

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) ALSに対する新規治療技術の創出
(英語) A new therapeutic approach for ALS

研究開発担当者 (日本語) 医科学研究所 教授 山梨裕司
所属 役職 氏名： (英語) The Institute of Medical Science, Professor, Yuji Yamanashi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 知財・規制対応
開発課題名： (英語) Implementation of intellectual property management and compliance with pharmaceutical regulations

研究開発分担者 (日本語) 医科学研究所 教授 長村文孝
所属 役職 氏名： (英語) The Institute of Medical Science, Professor, Fumitaka Nagamura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

<和文>

ALS (筋萎縮性側索硬化症) は多因子性疾患であり、多角的なアプローチによる新規治療技術の創出が必要とされる。近年、当該疾患における神経筋接合部 (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キナーゼ MuSK によって制御されるが、申請者は独自に単離した 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 の形成不全による重篤な運動機能障害を呈する先天性筋無力症 (*DOK7*-CMS/*DOK7*型筋無力症) の原因であることを発見した。さらに、Dok-7 の過剰発現がマウスの NMJ 形成を高度に増強することを発見し、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たな治療技術の創出」に直結すると考えた。そこで、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、その投与がマウスの NMJ を後天的

に拡張すること（NMJ 形成増強）を見出した。本研究では、これらの知見を踏まえ、ALS に対する NMJ 形成増強治療の開発を目的とし、以下の成果を達成した。

- 1) 本研究の初期においては、NMJ 形成不全に対する NMJ 形成増強治療の有効性を検証する先行研究の一部を実施し、AAV-D7 の発症後の投与が、NMJ 形成不全を呈する DOK7-CMS や常染色体優性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーマウスの NMJ 形成を増強し、運動機能・生存期間を改善することを実証した (*Science*, 345:1505-8, 2014)。
- 2) 前項の知見を踏まえ、家族性 ALS の約 2 割を占める SOD1 (Superoxide dismutase 1) 変異型の ALS モデルマウス (SOD1-G93A トランスジェニックマウス) に対する AAV-D7 の有効性を検証した。その結果、当該 ALS モデルマウスの発症後の投与により、①NMJ 形成不全の抑制、②筋萎縮の抑制、③運動機能の改善、④生存期間の延長、が認められた (*EMBO Mol. Med.*, in press)。
- 3) 前項の知見は、本研究が開発を目指す NMJ 形成増強治療が少なくとも SOD1-G93A 型の ALS モデルマウスに有効であることを実証するものである。しかしながら、上記先行研究で用いた AAV-D7 は組織特異性の低い CMV プロモーターにより DOK7-EGFP 融合遺伝子を発現する先行研究用のベクターであり、治験準備を目指す非臨床試験には適さない。そこで、マウスにおいて同様の NMJ 形成増強効果をもちながら、①筋特異性の高いプロモーターにより、②非融合 DOK7 遺伝子を発現する試験物としてのヒト DOK7 発現ベクター (AAV-DOK7) を開発した。
- 4) 試験物として開発した AAV-DOK7 については、非臨床試験用の製剤を GMP 準拠で製造し、その品質試験、並びにげっ歯類の非臨床毒性試験を実施し、当該試験物ベクターを用いた効果・効能試験の準備を整えた。
- 5) 本研究が遺伝子治療の開発研究である側面を踏まえ、代表者らが発見した DOK7 遺伝子に関する特許調査に対する橋渡し研究加速ネットワークプログラムの支援を申請し、その採択を経て、外部調査会社による競合調査を行い、特段の競合特許が無いことを確認した。
- 6) 規制対応の点で重要な PMDA との薬事戦略相談については、国内外の規制情報を収集し、非臨床試験の進め方、及びベクター製造に関する協議を継続的に実施し、本研究の進展を踏まえつつ、2 回の事前面談を行った。これらの面談で得た情報が上記非臨床試験の立案に活かされている点は規制対応上の重要な成果といえる

<英文>

ALS—amyotrophic lateral sclerosis, also known as Lou Gehrig’s disease—is a progressive, multifactorial neurodegenerative disorder of motor neurons with severe muscle atrophy and paralysis. However, only the glutamate release inhibitor riluzole has shown beneficial effects on patient life span, prolonging it by a few months. Thus, new treatment strategies for ALS have long been desired. The neuromuscular junction (NMJ), the essential synapse between a motor neuron and skeletal muscle, has recently emerged as an attractive therapeutic target, because studies of ALS model mice and patients revealed that degeneration of motor nerve terminals such as size-reduction and denervation at NMJs precedes proximal motor neuron degeneration. This research group and its collaborators previously reported, 1) the muscle protein Dok-7 is an

essential cytoplasmic activator of the muscle-specific kinase MuSK, which governs the formation and maintenance of NMJs, 2) mutations in the human *DOK7* gene cause *DOK7* myasthenia (*DOK7*-CMS), which is characterized by defective NMJ structure or NMJ synaptopathy, and 3) postnatal infection of mice with an adeno-associated virus vector for *DOK7* expression (AAV-D7) enlarges NMJs. In this project, we performed non-clinical and translational studies with the aim of developing a new therapeutic strategy for ALS, and obtained the following results.

