

20020447

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 伸一

平成15年(2003)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	筋ジストロフィーの治療用モデル動物の開発 .....	16
	埜中 征哉	
4	抗原受容体を介する免疫細胞不活化と免疫寛容 .....	19
	渡邊 武	
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

# 厚生労働科学研究費補助金（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

埜中 征哉

国立精神・神経センター 武蔵病院

渡邊 武

九州大学 生体防御医学研究所

### 研究要旨

- 1 AAV ヘクターに組み込み可能で、しかも充分な機能を持つマイクロ シ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 が充分な機能を持つことが判明した。
- 2 CS1 micro-dystrophin 遺伝子を骨格筋特異的な MCK プロモーター下で発現するように組み換えたアデノ随伴ウイルスヘクターを作製し、*mdx* マウス骨格筋に導入したところ、長期間の発現が観察され、シストロフィン陽性筋線維では中心核線維が減少し、単位面積当たりの張力も増加していた。
- 3 ユートロフィン プロモーターの領域をゲノムライブラリーから、クローニングし、LacZ 遺伝子を連結して、トランスジェニックマウスを作製し解析した結果、ユートロフィン プロモーターの活性は、肝、腎、大腸、精巣で高く、心筋 骨格筋・血管平滑筋では低いことが明らかになった。
- 4 国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、筋ジストロフィー大の繁殖が開始された。筋ジストロフィー大では、早期から特徴的な心電図の異常を呈するが、系統的な解剖を進めた結果、刺激伝導系の Purkinje 線維にほぼ選択的な空胞変性を見出した。
- 5 生体適合性高分子材料と、胸腺由来 TEL-2 ストローマ細胞及びサイトカインを組み合わせてマウスに移植することにより、リンパ節の基本構造を備えた組織構造物を人工的に構築することに成功した。
- 6 抗原受容体シグナルによって誘導される未熟 B 細胞の細胞死には、同シグナルによる新規タンパク質の合成が必要であるか、その候補として iWH37 を単離した。iWH37 の標的はミトコンドリア膜であり、膜電位の低下とチトクロム C の放出が細胞死の引き金になる。

### 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、ウイルスヘクターを用いた 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ヘ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もある。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) ヘクターを用いて、短縮型でありながら、筋ジストロフィーの表現型を改善する能力を持つ micro-dystrophin の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協力して、シストロフィンのホモログであるユートロフィンに着目した。ユートロフィンは 395 kDa の細胞骨格タンパク質であり、成熟骨格筋では神経筋接合部と筋腱移行部、および再生線維の筋内膜に一過性に発現する。最近ユートロフィン遺伝子には 2 種類のプロモーター (A, B) が報告されている。ユートロフィン トランスジェニ

ク *mdx* マウスへの表現型改善、シストロフィン・ユートロフィン二重欠失による表現型重篤化から、ユートロフィンはシストロフィンの機能がある程度代償できると考えられる。これまでの研究で、AxCALacZ 投与した *mdx* マウスの骨格筋形質膜でのユートロフィン過剰発現を見出し、筋変性を抑制していることに注目した。更に IL-6 投与により、ユートロフィン過剰発現が一部再現できることを既に報告した。そこでこれらのユートロフィンの過剰発現か A-ユートロフィン プロモーターの活性化によるものかをさらに検討することとした。

分担研究者の塾中は、主任研究者である武田と協力して、筋シストロフィー大に関する研究を行った。これまでシストロフィン欠損のモデル動物として *mdx* マウスが用いられてきたが、小型である上に軽症で進行性が目立たないために治療用のモデルとしては制限がある。そこで、ヒト DMD に類似した重症で進行性の経過を辿る筋シストロフィー大が注目されている。本研究は、筋シストロフィー大の治療用モデル動物としての筋シストロフィー大のコロニー確立を図ることを目的とする。

最後に、分担研究者の渡邊は、遺伝子治療の実現のために最も重要である免疫寛容の誘導に関する基礎的な実験を行った。第一に、様々な免疫不全状態や癌の治療を最終目的としてリンパ節の役割を果たす組織を人工的に作ることを目的とした。第二に、抗原受容体シグナルによって誘導される未熟 B 細胞の細胞死の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## B 研究方法

### 1 AAV ヘクターを用いた遺伝子導入 (武田)

#### (1) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発

ロッド・リピートをそれぞれ 4, 3, 1 個持つロッド短縮型 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* マウスを作出し、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解析を行った。

#### (2) 治療用 AAV ヘクターの *mdx* マウス骨格筋への導入と効果の判定

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  $\Delta$ CS1 cDNA を MCK プロモーターに連結した治療用 AAV ヘクター (AAV-MCK- $\Delta$ CS1) を作製し、10 日齢及び 5 週齢の *mdx* 骨格筋へ導入し、導入発現の効果を中心核線維の比率、張力の上から検討した。

### 2 アデノウイルスヘクターによるユートロフィン発現増強 (鈴木)

A タイプ ユートロフィンプロモーターを transgene に組み込んだトランスジェニックマウス {A-utrophin promoter / nls LacZ Tg mouse, background C57BL/6 mouse} を作製する。そして得られた各ラインについて、各臓器における内因性ユートロフィン発現と核における LacZ 発現との関係を免疫組織化学的に解析し、さらにトランスジェニックマウス再生筋 (CTX 投与による) やトランスジェニックマウスと *mdx* マウスとの交配から得られたマウス骨格筋に IL-6 を投与し、LacZ の発現を解析する。

