

200400782A

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

ナンセンス変異型筋ジストロフィーの
リードスルー薬物による治療法の確立

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 松田 良一

平成17 (2005) 年 4月

はじめに

筋ジストロフィーは遺伝子病の治療手段として正常な遺伝子の導入が有効であると考えられるが、アデノウイルスベクターの持つ炎症惹起作用とともにジストロフィンのようにベクターの容量を超えて巨大な場合（cDNAは14kb）には最適とはいえない。幹細胞の移植も試みられているが、半致死量の放射線を照射したレシピエントマウスとヒト患者を同等に考えることは難しいのが現状である。特にナンセンス突然変異型遺伝子病の治療戦略として、ストップコドンの読み越え（リードスルー）を誘発する薬物は遺伝子導入や幹細胞移植に次ぐ第三の戦略として注目される。しかし、そのようなリードスルー物質の検索手段、物質の投与ルート、投与量などの最適化をおこなう実験系の開発は進んでおらず、ゲンタマイシンなど限られた物質しか使われていないのが現状である。一方、リードスルーそれ自体の分子機構はほとんど分かっておらず、長期間投与の副作用についても不明である。

我々は、未承認抗生物質ネガマイシンがマウス骨格筋に対してリードスルー活性を持つことを示してきた。本研究「ナンセンス変異型筋ジストロフィーのリードスルー薬物による治療法の確立」において、平成16年度には以下の二点について研究をおこなったので報告する。

- 1) リードスルー現象を定量化するためのダブルレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作出
- 2) ネガマイシンの分子構造と類似した立体構造を持つ物質の探索

本研究実施にあたり、平成16年度厚生労働省科学研究費「こころの健康科学研究事業」のご援助をいただいたことに深く感謝いたします。

平成17年4月22日 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16年度 9,482千円（直接研究費のみ）

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成17年4月20日

厚生労働大臣 尾辻秀久 殿

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

マツダ リョウイチ

研究者 松田 良一

(所属機関 東京大学大学院)

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）に係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：ナンセンス変異型筋ジストロフィーのリードスルー薬物による治療法の確立（H16-こころ-027）

国庫補助金精算所要額：金 9,482,000円也（うち間接経費 0円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙（別添1のとおり）
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次（別添2のとおり）
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書（別添3のとおり）
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（別添4のとおり）
5. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5のとおり）
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
（総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること）
7. 健康危険情報

・研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源（研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細）について記述すること。

・既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。

・分担研究者、研究協力者の把握した情報・意見等についても主任研究者がとりまとめ、一括して総括研究報告書に記入すること。

・なお、交付基準額等決定通知の添付文書において、健康危険情報を把握した際には、一定の書式で速やかに厚生労働省健康危機管理官まで通報していただくよう協力をお願いしているので、本件とともに留意すること。

目次

I. 総括研究報告

ナンセンス変異型筋ジストロフィーのリードスルー薬物による治療法の確立 松田良一1
--------------------------------------------	--------

II. 分担研究報告

リードスルー薬剤のサンプル提供に関する研究 池田大四郎6
--------------------------------	--------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表7
---------------------	--------

IV. 研究成果の刊行物・別刷12
-----------------	---------

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

ナンセンス変異型筋ジストロフィーのリードスルー薬物による治療法の確立
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

本研究における、単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異症例の包括的治療法の基盤的理論は、抗菌性物質がリボソームに結合し、点変異により生じた未熟終止コドン（premature termination codon, PTC）とA部位との結合を阻害することで、PTCを読み越えて翻訳を進行させ、より長いタンパク質分子を作らせることにある。この読み越え【リードスルー】活性をもつ抗菌性物質を創出・探索し、生体内・外での薬効評価を効率化するための個体レベルにおけるリードスルー活性検出系として、PTCを挿入したβガラクトシダーゼとルシフェラーゼのデュアルレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（Tg）を作出し、現在までに3種（Ochre:TAA, Opal:TGA, Amber:TAG）のPTCのTgマウス系統を得ることに成功した。これらTgマウスを用いることで、初めて生体内でのリードスルー活性測定が可能となり、ゲンタマイシンによる各組織別リードスルー効率を評価した。また、上記コンストラクトを導入したマウス衛星細胞株C2C12とリアルタイムルミノメータを用いることでルシフェラーゼ活性の経時的測定が可能となり、細胞抽出液のルシフェラーゼ/βガラクトシダーゼ活性測定と併せることでリードスルー活性の定量化に成功した。さらに、三次元データ解析により105万種以上の化合物からネガマイシンの立体配位形成に適合する19種の類似物質を特定し入手した。加えて、mdxマウスにおける筋組織内の異所性石灰化が、筋変性の指標となり得ることを見出したことにより、X線マイクロCTを用いることで、同一個体における筋変性を経時的かつ非侵襲的に検証することが可能となった。