- 1) To see if therapeutic administration of AAV-D7 (*DOK7* gene therapy) aimed at enlarging NMJs is beneficial to neuromuscular disorders associated with NMJ defects, we first utilized mouse models of *DOK7* myasthenia or autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. We successfully demonstrated that *DOK7* gene therapy enhances motor activity and life span in these models (*Science*, 345:1505-8, 2014).
- 2) Given these results, we further tested if *DOK7* gene therapy benefits a mouse model of ALS (*SOD1-G93A*), and found that the NMJ-targeted therapy indeed suppresses size-reduction of the motor nerve terminals and subsequent denervation at NMJs in ALS model mice. In addition, we found that this therapy further suppresses muscle atrophy and enhances motor activity and life span in ALS mice (*EMBO Mol. Med.*, in press).
- 3) These findings established proof of concept with the ALS mouse model that *DOK7* gene therapy, or potentially other methods that are able to enlarge neuromuscular junctions after ALS onset, may be a novel treatment approach for this motor neuron disease. However, the *DOK7* expression vector AAV-D7 is not suitable for further tests in preparation for future clinical trials, because it carries the non-tissue-specific CMV promoter and the *EGFP-DOK7* fusion gene. Thus, we developed AAV-*DOK7* vector, which carries a muscle-specific promoter, which drives only the human *DOK7* gene without any fusion partners.
- 4) Also in preparation for future clinical trials, we manufactured AAV-*DOK7* for preclinical studies under GMP standard. We performed preclinical toxicity test with rodent under GLP standard, and prepared for further preclinical studies.
- 5) Given that this project aims ultimately to developing *DOK7* gene therapy for patients with ALS, we performed competitive patent research for the *DOK7* gene, and found no obvious one.
- 6) In preparation for future clinical trials, we have made consultation with PMDA twice. For the consultations, we collected relevant information nationally and globally. These consultations helped us set up the abovementioned preclinical studies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 2件、国際誌 9件)(*:corresponding author)

1. Miyoshi S, Tezuka T, Arimura S, Tomono T, Okada T, *Yamanashi Y. *DOK7* gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Molecular Medicine*. 2017, in press.

2. 長村文孝. ウイルスを用いたがん治療における治験に向けたガイドライン作成の取り組み. *次世代がん治療研究最前線*. 2017, 印刷中
3. Takahashi K, Igarashi T, *Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T. Improved Intravitreal AAV-Mediated Inner Retinal Gene Transduction after Surgical Internal Limiting Membrane Peeling in Cynomolgus Monkeys. *Mol Ther*. 2017, 4, 296-302.
4. Ueta R, Tezuka T, Izawa Y, Miyoshi S, Nagatoishi S, Tsumoto K, *Yamanashi Y. The carboxyl-terminal region of Dok-7 plays a key, but not essential, role in activation of muscle-specific receptor kinase MuSK and neuromuscular synapse formation. *Journal of Biochemistry*. 2016, 161, 269-77.
5. Eguchi T, Tezuka T, Miyoshi S, *Yamanashi Y. Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology. *Genes to Cells*. 2016, 21, 670-6.
6. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, *Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. 2016, 3, 15058.
7. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millan JL, Shimada T, *Okada T. Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. 2016, 3, 15059.
8. *Nagamura F. The Importance of Recruiting a Diverse Population for Stem Cell Clinical Trials. *Current Stem Cell Reports*. 2016, 2, 321-7.
9. 長村文孝. ウイルス療法ガイドライン・ガイダンスについて. *実験医学*. 2016, 34, 53-4.
10. Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, *Okada T, Takeda S. Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance. *Mol. Ther*. 2015, 236, 627-37.
11. Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, Motomura M, Yoshida N, Beeson D, Takeda S, *Yamanashi Y. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science*. 2014, 345, 1505-8.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 神経筋接合部と健康寿命, 口頭, 山梨裕司, 第19回脂質栄養シンポジウム, 2017/02/04, 国内.
2. 書処理手順の見直しによる治験開始手続きに要する日数の短縮, ポスター, 岡田美和子, 米富さつき, 武藤美和子, 金沢敬子, 長村文孝, 日本臨床試験学会, 2017/01/27, 国内.
3. AAV vector transduction strategy with MSCs-mediated immune-modulation to ameliorate neuromuscular disorders, 口頭, Okada T, The 29th Annual and International Meeting of the JAACT, Symposium (Gene therapy and cell therapy), 2016/11/12, 国内

