

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業等）
総括研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基礎的研究

主任研究者 武田 伸一 国立精神・神経センター 神経研究所 室長

研究要旨

1. 3.7 kb ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを *mdx* マウスに導入し発現を確認した。
2. *mdx* マウス骨格筋における内因性ユートロフィンの発現増強と表現型の改善に成功した。
3. 細胞性免疫を強く抑制するサイトカイン cDNA を投与すると、抗体産生の抑制に伴って導入遺伝子発現の増強が認められたが持続期間は短かった。この原因の一つにサイトカイン用ベクター中の ISS 配列がサイトカイン作用と逆に働いている可能性が考えられた。
4. 我が国で、筋ジストロフィー犬のキャリアが得られたが、その飼育には克服すべき課題が多数存在し、専任の飼育者を必要とすると考えられた。
5. α 1-syntrophin の欠損及び、nNOS の筋鞘からの消失だけでは、筋変性を生じないことを明らかにした。
6. laminin α 2 chain の完全な欠損により、末梢神経の髄鞘に異常を生ずることを明らかにした。

分担研究者

山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科 教授
桒中征哉 国立精神・神経センター 武蔵病院
院長

A. 研究目的

X染色体連鎖性劣性の遺伝形式をとり、重症の遺伝病である DMD は、発症頻度が高いが（出生男児 3,500 人に 1 人）、母体の卵細胞における突然変異が多い（発症者の約 3 分の 1）ため、遺伝相談が必ずしも有効ではない。患者家族団体からの強い要請がある他、社会的にも遺伝子治療の実現が待ち望まれている。特に、生命予後にとって最も重要な呼吸筋、あるいは周囲との接触のために重要な手指筋についてであっても、遺伝子導入によって機能を保持することができれば、患者の QOL の向上に結びつく。

しかし、DMD の欠損蛋白ジストロフィン膜関連細胞骨格蛋白であり、DMD で障害されている骨格筋および心筋は非分裂細胞から構成されている。従って、本疾患に対する遺伝子治療では、全身的に遺伝子を導入し、特定の組織まで遺伝子を誘導して導入産物を発現させ、しかも細胞内の構造の一部に取り込ませるか、或いは内在性の遺伝子発現を誘導する必要が出てくる。この治療は、非分裂細胞から成る神経組織に遺伝子を発現させることが必要な、中枢神経系の変性疾患に対する遺伝子治療のモデルとなりうる。

一方、先天的に欠損している分子を遺伝子治療法によって生体内に発現させた場合、宿主の免疫

系はそれを異物とみなし排除する方向に働く。遺伝子治療法は免疫学的反応を制御する方法が確立されてはじめて有効な治療法として定着する。そこで欠損遺伝子のモデルとして β -ガラクトシダーゼ (*b-gal*) 遺伝子 (*lacZ*) や蛋白抗原 (*CriI*) を、また免疫反応を制御する因子として種々サイトカイン遺伝子や免疫制御 DNA を選び、免疫応答への効果を検討した。また導入遺伝子のキャリアーとしての筋前駆細胞を単離することを目的に骨髄中の前駆細胞を認識する抗体の作成を試みた。

更に、筋ジストロフィーに対して、遺伝子治療法を中心とする新たな治療法を開発するためには、モデル動物の研究を欠かすことができない。現在は、主として、*mdx* マウスが用いられているが、小型で横隔膜以外は進行性が目立たないために、治療モデルとして研究を継続するには限界がある。一方、新たな治療のアイデアを得るためには、これまで以上に病態の解明のための研究を進める必要があり、そのためにはジストロフィン複合体に含まれる分子あるいは、複合体に関連を持つ分子について、遺伝子ターゲティングマウスを作製し、そのマウスの表現型を検討することで、筋ジストロフィーの病態を更に明らかにすることが、新たな着想に結びつくものと考えられる。

そこで、以下のような具体的な研究目的を掲げて研究を進めることにした。

1. これまで進めてきた第 1 世代のアデノウイルスベクターに加えて、guttled アデノウイルスベクターおよび AAV ベクターを用い、骨格筋における効率の高い、遺伝子導入法を確立する。また、

mdx マウス骨格筋にアデノウイルスベクターを感染させた際の組織の変化を組織学的、免疫組織学的に詳細に検討する。

2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導

a: 導入遺伝子産物に対する免疫応答、特に抗体応答を定量的に解析する。

b: 導入遺伝子産物に対する液性免疫応答（抗体産生）を、サイトカインDNA投与により制御する方法を確立する。

c: 外来性遺伝子産物に対する細胞性免疫応答の機序を明らかにし、それを制御する方法を確立する。

3. 筋ジストロフィーのモデル動物としての筋ジストロフィー犬の評価を行う。更に、筋ジストロフィーのモデル動物として、遺伝子ターゲティングの手法を用いて、 $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスと laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスを作製し、それぞれのマウスの表現型をくまなく明らかにすることで、それぞれの分子の発現と機能と筋ジストロフィーの関連を明らかにし、新たな治療法の道を探る。

B. 研究方法

1. ジストロフィン遺伝子の骨格筋への導入(武田)

a: ピッツバーグ大の Dr.Xiao らとの共同研究にて、3.7kb ジストロフィン遺伝子を CMV プロモーターあるいは RSV プロモーターの支配下で発現する3種類の AAV ベクターを作製した。これらを培養骨格筋細胞並びに成熟/新生児 *mdx* マウスの骨格筋に導入し、その発現を調べた。

b: 全長型ジストロフィン遺伝子 (14kb) を組み換えた gutted アデノウイルスベクターの作製し、培養骨格筋細胞、成熟*mdx*マウス骨格筋、新生児 *mdx*マウス骨格筋に対して導入し、その効果を検討する。

c. LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター AxCALacZ を新生児期 *mdx* マウスの前脛骨筋に導入し、骨格筋の組織像の変化を、経時的に組織学的、免疫組織学的検討を行った。

