

究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班，平成 21 年度ワークショップ，東京，7.31，2009

17. 武田 伸一：筋ジストロフィーの治療研究の進歩，筋ジストロフィーという病気をもっと知ろう，厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー集学的治療と均てん化に関する研究（神野班），特別講演，平成 21 年度 第一回筋ジストロフィーに関する市民公開講座，名古屋，7.18, 2009
18. 青木 吉嗣，横田 俊文，齊藤 崇，中村 昭則，武田 伸一：mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究，第 13 回 3 施設合同研究発表会，東京，6.16, 2009
19. 武田 伸一：筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究，第 46 回筋ジス協会全国大会，東京，5.17, 2009

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他，特記事項

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)  
分担研究報告書

ベクター系を応用した新規アンチセンス分子送達担体の開発

研究分担者 岡田 尚巳  
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

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン・スキップ治療の効果を高めるため、アンチセンス分子を効率よく心筋や骨格筋に送達する担体の開発を行った。まず、核内局在化と長期的な導入効果を目的として、RNA 標的効率を高めた改変 U7 snRNA にアンチセンス配列を結合し、これを発現する 9 型 AAV ベクターを構築した。実際にベクターを培養細胞に導入し、スキッピングが誘導されることを RT-PCR 法にて確認した。また、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を作製し、これを用いてモルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討した。蛍光標識モルフォリノを中空粒子に取り込ませ、これを培養細胞に投与し核内への良好な集積を確認した。さらに、9 型 AAV を正常犬に全身投与し、安全性を検証した。9 型 AAV を応用した改変 U7 snRNA 発現ベクターや中空粒子は、エクソン・スキップ治療に必要なアンチセンス分子の次世代担体として有望と考えられた。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)における遺伝子変異の多くはジストロフィン遺伝子の遺伝子変異集積領域であるエクソン 45-55 に集中している。アンチセンス・モルフォリノによるエクソン・スキップ治療の有効性が期待されているが、頻度の高い欠失をインフレーム化する基盤技術が確立していないことや、心筋への導入および作用時間が不十分であることが臨床的効果を得るための大きな課題である。本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時間の発現が期待できる 9 型アデノ随伴ウイルス(AAV)を応用し、アンチセンス分子送達担体の開発を行う。

B. 研究方法

まず、核内局在化と長期的な導入効果を目的として、アンチセンス配列を改変 U7 small

nuclear RNA(snRNA)に結合し、これを発現する 9 型 AAV ベクターを構築した。U7snRNA は真核生物の核内にみられる低分子 RNA の一つであり、Sm タンパク質との結合により U7 snRNP を形成し、ヒストン pre-mRNA の 3' 末端のプロセッシングに関与する。興味深いことに、Sm タンパク質結合領域をコンセンサス配列である Sm-opt に改変した U7 snRNA は、U7 RNA 量の増加と共に、核集積効率が向上する。この改変 U7 snRNA にアンチセンス分子を挿入すると、人為的に選択的 RNA スプライシングを誘導することが知られている。今回はこの U7snRNA の特性を利用し、効率よくスキッピングを誘導するためのアンチセンス発現カセットを構築した。

マウス U7 プロモーターによる snRNA の発現には、転写開始位置から 62-44bp 上流に存在している proximal sequence element (PSE:

TCACCTCATCGAAAGTGG)および 203-194bp 上流にある distal sequence element (DSE: GCATAGCCTT)が必須(Jacobs et. al.,1999)である。本研究ではこれらの配列を含め、マウス Rnu7 遺伝子(Gene ID: 19866)プロモーター領域の DSE から 20bp 上流までのシーケンスを含めて用いた。また、標的効率を高めるため、splicing silencer 配列として知られている、heterogenous ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1)の結合領域を付加した。以上の工夫によってアンチセンス配列は snRNP として核に集積し、高い効率でエクソン・スキップを誘導することが期待される。Pol II による遺伝子の転写の終了には snRNA 配列の末端から 14-27bp 下流の 3'box terminator sequence(3'box: GTCTACAATGAAAG)が必須(Jacobs et. al.,1999, Egloff et. al., 2008)であるため、Rnu7 遺伝子の 3'box から 20bp 下流までのシーケンスを配置した。

まず今年度は、マウス U7snRNA にアンチセンス配列および hnRNPA1 結合領域を付加した発現カセットを搭載する AAV ベクタープラスミドを構築した。アンチセンス配列としては、ジストロフィン遺伝子エクソン 51 のエキソン・スキップ療法臨床治験に用いられている PRO051(mA20)に対応する 20塩基を用いた。これをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、RT-PCR 法によってスキッピング効率を検証した。

また、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を作製し、これを用いてモルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討した。蛍光標識モルフォリノを界面活性剤と超音波の処理にて中空粒子に取り込ませた。限外濾過膜を用いて界面活性剤を除去し濃縮した。このモルフォリノ含有中空粒子をヒト横紋筋肉腫細胞株 RD に投与し、24 時間後に蛍光顕微鏡にて蛍光を確認した。さらに副反応を検証するため、マーカー遺伝子発現 9 型 AAV ベクター(AAV9-luciferase, AAV9-GFP;  $1 \times 10^{13}$  v.g./ site)を生後一日齢新生仔正常犬の前脛骨

筋や心筋に局所投与した。さらに、AAV9-luciferase( $1 \times 10^{13}$  v.g./ body)を新生仔正常犬の外頸静脈から経静脈的に全身投与した。

## C. 研究成果

### 1. 改変 U7 snRNA

改変型 U7snRNA にエクソン 51 スキップに必要なアンチセンス配列の発現カセットを搭載した AAV ベクタープラスミドを構築した。これをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、RT-PCR 法によってスキッピング効率を検証したところ、ほぼ完全にエクソン 51 がスキップしていることが証明された。

### 2. モルフォリノ含有 AAV 中空粒子

イオン交換法を用いて、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を精製した。モルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討するため、中空粒子と蛍光標識モルフォリノを様々な比率にて混合し、界面活性剤や超音波の処理によって中空粒子に取り込ませた。さらに、限外濾過膜を用いて界面活性剤を除去し濃縮に成功した。このモルフォリノ含有中空粒子を横紋筋肉腫細胞株 RD に投与したところ、24 時間後から、核内に強い蛍光が認められ、4 日間以上持続した。この結果から、9 型 AAV の中空粒子は、筋細胞の核内に効率よくモルフォリノを送達することが可能であると考えられた。この際、明らかな細胞毒性は認められなかった。

### 3. 9 型 AAV 副反応

9 型 AAV ベクターを新生仔正常犬の骨格筋・心筋内に局所投与あるいは経静脈的に全身投与したところ、投与 2 週後に免疫染色にて局所投与による遺伝子発現を確認したが、経静脈的投与による発現は微弱であった。両者の場合とも、ベクター投与に伴う特記すべき副反応は認められなかった。

## D. 考察

現在、英国において、核酸類似物質であるモルフォリノを用いたエクソン・スキップ療法の臨床治験が行われており、米国でも臨床治験を念頭に、前臨床試験による安全性評価が開始されている。ただし、現行のモルフォリノを用いた治療技術では、心筋への導入効率および作用時間が不十分であり、これらを克服することが高い臨床的効果を得るために求められている。

本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時間の発現が期待できる9型AAVを応用し、アンチセンス分子送達担体の開発を検討した。改変U7 snRNAを構築し、アンチセンス分子をベクターから発現させた結果、高い効率でエクソン51がスキップした。また、モルフォリノ含有AAV中空粒子を用いた方法でも、核内への集積が認められた。今後、モデル動物や患者検体由来の線維芽細胞を用いて、両者の担体の有効性と安全性を前臨床的に検証することで、臨床応用に向けた課題の抽出と解決が期待される。

## E. 結論

9型AAVを応用した改変U7 snRNA発現ベクターや中空粒子は、エクソン・スキップ治療に必要なアンチセンス分子の次世代担体として有望と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[欧文原著]

Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K. Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuro Report* (in press)

Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H.,

Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S., Ozawa, K. Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther*, 20:1013-1021, 2009.

