

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費

13公－1

# 遺伝性筋疾患に対する 分子治療の基盤研究

総括研究報告書  
(平成13年度～平成15年度)

平成16年3月

主任研究者 武田伸一

# 目 次

## \*総括研究報告

主任研究者 武 田 伸 一

## I. 遺伝性筋疾患に対する遺伝子治療

- 1) AAVベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入法並びにAAVベクター作製法  
に関する検討 ..... 11  
自治医科大学医学部 分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部 小 澤 敬 也
- 2) アデノ随伴ウイルスベクターを用いたDuchenne型筋ジストロフィーに対する  
遺伝子治療の開発に関する基盤的研究 ..... 14  
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 武 田 伸 一
- 3) 代謝性筋疾患に対する分子治療の基盤研究 ..... 21  
国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部 辻 野 精 一
- 4) 非ウイルスベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入及び発現法の開発に関する研究 ... 25  
大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝子治療学 金 田 安 史
- 5) 筋ジストロフィー治療を目指した遺伝子デリバリー用DDSの開発 ..... 28  
京都大学大学院 薬学研究科 西 川 元 也
- 6) RNAiを用いた疾患モデル動物の作出に向けた基礎的研究 ..... 32  
—C2C12細胞を用いたRNAi誘導とその効果—  
国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部 北 條 浩 彦

## II. 幹細胞を用いた移植治療法の開発

- 7) 骨格筋組織幹細胞移植治療に関する基礎的研究 ..... 39  
三菱化学生命科学研究所 幹細胞研究ユニット 橋 本 有 弘
- 8) 筋ジストロフィーの骨髄移植による治療法の開発的基礎研究 ..... 42  
大阪大学大学院 薬学研究科 細胞生理学分野 山 元 弘
- 9) 造血組織に由来する筋幹細胞の同定と生着に関する研究 ..... 46  
京都大学大学院 医学研究科 発達小児科 平 家 俊 男
- 10) 成体幹細胞を用いた心筋再生による心不全治療法の確立 ..... 49  
慶應義塾大学 医学部 心臓病先進治療学 福 田 恵 一
- 11) ES細胞を用いた筋ジストロフィーの治療法の確立及び  
血管におけるジストロフィンの機能解析 ..... 53  
熊本大学 医学部 附属病院 発達小児科 木 村 重 美

### Ⅲ. 分子病態に基づく治療法の開発

- 12) ミトコンドリアの病態制御と家族性筋萎縮性側索硬化症の分子治療法開発 ..... 63  
大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態学 井上 正 康
- 13) ミトコンドリア脳筋症の分子治療に関する基盤研究 ..... 66  
国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第二部 後藤 雄 一
- 14) ミトコンドリアを標的するリポソームベクターの基礎的研究 ..... 70  
自治医科大学 医学部 生化学 遠藤 仁 司
- 15) ジストロフィン欠損筋細胞で発現変動する分泌性タンパク質群の機能解析 ..... 76  
財団法人 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 腫瘍生化学研究部門 原 孝 彦
- 16) ヒト筋マイクロアレイの開発とそれを用いた筋疾患の分子病態の解明 ..... 81  
北陸先端科学技術大学院大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター 塚原 俊 文

### Ⅳ. 筋ジストロフィーを中心とした新たなモデル動物の開発

- 17) 核移植技術を用いたマウスES細胞由来個体の作出 ..... 89  
近畿大学 農学部 角田 幸 雄
- 18) 新しいモデル動物作成法の開発による遺伝性ヒト疾患の病態解析 ..... 92  
京都大学大学院 医学研究科 病理系腫瘍生物学講座 鍋島 陽 一
- 19) 筋ジストロフィー関連モデル動物の生産・供給システムの検討 ..... 98  
財団法人 実験動物中央研究所 日置 恭 司
- 20) 遺伝子改変マウスを用いた神経・筋疾患モデルの作出 ..... 102  
岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 形質転換生物研究施設 笹岡 俊 邦
- 21) 遺伝性筋・神経疾患モデルマウスにおける高次脳機能障害についての研究 ..... 104  
—Dystrophinの中枢における役割の検討—  
国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部 関口 正 幸
- 22) 実験動物としての筋ジストロフィー犬の研究 ..... 108  
—生殖工学技術を用いた繁殖及びコロニーの維持について—  
財団法人 実験動物中央研究所 谷岡 功 邦
- 23) 筋ジストロフィーモデル犬における健康管理と病態解析 ..... 111  
国立精神・神経センター 神経研究所 実験動物管理室 高橋 明 男

