

平成 26-28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 医薬品としての薬事承認申請をめざしたアンチセンス核酸による福山型筋ジストロフィー治療薬探索と非臨床試験
(英語) Search for Fukuyama type muscular dystrophy therapeutic drug and nonclinical trial with antisense nucleic acid aiming for drug regulatory approval as medicine

研究開発担当者 (日本語) 戸田 達史
所属 役職 氏名： (英語) Tatsushi Toda, Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

実施期間： 平成 26 年 6 月 2 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 動物モデルの整備とこれを用いた候補配列の薬効証明
開発課題名： (英語) Maintenance of animal models and proving the efficacy of candidate sequences using them

研究開発代表者 (日本語) 戸田 達史 神戸大学・大学院医学研究科・教授
所属 役職 氏名： (英語) Tatsushi Toda, Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 小林 千浩 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
所属 役職 氏名： (英語) Kazuhiro Kobayashi, Associate Professor, Kobe University Graduate school of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 池田 真理子 神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
所属 役職 氏名： (英語) Mariko Ikeda, Associate Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) PMDA による薬事戦略相談
開発課題名: (英語) Pharmaceutical Affairs Consultation on R&D Strategy (PMDA)

研究開発代表者 (日本語) 戸田 達史 神戸大学・大学院医学研究科・教授
所属 役職 氏名: (英語) Tatsushi Toda, Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 小林 千浩 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
所属 役職 氏名: (英語) Kazuhiro Kobayashi, Associate Professor, Kobe University Graduate school of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 池田 真理子 神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
所属 役職 氏名: (英語) Mariko Ikeda, Associate Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 高垣 和史 / 北川 英俊 日本新薬株式会社 東部創薬研究所・所長
所属 役職 氏名: (英語) Kazuchika Takagaki / Hidetoshi Kitagawa, General Manager, Discovery Research Laboratories in Tsukuba, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

分担研究 (日本語) GLP 原薬製造および GLP 試験
開発課題名: (英語) Production of API and GLP study

研究開発分担者 (日本語) 高垣 和史 / 北川 英俊 日本新薬株式会社 東部創薬研究所・所長
所属 役職 氏名: (英語) Kazuchika Takagaki / Hidetoshi Kitagawa, General Manager, Discovery Research Laboratories in Tsukuba, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

動物モデルの整備とこれを用いた候補配列の薬効証明において、動物モデルを用いた筋肉内への局所投与あるいは100 mg/kg程度の静脈内への全身投与において、20%程度のフクチンmRNAおよびタンパク質の回復を示し、さらに機能回復につながる α ジストログリカンの糖鎖修飾およびラミニン結合能の回復を実証した。膜修復分子ジスフェルリン欠損マウス sjl/sjl とフクチンレトロトランスポゾンノックインマウス $Hp/-$ を掛け合わせると筋細胞膜脆弱性が現れ、ジストロフィー病変が発現した。ヒト患者では糖鎖異常が軽症になると表現型も軽症化するため、モデルで糖鎖が軽症化すれば説明可能と考えており、この点に関してはPMDAでも了承を得ているが、この動物モデルが今後の治療実験などには表現型を呈するものとして使用しうる。

PMDA による薬事戦略相談において、FCMD 治療剤 NS-035 の「GLP 安全性試験のパッケージ」および「臨床評価方法」について薬事戦略相談を実施した。2回の事前面談の結果、対面助言は「非臨床毒性試験のパッケージ全体」についての相談とし、資料作成の方針やまとめ方を確認するとともに、毒性試験の各

項目について、論点整理が行われた。事前面談の結果を踏まえて、対面助言およびフォローアップ面談を実施し、臨床試験開始前に必要となる毒性試験パッケージを決定することが出来た。これに基づいて、オフターゲット解析を実施した。

GLP 原薬製造および GLP 試験において、GLP 試験は以下の試験を予定している。

分析： オリゴマーの理化学試験

薬物動態： 標識体合成、薬物動態試験

安全性： 一般毒性試験、遺伝毒性試験、安全性薬理試験

平成 26 年度は、薬物動態試験に用いる放射能ラベル体合成の原材料となる放射能ラベル体モノマーの合成の製造を行い、目的とする化合物を合成することができた。平成 27 年度は、平成 26 年度に合成した放射能ラベル体モノマーを原料として放射能ラベル体オリゴマーを合成し、薬物動態試験を実施した。日本新薬社内に治験原薬製造棟が完成したことにより、平成 28 年度は、GLP 原薬となるオリゴマーの製造を実施することができた。合成および精製工程は予定通りに終了し、GLP 試験実施に必要な量の GLP 原薬を確保することができた。これにより、GLP 原薬を用いた毒性試験を開始出来る準備が完了した。

