマスク領域として、これ以外の領域をスペクトリン・ジストロフィン両画像から消去する。
- ⑫ それぞれの画像ににおけるマスク領域のみの蛍光強度を測定する。

ヒト由来切片（正常対照、BMD、DMD）に対して上記の方法を適用して検討した。いずれについても、ひとつの切片から撮

影した重複しない4領域の画像を演算に用いたところ、目視で認められるジストロフィン蛍光強度とほぼ同様のジストロフィン/スペクトリン蛍光強度比が得られた。

3. エクソン・スキップの探索的技術開発に係る検討

3.1 GFP ベクターを用いたエクソンスキップ評価系の検討

Sazani P. (Nucl. Acid Res., 2001) を参考にして pEGFP-N1 (Clontech) 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 にわたりクローニングした。4 種類のインサート (ヒトイントロン 52 から 53、ヒトイントロン 50 から 51、マウスイントロン 52 から 53、ヒトイントロン 50-マウスエクソン 51-ヒトイントロン 51) を作製し、HBB intron2 の 425bp の位置に挿入した。ベクター 2 μ g を C2C12 および SH-Sy5y に nucleofector II にて導入し、蛍光、RT-PCR にて解析した。インサートを含むベクターではエクソンインクルージョンにより EGFP 遺伝子がフレームシフトを生じ蛍光が観察されないが、モルフォリノ核酸を 6 μ M の Endo-Porter で導入したところ、標的エクソンがスキップすることにより EGFP 遺伝子のフレームシフトが解消し、蛍光が観察されるとともに検出された mRNA も EGFP のエクソンのみから構成されていた。

3.2 エクソン 45-55 スキップに関する検討

mdx52 マウスに対して、エクソン 52 を除

いた各エクソンの exonic splicing enhancer を標的としたビボ・モルフォリノカクテルを前脛骨筋に局所投与したところ、エクソン 45-55 がスキップしてエクソン 44 と 56 が結合した mRNA の発現が認められた。ジストロフィンタンパク質のエクソン 57 領域を認識する抗体では免疫組織化学染色によりジストロフィンの発現が検出されるが、同エクソン 50 領域を認識する抗体では検出できなかった。また、投与した前脛骨筋では 60%近いジストロフィン陽性線維が認められた。さらに、*mdx52* マウスでは発現が消失しているジストロフィン・糖タンパク質複合体の各分子の発現が、投与後には発現が回復していたことも確認された。次に全身投与を行ったところ、ビボ・モルフォリノカクテル投与後は、心筋を除く全身の骨格筋にジストロフィンの発現が認められ、その程度は正常マウス (BL6) の 10%であった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析を行ったところ、*mdx52* マウスで認められるような中心核線維や筋線維の大小不同等の筋病理所見も治療群では改善し、正常マウスと類似した所見が認められた。治療群は未治療群と比較して血清クレアチンキナーゼ値の有意な減少が認められ、グリップテスト、トレッドミル等による筋機能も有意に回復していた。全体を通して明らかな毒性を示す所見は認められなかった。以上のような成果を踏まえ、エクソン 45-55 をスキップさせた短縮形ジストロフィンの機能を詳細に解析することが重要と考えられたため、短縮形ヒトジストロフィンのみを発現するトランスジェニックマウス (Δ 45-55Tg/*mdx* マウス) を作出し、その病理所見、運動機能等について解析を実施した。解析の結果、短縮型の dystrophin は細胞膜に一様に発現してお

り、ジストロフィン・糖タンパク質複合体の発現も回復していた。 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスの骨格筋機能は正常マウスと同程度であり、短縮形ジストロフィンは正常ジストロフィンとほぼ同等の機能を有することが示された。一方で、 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは成長に伴う体重の増加が正常マウス、*mdx* マウスと比較して緩やかで、20 週齢の前脛骨筋の筋線維数については、重量、平均筋断面積は正常マウスと比較して有意な低下を認められた。Fiber type 解析では $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは Type 2A 線維の増加と、Type 2B 線維の萎縮が認められた。

3.3 モルフォリノ核酸の取り込み機構に関する検討

mdx52 および正常マウスを対象に、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。また *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く、さらに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。そこで *mdx52* マウスにおいてカルジオトキシンによる同期的筋再生を誘導した前脛骨筋に、モルフォリノ 10 μ g を day 4 に局所投与した場合と、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、この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。一方、同期的筋再生誘導後では、正常マウスにおいてもモルフォリノ全身投与でエクソン・スキップを誘導できた。

