

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

システムに関する基礎検討を行った。即ち、既に作製済みの AAV2 の Rep, VP をそれぞれ発現する組換えバキュロウイルス bacRep2, bacVP2, 2 型 ITR の間に GFP 遺伝子を組み込んだ bacGFP2 以外に, AAV1 の VP を発現する bacVP1, また, AAV5 の Rep, VP をそれぞれ発現する bacRep5, bacVP5, ならびに 5 型 ITR の間に GFP 遺伝子を挿入した bacGFP5 を作製した。AAV1 を作製するには bacGFP2, bacRep2, bacVP1 を, AAV5 を作製するには bacGFP5, bacRep5, bacVP5 を組み合わせ, それらを浮遊培養系の昆虫細胞に感染させた。回収した AAV ベクターはセシウム密度勾配超遠心法により精製濃縮した。また, 293 細胞を用いた従来法で作製した AAV ベクターと, 遺伝子導入効率の比較検討を行った。

### 【結果】

LacZ 遺伝子発現効率と AAV の血清型との関係を比較検討したところ, 筋標本の X-Gal 染色では, 1 型及び 5 型において最大の発現が認められ, 2・3・4 型で

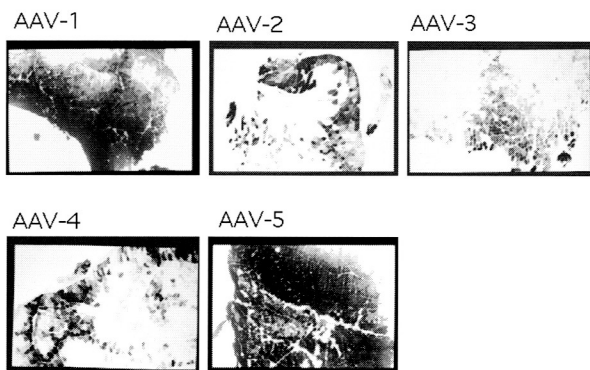


図1 各血清型 AAV ベクターを用いた筋肉への LacZ 遺伝子導入: X-Gal 染色  
4 週齢の C57BL/6J マウス前脛骨筋に脚当たり  $3 \times 10^{10}$  ゲノムコピー相当のベクターを注入し, 2 週間後に当該筋組織を摘出, 組織標本で X-Gal 染色を行った。

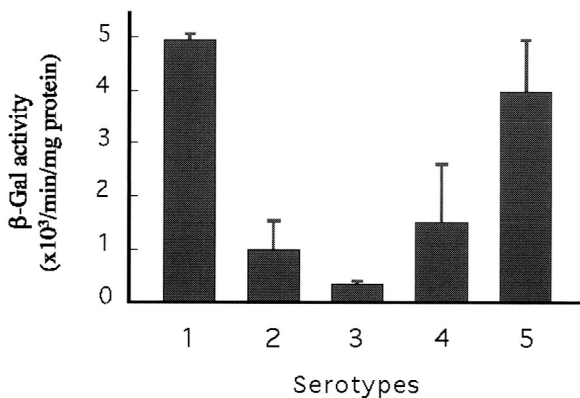


図2 各血清型 AAV ベクターを用いた筋肉への LacZ 遺伝子導入:  $\beta$ -Gal 活性  
図1で用いた筋組織と同様の標本における  $\beta$ -Gal 活性の測定結果。ベクターと同時に注入した色素の分布から注入の中心部付近を選定し, 脚当たり3箇所を標本を用いて比較を行った。X-Gal 染色で得られた視覚的印象と良く相関する結果が得られた。

は従来の 2 型における結果とほぼ同等の発現を示した (図 1)。 $\beta$ -Gal 活性の測定結果も同様の成績を示した (図 2)。いずれの筋標本においても明らかな組織障害像や細胞浸潤などは認められなかった。

Epo 発現と AAV の血清型との比較検討では, 血中の Epo 濃度は 1 型が最も高く, 5 型がこれに次ぎ, 残りはいずれも 2 型と同程度であった (図 3)。血液学的指標についてはいずれの群においても著明な赤血球増加が引き起こされ, 群間の統計学的有意差は認められなかった。また 4 ヶ月までの観察期間中, いずれの血清型のベクターを用いた場合にも血清 Epo 濃度及び血液学的指標は高値を維持した。

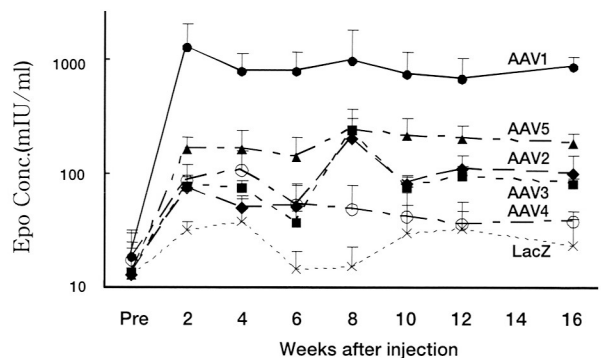


図3 各血清型由来 AAV ベクターを用いた筋肉への Epo 遺伝子導入  
4 週齢の C57BL/6J マウスの左右前脛骨筋に対して脚当たり  $3 \times 10^{10}$  ゲノムコピー相当のベクターを注入し, Epo 血中濃度を長期にわたり観察した。

SCID マウスにおける各血清型の比較においても 1 型を用いた場合が最良であり, 第 IX 因子では 200 ng/ml に達する血中濃度が得られ, 5 型ではおよそ 10 ng/ml レベルでこれに次ぎ, その他の血清型の場合には更に低かった。また, いずれの場合にも投与後 10 週間の観察期間にわたってほぼ一定の血中濃度を保っていた。1 型を用いた場合につき 1 年間追跡したが, 第 IX 因子の血中濃度はほぼ同じレベルで推移した。また, 1 年後の骨格筋を解析したが, 組織障害などは認められず, 免疫染色においても導入遺伝子の発現が確認された。

パッケージング細胞株の樹立に向けた検討では, 選別したクローンの中から AAV ベクターの産生効率が良いものが見出された。最高のものでは 10cm ディッシュあたり  $2.0 \times 10^{10}$  のベクター産生が観察された (図 4)。4 週間後の検討によってもこの産生量はそれほど低下せず, このクローンは比較的安定した産生株になっているものと考えられた。また, バキュロウイルスを用いた検討では, AAV 1 及び AAV 5 由来のベクター産生効率は, AAV 2 ベクターの場合とほぼ同様に 100 ml の培養で  $10^{13}$  ゲノムコピーに相当するベクターが産生可能であった。293 細胞, Cos 細胞, 骨格筋などへの遺伝子

導入効率については、昆虫細胞で作製したAAVベクターと従来法で作製したものとの間で特に違いは認められなかった。

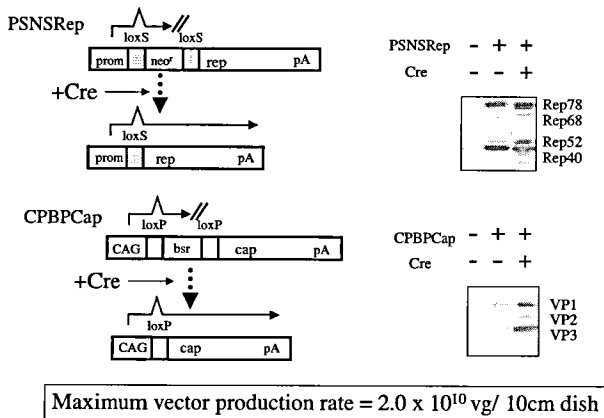


図4 AAVベクターパッケージング細胞株の樹立に向けた戦略

Cap発現プラスミド (CPBPCap) においては、そのままではCAGプロモーターによりプラストサイジン耐性遺伝子が発現する。そこにCreリコンビナーゼを作用させると、2カ所のloxP間の配列が失われ、CAGプロモーターがcap遺伝子を発現させるようになる。一方、Rep発現プラスミド (PSNSRep) においては、未処置時にはp5プロモーターによりneo耐性遺伝子が発現するが、Creリコンビナーゼの作用によりloxS (変異loxP) 間の配列が外れ、Repが発現するに至る。両者のプラスミドを安定して保持する細胞株を選択することで、効率の良いAAVベクターパッケージング細胞株が樹立された。

### 【考察】

骨格筋を標的としてLacZ, エリスロポエチン及び凝固第Ⅸ因子遺伝子を導入し、血清型の比較を行った。その結果、いずれの遺伝子を用いた場合にも1型由来するキャプシドを用いることで他を大きく凌駕する効果が得られた。LacZ遺伝子を用いた場合には5型を用いても高い効果が得られたが、β-Galは筋組織内に蓄積すること、1型と5型のいずれの場合にも組織が強度に青染していることから酵素活性が飽和しているために違いが出にくかったものと考えられる。一方、エリスロポエチン及び凝固第Ⅸ因子を用いた場合にはほぼ同様の傾向が認められ、血中への分泌などに関しては問題がなかったものと考えられた。1年間の観察によっても組織に対する影響がなく、高い発現が持続していることから、安全性に関して問題がないものと思われ、様々な応用が期待できる。

AAVの作製系としてはこれまで様々なパッケージング細胞株が報告されてきているが、実用レベルとして広く使われるに至ったものはない。今回我々の樹立した細胞株は以前野生型のloxPシステムを利用して樹立した細胞株に比べて30倍程度高い産生効率を有しており<sup>50)</sup>、トランスフェクション法を用いた場合に迫る値を得ることができた。しかしながら、実際の作業効率

はバキュロウイルスを用いる方が遙かに容易であり、今後ヒトへの応用などで更に大量のベクターが必要になることを考えると、後者の方法は極めて魅力的と思われる。

### 【結論】

AAVベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子治療法につき、様々な血清型由来のベクターを比較検討し、導入遺伝子にかかわらず1型由来のベクターが有用であることを確認した。その効果は少なくとも1年にわたって持続し、遺伝子導入を行った骨格筋に対する悪影響は観察されなかった。以上の結果を通して、AAVベクターを用いた方法の有効性と安全性を証明することが出来た。また、野生型及び変異型のloxP配列を利用することで新規のAAVのパッケージング細胞株を樹立した。さらに、バキュロウイルスを用いる方法の開発を進め、今後はその実用化に向けた研究を一層推進していく計画である。

### 【参考文献】

- 1) Chiorini JA, Kim F, Yang L, et al: Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* 73: 1309-19, 1999.
- 2) Chiorini JA, Yang L, Liu Y, et al: Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* 71: 6823-33, 1997.
- 3) Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, et al: Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* 221: 208-17, 1996.
- 4) Xiao W, Chirmule N, Berta SC, et al: Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73: 3994-4003, 1999.
- 5) Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, et al: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol Biotechnol* (in press)
- 6) Urabe M, Ding C, Kotin RM: Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13: 1935-43, 2002.
- 7) Ogasawara Y, Mizukami H, Urabe M, et al: Highly regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre/loxP switching system. *J Gen Virol* 80: 2477-80, 1999.

# 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法の開発に関する基盤的研究

武田 伸一\*

研究協力者 坂本 美喜\*, 吉村 まどか\*, 湯浅 勝敏\*, 鈴木 友子\*,  
横田 俊文\*, 池本 円\*, 望月 靖史\*

## 【緒言】

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の異常により引き起されるX連鎖性劣性の遺伝性筋疾患である<sup>1)</sup>。DMDは、発生率が高く(男児3,500人に1人)、進行性の重篤な骨格筋障害を生じ、呼吸障害や心障害による早期死亡として特徴づけられる。現在、筋ジストロフィーに対する効果的な治療法がないことから、根治的な治療法の開発が期待されている。

ウイルスベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療として、全アデノウイルス (Ad) ゲノムを欠失させ、全長型ジストロフィンcDNAを挿入可能にしたguttred Adベクターが開発されたが、ベクターの生産性が低いことやhelper Adの混入などの問題から、臨床応用へは問題が残されている<sup>2)</sup>。一方、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus, AAV) ベクターは、成熟骨格筋への導入効率が高く、導入遺伝子の安定した長期発現を与える。しかしながら、組み込み可能なサイズに4.9 kb以下と制限があることから、AAVベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療法を開発するためには、機能的な小型のジストロフィン遺伝子が必要となる。

ジストロフィンの4つの機能ドメインのうち、ロッド・ドメインは、N末端のアクチン結合ドメインとシステイン・リッチ及びC末端ドメイン間のスペーサーとしての機能を持つと考えられる<sup>3)</sup>。ごく軽症のBecker型筋ジストロフィーの患者からクローニングされた6.4 kbのミニ・ジストロフィンcDNAは、ロッド・ドメインが大きく欠損していたが、ミニ・ジストロフィンを発現するトランスジェニック (Tg) *mdx* マウスにおいて、表現型を著しく改善させた<sup>4)5)</sup>。

このミニ・ジストロフィンを基に、我々は、更にロッド・ドメインを短縮したマイクロ・ジストロフィン遺伝子を構築し、第一世代Adベクターを用いて*mdx*骨格筋に導入した<sup>6)</sup>。その結果、ロッド・リピートを1個以上持つマイクロ・ジストロフィンは効果的に発現し、筋形質膜に局在することが示された。しかし、Adベク

ターによる遺伝子導入では、マイクロ・ジストロフィンの発現は短期に留まり、機能を十分に評価するには至らなかった。

そこで、AAVベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療法を開発するために、先ずTg *mdx* マウスを作製し、マイクロ・ジストロフィンの機能を評価した<sup>7)</sup>。次に、*mdx*骨格筋へのAAVベクターによる効果的な遺伝子導入について検討を行った<sup>8)</sup>後、実際にAAVベクターを用いて治療用マイクロ・ジストロフィン遺伝子を*mdx*骨格筋へ導入し、筋ジストロフィーの表現型の改善について検討した。

## 【方法】

### 1. トランスジェニック *mdx* マウスの作製と解析

骨格筋で導入遺伝子の高発現を得るために、CAGプロモーター<sup>9)</sup>の下流にマイクロ・ジストロフィンcDNAを挿入した発現カセットを作製した。これをC57BL/6マウスの胚に注入し、F<sub>0</sub>マウスを作出した。導入遺伝子陽性のF<sub>0</sub>雄マウスをジストロフィンが欠損した雌の*mdx*マウスと交配し、全長型ジストロフィンを欠きマイクロ・ジストロフィンのみを発現するTg *mdx* F<sub>1</sub>マウスを得た。5週および10週齢のTg *mdx* マウスから前脛骨筋 (TA) と横隔膜を単離し、凍結標本を作製した。また、血清クレアチン キナーゼ (CK) 値を測定すると共に、横隔膜を用いて張力測定を行った。対照群としては、正常C57BL/10 (B10) マウスおよび同腹の導入遺伝子陰性の*mdx* F<sub>1</sub>マウスを用いた。

### 2. AAVベクターの作製

Ubiquitousな発現が可能なCMVプロモーターまたは筋特異的な短縮型のmuscle creatine kinase (MCK) プロモーターの下流でβ-galactosidase (β-gal) またはマイクロ・ジストロフィンを発現する2型AAVベクター、AAV-CMVLacZ, AAV-MCKLacZ, AAV-MCKΔCS1を作製した。短縮型MCKプロモーターは、マウスMCK遺

\*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

伝子の発現調節領域から筋特異的な活性を与えるエンハンサー領域 (200 bp) とコア・プロモーター領域 (約 360 bp) を取り出し、構築した<sup>10)</sup>。AAV ベクターの組み換えにあたっては、Pittsburgh 大学 Xiao 博士との共同研究により、adenovirus-free の plasmid co-transfection 法を用いて作製した<sup>11)</sup>。CsCl による密度勾配超遠心法により濃縮・精製した後、ドットプロット法によりウイルス力価 (vector genome, vg) を測定した。

### 3. 骨格筋への AAV ベクターの導入

10 日齢または 5 週齢の B10 または *mdx* マウスの TA 筋に、それぞれ 15 $\mu$ l (7.5  $\times$  10<sup>10</sup> vg) または 50  $\mu$ l (2.5-5.0  $\times$  10<sup>11</sup> vg) の AAV ベクターを直接注射した。AAV-CMVLacZ と AAV-MCKLacZ の導入では、1, 2, 4, 8 週後に解析を行った。一方、AAV-MCK $\Delta$ CS1 の導入では、導入 8, 24 週後に TA 筋を採取し、張力測定後、凍結標本を作製した。対照群として、同週齢の B10 TA 筋および非導入側の *mdx* TA 筋を用いた。

### 4. 骨格筋の解析

(1) 張力測定：埼玉医科大学 池本隆昭 博士との共同研究により確立した方法を用いて、強縮時の最大張力を測定し、単位面積あたりの筋張力を算出した<sup>7)</sup>。(2) 組織化学染色：凍結標本から横断切片 (10  $\mu$ m) を作製し、H&E 染色、または X-Gal 染色、Masson-Trichrome 染色を行った。(3) 免疫組織化学染色：6  $\mu$ m の凍結切片を作製し、アセトン固定後、免疫染色を行った。内因性のマウス IgG は FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) (Leinco Technologies) を用

いて検出した。ジストロフィン染色は、抗ジストロフィン抗体 NCL-DYSB (Novocastra) と M.O.M. kit (Vector Laboratory) を用いて検出後、DAB で発色させた。或は、Alexa 488-labeled anti-mouse IgG (H+L) (Molecular probes) を用いて一次抗体を検出した。同時に、ヘマトキシリンまたは TOTO-3 (Molecular probe) を用いて核を共染した。(4) 画像解析：CCD カメラを用いて顕微鏡画像を取り込んだ後、全横断面における中心核および辺縁核線維数と、ジストロフィン陽性および陰性線維数を測定した。間質面積および筋線維横断面積 (Cross section area) の計測は、画像解析ソフト Image pro plus<sup>TM</sup> (Media Cybernetics) を用いた。

## 【結果】

### 1. トランスジェニック *mdx* マウスを用いたマイクロ・ジストロフィンの機能解析

小型で機能的なマイクロ・ジストロフィン遺伝子を同定するために、ヒトミニ・ジストロフィン cDNA (6.4 kb) を基に、ロッド・リピートをそれぞれ 4, 3, 1 個持つ 3 種類のロッド短縮型 micro-dystrophin CS1 (4.9 kb), AX11 (4.4 kb), M3 (3.7 kb) cDNA を作製した (図 1)。これらのロッド・ドメインはトリプル・ヘリックス構造を維持するように再構築した<sup>12)</sup>。

マイクロ・ジストロフィンの筋変性に対する保護効果を検討するために、マイクロ・ジストロフィンを発現する Tg *mdx* マウスを作製した。免疫組織化学的染色では、3 種ともマイクロ・ジストロフィンは形質膜に局在し、さらにジストロフィン結合蛋白質の形質膜での発現を回復させた (data not shown)。次に、マイクロ・

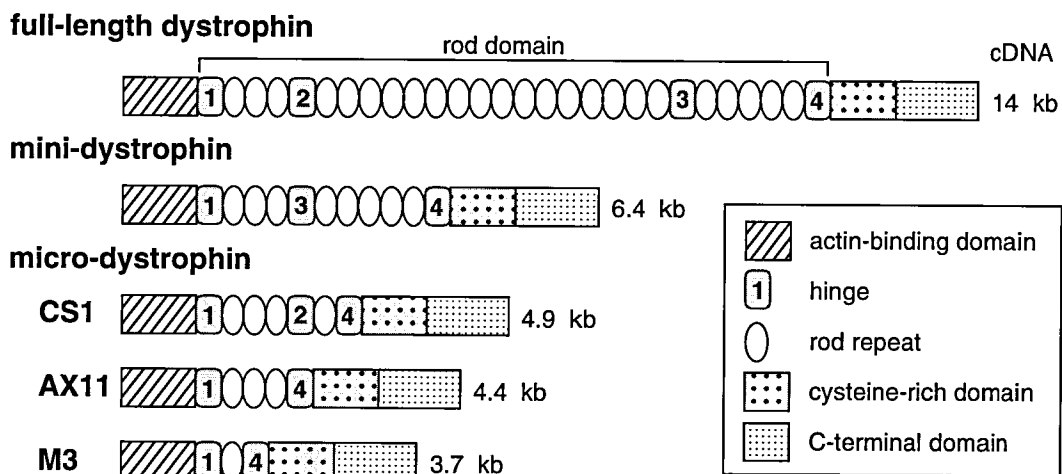


図 1 マイクロ・ジストロフィン cDNA の構築

全長型ジストロフィン (cDNA 14 kb) は、N 末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、C 末端ドメインの 4 つの機能ドメインから構成される。ロッド・ドメインは、24 個のロッド・リピートと 4 個のヒンジから成る。ごく軽症のベッカー型筋ジストロフィー患者からクローニングされたミニ・ジストロフィン (cDNA 6.4 kb) のロッド・ドメインを更に短縮し、ロッド・リピートを 4, 3, 1 個持つマイクロ・ジストロフィン CS1 (4.9 kb), AX11 (4.4 kb), M3 (3.7 kb) cDNA を構築した。

ジストロフィンの機能を評価するために、骨格筋病理像、中心核線維数、血清CK値、電気生理学的な筋張力発生を指標として、各Tg *mdx* マウスの解析を行った (図2)。その結果、5週齢と10週齢に共通して、マイクロ・ジストロフィンCS1は *mdx* マウスで認められる筋ジストロフィーの表現型を著しく改善させた。CS1-Tg *mdx* マウスでは、組織学的にも筋変性はほとんど認められず、中心核線維数や血清CKも正常B10マウスと有意差はなかった。また、機能的にも筋張力産生は正常レベルまで回復していた。一方、AX11、M3はロッド・リピート数に比例して表現型が改善していたが、正常レベルには及ばなかった。

## 2. AAVベクターを用いた *mdx* 骨格筋への遺伝子導入

AAVベクターによる骨格筋での導入発現効率を検討するために、AAV-CMVlacZをB10および *mdx* 骨格筋へ導入した。その結果、B10骨格筋では、 $\beta$ -galの発現は8週後まで維持されたのに対し、*mdx* 骨格筋では、4週後、 $\beta$ -gal発現は急速に低下した。導入4週後の *mdx* 骨格筋では、 $\beta$ -gal陽性線維の周辺にCD4、CD8陽性細胞を含む強い細胞浸潤が認められ、IgGの沈着が多量に検出された (図3上段)。 *mdx* 骨格筋における免疫応答

の賦活化を軽減するために、筋特異的なMCKプロモーターを用いた遺伝子導入の効果を検討した。AAV-MCKlacZを *mdx* 骨格筋へ導入したところ、CMVプロモーターに比べ $\beta$ -galの長期発現が認められ、導入4週後の *mdx* 骨格筋では細胞浸潤も軽減し、免疫応答の賦活化も抑制されていた (図3下段)。

## 3. AAVベクターを用いたマイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入による治療効果の検討

AAVベクターへの挿入可能サイズは4.9 kb以下であることから、CS1 cDNA (4.9 kb) の5', 3'非翻訳領域と alternative splicing を受ける exon 71-79 を欠失させた3.8 kbの $\Delta$ CS1遺伝子を作製した (図4A)。これを、短縮型MCKプロモーターの下流に連結し、治療用ベクターAAV-MCK $\Delta$ CS1を作製した。AAVベクターによる治療効果を検討するために、筋変性開始前の10日齢、あるいは変性・再生の過程である5週齢の *mdx* 骨格筋へ導入を行った。

5週齢へ導入した場合、8、24週の長期に渡って、40~50%の筋線維で $\Delta$ CS1の発現が認められた (図4B, C)。形態学的に解析したところ、AAV導入 *mdx* 骨格筋では中心核線維の割合が減少し、とりわけ $\Delta$ CS1陽性線維で

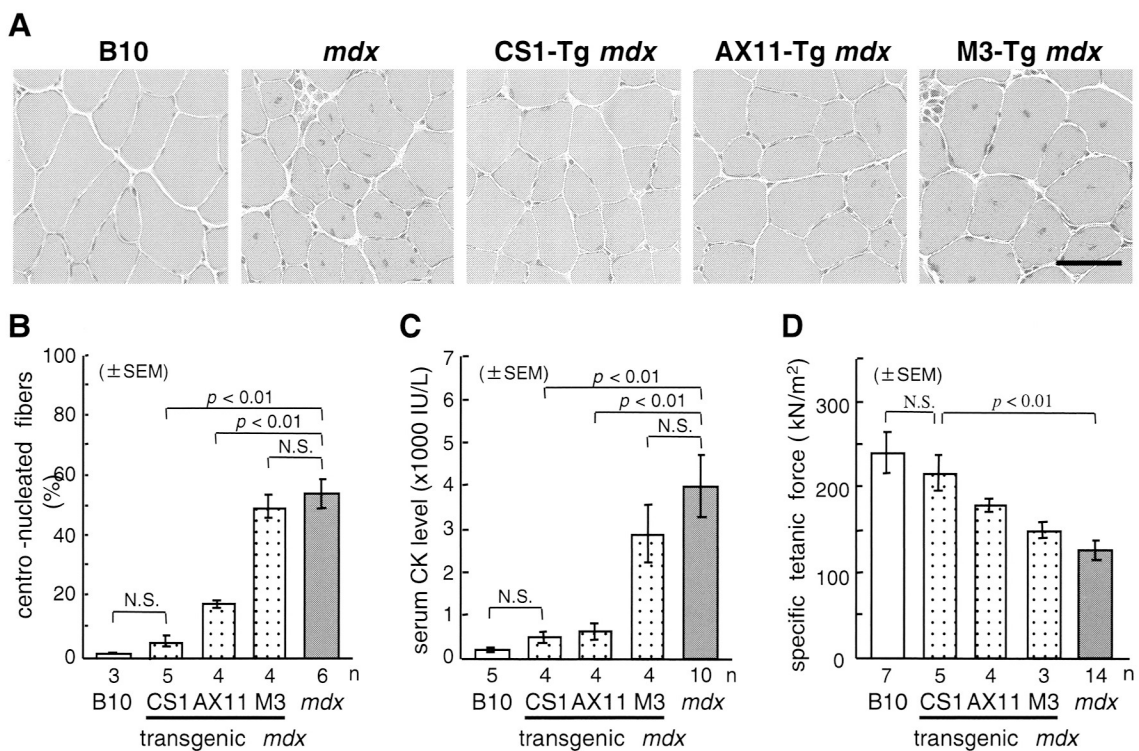


図2 マイクロ・ジストロフィンを発現するトランスジェニック (Tg) *mdx* マウスの解析  
5週齢のB10マウス、*mdx* マウス、CS1-, AX11-, M3-Tg *mdx* マウスの解析結果を示す。(A) 前脛骨筋の組織像 (H&E染色, Bar = 50  $\mu$ m)。(B) 前脛骨筋における中心核線維の割合。(C) 血清クレアチン・キナーゼ (CK) 値。(D) 横隔膜における単位面積あたりの筋張力産生能。

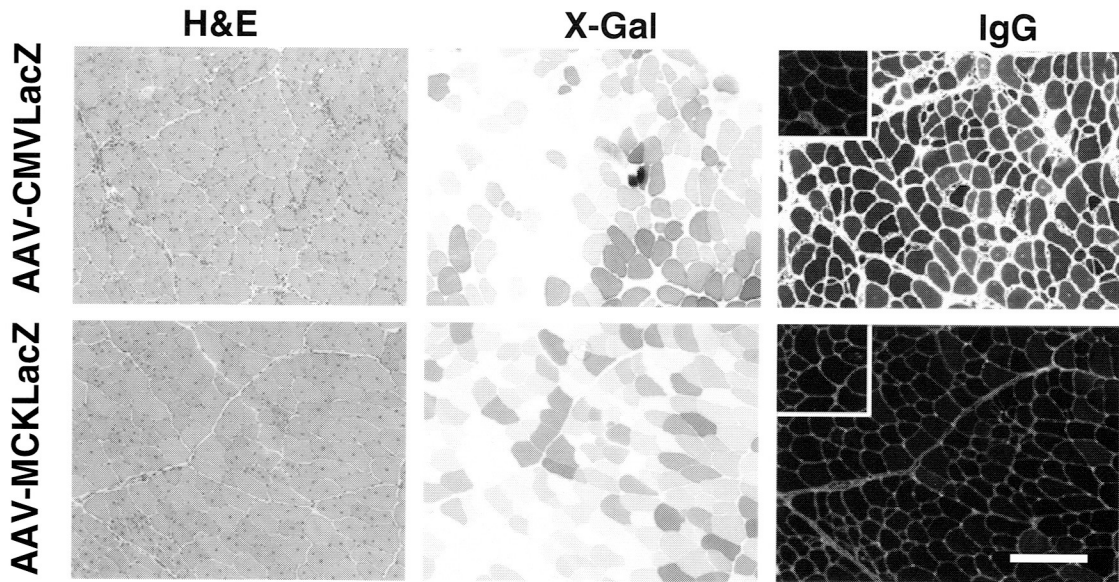


図3 筋特異的プロモーターを用いた *mdx* 骨格筋への遺伝子導入  
5週齢 *mdx* マウスの前脛骨筋に AAV-CMVlacZ または AAV-MCKlacZ を導入し、4週後に解析を行った。(左列) H&E 染色。(中列) X-Gal 染色。(右列) Mouse IgG の免疫組織染色 (Inset: 対側の非導入筋, Bar = 100  $\mu$ m)。上段の AAV-CMVlacZ 導入筋では、 $\beta$ -gal 陽性線維の周辺に細胞浸潤の集簇が認められ、間質および筋線維内に IgG の沈着が検出された。一方、下段の AAV-MCKlacZ 導入筋では、細胞浸潤は乏しく、IgG の沈着も検出されなかった。

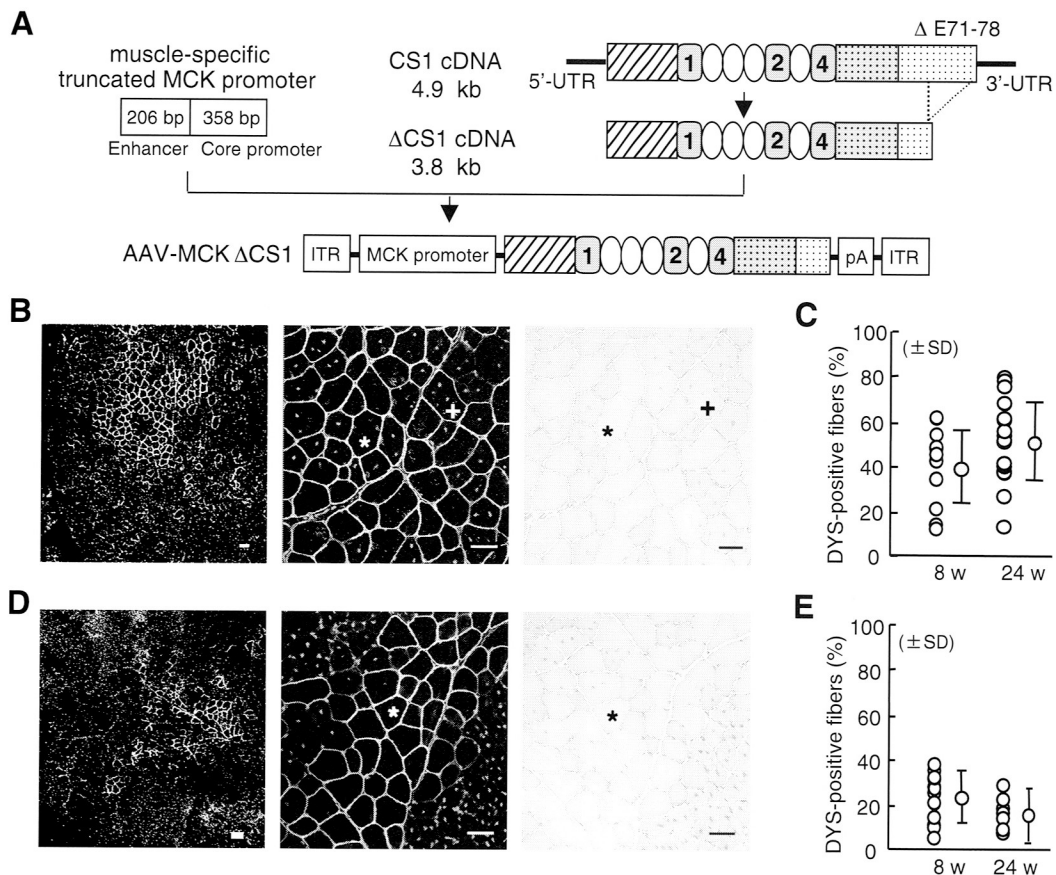


図4 治療用 AAV ベクターの *mdx* 骨格筋への遺伝子導入  
(A) 治療用 AAV ベクターの作製: CS1 cDNA (4.9 kb) の 5', 3' 非翻訳領域 (URT) と exon 71-78 を削除し、3.8 kb の  $\Delta$  CS1 cDNA を構築した。これを、MCK プロモーターの下流に連結し、AAV-MCK $\Delta$ CS1 を作製した。(B-E) 5週齢または 10日齢の *mdx* マウスの前脛骨筋へ AAV-MCK $\Delta$ CS1 を導入し、8週、24週後の  $\Delta$ CS1 の発現と組織像を調べた。(B, D) 導入 24週後のジストロフィンの免疫組織染色像と H&E 染色像 (Bar = 50  $\mu$ m)。(C, E)  $\Delta$ CS1 陽性線維の割合。(B, C) 5週齢への導入:  $\Delta$ CS1 陽性線維は広範囲に存在し、平均で 8 週後 39.2%, 24 週後 51.5% であった。また、 $\Delta$ CS1 陽性線維には中心核 (+) と辺縁核 (\*) が混在していた。(D, E) 10日齢への導入:  $\Delta$ CS1 陽性線維は 5週齢に比べ少なく、8 週後 22.8%, 24 週後 16.5% であった。しかし、ほとんどの  $\Delta$ CS1 陽性線維が辺縁核 (\*) を呈した。

低かった (図 5A)。さらに、筋病変を表す筋重量や筋張力産生は正常 B10 マウスのレベルまで改善していた (図 5B)。一方、10 日齢への導入では、 $\Delta$ CS1 陽性線維の比率は 5 週齢での導入に比べ低く、約 20% であった (図 4D, E)。治療効果を解析したところ、 $\Delta$ CS1 陽性線維における中心核数は著しく減少していた (図 5C)。興味深いことに、 $\Delta$ CS1 陽性線維は少なかつたにも拘わらず、筋張力は正常レベルまで回復していた (図 5D)。しかし、筋重量においては、有意な改善は認められなかった (data not shown)。

マイクロ・ジストロフィンの発現量が機能回復にどのように貢献するかを検討するために、 $\Delta$ CS1 陽性線維は少ないが筋張力の改善が認められた 10 日齢への導入について解析を行った (図 6)。筋張力回復の視点から

AAV ベクター導入後の *mdx* 骨格筋を解析したところ、筋重量と筋張力の間に正の相関が認められ、筋重量増加に伴い張力産生能が改善していた (図 6A)。さらに、筋肥大には結合織 (間質面積) の増加が関与していなかったことから、筋線維の肥大 (真性肥大) が示唆された (図 6B)。そこで、個々の筋線維について横断面積を計測したところ、AAV 導入 *mdx* 骨格筋の  $\Delta$ CS1 陽性線維では、平均筋線維横断面積が B10 および *mdx*、 $\Delta$ CS1 陰性線維に比べ著しく肥大していた (図 6C)。ヒストグラム解析を行ったところ、*mdx* や  $\Delta$ CS1 陰性の *mdx* 線維は小径への偏倚が確認されたが、 $\Delta$ CS1 陽性の *mdx* 線維では小径線維が減少し、むしろ正常 B10 線維以上に大径線維の割合が増加していた (data not shown)。

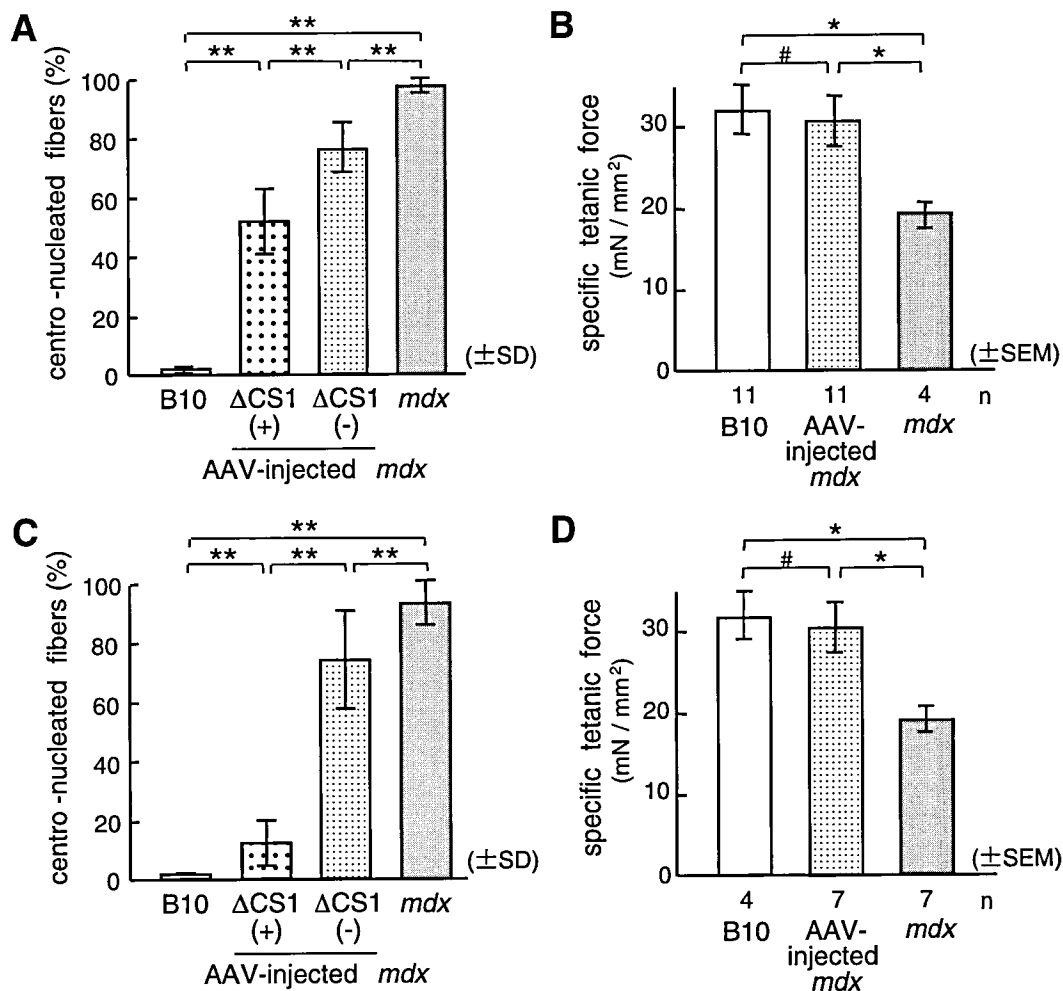


図 5 治療用 AAV ベクター導入後の *mdx* 骨格筋における治療効果  
5 週齢または 10 日齢の *mdx* マウスの前脛骨筋へ AAV-MCK $\Delta$ CS1 を導入し、24 週後に中心核線維の割合 (A, C) と筋張力 (B, D) を測定した。(A, B) 5 週齢への導入 (C, D) 10 日齢への導入 (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , #: N. S.)