### 3 新たな治療用モデル動物 (塾中)

(1) 平成 13 年 3 月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、施設内及び運営面の整備を進めた結果、同年 11 月より筋シストロフィー大の飼育が開始された。平成 14 年 6 月からは、同施設内での繁殖を開始する。

(2) 筋シストロフィー大及び同腹の正常対照大について、1 週齢の幼大から 1 歳齢の成大に至るまで、系統的な解剖を行い、特に骨格筋と心筋については、組織学的、免疫組織学的に詳細な解析を行う。

### 4 免疫寛容の誘導 (渡邊)

#### (1) 人工リンパ節の構築

これまで行ってきた研究を背景として、生体適合性高分子材料と胸膜由来 TEL-2 ストーマ細胞及び様々なサイトカインの組み合わせで、マウスの腎皮膜への移植を行う。

#### (2) 未熟 B 細胞の細胞死の分子機構

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う。

## C 研究成果

### 1 AAV ヘクターを用いた遺伝子導入 (武田)

#### (1) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発

CS1-Tg *mdx* マウス骨格筋では筋張力を含む全ての指標において、B10 マウスと有意差がないレベルまで回復がみられた。一方、M3-Tg *mdx* マウス骨格筋については、目立った表現型の改善は認められなかった。AX11-Tg *mdx* マウス骨格筋は両者の中間の改善を示した。

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

ΔCS1 cDNA を、MCK プロモーターに連結した治療用 AAV ヘクター (AAV-MCK-ΔCS1) を作製し、10 日齢及び 5 週齢の *mdx* マウス骨格筋へ導入したところ、24 週後の時点でも micro-dystrophin の筋鞘における発現が確認された。特に 5 週齢への導入では、シストロフィン陽性線維の比率が高く、しかも陽性線維では中心核線維の比率が有意に低下していた。張力の測定では治療用 AAV ヘクターを導入した骨格筋で単位面積当たりの張力が増加する傾向を認めた。

### 2 アデノウイルスヘクターによるユートロフィン発現増強 (鈴木)

Southern Blotting 法 PCR 法にてトランスジェニックマウスを判別し、独立した 4 ラインを確立した。核における LacZ 発現について、解析した結果、幼弱齢 成熟齢いずれの時期においても、全ての系統に共通して肝臓、腎臓、大腸、精巣での発現が認められ、細胞レベルでも内因性ユートロフィンの発現と一致していた。心筋 骨格筋 血管平滑筋では、内因性にはユートロフィンの発現が認められるにも関わらず、核における LacZ 発現を認めなかった。現在、各臓器における transgene mRNA レベルでの検討と核における LacZ 発現臓器での転写開始点を検討中である。

### 3 新たな治療用モデル動物 (埜中)

(1) 平成 14 年度内にキャリア大を用いた 4 回の分娩を経験した。産仔数は 6~8 匹であり、初期には Golden Retriever と Beagle の hybrid 効果もあって産仔数が多く、分娩困難も経験したが、その後は管理体制を確立することができた。平成 15 年 3 月末現在、筋シストロフィー大 7 匹、キャリア大 19 匹が飼育され、病態研究と遺伝子治療実験

が行われた。

(2) 筋シ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。筋シス大が我が国に導入されてから、これまでに 7 例の筋シ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。

そこで、筋シス大の心臓について、系統的な病理的検索を行ったところ、左室作業心筋には心電図異常に見合うだけの変性及び線維化の所見はなかった。ところが、刺激伝導系の Purkinje 線維には選択的な空胞変性が観察された。レクチン染色、電顕を用いた検討から、空胞には glycogen が貯留していると考えられる。

## 4 免疫寛容の誘導 (渡邊)

### (1) 人工リンパ節の構築

人工リンパ節の構築のためには、1) ストローマ細胞、2) TNF family のサイトカインやケモカイン、および、3) 三次元構造骨格、の 3 要素が必須であろうと考えて、研究を進めてきた。これらの要素の組み合わせに鋭意工夫を重ねた結果、ある生体適合性高分子材料と、我々の教室で樹立された胸腺由来 TEL-2 ストローマ細胞、及び、ある種のサイトカインを組み合わせることでマウスの腎皮膜下に移植することにより、移植 3 週間後には、少なくとも 50% 以上の移植組織において、リンパ節の基本構造を備えた組織構造物を人工的に構築することに成功した。その人工リンパ節組織に観察されるリンパ節の基本構造とは、1) 明確に区別される T 細胞領域と B 細胞領域を有すること、2) T 細胞、B 細胞とともに免疫反応において重要な役割を果たす樹状細胞が存在すること、3) 中心部に濾胞樹状細胞のネットワークを含む B 細胞領域が存在すること、4) 胚中心 B 細胞様の PNA 強陽性 B 細胞が存在すること、5) 抗体産生細胞である形質細胞が存在すること、さらに、6) リンパ節へのリンパ球の侵入門戸となる高内皮細静脈 (HEV) 様の血管構造が存在すること、である。