Ohshima, S., Shin, J.H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T. and Takeda, S. Transduction efficiency and immune response with AAV8 vector in dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009.

Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K. Retroviral Vector-Producing Mesenchymal Stem Cells for Targeted Suicide Cancer Gene Therapy. *J Gene Med* 11:373-381, 2009.

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K.I., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y. and Ozawa, K. Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther*, 16:383-391, 2009.

[欧文図書]

Okada, T., Takeda, S.: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in *A Guide to Human Gene Therapy* (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ.(in press)

## 2. 学会発表

Kasahara Yuko, Hiromi Kinoh, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima, Michiko Maeda, Akinori Nakamura, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda

Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells  
American Society of Gene Therapy 12<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

Jin-Hong Shin, Sachiko Ohshima, Hiromi Kinoh,  
Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda  
Electrocardiographic and pathologic improvement  
of mdx heart by transduction with  
rAAV9-microdystrophin  
American Society of Gene Therapy 12<sup>th</sup> Annual  
Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

Akiko Ishii, Jin-Hong Shin, Yuko Katakai,  
Fumiko Ono, Takashi Okada, and Shin'ichi  
Takeda  
Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy  
for muscular dystrophy using normal primates  
American Society of Gene Therapy 12<sup>th</sup> Annual  
Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

Kasahara Yuko, Hiromi Kinoh, Jin-Hong Shin,  
Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima, Takashi  
Okada, and Shin'ichi Takeda  
Cell therapeutic approach to Duchenne muscular  
dystrophy using myogenic differentiation of  
multipotent mesenchymal stromal cells in animal  
model  
The 15th Annual meeting of Japan Society of  
Gene Therapy, Toyonaka, July 9-11, 2009

Akiko Ishii, Jin-Hong Shin, Yuko Katakai,  
Fumiko Ono, Takashi Okada, and Shin'ichi  
Takeda  
Effective adeno-associated virus-mediated gene  
expression in skeletal muscle of normal primate  
The 15th Annual meeting of Japan Society of  
Gene Therapy, Toyonaka, July 9-11, 2009

岡田尚巳, 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 武  
田伸一 : AAV ベクターを用いた筋ジストロ  
フィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学  
会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009

笠原優子, 喜納裕美, 西山章代, Jin-Hong Shin,  
大島幸子, 岡田尚巳, 武田伸一 : MyoD 発現  
アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹  
細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植治療, 第 57  
回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 10.26,  
2009

喜納裕美, 岡田浩典, 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸  
一 : 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロ  
フィー犬胎児・新生児への遺伝子導入  
第 4 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会  
平成 21 年 10 月 31 日、岡山

武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原  
優子, 岡田尚巳 : 9 型 AAV ベクターを用いた  
筋ジストロフィー犬胎仔・新生仔への遺伝子  
導入  
平成 21 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対する治療研究を臨床  
に展開するための統括的研究、研究班会議  
平成 21 年 12 月 4 日、東京

岡田尚巳  
Development of AAV vector production system  
and therapeutic approaches for Duchenne  
muscular dystrophy  
熊本大学グローバルCOEリエゾンラボ研究  
会、平成 21 年 11 月 11 日、熊本

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他, 特記事項  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)  
分担研究報告書

Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた *mdx52* に対する  
ジストロフィン遺伝子エクソン 53 スキッピングの試みに関する研究

研究分担者 永田 哲也  
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

エクソン 53 はエクソンスキッピング対象患者の中で 3 番目に多いと考えられている。ジストロフィン遺伝子エクソン 52 欠失マウス (*mdx52* マウス) を対象に、エクソン 53 を標的に 21 種類のアンチセンス配列を設計し、筋注によりスキップ効率を比較した。単独ではスキッピング効率が低かったが、いくつかの組み合わせで 50%以上の効率が見られた。今後、この中で最も効果的な組み合わせを選択する。本研究の結果は、今後、施行されるであろう DMD を対象にしたエクソン 53 スキップ治療の可能性を示唆していると考えられた。

A. 研究目的

*Mdx52* マウスに対して phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) を筋肉内投与することにより、エクソン 53 スキップを誘導させるアンチセンス配列の至適条件を検討した。

B. 研究方法

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 53 において、5'および 3'スプライスサイト (それぞれ 53A, 53D) や ESEfinder3.0 ソフトにより同定した exonic splicing enhancer (ESE) を標的とする 25 mer のアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を 21 種類設計した。マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 52 を欠失した *mdx52* マウス (8 週齢) の前脛骨筋に、単独あるいは 2 種類の PMO (計 5 nmoles) を 1 回投与し、2 週間後に RT-PCR、ジストロフィン免疫染色、ウエスタンブロットによる解析を行い、最適な AO 配列を決定した。

C. 研究成果

1. 筋注による至適 AO 配列の検討

単一 PMO の投与においては、エクソン 53 の 3'スプライスサイトを標的に設計した 53D と 53A またはアクセプターサイトから 27-70bp 内側に設計された AO の組み合わせを使用すると RT-PCR で 50-55%程度のスキップ効率が確認された。また免疫染色でも同様にジストロフィンの発現が確認された。

D. 考察

現在、オランダとイギリスにおいて、DMD を対象にしたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの臨床試験が行われており、米国でも前臨床的試験による安全性評価が実施され臨床試験が開始されている。DMD を対象にした臨床データベースによる解析では、エクソン 53 スキップによりイン・フレーム化する変異は 3 番目に多く、今後臨床応用される可能性が高いと考えられる。

今回我々は *mdx52* マウスを用いた実験により、エクソン 53 でもエクソンスキッピングの効果があることが確認できた。今後、*mdx52* を使用し PMO の静脈投与により全身の骨格

筋に短縮型ジストロフィンが発現回復し、筋機能は改善するかを検討する。さらに、ヒト myoD 変換線維芽細胞を使用し、ヒト細胞での効果についても検討する。

なし

2. 実用新案登録

なし

## F. 健康危険情報

なし

3. その他, 特記事項

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[欧文原著]

- 1) Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S. Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. Free Radic Biol Med 47:1049-1056, 2009

[欧文図書]

