

20020889

厚生科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 良一

平成 15 (2003) 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した。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。

本年度の研究では、ネガマイシンのストップコドン読み越え活性の本体にせまるため、rRNA との結合の有無、結合分子比、さらに細胞培養系を用いたダブルレポーターアッセイによる読み越え活性の実測等において、大きな進展がみられた。さらに、分担研究者の研究室でも、本研究がきっかけとなってナンセンス突然変異型の筋ジストロフィー病態解明と治療研究に関して新たな展開が見られている。最後になりましたが、平成14年度の研究費補助をいただいた厚生労働省に深く感謝致します。

平成15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・研究成果に関する一覧表・別刷	
	1) 筋ジストロフィーに対する薬物治療-----	1
	2) 抗生物質によるナンセンス突然変異型遺伝子病の治療-----	8
	3) Growth Factor Array Fabrication Using an Ink Jet Printer-----	16
	松田 良一	
II.	分担研究報告・研究成果に関する一覧表・別刷	
1.	ジストロフィン欠損に伴う血管拡張障害-----	22
	武田 伸一	
2.	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-----	26
	原 孝彦	
3.	ネガマイシンによる筋ジストロフィーの治療-----	28
	浜田 雅	
4.	Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法に関する研究-----	29
	松尾 雅文	
5.	筋ジストロフィー培養骨格筋細胞の分子生物学的研究-----	31
	齊藤 加代子	
6.	1) 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-----	32
	2) Improved Serum-free Defined Medium for Proliferation and Differentiation of Chick Primary Myogenic Cells-----	35
	塩塚 政孝	
7.	1) 筋強直性ジストロフィーの分子病態と治療に関する研究-----	42
	2) The First Molecular Evidence that Autophagy Relates Rimmed Vacuole Formation in Chloroquine Myopathy-----	45
	3) Myotonic Dystrophy Protein Kinase [DMPK or Myotonin Protein Kinase(MtPK)]-----	51
	石浦 章一	

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

研究報告書

未認可抗生物質ネガマイシンを用いた筋ジストロフィーの治療

主任研究者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科助教授

研究要旨

副作用が強いアミノグリコシド系抗生物質に代わる薬剤としてジペプチド系抗生物質ネガマイシンに注目し、そのストップコドン読み越え作用を mdx マウスに投与して検討した所、骨格筋と心筋にそれまで検出されなかったジストロフィンの蓄積を認めた。ダブル・レポーターアッセイ系を用い、ストップコドン読み越え作用を定量した所、ゲンタマイシンの有意に高い活性を示した。TOF-MASS 解析によりネガマイシンがリボソーム RNA の A サイトに 3 分子結合する事が明かとなった。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の 5? 10%は、ナンセンス突然変異によるといわれている。もし、薬物等により、遺伝子内に生じたストップコドンを読み越えること(readthrough)ができれば、ナンセンス突然変異型の筋ジストロフィーは治療が可能になるだろう。

1999 年、Barton-Davis らは、readthrough 活性がある抗生物質ゲンタマイシンを mdx マウス（ジストロフィン遺伝子にナンセンス突然変異が生じたため筋変性を示すデュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデル動物）に投与し、それまで認められなかったジストロフィタンパク質の合成と蓄積が骨格筋組織に起きることを報告した。しかし、ゲンタマイシンは強い副作用を有するため、ヒトへの長期間投与は難しい。

昨年度の本研究において、我々はゲンタ

マイシンとは全く分子構造が異なり、かつ大腸菌由来の翻訳系で readthrough 活性をもつことが既に報告されている未承認抗生物質ネガマイシンを mdx マウスに投与することで、ゲンタマイシンの場合と同様、骨格筋にジストロフィンの蓄積が起きることを示した。

本年度は、1) ネガマイシン投与の長期間により、mdx マウスの心筋にもジストロフィンが蓄積すること、2) ネガマイシンがリボソーム RNA の A サイトに結合すること、3) ネガマイシンがレポーター遺伝子内に挿入されたストップコドンを実際に readthrough すること、を示す結果を得た。