**V. 遺伝子医療に関する社会医学的研究**

24) 筋ジストロフィー患者の遺伝子医療に対する知識と態度の検討 ..... 121  
-2070名へのアンケート調査及び31名への聞き取り調査の結果-

社団法人日本筋ジストロフィー協会 貝谷久宣

**Summary** ..... 129

**研究者一覧表** ..... 133

# 総括研究報告

主任研究者 武田 伸一

## 【研究目的】

当研究班は「遺伝子性筋疾患の根本治療への基盤研究 (10公-1)」の成果を受けて、原因遺伝子の追求と病態解明が進んでいる遺伝子性筋疾患に対して、根治的な治療法を確立するために、設立された。当研究班の研究目標を以下に示す。

1. 遺伝性筋疾患に対する遺伝子治療を確立する
2. 骨髄および骨格筋そのものから骨格筋細胞系譜の幹細胞を得て、効率の高い移植法を確立する
3. 分子病態の解明を前提とした新たな発想に基づく治療のための方法論を開発する
4. 治療法を臨床に応用するために、筋ジストロフィー犬を中心としたモデル動物を開発する
5. 遺伝子医療に関する社会医学的研究

以上の目標を達成するために、(10公-1)の構成班員を中心として、全国から優れた研究戦略を持つ研究者を選抜し、総員24名の班員構成とした。3年間の特筆すべき研究成果として、マウスモデルに対して遺伝子治療の方法が確立したこと、筋ジストロフィーの新たなモデル動物として筋ジストロフィー犬のコロニーを確立し、同犬の飼育・実験施設を立ち上げたことが特記される。

## 【研究組織】

主任研究者

武田 伸一 国立精神・神経センター

分担研究者

井上 正康 大阪市立大学大学院  
遠藤 仁司 自治医科大学医学部  
小澤 敬也 自治医科大学医学部  
貝谷 久宣 財団法人日本筋ジストロフィー協会  
金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科  
菊池 建機 国立精神・神経センター (13年度)  
木村 重美 熊本大学大学院医学薬学研究部  
後藤 雄一 国立精神・神経センター  
斎藤 (小原) 深美子 東京医科歯科大学 (13年度)  
笹岡 俊邦 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所  
鈴木 聡 日本医科大学医学部 (~14年度)  
関口 正幸 国立精神・神経センター  
高橋 明男 国立精神・神経センター

谷岡 功邦 財団法人実験動物中央研究所  
塚原 俊文 北陸先端科学技術大学院大学  
辻野 精一 国立精神・神経センター  
角田 幸雄 近畿大学農学部  
鍋島 陽一 京都大学大学院医学系研究科  
西川 元也 京都大学大学院薬学研究科 (15年度)  
橋本 有弘 三菱化学生命科学研究所  
原 孝彦 東京都臨床医学総合研究所  
日置 恭司 財団法人実験動物中央研究所  
福田 恵一 慶応義塾大学農学部  
平家 俊男 京都大学大学院医学系研究科 (14年度~)  
北條 浩彦 国立精神・神経センター (15年度)  
三好 浩之 理化学研究所筑波研究所 (14年度)  
山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科

## 【研究成果】

### 1. 遺伝性筋疾患に対する遺伝子治療法の確立

ジストロフィン欠損による筋ジストロフィー及びacid maltase欠損症などの代謝性筋疾患を主たる対象として、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター等を用いた研究及びウイルスベクターを用いない plasmid あるいは RNAi による研究が行われた。(武田, 小澤, 金田, 鈴木, 辻野, 西川, 北條)