なし

### 2. 学会発表

- 1) 武田伸一, 齊藤 崇, 中村昭則, 清水裕子, 青木吉嗣, 横田俊文, 永田哲也, 大澤真木子: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドのDMD患者細胞への応用. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2010
- 2) 青木吉嗣, 横田俊文, 齊藤 崇, 永田哲也, 中村昭則, 武田伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究. 日本人類遺伝学会第54回大会, 東京, 9.24, 2009
- 3) 永田哲也: 運動ニューロンを障害する変異 SOD1 アストロサイト由来の液性因子の解析. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
青木 吉嗣, 武田 伸一	筋ジストロフィー, 多発筋炎	阿部 康二	研修医のための の神経内科診療	新興医学 出版社	東京	2010	248-252
鈴木 友子, 武田 伸一	骨格筋	松島 綱治, 西脇 徹	炎症・再生医学 事典	朝倉書店	東京	2009	453-456

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, <u>Takeda S</u> , Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H	Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens	<i>J. Poult. Sci</i>	46	95-99	2009
Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, <u>Takeda S</u>	Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging	<i>Muscle Nerve</i>	40 巻 5 号	815-826	2009
Nakamura A, <u>Takeda S</u>	Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy	<i>Neuropathology</i>	29 巻 4 号	494-501	2009
Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, <u>Takeda S</u> , Heike T, Nakahata T	Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells	<i>FASEB J</i>	23 巻 6 号	1907-1919	2009
Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, <u>Takeda S</u> , Hoffman E	Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs	<i>Ann Neurol.</i>	65 巻 6 号	667-676	2009
Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, <u>Takeda S</u>	Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro	<i>Mech Dev</i>	126 巻 3-4 号	107-116	2009
Yokota T, <u>Takeda S</u> , Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP	A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground	<i>Arch Neurol.</i>	66 巻 1 号	32-38	2009
Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, <u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u>	Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle	<i>Mol Ther.</i>	17 巻 1 号	73-80	2009



## 疾患編

## 17. 筋ジストロフィー，多発筋炎

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 青木吉嗣・武田伸一

**Key words** Duchenne 型筋ジストロフィー，多発筋炎，皮膚筋炎**要点**

- ① Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の確定診断は，遺伝学的検査あるいは筋生検により行う。
- ② DMD の骨格筋および呼吸機能の改善を目的にステロイド投与を行う。
- ③ DMD では，心不全と呼吸障害を中心とした全身管理が重要である。
- ④ 多発筋炎・皮膚筋炎は，ステロイド，免疫抑制剤，免疫グロブリンにより加療を行う。
- ⑤ 多発筋炎・皮膚筋炎は，悪性腫瘍や間質性肺炎の合併に注意する。

**重要ポイント**

- ① 筋ジストロフィーは，骨格筋の壊死・変性を主病変とし，臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーのうち，もっとも頻度が高く重症の経過をとる Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に，呼吸および循環管理に加えて，ステロイド，アンジオテンシン変換酵素阻害薬，交感神経β受容体遮断薬などにより筋障害の改善が試みられている。
- ② 後天性筋疾患の代表である特発性炎症性ミオパチーは，多発筋炎，皮膚筋炎，封入体筋炎に分類される。特に多発筋炎は横紋筋のびまん性炎症性筋疾患であり，特徴的な皮疹を呈するものは皮膚筋炎という。成人に比較的多くみられ，ステロイド，免疫抑制剤，免疫グロブリンが筋力低下に奏効する 경우가多いが，悪性腫瘍や間質性肺炎の合併例は予後不良である。

**A****Duchenne 型筋ジストロフィー  
(Duchenne muscular dystrophy : DMD)**

筋ジストロフィーは「骨格筋の壊死・変性を主病変とし，臨床的には進行性の筋力

低下をみる遺伝性の疾患である」と定義される。筋ジストロフィーのうち，もっとも頻度が高く重症の経過をとる Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は，ジストロフィン遺伝子（Xp21.2）の変異により，骨格筋膜の安定性に重要なジストロフィンが欠損す

ることで発症する。ジストロフィンの欠損が不完全な場合はベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy : BMD) の表現型をとる。DMDは, X染色体連鎖遺伝形式をとり, 新生男児3,500人に1人の割合で発症する。

## 1. 臨床像

2～5歳前後で転びやすい, 歩行が遅いなどの症状で気づかれることが多いが, 高CK血症を偶発的に指摘され診断に至ることもある。特徴的な登はん性起立 (Gowers 徴候) を呈する。病初期には明らかな筋萎縮は認めず, 腓腹部や舌などの筋肥大を示す場合が多いが, 徐々に近位筋優位の筋力低下が進行して歩行は動揺性となり, 12歳までに歩行不能となり車椅子生活に移行する。前後して脊柱側彎や関節拘縮の出現をみる。13歳前後で座位の保持も困難となる。呼吸筋の筋力低下のため10歳後半に呼吸不全が生じ, 次第に心機能の低下も出現する。主として呼吸管理の進歩により, 平均死亡年齢は過去20年で10年程度延長し, 30歳前後になった。現在の死因は主に心不全および呼吸不全である。

## 2. 検査所見

### 1) 血液生化学検査

乳児期より著明な高CK血症 (20,000～40,000 U/L), アルドラーゼなどの筋原性酵素の上昇をみるが, 筋萎縮の進行とともに低下する。AST, ALT, LDHも上昇し, 肝機能障害と誤る場合がある。

### 2) 筋電図

随意収縮時に, 低振幅・短持続時間の運動単位, 運動単位の早期動員 (early recruit-

ment) がみられる。

### 3) 画像検査

骨格筋CT, MRIでは5歳頃から大殿筋の脂肪置換を認める。10歳以降では大腿四頭筋 (特に大腿直筋), 大内転筋と大腿二頭筋, 傍脊柱筋を中心に近位筋優位に筋容積の減少や脂肪置換が顕著となるが, 薄筋と縫工筋は比較的保たれる (selectivity pattern)。

### 4) 遺伝学的検査

他の検査所見からDMD/BMDの可能性が疑われ, 臨床的および遺伝医学的に有用と考えられる場合に実施を検討する。遺伝学的検査は, 生涯変化しない個人の重要な遺伝学的情報を扱うため, 担当医師から被験者 (保護者) に対して, 検査を行う意義, 利点と限界, その結果が家族や親族に及ぼす影響について十分説明し, 書面による同意を得た上で, 遺伝子異常が診断されたときの支援まで準備して実施されるべきである。検査実施前後に遺伝カウンセラーが遺伝カウンセリングを実施することが望ましい。

最近, 遺伝子変異が確立した男性のDMD/BMD患者を対象に, 臨床試験/治験の実施を目的とした筋ジストロフィー患者登録サイトの運用が開始された (Remudy : registry of muscular dystrophy. <http://www.remudy.jp/index.html>)。登録に際しては, 全例にmultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法によるスクリーニング検査を行い (保険診療), 必要に応じてシーケンス解析, 筋生検を実施する。

### 5) 筋生検

筋病理では, 筋の壊死・変性, 再生線維の混在, 筋線維の大小不同, 結合織の増生

がみられる。免疫組織化学染色では、DMDの筋細胞膜はジストロフィンをほぼ完全に欠損するが、BMDの細胞膜はまだら状(faint and patchy)に染色される。

### 3. 治療方針

DMDに対するステロイド投与の有効性に関して、筋力の増強あるいは維持と呼吸機能の改善がランダム化比較対照試験により証明されている。5～15歳の症例ではプレドニゾン(プレドニン®) 0.75 mg/kg/日の連続投与が治療の第一選択である。体重増加などの副作用の面から投与量の減量が望ましい場合には、0.5 mg/kg/日に減量し、3～4ヵ月でさらに0.3 mg/kg/日へと減量する。

