

課題番号：28-6

課題名：ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

主任研究者：武田 伸一（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

分担研究者：青木 吉嗣（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

岩田 裕子（国立循環器病研究センター研究所 分子生理部）

上住 聡芳（東京都健康長寿医療センター）

梅澤 明弘（国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部）

裏出 良博（筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構）

岡田 尚巳（日本医科大学 大学院医学研究科）

貝谷 久宣（(社)日本筋ジストロフィー協会）

櫻井 英俊（京都大学 iPS 細胞研究所）

清尾 康志（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

田中 廣壽（東京大学 医科学研究所）

野口 悟（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部）

萩原 正敏（京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学分野）

橋戸 和夫（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

橋本 有弘（国立長寿医療研究センター研究所 再生再建医学研究部）

深田 宗一郎（大阪大学大学院薬学研究科）

北條 浩彦（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

堀田 秋津（京都大学 iPS 細胞研究所）

松尾 雅文（神戸学院大学 総合リハビリテーション学部）

保田 昌彦（(公財)実験動物中央研究所 動物医学研究室）

湯浅 慎介（慶應義塾大学 医学部循環器内科）

1. 研究目的

原因が解明されたにもかかわらず治療法のない Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)については、全身の骨格筋と心筋が障害される疾患であることを考慮すると、全身的な治療法を開発することが最も重要である。そこで、これまで進めてきた研究のうち、DMD に対するアンチセンス核酸 (AO) を用いたエクソン・スキップ治療法の有効性と安全性を検証し、治験のプロトコルやマニュアルの準備を進めて、社会的、倫理的問題についても十分な検証を進めながら、同治療法を臨床応用することを目標とする。また、筋前駆細胞への分化誘導法を確立する必要がある iPS 細胞を用いた幹細胞移植治療ならびに筋ジストロフィーの病態解明に基づく薬物治療についてもこれまで研究班で開発してきたモデル動物を駆使して研究を進めて臨床に展開することを目標に研究を進める。

2. 研究方法

DMD に対する根治的治療法として、AO を用いたエクソン・スキップ治療の開発が進行している。我々はこれまでモデル動物での有効性を示すとともに、治験の実施に必要な患者レジストリー及び臨床試験支援ネットワークの重要性を指摘し、整備を提唱した経緯がある。既にエクソン 51 を対象とする治験が実施されているが、次いで対象患者が多いとされるエクソン 53 について、我々は日本新薬株式会社との

共同研究により、高い有効性が期待されるモルフォリノ製剤の AO(NS-065/NCNP-01)の配列を決定し、国産初のアンチセンス医薬品としての承認を得るべく医師主導型の早期探索的臨床試験を計画、平成 25 年から 27 年にかけて当該試験を実施した。iPS 細胞を用いた研究については、DMD 患者由来の線維芽細胞ないしは筋細胞を材料として幹細胞の誘導条件並びに移植法を確立するための検討を行った。一方、病態解明に基づく薬物治療の開発に関しては、プロスタグランジン(PGD2)合成酵素阻害剤、TRPV チャネル阻害剤、G-CSF 等に着目し、臨床に展開するための研究を進めた。

なお、倫理面の配慮として、DNA 組換え実験に関しては、各施設の組換え DNA 実験安全委員会による審査、承認を受けた上で実施した。動物実験については、各施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。ヒトを対象にした研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。

3. 研究結果及び考察

本研究班の中心的な課題であるエクソン・スキップについてはヒト・ジストロフィン遺伝子のエクソン 53 スキップを引き起こす有効なアンチセンス配列を同定した上で、霊長類とげっ歯類を用いた安全性・毒性試験を行い PMDA からの承認を受けて、

DMD 患者に対する早期探索的臨床試験を実施し、大きな有害事象なく終了することができた。殊に、投与された全例で RT-PCR 上 Skip した band が確認され、高用量群 (20 mg/kg) の 1 例では、ジストロフィンの発現が、免疫組織化学的にも Western blot 上でも確認された (Sci Transl Med, 2018)。現在、我が国と米国において、各々企業による第 1/II a 相試験並びに第 II 相試験 b'が行われている(武田班員)。類薬の承認申請の過程で FDA から寄せられた見解として 1)アンチセンス塩基配列の最適性、2)ジストロフィン検出の妥当性、3)最適の臨床評価法の開発が求められているので、他の研究班とも協力しながら、開発研究を進める必要がある。一方、エクソン 45 スキップについては新たな核酸医薬品である ENA を用いた臨床試験が行なわれた (松尾班員)。

また、本研究班は、筋衛星細胞、間葉系前駆細胞などの組織幹細胞について多くの業績を挙げてきた。しかし、組織幹細胞は増殖性に限りがあることが多く、全身骨格筋・心筋への移植が難しいという限界があった。近年、iPS 細胞が樹立され、我が国発の技術として大きな注目を集めている。櫻井班員は DMD 患者由来 iPS 細胞から筋細胞を誘導後、mdx マウスに移植し dystrophin 陽性筋線維の出現を確認し、更に、筋衛星細胞としての生着を確認した。一方、武田班員は EGsphere 法を改良した iPS 細胞からの筋前駆細胞の誘導法 (Sci Rep, 2018) 並びに direct reprogramming による iPS 細胞からの myogenic cell の誘導に成功している (Sci Rep, 2017)。

