

19990342

厚生科学研究費補助金

(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

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

1999年度

主任研究者 武田伸一

国立精神・神経センター 神経研究所

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. AAV ベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入による効果的な遺伝子発現のためには、ジストロフィン及びその下流に位置する分子が必要であることを明らかにした。
2. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子産物に対する免疫反応によって骨格筋の筋鞘にユートロフィンの発現増強を生じ、病変の緩和が起こることを明らかにし、筋ジストロフィーに対する治療に新たな局面を開いた。
3. 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。しかし、ある種のDNA配列は免疫応答を増強するため、これを抑制するための組み替え体の作成を進めた。
4. 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や筋肉中の前駆細胞を認識する抗体を作成し、その性格付けを行った。
5. 筋ジストロフィーに対する治療用モデルとして重要な筋ジストロフィー犬の発症犬が得られたが、そのうちの1頭は生後直後から呼吸障害を呈し、飼育上克服すべき課題を提示した。
6. 先天性筋ジストロフィーのモデルである laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウス骨格筋では、発育期に膜の透過性亢進による筋変性に引き続いて、再生過程でアポトーシスを生ずるため、筋再生が途上で頓挫することを見出した。再生の制御が治療に結びつく可能性がある。

分担研究者

山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科 教授  
埜中征哉 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 の向上に結びつき、将来への福音となる。

しかし、DMD の欠損蛋白ジストロフィンは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  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -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、アデノ随伴ウイルス (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

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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. 骨格筋への遺伝子導入法の確立 (武田)

(1) ピッツバーグ大学の Dr.Xiao のグループとの共同研究により、lacZ 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、C57BL/10 マウス(B10)、*mdx* マウス(*mdx*)、ミニ・ジストロフィン transgenic マウス (CVBA) 前脛骨筋への導入を行ない、経時的な解析を行った。

(2) 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* の前脛骨筋に導入し、免疫組織染色にて浸潤細胞の検討を行った。次に、免疫抑制剤 FK506、抗 CD4 抗体の前処置後に、AxCALacZ を導入し、ユートロフィン発現増強の有無を検討した。更に、マウスのユートロフィン遺伝子について、5'RACE 法を用いて未知の転写産物の有無を検討した。

2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導 (山元)

(1) 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。

(2) 細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、並びに IL12p40 鎖 cDNA の発現プラスミドを、ISS 配列を含まないベクターとするため、ampR 遺伝子の代わりに tet R とし組み替えた。

(3) 筋前駆細胞を特異的に認識する抗体を作成するために、C2C12 マウス筋芽細胞由来 C2/4 細胞株をラットに免疫して細胞融合し、C2/4 反応性でかつマウス正常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)

(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.Kornegay のグループ及びオーストラリアの Murdoch 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。実験動物中央研究所及び CSK リサーチパークと協力して、我が国に筋ジストロフィー犬コロニーを設立するための準備を行った。

(2)  $\alpha 1$ -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 と分子間連関するとされる機能分子 (得に水チャンネルを構成する Aquaporin-4 の発現について、骨格筋、中枢神経系を中心に組織学的、生化学的に詳細に検討した。

(3) laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウスの骨格筋に生ずる筋変性について、形態学的な検討を行った。

## C. 研究成果

1. 骨格筋への遺伝子導入法の確立

(1) AAV ベクターを用いた遺伝子導入

B10 骨格筋への AAV ベクターの導入では時間経過と共に  $\beta$ -gal 陽性線維が増加し高い発現が維持されるのに対し、*mdx* では導入遺伝子の導入 1, 2 週後の発現は B10 に比べ低く、しかも、4 週後に急速に低下した。ミニ・ジストロフィン遺伝子の発現により表現型の改善が見られる CVBA に対して遺伝子導入を行った結果、導入 1, 2 週後では B10 と同レベルの高い発現効率が得られたのに対し、導入 4, 8 週後になると *mdx* と同様に  $\beta$ -gal の発現が急速に減少した。一方、cardiotoxin 注入による B10 再生骨格筋では、導入遺伝子の発現効率は B10 の正常骨格筋に比べ低下していた。

(2) ユートロフィンの発現増強

前年度の研究で、新生児 *mdx* の前脛骨筋にアデノウイルスベクター AxCALacZ を導入し、ユートロフィンの発現増強を見出した。免疫組織染色法を用いてユートロフィンの発現部位を検討したところ、CD4 細胞、CD8 細胞、マクロファージの浸潤が認められた。そこで、免疫抑制剤 FK506、抗 CD4 抗体の投与をした *mdx* にアデノウイルスベクター導入を行ったところ、ユートロフィンの発現増強が抑制された。また、導入遺伝子を持たないアデノウイルスのみを導入した場合にはユートロフィンの誘導が認められないことから、ユートロフィンの

発現増強はアデノウイルスベクターの遺伝子産物に対する免疫反応が原因と考えられた。

### (3) ユートロフィン遺伝子の転写産物

骨格筋におけるユートロフィン転写産物を 5'RACE 法にて検討したところ、既報のものとは異なる 5' 端をもつ、2 つの転写産物を見出した。そのうちの1つは 1999 年 12 月にイギリスのグループから報告されたものと同一であったが、他の1つは全く未知の塩基配列を示していた。