2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導(山元)

a. lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスをマウス前脛骨筋内投与し、b-gal を発現させた。

b.細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、並びに IL12 の p40 鎖 cDNA を発現プラスミドに組み、対側筋肉内に投与した。

c. プラスミド投与後 2-4 週目に採血し、血中抗体価を ELISA 法にて測定した。

d. 免疫応答を制御するとされる DNA(ISS) 配列の

効果を調べるために、蛋白抗原 (CriJ) を ISS と共にマウスに投与し、抗体価を計測した。

e. 筋前駆細胞を同定する抗体を作成するために、C2C12 筋芽細胞由来 C2/4 株をラットに免疫して細胞融合し、C2/4 反応性でかつ正常脾細胞に反応しないモノクロナル抗体を選んだ。

3. 筋ジストロフィー治療モデル動物の開発(埜中、武田)

a. 筋ジストロフィー犬について、既にそのコロニーを設立している米国の Dr.Komegy のグループ及びオーストラリアの Mardock University の Dr. Howell のグループと密接な連絡をとり、情報を収集する。

b. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを作製し、その表現型を検討した。特に、 $\alpha 1$ -syntrophin と結合するとされる neuronal type の nitric oxide synthase (nNOS) の発現について、組織学的、生化学的に詳細に検討した。

c. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスの脊髄、末梢神経について、形態学的、生化学的、生理学的な検討を行った。

C. 研究成果

1. ジストロフィン遺伝子の骨格筋への導入

a. AAV ベクターに関しては、3.7 kbジストロフィン遺伝子を RSV プロモーターあるいは、CMV プロモーターの支配下で発現させることが可能な3種類の AAV ベクターを作製した。骨格筋培養細胞に対する *in vitro* 遺伝子導入においては、アデノウイルスを共に感染させることにより、一本鎖 DNAが二本鎖 DNA に変換され、想定されたサイズのジストロフィン (125 kDa) が転写・翻訳されることを確認した。一方、成熟期 *mdx* マウス骨格筋に *in vivo* 遺伝子導入したところ、2週過ぎからわずかに、また4週後から確実に小型ジストロフィンが発現することを見出した。その発現は、8週後、12週後でも、筋鞘に維持されていた。組換えた AAV ベクターの中では、CMV プロモーターの場合に最も高い発現結果を得た。AAVベクターについては、導入遺伝子が染色体に integrate されることにより長期に渡る発現が期待されるため、3.7 kb ジストロフィン遺伝子の長期発現効果について、検討を行っている。

b. 全長型ジストロフィン遺伝子 (12kb) および LacZ遺伝子を組み込んだ gutted アデノウイルスベクターを作製し、培養骨格筋細胞に導入した。しかし、 β -galactosidase の発現は確認できたものの、

ジストロフィンの発現を確認することはできなかった。

c. AxCALacZ を新生児期 *mdx* マウス骨格筋に導入したところ、LacZ 遺伝子が発現した領域では、筋ジストロフィーの表現型が改善することを見出した。即ち、*mdx* マウス骨格筋では、生後 2 週前後から筋変性を生じ、変性線維は中心核を持つ再生線維によって置き換えられる。ところが、LacZ 遺伝子が発現した領域では、変性線維も少なく、中心核線維の比率についても、LacZ 遺伝子が発現していない領域に比べて大きく減少していた。LacZ 遺伝子が発現した領域では骨格筋の permeability 障害の指標である Evans Blue の取り込みも見出されなかった。しかも、AxCALacZ 導入後 1 週頃から、筋鞘でユートロフィンの発現増強が観察された。このユートロフィン発現の増強と表現型の改善は、FK506 または抗 CD4 抗体を、予めマウスに投与することで消失した。

2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導

a. 正常マウス筋肉内での lac-Z 遺伝子発現は、2 週目で減弱する傾向が認められたが、IL10 もしくは IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを投与した時、b-gal 発現量は高値を示し、また筋組織中の b-gal 陽性筋細胞は対照群に比べ多数認められた。

b. IL4、IL10、IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを投与したマウスの血清中の抗 b-gal 抗体量を測定したところ、投与後早期ではいずれの群でも抗体産生量が減弱しており、筋肉内での b-gal の高発現を反映した。しかし時間経過と共に抗体価は上昇し、筋肉内での b-gal 発現量はそれに伴い減少した。

c. 抗体価が上昇する理由を明らかにするために、ベクター中に存在する免疫応答制御配列 ISS の役割を調べるために、蛋白抗原 (CriJ) に対する抗体価を測定したところ、ISS 部分配列が抗体産生増強の原因であることが明らかになった。

d. C2/4 細胞に反応性を有し、かつ正常マウス脾細胞には反応しないモノクロナル抗体 3 種を得た。C2/4 に対し最も強い反応性を示す抗体は、骨髄中の付着性細胞の一部にも反応性を示した。

3. 筋ジストロフィー治療モデル動物の開発

a. 既に、米国の Dr.Kornegy のグループから、筋ジストロフィー発症犬 (雄) (ゴールデンレトリバー種) の精子を持ち帰り、実験動物中央研究所に委託して、ビーグル犬に人工授精を進めていたが、ごく最近、筋ジストロフィー犬キャリア (雌)