### (2) 未熟 B 細胞の細胞死の分子機構

抗原受容体シグナルによって誘導される未熟B細胞の細胞死には、抗原受容体シグナルによる新規タンパクの合成が必要であることを示した。その新規タンパクの標的はミトコントリア膜であり、膜電位の低下とチトクロムCの放出が細胞死の引き金になることを示した。その新規タンパクの候補として iWH37 を単離した。iWH37 はミトコントリア膜に局在する。未熟B細胞 WEHI231 では、BCR 刺激によってその発現が誘導される。iWH37 タンパクにはミトコントリア膜の VDAC と結合する。Bac とも結合する。iWH37 タンパクの高発現は WEHI231 細胞でのミトコントリア膜電位の低下を引き起こす。

#### D 考察

1 AAV ヘクターを用いた遺伝子導入 (武田)  
transgenic *mdx* マウスの解析結果から、ロントリピート 4 個及びヒンシ 3 個を持つ microdystrophin CS1 cDNA が有効であることが示された。一方、これまでの研究で、AAV ヘクターを dystrophin を欠損した *mdx* マウス骨格筋に導入した場合に認められる過剰な免疫応答は骨格筋特異的な MCK プロモーターを使用することにより緩和されることが判明している。そこで、CS1 cDNA を MCK プロモーター下で発現させるよう設計した AAV ヘクター AAV-MCK- $\Delta$ CS1 を作製した。同ヘクターの導入により、*mdx* マウス骨格筋においては長期間の発現、中心核線維の減少、張力が増加する傾向を明らかにすることができた。今後、国立精神・神経センター内に確立した筋シストロフィー大のコロニーを用いて骨格筋に対し導入実験を行い、DMD に対する治療用プロトコルを提出したいと考える。

2 アデノウイルスヘクターによるユートロフィン発現増強 (鈴木)

今後は transgene の mRNA レベルでの解析 (RT-PCR)、核における LacZ 発現臓器での転写開始点の検討 (5' RACE 法を利用)、そしてトランスジェニック *mdx* マウスへの IL-6 投与、あるいは AxCALacZ 投与での transgene mRNA (LacZ mRNA) を TaqMan RT-PCR 法を用いて定量的に比較検討する必要がある。

3 新たな治療用モデル動物 (桒中)

国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設内において筋シス大の繁殖が開始されたことから、筋シス大のコロニーの確立の目途が立ったといえる。今後の課題は、筋シス大の病態の把握と治療研究であるか、筋シス大の病態に関しては、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 型筋シストロフィー (DMD) でも認められるが、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関連している可能性がある。

後者に関しては、最近 DMD の死因として心不全が呼吸不全を上回ることが指摘されている。今年度の研究で刺激伝導系の Purkinje 線維に選択的な空胞変性が見出されたことは特筆される。Purkinje 線維は作業心筋と同しく遅筋型の Myosin heavy chain から構成されるのに対し、エネルギー産生の上では、作業心筋が oxidative であるのに対し、Purkinje 線維は glycolytic であり、解糖系に依存していることが知られている。Purkinje 線維にほぼ選択的な空胞変性を生じ、しかも空胞内に glycogen が貯留していると考えられたことは、シストロフィン欠損の下流で解糖系の機能低下を生じていることを強く示唆する。以前から筋シストロフィーでは速筋が障害を受けやすいことが指摘されている。そこで、シストロフィン欠損の結果、何故 Purkinje 線維が障害されるのか今後明らかにしたい。また、Purkinje 線維の障害があれば、何故筋シストロフィーに特有の心電図異常を呈するのか明らかにすることも次の課題である。

一方、筋シストロフィー大は、ウイルスヘ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の良い対象であり、現在アデノ随伴ウイルスヘクターを用いた導入実験を行っている。さらに 14 年度末に実験大を対象にした X 線照射装置も搬入されたため、今後幹細胞を用いた移植治療についても研究を進める予定である。

4 免疫寛容の誘導 (渡邊)

今回、リンパ節の基本構造を備えた組織構造物を人工的に構築することに成功した。今後は、さら

に上記の人工リンパ節構築のための3要素に工夫を重ねると共に、この人工リンパ節を *in vivo* 及び *in vitro* で既知の抗原で刺激し、抗原特異的な抗体産生反応やキラーT細胞の誘導等の免疫反応が起こるかどうかを検討する予定である。

一方、未熟B細胞の細胞死の分子機構に関しては、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、シーンターゲノティックマウスの作製を行っている。

## E 結論

### 1 AAVヘクターを用いた遺伝子導入

(1) 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。  
(2) CS1 micro-dystrophinをAAVヘクターに組み込み、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。しかもmicro-dystrophin陽性筋線維では、中心核線維の減少と単位面積当たりの張力の増加が観察された。

### 2 アデノウイルスヘクターによるユートロフィン発現増強

今回のプロモーター活性の解析の結果から、ユートロフィンの発現は、各臓器や細胞によって転写レベル、mRNAの安定化、蛋白の安定性によって、複雑に制御されていることが明らかになった。今後は、他のプロモーター(タイプB)の活性だけではなく、LacZを発現するアデノウイルスヘクター導入筋で見られたmRNAの安定化因子や、蛋白の安定化要因を解析していく必要がある。