4. Signaling in NMJ formation and a therapeutic approach, 口頭, 山梨裕司, 23rd East Asia Joint Symposium, 2016/10/19, 国外
5. アカデミア発治験薬を用いた医師主導治験（第 I 相）の TRC 業務における現状と課題, ポスター, 大和田理代, 河野美那子, 柳真志帆, 堀部恵梨佳, 蓑手沙織, 長村文孝, CRC の在り方を考える会議, 2016/09/18, 国内.
6. ARO を担う人材教育, 口頭, 長村文孝, ARO 協議会総会, 2016/08/30, 国内.
7. 神経筋シナプス形成シグナルの基礎研究を起点とする橋渡し研究, 口頭, 山梨裕司, 第 2 回日本筋学会シンポジウム, 2016/08/06, 国内
8. Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 2 回日本筋学会シンポジウム, 2016/08/06, 国内
9. Attractive characteristics of scAAV vectors and improved methods for efficient production, 口頭, Okada T, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (Technical- Seminar), 2016/7/29, 国内
10. Signaling in NMJ formation and its disorders, 口頭, 山梨裕司, 第 34 回日本骨代謝学会シンポジウム, 2016/07/23, 国内
11. 筋ジストロフィーの遺伝子細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 15 回日本再生医療学会シンポジウム, 2016/03/18, 国内
12. 神経筋シナプス形成シグナルとその制御, 口頭, 山梨裕司, 第 1 回日本筋学会シンポジウム, 2015/08/08, 国内
13. Signaling in NMJ formation and a possible therapeutic approach, 口頭, 山梨裕司, 10th Japanese-French Workshop “New advances in treatments of neuromuscular diseases: From basic to applied myology”, 2015/07/03, 国外
14. アデノ随伴ウイルスベクターを応用した細胞遺伝子治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 14 回日本再生医療学会シンポジウム, 2015/03/21, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子導入用ウイルスベクター開発の現状と今後の展望, 岡田尚巳, ヒューマンサイエンス振興財団規制動向調査班 勉強会, 2016/09/15, 国内
2. AAV ベクターを用いた遺伝子治療の現状と展望, 岡田尚巳, バイオロジクスフォーラム第 13 回学術集会, 2016/02/29, 国内
3. 臨床試験・治験はなぜ必要?, 長村文孝, 市民公開講座・東京大学医科学研究所, 2015/04/20, 国内

(4) 特許出願

(報告様式4)

【16ek0109003h0103】

平成29年5月8日

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) ALS に対する新規治療技術の創出
(英語) A new therapeutic approach for ALS

研究開発担当者 (日本語) 東京大学 医科学研究所 教授 山梨裕司
所属 役職 氏名： (英語) The Institute of Medical Science, Professor, Yuji Yamanashi

実施期間： 平成24年 7月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 霊長類を用いた研究とマウスの病態解析
開発課題名： (英語) Transduction study in non-human primates and analysis
of mice respiratory dysfunction

研究開発分担者 (日本語) 日本医科大学 教授 岡田尚巳
所属 役職 氏名： (英語) Nippon Medical School, Professor, Takashi Okada

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発分担者による報告の場合

<和文>

呼吸不全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キナーゼ MuSK によって制御されるが、本研究の開発代表者は *Dok-7* を単離し、これが 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報告した (Science,312: 1802-5,2006; Science,313: 1975-8,2006)。さらに、*Dok-7* の過剰発現がマウスの NMJ 形成を高度に増強することを報告した (Science Signal.,2: ra7,2009)。以上の背景を根拠として *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たな治療技術の創出」に繋がる可能性を検証するため、開発代表者と協力しアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた *DOK7* 遺伝子発現ベクター (AAV-D7) の投与試験を実施した。この結果、各種疾患動物モデルにおける *DOK7* 発現が、NMJ 形成不全を呈する *DOK7*-CMS マウスや常染色体優性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (AD-EDMD) マウスの NMJ 形成を増強し、運動機能・生存期間を改善することを実証した (Science, 2014)。さらにこれらの知見を踏まえた研究課題「ALS に対する NMJ 形成増強治療の開発」の分担研究「霊長類を用いた研究とマウスの病態解析」を推進し、以下の成果を得た。