## 2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導

(1) 昨年度報告したように、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、 $\beta$ -gal 発現量は高値を示し、また筋組織中の  $\beta$ -gal 陽性筋細胞は対照群に比べ多数認められた。サイトカイン遺伝子発現ベクターの投与は、 $\beta$ -gal 発現を持続させる働きを有していたが、その有効期間が短いことが判った。その理由は、ベクター中の ampR 遺伝子の中に存在する CpG(ISS) 配列が、サイトカイン機能と拮抗的に Th1 型免疫応答を増強しているせいであると考えられる。そこで ampR 遺伝子の代わりに薬剤耐性遺伝子を tet R としたベクターを構築し、それに IL10 もしくは IL12p40 鎖遺伝子を組み替えたベクターを構築した。

(2) IL10、IL12p40 鎖遺伝子を組み込んだ新規発現ベクターを、マウス前頸骨筋内に投与し、同時に投与した外来性抗原 (OVA) に対する抗体産生能について、検討を始めた。

(3) C2/4 細胞に反応性を有し、かつ正常マウスリンパ球には反応しないモノクロナル抗体を 10 種以上得た。正常筋、およびカルジオトキシン (CTX) 処理後種々の時間を経過した筋組織に対するモノクロナル抗体の反応性を調べたところ、クロン #155 (155) は、正常筋組織の一部の細胞、CTX 処理後の後期 (72 時間以降) の一部の細胞に反応性を示した。クロン #27-1 (27-1) は、正常筋組織の一部の細胞、および CTX 処理後の初期 (24 時間以前) の一部の細胞に反応性を示した。クロン #157 (157) は、正常筋組織には反応性を示さないものの、CTX 処理後の初期から中期 (24-48 時間頃) の一部の細胞に反応性を示した。

## 3. 筋ジストロフィー治療モデル動物の開発

### (1) 筋ジストロフィー犬

既に、米国の Dr.Kornegay のグループから、筋ジストロフィー発症犬 (CXMD) (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、昨年度の研究で、F1 世代のキャリア犬 (雌) を得

た。本年度はさらに、キャリア犬とビーグル犬の交配を進めた結果、PCR 反応を用いた遺伝子診断により、F2 世代の雄 5 頭のうち 2 頭が CXMD、雌 3 頭のうち 1 頭がキャリア犬と診断された。CXMD の内の 1 頭は娩出直後から無呼吸状態で、蘇生後も呼吸異常が続き、生後 4 時間で死亡した。残りの 1 頭については、1 週齢後採血から CK 値の異常を示し、行動観察上、正常個体に比較して運動量が少ない傾向があった。

### (2) $\alpha$ 1-syntrophin ノックアウトマウス

ジストロフィンを欠損する Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) あるいは *mdx* マウス骨格筋では、Orthogonal Array Particle (OAPs) が減少することが以前から知られていた。最近になって、OAPs が水チャンネルに一致し、その構成分子が Aquaporin-4 であることが明らかになった。Aquaporin-4 の C 端には、PDZ domain の結合配列が見い出されたため、PDZ domain を持つ  $\alpha$ 1-syntrophin を欠損したノックアウトマウスにおける Aquaporin-4 の発現を検討した。その結果、Aquaporin-4 は、 $\alpha$ 1-syntrophin の発現している骨格筋筋鞘及び Astrocyte の endfeet から欠損していた。興味深いことに、本来  $\alpha$ 1-syntrophin の発現していない肺、腎、胃上皮では、Aquaporin-4 の発現は保たれていたことから、Aquaporin-4 を膜にアンカーするための分子機構が当初考えられていたよりも複雑であることが明らかになった。

### (3) laminin $\alpha$ 2 chain ノックアウトマウス

laminin  $\alpha$ 2 chain ノックアウトマウスの骨格筋では、生後 9 日から 11 日目にかけて、筋形質膜の透過性の亢進が起こり、その結果として筋変性を生ずる。13 日目ころから、筋変性に引き続いて、筋再生を生ずるが、筋再生過程にある多くの細胞でアポトーシスを生じ、その結果として筋再生が途上で頓挫する。

## D. 考察

### 1. ジストロフィン遺伝子の骨格筋への導入

(1) AAV ベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入において、*mdx* での遺伝子の発現効率が導入初期には低い要因として、中心核を持つ再生線維では辺縁核線維に比べ遺伝子の導入効率が低下が関与する可能性がある。*mdx* での遺伝子の発現効率が導入後期には急速に低下する要因として、発現が低下する時期に一致して、CD4、CD8 陽性細胞の浸潤や筋線維内に IgG の沈着が認められることから、筋線維の膜透過性の亢進と細胞性免疫が関与している可能性がある。

(2) アデノウイルスベクターの導入により生ずるユートロフィンの発現増強と、その結果としての筋ジストロフィー所見の改善については、今後、今回見

い出した新たな転写産物のプロモーター解析を行い、アデノウイルスベクターにより誘導されるユートロフィンの発現機構を明らかにする。更に、一部のサイトカインにより、ユートロフィンに転写が活性化される可能性があるため、その機構について検討する。