### 3 新たな治療用モデル動物

(1) 国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、筋シストロフィー大の繁殖が開始され、コロニーの確立をみた。  
(2) 筋シストロフィー大は、作業心筋に変性を生ずる以前に、刺激伝導系のPurkinje線維に選択的

な空胞変性を生じていた。

## 4 免疫寛容の誘導

(1) 生体適合性分子材料とストローマ細胞及びサイトカインを組み合わせて移植することにより、リンパ節を人工的に構築することに成功した。  
(2) 未熟B細胞の細胞死に関わる分子としてiWH37を単離し、同分子の標的ミトコンドリアにあることを明らかにした。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### I 論文発表

#### < 英文 >

- 1 Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S  
Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)  
*Experimental Animals* (in press) 2003
- 2 Yuge R, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K  
Simulated microgravity inhibits p38<sup>MAPK</sup> cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat  
*In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* (in press) 2003
- 3 Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E  
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy, genotype-phenotype correlation in mutant mice  
*Neuromuscul Disord* 2003 13(3) 207-15
- 4 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product  
*Gene Ther* 9 1576-88, 2002
- 5 Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S  
Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice  
*Biochim Biophys Acta* 1588 195, 2002
- 6 Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa

- K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S  
 $\alpha$ 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration  
*J Cell Biol* 158 1097-1107, 2002
- 7 Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill VJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G  
 Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in *mdx* mouse muscle  
*Hum Mol Genet* 11 1719-30, 2002
- 8 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S  
 Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene  
*Biochem Biophys Res Commun* 293(4) 1265-72, 2002
- 9 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
- 10 Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and Takeda S  
 Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle  
*J Appl Physiol* 92(5) 1936-42, 2002
- 11 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* 520(1-3) 18-24, 2002
- 12 Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimura J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I  
 Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy  
*Neurology* 2002, 59 1689-1693
- 13 Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I  
 Ullrich disease Collagen VI deficiency EM suggests a new basis for muscular weakness  
*Neurology* 2002, 59 920-923
- 14 Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I  
 Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease  
*Neurology* 2002, 58 1773-1778
- 15 Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I  
 The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy  
*J Biochem* 2002, 131 647-651
- 16 Komaki H, Fukazawa T, Houzen H, Yoshida K, Nonaka I, Goto Y  
 A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions  
*Ann Neurol* 2002, 51 645-648
- 17 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* 2002, 70 1368-1375
- 18 D Himeji, T Horouchi, H Tsukamoto, K Hayashi, T Watanabe, M Harada  
 Characterization of caspase-8L a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade  
*Blood* 99 4070-4078, 2002
- 19 R Z Ma, J Gao, P D Fillmore, N D Meeker, K S K Tung, T Watanabe, J F Zachary, H Offner, E P Blankenhorn, and C Teuscher  
 Identification of Bphs, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1  
*Science* 297 620-623, 2002
- 20 M Jutel, T Watanabe, M Akdis, K Blaser and C Akdis  
 Immune regulation by histamine  
*Current Opinion in Immunology*, 14 735-740, 2002
- 21 M Seimiya, R Bahar, Y Wang, K Kawamura, Y Tada, S Okada, M Hatano, T Tokuhisa, H Saisho, T Watanabe, M Tagawa, and J O-Wang  
 Clast5/Stral13 is a negative regulator of B lymphocyte activation  
*Biochem. Biophys Res Comm.* 292 121-127, 2002
- 22 S Oizumi, K Yamasaki, M Nakashima, T Watanabe, T Hommura, S Ogura, M Nishimura, H Dosaka-Akita  
 RCAS1 expression, A potential prognostic marker for adenocarcinomas of the lung

- Oncology*, 62 333-339, 2002
- 23 K Izushi, H Nakahara, N Tai, M Mio, T Watanabe and C Kamei The role of histamine H1 receptors in late phase reaction of allergic conjunctivitis  
*Eur J Pharmacology* 440 79-82, 2002
- 24 R Bahar, J O-Wang, K Kawamura, M Semiya, Y Wang, M Hatano, S Okada, T Tokuhisa, T Watanabe and M Tagawa Growth retardation, polyploidy and multinucleation induced by Clast3, a novel cell cycle-regulated protein  
*J Biol. Chem.* 2002 (in press)
- II 学会発表
- 1 尾嶋孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の発現パターンについてについて  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002
- 2 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002
- 3 武田伸一  
「筋ジストロフィーに対する治療研究の進展」  
三多摩神経懇話会 4/20, 2002
- 4 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
日本神経学会 札幌 5/29-31, 2002
- 5 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002
- 6 尾嶋孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の動態について  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002
- 7 鈴木友子、武田伸一  
筋ジストロフィーに対する治療戦略  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002
- 8 Takeda S, Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y  
IL-6 activates the *utrophin* gene transcription through promoter A in neonatal *mdx* skeletal muscles  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 6 June, 2002
- 9 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yoshimura M, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 8 June, 2002
- 10 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Masuda S, Ikemoto T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene  
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002
- 11 Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Utrophin mRNA stability can be involved in Utrophin over-expression in AxCALacZ-injected neonatal *mdx* skeletal muscles  
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002
- 12 Takeda S  
Molecular therapy for Duchenne muscular dystrophy  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Symposia, Vancouver, Canada, 9 July, 2002
- 13 Hirata A, Masuda Y, Miyagoe-Suzuki Y, Kamakura K, Takeda S  
Expression profiles of cytokine and cytokine-related genes in regenerating skeletal muscle induced by cardiotoxin-injection  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 10 July, 2002
- 14 Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S  
Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-Linked muscular dystrophy  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 11 July, 2002
- 15 Takeda S  
Molecular therapies of muscular dystrophies  
Invited lecture  
5th National Conference on Neuromuscular Diseases Beijing, China 9 17, 2002
- 16 Takeda S  
New therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy  
International Symposium of "Molecular Therapy for muscular Dystrophy" 11/26, 2002 東京
- 17 尾嶋孝一、他  
骨髄 SP 細胞の骨格筋細胞への分化について  
第2回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 18 上住聡芳、他  
骨格筋再生過程における Side population (SP) cells の動態