分担研究者

池田大四郎（財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター
副センター長）

A. 研究目的

本研究は、ナンセンス変異型遺伝性疾患の革新的な治療法として、遺伝子中に生じた変異終止コドンを抗菌性物質のリードスルー活性を利用して克服する「リードスルー薬物療法」の開発を目指している。現在では、ユダヤ系人種に多い嚢胞性繊維症や、血友病、神経線維腫症、網膜色素変性症、水疱性疾患、ライソゾーム性蓄積症等の治療薬として、国際的にリードスルー活性がある物質の開発が注目されている。多くの致死的疾患を含むナンセンス変異症例は、単一遺伝性疾患では3割を占め、筋ジストロフィーでは15%程度であるが、筋疾患に関与するものだけでも239種特定されている（平成17年4月現在）。リードスルー療法は、筋ジストロフィーのみならずナンセンス変異が原因の広汎な遺伝性疾患の治療法として有望である。

本研究では、ゲンタマイシンより毒性が低く（LD50は1/20、聴覚毒性は無い）、リードスルー活性の高いネガマイシンというリード薬物を既に特定しており、その分子改変と抗菌性物質群の網羅的探索を効率化するために、生体内・外で薬効を評価・解析できるリードスルー活性検出系の開発が必須となった。このため、デュアルレポーター遺伝子を組み込んだTgマウスと細胞株を作製することと、ネガマイシンの立体配位形成に適合する類似物質を三次元データ解析により特定することを目的とした。また、筋ジストロフィーモデルマウスの筋変性を経時的かつ非侵襲的に検証することができうる新規指標を探索することも意図した。

B. 研究方法

・Tgマウスの作出とリードスルー活性の定量

βガラクトシダーゼとルシフェラーゼ遺伝子を連結し、その繋ぎ目に3種類の終止コドンを挿入した3種類のコンストラクト（mdxマウスのエクソン23のPTC前後12mer周辺配列を含む27mer）を含む、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリ

β -アクチンハイブリッドプロモーターを有する発現ベクター (pCAGGS) を生殖細胞系列に組み込んだTgマウス系統を作出した。3種類のPTC (Ochre:TAA, Amber:TAG, Opal:TGA) を含むコンストラクトを注入したマウス受精卵の雄性前核を偽妊娠させたICR雌マウス子宮内に移植し、生まれた仔マウスの尾DNAを用いてPCRにより遺伝子導入マウスを同定した。このファウンダーマウス雄と、遺伝的背景を同じくするC57BL/6野生型雌とを交配させ、生まれたF1マウスの脳、肺、肝臓、膵臓、小腸、脾臓、腎臓、骨格筋、心筋の凍結切片のX-gal染色と組織抽出液からの β ガラクトシダーゼ発現を指標に、さらに交配させてTgマウス系統を樹立させた。作出されたTgマウスでのリードスルー活性を評価するために、ゲンタマイシン (1.2×10^{-5} mol/Kg) を一週間連日皮下投与し、各組織抽出液から β ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性をルミノメータにより測定した。

・培養細胞によるリードスルー活性の定量

上述のコンストラクトをマウス骨格筋細胞株C2C12に導入し、FACSと限界希釈法を用いてスクリーニングし、3種の細胞株を樹立した。これら細胞株とTgマウス骨格筋由来初代培養細胞に候補抗菌性物質を投与後、リアルタイムルミノメータ (Kronos,アトー社) による培養細胞のルシフェラーゼ活性の経時的測定や、細胞抽出液のルシフェラーゼ/ β -ガラクトシダーゼ活性測定から、リードスルー活性を定量化した。

・モデル動物による体内動態の標的化

候補抗菌性物質をデュシャンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスであるmdxマウスに2週間連日皮下投与 (1.2×10^{-5} mol/Kg) し、経日的な体重測定と血清クレアチンキナーゼ活性の定量、筋組織 (大腿筋、前頸骨筋、横隔膜、心筋) 抽出液からのIn-Gel Western法によるジストロフィンタンパク質の発現を指標に、候補抗菌性物質の薬効を検討した。また、X線マイクロCTを用い、mdxマウス同一個体における骨格筋組織内の三次元カルシウム局在の経時的検出を行った。