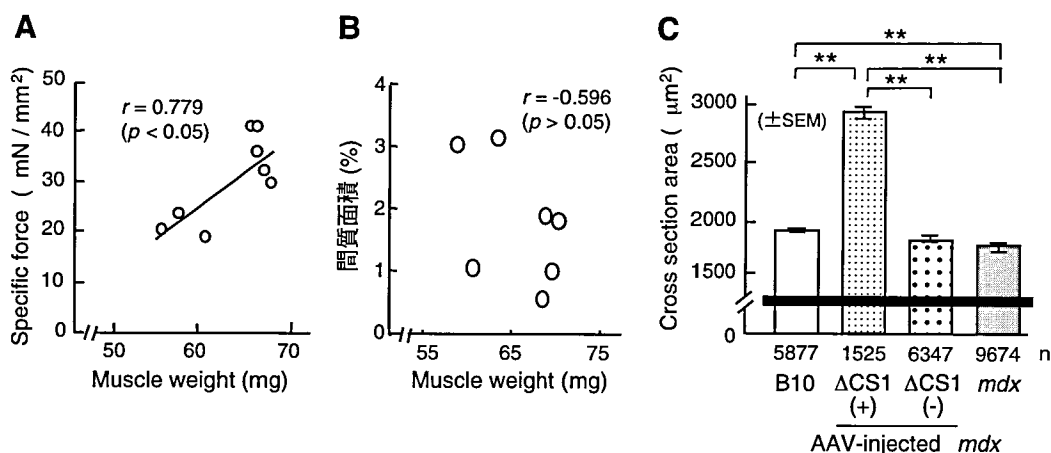


図6 10日齢で導入した *mdx* 骨格筋の形態学的解析  
10日齢で AAV-MCK  $\Delta$ CS1 を導入した24週後の *mdx* マウスの前脛骨筋における治療効果と筋線維肥大の関係について解析した。(A) 筋張力と筋重量の相関。(B) 間質面積と筋重量の相関。(C) 筋線維の横断面積 (\*\*:  $p < 0.01$ , #: N.S.).

## 【考察】

### 1. マイクロ・ジストロフィンの機能

マイクロ・ジストロフィンを発現する Tg *mdx* マウスを作製し、形態学および機能的に評価したところ、ロッド・リピート数に依存して表現型(変性・再生像、中心核線維の割合、CK 値、筋収縮力)の改善が認められた。これは、ロッド構造、特にロッド・リピート数がマイクロ・ジストロフィンの機能にとって重要であることを示唆した。特に、CS1 は正常レベルと同等の改善効果を示した。これは、少なくともロッド・リピート4個とヒンジ3個は、筋収縮による機械的ストレスに対してマイクロ・ジストロフィン分子に flexibility を与え、形質膜の安定性を向上させると考えられる。

### 2. AAV ベクターを用いた骨格筋への効果的な遺伝子導入

AAV ベクターを用いた *mdx* 骨格筋への遺伝子導入において、ubiquitous な CMV プロモーターは導入遺伝子産物に対する強い免疫応答を誘導し、導入4週後に遺伝子発現を急速に低下させた。これは、AAV ベクターが感染した抗原提示細胞内で導入遺伝子産物の産生が起り、細胞障害性 T 細胞が活性化されるためと考えられる<sup>14)</sup>。その背景に、dystrophic な *mdx* 骨格筋では Dendritic cell や Macrophage などの抗原提示細胞が多数存在し、AAV ベクター導入後の免疫応答を増強することが挙げられる<sup>8)</sup>。これに対しては、筋特異的な MCK プロモーターを使用することで導入効果の改善が認められた。結果は示さなかったが、B10 マウスを用いて同様に検討したところ、AAV-CMVlacZ の導入では12週以降に  $\beta$ -gal 発現が減少する傾向にあったが、MCK プロモーターを用いた場合では導入1年7ヶ月後でも  $\beta$ -

gal 発現は維持されていた。

### 3. 治療用 AAV ベクターを用いた *mdx* 骨格筋における治療効果

AAV-MCK $\Delta$ CS1 を変性発症前および変性過程の *mdx* 骨格筋に導入したところ、いずれの時期においても治療効果が認められた。また、CS1 を更に短縮した  $\Delta$ CS1 は、筋変性に対する防御効果および生理学的機能を十分に維持していることが示唆された。5週齢での導入では、約50%の筋線維に  $\Delta$ CS1 の発現が得られ、発症後の治療によって機能および病態が回復することを示した。また、発症前の10日齢の導入では、約20%の筋線維への発現でも機能的な改善が認められ、 $\Delta$ CS1 陽性線維の代償的な肥大により筋張力が改善することが示唆された。これは、DMD 筋では膜機能が残存する筋線維の肥大が機能低下に対応していることから支持される<sup>14)</sup>。

ジストロフィンの発現と機能回復についての示唆が、これまで DMD キャリアや Tg *mdx* マウスの研究から得られている。これらの結果では、ジストロフィン蛋白量は表現型にはあまり影響を及ぼさず、むしろジストロフィン陽性線維数が表現型の改善にとって重要な因子であると考えられてきた。例えば、機能回復が認められた mini-dystrophin Tg *mdx* マウスでは、蛋白量は20-30%であったが、発現線維数は半数程度であった<sup>45)</sup>。本研究は、更に少ない20%以下の陽性線維数で機能が回復することを示した。これは、今後の治療研究において、治療効果を得るための重要な指標を与えるものと考えられる。

### 4. 今後の検討課題

DMD に対する治療研究では、これまで小型の *mdx* マ

ウスが用いられてきたが、軽症で進行性は目立たない。そこで、ヒトへ応用するためには、重症で進行性の経過を辿る大型の筋ジストロフィー犬<sup>19)</sup>を用いた臨床前試験が必要となる。AAVベクターを用いたイヌ骨格筋への遺伝子導入について検討を行ったところ、マウスとは大きく異なり、高い導入発現効果が得られていない。AAVベクターを導入したイヌ骨格筋では、導入初期から免疫応答を伴った強い細胞浸潤が観察されたことから、今後は免疫応答の機序を詳細に解明することがヒトへの応用を考えるうえで重要と考えられる。更に、導入発現効率を改善するために、免疫抑制剤の併用や異なる serotype の AAV ベクターによる導入についても検討していく必要がある。

### 【結 論】

我々は、AAVベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療法の確立を試みた。

- (1) マイクロ・ジストロフィンの機能を Tg *mdx* マウスを用いて検証したところ、ロッド・リピート4個を持つCS1が最も効果的であった。
- (2) AAVベクターを用いた *mdx* 骨格筋への遺伝子導入では、筋特異的な短縮型MCKプロモーターの利用が有効であった。
- (3) AAVベクターを用いてマイクロ・ジストロフィンΔCS1を *mdx* 骨格筋へ導入したところ、筋変性に対する保護効果と筋張力産生の改善効果が認められた。

### 【参考文献】

- 1) Emery AEH: Duchenne muscular dystrophy, 2<sup>nd</sup> edn. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- 2) Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y: Gene therapy for muscular dystrophies: current status and future prospects. *BioDrugs* **15**: 635-644, 2001.
- 3) Brown SC, Lucy JA: Dystrophin. Gene, protein and cell biology, Cambridge University Press, Oxford, 1997.
- 4) Wells DJ, Wells KE, Asante EA, et al: Expression of human full-length and minidystrophin in transgenic *mdx* mice: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **4**: 1245-1250, 1995.
- 5) Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, et al: Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic *mdx* mice. *Hum Mol Genet* **4**: 1251-8, 1995.
- 6) Yuasa K, Miyagoe Y, Yamamoto K, et al: Effective restoration of dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-mediated transfer of truncated dystrophin cDNAs. *FEBS Lett* **425**, 329-36, 1998.
- 7) Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, et al: Microdystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1265-72, 2002.
- 8) Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, et al: Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* **9**: 1576-88, 2002.
- 9) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J, et al: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193-199, 1991.
- 10) Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, et al: E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* **16**: 5058-68, 1996.
- 11) Xiao X, Li J, Samulski RJ: Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**: 2224-2232, 1998.
- 12) Koenig M, Kunkel LM: Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* **265**: 4560-66, 1998.
- 13) Zhang Y, Chirmule N, Gao GP, et al: CD40 ligand-dependent activation of cytotoxic T lymphocytes by adeno-associated virus vectors in vivo: role of immature dendritic cells. *J Virol* **74**: 8003-10, 2000.
- 14) Zammit PS, Partridge TA: Sizing up muscular dystrophy. *Nat Med* **8**: 1355-6, 2002.
- 15) Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, et al: Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD). *Exp Anim* **52**: 93-97, 2003.

# 代謝性筋疾患に対する分子治療の基盤研究

辻野 精一\*

研究協力者 水上 浩明\*\*, 小澤 敬也\*\*, Nina Raben\*\*\*

## 【緒論】

Acid maltase (AM) はライソゾーム酵素でグリコーゲンを加水分解しグルコースを生成する。遺伝性代謝性筋疾患の一つである acid maltase 欠損症 (AMD) は分解されないグリコーゲンがライソゾームに蓄積し組織を障害する。臨床的に発症時期により乳児型, 若年型, 成人型の3型に分類され, 若年型と成人型は症状がほぼ骨格筋に限局するが, 乳児型は呼吸筋, 心筋が強く侵され早期に死に至る重篤な病態である<sup>1)</sup>。しかしながら現在有効な治療法はない。欧米では酵素補充療法の臨床試験が行われており一定の効果が報告されているが1回投与の効果は持続せず投与を繰り返し継続する必要があり, 将来的に遺伝子治療も期待される。我々は, 筋への高効率な遺伝子導入を可能とするアデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療の効果を動物モデルにおいて検討してきた。自然発生 AMD ウズラを動物モデルとして用い, ヒト AM を発現する組換えアデノウイルスの筋局所的効果を報告した<sup>2)</sup> のに引き続き, AM ノックアウト (KO) マウス<sup>3) 4)</sup> を用いて検討を行ってきた。アデノウイルスベクターでは心腔内投与で肝に AM を大量に発現させることが可能で, 肝で発現した AM は主に前駆蛋白として分泌され血液を介し全身に及び, 筋細胞などで取り込まれライソゾーム中で活性型 AM にプロセスされるといった過程を経て全身に効果を及ぼした。しかしベクター自体の問題点である免疫原性のため長期の効果は望めず, 臨床症状の改善には至らなかった。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは非分裂細胞への遺伝子導入効率に優れ, かつ免疫原性が低く野生型ウイルスでさえ病原性がないという点から遺伝子治療に用いるベクターとして期待されている。当初, 広く研究に用いられていた血清型 2 型の AAV ベクターでは, 少なくとも我々の用いている AM-KO マウスのストレインでは心腔内投与による肝での発現も筋肉内投与による筋局所的発現も非常に弱く, 効果を示すことができなかった。最近, AAV ベクターの血清型により生物種,

組織の遺伝子導入効率が異なることが知られるようになってきたため, 今回, 異なる血清型の AAV ベクターによる AM-KO マウスへの AM 遺伝子導入効率を比較検討し, その結果に基づき, 5 型 AAV ベクターを用いた長期的 AM 遺伝子発現を観察した。

## 【対象と方法】

### 1) AM-KO マウス及び線維芽細胞

使用した AM-KO マウスはその AM 遺伝子のエクソン 6 をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作製された<sup>3) 4)</sup>。このマウスにおいてグリコーゲンの蓄積は生下時より認められるが, 臨床的にはヒトの乳児型のような表現型をとらず, 成獣になっても動作の緩慢はあるものの明かな心肥大や肝肥大を認めず生殖も正常と同様である。しかしながら 7-8 月齢で著明なミオパチー, すなわち後脚が開き走行ができなくなり, 傍脊柱筋の異常によると考えられる脊柱の後弯などを生じる。線維芽細胞はその皮膚より培養した。

### 2) AAV ベクター

ヒト AM cDNA 挿入ベクタープラスミド, AAV 遺伝子発現プラスミド, アデノウイルス遺伝子発現プラスミドをリン酸カルシウム法を用いて 293 細胞に同時にトランスフェクションし作製した (AAV-AM)。CMV プロモーターにより AM が発現される構築となっている。塩化セシウム溶液による濃度勾配法を用い 2 回精製し, 定量的ドットプロットを用いてウイルス量を決定した。2 型 (AAV2-AM), 3 型 (AAV3-AM), 5 型 (AAV5-AM) の 3 種の血清型の AAV ベクターを作成した。

### 3) AAV ベクターの *in vivo* 投与

6 週齢の AM-KO マウスの前脛骨筋内に各血清型 AAV-LacZ または AAV5-AM を  $2.3 \times 10^{11}$  particles 注射した。注射位置マーカーとしての墨を混注した。AAV5-AM に関しては, 前, 2 週後, 5 週後, 9 週後, 6 ヶ月後に各 3 匹ずつ解剖し注射側, 対側の前脛骨筋, 肝, 心筋を採

\*国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部  
\*\*自治医科大学 分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部  
\*\*\*米国 NIH

取した。

#### 4) AM活性とグリコーゲン含量の測定

培養細胞または凍結組織標本をホモジナイズし4-MUGを基質としAM活性を測定した。またグリコーゲンは完全に加水分解した後、グルコース量として定量した。

#### 5) 組織染色

組織をクライオスタットを用い10 $\mu$ m切片とし、PAS染色または $\beta$ -galactosidase染色を行った。

#### 6) Western blot解析

凍結組織標本のホモジネートをSDS-7.5%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動しニトロセルロース膜にブロット後抗ヒトAM抗体と反応させた。

### 【結果】

#### 1) 各血清型 AAV ベクターによる AM-KO マウス線維芽細胞への遺伝子導入.

AM-KO マウスの線維芽細胞に対する AM 遺伝子の導入発現効率は AAV5-AM と AAV3-AM が AAV2-AM に比べ明らかに効率が良かった。さらに AAV5-AM は AAV3-AM よりもやや効率が良い傾向が見られた (図1)。

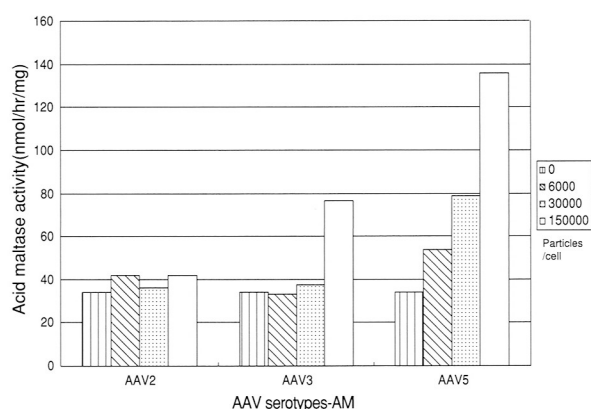


図1 AAV2-AM, AAV3-AM, AAV5-AM を感染した1週間後のAM-KO マウス由来培養皮膚線維芽細胞のAM活性。

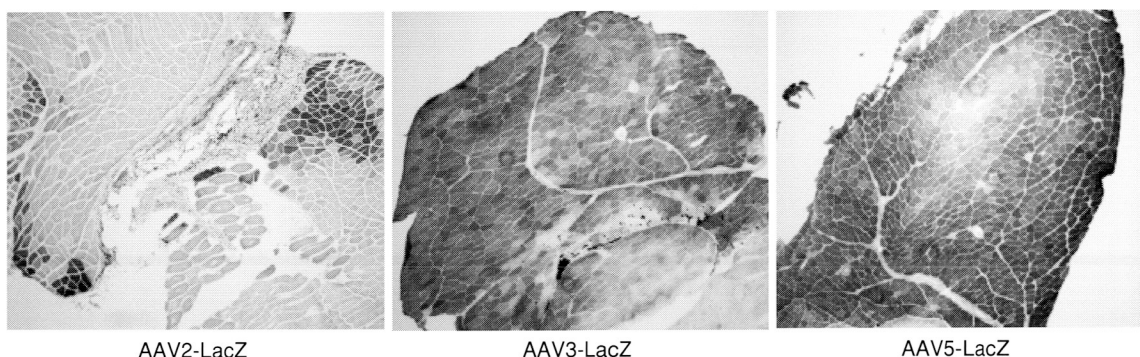


図2 AAV2-LacZ, AAV3-LacZ, AAV5-LacZ を AM-KO マウスの前脛骨筋に注射し1週間後の $\beta$ -galactosidase 染色。

#### 2) LacZ をマーカーとした各血清型 AAV ベクターの AM-KO マウス前脛骨筋への遺伝子導入効率の比較.

AAV5-LacZ と AAV3-LacZ は AAV2-LacZ に比べ明らかに遺伝子の導入発現効率が良かった (図2)。

#### 3) 血清型 5 型 AAV ベクター (AAV5-AM) による AMKO マウス in vivo 遺伝子導入.

AAV5-AM を注射した AM-KO マウスの前脛骨筋では2週間には AM 活性は正常値以上に上昇しグリコーゲン量は低下した。5 および9 週後には正常値程度の AM 活性を維持しグリコーゲン量の軽減も続いていた。6ヶ月後、AM 活性は再び上昇する傾向を認め、1 個体では著増した。それに伴いグリコーゲン量も再び低下する傾向を認めた (図3, 図4)。PAS 染色 (図5) と Western blot (図6) でも生化学的解析結果と一致する結果を得たが、PAS 染色では5 週以降、筋線維によってグリコーゲンが再び蓄積する線維と、持続して蓄積が改善している線維があることが示された。注射していない側の前脛骨筋、及び心筋、肝には明らかな効果は認められなかった。

### 【考察】

以前、我々は従来広く用いられてきた AAV2 ベクターでは、少なくともこの AM-KO マウスのストレイン (C57BL/6 x 129/Sv) では線維芽細胞及び筋組織で遺伝子導入発現効率が非常に低いことを報告した。しかし AAV ベクターはその血清型によって動物種や標的臓器での効率が異なることが知られるところとなり、今回、他の血清型 AAV5 および AAV3 ベクターを AAV2 ベクターと比較した。AM-KO マウスの培養皮膚線維芽細胞及び in vivo 筋組織では、AAV2 ベクターに比べ AAV5 および AAV3 の遺伝子導入発現効率が高く、これらの使用は遺伝子治療研究に有用と思われる。

次に AAV5-AM を AM-KO マウスの前脛骨筋に注射したところ少なくとも6ヶ月に渡り、酵素活性の上昇の

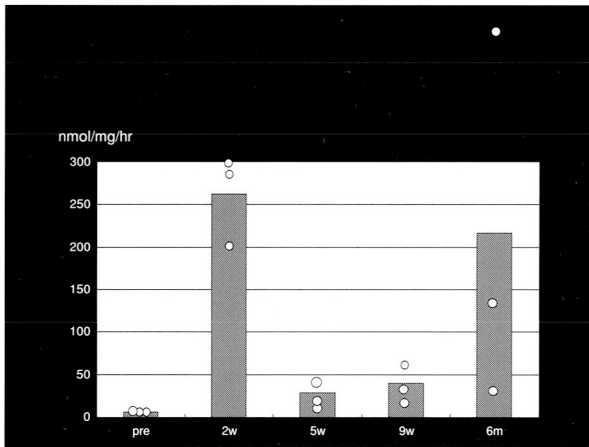


図3 AAV5-AMを注射したAM-KOマウス前脛骨筋のAM活性. 丸は個々の値で平均を棒グラフで示した.

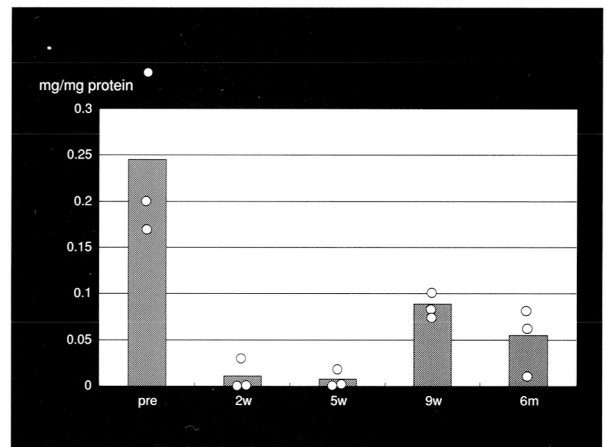
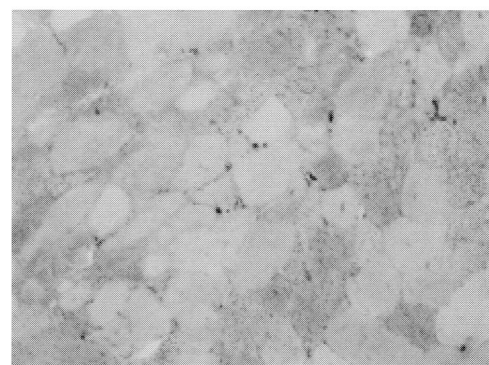


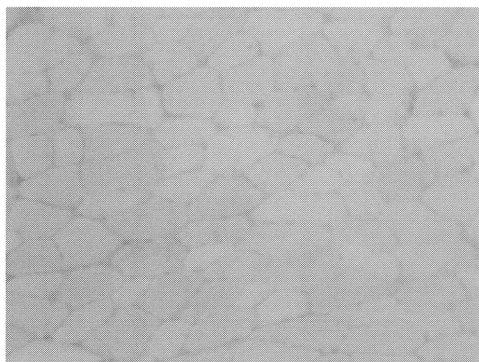
図4 AAV5-AMを注射したAM-KOマウス前脛骨筋のグリコーゲン含量. 丸は個々の値で平均を棒グラフで示した.



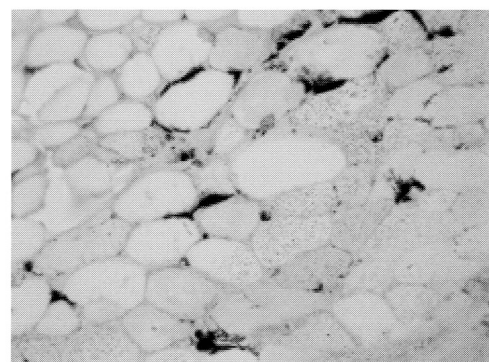
NT



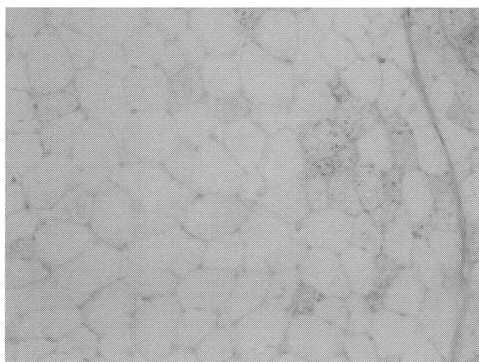
9W



2W



6M



5W

図5 AAV5-AMを注射したAM-KOマウス前脛骨筋のPAS染色. 黒い粒子はマーカーとして混注した墨が残留している. NT: 処置なし.



図6 AAV5-AMを注射したAM-KOマウス前脛骨筋の抗ヒトAM抗体を用いたWestern blot解析。AMは119 kDaの前駆蛋白から75, 76, 70 kDaの活性型にプロセスされることが知られている。

持続、及び蓄積するグリコーゲンの軽減を認め、長期的効果を示すことができたと考えられた。5週後、9週後と酵素活性は正常程度であったのが6ヶ月後再び2週後と同程度に上昇したのは、AAVベクターがある程度染色体に組み込まれ安定して遺伝子を発現できるようになったことが理由である可能性も考えられた。

しかし注射していない側の前脛骨筋や心筋、肝では酵素活性は上昇せず、全身的效果を及ぼすことはできなかった。アデノウイルスの場合、心腔内注射すると肝でAMが強く発現し主に前駆蛋白として分泌され血液を介し全身に及び、筋細胞などで取り込まれリソソーム中で活性型AMにプロセスされるといった過程を経て全身に効果を及ぼしたが、CMVプロモーターAAVベクターの場合は心腔内投与しても肝でAMが大量発現することはなかった。

同じライソゾーム病であるFabry病の遺伝子治療研究では筋にAAVベクターで遺伝子導入すると、そこから酵素( $\alpha$ -galactosidase)が分泌され全身的效果を示したという報告がある。この差異の理由としては酵素蛋白により筋細胞からの分泌が異なる可能性があると考えられた。

しかし本疾患では正常の20%程度の酵素活性があれば発症しないことが知られており、その程度の酵素を全身の筋に供給することによってすでに出現している症状も回復する可能性がある。このような意味では本疾患のような代謝性疾患は遺伝子治療の実用の可能性が比較的高いと考えられ今後とも研究を続けることの意義は大きいと思われる。

#### 【結 論】

1) 従来広く用いられてきたAAV2ベクターに比べ、

少なくともこのAM-KOマウスストレインでは線維芽細胞及び筋組織でAAV5およびAAV3の遺伝子導入発現効率が遥かに高く、遺伝子治療研究に有用と思われた。

2) AAV5-AMのAM-KOマウス個体筋肉内投与は6ヶ月までの長期に渡り効果を及ぼし続けることを示したが、全身的效果を及ぼすには至らなかった。

#### 【文 献】

- 1) DiMauro S, Servidei S, Tsujino S: Disorders of carbohydrate metabolism: Glycogen storage diseases. In *The molecular and genetic basis of neurological disease* (edited by Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, et al), 2nd ed, Butterworth-Heinemann, Boston, 1067-97, 1997.
- 2) Tsujino S, Kinoshita S, Tashiro T, et al: Adenovirus-mediated transfer of human acid maltase gene reduces glycogen accumulation in skeletal muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. *Hum Gene Ther* **9**: 1609-16, 1998.
- 3) Raben N, Nagaraju K, Lee E, et al: Targeted disruption of the acid  $\alpha$ -glucosidase gene in mice causes an illness with critical features of both infantile and adult human glycogen storage disease type II. *J Biol Chem* **273**: 19086-92, 1998.
- 4) Raben N, Nagaraju K, Lee E, et al: Modulation of disease severity in mice with targeted disruption of the acid  $\alpha$ -glucosidase gene. *Neuromuscul Disord* **10**: 283-91, 2000.

