

201442004A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

ALSに対する新規治療技術の創出

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山梨 裕司

東京大学医科学研究所

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人東京大学 総長 濱田 純一 代理人 国立大学法人東京大学医科学研究所 事務部長 紺野 喜久恵 が実施した平成26年度「ALSに対する新規治療技術の創出」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
ALSに対する新規治療技術の創出 山梨裕司	----- 1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 研究全体の総括 山梨裕司	----- 4
2. マウスを用いた試験 山梨裕司	----- 5
3. 霊長類を用いた試験 岡田尚巳	----- 8
4. 規制・知財対応 長村文孝	----- 10
III. 学会等発表実績	----- 12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 13

I. 委託業務成果報告（総括）

ALS に対する新規治療技術の創出

業務主任者 山梨裕司 東京大学医科学研究所教授

本業務においては ALS に対する新規治療技術の創出を目指し、その基礎となる知見を独自に発見した NMJ 形成増強技術を基盤とする新たな治療技術開発の推進と、臨床試験の実施に向けた非臨床 POC の取得を主たる目的として、各業務項目を実施した。

1. 研究全体の総括

山梨裕司・東京大学医科学研究所、
教授

2. マウスを用いた試験

山梨裕司・東京大学医科学研究所、
教授

3. 霊長類を用いた試験

岡田尚巳・日本医科大学大学院医学
研究科、教授

4. 規制・知財対応

長村文孝・東京大学医科学研究所、
教授

A. 研究目的

近年の臨床研究や疾患モデル研究の進展により、呼吸を含む重篤な運動機能障害を呈する ALS において神経筋接合部 (NMJ) の形成不全の重要性が示されつつある。NMJ の形成は筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK によって制御されるが、代表者らは独自に単離した Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接作用し、活性化することが NMJ 形成シグナルの駆動に必須であることや、その異常が NMJ の形成不全と重篤な運動機能障害を呈する先天性筋無力症 (DOK7-CMS) の原因であることを発見した (Science, 312: 1802-5, 2006; Science, 313: 1975-8, 2006)。さらに、Dok-7 の過剰発現が個体の NMJ 形成を高度に増強

することを発見し (Science Signal., 2: ra7, 2009)、Dok-7 の発現増強が、NMJ 形成不全による運動機能障害に対する新規治療技術の創出に貢献し得ると考えた。

以上の経緯を踏まえ、本研究では ALS に対する新規治療技術の創出を目指し、NMJ 形成増強治療に関する非臨床 POC の取得を主たる目的とした。

B. 研究方法

(1) マウスを用いた試験

上記の目的を達成するために本研究においては NMJ の形成不全を呈する疾患モデルマウスに対する NMJ 形成増強治療の先行研究を実施した。その為に、NMJ 形成増強技術としてアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたヒト DOK7 遺伝子発現ベクター (AAV-D7) を作出し、また、NMJ 形成不全を呈する疾患モデルマウスとして DOK7 型筋無力症マウスを独自に樹立すると共に、常染色体優性エメリリー・ドレフェス型筋ジストロフィー (AD-EDMD) マウスを導入した。

(2) 霊長類を用いた試験

本研究では、NMJ 形成増強治療に関する POC の取得を齧歯類のみならず、霊長類においても目指している。そこで、コモンマーモセットを用いた試験を計画した。具体的には、当該動物における NMJ 可視化技術を確立すると共に、AAV 投与条件の検討を進めた。

(3) 規制・知財対応

本研究を支える特許は研究代表者らによって既に日本および米国で成立し(特許 第5339246号;米国特許 US8222383)、欧州で審査中である。そこで、本件特許に対する知財調査を実施した。本研究が目指す遺伝子治療に必須の AAV ベクターについても、その知財権の状況を調査、検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については東京大学医科学研究所、日本医科大学大学院医学研究科、国立精神・神経医療研究センター神経研究所の組換えDNA実験、並びに動物実験に関する規則・指針を遵守し、マウスを用いる実験においては東京大学医科学研究所の動物実験委員会と遺伝子組換え生物等安全委員会に事前の承認を受けた上で、また、マーモセットを用いる実験については国立精神・神経医療研究センター神経研究所の動物実験倫理問題検討委員会に事前の承認を受けた上で、それぞれの実験を実施した。当然のことながら、本研究においては全ての関係法令を遵守した。

C. 研究結果

(1) マウスを用いた試験

上述の通り、本研究ではヒト DOK7 遺伝子発現ベクター (AAV-D7) を作出し、出生後のマウスへの投与によって NMJ が拡張されることを示した。さらに、独自に作出した DOK7 型筋無力症マウスや AD-EDMD マウスへの発症後の投与による運動機能改善効果と延命効果を実証した。

(2) 霊長類を用いた試験

本年度の研究においては、コモンマーモセットの NMJ の可視化が想定以上に難しいことが判明し、その可視化条件の至適化を進め、安定的な可視化条件を確立した。そこで、EGFP を発現する AAV ベクター (AAV-EGFP) を用いてマーモセットへの投与条件の検討を進め、至適条件を決定した。現在、AAV-D7 の投与実験を進めている。

(3) 規制・知財対応

本研究に関する医薬品医療機器総合機構との薬事戦略相談事前面談では、試験物の規格決定後に品質および非臨床試験について相談を行う事となった。そこで、当該試験物に関する国内外の規制情報を収集し、それに基づく対応策の策定を進めた。また、企業への導出も視野に入れ、本件特許を保有する東京医科歯科大学の TLO と導出条件等に関する相談を進めた。

D. 考察

本年度の研究においては、DOK7 型筋無力症のモデルマウスだけでなく、dok-7 遺伝子は正常な AD-EDMD モデルマウスについても、AAV-D7 の発症後の投与による運動機能の改善効果や延命効果を示すことができた。この事実は、AAV-D7 を用いた NMJ 形成増強治療が DOK7 遺伝子に異常をもたない NMJ 形成不全にも有効であることを示唆するものである。今後は、この治療効果の実体を知るための分子生物学的な解析や病態生理学的な解析が望まれる。さらに、将来の治療を視野に、本年度の研究により確立された、霊長類を用いた試験条件と規制・知財対応の基本姿勢を踏まえた開発研究を着実に推進する必要がある。

E. 結論

本年度の研究においては、先行実験として実施した DOK7 型筋無力症と AD-EDMD のモデルマウスの運動機能障害に対する改善効果を示すことができた。また、霊長類を用いた試験と規制・知財対応については、本年度の研究により、次年度以降の研究基盤を固めることができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda. Intra-amniotic rAAV-mediated

microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance.