3.4 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・スキップ療法の検討

dy3k/dy3k マウスは、LAMA2 遺伝子がコードするラミニン $\alpha 2$ 鎖の欠損により、体重増加不良、筋力低下を呈し生後 6~8 週で死亡する。筋病理所見では、筋線維の壊死と結合組織の増加を認める。本マウスは LAMA2 遺伝子のエクソン 4 に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子によるフレームシフトにより発症するため、モルフォリノにより当該エクソンをスキップできれば、短縮型メロシンが産生されると考えられる。効果的なスキップを誘導するモルフォリノ配列を探索し、局所または全身投与を行い、免疫染色及び RT-PCR で解析した。その結果、局所投与により前脛骨筋におけるエクソン 4 スキップ、及び免疫蛍光染色によるメロシンの発現が確認できた。腹腔内全身投与の結果、統計的な有意差はないものの生存期間の延長傾向を認めた。

D. 考察

1. エクソン 53 スキップ治療薬の非臨床試験に係る検討

本研究課題の採択期間中に行ったエクソン 53 スキップ治療薬の臨床開発プロジェクトの事前検討を通して、核酸医薬品全般に求められる非臨床試験の試験項目及び実施時期については、現時点にお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が

認識された。そのため実際に薬事戦略相談対面助言を行い、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。この過程においては薬効薬理試験、安全性薬理試験、急性毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、及び薬物動態試験についても予備的な検討を行い、本治療薬の高い有効性と安全性を確認してきたところである。一例として薬物動態に関して、類薬として治験が進行しているモルフォリノによるエクソン 51 スキップ治療薬 eteplirsen では血中半減期が短い（1.62-3.60 時間）ことが報告されているが、本治療薬についても類似した結果が得られている。また非臨床試験を計画する過程において作成した治験実施計画書骨子案は、治験薬の筋肉内注射と静脈内注射を、期間を隔てて同一の被験者に対し行う計画であった。これは被験者数を増加させることなく、単回投与によるジストロフィン発現の検出、及び静脈内投与を行う前の予測し得ない個々の被験者に生じる副作用の予見、並びに週 1 回計 8 週間の反復投与によるジストロフィン産生の確認、次相の臨床試験計画立案のための情報収集を意図したものであった。経静脈投与における投与量は、その後に実施される非臨床試験の結果を踏まえ、最終的な実施計画として確定させる予定であった。この骨子案はその後に明らかとなった安全性薬理試験、

反復投与毒性試験等の結果、並びに先行するエクソン 51 スキップ治療薬の臨床試験に関して公表された中間解析結果等を踏まえ、大きく見直されることとなるが、その過程は本研究課題と並行して実施されている医療技術実用化総合研究事業において検討を行ったことから本稿では概要に留め、当該研究事業に関する報告において詳細を取りまとめる予定である。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。本治験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、非臨床試験計画の内容を始めとした開発計画の進捗管理に反映させたことが一因と考えられた。

2. 臨床試験におけるスクリーニング及び有効性評価方法等に係る検討

NCNP に受診歴のある DMD 患者全体のうち、エクソン 53 スキップ対象者は 9-10% であり、従来文献等で報告されている頻度とほぼ同様であった。医薬品開発における早期探索的臨床試験、第二相、第三相試験とい今後の展開を踏まえると、把握可能な患者数はやはり少数であることが明らかとなり、改めて希少疾患に対する医薬品開発の困難が浮き彫りとなった。このような課題に対しては、患者レジストリーを活用とした被験者組み入れ、多施設共同試験を念頭においた臨床試験