# 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

金田 安史\*

## 【緒言】

最初の遺伝子治療臨床研究が、1990年に始められて以来、現在、全世界で900以上の遺伝子治療プロトコールが提出され、試験的治療が行われている。期待はされているが、現在行われている遺伝子治療はまだ医療の段階にあるものではなく、遺伝子医薬品を開発するための試験的な医療であり、安全性と一部有効性を評価することから始められている。いくつかの有効例が最近報告されているが、全般的にはまだ目立った成果は上がっていない。特に全身性の筋疾患はもっともむずかしいターゲットの一つであろう。解決すべき課題はいかに広範囲の筋組織に遺伝子導入ができ、治療に十分な程度の発現レベルを保持できるかという点であろう。

言うまでもなく遺伝子導入ベクターの開発は遺伝子治療の成功の鍵として注目されてきた。方法にはウイルスベクターと非ウイルスベクターがありそれぞれ開発が進んでいるが、理想とする高効率・低侵襲ベクター開発は実現されていない。

本研究においては遺伝性筋疾患の有効な分子治療法の確立をめざして骨格筋への有効な遺伝子導入法と効果的な発現法の開発を行うことを目的とする。現状では骨格筋は遺伝子導入が行いやすい組織ではあるにも関わらず、筋疾患の治療には十分な成果はあがっていない。そこで非ウイルスベクターの筋肉への導入効率を増強できる方法を開発し、できる限り広範囲の骨格筋に遺伝子発現を検討した。また導入遺伝子の発現にも注目する必要があり、転写活性を増強しかつ維持するために必要なコンポーネントを取り入れた新たな発現系を開発を試みた。これらの方法を、マウスの胎仔期、成育期の筋肉内へ遺伝子導入と発現増強及び維持を評価した。

## 【方法】

### 1. 非ウイルスベクターによる骨格筋への遺伝子導入法の開発

まず骨格筋にNaked DNAを注入し、電気パルスをかけるエレクトロポレーション法の最適化の条件を検討

した。遺伝子としてはCMV promoterをもつ luciferaseを用いた。

次にNaked plasmid DNAにオプチゾン等の造影剤を混合し超音波を用いて遺伝子を導入する方法をマウスの胎仔期、成育期に応用し、できるかぎり広範囲の筋肉内へ遺伝子導入できる条件を検討した。

### 2. 遺伝子発現の増強、維持に関する研究

遺伝子発現の増強法としてRNA増幅可能なSFV replicase vectorによる骨格筋での遺伝子発現増強研究を行った。

遺伝子の長期発現のためにEpstein-Barr virus (EBV)のレプリコン装置を用いたレプリコンプラスミドを作成した。これはEBVのoriP, EBNA-1の配列を挿入したプラスミドで、CMV promoterをもつ luciferase 遺伝子を含んでいる。これらをHVJ-liposomeでマウス前頸骨筋に導入し、luciferase 発現とサザンブロットを施行した。EBのレプリコンベクターではEBNA-1は元來作成されていたプラスミド由来のプロモーター (Amp resistant gene中に含まれるプロモーター配列)によって制御されているが、これをさらに強力なCMV promoterに置き換えたプラスミドを作成した。

以上、動物実験については大阪大学医学系研究科で定める動物実験のガイドラインを遵守した。

## 【結果】

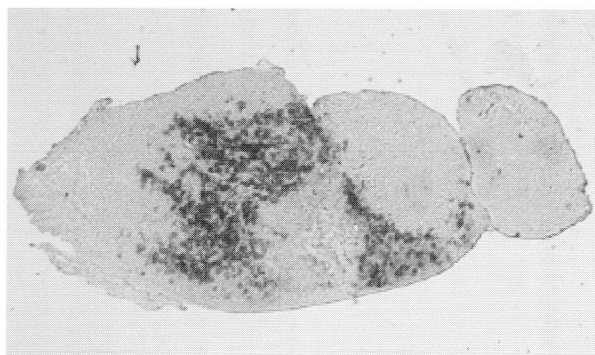
### 1. Electroporation 法

luciferase 遺伝子を前脛骨筋に導入して導入効率を検討したところ、24時間後のLuciferaseタンパク産生量はマウスでそれぞれ170倍 (plate 電極, 6 pulses, 50 V, 100 m sec), またラットで800倍 (100 V, 50 m sec)であった。また、LacZ 遺伝子をマウス前脛骨筋に導入して導入範囲を検討したところ、3日目のX-gal染色において全体の約半分にβ-galactosidase陽性細胞を認めた (図1)。

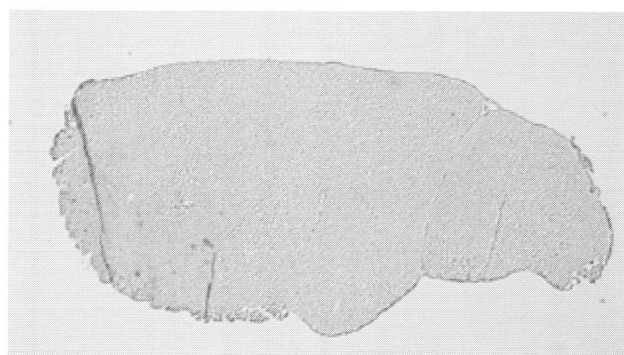
### 2. 骨格筋遺伝子導入への超音波造影法の応用

1) Naked luciferase plasmid DNAを8週令のマウスの骨格筋に注入すると、20μg以上のDNAの注入によ

\*大阪大学大学院医学系研究科



Electroporation法



Naked DNA法

図1 ラット骨格筋でのLacZ遺伝子発現

って約2週間にわたってルシフェラーゼの発現が得られた。Naked DNAの遺伝子導入効率を増強するため超音波を併用したが、これだけでは安定した発現増強がえられなかった。そこで造影剤のオプチゾン(Naked DNA溶液と1:1で混合して骨格筋に注入後超音波をかけると約10倍以上の遺伝子発現の増強が得られた。オプチゾン50-75%が最も導入には適していた<sup>1)</sup>。用いた超音波の条件は1 MHz, 2.5 W/cm<sup>2</sup>で1-10分間照射すればほぼ同等導入効率を得られたので、最もダメージの少ない1分間の照射を行うことにした。しかし遺伝子を導入5秒後に超音波処理を行うとこのような効率のよい遺伝子発現が得られたが、超音波処理5秒後に遺伝子を注入すると発現は10%以下に低下した。

- この超音波・造影剤法をマウス胎仔への遺伝子導入に用いた。妊娠13週のICRマウスの子宮内の胎仔の羊水内にガラス微小管を用いて10 µlのNaked DNA/オプチゾン溶液を注入し、子宮外から超音波(4.0 W/cm<sup>2</sup>の強度で2 Hzの超音波を10秒間が最適条件であった)をかけて遺伝子発現をみた。ルシフェラーゼ遺伝子発現は主として胎仔の全身皮膚に認められ、発現レベルはNaked DNAのみ、或いはNaked DNA/超音波の約1000倍であった<sup>2)</sup>。GFP遺伝子発現も導入され、胎仔皮膚に点状に発現が見られた。蛍光オリゴの取り込みも同様であった。羊水中ではなく、胸腔内に導入すると肺と横隔膜に、腹腔内では腸、脳室内導入では脳室周囲に遺伝子発現が認められた。発現は導入後から漸次低下したが、生後1週間まで認められた。この手技による胎仔生存率は50-70%であった。
- 血液中に遺伝子と造影剤を入れ、目的の組織に体外から超音波を当てることにより物理的な標的遺伝子導入を試みた。そのために東芝との共同で集

束型超音波発生装置を開発し、その効果を調べた。現在のところ、1 mlの遺伝子溶液(50%オプチゾン200 µg DNA)を尾静脈から注入し、直後に骨格筋に超音波を当てると骨格筋に遺伝子発現がおこることがわかった。

### 3. 遺伝子発現増強法の開発

RNAを増幅する方法による遺伝子発現の増強系として、SFV replicase vectorを用いて、LacZ遺伝子発現を培養細胞、骨格筋で検討した。BHK-21細胞ではSFV replicase vectorによるLacZ遺伝子発現はreplicaseを用いない場合の約10倍増強された。またマウス骨格筋での発現はSFV replicaseによってやはり約10倍増強された。

### 4. 遺伝子発現の維持法の開発

- EBVレプリコンプラスミド導入による筋肉内でのルシフェラーゼ遺伝子の発現レベルの推移を経時的にフォローした結果、EBレプリコンがあることによって遺伝子発現が導入7日においても導入1日後の発現レベルよりも高く維持された。レプリコンがないと3日目をピークに低下した。サザンブロットを行なってluciferase遺伝子のコピー数の比を比較したところ、導入3日、7日後でともに通常のプラスミドのコピー数が約3倍多かった。
- 培養細胞に導入した場合CMV promoterでドライブされるEBNA-1は元来の弱いプロモーターでコントロールされるEBNA-1と比較して約10倍のEBNA-1の発現増強を可能にした。これらのプラスミドをマウス前頸骨筋に導入してluciferase遺伝子発現を比較した。CMV-EBNA-1のものが、弱いプロモーターでドライブされるEBNA-1をもつluciferase発現EBレプリコンベクターと比較して3-



5倍であった。そこで luciferase 遺伝子のコピー数をサザンプロットで解析したところ、両プラスミド間で有意な差を認めなかった。

### 【考 察】

- 1) エレクトロポレーション法は骨格筋での遺伝子発現の増強に適し、安全性の面からも他の内蔵よりは骨格筋や皮膚等の直接外部からアプローチできる対象が臨床応用にも近いであろう。しかしヒトの場合に最適な条件をとることから始めなければならないと考えられる。大型動物での実験が必要である。

超音波造影法による骨格筋での遺伝子発現増強は可能であるが、メカニズムとしては microbubble の破裂によるエネルギーによって細胞膜に微少な孔があいて遺伝子が注入されるようである。したがって細胞毒性があること、組織の表層のみの遺伝子導入にとどまることなどまだ改良されるべき技術である。胎仔への遺伝子導入は倫理的問題がクリアされねばならず、また現技術では生存率をほぼ 100% にまで改善しないと実用的な技術ではない。しかし胎仔横隔膜への遺伝子導入が可能である点は有用性を認めてもよい。

- 2) SFV replicase vector は骨格筋における遺伝子発現増強には応用可能であるが、replicase と下流の遺伝子の距離がかなり重要なポイントではないかと考えられるデータを得ている。今後の検討課題である。
- 3) EBV レプリコンの長期遺伝子発現は従来は oriP が核マトリックスに結合し、安定化されるためであろうと考えられてきた。しかし今回の実験では EB レプリコンを含まないプラスミドでも安定に（むしろコピー数が多い）核内に存在することがわかった。したがって EB レプリコンの遺伝子発現増強作用は転写活性を高く維持できるようにクロマチン構造を変化させているのではないかとということが示唆される。EB レプリコンをもたないと遺伝子が残っていても転写が不活性化されうると考えられる<sup>3)</sup>。この転写活性化は EBNA-1 の発現量と相関しているようであり、EBNA-1 が oriP に結合することによって転写が活性化できるような構造を維持されるのではないかと推測される。

### 【結 論】

まだ実用性には乏しいが、非ウイルスベクターによる筋肉組織への遺伝子導入・発現技術は着実に改良が重ねられており、今後大型動物での検討を克明に行な

えば臨床応用も近いのではないかと考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound; enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 9: 372-380, 2002.
- 2) Endoh M, Morishita R, Kanzak T, et al: Fetal gene transfer by intra-uterine Shotgun Method (SGM) using microbubble-enhanced ultrasound. *Mol Ther* 5: 501-505, 2002.
- 3) Otomo T, Yamamoto S, Morishita R, et al: EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo : applications to gene therapy for cancer. *J Gene Med* 3: 345-352, 2001.

# 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

西川 元也\*

研究協力者 小林 直樹\*, 岡部 貴幸\*, 枚田 一宏\*, 橋田 充\*, 高倉 喜信\*

## 【緒言】

筋肉は外来性遺伝子の発現が比較的容易であり、プラスミドDNAをはじめとする各種ベクターの注射により簡便に遺伝子発現を得ることができる。また、筋肉細胞は寿命が長いことアデノウイルスベクターなど特に免疫原性の高いベクターを使わない限り遺伝子発現は長期間持続する傾向にある。このような特徴を有する筋肉細胞での遺伝子発現が対象となることから、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の可能性は高いと考えられる。しかしながら、ベクターの筋肉注射による投与では遺伝子発現が投与部位近傍に限局されるため、細胞単位での機能回復が必要と考えられる筋ジストロフィーに対する治療効果はあまり期待できない。筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を実現するためには、多数の筋肉細胞に対して効率的に治療用遺伝子をデリバリーする技術の開発が不可欠である。我々はこれまでに、血管内への大容量プラスミド水溶液の急速投与により血管内圧を一時的に上昇させることで、広範囲の筋肉細胞への遺伝子導入が可能であることを明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。そこで本研究では、血管内へのプラスミドDNA水溶液投与による遺伝子導入において、プラスミドDNAのサイズが及ぼす影響について検討した。また、遺伝子導入の結果産生されるタンパク質に対して動態制御機能を付加し、遺伝子非導入細胞へのタンパク質デリバリーによるタンパク質陽性細胞数の増大を試みた。

## 【方法】

1. プラスミドDNA: CMVプロモータ下にホタルシフェラーゼまたは, farnesyl化シグナルを有する緑色蛍光タンパク質 (EGFP-F),  $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするプラスミドDNAを用いた。細胞浸透ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) として HIV Tatペプチドと HSV VP22タンパク質を選択し, 各配列をベクターに挿入することにより CPP融合 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクターを構築した。また, EGFP-Fをコードするプラスミド

DNA (pEGFP-F; 4.8 kbp) のCMVプロモータの開始点からSV40 pA末尾までをPCRにより増幅し, 1.7 kbpのEGFP-F発現ユニット (EGFPFmini) を作成した (図1)。

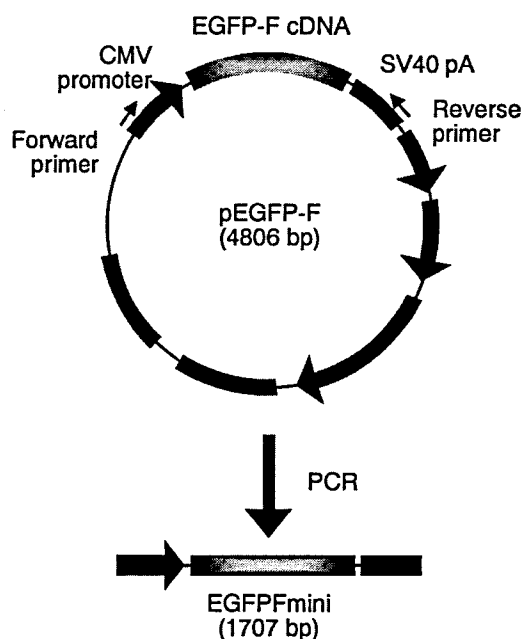


図1 EGFP-FをコードするプラスミドDNA (pEGFP-F) の構造とPCRによるEGFP-F発現ユニット (EGFPFmini) の作成

2. プラスミドDNAの放射標識: プラスミドDNAの構造変化を最小限にし, また細胞内で代謝分解された放射活性を有するDNA分解物の細胞外排出低減を目的に, 新規放射標識法を開発した<sup>3)</sup>。即ち, 第一級アミノ基をもつ4-[p-azidosalicylamido]butylamine (ASBA) と二官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 無水物を予め結合させ, 紫外線照射によりプラスミドDNAに共有結合した。未反応物を除去後, [<sup>111</sup>In]InCl<sub>3</sub>と混和することにより<sup>111</sup>In標識プラスミドDNAを得た。
3. マウス下肢筋肉へのプラスミドDNAデリバリー: マウスを麻酔下開腹し, 大動脈および大静脈を一時的にクランメで遮断することにより血流を一時的に停止させた状態で尾動脈内に2mlのプラスミドDNA水溶

\*京都大学大学院薬学研究科

液を急速（5秒）に投与した。投与15秒後にクランメを外し、腹部を縫合した。一定時間の後に筋肉を回収し、放射活性またはルシフェラーゼ活性を測定した。

4. ハイドロダイナミクス法による肝臓への遺伝子導入：Liuらの方法<sup>9)</sup>に準じ、1.6 mlの生理食塩水に溶解したpEGFP-FまたはEGFPFminiをマウス尾静脈内に急速投与した（ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入）。一定時間後に肝臓を摘出、凍結組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡による観察により遺伝子発現を評価した。また、各種β-ガラクトシダーゼ発現ベクターも同様に投与し、肝臓を摘出後X-galによる組織染色を行った。

## 【結果】

1. 下肢筋肉へのプラスミドDNAデリバリーの定量的評価：静脈内に200μlのプラスミドDNA水溶液を投与した場合には、下肢筋肉での遺伝子発現（ルシフェラーゼ活性）は殆ど認められなかった（図2）。これに対し、2mlの溶液量で同量のプラスミドDNAを投与した場合には高い遺伝子発現が認められた。特に動脈内投与により静脈への投与と比較して約25倍高い遺伝子発現が

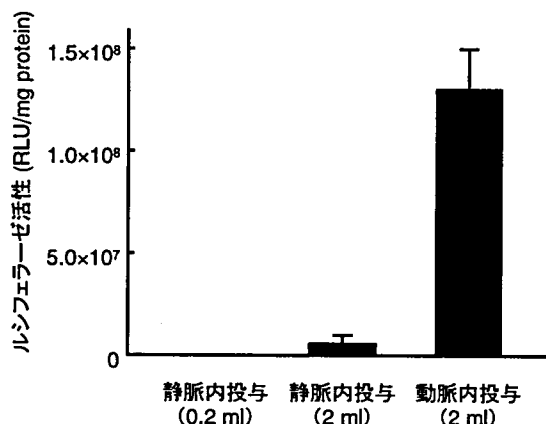


図2 プラスミドDNA水溶液血管内投与後の下肢筋肉での遺伝子発現

得られた。図3に、<sup>111</sup>In標識プラスミドDNAを投与したときの筋肉組織での放射活性の分布を示す。200 μlのプラスミドDNA水溶液投与では下肢筋肉への放射活性の有意な集積は認められず、上肢筋肉とほぼ同程度の低い分布であった。これに対し、2mlの溶液量で動脈内投与した場合には、下肢筋肉全体へのほぼ均一かつ高い分布が得られた。一方、筋肉への遺伝子投与方法として汎用されるプラスミドDNAの筋肉注射後の動態についても併せて検討した。プラスミドDNA水溶液（20 μl）を右腓腹筋に注射したところ、投与筋肉への高濃度な蓄積が認められ、それ以外の筋肉への移行は乏しいことが明らかとなった。

2. PCR断片化による遺伝子発現細胞数の増大：図4に、pEGFP-FまたはEGFPFminiを同じ投与量（8.83 pmol）でマウスに投与したときの肝臓凍結切片の共焦点レーザー顕微鏡像を示す。いずれの場合にも、緑色蛍光を発するEGFP陽性細胞が検出されたが、EGFPFminiを投与した場合（図4B）に、より多くの肝細胞での遺伝子発現が得られる傾向が認められた。

3. CPP融合による遺伝子発現後のβ-ガラクトシダーゼの細胞間分布：ハイドロダイナミクス法により通常のβ-ガラクトシダーゼを発現するpLacZを投与した場合には、これまでの報告<sup>9)</sup>にあるように肝静脈近傍の肝細胞での遺伝子発現が認められた（図5A）。Tatペプチド融合β-ガラクトシダーゼ発現ベクター（pTat-LacZ）の投与により、pLacZの場合とほぼ同様の染色像が得られた（図5B）。これに対し、VP22融合β-ガラクトシダーゼ発現ベクター（pLacZ-VP22）では肝臓がより広範囲に染色され（図5C）、VP22を融合することで遺伝子発現により得られたβ-ガラクトシダーゼが、遺伝子非発現細胞に移行することが示唆された。

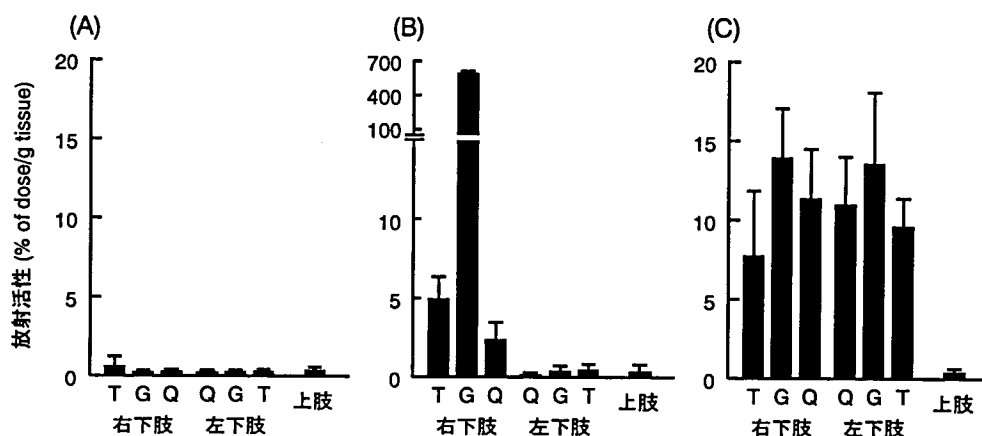


図3 プラスミドDNAの筋肉組織での分布  
(A) 尾静脈内注射 (200 μl), (B) 筋肉注射 (右腓腹筋, 20 μl),  
(C) 大容量動脈内注射法 (2 ml). T, 脛骨筋; G, 腓腹筋; Q, 大腿筋

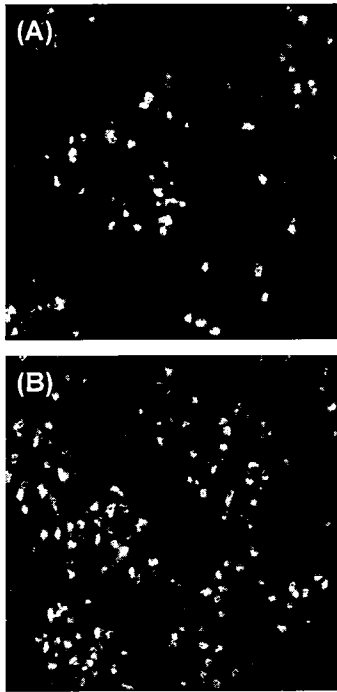


図4 ハイドロダイナミクス法による (A) pEGFP-Fまたは (B) EGFPFmini投与後の肝臓切片の共焦点レーザー顕微鏡像

#### 【考 察】

筋肉への遺伝子導入は、プラスミドDNA、アデノウイルスベクター、AAVベクターなどを組織間隙に注入することで容易に達成可能である。1990年のWolffらによる報告<sup>9)</sup>以来、プラスミドDNAの筋肉注射は筋肉への最も簡便かつ安全な遺伝子導入法として注目されてきた。このときの遺伝子発現効率率はウイルスベクターと比較すると低いものの、これを改善する方法として、投与する溶液組成の選択や投与容積の増加、高分子の添加、エレクトロポレーション・超音波の利用などが検討され、その有用性が報告されている。こうした検討では、遺伝子発現が改善されることに加えて、遺伝子導入細胞数の増大が得られる場合もある。しかしながら、依然として遺伝子発現細胞はプラスミドDNA投与部位近傍に限局される。一方、Phelpsら<sup>6)</sup>は、*mdx*マウスにジストロフィン遺伝子を導入したトランスジェニ

ックマウスにおける検討の結果、筋肉組織の機能回復には、発現の均一性、即ちジストロフィン発現細胞数が重要であることを報告している。また発現量は正常値の20%程度で十分であることを報告している。従って、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の試みにおいては、できるだけ多数の筋肉細胞への遺伝子導入を実現する方法、即ち遺伝子デリバリーシステムの開発が重要であると考えられる。

我々はこれまでに、プラスミドDNAを血管内に投与することで、マウス骨格筋あるいは横隔膜細胞に対して効率良く遺伝子導入が可能であることを報告してきた<sup>12)</sup>。しかしながら、筋肉組織の血管は連続内皮で構成されることから、巨大分子であるプラスミドDNAは生理的条件下では殆ど透過できない。しかしながら、今回の検討から、一時的に血管内圧を上昇させることでプラスミドDNAを筋肉組織にデリバリー可能であり(図3)、さらには遺伝子発現が得られることが明らかとなった(図2)。血管壁や細胞膜を介する物質の透過現象は通常分子サイズに依存し、小さいものほど透過に適していることが考えられる。本研究では、肝臓を標的とした遺伝子導入法であるハイドロダイナミクス法を用い、DNAサイズを小さくすることによる遺伝子導入細胞数増大について検討した。4.8 kbpのプラスミドDNAに対し、1.7 kbpのDNA断片とすることで遺伝子発現細胞数が増大する傾向が認められ、遺伝子発現に至る過程においてDNAサイズを小さくすることの有用性が示唆された。ジストロフィンには現在知られるタンパク質の中で最も長い遺伝子にコードされたタンパク質であり、そのcDNAだけでも14 kbpと非常に長い。従って、全長ジストロフィンcDNAを含有するプラスミドDNAは通常17 kbp程度になる。一方、ベクターサイズの限界から、AAVベクターなどへのジストロフィンcDNAの組み込みにおいては、ロッドドメインを短縮したマイクロ、ミニジストロフィンが開発されている<sup>7)</sup>。プラスミドDNAをはじめとする非ウイルスベクターによる遺伝子導入法は、用いる遺伝子サイズに制限がな

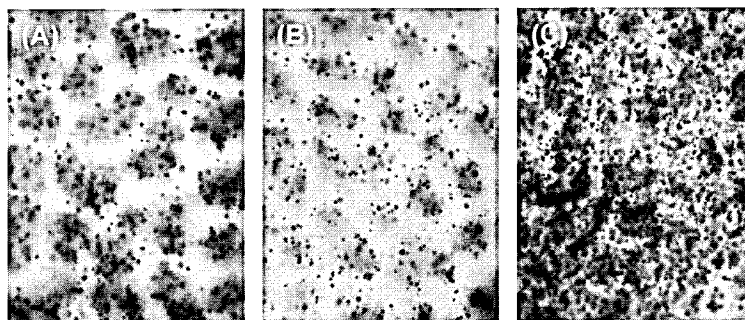


図5 ハイドロダイナミクス法による (A) pLacZ, (B) pTat-LacZ, (C) pLacZ-VP22投与後の肝臓X-gal染色像

いことが利点の一つとされるが、本研究の結果から、デリバリー効率を考慮した場合には非ウイルスベクターによる遺伝子導入においても短縮化ジストロフィンの利用についての検討が必要であると考える。

非常に効率的な遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法による肝臓への遺伝子導入においても、遺伝子導入可能な細胞は約40%であるとされる<sup>1)</sup>。下肢筋肉への遺伝子導入においては2mlと非常に多い溶液量を用いているにも関わらず、遺伝子発現細胞数は肝臓と比較すると少ない。本研究では、DNAサイズを小さくすることによる遺伝子デリバリーの改善に加え、発現により得られるタンパク質を遺伝子非発現細胞にデリバリーすることで、ジストロフィン陽性細胞数を増大することを試みた。これまでにCPPと総称される多数のペプチドが報告され、*in vitro*ならびに*in vivo*実験からこれらが高い細胞膜透過能を有することが証明されている<sup>8)</sup>。また、タンパク質あるいはプラスミドDNA複合体にCPPを結合することで、これら高分子の細胞内デリバリーが達成できることも示されている。しかしながら、*in vivo*において、遺伝子発現の結果得られたCPP融合タンパク質が、細胞外、さらには別の細胞内へ移行するかについては明らかではない。我々は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをモデル細胞質局在タンパク質として用いた検討から、HSV VP22を $\beta$ -ガラクトシダーゼに融合することで、ハイドロダイナミクス投与後の肝臓においてより多くのX-gal陽性細胞を得ることに成功した(図5)。一方、HIV Tatペプチドを用いた場合には同様の効果は得られなかった。TatのCPP配列中には核移行シグナルも含まれることから、細胞内に存在するTat融合 $\beta$ -ガラクトシダーゼの細胞外移行は生じにくいものと推察される。VP22には核移行特性はないことから<sup>9)</sup>、細胞外への移行が促進されたものと考えられる。今後は、ジストロフィンにこのアプローチを応用し、細胞膜への移行なども含めた解析を検討する予定である。

### 【結 論】

ジストロフィン陽性筋肉細胞数を増大するためには、血管内にプラスミドDNA水溶液を投与することが有効であり、投与するDNAサイズを縮小することでさらなる改善が可能であることを示した。また、HSV VP22の利用により、遺伝子非発現細胞へのタンパク質デリバリーが可能であることを明らかにした。本研究で用いたアプローチは、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療においてジストロフィン陽性細胞数を増大するための有効なテクノロジーになるものと考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Liu F, Nishikawa M, Clemens PR, et al: Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd<sup>mdx/mdx</sup> mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* 4: 45-51, 2001.
- 2) Liang KW, Nishikawa M, Liu F, et al: Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther* (in press).
- 3) Nishikawa M, Nakano T, Okabe T, et al: Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study. *Bioconjug Chem* 14: 955-61, 2003.
- 4) Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6: 1258-66, 1999.
- 5) Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1465-8, 1990.
- 6) Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, et al: Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum Mol Genet* 4: 1251-8, 1995.
- 7) Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, et al. Microdystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1265-72, 2002.
- 8) Langel U: *Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications*, Florida: CRC Press LLC, 2002.
- 9) Elliott G, O'Hare P: Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-33, 1997.

# RNAiを用いた疾患モデル動物の作出に向けた基礎的研究 —C2C12細胞を用いたRNAi誘導とその効果—

北 條 浩 彦\*

研究協力者 左合 典子\*\*

## 【緒 言】

遺伝性筋疾患をはじめ様々な遺伝性疾患の病態解明そして治療法の確立のために、それらの疾患に対するモデル動物やモデル細胞の利用は不可欠であり、そしてそのはたす役割は非常に大きい。しかしながら、有用な疾患モデル動物・細胞を作出するためには非常に多くの時間と労力を費やさなければならないのが現状である。また、多くの疾患がそうであるように複数の遺伝因子が疾患と関連していた場合、それらを従来の方法を使ってモデル動物・モデル細胞を作出すれば、さらに膨大な時間と労力を要するのは必至である。よって、従来のモデル動物・モデル細胞作出技術に代わる簡便な手法の確立は、より複雑な疾患に対する有用なモデル動物・細胞作出に大きく貢献すると考えられる。

近年、最も注目されている生体内現象の中にRNA interference (RNAi; RNA 干渉) が挙げられる。これは、二本鎖RNAによって引き起こされる配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制現象であり、哺乳動物細胞をはじめ様々な生物種で観察されている。この不思議な現象が報告されたのは、わずか5年前(1998年)のことであり<sup>1)</sup>、その分子メカニズムについてはまだ十分理解されてはいない。しかしながら、今日、すでに様々な分野で簡便な遺伝子ノックダウン方法として利用されている。

今回我々は、このRNAiに着目し、そのRNAi誘導技術を用いた遺伝子ノックダウン方法によって遺伝性筋疾患に対する疾患モデル動物・モデル細胞を作出するための基礎的研究を行った。

## 【方 法】

### 1. マウス長指伸筋からの筋線維単離

すでに報告されている手法に従って<sup>2)</sup>、ICRマウス下肢から長指伸筋を摘出し、コラゲナーゼ処理によって筋線維を解し、筋線維を単離した。単離した筋線維は、10%ウマ血清を含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 内で37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。プラスミド

DNA、合成siRNAを用いたトランスフェクションは、単離後2~3時間以内に行った。

### 2. C2C12細胞の培養と分化誘導

筋管細胞への分化能をもつマウス筋芽細胞由来株C2C12細胞は、growth medium (GM) [15%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含むDMEM] を用いて未分化状態で増殖培養し、筋管細胞へ分化誘導する場合は、Differential medium (DM) [5%ウマ血清を含むDMEM] を用いて培養を行い、筋管細胞に分化させた。

### 3. レポーター遺伝子と合成 small interfering RNA (siRNA) を用いたRNAi誘導

ホタル・ルシフェラーゼレポーター遺伝子に対する21塩基のRNAオリゴヌクレオチド(siRNA)を合成し、熱変成—アニーリングによって二本鎖のオリゴヌクレオチド二量体 (siRNA 二量体) を形成させた。そのsiRNA二量体とホタル・ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドDNA、pGL3 (プロメガ社)、そしてコントロール遺伝子としてウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドDNA、phRL-TK (プロメガ社) をリポフェクタミン2000試薬 (インビトロジェン社) によって細胞内に共トランスフェクションした。その後、それぞれの実験で示す時間や時期に、細胞抽出液を調整し、デュアル・ルシフェラーゼアッセイ法を用いてルシフェラーゼの活性を測定し、RNAiによるホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果を調べた。

### 4. RNA抽出とRT-PCR

TRIZOL 試薬 (インビトロジェン社) を用いて、マウス各組織そしてC2C12細胞から全RNAを抽出した。そして、得られたRNAを鋳型にオリゴdTと逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、PCR法によって遺伝子発現を調べた (RT-PCR)。正確な発現量を調べるために、

\*国立精神・神経センター神経研究所

\*\*東京大学大学院医学系研究科

PCRにはABI PRISM 7000によるリアルタイムPCR法を用いて解析を行った。

### 【結果・考察】

二本鎖RNAによるRNAiの誘導過程において、Dicerと呼ばれるRNase III様のリボヌクレアーゼが重要な働きをすることがすでに知られている。Dicerは長い二本鎖RNAを切断し21～25 bpのsiRNA二量体を生じさせ、そして、その切断されたsiRNA二量体がRNA-induced silencing complex (RISC)に取り込まれて配列特異的なRNAiメダイエーターとして機能する。興味あることに、骨格筋組織においては、このDicer遺伝子の発現量が特に少ないことがノーザンブロットやRT-PCR法を用いた解析で知られている<sup>34)</sup>。

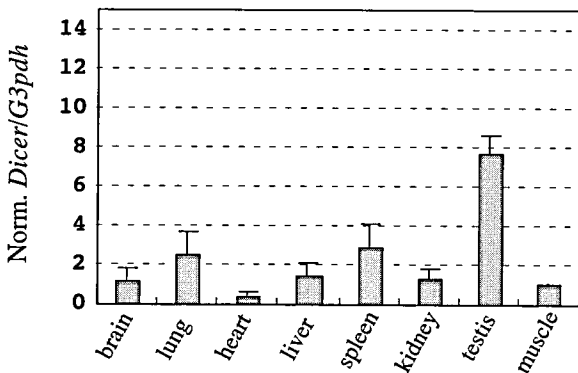


図1 各組織におけるDicerの発現量

我々は、まず始めに、マウス各組織間におけるDicer遺伝子の発現量の違いについて検討を行った。マウス各組織より全RNAを抽出し、RT-リアルタイムPCR法によってDicerそしてコントロール遺伝子としてG3PDHの発現量を調べた。その結果、骨格筋と心筋組織においてDicerの発現量が他の組織に比べてはるかに低いことが示された(図1)。この結果は従来の結果と一致し、筋肉系の細胞・組織においてDicer遺伝子の発現が低下していることを示唆している。さらに我々は、RISC複合体に関わる遺伝子、eIF2C1～4遺伝子<sup>9)</sup>についても各組織間での発現量の違いを調べた。その結果、驚くべきことに、eIF2C1～4遺伝子もDicer遺伝子と同様に、骨格筋、心筋組織においてそれらの発現量が他の組織と比べて明らかに低いことが示された(図2)。これらの結果から、次のような疑問が挙げられる：RNAiに関わる遺伝子の発現量が少ない筋肉細胞・組織において、実際にRNAiが誘導されるのであろうか？この疑問に答えるために、我々は、マウス下肢より長指伸筋を摘出し、そこから筋線維を単離した。そして、その筋線維に合成siRNAを用いてRNAiを誘導し、RNAi活性が見られるか否かについて検討を行った。

単離した筋線維に、レポーター遺伝子であるホタル・ルシフェラーゼ (Photinus luciferase) 遺伝子に対する19塩基対の合成siRNA二量体<sup>6)</sup>とホタル・ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドDNA (pGL3) としてコントロール遺伝子としてウミシイタケ・ルシフェ

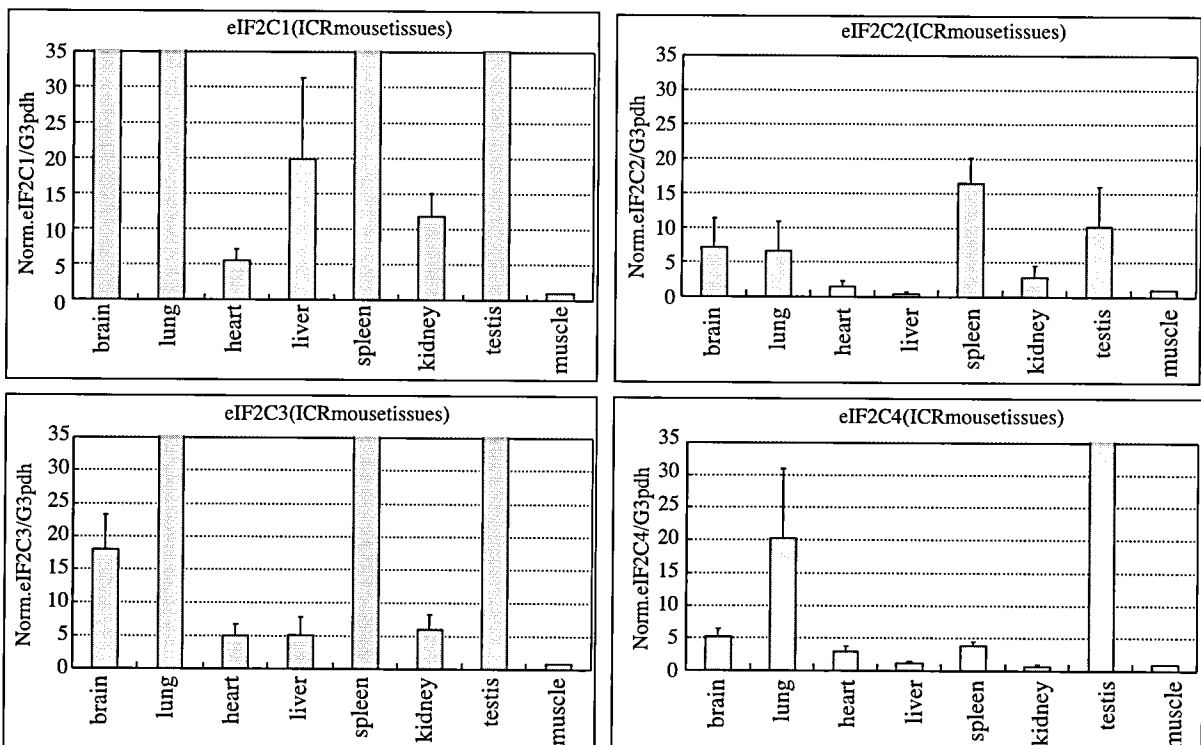


図2 遺伝子発現プロファイル

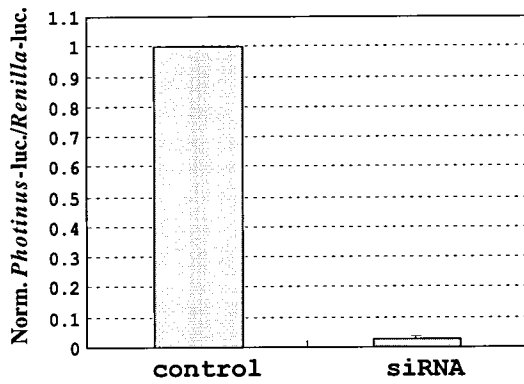


図3 筋線維におけるRNAi誘導

ラーゼ (Renilla luciferase) 遺伝子をコードするプラスミドDNA (pRL-TK) を共トランスフェクションし、24時間後、ルシフェラーゼの活性を測定してRNAiによるホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を解析した。その結果、図3に示すように、強いホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制が観察され、筋肉細胞・組織におけるRNAiの誘導・活性機構の存在が確認された。