#### 【心不全】

定期的に脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide : BNP)の測定や心エコーを施行し、左室駆出率40%以下(BNP 20～60 pg/mL)で、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(レニベース®, 2.5 mg/日から開始し漸増)、交感神経β受容体遮断薬(アーチスト®, 1.25 mg/日から開始し漸増。上限は10 mg/日)を開始する。心筋障害が進行した際は拡張型心筋症の心不全に準じ、強心薬、利尿薬も加える。

#### 【呼吸障害】

定期的なSpO<sub>2</sub>、%VC、ピークカフフロー、終末呼気炭酸ガス濃度の測定が重要である。開始時期は、低酸素に基づく症状がある場合、睡眠時にSpO<sub>2</sub>低下がある場合、VCが1L(あるいは%VCが20%)を下回る時期の前後、PaCO<sub>2</sub>が55 Torr以上であれば夜間に非侵襲的陽圧換気療法(Noninvasive Positive Pressure Ventilation : NPPV)を開

始する。病状、病態に応じて昼間にもNPPVを追加する。排痰障害にはカフレーター(Mechanical In-Exsufflator : MI-E)や肺内パーカッション換気療法(IPV)も有効である。

### 4. 患者指導とリハビリテーション

早期より側彎と関節拘縮の予防に努め、必要に応じて装具、コルセットを作製する。最大強制吸気量維持のため呼吸訓練を行い、舌咽頭呼吸の習得を試みる。側彎は外科的治療も含め積極的に治療する。過度の痩せは消化管機能を低下させるため栄養指導が大切である。

### 5. 根本的治療開発の動向

現在DMDに対して、PTC124によるリード・スルー療法、ES/iPS細胞や筋芽細胞の移植治療、ウイルスベクターによる遺伝子治療などの開発が進められている。当研究部では、これまでアンチセンス・モルフォリノを用いたエクソン・スキッピング療法の前臨床試験を行ってきた。この成果を踏まえて、DMDを対象にしたエクソン51スキッピングの臨床試験を実施する準備を進めている。

## **B** 多発筋炎(polymyositis : PM), 皮膚筋炎(dermatomyositis : DM)

後天性筋疾患の代表である特発性炎症性ミオパチーは、多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎に分類される。特に多発筋炎は横紋筋のびまん性炎症性筋疾患であり、特徴的な皮疹を呈するものは皮膚筋炎という。多発筋炎・皮膚筋炎の有病率は人口10万あた

り約6人と推定される。男女比は女性が約2倍と多い。発症年齢の約半数は40～60歳である。

### 1. 病因

発症には自己免疫機序が関与する。多発筋炎では、筋線維・間質・血管周囲にマクロファージ、CD8<sup>+</sup>T細胞が浸潤し、筋線維内のカルパインなどのタンパク分解酵素を活性化する結果、筋線維は壊死する（細胞性免疫）。皮膚筋炎では、主に筋周膜の血管周囲や間質にB細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞（ヘルパーT細胞）が浸潤する（液性免疫）。筋内微小血管の内皮細胞が傷害される結果、循環障害による筋束周囲萎縮が生じる。

### 2. 臨床像

急性ないし亜急性（数週～数ヵ月）に進行する。初発症状は、四肢近位筋・頸筋・体幹の筋力低下、筋痛、関節痛がみられることが多い。遠位筋力の低下は遅れて生ずる。進行例では筋萎縮を認めることがある。嚥下障害が生じることがあるが、構音障害を伴うことは少ない。びまん性間質性肺炎、肺線維症、心筋炎をしばしば合併する。自然寛解や増悪を繰り返しつつ徐々に進行し、5年生存率は約75%である。皮膚筋炎は多発筋炎と類似した臨床像を呈するが、ゴットロン徴候（指関節伸側で肥厚した紅斑）、ヘリオトロープ疹（上眼瞼の紫紅色の浮腫性紅斑）を伴うことを特徴とする。皮膚筋炎の悪性腫瘍合併頻度は約20%であり、多発筋炎と比べて2.1～6.5倍高い。女性では、乳癌・卵巣腫瘍、男性では肺癌・消化器癌・前立腺癌が多い。女性の悪性腫瘍合併率は男性の約2倍で、50歳以上は高い。

## 3. 検査所見

### 1) 血液生化学検査

活動期には血清CK値は正常値の約10倍に上昇し、ミオグロビン値も上昇する。アルドラーゼ、AST、ALT、LDH、%クレアチン尿（尿中クレアチン/尿中クレアチン+尿中クレアチニン）が上昇し、活動性の指標判定に有用である。

### 2) 筋電図

随意収縮時には、低振幅・短持続時間の運動単位、運動単位の早期動員（early recruitment）がみられる。刺入電位は亢進していることが多い。安静時には線維性収縮電位、陽性鋭波を認める。

### 3) 画像検査

急性期の骨格筋MRIは、STIR（Short TI Inversion Recovery）法および脂肪抑制T2強調画像では、病変は多巣性あるいはびまん性の高信号を示す。進行例は、筋萎縮およびT1強調画像で高信号を示す。

### 4) 筋生検

筋束内の周辺・筋線維の内部・血管周囲にCD8<sup>+</sup>T細胞やマクロファージの浸潤像、筋線維の変性と再生、結合織の増生を認める。特に皮膚筋炎では血管周囲の細胞浸潤が主体であり、筋束周囲萎縮が認められることが多い。

### 5) 自己抗体

抗Jo-1抗体は肺線維症の合併のある多発筋炎の50%、皮膚筋炎の20%に認められる。抗シグナル認識粒子（SRP）抗体は筋炎と心障害を伴う急性発症の重症皮膚筋炎および多発筋炎の5%に検出される。皮膚筋炎に特異的な抗Mi-2抗体は35%で検出され、抗

p155抗体は悪性腫瘍合併例で高率とされる。その他の膠原病を合併するオーバーラップ(重複)症候群では、抗PM-1抗体(強皮症)、抗Ku抗体(強皮症・全身性エリテマトーデス)、抗nRNP抗体(混合性結合組織病)が陽性となることがある。

#### 4. 診断

BohanとPeterの診断基準や皮膚筋炎・多発筋炎の改訂診断基準(厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成4年度研究報告, pp25-28, 1993)が汎用される。

#### 5. 治療方針

多発筋炎あるいは皮膚筋炎の確定診断後は、プレドニン®1~1.5 mg/kg/日を1~2ヵ月間連日投与する。筋力の改善、血清CK値の減少がみられれば2週間に10%の割合でプレドニン®を減量し、2~3年程度は維持療法を行う。筋症状は早期治療例ほど回復がよい。改善がないときは同量を1~2ヵ月間投与するか、ステロイドパルス療法を2~3クール行う(メチルプレドニゾン1g/回の3日間連続投与)。効果がない場合はメトトレキサート(メソトレキセート®, 5~25 mg/週, 経口あるいは筋肉内投与)、アザチオプリン(イムラン®, 50~100 mg/日, 経口投与)などを併用する。ステロイド、免疫抑制薬の無効例では、追加療法として免疫グロブリン療法を併用する。

