

10030762

厚生労働科学研究研究費補助金

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 松田 良一 (東京大学)

平成16. (2004) 年 5月

はしがき

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は新生男児3,000人に一人の割合で発生する致死性疾患である。しかも、発祥患児の3割は家族歴のない孤発例であるため、すべてを出生前診断により予知することは極めて困難とされている。一方、点突然変異の結果、遺伝子内に生じた終止コドンによりタンパク質の合成が起こらないために生じたナンセンス突然変異型は、DMD患者全体の5～10%を占めるといわれる。1999年、米国ペンシルバニア大学のLee Sweeneyらは、mRNA翻訳過程で終止コドンを読み飛ばす（read-through）能力があるゲンタマイシンをジストロフィン遺伝子にナンセンス突然変異を有するmdxマウスに投与し、骨格筋においてジストロフィンの蓄積を認めた。しかし、ゲンタマイシンのもつ毒性から強い副作用が懸念され、長期間にわたる連続投与は疑問視されている。

われわれは、1970年に日本の微生物化学研究所で発見されたネガマイシンに大腸菌に対してread-through活性を認める報告の存在を知った。このネガマイシンは未認可抗生物質であり、直ちにヒトへの臨床応用は難しいが、哺乳類細胞へもゲンタマイシンと同様の作用を有することが期待されたので、Lee Sweeneyらの報告した投与スケジュールで、ネガマイシンをmdxマウスに投与した。その結果、骨格筋においてジストロフィンの蓄積を認めた。

本研究は、このネガマイシンの作用機序の解明、read-through活性の定量化、ネガマイシンの毒性、ナンセンスmRNAの崩壊（NMD）を阻害する薬剤の開発、筋特異的薬物分配の開発などを目的とした。3年間の研究の結果、ネガマイシンは、ゲンタマイシンより毒性が顕著ではなく、ナンセンス突然変異型の筋ジストロフィーの薬物治療に有効であることが示唆された。さらに、本研究により、read-through活性の測定用トランスジェニックマウスの開発に成功した。このトランスジェニックマウスを用いて、ネガマイシンの標的臓器の特定、投与条件の最適化、さらには、ネガマイシンの類縁体、類似体など種々の薬物のread-through活性を容易に検討できる可能性が拓けた。

今後、この研究をさらに推し進め、ナンセンス突然変異による安全で効果的な筋ジストロフィーの薬物治療薬の開発を目指して行きたい。

平成16年5月 主任研究者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）

交付額平成13年度 25,000千円（直接研究費のみ）

平成14年度 25,000千円（直接研究費のみ）

平成15年度 25,000千円（直接研究費のみ） 総計 75,000千円

目 次

はじめに-----	1
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-----	2
松田 良一	
II. 分担研究報告	
1. ナンセンス突然変異による遺伝子病を治療するための NMD防止策に関する研究 -----	7
石浦章一	
2. ジストロフィン欠損による筋肉内微小循環動態に関する研究-----	9
武田伸一	
3. Duchenne型筋ジストロフィーの治療薬に関する研究-----	11
松雄雅文	
4. ジストロフィン欠損マウスおよび筋ジストロフィー患者生検筋由来の 筋細胞株の樹立-----	13
原 孝彦	
ネガマイシン産生菌の生産力価の向上のための研究-----	14
池田大四五郎	
5. 生検および剖検時に採取した筋意j巢トロフィー患者の培養骨格筋細胞 の 分子生物学的解析に関する研究-----	15
斉藤加代子	
6. 筋ジストロフィーマウスおよび患者由来骨格筋細胞を用いた リードスルーアッセイに関する研究-----	17
塩塚政孝	
7. リポゾームを用いた筋ジストロフィーに対するゲンタマイシン治療の開発 及びその治療適応患者のスクリーニング方法の確立に関する研究-----	19
木村重美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25

研究要旨 ナンセンス突然変異による筋ジストロフィーの化学療法薬を開発する目的で、premature stop codon を翻訳過程で read-through する機能をもつネガマイシンに注目し、その mdx マウスにおけるジストロフィン発現への効果、read-through 活性、および作用機序について検討した。その結果、ネガマイシンは mdx マウスの骨格筋と心筋におけるジストロフィンの蓄積を促進し、ゲンタマイシンより read-through 活性が高く、rRNA の A site に結合する能力があることが分かった。さらにアクセイ系として有用な dual reporter gene を導入されたトランスジェニックマウスを作出に成功した。

1. 研究目的

筋ジストロフィー患者のうち、ナンセンス突然変異は1~3割を占めるといわれる。突然変異で生じた premature stop codon を翻訳過程で read-through できれば治療できる可能性がある。そのような抗生物質としてゲンタマイシンが注目されている。本研究では、同様の作用を持つ未認可抗生物質ネガマイシンに焦点を当て、治療薬としての効果、作用機序等を解明する。また、ナンセンス突然変異に特徴的な mRNA の分解機構の解明や筋特異的薬物分配系の開発をおこなう。