筋ジストロフィーの病態を出発点とした治療研究に関しては、PGD2 合成酵素阻害剤について、DMD 患者における尿中代謝産物の検索 DMD 患者を対象としたヒト PGDS 阻害剤 (TAS-205)による、第一相臨床試験が行なわれた後、臨床的な有効性を問う第二相臨床試験が行なわれた (裏出班員)。ストレッチ感受性 Ca^{2+} 透過性チャネル(TRPV2)を標的とした筋ジストロフィー治療薬の開発に関して、市販薬のスクリーニングで同定された抗アレルギー薬として知られるトラニラストの有効性を検討した結果、心筋症、重症心不全動物モデルにおいて心機能の有意な改善が認められただけでなく、mdx や DKO の心収縮能も濃度依存的に改善した (岩田班員)。この結果を受けて、国立病院機構刀根山病院において同薬の投薬が行なわれた。その結果として、DMD に対する同薬の先進医療 B の認定が行われることが特記される。

4. 結論

DMD に対するエクソン 53 スキップの早期探索的臨床試験を行い、その安全性と有効性を立証することができた。DMD に対しては、今後、より多くの DMD 患者が対象となり得るマルチ・エクソン・スキップ

の方法論や革新的技術開発を進めることが重要である。

一方、NCNP の研究基盤を強化することが重要であるが、本研究班で構築してきた筋ジストロフィーモデル動物のプラットフォームについて、エクソン・スキップ薬のみならずプロスタグランジン合成酵素阻害剤、G-CSF の開発等に関与し貢献することができた。今後は、以上の治療法のみならず、国際的にも注目されている幹細胞研究や iPS 細胞を用いた再生治療法について更に研究を加速することが重要である。これらの研究と研究基盤を通して分子マーカーや臨床評価法が確立することが期待されている。

5. 研究発表 (原著論文 33 報他、多数)

1) Hyzewicz J, (6 名), Takeda S: Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. *Am J Pathol.* 2017 Mar 15. pii: S0002-9440(17)30195-5. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.019. [Epub ahead of print] PMID: 28315675. 査読有

2) Miyagoe-Suzuki Y, (9 名), Takeda S: Induction of Pluripotent Stem Cells from a Manifesting Carrier of Duchenne Muscular Dystrophy and Characterization of Their X-Inactivation Status. *Stem Cells Int.* 2017;2017:7906843. doi: 10.1155/2017/7906843. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28491099. 査読有

3) Sakai-Takemura F, (8 名), Takeda S: Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep.* 2018 Apr 26;8(1):6555. doi: 10.1038/s41598-018-24959-y. PMID: 29700358. 査読有

4) Komaki H, (5 名), Aoki Y, Takeda S: Systemic administration of the morpholino antisense NS-065/NCNP-01 for exon-53 skipping in Duchenne muscular dystrophy: A phase I study. *Sci Transl Med.* in press. 査読有

5) Echigoya Y, (9 名), Aoki Y, Takeda S, Yokota T: Effects of systemic multiexon skipping with peptide conjugated morpholinos in the heart of a dog model of DMD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 114(16): 4213-4218, 2017. doi: 10.1073/pnas.1613203114. 査読有

6) Ito N, Kii I, Shimizu N, Tanaka H, Takeda S: Direct reprogramming of fibroblasts into skeletal muscle progenitor cells by transcription factors enriched in undifferentiated subpopulation of satellite cells. *Sci Rep.* 14; 7(1): 8097, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08232-2. 査読有

7) Cho A, Malicdan MCV, Miyakawa M, Nonaka I,

Nishino I, Noguchi S: Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in the GNE myopathy. *Hum Mol Genet.* 15; 26(16): 3081-3093, 2017. doi: 10.1093/hmg/ddx192. 査読有

8) Sako Y, (8名), Hashimoto N, Hosoya T, Matsuo M, Hagiwara M: Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep.* 30; 7: 46126, 2017. doi: 10.1038/srep46126. 査読有

6. 知的所有権の出願・取得状況

1) 名称：加速度・角速度の測定による筋原性疾患の診断装置及び方法

出願番号:特願2017-173971号、整理番号:2017-79301

出願日 2017年9月11日

発明者：武田 伸一，倉岡 睦季

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

特許出願人：国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

産業財産権の出願・取得状況 計 5 件

7. 自己評価

本研究班に課せられた使命、即ち筋ジストロフィーに対する治療法の開発に関しては、臨床試験を行って有望な結果が得られ、さらに次相試験が行なわれていることから、これを達成できたと考えている。

最後に、科学性、学際性、国際性、公平性、倫理性、公開性を原則として、筋ジストロフィーに対して治療を開発するための研究班を長年に渡って組織させて頂いていることに深く感謝し、今後のご配慮をお願いしたい。