- 第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 19 武田伸一、他  
骨髄細胞はどのように骨格筋の再生に関与するのか？  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 20 Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Nonaka I  
Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/11/2002
- 21 Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I  
Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/8/2002
- 22 Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M  
Clinicopathological features of genetically-confirmed danon disease  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/11/2002
- 23 Nonaka I  
Recent advances in congenital muscular dystrophies  
The 9th International Child Neurology Congress, Beijing, China, 9/21/2002
- 24 Nonaka I  
Hereditary inclusion body myopathy and distal myopathy  
2<sup>nd</sup> annual scientific meeting of Asian and Oceanian myology center, Beijing, China, 9/19/2002

H 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（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 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。
- 2 CS1 micro-dystrophin 遺伝子を更に短縮した上で、骨格筋特異的な MCK プロモーター下で発現するように組み換えたアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、ジストロフィンを欠損した *mdx* マウス骨格筋に導入したところ、長期間の発現が観察された。しかもジストロフィン陽性筋線維では中心核線維が減少し、導入筋では単位当たりの張力も増加傾向にあった。

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) ベクターを用いて、短縮型でありながら、筋ジストロフィーの表現型を改善する能力を持つ micro-dystrophin の遺伝子治療についての研究を行った。

B 研究方法

(1) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発  
ロッド リピートをそれぞれ 4, 3, 1 個持つロッド短縮型 micro-dystrophin CS1 (49 kb)、AX11 (44 kb)、M3 (37 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* マウスを作出し、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解析を行った。

(2) 治療用 AAV ベクターの *mdx* マウス骨格筋への導入と効果の判定

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  $\Delta$ CS1 cDNA を MCK プロモーターに連結した治療用 AAV ベクター (AAV-MCK- $\Delta$ CS1) を作製し、10 日齢及び 5 週齢の *mdx* 骨格

筋へ導入し、導入発現の効果を中心核線維の比率、張力の上から検討した。

C 研究成果

(1) 機能的な micro-dystrophin cDNA の開発

CS1-Tg *mdx* マウス骨格筋では筋張力を含む全ての指標において、B10 マウスと有意差がないレベルまで回復がみられた。一方、M3-Tg *mdx* マウス骨格筋については、目立った表現型の改善は認められなかった。AX11-Tg *mdx* マウス骨格筋は両者の中間の改善を示した。

(2) 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

$\Delta$ CS1 cDNA を、MCK プロモーターに連結した治療用 AAV ベクター (AAV-MCK- $\Delta$ CS1) を作製し、10 日齢及び 5 週齢の *mdx* マウス骨格筋へ導入したところ、24 週後の時点でも micro-dystrophin の筋鞘における発現が確認された。特に 5 週齢への導入では、ジストロフィン陽性線維の比率が高く、しかも陽性線維では中心核線維の比率が有意に低下していた。張力の測定では治療用 AAV ベクターを導入した骨格筋で単位面積当たりの張力が増加する傾向を認めた。

D 考察

transgenic *mdx* マウスの解析結果から、ロッドリピート 4 個及びヒンジ 3 個を持つ micro-dystrophin CS1 cDNA が有効であることが示され

た。一方、これまでの研究で、AAV ベクターを dystrophin を欠損した *mdx* マウス骨格筋に導入した場合に認められる過剰な免疫応答は骨格筋特異的な MCK プロモーターを使用することにより緩和されることが判明している。そこで、CS1 cDNA を MCK プロモーター下で発現させるよう設計した AAV ベクター-AAV-MCK- $\Delta$ CS1 を作製した。同ベクターの導入により、*mdx* マウス骨格筋においては長期間の発現、中心核線維の減少、張力が増加する傾向を明らかにすることができた。今後、国立精神・神経センター内に確立した筋ジストロフィー大のコロニーを用いて骨格筋に対し導入実験を行い、DMD に対する治療用プロトコルを提出したいと考える。

## E 結論

- (1) transgenic *mdx* マウスを用いた検定により、rod repeat を4個、hunge 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。
- (2) 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。しかも micro-dystrophin 陽性筋線維では、中心核線維の減少と単位面積当たりの張力の増加が観察された。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### I 論文発表