Mol. Ther., in press (doi: 10.1038/mt.2015.5.)

Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, Yuji Yamanashi. *DOK7* gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction.

Science, 345: 1505-1508 (2014)

Tohru Tezuka, Akane Inoue, Taisuke Hoshi, Scott D. Weatherbee, Robert W. Burgess, Ryo Ueta, and Yuji Yamanashi. The MuSK-activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: 16556-16561 (2014)

Riichiro Hira, Fuki Ohkubo, Yoshito Masamizu, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Takashi Okada, and Masanori Matsuzaki. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning.

Nature Commun., 5: 5551 (2014)

2. 学会発表

山梨裕司、「NMJ 形成シグナルとその制御」
筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発 研究班会議（招待発表）
平河町 東京 2014 年 12 月 3 日

Noriko Fujiwara, Fumitaka Nagamura, Kazufumi Matsumoto, Naohide Yamashita, Yukie Takemura, Kiyoko Kamibeppu. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. International Association of Clinical Research Nurses. Boston, Massachusetts, USA. November 7 (2014)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 出願

該当なし

3. 実用新案登録

該当なし

4. その他

該当なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

研究全体の総括

担当責任者 山梨裕司 東京大学医科学研究所教授

本業務が種々のモデル動物・モデル系を用いる多様な実験系を含み、また、関連する規制・知財対応を並行して進める広範な研究開発業務であることを考慮し、その全体としての効率的な推進と総括を目的とした本項目を計画した。

A. 研究目的

上述の通り、本研究事業は種々のモデル動物・モデル系を用いる多様な実験系を内包し、さらに、将来の臨床試験への円滑な移行を目指した規制・知財対応を並行して推進する広範な研究開発業務といえる。そこで、本研究事業全体の効率的な推進と総括を目的とする、本項目を計画した。

B. 研究方法

上記の目的を達成するために、本項目においては担当責任者であり、本研究全体の業務主任者である山梨が、自身が担当する「マウスを用いた試験」、岡田が担当する「霊長類を用いた試験」、長村が担当する「規制・知財対応」の各業務項目の内容を把握し、研究協力者を含む個別会議・全体会議を通じて、全情報の共有と各実験計画の調整を遅滞無く実施した。

（倫理面への配慮）

本業務項目自体への直接の該当はない。

C. 研究結果

本業務項目自体による直接の研究結果はないが、既述の「総括」は本業務項目の結果ともいえる。また、例えば、自身が担当するマウスを用いた先行試験の結果と長村が担当する規制・知財対応の結果に関する頻繁な議論を通じて、将来の臨床試験の要求に耐えうる試験物の候補規格の絞り込み

を進め、遅滞無く、マウスを用いた試験に着手することができた。さらに、その結果を、霊長類を用いた試験を担当する岡田と随時協議することで、既に、霊長類モデル動物（マーモセット）への投与計画の策定に着手している。

D. 考察

自明のことではあるが、業務主任者が本業務項目を担当することで、研究全体の効率的な推進が可能になったと考える。

E. 結論

本業務項目により、本研究全体の効率的な推進が可能となった。なお、総括についての結論は既述の通り。

F. 研究発表

本業務項目自体への直接の該当はない。

G. 知的財産権の出願・登録状況

本業務項目自体への直接の該当はない。

II. 委託業務成果報告（業務項目）

マウスを用いた試験

担当責任者 山梨裕司 東京大学医科学研究所教授

本項目においても ALS に対する新規治療技術の創出を目指し、NMJ 形成増強技術を基盤とする新たな治療技術開発の推進と、臨床試験の実施に向けた非臨床 POC の取得を主たる目的として、正常マウスと疾患モデルマウスを用いた各種試験を実施した。

A. 研究目的

前述の通り、近年の臨床研究や疾患モデル研究の進展により、呼吸を含む重篤な運動機能障害を呈する ALS において神経筋接合部 (NMJ) の形成不全の重要性が示されつつある。NMJ の形成は筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK によって制御されるが、代表者らは独自に単離したアダプター様分子である Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接作用し、活性化することが NMJ 形成シグナルの駆動に必須であることや、その異常が NMJ の形成不全と重篤な運動機能障害を呈する DOK7 型筋無力症 (DOK7-CMS) の原因であることを発見した (Science, 312: 1802-5, 2006; Science, 313: 1975-8, 2006)。さらに、マウスでの筋特異的な Dok-7 の過剰発現が個体の運動機能に顕著な影響を与えることなく、NMJ 形成を増強することを発見し (Science Signal., 2:ra7, 2009)、Dok-7 の発現増強が、NMJ 形成不全による運動機能障害に対する新規治療技術の創出に貢献し得ると考えた。

以上の経緯を踏まえ、本研究では ALS に対する新規治療技術の創出を目指し、正常マウスと疾患モデルマウスを用いた NMJ 形成増強治療に関する非臨床 POC の取得を主たる目的とした。

B. 研究方法

上記の目的を達成するために、本項目に

おいては NMJ の形成不全を呈する疾患モデルマウスに対する NMJ 形成増強治療の先行研究を実施した。その為に、NMJ 形成増強技術としてアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたヒト DOK7 遺伝子発現ベクター (AAV-D7) を作出し、正常マウスに対する出生後の投与が NMJ 形成シグナルを増強し、NMJ 全体を拡張することを確認した。さらに、NMJ 形成不全を呈する疾患モデルマウスとして DOK7-CMS 症例に最も高頻度に認められる変異を導入した DOK7-CMS マウスを独自に樹立し、強度の NMJ 形成不全と筋力の低下、生後 20 日以内での致死性を確認した。そこで、当該モデルマウスの発症後に AAV-D7 を投与することで、その治療効果の検証を進めた。