ネットワークの構築などの取り組みが有用と考えられるが、これらについても並行して実施中の医療技術実用化総合研究事業の成果を活用していくことを想定している。このような状況を踏まえ、希少な被験者を効率的かつ適切に臨床試験に組み入れ、さらに治療効果の有効性を適切に評価するためにも、スクリーニング・評価方法の検討は重要な事項の一つである。被験者組み入れに際しての適格性判定に活用することを目的として、DMD 患者由来線維芽細胞にレトロウイルス及びレンチウイルスを用いてMYOD 遺伝子を導入し、筋分化を誘導する手法を検討したところ、アンチセンス核酸の有効性を *in vitro* で検証することが可能であった。実際の臨床試験の場面では、各被験者の投与スケジュールにおけるスクリーニング用の細胞採取時期及び初回投与時期、並びに細胞の増殖速度やウイルスの力価を踏まえ、レトロウイルスとレンチウイルスの使用を選択することになると考えられた。これはレトロウイルスは、感染対象細胞が十分な増殖特性を有している場合に効率的に感染し、結果として筋分化を誘導可能な細胞が充分量確保できたのに対し、我々の作成したレンチウイルスは、感染対象細胞に高い増殖特性を要求しないものの、ウイルスの力価が比較的低く、最終的に目的とする細胞の収量に制限があったためである。実際に NCNP/DMT01 における被験者組み入れが開始され、各被験者由来の線維芽細胞が分離されると、いずれの細胞も順調な増殖特性を有しており、レトロウイルスを用いた遺伝子導入が最適と考えられたことから、全例に対してレトロウイルスを用いた系で *in vitro* アッセイを行った。その結果、平成 25 年度末までに、臨床試験の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た。今回組み入れた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。特にエクソン 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。このことより、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。また二重蛍光免疫染色によるジストロフィン定量法の検討に関しては、まずモデルマウスを用いた検討により、実際にエクソン・スキップによるジストロフィン発現の相対的定量化が可能であること明らかとなった。このことは、ヒト検体において正常者、DMD/BMD 患者間で同様の解析結果が得られれば、ヒトにおいてもエクソン・スキップ治療後に出現するジストロフィンタンパク質の相対的定量にも応用可能であることを示唆した。実際の臨床試験では、(a) 正常対照コントロール（健常者由来）(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)の3種類の検体を同一のスライド上で染色・撮影して解析することが想定される。(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し、また適切な効果量の評価方法が明らかとなれば、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することも可能と考えられる。本研究の最終年度には、実際にヒト検体(正常、BMD, DMD由来)を用いた検討を通じて、目視で得られるジストロフィンの蛍光強度を、正常対照を基準とした相対定量値で表すことが可能であった。ただし今回の検討で、BMDとDMDの差について検出することは可能であったが、ヒトにおけるエクソン・スキップ治療に対する適用可能性は、臨床試験における検体が採取されるまでは実際のところ判断が困難である。今後は本臨床試験を通じて得られる被験者検体を用いて、本手法の最終的な調整を行いながら、適切な定量的解析の実施に向けた検討を進めていく必要がある。なおDMDモデルマウスに関して、プロテオーム解析に用いるSILAC(Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)法と質量分析計を活用したタンパク質定量法が、病態関連タンパク質の解析に有用であることを我々は報告しているが(Rayavarapu S, *Mol Cell Proteomics*, 2013)、今後はこのような手法をエクソン・スキップの有効性評価に応用することも検討していく必要がある。

3. エクソン・スキップの探索的技術開発に係る検討

GFPベクターを用いたスキップ評価系の構築に関しては、一般的にはRT-PCRに

よって行うアンチセンス核酸のエクソン・スキップ効率の評価を、GFP蛍光より可視的に評価する手法について検討した。その結果、モルフォリノ投与によりベクターに組み込まれた標的エクソンのスキッピングが生じて、GFPの発現とエクソン・スキップを生じたmRNAの生成が確認された。本手法は今後のアンチセンス核酸の配列スクリーニングへの応用可能性を示し、最適配列探索の過程をハイスループット化する可能性を秘めており、エクソン・スキップ基盤的技術の高度化に寄与する可能性を秘めている。またエクソン・スキップの適応患者を拡大すること、また機能的に有利な短縮形ジストロフィンが存在する可能性を探索することを目的として、モデルマウスを用いたエクソン45-55に対するマルチエクソンスキップの検討を行った。DMD遺伝子のエクソン45-55は遺伝子変異の集積領域であり、この領域全体のマルチエクソン・スキップは、欠失変異を有する患者の60%以上を治療対象とし、さらに骨格筋症状を極めて軽微にすることが期待されている。実際にエクソン45-55が欠失している患者では、若干の心筋症状が認められるものの、骨格筋ではほぼ無症状であることが報告されている。我々は*mdx52*マウスを対象に、局所投与ならびに全身投与によって同領域内の10個のエクソンを読み飛ばすことに初めて成功しただけでなく、産生された短縮型のジストロフィンが有効に機能を有することを明らかにした。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の機能を示し、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・スキップの可能性を実証した最初の報告である。今後はより安全性・有効性に優れたアンチセンス核酸を用いることにより、全身の骨格筋にお

ける効率的なマルチエクソン・スキップを目指すのみならず、心筋においても同様の効果をもたらす治療技術の開発を進めていくことが期待される。さらに、同エクソンを欠失したトランスジェニックマウス ($\Delta 45-55Tg/mdx$ マウス) では、正常マウスと同等の機能的・病理的改善が認められ、エクソン 45-55 短縮形ジストロフィンの有効性が確認できた。一方で、同マウスでは筋線維数の減少や fiber type 構成比の変化が認められた。これはエクソン 45-55 がコードしているジストロフィンのロッドドメインの省略が、一部の神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の局在を細胞膜から細胞質に変化させ、細胞質で活性化された nNOS が筋小胞体の Ryanodine receptor をニトロシル化し、恒常的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで、筋萎縮を惹起する Atrogin-1, MuRF1、筋線維組成を変化させる PGC1 α といったシグナル経路を活性化させた結果と考えられた。今後 DMD に関しては、現在開発が進行しているエクソン 51、53 など、これら以外を対象としたエクソン・スキップ治療薬の開発が進むものと考えられる。その結果、スキップの適応となるフレームシフト変異パターンの種類が増加するのに伴い、スキップの結果産生される短縮形ジストロフィンのインフレーム欠失パターンも多様化していくと考えられる。これらの多様化した短縮形ジストロフィンがどのような機能・特性を有し、またその性質が症状の改善につながるものであるかを解明していくことは極めて重要である。このように最適な構造を有する短縮形ジストロフィンのパターンを探索していく研究においても、今回エクソン 45-55 を欠失したトランスジェニックマウスで得られた知見は活用できるものと考えられる。一方、モルフォリノ核酸の筋線維への取り込み機構に