を得たとの知らせがもたらされた。同じく、筋ジストロフィー犬のコロニーを樹立しているオーストラリアのグループについて、視察を行ったところ、筋ジストロフィー発症犬は、誕生直後から、嚔下に制限があるため、授乳及び食餌の摂取について完全な介助が必要であることが判明した。

b. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損していた。 $\alpha 1$ -syntrophin の欠損に伴って、neuronal type の Nitric Oxide synthase (nNOS) の発現が形質膜から欠損したが、NO に対する筋収縮特性は保持され、組織学的にも骨格筋には異常は検出されなかった。

c. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスの脊髄では、laminin $\alpha 2$ chain が全く発現していないにも拘わらず、*dy* マウスの前根に見出されるような amyelination 構造 (髄鞘の形成されていない大径線維の集簇) が観察されないことが明らかになった。一方、同マウスの末梢神経では、有髄神経直径の分布に異常があり、大径線維の脱落を反映して、末梢神経伝導速度が遅延していた。

D. 考察

1. ジストロフィン遺伝子の骨格筋への導入

我々の作製した gutted アデノウイルスベクターでは、ジストロフィンの発現が確認できなかったが、これはウイルスを増殖させる際にジストロフィン遺伝子に組換えを生じた可能性があり、今後原因を確認する必要がある。

AAV ベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子が染色体に組み込まれることにより長期発現が期待される。今後 3.7 kb ジストロフィン遺伝子を長期発現させることにより、筋ジストロフィーの表現型の改善があるかどうか検討したい。

AxCALacZ の感染した骨格筋では、免疫反応の起こる中でユートロフィンが過剰発現し、ジストロフィー性変化から筋線維が保護されたと考えられる。ユートロフィンは、筋再生の過程でも、その発現が見出されることがあるが、今回、数多くの筋再生のマーカーについて、検討した所、アデノウイルスベクターの導入によるユートロフィンの発現の増強は筋再生に伴う二次的な現象とは異なることが判明した。今後、ユートロフィン発現増強の機序について詳細に検討し、筋ジストロフィーの治療への応用を検討したい。

2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導

導入遺伝子産物に対する免疫応答を制御する目的で、導入遺伝子モデルとして lac-Z を組み込んだアデノウイルスベクターを用い、またそれに対

する免疫応答を制御する目的で、細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを反対側の筋肉内に投与した。筋肉内での b-gal 発現は、サイトカイン遺伝子を反対側に投与しておくことによって発現の増強と延長が認められた。しかし4週以降その発現は減少した。こうした経過と血中抗体価とは逆相関的に変動し、血中抗体を誘導する機能（すなわち Th1 型免疫応答）が発現抑制に関与することが示唆された。サイトカイン発現ベクター中には Th1 型免疫応答を増強する配列 (ISS配列) の存在が最近報告されたため、ISS 単独の効果を調べたところ、ISS 存在下で抗体応答が増強されることが判った。すなわちサイトカイン遺伝子発現が外来遺伝子発現に対して抑制的に働くが、時間経過と共にサイトカイン用ベクター中の ISS が逆にサイトカイン機能を打ち消す可能性が示唆された。今後 ISS 配列を持たないベクターの構築が必要とされる。

筋肉内で目的の遺伝子を発現させる方法の一つとして、筋前駆細胞を用いる方法が考えられる。そこで骨髄中の前駆細胞の濃縮効率を上げる目的で3種のモノクロナル抗体を得た。現時点で、筋前駆細胞特異的であるかどうか現時点では不明であるが、今後組織化学的手法による筋衛星細胞への反応性、骨髄中の抗体反応性細胞の同定、さらには抗体が認識する分子の同定をおし進めていく予定である。

3. 筋ジストロフィー治療モデル動物の開発

我が国においても、筋ジストロフィー犬のキャリア犬が得られたことから、コロニーの樹立に向けて、着実な一歩が記されたと言える。しかし、今回、筋ジストロフィー犬の飼育に非常に大きな障害が存在することが判明したことから、筋ジストロフィー犬は、専任の獣医師及び動物看護師などにより、極めて厳重に飼育・維持される必要があることも明らかになった。しかも、その施設は、実際に治療実験を行う研究者のごく近隣に置かれる必要がある。

$\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損し、nNOS の発現もまた、筋鞘から消失しているにも拘わらず、骨格筋の NO に対する収縮特性は維持されていたことから、細胞質分画の nNOS がその役割を担っていることが考えられた。一方、筋鞘における nNOS の役割は未だ明らかではないが、現在、 $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを用いた筋再生実験を進めているので、その機能を更に明らかに

したいと考えている。

laminin $\alpha 2$ chain が欠損することで、末梢神経・髄鞘の形態学的、生理学的な異常を来すことを始めて明らかにすることができた。しかし、laminin $\alpha 2$ chain の partial な欠損である dy マウスで何故、amyelination を生ずるのかは不明であり、今後の課題である。