次に、筋管細胞への分化過程におけるRNAiの特徴・性質を調べるために、マウス筋芽細胞由来株C2C12細胞を用いたRNAi誘導実験を行った。まず、分化過程におけるDicer, eIF2C1~4遺伝子の発現プロファイルを上記と同じ方法によって解析した。その結果、未分化細胞から筋管細胞に分化するに伴って、Dicer, eIF2C1~3遺伝子の発現が減少することが観察され、そして、骨格筋組織に近い発現プロファイルが示された。eIF2C4遺伝子発現については、未分化、分化細胞でほとんど差がなく、発現量は骨格筋組織と同じであった。このC2C12細胞にRNAiを誘導し、同時に筋管細胞への分化誘導を行うと、強いRNAi活性が誘導後一週間ほど観察され、その後、徐々にその活性が失われていった(図4)。この活性の低下が、上記で示したDicer, eIF2C1~4遺伝子発現の減少に伴うRNAi誘導・活性

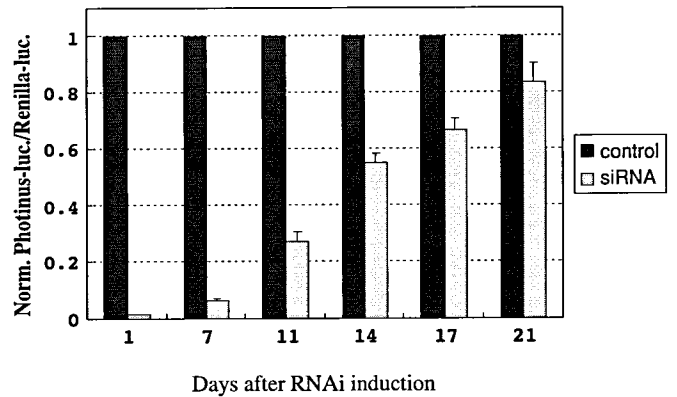


図4 C2C12細胞分化誘導に伴うRNAi活性の変化

機構の喪失によるものなのか否かを確認するために、筋管細胞分化後にRNAiを誘導し、その活性の有無を調べた。その結果、図5に示すように、筋管細胞分化後も強いRNAi活性が観察された。これらの結果から、上記のRNAi活性の低下について一つの可能性が考えられる。すなわち、細胞内に成立した活性型のRISCの安定性が時間の経過と共に徐々に失われていったと考えられる。分化したC2C12筋管細胞と同様に細胞分裂を停止した神経細胞内にRNAiを誘導した場合、その活性は少なくとも3週間にわたって持続する<sup>7)</sup>。これら二つの細胞種でのRNAi活性の違いは、活性型RISCの安定性が細胞種・組織ごとに異なる可能性を示唆している。

最後に、内在性遺伝子をターゲットとしたRNAiによる遺伝子ノックダウンを試みた。ターゲットとして選んだ内在性遺伝子はDystrobrevin-alpha (DtnA) と -beta (DtnB) 遺伝子で、それぞれの遺伝子に対して合成siRNA二量体を設計しRNAiによるノックダウン実験のメディエーターとして用いた。合成siRNA二量体を未分化C2C12細胞に導入し、48時間後に全RNAを抽出し、RT-リアルタイムPCR法によってターゲット遺伝子の発現量を解析した。その結果、約50%の遺伝子ノックダウン効果が見かけ上観察された(図6)。しかしながら、この結果には、siRNAの細胞内への導入効率に疑問が

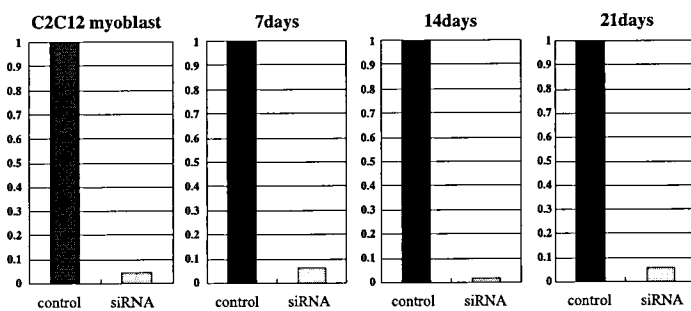


図5 C2C12細胞分化後におけるRNAi誘導

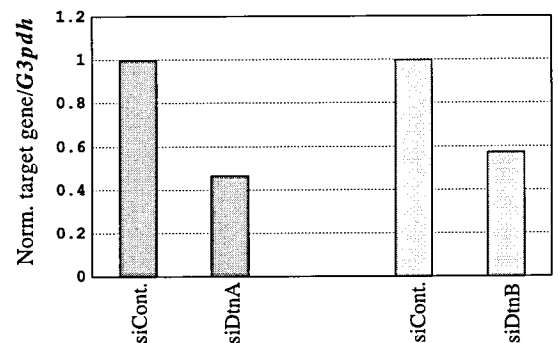


図6 RNAiによる内在性DtnA, DtnB遺伝子ノックダウン



あり、効率の良い siRNA 導入法が今後の重要な課題になると考える。

#### 【結 論】

本研究によって、RNAi 誘導・活性に関わる重要な遺伝子 (Dicer や eIF2C1 ~ 4 遺伝子) の発現が少ない筋肉細胞においても、RNAi が正確に誘導され、強い活性を示すことが実証された。この成果は、RNAi を応用した様々な遺伝性筋疾患モデル動物・モデル細胞の作出の可能性をさらに高め、それらのモデルを用いた新規治療法・治療薬の開発の実現化を期待させると考える。

#### 【参考文献】

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al: Protein and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-11, 1998.
- 2) Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, et al: Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vivo Cell Dev Biol Anim* **31**: 773-9, 1995.
- 3) Matsuda S, Ichigotani Y, Okuda T, et al: Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochi Biophys Acta* **1490**: 163-9, 2000.
- 4) Nicholson RH, and Nicholson AW: Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* **13**: 67-73, 2002.
- 5) Doi N, Zenno S, Ueda R, et al: Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol* **13**: 1-20, 2003.
- 6) Hohjoh H: RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS lett* **521**: 195-9, 2002.
- 7) Omi K, Tokunaga K and Hohjoh H: Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS lett* (in press).

## Ⅱ．幹細胞を用いた移植治療法の開発

# 骨格筋組織幹細胞移植治療に関する基礎的研究

橋本有弘\*

研究協力者 稲川 匡代\*, 梅田 理恵子\*

## 【緒言】

筋疾患の治療法として筋芽細胞移植の有効性が検討され、臨床応用も試みられてきたが、その有効性は未だ確認されていない(図1)。筋細胞移植治療の有効性を、移植細胞の「質」という面から再度検討する必要がある。また、実験動物に由来する筋細胞に比べ、ヒト筋細胞の性質については不明の点が多い。筋疾患に対する細胞移植治療法を確立するためには、ヒト筋衛星細胞およびそれに由来する筋細胞の性質を解明する必要がある。

本研究は、マウス筋衛星細胞の初代培養法を基盤として、ヒト筋衛星細胞の初代培養法を確立し、「筋疾患に対する幹細胞移植治療法」開発のための基盤となるヒト筋衛星細胞の性質解明をめざす。

## 【方法】

### ①ヒト筋衛星細胞由来筋細胞の分離・培養

女性患者(44歳)乳ガン切除後の形成手術の際に生じた余剰筋組織(背部骨格筋)は、神奈川がんセンターにおいて、患者の承諾(インフォームド・コンセント)を確認後、実験に供した。筋組織を細切後、細胞分散液(0.025% V型コラゲナーゼV, 0.125% トリプシン)処理し、得られた単離細胞を、初代培養筋細胞用増殖培地(pmGM, 20% FCS, 2% Ultraser G in hDMEM)に懸濁後、タイプIコラーゲンでコートした100-mm培養皿に播き、10%炭酸ガス存在下、37℃で培養した。

### ②ヒト筋衛星細胞由来筋細胞クローンHu5の培養

ヒト初代培養筋細胞より単一細胞由来のクローンHu5を分離し、解析に用いた。Hu5は $2 \times 10^5$ 細胞をタイ

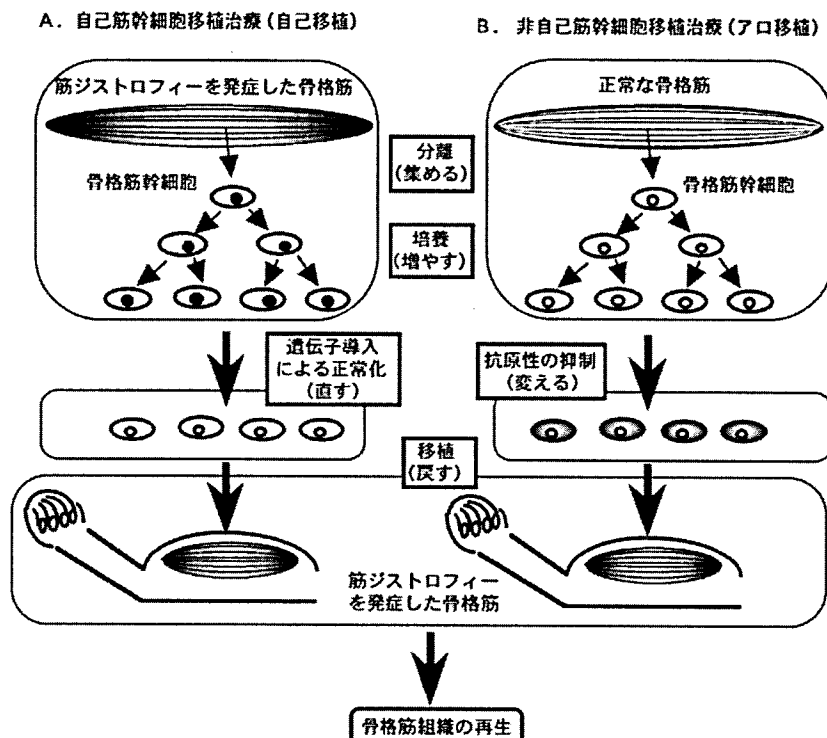


図1 筋細胞移植治療のアウトライン

筋細胞移植治療としては、患者筋組織より分離・培養し、遺伝子導入によって機能を正常化したのち(exo vivo 遺伝子治療)、患者筋組織へ移植する「自己細胞治療」と、正常筋組織から得られた筋細胞を患者組織へ移植する「アロ移植治療」が考えられる。自己細胞移植の場合ですら、筋組織に移植された筋細胞のほとんどは、移植後24時間以内に死滅すると報告されており、その克服が必須の課題となっている。さらに、アロ移植においては移植免疫反応の抑制が必要になる。

プIコラーゲンでコートした100-mm培養皿に播き、pmGM中で10%炭酸ガス存在下、37°Cで培養した。

### ③ Hu5の培養下における分化誘導

Hu5に筋分化を誘導する場合は、培養開始24時間後に培地を「初代培養筋細胞用分化培地 (pmDM; 2% FCS, 5 µg/ml holo-transferrin, 10 µg/ml insulin, 10nM selenite in hDMEM)」に交換し、培養した。骨分化を誘導する場合は、培養開始40-48時間後に培地を「10% FCS, 10mM βGPin DMEM」に交換し、培養した。

### ④ヒト・ディシェンヌ型筋ジストロフィー筋組織の解析

ディシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) と診断された生後4カ月および5カ月の男児の上腕二頭筋より摘出された筋組織の凍結切片を作製し、抗体染色および組織化学的検索に供した。インフォームド・コンセントは国立精神・神経センターにおいて確認された。

## 【結果】

### ① Hu5の増殖・分化能

Hu5は約20時間の倍加時間を示したが、継代数が10代を越えると急激な増殖低下を示した。Hu5は高密度で培養すると、pmGM中でも筋管細胞を形成した。また、セミコンフルエントになった時点で、培地をpmDMに交換すると速やかに筋管細胞を形成した。これらの筋管細胞はMHCを発現していることがと特異抗体法を用いて確かめられた (図2)。

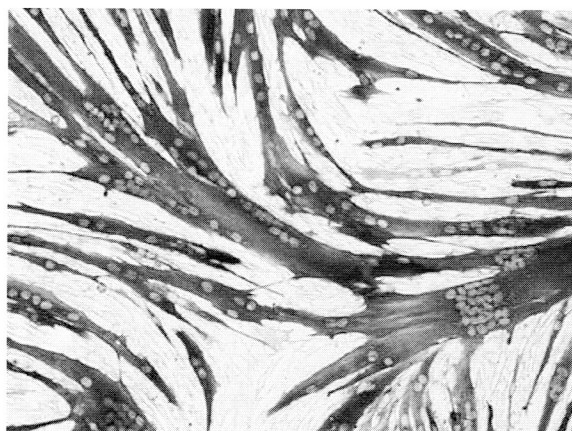


図2 ヒト初代培養筋細胞クローンHu-5の筋分化  
Hu-5はコンフルエントな状態で放置すると、増殖培地中でも互いに細胞融合し、発達した筋管細胞に分化する。分化した細胞は、ミオシン重鎖を発現している。

### ② Hu5における筋細胞系譜マーカーの発現

蛍光抗体法を用いて検討した結果、未分化Hu5はMyoD, PAX7, nestin, desminという筋細胞系譜のマーカータンパク質を発現していることが明らかになった。また、筋分化マーカーであるサルコメリック・ミオシン重鎖 (MHC) の発現は見られなかった。

### ③ Hu5における骨分化マーカーの発現

Hu5は骨分化決定因子Runx2を発現していることが、蛍光抗体法およびRT-PCR法によって示された。さらに、Hu5は未分化増殖状態にあるにもかかわらず、骨芽細胞の初期マーカーである骨型アルカリ性フォスファターゼ (ALP) を発現していることが、特異抗体による染色によって明らかになった (図3)。

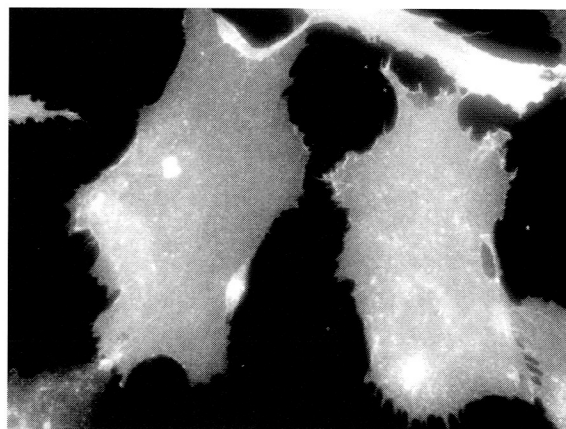


図3 ヒト初代培養筋細胞クローンHu-5における骨型アルカリ性フォスファターゼの発現

未分化なHu-5は、BMP2非存在化で、既に骨芽細胞のマーカーである骨型アルカリ性フォスファターゼを発現している。

### ④骨分化能の検討

Hu5をβグルセロリン酸 (βGP) 存在下で培養すると、細胞周囲にカルシウム (リン酸カルシウムと推測される) を蓄積し、骨最終分化が誘導された。カルシウム沈着はBMP2刺激がなくとも、βGP単独で誘導された。

### ⑤ Hu5の不死化

Hu5を不死化するために、ヒト・テロメラーゼ遺伝子およびヒト・パピローマ初期遺伝子E7を導入した。両遺伝子を導入されたHu5細胞は、継代数80以上、集団倍加数200以上に渡って培養・維持することができた。また、これらの細胞は筋分化能を保持していることが確認された。

### ⑥ DMD筋組織における骨芽細胞マーカーの発現

DMD筋組織において再生筋繊維がALP活性を示すことが知られている (図4)。骨型ALP特異的抗体を用いた免疫染色によって、このALP活性は骨型ALPの発現によるものであることが明らかになった (図5)。また、DMD筋組織において、骨型ALPを発現するPax7陽性の筋前駆細胞が同定された。

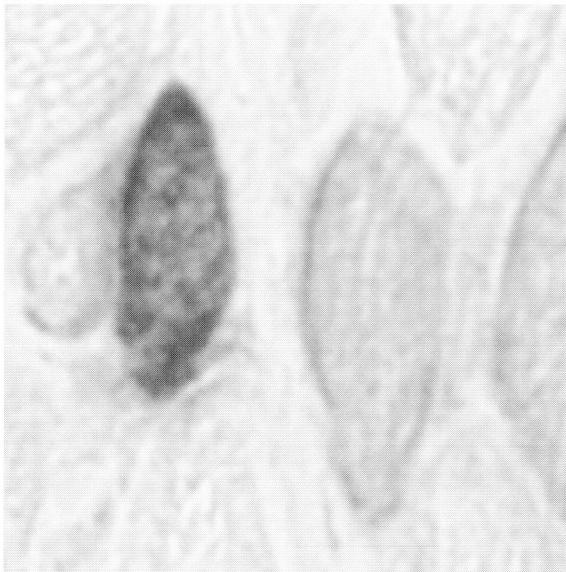


図4 ヒト再生筋繊維におけるアルカリ性フォスファターゼ活性

ヒト・ディシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋組織中に見られる再生筋繊維は、アルカリ性フォスファターゼ活性を示す。Fast Blue RRを用いた組織化学法によってアルカリ性フォスファターゼ活性を検出した。

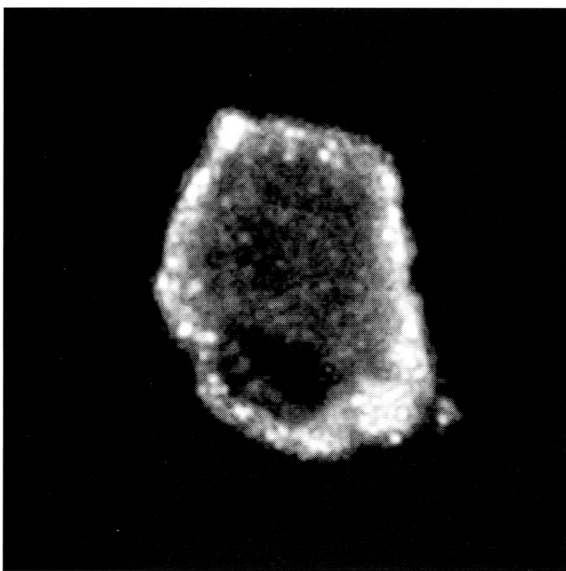


図5 ヒト再生筋繊維における骨型アルカリ性フォスファターゼ発現

ヒト・ディシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋組織中に見られる再生筋繊維は、骨型アルカリ性フォスファターゼを発現している。モノクローナル抗体による蛍光染色像を示す。

### 【考 察】

私達は先に確立したマウス筋衛星細胞の初代培養系における成果を基盤として、ヒト骨格筋細胞の初代クローン培養に成功した。得られたヒト筋細胞クローンHu5はマウス筋細胞と同様に、筋分化能のみならず骨分化能をも保持していた。さらに、Hu5はBMP2非依存的に骨型ALPを発現することが明らかになった。また、

ヒトDMD筋組織において、再生筋繊維が骨型ALPを発現していること、骨型ALP陽性の筋前駆細胞が存在することが判明した。以上の結果は、in vitroのみならずin vivoにおいても、ヒト筋サテライト細胞系譜では、骨芽細胞マーカーの発現が誘導されることを示している。これはマウス、ラットでは見られない現象であり、ヒト筋細胞がヒト固有の性質を有していることを示唆している。本研究において確立された不死化ヒト筋細胞は、ヒト筋細胞の性質解明のためにきわめて有効な実験系を提供するものと期待される。

### 【結 論】

私達はヒト骨格筋より筋細胞クローンを分離・増殖させる条件を確立した。解析の結果、ヒト初代培養筋細胞は、マウス筋細胞には見られない特有の性質を有するものと考えられた。さらに、分化能を保持したまま、ヒト筋細胞を不死化することに成功し、ヒト筋細胞の性質解明に資する、新たな実験系を樹立した。

### 【謝 辞】

ヒト筋細胞の分離に関しては、神奈川癌センター 安本茂 先生、清水調 先生、ヒト筋細胞の不死化に関しては国立癌センター 清野透 先生、ヒト・ディシェンヌ型筋ジストロフィー筋組織の解析に関しては、国立精神・神経センター 埜中征哉 先生、後藤雄一 先生との共同研究の成果である。共同研究者の皆様へ深く感謝申し上げます。

### 【参考文献】

1. Wada M R, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, et al: Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* **129**: 2987-2995, 2002.
2. Hashimoto N, Ogashiwa M: Isolation of a differentiation-defective myoblastic cell line, INC2, expressing muscle LIM protein underdifferentiation-inducing conditions. *Dev Growth Differ* **39**: 363-372, 1997.

# 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

山 元 弘\*

研究協力者 深田 宗一\*\*、樋口 才飛\*、瀬川 将司\*、幸田 健一\*、山本 有希子\*  
辻川 和丈\*、湯浅 勝敏\*\*、上住 聡芳\*\*、鈴木 友子\*\*、武田 伸一\*\*

## 【緒 言】

ほ乳動物の骨髄中には、様々な血液細胞に分化し得るいわゆる造血系幹細胞が存在する。しかし近年、造血細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、血管細胞、肝臓細胞はじめ、心筋細胞や骨格筋細胞に分化できる細胞も骨髄中に存在することが明らかにされ、骨髄移植法により様々な疾患を治療できる可能性が示唆されるようになった。Ferrariらは、免疫能を欠損したマウスに筋再生を誘導し、同時に骨髄細胞を移植すると骨髄由来細胞が再生筋中に見つかること<sup>1)</sup>、また Gussoniらは、放射線照射した *mdx* マウスに骨髄移植することで、ジストロフィン陽性の筋が再生することを報告し<sup>2)</sup>、骨髄移植による筋ジストロフィーの治療法が一躍注目を集めるようになった。われわれは、標識マーカーとして GFP 遺伝子を導入したマウスを用いて、骨髄細胞移植による筋再生のための新しい再構築実験系の確立を試み、これまでの報告を検証するとともに、より効率のよい移植法を目指して筋ジストロフィー治療のための基礎的研究を進めた<sup>3)</sup>。また筋衛星細胞を認識するモノクロナル抗体を作成し、筋衛星細胞の性格付けを行った<sup>4)</sup>。さらに、筋再生過程での炎症性細胞の役割についても検討し、いくつかの興味深い知見を得た。

## 【方 法】

### 1. 骨格筋の再生に関する検討

岡部ら<sup>5)</sup>により開発された GFP 遺伝子導入マウスを、正常 C57BL/6 マウスと交配し、GFP 陽性マウスを選び、ドナー細胞を調製した。ドナー細胞には、成骨髄細胞、あるいは胎齢 14-15 日の胎児肝臓細胞を用いた。実験動物中央研究所から恵与された *mdx* マウスは、自家繁殖して用いた。

キメラマウスは、2 種類の方法で作成した。一つは 10 Gy のガンマ線照射したマウスにドナー細胞を移植する放射線キメラ法と、もう一つは妊娠マウスにブスルファンを腹腔内投与し、出生後に骨髄細胞もしくは胎児肝臓細胞を投与する新生児キメラ法を用いた<sup>3)</sup>。一定

期間後、宿主マウスにカルジオトキシン (CTX) を投与した後骨格筋を採取し、GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。宿主マウスを *mdx* とした時は、CTX 無処理で観察した。

### 2. 筋衛星細胞特異的モノクロナル抗体の作成

筋前駆細胞を選択的に濃縮する手法を確立するため、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞をラットに免疫し、モノクロナル抗体を得た。抗体は、C2C12 細胞に対する反応性を基礎に選択し、その後組織化学的検索により選別した。その結果、マウス筋衛星細胞を認識するモノクロナル抗体 SM/C2.6 を得た。SM/C2.6 反応性細胞をセルソーターにて分別採取し、培養や移植による筋分化能の検討、さらに細胞表面マーカー抗原を解析した。

### 3. 筋再生過程における炎症性細胞の解析

正常 C57BL/6 マウス前脛骨筋に CTX を投与し、経時的に筋を組織化学的に解析した。筋再生時のマクロファージの機能を調べるために、*op* (osteopetrosis) マウスを *mdx* マウスと交配し、*op/op mdx* およびそのパートナー遺伝子型マウスを得た。これらにエバンスブルー (EBD) を投与し、筋組織から EBD を回収してその濃度を定量した。

## 【結 果】

### 1. 骨髄細胞移植、胎児肝臓細胞移植による筋再生効率の比較

放射線キメラマウス、新生児キメラマウスいずれの場合も、頻度は低いけどドナー細胞由来の GFP 陽性筋が見つかった。また新生児キメラマウスの場合、ドナー細胞が筋衛星細胞として骨格筋内に存在した<sup>3)</sup>。

前脛骨筋の全筋繊維のうち、GFP 陽性繊維がどれほど認められるかを算出したが、ドナー細胞が再生に参加する割合は、多くてもたった 3% 弱にしか過ぎず、単純な細胞移植法では機能的な筋を再生することは非常に難しいことがわかった<sup>3)</sup>。しかし、骨髄細胞と胎児

\*大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野

\*\*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

肝臓細胞の再生筋への寄与率を移入した細胞数で比較すると、胎児肝臓細胞をドナーとしたときの方がはるかに優れていることがわかった (図 1)。

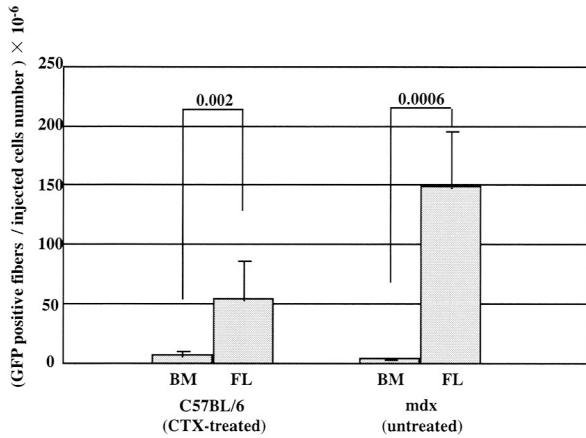


図 1 細胞移植による筋再生の効率比較  
投与した細胞 (骨髄細胞, 胎児肝臓細胞) 当たりの GFP 陽性繊維数を算出した. 正常 C57BL/6 マウスを宿主として CTX 処理により筋再生を誘導した場合 (左), mdx マウスを宿主として, CTX 処理無しで自然な筋再生を観察した場合 (右) を示した. ドナー細胞としての成マウス骨髄細胞 (BM) と胎児肝臓細胞 (FL) を比較すると, 明らかに胎児肝臓細胞が優れていることがわかる.

## 2. SM/C2.6 抗体を用いた筋衛星細胞の単離濃縮

モノクロナル抗体のうち, SM/C2.6 抗体が筋衛星細胞を認識していることが示唆された (図 2 A - C). 筋線維培養法 (single fiber culture) で調べると, 線維に付着した単細胞が染色できた (図 2 D). さらに骨格筋から単細胞分画を採取し, SM/C2.6 抗体を用いて精製した細胞を培養すると, desmin 陽性の筋管を形成し (図 2 E), なおかつ筋管には MyoD 陽性の核が認められた (図 2 F). SM/C2.6 抗体を用いて GFP マウス骨格筋から精製した細胞を mdx マウス前脛骨筋内に移植し, 精製細胞の筋分可能を調べたところ, 投与局所に中心核を持った GFP 陽性の再生筋線維が認められた (図 2 G, H).

以上の事実を総合すると, SM/C2.6 抗体は筋衛星細胞を認識し, かつ筋衛星細胞を単離精製することを可能にする新規モノクロナル抗体であることがわかった. そこで次に, 筋衛星細胞が持つ細胞表面抗原マーカーの検索を試みた. まず SM/C2.6 抗体が, 筋衛星細胞が持つ既知の細胞表面分子を認識しているかどうかを確認する目的で two-color flow cytometry 法で調べ, M-cadherin や c-met (HGF-受容体) ではないことを明らかにした (データ省略). さらに, 筋衛星細胞は c-kit,

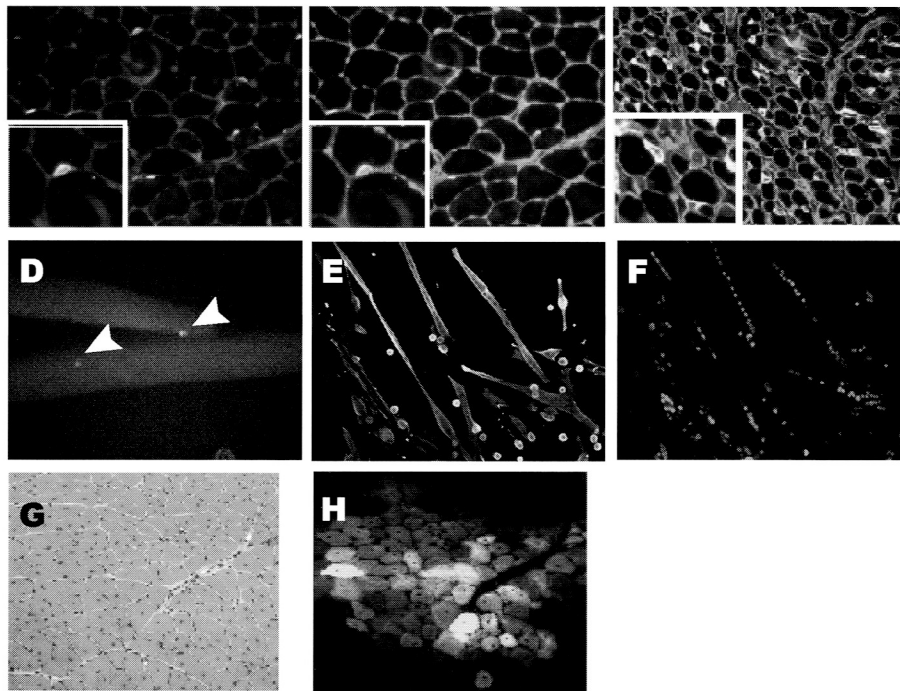


図 2 新規モノクロナル抗体 SM/C2.6 の反応性と筋衛星細胞の性格付け

- A : SM/C2.6 抗体で成マウス骨格筋を染色した.
- B : A と同一切片のラミニンと DAPI の二重染色.
- C : 新生時期マウス骨格筋の SM/C2.6 抗体染色 (ラミニン, DAPI との三重染色).
- D : 成マウス骨格筋繊維培養時の SM/C2.6 抗体染色. 矢頭の位置に陽性細胞が見つかる.
- E : SM/C2.6 抗体を用いてセルソーターで単離精製した筋単核細胞を, いったん増殖させた後分化培養系に移した. desmin 染色.
- F : E と同一集団の MyoD 染色.
- G : SM/C2.6 抗体で精製した GFP マウス由来筋単核細胞を mdx マウスに移植し, 筋組織を調べた. H-E 染色.
- H : 再生筋繊維が発現する GFP 蛍光 (G と同一切片).

Sca-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>であることがわかった (図3). Hoechst 33342 dye-staining test による解析で, 筋衛星細胞は main population (MP) に含まれ, side population (SP) にはほとんど見つからなかった (図4).

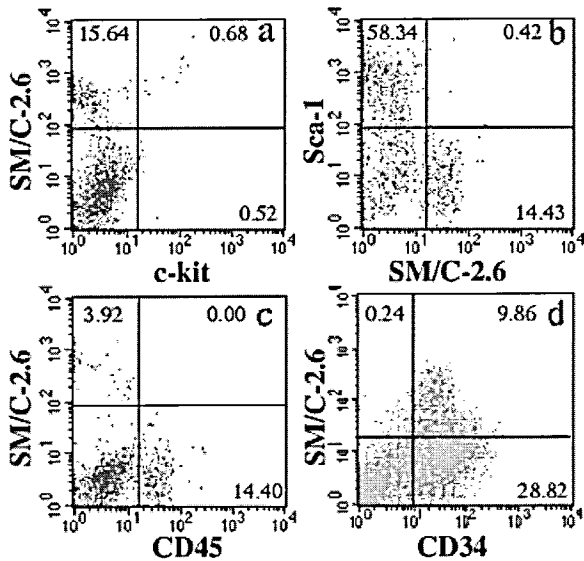


図3 筋衛星細胞の細胞表面マーカー抗原 SM/C2.6 抗体反応性筋衛星細胞を two-color flowcytometry 法で解析した. 筋衛星細胞は c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> の表現型を示す.

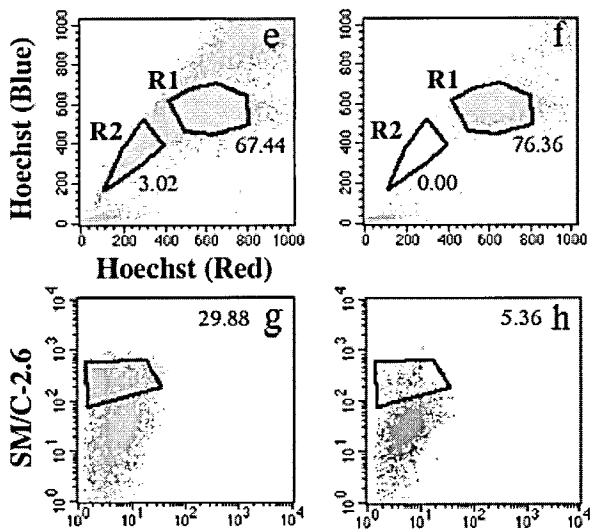


図4 筋衛星細胞は main population 分画の細胞  
左上: 単核細胞を Hoechst33342 で染色し, MP 分画 (R1) と SP 分画 (R2) に gate した.  
右上: Verapamil 存在下では SP 分画 (R2) が消失している.  
それぞれの分画の SM/C2.6 抗体反応性. 筋衛星細胞は MP 分画 (R1) に含まれ (左下), SP 分画 (R2) (右下) にはごくわずかしか見当たらない.

### 3. 筋再生過程におけるマクロファージの役割

正常 C57BL/6 マウスに CTX による筋再生を誘発し, 経時的に筋組織を観察したところ, 障害初期 (12-24 時間目) には多数の顆粒球の浸潤が認められ, 筋再生が始まる頃 (48-72 時間目) には, 顆粒球の消失と入れ替

わるようにマクロファージの浸潤が認められた (データ省略). マクロファージが筋再生のきっかけに関与していることが示唆されたため, *op/+* マウスと *mdx* マウスを交配し, マクロファージ系細胞が減少する *op/op mdx* マウスを得て, 組織化学的に検討した. その結果, *op/op mdx* マウスは *op/+ mdx* マウスに比べて筋再生が遅延することがわかった (データ省略). こうした表現型を定量的に比較する目的で, マウスに EBD を腹腔内投与した後還流により血液を洗浄除去し, 採取した骨格筋中に含まれる EBD を抽出して分光光学的に定量した. 図5に示すように, *op/op mdx* マウス筋は *op/+ mdx* マウスに比べて多量の EBD を含有していることがわかり, マクロファージの欠如は筋再生の効率を著明に低下させていることが明らかになった.