方法と結果

1) ネガマイシンを投与された mdx マウスの心筋におけるジストロフィンの蓄積

ネガマイシンを mdx マウスに2週間皮下投与すると骨格筋（前脛骨筋）においてジストロフィンの蓄積を求めたが、心筋においてはその蓄積は認められなかった。そこで、4週間の長期投与を mdx マウスに行った所、心室筋においてジストロフィンの蓄積が起きていることを蛍光抗体およびイムノプロット法により証明した。

## 2) ネガマイシンのリボゾーム RNAA サイトへの結合

翻訳過程を干渉するゲンタマイシンは、リボゾーム RNA の A サイトに結合することが報告されている。そこで、我々はネガマイシンもリボゾーム RNA の A サイトに結合するかを検討した。合成した 27 塩基長の A サイト配列とネガマイシンを 1 対 10 の割合で混合し、イオン・スプレイ型飛行時間質量分析器(TOF Mass)を用いて結合物の分子量を測定した。その結果、A サイト RNA 断片 1 分子に対し、ネガマイシンは 3 分子結合することが示された。

## 3) ネガマイシンの readthrough 活性の定量

フランスの P. Guicheney, V. Allamand, J. P. Rousset らと共同で、ネガマイシンの readthrough 活性を測定した。まず、SV40 プロモーター配列に  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子配列を縦列につなぎ、その両遺伝子の結合部に先天性筋ジストロフィー由来のストップコドンを含む配列 27 塩基配列を挿入したコンストラクトを作成。それを NIH 3T3 細胞に導入し、

その細胞の培養液にネガマイシン (500microgram/ml)を投与した。投与 24 時間後に両遺伝子産物の酵素活性を測定し、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性に対してルシフェラーゼ活性を標準化し、抗生物質非存在下および存在下でのルシフェラーゼ活性の上昇率をもって、readthrough 活性とした。その結果、ネガマイシンはゲンタマイシンに比べ有意に高い readthrough 活性を示した。

## 考察

ジペプチド系抗生物質ネガマイシンは、同様の readthrough 活性を示すアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンとは異なる分子構造である。昨年度の研究から、マウスの LD50 と聴力障害惹起活性で見ると、ゲンタマイシンに比べ、毒性はかなり低いことが知られた。長期間投与で mdx マウスの心筋においてもジストロフィンの合成と蓄積に有効であったことから、ナンセンス突然変異型の筋ジストロフィーの治療薬として有力な候補と考えられる。さらに、ダブル・レポーターアッセイ系により、ネガマイシンがゲンタマイシンより高い readthrough 活性が認められ、さらに rRNA の A site への結合も証明されたことで、ネガマイシンのヒトを含めた哺乳類への投与 n 合理性が示された。今後は、ネガマイシン類似体あるいは分子改変体の readthrough 活性と毒性の検討をおこなう予定である。

## 参考文献

M. Hamada, et al. A new antibiotic negamycin.

J. Antibiot. 23: 170-171. 1970.

Y. Uehara, et al. Negamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phage f2 RNA in vitro. *iochim. Iophys. Acta.* 374: 82-95. 1974.

E. Barton-Davis, et al. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 104: 375-381. 1999.

M. Arakawa, et al. Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myol.* 20:154-158. 2001.

M. Cassan, et al. UGA readthrough in mammalian cells: Effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol. Biol.* 2: 3-9.2001.

研究成果に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
松田良一	抗生物質によるナンセンス突然変異型遺伝子型の治療	モレキュラー メディシン	39 巻 12 号	1430-1436	2002 年
荒川正行	筋ジストロフィーに対する薬物治療	医学のあゆみ	204 巻 3 号	183-188	2003 年
Watanabe, K	Growth Factor Array Fabrication Using an Ink Jet Printer	Zoological Science	Vol.20	In press	2003 年

20020889

以降 P.2～21までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
前ページの「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ジストロフィン欠損に伴う血管拡張障害