・候補抗菌性物質の選定

三次元データのコンピュータ解析により、ネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物を105万種以上の化合物から探索した。

(倫理面への配慮)

Tgマウスを用いたリードスルー活性の検出、mdxマウスを用いたジストロフィン発現の検出等の動物実験においては、東京大学と微生物化学研究会の各動物実験委員会の承認を得て、動物実験の手引きに従い実験を行った。

C. 研究結果

・Tgマウスの作出とリードスルー活性の定量

Ochre, Amber, Opal (TAA, TAG, TGA) をPTC部位にそれぞれ挿入して得られたTgマウスが誕生し、脳、肺、肝臓、膵臓、小腸、脾臓、腎臓、心筋、骨格筋 (大腿筋、前頸骨筋、横隔膜) の各臓器の凍結切片のX-gal染色と組織抽出液からの β ガラクトシダーゼ発現を確認したところ、骨格筋 (大腿筋、前頸骨筋)、心筋、脳での発現が高かった。

Tgマウスへのゲンタマイシン皮下投与による各組織抽出液からの β ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性を測定した結果、投与群ではルシフェラーゼ活性の蓄積が骨格筋 (大腿筋の前側・後側とも) で有意に高く、リードスルー活性を検出することに成功した。

・培養細胞によるリードスルー活性の定量

樹立細胞やTgマウス骨格筋由来初代培養細胞へのゲンタマイシン処理によるリードスルー活性の確認を、ルシフェラーゼ活性の経時的測定や、細胞抽出液のルシフェラーゼ/ β -ガラクトシダーゼ活性測定から、リードスルー活性を定量化した。リアルタイムルミノメータを用いることで、ゲンタマイシンによるリードスルー活性は、処理後3~6時間頃に最大になることを検証した。

・モデル動物による体内動態の標的化

mdxマウスへ候補抗菌性物質を2週間連日皮下投与し、経日的な体重測定と眼窩採血による血清クレアチンキナーゼ活性の定量、組織抽出液からのIn-Gel Western法によるジストロフィンタンパク質の発現を指標に、候補抗菌性物質の薬効を検討した。現在のところ、体重の減少が無く、クレアチンキナーゼ活性の低下を認める抗菌性物質/化合物として、5-Methoxyuridineやシソマイシン等幾つか見出したが、ジストロフィンタンパク質の検出にまでは至っていない。

X線マイクロCTを用いたmdxマウス同一個体における三次元カルシウム局在の経時的検出により、異

所性石灰化が筋変性の指標となり得ることを見出した。

・候補抗菌性物質の選定

三次元データ解析により、ネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物を24種特定し、19種入手した。特定した化合物の一覧を別紙に記す (pp. 9-11)。また、リードスルー惹起が想定されるアミノグリコシド系抗生物質製剤を9種入手した。

D. 考察

Ochre, Amber, Opal (TAA, TAG, TGA) を PTC部位にそれぞれ挿入して得られた3種のTgマウスについては、骨格筋(大腿筋, 前頸骨筋), 心筋, 脳での β ガラクトシダーゼ発現が高く, ゲンタマイシン投与によるリードスルー活性を*in vivo*で検出することに初めて成功した。更なる発現能力の強化や感受性範囲の拡大を図るため交配を重ねるつもりである。

高分化型の細胞であるC2C12に導入された遺伝子は染色体に組み込まれず, プラスミドベクターで遺伝子が導入されていたため, その排出能が高いことが考えられるため, Tgマウス骨格筋由来初代培養細胞を用いる方がより感受性が高まると考えられる。

mdxマウスへの投与実験では, 経日的な体重測定, 血清クレアチンキナーゼ活性の定量, 組織抽出液からのIn-Gel Western法によるジストロフィンタンパク質の発現に加え, 運動能力と, 血中の総タンパク質, カルシウム, 無機リン, アルカリフォスファターゼ活性等の測定も加え候補薬物の薬効を検討する。異所性石灰化の指標分子機構解明のため, 週齢, 性別, 筋組織毎に石灰化部位から分離したmRNAから骨関連タンパク質の発現を解析する必要がある。

E. 結論

ナンセンス変異型遺伝性疾患の包括的治療のため作出された3種のTgマウス系統は, 薬物および変異原解析系として汎用性が高いモデル動物となるため, 更なるレポーター遺伝子発現能力の強化や感受性範囲の拡大を図り交配を重ねた上で, 使用方法特許を取得する予定である。これらの知的財産は今後の創薬研究に貢献し, その技術開発に提供できうる強力なツールとなる。

