

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）

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（東京大学医学部附属病院）

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）

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 に次いでエクソン・スキップ治療の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、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。次に国産初のアンチセンス医薬品としての承認を得ることを目標として、企業による次相試験に参画する一方、長年の共同研究の相手先である研究者を介して米国に導出することができた。

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。さらに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 チャネル阻害剤等に着眼し、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として追究してきたエクソン・スキップに関しては、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実施することができた (NCNP/武田班員)。特に、投薬量に応じた薬物の最高血中濃度 (Cmax) の上昇が得られ、投与が行なわれた 10 例全例で、エクソン 53 スキップが観察された。しかも Cmax と mRNA レベルでのエクソン・スキップ効率が相関していた。更に、投与例の多くでジストロフィンの発現が確認され、特にその 1 例では、正常対照の 8.1% に達していた。 (*Sci Transl Med*, 2018)。この結果、厚労省による「先駆け審査制度」、米国 FDA による fast track 制度の指定を受け、我が国と米国で企業による次相試験が行われ、我が国の I/II 相試験では、40 mg/kg あるいは 80 mg/kg の週 1 回投与で、各 8 名が顕著な有害事象なく 24 週の投与を終了したばかりでなく、全例で RT-PCR 上エクソン 53 スキップを認めた。80 mg/kg の 24 週投与の後に行われた筋生検で顕著なジストロフィン発現を認めた。同様な結果は、米国での投与例でも得られている他、DMD の自然歴と比較して、良好な臨床評価指標の改善結果も得られている。次の段階として、我が国と米国で条件付き早期承認制度への申請が準備されていることが特筆される。NCNP の武田・青木班員は、エクソン 44 スキップについても開発を進め小牧班とも協力して医師主導治験としての展開を目指す一方で、従来のモルフォリノ核酸では、効果が得られなかった心筋でのエクソン・スキップについて、ペプチドを付加した PPMO を用いて、高い導入効果が得られることを明らかにした (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2017)。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われている (神戸学院大/松尾班員)。

本研究班は、幹細胞、筋再生の分野でも画期的な成果を世界に発信してきた歴史を持つ。一つは、筋再生の鍵を握っている筋衛星細胞の遺伝子発現パターンを明らかにしたことであり、もう一つは骨格筋の新しい幹細胞としての間葉系前駆細胞の提唱である。前者に関しては、最初に指摘した Calcitonin Receptor の生理的な意義が阪大の深田班員を共同研究者としたフランスの研究グループにより明らかにされた (*Nature*, 2018)。後者の細胞を発見した都健康長寿医療センター・上住班員は、レチノイン酸シグナルが筋の脂肪化、線維化を担う間葉系前駆細胞の機能抑制に重要であることを見出し、レチノイン酸に比べ脂肪分化を数百～千倍の強さで抑制

するレチノイン酸受容体作動薬の開発に成功した。一方で、我が国発で世界をリードする科学技術として開発された iPS 細胞に関しては、筋細胞系譜の幹細胞を誘導しにくいという大きな限界があった。CiRA の櫻井班員と共に長年に渡って努力を続けてきた NCNP の武田班員は中胚葉誘導法と EG sphere 法に加え、TGF β シグナルを抑制することにより、誘導方法を確立することができた (*Sci Rep*, 2018)。今後の課題は、移植法を確立することにある。

一方、薬物開発に関しては、武田班員は、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45~55 欠失例が例外的に軽微な症状を示すことに着目して研究を進めてきた。殊に 45~55 欠失ジストロフィンのトランスジェニックマウスを作出して mdx マウスと交配して検討を進めたところ、同マウスでは外部膜のぜい弱性は改善していた。一方で筋小胞体膜のリアノジン・レセプターは細胞内の nNOS により産出された NO により、過剰にニトロシル化していた。そのため、細胞内に Ca が漏出していたが、Ca イオンを小胞体に取り込む Ca ポンプ (SERCA) の働きがよく保たれており、それがジストロフィン欠損状態では増加していた Sarcoplipin の発現低下によることを突きとめた。現在、Sarcoplipin はジストロフィン欠損の新たな治療ターゲットとして注目されている (*BBRC*, 2018)。プロスタグランジン合成酵素阻害剤についても DMD 患者における尿中代謝産物の検索を元に、健常者における first in human 試験に引き続き、DMD 患者における第 2 相企業治験が行なわれた (東京大学/裏出班員)。また、NCVC の岩田班員が長年に渡って進めてきた Ca²⁺透過チャネル (TRPV2) 阻害についての基礎研究に引き続き、NHO 刀根山病院の松村先生によって、臨床でのパイロット試験が行われた結果、既存の阻害薬による DMD の心筋障害に対する先進医療 B として認められた。

5. 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に引き続き、我が国と米国で次相試験を行い、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、次に医師主導治験が計画されているエクソン 44 スキップを始めとし、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、TRV2 阻害剤等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 48 報他、多数)