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. 骨格筋線維から nNOS を欠損している *mdx* マウス、全身臓器から完全に nNOS を欠損した nNOS<sup>-/-</sup> マウス及び筋鞘における nNOS を欠如する  $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup> マウスについて、睾丸拳筋内の細動脈レベルでのすり応力負荷に対する血管拡張性を検討したところ、*mdx* マウス及び nNOS<sup>-/-</sup> マウスで血管拡張性に異常が観察された。
2. 骨格筋の中の細動脈レベルの血管がすり応力負荷に対して、血管拡張を生ずるためには、nNOS が必要である。

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 Negamycin, Gentamicin 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。DMD においては、運動時に血管の拡張障害を生じ、骨格筋が相対的な虚血に陥る可能性が指摘されている。実際に、ジストロフィンを欠損した *mdx* マウスの頸動脈や腸間膜動脈のような比較的大きな血管では、各種血管拡張薬に対する血管拡張反応は正常であるものの、すり応力に対しては拡張障害があり、血管内皮の一酸化窒素合成酵素 (NOS) の関与が指摘されている。我々はジストロフィン欠損によって、骨格筋線維において神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の発現の異常を伴う点に着目した。骨格筋に隣接する細動脈では、骨格筋の筋鞘に豊富に存在する nNOS が血管拡張に関与する可能性がある。そこで我々は、*mdx* マウスとその対照マウス及び nNOS 欠損マウス (nNOS<sup>-/-</sup>)、 $\alpha 1$ -ジストロフィン欠損マウス ( $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup>) とその対照マウスについて骨格筋に直接流入する細動脈のレベルで血管拡張薬の投与、及びすり応力が增大するように負荷を加え、それに対する血管の拡張性を比較検討した。

B. 研究方法

8~10 週の C57BL/10 及び *mdx* マウス、C57BL/6 及び  $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup> と nNOS<sup>-/-</sup> を用いた。麻酔下に、血液

循環を保ったまま、睾丸拳筋を切り広げ、同筋内を流れる細動脈 (直径 6~30 $\mu$ m) を顕微鏡下で観察する一方で、CCD カメラを介して画像をビデオテープあるいはコンピュータに記録した。血管拡張薬として、NOS の作働薬である Acetylcholine と NO の donor である Sodium Nitroprusside を使用した。枝分かれした血管の一方の下流側で血管を結紮することで、他方の血管に流量の負荷 (すり応力) を与え、血管の拡張性 (血管径) 及び流量の変動を測定した。

C. 研究成果

Acetylcholine と Sodium Nitroprusside の投与に対する血管拡張性については、C57BL/10 マウスと *mdx* マウス及び C57BL/6 マウスと  $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup>、nNOS<sup>-/-</sup> マウスとの間で、有意差は認められなかった。すなわち、どの line のマウスの睾丸拳筋内の細動脈も拡張性を示した。一方、すり応力負荷に対する血管の拡張性は、*mdx* マウスと nNOS<sup>-/-</sup> マウスにおいて正常対照に比べ有意に低下していた。しかし、 $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup> マウスでは対照と有意差は認められなかった。

D. 考察

全てのマウスの睾丸拳筋内の細動脈が血管拡張薬に対して有意差のない血管拡張を示したことから、*mdx* マウス、 $\alpha 1$ -syn<sup>+/+</sup> マウス、及び nNOS<sup>-/-</sup> マウスにおいては、細動脈レベルの血管平滑筋の機能は

正常であるといえる。*mdx* マウス及び *nNOS*<sup>+</sup> マウスにおいて、ずり応力負荷に対して血管拡張性が低下することに関しては、*mdx* マウスでは、骨格筋における *nNOS* の発現が高度に低下していることを考え併せると、細動脈レベルの血管がずり応力負荷に対して血管拡張を行うためには、*nNOS* が必要であることが明らかである。*α1-syn*<sup>+</sup> マウスで血管拡張性に異常がない点については、同マウスにおいては、*nNOS* は骨格筋の筋鞘には局在しないものの、骨格筋における発現量には変化がないことから、ずり応力負荷に対する細動脈の血管拡張性には、筋線維内での *nNOS* の局在は影響しないと考えられる。今後の問題点は、ずり応力負荷に対する血管拡張には、血管内皮あるいは筋線維の何れの *nNOS* が重要であるのかという点にある。細動脈の内皮には、発現量としては少なくとも *nNOS* が発現しており、ジストロフィン依存性であると考えられるからである。