#### a) AAVベクターを用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療法の開発

AAVベクターは抗原性が低く、骨格筋における長期間安定した発現が期待されている。しかし、導入遺伝子の長さ制限があるため、第一年度の研究で transgenic mouse の手法を用いて、小型でしかも十分な機能を持つ micro-dystrophin 遺伝子の開発研究が行われた。第二年度には、AAVベクターによる遺伝子導入に伴う免疫応答が ubiquitous な CMV プロモーターではなく、骨格筋特異的な MCK プロモーターを利用することによって軽減することを明らかにした。第三年度には、筋ジストロフィーの表現型を改善する能力を持つ CS1 micro-dystrophin を組み換えた AAV-MCK- $\Delta$ CS1 を作製し、*mdx* マウス骨格筋に導入したところ、24週に及ぶ micro-dystrophin の発現が確認された。しかも、筋ジストロフィーの症状が既に発症している5週齢のマウス骨格筋に導入した場合でも、ジストロフィンの陽性線維では

中心核線維の比率が低下し、単位面積当たりの張力も増加していた。さらに、興味深いことには、筋ジストロフィーの症状が発症する以前の10日齢マウス骨格筋に導入した場合には、micro-dystrophinの陽性線維の比率は20%以下であるにもかかわらず、筋張力の正常化が観察され、その背景として、micro-dystrophin陽性線維の選択的肥大が検出された。さらに、Beagle種の筋ジストロフィー犬のコロニーを確立した国立精神・神経センターの中型実験動物研究施設において、筋ジストロフィー犬骨格筋に対してAAVベクター遺伝子導入を行ったが、筋ジストロフィー犬あるいはその正常対照犬骨格筋に導入した場合でも、過剰な免疫応答が誘導され、導入遺伝子産物の発現が短期間に留まることが判明した。イヌ骨格筋から準備した初代骨格筋培養細胞に対しては、AAVベクターの感染性はむしろ高い結果を得た。イヌ骨格筋への導入でも免疫抑制剤の使用により、不完全ながら、免疫応答が抑制され、導入遺伝子産物の長期間発現が観察された。しかし、AAVベクターを用いた方法論をヒトに対して応用するためには、免疫応答現象の背景の解明とその抑制法の確立が求められている。

#### b) AAVベクターの新たな血清型の開発

AAVベクターについては、血清型により組織における遺伝子導入発現効率が異なることが知られていた。そこで、5種の血清型AAV1-, AAV2-, AAV3-, AAV4-, AAV5-を用いてLacZ遺伝子をサル骨格筋へ導入した結果、AAV1-LacZ及びAAV5-LacZの発現効率が高いことが明瞭になった。一方、平成15年度の班会議に特別講演して頂いた米国ワシントン大学のチェンバーライン教授は、AAV6ベクターを用いるとマウスの尾静脈経由で全身の骨格筋と心筋に対する遺伝子導入が可能との驚くべき結果を発表された。今後dystrophin, Acid maltase等疾患モデルに対する治療用遺伝子に応用されることが期待される。

## 2. 幹細胞を用いた移植治療法の開発

骨格筋は強い再生能力を持つ器官である。再生能力の源泉は、これまで基底膜と筋形質膜には含まれて存在する筋衛星細胞のみに求められていた。ところが、筋衛星細胞を培養して筋ジストロフィー(DMD)患児に移植を行っても、その効果は明瞭でなかった。そこで骨髄等に存在する筋細胞系譜の幹細胞が注目されるようになった。筋ジストロフィー等の遺伝性筋疾患に対して幹細胞移植を用いる最大の利点は、経静脈的投与により、全身の骨格筋に効果が期待できることにある。(木村, 橋本, 福田, 山元, 武田, 平家, 三好)