2. 研究方法

- 1) ネガマイシン生産菌の蘇生と高生産菌の選別する。
- 2) mdx マウスへ投与し、ジストロフィンの発現、蓄積を免疫化学的に検証する。さらに、rRNA の A サイトへの結合の有無を TOF-Mass を用いて検討する。
- 3) read-through を起こす標的組織を明らかにするとともに、新たな read-through 薬を開発するため、dual reporter gene を導入さ

れたトランスジェニックマウスを作出する。

倫理面への配慮

動物実験は東京大学、臨床研の審査、ヒト患者生検筋の採取と細胞株樹立については、臨床研、東京女子医大、神戸大の倫理審査を経て、インフォームド Consent のもと実施した。

3. 研究結果及び考察

1) Streptomyces sp. M890-C2 由来の高生産菌株を蘇生させ、100~200ug/ml の生産力価を維持していることを確認し、5g の生産をおこなった。しかし、この生産菌の培養、ネガマイシンの分離と精製は困難を極め、毒性試験に必要な量を生産するには至らなかった。今後、全合成の可能性を検討する必要がある。

2) ネガマイシンを投与された mdx マウスの骨格筋と心筋においてジストロフィンの蓄積を認めた。特に心筋への効果が認められたことは、治療薬として大いに期待が持てる。また、TOF-Mass によりネガマイシン 3 分子が 1 分子の rRNA A サイト断片と特異的に結合することを証

明した。この結合により、翻訳過程への干渉が生じることが示唆された。

3) LacZ と Luciferase 遺伝子と premature stop codon 配列で繋いだ dual reporter gene を持つトランスジェニックマウスの作出に成功した。これを用いて、read-through 薬の標的組織、新たな read-through 薬の検索を行うための検出系が確立した。

4. 評価（研究成果）

1) 達成度について

ネガマイシンの生産、mdx マウスにおける投与効果、mdx マウスとヒト患者由来の長寿命筋細胞株の樹立、ネガマイシンの翻訳系への結合、NMD の分子機構の解明への端緒、MyoD 導入による患者繊維芽細胞の転換と、それを用いた患者毎の read-through 適用検査系の確立、ハイブリッド型リポソームによる筋への薬物分配系の開発、read-through 効果を生体レベルで検出定量するためのトランスジェニックマウスの作出等について、大きな進展があり、研究の目的は概ね達成された。

2) 研究成果の学術的意義について

Premature stop codon を薬物により read-through させる研究は、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンを用いて行われて来た。本研究において、ゲンタマイシンとは全く異なる構造のネガマイシンが、ナンセンス突然変異による遺伝子病の治療薬として使え、その作用機序の一端や解明されたことは、大きな意義がある。さらに、本研究により、ナンセンス突然変異治療のための理解が進んだ点、トランスジェニックマウスの作出など新たな read-through 治療薬開発への大きな足掛かりが得られた。

3) 研究成果の行政的意義について

筋ジストロフィーは、原因遺伝子が同定されても、未だ治療手段が確立していない重篤な疾患である。遺伝子導入や細胞移植以外にも有効な薬物療法の開発が待たれる。アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンはその候補薬物であるが、その毒性の強さから、患者への長期投与は難しいとされている。本研究において、我が国で発見された未認可抗生物質ネガマイシンが mdx マウスの premature stop codon を read-through を生じさせ、ジストロフィンの筋への蓄積が認められたこと、その作用機序の一端が解明出来たことは、大きな意義がある。

4) その他、特記すべき事項について

本研究により、ネガマイシンの用法特許をアメリカと日本に出願した。その過程で、ユダヤ人に多い、膿胞性繊維症治療薬を開発している研究者や企業と情報を交換する機会がもたれ、今後、日米共同でネガマイシンをナンセンス突然変異型遺伝子病の治療薬として分子改良、大規模毒性試験等を行うことが決まった。

5. 結論

本研究において、ネガマイシンによりナンセンス突然変異型筋ジストロフィーのモデル動物である mdx マウスの薬物治療が可能であることが初めて示された。さらに、その作用機序としてネガマイシンが rRNA の翻訳に重要な A サイトに結合することが明らかとなった。ネガマイシンの毒性はゲンタマイシンより有意に低いことから、ナンセンス突然変異型遺伝子病の治療薬としての有効性が示唆された。さらに read-through の検出系としてトランスジェニックマウスの作出に成功したことから、今後の展開が期待される。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表件数 85

原著論文による発表件数 3

それ以外(レビュー等)の発表件数 29

その内の主なもの(references)

論文発表 (レビュー)

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一(2004) ナンセンス突然変異型の遺伝性疾患は抗生物質で治療できるか? ゲノム医学 4:53-57.