- 1) マーモセット骨格筋への AAV-D7 の筋肉内投与によるヒト *DOK7* の強制発現では、投与後 6 週、もしくは、21 週におけるヒト *DOK7* の発現誘導は維持されており、顕著な発現抑制は認められなかった。また、観察した全てのサンプルにおいて当該ベクターに起因する副反応は観察されなかった。この点では、各 1 頭ずつの知見ではあるが、当該治療技術の安全性を示唆する成果と言える。
- 2) AAV-D7 による ALS マウスの呼吸を含めた運動機能の改善効果について科学的な検証を加える目的で、プレチスモグラフィーによる呼吸機能の定量的測定系を確立した。正常マウスおよび呼吸筋傷害により呼吸機能の低下が知られている筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスおよび ALS モデルマウスを用いて、測定条件の設定を行い、無拘束状態における長時間の呼気および吸気フローの安定的検出条件を確立した。これにより、幼若期からの経時的呼吸機能のモニタリングが可能となった。

<英文>

The neuromuscular junction (NMJ) has recently emerged as an attractive therapeutic target of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) that is a progressive severe neurodegenerative disorder of motor neurons with motor and respiratory dysfunction. The muscle protein Dok-7, which is originally isolated by the principal investigator, is an essential cytoplasmic activator of the muscle-specific kinase MuSK that governs the formation and maintenance of NMJs (Science,312: 1802-5,2006; Science Signal.,2: ra7,2009), and mutations in the human *DOK7* gene cause *DOK7* myasthenia, which is characterized by defective NMJ structure or NMJ synaptopathy (Science,313: 1975-8, 2006). In collaboration with the principal investigator, we previously reported that postnatal transduction of mice with an adeno-associated virus vector for *DOK7* expression (AAV-D7) enlarges NMJs (Science, 2014). In this project, non-clinical and

translational studies to develop a new therapeutic strategy for ALS were conducted. We focused on the investigation of AAV vector-mediated DOK7 transduction effects in non-human primates and mice respiratory dysfunction to obtain the results described below.

1) Forced expression of DOK7 in the common marmoset skeletal muscle transduced with AAV-D7 suggested efficient transgene expression at six and twenty-one weeks after the transduction. Importantly, robust DOK7 expression was sustained in the course of the study, whereas the adverse events related to the AAV-mediated transduction were not observed.

2) A quantitative measurement protocol of respiratory function by plethysmography to analyze the effects of AAV-D7 on respiratory dysfunction in the ALS mouse was performed. The measurement conditions were established using wild type, ALS mice, and *mdx* mice, a Duchenne muscular dystrophy model with impaired respiratory function due to respiratory muscle involvement. The stable monitoring condition of long-term exhalation and inhalation flow under the unconstrained environment was achieved by using plethysmography. The technical expertise would enable the monitoring of therapeutic effects on respiratory dysfunction in infant disease model.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 6 件）

1. Miyoshi S, Tezuka T, Arimura S, Tomono T, Okada T, *Yamanashi Y. *DOK7* gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Molecular Medicine*. 2017, in press.
2. Takahashi K, Igarashi T, *Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T. Improved Intravitreal AAV-Mediated Inner Retinal Gene Transduction after Surgical Internal Limiting Membrane Peeling in Cynomolgus Monkeys. *Mol Ther*. 2017, 4, 296-302.
3. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, *Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. 2016, 3, 15058.
4. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millan JL, Shimada T, *Okada T. Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. 2016, 3, 15059.
5. Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, *Okada T, Takeda S. Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance. *Mol. Ther*. 2015, 236, 627-37.

6. Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, Motomura M, Yoshida N, Beeson D, Takeda S, *Yamanashi Y. *DOK7* gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science*. 2014, 345, 1505-8.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. AAV ベクターを用いた遺伝子治療の現状と課題, 口頭, 岡田尚巳, 第 1 回 日本遺伝子細胞治療学会 若手研究会セミナー, 2016/12/9, 国内.
2. AAV vector transduction strategy with MSCs-mediated immune-modulation to ameliorate neuromuscular disorders, 口頭, Okada T, The 29th Annual and International Meeting of the JAACT, Symposium (Gene therapy and cell therapy), 2016/11/12, 国内.
3. Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 2 回日本筋学会シンポジウム, 2016/08/06, 国内.
4. Attractive characteristics of scAAV vectors and improved methods for efficient production, 口頭, Okada T, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (Technical- Seminar), 2016/7/29, 国内.
5. 筋ジストロフィーの遺伝子・細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016/3/18, 国内.
6. アデノ随伴ウイルスベクターを応用した細胞遺伝子治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 14 回日本再生医療学会シンポジウム, 2015/03/21, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子導入用ウイルスベクター開発の現状と今後の展望, 岡田尚巳, ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査班, 2016/9/15, 国内.
2. AAV ベクターを用いた遺伝子治療の現状と展望, 岡田尚巳, バイオロジクスフォーラム第 13 回学術集会, 2016/2/29, 国内.

(4) 特許出願

なし