#### < 英文 >

- 1 Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S  
Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)  
*Experimental Animals* (in press) 2003
- 2 Yuge R, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K  
Simulated microgravity inhibits p38<sup>MAPK</sup> cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat  
*In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* (in press) 2003
- 3 Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E  
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy, genotype-phenotype correlation in mutant mice  
*Neuromuscul Disord* 2003 13(3) 207-15
- 4 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product  
*Gene Ther* 9 1576-88, 2002
- 5 Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S  
Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice  
*Biochim Biophys Acta* 1588 195, 2002
- 6 Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S  
 $\alpha$ 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration  
*J Cell Biol* 158 1097-1107, 2002
- 7 Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill VJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G  
Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in *mdx* mouse muscle  
*Hum Mol Genet* 11 1719-30, 2002
- 8 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S  
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene  
*Biochem Biophys Res Commun* 293(4) 1265-72, 2002
- 9 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
- 12 Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and

Takeda S

Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle

*J Appl Physiol* 92(5) 1936-42, 2002

- 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* 520(1-3) 18-24, 2002

< 和 文 >

- 1 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

- 2 武田伸一、平田 彰  
筋ジストロフィー  
臨床検査 46(5) 467-478, 2002

- 3 尾島孝一 武田伸一  
骨格筋幹細胞と再生移植治療  
血液 腫瘍科 44(6) 442-448, 2002

- 4 高橋丈二、武田伸一  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療  
医学のあゆみ 204 174-178, 2003

- 5 武田伸一、坂本美喜  
神経 筋疾患に対する遺伝子治療  
Medical Science Digest 29(3) 104-108, 2003

- 6 鈴木友子、武田伸一  
筋衛星細胞と多能性幹細胞からの再生  
Molecular Medicine 40 257-264, 2003

- 7 吉村まどか、武田伸一  
神経変性疾患の遺伝子治療の現状  
Practical Ophthalmology 91 100-101, 2003

II 学会発表

- 1 尾島孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の発現パターンについてについて  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002

- 2 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002

- 3 武田伸一  
「筋ジストロフィーに対する治療研究の進展」  
三多摩神経懇話会 4/20, 2002

- 4 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
日本神経学会 札幌 5/29-31, 2002

- 5 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002

- 6 尾島孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の動態について  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002

- 7 鈴木友子、武田伸一  
筋ジストロフィーに対する治療戦略  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002

- 8 Takeda S, Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y  
IL-6 activates the *utrophin* gene transcription through promoter A in neonatal *mdx* skeletal muscles  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 6 June, 2002

- 9 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yoshimura M, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 8 June, 2002

- 10 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Masuda S, Ikemoto T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene  
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002

- 11 Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Utrophin mRNA stability can be involved in Utrophin over-expression in AxCALacZ-injected neonatal *mdx* skeletal muscles  
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002

- 12 Takeda S  
Molecular therapy for Duchenne muscular dystrophy  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Symposia, Vancouver, Canada, 9 July, 2002

- 13 Hirata A, Masuda Y, Miyagoe-Suzuki Y, Kamakura K, Takeda S  
Expression profiles of cytokine and cytokine-related genes in regenerating skeletal muscle

induced by cardiotoxin-injection

X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 10 July, 2002

- 14 Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S  
Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-Linked muscular dystrophy  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 11 July, 2002
- 15 Takeda S  
Molecular therapies of muscular dystrophies  
Invited lecture  
5th National Conference on Neuromuscular Diseases Beijing, China 9 17, 2002
- 16 Takeda S  
New therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy International Symposium of "Molecular Therapy for muscular Dystrophy" 11/26, 2002 東京
- 17 尾嶋孝一、他  
骨髄 SP 細胞の骨格筋細胞への分化について  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 18 上住聡芳、他  
骨格筋再生過程における Side population (SP) cells の動態  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 19 武田伸一、他  
骨髄細胞はどのように骨格筋の再生に関与するのか？  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸

#### H 知的所有権の出願 登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（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 ユートロフィン プロモーター（タイプ A）の領域をゲノムライブラリーから、クローニングした。
- 2 領域活性の解析を行うため、プロモーター下流に核移行シグナルをつけた LacZ 遺伝子を連結し、トランスジェニックマウスを作製した。
- 3 系統のトランスジェニックマウスを解析し、A タイプのユートロフィン プロモーターの活性は、肝、腎、大腸、精巣で高く、心筋 骨格筋 血管平滑筋では低いことが明らかになった。

**A 研究目的**

ユートロフィン は 395 kDa の細胞骨格タンパク質であり 成熟骨格筋では神経筋接合部と筋腱移行部 および再生線維の筋内膜に一過性に発現する。最近ユートロフィン遺伝子には 2 種類のプロモーター（A, B）が報告されている。ユートロフィン トランスジェニック *mdx* マウスへの表現型改善 ジストロフィン ユートロフィン二重欠失による表現型重篤化から ユートロフィンはジストロフィンの機能をある程度代償できると考えられる。我々は、AxCALacZ 投与した *mdx* マウスの骨格筋筋質膜でのユートロフィン過剰発現を見だし、筋変性を抑制していることに注目した。更に IL-6 投与により、ユートロフィン過剰発現が一部再現できることを既に報告した。そこでこれらのユートロフィンの過剰発現が A-ユートロフィン プロモーターの活性化によるものをさらに検討することとした。