In the maintenance of animal models and proving the efficacy of candidate sequences using them, we showed about 20% of fukutin mRNA and protein recovery in local administration to the muscle using an animal model or systemically administered intravenously at about 100 mg / kg, and furthermore we demonstrated a sugar chain modification of α -dystroglycan and restoration of laminin binding capacity, leading to functional recovery. Mating of membrane repair molecule dysferlin-deficient mouse sj1 / sj1 and fukutin retrotransposon knock-in mouse Hp / - showed muscle cell membrane fragility and developed dystrophic lesions. In human patients, if the abnormality of the glycosylation is mild, the phenotype also becomes mild, so we believe that therapeutic effect can be explained if the carbohydrate chain abnormality becomes mild in the model, and this point is also acknowledged by PMDA, but this animal model may be used as a phenotypic model for future treatment experiments and the like.

We held a consultation meeting with PMDA regarding a "Package for GLP toxicity studies to support an initial clinical trial" and "Methods of clinical evaluation". As a result of the meeting, we decided on the methods and criteria for off-target analysis required to start clinical trials. Based on this consultation, we performed off-target analysis.

In the first year, radiolabeled monomer was synthesized as a precursor for the synthesis of radiolabeled oligomer. In the second year, radiolabeled oligomer was synthesized from the monomer, then pharmacokinetic studies were performed on the oligomer. In the third year, GLP API production was carried out to give the API in sufficient yield.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

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 12 件)

1. Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Mohri S, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat Comm*, 2014, 5:3932.
2. Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, Katanosaka Y, Shimizu T, Sonoo M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. *Hum Mol Genet*, 2014, 23:4543-4558.
3. Kanagawa M, Lu Z, Ito C, Matsuda C, Miyake K, Toda T. Contribution of dysferlin deficiency to skeletal muscle pathology in asymptomatic and severe dystroglycanopathy models: generation of a new model for fukuyama congenital muscular dystrophy. *Plos ONE*, 2014, 9:e106721.
4. Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S'I, Toda T. Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci Rep* 2015, 5:8316.
5. Yang H, Kobayashi K, Wang S, Jiao H, Xiao J, Toda T, Wu X, Xiong H. Founder mutation causes classical Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) in Chinese patients. *Brain Dev*, 2015, pii: S0387-7604(15) 00035-2.
6. Oda T, Xiong H, Kobayashi K, Wang S, Satake W, Jiao H, Yang Y, Cha PC, Hayashi Y.K., Nishino I, Suzuki Y, Sugano S, Wu X, Toda T. A de novo mutation of the MYH7 gene in a large Chinese family with autosomal dominant myopathy. *Hum Genome Var* 2, 2015, Article number: 15022.
7. Noda Y, Sekiguchi K, Kohara N, Kanda F, Toda T. Ultrasonographic diaphragm thickness correlates with compound muscle action potential amplitude and forced vital capacity. *Muscle Nerve* 2016, 53:522-527.
8. Taniguchi-Ikeda M, Takeshima Y, Lee T, Nishiyama M, Awano H, Yagi M, Unzaki A, Nozu K, Nishio H, Matsuo M, Kurahashi H, Toda T, Morioka I, Iijima K. Next-generation sequencing discloses a nonsense mutation in the dystrophin gene from long preserved dried umbilical cord and low-level somatic mosaicism in the proband mother. *J Hum Genet* 2016, 61:351-355.
9. Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manya K, Furukawa JI, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T. Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. *Cell Rep*, 2016, 14: 2209-2223.
10. Kuwabara N, Manya H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manya K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R. Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016, 113:9280-9285.
11. Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, Toda T. Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review. *Mol Aspects Med*, 2016 51: 115-124.