E. 結論

1. 全長型ジストロフィン遺伝子 (12kb) および LacZ 遺伝子を組み込んだ gutted アデノウイルスベクターの作製を試みたが、現在のところ完成していない。3.7 kb ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを *mdx* マウス骨格筋に導入し、その発現を確認した。
2. *mdx* マウス骨格筋における内因性ユートロフィンの発現増強と表現型の改善に成功した。
3. 細胞性免疫を強く抑制するサイトカイン cDNA を投与すると、抗体産生の抑制に伴って導入遺伝子発現の増強が認められたが持続期間は短かった。この原因の一つにサイトカイン用ベクター中の ISS 配列がサイトカイン作用と逆に働いている可能性が考えられた。ISS 配列を持たないベクターにサイトカイン遺伝子を組み込むことが必要である。
4. C2/4 筋芽細胞反応性モノクロナル抗体を得た。
5. 我が国で、筋ジストロフィー犬のキャリアが得られたが、その飼育には克服すべき課題が多数存在し、専任の飼育者を必要とすると考えられた。
6. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスの骨格筋を解析し、 $\alpha 1$ -syntrophin の欠損及び、nNOS の筋鞘からの消失だけでは、筋変性を生じないことを明らかにした。
7. laminin $\alpha 2$ chain の完全な欠損により、末梢神経の髄鞘に、形態学的、生理学的な異常を生ずることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto K, et al.: A pedigree analysis with minimizing ascertainment bias reveals anticipation in Met30-transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy
J Med Genet 35: 23-30, 1998
2. Qu Y, et al.: Differential expression of Notch genes in the neurogenesis of mouse embryos
Oral Med Pathol 3:21-28, 1998

3. Suzuki M, et al.: Molecular cloning of chick Nau gene and analysis of its expression patterns during neurogenesis
I Med Dent Sci 45: 1-9, 1998
4. Yuasa K, et al. :
Effective restoration of dystrophin-associated proteins *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA
FEBS Letters 425: 329-336, 1998
5. Sakamoto K, et al. : Ectopic expression of lunatic Fringe leads to downregulation of Serrate-1 in the developing chick neural tubes; analysis using *in ovo* electroporation transfection technique
FEBS Letters 426: 337-341, 1998
6. Yoshida K, et al. : Insertional mutation by transposable element, L1, in the DMD gene results in X-linked dilated cardiomyopathy
Hum Mol Genet 7: 1129-1132, 1998
7. Hagiwara Y, et al. : Fiber-type-dependent expression of adenovirus-mediated transgene in mouse skeletal muscle fibers
Acta Neuropathol (Berl) 96: 228-232, 1998
8. Kameya S, et al. : α 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric oxide synthase at the sarcolemma, but does not induce muscle degeneration
J Biol Chem 274: 2193-2200, 1999
9. Nakamura A, et al. : A novel Sac I RFLP in the 3' untranslated region of the myotonin protein kinase gene
J Human Genetics (in press)
10. Ishii A, et al.: Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle
Muscle Nerve (in press)
11. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究—アデノウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入の有用性—生体の科学 49: 68-74, 1998.
12. 武田伸一：遺伝子治療、筋ジストロフィーは
ここまでわかった Part 2、筋ジストロフィー研究連絡協議会、pp205-216, 1999
13. Yoshida, Y. et al: Antitumor effect of human pancreatic cancer cells transduced with cytokine genes which activate Th1 helper T cells. Anti-cancer Res. 18:333-336, 1998.
14. Kawamura, N. et al: Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse T cell subsets. NeuroImmunoModulation 5:9-15, 1998.
15. Iimori, H. et al: Lateral hypothalamus modulates the intrinsic splenic NK cell activity in rats. NeuroImmunoModulation, 5:221-225, 1998.
16. Miyazawa, H. et al: Structure and promoter region of the surface membrane protein HS9 gene expressed on the thymic epithelial cells.
B.B.A. (印刷中) 1999.
17. Tasaki, K. et al: Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of IL12 or IL18 which activate Th1 helper T cells. Can. Gene Therapy (印刷中) 1999.
18. Kawakami, N. et al: Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the thymus. J. Immunol. (印刷中) 1999.
19. Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M: Distal myopathy with rimmed vacuoles. Neuromuscul Disord 8:333-337, 1998
20. Nonaka I: Animal models of muscular dystrophies. Lab Animal Sci 48:8-17, 1998.
21. Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). Hum Genet 103:323-327, 1998
22. Nishino I, Minami N, Nonaka I, et al: MTM1 gene mutations in Japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. Neuromuscul Disord 8:453-458, 1998
23. Kubo S, Tsukahara T, Nonaka I, et al: Presence of

emerinopathy in cases of rigid spine syndrome.
Neuromuscul Disord 8:502-507. 1998

24. Makino M, Horai S, Yu-ichi Goto Nonaka I:
Confirmation that a T-to-C mutation at 9176 in
mitochondrial DNA is an additional candidate mutation
for Leigh's syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:149-151,
1998

25. Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: An
ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type
congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392,
1998

学会発表

1. Yamamoto, K., et al.: Effective restoration of
dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-
mediated transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA.
1st Annual Meeting of the American Society of Gene
Therapy. Seattle, USA, 1998

2. Takeda, S., et al.: Improvement of the dystrophic
phenotype of mdx mice by adenovirus-mediated gene
transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA. The 4th
Annual Meeting 1998 The Japan Society of Gene
Therapy. Tokyo, 1998

3. Miyagoe, Y., et al.: Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant
mice by targeted disruption of the lama2 gene. IX
International Congress on Neuromuscular Diseases.
Adelaide, Australia, 1998

4. Takeda, S.: Adenovirus-mediated gene transfer of 3.7
kb truncated dystrophin cDNA into mdx skeletal
muscle. Symposium in IX International Congress on
Neuromuscular Diseases. Adelaide, Australia, 1998

5. Takeda, S.: Dystrophin and its isoforms. Workshop
in IX International Congress on Neuromuscular
Diseases. Adelaide, Australia, 1998

6. 湯浅勝敏 他: アデノ随伴ウイルス (AAV) ベク
ターを用いたmdxマウス骨格筋へのロッド短縮型
ジストロフィンの遺伝子導入 第21回日本分子生
物学会年会 1998