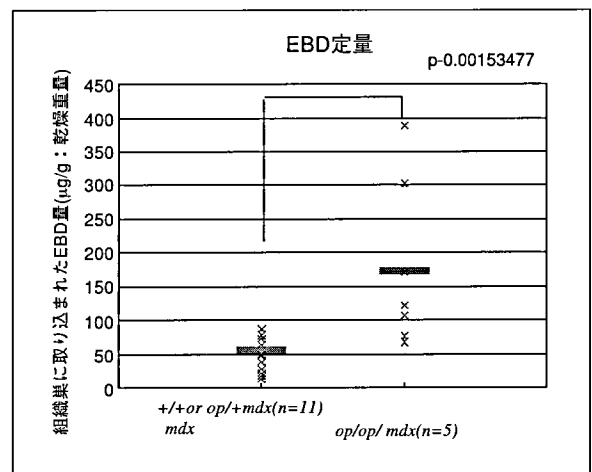


図5 *op/op mdx* マウス骨格筋への EBD の取り込み量 *+/+ mdx*, *op/+ mdx* マウス (左) に比べ, *op/op mdx* マウスでは EBD の取り込み量が増加しており, マクロファージが減少したマウスでは筋再生不良がうかがえる.

### 【考察と今後の課題】

通常の放射線照射骨髄キメラマウスに比べて, 骨髄細胞移植した新生児キメラマウスに GFP 陽性筋の出現頻度が高い傾向が認められ, また骨髄細胞に比べて, 胎児肝臓細胞の方が高い頻度で筋前駆細胞を含んでいることがわかった. ドナー細胞は粗分画であるため, 厳密な意味での前駆細胞の貢献度の違いについては結論を下せないが, 胎児肝臓にも筋前駆細胞が含まれることは興味深い. この事実を根拠にマウス臍帯血移植を試みたところ, 頻度は低い臍帯血中にも前駆細胞があること, また臍帯血細胞を培養することで筋繊維生成をも認めた (データは示していない). 今後, 臍帯血移植の効率についてさらに検討を加え, 臍帯血バンクへの期待につなげたい.

しかし, ドナー細胞が筋再生に参加することが明らかにできても, 残念ながらその再生への貢献度はきわ



めて低く、現時点では、骨髄移植や臍帯血移植が筋ジストロフィー治療にすぐに結びつくとは考えられない。こうした問題点を克服する手段の一つとして、本研究では筋前駆細胞を選択的に濃縮できるかどうか、そのためにはどのような手法が可能であるかを検討し、まず筋衛星細胞を特異的に単離精製するために、モノクロナル抗体の作成を進めた。その結果、SM/C2.6と名づけたモノクロナル抗体が、効率よく筋衛星細胞を濃縮できることがわかった。SM/C2.6が認識する分子は現在解析中であるが、M-cadherinやc-metではないことを明らかにした。SM/C2.6が筋衛星細胞に反応することから、筋衛星細胞の細胞表面抗原分子を調べた。そして、c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>であることを明確にした。さらにHoechst 33342 dye-staining testによる解析から、筋衛星細胞はMP分画に含まれることを明らかにした。これまで筋衛星細胞の存在を示唆してきたSP分画にはほとんど見つからないことから、筋衛星細胞の新しいフェノタイプが同定できたものと考えられる。現在このモノクロナル抗体を用いた骨髄細胞からの前駆細胞濃縮は成功していない。他の抗体との組み合わせが必要と思われる。更なるモノクロナル抗体作成を進めている。

筋再生時には、多数の炎症性細胞の浸潤が認められる。本研究では、炎症性細胞のうち特にマクロファージに着目し、その役割を調べた。マクロファージは炎症後期に浸潤が盛んになり、特にマクロファージ浸潤時期に一致して筋再生が始まる。このことは、マクロファージが崩壊した筋を貪食処理し、その結果空間的・細胞接触的な刺激が筋衛星細胞に伝わり筋再生のきっかけになると考えることが可能である。しかし一方、マクロファージが産生する何らかの生理活性分子が筋衛星細胞の増殖・分化に働いていると考えることもできる。もし生理活性分子が同定できれば、細胞移植による筋再生手法に新しい考え方を導入することもできる。こうした観点から、まず*op/op* フェノタイプと*mdx* フェノタイプを持つ*op/op mdx* マウスを作成し、その筋組織を調べた。*op/op* マウスはマクロファージ分化に重要なM-CSF遺伝子に変異があるマウスで、osteopetrosis マウスと呼ばれる。このマウスではマクロファージ系細胞の分化が低下し、その結果osteoclastが減少するため、骨代謝が正常に起こらない。したがって大理石(骨)病(osteopetrosis)モデルとされる。

*mdx* マウスは自然な筋崩壊・再生が繰り返されるため、マクロファージ数の減少を伴った*op/op mdx* での筋再生を調べたところ、筋再生の遅延が組織化学的に見出された(データは示していない)。再生遅延は筋組織の部位によるバラツキが大きいため、EBDを投与して、障

害筋に取り込まれる色素を定量した。その結果*op/op mdx* では、*op/+ mdx* に比べ色素の取り込み量が高く、筋再生が有意に遅れていることがわかった。さらに抗M-CSF受容体抗体を投与した実験でもマクロファージの役割が再現され(データは示していない)、筋再生にはマクロファージが重要な機能を果たしていることが明らかになった。今後、初期に浸潤する顆粒球、遅れて浸潤するマクロファージを局所に誘導する因子の検索、マクロファージが産生する因子の検索などを進める予定であり、筋再生の効率を上昇させる手法の開発に役立つものと考えている。

### 【結 論】

1. 骨髄移植や胎児肝臓細胞移植は、筋再生の治療手段となり得る可能性が示唆されたが、臨床応用にはまだ程遠い手法であると考えられる。
2. 筋再生の効率を上昇させる目的で、筋前駆細胞を特異的に認識する抗体の作成を進め、筋衛星細胞を選択的に単離・濃縮できるモノクロナル抗体を得た。この抗体を用いて筋衛星細胞を単離し、その性格付け、細胞表面抗原マーカーを同定することに成功した。
3. 筋再生過程におけるマクロファージの役割を調べ、再生にはマクロファージが必須の役割を果たすことを明らかにした。

### 【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**: 1528-30, 1998.
- 2) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al: Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**: 390-4, 1999.
- 3) Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, et al: Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci* **115**: 1285-93, 2002.
- 4) Fukada S, Higuchi S, Segawa M, et al: Purification and cell surface marker characterization of mouse skeletal muscle stem cells, satellite cells, by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* (in press), 2004.
- 5) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**: 313-19, 1997.

# 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

平 家 俊 男\*

研究協力者 吉本 桃子\*, 塩田 光隆\*, 春山 宗忠\*\*, 中畑 龍俊\*

## 【緒言】

近年、造血幹細胞移植を受けた個体において、骨格筋を含む様々な組織に、ドナー由来の細胞が分化することが示された。この現象は、骨髄組織において、1) 造血組織の枠を超えて様々な組織に分化し得る幹細胞が存在する、2) 造血幹細胞が造血組織の枠を超えて分化し得る可塑性を有する、という2つの可能性を示唆する。一方、組織の枠を超えた分化は、レシピエントの組織細胞とドナーの造血細胞との融合により生じるとの報告もある。骨格筋再生の機構において、上記の3種類の機構のうち、どの機構が主となる再生機構を担うのか明らかではない。今回我々は、GFPトランスジェニックマウスに由来する造血幹細胞分画を用いて、放射線照射マウスや、c-kit遺伝子の変異を有し幹細胞が減少するW/Wマウスに移植し、骨格筋再生過程における役割について検討した。さらに、骨髄に存在する非血球細胞より、骨格筋細胞に分化する細胞の同定を試みた。

## 1. 骨髄造血幹細胞から筋肉分化に関する検討

### 【方法】

**細胞:** GFPトランスジェニック (Tg) マウス (C57BL/6) の骨髄細胞を脛骨、腓骨から採取。ビオチン化一次抗体 (CD3, CD45R/B220, Mac-1, Gr-1, Ter119, 全てPharMingen (PM) 社) を反応させ、auto MACS (Miltenyi Biotec 社) にてlineage陰性 (Lin-) 細胞を採取。次にLin-細胞をSca1-PE抗体とc-kit-APC抗体 (共にPM社) に反応させ、FACS Vantage (Becton Dickinson (BD) 社) にてc-kit陽性Sca1陽性Lin陰性 (KSL) 細胞を採取。

**移植:** GFP Tg マウス由来の1-5x10<sup>3</sup> KSL細胞をWT (C57BL/6) 由来の2x10<sup>5</sup> 骨髄細胞と共に、9.0Gy全身照射したWT 或いはmdx (C57BL/10) 成人マウスの尾静脈より静脈注射。日齢0-3のW/W<sup>v</sup> マウス (C57BL/6) の場合は非照射で前顔面静脈より注射。

**免疫染色:** 筋組織を4% paraformaldehydeで固定しOCTコンパウンド包埋後に-30℃凍結保存。クライオスタットで厚さ7µmの凍結切片を作成し、一次抗体反応;

GFP (Clone Teq 社), ラミニン (DAKO 社)。次にアルカリホスファターゼ (ALP) 或いはCy3の二次抗体で染色 (共にJackson ImmunoResearch (JIR) 社)。ヘキスト33324染色にて核染色。染色後confocal顕微鏡 (Olympus 社) にて観察。

**Single cell culture (単繊維培養):** 腓腹筋をコラゲナーゼで37℃90分処理し、単一筋繊維を採取しマトリゲルでコートした24ウェルプレートにのせ10%ウマ血清/0.5% chick embryo extract (CEE, Gibco 社) / DMEM (Sigma 社) にて培養。4日目に20%FCS / 10%ウマ血清 / 1% CEE / DMEMに変更。8日目に2%FCS / 10%ウマ血清 / 0.5% CEE / DMEMに変更し培養を続けた。

**PCR:** KSL細胞移植後6ヶ月後の腓腹筋から行った単繊維培養のウェルよりDneasy Tissue Kit (QUIAGEN 社) にてDNA採取。GFPプライマーは(5'-3'); CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC G及びCAC GAA CTC CAG CAG GAC CAT G, nested GFPプライマーは(5'-3'); ACA AGT TCA GCG TGT CCG GCG A及びCTT CTC GTT GGG GTC TTT GCT C。

### 【結果】

**WT:** GFP Tg マウス由来KSL細胞 (CD45陽性を確認) を致死量照射したWTマウスに移植し、蛍光顕微鏡及び免疫染色にてGFP陽性細胞を観察した。移植後3日目にはGFP陽性筋線維は検出されなかった。移植後10日目と20日目では肋間筋、大腿四頭筋、腹壁筋、外眼筋等の全身筋組織にてGFP陽性筋線維が観察された (図1-A)。横断面では様々な大きさの筋線維が存在し、その中心に核が局在していた。それら筋線維はクラスターを形成する傾向にあった。筋組織内の総核数に対するGFP陽性細胞の比率はこれまでの報告より多く、5-20%であった。移植後30日以降はGFP陽性筋線維は観察されなかったが、いくつかのGFP陽性単核球がラミニン直下に検出された。W/W<sup>v</sup> マウスへの移植群ではどの時期においてもGFP陽性筋線維は全く検出されなかったが、移植後30日目にいくつかのGFP陽性単核球がラミニン直下に存在していた。WT及びW/W<sup>v</sup> マウスと

\*京都大学医学部小児科, 助教授

\*\*京都大学大学院医学研究科医学研究科発達小児科学

も移植後6ヶ月の単線維培養では筋線維の増殖を認め、ALPで染色されるGFP陽性筋線維が存在した。更にnested PCRによりGFP DNAを検出した。移植後30日以内の早期では単線維培養からの筋線維の増殖は認めなかった。

**mdx : GFP** Tg マウス由来 KSL 細胞を致死量照射した mdx マウスに移植し蛍光顕微鏡及び免疫染色にて GFP 陽性細胞を観察した。移植後3ヶ月と6ヶ月の両方において、GFP 陽性筋線維が全身の筋組織において観察された。これらは ALP 染色により GFP 陽性である事を確認した (図 1-B)。ラミニン陽性の筋線維も一部に検出された。

## II. 骨髄間質細胞からの筋肉分化に関する検討

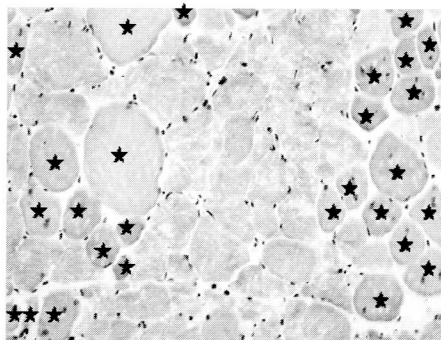
### 【方法】

4週齢の C3H/He 雌マウスの骨髄細胞から lineage (CD4, CD8a, Mac1, B220, Gr-1, Ter119, 全て PM 社) 陰性細胞を採取し、20%FCS / IMDM (Sigma 社) にて培養し、sub-confluent になった時点で継代。これを繰り返しある程度均一な細胞が得られた時点で直接分化群と浮

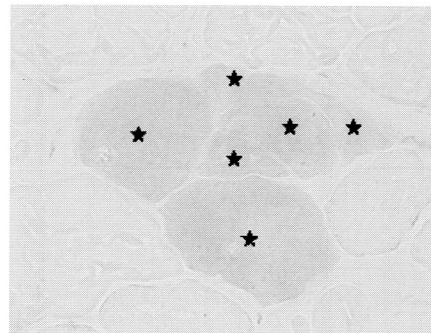
遊培養群に分けた。直接分化群は confluent になった時点で 5-azacytidine (5-aza, Sigma 社) 5 μM / 2%FCS / IMDM に変更。24 時間後に 2%FCS / IMDM に変更し 2 週間培養した。浮遊細胞群は低接着性条件にて浮遊培養させ sphere を形成 (図 2-B) した後再び平面培養に戻し、confluent になった時点で 5-aza で同様に筋肉分化を誘導した。その後ミオシン (zymed 社)、デスミン (sigma 社)、ミオジェニン (DAKO 社) を一次抗体とし免疫染色 (Cy3, JIR 社) を行った。又、sphere 形成後の細胞の表面抗原を FACS Caliber (BD 社) で解析した。

### 【結果】

直接分化群では一度も筋管細胞を得る事はなかった。浮遊細胞群では筋管細胞様に変化する細胞を得た (図 2-B)。これらはミオシン、デスミン、ミオジェニンが陽性であった。sphere を形成した細胞は CD45, CD34 陰性で、Sca1, CD105, β1 インテグリン, CD44, VE カドヘリン (全て PM 社) が陽性であった。



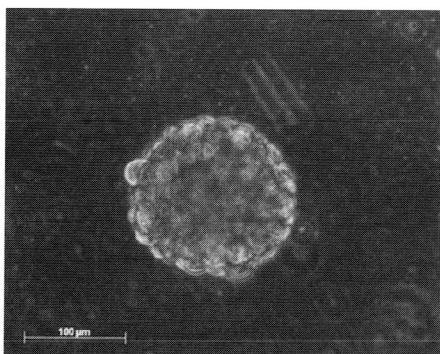
A. 移植後 20 日 (WT 群)



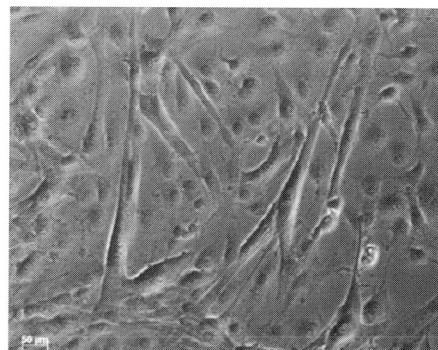
B. 移植後 6 ヶ月 (mdx 群)

星印 ; GFP 陽性筋線維

図 1 骨髄造血幹細胞移植後 GFP-ALP 染色



A. 浮遊培養 7 日目の sphere (x200)



B. 5-azacytidine 添加 14 日目の筋管細胞 (x40)

図 2 骨髄間質細胞からの筋肉分化

## 【考 察】

骨髓組織は、造血細胞の基となる造血幹細胞と、造血幹細胞の生存、増幅、分化を支持する微少環境を形成するストローマ細胞から成る。さらに、ストローマ細胞には、脂肪細胞、軟骨細胞、筋肉細胞などの分化し得る間葉系幹細胞が含まれることが近年の研究で明らかとなった。この分類に従うと、骨格筋は間葉系幹細胞より増殖分化する。しかし、間葉系幹細胞よりの骨格筋への分化効率は低く、造血細胞移植による骨格筋再生への寄与度については検討の余地を残している。今回我々は、まず従来造血幹細胞と分類されている lin-細胞分画を移植することにより、筋肉再生機構について解析した。レシピエントマウスとして放射線照射を行った正常マウス、c-kit 遺伝子に変異を有し造血幹細胞の数的減少をきたす W/W マウスを用いて検討したところ、移植後早期において、GFP 陽性の骨格筋が多数観察され、移植造血幹細胞の骨格筋への分化が示唆された。GFP 陽性筋肉は長期の観察では認められなくなるが、single fiber culture において GFP 陽性の筋芽細胞が同定され、骨格筋幹細胞に分化し得ることも観察された。この結果は、従来造血幹細胞として捉えられていた lin-細胞分画には、造血幹細胞活性とともに、骨格筋へと分化し得る細胞分画を含むことを意味する。今後、この分画が、造血細胞、骨格筋細胞に分化し得るより未熟な幹細胞に相当するのか、造血幹細胞としての可塑性あるいは transdifferentiation として捕らえるのか、さらなる検討が必要である。さらに、mdx マウスにおいて同様の移植を行ったところ、移植後早期、後期にわたって GFP 陽性骨格筋が多数観察された。生体において組織への幹細胞生着には、標的とする組織の障害の存在が必要とされている。mdx マウスにおいて観察された現象は、障害、再生を繰り返している mdx マウスの骨格筋においては、移植造血幹細胞の生着、骨格筋への分化を促進する分子学的機構が存在することが考えられ、この観点よりの検索も必要と考えられる。一方、近年、骨髓より血球系マーカーを有しない多分化幹細胞 (MAPC) の同定が報告された。我々も同様の多能を有する細胞の同定を試み、様々な体性幹細胞の作成に用いられている sphere 法を応用することにより、骨格筋への分化能を有する細胞の同定を行った。現在、この細胞の生体内における幹細胞活性を検討中である。我々の結果は、造血組織の中のどの細胞群が主として骨格筋再生に主として寄与するかという問題に、結論をもたらしていない。今後、mdx マウス等を用いて、筋ジストロフィー症の治療には有効な細胞群の同定、および生着部位である障害骨格筋の分子学的機構につ

いて、検討を進めていく必要がある。

## 【結 論】

lin- の造血幹細胞分画に、骨格筋再生に寄与する細胞群が存在することを明らかにした。この細胞群は、移植後早期の骨格筋再生に寄与するとともに、移植後後期には、骨格筋幹細胞として存在することが判明した。一方、非血球細胞群にも、骨格筋へと分化する細胞群が存在することも明らかとなった。

## 【参考文献】

- 1) Heike T, Nakahata T: Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 313-312, 2002.
- 2) Ito M, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al: NOD/SCID gnull mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**: 3175-3182, 2002.
- 3) Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, et al: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  mice model. *Blood* **102**: 873-880, 2003.
- 4) Yoshimoto M, Shinohara T, Heike T, et al: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicated the presence of a niche. *Exp Hematol* **31**: 733-740, 2003.
- 5) Mitsui T, Watanabe S, Taniguchi Y, et al: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* **101**: 2990-2995, 2003

# 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

福田 恵 一\*

研究協力者 藤田 淳\*, 板橋 祐史\*\*, 真鍋 知宏\*\*, 川口 治子\*, 八木 崇\*\*

## 【目 的】

本研究では骨髄間葉型幹細胞を分化誘導することにより心筋細胞を作製し、心不全治療に応用しうるレベルに至るまでの基礎研究を目指している。これまでの研究で骨髄由来の再生心筋がカテコラミンの $\alpha_1$ 受容体、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 受容体を発現し、心肥大や心収縮力の増加などの機能を有することを明らかにしてきた。本研究では再生心筋細胞をイオンチャネルの移植する技術の開発を試みることを第一の目的とした。次に、骨髄移植モデルを用い、生体内の骨髄間葉系幹細胞を心筋梗塞巣に移動させ、心筋細胞に分化し得るかいないかを解析した。幹細胞が骨髄から心筋梗塞巣に速やかに移動させるため、各種サイトカインを使用し、その影響も観察することを第2の目的とした。

## 【方 法】

### ①再生心筋細胞におけるイオンチャネルの発現：

CMG細胞に最終分化誘導を行う前後でRNAを採取した。心筋細胞に発現することが知られているイオンチャネル $I_{CaL}$ 、 $I_f$ 、 $I_{K1}$ 、 $I_{K_{ACh}}$ 、 $I_{K_{ATP}}$ 、 $I_{to}$ 、 $I_{Ks}$ 、 $I_{Kr}$ を形成するサブユニットの発現をRT-PCR法を用いて観察した。具体的には $I_{K1}$  (IRK1, IRK2),  $I_{Kr}$  (MERG),  $I_{Ks}$  (KvLQT1, minK),  $I_{to}$  (KV1.2, KV1.4, KV2.1, KV4.2, KV4.3),  $I_{K_{ATP}}$  (KIR6.1, KIR6.2, SUR2A, SUR2B),  $I_{K_{ACh}}$  (GIRK1, GIRK4),  $I_f$  (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4)の発現を解析した。同時にCMG細胞にパッチクランプ法と活動電位を記録することにより遺伝子発現と機能の相関を検討した。

### ②再生心筋細胞の移植：

ミオシン軽鎖-2vのプロモーターにGFPを組み換えた遺伝子を発現させたCMG細胞に分化誘導を行い、心筋細胞のみをFACSにて単離した。単離した細胞をマウス心臓に移植し、移植心を解析した。移植細胞のマーカにはGFPだけでなく、アデノウイルスにlacZを組み込んだ遺伝子改変ウイルスを感染させ、lacZを発現させた。

③GFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞を採取し、致死量放射線照射後の同系マウス(C57BL/6)に骨髄移植した。2月後マウスの末梢血を採取し、血球系細胞をFACS解析した。また、骨髄血のサイトスピン標本を作成した。血球系細胞のキメラ率が90%を超えるマウスに関して、麻酔開胸し左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成した。梗塞作成の翌日より10日間G-CSF, GM-CSFを投与した。生存率を観察するとともに、2ヶ月後心エコーにて心機能を評価後に心臓を摘出した。レーザー顕微鏡により抗心筋アクチニン抗体、抗 $\alpha$ -平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)抗体、抗von Willebrand Factor(vWF)抗体とDAPI(核染色)の共染色により心筋組織再生について解析した。

## 【結 果】

①CMG細胞では5-アザシチジンによる最終分化誘導をかける前より $IRK1$ と $MERG$ の発現が観察された。これは最終分化誘導をかける以前に静止膜電位を呈することが示唆された。洞結節型の活動電位を呈する分化誘導後2週間より $HCN4$ 、 $Ca\alpha 1c$ 、 $KV1.4$ の発現が観察された。これはこの時期にペースメーカー電位を生じる $I_f$ 電流と $I_{CaL}$ 電流が記録されることを示唆していた。心室筋細胞型を呈する4週以後には $HCN1$ 、 $KV2.1$ 、 $KV4.2$ 、 $IRK2$ 、 $KIR6.1$ 、 $KIR6.2$ 、 $SUR2A$ の発現が観察された。これはCMG細胞が $I_{K_{ATP}}$ 、 $I_{to}$ 電流を発現することを示し、この時期に心室筋細胞型活動電位を呈することを説明し得る現象と考えられた。分化誘導後6週までの時点では $KV1.2$ 、 $KV4.3$ 、 $KvLQT1$ 、 $minK$ 、 $GIRK1$ 、 $GIRK4$ の発現は認められなかった。これはCMG細胞が $I_{Ks}$ 、 $I_{K_{ACh}}$ を発現しないことを示し、CMG細胞が心房筋の表現型を取らないことと一致する所見と考えられた(図1, 2)。

②CMG細胞をマウス心臓に移植すると、移植された細胞はレシピエントの心筋細胞と平行した走向を示した。移植細胞は3カ月以上はレシピエントに生着することが観察された(図3, 4)。

\*慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学

\*\*慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

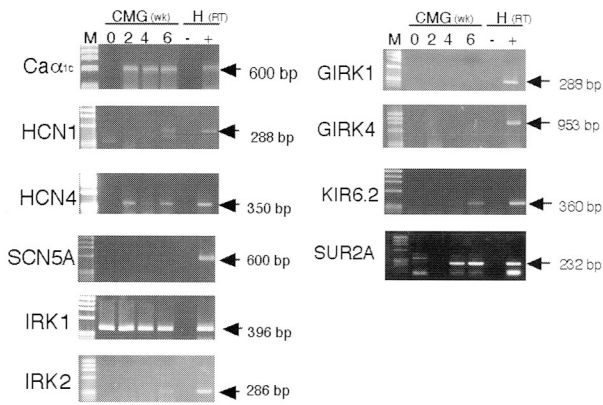


図 1

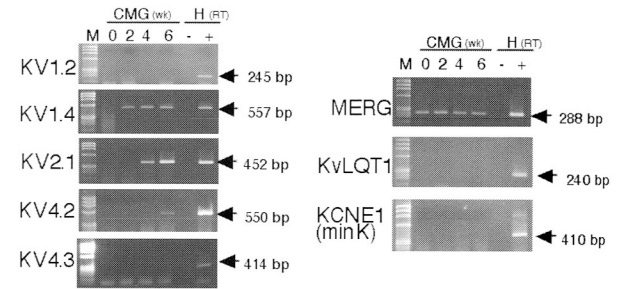
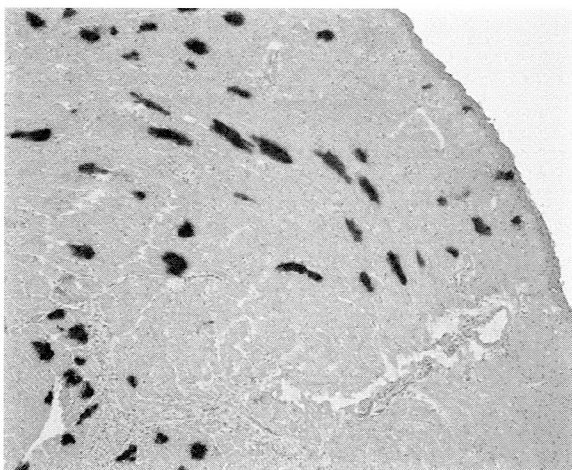
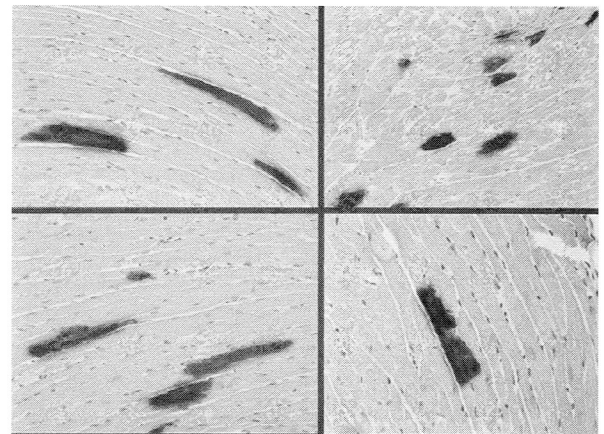


図 2



(HE染色およびLacZ染色)

図 3 再生心筋細胞移植後 4 週間目の組織像



(HE染色およびLacZ染色)

図 4 再生心筋細胞移植後 4 週目の組織像

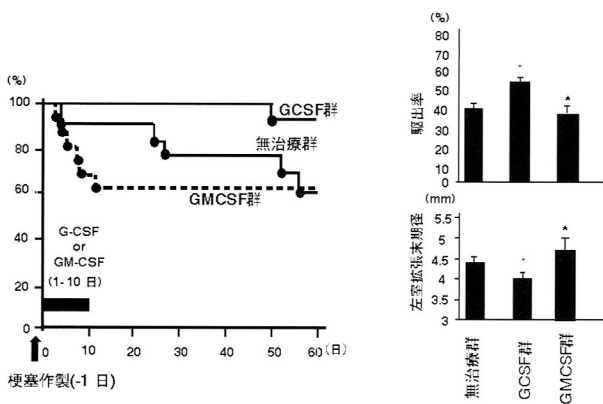


図 5

③梗塞後 2 ヶ月の時点での生存率は生食投与群では約 60%，G-CSF 投与群で約 90%であり，著明な生存率の改善を認められた（図 5）。一方，GM-CSF 投与群では生食投与群に比し急性期の死亡率の増加が観察された。GM-CSF を投与した群では急性期において梗塞巣に多数の CD45 陽性，MAC1 陽性のマクロファージの浸潤を認めたが，G-CSF 投与群では CD45 陽性細胞は認めるものの MAC1 陽性の細胞は有為に低かった。梗塞後 2 か月の段階の心エコーによる解析では G-CSF 投与群では生食投与群に比べて左室駆出率（EF）の上昇，左室拡張末期径（LVEDD）の短縮が観察され，心機能の改善を認められた。一方，GM-CSF 投与群では EF の低下，LVEDD の拡大を認め，心機能の増悪が観察された。梗塞後 2 ヶ月の時点での組織では梗塞部位に一致して GFP 陽性細胞が多数観察され，その一部は心筋，血管内皮，平滑筋細胞の抗体と共染色され，骨髓幹細胞により組織再生がなされていること，G-CSF 投与によりこの

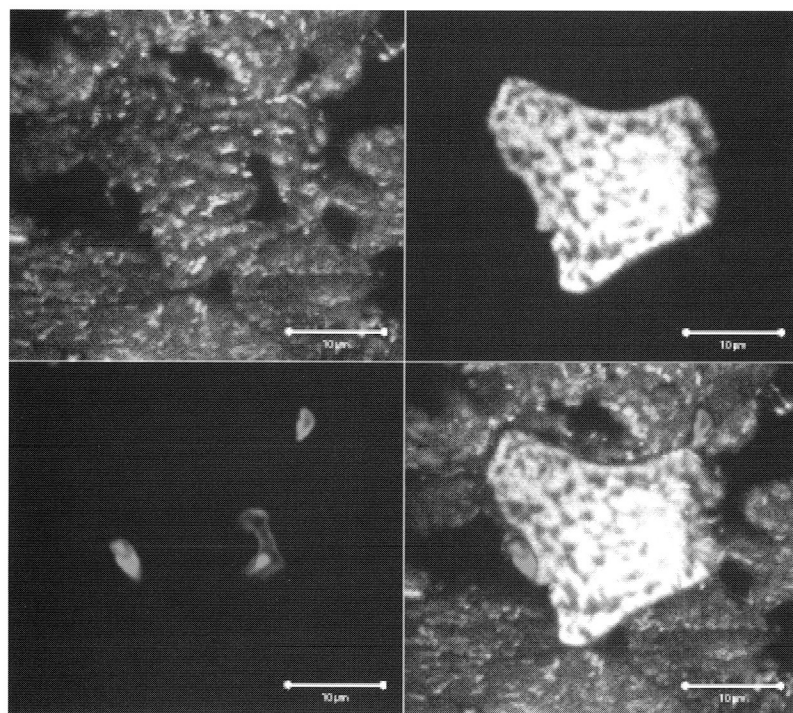


図6 骨髄由来のGFP陽性再生心筋細胞

GFP 陽性細胞が著しく増強することが観察された (図6)。GFP 陽性細胞中の心筋細胞の占める割合は10%程度であり、残りの細胞の多くは抗アクチニン抗体、抗SNA抗体、抗vWF抗体の染色が陰性であり、線維芽細胞様の細胞であると推測された。

#### 【考 察】

本研究により骨髄細胞由来の心筋細胞は *in vivo* の心筋細胞と同様にイオンチャンネルを発現し、かつ経時的に発現が変化することが明らかとなった。このイオンチャンネルの変化が活動電位の変化をもたらすものと考えられた。再生心筋細胞は移植された後、レシピエントの心筋細胞と連結し、長期間生体心に生着することが明らかとなった。

骨髄多能性幹細胞は心筋梗塞時に梗塞巣に移動し、血管内皮・平滑筋・心筋等の組織再生に寄与した。適切なサイトカインの投与は骨髄多能性幹細胞による組織再生能力を向上させ、心機能を改善した。生体内で成体幹細胞を流血中に誘導し、組織分化することができれば、患者本人の幹細胞で組織再生し得る方法を開発することができることになり、心筋症その他の心筋全体が障害される疾患の治療にも結びつくものと考えられる。

#### 【文 献】

1) Fukuda K: Development of regenerative cardiomyocytes

from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs* **25**: 183-193, 2001.

- 2) Tahara S, Fukuda K, Kodama H, et al: Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Pyk2 and EGF Receptor in Rat Cardiomyocytes K+ Channel Blocker-Evoked Signals in Cardiomyocyte. *J AM Coll Cardiol* **38**: 1554-1563, 2001.
- 3) Sano M, Fukuda K, Kato T, et al: ERK and p38MAPK, but not NF- $\kappa$ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* **89**: 661 - 669, 2001.
- 4) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al: Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* **105**: 380-386, 2002.
- 5) Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, et al: Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **34**: 139-50, 2002.
- 6) Fukuda K: Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenital anomalies* **42**: 1-9, 2002.
- 7) Fukuda K: Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy. *Bone Marrow Transplant* **32**: S25-S27, 2003.

- 8) Fukuda K: Stem cell transplantation as a mode of regenerative medicine. *Jpn Med Association J* **46**: 333-338, 2003.
- 9) Fukuda K: Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Competes Rendus Biologies* **325**: 1-12, 2002
- 10) Kodama H, Fukuda K, Takahashi E, et al: Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation. *Hypertention* **41**: 1372-1379, 2003.
- 11) Ariizumi T, Kinoshita M, Yokota C, et al: Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int J Dev Biol* **47**: 405-410, 2003.
- 12) Fukuda K: Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow: Use of mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering. *Cytotechnology* **41**: 165-175, 2003.
- 13) Yuasa S, Fukuda K, Tomita T, et al: Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. *Mol Cell Biochem* (in press) 2004.
- 14) Hisaka Y, Ieda M, Nakamura T, et al: Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. *J Am Coll Cardiol* (in press) 2004.
- 15) Ieda M, Fukuda K, Kimura K, et al: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* (in press) 2004.
- 16) Takahashi T, Fukuda K, Miyoshi S, et al: LIF activates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphorylation of serine 1829 of rabbit Cav1.2 *Circ Res* (in press) 2004.
- 17) Fukuda K: Regenerattive medicine for cardiomyocyte. *Jap Med Ass J* (in press) 2004.
- 18) Fukuda K: Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Human Cell* **13**: 83-94, 2003.



