



図1 DMD-nullマウス(右)と野生型マウス(左)の筋組織切片像

DMD-nullマウスの骨格筋は生後激しく崩壊するがその後再生し、筋組織は再生筋で置きかえられる

ソンがあり、少なくとも7個のプロモーターにより多数のアイソフォームが合成されていることが知られている。最も分子量の小さいアイソフォーム Dp71 は、ES細胞でも発現しているため、HAC-DMDを導入したES細胞で、ヒト型のDp71が発現していることをRT-PCR法により確認した。マウス個体内での発現は、骨格筋、脳および肝臓におけるヒト型ジストロフィンアイソフォーム(Dp427c, Dp427m およびDp71)の存在をRT-PCRで確認した。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認のもとに行われた。また、本研究で用いた生検試料(DMD由来筋芽細胞)は、国立精神神経センターとの契約に基づき、連結不可能匿名化された試料として研究に使用した。

c. 研究結果及び考察

1) DMD-nullマウスの作成および表現型の解析

Cre-loxPシステムを利用してX染色体上にジストロフィン遺伝子領域約2.4Mbを欠失させたES細胞は、通常の分化能・増殖能を保持し核型も正常であることを確認した。このES細胞を用いて作成したキメラマウスのうち、3匹のマウス(すべて雌)において、ES細胞の生殖系列への伝達が観察された。このキメラマウスを野生型雄マウスと交配することにより、ジストロフィンの欠損したDMD-nullマウス(xDMD-nullY)を得ることに成功した。DMD-nullマウスは、外見上目立った表現型は認められないが、驚きやすいなどの若干の行動異常が見られる。このマウスの骨格筋で

は、生後2週頃より激しい筋崩壊が生じる(図1)。しかし、mdxマウス同様、筋組織が再生し、生後5週以降の筋組織はほとんどが再生筋で占められるようになり、本マウスの平均寿命は野生型マウスと同等であることが判明した。

DMD-nullマウスの最も顕著な表現型は、不妊であるという点である。精巣および精巢上体を組織学的免疫組織化学的に検索した結果、精子形成の異常により正常な精子がほとんど認められないことが判明した。精巣ではジストロフィンアイソフォームDp71が発現していることをRT-PCRで確認した。ジストロフィンが精子形成に関与していることは今まで全く知られていなかった知見であり、現在その詳細な解析を進めている。

2) ES細胞を介した、HAC-DMDのマウス個体への導入およびマウス個体内におけるヒト型ジストロフィンの発現。

CHO細胞に保持した人工染色体HAC-DMDをマイクロセル融合法を用いてマウスES細胞へ導入した。最初に、mdxマウスより新に樹立したES細胞株(昨年度報告書参照)を用いて実験を行った。ES細胞において、HAC-DMDが正常に機能していることを確認するために、ES細胞でも発現するDp71の発現をRT-PCRで確認した。このES細胞を用いてキメラマウスを作成し、キメラ個体でのヒト型ジストロフィンの発現を調べた。その結果、脳ではジストロフィンアイソフォームDp427cが、骨格筋ではDp427mが、また肝臓ではDp71が各々正常に発現していることを示唆する結果を得

た。これらの結果から、本研究により作成した人工染色体 HAC-DMD は、マウス個体内で安定に保持されること、またこれらのマウスではヒトジストロフィン遺伝子がマウス個体内で正常に発現していることが判明した。さらに、このキメラマウスを野生型マウスと交配したところ、1 匹のキメラマウスにおいて生殖系列への伝達が認められた。

当初の予定では、DMD-null ES 細胞へも HAC-DMD を導入する予定であり、実際に HAC-DMD を組み込んだ DMD-null ES 細胞株もすでに分離しているが、HAC-DMD が生殖系列に伝達されたことから、本マウスと DMD-null マウスヘテロ接合体 (XDMD-nullX) を交配することにより、マウスのジストロフィンがゲノムレベルで欠失し、代わりにヒトのジストロフィン領域が転座した人工染色体を保持したマウスを得ることが可能になる。現在、このような交配を進めているところである。

本研究で得られた結果から、今後ヒト筋ジストロフィー患者由来の HAC-DMD ベクターを作成し、同様な操作により DMD 患者由来のジストロフィンを保持した全く新しい DMD モデルマウスを作成することが可能であることが示された。現在、すでに人工染色体ベクター作成に着手している。

D. 結論

今年度の研究により、ヒトとマウスのジストロフィン遺伝子をゲノムレベルで置き換えた新しいモデルマウス作成の実験的基盤が確立したと考えられる。これらのマウスは、近年急速に進展している筋ジストロフィーの根本治療法の検証に極めて有用であり、社会的意義が高いものと考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

H Kudoh, H Ikeda, M Kakitani, A Ueda, M Hayasaka, K Tomizuka and K Hanaoka: A new model mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4 megabase deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system. Biochem Biophys Res Communi 328, 507-516 2005

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kazuki Y, Kimura M, Nishigaki R, Kai Y, Abe S, Okita C, Shirayoshi Y, Schulz TC, Tomizuka K, Hanaoka K, Inoue T, Oshimura M	Human chromosome 21q22.2-qter carries a gene(s) responsible for downregulation of mlc2a and PEBP in Down syndrome model mice	Biochem Biophys Res Commun	317 (2)	491-9	2004
Kato M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, Shirayoshi Y, Oshimura M	Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery	Biochem Biophys Res Commun	321 (2)	280-90	2004
Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, Ichihashi M, Tanaka K	Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome	Proc Natl Acad Sci USA	101 (43)	15410-5	2004
Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T	Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis	Cell	119 (7)	1001-12	2004
Kudoh H, Ikeda H, Kakitani M, Ueda A, Hayasaka M, Tomizuka K, Hanaoka K.	A new model mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4 Mb deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system.	Biochem Biophys Res Commun	328(2)	507-16	2005

Otsuki A, Tahimic CG, Tomimatsu N, Katoh M, Chen DJ, Kurimasa A, <u>Oshimura M</u>	Construction of a novel expression system on a human artificial chromosome	Biochem Biophys Res Commun	329 (3)	1018-1025	2005
Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Kuroiwa Y, Kakitani M, Katoh M, <u>Oshimura M</u> , <u>Tomizuka K</u>	Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts	Gene Ther	Epub ahead of print		2005 Mar 3
Haruta M, Meguro M, Sakamoto YK, Hoshiya H, Kashiwagi A, Kaneko Y, Mitsuya K, <u>Oshimura M</u>	Narrowed abrogation of the Angelman syndrome critical interval on human chromosome 15 does not interfere with epigenotype maintenance in somatic cells	J Hum Genet	Epub ahead of print		2005 Mar 3