平成17年度は, *in silico*スクリーニングで得られたネガマイシン関連物質のリードスルー活性を, Tg

マウス個体, Tgマウス由来初代培養細胞, モデル動物個体で評価する。具体的には, Tgマウス個体レベルにおいて, 画像解析技術や分子生物学的・生化学的手法を駆使してリードスルー活性を定量することで, 抗菌性物質の組織特異性, 薬剤感受性(有効性と副作用)の把握を明確にし, 標的組織を原因組織とするナンセンス変異型遺伝性疾患の治療薬候補を探索する。また, Tgマウスの感受性を高めた上で, 非侵襲的にリードスルー活性を監視する系の確立も並行して行う。Tgマウス各組織由来の培養細胞においては, 既に確立している多因子複合作用解析系(米国へ6件の特許出願中)を用いる。この系は, カラーインクジェットプリンタを利用し, インクの代わりに異なる種類/濃度の薬剤を微量な液滴で吐出させることでハイスループットスクリーニングを可能にするもので, リードスルー効率を相乗的に高める薬剤, 異常mRNAを保持するNonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) 阻害剤, タンパク質合成系に干渉する抗菌性物質や, タンパク質/核酸合成阻害剤などの複数の薬剤の相互・複合作用を効果的に検討し, よりリードスルー活性をもち, 副作用が少ない薬剤の組み合わせを明らかにし, 併用療法を検討する。モデル動物個体についてはmdxマウスを用い, X線マイクロCTを用いた筋組織内の異所性石灰化の検出や血清の生化学分析, 運動能力測定, In-Gel Western法によるジストロフィンタンパク質の発現を指標に, 候補抗菌性物質の薬効を検討する。また血清検体を用いて薬物濃度を測定することにより, 候補抗菌性物質の吸収, 分布, 代謝, 排泄, 毒性について解析を行う。得られた薬物動態プロファイルから, 投与経路・量・間隔等の最適化を検討すると共に, 複数薬物の投与効果や, 疾患に合わせた標的組織特異的かつ効率的なドラッグデリバリーシステムを検証する。並行してmdxマウス骨格筋における異所的石灰化の分子機構を解明するため, 週齢, 性別, 筋組織毎に石灰化部位から分離したmRNAから骨関連タンパク質の発現を検証する。以上から, ネガマイシンと同様のリードスルー活性を有する物質が得られれば, 有機化学的展開と質量分析を用いた構造活性相関から, 薬効の増強, 副作用の軽減, 溶解性・安定性・吸収性の改善を計り, 分子設計と合成展開により創出された新規物質について物質特許を申請し, オープン薬として承認申請を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamane A, Akutsu S, and Matsuda R (2005) Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damages in mdx mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* in press

Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 166, 347-357

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

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スン* 41: 332-337

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一 (2004) 筋ジストロフィーの病態に応じた薬物治療の可能性 *臨床神経学* 44: 908-910

松田良一 (2004) カラーインクジェットプリンタを用いた成長因子アレイの作製 *Bionics* 1:72-73

2. 学会発表

吉川奈美子, 松田良一 (2004) mdxマウス骨格筋の異所的石灰化 日本動物学会第75回大会

嶋田健一, 松田良一 (2004) 哺乳類培養細胞における未熟終止コドン読み越え活性測定系の確立 日本動物学会第75回大会

大野智久, 松田良一 (2004) 局所麻酔剤マーカインによる筋管細胞特異的物質導入法の検討 日本動物学会第75回大会

満武里奈, 松田良一 (2004) インクジェットプリンタを用いて配列パターン制御した骨格筋細胞の培養 日本動物学会第75回大会

塩塚政孝, 藤山朋代, 渡辺昌也, 渡辺耕平, 宮崎健, 松田良一 (2004) 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 III 日本動物学会第75回大会

山根明, 阿久津覚誠, 松田良一 (2004) mdxマウスの咬筋, 腓腹筋, ヒラメ筋, 横隔膜の衛星細胞プールと活性化 日本動物学会第75回大会

Matsuda R, Shiozuka M, and Shimada K (2004) Current Situation of Negamycin Research. International Symposium "Molecular Therapy of Muscular Dystrophy Part II"

Kikkawa N, Ohno T, Shiozuka M, and Matsuda R (2004) Visualization of ectopic calcification in mdx mouse skeletal muscle. The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting

Ohno T, and Matsuda R (2004) A new method of specific introduction of substances into myotubes using marcaïne. The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting

Shimada K, Hara T, Shiozuka M, and Matsuda R (2004) Sequential measurement of readthrough activity with mammalian cell culture. The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting

Mitsutake R, Shiozuka M, Watanabe K, Miyazaki T, Kimura I, and Matsuda R (2004) In vitro muscle fiber formation on patterned gelatin stripes printed by a color ink-jet

printer. The American Society for Cell Biology
44th Annual Meeting

Watanabe K, Fujiyama T, Miyazaki K,
Shiozuka M, and Matsuda R (2005) Fabrication
of Growth Factor Array Using a Color Ink Jet
Printer. 2nd International Bioprinting,
Biopatterning Workshop

Shiozuka M, Shimada K, and Matsuda R (2005)
Establishment of dual reporter transgenic
mice for read-through assay. FASEB Summer
Research Conference 4th "Muscle satellite &
stem cell"

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

「ネガマイシン及びその類似体によるナンセンス
突然変異遺伝病の治療薬」としてアメリカ、カナ
ダ、イスラエル、オーストラリア、日本に用法特許
を出願中である。

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

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

リードスルー薬物～

主任研究者 池田大四郎 財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究センター
副センター長

研究要旨

リードスルー薬剤のサンプル提供

A. 研究目的

アミノグリコシド抗生物質（AG）は、抗菌薬として広く臨床で使用されている。本抗生物質はバクテリアのrRNAに作用し、そのタンパク質合成を阻害する。一方、近年真核細胞においてAGが終止コドンの読み越え活性を有することが報告されている。

当研究センターは、過去にジベカシン、アルベカシンなどのアミノグリコシド抗生物質を創製した経緯から、本プロジェクトにおいて新たなリードスルー活性を有する薬剤を見いだすために各種AGを提供する。

C. 研究結果

16年度では、ジベカシン（DKB）約1g（力価715ug/mg）を調整し提供した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Someno T, Kunimoto S, Nakamura H, Naganawa H, and Ikeda D. Absolute configuration of kigamicins A, C and D. *J. Antibiot.* 58, 56-60. (2005)

Momose I, Umezawa Y, Hirosawa S, Iinuma H, and Ikeda D. Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1867-71. (2005)

Kawada M, Yoshimoto Y, Minamiguchi K, Kumagai H, Someno T, Masuda T, Ishizuka M, and Ikeda D. A microplate assay for selective

measurement of growth of epithelial tumor cells in direct coculture with stromal cells. *Anticancer Res.* 24, 1561-1568. (2004)

Hashizume H, Hirosawa S, Sawa R, Muraoka Y, Ikeda D, Naganawan H, and Igarashi M. Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.*, 57, 52-58. (2004)

Kawada M, Yoshimoto Y, Kumagai H, Someno T, Momose I, Kawamura N, Isshiki K, and Ikeda D. PP2A inhibitors, harzianic acid and related compounds produced by fungus strain F-1531. *J. Antibiotics*, 57, 235-237. (2004)

Kumagai H, Someno T, Dobashi K, Isshiki K, Ishizuka M, and Ikeda D. ICM0301s, new angiogenesis inhibitors from *Aspergillus* sp. F-1491 I. Taxonomy, fermentation and biological activities. *J. Antibiot.*, 57, 97-103. (2004)

Someno T, Kumagai H, Ohba S, Amemiya M, Naganawa H, Ishizuka M, and Ikeda D. ICM0301s, new angiogenesis inhibitors from *Aspergillus* sp. F-1491 II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, 57, 104-109. (2004)

Hashizume H, Hirosawa S, Sawa R, Muraoka Y, Ikeda D, Naganawa H, and Igarashi M. Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. *J. Antibiot.*, 57, 52-8. (2004)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

Yamane A, Akutsu S, and Matsuda R (2005) Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damages in mdx mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* in press

Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 166, 347-357

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

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

塩塚政孝, 荒川正行, 松田良一 (2004) 筋ジストロフィーの病態に応じた薬物治療の可能性 *臨床神経学* 44: 908-910

松田良一 (2004) カラーインクジェットプリンタを用いた成長因子アレイの作製 *Bionics* 1:72-73

松田良一 (2005) 質・量とも最低の生物教科書で科学立国, 遠い夢 *現代* 6月号 pp.222-229 講談社

Kawada M, Yoshimoto Y, Minamiguchi K, Kumagai H, Someno T, Masuda T, Ishizuka M, and Ikeda D. A microplate assay for selective measurement of growth of epithelial tumor cells in direct coculture with stromal cells. *Anticancer Res.* 24, 1561-1568. (2004)