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一(2004) ナンセンス変異型遺伝性疾患のリードスルー療法モレキュラーメディシン 41: 332-337.

松田良一 ナンセンス突然変異が原因の筋ジストロフィーに対する薬物治療の可能性. 日本先天代謝異常学会雑誌 19: 9-13. 2003.

荒川正行, 松田良一 筋ジストロフィーに対する薬物治療ー ゲンタマイシンとネガマイシン 医学の歩み 204(12): 183-188. 2003.

学会発表

藤山朋代, 渡辺耕平, 宮崎健, 塩塚政孝, 松田良一 (2003) インクジェットプリンタを用いた成長因子アレイの作成 II Zool. Sci., 20 : 1540.

2) 海外

口頭発表件数 3

原著論文による発表件数 2

それ以外(レビュー等)の発表件数 0

その内の主なもの(references)

論文発表

Yamane A, Akutsu S, and Matsuda R; Satellite cell activation and utrophin transcription in *mdx* diaphragm muscle. *Muscle Nerve in press*

Nakayama Y, Nara N, Kawakita Y, Takeshima Y, Arakawa M, Katoh M, Morita S, Iwatsuki K, Tanaka K, Okamoto S, Kitamura T, Seki N, Matsuda R, Matsuo M, Saito K, and Hara T; Cloning of cDNA encoding a regeneration-associated muscle protease whose expression is attenuated in cell lines derived from Duchenne muscular dystrophy patients. *Am. J. Pathol.*, 164, 1773-1782, 2004

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J. Biochem.*, 134: 751-758.

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin-therapy in skeletal and

cardiac muscles of *mdx* mice. Basic Appl. Myol., 13: 313-320.

学会発表

Matsuda R, Arakawa M, and Shiozuka M (2003) Can negamicin restore dystrophin in *mdx* mouse? Basic Appl. Myol., 13(5):259.

Fujiyama T, Watanabe K, Miyazaki T, Shiozuka M, and Matsuda R (2003) Growth factor array fabrication using an ink jet printer. Mol. Biol. Cell, 14: 427a.

Shiozuka M, Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. Mol. Biol. Cell, 14: L95.

7. 知的所有権の出願・取得状況

Agent for treating diseases caused by nonsense mutation. PCT出願 国際出願番号 PCT/JP02/05914 1件

厚生労働省科学研究費補助金

分担研究報告書

ナンセンス突然変異による遺伝子病を薬物治療するための NMD 防止策に関する研究

分担研究者 石浦 章一 東京大学大学院総合文化研究科教授

研究要旨 ナンセンス突然変異による遺伝子病を薬物治療するには、NMD 防止策を見つける必要がある。ナンセンス突然変異を有する mRNA を不要と認識し、自らが分解してしまう機構で、これに関係する hSMG-1 キナーゼの生理意義について研究を行った。その結果、hSMG-1 阻害剤であるカフェイン、ウオルトマニンが、遺伝性筋疾患であるウルリッヒ病線維芽細胞でのコラーゲン VI の合成量を増すことが判明した。

1. 研究目的

遺伝性筋疾患の新しい治療法について、2つの研究を行った。1つはトリプレットリピート伸長疾患と抗酸化剤による治療、もう1つは NMD 防止である。特に後者は、従来用いられている停止コドンの前に停止コドンができると、その mRNA を不要と認識し、自らが分解してしまう機構で、これに関係する hSMG-1 キナーゼの生理意義について研究を行った。

2. 研究方法 (倫理面の配慮)

hSMG-1 は、横浜市立大学の 大野茂男先生から供与された。種々の欠失変異体を作成し、免疫沈降実験に用いた。

3. 研究結果及び考察

hSMG-1 阻害剤であるカフェイン、ウオルトマニンが、遺伝性筋疾患であるウルリッヒ病線維芽細胞でのコラーゲン VI の合成量を増すことが判明した。また hSMG-1 と hUPF-1 との相互作用が明らかになった。

4. 評価 (研究成果)

1) 達成度について

NMD に関する因子は十数種類知られており、その中でも hSMG-1 は重要なキナーゼと考えられている。これとヘリカーゼで

ある hUPF-1 は NMD 機構には必須で、その相互作用があきらかになったことは有意義なことであった。

2) 研究成果の学術的意義について

NMD の阻害による遺伝性疾患の治療の可能性については、世界中の研究者たちが今最も注目しているところである。その中でも hSMG-1 と hUPF-1 については、ノンセンスコドン認識過程に働くと考えられ、相互作用の意義は大きい。