他方、本研究全体の目的が ALS 病態の改善であることを踏まえ、DOK7-CMS とはその原因においては異なるものの NMJ 形成不全を呈する点では共通する常染色体優性エメリー・ドレフェス型筋ジストロフィー (AD-EDMD) のモデルマウス (J. Cell Biol., 184: 31-4, 2006) を導入した。この疾患モデルマウスについても、個体毎に発症を確認した上で、AAV-D7 の治療効果の検証を行った。

(倫理面への配慮)

上記の動物実験については東京大学医科学研究所の組換え DNA 実験、並びに動物実

験に関する規則・指針を遵守し、動物実験委員会と遺伝子組換え生物等安全委員会に事前の承認を受けた上で実施した。当然のことながら、本研究においては全ての関係法令を遵守した。

C. 研究結果

前項に記載の通り、本研究ではヒト DOK7 遺伝子発現ベクター (AAV-D7) を作出し、正常マウスの出生後の投与により、人為的に個体の NMJ が拡張できることを実証した。さらに、独自に樹立した DOK7-CMS のモデルマウスの運動機能障害 (横倒しにした際の姿勢回復に 10 秒以上を要する状態) を個体毎に確認し、AAV-D7 を腹腔投与したところ、NMJ 形成シグナルの増強 (MuSK 活性化) と NMJ 形成増強 (NMJ の拡張) が誘導され、正常な運動機能の回復と 1 年以上の延命効果を実証することができた。しかしながら、この結果は、ある特定の遺伝子異常によって発症する疾病に対して、その正常遺伝子の発現を導入する狭義の遺伝子治療と理解される。そこで、DOK7 遺伝子の異常を伴わない AD-EDMD のモデルマウスに対して、同様の発症後の腹腔投与による検証実験を行った。その結果、当該モデルマウスにおいても、NMJ 形成シグナルと NMJ 形成の増強、並びに運動機能の改善効果と生存期間の延長効果を確認することができた。しかしながら、これらの治療・改善効果は正常個体のレベルにまでは至っておらず、部分的な、恐らく、NMJ 形成不全による運動機能障害に限定された改善効果であることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究によって、AAV-D7 による発症後の治療介入が NMJ 形成不全を伴う 2 種の疾患モデルマウスに対して、NMJ 形成増強効果と運動機能の改善効果、並びに延命効果を示すことが実証された。特に、AD-EDMD のモデルマウスが Lamin 欠損マウスであることを考えると、本治療技術は、DOK7 遺伝子異常の有無によらず、NMJ 形成不全に起因する運動機能障害全般に有効と

なる可能性が考えられる。この点において、その多くが原因不明の多因子性疾患である ALS に対しても、その原因によらず、NMJ 形成不全に起因する運動機能障害の改善効果が期待される。さらに、我々が創出を目指す NMJ 形成増強治療は、その名の通り、NMJ を標的とする治療技術であり、既存、もしくは今後開発される多用な治療技術との併用治療も期待できる。今後は、AAV-D7 の治療効果の実体を知るための分子生物学的な解析や病態生理学的な解析が望まれる。

E. 結論

本年度の研究においては、先行実験として実施した DOK7 型筋無力症と AD-EDMD のモデルマウスの運動機能障害に対する改善効果を示すことができた。また、前者に対する延命効果が 1 年以上であることを考えると、マウスに対する AAV-D7 投与の安全性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, Yuji Yamanashi. *DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction.* *Science*, 345: 1505-1508 (2014)

Tohru Tezuka, Akane Inoue, Taisuke Hoshi, Scott D. Weatherbee, Robert W. Burgess, Ryo Ueta, and Yuji Yamanashi. *The MuSK-activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 16556-16561 (2014)

2. 学会発表

山梨裕司、「NMJ 形成シグナルとその制御」

筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発 研究班会議（招待発表）
平河町 東京 2014年12月3日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 出願

該当なし

3. 実用新案登録

該当なし

4. その他

該当なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

霊長類を用いた試験

担当責任者 岡田 尚巳 日本医科大学大学院医学研究科教授

本研究では、齧歯類のみならず霊長類においても、NMJ 形成増強治療に関する POC の取得を目指し、コモンマーモセットを用いた試験を計画した。具体的には、当該動物における NMJ 可視化技術を確立すると共に、AAV 投与条件の検討を進めた。その結果、コモンマーモセットの NMJ の可視化が想定以上に難しいことが判明したため、その可視化条件の至適化を進め、安定的な可視化条件を確立した。また、EGFP を発現する AAV ベクター（AAV-EGFP）を用いてマーモセットへの投与条件を検討し、至適条件を検証した。本研究により、次年度以降の研究基盤を固めることができた。

A. 研究目的

本研究では、NMJ 形成増強治療に関する POC の取得を齧歯類のみならず、霊長類においても目指している。そこで、コモンマーモセットを用いた試験を計画した。具体的には、当該動物における NMJ 可視化技術を確立すると共に、AAV 投与条件の検討を進めた。

B. 研究方法

霊長類における POC の取得には、その NMJ の可視化による構造や大きさの解析が必要となる。そこで、マウスの NMJ 可視化技術を基礎として、コモンマーモセットの NMJ 可視化条件を確立した。当該実験においては、各個体を深麻酔下の心臓放血により安楽殺し、同時に 1%PFA にて灌流固定した。その上で、四肢の骨格筋を摘出し、1%PFA にて追加の固定を行った。固定サンプルより凍結切片を作製し、NMJ の可視化に必須の運動神経軸索と運動終板の可視化条件を種々、検討した。他方、コモンマーモセットでの AAV ベクターの投与条件については、EGFP を発現する AAV ベクター（AAV-EGFP）を用いた検討を進め、至適と思われた条件にて AAV-D7 の投与実験を実施した。