## 2. 外来性遺伝子導入に対する免疫学的寛容の誘導

導入遺伝子産物に対する免疫応答は、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投与することによって抑制される。しかしその効果の持続期間は2-4週と短く、血中抗体も上昇する。これは Th1 型免疫応答を増強する配列 (ISS 配列) が、サイトカインの機能を打ち消していると考えられるため、ISS 配列を持たないベクターの構築を進めた。この新規発現ベクターの機能については、現在鋭意検討中である。

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。これら3種のモノクロナル抗体と、ラミニンやデスミンの染色性、筋組織内での分布を検討したところ、155 と 27-1 は、筋衛星細胞を染色していると考えられる。2種の反応性が多少異なっていることから、27-1 に比べ 155 はより未分化な筋衛星細胞に特異的に反応している可能性が高い。また 157 は、活性化筋衛星細胞に反応性を示すと考えられる。

今後に残された課題として、

- (1) 対応抗原の生化学的解析を行うこと、
- (2) 筋組織から筋衛星細胞を選択的に濃縮できるかどうかを検討すること、
- (3) 現時点では、155 と 27-1 は骨髄細胞にはほとんど反応しないが、これは骨髄中の筋前駆細胞の頻度が低いためであると考えられ、陽性細胞を濃縮する方法を検討こと、
- (4) 未検討のモノクロナル抗体についてそれらの反応性を調べ、筋前駆細胞特異的抗原のマーカー系列を作成すること、などが挙げられる。

## 3. 筋ジストロフィー治療モデル動物の開発

(1) 我が国においても、筋ジストロフィー犬の発症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、同時に幾つか問題があることも明らかになった。

(a) 発症犬の一部は、生後早期に respiratory distress に陥る場合がある。

(b) 最初の crisis を生き延びた CXMD の臨床像は比較的軽い。

臨床像が重篤であったり、または軽微に過ぎると今後の治療研究を進める過程で、治療効果の判定が難しい可能性が出てくる。特に、ゴールデンレトリバー種をより小型のビーグル犬と交配しているため、

症状が軽症化する可能性を考慮に入れる必要がある。

(2) 骨格筋筋鞘及び Astrocyte の endfeet に発現し、水チャンネルを担う Aquaporin-4 が、筋ジストロフィーで欠損することが、その病像にどのように関与しているのかは明らかではない。今後、 $\alpha$ 1-syntrophin と Aquaporin-4 の分子間連関を明らかにすると共に、Aquaporin-4 の欠損が骨格筋にどのような機能上の変化を生じているのか明らかにしたい。おそらく、 $\alpha$ 1-syntrophin は、チャンネル蛋白質、レセプターなどを膜に局在させるために必要な分子として、その機能がますます注目されてゆくと考えられる。

(3) laminin  $\alpha$ 2 chain が欠損する先天性筋ジストロフィー (Merosin-deficient congenital muscular dystrophy) では、筋変性に加えて、細胞浸潤、筋再生不良など様々な組織学的な所見を呈することが知られ、それを説明することが困難であった。今回の我々の検討で、laminin  $\alpha$ 2 chain が欠損骨格筋では、膜透過性の亢進に伴う筋変性と筋再生異常という二つの phase が sequential に現れることが初めて明らかになった。今後 laminin  $\alpha$ 2 chain が欠損するために、どのようなシグナルが、laminin のレセプターである  $\alpha$ -dystroglycan とインテグリン複合体に伝達され、細胞死に結びつくのか明らかにすることが重要である。再生の制御が治療法に結びつく可能性が出てきたからである。

## E. 結論

1. AAV ベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入を行う過程で、ジストロフィン及びその下流に位置する分子が発現効率に関わることを見出した。
2. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって骨格筋の筋鞘に生ずるユートロフィンの発現増強は、導入遺伝子産物に対する免疫反応によることを明らかにした。
3. ユートロフィン遺伝子について、従来の報告とは異なる 5' 端を持つ新たな転写産物を見出した。
4. 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。そこで、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んだ。
5. C2/4 筋芽細胞反応性の興味あるモノクロナル抗体を得た。
6. 筋ジストロフィー犬の発症犬が得られたが、治療用のモデル動物として確立するためには、検討することも多いことが明らかにされつつある。
7.  $\alpha$ 1-syntrophin ノックアウトマウスを用いることにより、水チャンネルを構成する Aquaporin-4