# 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

木村重美\*

研究協力者 I. 小篠 史郎\*, 伊藤 薫\*, 池澤 誠\*, 平沼 多加志\*, 松倉 誠\*,  
三池 輝久\*, 荒木 喜美<sup>1</sup>, 山村 研一<sup>1</sup>, 阿部 訓也<sup>2</sup>, 丹羽 仁史<sup>3</sup>  
II. 伊藤 薫\*, 小篠 史郎\*, 池澤 誠\*, 平沼 多加志\*, 松倉 誠\*,  
吉岡 毅\*, 三池 輝久\*, 荒木 喜美<sup>1</sup>, 山村 研一<sup>1</sup>, 鈴木 操<sup>4</sup>,  
三輪 岳志<sup>5</sup>, Gail D. Thomas<sup>6</sup>

## I. ES細胞を用いた筋ジストロフィーの治療法の確立

### 【緒言】

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)は筋力低下が進行し、20歳代で亡くなる病である。現在のところ、根治治療はない。近年、ウイルスベクター、細胞移植などの根治治療に向けて基礎研究がなされている。しかし、最もよく研究が行われているウイルスベクターは全身投与が出来ないなどの問題がある。

しかし、骨髄や骨格筋より分離した筋細胞になる幹細胞(SP cell, MDSCs)を経静脈的にマウスに投与したところ<sup>1) 2) 3)</sup>全身の骨格筋へ移行し筋線維になることが解明された。この方法により筋ジストロフィーの治療が可能であることが示唆された。しかし、この骨髄由来の細胞は骨髄細胞の1%以下であり、また未分化の状態では長期培養できないなどの欠点がある。

一方、ES細胞(embryonic stem cell)は多分化能を保持したまま長期培養が可能であるが、以下の問題点がある。1つは筋細胞のみに分化するように制御することが困難ということ、2つ目はこの細胞を個体に導入した場合、腫瘍形成が認められること、3つ目は免疫反応を回避できないということである。その1, 2の解決のために、Tet-Offのシステムを利用して筋細胞への分化を誘導する転写因子であるMyoD遺伝子<sup>4)</sup>を人工的に制御し、ES細胞を筋細胞に分化させ、その細胞を用いて治療に応用する。

### 【方法】

Tet-offシステムとはtetracycline存在下では目的遺伝子の発現が抑えられ、除去することにより発現が開始されるシステムである。このシステムには調節プラス

ミドと応答プラスミドの2つのプラスミドが必要である。このシステムを利用して、tetracycline存在下ではMyoDの発現が抑えられ、除去することにより発現が誘導されるES細胞をクローニングする。つまり、tetracyclineを除去することにより、ES細胞は筋細胞に誘導される訳である。丹羽ら<sup>5)</sup>は既にTet-Offシステムに従うES細胞を得ている。その細胞(ZHTc6)においてTet-Offシステムで制御されているcDNAをMyoD遺伝子に入れ替えることにより、MyoD遺伝子がTet-Offシステムに従うES細胞を得る。

### 1. ES細胞(ZHTc6)の培養

ZHTc6の維持にはGMEM, 15% Knockout SR (Gibco), LIF 1000 U/ml, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol, doxycycline 100 ng/ml, Zeocin 10 µg/mlの培養液を使用した。ゼラチンコートデッシュを使用し、維持には3日毎に細胞をトリプシン処理し、播種した。相同組替えの起きたクローンを維持するための培養液は、前述の維持培養液にG418 150 µg/ml, Hygromycin 80 µg/mlを加えたものを使用した。分化を誘導するための培養液は、GMEM, 4%FBS, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol, G418 150 µg/ml, Hygromycin 80 µg/mlを使用した。

### 2. Supertargeting法(図1)

応答ベクターと相同性があるtetracycline反応性プロモーター領域とLacZ遺伝子とでMyoD遺伝子をはさんだSupertargeting Vectorを作製した(図1)。100 µgのSupertargeting Vectorを $3 \times 10^7$ 個のZHTc6細胞にelectroporation法で導入した。その後、doxycycline存在下でG418の濃度を200または300 µg/mlとしてスクリーニングし、10~14日後にコロニーを20個ピックアップ

\*熊本大学医学部附属病院発達小児科

1.熊本大学医学部附属病院臓器形成

2.理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター

3.理化学研究所発生・再生科学総合研究センター

4.熊本大学動物資源開発センター

5.大阪大学遺伝情報実験施設

6. Dept. of Internal Medicine, Hypertension Division  
UT Southwestern Medical Center, USA

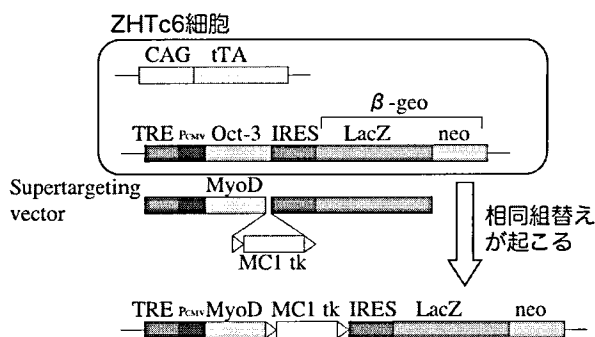


図1 Supertargeting 法

ZHTc6細胞は調節プラスミドと応答プラスミドを持っており、Supertargeting Vectorは応答プラスミドとDNA配列が相同性がある部分があるためにこれを導入すると一定の確率で相同組換えを起こす。tTA: tetracycline-controlled transactivator, TRE: tetracycline-response element, IRES: encephalomyocarditis internal ribosome entry site, MC1 tk: herpes simplex virus thymidine kinase (HSV tk) gene without pA under the control of MC1 expression unit (PyF101 mouse polyoma virus mutant enhancer + HSV tk minimal promoter)

アップした。その後一か月間で十分な増加が得られた細胞について、Southern blotting法およびLacZ染色でOct3遺伝子がMyoD遺伝子に相同組換えがおこっているクローンを確認した。Southern blotting法の際にはその細胞よりDNAを抽出してSac Iで切断し、プローブにはpCH110 (LacZ遺伝子を含むプラスミド)をSac IとEcoRVで切断して得られた800 bpの切断断片をGeneClean IIを用いて精製してこれをプローブとした。

### 3. 分化誘導

維持のための培養液よりdoxycyclineを除去し、分化誘導培地に変更した。まず、MyoD遺伝子が発現するかWestern blotting法で確認した。その後、連日細胞の形態を経時的に観察した。その細胞よりタンパクを分離し、筋分化マーカーの発現をWestern blotting法で解析した。

### 4. Western blotting

12.5%のポリアクリルアミドゲルで24mAで2時間かけて電気泳動し、80Vで2時間かけてメンブレンにblottingした。一次抗体については、抗desmin抗体(SIGMA D1033)は1:100、抗myogenin抗体(SIGMA M5815)は1:10、抗myoD抗体(DAKO M3512)は1:10、抗fast Myosin Heavy Chain (fMHC)抗体(SIGMA M4276)は1:100、抗actin抗体は1:200で使用した。二次抗体はビオチン化抗マウスIgG抗体を使用し、ABC法により発色反応を行った。

### 5. nude-mdx マウスへの投与

in vitroで筋細胞へ分化誘導が確認されたZHTc6をdoxycycline除去して2日後に、 $3 \times 10^6$ 個をnude-mdxマウスの腓腹筋へ筋注した。その後、14, 49日後、投与部位より骨格筋を分離し、投与した細胞が筋線維に分化したかどうかをdystrophin染色、LacZ染色により検討

した。

## 【結果】

### 1. Supertargeting

Supertargeting VectorをZHTc6細胞に導入後Southern blotting法にて3.2 kbのバンドを確認し、相同組換えによりOct3遺伝子がMyoD遺伝子に置き変わったクローンを3個得た(図2)。これらのクローンはいずれもdoxycycline存在下でLacZ染色が陽性であった。

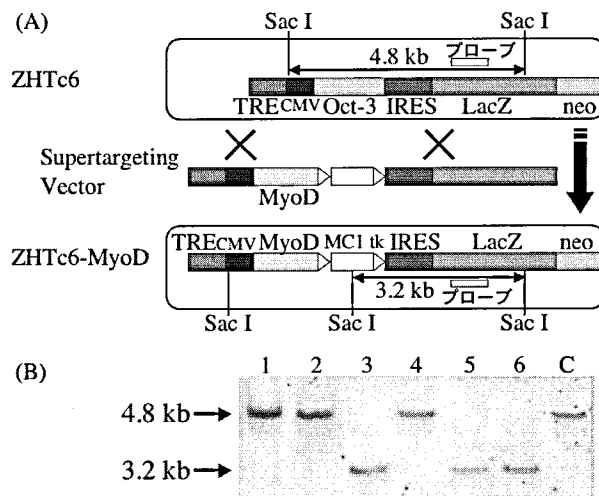


図2 相同組み換え体の解析

(A) 相同組み換え体の解析方法

(B) Southern blotting法によるSupertargeting VectorをZHTc6細胞に導入後ピックアップしたクローン(1~6)の解析。相同組換えの起きたクローン(3, 5, 6)ではMC1 tkプロモーター内のSac Iサイトの存在のため3.2 kbのバンドが生じた。C: Control (ZHTc6)

### 2. in vitroでの分化誘導

MyoD遺伝子に入れ替わったクローン(以下、ZHTc6-MyoDと呼ぶ)をdoxycyclineを除去した分化培養液中で培養するとWestern blotting法でMyoDタンパクが発現していることを確認した(後述)。その後、経時的にその細胞の形態を観察した。doxycycline除去後3日目から4日目にかけて約80%の細胞が死滅し、生存した細胞の中で5日目で丸いES細胞が突起をだし、7日目には癒合を認めた。その後10日目で自発的に収縮を始め収縮の強いところではディッシュから剥離する細胞が観察された。(図3)

### 3. 分化誘導後のLacZ染色

ZHTc6-MyoDを分化誘導してLacZ染色を施行したが、マイオチューブとなった細胞はLacZ陽性線維は認めなかった。

### 4. 筋分化マーカーによる検討

ZHTc6-MyoDを分化誘導かけると、1日目からMyoDの発現が認められた。3日目以降にはdesminが発現し、

3～5日目まで myogenin, そして10日目以降に MHC の発現が確認された (図4).

### 5. nude-mdx マウスへの投与

投与後, 14日目では dystrophin 陽性の筋線維は認めなかったが49日目で dystrophin 陽性の筋線維を認めた (図5). しかし, 投与した細胞がすべて筋細胞に分化したわけではなく ES 細胞由来と思われる顆粒様の細胞が多く認め, 腫瘍化していた. LacZ 染色では陽性線維を認めなかった.

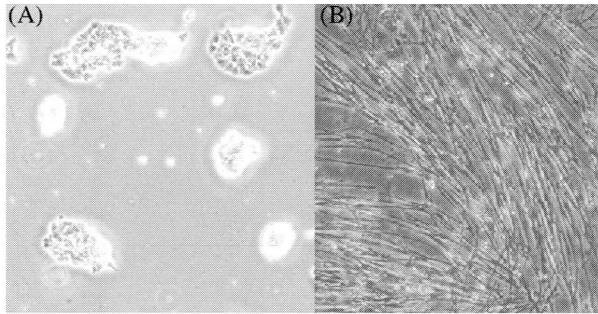


図3 ES 細胞より筋管細胞へ分化誘導 (A) ZHTc6-MyoD の維持培養液中の形態. (B) ZHTc6-MyoD を分化誘導培養液中で培養して10日目. 細長い細胞同士が癒合しており, 自発的に収縮する細胞も認められる.

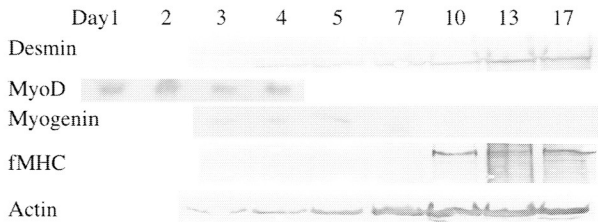


図4 ウエスタンブロット法による筋分化への解析 ZHTc6-MyoD を分化誘導後, 筋分化マーカーの発現の継時的変化を Western blotting 法で解析した.

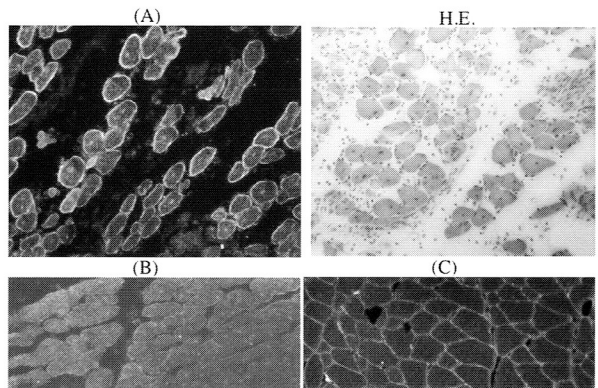


図5 nude-mdx マウスへの ZHTc6-MyoD の導入 腫瘍組織の一部の dystrophin 染色 (A) と H.E. 染色 (H.E.). (B) nude-mdx マウスの腓腹筋の dystrophin 染色 (ネガティブコントロール). (C) B10 マウスの腓腹筋の dystrophin 染色 (ポジティブコントロール)

### 【考察】

Supertargeting 法により, MyoD 遺伝子が Tet-off システムに従うクローンを得ることができ, in vitro では高率に筋細胞へ分化誘導が可能であった. ES 細胞より MyoD を発現させて分化させた細胞は形態的にも筋管細胞様の形態をとり, 最終的には自発的な収縮を観察できるまでなった. また, 筋分化関連タンパクの発現を経時的に Western blotting 法で解析したところ, desmin が分化誘導3日目に確認でき, 次いで3日目に myogenin, 10日目に fMHC の発現が確認でき間違いなく筋細胞へ分化していることが証明された. McBurney らは EC 細胞を DMSO 存在下で embryoid body を作製後, デッシュに接着させると全細胞の 5-15% が筋細胞へ分化することを報告している<sup>6)</sup>. 我々の方法で筋分化誘導をかけると一部は死滅するが, 生存した細胞の 90% 以上が分化することがわかった.

しかし, その細胞を nude-mdx マウスへ筋注すると腫瘍を形成し, 一部の細胞しか筋細胞へ分化しなかった. このようなことはマイオブラストや骨髄由来の SP cell では認めていない. In vitro では高率に分化誘導がかかるが, in vivo では高率に誘導がかからない原因は以下のことが考えられる. 1. 何らかの原因で MyoD 遺伝子の発現が消失しているかもしれないこと, 2. Hygromycin, G418 を投与しないことにより未分化の維持が出来なくなり, 筋細胞以外の分化にスイッチが入った可能性があることなどが考えられる.

また, 本来 lacZ 遺伝とネオマイシン耐性遺伝子は MC1 プロモーターで制御しているため, 筋細胞へ分化誘導がかかっても lacZ 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子は発現しているはずである. この細胞は G418 存在下で培養しているためネオマイシン耐性遺伝子は発現している. しかし, lacZ 遺伝子の発現は認められなかった. この矛盾はネオマイシン耐性遺伝子と LacZ 染色の感度の差によるものかもしれない. また, これらの遺伝子の上流の MyoD 遺伝子が発現することにより, 何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられる.

これらの結果より, in vitro において MyoD 遺伝子は ES 細胞を高率に筋細胞に分化させることが証明された. まだまだ, ハードルが高いものの, ES 細胞を用いて筋ジストロフィーに対する細胞治療が可能であることを示唆している.

### 【結論】

Doxycycline 存在下では未分化のまま維持することが可能で, Doxycycline を除去すると in vitro では高率に筋細胞に分化可能な ES 細胞株 ZHTc6-MyoD を樹立した.

この細胞を mdx-nude マウスに筋注すると一部は dystrophin 陽性線維に分化することを確認した。

#### 【参考文献】

- 1) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**: 390-4, 1999.
- 2) Ferrari G, Angelis GC, Coletta M, et al: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**: 1528-1530 1998.
- 3) Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, et al: Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* **5**: 640-646, 2003.
- 4) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000, 1987.
- 5) Niwa H, Miyazaki J, Smith A: Quantitative expression of Oct3/4 defines defferentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**: 372-6, 2000.
- 6) McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, et al: Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**: 165-7, 1982.

## II. 血管におけるジストロフィンの機能解析

### 【緒言】

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では筋膜でジストロフィン (dy) が欠損しているが、筋壊死のメカニズム及び dy の生理作用は不明である。現在、筋線維の膜に存在す dy が欠損することによりその細胞の安定性がなくなり筋崩壊が始まると言われている (膜説)。

しかし、その膜説では筋の再生壊死がグループをなして DMD 患者の骨格筋では存在することが説明がつかない。そこで、我々は筋線維の dy が欠損することにより、もともと筋線維が脆弱化しているところに血管の異常が加わり血流の異常が筋崩壊が起こるという仮説を考えている。DMD の血流異常の検討については 1980 年代後半から 90 年代前半にかけて骨格筋由来の nNOS が産生する NO が筋収縮時の血管拡張に大きく関わっていることが報告されるようになってきた。Chang<sup>1)</sup> や Thomas<sup>3)</sup> のグループが 90 年代後半に筋ジストロフィーにおける血管機能の異常を報告している。すなわち、正常では骨格筋由来の nNOS が  $\alpha$ -adrenergic な血管収縮を減じるが、dy を欠く DMD やそのモデル動物の mdx マウスでは dy 欠損により nNOS も減少するため、運動時に虚血状態となり、それが DMD の病態の進行に大きく関わっているというものである。それは以前考えられてきたような構造的な虚血ではなく、微小で局所的・機能的な虚血状態である。

我々は DMD で筋壊死が起こるメカニズムには nNOS の関与などによる血管平滑筋の機能障害に伴う異常と血液凝固系の亢進が大きく関与していると考えている<sup>4)</sup>。そこで、mdx マウスの血管平滑筋のみに dy を発現させるトランスジェニックマウス作製し、血管病変に由来する筋壊死の有無を検討すれば dy の生理機能についての大きな情報が得られるのではないかと考えた。

### 【方法】

#### 1. トランスジェニックマウス作製のコンストラクト

トランスジェニック作製のコンストラクトに必要な制限酵素, ApaI, SpeI, HindIII, NotI, SalI, EcoRI, PstI, のサイトを持つオリゴ DNA をまず作製する。このオリゴ DNA を Bluescript II KS- の ApaI と PstI で切断したベクターにライゲーションする。その後、そのサイトを利用して SV40 の PolyA signal, 心臓と平滑筋特異的に発現させる (骨格筋には発現させない) ヒト smooth muscle  $\alpha$ -actin promoter (SMAp)<sup>1)</sup>, ジストロフィン cDNA をライゲーションする。

## 2. ジストロフィン発現の確認

作製したコンストラクトが dy を発現するか C2C12 細胞にトランスフェクションして導入し dy の発現を確認する。

## 3. トランスジェニックマウス作製

定法に従いマウスの受精卵に作製したコンストラクトをマイクロインジェクションし仮親マウスに戻しトランスジェニックマウスを作製する。

## 4. トランスジェニックマウスの確認

マウスのしっぽより DNA 抽出し、プライマー 5'-TGCTCACGAGAACACATGATA-3' と 5'-AGTGTATATCAAGGCAGCGAT-3' を使用し PCR 法とプロモーター部位をプローブとして PstI にて DNA を消化しサザンブロット法を用いてコンストラクトが導入されているか確認する。

## 5. Tg/mdx マウスの作製

トランスジェニックマウスを mdx マウスと交配させ、mdx マウスの血管に於いて dy が発現しているトランスジェニック mdx マウス (Tg/mdx) を作製する。ジストロフィン抗体 dy60 (ホフマン博士より供与) を用いて血管平滑筋における dy の発現を確認する。

## 6. Tg/mdx マウスにおける dy の組織分布

定量 PCR を用いて dy の各臓器における定量を行った。Tg/mdx マウスの大動脈、骨格筋、心筋、肺、脳、小腸、肝臓、精巣、腎臓から TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、reverse transcriptase を用いて cDNA を作成した (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR : Invitrogen)。ヒト dy に特異的にプローブとプライマーを設定し (プライマー ; 5'-AGACCTTGGGCAGCTTGAAAA-3' と 5'-GGAGATAACCACAGCAGCAGATG-3', プローブ ; 5'-TTGAAGACCTTGAAGAGC-3'), PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用い以下の条件で real time RT-PCR を行なった : 50°C 2分, 95°C 10分, 95°C 15秒のアニーリングの後 60°C 1分の伸長反応を 40 サイクル。結果は 18S rRNA の発現量を内部標準とし、その相対値を求める検量線法により表した。

## 7. Tg/mdx マウスにおける血管の機能

Thomas の方法を用いて血管機能の解析を行った<sup>3)</sup>。マウスを麻酔した後、左下腿三頭筋を膝蓋腱を介してトランスデューサーに接続し、左座骨神経を露出して、運動閾値の 2-3 倍の電圧で 100 Hz, 0.2 ms の電氣的刺激を 1 分間に 30 回の頻度で 10-20 分間行なった。右大腿動脈にカテーテルを挿入し、まず安静時に norepinephrin (NE) を投与し (6.3-12.5 ng), 左大腿動脈周辺にドップラープローブを設置して VF-1 pulsed Doppler flow system (Crystal Biotech, Holliston, MA) を用いて血流速度を測

定した。次に刺激により筋を収縮させ、筋張力がピーク時の 50% まで低下した時に NE を安静時と同量投与し、血流を測定した。また、別に頸動脈にカテーテルを挿入し、経時的に血圧を測定した。

## 【結果】

### 1. トランスジェニックマウス作製

トランスジェニックマウス作製用コンストラクト (SMAp-dy-An) を図 6 に示す。

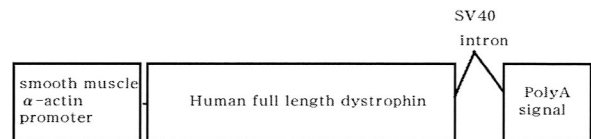


図 6 トランスジェニックマウス作製用コンストラクト  
ヒト smooth muscle  $\alpha$ -actin promoter の下流にヒトの 14 kb の full length dystrophin をつなぎ、さらにその下流に SV40 の polyA signal をつないだ (SMAp-dy-An)。

SMAp-dy-An を C2C12 細胞に導入した後、ジストロフィン染色をして、dy の発現を調べた結果、約 20% の細胞が dy 陽性であった。

SMAp-dy-An を C57BL/6 のマウスの受精卵約 800 個にマイクロインジェクションし、仮親マウスの子宮にその卵を戻した結果、41 匹のマウスが生まれた。生まれたマウスのしっぽより DNA を抽出後、プロモーターの一部をプローブに用いてサザンブロットング (図 7) を施行し、SMAp-dy-An が導入されているかを確認した。また、同時にプロモーター領域と dy 領域にプライマーを設定し PCR 法でも確認をした。その結果、7 匹のトランスジェニックマウスを得ることができた。このうち 1 匹が原因不明で死亡した。結局得られたトランスジェニックマウスは 6 匹である。その内 3 ラインが mdx マウスと交配し継代することが可能であった。

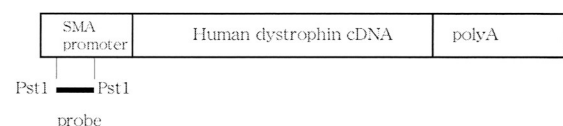
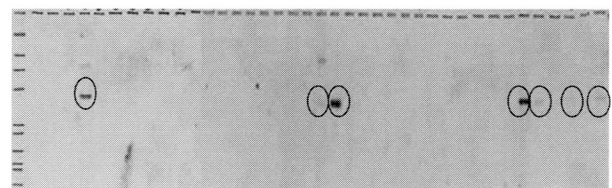


図 7 サザンブロットング法によるトランスジェニックマウスのスクリーニング

プロモーター内部にプローブを設定した。41 匹中 2 匹は解析前に死亡したため、合計 39 匹についてサザンブロットングを行ない、7 匹の DNA においてトランスジーンを導入を確認した。

## 2. トランスジェニックマウスのdyの発現

まず、Tg/mdxの肺の血管の平滑筋特異的にdyが発現していることを確認した(図8)。ついで、マウスのラインにおけるdyの各臓器における発現を定量PCRで検討した結果を示す(図9)。その結果、骨格筋にはdyが発現せず、平滑筋特異的にdyが発現していることが確認できた。

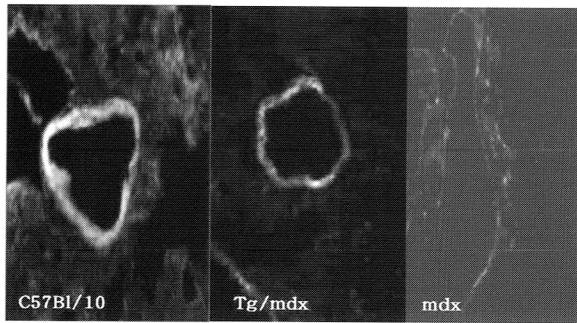


図8 dystrophinの発現

dystrophin抗体(dy 60 Kd)を用いて肺の血管の免疫染色を行った。Tg/mdxではC57マウスに比べやや弱いもののdystrophinの発現が確認できた。他のラインのTg/mdxマウスも同様の結果であった。

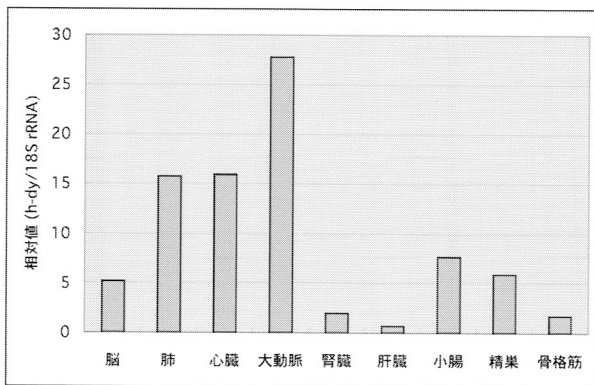


図9 RT-PCRによるdy発現の定量

脳、肺、心臓、大動脈、腎臓、肝臓、小腸、精巣、骨格筋からtotal RNAを抽出し、real time RT-PCRによって各組織での発現量の相対値を比較した。心臓及び平滑筋組織に高い発現を認める一方、骨格筋には極わずかの発現しか認めない。

## 3. Tg/mdxにおける血管での機能

コントロールのC57Bl/10マウスにおいては安静時の血流はNEの投与によってベースラインの値から大きく低下する一方、筋収縮時には低下は小さく、両者の低下の程度には有意な差があった(血流速度の変化: 安静時  $-18.8$  kHz/s, 筋収縮時  $-3.6$  kHz/s,  $p=0.000017$ )。これに対し、mdxマウスではNEを安静時に投与した場合の血流の低下の程度と筋収縮時の血流の低下の程度は有意差はなかった(安静時  $-31.9$  kHz/s, 筋収縮時  $-29.9$  kHz/s,  $p=0.445$ )。これはThomasらの報告と同様の結果である<sup>2)</sup>。これに対し、Tg/mdxでは安静時の血流の低下はmdxと同程度であったが、筋収縮時には安静時に比べ血流低下の程度は小さく、鈍化していた(安静時  $-25.9$  kHz/s,

筋収縮時  $-15.1$  kHz/s,  $p=0.004$ )。血管のコンダクタンスの変化も同様の結果で、C57Bl/10では安静時にNEを投与するとコンダクタンスの低下は大きいものに対し、筋収縮時の投与ではコンダクタンスの低下は有意に減少していた(コンダクタンスの変化: 安静時  $-0.301$  kHz/mmHg/s, 筋収縮時  $-0.072$  kHz/mmHg/s,  $p=0.000026$ )。mdxマウスではNEを投与した場合コンダクタンスの低下に安静時と筋収縮時の間には有意差はなかった(安静時  $-0.558$  kHz/mmHg/s, 筋収縮時  $-0.649$  kHz/mmHg/s,  $p=0.112$ )。これに対し、Tg/mdxにNEを投与した場合、筋収縮時のコンダクタンスの低下は安静時に比べ有意に鈍化した(安静時  $-0.528$  kHz/mmHg/s, 筋収縮時  $-0.36$  kHz/mmHg/s,  $p=0.020$ ) (図10)。以上より、筋収縮時にmdxでみられた $\alpha$ -adrenergicな血管の収縮による血流の低下は血管平滑筋にdyが存在することにより代償され野生型のパターンに近づくことが証明された。

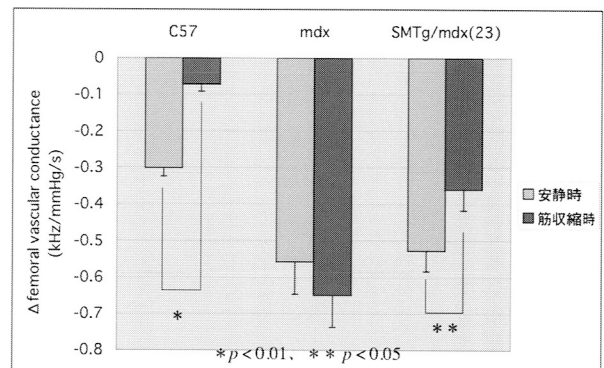


図10 NE投与による血管コンダクタンスの変化

C57, mdx, Tg/mdxのマウスに安静時及び筋収縮時にNEを経動脈的に投与した。Mdxでは筋収縮時も血管は全く拡張しないのに対し、Tg/mdxではC57マウスのように筋収縮時には血管の収縮が减弱していることが分かる。

## 【考察】

SMAp-dy-Anの作製は全長で19 kbである。ベクターの長さを含めると22 kbあり、プラスミドの増殖できる限界の長さである。このコンストラクトは通常の方法では作製できなかった。よって、必要な制限酵素のサイトを人工的に作製し、そのサイトを利用して容易にこのコンストラクトを作製することが出来た。

筋分化の過程でdyの発現はマイオチューブより確認できるようになる。C2C12細胞はマイオブラストであるため、dyの発現を認めない。ヒトsmooth muscle  $\alpha$ -actin promoterでは、マイオブラストで遺伝子の発現は可能である。よって、C2C12細胞にSMAp-dy-Anを導入後、dy陽性細胞を認めれば、このコンストラクトがdyを発現することが可能と考えてよい。

三輪らはヒトsmooth muscle  $\alpha$ -actin promoterにレポーター遺伝子であるCATをつなぎトランスジェニックマ

ウスを作製し、そのプロモーターの特徴を調べた結果心臓と平滑筋に特異的にCATが発現していた。我々もこのプロモーターを使用してdy遺伝子が平滑筋特異的に発現していることを定量RT-PCRで確認した。よって、Tg/mdxはdyが骨格筋で発現せずに血管平滑筋に特異的に発現しているマウスである。このマウスを使用して血管の機能及び骨格筋での筋崩壊を解析すれば血管平滑筋におけるdyの機能が明確になる。

Thomasらは1998年に、mdxマウスを用いて血管の運動時の血管に於いてアドレナリン投与後、その血管が拡張せず、収縮した状態が続き一過性に虚血になることを報告している<sup>3)</sup>。その原因はdyに結合している骨格筋由来のnNOSの欠如であるとしている。ついで、2000年Duchenne型筋ジストロフィーの血流を調べ、DMDの患者においても運動時の反射性の交感神経活動状態では血管収縮が減弱されず、血流調節が障害されていると報告し、骨格筋のnNOSの欠如が原因であることを示唆している<sup>3)</sup>。しかし、我々の研究では血管平滑筋のdyが回復することにより血流調節能が改善していることから、血管平滑筋においてdyと結合しているnNOS関与もあることが示唆された。但しTg/mdxでは組織像などの表現型が改善していない。免疫染色の結果から血管におけるdyの発現が野生型のC57Bl/10マウスに比べ弱い可能性があり、これが血流の改善が完全ではないことの一因になっていると考えられる。血管の機能がさらに回復すれば表現型も回復することが考えられ、これらの検討は今後の課題である。

### 【結 論】

我々は平滑筋のみにdyを発現するTg/mdxマウスを3ライン作出し、血管におけるdyの機能解析を行なった。その結果、血管平滑筋にdyが存在することにより筋収縮時の $\alpha$ -adrenergicな血管の収縮による血流の低下が改善することが分かった。

### 【参考文献】

- 1) Chang WJ, Iannaccone ST, Kim SL, et al: Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9142-7, 1996.
- 2) Nakano Y, Nishihara T, Sasayama S, et al: Transcriptional regulatory elements in the 5' upstream and first intron regions of the human smooth muscle  $\alpha$  actin encoding gene. *Gene* **99**: 285-9, 1991.
- 3) Gail DT, Mikael S, Kim SL, et al: Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci*

*USA* **95**: 15090-5, 1998.

- 4) Miike T, Sugino S, Ohtani Y, et al: Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. *J Neurol Sci* **82**: 67-80, 1987.
- 5) Mikael S, Bahman C, Shannon A. H, et al: Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13818-23, 2000.