#### E. 結論

- (1) 細動脈のずり応力負荷に対する血管拡張性は、*nNOS* に依存している。
- (2) ずり応力負荷に対する血管拡張性に対して、細動脈の血管内皮あるいは筋線維の *nNOS* のいずれがより重要であるのかは、今後の問題である。

#### 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: *α1-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 Commu* 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. 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 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: Internatiional 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

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

分担研究者 原 孝彦

財) 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

研究要旨

ジストロフィン欠損する Mdx マウス骨格筋の初代培養系に SV40 温度感受性 T 抗原を発現させることによって、Mdx 筋細胞株を新規に樹立した。この細胞株は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、ネガマイシン処理によりジストロフィンを再発現した。また、同様の方法によって、デュセンヌ型およびベッカー型筋ジストロフィー患者の筋生検細胞の株化にも成功した。

A. 研究目的

筋ジストロフィーは低年齢でのいたましい発病経緯をたどる難病で、現在その治療方法はない。我が国でも最も患者数の多いデュセンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンは cDNA サイズが 14Kb と大きく、また全身の筋肉にデリバーすることも困難である。そこで、ネガマイシンのような停止コドンを読み飛ばす抗生物質によってノンセンス変異を救済する方法は有望である。本研究では、ネガマイシンの有効性と副作用を試験管内で評価するために、ジストロフィン欠損マウスおよびヒト患者生検筋から新しく筋細胞株を樹立することを目的とした。

B. 研究方法

Mdx マウス骨格筋および筋ジストロフィー患者筋生検の筋初代培養系に、SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルスを感染させることでそれぞれの筋細胞を株化した。患者筋生検に関しては、東京女子医大・斎藤加代子教授、神戸大・松尾雅文教授との共同研究。

(倫理面への配慮)

ヒト患者筋生検細胞株の樹立に関しては、個人の遺伝子情報が外部に漏れないこと、また、本目的以外の流用をしない、ことなど明記した倫理申請書を本研究所および病院の双方で審議し承認を得ている。さらに、医師と患者家族との間で筋生検を本研究に使用することの同意をいただいてから、研究を実施した。

C. 研究結果

レトロウイルスベクター導入に先立って、まず骨格筋細胞の増殖能を高めるよう初代培養系を最適化した。その上で、SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルスを、Mdx マウス筋細胞に感染し、持続的に培養

することで株化した。これらの細胞株は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。Mdx マウス筋細胞株をネガマイシン処理すると、筋管の一部でジストロフィンタンパク質の再発現が観察された。また、筋ジストロフィー患者家族の同意に基づいて患者筋生検細胞の株化を同様の方法にて行い、現在までに、デュセンヌ型 3 例およびベッカー型 2 例について温度感受性ヒト筋細胞株の樹立に成功した。

D. 考察

筋細胞の初代培養で増える筋細胞数には限度があり、薬剤応答の評価には十分でなかった。本研究により、均質な変異筋細胞を利用できるようになった。ネガマイシンの応用範囲を拡大する目的で、今後は他のタイプの筋ジストロフィーについても同様の細胞株を製する予定である。

E. 結論

ジストロフィン欠損する新規筋細胞株を、Mdx マウスおよび患者筋生検細胞から樹立した。ネガマイシンの有効性検討に有用であると期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

## 2. 学会発表

中山由紀、田中貴代子、岩槻 健、荒川正行、  
加藤真樹、関 直彦、松田良一、原 孝彦：  
mdx 変異により発現変動する骨格筋細胞遺  
伝子の検索. 第24回日本分子生物学会年会,  
2001.12.10, 横浜