7. 西澤史子他: GFP標識マウス由来血液幹細胞を
用いた胸腺内T細胞初期分化 日本薬学会 1998

8. 山元 弘他: サイトカイン cDNA 移入法による
免疫応答の制御の試み 日本薬学会 1998

9. 岩尾睦美他: 胸腺細胞の発達におけるメロシンの
機能的意義 8th Kyoto T Cell Conference 1998

10. 深田宗一朗他: 胸腺細胞の発達・分化における
メロシンの役割 日本薬学会近畿支部大会 1998

11. 川上直人他: GFPマウス胎児肝細胞を用いた胸
腺への細胞移行分子 日本免疫学会 1998

12. 岩尾睦美他: ラミニン $\alpha 2$ 鎖遺伝子欠損マウスに
認められる胸腺細胞の発達異常の解析 日本免疫学
会 1998

13. 滝沢綾子他: マウスT細胞におけるNPY受容体
サブタイプの発現 日本免疫学会 1998

14. 飯森洋史他: 外側視床下部によるNK活性の調
節 日本免疫学会 1998

15. 宮澤仁志他: マウスH S 9 遺伝子の転写制御領
域の解析 日本分子生物学会 1998

16. 辻川和丈他: 受容体型チロシンホスファターゼ
LARによるインスリンレセプターのチロシン脱
リン酸化機構 日本分子生物学会年会 1998

17. 一條智子他: 受容体型チロシンホスファターゼ
LARによるFynのチロシン脱リン酸化 日本分子
生物学会年会 1998

18. 中川雅裕 他: ラミニン $\alpha 2$ 鎖ノックアウトマウ
スの末梢神経におけるラミニンとインテグリン
分子の発現解析 第21回日本分子生物学会年会 横
浜; 1998年12月16-19日

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基盤的研究

分担研究者 武田 伸一 国立精神・神経センター 神経研究所

研究要旨

1. 3.7 kb 小型ジストロフィン遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作製して、*mdx* マウス骨格筋に導入し、長期間の発現が可能であることを見出した。
2. アデノウイルスベクターの導入により *mdx* マウス骨格筋における内因性ユートロフィンの発現増強により、筋ジストロフィーの表現型が改善することを見出した。
3. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを作製し、neuronal type nitric oxide synthase (NOS-1) の形質膜における発現にとって、 $\alpha 1$ -syntrophin が重要であることを始めて *in vivo* で明らかにした。

A. 研究目的

1. これまで進めてきた第1世代のアデノウイルスベクターに加えて、guttred アデノウイルスベクターおよび AAV ベクターを用い、骨格筋における効率の高い、遺伝子導入法を確立する。
2. *mdx* マウス骨格筋にアデノウイルスベクターを感染させた際の組織の変化を組織学的、免疫組織学的に詳細に検討する。
3. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを作製し、同分子の *in vivo* における役割を明らかにする。

B. 研究方法

1. 全長型ジストロフィン遺伝子 (12kb) および LacZ 遺伝子を組み込んだ gutted アデノウイルスベクターの作製し、培養骨格筋細胞に導入した。
2. ピッツバーグ大の Dr.Xiao らとの共同研究にて、3.7kb ジストロフィン遺伝子を CMV プロモーターあるいは RSV プロモーターの支配下で発現する3種類の AAV ベクターを作製した。これらを培養骨格筋細胞並びに成熟/新生児 *mdx* マウスの骨格筋に導入し、その発現を調べた。
3. LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター AxCALacZ を新生児期 *mdx* マウスの前脛骨筋に導入し、骨格筋の組織像の変化を、経時的に組織学的、免疫組織学的検討を行った。
4. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを作製し、その表現型を検討した。特に、 $\alpha 1$ -syntrophin と結合するとされる neuronal type の nitric oxide synthase (nNOS) の発現について、組織学的、生化学的に詳細に検討した。

C. 研究結果

1. 全長型ジストロフィン遺伝子 (12kb) および LacZ 遺伝子を組み込んだ gutted アデノウイルスベクターを作製し、培養骨格筋細胞に導入した。しかし、 β -galactosidase の発現は確認できたものの、ジストロフィンの発現を確認することはできなかった。
2. AAVベクターを用いた *in vitro* 遺伝子導入で、アデノウイルスを共に感染させることにより、想定されたサイズのジストロフィン (125 kDa) の転写・翻訳を確認した。また、成熟期 *mdx* マウス骨格筋 *in vivo* への導入では、2 週間からわずかに、4 週間から確実に小型ジストロフィンが発現した。その発現は、8 週間、12 週間でも、筋鞘に維持されていた。組換えた AAV ベクターの中では、CMV プロモーターの場合に最も高い発現結果を得た。
3. AxCALacZ を新生児期 *mdx* マウス骨格筋に感染させると、 β -galactosidase を発現した領域を中心として、変性線維と中心核線維が減少していた。また感染領域で、ジストロフィー性変化に伴う筋鞘の透過性亢進が軽減した。同部位を詳細に観察すると、AxCALacZ 導入された部分の筋鞘でユートロフィンの発現増強が観察された。このユートロフィン発現の増強と表現型の改善は、FK506 または抗 CD4 抗体を、予めマウスに投与することで消失した。
4. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損していた。 $\alpha 1$ -syntrophin の欠損に伴って、neuronal type の Nitric Oxide synthase (nNOS) の発現が形質膜から欠損したが、NO に対する筋収縮特性は保持され、組織学的にも骨格筋には異常は検出されなかった。

D. 考察

1. 我々の作製した gutted アデノウイルスベクターでは、ジストロフィンの発現が確認できなかったが、これはウイルスを増殖させる際にジストロフィン遺伝子に組換えを生じた可能性があり、今後原因を確認する必要がある。