**B 研究方法**

まず A タイプ ユートロフィンプロモーターを transgene に組み込んだトランスジェニックマウス {A-utrophin promoter / nls LacZ Tg mouse , background C57BL/6 mouse} を作製する。そして得られた各ラインについて、各臓器における内因性ユートロフィン発現と核における LacZ 発現との関係を免疫組織化学的に解析し、さらにトランスジェニックマウス再生筋（CTX 投与による）

やトランスジェニックマウスと *mdx* マウスとの交配から得られたマウス骨格筋に IL-6 を投与し、LacZ の発現を解析する。

**C 研究成果**

Southern Blotting 法 PCR 法にてトランスジェニックマウスを判別し、独立した 4 ラインを確立した。核における LacZ 発現について、解析した結果、幼弱齢 成熟齢いずれの時期においても、全ての系統に共通して肝臓、腎臓、大腸、精巣での発現が認められ、細胞レベルでも内因性ユートロフィンの発現と一致していた。心筋 骨格筋 血管平滑筋では、内因性にはユートロフィンの発現が認められるにも関わらず、核における LacZ 発現を認めなかった。現在、各臓器における transgene mRNA レベルでの検討と核における LacZ 発現臓器での転写開始点を検討中である。

**D 考察**

今後は transgene の mRNA レベルでの解析（RT-PCR）、核における LacZ 発現臓器での転写開始点の検討（5' RACE 法を利用）、そしてトランスジェニック *mdx* マウスへの IL-6 投与、あるいは AxCALacZ 投与での transgene mRNA（LacZ mRNA）を TaqMan RT-PCR 法を用いて定量的に比較検討する必要がある。

## E 結論

今回のプロモーター活性の解析の結果から、ユートロフィンの発現は、各臓器や細胞によって転写レベル、mRNA の安定化、蛋白の安定性によって、複雑に制御されていることが明らかになった。今後は、他のプロモーター（タイプB）の活性だけではなく、LacZ を発現するアデノウイルスベクター導入筋で見られた mRNA の安定化因子や、蛋白の安定化要因を解析していく必要がある。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### I 論文発表

#### < 英文 >

- 1 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product  
*Gene Ther* 9 1576-88, 2002
- 2 Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, Takeda S  
Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice  
*Biochim Biophys Acta* 1588 195, 2002
- 3 Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S  
 $\alpha$ 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration  
*J Cell Biol* 158 1097-1107, 2002
- 4 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S  
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene  
*Biochem Biophys Res Commun* 293 1265-72, 2002

#### < 和文 >

- 1 鈴木友子、武田伸一  
筋衛星細胞と多能性幹細胞からの再生  
*Molecular Medicine* 40 257-264, 2003
- II 学会発表
- 1 尾嶋孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の発現パターンについて  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002
- 2 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002
- 3 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
日本神経学会 札幌 5/29-31, 2002
- 4 平田彰、他  
cDNA array を用いた骨格筋変性 再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討  
第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002
- 5 尾嶋孝一、他  
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の動態について  
第23回日本炎症 再生医学会 7, 2, 2002
- 6 鈴木友子、武田伸一  
筋ジストロフィーに対する治療戦略  
第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002
- 7 Takeda S, Itoh Y, Fujumori K, Miyagoe-Suzuki Y  
IL-6 activates the *utrophin* gene transcription through promoter A in neonatal *mdx* skeletal muscles  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 6 June, 2002
- 8 Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yoshimura M, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S  
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response  
5<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 8 June, 2002
- 9 Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Masuda S, Ikemoto T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic

phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene

The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002

- 10 Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S  
Utrophin mRNA stability can be involved in Utrophin over-expression in AxCALacZ-injected neonatal *mdx* skeletal muscles  
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002
- 11 Hirata A, Masuda Y, Miyagoe-Suzuki Y, Kamakura K, Takeda S  
Expression profiles of cytokine and cytokine-related genes in regenerating skeletal muscle induced by cardiotoxin-injection  
X<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 10 July, 2002
- 12 尾嶋孝一、他  
骨髄 SP 細胞の骨格筋細胞への分化について  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 13 上住聡芳、他  
骨格筋再生過程における Side population (SP) cells の動態  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
- 14 武田伸一、他  
骨髄細胞はどのように骨格筋の再生に関与するのか？  
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸

#### H 知的所有権の出願 登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（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 神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、筋ジストロフィー犬の繁殖が開始された。
- 2 筋ジストロフィー大は、筋ジストロフィーに対して遺伝子治療を開始するための鍵となる重要なモデル動物である。
- 3 筋ジストロフィー犬では、早期から特徴的な心電図の異常を呈するが、系統的な解剖を進めた結果、刺激伝導系の Purkinje 線維にほぼ選択的な空胞変性を見出した。

A 研究目的

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の開発には、モデル動物が極めて重要な役割を果たしている。これまでシストロフィン欠損のモデル動物として *mdx* マウスが用いられてきたが、小型である上に軽症で進行性が目立たないために治療用のモデルとしては制限がある。そこで、ヒト DMD に類似した重症で進行性の経過を辿る筋ジストロフィー大が注目されている。本研究は、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大のコロニー確立を図る。