3) 研究成果の業績的意義について

トリプレットリピート伸長疾患については、論文がいくつか発表されたが、NMD については現在論文を準備中である。

4) その他特記すべき事項について

なし

5. 結論

NMD 阻害は、遺伝性疾患の治療に有効な手段である可能性が示唆された。

6. 研究発表

2) 海外

口頭発表件数 5

原著論文による発表件数 2

5

それ以外 (レビュー等) の発表件数

そのうちの主なもの(references)

論文発表

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

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

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

Kino, Y., Oma, Y., Takeshita, Y., Takahashi, N., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2003) Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. *Basic Appl. Myol.* 13, 293-298

Takeshita, Y., Sasagawa, N., Usuki, F. & Ishiura, S. (2003) Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl. Myol.* 13, 305-308

Yoshikawa, A., Mitsuhashi, H., Sasagawa, N., Tsukahara, T., Hayashi, Y., Nishino, I., Goto, Y. & Ishiura, S. (2003) Expression of ARPP-16/19 in rat denervated skeletal muscle. *J. Biochem.* 134, 57-61

Sasagawa, N., Kino, Y., Takeshita, Y., Oma, Y. & Ishiura, S. (2003) Overexpression of human myotonic dystrophy protein kinase in *Saccharomyces Pombe* induces abnormal polarized and swollen cell morphology. *J. Biochem.* 134, 537-542

Kino, Y., Oma, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2004) Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Mol. Genet.* in press

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

厚生労働省科学研究費補助金（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よる筋肉内微小循環動態に関する研究

分担研究者 武田伸一 国立精神・神経センター神経研究所遺伝子治療研究部長

研究要旨 ジストロフィン欠損による筋肉内微小循環動態を明らかにするために、ずり応力に対する血管拡張能を NOS との関連に注目しながら検討したところ、ずり応力に対する血管拡張の責任分子が nNOS であることが明らかになった。

1. 研究目的

デュシェンヌ筋ジストロフィー（DMD）への新たな治療法開発を最終的な目標として、ジストロフィン欠損による筋肉内微小循環動態を明らかにするために、ずり応力に対する血管拡張能を NOS との関連に注目しながら検討する。

2. 研究方法（倫理面の配慮）

8-10 週齢の C57BL/10 マウスおよび *mdx* マウス、C57BL/6、*α1syn*^{-/-}、*eNOS*^{-/-}、*nNOS*^{-/-} を使用した。麻酔下に循環を保ったまま辜丸挙筋を展開し顕微鏡下に薬剤の投与とずり応力に対する血管拡張反応を観察・記録した。

3. 研究結果及び考察

薬剤に対する血管拡張能は保たれていたが、ずり応力に対する拡張能は nNOS の欠損動物群で低下していた。*eNOS* の欠損動物群では正常であったことから、ずり応力に対する血管拡張の責任分子が nNOS であることが明らかになった。

4. 評価（研究成果）

1) 達成度について

ジストロフィン欠損のマウスモデルを用い

た筋肉内微小循環動態については、結論を得ることができた。治療法の開発のためには、より大型で重症のモデル動物である筋ジストロフィー犬を用いた実験が必要である。

2) 研究成果の学術意義について

ずり応力に対する血管拡張能の責任分子が nNOS であって、筋肉内微小循環動態がジストロフィン欠損状態で障害されていることを見出した学術的意義は高い。

3) 研究成果の行政的意義について

筋ジストロフィーに対する治療法は未だに確立していないので、新たな病態研究を進めることは、将来の治療法開発のために重要である。

4) その他特記すべき事項について

5. 結論

筋肉内微小血管におけるずり応力に対する血管拡張が nNOS 依存性であり、ジストロフィン欠損状態では障害されていることを明らかにした。

6. 研究発表

Szeged, Hungary, Sep 5, 2003.

1) 国内
口頭発表 60
件
原著論文による発表 2
件
それ以外(レビュー等)の発表 23 件

そのうち主なもの

論文発表

佐藤克二郎、武田伸一：

筋ジストロフィー治療の進歩

小児科 44, 26-37, 2003

学会発表

佐藤克二郎、市岡滋、波利井清紀、武田伸一：

ずり応力に対する血管拡張性応答における一酸化窒素合成酵素の影響に関する検討

第11回日本形成外科学会 基礎学術集会、

宮城県仙台市 10.14, 2003

2) 海外
口頭発表 22
件
原著論文による発表 27
件
それ以外(レビュー等)の発表 0 件

そのうち主なもの

論文発表

Sato K, Yokota T, Takeda S:

Shear stress-induced vasodilation of arterioles is dependent on nNOS expression, but not on nNOS localization at the sarcolemma.