2. AAV ベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子が染色体に組み込まれることにより長期発現が期待される。今後 3.7 kb ジストロフィン遺伝子を長期発現させることにより、筋ジストロフィーの表現型の改善があるかどうか検討したい。

3. AxCALacZ の感染した骨格筋では、免疫反応の起こる中でユートロフィンが過剰発現し、ジストロフィー性変化から筋線維が保護されたと考えられる。ユートロフィンは、筋再生の過程でも、その発現が見出されることがあるが、今回、数多くの筋再生のマーカーについて、検討した所、アデノウイルスベクターの導入によるユートロフィンの発現の増強は筋再生に伴う二次的な現象とは異なることが判明した。今後、ユートロフィン発現増強の機序について詳細に検討し、筋ジストロフィーの治療への応用を検討したい。

4. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損し、nNOS の発現もまた、筋鞘から消失しているにも拘わらず、骨格筋の NO に対する収縮特性は維持されていたことから、細胞質分画の nNOS がその役割を担っていることが考えられた。一方、筋鞘における nNOS の役割は、未だ明らかではないが、現在、 $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを用いた筋再生実験を進めており、その機能を更に明らかにしたいと考えている。

E. 結論

1. 全長型ジストロフィン遺伝子 (12kb) および LacZ 遺伝子を組み込んだ gutted アデノウイルスベクターの作製を試みたが、現在のところ完成していない。3.7 kb ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを mdx マウス骨格筋に導入し、その発現を確認した。

2. mdx マウス骨格筋における内因性ユートロフィンの発現増強と表現型の改善に成功した。

3. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを作製し、neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) の形質膜における発現にとって、 $\alpha 1$ -syntrophin が重要であることを始めて明らかにすることができた。

F. 研究発表

論文発表

1. Yuasa, K., Miyagoe, Y., Yamamoto, K., Nabeshima, Y., Dickson, G. & Takeda, S. Effective restoration of dystrophin-associated proteins *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA. *FEBS Letters* 425: 329-336, 1998

2. Hagiwara Y, Ishii A, Nonaka I, Kikuchi T and Takeda S : Fiber-type-dependent expression of adenovirus-mediated transgene in mouse skeletal muscle fibers. *Acta Neuropathol (Berl)* 96: 228-232, 1998

3. Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K., Nabeshima, Y., & Takeda, S. $\alpha 1$ -syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric oxide synthase at the sarcolemma, but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274: 2193-2200, 1999

4. Ishii A, Hagiwara Y, Saito Y, Yamamoto K, Yuasa Y, Sato Y, Arahata K, Shoji S, Nonaka I, Saito I, Nabeshima Y & Takeda S, Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* (in press)

5. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究—アデノウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入の有用性—*生体の科学* 49: 68-74, 1998.

学会発表

1. Yamamoto, K., et al.: Effective restoration of dystrophin-associated proteins *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA. 1st Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. Seattle, USA, 1998

2. Miyagoe, Y., et al.: Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant mice by targeted disruption of the lama2 gene. IX International Congress on Neuromuscular Diseases. Adelaide, Australia, 1998

3. Takeda, S.: Adenovirus-mediated gene transfer of 3.7 kb truncated dystrophin cDNA into mdx skeletal muscle. Symposium in IX International Congress on Neuromuscular Diseases. Adelaide, Australia, 1998

4. Takeda, S.: Dystrophin and its isoforms. Workshop in IX International Congress on Neuromuscular Diseases. Adelaide, Australia, 1998

5. 湯浅勝敏 他: アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた mdx マウス骨格筋へのロッド短縮型ジストロフィンの遺伝子導入 第21回日本分子生物学会年会 1998

分担研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基礎的研究

分担研究者 山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科

研究要旨 導入される遺伝子産物に対する免疫反応の細胞性機序を明らかにし、これを人為的に制御する方法を開発することを目的とする。サイトカイン遺伝子を投与することによって、モデル抗原遺伝子産物の発現の延長が認められた。この原因の一つに、特異的抗体応答の抑制が確認できた。ある種のDNAは、抗体産生を増強することが確認できた。さらに、導入遺伝子のキャリアーとしての筋前駆細胞を単離することを目的に骨髄中の前駆細胞を認識する抗体の作成を試みた。

分担研究者 山元 弘
大阪大学大学院薬学研究科
教授

して細胞融合し、c2/4 反応性でかつ正常脾細胞に反応しないモノクロナル抗体を選んだ。

A. 研究目的

先天的に欠損している分子を遺伝子治療法によって生体内に発現させた場合、宿主の免疫系はそれを異物とみなし排除する方向に働く。遺伝子治療法は免疫学的反応を制御する方法が確立されてはじめて有効な治療法として定着する。そこで欠損遺伝子のモデルとしてβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) 遺伝子 (lacZ) や蛋白抗原 (CriJ) を、また免疫反応を制御する因子として種々サイトカイン遺伝子や免疫制御DNAを選び、免疫応答への効果を検討した。また導入遺伝子のキャリアーとしての筋前駆細胞を単離することを目的に骨髄中の前駆細胞を認識する抗体の作成を試みた。

B. 研究方法

1. lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスをマウス前けい骨筋内投与し、β-gal を発現させた。
2. 細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、並びに IL12 の p40 鎖 cDNA を発現プラスミドに組み、対側筋肉内に投与した。
3. プラスミド投与後2-4週目に採血し、血中抗体価をELISA法にて測定した。
4. 免疫応答を制御するとされるDNA (ISS) 配列の効果調べるために、蛋白抗原 (CriJ) をISSと共にマウスに投与し、抗体価を計測した。
5. 筋前駆細胞を同定する抗体を作成するために、c2c12 筋芽細胞由来 c2/4 株をラットに免疫