Nakayama, T., Nara, T., Arakawa, M.,  
Kato, M., Seki, N., Matsuda, R., and Hara,  
T. : Gene expression affected by the Mdx  
mutation in skeletal muscle cell lines. Xth  
International Congress on  
Neuromuscular Diseases, 2002.7.7-12,  
Vancouver, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

研究課題名：ネガマイシンによる筋ジストロフィーの治療

分担研究者：微生物化学研究所 顧問 浜田 雅

1. 平成13年度に引き続き、ネガマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. M890-C2 株による生産力価向上およびその試作研究を実施した。  
そのなかから高生産力価株を用いて生産を行いネガマイシンサンプルの供給を行うことができた。
2. 上記ネガマイシンを用いて、ネガマイシンと RNA との直接的な相互作用を観察するための検討を開始した。
3. 過去に実施されたネガマイシンの抗菌剤開発を前提とした薬理作用の研究の再調査を行った。

## Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法に関する研究

(分担) 松尾雅文 神戸大学大学院医学系研究科教授

### 研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (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。点突然変異を治療する方法を確立するための検討を行った。

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。

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。Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者の中からナンセンス変異を有する例を同定することに着手し、欠失の異常が発見されなかった症例で、患者のジストロフィン cDNA を解析していった。そして、少なからずの症例でジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を同定することに成功した。そこで、患者あるいは患者両親から同意を得て、その患者の筋細胞株を樹立した。

まず、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する方法について検討した。ジストロフィン遺伝子の点突然変異を修正するためにキメラ RNA/DNA を合成し、患者由来筋細胞に導入した。そして、培養後に細胞のジストロフィン染色を行った。しかし、キメラ RNA/DNA 導入による遺伝子修復効率は低かった。すなわち、筋細胞をジストロフィン染色するとごく一部の筋線維がジストロフィン陽性になったが、ほと



んどは陰性のままであった。現在のところではキメラ RNA/DNA を臨床応用するレベルにはいたらなかった。

また、抗生物質のゲンタマイシンを使って点突然変異を修復することを試みた。ナンセンス変異を有する患者細胞株の培養液にゲンタマイシンを加え、さらに培養した。培養後筋細胞をジストロフィン染色した。ナンセンス変異を有する一部の症例ではゲンタマイシンに反応してジストロフィンの産生が認められた。しかし、一部の症例ではジストロフィンの産生は認められなかった。これは、ナンセンス変異の異常の差によるものと示唆された。今後、さらに詳しく解析する予定である。一方、ゲンタマイシンに反応例では臨床応用が可能と考えられた。

# 筋ジストロフィー培養骨格筋細胞の分子生物学的研究

斎藤加代子、近藤恵里、河北有規子

東京女子医科大学小児科、同大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野

## 研究要旨

筋ジストロフィーの病態の解明と根本治療法の開発に向けて、患者骨格筋細胞を培養し、1) 各種筋ジストロフィー由来の骨格筋衛星細胞の培養系を作成、2) 疾患の病態解明のために培養細胞の分子生物学的な特徴を解析した。その結果、DMD筋細胞は培養系でもジストロフィンのmRNAおよび蛋白の発現が障害されており、Ex vivo治療の指標として応用が可能であることが明らかになった。また、全ての細胞でメロシンの発現は見られなかった。さらに分化の進んだ段階で発現してくる可能性はあると考えられ、分化を誘導する系を確立していくことが必要である。

## 研究目的

筋ジストロフィーの病態の解明と根本治療法の開発に向けて、患者骨格筋細胞を培養し、1) 各種筋ジストロフィー由来の骨格筋衛星細胞の培養系を作成し、2) 疾患の病態解明のために培養細胞の分子生物学的な特徴を調べ、3) Ex vivoにおける治療システムを確立することを目的とした。

## 対象と研究方法

対象は診断的筋生検時に得られたDuchenne型筋ジストロフィー(DMD) 1例、Becker型筋ジストロフィー(BMD) 1例、病理解剖時に得られた福山型筋ジストロフィー(FCMD) 胎児2例(18週、20週)、FCMD剖検例1例、コントロール2例からの骨格筋細胞である。これらの生検筋または剖検筋から、骨格筋衛星細胞を得て、初代培養を行なった。その一部をクローニングにより筋細胞クローンとした。また一部をSV40によって株化した。得られた骨格筋培養細胞において、増殖期、分化期におけるCKの測定、Taqmanプローブを用いた比較定量RT-PCRによるジストロフィンmRNAの発現量の測定、ジストロフィン、メロシン、 $\alpha$ -ジストログリカンに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行なった。