### Ⅲ. 分子病態に基づく治療法の開発



# 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

井上 正 康\*

研究協力者 吉良 幸美\*\*

## 【緒 言】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は中年期以降に発症する進行性神経変性疾患である。ALS の約 5 ~ 10% は常染色体優性遺伝形質をとる家族性 (FALS) であり、その発症に Cu/Zn-SOD (SOD1) の点突然変異が関与することが判明したが、その分子機構は尚不明である。これまで、SOD1 の変異が分子構造維持に関与する部位に集中していることから、その細胞内局在性変化を検討し、正常 SOD1 がミトコンドリアやペルオキシソームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD1 では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。また、他臓器に比較してミトコンドリア依存性の高い運動神経が特異的ターゲットとなることから、本疾患ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、運動神経に選択的なアポトーシスが誘起される可能性が示唆された。さらに、ミトコンドリア依存性アポトーシスでは長鎖脂肪酸の膜毒性が重要であることを明らかにし、FALS の神経細胞死でも本毒性が関与している可能性が示唆された。本研究では、FALS におけるミトコンドリア障害の関与、及び  $\beta$  酸化を介して長鎖脂肪酸をエネルギーに変換するカルニチンの予防治療効果を検討した。

## 【方 法】

1. 抗ヒト型 SOD1, SOD2 及びペルオキシソーム膜タンパク質 PMP-70 の特異的抗体を調整した。本 SOD1 抗体はヒトとラットやマウスの SOD1 を分別検出可能である。Wistar ラットの肝と脳より顆粒画分と細胞質画分を調整し、SOD1 の細胞内局在を Western blotting 法により解析した。
2. インタクトな細胞内での SOD1 の局在性を検討するため、ヒト繊維芽細胞の免疫形態学的検討、及び SOD1 と各オルガネラ膜との結合について生化学的検討を行った。
3. 正常および本研究室で発見した Asn86Ser (N86S) 変異 SOD1 を酵母で発現調整し、ラット肝ミトコンドリアとペルオキシソーム膜との相互作用を検討した。

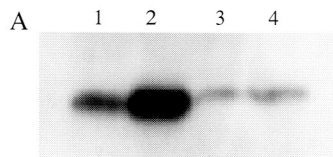
同様に、5 種類の FALS 変異 SOD の膜結合能についても検討した。

4. G93A-SOD1 FALS トランスジェニックマウス (Tg) の病態発症および進行におけるミトコンドリア障害の関与を検討するため、ミトコンドリアの遺伝子変異、活性酸素産生および酸化障害の程度を解析した。
5. PC-12 細胞を用い、カルニチンがミトコンドリア依存性の障害を抑制しうるか否かを検証した。
6. カルニチン (400 mg/kg/day) を含む飲水を Tg に与え、運動能力、発症時期、進行速度、及び寿命に対するカルニチンの作用を検討した。
7. 筋ジストロフィーの発症と病態進行における酸化障害の関与を検討するため、筋ジストロフィーマウスの骨格筋を脂質過酸化や DNA 酸化の指標である 4-HNE と 8-OHdG 抗体でそれぞれ免疫染色し、酸化障害の程度を解析した。

## 【結 果】

### 1. SOD1 の細胞内超微局在性の解析

細胞分画法及び免疫学的検討の結果、細胞質局在と考えられていた SOD1 が、細胞内ではミトコンドリアやペルオキシソームに可逆的に結合、局在していることが判明した。さらに、ミトコンドリアへの結合は、膜電位依存性であることが判明した。



### 2. 変異 SOD1 の細胞内局在性変化

FALS 患者変異型 SOD1 のミトコンドリアへの結合性を検討した結果、解析した変異 SOD1 は何れもミトコンドリア膜への結合力が低下していた。

\*大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学教室

\*\*同大学共同研究室

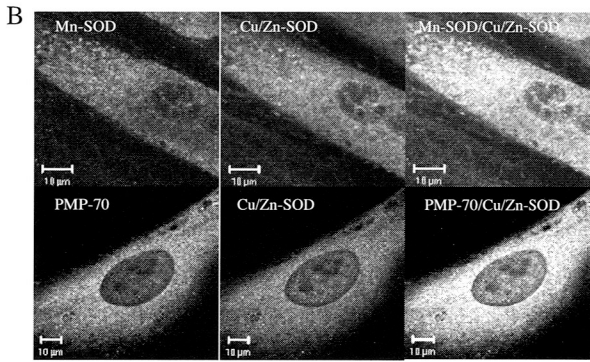


図1 SOD1の細胞内局在  
A) ラット肝・脳よりミトコンドリア画分および細胞質画分を調整し、抗SOD1抗体を用いたwestern blottingを行った。1: 肝ミトコンドリア画分, 2: 肝細胞質画分, 3: 脳ミトコンドリア画分, 4: 脳細胞質画分。  
B) 皮膚繊維芽細胞を用いた免疫染色像

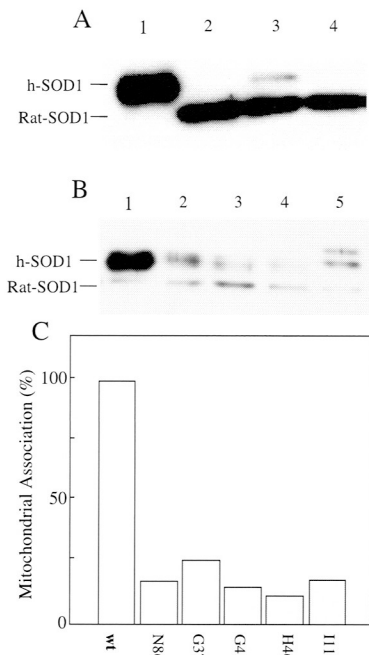


図2 FALS変異SOD1のミトコンドリア結合能  
ラット肝より分離調整したミトコンドリアとFALS患者に見られる変異SOD1のin vitro binding assay。  
A) 1: ヒトSOD1のみ, 2: ラットミトコンドリア画分 (mt) バンドはラットSOD1, 3: mt + wt-SOD1, 4: mt + N86S-SOD1, B) 1: mt + wt-SOD1, 2: mt + G37R-SOD1, 3: mt + G41S-SOD1, 4: mt + H46R-SOD1, 5: mt + I113T-SOD1。  
C) ヒト型SOD1のバンドを定量グラフ化

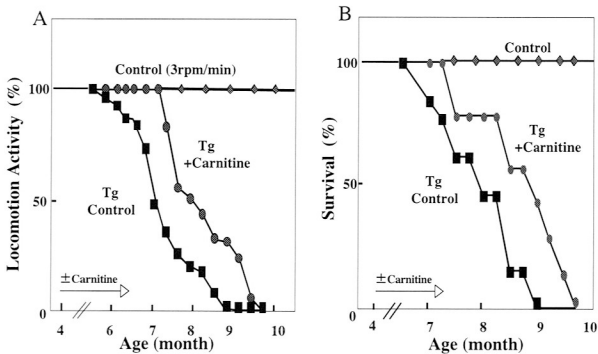


図3 G93AFALS Tgにおけるカルニチンの治療効果  
A) 運動機能テスト: ロタロッドを用いて3rpm/minの条件下で病態の進行に対するカルニチンの作用を検討。  
B) 寿命に対するカルニチンの作用

### 3. FALS Tg マウスの酸化障害

Tg マウスの脊椎と腓腹筋の脂質過酸化を検討した結果、病態の進行に伴い過酸化産物が増加し、8-OHdGのレベルも上昇した。

### 4. PC12細胞のミトコンドリア膜脱分極におけるカルニチンの影響

PC12細胞のミトコンドリアは血清除去により脱分極し、ミトコンドリア依存性アポトーシスを誘起する。カルニチン添加により本脱分極とアポトーシスが抑制された。

### 5. カルニチンの生体内作用

Tg マウスにカルニチン含有水 (400 mg/kg/day) を摂取させ、その運動能 (ロタロッドにより評価)、病態発症時期と進行速度、および寿命に対する影響を検討した。コントロールと比較し、カルニチン投与群では運動能力の低下時期が約1ヶ月半も遅延し、寿命も約1ヶ月延長した。

### 6. 筋ジストロフィーマウスにおける酸化障害

脂質過酸化とDNA酸化障害の指標である4-HNEおよび8-OHdGに対する抗体を用いた免疫染色の結果、mdxマウスの骨格筋細胞障害は筋束単位で起こること、再生間もない筋においても脂質過酸化反応が亢進していることが判明した。また、8-OHdG陽性細胞では脂質過酸化反応が顕著に見られ、筋ジストロフィーにおける筋細胞死に酸化障害の関与が示唆された。

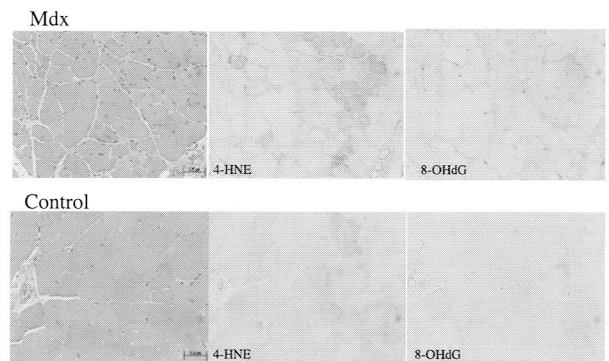


図4 mdxマウス筋の酸化障害  
10ヶ月齢のmdxマウスおよびコントロール筋のHE染色および同領域の4-HNE, 8-OHdG免疫染色像。

### 【考察及び結論】

これまでに、FALS患者で見られた変異部位の多くはSOD1分子の立体構造に影響する部位に多く、変異SOD1の多くは分子構造特性が変化していることが示唆されている。SODによる $O_2^-$ の細胞内消去反応は拡散律速的(部位特異的)に起こらなければならない。したがって、本研究で見いだしたごとく、SOD1が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアやペルオキシソーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークして

くる  $O_2^-$  をその膜表面で効率良く消去しうると考えられる。FALS 患者で見られる変異 SOD1 ではオルガネラへの結合能が低下していることより、変異 SOD1 の局在性変化がミトコンドリア膜局所での  $O_2^-$  の消去不全を誘起し、ミトコンドリアの活性酸素傷害が蓄積し、その結果ミトコンドリア依存性の細胞死を誘導する可能性が示唆された。実際、FALS の症状はミトコンドリア依存性の高い運動神経や骨格筋に特異的に発現する。Tg マウスでの検討でも、病態の進行に伴い酸化障害が増加しており、本仮説は臨床病態の特性とも良く一致する。

本研究では、ミトコンドリア依存性の神経細胞死がカルニチンにより著明に抑制されること、および FALS Tg マウスの病態が著明に軽減することも判明した。この所見は、FALS 患者でもカルニチンの保護作用を検討してみる意義があることを示唆する。今後、この点に注目し、病態動物モデルおよび FALS 患者における病態軽減法を開発したい。

また、筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) を用いた検討の結果、FALS 同様に、mdx マウスの骨格筋においても筋束単位での酸化障害が起こっていること、筋ジスに特徴的な中心核を持つ再生筋においても酸化障害が見られることが判明した。以上のことより、筋ジストロフィーの病態発症・進行においてもミトコンドリア障害の関与を検討し、FALS 同様に筋肉のミトコンドリアを保護するカルニチンの治療効果を検討してみる価値があると思われる。今後、この点に関してさらに検討していく予定である。

#### 【参考文献】

- 1) Kira Y, Sato E, Inoue M: Association of Cu, Zn-Type Superoxide Dismutase With Mitochondria and Peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **399**: 96-102, 2002.
- 2) Chang BJ, Nishikawa M, Sato E, et al: L-Carnitine Inhibits Cisplatin-Induced Injury of the Kidney and Small Intestine. *Arch Biochem Biophys* **405**: 55-64, 2002.
- 3) Nishikawa M, Nshiguchi S, Shiomi S, et al: Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* **61**: 1843-1845, 2001.
- 4) Furuno T, Kanno T, Arita K, et al: Roles of Long Chain Fatty Acids and Carnitine in Mitochondrial Membrane Permeability Transition. *Biochem Pharmacol* **62**: 1037-1046, 2001.
- 5) 新ミトコンドリア学 内海耕 井上正康監修. 共立出版. 2001

# ミトコンドリア脳筋症の分子治療に関する基盤研究

後 藤 雄 一\*

研究協力者 小牧 宏文\*\*\*, 三牧 正和\*, 和泉 美奈\*\*, 西野 一三\*, 埜中 征哉\*\*

## I. 自然軽快した 3243 変異を有する患者由来培養細胞の変異率変動に関する研究

### 【緒 言】

ミトコンドリア脳筋症の原因として、ミトコンドリア DNA 異常が明らかにされた。患者細胞では変異型と正常型が混在しており（ヘテロプラスミーという）、変異型の比率が細胞機能障害と相関することが判明した。将来的には、変異型の比率を人為的に変動させることで、異常の発現を抑制し、細胞機能を正常に保つ新しい治療法の開発をめざす。そのために、まず変異ミトコンドリア DNA の細胞内での挙動を決定している因子の同定を行う。ミトコンドリア DNA のヘテロプラスミーに関係する因子として、細胞の種類、分裂能、エネルギー依存度、微小環境（血流、糖の濃度）などが挙げられる。我々は、DNA の複製・維持に係わる遺伝的素因がもっとも重要な因子と考え、自然経過で骨格筋のヘテロプラスミーの程度が低下し臨床症状も改善した症例から得た線維芽細胞を用い、ヘテロプラスミーの挙動を検討した。

### 【対象と方法】

3243 変異を有し、骨格筋でのヘテロプラスミーが自然に低下した女性<sup>1)</sup> から、インフォームド・コンセントの元に線維芽細胞を樹立した。D-MEM/F12+10%FBS の培養液で培養し、週に 2 回の培養液交換、80%コンフルエンスで 1/2 を DNA 分離、1/4 を凍結保存、1/4

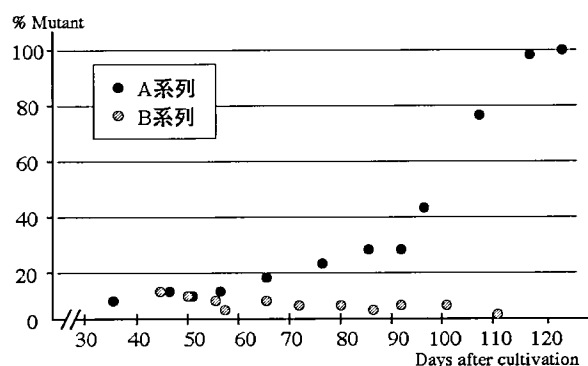


図 1 3243 変異率が時間とともに変動する 2 つの細胞系列

を新しいシャーレに蒔き直した。

3243 変異率の測定は、野生型／変異型に特異性のある Taq-Man プローブを用いてそれぞれの分子数を測定し、比率を算出した。また、ミトコンドリア DNA 全周のシーケンスは既報の通りに行い、同定された G185A 多型、T5775C 多型、T7080C 多型についても、それぞれ特異的な Taq-Man プローブを作成し、多型の有無と比率を検出する系を作った。これら多型の正常人での頻度は、200 人のデータ（未発表）を用いた。

### 【結 果】

3243 変異の比率が時間の経過とともに増加する A 系列と低下する B 系列が得られた（図 1）。両系列において、変異率が増加（もしくは低下）する前後におけるミトコンドリア DNA の全塩基配列を調べたところ、3243 変異を含む 4 個の変異が存在した（表 1、図 2）。そのうち、5775 変異はホモプラスミーで存在していたが、3243 変異と同様にヘテロプラスミーとして存在していたのは 2 個であった。一つは 185 変異で、3243 変異率の上昇とともに変異型の A の比率が低下し野生型の G をもつゲノムの比率が増加していた。もう一つは 7080 変異であり、185 に比較すると 3243 変異の挙動に一致はしないが、野生型の T の比率が低下し変異型の C の比率が増加していた。さらに詳細に 3243 変異率の変動との関係を調べたところ、図 3 のような挙動を示した。

	3243	185	5775	7080
WT	A	G	T	T
A1	G 10 %	A (Homo)	C (Homo)	T (Homo)
A2	G 78 %	A / G (Hetero)	C (Homo)	T / C (Hetero)
B1	G 10 %	A (Homo)	C (Homo)	T (Homo)
B2	G 1 %	A (Homo)	C (Homo)	T (Homo)

A1, A2: 変異率が上昇した細胞系列の培養初期と後期  
B1, B2: 変異率が上昇した細胞系列の培養初期と後期

表 1 両細胞系列の培養初期と後期のミトコンドリア DNA 全塩基配列

\*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部  
\*\*国立精神・神経センター武蔵病院

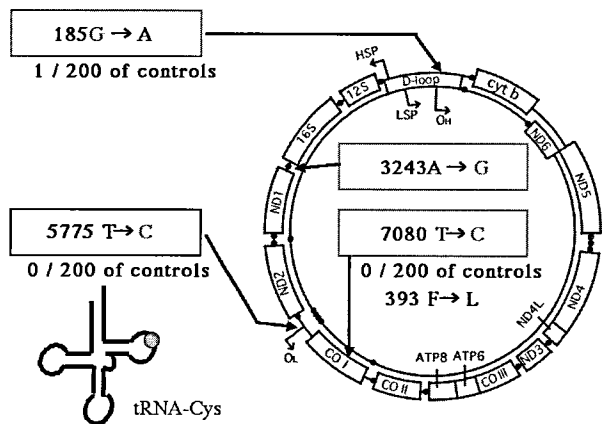


図 2

3243 変異率の低下した B 系列においては、上記のような 3243 変異率の変動に連動して変化する多型の出現は認めなかった (表 1, 図 2)。

### 【考 察】

時間の経過とともに 3243 変異率が上昇する系列では、185 変異型の減少 (野生型の増加) と 7080 変異型の上昇が平行に動いていた。185 変異は、正常対照者 200 人のうち 1 人に存在し、7080 変異は正常対照者 200 人には存在しなかった。したがって、これらはきわめて希な多型であり、3243 変異率の変動への関与の可能性はある。

185 変異の存在する部位は D-loop 中の H 鎖複製開始点の近傍である。DNA ポリメラーゼ  $\gamma$  や Tfam などの複製に係わる諸因子と 185 部位の塩基との相互作用が存在し、それに変化が起きている可能性がある。今後の検討課題である。

また、7080 変異は CO I サブユニットのなかの 386 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンがリジンに変化する変異であるが、3243 変異率の変動との直接的な関係は不明である。

### 【結 論】

骨格筋で自然に 3243 変異が低下した患者から得られた線維芽細胞において、時間とともに 3243 変異率が上昇する細胞系列と低下する細胞系列が得られた。その際、上昇する細胞系列のみに 185 と 7080 の部位に 3243 変異率と比率が連動する多型を見いだした。今後は、185 部位に相互作用する核性因子の同定と 185 変異の有無による効果の確認を行うとともに、7080 変異の効果についても検討が必要である。

### 【文 献】

1) Kawakami Y, Sakuta R, Hashimoto K, et al:

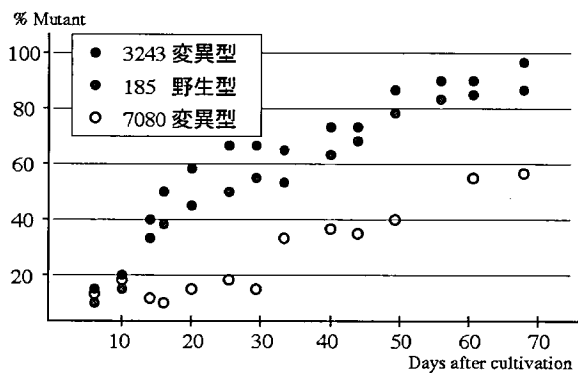


図 3 3243 VS 185 VS 7080

Mitochondrial myopathy with progressive decrease in mitochondrial tRNA-Leu(UUR) mutant genomes. *Annals of Neurology* 35: 370-373, 1994.

## II. 乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症の分子病態解析

### 【緒言】

乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症は、乳児期早期に哺乳力低下、筋力低下、呼吸障害などで発症するものの、1歳前くらいから自然に軽快する臨床経過をたどる希な疾患である。症状のある時期に採取した生検筋では、多数のragged-red fiber (RRF) とチトクローム c 酸化酵素活性の欠損を認めるが、回復期の生検筋では、RRFの減少とチトクローム活性の回復を認める。この病気は、病初期においては、同様な症状で発症し、急速に多臓器（腎、心など）の障害を併発し死に至る乳児致死型チトクローム c 酸化酵素欠損症との鑑別が困難であり、両疾患の確定診断と予後予測には病因を確定することが重要であるが、未だ明らかになっていない。今研究では、われわれが経験した乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症9例の病因の解明のため、ミトコンドリア DNA 全周の塩基配列の決定を行い、病因と考えられる点変異を見いだした。

### 【対象と方法】

乳児期に発症し、病理学的または生化学的またはその両方で生検筋におけるチトクローム c 酸化酵素欠損が確認され、臨床的に症状が改善した9例（男2例、女7例）を対象とした（表2）。骨格筋所見は、図4のように、特徴的なRRFとチトクローム c 酸化酵素欠損像を示した。

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9
筋生検時年齢	8m	5m	5m	3m	4m	9m	8m	3m	12m
性別	F	F	F	F	M	M	F	F	F
血液乳酸値	12.5	24.0	25.2	149.3	23.5	18.7	41.8	5.5	WNL
髄液乳酸値	8.3	ND	21.3	50.0	11.1	ND	48.2	11.3	ND
RRF	++	++	++	++	++	++	+	++	+
COX欠損	+	+	+	+	+	+	+	+	+
生化学的COX欠損	+	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND

表2 症例の臨床所見

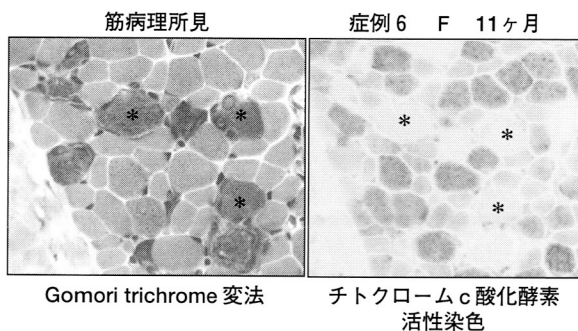


図4

9例のうち、6例は3歳までに正常対象者と変わらぬ運動能力を回復した完全回復群、3例は人工呼吸や人工栄養などの医学的処理を必要とした不完全回復群であった。

全例の生検筋からDNAを抽出し、Akanumaらの方法でミトコンドリアDNA全周の塩基配列を決定した。

見いだされた14674変異を検出するために、変異があると制限酵素で切断される mismatchプライマーを用いたPCR-RFLP法を行った。

### 【結果】

9例の全周シーケンスにより、標準配列とは異なる84個の塩基置換を見いだした。そのうち多型として報告があるものが69個、報告のないものが15個であり、9例内の6例に同一塩基の置換（2種類）を見いだした。それは、グルタミン酸転移RNAの3'末端のアデニンがグアニンに変わる変異（4例）、もしくはシトシンに変わる変異（2例）であった（図5）。これらは、正常日本人200例には存在しない塩基置換であった。

また、PCR-RFLP法でも点変異の確認ができた（図6）。これらの変異はすべてホモプラスミーで存在することが判明した。

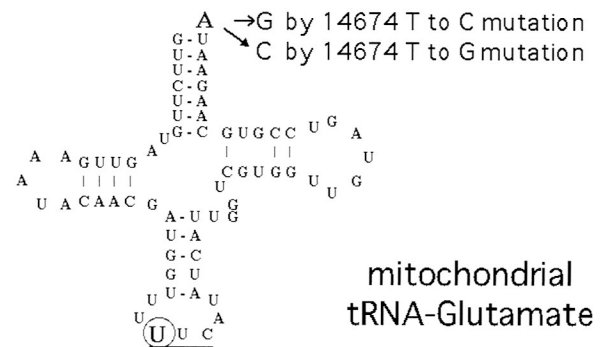


図5 T14674C(4例),T14674G(2例)が完全回復例6例全例に存在した

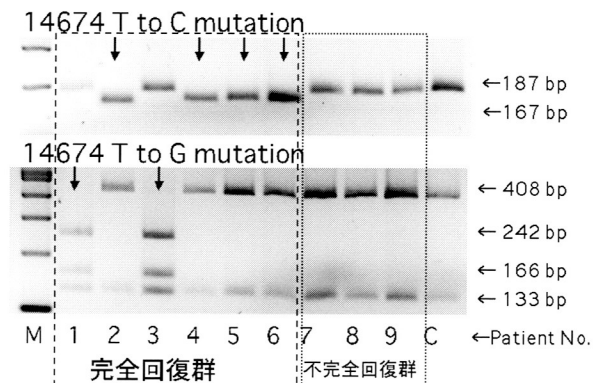


図6 14674変異のPCR-RFLPによる確認

### 【考 察】

乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症の9例のうち、完全回復型6例にミトコンドリアDNAの同一部位にホモプラスミーの点変異を見いだした。この変異は、日本人200人には存在せず、また乳児致死型の5例の検討でも存在しなかった（未報告）。したがって、この部位の点変異は、乳児良性型特異的な病因的変異と考えられる。

この部位は、グルタミン酸転移RNAの3'末端に位置し、一次転写産物からのプロセシング、CCA塩基の付加、U34のアンチコドン修飾、アミノアシル化という一連の転移RNAの成熟のどの部分に影響を与えるかは、今のところ不明である。プレリミナリーな実験結果ではあるが、Northernプロットでは明らかな異常は検出できていない。

このホモプラスミックな点変異の効果が明らかでない以上、なぜこの疾患が良性の経過をたどるのかについての知見は得られていないが、上記の転移RNAの成熟化プロセスに関するある核性因子にアイソフォームが存在し、その発現の変化が関わっている可能性を最も有力と考えて、今後の研究を進めてゆく予定である。

### 【結 論】

乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症の特異的なミトコンドリアDNA上の点変異を見いだした。この点変異と良性な経過との関係が明らかになれば、他の病気の新しい予防や治療について大きなヒントが得られるものと考えられる。

# 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

遠藤 仁 司\*

研究協力者 佐藤 正章\*, 佐藤 史\*, 坂下 英司\*, 浜本 敏郎\*

## 【緒 言】

ミトコンドリアは細胞内小器官であり、その構造は外膜とクリステ構造を持つ内膜から構成され、細胞質全体に管状の網様な構造をとって分布する。また核遺伝子以外の独自の遺伝子（ミトコンドリアDNA）を有する。ミトコンドリアの機能は、細胞の活動に必要なエネルギーを産生し、また重要な生体物質の生合成や分解などを触媒する。また活性酸素の産生やアポトーシスの誘導シグナルの産生などの生物活性も有する。ミトコンドリア遺伝子の異常に基づくミトコンドリア病はミトコンドリア脳筋症の病因であり、さらに拡張型心筋症、II型糖尿病、アルツハイマー病やパーキンソン病などの病因にもなる。変異ミトコンドリアDNAは正常ミトコンドリアDNAと共存するヘテロプラスミーとして細胞内に存在し、変異DNAの存在比が一定の閾値を越えると細胞機能が低下し症状が出現する。ミトコンドリアDNAは核と異なりミトコンドリアに存在するので、これらの疾患に対する遺伝子治療法は現在確立されていない。

ミトコンドリア遺伝子異常症に対する遺伝子治療には、従来型の核遺伝子を標的としたベクターではなく、ミトコンドリア遺伝子をミトコンドリア内に導入する新規な方法が必要とされている。本研究ではミトコンドリアを特異的に標的するリポソームベクターを新規に開発し研究することを目的とする。我々はミトコンドリア同士の認識と融合を司るヒトミトコンドリア膜貫通タンパクを同定した。本研究ではこのタンパクを膜の有効構成成分とするプロテオリポソームを開発する（図1）。この非ウイルス性のリポソームベクターに正常なミトコンドリアDNAを包埋し、これを細胞内に移入することにより、正常な遺伝子をミトコンドリア内に導入する事が最終的に可能と考えられる。また、このリポソームベクターは、任意の物質（外来遺伝子や薬剤等）をミトコンドリア内に導入することが可能である。導入する任意の物質として、変異ミトコンドリアDNAを認識するリボザイムや、ミトコンドリアの代謝を改善

する薬剤なども考えられる。

## プロテオリポソーム

## ミトコンドリア

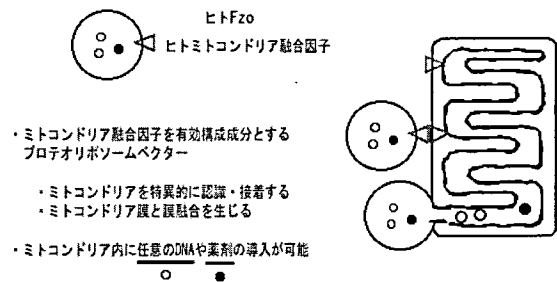


図1 ミトコンドリアを標的するリポソームベクターの概念図

このミトコンドリアDNAに対する遺伝子治療法の類縁のものとして、マイクロインジェクション法やサイブリード法による外来ミトコンドリアの移入が報告されているが、ミトコンドリア以外の多量の細胞質成分を移入するという欠点や、また任意の遺伝子や物質をミトコンドリア内に移入できないという欠点がある。

本研究では、(1)ヒトミトコンドリア融合因子を単離し機能ドメインの検討を行い、ミトコンドリア凝集・融合に必要なドメインを明らかにする、(2)このドメインの組換え蛋白を作製し、ミトコンドリアを標的するプロテオリポソームを作成し、試験管内での膜融合活性を検定する、(3)ミトコンドリア融合装置の補助因子を解析する。以上の研究を通じて、ミトコンドリアを特異的に標的するリポソームベクター開発の基礎的研究を施行する。

## 【方 法】

### 1. ミトコンドリア融合因子ヒトホモログの単離と変異解析

ヒトミトコンドリア融合因子 (*hfzo1-3*) のcDNAを、ショウジョウバエ *fzo* (*dfzo*) 遺伝子のホモロジーから単離した。これらのcDNAを哺乳細胞発現ベクターに組み込み、HeLa細胞に一過性に発現させた。遺伝子導

\*自治医科大学医学部生化学講座



入後ロダミン 123 でミトコンドリアを染色し、ミトコンドリアの凝集を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。またこれらのカルボキシル末端 (C 末端) に GFP を付加した遺伝子を作成し、本タンパク質の細胞内局在を検討した。また、アミノ末端 (N 末端) や C 末端の欠失変異や、GTP 結合ドメインへの点変異体を作製し機能ドメインを検定した。また遺伝子導入した細胞のミトコンドリア内膜をチトクローム C 酸化酵素染色を行った後、電子顕微鏡を用いてミトコンドリア膜の融合を検定した。さらに本タンパクに対するポリクローナル抗体を作製した。HeLa 細胞からミトコンドリアを分離し、抗体を用いてミトコンドリア上の局在を生化学的に検定した。また、ゲルろ過法にて本タンパク質を含む複合体形成を検定した。

## 2. ミトコンドリア融合因子の機能ドメインの作成

ヒトミトコンドリア融合因子 (hFzo1-3) の機能ドメインを解析したところ C 末端領域が融合活性を持つ領域であった。本領域をコードする cDNA を、原核生物発現用ベクター (pQE80L) に組み込み、大腸菌を用いて His タグ融合タンパク質の大量産生およびアフィニティー精製を施行した。

## 3. プロテオリポソームの作成と膜融合活性の測定

精製した本蛋白を大豆リン脂質に組み込んだプロテオリポソームを作製した。本プロテオリポソーム同士が膜融合して、リポソーム内容物が混和するか否かを、テルビウム (Tb) とジピコリン酸 (DPA) を用いた蛍光強度の測定により、試験管内で検証した。

## 4. 免疫沈降法による複合体タンパク質の同定

Fzo とは別のミトコンドリア融合因子である酵母 Mgm1 のヒトホモログである OPA1 の遺伝子を単離した。この N 末端部分に相当するタンパク質を大腸菌にて大量産生し、これに対するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて HeLa 細胞のミトコンドリアを試料として免疫沈降法を行った。これらの免疫沈降物にヒト Fzo が存在するか、抗ヒト Fzo 抗体によるウェスタンブロット法にて検討した。また、OPA1 タンパク質のミトコンドリア膜形態形成に関する機能を解析した。

## 【結果】

### 1. ミトコンドリアの凝集および融合を促進する蛋白の同定と機能解析

ミトコンドリアの凝集および融合に関わるヒトミトコンドリア融合因子 (hFzo1-3) は各々 741, 769 および

757 のアミノ酸長を有する大きな GTP 結合タンパク質で、C 末端に二つの膜貫通ドメインと二つのコイルドコイルドメインを有する。hfzo1 と hfzo2 は一つの遺伝子から選択的スプライシングにて産生される (特許出願: 特願 2001-254525 号, PTC/JP01/09783)。また hfzo2 と hfzo3 にコードさせるタンパク質は N 末端にミトコンドリア標的シグナルと予測される構造を有する (図 2)。これらの遺伝子を哺乳類発現ベクターに組み替え HeLa 細胞に一過性発現させたところ、いずれの遺伝子もミトコンドリアの凝集活性が認められた。また、これらのタンパクの C 末端に GFP を融合した遺伝子を発現させると、いずれの遺伝子産物もミトコンドリアに局在した。これらの遺伝子のミトコンドリア凝集活性は、hfzo2 > hfzo1 > hfzo3 の順に高かった (図 3)。

次に、これらのタンパク質の機能ドメインを同定するために GTPase ドメインに不活型の点変異を導入したところ、hFzo1 (K88T) と hFzo2 (K116T) では凝集活性が著明に抑制されたが、hFzo3 (K109T) では活性に変化は認められなかった。欠失変異解析では、まず C 末端欠失変異を作製したところ、hFzo2 と hFzo3 の N 末端に存在するミトコンドリア標的シグナルは、ミトコンドリアへの標的活性を有することが共焦点レーザー顕微鏡で確認された。しかし N 末端にはミトコンドリア凝集活性は存在しなかった。次に N 末端の欠失変異解析では、C 末端のコイルドコイルドメインと膜貫通ドメインで凝集活性が認められた。特に hFzo1, 2 の C 末端領域のみで、GTPase 不活化点変異体における活性よりも高いミトコンドリア凝集活性を示したことから、C 末端領域がミトコンドリア凝集活性の活性ドメインであり、N 末端の GTPase ドメインは活性調節ドメインであることが明らかになった (図 3)。

ヒト Fzo タンパク質はミトコンドリアの凝集活性を持つことが示されたが、ミトコンドリアの膜の融合活性があるか否かを検討するために、電子顕微鏡を用いてミトコンドリア膜の状態を観察した。hfzo2 を遺伝子導入した HeLa 細胞をチトクローム C 染色後、電子顕微鏡にてミトコンドリア像を観察すると、ミトコンドリア内膜の融合を示唆する像が示された。次に HeLa 細胞からミトコンドリアを精製し、抗 hFzo 抗体を用いたウェスタンブロット法にて細胞内局在を検討したところ、これらのタンパク質はミトコンドリアに局在し、特に重ミトコンドリア粒子のシヨ糖密度勾配遠心法の結果からミトコンドリア外膜画分および中間比重画分の両方に存在することが示された。またプロテアーゼ保護実験からこれらタンパク質のトポロジーを検討したところ、N 末端が細胞質側に、C 末端がマトリックス側に

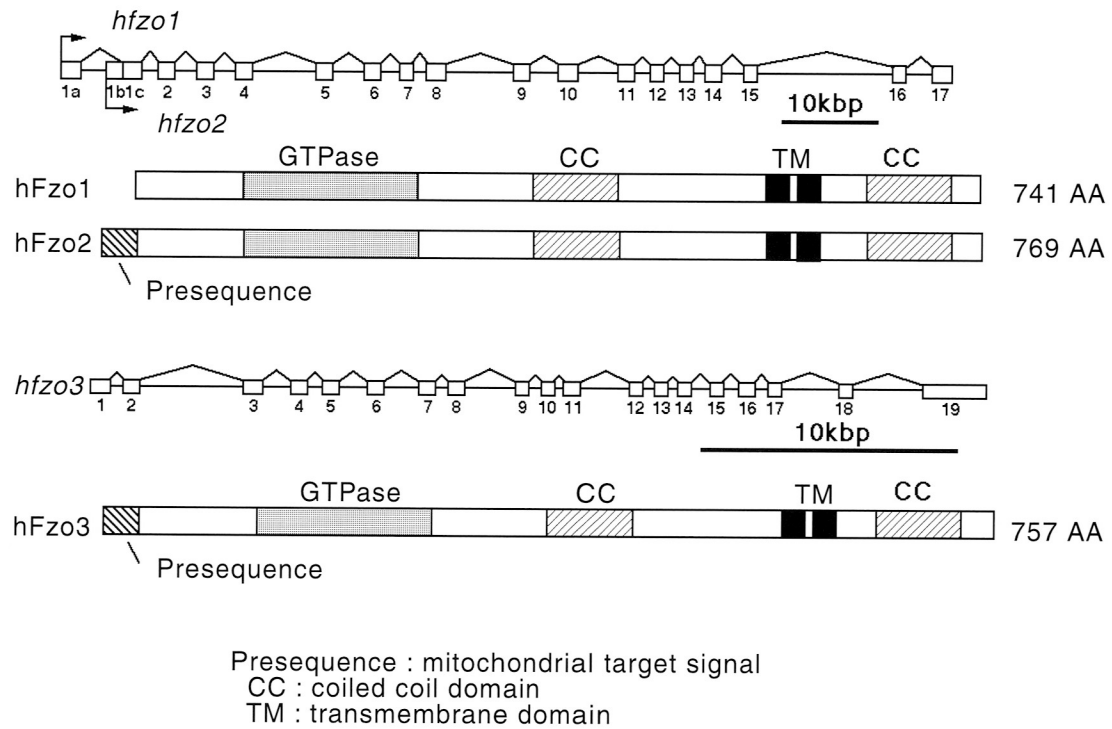


図2 ミトコンドリア融合因子・ヒト *fzo* 遺伝子とタンパク質の構造

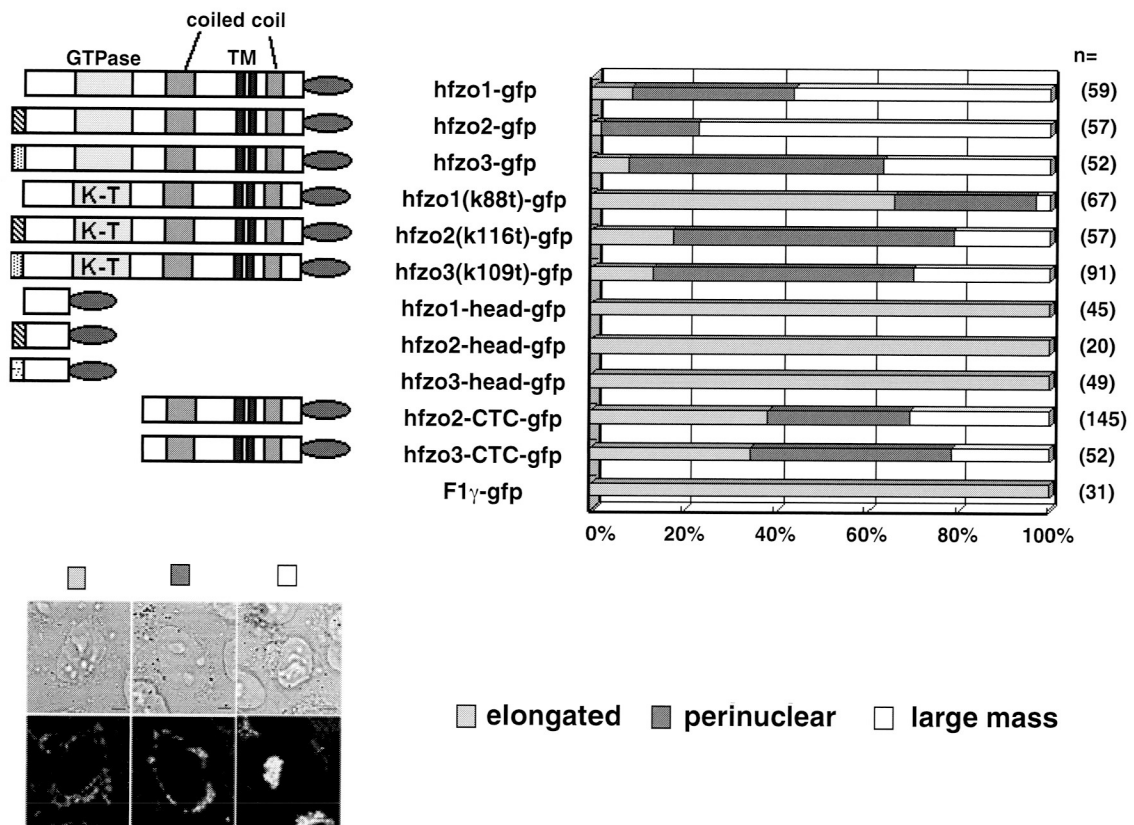


図3 ミトコンドリア凝集活性の要約  
 HeLa細胞に各変異遺伝子を導入し、ミトコンドリアの凝集パターンを elongated, perinuclear, large mass の三種類に分類して、それぞれのミトコンドリア凝集活性を検討した。

存在することが示された。図4にそのモデルを示した。

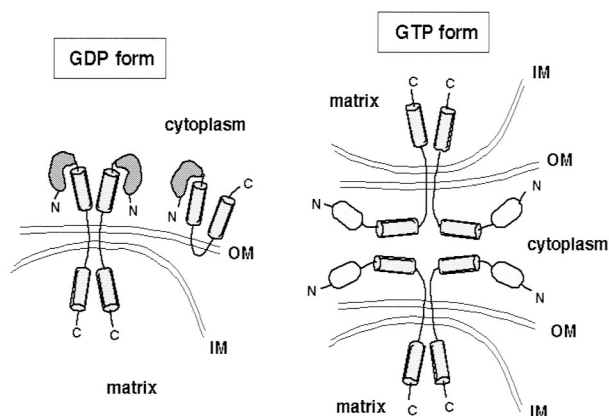


図4 ヒトミトコンドリア融合因子 hFzo のモデルの提唱  
GDP form ではGTP結合ドメインは膜融合の活性部位であるコイルドコイルドメインを抑制するが、GTP form ではコイルドコイルドメインの抑制は解除され、隣接したミトコンドリア膜上のコイルドコイルドメイン同士が膜融合を引き起こすと考えられる。IM: inner membrane, OM: outer membrane.