B 研究方法

- 1 平成 13 年 3 月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、施設内及び運営面の整備を進めた結果、同年 11 月より筋ジストロフィー大の飼育が開始された。平成 14 年 6 月からは、同施設内での繁殖を開始する。
- 2 筋ジストロフィー大及び同腹の正常対照大について、1 週齢の幼大から 1 歳齢の成大に至るまで、系統的な解剖を行い、特に骨格筋と心筋については、組織学的、免疫組織学的に詳細な解析を行う。

C 研究成果

- 1 平成 14 年度内にキャリア大を用いた 4 回の分娩を経験した。産仔数は 6~8 匹であり、初期には Golden Retriever と Beagle の hybrid

効果もあって産仔数が多く、分娩困難も経験したか、その後は管理体制を確立することかてきた。平成 15 年 3 月末現在、筋ジストロフィー大 7 匹、キャリア大 19 匹が飼育され、病態研究と遺伝子治療実験が行われた。

- 2 筋ジストロフィー大の臨床徴候としては、生後 8 週齢から骨格筋、特に四肢、側頭筋、腰部の萎縮及び関節の拘縮、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るいそう及び脱水も観察された。
- 3 筋ジストロフィー大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。筋ジストロフィー大が我が国に導入されてから、これまでに 7 例の筋ジストロフィー大の死亡があった（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。

そこで、筋ジストロフィー大の心臓について、系統的な病理的検索を行ったところ、左室作業心筋には心電図異常に見合うだけの変性及び線維化の所見はなかった。ところが、刺激伝導系の Purkinje 線維には選択的な空胞変性が観察された。レクチン染色、電顕を用

いた検討から、空胞には glycogen が貯留していると考えられる。

#### D 考察

国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設内において筋ジストロフィー大の繁殖が開始されたことから、筋ジストロフィー大のコロニーの確立の目的が立ったといえる。今後の課題は、筋ジストロフィー大の病態の把握と治療研究であるが、筋ジストロフィー大の病態に関しては、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) でも認められるが、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に関連している可能性がある。

後者に関しては、最近DMDの死因として心不全が呼吸不全を上回ることが指摘されている。今年度の研究で刺激伝導系の Purkinje 線維に選択的な空胞変性が見出されたことは特筆される。Purkinje 線維は作業心筋と同じく遅筋型の Myosin heavy chain から構成されるのに対し、エネルギー産生の上では、作業心筋が oxidative であるのに対し、Purkinje 線維は glycolytic であり、解糖系に依存していることが知られている。Purkinje 線維にほぼ選択的な空胞変性を生じ、しかも空胞内に glycogen が貯留していると考えられたことは、ジストロフィン欠損の下流で解糖系の機能低下を生していることを強く示唆する。以前から筋ジストロフィー大では速筋が障害を受けやすいことが指摘されている。そこで、ジストロフィン欠損の結果、何故 Purkinje 線維が障害されるのか今後明らかにしたい。また、Purkinje 線維の障害があれば、何故筋ジストロフィー大に特有の心電図異常を呈するのか明らかにすることも次の課題である。

一方、筋ジストロフィー大は、ウイルスヘ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の良い対象であり、現在アデノ随伴ウイルスヘクターを用いた導入実験を行っている。さらに 14 年度末に実験犬を対象にした X 線照射装置も搬入されたため、今後幹細胞を用いた移植治療についても研究を進める予定である。

#### E 結論

- 1 国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、筋ジストロフィー大の繁殖が開始され、コロニーの確立をみた。
- 2 筋ジストロフィー大は、作業心筋に変性を生ずる以前に、刺激伝導系の Purkinje 線維に選択的な空胞変性を生じていた。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### I 論文発表

##### < 英文 >

- 1 Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohji T, Nishimiyama J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I  
Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy  
Neurology 2002, 59 1689-1693
- 2 Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I  
Ullrich disease Collagen VI deficiency EM suggests a new basis for muscular weakness  
Neurology 2002, 59 920-923
- 3 Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nozaka I, Hirano M, Nishino I  
Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease  
Neurology 2002, 58 1773-1778
- 4 Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I  
The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy  
J Biochem 2002, 131 647-651
- 5 Komaki H, Fukazawa T, Houzen H, Yoshida K, Nonaka I, Goto Y

A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions

Ann Neurol 2002, 51 645-648

- 6 Ankawa-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 2002, 70 1368-1375

9/19/2002

H 知的所有権の出願・登録状況  
なし

## II 学会発表

- 1 Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Nonaka I  
Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/11/2002
- 2 Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I  
Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/8/2002
- 3 Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M  
Clinicopathological features of genetically-confirmed danon disease  
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7/11/2002
- 4 Nonaka I  
Recent advances in congenital muscular dystrophies  
The 9th International Child Neurology Congress, Beijing, China, 9/21/2002
- 5 Nonaka I  
Hereditary inclusion body myopathy and distal myopathy  
2<sup>nd</sup> annual scientific meeting of Asian and Oceanian myology center, Beijing, China,