#### a) 骨髄SP細胞の筋細胞への分化

幹細胞移植を用いた遺伝性筋疾患に対する治療法の限界の一つは、その効率が低いことにある。そこで、幹細胞を濃縮する方法として骨髄細胞からHoechst dyeとセルソーターを用いてSP分画を得た。SP細胞は放射線を照射したmdxマウスに移植すると、骨格筋に分化すると共に、造血系を再構築することが判明している。SP細胞を単独でin vitroで培養しても、筋細胞に分化させることができなかった。ところが、SP細胞を単一筋線維培養法を用いて筋衛星細胞と共に共培養すると筋細胞に分化させることができた。注目されることとして、造血能力のある骨髄や胎児肝のSP細胞は、共培養系で筋細胞に分化することができたが、骨髄の非SP細胞分画や、造血能力のない新生児肝細胞は、筋細胞への分化能力を持たなかった。一方で、骨髄SP細胞であれば、血球系であっても、非血球系であっても、筋細胞に分化することが観察された。筋細胞に分化しうる細胞は共通した細胞表面の性質を有すると考えられるが、さらに分子機構の研究を進めることで幹細胞が筋細胞に分化する効率を高める方策を見出すことが期待される。

#### b) 骨格筋衛星細胞

筋衛星細胞と筋再生の関連はよく知られているが、これまで筋衛星細胞にはよい分子マーカーがなかった。そこで山元班員は、静止期筋衛星細胞のみを認識するモノクローナル抗体を得るべく、研究を開始した。その結果得られた抗体の一つ2C/6は、ほぼ静止期の筋衛星細胞のみを認識していた。そこで次に同抗体とセルソーターを用いて筋衛星細胞のみを集め、DNA chipを用いたexpression profileの検討を行っている。

## 3. 分子病態に基づく治療法の開発

分子遺伝子の進展は、多くの疾患の遺伝学的な背景を明らかにしたが、これらの原因遺伝子産物の機能を前提とした分子病態研究は従来とは異なる発想の治療研究を可能にしている。(後藤, 関口, 井上, 遠藤, 原, 塚原)

#### a) 筋ジストロフィー細胞株における遺伝子発現

遺伝性筋疾患の病態を解明するために、ジストロフィンを欠損する筋細胞株(mdx-sm)と正常(B10-sm)に加えて、Duchenne型あるいはBecker型と診断された患者は検筋からも細胞株を樹立した。両者を詳細に比較検討したところ、mdx筋及びDMD/BMD筋で共通して発現低下している未知の遺伝子(分泌性セリンプロテアーゼ様分子)とmdx筋でのみ発現増加している9種類の遺伝子(Thymosin  $\beta$ 4, Osteopontin, PC3など)が見出された。

#### b) ヒト筋 cDNA マイクロアレイの開発

筋ジストロフィーに関しては、細胞膜、基底膜関連のタンパク質の他、核膜関連タンパク質、細胞質に存在する酵素群、糖鎖修飾タンパク質など多岐にわたる分子が関与している。そこで筋ジストロフィーに共通する病態像及び個々の病型を特徴付ける病態像を明らかにするために、ヒト筋 cDNA マイクロアレイの開発を行った。これまでにヒト骨格筋に発現する 3,500 種類の遺伝子発現を解析することが可能になった。6 例の DMD 生検筋を分析した結果では、壊死変化の増加あるいは重症例ないし、軽症例であるのかによって、遺伝子発現のプロファイリングが異なることが判明した。すなわち、患者生検筋を用いた分子病理的研究が可能になったといえる。

#### c) ジストロフィン欠損による中枢神経障害

ジストロフィン欠損による Duchenne 型筋ジストロフィーでは、約 50% の例で知能低下を認めることはよく知られているが、基質的な病変は認められず、その分子病態は明らかでない。関口班員は、*mdx* マウスをモデルとして研究を行い、同マウスをモデルとして研究を行い、同マウスは学習・記憶機構に障害はなく、運動性も保たれていたが、情動行動に異常があることを初めて明らかにした。