の形質膜への局在にとって、 $\alpha 1$ -syntrophin が重要であることを始めて明らかにした。

8. laminin  $\alpha 2$  chain の完全な欠損により、膜透過性の亢進に引き続いて、筋再生の異常が起こることが明らかにされた。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Nakamura A, et al.: A novel Sac I RFLP in the 3' untranslated region of the myotonin protein kinase gene *J Human Genetics* 44:135-137, 1999
2. Ishii A, et al.: Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle, *Muscle Nerve* 22: 592-599, 1999
3. Inobe M, et al.: Identification of EPS8 as a Dvl1 associated molecule *Biochem Biophys Res Commu* 266: 216-221, 1999
4. Miyagoe-Suzuki Y, et al.: Merosin and congenital muscular dystrophy, *Microsc Res Tech* 48: 181-191, 2000
5. Yokota T, et al.: Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in  $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice, *Proc. Japan Acad* 76: Ser.B, 22-27, 2000.
6. Takeda S: Gene Therapy of Muscular Dystrophy, Reality and Dream, *Neuroscience News* 3: 51-56, 2000
7. Yamamoto K, et al.: Immune response to adenoviral-delivered antigens upregulates utrophin, and results in mitigation of muscle pathology in mdx mice, *Human Gene Therapy*, (in press)
8. Miyazawa, H. et al.: Structure and promoter region of the surface membrane protein HS9 gene expressed on thymic epithelial cells. *B.B.A.*, 1444:407-411, 1999.
9. Hoq, Md.M. et al.: Insufficient resistance of trehalose-6, 6'-dimycolate-treated T-cell receptor d gene mutant (TCRd<sup>-/-</sup>) mice against influenza virus infection. *Microbiol. Immunol.*, 43:491-493, 1999.
10. Kawakami, N. et al.: Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the thymus. *J. Immunol.*, 163:3211-3216, 1999.
11. Kawakami, N. et al.: Green fluorescent protein-transgenic mouse: Immune functions and its application to the studies of lymphocyte development. *Immunol. Lett.*, 70:165-171, 1999.
12. Kohama, Y. et al.: Immunostimulatory oligonucleotide induces Th-1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104:1231-1238, 1999.
13. Yamada, E. et al.: Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK. *B.B.A.*, 1495:250-262, 2000.
14. Iwao, M. et al.: Thymic atrophy in laminin- $\alpha 2$  chain deficient mice is a result of selective death of CD4+8+ immature thymocytes. *Immunology*, (in press), 2000.19.
15. Nonaka I: Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 1999;12:493-499
16. Minami N, et al.: Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 1999; 171:31-37
17. Murakami N, et al.: Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle Nerve*, 1999; 22: 889-898.
18. Imoto C, et al.: Nebulin is normally expressed in nemaline myopathy. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 433-436.
19. 埜中征哉: 臨床のための筋病理 1999: 9.20 日本医事新報社
20. 武田伸一: 筋肉細胞、遺伝子治療開発ハンドブック、p474-479, 1999
21. 武田伸一: 脳科学における遺伝子治療の現状と将来像- 遺伝子治療、細胞治療、創薬の総合による分子治療へ- 脳の科学、21: 1171-1181, 1999

22. 武田伸一: 胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, ES cell) 脳の科学、21: 1168, 1999

23. 武田伸一 他: 筋疾患の遺伝子治療 - Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に - 神経研究の進歩、印刷中

24. 武田伸一 他: 筋ジストロフィーのモデル犬 医学の歩み、印刷中

25. 武田伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療研究の現状 Clinical Neuroscience、印刷中

#### 学会発表

1. Yamamoto K, et al.: Adenovirus vector-mediated immune reaction causes utrophin upregulation and prevents muscle degeneration in dystrophic mdx mice. 2nd Annual Meeting American Society of Gene Therapy. Washington, DC, USA; June 9-13, 1999

2. Takeda S, et al.: Adenovirus vector-mediated immune reaction causes utrophin upregulation and amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice. The 5th Annual Meeting, The Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, Japan; June 18-19, 1999

3. Takeda S: Therapeutic approaches of DMD: Over-expression of endogenous utrophin in mdx skeletal muscle. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000

4. 保坂幸男 他:  $\alpha 1$  シントロフィンノックアウトマウス骨格筋の実験的再生系における筋肥大とその分子機構の解析 第 22 回日本分子生物学会年会 福岡; 1999 年 12 月 7-10 日

5. 湯浅勝敏 他: アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子導入 第 22 回日本分子生物学会年会 福岡; 1999 年 12 月 7-10 日

6. 猪部学 他: マウス Dishevelled ホモログ会合分子 EPS8 のシグナル伝達における役割 第 22 回日本分子生物学会年会 福岡; 1999 年 12 月 7-10 日

7. 勝部憲一 他: MAP 遺伝子 *Nau* / *STOPmRNA* の 3'非翻訳領域の機能 第 22 回日本分子生物学会年会 福岡; 1999 年 12 月 7-10 日

8. 坂本啓 他: トリ神経管における Delta-1, Serrate-1 の発現調節機構の解析 第 22 回日本分子生物学会年会 福岡; 1999 年 12 月 7-10 日

9. Hosaka Y, et al.: Skeletal muscle of  $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice exhibits significant hypertrophy during regeneration. Keystone Symposia. Keystone, USA; February 3-9, 2000

10. Yokota T, et al.: Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in  $\alpha 1$  syntrophin knockout mice. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000

11. Hosaka Y, et al.: Skeletal muscle of  $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice exhibits significant hypertrophy during regeneration. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000