## 倫理面への配慮

本研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受けている。

## 研究結果

(1) 増殖期、分化期におけるCKの測定：各培養細胞は増殖培地では2～4日でmyoblastはconfluentに近くなる。分化誘導培地に変えて4日で融合して多核のmyotubeになる。増殖期、分化期それぞれの細胞のCK値を測定し、増殖期から分化期へとCK値が高くなっていることを確認した。コントロールとBMDの細胞が特に高いCK値を示していた。

(2) Taqmanプローブを用いた比較定量RT-PCRによるジストロフィンmRNAの発現量の測定：培養筋細胞におけるジストロフィンmRNAの発現量の経時的変化をとらえるため、ジストロフィン遺伝子エクソン43-44に対するTaqMan Probeを用いた比較定量RT-PCRを行ない、検量線法で算出した各サンプルの初期量を内部コントロールのGAPDH量で補正した値を検討したところ、発現量は増殖期よりも分化期で増加しており、その程度は正常コントロール筋で約1.3倍、BMD筋では約1.2倍に対し、DMD筋では約2倍と低いことがわかった。また、分化期同士で比較した場合、コントロールを1とすると、BMD筋では相対的に約6倍の発現があることがわかったが、DMD筋では約1/2であった。これは、生検/剖検筋組織間でのmRNA量を検討した結果と同じ傾向を示した。DMD筋に比べ、障害の程度の低いBMD筋では、筋再生が活発である可能性があった。

(3) ジストロフィン、メロシン、 $\alpha$ -ジストログリカンに対する抗体を用いた免疫組織化学染色：コントロール、BMD、FCMDのmyotubeの細胞質にジストロフィンの反応がみられたが、DMDではジストロフィンは陰性であった。一方、メロシンに関してはコントロール、BMD、DMD、FCMDいずれも反応がみられなかった。メロシンは分化が進んでから発現してくる可能性が考えられる。 $\alpha$ -ジストログリカンの反応はコントロールとBMD細胞の細胞質に認められ、DMDではわずかに認められた。FCMDの胎児細胞では反応がほとんどなかった。

## 考察と結論

- 1) DMD、BMD、FCMD患者由来の筋衛星細胞培養系を作成した。
- 2) DMD筋細胞は培養系でもジストロフィンのmRNAおよび蛋白の発現が障害されており、Ex vivo治療の指標として応用が可能である。
- 3) 全ての細胞でメロシンの発現は見られなかった。分化の進んだ段階で発現してくる可能性があると考えられる。
- 4)  $\alpha$ -ジストログリカンの発現はFCMD由来の筋細胞で低下していた。 $\alpha$ -ジストログリカンの細胞内での動態に障害がある可能性を示唆した。

# 厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業） 分担研究報告書

## 「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」に関する研究 分担研究者 塩塚政孝（財）長寿科学振興財団リサーチレジデント

研究要旨：mdxマウスやヒトDMD患者由来の骨格筋単株化細胞を用いた培養系と、ネガマイシン処理によるジストロフィンタンパク質の蓄積を検討した。

### A. 研究目的

ネガマイシンによる、デュシャンヌ型筋ジストロフィー症（DMD）におけるジストロフィンタンパク質の回復を、マウス・ヒト細胞を用いた*in vitro*の系で検証することを目的とした。

### B. 研究方法

培養mdxマウス骨格筋細胞（初代培養細胞と、アンホトロピックウイルス産生系PLAT-Eを用いて作成した温度感受性SV40 large T antigen遺伝子を導入した単株化細胞）を用いて、ネガマイシンをはじめとする（財）微生物化学研究所が保有する公開済及び未公開抗生物質の効果、クレアチンキナーゼ活性やジストロフィンといった筋特異的タンパク質の蓄積を指標として、生化学的・免疫組織化学的に検討した。また、ナンセンス突然変異を有するヒトDMD患者筋生検由来骨格筋細胞の単株化細胞の培養系の確立を試みた。