Neuromuscular Disorder 13: 635, 2003

学会発表

Sato K, Yokota T, Takeda S:

Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired, through decreased nNOS expression

8th Congress of the World Muscle Society,

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

Duchenne型筋ジストロフィーの治療法に関する研究

松尾雅文（神戸大学医学部発達小児科）

研究要旨 Duchenne型筋ジストロフィーの治療法としてのゲンタマイシンの有効性を検討した。ナンセンス変異を有する8例のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の培養筋細胞にゲンタマイシンを投与したところ、TGA変異をもつ患者ではゲンタマイシンに反応してジストロフィンが発現することが判明した。

1. 研究目的

Duchenne型筋ジストロフィーの治療法としてのゲンタマイシンの有効性を検討する。

2. 研究方法（倫理面の配慮）

Duchenne型筋ジストロフィー患者を対象としてジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を同定する。そして、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有する患者から得られた筋細胞を用いて、ゲンタマイシン添加培養液を用いてそのリードスルー効果をジストロフィンの発現をみることによる解析する。しかし、他の変異をもつ例では効果はみられなかった。

3. 研究結果及び考察

ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有する8例のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の培養筋細胞にゲンタマイシンを投与したところ、TGA変異をもつ患者ではゲンタマイシンに反応してジストロフィンが発現することが判明した。しかし、他の変異をもつ例では効果はみられなかった。

4. 評価（研究成果）

1) 達成度について

当初の目的に沿った成果が得られた。

2) 研究成果の学術的意義について

ナンセンスコドンの型によりリードスルー効果に差があることが判明し、今後より一層分子生物学的解析が必要ながことが判った。

3) 研究成果の業績的意義について

Duchenne型筋ジストロフィー治療へ大きく前進したと評価される。

4) その他特記すべき事項について

5. 結論

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表件数

原著論文による発表件数

それ以外（レビュー等）の発表件数

その打ちの主なもの(references)

論文発表

学会発表

（著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

2) 海外

口頭発表件数 3件

原著論文による発表件数 8件

それ以外（レビュー等）の発表件数

その打ちの主なもの(references)

論文発表

Takeshima, Y, Yagi, M, Ishikawa, Y, Ishikawa, Y, Minami, T, Nakamura, H, Matsuo, M. Brain Dev,23,788-798,2001 Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient

Suminaga, R, Takeshima, T, Adachi, K, Yagi, M, Nakamura, H, Matsuo, M.Hum Genet,47,196-201,2002 A novel cryptic exon in intron 3 of the dystrophin gene was incorporated into dystrophin mRNA with a single nucleotide deletion in exon 5

Saito-Ohara F, Hukuda Y, Ito M, Agarwala KL, Hayashi M, Matsuo M, Imoto I, Yamakawa K, Inazawa J.Am. J. Hum.Genet.,71,637-645,2002 The Xp22 inversion breakpoint interrupted a novel ras-like GTPase gene in a DMD patient in profound mental retardation.

Lai P-S, Takeshima Y, Adachi K, van Tran K, Ngyen H. T Low P-S Matsuo M.J. Hum. Genet.,47,552-555,2002 Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations.

Yagi M, Takeshima Y, Wada H, Nakamura H, Matsuo M.Hum. Genet.112,164-170,2003 Two alternative exons can result from activation of the cryptic splice acceptor site deep within intron 2 of the dystrophin gene in a patient with as yet asymptomatic dystrophinopathy.

Ito T, Takeshima Y, Yagi M, Kamei S, Wada H, Matsuo M.J. Neurol250,581-587,2003 Analysis of dystrophin mRNA from skeletal muscle but not from lymphocytes led to identification of a novel nonsense mutation in a carrier of Duchenne muscular dystrophy.

Adachi K, Takeshima Y, Wada H, Yagi Y, Nakamura H, Matsuo M.Ped. Res.53,1-7,2003 One of dystrophin mRNAs produced by a novel splice donor site mutation was in-frame and resulted in intermediate dystrophinopathy

学会発表

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

Matsuo M.Yagi M.,Takeshima Y.International Symposium of Molecular therapy of Muscular dystrophy2002 Treatment of Duchenne muscular dystrophy with oligonucleotides against an exonic splicing enhancer sequence

Matsuo M. Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y. Pediatric Academic Societies' Annual Meeting 2003 Induction of dystrophin expression in myocytes of duchenne muscular dystrophy by creating in-frame mRNA with antisense oligonucleotides

Matsuo M, Yagi M., Ishibashi K, Takeshima Y. Vth Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies2003 Induction of dystrophin expression in myocytes of duchenne muscular dystrophy by creating in-frame mRNA with antisense oligonucleotides

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
ありません。

ジストロフィン欠損マウスおよび筋ジストロフィー患者生検筋由来の筋細胞株の樹立
分担研究者 原 孝彦 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マウスおよび筋ジストロフィー患者生検筋から新たに筋細胞株を樹立することを目的とし研究をおこなった。その結果、ジストロフィンを欠損する骨格筋細胞株を、Mdx マウスおよび各種の筋ジストロフィー患者筋生検細胞から樹立した。

