

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を

実現するための基盤的研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成14年(2002)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を実現するための基盤的研究	----- 1
武田 伸一	
II. 分担研究報告	
1. ウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入法の開発	----- 9
武田 伸一	
2. アデノウイルスベクターの導入によるユートロフィン発現の分子機構	----- 13
鈴木 友子	
3. 抗原受容体を介する免疫細胞不活化と免疫寛容	----- 16
渡邊 武	
4. 筋ジストロフィーの治療用モデル動物の開発	----- 18
埜中 征哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 22

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を実現するための基盤的研究

主任研究者 武田 伸一
国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
分担研究者 鈴木 友子
国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
渡邊 武
九州大学 生体防御医学研究所
埜中 征哉
国立精神・神経センター 武蔵病院

研究要旨

1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、ジストロフィンを欠損した *mdx* 骨格筋に対する遺伝子導入を行ったところ、強い免疫応答が誘導されたため、免疫担当細胞における遺伝子発現を考慮して骨格筋特異的な MCK プロモーターを採用したところ、遺伝子発現の延長が観察された。一方、AAV ベクターに組み込み可能で、しかも十分な機能を持つマイクロ・ジストロフィン遺伝子を得るために transgenic *mdx* マウスを作製して、その機能を検定した結果、rod repeat を4個持つ CS1 micro-dystrophin が十分な機能を持つことが判明した。そこで、CS1 micro-dystrophin を AAV ベクターに組み込み、*mdx* マウス骨格筋に導入したところ、長期間のマイクロ・ジストロフィン遺伝子の発現が観察された。
2. 新生仔 *mdx* マウス骨格筋において、アデノウイルスベクターの導入によって引き起こされたユートロフィンの筋鞘での発現に関しては、IL-6 による転写の活性化が関与していることを明らかにした。ユートロフィンの3種類の転写産物、A, A', B の real time RT-PCR を用いた解析から、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増強には、ユートロフィン mRNA の安定化が関与していることが明らかになった。
3. 未熟B細胞株 WEHI231 細胞で BCR 刺激後、早期に発現誘導される新規遺伝子をクローニングし、iWH37 と名付け、同分子がB細胞の apoptosis に関与する可能性があることを見出した。
4. 国立精神・神経センター内に、筋ジストロフィー犬を飼育し、同犬を用いた実験を行うための中型実験動物研究施設が設立され、筋ジストロフィー犬の飼育が開始された。筋ジストロフィー犬は、比較的早期から心電図の異常を呈し、心臓死する例があることから、筋ジストロフィーの心障害モデルとして、重要である。一方、前後肢の骨格筋と外眼筋では障害の程度が異なることが観察されたが、ユートロフィン mRNA の安定性が骨格筋によって異なることが障害度と関連する可能性がある。

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子の変異による X-連鎖性の進行性筋疾患である。DMD に対する有効な治療法はなく、ウイルスベクターを用いた dystrophin cDNA の遺伝子導入が有効な治療法の一つと考えられる。しかし、DMD に対して遺伝子治療法を開発するためには、骨格筋に対する遺伝子導入効率の高いウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行うことが重要であるが、ホストにおける免疫寛容を誘導する必要がある。

ある。しかも、治療法を開発するためには、適切な治療用のモデル動物を開発する必要がある。そこで、主任研究者の武田は、以下のように分担研究者と協力して研究を推進した。

分担研究者としての武田は、免疫原性が低く、導入遺伝子の長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療についての研究を行った。

一方、分担研究者の鈴木は、主任研究者の武田と骨格筋に対する高い導入効率を持つアデノウイ

ルスベクターを用いて研究を進める内に、興味深い事実を見出した。筋ジストロフィーモデルである *mdx* マウス骨格筋にアデノウイルスベクターを導入したところ、筋変性および再生筋線維に認められる中心核線維が減少し、表現型が改善していることを見出した。この現象はアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った場合に、遺伝子産物に対する免疫反応が起こり、ジストロフィンのホモログであるユートロフィンの発現が増強されるためであることを明らかにした(Hum Gene Ther 11: 669-680, 2000)。そこで免疫応答の過程でどのサイトカインが関与しているのかを明らかにし、さらにユートロフィン発現増強の分子機構に注目して検討を行った。

分担研究者の渡邊は、遺伝子治療の実現のために必要な免疫寛容の誘導を巡って、以下のような研究を行った。すなわち、未熟B細胞ではB細胞抗原受容体(BCR)刺激によりアポトーシスが生ずることが知られている。これは自己抗原に反応する免疫細胞の除去による寛容誘導機構の一つと考えられている。本研究ではBCRからのシグナルによるB細胞活性化の負の制御の分子機構について解析を行った。

最後に、分担研究者の埜中は、主任研究者である武田と協力して、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確立を図ることを目標に研究を推進した。

B. 研究方法

1. AAVベクターを用いた遺伝子導入(武田)

(1) 長期発現が可能なAAVベクターの開発

Ubiquitousな発現が可能なCMVプロモーター下で*LacZ*遺伝子を発現するAAVベクター(AAV-CMV-*LacZ*)を正常C57BL10(B10)マウス及び*dystrophin*が欠損した*mdx*骨格筋へ導入した。*mdx*骨格筋では強い免疫応答が観察されたため、筋特異的な*muscle creatine kinase*(MCK)プロモーター下で*LacZ*遺伝子を発現するAAVベクターをB10骨格筋、*mdx*骨格筋導入し、その発現効率を検討した。

(2) 機能的な*micro-dystrophin* cDNAの開発

AAVベクターへ挿入可能な、小型で機能的な*dystrophin*遺伝子を得るために、ロッド・リピートをそれぞれ4, 3, 1個持つ3種類のロッド短縮型

micro-dystrophin CS1 (4.9 kb), AX11 (4.4 kb), M3 (3.7 kb) cDNAを作製した。各*micro-dystrophin*の機能を検定するために、*micro-dystrophin-transgenic*(Tg) *mdx*マウスを作製し、血清CK値と骨格筋病理像、電気生理学的な張力発生を指標として各マウスの解析を行った。

(3) 治療用AAVベクターの作製と*mdx*マウス骨格筋への遺伝子導入

AAVベクターへの挿入可能サイズは4.9 kb以下であることから、*micro-dystrophin* CS1 cDNAの5', 3'-非翻訳領域、及び*alternative splicing*を生じている*exon* 71-78を欠失させた Δ CS1 cDNA (3.8 kb)を作製した。これをMCKプロモーター(0.6 kb)に連結した治療用AAVベクターを作製し、*mdx*骨格筋へ導入した。

2. アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強(鈴木)

C57BL/10及び*mdx*マウスを用い、アデノウイルスベクター(AxCALacZ; 5×10^7 pfu)を含む6 μ l PBSを1週齢マウスの右後肢前脛骨筋(TA)に注射した。また、IL-6は800 ngを6 μ l PBSに溶解し、2週齢マウスの右TAに1日1回、5日間連続注射した。IL-6機能を阻害するため、吉崎博士(阪大院、医、健康医学第一)から供与を受けたラット抗マウスIL-6レセプターモノクローナル抗体を100 μ l PBSに溶解し、AxCALacZ投与前に腹腔内投与を行った。ユートロフィンmRNAの定量は、A、A'、B-ユートロフィン転写産物および3種ユートロフィン共通配列に対するプライマーおよびTaqManプローブを設計し、Real time RT-PCR(ABI PRISM 7700)にて行った。内部標準としてGAPDHを用い、得られた値を標準化した。

3. 免疫寛容の誘導(渡邊)

未熟B細胞株WEHI231細胞ではBCRシグナルによりアポトーシスが誘導される。そこでBCR刺激後、比較的早期にWEHI231細胞に誘導される遺伝子の検索を行い、見つかった新規タンパクのcDNAを、iWH37と名付けた。

4. 新たな治療用モデル動物(埜中)

(1) 国立精神・神経センター内に筋ジストロフィー犬を飼育し、実験するためのコロニーを確立する。

(2) 筋ジストロフィー犬のコロニーを既に設立し

ている米国のミズーリ州、コロンビア獣医大学の Dr. Kornegay 及び西オーストラリア州パース市郊外のマードック大学獣医学部の Dr. Howell と密接な連絡をとり、筋ジストロフィー犬に関する情報を収集する。

(3) 実験動物中央研究所及び中外医科学研究所(旧 CSK リサーチパーク)と協力して、筋ジストロフィー犬の繁殖を国内の施設で進め、筋ジストロフィー犬の遺伝子診断、生育状況の把握に努める。

C. 研究成果

1. AAV ベクターを用いた遺伝子導入(武田)

(1) 長期発現が可能な AAV ベクターの開発

正常 B10 マウス骨格筋における AAV-CMV-LacZ による β -galactosidase (β -gal) の発現は、8 週後まで維持された。一方、*dystrophin* が欠損した *mdx* 骨格筋では、4 週後、 β -gal 発現は急速に低下した。導入 4 週後の *mdx* 骨格筋では、 β -gal 陽性線維の周辺に CD4, CD8 陽性細胞を含む強い細胞浸潤が認められ、 β -gal に対する IgG が多量に検出された。*mdx* 骨格筋における免疫応答の賦活化に、抗原提示細胞内での導入遺伝子の発現の関与が考えられたことから、筋特異的な *muscle creatine kinase* (MCK) プロモーター下で *LacZ* 遺伝子を発現する AAV ベクターを導入した所、B10 骨格筋では少なくとも 24 週間 β -gal 発現は維持された。一方、*mdx* 骨格筋では、MCK プロモーターを使用しても、導入 8 週後には、 β -gal 発現の低下が認められたことから、*mdx* 筋線維からの抗原放出が免疫応答を賦活化した可能性が考えられた。

(2) 機能的な *micro-dystrophin* cDNA の開発

M3-Tg *mdx* マウスでは筋ジストロフィーの表現型の改善は認められなかったが、CS1-Tg *mdx* マウスでは筋張力を含む全ての指標において、正常 B10 マウスと有意差がないレベルまで回復が見られた。一方、AX11-Tg *mdx* マウスでは、M3-と CS1 の中間的な改善が観察された。

(3) 治療用 AAV ベクターの作製と *mdx* マウス骨格筋への遺伝子導入

micro-dystrophin CS1 cDNA の 5', 3'-非翻訳領域及び *exon* 71-78 を欠失させた Δ CS1 cDNA (3.8 kb) を、MCK プロモーター (0.6 kb) に連結した治療用 AAV ベクターを作製し、*mdx* 骨格筋へ導入した

ところ、8 週後の時点でも *micro-dystrophin* の発現が確認された。

2. アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強(鈴木)

免疫応答に関与するサイトカインの中でも IL-6 は新生仔 *mdx* マウスの筋形質膜におけるユートロフィン発現を増強することを見出した。抗 IL-6 レセプター抗体を投与すると、アデノウイルスベクターによる筋形質膜におけるユートロフィンの発現増強が抑制されたことから、アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強には IL-6 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった(Hum Gene Ther, 13: 509-518, 2002)。次に IL-6 によるユートロフィンの発現増強が転写レベルかどうか TaqMan 定量的 RT-PCR を用いて検討した。ユートロフィンの転写産物には 5' 端の違いにより、A-, A'-および B- ユートロフィンの 3 種類が存在するが、IL-6 は A-ユートロフィン mRNA 発現のみを一過性に増大させた。一方、アデノウイルスベクターは、導入 4 週後まで 3 種すべてのユートロフィン mRNA 発現を増大させた。したがって、IL-6 は主にプロモーター A の活性化を介して、ユートロフィンの転写活性を誘導する可能性が示された。一方、アデノウイルスベクター導入によるユートロフィン発現増強には、おそらくユートロフィン mRNA の安定化が関与することが示唆された。

3. 免疫寛容の誘導(渡邊)

iWH37 はタンパク-タンパク相互作用に機能すると考えられている SAM domain を持つ新規のタンパクである。この WEHI231 細胞のアポトーシス誘導には、BCR からのシグナルによる新規の遺伝子 iWH37 の発現とタンパクの合成が必須であり、そのタンパクがミトコンドリアを標的とすることが明らかになった。静止期の WEHI231 細胞では iWH37 のメッセージは認められないが、BCR 刺激後、4-8 時間で強く発現が誘導された。一方、成熟 B 細胞、成熟 T 細胞では静止期においてメッセージがすでに存在するが、BCR 刺激により、急速に減少した。iWH37 を強制発現させると、生存細胞では細胞質に局在しているが、アポトーシスに陥った細胞ではミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア膜上のイオンチャンネル

である VDAC,および BAK と結合するがわかった。iWH37 を Cos7 細胞に強発現すると、ミトコンドリアに iWH37 が局在した場合は細胞死が誘導された。ドキサイクリン(テトラサイクリン)誘導型発現ベクターに iWH37 の cDNA を挿入して、WEHI231 細胞に組み込んで発現させた後、そのような WEHI231 細胞にドキサイクリンを添加して iWH37 の cDNA を発現させると、細胞内のミトコンドリア膜電位の低下が観察され細胞死が誘導された。

4. 新たな治療用モデル動物(楚中)

(1) 厚生労働省によって国立精神・神経センター内に中型実験動物研究施設が建設され、建家は平成13年3月に完成した。引き続き、施設内及び運営面の整備が進められ、11月より筋ジストロフィー犬の飼育が開始された。

(2) マードック大学の筋ジストロフィー犬施設へ、平成13年7月と平成14年2月の二度にわたって研究者を派遣し、筋ジストロフィー犬の飼育に関する情報の収集を行った。一方、平成14年1月、マードック大学獣医学部から Dr. Howell を迎えて、中型実験動物研究施設及び中外医科学研究所を視察頂くと共にセミナーを開催した。

(3) Dr. Kornegay より平成7年に筋ジストロフィー犬の冷凍精子を譲り受けて、人工授精を始めてから、平成13年の末までの段階で、筋ジストロフィー犬22匹とキャリア犬18匹の作出に成功している。この間、状態が良好な筋ジストロフィー犬の精子を用いて、雌のビーグル犬との人工授精に成功した。これにより、筋ジストロフィー犬とキャリア犬の人工授精交配の道も拓け、より多数の筋ジストロフィー犬を得ることが可能となった。国立精神・神経センターの中型実験動物研究施設では、平成14年3月末の段階で筋ジストロフィー犬3匹、キャリア犬8匹が飼育され、コロニーの構築と病態の研究を行っている。

(4) 筋ジストロフィー犬の兆候としては、骨格筋、特に四肢、側頭筋、腰部の骨格筋の萎縮及び拘縮、自発運動の減少、流涎が観察された。さらに顎関節の拘縮及び巨舌により飼料の摂取及び飲水が困難な個体が散見され、それらの個体では顕著な羸瘦及び脱水も観察された。筋ジストロフィー犬について心電図測定を行った結果、5カ月齢の個

体において心電図のII, III, aVf 誘導におけるQ波の増大が認められた。これまでに7例の筋ジストロフィー犬の死亡があった(出生直後2例、7カ月齢2例、8カ月齢1例、9カ月齢1例、10カ月齢1例)が、それらの死因については、経過および剖検所見より多くは心不全によるものと考えられた。

生検、剖検を用いた骨格筋の検索では、前後肢骨格筋の変性及び再生像が観察され、免疫組織化学的検討によって筋鞘のジストロフィンを欠損していることが明らかになった。一方、外眼筋では、他の骨格筋に比較して病理変化が軽度で、特にユートロフィンが強く発現していることが明らかになり、筋障害の程度とユートロフィン発現の関連性が示唆された。

D. 考察

1. AAVベクターを用いた遺伝子導入(武田)

(1) 長期発現が可能なAAVベクターの開発
AAVベクターを用いて遺伝子導入した場合に、*mdx*骨格筋において見出された免疫応答の賦活化については、*mdx*マウス骨格筋に浸潤している免疫相当細胞にAAVベクターが導入され、抗原提示細胞内での導入遺伝子の発現の関与が考えられたことから、筋特異的なMCKプロモーターの使用を考えた。しかし、それでも8週間には発現低下を生じたことから、*mdx*骨格筋には筋変性を生じているため、*mdx*筋線維からの抗原放出が免疫応答を賦活化した可能性が考えられた。したがって、治療用遺伝子をMCKプロモーターを用いて発現させれば、より長期間の発現が期待できる。

(2) 機能的なmicro-dystrophin cDNAの開発
transgenic *mdx*マウスの解析結果から、治療用遺伝子としてロッド・リピート4個を持つmicro-dystrophin CS1 cDNAが有効であることが示された。AX11, M3との比較からは、リピート数あるいは前半の4リピートが特に重要である可能性が示されたといえる。

(3) 治療用AAVベクターの作製と*mdx*マウス骨格筋への遺伝子導入

AAV- Δ CS1により、8週間に及ぶ長期の発現が確認されたことから、機能の修復状態について検定する必要がある。今後、筋ジストロフィー犬へ導入して効果を検定し、DMDに対する治療用プロ

トコルを提出したいと考えている。

2. アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強 (鈴木)

これらの結果から、IL-6 は主にプロモーターA の活性化を介して、ユートロフィンの転写活性を誘導する可能性が示された。一方、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には、ユートロフィン mRNA の安定化が関与することが示唆された。今後、ユートロフィン mRNA の安定化の機構を検討することは、新たな筋ジストロフィー治療のための方法論を提出させるばかりでなく、病態の分子機構を明らかにする可能性がある。

3. 免疫寛容の誘導 (渡邊)

WEHI231 細胞では、iWH37 は BCR 刺激により誘導されることから、新規タンパク iWH37 は自己抗原と反応する未熟B細胞の抗原特異的な細胞死の誘導に関与する分子と考えられる。この iWH37 分子の *in vivo* での機能、特に B 細胞選択における役割、および他の apoptosis 関連遺伝子との関連を明らかにするため、トランスジェニックマウス、ジーンターゲティングマウスの作製を行っている。

4. 新たな治療用モデル動物 (埜中)

国立精神・神経センター内に筋ジストロフィー犬を飼育し、同犬を用いた実験を行うための中型実験動物研究施設が設立され、実際に筋ジストロフィー犬の飼育が開始されたことから、今後の課題は、筋ジストロフィー犬の病態の把握と、治療研究に移ったと言える。筋ジストロフィー犬の病態に関しては、次の二点が注目される。

- ① 骨格筋障害
- ② 心筋障害

前者に関しては、前後肢の骨格筋と外眼筋では障害の程度が異なることが重要である。この差は、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) でも認められ、ユートロフィンの発現の差によるのではないかとされているが、解決を見ていない。ユートロフィン mRNA の安定性が骨格筋の部位によって異なることが障害度と関連している可能性があるため、筋ジストロフィー犬が中型動物であって、外眼筋を採取しやすいことを活かして研究を進めたい。

後者に関しては、最近DMDの死因としても問題になっている。しかし、これまで使われてきたジストロフィン欠損による *mdx* マウスは、その大きさからしても、心循環器系について、研究するには困難があった。今回、筋ジストロフィー犬に心不全を呈する例が見出されたことは、筋ジストロフィーによる心症状及びそれに対する方策を研究するのに、よいモデル動物が得られた可能性を呈示する。臨床的には、不整脈が、分子病態学的には、冠血管の拡張障害が考えられるので今後研究を進めたい。

一方、治療研究に関しては、これまでマウスモデルを利用して、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療研究、及び幹細胞を用いた細胞移植治療研究が行われてきた。筋ジストロフィー犬は、その良い対象であり、今後アデノ随伴ウイルスベクターの導入および、筋ジストロフィー犬骨髄からの幹細胞の採取を手始めとして、研究を行う予定である。

E. 結論

1. AAV ベクターを用いた遺伝子導入 (武田)

- (1) 骨格筋特異的な MCK プロモーターを AAV ベクターに組み込むことにより、*mdx* 骨格筋でも、導入遺伝子産物の発現増強が観察された。
- (2) transgenic *mdx* マウスを用いた検定により、rod repeat を 4 個、hinge を 3 個持つ CS1 micro-dystrophin が十分な機能を有することが明らかになった。
- (3) CS1 micro-dystrophin を AAV ベクターに組み込み、MCK プロモーターを用いて発現させると、*mdx* 骨格筋でも長期間の発現が観察された。

2. アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強 (鈴木)

- (1) 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増強機構には、IL-6 による転写の活性化が関与していた。
- (2) ユートロフィンの発現増強の分子機構を明らかにするためには、mRNA の安定化の機構を検討する必要がある。

3. 免疫寛容の誘導 (渡邊)

BCR 刺激後早期に WEHI231 細胞に誘導される遺

伝子を同定し、iWH37 と命名した。さらにこの分子が B 細胞の apoptosis に関与する可能性があることを見出した。

4. 新たな治療用モデル動物 (埜中)

(1) 国立精神・神経センター内に中型実験動物研究施設が設立され、筋ジストロフィー犬の飼育が開始された。

(2) 筋ジストロフィー犬は、比較的早期から心電図の異常を呈し、心臓死する例があることから、筋ジストロフィーの心障害モデルとして、重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

< 英文 >

1. Takeda S and Miyagoe-Suzuki Y:
Gene Therapy for Muscular Dystrophies:
Current Status and Future Prospects
BioDrugs 15: 635-644, 2001
2. Hoshino S, Ohkoshi N, Ishii A, Kameya S, Takeda S, and Shoji S:
The expression of dystrophin and $\alpha 1$ -syntrophin during skeletal muscle regeneration
J Muscle Res Cell Motil 22: 185-191, 2001
3. Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, and Takeda S:
Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin $\alpha 2$ chain-null mutant (dy^{3K}/dy^{3K}) mice
Glia 35: 101-110, 2001
4. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K:
Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain by stimulating ubiquitin-dependent proteolysis
FASEB J 15(7): 1279-1281, 2001
5. Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, Kaga K, Kondo S, Morita S, Kitamura T, Matsuda R:

Negamaycin can restore dystrophin in *mdx* skeletal muscle

Acta Myologica XX: 154-158, 2001

6. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K:
Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification
Developmental Biology 241(2):313-26, 2002
7. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T:
Proapoptotic effect of presenilin2 overexpression is mediated by downregulation of Bcl-2 in cultured neurons
J Neurochem 79(6) 1161-8, 2001
8. Nakagawa M, Ikezoe K, Miyagoe-Suzuki Y, Nonaka I, and Takeda S:
Increased membrane permeability in early postnatal period of laminin $\alpha 2$ chain-null mice, dy^{3K}/dy^{3K}
Acta Myologica XX: 167-173, 2001
9. Miyagoe-Suzuki Y, and Takeda S:
Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with $\alpha 1$ -syntrophin at the sarcolemma
Microscopy Research and Technique 55: 164-170, 2001
10. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:
Interleukin-6 Induces Over-Expression of the Sarcolemmal Utrophin in Neonatal *mdx* Skeletal Muscle
Human Gene Therapy 13: 509-518, 2002
11. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H:
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice
J Cell Sci 115: 1285-1293, 2002
12. Inobe M, Inobe I, Adams G R, Baldwin K M and Takeda S:
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle

- J Appl Physiol* (in press)
13. Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N and Ikeda S:
Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in *mdx* mice hearts by physiological exercise.
FEBS Letter (in press)
 14. M.Jutel, T. Watanabe, S.Klunker, M. Akdis, O.A.R. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R.Koga, T. Kobayashi, K. Blser, C.A. Akdis:
Histamine regulates T cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors.
Nature 413: 420-425, 2001
 15. Z-Li Huang, W-M. Qu, W-D. Li, T. Mochizuki, N. Eguchi, T. Watanabe, Y. Urade and O. Hayaishi:
Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9965-9970, 2001.
 16. M. Kubokawa, M. Nakashima, T. Yao, K-I. Ito, N. Harada, H. Nawata and T. Watanabe:
Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer.
Int. J. Oncology. 19:695-700, 2001
 17. M. Izumi, Y.Nakanishi, M. Nakashima, N.Hara, and T. Watanabe:
Expression of tumor associated antigen RCAS1 is significantly correlated with poor prognosis in non small cell lung cancer.
Cancer 92 (2): 446-451, 2001
 18. K. Oshima, K.Muta, M.Nakashima, S.Haraoka, K.Tutiya, J.Suzumiya, C.Kawasaki, T.Watanabe, M.Kikuchi:
Expression of human tumor-associated antigen RCAS1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein-Barr virus infection. A potential mechanism of immune evasion.
Int. J. Cancer. 93:91-96, 2001
 19. T.Yuasa, M.Ono, T.Watanabe and T.Takai:
Lyn is essential for Fcγ receptor III-mediated systemic anaphylaxis but not for the Arthus reaction.
J. Exp. Med. 193 (5): 563-571, 2001
 20. T. Matsushima, M.Nakashima, K.Oshima, Y.Abe, J.Nishimura, H.Nawata, T.Watanabe and K.Muta:
RCAS1: A novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells.
Blood 96:313-321, 2001
 21. K. Ohshima, M. Nakashima, K. Sonoda, M. Kikuchi and T. Watanabe:
Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy; the possible role in immune privilege.
Clin. Exp. Immunol. 123: 481-486, 2001.
 22. T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata:
Targeted disruption of histamine H1 receptor attenuated regulatory effect of leptin on feeding behavior, adiposity and UCP family expression in mice.
Diabetes 50: 385-391, 2001
 23. T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata:
Central infusion of histamine reduced fat accumulation and increased UCP family expression in leptin resistant obese mice.
Diabetes 50: 376-384, 2001
 24. Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I.
Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease.
Neurology, in press
 25. Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RE, Iannaccone S, Dalakas, MC, Yamada Y.
Structural and functional mutations of the Perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia
Am J Hum Genet, in press
 26. Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tashikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa

H, Toda T.

Deficiency of α -dystroglycan in muscle-eye-brain disease.

Biochem Biophys Res Commun 291: 1283-1286, 2002

27. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y.

Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy.

Neurology 58: 323-325, 2002.

28. Ikemoto-Tsuchiya K, Nishino I, Kawai M, Morimatsu M, Nonaka I.

A new form of muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities.

Muscle Nerve 24: 1710-1711, 2001.

29. Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I.

Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease.

Neurology 57: 903-905, 2001.

30. Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I.

Danon disease and related disorders.

Acta Myologica 20:120-124, 2001

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入法の開発

分担研究者 武田伸一 国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、ジストロフィンを欠損した *mdx* 骨格筋に対する遺伝子導入を行ったところ、強い免疫応答が誘導されたため、免疫担当細胞における遺伝子発現を考慮して骨格筋特異的な MCK プロモーターを採用したところ、遺伝子発現の延長が観察された。
2. AAV ベクターに組み込み可能で、しかも十分な機能を持つマイクロ・ジストロフィン遺伝子を得るために *transgenic mdx* マウスを作製して、その機能を検定した。その結果、rod repeat を 4 個持つ CS1 *micro-dystrophin* が十分な機能を持つことが判明した。
3. CS1 *micro-dystrophin* を AAV ベクターに組み込み、*mdx* マウス骨格筋に導入したところ、長期間のマイクロ・ジストロフィン遺伝子の発現が観察された。

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子の変異による X-連鎖性の進行性筋疾患である。DMD に対する有効な治療法はなく、ウイルスベクターを用いた *dystrophin* cDNA の遺伝子導入が有効な治療法の一つと考えられる。我々は、免疫原性が低く、導入遺伝子の長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療についての研究を行った。

B. 研究方法

(1) 長期発現が可能な AAV ベクターの開発

Ubiquitous な発現が可能な CMV プロモーター下で *LacZ* 遺伝子を発現する AAV ベクター (AAV-CMV-*LacZ*) を正常 C57BL10 (B10) マウス及び *dystrophin* が欠損した *mdx* 骨格筋へ導入した。*mdx* 骨格筋では強い免疫応答が観察されたため、筋特異的な *muscle creatine kinase* (MCK) プロモーター下で *LacZ* 遺伝子を発現する AAV ベクターを B10 骨格筋、*mdx* 骨格筋導入し、その発現効率を検討した。

(2) 機能的な *micro-dystrophin* cDNA の開発

AAV ベクターへ挿入可能な、小型で機能的な *dystrophin* 遺伝子を得るために、ロッド・リピートをそれぞれ 4, 3, 1 個持つ 3 種類のロッド短縮型 *micro-dystrophin* CS1 (4.9 kb), AX11 (4.4 kb), M3

(3.7 kb) cDNA を作製した。各 *micro-dystrophin* の機能を検定するために、*micro-dystrophin-transgenic* (Tg) *mdx* マウスを作製し、血清 CK 値と骨格筋病理像、電気生理学的な張力発生を指標として各マウスの解析を行った。

(3) 治療用 AAV ベクターの作製と *mdx* マウス骨格筋への遺伝子導入

AAV ベクターへの挿入可能サイズは 4.9 kb 以下であることから、*micro-dystrophin* CS1 cDNA の 5', 3'-非翻訳領域、及び *alternative splicing* を生じている exon 71-78 を欠失させた Δ CS1 cDNA (3.8 kb) を作製した。これを MCK プロモーター (0.6 kb) に連結した治療用 AAV ベクターを作製し、*mdx* 骨格筋へ導入した。

C. 研究成果

(1) 長期発現が可能な AAV ベクターの開発

正常 B10 マウス骨格筋における AAV-CMV-*LacZ* による β -galactosidase (β -gal) の発現は、8 週後まで維持された。一方、*dystrophin* が欠損した *mdx* 骨格筋では、4 週後、 β -gal 発現は急速に低下した。導入 4 週後の *mdx* 骨格筋では、 β -gal 陽性線維の周辺に CD4, CD8 陽性細胞を含む強い細胞浸潤が認められ、 β -gal に対する IgG が多量に検出された。*mdx* 骨格筋における免疫応答の賦活化に、抗原提示細胞内での導入遺伝子の発現の関与が考え

られたことから、筋特異的な muscle creatine kinase (MCK) プロモーター下で *LacZ* 遺伝子を発現する AAV ベクターを導入した所、B10 骨格筋では少なくとも 24 週間 β -gal 発現は維持された。一方、*mdx* 骨格筋では、MCK プロモーターを使用しても、導入 8 週間後には、 β -gal 発現の低下が認められたことから、*mdx* 筋線維からの抗原放出が免疫応答を賦活化した可能性が考えられた。

(2) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発

M3-Tg *mdx* マウスでは筋ジストロフィーの表現型の改善は認められなかったが、CS1-Tg *mdx* マウスでは筋張力を含む全ての指標において、正常 B10 マウスと有意差がないレベルまで回復が見られた。一方、AX11-Tg *mdx* マウスでは、M3-と CS1 の中間的な改善が観察された。

(3) 治療用 AAV ベクターの作製と *mdx* マウス骨格筋への遺伝子導入

micro-dystrophin CS1 cDNA の 5', 3'-非翻訳領域及び expn 71-78 を欠失させた Δ CS1 cDNA (3.8 kb) を、MCK プロモーター (0.6 kb) に連結した治療用 AAV ベクターを作製し、*mdx* 骨格筋へ導入したところ、8 週間後の時点でも micro-dystrophin の発現が確認された。

D. 考察

(1) 長期発現が可能な AAV ベクターの開発

AAV ベクターを用いて遺伝子導入した場合に、*mdx* 骨格筋において見出された免疫応答の賦活化については、*mdx* マウス骨格筋に浸潤している免疫相当細胞に AAV ベクターが導入され、抗原提示細胞内での導入遺伝子の発現の関与が考えられたことから、筋特異的な MCK プロモーターの使用を考えた。しかし、それでも 8 週間後には発現低下を生じたことから、*mdx* 骨格筋には筋変性を生じているため、*mdx* 筋線維からの抗原放出が免疫応答を賦活化した可能性が考えられた。したがって、治療用遺伝子を MCK プロモーターを用いて発現させれば、より長期間の発現が期待できる。

(2) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発

transgenic *mdx* マウスの解析結果から、治療用遺伝子としてロッド・リピート 4 個を持つ micro-dystrophin CS1 cDNA が有効であることが示された。AX11, M3 との比較からは、リピート数あるいは前半の 4 リピートが特に重要である可能性が

示されたといえる。

(3) 治療用 AAV ベクターの作製と *mdx* マウス骨格筋への遺伝子導入

AAV- Δ CS1 により、8 週間に及ぶ長期の発現が確認されたことから、機能の修復状態について検定する必要がある。今後、筋ジストロフィー犬へ導入して効果を検定し、DMD に対する治療用プロトコルを提出したいと考えている。

E. 結論

(1) 骨格筋特異的な MCK プロモーターを AAV ベクターに組み込むことにより、*mdx* 骨格筋でも、導入遺伝子産物の発現増強が観察された。

(2) transgenic *mdx* マウスを用いた検定により、rod repeat を 4 個、hinge を 3 個持つ CS1 micro-dystrophin が十分な機能を有することが明らかになった。

(3) CS1 micro-dystrophin を AAV ベクターに組み込み、MCK プロモーターを用いて発現させると、*mdx* 骨格筋でも長期間の発現が観察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Takeda S and Miyagoe-Suzuki Y: Gene Therapy for Muscular Dystrophies: Current Status and Future Prospects *BioDrugs* 15: 635-644, 2001
2. Hoshino S, Ohkoshi N, Ishii A, Kameya S, Takeda S, and Shoji S: The expression of dystrophin and α 1-syntrophin during skeletal muscle regeneration *J Muscle Res Cell Motil* 22: 185-191, 2001
3. Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, and Takeda S: Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin α 2 chain-null mutant (*dy^{3K}/dy^{3K}*) mice *Glia* 35: 101-110, 2001

4. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K:
Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain by stimulating ubiquitin-dependent proteolysis
FASEB J 15(7): 1279-1281, 2001
 5. Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, Kaga K, Kondo S, Morita S, Kitamura T, Matsuda R:
Negamycin can restore dystrophin in *mdx* skeletal muscle
Acta Myologica XX: 154-158, 2001
 6. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K:
Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification
Developmental Biology 241(2):313-26, 2002
 7. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T:
Proapoptotic effect of presenilin2 overexpression is mediated by downregulation of Bcl-2 in cultured neurons
J Neurochem 79(6) 1161-8, 2001
 8. Nakagawa M, Ikezoe K, Miyagoe-Suzuki Y, Nonaka I, and Takeda S:
Increased membrane permeability in early postnatal period of laminin $\alpha 2$ chain-null mice, *dy^{3K/dy^{3K}}*
Acta Myologica XX: 167-173, 2001
 9. Miyagoe-Suzuki Y, and Takeda S:
Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with $\alpha 1$ -syntrophin at the sarcolemma
Microscopy Research and Technique 55: 164-170, 2001
 10. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:
Interleukin-6 Induces Over-Expression of the Sarcolemmal Utrophin in Neonatal *mdx* Skeletal Muscle
Human Gene Therapy 13: 509-518, 2002
 11. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H:
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice
J Cell Sci 115: 1285-1293, 2002
 12. Inobe M, Inobe I, Adams G R, Baldwin K M and Takeda S:
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle
J Appl Physiol (in press)
 13. Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N and Ikeda S:
Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in *mdx* mice hearts by physiological exercise.
FEBS Letter (in press)
- < 和 文 >
1. 宮越友子、武田伸一：
筋衛星（サテライト）細胞と遺伝子性筋疾患の遺伝子治療
神経研究の進歩 45: 54-62, 2001
 2. 武田伸一：
ポストゲノム医療の展望：総論
神経疾患
日本臨床 59: 19-30, 2001
 3. 武田伸一、坂本美喜：
筋ジストロフィーに対する治療研究の進展
内科 87: 744-745, 2001
 4. 武田伸一、松尾雅文：
IV. 筋ジストロフィーの臨床と基礎の最前線：
責任遺伝子の解明とその臨床応用
脳と発達 33: 221-223, 2001
 5. 武田伸一：
筋ジストロフィーの遺伝子治療の展望
神経治療学 18(5/6): 475-480, 2001
 6. 吉田邦広、武田伸一：
ジストロフィノパチーによる X 連鎖性拡張型心筋症
日本臨床 領域別症候群 35: 23-27, 2001
 7. 中村昭則、武田伸一：

ジストロフィノパチーを伴うグリセロール
キナーゼ欠損症

日本臨床 領域別症候群 35: 28-30, 2001

8. 武田伸一 :
遺伝性筋疾患を巡る進歩－原因遺伝子の追
究と分子病態の解明から分子治療へ
最新医学 増刊 臨床遺伝子学'01 2182-
2194, 2001
9. 中川雅裕, 武田伸一 :
その他の筋ジストロフィー
小児内科 増刊 33: 750-1, 2001
10. 吉村まどか, 武田伸一 :
Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺
伝子治療
神経内科 56: 18-24, 2002
11. 尾嶋孝一, 武田伸一 :
筋疾患の遺伝子・再生治療,
神経・筋疾患の最新医療, 先端医療技術研
究所, pp241-246, 2001

II. 学会発表

1. Takeda S, Fujimori K, Yamamoto K, Miyagoe-
Suzuki Y, Yuasa K, Hosaka Y:
Interleukin-6 up-regulates utrophin expression in
mdx skeletal muscle.
American Society of Gene Therapy, Seattle, USA,
May 30-June 3, 2001
2. Takeda S, Fujimori K, Sakamoto M, Yuasa K,
Miyagoe-Suzuki Y:
New therapeutic approaches of muscular
dystrophy.
4th Colloque Franco-Japonais sur les
Dystrophies Musculaire: progrès vers la thérapie,
Paris, France, 15-16 June, 2001
3. 武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する治療法の進展
第 42 回日本神経学会総会 東京; 2001 年 5
月 13 日
4. 武田伸一 :
筋ジストロフィーの遺伝子治療の展望
第 19 回日本神経治療学会 東京; 2001 年 6
月 28 日
5. 武田伸一他 :
Administration of interleukin-6 up-regulates the
sarcolemmal utrophin in neonatal *mdx* skeletal

muscle

第 7 回日本遺伝子治療学会 東京; 2001 年 7
月 7 日

6. 湯浅勝敏他 :
Enhanced immune response inhibits long-term
expression of transferred gene products in adeno-
associated virus (AAV) vector-mediated gene
transfer into dystrophin-deficient *mdx* skeletal
muscle.
第 7 回日本遺伝子治療学会 東京; 2001 年 7
月 7 日
7. 武田伸一 :
筋疾患の再生と治療への展望
第 18 回小児神経筋疾患懇話会 東京; 2001
年 8 月 25 日
8. 伊藤由佳, 藤盛圭太, 鈴木友子, 吉崎和幸,
山元弘, 武田伸一 :
IL-6 投与による *mdx* マウス骨格筋における
ユートロフィンの発現増強
第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001
年 12 月 9 日
9. 平田彰, 増田智, 鈴木友子, 鎌倉恵子, 武
田伸一 :
cDNA array を用いた骨格筋変性再生過程に
おける遺伝子発現変化の検討
第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001
年 12 月 9 日
10. 坂本美喜, 湯浅勝敏, 吉村まどか, 横田俊
文, 田内亜紀, 鈴木友子, 武田伸一 :
短縮型ジストロフィン遺伝子は *mdx* マウス
の表現型を改善する
第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001
年 12 月 10 日
11. 横田俊文, 保坂幸男, 宮越(鈴木)友子,
松田良一, 武田伸一 :
 $\alpha 1$ -シントロフィンノックアウトマウスは筋
再生過程において神経筋接合部の異常及び筋
肥大を呈する
第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001
年 12 月 12 日

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

アデノウイルスベクターの導入によるユートロフィン発現の分子機構

分担研究者 鈴木友子 国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 室長

研究要旨

1. 新生仔 *mdx* マウス骨格筋において、アデノウイルスベクターの導入によって引き起こされたユートロフィンの筋鞘での発現に関しては、IL-6 による転写の活性化が関与していることを明らかにした。
2. ユートロフィンの3種類の転写産物、A, A', B の real time RT-PCR を用いた解析から、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増強には、ユートロフィン mRNA の安定化が関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

筋ジストロフィーモデルである *mdx* マウス骨格筋にアデノウイルスベクターを導入したところ、筋変性および再生筋線維に認められる中心核線維が減少し、表現型が改善していることを見出した。この現象はアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った場合に、遺伝子産物に対する免疫反応が起こり、ジストロフィンのホモログであるユートロフィンの発現が増強されるためであることを明らかにした(Hum Gene Ther 11: 669-680, 2000)。そこで免疫応答の過程でどのサイトカインが関与しているのかを明らかにし、さらにユートロフィン発現増強の分子機構に注目して検討を行った。

B. 研究方法

C57BL/10 及び *mdx* マウスを用い、アデノウイルスベクター(AxCALacZ; 5×10^7 pfu)を含む $6 \mu\text{l}$ PBS を1週齢マウスの右後肢前脛骨筋(TA)に注射した。また、IL-6は800 ngを $6 \mu\text{l}$ PBSに溶解し、2週齢マウスの右TAに1日1回、5日間連続注射した。IL-6機能を阻害するため、吉崎博士(阪大院、医、健康医学第一)から供与を受けたラット抗マウスIL-6レセプターモノクローナル抗体を $100 \mu\text{l}$ PBSに溶解し、AxCALacZ投与前に腹腔内投与を行った。ユートロフィン mRNA の定量は、A, A', B-ユートロフィン転写産物および3種ユートロフィン共通配列に対するプライマーおよびTaqManプローブを設計し、Real time RT-

PCR (ABI PRISM 7700)にて行った。内部標準としてGAPDHを用い、得られた値を標準化した。

C. 研究成果

免疫応答に関与するサイトカインの中でもIL-6は新生仔 *mdx* マウスの筋形質膜におけるユートロフィン発現を増強することを見出した。抗IL-6レセプター抗体を投与すると、アデノウイルスベクターによる筋形質膜におけるユートロフィンの発現増強が抑制されたことから、アデノウイルスベクターによるユートロフィン発現増強にはIL-6が重要な役割を果たしていることが明らかとなった(Hum Gene Ther, 13: 509-518, 2002)。次にIL-6によるユートロフィンの発現増強が転写レベルかどうかTaqMan定量的RT-PCRを用いて検討した。ユートロフィンの転写産物には5'端の違いにより、A-, A'-およびB-ユートロフィンの3種類が存在するが、IL-6はA-ユートロフィン mRNA 発現のみを一過性に増大させた。一方、アデノウイルスベクターは、導入4週後まで3種すべてのユートロフィン mRNA 発現を増大させた。したがって、IL-6は主にプロモーターAの活性化を介して、ユートロフィンの転写活性を誘導する可能性が示された。一方、アデノウイルスベクター導入によるユートロフィン発現増強には、おそらくユートロフィン mRNA の安定化が関与することが示唆された。

D. 考察

これらの結果から、IL-6 は主にプロモーターA の活性化を介して、ユートロフィンの転写活性を誘導する可能性が示された。一方、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には、ユートロフィン mRNA の安定化が関与することが示唆された。今後、ユートロフィン mRNA の安定化の機構を検討することは、新たな筋ジストロフィー治療のための方法論を提出させるばかりでなく、病態の分子機構を明らかにする可能性がある。

E. 結論

- (1) 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増強機構には、IL-6 による転写の活性化が関与していた。
- (2) ユートロフィンの発現増強の分子機構を明らかにするためには、mRNA の安定化の機構を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Takeda S and Miyagoe-Suzuki Y:
Gene Therapy for Muscular Dystrophies:
Current Status and Future Prospects
BioDrugs 15: 635-644, 2001
2. Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, and Takeda S:
Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin $\alpha 2$ chain-null mutant (dy^{3K}/dy^{3K}) mice
Glia 35: 101-110, 2001
3. Nakagawa M, Ikezoe K, Miyagoe-Suzuki Y, Nonaka I and Takeda S:
Increased membrane permeability in early postnatal period of laminin $\alpha 2$ chain-null mice, dy^{3K}/dy^{3K}
Acta Myologica XX: 167-173, 2001
4. Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S:
Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with $\alpha 1$ -syntrophin at the sarcolemma

Microscopy Research and Technique 55: 164-170, 2001

5. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:
Interleukin-6 Induces Over-Expression of the Sarcolemmal Utrophin in Neonatal *mdx* Skeletal Muscle
Human Gene Therapy 13: 509-518, 2002
6. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H:
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice
J Cell Sci 115: 1285-1293, 2002

< 和文 >

1. 宮越友子、武田伸一：
筋衛星（サテライト）細胞と遺伝子性筋疾患の遺伝子治療
神経研究の進歩 45: 54-62, 2001
- ## II. 学会発表
1. Takeda S, Fujimori K, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Hosaka Y:
Interleukin-6 up-regulates utrophin expression in *mdx* skeletal muscle.
American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, May 30-June 3, 2001
 2. Takeda S, Fujimori K, Sakamoto M, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y:
New therapeutic approaches of muscular dystrophy.
4th Colloque Franco-Japonais sur les Dystrophies Musculaire: progrès vers la thérapie, Paris, France, 15-16 June, 2001
 3. 武田伸一他：
Administration of interleukin-6 up-regulates the sarcolemmal utrophin in neonatal *mdx* skeletal muscle
第7回日本遺伝子治療学会 東京；2001年7月7日
 4. 湯浅勝敏他：
Enhanced immune response inhibits long-term

expression of transferred gene products in adeno-associated virus (AAV) vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient *mdx* skeletal muscle.

第7回日本遺伝子治療学会 東京；2001年7月7日

5. 伊藤由佳、藤盛圭太、鈴木友子、吉崎和幸、山元弘、武田伸一：
IL-6 投与による *mdx* マウス骨格筋におけるユートロフィンの発現増強
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月9日
6. 平田彰、増田智、鈴木友子、鎌倉恵子、武田伸一：
cDNA array を用いた骨格筋変性再生過程における遺伝子発現変化の検討
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月9日
7. 坂本美喜、湯浅勝敏、吉村まどか、横田俊文、田内亜紀、鈴木友子、武田伸一：
短縮型ジストロフィン遺伝子は *mdx* マウスの表現型を改善する
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月10日
8. 横田俊文、保坂幸男、宮越（鈴木）友子、松田良一、武田伸一：
 $\alpha 1$ -シントロフィンノックアウトマウスは筋再生過程において神経筋接合部の異常及び筋肥大を呈する
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月12日

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

抗原受容体を介する免疫細胞不活化と免疫寛容

分担研究者 渡邊 武
九州大学 生体防御医学研究所

研究要旨

1. 未熟B細胞株 WEHI231 細胞で BCR 刺激後、早期に発現誘導される新規遺伝子をクローニングし、iWH37 と名付けた。
2. 同分子が B 細胞の apoptosis に関与する可能性のあることを見出した。今後は、同分子の *in vivo* での機能、特に B 細胞選択における役割、および他の apoptosis 関連遺伝子との関連を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

未熟B細胞ではB細胞抗原受容体（BCR）刺激によりアポトーシスが生ずることが知られている。これは自己抗原に反応する免疫細胞の除去による寛容誘導機構の一つと考えられている。本研究では BCR からのシグナルによるB細胞活性化の負の制御の分子機構について解析を行った。

B. 研究方法と研究成果

未熟B細胞株 WEHI231 細胞では BCR シグナルによりアポトーシスが誘導される。そこで BCR 刺激後、比較的早期に WEHI231 細胞に誘導される遺伝子の検索を行い、見つかった新規タンパクの cDNA を、iWH37 と名付けた。iWH37 はタンパク-タンパク相互作用に機能すると考えられている SAM domain を持つ新規のタンパクである。この WEHI231 細胞のアポトーシス誘導には、BCR からのシグナルによる新規の遺伝子 iWH37 の発現とタンパクの合成が必須であり、そのタンパクがミトコンドリアを標的とすることが明らかになった。静止期の WEHI231 細胞では iWH37 のメッセージは認められないが、BCR 刺激後、4-8 時間で強く発現が誘導された。一方、成熟B細胞、成熟T細胞では静止期においてメッセージがすでに存在するが、BCR 刺激により、急速に減少した。iWH37 を強制発現させると、生存細胞では細胞質に局在しているが、アポトーシスに陥

った細胞ではミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア膜上のイオンチャンネルである VDAC、および BAK と結合するがわかった。iWH37 を Cos7 細胞に強発現すると、ミトコンドリアに iWH37 が局在した場合は細胞死が誘導された。ドキシサイクリン（テトラサイクリン）誘導型発現ベクターに iWH37 の cDNA を挿入して、WEHI231 細胞に組み込んで発現させた後、そのような WEHI231 細胞にドキシサイクリンを添加して iWH37 の cDNA を発現させると、細胞内のミトコンドリア膜電位の低下が観察され細胞死が誘導された。

C. 考察

WEHI231 細胞では、iWH37 は BCR 刺激により誘導されることから、新規タンパク iWH37 は自己抗原と反応する未熟B細胞の抗原特異的な細胞死の誘導に関与する分子と考えられる。この iWH37 分子の *in vivo* での機能、特に B 細胞選択における役割、および他の apoptosis 関連遺伝子との関連を明らかにするため、トランスジェニックマウス、ジーンターゲティングマウスの作製を行っている。

D. 結論

BCR 刺激後早期に WEHI231 細胞に誘導される遺伝子を同定し、iWH37 と命名した。さらにこの分子が B 細胞の apoptosis に関与する可能性があ

ることを見い出した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. M.Jutel, T. Watanabe, S.Klunker, M. Akdis, O.A.R. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R.Koga, T. Kobayashi, K. Blser, C.A. Akdis:
Histamine regulates T cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors.
Nature 413: 420-425, 2001
2. Z-Li Huang, W-M. Qu, W-D. Li, T. Mochizuki, N. Eguchi, T. Watanabe, Y. Urade and O. Hayaishi:
Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9965-9970, 2001.
3. M. Kubokawa, M. Nakashima, T. Yao, K-I. Ito, N. Harada, H. Nawata and T. Watanabe:
Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer.
Int. J. Oncology. 19:695-700, 2001
4. M. Izumi, Y.Nakanishi, M. Nakashima, N.Hara, and T. Watanabe:
Expression of tumor associated antigen RCAS1 is significantly correlated with poor prognosis in non small cell lung cancer.
Cancer 92 (2): 446-451, 2001
5. K. Oshima, K.Muta, M.Nakashima, S.Haraoka, K.Tutiya, J.Suzumiya, C.Kawasaki, T.Watanabe, M.Kikuchi:
Expression of human tumor-associated antigen RCAS1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein-Barr virus infection. A potential mechanism of immune evasion.
Int. J. Cancer. 93:91-96, 2001
6. T.Yuasa, M.Ono, T.Watanabe and T.Takai:
Lyn is essential for Fcg receptor III-mediated

systemic anaphylaxis but not for the Arthus reaction.

J. Exp. Med. 193 (5): 563-571, 2001

7. T. Matsushima, M.Nakashima, K.Oshima, Y.Abe, J.Nishimura, H.Nawata, T.Watanabe and K.Muta:
RCAS1: A novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells.
Blood 96:313-321, 2001
8. K. Ohshira, M. Nakashima, K. Sonoda, M. Kikuchi and T. Watanabe:
Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy; the possible role in immune privilege.
Clin. Exp. Immunol. 123: 481-486, 2001.
9. T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata:
Targeted disruption of histamine H1 receptor attenuated regulatory effect of leptin on feeding behavior, adiposity and UCP family expression in mice.
Diabetes 50: 385-391, 2001
10. T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata:
Central infusion of hitamine reduced fat accumulation and increased UCP family expression in leptin resistant obese mice.
Diabetes 50: 376-384, 2001

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィーの治療用モデル動物の開発

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. 国立精神・神経センター内に、筋ジストロフィー犬を飼育し、同犬を用いた実験を行うための中型実験動物研究施設が設立され、筋ジストロフィー犬の飼育が開始された。
2. 筋ジストロフィー犬は、比較的早期から心電図の異常を呈し、心臓死する例があることから、筋ジストロフィーの心障害モデルとして、重要である。
3. 筋ジストロフィー犬においては、前後肢の骨格筋と外眼筋では障害の程度が異なることが観察されたが、ユートロフィン mRNA の安定性が骨格筋によって異なることが障害度と関連する可能性がある。

A. 研究目的

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確立を図る。

B. 研究方法

1. 国立精神・神経センター内に筋ジストロフィー犬を飼育し、実験するためのコロニーを確立する。
2. 筋ジストロフィー犬のコロニーを既に設立している米国のミズーリ州、コロンビア獣医大学の Dr. Komegay 及び西オーストラリア州パース市郊外のマードック大学獣医学部の Dr. Howell と密接な連絡をとり、筋ジストロフィー犬に関する情報を収集する。
3. 実験動物中央研究所及び中外医科学研究所（旧 CSK リサーチパーク）と協力して、筋ジストロフィー犬の繁殖を国内の施設で進め、筋ジストロフィー犬の遺伝子診断、生育状況の把握に努める。

C. 研究成果

1. 厚生労働省によって国立精神・神経センター内に中型実験動物研究施設が建設され、建家は平成 13 年 3 月に完成した。引き続き、施設内及び運営面の整備が進められ、11 月より筋ジストロフィー犬の飼育が開始され

た。

2. マードック大学の筋ジストロフィー犬施設へ、平成 13 年 7 月と平成 14 年 2 月の二度にわたって研究者を派遣し、筋ジストロフィー犬の飼育に関する情報の収集を行った。一方、平成 14 年 1 月、マードック大学獣医学部から Dr. Howell を迎えて、中型実験動物研究施設及び中外医科学研究所を視察頂くと共にセミナーを開催した。
3. Dr. Komegay より平成 7 年に筋ジストロフィー犬の冷凍精子を譲り受けて、人工授精を始めてから、平成 13 年の末までの段階で、筋ジストロフィー犬 22 匹とキャリア犬 18 匹の作出に成功している。この間、状態が良好な筋ジストロフィー犬の精子を用いて、雌のビーグル犬との人工授精に成功した。これにより、筋ジストロフィー犬とキャリア犬の人工授精交配の道も拓け、より多数の筋ジストロフィー犬を得ることが可能となった。国立精神・神経センターの中型実験動物研究施設では、平成 14 年 3 月末の段階で筋ジストロフィー犬 3 匹、キャリア犬 8 匹が飼育され、コロニーの構築と病態の研究を行っている。
4. 筋ジストロフィー犬の兆候としては、骨格筋、特に四肢、側頭筋、腰部の骨格筋の萎縮及び拘縮、自発運動の減少、流涎が観察された。さらに顎関節の拘縮及び巨舌によ