Hashizume H, Hirosawa S, Sawa R, Muraoka Y, Ikeda D, Naganawan H, and Igarashi M. Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. II. Structure elucidation. *J. Antibiotics*, 57, 52-58. (2004)

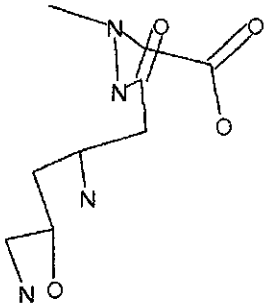
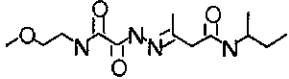
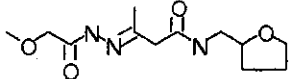
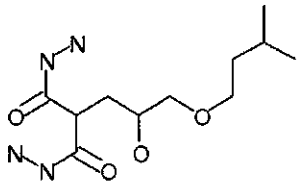
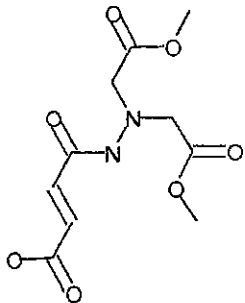
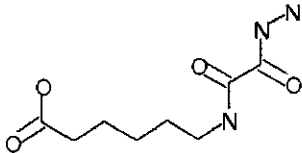
Kawada M, Yoshimoto Y, Kumagai H, Someno T, Momose I, Kawamura N, Isshiki K, and Ikeda D. PP2A inhibitors, harzianic acid and related compounds produced by fungus strain F-1531. *J. Antibiotics*, 57, 235-237. (2004)

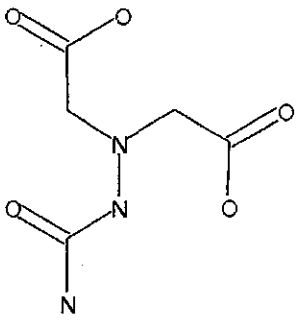
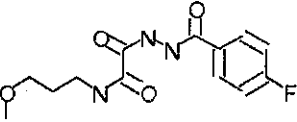
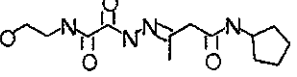
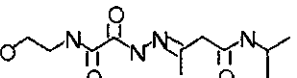
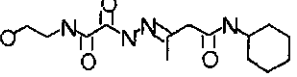
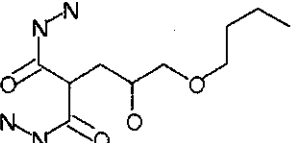
Kumagai H, Someno T, Dobashi K, Isshiki K, Ishizuka M, and Ikeda D. ICM0301s, new angiogenesis inhibitors from *Aspergillus* sp. F-1491 I. Taxonomy, fermentation and biological activities. *J. Antibiotics*, 57, 97-103. (2004)

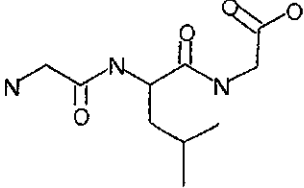
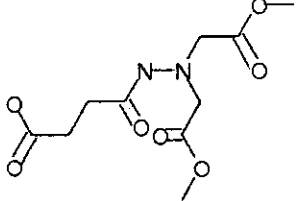
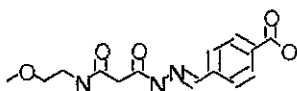
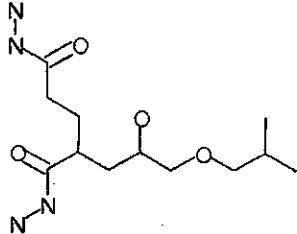
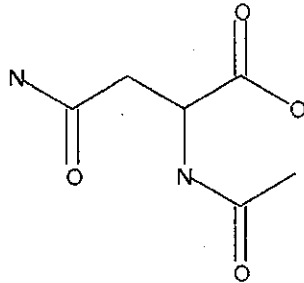
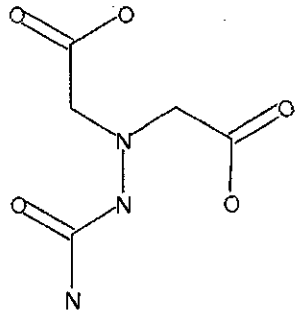
Someno T, Kumagai H, Ohba S, Amemiya M, Naganawa H, Ishizuka M, and Ikeda D. ICM0301s, new angiogenesis inhibitors from *Aspergillus* sp. F-1491 II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiotics*, 57, 104-109. (2004)