1. 研究目的

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筋ジストロフィー患者生検筋から新たに筋細胞株を樹立することを目的とした。

2. 研究方法（倫理面への配慮）

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 抗原を遺伝子導入することにより株化を試みた。なお、患者細胞の実験は本研究および提携先大学病院の双方のヒト実験倫理委員会より承認を得て実施した。

3. 研究結果及び考察

Mdx マウス、DMD および CMD 患者由来の骨格筋細胞株の樹立に成功した。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タンパク質の再発現が観察された。これにより、均質な変異筋細胞を利用したネガマイシンの薬効検定が可能となった。

4. 評価

1) 達成度 分担課題の目標は達成した。
2) 学術的意義 SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルス感染により、筋ジス患者由来筋細胞株を樹立できることを明確に示した。今後の遺伝子解析や生化学的解析に有用な材料であると同時に、他のタイプの筋疾患治療研究にも新しい方法論を与えた。

3) 業績的意義 分化能を保持する筋ジス患者由来筋細胞株の樹立は本邦初であり、ネガマイシンや関連リード化合物の有効性や副作用を調べる方法として極めて有用である。

4) その他 マイクロアレイと組み合わせることで、筋ジストロフィー患者筋細胞の遺伝子プログラムを容易に解析できる。

5. 結論

ジストロフィンを欠損する骨格筋細胞株を、Mdx マウスおよび各種の筋ジストロ

フィー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。

6. 研究発表

1) 国内 口頭発表件数 2、原著論文件数 0、レビュー件数 0

<主な学会発表>

中山由紀、戸倉由香、奈良典子、原 孝彦：デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来の細胞株で発現が減少する遺伝子 Regeneration-associated muscle protease cDNA の単離. 第 26 回日本分子生物学会年会, 2003. 12. 13, 神戸

2) 海外 口頭発表件数 1、原著論文件数 3、レビュー件数 0

<主な論文発表>

Nakayama, Y., Nara, N., Kawakita, Y., Takeshima, Y., Arakawa, M., Katoh, M., Morita, S., Iwatsuki, K., Tanaka, K., Okamoto, S., Kitamura, T., Seki, N., Matsuda, R., Matsuo, M., Saito, K., and Hara, T. (2004): Cloning of cDNA encoding a regeneration-associated muscle protease whose expression is attenuated in cell lines derived from Duchenne muscular dystrophy patients. *Am. J. Pathol.*, 164:1773-1782.

<主な学会発表>

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

7. 知的所有権の出願

出願番号2003-307723「筋ジストロフィーで発現低下する筋再生関連プロテアーゼRampをコードするマウスおよびヒトcDNAのクローニング」発明者 原 孝彦・中山由紀 出願日 2003年8月29日

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ネガマイシン産生菌の生産力価の向上のための研究

研究分担者 池田大四郎 微生物化学研究センター創薬研所長

研究要旨 ネガマイシンの生産菌の生産力価の向上した菌株の存在が判明した。

ネガマイシンの生産菌は *Streptomyces* sp. M890-C2 であり、この株は 1964 年に群馬県妙義山の土壌から分離された放線菌である。

長期間保存されたこの菌株を蘇生させ、あらためてネガマイシンの生産力価を試験した。その結果、20? 40mcg/ml のネガマイシンの生産を確認できた。

しかし、本プロジェクトのためのサンプル供給という点においては低力価であるため、さらに過去の試験結果を調査した。その結果 1969 年の力価検討試験においてきわめて生産力価の向上した菌株の存在が判明した。

この高生産株は凍結保存されており、これを蘇生させ培養試験を行ったところ、100? 200mcg/ml の生産力価を保持していることが判明した。

この菌株を用いてネガマイシンの試作を行った。しかし、大量培養をおこなうと期待の生産力価を再現できなかった。そのため培養を繰り返し 120mg のネガマイシンを供給することができた。

引き続き、本プロジェクトに必要なネガマイシン供給のため、ネガマイシン生産菌株による生産力価向上およびその試作研究を実施した。

その結果、高生産力価株を用いてネガマイシンの生産を行いサンプルの供給（約 5g）を行うことができた。

上記ネガマイシンを用いて、ネガマイシンと rRNA との直接的な相互作用を観察するための検討をおこなった。本実験では、TOF-MS を用いてネガマイシンと rRNA の A-site 断片との相互作用を測定し、ネガマイシンと rRNA とが 3 : 1 の割合で複合体を形成することが判明した。

ネガマイシンの抗菌剤開発を前提とした薬理作用の調査を行った。

論文発表

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J. Biochem.*, 134: 751-758.

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin-therapy in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *Basic Appl. Myol.*, 13: 313-320.