#### 6. 治療のポイント

筋症状増悪時には筋炎の再燃か、ステロイドミオパチーの合併かの鑑別が重要であ

る。血清CK値上昇、筋電図で線維性収縮電位や陽性鋭波の出現頻度が上昇した場合には再燃を疑う。ステロイドミオパチーは、プレドニン内服を4週間以上続けた場合に発症し、下肢近位筋優位の筋力低下・筋萎縮を呈するが、顔面筋および頸部伸展筋は保たれ、血清CK値は低下する。

#### 7. 患者指導とリハビリテーション

急性期は等尺性収縮以外の運動は避ける。安定後は誤嚥性肺炎、廃用性筋萎縮、関節拘縮予防のための理学療法を早期に開始する。

謝辞：本稿の執筆にあたり貴重なご助言を頂いた国立病院機構東埼玉病院 神経内科 尾方克久先生、国立精神・神経センター病院 神経内科 大矢寧先生、同院 遺伝カウンセリング室 池上弥生遺伝カウンセラーに感謝します。

#### 文 献

- 1) Moxley RT 3rd, et al. : Practice parameter : corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy ; report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 64 : 13-20, 2005.
- 2) Bohan A & Peter JB : Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med*, 292 : 344-347, 1975.
- 3) Dalakas MC : Therapeutic targets in patients with inflammatory myopathies ; present approaches and a look to the future. *Neuromuscul Disord*, 16 : 223-236, 2006.

## 5. 骨格筋

骨格筋は傷害を受けると再生する（図1）。筋傷害シグナルにより骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞（muscle satellite cells）が活性化され、分裂・増殖し、やがてお互いに融合、あるいは既存の筋線維と融合して筋線維を再生する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy；DMD）等の重篤な遺伝性筋疾患に対して筋・幹細胞を移植する再生医療が期待されているが、その確立のためには、筋組織の再生がどのように制御されているかを理解することが重要である。

### a. 骨格筋衛星細胞

筋衛星細胞は筋基底膜と筋線維の間にある単

核の細胞で1961年にAlexander Mauroによって初めてその存在を記載された。通常、細胞周期のG0の状態にあるが、筋傷害時に活性化され、増殖して筋線維を再生する。生直後は骨格筋組織の中の核の30%程度が筋衛星細胞の核であるが、成体になると5%程度とほぼ一定になる。体幹と四肢の骨格筋の発生学的な起源は沿軸中胚葉由来の体節であり、その中に形成されるdermomyotomeに出現するPax3, Pax7陽性の筋前駆細胞（muscle progenitor cells）が増殖し、やがてMyf5, MyoD等の筋分化制御遺伝子を発現して筋芽細胞（myoblast）となり、次に増殖を止め、融合して、筋線維を形成する。筋衛星細胞はその過程で派生してく

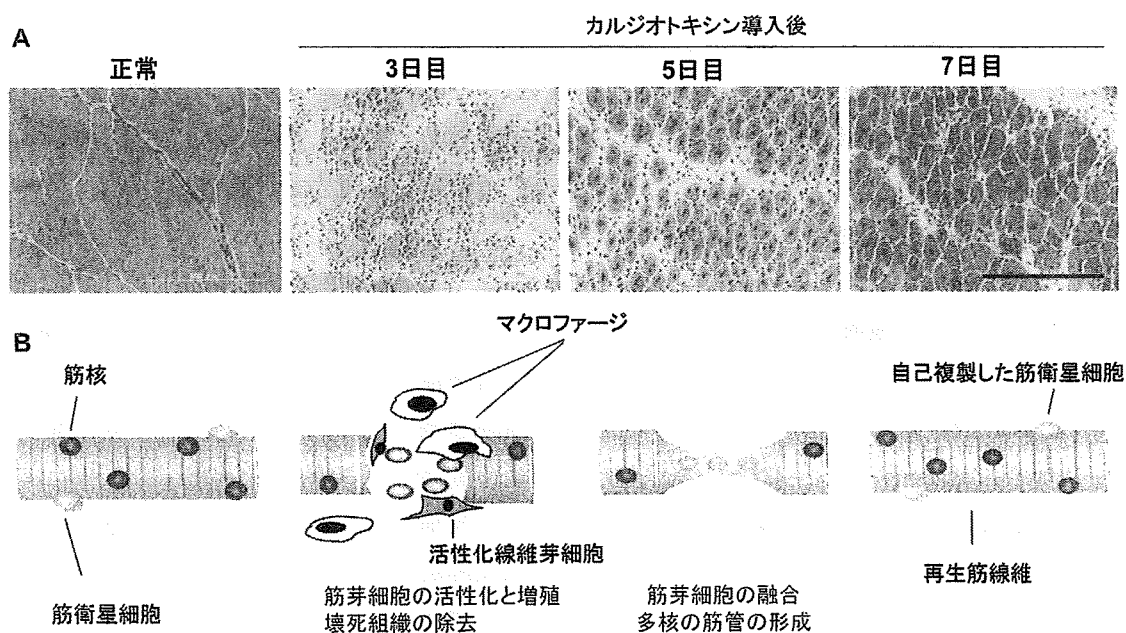


図1 骨格筋の再生

A) C57Bl/6 マウス骨格筋に蛇毒であるカルジオトキシンを導入して筋傷害を引き起こした後の組織修復過程を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。スケールバー：200ミクロン。

B) 骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞は、静止期状態では筋基底膜と筋線維の間に存在するが、筋傷害時には活性化し、増殖する（筋芽細胞）。やがてお互いに融合し、あるいは既存の筋線維と融合して筋再生が完了する。この過程には好中球やマクロファージ等による壊死組織の貪食機能が重要である。活性化した筋衛星細胞の一部は、元の筋衛星細胞の状態に戻る（自己複製）。

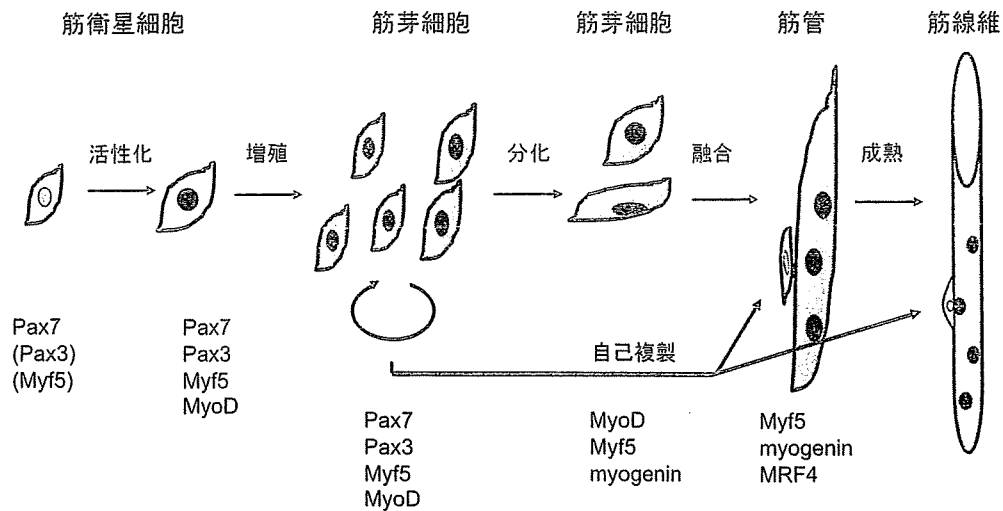


図2 筋衛星細胞の分化過程とその制御因子

筋衛星細胞の筋分化は、発生過程の筋分化と類似しているが、その維持には Pax7 が重要な働きを持つ。筋衛星細胞が不均等分裂により自己複製すると考えられているが、そのタイミングや制御分子に関しては不明な点が多い。