（倫理面への配慮）

上記の動物実験については日本医科大学大学院医学研究科と国立精神・神経医療研究センター神経研究所の組換え DNA 実験、並びに動物実験に関する規則・指針を遵守し、国立精神・神経医療研究センター神経研究所の動物実験倫理問題検討委員会に事前の承認を受けた上で、それぞれの実験を実施した。当然のことながら、本研究においては全ての関係法令を遵守した。

C. 研究結果

本年度の研究においては、コモンマーモセットの NMJ の可視化が想定以上に難しいことが判明したため、その可視化条件の至適化を進め、安定的な可視化条件を確立した。そこで、EGFP を発現する AAV ベクター（AAV-EGFP）を用いてマーモセットへの投与条件の検討を進め、至適条件を決定した。現在、AAV-D7 の投与実験を進めている。

D. 考察

将来の治験を視野に、本年度の研究により確立された、霊長類を用いた試験条件の開発研究を着実に推進する必要がある。

E. 結論

本年度の研究により、霊長類を用いた試験についての、次年度以降の研究基盤を固めることができた。

4. その他
該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroimi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda. Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance.
Mol. Ther., in press (doi: 10.1038/mt.2015.5.)

Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, Yuji Yamanashi. *DOK7* gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction.
Science, 345: 1505-1508 (2014)

Riichiro Hira, Fuki Ohkubo, Yoshito Masamizu, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Takashi Okada, and Masanori Matsuzaki. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning.
Nature Commun., 5: 5551 (2014)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 出願

該当無し

3. 実用新案登録

該当なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

規制・知財対応

担当責任者 長村 文孝 東京大学医科学研究所教授

本項目においては、ALS に対する NMJ 形成増強技術を基盤とする新たな治療技術開発の推進と臨床試験の実施に向けた非臨床試験を実施するための規制および知財対応を目的として、情報をとりまとめ、必要な対応を行う。

A. 研究目的

本研究事業全体としては、有効な治療に乏しい ALS に対する新規治療技術の開発を目指し、Dok-7 の発現を増強させることにより、神経筋接合部（NMJ）の形成を増強させ、運動機能障害を改善させる新規治療技術の創出を目的とした。この NMJ 形成増強手法としてアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いたヒト DOK7 遺伝子発現ベクター（AAV-D7）を用いるを試みているが、医師主導治験を含めた薬機法の下での開発を進めており、そのために必要となる規制対応、ならびに企業導出に向けてより競争力のある知財対応を検討することを本業務項目の目的とする。

B. 研究方法

本研究では、薬機法およびその関連法規、ガイドライン等を収集し取り纏め、今後の非臨床試験、製造、治験実施のために実際にどのように対応していくかの検討を行う。また、遺伝子治療については、国内に比較して欧米での開発が進んでおり、そのため特にガイドラインについては、米国 FDA (Food and Drug Administration) 及び EMA (European Medicinal Agency) 等の規制当局が発出している法規・ガイドライン、審査報告書等の資料あるいは学会等での資料の収集と解析を行う。また、本研究事業で用いるベクターと類似の製剤についての非臨床、製造、早期の臨床試験に関する文献を

収集・解析し AAV-D7 の開発に有益な情報を収集し、必要に応じて他の研究者に提供する。

（倫理面への配慮）

公表された法規、ガイドライン、文献を基に行うため特に倫理的配慮を必要としない。

C. 研究結果

欧州では遺伝子治療のように先進的な医療開発はEMAが管理しており、本事業においても有用なガイドラインが発出されており、特に Quality, non-clinical and clinical issues relating specifically to recombinant adeno-associated viral vectors は AAV について品質、非臨床試験および臨床段階における AAV 特有の問題点とその対応を明らかにしており本研究における各段階での対応方法について非常に参考となる点で、Questions and Answers on gene therapy では製造開発中の同等性の立証、特性解析としてのベクターの全塩基配列解析、環境への影響が本研究事業に有益である点で開発への大きな参考資料となることが判明した。米国 FDA では、”Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products”、”Guidance for Industry Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products”が発出されているが、総論的であり、”Guidance for Industry: Process Validation: General Principles and

Practice”が、小スケールでの実験系に必要な製剤製造から、非臨床試験、治験用にスケールアップして製造する際に必要であることがわかった。本研究ではAAV-D7の製造は委託するもののその管理において重要であり、アカデミアであっても精通しておくべき情報である。米国ではNIHとFDAによるRAC (recombinant DNA advisory committee) により遺伝子治療の臨床計画は検討されるが、アカデミアとしての開発の管理や支援はNIHが事実上管理している。NIHからは”NIH Guidelines (NIH Guidelines for researcher involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules)”が発出され、アカデミアが開発を行う場合の設備、構造、手順を規定しており、日米の研究室環境の差はあるものの本研究を含めて参考となることが判明した。

知財に関しては今後の開発を進めるうえで必要な情報を研究代表者に提供し、また、特許の侵害調査実施についての取り纏めを行った。

D. 考察

本邦において、遺伝子治療のように革新的な医療開発は、参考にすべき前例やガイドラインに乏しいことにより、非臨床試験の実施あるいは製造、品質保証について困難が生じるとされ、それが臨床開発の遅れに繋がるとされてきた。今回、規制情報を取りまとめてみると、米国では総論的なガイドラインは発出されているが、本研究に特化する形で使用できるものはなかった。しかし、EMA では、AAV を対象としたガイドラインが発出されており、本研究にほぼそのまま当てはめることができる。また、医薬品医療機器総合機構とは、薬事戦略相談・事前面談を既に始めているが、次の実施時期についても示されており、規制面での対応では、情報不足による研究の遅延の懸念は低いと考えられる。