12. 坂根直樹 他: 胎児肝細胞の胎児胸腺への移行に関与する接着分子の解析 日本薬学会 1999

13. 青木賢二 他: IL18 産生腫瘍細胞による抗腫瘍免疫の誘導 日本薬学会 1999

14. 辻川和丈 他: マウス CGRP 受容体のクローニングと Th 細胞における発現 日本薬学会 1999

15. H. Yamamoto 他: Thymus atrophy in the laminin  $\alpha 2$  gene deficient mouse. FASEB 1999

16. 坂根直樹 他: マウス胸腺への細胞移行の解析 9th Kyoto T Cell Conference 1999

17. 一條智子 他: 受容体型 PTPase LAR による INS-R と Fyn のチロシン脱リン酸化 日本生化学会 1999

18. 辻川和丈 他: 抗 LAR P-subunit モノクローナル抗体の作製と特性 日本生化学会 1999

19. 小濱靖弘 他: 免疫応答刺激性 DNA 投与による杉花粉 allergy の制御 日本アレルギー学会 1999

20. 岩尾睦美 他: ラミニンのマウス胸腺内分布 日本免疫学会 1999

21. 坂根直樹 他: T 前駆細胞の胸腺への移入に必要な

な接着分子の差異 日本免疫学会 1999

22. 常世田好司 他:T細胞における NPY のシグナル伝達経路の解析 日本免疫学会 1999

23. 宮内浩典 他:機能的 CGRP 受容体のマウス T細胞における発現 日本免疫学会 1999



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. *mdx* マウス骨格筋に対するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子の発現効率が低下することを初めて明らかにした。
2. アデノウイルスベクター導入によるユートロフィンの発現増強は導入遺伝子産物に対する免疫反応が原因であることを明らかにした。
3. 5' 端が未知の塩基配列を示す新たなユートロフィン転写産物を発見した。
4.  $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスの筋鞘及び Astrocyte の endfeet から水チャンネルを構成する Aquaporin 4 が欠損することを明らかにした。

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、アデノ随伴ウイルス(AAV) ベクターを用いて骨格筋に対す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ユートロフィンの発現機序について詳細に検討する。
3.  $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスの解析を通じて、機能分子を膜にアンカーする分子としての  $\alpha 1$ -syntrophin の役割を明らかにする。

B. 研究方法

1. ピッツバーグ大学の Dr.Xiao のグループとの共同研究により、lacZ 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、C57BL/10 マウス(B10)、*mdx* マウス(*mdx*)、ミニ・ジストロフィン transgenic マウス (CVBA) 前脛骨筋への導入を行ない、経時的な解析を行った。
2. 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* の前脛骨筋に導入し、免疫組織染色にて浸潤細胞の検討を行った。次に、免疫抑制剤 FK506、抗 CD4 抗体の前処置後に、AxCALacZ を導入し、ユートロフィン発現増強の有無を検討した。更に、マウスのユートロフィン遺伝子について、5'RACE 法を用いて未知の転写産物の有無を検討した。
3.  $\alpha 1$ -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 と分子間連関するとされる機能分子（得に水チャンネルを構成する Aquaporin-4 の発現について、骨格筋、中枢神経系を中心に組織学的、生化学的に詳細に検討した。

C. 研究結果

1. B10 骨格筋への AAV ベクターの導入では時間経過と共に  $\beta$ -gal 陽性線維が増加し高い発現が維持されるのに対し、*mdx* では導入遺伝子の導入 1, 2 週後の発現は B10 に比べ低く、しかも、4 週後に急速に低下した。ミニ・ジストロフィン遺伝子の発現により表現型の改善が見られる CVBA に対して遺伝子導入を行った結果、導入 1, 2 週後では B10 と同レベルの高い発現効率が得られたのに対し、導入 4, 8 週後になると *mdx* と同様に  $\beta$ -gal の発現が急速に減少した。一方、cardiotoxin 注入による B10 再生骨格筋では、導入遺伝子の発現効率は B10 の正常骨格筋に比べ低下していた。
2. 前年度の研究で、新生児 *mdx* の前脛骨筋にアデノウイルスベクター AxCALacZ を導入し、ユートロフィンの発現増強を見出した。免疫組織染色法を用いてユートロフィンの発現部位を検討したところ、CD4 細胞、CD8 細胞、マクロファージの浸潤が認められた。そこで、免疫抑制剤 FK506、抗 CD4 抗体の投与をした *mdx* にアデノウイルスベクター導入を行ったところ、ユートロフィンの発現増強が抑制された。また、導入遺伝子を持たないアデノウイルスのみを導入した場合にはユートロフィンの誘導が認められないことから、ユートロフィンの発現増強はアデノウイルスベクターの遺伝子産物に対する免疫反応が原因と考えられた。
3. 骨格筋におけるユートロフィン転写産物を 5'RACE 法にて検討したところ、既報のものとは異なる 5' 端をもつ、2 つの転写産物を見出した。そのうちの一つは 1999 年 12 月にイギリスのグループから報告されたものと同じであったが、他の一つは全く未知の塩基配列を示していた。
4. ジストロフィンを欠損する Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) あるいは *mdx* マウス骨格