### 4. 筋ジストロフィーを中心とした新たなモデル動物の開発

筋ジストロフィーを中心とする遺伝性筋疾患では、分子遺伝学の進歩により明らかにされた原因遺伝子についてはノックアウトマウスの作製もほぼ出そろっている。しかし、それらは embryonic lethal であったり、軽症であるために必ずしも病態・治療モデルとして適切ではない。そこで、核移植技術、RNAi など新たな方法論の下にモデル動物を開発する必要がある。特に、ジストロフィン欠損の *mdx* マウスに対して重症で進行性の経過を辿る筋ジストロフィー犬を中心とした開発研究を行った。(笹岡、高橋、谷岡、角田、鍋島、日置)

#### a) 筋ジストロフィー犬

平成 13 年 11 月から、国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、筋ジストロフィー犬の飼育が開始され、同 14 年 6 月からは、同施設内での繁殖も開始された。特に同 15 年 6 月から、人工授精による繁殖が可能になったことから、Beagle 犬を base にした筋ジストロフィー犬の colony は確立したと考えている。筋ジストロフィー犬は骨格筋障害を呈することはもちろんであるが、早期から心電図上 II, III, aVf 誘導の深い Q 波を呈し、しかも 8-10 ヶ月齢を中心に突然死が観察された。DDMD の療育においても、人工呼吸器の発達により呼

吸不全死が減少し、心不全死が増加していることから、筋ジストロフィー犬の心筋障害の分子病態を解明し、新たな治療法を開発することが期待される。そこで、筋ジストロフィー犬の心臓について継続的な病理学的検討を行った。その結果、心電図変化に見合う左室の線維化は観察されず、4 ヶ月齢から刺激伝導系である Purkinje 線維の選択的空胞変性が検出された。電子顕微鏡を用いた超薄切片の検討では、空胞に一致した膜構造は観察されず、断裂した myofibril と変性した mitochondria が検出されたことから、空胞は myofibril の崩壊を反映していると考えた。さらに筋ジストロフィー犬の Purkinje 線維には全長型のジストロフィンの発現は欠くが、C 型の分子種が検出された。そこで、micro dissection 法を用いて、患犬の Purkinje 線維のみを集積し、Western blot 法を用いて検討したところ、同 Purkinje 線維のみに Dp71 が検出された。同 Purkinje 線維の膜で  $\mu$ -calpain の発現増加を認めたことと考え併せると、Dp71 の発現が膜での Ca-channel の活性化を引き起こし、それが  $\mu$ -calpain の膜への translocation を引き起こしている可能性がある。今後、ジストロフィンの欠損がなぜ Purkinje 線維の選択的障害を引き起こすのか、また、Purkinje 線維の障害により、どのような電気的異常を生ずるのか、検討することが重要である。

#### b) 核移植技術の応用

マウス ES 細胞から安定してマウス個体を作成するため核移植技術の確立を試みた。ES 細胞由来の核移植を行った場合、桑実胚、胚盤胞への発生率、着床率は比較的高いが、産子数は少なく、しかも出生後すぐに死亡する傾向にあった。

### 5. 遺伝子医療に関する社会医学的研究 (貝谷)

日本筋ジストロフィー協会を中心として、筋ジストロフィー患者、家族に対する広範なアンケート調査が行われた。今年度はその結果を詳細に解析したが、筋ジストロフィー患者家族の 79% は、自分たちの病気が遺伝子の変異によるものであり、71.2% は遺伝子診断ができることを知っていた。しかし、実験段階でも遺伝子治療を受けたいと思う人は 21.0% に留まっており、受けたくないと回答した 23.7% を下回っていた。