知財については、調査あるいは相談を行っており、臨床開発にあたっては競合特許が存在しても回避できる見通しである。

E. 結論

本年度の研究においては、今後の研究遂行に必要な規制あるいは知財に関する情報を収集し、今後の対応を検討した。その結果、特に大きな支障となる問題点は存在しないと考えられ、研究の遂行に問題はないと結論づけられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

Noriko Fujiwara, Fumitaka Nagamura, Kazufumi Matsumoto, Naohide Yamashita, Yukie Takemura, Kiyoko Kamibeppu. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. International Association of Clinical Research Nurses. Boston, Massachusetts, USA. November 7 (2014)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 出願
該当なし

3. 実用新案登録
該当なし

4. その他
該当なし

III. 学会等発表実績

様式第19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「ALSに対する新規治療技術の創出」

機関名 東京大学 医科学研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
NMJ形成シグナルとその制御（口頭発表、招待）	山梨裕司	筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発 研究班会議	2014年12月3日	国内
Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course（ポスター発表）	Fujiwara N, Nagamura F, Matsumoto K, Yamashita N, Takemura Y, Kamibeppu K.	International Association of Clinical Research Nurses.	2014年11月7日	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance.	Hayashi-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S.	Molecular Therapy	in press	国外
DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction.	Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, Motomura M, Yoshida N, Beeson D, Takeda S, Yamanashi Y	Science	2014年9月19日	国外
The MuSK activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses.	Tezuka T, Inoue A, Weatherbee SD, Burgess, RW, Ueta R, Yamanashi Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	2014年11月18日	国外
Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning.	Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M.	Nature Communications	2014年11月24日	国外

IV. 研究成果の刊行物・別刷

<次頁以降に添付>

Intra-Amniotic rAAV-Mediated Microdystrophin Gene Transfer Improves Canine X-Linked Muscular Dystrophy and May Induce Immune Tolerance

Hiroshi Hayashita-Kinoh¹, Naoko Yugeta¹, Hironori Okada¹, Yuko Nitahara-Kasahara¹, Tomoko Chiyo¹, Takashi Okada¹ and Shin'ichi Takeda¹

¹Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Japan

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe congenital disease due to mutations in the dystrophin gene. Supplementation of dystrophin using recombinant adeno-associated virus vector has promise as a treatment of DMD, although therapeutic benefit of the truncated dystrophin still remains to be elucidated. Besides, host immune responses against the vector as well as transgene products have been denoted in the clinical gene therapy studies. Here, we transduced dystrophic dogs fetuses to investigate the therapeutic effects of an AAV vector expressing microdystrophin under conditions of immune tolerance. rAAV-CMV-microdystrophin and a rAAV-CAG-luciferase were injected into the amniotic fluid surrounding fetuses. We also reinjected rAAV9-CMV-microdystrophin into the jugular vein of an infant dystrophic dog to induce systemic expression of microdystrophin. Gait and cardiac function significantly improved in the rAAV-microdystrophin-injected dystrophic dog, suggesting that an adequate treatment of rAAV-microdystrophin with immune modulation induces successful long-term transgene expression to analyze improved dystrophic phenotype.

Received 25 February 2014; accepted 2 January 2015; advance online publication 10 February 2015. doi:10.1038/mt.2015.5

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive genetic disorder causing progressive deterioration of skeletal and cardiac muscles due to mutations in the dystrophin gene. Progressive deterioration in striated muscle function in affected individuals ultimately results in early death due to cardiac and respiratory dysfunction. Currently, there is no cure for DMD, but several novel strategies for replacing or repairing the dystrophin gene are in development. Those are including the gene replacement therapies mediated by viral vectors, the use of stem cells of different tissue origins and transcript repair treatments using exon-skipping strategies. Spontaneous forms of X-linked muscular dystrophy due to dystrophin deficiency have been identified in mice (*mdx* mouse), multiple dog breeds and cats. We previously reported dystrophin supplementation strategies in which the local injection of recombinant adeno-associated virus

(rAAV)-microdystrophin into the skeletal muscle of *mdx* mice^{1,2} and the systemic injection of rAAV9-microdystrophin into *mdx* mice³ resulted in extensive expression of microdystrophin and improvement of myocardial dysfunction. Unlike *mdx* mouse, canine X-linked muscular dystrophy is the animal model most similar to human DMD with progressive fatal disease. Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) has been the most extensively characterized and examined dog model. Alternatively, we established and studied a beagle-based model of canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD)⁴⁻⁷ Also, other groups have reported the systemic gene delivery of an rAAV-truncated dystrophin to dystrophic dogs,⁸⁻¹¹ although functional improvement remained to be elucidated. Sampaolesi *et al.*¹² have reported the microdystrophin-transduced autologous mesoangioblast treatment of the dystrophic dogs although they could not obtain functional improvements because of lack of immune modulation. Therefore, effectiveness of the microdystrophin (truncated dystrophin) replacement strategy in preclinical settings still remains open question.

Of the different gene delivery vectors available, rAAV vectors hold great promise for gene therapy because of their safety, low toxicity, and longevity of transgene expression. However, immune responses elicited against rAAV capsid proteins or transgene products can prevent efficient gene therapy. To induce effective long-term expression of a transgene, it is important to prevent immune-mediated destruction of the transduced muscles by regulating the host immune response. We and others reported that rAAV-mediated transfer of genes into the skeletal muscle of dogs evokes immune responses to the rAAV or the transgene products.¹³⁻¹⁵ The relevance of immune effects during gene transfer is emphasized by the results of a recent clinical gene therapy trial of rAAV2.5-minidystrophin in six DMD patients, in which immune responses to transduced dystrophin were detected.¹⁶

To overcome these immune responses against vectors or transgenes, intra-arterial administration of rAAV or plasmid vectors currently offers the best system for delivery of recombinant dystrophin to dystrophic muscle while minimizing the antivektor/transgene immune responses. Another strategy to improve gene delivery by preventing unwanted host immune responses to rAAV-dystrophin, coadministration of immunosuppressant with rAAV.¹⁷ However, long-term use of immunosuppressant

Correspondence: Takashi Okada, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8602, Japan. E-mail: t-okada@nms.ac.jp

is clearly not desirable in DMD and it is need to develop clinically applicable methods of inducing tolerance to dystrophin in DMD patients. Fetal gene delivery induces immune tolerance to hF.XI in the hemophilia B mouse model when compared with postnatal gene delivery.^{18–20} We hypothesized that intra-amniotic injection of rAAV would induce oral immune tolerance to rAAV and/or the microdystrophin transgene and achieve long-term transgene expression. Here, we provide evidence that transfer of rAAV9-microdystrophin into CXMD₁ fetuses induce tolerance to rAAV, long-term transgene expression, and functional improvement.