筋では、Orthogonal Array Particle (OAPs) が減少することが以前から知られていた。最近になって、OAPs が水チャンネルに一致し、その構成分子が Aquaporin-4 であることが明らかになった。Aquaporin-4 の C 端には、PDZ domain の結合配列が見い出されたため、PDZ domain を持つ  $\alpha 1$ -syntrophin を欠損したノックアウトマウスにおける Aquaporin-4 の発現を検討した。その結果、Aquaporin-4 は、 $\alpha 1$ -syntrophin の発現している骨格筋筋鞘及び Astrocyte の endfeet から欠損していた。興味深いことに、本来  $\alpha 1$ -syntrophin の発現していない肺、腎、胃上皮では、Aquaporin-4 の発現は保たれていたことから、Aquaporin-4 を膜にアンカーするための分子機構が当初考えられていたよりも複雑であることが明らかになった。

#### D. 考察

1. AAV ベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入において、*mdx* での遺伝子の発現効率が導入初期には低い要因として、中心核を持つ再生線維では辺縁核線維に比べ遺伝子の導入効率が低下が関与する可能性がある。*mdx* での遺伝子の発現効率が導入後期には急速に低下する要因として、発現が低下する時期に一致して、CD4, CD8 陽性細胞の浸潤や筋線維内に IgG の沈着が認められることから、筋線維の膜透過性の亢進と細胞性免疫が関与している可能性がある。
2. アデノウイルスベクターの導入により生ずるユートロフィンの発現増強と、その結果としての筋ジストロフィー所見の改善については、今後、今回見出した新たな転写産物のプロモーター解析を行い、アデノウイルスベクターにより誘導されるユートロフィンの発現機構を明らかにする。更に、一部のサイトカインにより、ユートロフィンに転写が活性化される可能性があるため、その機構について検討する。
3. 骨格筋筋鞘及び Astrocyte の endfeet に発現している Aquaporin-4 の欠損が筋ジストロフィーの病像にどのように関与しているのかは明らかではない。今後、 $\alpha 1$ -syntrophin と Aquaporin-4 の分子間連関を明らかにすると共に、Aquaporin-4 の欠損が骨格筋にどのような機能上の変化を生じているのか明らかにしたい。

#### E. 結論

1. AAV ベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入を行う過程で、ジストロフィン及びその下流に位置する分子が発現効率に関わることを見出した。
2. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって骨格筋の筋鞘に生ずるユートロフィンの発現増強は、遺伝子産物に対する免疫反応によることを明らかにした。
3. ユートロフィン遺伝子について、従来の報告と

は異なる 5' 端を持つ新たな転写産物を見出した。

4.  $\alpha 1$ -syntrophin ノックアウトマウスを用いることにより、水チャンネルを構成する Aquaporin-4 の形質膜への局在にとって、 $\alpha 1$ -syntrophin が重要であることを始めて明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. 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* 22: 592-599, 1999
  2. Miyagoe-Suzuki Y, Nakagawa M & Takeda S: Merosin and congenital muscular dystrophy, *Microsc Res Tech* 48: 181-191, 2000
  3. Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Kameya S, Shibuya S, Matsuda R, Wakayama Y, & Takeda S: Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in  $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice, *Proc. Japan Acad* 76: Ser.B, 22-27, 2000.
  4. Takeda S: Gene Therapy of Muscular Dystrophy, Reality and Dream, *Neuroscience News* 3: 51-56, 2000
  5. Yamamoto K, Yuasa K, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Yamamoto H, Nabeshima Y, & Takeda S: Immune response to adenoviral-delivered antigens upregulates utrophin, and results in mitigation of muscle pathology in *mdx* mice, *Human Gene Therapy*, (in press)
- 他2報

##### 学会発表

1. Yamamoto K, et al.: Adenovirus vector-mediated immune reaction causes utrophin upregulation and prevents muscle degeneration in dystrophic *mdx* mice. 2nd Annual Meeting American Society of Gene Therapy. Washington, DC, USA; June 9-13, 1999
2. Takeda S, et al.: Adenovirus vector-mediated immune reaction causes utrophin upregulation and amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice. The 5th Annual Meeting, The Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, Japan; June 18-19, 1999
3. Takeda S: Therapeutic approaches of DMD: Over-expression of endogenous utrophin in *mdx* skeletal muscle. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000

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. 筋ジストロフィーに対する治療用モデルとして重要な筋ジストロフィー犬の発症犬が得られたが、そのうちの1頭は生後直後から、呼吸障害を呈し、飼育上、克服すべき課題を提示した。
2. 先天性筋ジストロフィーのモデルである laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウス骨格筋では、発育期に膜の透過性亢進による筋変性に引き続いて、再生過程でアポトーシスを生ずるため、筋再生が途上で頓挫する。

A. 研究目的

1. 筋ジストロフィーの治療用モデル動物としての筋ジストロフィー犬のコロニーの確立を図る。
2. laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウスの筋変性の発症機構を明らかにする。

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.Kornegay のグループ及びオーストラリアの Murdoch 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。実験動物中央研究所及び CSK リサーチパークと協力して、我が国に筋ジストロフィー犬コロニーを設立するための準備を行う。
2. laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウスの骨格筋に生ずる筋変性について、形態学的な検討を行う。