### C. 研究結果

mdxマウス骨格筋単株化細胞におけるネガマイシン処理の効果を検討するにあたって、自ら開発した無血清培養液を用いることで、従来の実験系よりも更に明確に調べることが可能となった。無血清培養液の組成は、基本合成培養液としてダルベッコ変法イーグル最少必須培養液・ハムF12培養液・199培養液を1:1:2の割合で混合したものに、ウシホロトランスフェリン、ウシインスリン、ウシ血清アルブミン（フラクションV）、ヒトリコンビナント塩基性線維芽細胞成長因子、ヒトリコンビナントインスリン様成長因子-I、ヒトフィブロネクチンを加えたもので、血清含有培養系での作用よりも薬物の感受性が高く示されるものである。

培養基質へのI型コラーゲン配向やアスコルビン酸の添加により、筋管形成はある程度改善され、ネガマイシン処理によるジストロフィンタンパク質の蓄積は蛍光抗体法で認められたが、その発現は微弱であった。

### D. 考察

ネガマイシン処理をした培養mdx単株化細胞では、抗ジストロフィン抗体を用いた蛍光抗体法によりジストロフィンタンパク質の発現が未だ弱いため、単株化細胞のリクローニング（分化能をもたない細胞や線維芽細胞の混入が見られるため）や、IV型コラーゲンやラミニン等の細胞外基質成分の塗布、培養液構成成分の再検討を行い、より発達した筋管形成を実現する培養系の改善が必須である。

ヒトにおける筋衛星細胞はマウスとは異なり、特にDMD由来筋芽細胞は増殖能力に限界があり、急速に老化を生じることが報告されている。実際、その増殖能力、分化後の成熟の度合いは低く、実験に必要となる細胞の確保が困難であり、テロメアの浸食も指摘されている。現在、5種のDMD患者由来単株化細胞を、32°Cでの増殖培養液として19%ウシ胎仔血清-5% UltrosorG-ダルベッコ変法イーグル最少必須培養液、39°Cでの分化培養液として5%ウシ胎仔血清-2% UltrosorG-ダルベッコ変法イーグル最少必須培養液/ハムF12培養液（1:1、抗生物質不含）を用いており、分化状態を継続させた後、タンパク質の発現を解析しているが、基本合成培養液と添加血清関連因子、ビタミン類の選定、培養基質への細胞外基質の塗布から、筋特異的タンパク質の発現・蓄積を指標とした免疫組織科学的・生化学的手法を用いて検討し、より分化状態の良い/早く分化する培養系の確立に邁進している。

### E. 結論

ヒトDMD患者の筋生検試料由来衛星細胞を分化能をもったまま株化し、増殖・分化状態を維持できれば、*in vitro*における薬剤の治療効果を検証でき、筋ジストロフィー症のオーダーメイドによる化学療法の可能性が拓かれるため、基礎的かつ地味な実験ではあるが、その重要性は高いと思われる。さらに、より簡便に治療効果が検討できるスクリーニング系の開発も意図し、*in vitro*での細胞毒性を検証することも並行して続ける予定である。

## G. 研究発表

### 2. 学会発表

**Shiozuka M, Yokoyama S, and Kimura I**

Role of HGF/SF in somite myogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **38**:11-A(2002)

横山成俊, 塩塚政孝, 木村一郎

体節筋発生におけるHGF/c-MET系の役割

*Zool. Sci.*, **19** *in press* (2002)

荒川正行, 塩塚政孝, 松田良一

ネガマイシンによるナンセンス突然変異型筋ジ

ストロフィーの正常化 *Zool. Sci.*, **19** *in press* (2002)

**Shiozuka M, Yokoyama S, and Kimura I**

Role of HGF/c-MET signaling system in somite myogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **13**:

531a(2002)