RESULTS

Efficacy of intrauterine gene transfer and estimation of rAAV genome copy number after intra-amniotic injection of rAAV9-microdystrophin into CXMD₁ fetuses

In dogs, the thymus starts to develop on Day 27 of gestation and is complete by Day 45.²¹ We hypothesized that immune tolerance to rAAV and/or its transgene could be induced by injecting rAAV into CXMD₁ fetuses before the immune system had matured. Therefore, we injected rAAV9-CMV-microdystrophin and rAAV9-CAG-luciferase into the amniotic fluid surrounding fetuses on E35. There were no significant adverse events associated with rAAV-introduction during gestation. All puppies were delivered by cesarean section at E60. The genotypes of all offspring were confirmed by PCR. They included one normal dog (6101MN), two carrier dogs (6103FC and 6106FC), two DMD-affected dogs (6102MA and 6104MA), and one untransduced affected dog (6105MA). 6105MA is a control and was not injected by rAAV at all (Table 1).

To determine the efficiency of viral vector gene transfer, we quantified the number of viral particles in individual tissues by qPCR. The rAAV genome was detected in the amnion and umbilical cord of all transduced dogs, with a maximum copy number of 37.5 viral genomes (v.g.)/diploid cell in the amnion of dog 6102MA (Figure 1a). The rAAV genome copy number in the umbilical cord (6101MN 1.8 v.g./cell, 6102MA 0.41 v.g./cell, and 6104MA 1.6 v.g./cell) was less than that in the amnion (6101MN 3.79 v.g./cell and 6104MA 11.7 v.g./cell). The vector genome was not detected in the untransduced affected dog (6105MA amnion 0.52 v.g./cell, umbilical cord 0.105 v.g./cell).

T-cell response to the rAAV

We next examined punch biopsies of the temporal muscle of transduced dogs by immunohistochemical staining to investigate the efficacy of intra-amniotic rAAV-microdystrophin injection. Marker gene expression in the biopsied temporal muscle from transduced dogs (6101MN, 6102MA, and 6104MA) was apparent at 4 weeks-of-age, although dystrophin expression was marginal in 6102MA and 6104MA (data not shown). To evaluate the T-cell responses to rAAV in transduced dogs, we examined the induction of IFN- γ in PBMCs after antigen stimulation (Figure 1b). PBMCs from 6-week-old transduced dogs were stimulated with rAAV9-microdystrophin for 4 hours. One transduced DMD-affected dog (6102MA) showed lower induction of IFN- γ than the untransduced DMD-affected dog (6105MA), possibly suggesting the induction of immune tolerance to rAAV itself. Given this level of T-cell responsiveness, we selected this dog for further study to maximize transgene expression; 6102MA received an additional intravenous injection of 3×10^{13} genome copies (1.2×10^{13} v.g./kg body weight) of rAAV9-CMV-microdystrophin at 6 weeks of age (Table 1) without concomitant immunosuppression.

Clinical manifestations

The untransduced dystrophic dog (6105MA) showed a lower body weight at 4 months, and slower weight gain thereafter, compared with 6102MA (Figure 2a). We developed a scoring system for CXMD₁²² that was based upon the examination of mobility and posture, for which the dogs were given scores of between 0 (normal) and 30 (severely affected) (Supplementary Table S2). 6102MA scored significantly higher than 6105MA (Figure 2b). Dog 6105MA showed clear dysfunctions, such as a short-stepped gait, head bobbing, slower running speed, and poor activity levels from 4 months of age (Figure 2b, Supplementary Video S1). On the other hand, 6102MA demonstrated better gait function than its affected littermates (6104MA and 6105MA). To further examine muscle function, we analyzed the physical activity of the transduced dystrophic dogs using an infrared sensor system (Supermex) by averaging the spontaneous locomotor activity shown by the dogs over 5 days and nights (12 hours light/dark cycle). Dog 6105MA was less active than dogs 6102MA and 6104MA, both in the light and in the dark (Supplementary Figure S1). Routine examination of standard serum protein levels suggested that rAAV transduction into the fetuses induced no

Table 1 Genotypes and gender of the AAV-treated dogs

Dog ID	Sex	DMD Phenotype	IUGT (injected into amniotic fluid)	Transgene	Systemic AAV injection (at 6 weeks old)
6101MN	M	Normal	+	Luci, μ Dys	–
6102MA	M	Affected	+	Luci, μ Dys	μ Dys
6103FC	F	Carrier	+	Luci, μ Dys	–
6104MA	M	Affected	+	Luci, μ Dys	–
6105MA	M	Affected	–	Luci, μ Dys	–
6106FC	F	Carrier	+	Luci, μ Dys	–

Injected rAAV vectors all included rAAV9-CMV-microdystrophin and rAAV9-CAG-luciferase. Untransduced affected dog (6105MA) is a control. Transduced affected dog (6102MA) was injected into the jugular vein with rAAV9-microdystrophin at 6 weeks old. 61 series (6101MN to 6106FC, except for 6105MA) were injected AAV at embryonic day 35. For IUGT, rAAV9-CMV- μ Dys 1.0×10^{12} v.g./fetus along with rAAV9-CAG-Luci-WPRE 1.0×10^{11} v.g./fetus. For systemic injection, rAAV9-CMV- μ Dys 1.2×10^{13} v.g./kg body weight were injected into the jugular vein of the 6102MA.