C. 研究結果

1. 既に、米国の Dr.Kornegay のグループから、筋ジストロフィー発症犬 (CXMD) (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、昨年度の研究で、F1世代のキャリア犬(雌)を得た。本年度はさらに、キャリア犬とビーグル犬の交配を進めた結果、PCR 反応を用いた遺伝子診断により、F2世代の雄5頭のうち2頭が CXMD、雌3頭のうち1頭がキャリア犬と診断された。CXMDの内の1頭は娩出直後から無呼吸状態で、蘇生後も呼吸異常が続き、生後4時間で死亡した。残りの1頭については、1週齢後採血から CK 値の異常を示し、行動観察上、正常個体に比較して運動量が少ない傾向があった。
2. laminin  $\alpha 2$  chain ノックアウトマウスの骨格筋では、生後9日から11日目にかけて、筋形質膜の透過性の亢進が起こり、その結果として筋変性を生ずる。13日目ころから、筋変性に引き続いて、筋再生を生ずるが、筋再生過程にある多くの細胞でアポトーシスを生じ、その結果として筋再生が途上で頓挫する。

D. 考察

1. 我が国においても、筋ジストロフィー犬の発症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、同時に幾つか問題があることも明らかになった。
  - (1) 発症犬の一部は、生後早期に respiratory distress に陥る場合がある。
  - (2) 最初の crisis を生き延びた CXMD の臨床像は比較的軽い。

臨床像が重篤であったり、または軽微に過ぎると今後の治療研究を進める過程で、治療効果の判定が難しい可能性が出てくる。特に、ゴールデンレトリバー種をより小型のビーグル犬と交配しているため、症状が軽症化する可能性を考慮に入れる必要がある。

2. laminin  $\alpha 2$  chain が欠損する先天性筋ジストロフィー (Merosin-deficient congenital muscular dystrophy) では、筋変性に加えて、細胞浸潤、筋再生不良など様々な組織学的な所見を呈することが知られ、それを説明することが困難であった。今回の我々の検討で、laminin  $\alpha 2$  chain が欠損骨格筋では、膜透過性の亢進に伴う筋変性と筋再生異常という二つの phase が sequential に現れることが初めて明らかになった。今後 laminin  $\alpha 2$  chain が欠損するために、どのようなシグナルが、laminin のレセプターである  $\alpha$ -dystroglycan とインテグリン複合体に伝達され、細胞死に結びつくのか明らかにすることが重要である。再生の制御が治療法に結びつく可能性が出てきたからである。

E. 結論

1. 筋ジストロフィー犬の発症犬が得られたが、治療用のモデル動物として確立するためには、検討することも多いことが明らかにされつつある。
2. laminin  $\alpha 2$  chain の完全な欠損により、膜透過性の亢進に引き続いて、筋再生の異常が起こることが明らかにされた。

F. 研究発表

論文発表

1. 埜中征哉：臨床のための筋病理 1999: 9.20 日本医事新報社
2. Nonaka I: Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 1999;12:493-499
3. Minami N, Nishino I, Kobayashi O, Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I: Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 1999; 171:31-37
4. Murakami N, McLennan IS, Nonaka I, Koishi K, Baker C, Hammond-Tooke G: Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle Nerve*, 1999; 22: 889-898.
5. Imoto C, Kimura S, Kawai M, Nonaka I: Nebulin is normally expressed in nemaline myopathy. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 433-436.
6. 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* 1999; 22: 592-599.

# 厚生科学研究費補助金（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。ある種の DNA 配列は免疫応答を増強するため、これを抑制するための組み替え体の作成を進めた。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や筋肉中の前駆細胞を認識する抗体を作成し、その性格付けを行った。

分担研究者 山元 弘  
大阪大学大学院薬学研究科  
教授

### 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(卵白アルブミン:OVA、杉花粉抗原:CrI)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. 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(CrI)をISSと共にマウスに投与し、抗体価を計測した。
2. 細胞性免疫を抑制するサイトカイン、IL4、IL10、並びにIL12p40鎖cDNAの発現プラスミドを、ISS配列を含まないベクターとするため、amp<sup>R</sup>遺伝子の代わりにtet<sup>R</sup>として組み替えた。
3. 筋前駆細胞を特異的に認識する抗体を作成するために、C2C12マウス筋芽細胞由来C2/4細胞株をラットに免疫して細胞融合し、C2/4反応性でかつマウス正常細胞に反応しないモノクロナル抗体を選んだ。