本分担研究による特許申請はない。

研究要旨 ナンセンス変異による DMD 筋の薬物感受性を検討した結果、 α メチルプレドニゾン (MEPD)、ゲンタマイシン (GM) は培養細胞の分化を阻害した。MEPD は正常筋においても dys 発現を増強。DMD 筋は GM 添加で終止コドン readthrough による dys が僅かに発現、GM+MEPD 添加では発現がより増強した。

1. 研究目的

筋ジストロフィーの治療実現に向けて、患者骨格筋培養細胞を用いた分子生物学的解析を行い、疾患の病態を明らかにするとともに、培養系での治療効果の指標を得る。今回はナンセンス変異による DMD 筋の薬物感受性を検討。

2. 研究方法（倫理面の配慮）

インフォームドコンセントのもと生検（剖検）筋組織から筋衛星細胞の初代培養を得た。 α メチルプレドニゾン (MEPD)、ゲンタマイシン (GM) を添加した培養における細胞の形態学的観察とジストロフィン (dys) 発現を評価した。（本学倫理委員会にて承認を受けている。）

3. 研究結果及び考察

両薬物は培養細胞の分化を阻害した。MEPD は正常筋においても dys 発現を増強。DMD 筋は GM 添加で終止コドン readthrough による dys が僅かに発現、GM+MEPD 添加では発現がより増強したが、細胞の著しい形態変化を来した。

4. 評価（研究成果）

1) 達成度について

薬物効果の検討に入る前段階として、患者筋細胞由来 mRNA より点突然変異を検索することにも時間がかかった。薬物の dys に対する効果は明らかにできたが、作用機序や臨床応用への至適条件の検討がまだ達成できない。

2) 研究成果の学術的意義について

MEPD は培養細胞の分化を阻害するにもかかわらず dys の発現を増強するという作用機序についての検討には至れず、今後、dys 以外の筋特異的タンパクへの影響を含め、機序の検討が必要である。

3) 研究成果の業績的意義について

ヒト骨格筋細胞の初代培養を用いた GM の有効性の検討は本研究が初めてである。マウスでの実験を参考にした今回の使用濃度を再検討し、培養細胞の形態変化（細胞毒性）を緩和しつつ dys の発現増強を得る必要がある。

4) その他特記すべき事項について

GMの臨床応用には、高濃度使用による副作用防止のためのデリバリーシステムの開発、あるいはネガマイシン使用への変換が必須であると思われた。

5. 結論

MEPDはdysの発現を増強させ、GMはdysの終止コドンreadthroughによりdysを発現させることがヒト培養筋細胞で確認できた。両薬剤の同時投与はdys発現に対し相乗効果が得られたが、細胞毒性が強く、使用条件検討を要した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：2件

原著論文による発表：なし

主なもの

・斎藤加代子、池谷紀代子、近藤恵里ほか：筋ジ

ストロフィー培養骨格筋細胞の分子生物学的研究；平成14年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」清水班班会議
・斎藤加代子、近藤恵里、池谷紀代子ほか：筋ジストロフィー培養骨格筋細胞におけるステロイドおよびゲンタマイシンの影響；平成15年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」清水班班会議

2) 海外

なし

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究要旨 mdxマウス骨格筋細胞株やナンセンス変異を有するヒトDMD患者由来骨格筋細胞の準株化細胞を用いた培養系で検証するため、よりジストロフィンの検出効率が高くなる実験条件の確立を行った。

1. 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、mdxマウス骨格筋細胞株やナンセンス変異を有するヒトDMD患者由来骨格筋細胞の準株化細胞を用いた培養系で検証すること、またその培養系・検出系を確立することを目的とした。

2. 研究方法(倫理面の配慮)

mdxマウス骨格筋細胞株やナンセンス変異を有するヒトDMD患者由来骨格筋細胞の準株化細胞を培養し、免疫組織化学・生化学的手法により解析した。ヒト細胞は、東京女子医大の斉藤教授および神戸大学の松尾教授により、各大学の倫理指針に従いインフォームドコンセントを経て採取された筋生検試料を材料とした。

3. 研究結果及び考察

ジストロフィンタンパク質の発現をより高めるため培養液を改良し、感度良く検出するためIn-Gelウエスタン法を用いたところ、これまでよりも少ない細胞数/培養面積からの発現検出が一部可能になった。また無血清培養系を用いることで、従来よりも薬物の感受性を高くすることが可能となった。

4. 評価(研究成果)

1) 達成度について

In-Gelウエスタン法については改善の余地はあるが、残された課題に対しては、初代培養細胞を用いることで解決できると考えられる。またネガマイシン以外の抗菌性物質の網羅的検討の際にも必須となるため、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、並行して続ける予定である。

2) 研究成果の学術的意義について

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。

3) 研究成果の業績的意義について

2003年12月にサンフランシスコで開催された第43回アメリカ細胞生物学会年会において、本研究内容を発表したところ、“Hot Pick”に選定され、出版・放送関係者にプレスリリースされ注目を集めた。