- 1) Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, Tachimori H, Nakamura H, Aoki Y, Takeda S : Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 2018 Apr 18;10(437). pii: eaan0713. doi:10.1126/scitranslmed.aan0713. PMID: 29669851
- 2) Sakai-Takemura F, Narita A, Masuda S, Wakamatsu T, Watanabe N, Nishiyama T, Nogami K, Blanc M, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y: 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
- 3) Ito N, Ruegg UT, Takeda S : ATP-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels and Subsequent Activation of mTOR as Regulators of Skeletal Muscle Hypertrophy. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 18;19(9). pii: E2804. doi: 10.3390/ijms19092804.
- 4) Watanabe N, Nagata T, Satou Y, Masuda S, Saito T, Kitagawa H, Komaki H, Takagaki K, Takeda S : NS-065/NCNP-01: An Antisense Oligonucleotide for Potential Treatment of Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018 Dec 7;13:442-449. doi: 10.1016/j.omtn.2018.09.017. Epub 2018 Sep 27.
- 5) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Ruegg UT, Takeda S : Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Oct 20;505(1):51-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.039. PMID: 30236982
- 6) Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Tachimori H, Kato N, Shibasaki H, Shin A, Aoki Y, Kimura E, Takeda S : Accelerometric outcomes of motor function related to clinical evaluations and muscle involvement in dystrophic dogs. *PLoS One.* 2018 Dec 11;13(12):e0208415. doi: 10.1371/journal.pone.0208415. eCollection 2018. PMID: 30533017
- 7) Shibasaki H, Imamura M, Arima S, Tanihata J, Kuraoka M, Matsuzaki Y, Uchiumi F, Tanuma S, Takeda S : Characterization of a novel microRNA, miR-188, elevated in serum of muscular dystrophy dog model. *PLoS One.* 2019 Jan 30;14(1):e0211597. doi: 10.1371/journal.pone.0211597. eCollection 2019
- 8) Lee J, Echigoya Y, Duddy W, Saito T, Aoki Y, Takeda S, Yokota T: Antisense PMO cocktails effectively skip dystrophin exons 45-55 in myotubes transdifferentiated from DMD patient fibroblasts. *PLoS One.* 2018 May 17;13(5):e0197084. doi: 10.1371/journal.pone.0197084. eCollection 2018. PMID: 29771942
- 9) Miyatake S, Mizobe Y, Tsoumpra MK, Lim KRQ, Hara Y, Shabanpoor F, Yokota T, Takeda S, Aoki Y: Scavenger Receptor Class A1 Mediates Uptake of Morpholino Antisense Oligonucleotide into Dystrophic Skeletal Muscle. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Mar 1;14:520-535. doi: 10.1016/j.omtn.2019.01.008. Epub 2019 Jan 25
- 10) Takizawa H, Hara Y, Mizobe Y, Ohno T, Suzuki S, Inoue K, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Hoshino M, Komaki H, Takeda S, Aoki Y: Modelling Duchenne muscular dystrophy in MYOD1-converted urine-derived cells treated with 3-deazaneplanocin A hydrochloride. *Sci Rep.* 2019 Mar 7;9(1):3807. doi: 10.1038/s41598-019-40421-z.
- 11) Hosokawa M, Takeuchi A, Tanihata J, Iida K, Takeda S, Hagiwara M: Loss of RNA-Binding Protein Sfpq Causes Long-Gene Transcriptopathy in Skeletal Muscle and Severe Muscle Mass Reduction with Metabolic Myopathy. *iScience.* 2019 Mar 29;13:229-242. doi: 10.1016/j.isci.2019.02.023. Epub 2019 Feb 27.
- 12) Baghdadi MB, Castle D, Machado L, Fukada SI, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P:

Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. Nature. 2018 May;557(7707):714-718.doi:10.1038/s41586-018-0144-9. Epub 2018 May 23.

- 13) Kawaguchi T, Niba ETE, Rani AQM, Onishi Y, Koizumi M, Awano H, Matsumoto M, Nagai M, Yoshida S, Sakakibara S, Maeda N, Sato O, Nishio H, Matsuo M: Detection of Dystrophin Dp71 in Human Skeletal Muscle Using an Automated Capillary Western Assay System. Int J Mol Sci. 2018 May 23;19(6).pii:E1546.doi:10.3390/ijms19061546.
- 14) Yamamoto T, Awano H, Zhang Z, Sakuma M, Kittaki S, Matsumoto M, Nagai M, Sato I, Imanishi T, Hayashi N, Matsuo M, Iijima K, Saegusa J: Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy Is Less Frequent in Patients With Mutations in the Dystrophin Dp116 Coding Region Than in Other Regions. Circ Genom Precis Med. 2018Jan;11(1):e001782. doi: 10.1161/CIRCGEN.117.001782.
- 15) Matsuo M, Shirakawa T, Awano H, Nishio H: Receiver operating curve analyses of urinary titin of healthy 3-y-old children may be a noninvasive screening method for Duchenne muscular dystrophy. Clin Chim Acta. 2018 Nov;486:110-114. doi:10.1016/j.cca.2018.07.041. Epub 2018 Jul 24.
- 16) 武田伸一 :
超高齢社会に挑む骨格筋のメディカルサイエンス はじめに一骨格筋研究の新たな時代へ pp3-7 実験医学 (増刊) Vol.36-No7, 2018 (榊羊土社、東京)
- 17) 武田伸一 :
巻頭言「神経・筋難病の克服に向けて」 「BIO Clinica」 特集「神経・筋難病治療の最前線」 2018年7月30日発行、7月臨時増刊号、(榊北隆館、東京)

6. 知的所有権の出願・取得状況

1) 出願 計 9 件

名称：随時尿中細胞を用いた筋系細胞の誘導方法

出願番号：PCT/JP2018/047447

出願日：2018年12月25日

発明者：青木吉嗣，滝澤歩武、武田伸一，

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

2) 取得 計 27 件

名称：アンチセンス核酸(エクソン 45)

出願番号：特許第 10144931 号

出願日：2015年9月15日

取得日：2018年11月28日

発明者：武田伸一，青木吉嗣，塩谷由輝子，戸根悠一郎

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。