る。c-Met, Pax7, Myf5, M-cadherin, CD34 等が筋衛星細胞特異的マーカーとして知られているが、昨今の網羅的遺伝子発現研究等の結果、新しいマーカー（カルシトニン・レセプター、odz4 等）がリストに加わってきた。筋衛星細胞研究には実験動物の骨格筋から筋衛星細胞を高い純度で分離する方法が有用だが、従来は、線維芽細胞との培養皿への接着性の違いを利用した preplating 法、現在は各種細胞表面マーカーで染色しセル・ソーターで分離する方法が用いられている。筋衛星細胞は自己複製することで、一生涯にわたって筋再生能を維持する（図1, 図2）。その機構として不均等分裂が提唱されているが、その分裂様式、制御因子等、不明な点が残されている。

#### b. 筋衛星細胞の活性化, 増殖, 分化

骨格筋が傷害されると nitric oxide synthase (NOS) が活性化され、nitric oxide (NO) が産生され、hepatocyte growth factor (HGF; 肝細胞増殖因子) を活性化し、c-Met レセプターへ結合する。c-Met を介したシグナルが筋衛星細胞を活性化し、筋衛星細胞は活発に増殖する。筋衛星細胞の増殖能は分裂を繰り返す

と徐々に低下する。とくに筋ジストロフィー等の、筋変性・壊死、再生を繰り返す筋疾患では、筋衛星細胞の増殖能は徐々に低下し、筋再生が筋壊死に追いつかなくなり、筋線維が脱落し、筋力が低下していく。筋衛星細胞は筋細胞の他に脂肪細胞、骨細胞にも分化することが報告されているので、筋疾患の進行した段階で認められる脂肪変性や、徐々に筋組織の骨化が進行する進行性骨化性線維異形成症等の遺伝性の疾患の発症に関与する可能性がある。

#### c. 筋・幹細胞と再生医療

1990年代前半、近親者から得た筋衛星細胞を培養後、DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが、その効率は低かった。移植直後に多くの筋芽細胞が死んでしまうこと、移植後筋芽細胞があまり移動しないこと、免疫抑制が不十分であったこと等が原因であったと推察されている。1998年、骨髓細胞が筋線維へ分化し、さらに筋衛星細胞へ分化することが示され<sup>1)</sup>、造血幹細胞の可塑性との関連で、DMDへの治療応用が期待されたが、その筋線維再生への寄与率はわずかであり、またその分化機序は依然不明で、大部分は細胞融合に

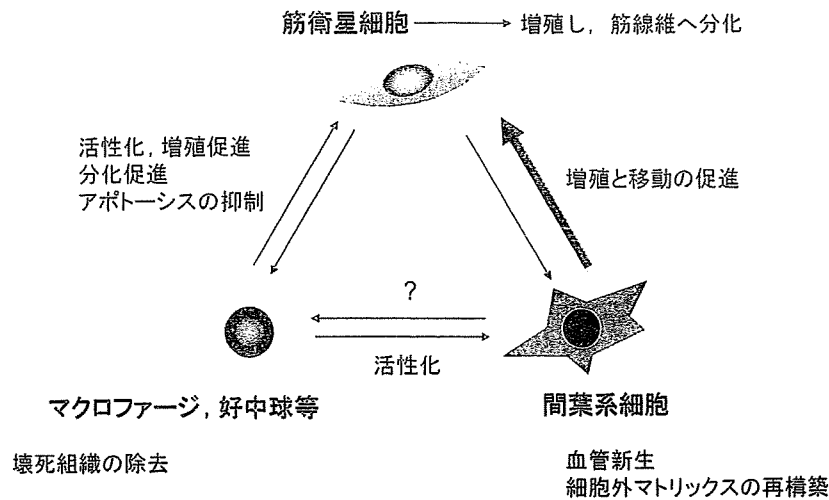


図3 筋再生を制御する細胞とそのネットワーク

筋再生過程では、筋前駆細胞である筋衛星細胞が中心的な役割を果たすが、その他に、壊死組織の除去を担うマクロファージ、好中球等が重要な細胞である。さらに間葉系細胞が間質に存在し、筋傷害時に活性化し、細胞外マトリックスの分解と再構築を促進し、血管新生を制御することで筋再生を制御している。これらの細胞は、直接相互作用する他に、サイトカイン等を介してお互いの活性化、増殖や移動、生存、分化を制御している。

よると思われた。しかし血中の AC133 陽性細胞は移植すると効率よく筋線維に分化するという報告もあり、循環している細胞の中に筋分化能を持つ特別な細胞が存在する可能性は否定できない。一方、骨格筋組織の間質や血管周囲にも、多能性を持ち、筋細胞へも分化する細胞が数多く報告されているが、これらの細胞の相互関係ははっきりしない。それらは、ヘキスト色素を排出する能力に富む side population 細胞 (SP cells)、血管周囲に存在するペリサイト (pericyte)、同じく血管組織に由来するメソアンギオブラスト (mesoangioblast)、muscle-derived stem cells、myo-endothelial cells 等である。数量的には筋衛星細胞が筋線維再生に最も寄与していることは広く認められているが、筋変性疾患に対する移植治療という観点では、移植後の生存率が低く、局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して、経動脈的、あるいは経静脈的に移植可能なこれらの多能性幹細胞の利用が期待されている<sup>2)</sup>。

#### d. 筋再生におけるマクロファージや線維芽細胞の役割

筋再生はさまざまな細胞間の相互作用によって完了する。なかでもとくに重要な細胞はマクロファージと間質の線維芽細胞様の間葉系細胞であろう (図3)。マクロファージは壊死組織の除去の他に、筋衛星細胞の活性化やアポトーシスの抑制、筋分化の促進等の機能があると考えられており<sup>3)</sup>、その機能不全で筋再生は障害される。間葉系細胞も筋再生時に活性化され、増殖し、MMPs 等のプロテアーゼを分泌し、細胞移動の促進、細胞外マトリックスの分解・再構築、血管新生、各種成長因子の活性化に関わっている。また、各種ケモカインを分泌しており、炎症細胞、免疫担当細胞の制御にも関わっていると思われる。間葉系細胞は *in vitro* でも脂肪細胞へ分化しやすい傾向を持ち、この細胞の機能低下や異常な活性化が、筋再生の遅延、筋組織の線維化、脂肪変性に関わっていると考えられるので、再生医療の良き標的である。

[鈴木友子, 武田伸一]



参考文献

- 1) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al : Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279(5356) : 1528-1530, 1998.
- 2) Boldrin L, Morgan JE : Activating muscle stem cells : therapeutic potential in muscle diseases. *Curr Opin Neurol* 20(5) : 577-582, 2007.
- 3) Arnold L, Henry A, Poron F, et al : Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204(5) : 1057-1069, 2007.