AAV, adenoassociated virus; F, female; M, male; IUGT, *in utero* gene transfer; Luci, luciferase; μ Dys; microdystrophin.

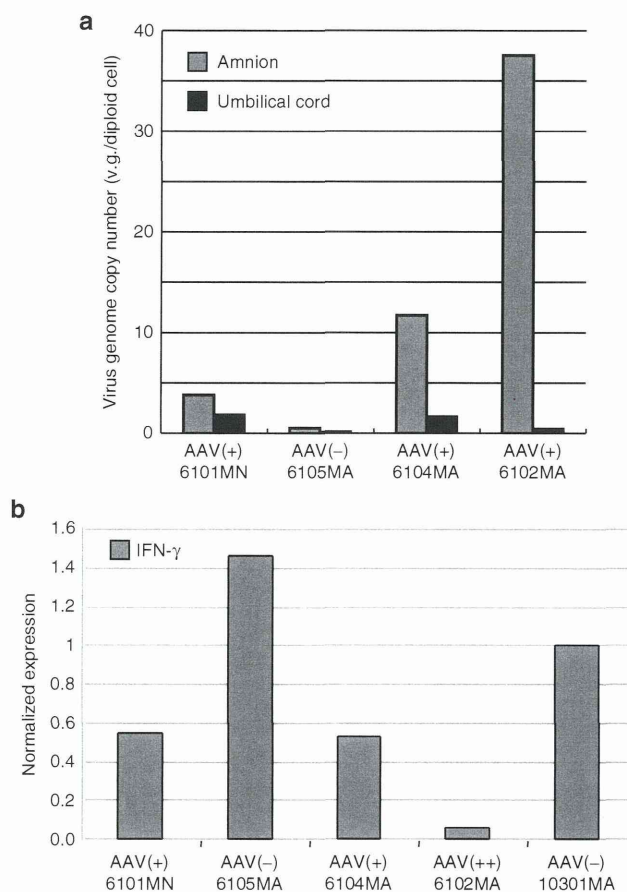


Figure 1 Quantification of rAAV genome copy number and T-cell responses to the rAAV and transgene product in transduced dogs. **(a)** Quantitative PCR analysis of vector gene copy number/diploid genome in DNA samples extracted from the amnion and umbilical cords of transduced dogs. **(b)** IFN- γ mRNA expression in PBMCs stimulated with rAAV. PBMCs from 6-week-old transduced dogs were stimulated for 4 hours with rAAV9-microdystrophin. IFN- γ mRNA expression was determined by qRT-PCR ($\Delta\Delta C_t$ method). Expression levels of IFN- γ in the untreated affected dog (10301MA) at same weeks old were used as the reference for calculating relative-fold increases. This DMD dog was delivered by rAAV-untreated mother. The RNA transcripts were normalized to endogenous 18S rRNA.

significant side effects (**Supplementary Table S1**). Also, mean serum creatine kinase levels were not significantly different between the treatment groups (**Supplementary Table S1**).

Transgene expression in rAAV-injected dogs (macroscopic and histopathologic analysis)

We next investigated the efficacy of the intra-amniotic rAAV-microdystrophin injections and systemic rAAV transduction. To evaluate long-term transduction efficiency, we performed necropsies 127 weeks after intrauterine gene delivery (123 weeks after cesarean section, and 115 weeks after systemic gene delivery). The heart and diaphragm were analyzed macroscopically. Surprisingly, the thickness of left ventricle (LV) and intraventricular septum (IVS) of the transduced and systemically injected affected dog (6102MA) appeared normal. The skeletal muscles (tibialis anterior and diaphragm) and cardiac muscle of the transduced dogs were

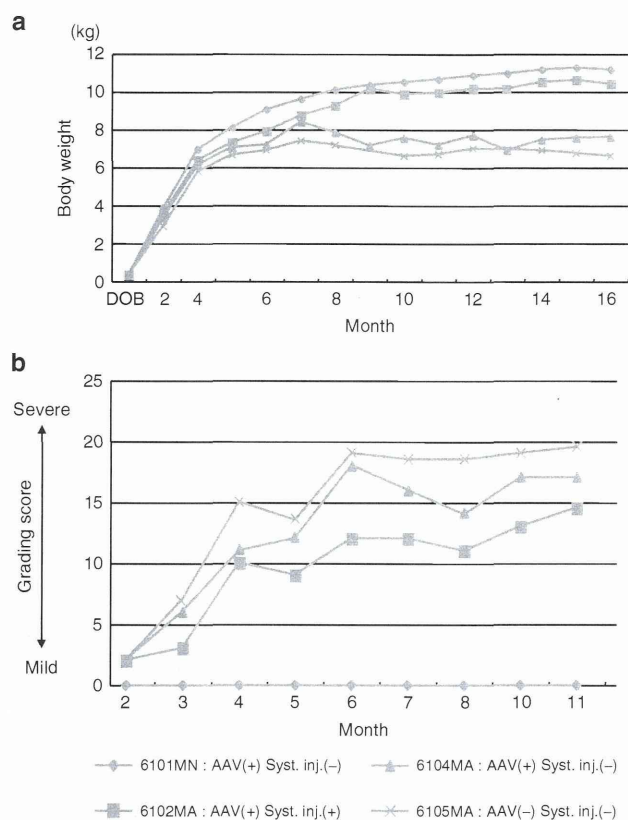


Figure 2 Clinical manifestations in the rAAV-transduced dogs. **(a)** Body weight changes in four dogs transduced with rAAV9-microdystrophin and rAAV-luciferase via amniotic fluid injection. **(b)** Clinical grading scale used to assess the transduced dogs. Clinical scores used to measure gait disturbance, mobility disturbance, limb or temporal muscle atrophy, drooling, macroglossia, and dysphagia are described (**Supplementary Table S2**).

analyzed by immunohistochemical staining using antiluciferase and antidystrophin antibodies (**Figures 3** and **4b**). The transduced unaffected (normal) dog (6101MN) showed prominent expression of the marker gene. Dog 6104MA (transduced with the intra-amniotic vector, without systemic injection of rAAV-microdystrophin) also showed prominent marker gene expression, but no dystrophin expression. Dog 6102MA (transduced with the intra-amniotic vector followed by systemic rAAV-microdystrophin injection at 6 weeks of age) showed clear marker gene expression and dystrophin expression even at 2 years and 4 months of their age.