C. 研究成果

1. 正常マウス筋肉内での lac-Z 遺伝子発現は、2週目で減弱する傾向が認められたが、IL10 もしくは IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを投与した時、β-gal 発現量は高値を示し、また筋組織中の β-gal 陽性筋細胞は対照群に比べ多数認められた。
2. IL4、IL10、IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを投与したマウスの血清中の抗 β-gal 抗体量を測定したところ、投与後早期ではいずれの群でも抗体産生量が減弱しており、筋肉内での β-gal の高発現を反映した。しかし時間経過と共に抗体価は上昇し、筋肉内での β-gal 発現量はそれに伴い減少した。
3. 抗体価が上昇する理由を明らかにするために、ベクター中に存在する免疫応答制御配列 ISS の役割を調べるために、蛋白抗原 (CriJ) に対する抗体価を測定したところ、ISS 部分配列が抗体産生増強の原因であることが明らかになった。
4. c2/4 細胞に反応性を有し、かつ正常マウス脾細胞には反応しないモノクロナル抗体3種を得た。c2/4 に対し最も強い反応性を示す抗体は、骨髄中の付着性細胞の一部にも反応性を示した。

D. 考察

導入遺伝子産物に対する免疫応答を制御する目的で、導入遺伝子モデルとして lac-Z を組み込んだアデノウイルスベクターを用い、またそれに対

する免疫応答を制御する目的で、細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、IL12p40 鎖遺伝子発現ベクターを反対側の筋肉内に投与した。筋肉内での β -gal 発現は、サイトカイン遺伝子を反対側に投与しておくことによって発現の増強と延長が認められた。しかし4週以降その発現は減少した。こうした経過と血中抗体価とは逆相関的に変動し、血中抗体を誘導する機能（すなわち Th1 型免疫応答）が発現抑制に関与することが示唆された。サイトカイン発現ベクター中には Th1 型免疫応答を増強する配列 (ISS 配列) の存在が最近報告されたため、ISS 単独の効果を調べたところ、ISS 存在下で抗体応答が増強されることが判った。すなわちサイトカイン遺伝子発現が外来遺伝子発現に対して抑制的に働くが、時間経過と共にサイトカイン用ベクター中の ISS が逆にサイトカイン機能を打ち消す可能性が示唆された。今後 ISS 配列を持たないベクターの構築が必要とされる。

筋肉内で目的の遺伝子を発現させる方法の一つとして、筋前駆細胞を用いる方法が考えられる。そこで骨髄中の前駆細胞の濃縮効率を上げる目的で3種のモノクロナル抗体を得た。現時点で、筋前駆細胞特異的であるかどうか現時点では不明であるが、今後組織化学的手法による筋衛星細胞への反応性、骨髄中の抗体反応性細胞の同定、さらには抗体が認識する分子の同定をおし進めていく予定である。

E. 結論

細胞性免疫を強く抑制するサイトカイン cDNA を投与すると、抗体産生の抑制に伴って導入遺伝子発現の増強が認められたが持続期間は短かった。この原因の一つにサイトカイン用ベクター中の ISS 配列がサイトカイン作用と逆に働いている可能性が考えられた。ISS 配列を持たないベクターにサイトカイン遺伝子を組み込むことが必要である。C2/4 筋芽細胞反応性モノクロナル抗体を得た。

F. 研究発表

論文発表

1. Yoshida, Y. et al: Antitumor effect of human pancreatic cancer cells transduced with cytokine genes which activate Th1 helper T cells. *Anti-cancer Res.* 18:333-336, 1998.
2. Kawamura, N. et al: Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse T cell subsets.

NeuroImmunoModulation 5:9-15, 1998.

3. Iimori, H. et al: Lateral hypothalamus modulates the intrinsic splenic NK cell activity in rats. *Neuro-ImmunoModulation*, 5:221-225, 1998.
4. Miyazawa, H. et al: Structure and promoter region of the surface membrane protein HS9 gene expressed on the thymic epithelial cells. B.B.A. (印刷中) 1999.
5. Tasaki, K. et al: Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of IL12 or IL18 which activate Th1 helper T cells. *Can. Gene Therapy* (印刷中) 1999.
6. Kawakami, N. et al: Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the thymus. *J. Immunol.* (印刷中) 1999.

学会発表

1. 西澤史子他: GFP標識マウス由来血液幹細胞を用いた胸腺内T細胞初期分化 日本薬学会 1998
2. 山元 弘他: サイトカインcDNA移入法による免疫応答の制御の試み 日本薬学会 1998
3. 岩尾睦美他: 胸腺細胞の発達におけるメロシンの機能的意義 8th Kyoto T Cell Conference 1998
4. 深田宗一朗他: 胸腺細胞の発達・分化におけるメロシンの役割 日本薬学会近畿支部大会 1998
5. 川上直人他: GFPマウス胎児肝細胞を用いた胸腺への細胞移行分子 日本免疫学会 1998
6. 岩尾睦美他: ラミニン α 2 鎖遺伝子欠損マウスに認められる胸腺細胞の発達異常の解析 日本免疫学会 1998
7. 滝沢綾子他: マウスT細胞におけるNPY受容体サブタイプの発現 日本免疫学会 1998
8. 飯森洋史他: 外側視床下部によるNK活性の調節 日本免疫学会 1998
9. 宮澤仁志他: マウスHS9遺伝子の転写制御領域の解析 日本分子生物学会 1998
11. 辻川和丈他: 受容体型チロシンホスファターゼLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化機構 日本分子生物学会年会 1998
12. 一條智子他: 受容体型チロシンホスファターゼLARによるFynのチロシン脱リン酸化 日本分子生物学会年会 1998