## Expression Pattern of *WWP1* in Muscular Dystrophic and Normal Chickens

Hirokazu Matsumoto<sup>1</sup>, Hideaki Maruse<sup>1</sup>, Shinji Sasazaki<sup>1</sup>, Akira Fujiwara<sup>2</sup>, Shin'ichi Takeda<sup>3</sup>, Nobutsune Ichihara<sup>4,5</sup>, Tateki Kikuchi<sup>3</sup>, Fumio Mukai<sup>1</sup> and Hideyuki Mannen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

<sup>2</sup> Laboratory Animal Research Station, Nippon Institute for Biological Science, Kobuchisawa 408-0041, Japan

<sup>3</sup> Department of Molecular Therapy and of <sup>4</sup> Animal Models for Human Disease, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo 182-8502, Japan

<sup>5</sup> Department of Anatomy I, School of veterinary medicine, Azabu University, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan

The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (*WWP1*) is classified into one of ubiquitin ligases which play an important role in ubiquitin-proteasome pathway. Previously, we identified the *WWP1* gene as a candidate gene of chicken muscular dystrophy by linkage analysis and sequence comparison. However, the mechanism causing pathological changes and underlying gene function remains elucidated. In the present study, we analyzed the *WWP1* gene expression in various muscles and tissues of normal chickens, and compared with those from muscular dystrophic chickens. Two mRNA isoforms were detected in all tissues examined and revealed almost equal expression level. The *WWP1* expression of dystrophic chickens was decreased in almost all skeletal muscles including unaffected muscles. These data indicate that there might not be a causal relationship between the alteration of *WWP1* expression level and the severity of muscular dystrophy.

**Key words:** chicken, expression analysis, fast twitch muscle fiber, muscular dystrophy, *WWP1*

*J. Poult. Sci.*, 46: 95–99, 2009

### Introduction

The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (*WWP1*) is classified into an ubiquitin ligase (E3) which plays an important role in ubiquitin-proteasome pathway (UPP) to degrade unneeded or damaged proteins (Scheffner and Staub, 2007). E3 recognizes and catalyzes ubiquitin (Ub) conjugation to specific protein substrates (Liu, 2004). Comparative genome analysis reveals few genes encoding E1, tens of E2 encoding genes and hundreds of E3 encoding genes (Semple *et al.*, 2003).

The *WWP1* gene is classified into HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus)-type E3 which possesses one C2 domain, multiple WW domains and one HECT domain (Pirozzi *et al.*, 1997; Flaszka *et al.*, 2002). The C2 domain binds to the cellular membranes in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Plant *et al.*, 1997) and mediates interactions with other proteins (Plant *et al.*, 2000; von

Poser *et al.*, 2000; Augustine, 2001). The WW domain has two conserved tryptophan residues and binds proline-rich region (Sudol *et al.*, 1985). HECT domain, similar to E2s structurally, has a cysteine residue as an active center that transfers the activated Ub from E2 onto first itself, and then onto its substrates (Jackson *et al.*, 2000).

The muscular dystrophies are the group of inherited diseases with progressive weakness and degeneration of skeletal muscle (Partridge, 1991). It is well known that abnormalities of muscle proteins linking sarcolemma and basal lamina lead to cause muscular dystrophies (Lisi and Cohn, 2007), but there are a number of muscular dystrophies and related diseases of which causes are still unknown. We identified *WWP1* gene as a candidate responsible for the chicken muscular dystrophy by the linkage analysis (Matsumoto *et al.*, 2007) and the sequence comparison between normal and dystrophic chickens (Matsumoto *et al.*, 2008). The R441Q missense mutation was found in *WWP1* gene to cause the phenotype of muscular dystrophy.

The *WWP1*s of human (Flaszka *et al.*, 2002; Komuro *et al.*, 2004), mouse (Dallas *et al.*, 2006) and *C. elegans* (Huang *et al.*, 2000) were intensively studied and known

Received: October 10, 2008, Accepted: December 24, 2008

Correspondence: Dr. H. Mannen, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan.

(E-mail: mannen@kobe-u.ac.jp)

that the *WWP1* gene is expressed ubiquitously, but strongly in liver, bone marrow, testis and skeletal muscles (Flasza *et al.*, 2002; Komuro *et al.*, 2004). In chicken, however, the *WWP1* expression has not been studied. The expression analysis of *WWP1* gene is important since it was reported that altered expression of known responsible gene could lead dystrophic phenotype (Smythe and Rando, 2006).

In this study, we analyzed the mRNA expression of *WWP1* in various skeletal muscles and other tissues of normal and dystrophic chickens by using Northern blotting and reverse transcription (RT)-PCR analysis to know the differences in the general expression pattern between them.

## Materials and Methods

### Chickens

A two-month-old dystrophic chicken (New Hampshire: NH-413) and an age-matched normal chicken (White Leghorn: WL-F) were used in this study. The New Hampshire (NH-413) strain is a homozygous dystrophic line introduced from University of California, Davis to Japan in 1976 (Kondo *et al.*, 1982). The disease in this strain is transmitted co-dominantly by a single gene, but the phenotype is modified by other background genes (Kikuchi *et al.*, 1981, 1987; Wilson *et al.*, 1979). The White Leghorn (WL-F) strain was established in 1970s, and maintained as closed colony in the Nippon Institute of Biological Science in Yamanashi, Japan. This study was carried out according to the guidelines of Animal Experimentation of Kobe University.

### Expression analysis

For Northern blotting, mRNAs were isolated from *M. pectoralis superficialis* (PS), *M. tensor fascia lata* (TFL), *M. biceps femoris* (BF), *M. triceps surae* (TS), *M. peroneus longus* (PL), heart (H), brain (B), liver (L), kidney (K) and whole embryo (E) with PolyATtract mRNA Isolation kit (Promega, Madison, WI, USA). The 2 µg of mRNAs, which were measured with NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), were resolved by 1.2% agarose gel electrophoresis in the presence of formaldehyde and blotted on to Hybond-N+ membrane (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The mRNAs were visualized using digoxigenin (DIG) reagents, and kits for non-radioactive nucleic acid labeling and detection system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the procedure specified by the manufacturer excepting that the washing was done with 4×SCC 0.1% SDS at room temperature for 10 min, 4×SCC 0.1% SDS at 40°C for 8 min and then 2×SCC 0.1% SDS at 40°C for 8 min twice. The DIG-labeled DNA probes were prepared by PCR using DIG-dUTP using pectorals cDNA sample of a WL-F strain female as a template. The primers applied in this procedure were 5'-tccctcataatgttgaaagcagaca-3' (*WWP1*p-F), 5'-gtaataaccaaggtaatatgtaaac-3' (*WWP1*p-R) (NM\_001012554), 5'-ccgtgtgcccaacccaatgtctctg-3'

(*GAPDH*p-F) and 5'-cagttctatcagcctctcccacctc-3' (*GAPDH*p-R) (NM\_204305). The PCR was done for 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec (*WWP1*) and for 35 cycles at 94°C for 30 sec, 63°C for 30 sec, 72°C for 30 sec (*GAPDH*) using TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara Bio Inc., Tokyo, Japan). Quantitative analysis was performed with Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

In order to analyze mRNA expression of *WWP1* gene in the PS, *M. anterior latissimus dorsi* (ALD) and H, RT-PCR method was applied. The concentration of cDNA derived from these muscles was calculated by NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) and comparable cDNAs were used as template. The primers applied were 5'-attaggaagagccactgtagact-3' (*WWP1*r-F) and 5'-tctgttgattgaggttctgtctgt-3' (*WWP1*r-R) (NM\_001012554). The PCR was done for 35 and 40 cycles at 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, 72°C for 30 sec using TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara Bio Inc.).