H&E-stained LV sections of heart tissue from the untransduced affected dog (6105MA) showed evidence of cardiac damage, including interfascicular fatty infiltration throughout; however, little evidence was evident in the heart tissue from 6102MA (**Figure 4**).

The diaphragm was hypertrophic and more fibrotic changes were evident in dogs 6105MA and 6104MA than in 6102MA (**Figure 3b,c**). Fibrotic areas of the diaphragm in dogs 6102MA were less than in 6105MA (**Figure 3c,d**). Indeed, the intercostal muscles of 6102MA were thicker than those of 6105MA (data not shown). Furthermore, we found necrotic myofibers in 6105MA and 6104MA. Variance coefficients of the muscle fiber size determined in diaphragm muscles of 2 years and 4 months old 6102MA was 499.4 ± 20.1 , whereas the variance coefficient of the muscle

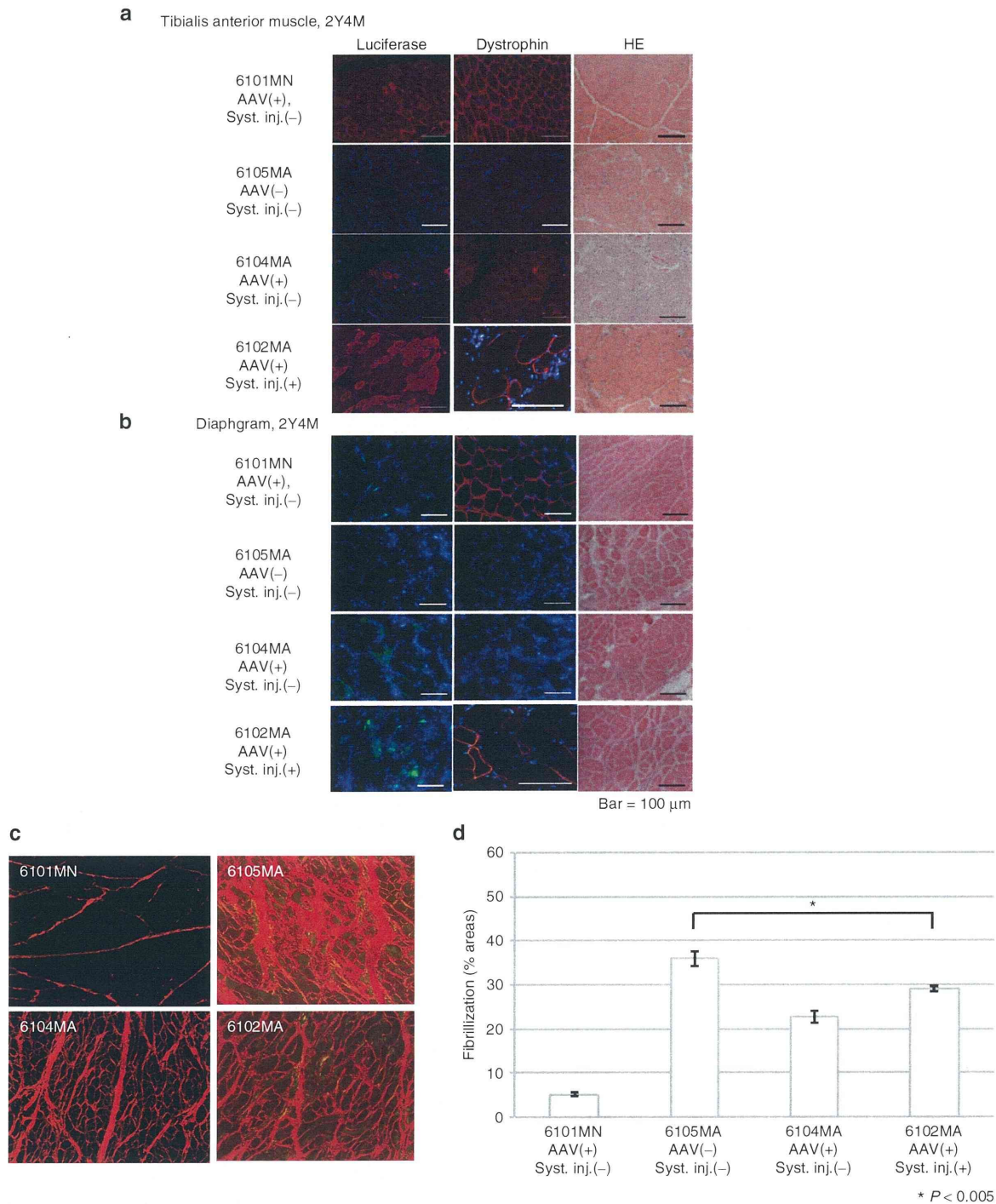


Figure 3 Immunohistochemical detection of the transgene in the skeletal muscle. Immunohistochemical staining for luciferase and dystrophin is shown in cross-sections of muscle tissue from the negative control dog (6105MA), the intra-amniotic vector-transduced affected dog (6104MA) and the affected dog with intra-amniotic vector transduction followed by systemic AAV injection (6102MA). **(a)** Tibialis anterior and **(b)** diaphragm, at 2 years and 4 months of age. Scale bars = 100 μm. **(c)** Fibrillation of the diaphragm of the 6101MN, 6102MA, 6104MA, and 6105MA. Sirius Red staining of the diaphragm of the affected dogs. **(d)** Fibrotic areas of the both dogs are estimated by BZ-analyzer software (Keyence, Osaka, Japan) and analyzed by ImageJ software. * $P < 0.001$ unpaired t -test.