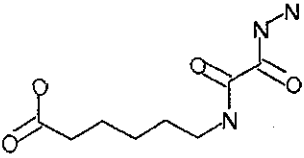
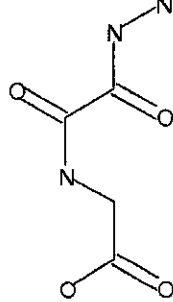
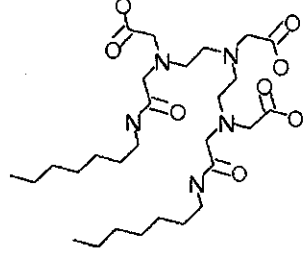
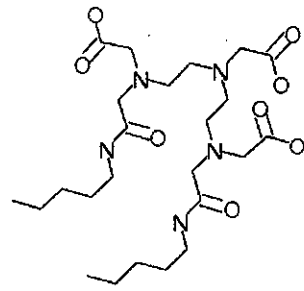
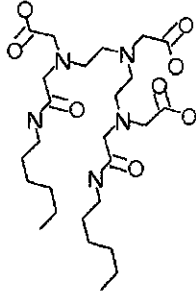
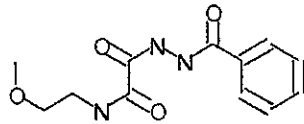
Momose I, Umezawa Y, Hirosawa S, Iinuma H, and Ikeda D. Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1867-71. (2005)

Someno T, Kunimoto S, Nakamura H, Naganawa H, and Ikeda D. Absolute configuration of kigamicins A, C and D. *J. Antibiot.* 58, 56-60. (2005)

mol	Formula	MolWeight
<p>1</p> 		
<p>2</p> 	C13H24N4O4	300.357
<p>3</p> 	C12H21N3O4	271.316
<p>4</p> 	C11H24N4O4	276.335
<p>5</p> 	C10H14N2O7	274.23
<p>6</p> 	C8H15N3O4	217.224

	mol	Formula	MolWeight
7		C5H9N3O5	191.143
8		C13H16FN3O4	297.285
9		C13H22N4O4	298.341
10		C11H20N4O4	272.303
11		C14H24N4O4	312.368
12		C10H22N4O4	262.308

	mol	Formula	MolWeight
13		C10H19N3O4	245.278
14		C10H16N2O7	276.246
15		C14H17N3O5	307.305
16		C12H26N4O4	290.362
17		C6H10N2O4	174.156
18		C5H9N3O5	191.143

	mol	Formula	MolWeight
19		C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₄	217.224
20		C ₄ H ₇ N ₃ O ₄	161.117
21		C ₂₈ H ₅₃ N ₅ O ₈	587.755
22		C ₂₄ H ₄₅ N ₅ O ₈	531.648
23		C ₂₆ H ₄₉ N ₅ O ₈	559.702
24		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄	265.268

Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damages in mdx mice

AKIRA YAMANE¹, SATONARI AKUTSU², THOMAS G.H. DIEKWISCH³ AND RYOICHI MATSUDA⁴

¹Department of Pharmacology, ²High Technology Research Center, Tsurumi University School of Dental Medicine, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501, Japan. ³Brodie Laboratory for Craniofacial Genetics, University of Illinois College of Dentistry, Department of Orthodontics, USA. ⁴Department of Biology, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

Running head: Satellite cell and utrophin in mdx muscle damage

Address for reprints and other correspondence: A. Yamane, Department of Pharmacology, Tsurumi University School of Dental Medicine, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501, Japan

E-mail yamane-a@tsurumi-u.ac.jp Fax +81-45-573-9599

Akira Yamane, Satonari Akutsu, Thomas G.H. Diekwisch, and Ryoichi Matsuda.

Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damages in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* —To determine whether muscle satellite cells and utrophin are correlated with the degree of damage in mdx skeletal muscles, we measured the area of the degenerative region as an indicator of myofiber degeneration in the masseter, gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles of mdx mice. Further, we analyzed the expression levels for the paired box homeotic gene 7 (pax7), m-cadherin (the makers of muscle satellite cells), and utrophin mRNAs. We also investigated the immunolocalization of m-cadherin and utrophin proteins in the muscles of normal C57BL/10J (B10) and mdx mice. The expression level for pax7 mRNA and the percentage of m-cadherin-positive cells to the total number of cell nuclei in the muscle tissues in all four muscles studied were greater in the mdx than in the B10. However, there was no significant correlation between the muscle damage and expression level for pax7 mRNA ($R=-0.140$), nor was there a correlation between the muscle damage and the percentage of satellite cells to the total number of cell nuclei ($R=-0.411$) in the mdx. The expression level for utrophin mRNA and intensity of immunostaining for utrophin in all four muscles studied were greater in the mdx than in the B10. However, neither was there a significant correlation between the muscle damage and the expression level for utrophin mRNA ($R=0.231$) in the mdx, although up-regulated utrophin was incorporated into the sarcolemma. These results suggest that satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damages in mdx mice.

mdx mouse; skeletal muscles; dystrophy; satellite cell; utrophin

The X chromosome-linked muscular dystrophic mdx mouse lacks the sarcolemmal protein, dystrophin, and represents a genetic homologue of human Duchenne muscular dystrophy. Dystrophin is a 427 kDa cytoskeletal protein that is expressed in the sarcolemma (membrane structure of the myofiber) and contributes to the stability of the sarcolemma. Lack of dystrophin causes myofiber degeneration due to membrane damage, calcium over-uptake by muscle cells, over-contraction, and activation of intracellular proteinase (2, 19). The damage of the myofibers varies among the muscles of the mdx mouse; the mdx diaphragm muscle is more severely damaged by dystrophy than are the other muscles (9, 27), whereas craniofacial muscles such as the masseter and extraocular muscles are less damaged (15, 20). However, the mechanism underlying differences in the degree of myofiber damage among the mdx skeletal muscles is unclear.

Muscle satellite cells are mononucleated and quiescent stem cells that reside between the sarcolemma and basal lamina of adult myofibers (4, 12). In response to stimuli such as mechanical loading, unloading, denervation, and injury, the satellite cells are activated to proliferate, differentiate to myoblasts, and fuse to pre-existing myofibers. This activation is thought to induce adaptive changes of skeletal muscle such as hypertrophy, the alteration of fiber type, and regeneration (1, 4, 12, 23). These observations suggest that satellite cells are correlated with the degree of damage in mdx skeletal muscles.

Utrophin is a paralogue of dystrophin and can functionally replace dystrophin (2, 7, 30). In normal adult myofibers, the expression of utrophin is confined to the neuromuscular and myotendinous junctions, whereas, in mdx myofibers, utrophin is expressed throughout the sarcolemma instead of dystrophin and the total amount of utrophin is markedly elevated in comparison with that in normal myofibers (2, 33). Moreover, transgenic mdx mice displaying fairly high amounts of utrophin show a complete correction of the dystrophic status (30). On the other hand, mdx mice where the utrophin gene has been inactivated present a catastrophic

aggravation of their myopathy leading to early death (6). The situation in mdx muscles, however, lies between these last two extremes. And it seems important to know if the spontaneous level of utrophin expression is negatively correlated with the degree of damage in mdx skeletal muscles.

In the present study, to determine whether muscle satellite cells and the expression of utrophin are correlated with the degree of damage in mdx skeletal muscles, we measured the area of the degenerative region relative to the total muscle area, an indicator of myofiber degeneration, in the masseter, gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles of the mdx mouse. Further, we analyzed the mRNA expression levels for the paired box homeotic gene 7 (pax7), m-cadherin (the makers of muscle satellite cells), and utrophin, and investigated the immunolocalization of m-cadherin and utrophin in the muscles of both normal and mdx mice.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals. Dystrophic mdx and control C57BL/10J (B10) mice, obtained from the Central Animal Research Laboratory (Kanagawa, Japan), were used throughout the present study. All mice were kept on a 12 h light-dark cycle, fed a pellet diet (CE-2; Clea Japan, Tokyo, Japan), and were allowed tap water ad libitum. All experimental protocols concerning animal handling were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of the Tsurumi University School of Dental Medicine.

Histological analysis of degenerative area. Six mdx and six control B10 mice, aged 6 weeks, were killed by cervical dislocation under ether anesthesia. The body weights of the mdx and B10 mice were 17.2 ± 1.9 g and 18.9 ± 1.5 g (mean \pm 1 SD), respectively. Whole portions of the left masseter, gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles were removed and fixed in Bouin's fixative for 1 h at 4°C. After washing in phosphate-buffered saline (PBS), the sections