### Histology

The PS, ALD and H were snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and sectioned in a cryostat (Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan). The histopathology was made by hematoxylin-eosin staining (HE) method (Kikuchi *et al.*, 1981).

## Results

The mRNA expression of *WWP1* gene was detected by Northern blotting in various muscles and other tissues of normal and muscular dystrophic chickens (Fig. 1). Two bands were detected in all tissues examined, and revealed almost equally expression level in any muscles and tissues observed.

In the PS, BF, TS, PL, B and K, *WWP1* gene was strongly expressed in normal than in dystrophic chickens (Fig. 1). *GAPDH* was used as an internal control of *WWP1* expression analysis. In TFL, L and E, similar *WWP1* expression level was observed between two phenotypes (Fig. 1).

RT-PCR analysis indicated that *WWP1* gene was expressed in slow tonic ALD, not only in PS and H of both phenotypes (Fig. 2A). Figure 2B shows histopathological changes in PS, ALD and H of normal and dystrophic chickens. The pathological findings in dystrophic PS were characterized by the degenerating fibers with many vacuoles in cytoplasm, the fatty infiltration into connective tissue, and the proliferation of nuclei within muscle fibers with large variation in sizes. However, no such lesions were observed in ALD and H from age-matched dystrophic chickens (Fig. 2B).

## Discussion

Northern blotting with *WWP1* specific probe detected two bands in all tissues and muscles examined (Fig. 1). Northern blot analysis of *WWP1* expression in human tissues also exhibited two bands (Mosser *et al.*, 1998), and RT-PCR analysis showed that human *WWP1* gene had at

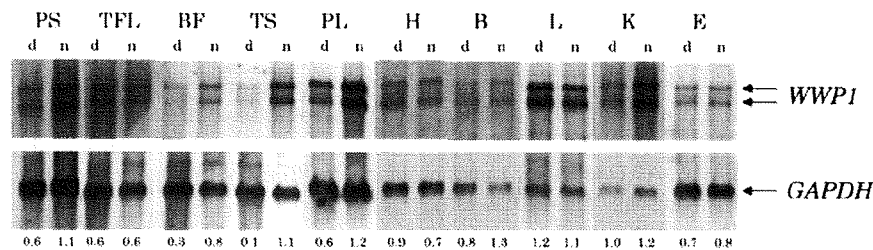


Fig. 1. Expression of chicken *WWPI* in various tissues.

A *WWPI* cDNA probe was used to detect *WWPI* mRNA transcripts by Northern blotting using blots containing 2  $\mu$ g of mRNAs from chicken muscles or various other tissues. *M. pectoralis superficialis* (PS), *M. tensor fascia lata* (TFL), *M. biceps femoris* (BF), *M. triceps surae* (TS), *M. peroneus longus* (PL), heart (H), brain (B), liver (L), kidney (K) and embryo (E) were analyzed. A doublet band is detected at variable levels in all tissues. "d" indicates mRNAs from dystrophic chickens. "n" indicates mRNAs from normal chickens. The numbers below the *GAPDH* bands represent the relative ratios of *WWPI*/*GAPDH*.

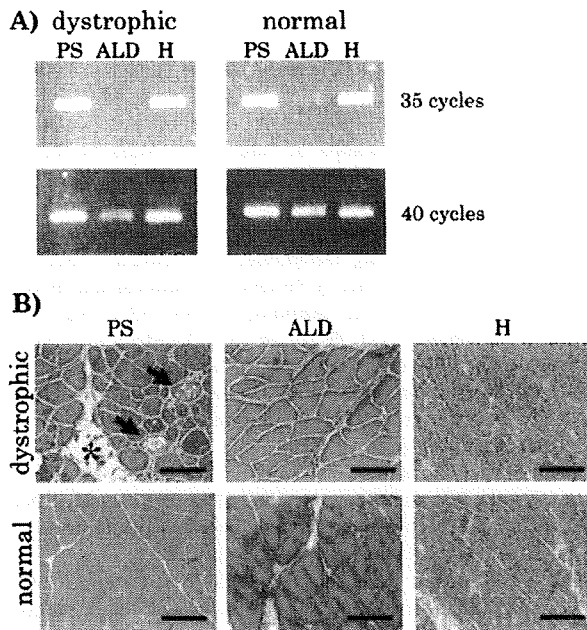


Fig. 2. RT-PCR detection of *WWPI* gene and histological analysis for three representative muscle types.

*M. pectoralis superficialis* (PS), *M. anterior latissimus dorsi* (ALD) and heart (H) expressed *WWPI* less in muscular dystrophic chicken, but only dystrophic PS was severely harmed. A) Expression of *WWPI* in PS, ALD and H was analyzed by RT-PCR method. PCR was performed for 35 or 40 cycles. B) The PS, ALD and H of dystrophic (NH-413) and normal (WL-F) chickens were analyzed with HE staining. Vacuoles (arrows) and fatty infiltration (asterisk) are observed in PS of dystrophic chickens. It is also remarkable that, in dystrophic PS, many muscle fibers have many nuclei in cytoplasm and vary widely in size. These pathological features are not observed in ALD and H of dystrophic chicken. Scale bar = 120  $\mu$ m.

least six mRNA isoforms synthesized through the alternative splicing, two of which were strongly expressed and commonly observed in various tissues (Flasza *et al.*, 2002). The mRNA doublet bands of chicken *WWPI* by Northern blot analysis might be equivalent to two bands of human tissues, while a single band was observed by RT-PCR analysis in chicken (Fig. 2A), suggesting that the amplified region does not include alternative spliced site. Flasza *et al.* (2002) also mentioned that the relative ratio of these isoforms from human *WWPI* varied in a tissue-specific manner, but the doublet bands of chicken *WWPI* were expressed almost equally in all tissues examined.

The *WWPI* gene expression in *M. pectoralis superficialis* (PS) of dystrophic chicken was less than that of normal chicken (Fig. 1). The PS of chicken is a fast twitch muscle composed of two types of fast twitch fibers (aW and bW). TFL, BF, TS and PL muscles from wing and leg are mixed muscles co-existing fast twitch (aW and bW) with slow twitch fibers (bR) in a mosaic pattern (Ashmore and Doerr, 1971a), except that the ALD and *M. adductor magnus* are composed of slow tonic fibers (ST) innervated multiply (Ashmore *et al.*, 1978; Kikuchi *et al.*, 1986). In chicken muscular dystrophy, fast twitch fibers are initially and most severely affected, while slow twitch and slow tonic muscles persist relatively harmless throughout the life span (Ashmore and Doerr, 1971b; Barnard *et al.*, 1982). The *WWPI* expression in dystrophic BF, TS and PL showed a similar downward trend as observed in dystrophic PS (Fig. 1). These data indicate that there might not be a causal relationship between the alteration of *WWPI* expression level and the severity of muscular dystrophy, since not only affected muscles but unaffected ones exhibited the same pattern. Moreover, the alteration of *WWPI* expression level was observed in other unaffected tissues, such as B and K, which reinforces our hypothesis that the alteration of *WWPI* expression levels