4) その他特記すべき事項について

5. 結論

増殖能力や分化後の成熟の度合いが低いDMD由来筋芽細胞において、培養液の改良により、薬物の感受性を高め、指標となるタンパク質の発現を高めることに成功した。これを効率よく検出するためIn-Gelウエスタン法を用い、従来よりも少ない細胞からの発現検出が一部可能になった。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表件数 5

原著論文による発表件数 0

それ以外(レビュー等)の発表件数 2

その内の主なもの(references)

論文発表(レビュー)

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一(2004) ナンセンス突然変異型の遺伝性疾患は抗生物質で治療できるか? ゲノム医学 4:53-57.

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一(2004) ナンセンス変異型遺伝性疾患のリードスルー療法
モレキュラーメディシン 41: 332-337.

学会発表

藤山朋代, 渡辺耕平, 宮崎健, 塩塚政孝, 松田良一(2003) インクジェットプリンタを用いた成長因子アレイの作成 II Zool. Sci., 20: 1540.

横山成俊, 塩塚政孝, 木村一郎 (2003) 体節筋原細胞の移動におけるHGF/SFとN-cadherinの役割
Zool. Sci., 20: 1561.

板原裕一, 横山成俊, 塩塚政孝, 木村一郎 (2003) 筋衛星細胞の分化におけるTGF-betaの効果 Zool. Sci., 20: 1563.

2) 海外

口頭発表件数 3

原著論文による発表件数 2

それ以外(レビュー等)の発表件数 0

その内の主なもの(references)

論文発表

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. J. Biochem., 134: 751-758.

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin-therapy in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. Basic Appl. Myol., 13: 313-320.

学会発表

Matsuda R, Arakawa M, and Shiozuka M (2003) Can negamycin restore dystrophin in *mdx* mouse? Basic Appl. Myol., 13(5):259.

Fujiyama T, Watanabe K, Miyazaki T, Shiozuka M, and Matsuda R (2003) Growth factor array fabrication using an ink jet printer. Mol. Biol. Cell, 14: 427a.

Shiozuka M, Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, and Matsuda R (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. Mol. Biol. Cell, 14: L95.

7. 知的所有権の出願・取得状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

リポソームを用いた筋ジストロフィーに対するゲンタマイシン治療の開発及びその治療

適応患者のスクリーニング方法の確立に関する研究

分担研究者 木村重美 熊本大学医学部小児科助手

研究要旨 ゲンタマイシン(G)のリードスルーを利用して Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する治療法を開発するためハイブリット型リポソームを使用して効率よく筋組織に移行させる DDS (Drug Deliverly Sysytem) をほぼ確立した。

1. 研究目的

ゲンタマイシン(G)のリードスルーを利用して Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する治療法を開発する。また、その治療適応患者をスクリーニングする方法を確立する。

2. 研究方法

ゲンタマイシンの副作用を回避するため、ハイブリット型リポソームを使用して効率よく筋組織に移行させる DDS (Drug Deliverly Sysytem) を確立する。また、患者の線維芽細胞を筋細胞に分化させて、ゲンタマイシンによりジストロフィンが発現するか検討する。

3. 研究結果及び考察

蛍光ハイブリット型リポソームは骨格筋にも移行し、投与後少なくとも6時間は骨格筋に存在した。点突然変異の TGA を持つ患者の線維芽細胞ではゲンタマイシンによりジストロフィンの発現が確認されたが、他の変異では認められなかった。

4. 評価

1) 達成度について

ハイブリット型リポソームが組織に移行することが証明されたが、ゲンタマイシン封入リポソーム (G-L) の効果の検討は今後、研究予定である。100%封入 G-L の作製には成

功している。ゲンタマイシン治療対象患者のスクリーニング法を確立した。

2) 研究成果の学術的意義について

ハイブリット型リポソームを使用することによりナンセンス変異をもつ筋疾患の治療に応用可能であることが示唆された。DMD 患者においてゲンタマイシンの効果は TGA を持つ患者が有効であることが予想される。

3) 研究成果の業績的意義について

リポソームを使用することによりゲンタマイシンの副作用を軽減することが可能となる。ジストロフィン遺伝子をシークエンスしなくても我々の確立した方法を用いると治療適応患者のスクリーニングが可能となり、時間と労力が短縮される。

4) その他特記すべき事項について

100%封入 G-L を作製し、現在 DMD のモデルマウスに投与中である。

5. 結論

ハイブリット型リポソームが筋組織に移行することを証明した。100%封入 G-L の作製に成功した。ゲンタマイシン治療対象患者のスクリーニング法を確立し TGA を持つ患者が一番有効であることが予想される。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表件数 6 (厚生労働省の班会議を2つ含む)