### C. 研究成果

1. 昨年度報告したように、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。サイトカイン遺伝子発現ベクターの投与は、β-gal発現を持続させる働きを有していたが、その有効期間が短いことが判った。その理由は、ベクター中のamp<sup>R</sup>遺伝子の中に存在するCpG(ISS)配列が、サイトカイン機能と拮抗的にTh1型免疫応答を増強しているせいであると考えられる。そこでamp<sup>R</sup>遺伝子の代わりに薬剤耐性遺伝子をtet<sup>R</sup>としたベクターを構築し、それにIL10もしくはIL12p40鎖遺伝子を組み替えたベクターを構築した。
2. IL10、IL12p40鎖遺伝子を組み込んだ新規発現ベクターを、マウス前頸骨筋内に投与し、同時に投与した外来性抗原(OVA)に対する抗体産生能について、検討を始めた。
3. C2/4細胞に反応性を有し、かつ正常マウスリンパ球には反応しないモノクロナル抗体を10種以上得た。正常筋、およびカルジオトキシン(CTX)処理後種々の時間を経過した筋組織に対するモノクロナル抗体の反応性を調べたところ、クロン#155(155)は、正常筋組織の一部の細胞、CTX処理後の後期(72時間以降)の一部の細胞に反応性を示した。クロン#27-1(27-1)は、正常筋組織の一部の細胞、およびCTX処理後の初期(24時間以前)の一部の細胞に反応性

を示した。クロン#157 (157) は、正常筋組織には反応性を示さないものの、CTX 処理後の初期から中期 (24-48 時間頃) の一部の細胞に反応性を示した。

#### D. 考察

導入遺伝子産物に対する免疫応答は、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投与することによって抑制される。しかしその効果の持続期間は 2-4 週と短く、血中抗体も上昇する。これは Th1 型免疫応答を増強する配列 (ISS 配列) が、サイトカインの機能を打ち消していると考えられるため、ISS 配列を持たないベクターの構築を進めた。この新規発現ベクターの機能については、現在鋭意検討中である。

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。これら 3 種のモノクロナル抗体と、ラミニンやデスミンの染色性、筋組織内での分布を検討したところ、155 と 27-1 は、筋衛星細胞を染色していると考えられる。2 種の反応性が多少異なっていることから、27-1 に比べ 155 はより未分化な筋衛星細胞に特異的に反応している可能性が高い。また 157 は、活性化筋衛星細胞に反応性を示すと考えられる。

今後に残された課題として、1:対応抗原の生化学的解析を行うこと、2:筋組織から筋衛星細胞を選択的に濃縮できるかどうかを検討すること、3:現時点では、155 と 27-1 は骨髄細胞にはほとんど反応しないが、これは骨髄中の筋前駆細胞の頻度が低いためであると考えられ、陽性細胞を濃縮する方法を検討こと、4:未検討のモノクロナル抗体についてそれらの反応性を調べ、筋前駆細胞特異的抗原のマーカー系列を作成すること、などが挙げられる。

#### E. 結論

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んだ。また、C2/4 筋芽細胞反応性の興味あるモノクロナル抗体を得た。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Miyazawa, H. et al: Structure and promoter region of the surface membrane protein HS9 gene expressed on thymic epithelial cells. B.B.A., 1444:407-411, 1999.
2. Hoq, Md. M. et al: Insufficient resistance of trehalose-6,

6'-dimycolate-treated T-cell receptor  $\delta$  gene mutant (TCR $\delta^{-/-}$ ) mice against influenza virus infection. Microbiol. Immunol., 43:491-493, 1999.

3. Kawakami, N. et al: Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the thymus. J. Immunol., 163:3211-3216, 1999.
4. Kawakami, N. et al: Green fluorescent protein-transgenic mouse: Immune functions and its application to the studies of lymphocyte development. Immunol. Lett., 70:165-171, 1999.
5. Kohama, Y. et al: Immunostimulatory oligonucleotide induces Th-1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. J. Allergy Clin. Immunol., 104:1231-1238, 1999.
6. Yamada, E. et al: Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK. B.B.A., 1495:250-262, 2000.
7. Iwao, M. et al: Thymic atrophy in laminin-alpha-2 chain deficient mice is a result of selective death of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> immature thymocytes. Immunology, (in press), 2000.

ほか 2 編

##### 学会発表

1. 坂根直樹他: 胎児肝細胞の胎児胸腺への移行に関する接着分子の解析 日本薬学会 1999
2. 青木賢二他: IL18 産生腫瘍細胞による抗腫瘍免疫の誘導 日本薬学会 1999
3. 辻川和丈他: マウス CGRP 受容体のクローニングと Th 細胞における発現 日本薬学会 1999
4. H. Yamamoto 他: Thymus atrophy in the laminin alpha-2 gene deficient mouse. FASEB 1999
5. 坂根直樹他: マウス胸腺への細胞移行の解析 9th Kyoto T Cell Conference 1999
6. 一條智子他: 受容体型 PTPase LAR による INS-R と Fyn のチロシン脱リン酸化 日本生化学会 1999
7. 辻川和丈他: 抗 LAR P-subunit モノクローナル抗体の作製と特性 日本生化学会 1999
8. 小濱靖弘他: 免疫応答刺激性 DNA 投与による杉花粉 allergy の制御 日本アレルギー学会 1999
9. 岩尾睦美他: ラミニンのマウス胸腺内分布 日本免疫学会 1999
10. 坂根直樹他: T 前駆細胞の胸腺への移入に必要な接着分子の差異 日本免疫学会 1999
11. 常世田好司他: T 細胞における NPY のシグナル伝達経路の解析 日本免疫学会 1999
12. 宮内浩典他: 機能的 CGRP 受容体のマウス T 細胞における発現 日本免疫学会 1999

ほか 4 報