関する検討では、モデルマウスでエクソン・スキップの結果生じたジストロフィン陽性線維のうち、ブロモデオキシウリジン (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、BrdU 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た。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が、我々が見出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取り込み機構の存在を示唆している。また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を始めとする核酸医薬品を DMD 以外の筋疾患にも応用できる可能性を示した。そこで我々は、DMD 以外の遺伝性筋疾患への適応拡大について検討するため、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーのモデルマウスに対するエクソン・スキップを試みた。その結果、同マウスにおいて標的エクソンのスキップとメロシンの部分的な回復が認められ、また統計的に有意ではないものの生存期間の延長による症状改善効果も認められた。このことから、筋再生が活発な組織に対してはモルフォリノ核酸を用いた治療法が応用できる可能性が示唆され、エクソン・スキップの対象疾患を拡大していく上で重要な知見が得られた。

E. 結論

本研究課題で開発を進めてきたエクソン 53 スキップ治療薬 (NS-065/NCNP-01) の早期探索的臨床試験は、PMDA との薬事

戦略相談を経て 2013 年（平成 25 年）5 月に治験計画届出を行い、同年 10 月には第 1 例への投与を開始した（UMIN CTR: 000010964, ClinicalTrials.gov: NCT02081625）。当初予定していた 2013 年の投与開始に至ったことから、計画全体としてほぼ所期の目的を達成したと評価できる。実施期間内に得られた非臨床試験成績、並びに臨床試験で用いるスクリーニング及び有効性評価手法などは、本治療薬が国産初のモルフォリノ核酸による医薬品であることを踏まえ、その新規性に由来する学術的意義は高い。現時点では知財管理上、開示不能な成果もあるが、開発の進展に伴い公表を進めていく。またエクソン 45-55 のマルチスキップ（Aoki Y, et al., *PNAS*. 2012）、モルフォリノ核酸取り込み機構の解明（Aoki Y, et al., *Hum Mol Genet*. 2013）などは、エクソン・スキップ治療薬の今後の展開に繋がる学術的に重要な成果である。行政面での成果としては、対象疾患である DMD は難治性・希少性疾患であり、このような疾患に対する治療薬の開発は、我が国の医療水準の向上、また新たな治療薬の普及という医療経済的効果が期待できる。また本治療薬の開発は、PMDA との薬事戦略相談を通じた規制当局との綿密な相談に基づいており、画期的なシーズの実用化を目指す政府方針とも合致したモデルケースとしての意義も有している。現在実施中の早期探索的臨床試験に関しては、試験デザイン検討、被験者組み入れ、モニタリング・監査、データマネジメント等の治験関連業務を、医療技術実用化総合研究事業を活用し、主に技術面の検討を行う本課題と連携しつつ実施している。当該臨床試験はデータ解析等を含めると早くても平成 27 年度までは継続する見込みであるが、本課題の終了後に、当該

試験に係る技術的課題の検討を支援する枠組みの構築が重要と考えられる。以上、本研究課題では、エクソン 53 スキップ治療薬の実用化を目指し、早期探索的臨床試験開始に向けた技術的課題の検討を行って来た。実施最終年度に当該臨床試験の開始に至り、所期の目的は達成されたと考えられる。今後は臨床試験の進捗に伴い生じると予想される、新たな技術的課題に取り組むための体制構築を進めていく。

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. 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.
 8. 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.
 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. 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.
 11. 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.
 12. 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]

13. Okada T, Takeda S: Current Challenges and Future Directions in Recombinant AAV-Mediated Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. *Pharmaceuticals* (Basel). 2013 Jun 27;6(7):813-836.
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. doi:10.1016/j.nmd.2012.10.025.Epub 2013 Jan 10
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. doi: 10.1038/nm.3019. Epub 2012
19. Ota M, Nakata Y, Ito K, Kamiya K, Ogawa M, Murata M, Obu S, Kunugi H, Sato N. Differential diagnosis tool for parkinsonian syndrome using multiple structural brain measures. *Computational and mathematical methods in medicine*. 2013;2013:571289.
20. 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). *Neuromuscular disorders* : NMD. 2013;23(1):84-88.
21. 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 of repeated lidocaine injections into the external oblique for upper camptocormia in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2013;19(3):350-354.
22. 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*. 2012 Oct;60(10):1451-1467. doi: