

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

未認可抗生物質ネガマイシンによる  
筋ジストロフィーの治療

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 良一

平成 14 (2002)年 4 月

## はじめに

1999年の夏、ペンシルバニア大学の Lee Sweeney 教授らのグループが mdx マウスにゲンタマイシンを投与してジストロフィンを発現させることに成功したニュースは私達にとって大きなショックであった。しかし、日本は梅沢浜夫先生によるカナマイシンの発見以来、抗生物質の探索大国である。もしかしたら、あのゲンタマイシンより毒性が少なく、しかも良く効く抗生物質があるかも知れないと思い、本棚にあった「抗生物質大要—第4版」(田中信男・中村昭四郎著、東京大学出版会 1992年刊)からネガマイシンという名の抗生物質を見つけたのが本研究の発端であった。さっそく、梅沢先生が作られた(財)微生物化学研究会附属微生物化学研究所に電話し、ネガマイシンの存在を確認、その供与を御願いし、実験を開始した。幸い、国立精神・神経センターの故荒畑喜一先生や杉田名誉総長、小澤名誉所長、武田部長にもご協力していただき、厚生省精神・神経疾患研究委託費の旧石川班、旧荒畑班(現清水班)のメンバーの方々に新たに微生物化学研究所、東京都臨床医学総合研究所の研究者を迎え、研究グループを組織できた。特に、ネガマイシン本体やその類似体、さらにゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質の研究開発や研究の人材の宝庫である微生物化学研究所に御協力いただいたことが大きい。竹内富雄所長、浜田博士、近藤博士に深く感謝したい。

本研究では、ナンセンス突然変異によって生じた Duchenne 型筋ジストロフィーの患者さんからいただいた生検組織由来の筋細胞も使っている。その細胞に臨床研の原博士が、がん遺伝子である SV40-T を導入し、培養系で抗生物質の薬理効果を検討できるように長寿命化して、個々の患者さん毎に、その筋細胞がどの抗生物質が効果を示すかを試そうとしている。これは、筋ジストロフィーの化学療法におけるオーダーメイド型治療のひな形とも言える。

研究組織メンバーのひとりである神戸大学医学部小児科の松尾雅文教授に対して「この子をネガマイシンによる治療の最初の成功例にして下さい」と小学校1年生の息子さんの筋生検を申し出て下さったお母さんと御本人、それに世界中の筋ジストロフィー患者さん達にも報うべく、今後も最大の努力をしていきたい。最後になりましたが、平成13年度の研究費補助をしていただいた厚生労働省にも深く感謝致します。

平成14年4月10日

研究組織を代表して 松田 良一

## 目次

I.	総括研究報告	
	未認可抗生物質ネガマイシンによる筋ジストロフィーの治療に関する研究----	1
	松田 良一	
II.	分担研究報告	
1.	新たな治療法としてのユートロフィン発現増強-----	5
	武田 伸一	
2.	SV-40T 導入によるサテライト細胞の不活化に関する研究-----	9
	原 孝彦	
3.	ネガマイシン高生産株の培養とネガマイシンの試験生産-----	11
	浜田 雅	
4.	1) Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の患者由来の骨格筋細胞の初代培養 とナンセンス突然変異型の DMD 細胞株の確立-----	12
	2) DMD における効率的な mRNA 直接塩基配列決定法によるジストロフィ ン遺伝子解析	
	斉藤 加代子	
5.	Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法に関する研究-----	13
	松尾 雅文	
6.	1) マウス初代培養筋原細胞のための無血清培養液の改善-----	15
	2) 抗生物質による mdx マウス骨格筋のジストロフィン機能回復	
	3) 培養体節筋原細胞における HGF/SF の役割	
	4) 液性因子による筋衛星細胞の休眠化制御機構	
	塩塚 政孝	
7.	Nonsense-mediated mRNA decay を利用した新しい筋疾患治療法の開発-----	16
	石浦 章一	
III.	研究成果に関する一覧表-----	17
IV.	研究製菓の刊行物・別刷-----	19~102

はじめに

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

未認可抗生物質ネガマイシンによる筋ジストロフィーの治療（H13-脳-015）

主任研究者 松田良一 東京大学助教授

研究要旨 ストップコドンの読み越え作用を持つ未認可抗生物質ネガマイシンを用いてナンセンス突然変異によって生じた筋ジストロフィーに対する化学療法の可能性を探った。ネガマイシンは *mdx* マウスおよびその骨格筋培養細胞においてジストロフィンの合成を促進した。ナンセンス突然変異によって生じたヒトの筋ジストロフィー骨格筋細胞にネガマイシンが効果をもたらすかどうかを調べるため、生検試料由来の筋細胞に SV40-T 遺伝子を導入し、長寿命化を試みている。

分担研究者名 武田伸一（国立精神・神経センター神経研究所）、原 孝彦（(財)東京都臨床医学総合研究所）、浜田 雅（(財)微生物化学研究会附属微生物化学研究所）、斉藤加代子（東京女子医科大学）、松尾雅文（神戸大学）、塩塚政孝（早稲田大学）、石浦章一（東京大学）

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の患者の 5-15%はジストロフィン遺伝子のナンセンス突然変異によって起きる。もし、生じたストップコドンを読み越えさせる薬物があれば、化学療法が可能である。1999 年、米国の LeeSweeney らはゲンタマイシンの持つストップコドン読み越え活性を利用してジストロフィン遺伝子にナンセンス突然変異がある *mdx* マウスの薬物治療に成功した。しかし、ゲンタマイシンは聴覚毒性や腎毒性が強

いため、長期間投与は危険である。そこで、別の抗生物質を検索した所、ネガマイシンという未認可抗生物質に同様な作用があることが分かった。我々は、このネガマイシンを *mdx* マウスに投与し、ジストロフィンの発現を認めた。本研究ではネガマイシンの毒性、至適投与量や投与方法、さらにその類似体の機能について検討し、ナンセンス突然変異型遺伝子病の薬物治療薬の開発を目指すことを目的とした。さらに患者の筋細胞への効果を調べるため、ナンセンス突然変異型 DMD 患者の生検試料から骨格筋細胞株の樹立を目指す。

B. 研究方法

1) ネガマイシンの高度産生菌を用いてネガマイシンの生産を行う。  
2) *mdx* マウスにネガマイシンを投与し、そのジストロフィン発現量、治療効果、毒性について検討する。  
3) *mdx* マウス由来骨格筋

細胞に易熱性 SV40-T 遺伝子を導入し長寿命細胞株を樹立する。4) 同様にヒト DMD 患者由来の骨格筋細胞に易熱性 SV40-T 遺伝子を導入し長寿命細胞株を樹立する。5) これらを培養系で分化させ培養液にネガマイシンを添加し、筋細胞におけるジストロフィンの発現を検討する。6) 正常および mdx マウス由来の小各区筋細胞株において発現する遺伝子を cDNA ランダムアレイを用いて同定する。7) 緑色蛍光タンパク質あるいはルシフェラーゼ遺伝子内にストップコドンを入れた DNA コンストラクトを細胞に導入し、その細胞を用いてネガマイシンによるストップコドンの読み越し活性を測定するアッセイ系を作る。8) 培養系での筋細胞損傷を測定するため、無血清培養液中に漏出してくるクレアチンキナーゼ活性の定量系を開発する。

### C. 研究結果

1) 1969 年に樹立したネガマイシンの高度産生菌の蘇生に成功し、それを用いてネガマイシンの試験生産を始めた。2) mdx マウスにネガマイシンを投与した所、正常マウス骨格筋の 1/10 レベルのタンパク量のジストロフィン発現した。聴覚毒性は認められなかった。同時におこなったゲンタマイシン投与マウスの聴覚は低下していたので、ネガマイシンは聴覚毒性がないか低いことが示された。3) 正常および mdx マウス由来骨格筋細胞に易熱性 SV40-T 遺伝子を導入し分化能を有する長寿命化細胞株を樹立した。4) mdx マウス由来の骨格筋細胞を培養系で分化させ培養液にネガマイシンを添加した所、ジストロ

フィンの発現を認めた。今後、添加量、添加中止後のジストロフィタンパク質の減少等について調べる。5) mdx マウス由来細胞で転写が活性化している遺伝子を 10 種類、低下している遺伝子を 5 種類を同定した。6) 同様にナンセンス突然変異型のヒト DMD 患者由来の骨格筋細胞に易熱性 SV40-T 遺伝子を導入し長寿命化細胞を数系統作った。これらを用いて、ネガマイシンの効果を検討する。7) ネガマイシンによるストップコドンの読み越し活性を定量化できるアッセイ系を作出中である。8) 培養系での筋細胞損傷のマーカーとしてクレアチンキナーゼ活性を測定するため、無血清培養液を開発した。

### D. 考察

初年度において、ネガマイシンの有効性が確認出来た。さらに、ナンセンス突然変異によって生じたヒト筋ジストロフィー患者の骨格筋細胞の SV40-T 遺伝子の導入による長寿命化をできるだけ多くのケースについて進め、培養系での化学療法の有効性を確認したい。

### E. 結論

mdx マウス骨格筋に対し、*in vivo* および *in vitro* でネガマイシンを投与した所、ジストロフィタンパク質の蓄積を認めた。2) 正常および mdx マウス、さらにナンセンス突然変異型のヒト DMD 患者由来の骨格筋細胞に易熱性 SV40-T 遺伝子を導入し、それぞれの細胞の長寿命化に成功した。3) それらを用いて *in vitro* でネガマイシンその他の薬物による治療効果を検討するアッセイ系が出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Arakawa M., Nakayama Y., Hara T., Shiozuka M., Takeda S., Kaga K., Morita S., Kitamura T., and Matsuda R. (2001) Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myologica* XX: 154-158.

その他

荒川正行、松田良一 (2001) 筋ジストロフィーの治療薬を探す 難病と在宅ケア 4: 26-30

荒川正行、松田良一 (2001) 筋ジストロフィーの分子病体と治療の可能性—Duchenne 型筋ジストロフィーを中心として— *モレキュラーメディシン* 38:1284-1289.

松田良一 (2001) 遅筋と速筋はどのように決まるのか? Q&A 運動と遺伝 (大野、及川、石井編) 120-121. 大修館書店

荒川正行、松田良一 (2001) 筋ジストロフィーはどのようにして起こるのか? Q&A 運動と遺伝 (大野、及川、石井編) 122-123. 大修館書店

荒川正行、松田良一 (2001) ミオシン遺伝子のプロモーターはどこまでわかっているのか? Q&A 運動と遺伝 (大野、及川、石井編) 126-127. 大修館書店

松田良一 (2001) 骨格筋を理解するための生物学—受精から骨格筋の形成、再生と筋ジストロフィーまで— 筋機能改善の理学療法とそのメカニズム—理学療法の科学的基礎を求めて (望月、山田編) NAP 社 131-144.

松田良一 (2002) 受精と初期発生 分子生物学への招待 (矢沢洋一、鈴木範男編) 三共出版

松田良一 (2002) 形態形成 分子生物学への招待 (矢沢洋一、鈴木範男編) 三共出版

2. 学会発表

Nagata Y., and Matsuda R. (2001) Immunocytochemical analysis of plasma membrane sphingomyelin during the muscle cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* . 12: 162a.

Watanabe K., and Matsuda R. (2001) Growth factor and attachment factor printing using color ink jet printer. *Zool. Sci.* 18: 35a.

Ymane A., and Matsuda R. (2001) The expression of utrophin and MyoD genes in diaphragm, gastrocnemius, soleus and masseter muscles of mdx mice. *Develop. Growth & Differ.* 43: S151.

Shiozuka M., Yoshida M., Matsuda R., and Kimura I. (2001) Improvement of serum-free medium for mouse primary myogenic cells. *Develop. Growth & Differ.* 42: S158.

Nagata Y., and Matsuda R. (2001) Lysenin-sphingomyelin binding at the cell surface decreases during muscle cell differentiation. *Develop. Growth & Differ.* 43: S111.

Arakawa M., and Matsuda R. (2001) Negamycin can restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *Develop. Growth & Differ.* 43:S152.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

3. 実用新案登録

なし

4. その他

米国にネガマイシンの用途特許を仮出願中である。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

新たな治療法としてのユートロフィン発現増強

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. 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。
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可能性がある。

A. 研究目的

ジストロフィン欠損による筋ジストロフィーに対して Negamycine, Gentamycine のような read through を企図する薬物の研究の他に、分子病態の解明に基づく、新たな治療法の開発が求められている。我々は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増強に注目した。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。

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;  $5 \times 10^7$  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  $800 \text{ ng}$  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し、ジストロフィン欠損による筋ジストロフィーに対する新たな治療法を開発するためには、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. 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:  
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 Takeda 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

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: 23-27, 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.  
4<sup>ème</sup> 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

分担研究項目：SV-40T 導入によるサテライト細胞の不死化

原 孝彦

東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 腫瘍生化学研究部門 室長

### <目的>

筋ジストロフィーの実験動物モデルであるジストロフィン欠損マウス mdx では、加齢が進むにつれて骨格筋・心筋の変成がおこる。ヒト筋ジストロフィーの患者ではこの変成部位が線維化して筋肉組織が退縮していくのに対して、mdx マウスでは筋肉の部分再生がおこり、激しい運動負荷をかけない限り致死にはならない。したがって病態モデルとして臨床像全てを再現することはできない反面、生存するが故に生化学的および遺伝学的な実験には最適である。mdx マウスで遺伝的に欠損するのは、膜を裏打ちする巨大な細胞骨格たんぱく質ジストロフィンのみである。しかし、それによって筋膜の統合性が失われ、細胞レベルあるいは組織レベルで二次的なシグナル伝達異常やそれを補償しようとする生体反応がおこっている。変成筋内ではマクロファージ、肥満細胞、Tリンパ球が集合し炎症がおこるため、これまでの筋ジストロフィーの研究は個体レベルでの病理解析や遺伝子治療に重点が置かれていた。しかし、本疾患はもともと筋膜の異常が原因でおこる疾患であり、ジストロフィン欠損による筋肉細胞そのものの遺伝子発現異常をより詳しく解析することが、新しい治療法開発につながる可能性がある。また、ネガマイシンあるいはそのデリバティブの効用を筋細胞レベルで検証する評価系の確立も筋ジストロフィー治療研究に必須となろう。本研究では、SV40 温度感受性 T 抗原を利用して、まず mdx マウスおよび正常マウスより、次に筋ジストロフィー患者生検から各種の新規骨格筋細胞株を樹立することを試みる。さらに mdx 由来筋細胞株で発現変動する遺伝子群のクローニングを通じて、筋ジストロフィー発症の新しい分子マーカーや補助因子を探索することを目的とする。

### <方法>

mdx マウス骨格筋および B10 正常マウス骨格筋初代培養系に、SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルス (SV40tsT ウイルス) を感染させることでそれぞれの筋細胞を株化した。次に高効率のアンホトロピックウイルス産生系 PLAT-A を用いて作製した SV40tsT ウイルスを、筋ジストロフィー患者生検細胞に感染させることでヒト患者由来筋細胞株を新規作製した。一方、mdx 筋細胞株と正常 B10 筋細胞株の cDNA をそれぞれプローブにしてマウス cDNA ランダムマイクロアレイをハイブリダイズし、発現量に差のある遺伝子群を同定した。

### <結果>

#### 1. mdx マウス筋細胞株および正常筋細胞株の樹立

ジストロフィンを欠損する筋細胞株 (mdx-sm) および正常筋細胞株 (B10-sm) を樹立するのに成功した。これらの細胞株は許容温度 (32.5℃) で増殖し、培養系の中でデスミン陽性の筋管を自発的に分化させる能力を有していた。筋分化の頻度は、mdx マウスの筋再生能を反映

してmdx-sm細胞株の方がより高進していた。また期待通り、mdx筋細胞株はジストロフィンの発現を欠損していた。

## 2. 筋ジストロフィー患者骨格筋由来細胞株の樹立

ベッカー型およびデュシャンヌ型筋ジストロフィーと診断を受けた患者の筋細胞生検を初代培養後、SV40tsTウイルスを感染させて継代培養した。その結果、それぞれのタイプの筋ジストロフィーおよび正常骨格筋由来の筋細胞株を新しく得ることに成功した。他の患者数例についても、現在継代培養を行っている。ヒト患者由来筋細胞株は、マウスのそれに比べて分裂速度は遅いが、生化学的な解析には耐えられると期待される。

## 3. 遺伝子発現解析

mdx-sm細胞株と正常B10-sm細胞株との遺伝子発現の違いをマイクロアレイを用いて比較した。マウス脳や胎仔に由来する約4000種類のcDNAをのせたマイクロアレイのハイブリダイゼーション解析の結果、mdx筋細胞株では10種類の遺伝子（新規2を含む）のmRNAが正常筋芽細胞より高いレベルで発現しており、逆に5種類の遺伝子（新規1を含む）は、発現が抑制されていた。前者には、クレアチン合成の律速酵素であるaminodiotransferase、ジストロフィンと結合するmc7タンパク質、膜裏打ちタンパク質SCHIP1などが含まれ、一方、酸化ストレスから細胞を防御するSelenoprotein P、LPS誘導遺伝子GARG16などが発現低下していた。これらの分子の発現動態がジストロフィン発現と直接リンクしているかどうか、またヒト筋ジストロフィー細胞株で当てはまるかどうか、について現在解析している。

### <考察>

課題であったジストロフィン欠損筋細胞株の樹立に成功した。本プロジェクトの主目的であるネガマイシンの薬効検定や類似化合物のスクリーニングに役立つと期待される。mdxマウス筋細胞株のみならずヒト生検筋細胞をより長期に培養できるようになったことで、細胞レベルでの分子生物学・生化学的な解析も可能となろう。実際にmdx筋細胞株で特異的に発現変動している幾つかの遺伝子を同定することができた。これらは筋ジストロフィーの病態とリンクした新規マーカーとなるか、あるいは病因遺伝子のひとつである可能性もある。今後、mdx関連遺伝子群の発現動態とジストロフィンが制御するシグナル伝達系との関連を今後詳細に解析していくことで、ほとんど治療法のない筋萎縮症の進行を阻止する新たな方法が開発できるかもしれない。

### <発表>

Arakawa, M., Nakayama, Y., Hara, T., Shiozuka, M., Takeda, S., Kaga, K., Kondo, S., Morita, S., Kitamura, T., and Matsuda, R. Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myologica*, 20: 154-158, 2001

知的財産権の出願・登録状況 なし

平成 13 年度厚生科学研究費補助金の交付を受けて、「脳科学」研究事業に係る次の課題の分担研究者として調査研究を実施した。

研究課題名 未認可抗生物質ネガマイシンによる筋ジストロフィーの治療

1964 年に微生物化学研究所で群馬県妙義山の土壌より分離した放線菌 *Streptomyces* sp.M890-C 2 株は、ネガマイシンを生産する。平成 13 年度は、長期間保存されたこの菌株を蘇生して培養し、ネガマイシンの生産力価を試験した。その結果 20-40mcg/ml のネガマイシン生産を確認した。このネガマイシンの生産力価は分離時の生産力価と変わらないが、試作のためには低力価であり、「せめて 50-60mcg/ml の生産力価が欲しい」と試作を依頼したメルシャン(株)生物資源研究所の要望があつた。そこで、この菌株についての実験歴史をひもとき、1969 年に本株の力価向上試験を行つている結果を改めて見出した。これらの力価向上株は、当時 1000mcg/ml の高生産株と記載されている。これらの高生産株は凍結乾燥で保存されていたが、これを蘇生し、培養試験を行い生産力価を検討した。その結果、当時の高い生産力は見出されなかつたが 100-200mcg/ml の生産力価は保持されており、この培養液の予備抽出よりネガマイシンの物質としての確認も行つた。現在その高生産株で試作中である。

微生物化学研究所 浜田 雅

知的財産権の出願・登録状況 なし

## 厚生科学研究費（脳科学研究事業）平成13年度報告書

東京女子医科大学小児科 齋藤加代子、近藤恵里

### 1) Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の患者由来の骨格筋細胞の初代培養とナンセンス突然変異型の DMD 細胞株の樹立

エクソンレベルの欠失が認められない DMD 患者の生検骨格筋細胞において、Blau Hが開発した骨格筋衛星細胞の培養法に従い、初代培養、筋細胞クローニングを施行した。本研究の分担研究者の原孝彦博士との共同研究によって、細胞の不死化を行い、cell line を確立した。今年度は東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て、3症例の cell line 確立に成功している。

### 2) DMD における効率的な mRNA 直接塩基配列決定法によるジストロフィン遺伝子解析

今年度は、DMD の約3割に認められると考えられる微小変異の効率的同定法を解析するための基礎的準備を行っている。ジストロフィンゲノム DNA の解析で欠失・重複等の大きな変異が同定し得なかった DMD 症例を対象として、現在のところ約30例を対象としており、これは当科の DMD/BMD の約20%に相当している。その中でも特に、保因者診断を希望している家系、および過去に連鎖解析のみで保因者診断を受けている家系については優先的に解析を進め、診断精度の向上をはかっている。ただしこれら対象症例のほとんどにおいては、RNA を調整する材料とし得るのが末梢血リンパ球の cell pack あるいは新鮮血のみとなっているため、従来の塩酸グアニジン抽出法をより効率化したカラムキットによる抽出法、および Roberts et al(1991)の微量発現ジストロフィン mRNA (筋細胞の3000分の1)の RT-PCR による直接塩基配列決定法に基づき、それぞれの手技の至適条件を調整しながら解析を行っている。さらに今後はキャピラリー・シーケンサーを用いる解析、マイクロアレイ法などを検討する予定である。

知的財産権の出願・登録状況 なし

## Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法に関する研究

松尾雅文、竹島泰弘

神戸大学大学院医学系研究科

原孝彦

東京都臨床医学総合研究所

松田良一

東京大学大学院総合文化研究所

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は最も頻度の高い遺伝性筋疾患で、しかも重篤な進行性筋萎縮症で 20 才台には死に至る。しかしながら、未だに治療法は確立されておらず、多くの患者から治療法の確立が切望されている。

DMD の責任遺伝子として 10 年以上前にジストロフィン遺伝子が発見され、DMD の遺伝子異常の解析は進み、分子病態の解明が大きく進展した。ところが、正常遺伝子を生体に導入する遺伝子治療法を含めて未だ確立された治療法はない。DMD はジストロフィン遺伝子の変異から発症し、その変異の多くは欠失であるが、一部は点突然変異を有する。

DMD では、遺伝子内の欠失変異により遺伝子から転写された mRNA でのアミノ酸読み取り枠にずれ (アウトフレーム) を生じ、ストップコドンが出現し、ジストロフィン合成されなくなる。一方、同じジストロフィン遺伝子の変異で発症する症状の軽い Becker 型筋ジストロフィー (BMD) では mRNA のアミノ酸読み取り枠が維持され (インフレーム)、サイズの小さなジストロフィンが産生される。

私たちは、「ジストロフィン神戸」というジストロフィン遺伝子の特異な異常を発見し、その病態解析から mRNA のスプライシングを制御する全く新たな治療法を着想するに至った。すなわち、mRNA 前駆体のスプライシング時にスプライシング促進配列の機能をアンチセンスオリゴヌクレオチドにより阻害し、エクソンのスキッピングを誘導するものである。これにより、mRNA のアミノ酸読み取り枠をインフレームにかえ、ジストロフィンを産生させようとするも



のである。実際に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてスプライシング時にエクソンのスキッピングを誘導させて、患者由来筋細胞でジストロフィンを発現させることに成功してきた。そこで、この治療をさらに展開すべくジストロフィン遺伝子のエクソン配列内のスプライシング促進配列について解析を実施した。

また、点突然変異を治療する方法を確立するために以下の検討を行った。キメラ RNA/DNA の相同組み換え反応を利用してジストロフィン遺伝子の異常を修復しようとするものである。現在のところ遺伝子修復効率は低く、高感度に遺伝子修復を検出できる系の確立に着手した。ここでは、GFP という緑色の蛍光を発するタンパクの発現量から遺伝子が修正されたことを肉眼的に検証できる系を確立しようとした。まず、正常配列からなるジストロフィン cDNA の一部の配列を GFP 発現ベクターの上流に組み込んだ人工遺伝子を作製する。そして、これを細胞に導入してジストロフィンと GFP とが融合したタンパクを発現させ、発する蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、この GFP 発現システムが有効に機能することが判明した。

そこで、GFP 配列の上流に私たちが発見している患者の異常なジストロフィン cDNA 塩基配列を組み込んだ発現ベクターを作製した。このベクターを細胞に導入し、GFP との融合タンパクを発現させた。この条件では、ジストロフィン cDNA に変異があり、アミノ酸読み取り枠にずれがあるため GFP との融合タンパクは産生されず、蛍光は観察されなかった。

そこで、この遺伝子の異常を修復するため患者で発見された遺伝子異常部位に相当する正常のジストロフィン遺伝子配列などからなるキメラ RNA/DNA を合成した。この合成したキメラ RNA/DNA と GFP 発現人工遺伝子とをキャリアー物質とともに混じて培養細胞にコトランスフェクションした。そして、正常の配列と置き換った人工遺伝子からはジストロフィンと GFP の融合タンパクが産生される事を確認した。しかし、GFP 陽性細胞数はまだ少なく、遺伝子修復効率が未だ低いことが示唆され、現在さらに多様な配列を用いて高効率に遺伝子修復が生じる化合物を検索中である。さらに実用化前試験を実施するために DMD 患者筋細胞の不死化を行った。

**①マウス初代培養筋原細胞のための無血清培養液の改善**

ニワトリ初代筋原細胞の増殖と分化を実現する、完全に既知の生理的な物質から構成された無血清培養液は完成した (Zool. Sci., 17:201-207, 2000)。しかし、ニワトリ初代筋原細胞は、細胞分化のための研究には良く用いられても、筋ジストロフィーのような遺伝子疾患の研究のためにはあまり用いられない。そのため、この無血清培養系を改変し、マウス初代筋原細胞にも流用できるよう検討した。その結果、細胞の調整や因子の改変により、デュシャンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物であるmdxマウスや正常マウスからの筋原細胞を、一週間ほどで筋管形成にまで到達させる無血清培養系を確立した。2001年5月、京都国際会議場での第14回国際発生生物学会にて報告。

**②抗生物質によるmdxマウス骨格筋のジストロフィン機能回復**

ジストロフィン遺伝子内のナンセンス突然変異によりジストロフィンが発現せず、筋細胞の崩壊を起こしているmdxマウスに、ポリアミン系抗生物質であるネガマイシンを投与することにより、血清クレアチンキナーゼの減少、ジストロフィンの発現等を指標に、mdxマウスの筋変性を抑制できることを見出した。また、同様の効果を持つことが報告されているゲンタマイシンより副作用が少ないことも聴力、体重等から明らかになった (Acta Myologica, 20:154-158, 2001)。現在、mdxマウス由来筋細胞株やヒトナンセンス型DMD筋細胞株を用いた培養系において、ネガマイシンを含む多種抗生物質の投与によるジストロフィンタンパク質の蓄積を、免疫組織化学的手法により検出中である。

**③培養体筋筋原細胞におけるHGF/SFの役割**

肝細胞成長因子/分散因子 (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor: HGF/SF) は、骨格筋形成に不可欠であり、初期発生および再生時に大規模に起こる筋原細胞の移動を開始させるシグナル因子である可能性とともに、その移動を走化的に誘導する因子である可能性が議論されている。このHGF/SFの作用について、発生段階の異なるニワトリ胚由来の培養筋原細胞を用いて、生化学・形態学・免疫組織化学的手法を駆使することにより検討した結果、体筋組織ではモートゲンとして筋芽細胞群の遊走・分散を促進し、胸筋由来細胞に対してはマイトゲンとして増殖を促進すること、HGF/SFのレセプターであるc-Metタンパク質とHGF/SFタンパク質が筋原細胞に存在することを明らかにし、HGF/SFがオートクライン/パラクライン機構により筋原細胞の移動に関与している可能性を示唆した。

2001年7月、ツーソン (アリゾナ州) で行われた第2回FASEB Summer Research Conference "Muscle Stellite & Stem Cell" 国際会議、2001年10月九州産業大学で行われた第72回日本動物学会大会にて一部報告したが、更に詳細な、ニワトリ初期胚を用いたホールマウント免疫染色法におけるHGF/SFやc-Met、筋発生制御因子等の発現については、2002年4月、ニューオーリンズ (ルイジアナ州) で行われるアメリカ実験生物学会にて報告予定である。

**④液性因子による筋衛星細胞の休眠化制御機構**

内在性のActivin/Follistatin系は筋発生の重要な調節因子であり (Zool. Sci., 14: 327-330, 1997)、Activin AがMyoD1mRNAの発現をdown-regulateすることから、この筋分化抑制作用と筋衛星細胞の休眠化制御の関連について、実験的筋再生系 (カルジオトキシン~局所麻酔薬~の投与による筋崩壊の誘発) や遺伝子性筋疾患による筋再生系を対象として、検討中である。

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)を利用した新しい筋疾患治療法の開発  
石浦章一 (東京大学・大学院総合文化研究科)

NMDは、mRNAサーベイランスシステムで、premature termination codonを持つ異常mRNAを分解除去する。これに関係するのがhSMG-1キナーゼタンパク質である。NMDを阻害すれば、多少機能が保持された異常タンパク質が蓄積し、症状を和らげる可能性があるため、遺伝子変異の治療のための基礎研究が盛んに行われている。hSMG-1キナーゼの特異的阻害剤にはウオルトマニンやカフェインが知られているため、ナンセンス型遺伝性疾患の培養細胞系を用いてこれらの効果を検討する基礎実験を行った。

その結果、ウオルトマニン10mM、カフェイン7.5mMの添加後16時間目においてmRNAレベルがそれぞれ、3.4倍、2.4倍に上昇していることがわかった。また、免疫化学染色においても明らかに染色性が増大し、hSMG-1阻害の効果が認められた。今後は、ネガマイシンやゲンタマイシンとの併用がどこまで効果を上げるかについて検討していく予定である。

文献

Sakaki, M., Takahashi, N., Sasagawa, N., Arahata, K. & Ishiura, S. (2001)  
Interaction between emerin and nuclear lamins. *J.Biochem.* 129, 321-327

Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Tokunaga, H., Matsumoto, M., Eto, K, Ishiura, S. & Higuchi, I. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 199-203

Fuke, S., Suo, S., Takahashi, N., Koike, H., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2001)  
The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *The Pharmacogenomics J.* 1, 152-156

Umeda T, Kouchi Z, Kawahara H, Tomioka S, Sasagawa N, Maeda T, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. (2001) Limited proteolysis of filamin is catalyzed by caspase-3 in u937 and jurkat cells. *J.Biochem.* 130, 535-542

Takahashi N, Sasagawa N, Usuki F, Kino Y, Kawahara H, Sorimachi H, Maeda T, Suzuki K, Ishiura S. (2001) Coexpression of the CUG-Binding Protein Reduces DM Protein Kinase Expression in COS Cells. *J.Biochem.* 130, 581-587

Suo, S., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2002) Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci.Lett.* 319, 13-16

Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2002) Myotonic dystrophy protein kinase. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* 5, 2203-2205

Suzuki, T., Nakagawa, M., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Nishino, I., Ishiura, S. & Nonaka, I. (2002) The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. *J.Biochem.* in press

知的財産権の出願・登録状況 なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松田良一	遅筋と速筋はどのように決まるのか？	大野、及川、石井	Q&A 運動と遺伝	大修館書店	東京	2001	120-121
荒川正行 松田良一	筋ジストロフィーはどのようにして起こるのか？	大野、及川、石井	Q&A 運動と遺伝	大修館書店	東京	2001	122-123
荒川正行 松田良一	ミオシン遺伝子のプロモーターはどこまでわかっているのか？	大野、及川、石井	Q&A 運動と遺伝	大修館書店	東京	2001	126-127
松田良一	骨格筋を理解するための生物学—受精から骨格筋の形成、再生と筋ジストロフィーまで—筋機能改善の理学療法とそのメカニズム—	望月、山田	理学療法の科学的基礎を求めて	NAP社	東京	2001	131-144
松田良一	受精と発生	矢沢洋一 鈴木範男	分子生物学への招待	三共出版	東京	2002	77-97
松田良一	形態形成	矢沢洋一 鈴木範男	分子生物学への招待	三共出版	東京	2002	98-123