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基盤的研究

分担研究者 埜中 征哉 国立精神・神経センター 武蔵病院

研究要旨

1. 我が国で、筋ジストロフィー犬のキャリアが得られたが、その飼育には克服すべき課題が多数存在し、専任の飼育者による、飼育施設が必要であると考えられた。
2. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin を欠損し、neuronal type nitric oxide synthase (NOS-1) が形質膜から消失するが、筋変性は生じないことを明らかにした。
3. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスでは、末梢神経の髄鞘に、形態学的、生理学的な異常を生ずることを明らかにした。

A. 研究目的

1. 筋ジストロフィーのモデル動物としての筋ジストロフィー犬の評価を行う。
2. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスについて、骨格筋の組織像を明らかにする。
3. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスの末梢神経系の異常を明らかにする。

B. 研究方法

1. 筋ジストロフィー犬について、既にそのコロニーを設立している米国の Dr.Komegy のグループ及びオーストラリアの Mardock Universityの Dr.Howell のグループと密接な連絡をとり、情報を収集する。
2. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスの骨格筋について、組織学的、生化学的に検討した。
3. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスの脊髄、末梢神経について、形態学的、生化学的、生理学的な検討を行った。

C. 研究結果

1. 既に、米国の Dr.Komegy のグループから、筋ジストロフィー発症犬（雄）（ゴールデンレトリバー種）の精子を持ち帰り、実験動物中央研究所に委託して、ビーグル犬に人工授精を進めていたが、ごく最近、筋ジストロフィー犬キャリア（雌）を得たとの知らせがもたらされた。同じく、筋ジストロフィー犬のコロニーを樹立しているオーストラリアのグループについて、視察を行ったところ、筋ジストロフィー発症犬は、誕生直後から、嚙下に制限があるため、授乳及び食餌の摂取について完全な介助が必要であることが判明した。

2. $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損していた $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、neuronal type の Nitric Oxide synthase (nNOS) の発現が形質膜から欠損したが、NO に対する筋収縮特性は保持され、組織学的にも骨格筋には異常は検出されなかった。

3. laminin $\alpha 2$ chain ノックアウトマウスの脊髄では、laminin $\alpha 2$ chain が全く発現していないにも拘わらず、*dy*マウスの前根に見出されるような amyelination 構造（髄鞘の形成されていない大径線維の集簇）が観察されないことが明らかになった。一方、同マウスの末梢神経では、有髄神経直径の分布に異常があり、大径線維の脱落を反映して、末梢神経伝導速度が遅延していた。

D. 考察

1. 我が国においても、筋ジストロフィー犬のキャリア犬が得られたことから、コロニーの樹立に向けて、着実な一歩が記されたと言える。しかし、今回、筋ジストロフィー犬の飼育に非常に大きな障害が存在することが判明したことから、筋ジストロフィー犬は、専任の獣医師及び動物看護師などにより、極めて厳重に飼育・維持される必要があることも明らかになった。しかも、その施設は、実際に治療実験を行う研究者のごく近隣に置かれる必要がある。

2. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスでは、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現を完全に欠損し、nNOS の発現もまた、筋鞘から消失しているにも拘わらず、骨格筋の NO に対する収縮特性は維持されていたことから、細胞質分画の nNOS がその役割を担ってい

ることが考えられた。一方、筋鞘における nNOS の役割は未だ明らかではないが、現在、 $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを用いた筋再生実験を進めているので、その機能を更に明らかにしたいと考えている。

3. laminin $\alpha 2$ chain が欠損することで、末梢神経・髄鞘の形態学的、生理学的な異常を来すことを始めて明らかにすることができた。しかし、laminin $\alpha 2$ chain の partial な欠損である dy マウスで何故、amyelination を生ずるのかは不明であり、今後の課題である。

E. 結論

1. 我が国で、筋ジストロフィー犬のキャリアが得られたが、その飼育には克服すべき課題が多数存在し、専任の飼育者を必要とすると考えられた。

2. $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスの骨格筋を解析し、 $\alpha 1$ -syntrophin の欠損及び、nNOS の筋鞘からの消失だけでは、筋変性を生じないことを明らかにした。

3. laminin $\alpha 2$ chain の完全な欠損により、末梢神経の髄鞘に、形態学的、生理学的な異常を生ずることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M: Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 8:333-337, 1998

2. Nonaka I: Animal models of muscular dystrophies. *Lab Animal Sci* 48:8-17, 1998.

3. Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* 103:323-327, 1998

4. Nishino I, Minami N, Nonaka I, et al: MTM1 gene mutations in Japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 8:453-458, 1998

5. Kubo S, Tsukahara T, Nonaka I, et al: Presence of emerinopathy in cases of rigid spine syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:502-507, 1998

6. Makino M, Horai S, Yu-ichi Goto Nonaka I: Confirmation that a T-to-C mutation at 9176 in mitochondrial DNA is an additional candidate mutation for Leigh's syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:149-151, 1998

7. Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998

8. Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., et al. $\alpha 1$ -syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric oxide synthase at the sarcolemma, but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274: 2193-2200, 1999

学会発表

1. 中川雅裕 他: ラミニン $\alpha 2$ 鎖ノックアウトマウスの末梢神経におけるラミニンとインテグリン分子の発現解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜; 1998年12月16-19日