12. Many H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manyu K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T. The Muscular Dystrophy Gene TMEM5 Encodes a Ribitol β 1,4-Xylosyltransferase Required for the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *J Biol Chem*. 291:24618-24627, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 福山型筋ジストロフィーの病態基盤と新たな治療法の開発, 口頭, 戸田 達史, 第 56 回日本小児神経学会学術大会, 2014/5/29 (国内)
2. 神経難病の治療と研究の現状と展望, 口頭, 戸田 達史, 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集, 2014/6/27 (国内)
3. Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. ポスター, Motoi Kanagawa, Chih-Chieh Yu, Chiyomi Ito, So-ichiro Fukada, Tomoko Chiyo, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda, Tatsushi Toda. The 13th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD) 2014/7/8 (国外)
4. A de novo mutation of the MYH7 gene in a large Chinese family with autosomal dominant myopathy. ポスター, T Toda, H Xiong, T Oda, K Kobayashi, S Wang, W Satake, H Jiao, Y Yang, Y Suzuki, S Sugano, X Wu. 19th international congress of the world muscle society, 10/8/2014 (国外)
5. 福山型筋ジストロフィー症の遺伝子治療研究, 口頭, 戸田達史, 第 3 2 回全国筋ジストロフィー大阪大会, 10/17/2014 (国内)
6. 神経・筋疾患の分子メカニズム、遺伝子治療、分子標的治療 / Molecular pathogenesis, genetic counseling, and molecular targeting therapy for neurological and muscular diseases. 口頭, 戸田達史, 日本人類遺伝学会第 59 回大会 2014/11/21 (国内)
7. α -dystroglycanopathy and molecular targeting therapy. 口頭, Tatsushi Toda, Fourth International Workshop for Glycosylation Defects in Muscular Dystrophies. 2014/4/16 (国外)
8. Recent Advances in Genetics of α -Dystroglycanopathy. 口頭, Tatsushi Toda, the 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), 2015/5/14 (国外)
9. Genomewide analysis and molecular targeting therapy for neurological diseases. 口頭, Tatsushi Toda, nature conference - Genomic Variations in Precision Medicine, 2015/5/17 (国外)
10. Use of antisense oligonucleotides in FCMD mouse models. 口頭, Tatsushi Toda, 212th ENMC International Workshop Animal models of Congenital Muscular Dystrophies. 2015/5/29 (国外)
11. Molecular pathogenesis & molecular targeting therapy for α - dystroglycanopathy, 口頭, Toda T. The 10th Japanese-French Workshop “New advances in treatments of neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology.” 2015/7/3 (国外)
12. Recent Advances in Muscular Dystrophy. 口頭, Toda T. UNIVERSITY OF WASHINGTON-KOBE UNIVERSITY SYMPOSIUM ON CELL SIGNALING, 2015/9/10 (国外)

13. 福山型筋ジストロフィー及び類縁疾患の糖鎖病態と分子標的治療. 口頭, 戸田 達史. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015/12/2 (国内)
14. 筋ジストロフィーの分子機構と治療戦略. 口頭, 戸田達史. 第 113 回日本内科学会, 2016/4/15 (国内)
15. 福山型先天性筋ジストロフィーの治療法開発. 口頭, 戸田達史. 第 57 回日本神経学会学術大会 2015/5/19 (国内)
16. Gene Therapy for Transposon Disease. 口頭, 戸田達史. 第 57 回日本神経学会学術大会 2015/5/19 (国内)
17. 福山型筋ジストロフィーをはじめとするジストログリカン異常症の分子病態と治療. 口頭, 戸田達史. 第 2 回日本筋学会学術集会 2015/8/6 (国内)
18. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. 口頭, Toda T. Warren Workshop VI 2016/8/26 (国内)
19. Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy, 口頭, Toda T, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Wada Y, Endo T. 21st WMS congress 2016/10/5 (国外)
20. Identification of a Post-Translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. ポスター, Toda T, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Wada Y, Endo T. 141st Annual Meeting of the American Neurological Association, 2016/10/17 (国外)
21. Identification of a Post-Translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. ポスター, Toda T, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Wada Y, Endo T. The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2016/10/21 (国外)
22. Genome-wide Analysis and Molecular Targeting Therapy for Neuro-Muscular disease. 口頭, Toda T. 2016 Taiwan-Japan Joint Conference on Genomic Studies and Annual Retreat of Taiwan Genomics and Genetics Society. 2016/12/16 (国外)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願