# I. 遺伝性筋疾患に対する遺伝子治療

# AAVベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入法 並びにAAVベクター作製法に関する検討

小澤 敬也\*

研究協力者 水上 浩明\*, 卜部 匡司\*, 岡田 尚巳\*, 松下 卓\*, 久米 晃啓\*

## 【緒言】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは非病原性ウイルスに由来することから安全性が高く、しかも骨格筋・心筋への遺伝子導入効率に優れているなど、現時点での遺伝子導入法としてはほぼ理想的な性質を備えている。本研究では AAV ベクターを用いる方法の実用化を念頭に置き、筋細胞への遺伝子導入法において利用するベクターキャプシドの血清型・プロモーター・エンハンサーなどにつき好適な条件を探索すると共に、動物個体レベルにおける導入遺伝子の長期的な発現及び宿主側の反応に関して検討を加えた。一方、ベクター産生系に関する進歩としては、従来行ってきたパッケージング細胞株に関して引き続き検討を行うと共に、全く新しい方法としてバキュロウイルスを用いる作製法を開発し、需要が増大している各血清型ベクターの効率よい産生に向けて原型である 2 型のシステムを改変した。

## 【方法】

### 1) 血清型に関する検討

AAV の 1 型から 5 型までのベクター作製システムに関しては、供与を受ける、もしくは 2 型ベクターの作製システムを本研究室において改変するなどによって準備した (表 1)<sup>1)</sup>。各血清型のキャプシドによる効果を比較する目的で、CMV プロモーターを用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal)、マウスエリスロポエチン (Epo) 及びヒト型凝固第 IX 因子を発現する AAV ベクターを各々構築・作製した。AAV-LacZ 及び AAV-Epo 筋注群では 4 週齢の C57BL/6J マウスを用い、前脛骨筋に  $1 \times 10^{11}$  ゲノムコピー相当のベクターを注入した。AAV-LacZ 筋注群については、注入 2 週間後に当該筋組織を摘出し、組織標本における X-Gal 染色及び筋組織における  $\beta$ -Gal 活性の測定を行った。また、AAV-Epo 筋注群では 2 週間毎に採血し、血中 Epo 濃度及び血液学的指標を追跡した。

ヒト型凝固第 IX 因子を搭載したベクター (AAV-FIX) は 4 週齢の SCID マウスを用いて前脛骨筋に  $1 \times 10^{11}$  ゲ

ノムコピー相当のベクターを注入し、長期にわたる発現と骨格筋に与える影響につき評価した。なお、動物実験計画は自治医大動物実験指針規定などに沿って動物倫理面を含めて審議され、承認を受けている。

AAV の血清型一覽

	発見	ベクター 開発	2型との 相同性	由来	レセプター	主な標的組織
1型	1965	1999	中等度	サル	不明	骨格筋、その他
2型	1966	1982	—	ヒト	ヘパラン硫酸	神経
3型	1966	1996	高い	ヒト	不明	神経
4型	1966	1997	低い	サル	sialic acid $\alpha$ 2-3 (O)	脳室上衣
5型	1984	1999	低い	ヒト	PDGF receptor	気道上皮、神経
6型	1998	1999	中等度	AAV-1 + AAV-2	不明	AAV-1 と酷似
7型	2002	2002	中等度	サル	不明	骨格筋
8型	2002	2002	中等度	サル	不明	肝臓

表 1

これまでに報告された AAV の各血清型につき主な知見を抜粋した。各々の血清型のレセプター及び組織特異性に関して情報が集積しつつある。

### 2) ベクター作製システムに関する改良

パッケージング細胞株の樹立では、従来用いてきた Cre-loxP システムを更に改良し、それぞれ独立して発現制御が可能である野生型及び変異型の loxP システムを用いて、AAV の cap 遺伝子及び rep 遺伝子の発現誘導可能なプラスミドを構築した<sup>2)</sup>。これら 2 種類のプラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、クローンを選択した。これらのクローンは増幅した後、10cm ディッシュを用いてパッケージング能力を検討した。検討に際しては、LacZ 発現プラスミドをトランスフェクションした上で Cre 発現アデノウイルスベクターを感染させることで、LacZ 遺伝子を搭載した AAV ベクターを産生させ、ベクター産生量については DNA ドットプロット法を用いて定量した。

また、バキュロウイルスを用いる AAV ベクター作製法としては、2 型のベクターを作製するシステムを土台とし<sup>3)</sup>、特に需要の多い 1 型及び 5 型のベクター作製

\*自治医科大学医学部分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部