## 2. ミトコンドリア融合因子を用いたプロテオリポソームの作成と機能解析

ヒトミトコンドリア融合因子 (hFzo2, 3) のカルボキシル末端領域はミトコンドリア融合活性を示す活性領域である。本領域は各々 394 および 389 のアミノ酸長を有し、N 末端側からコイルドコイルドメイン、二つの膜貫通ドメイン、コイルドコイルドメインの各ドメイン構造を有する。この領域をコードする cDNA を大腸菌発現ベクターである pQE80L にサブクローニングし、大腸菌 BL21 codon plus 株に形質転換した。次に IPTG で誘導させ His-hFzo 融合タンパク質を大量発現させた。2 種類の融合タンパク質はいずれも封入体として不溶性画分に存在していたため 8M 尿素存在下で可溶化させた後、ニッケル NTA カラムを用いて精製した。その後、透析にて変性剤を除き精製タンパク質をまき戻させた。次に、巻き戻した精製タンパク質に大豆リン脂質を混和させプロテオリポソームを作成した。超遠心分離法にてリポソームを分離すると、組み換えタンパク質が検出された。その結果これらのタンパク質はリポソームに組み込まれた膜タンパク質であることが試験管内で示された。

次に、このリポソームの膜融合活性を Tb/DPA 法を用いて測定した。Tb/DPA 法は Tb と DPA を内包するそれぞれのリポソームを作成したのち、それらを試験管内で反応させる方法である。膜そのものを蛍光でラベルした場合とは異なり、リポソームの内腔がミキシングしなければ Tb/DPA の蛍光が発しないため、Tb/DPA 法はより厳しい条件下での膜融合活性の測定が可能である (図5)。それらの膜融合活性を Tb/DPA の蛍光強度

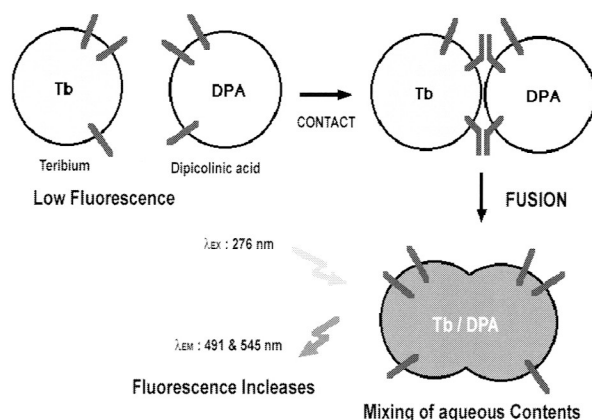


図5 ヒト Fzo タンパク質を有するプロテオリポソームの膜融合アッセイ法

を経時的に測定し検討した。その結果、hFzo を含むプロテオリポソームでは、コントロールである大豆リン脂質のみのリポソームに比較して Tb/DPA の蛍光強度増加の初速度が有意に高値を示した。すなわちリポソーム同士が融合しかつそれらの内容物が混和することが示された。以上から、hFzo タンパク質はそれ自身が膜融合活性を有する分子であることが示された。

## 3. ミトコンドリア融合装置の複合体タンパク質の検討

ミトコンドリア膜を可溶化してゲルろ過を行ったところ、いずれのタンパク質も約 440 kDa の大きさの複合体を形成しており、単量体の大きさでは存在しなかった。このことから、hFzo タンパク質はミトコンドリア膜融合装置としてタンパク質複合体を形成していることが明らかとなった。

Fzo とは別のミトコンドリア融合因子である酵母 Mgm1 のヒトホモログである OPA1 の遺伝子を単離し、この N 末端部分に相当するタンパク質を大腸菌にて大量産生し、これに対するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて HeLa 細胞のミトコンドリアを可溶化し、免疫沈降法を行った。沈降物を抗ヒト Fzo 抗体にてウェスタンブロット法を行った結果、OPA1 タンパク質とヒト Fzo タンパク質は共沈することが明らかになった (図6)。即ち、OPA1 タンパク質はミトコンドリア融合装置の複合体の構成因子と考えられた。

次に OPA1 タンパク質のミトコンドリア膜形態形成に関する機能解析を試みた。抗 OPA1 抗体を用いて HeLa 細胞のウェスタンブロットを施行したところ、分子量の異なる二種類の OPA1 アイソフォームが存在し、いずれもミトコンドリア膜間腔に局在することを明らかにした。また、亜ミトコンドリア粒子のショ糖密度遠心法の結果から分子量の小さなタンパク質 (short form) は外膜に、また分子量の大きなタンパク質 (long form)

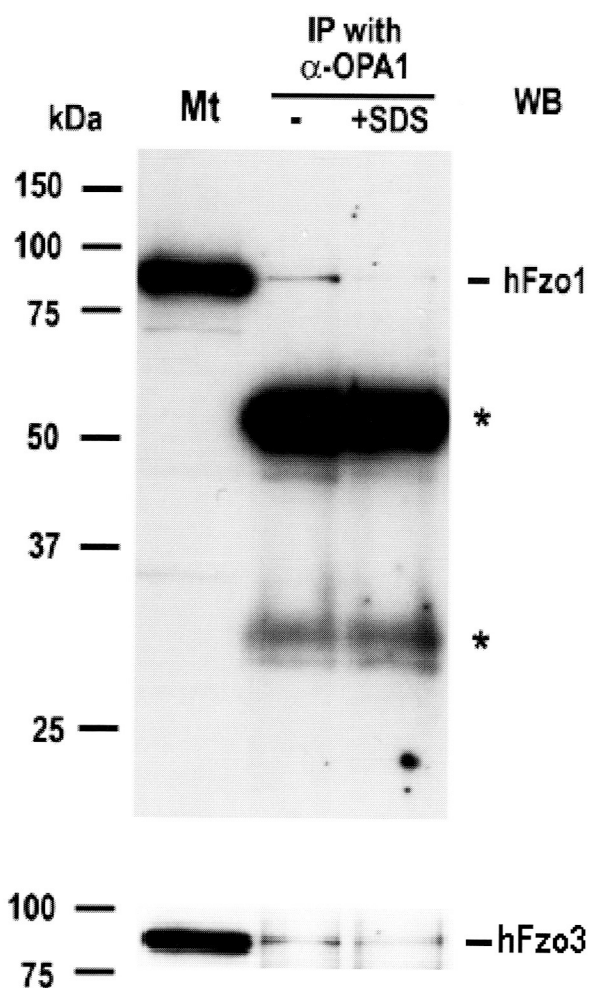


図6 抗OPA1抗体によるFzoタンパク質との免疫沈降  
 抗OPA1抗体を用いて、SDS存在下・非存在下で可溶化したミトコンドリア試料を免疫沈降した。その沈降物とミトコンドリア試料を用いて、抗hFzo1抗体および抗hFzo3抗体にてウェスタンブロット法を行なった。その結果、OPA1とhFzo1-3タンパク質は共沈することが示された。なお、\*で示すバンドは抗体の重鎖と軽鎖である。

は主に内膜に結合して存在することが明らかになった。次に可溶化したミトコンドリアをゲルろ過法にて分析すると、long formは約440 kDaの大きさで、short formは約150 kDaの大きさの分子量の分画に存在した。即ち、それぞれの異なるタンパク質複合体を形成し、特にlong formがhFzoタンパク質と複合体を形成することが明らかになった。この内膜と外膜への局在の相違は、それぞれの膜の形態が異なっていることを考えると、OPA1の分子機構を考える上で重要な問題である。

### 【考察】

ミトコンドリアDNA異常に基づくミトコンドリア病の根本的治療には、従来の核遺伝子への遺伝子治療法とは異なる、ミトコンドリアを標的とした新たな遺伝子導入法の開発が必要である。本研究では、ミトコンドリア融合因子を有効構成成分とするミトコンドリアを特異的に標的する新規リポソームベクターの基礎

的開発を目的としている(図1)。このようなベクターを開発することによって、正常なミトコンドリアDNAだけでなく、リボザイムなどの任意の外來性遺伝子やミトコンドリアの機能を調節する薬剤などをミトコンドリア内に導入することが可能となり、将来的にはミトコンドリアの機能が関わる多くの疾患を対象とした新たなドラッグデリバリーシステムとして利用が可能になると考えられる。

本研究では、ミトコンドリア同士の凝集と融合を司る因子としてヒト*fzo*遺伝子を単離した。本遺伝子は分子量約80 kDaの大きな膜結合型GTPaseをコードする。本タンパク質はHeLa細胞内でミトコンドリアの凝集活性を有し、電顕上ミトコンドリア内膜の融合を促進する。また、ミトコンドリア外膜と内膜を貫通する特徴を有し、GTPaseドメインによって活性が調節される。ミトコンドリア凝集活性はC末端の領域が必要十分であった。以上から、このC末端領域のタンパク質を、ミトコンドリアを標的するプロテオリポソームベクターの有効構成成分として使用することが可能と考えられた。

前述の仮説を確かめるために、我々はミトコンドリア融合因子のC末端領域の組換え蛋白を作成し、これを脂質に組み込んだプロテオリポソームを作製した。本タンパク質は膜蛋白であることがin vitroで示された。さらに、Tb/DPA蛍光測定法によりミトコンドリア融合因子を持つプロテオリポソームに特異的にリポソーム同士が融合し内容物が混和することが試験管内で証明された。これまでの研究から、ミトコンドリア融合因子は巨大な複合体を形成していることが示されたが、今回の実験から本タンパク質が単独で膜融合活性を持つことが示された。本タンパク質は大きな複合体を形成するミトコンドリア融合装置のコア因子と考えられる。

ヒトFzoタンパク質のC末端領域は、コイルドコイルドメインおよび膜貫通ドメインを持つことから、小胞の融合に関する装置(SNARE, syntaxinなど)の一次構造に類似性が認められる。一組のコイルドコイルドメインと膜貫通ドメインを有するSNAREタンパク質も単独でリポソームの融合活性を持つことから、ヒトFzoタンパク質のC末端領域もSNAREタンパク質と同様のメカニズムで膜融合を行うと考えられる。

一方、我々はミトコンドリア融合タンパク質のひとつであるOPA1がhFzoタンパク質と結合することを明らかにした。これまで我々はOPA1が哺乳動物細胞でアイソフォームを形成し、ミトコンドリア内膜と外膜におのおの異なる局在を示すことを明らかにした。特に内膜のクリステ構造の形成に関与すると考えられる。特に分子量の大きなOPA1アイソフォームは、hFzoタンパ

ク質と同じ約440 kDaの複合体を形成する。このように、ミトコンドリア融合装置の全容を明らかにすることはミトコンドリアを標的するリポソームベクターのミトコンドリア融合効率を高める上で重要である。

### 【結 論】

本研究ではミトコンドリア融合因子の組換えタンパク質を脂質に組み込んだプロテオリポソームを作製し、ミトコンドリアを特異的に標的するリポソームベクターの開発を目指した。我々はミトコンドリア融合因子であるヒトFzoタンパク質を単離し、膜融合活性の必須ドメインを同定した。またこのドメインの組換えタンパク質を作製し、試験管内で作成したプロテオリポソームを用いて膜融合活性を証明した。さらにミトコンドリア融合装置のひとつであるOPA1タンパク質を検討し、ヒト細胞にアイソフォームが存在しミトコンドリア内の局在が異なることを明らかにした。本因子はミトコンドリア融合装置の補助因子のひとつである。今後はミトコンドリアDNAを抱埋した本プロテオリポソームを細胞にマイクロインジェクションすることにより、実際に細胞内でミトコンドリアを標的するかを検討することが重要である。本研究はミトコンドリア病の遺伝子治療の基礎的技術を確立する第一歩である。

### 【参考文献】

- 1) Inoki Y, Hakamata Y, Endo H, et al: Proteoliposomes colocalized with endogenous mitochondria in mouse fertilized egg. *Biochem Biophys Res Commun* **278**:183-91, 2000.
- 2) Inoki Y, Miura T, Endo H, et al: Ganglioside GD3 and its mimetics induce cytochrome c release from mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:1210-6, 2000.
- 3) Kagawa Y, Inoki Y, and Endo H: Gene therapy by mitochondrial transfer. *Adv Drug Deliv Rev* **49**:107-19, 2001.
- 4) 遠藤仁司. ミトコンドリアの相互作用と融合. 新ミトコンドリア学, 共立出版, pp 170-8, 2001.
- 5) Hayakawa M, Sakashita E, Endo H, et al: Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J Biol Chem* **277**: 6974-84, 2002.
- 6) Tamada H, Sakashita E, Endo H, et al: cDNA cloning and characterization of Drb1, a new member of RRM-type neural RNA-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 96-104, 2002.
- 7) Furukawa Y, Nishimura N, Endo H, et al: Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 39760-8, 2002.
- 8) Satoh M, Hamamoto T, Endo H, et al: Differential sublocalization of Dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **300**: 482-93, 2003.
- 9) Jin Y, Suzuki H, Endo H, et al: A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J* **22**: 905-12, 2003.
- 10) Yokouchi K, Ito M, Endo H, et al: Stage-specific regulatory element of mouse Sry gene. *Mol Reprod Dev* **64**: 389-96, 2003.
- 11) Inoki T, Yamagami S, Endo H, et al: Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 1036-1043, 2004.
- 12) Sakashita E, Tatsumi S, Endo H, et al: Human RNPS1 and Its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. *Mol Cell Biol* **24**: 1174-1187, 2004.
- 13) Sato A, Endo H, Kagawa Y, et al: Polymorphism, heteroplasmy, mitochondrial fusion and diabetes. *Bioscience Rep* (in press)

# 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

原 孝 彦\*

研究協力者 中山 由紀\*, 奈良 典子\*, 戸倉 由香<sup>1</sup>, 荒川 正行<sup>2</sup>, 松田 良一<sup>2</sup>, 河北 有規子<sup>3</sup>,  
齋藤 加代子<sup>3</sup>, 竹島 泰弘<sup>4</sup>, 松尾 雅文<sup>4</sup>, 加藤 真樹<sup>5</sup>, 関 直彦<sup>5</sup>, 北村 俊雄<sup>6</sup>

## 【緒言】

筋ジストロフィーに代表される筋萎縮症は低年齢でのいたましい発病経緯を辿ることから、発症の原因究明と治療方法の開発を目指して世界各国で活発な研究が進行している。ヒト筋ジストロフィー患者では骨格筋・心筋の変性がおこり、そこが線維化して筋肉組織が加齢とともに退縮していく。興味深いことに、筋ジストロフィーの実験動物モデルであるジストロフィン欠損マウス Mdx では、横隔膜を除いて成獣の骨格筋線維は機能的に正常に近い。これは Mdx マウス筋の再生能力が高いことに起因すると推察されている。近年、Mdx マウス横隔膜の変性も IGF-1 の強制発現や Myostatin の中和阻害によって克服されることが示された。このように、筋再生力を高めることも筋ジストロフィーの治療戦略として期待されている。一方、Mdx マウスの筋再生部位には骨髄の造血幹細胞も動員され、低頻度ながら筋細胞へと分化転換する。我々は近年の研究によって、再生組織の血管や間質層に造血幹細胞に由来する骨髄球系血液細胞が多く動員されることを見出している<sup>1)</sup>。したがって筋変性部位の迅速な修復時には、筋細胞自身の再分化と組織再構築のための血管内皮細胞や間質系細胞の動員が同時に起こっていて、マクロファージをはじめとする骨髄球系血液細胞がそれを助けていると推察される。我々は、ジストロフィン欠損による若齢 Mdx マウスでの筋変性が、二次的に骨格筋再生を促進する遺伝子プログラムを発動させているのではないかと仮定した。

本研究ではまず Mdx 筋細胞株を樹立してジストロフィン欠損に伴って生ずる遺伝子発現の変化を網羅的に解析することで、筋変性につながる細胞内シグナル分子群および筋再生誘導サイトカインの同定を試みた。

次に、筋ジストロフィー患者の筋生検より筋細胞株を新たに樹立し Mdx マウス筋細胞株との遺伝子発現を比較することによって、筋再生促進と筋変性に関連する遺伝子産物の絞り込みをおこなった。最終的には Mdx マウス筋細胞株や筋ジストロフィー患者生検筋細胞株で発現変動する遺伝子群の中から、分泌性タンパク質をコードする 5 種類の分子に標的をしばり、詳細な発現動態と機能探索をおこなった。これら一連の試みを通じて、骨格筋の再生と筋ジストロフィー発症・病態悪化の新たな分子背景を明らかとすることを目指した。

## 【方法】

Mdx マウス骨格筋および B10 正常マウス骨格筋初代培養系に、SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルスを感染させることでそれぞれの筋細胞を株化した。次に両細胞株の全 cDNA を蛍光標識したプローブを用いて、マウス cDNA ランダムマイクロアレイやサイトカインマイクロアレイをハイブリダイズし、発現量に差のある遺伝子群を同定した。その後発現レベルの差をノーザンブロットイングや RT-PCR により確認した。一方、ベッカー型あるいはデュシャンヌ型筋ジストロフィーと診断された患者筋生検細胞数例を患者家族の同意のもとで、SV40 温度感受性 T 抗原を利用してそれぞれ株化した。それらの患者生検筋細胞株を用いて、Mdx 筋細胞株で発現変動していた遺伝子群の発現動態を解析した。さらに Mdx 筋細胞株で発現変動していた分泌性タンパク質をコードする遺伝子については、筋損傷モデル実験系を用いて筋再生時における発現誘導と生物活性について検討した。

\*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

1, 東京大学大学院理学系生物科学

2, 同総合文化研究科

3, 東京女子医大小児科

4, 神戸大学大学院医学系育成医学

5, 千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム

6, 東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法

## 【結果】

### 1. ジストロフィン欠損マウス骨格筋細胞株の樹立

Mdx マウスや筋ジストロフィー患者の筋肉中の遺伝子発現動態を解析するには、直接筋生検より mRNA を調製するという方法が考えられる。しかし、筋変性部位には多くの炎症性細胞が存在し、また組織像も病気の進行状態に依存して均一ではない。筋ジストロフィーの病変と直接的に関連する骨格筋で発現する遺伝子を単離する目的で、本研究ではまずジストロフィンを欠損する筋芽細胞株 (mdx-sm) および正常マウス由来筋芽細胞株 (B10-sm) を樹立した (図 1A)<sup>2) 3)</sup>。これらの細胞株は培養系の中でデスミン陽性の筋管を自発的に分化させる能力を有するが、筋分化の頻度は mdx-sm の方がより昂進していた (図 1A)。

### 2. 遺伝子発現解析

次に mdx-sm 細胞株と正常 B10-sm 細胞株の遺伝子発現の違いをマイクロアレイを用いて比較した。マウス脳や胎仔に由来する約 4000 種類の cDNA をのせたマイクロアレイのハイブリダイゼーション解析の結果、mdx 筋細胞株では 15 種類の遺伝子 (新規 3 を含む) の mRNA が正常筋芽細胞より高いレベルで発現しており、逆に 12 種類の遺伝子 (新規 2 を含む) は、発現が抑制されていた。前者には、クレアチン合成の律速酵素である Arg/Gly amidinotransferase、筋分化促進転写因子 MEF2、アクチン重合を阻害する Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) などが含まれ、一方、酸化ストレスから細胞を防御する selenoprotein P や機能未知プロテアーゼ Regeneration-associated muscle protease (RAMP) などが発現低下していた<sup>4)</sup> (図 1B)。また、既製のサイトカインアレイを用いた解析では、IGF-2, BMP-4, osteopontin, frizzled related protein-2 (FRP-2), BRAK などの分泌性タンパク質が mdx-sm 細胞株で発現昂進し、MCP-1, Thrombospondin-2 (TSP-2) は逆に発現低下していた (データ省略)。

### 3. Mdx-sm 筋細胞株での遺伝子発現変動とジストロフィンとの関連

ジストロフィタンパク質は筋芽細胞では発現せず、筋管形成とともに発現誘導され筋繊維の強度保持や筋内シグナル伝達を制御すると考えられている。Mdx-sm 筋細胞株で観察された遺伝子発現変動が、ジストロフィン自体とは独立におこっていることを確かめるために、マイクロジストロフィン遺伝子をドキシサイクリン誘導性プロモーター下に配置して Mdx-sm 細胞株に遺伝子導入した。Mdx-sm 細胞をドキシサイクリン処理後、発現変動していた遺伝子群をノザンプロットングによ

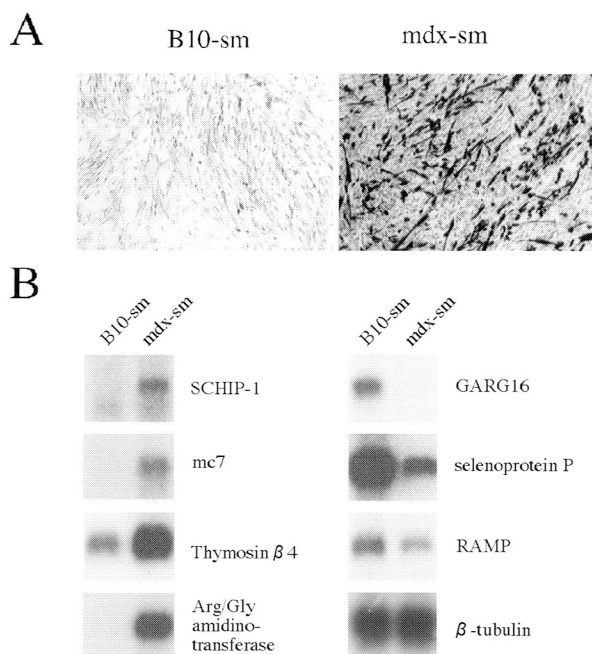


図 1 mdx マウス骨格筋由来細胞株の樹立と発現変動遺伝子の単離

(A) SV40 温度感受性 T 抗原の導入により、mdx マウス筋芽細胞株 (mdx-sm) および正常マウスコントロール筋芽細胞株 (B10-sm) をそれぞれ樹立した。写真は抗デスミン抗体を用いた免疫染色像を示す。mdx-sm 細胞株の方が筋管形成頻度が高かった。

(B) cDNA マイクロアレイを用いて mdx-sm 細胞株と B10-sm 細胞株との間の遺伝子発現を比較した結果、図に示すいくつかの遺伝子 mRNA の発現が両者間で変動していた。RAMP は本研究によりクローニングした機能未知プロテアーゼ遺伝子。

って調べたところ、ジストロフィン再発現によるレスキューは観察されなかった (データ省略)<sup>4)</sup>。この結果は、Mdx-sm 細胞株で起こっている遺伝子発現変動は、ジストロフィン欠損によるのではなく変性と再生を繰り返す筋組織での二次的な細胞内遺伝子プログラムを反映しているものと推察される。

### 4. 筋ジストロフィー患者筋生検細胞株の樹立と病態関連遺伝子の発現解析

神戸大・東京女子医大グループとの共同研究として、筋ジストロフィー患者筋生検細胞の株化を試み、デュシャンヌ型 6 例、ベッカー型 2 例、そして健康人 1 例について、in vitro で筋管形成する温度感受性筋細胞株の樹立に成功した<sup>4)</sup> (図 2A)。次に、mdx-sm 細胞株で発現変動していた遺伝子群すべてについて、ヒト mRNA を検出するプライマーを準備して RT-PCR 解析を行った結果、Mdx-sm 細胞株でのみ発現上昇している遺伝子を 9 種類 (T $\beta$ 4, FRP-2, BRAK, osteopontin, など) 同定した (データ省略)。一方、新規プロテアーゼ RAMP mRNA の発現は、mdx-sm および DMD/BMD 患者筋細胞株とで共通して発現低下していることを見出した<sup>4)</sup> (図 2B)。

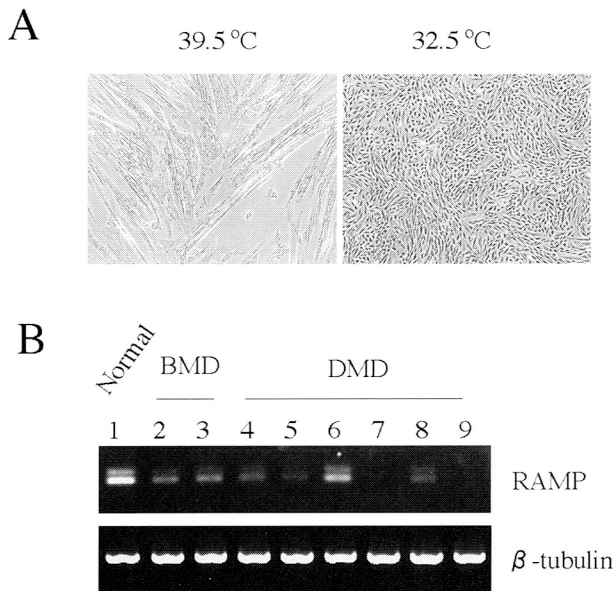


図2 筋ジストロフィー患者筋生検由来する細胞株の樹立と RAMP mRNA の発現

(A) SV40 温度感受性 T 抗原をコードするレトロウイルスを用いて、DMD 患者、BMD 患者、および健常人の骨格筋生検初代培養系より筋芽細胞株 (DMD-sm1, 2, etc) をそれぞれ樹立した。写真は代表的な患者筋生検由来細胞株 BMD-sm1 を非許容温度 (39.5°C) あるいは許容温度 (32.5°C) で培養したときの位相差顕微鏡像を示す。

(B) 健常人 1 例 (1), BMD 患者 2 例 (2, 3), および DMD 患者 6 例 (4-9) の骨格筋生検由来細胞株をそれぞれ用いて RAMP mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。健常コントロールに比べ RAMP は DMD, BMD 患者筋芽細胞株で発現低下していた。

### 5. 筋損傷モデル実験系を用いた筋再生関連遺伝子の発現と機能解析

上述の遺伝子発現解析結果に基づき、以下の 5 種類の分泌性タンパク質に重点を置いて研究を進めた。筋再生時の発現動態や筋芽細胞に対する生物活性を含めて、これまでに得られた実験結果を以下に列挙する。

**RAMP**: 我々が cDNA クローニングした機能不明の新規プロテアーゼ<sup>4)</sup>。Mdx 筋細胞株、DMD/BMD 患者筋細胞株の両方で発現低下していた。そのアミノ酸配列から、RAMP は分泌性タンパク質で細胞間相互作用にも関与する可能性が推察された (図 3A)。mRNA は定常状態では脳と骨格筋に主に発現している (図 3B) が、針による筋損傷実験では筋再生に伴って発現レベルがさらに上昇した (図 4A)。その発現は中心核を持つ再生筋に局限し (図 4B 矢印)、成熟筋では発現していなかった (図 4B 矢頭)。これらの結果は、RAMP の発現低下が筋ジストロフィーの病態に関与している可能性を示唆している。

**Tβ4**: G アクチン結合性の 43 アミノ酸から成るペプチドで好中球の動員活性を持つ。Mdx 筋細胞株のみなら

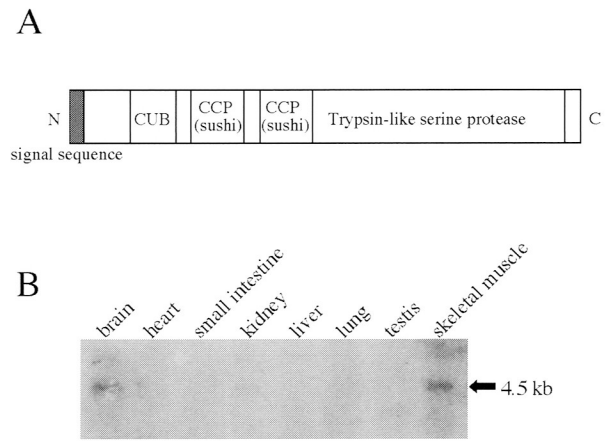


図3 RAMP プロテアーゼの推定構造と発現

(A) コーディング領域の塩基配列から予想された RAMP プロテアーゼの構造上の特徴を示す。CUB ドメインは BMP1 など発生関連タンパク質で、一方 CCP (sushi) ドメインは補体や細胞接着タンパク質にそれぞれ観られるモチーフ。RAMP は C 端にトリプシン様セリンプロテアーゼ配列を持つ分泌性タンパク質であった。

(B) 正常成獣マウス臓器における RAMP mRNA の発現。RAMP は骨格筋と脳に特異的に発現していた。

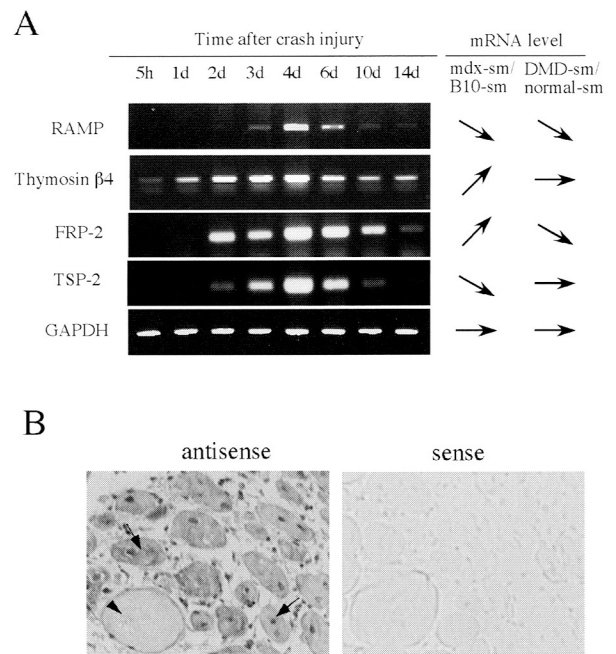


図4 mdx 筋細胞株で発現変動する分泌性タンパク質 mRNA の筋再生時における発現誘導

(A) 刺針によりマウス後肢骨格筋に損傷を与えたあと、継続的に筋組織 RNA を回収した。それぞれの時点で、mdx-sm 細胞で発現変動していた 4 種類の分泌性タンパク質の mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。いずれも筋損傷 4 日目をピークに発現上昇した。

(B) 刺針 6 日後の TA 筋切片を用いて RAMP mRNA の発現を in situ hybridization にて解析した。antisense プローブで検出される RAMP mRNA シグナルは中心核を持つ再生筋 (矢印) 에만存在し、成熟した筋管 (矢頭) にはなかった。



ず Mdx マウス骨格筋自体でも発現昂進していた。mRNA 発現はどの臓器でも観られたが、筋損傷モデルではさらに発現が強化された (図 4A)。骨格筋の損傷治癒過程において、T $\beta$ 4 は再生筋と炎症性細胞の両者で産生されていた (データ省略)。T $\beta$ 4 および酸化型タンパク質を合成し、C2C12 細胞株を用いて骨格筋細胞に対する生物活性を解析したところ、T $\beta$ 4 は濃度依存的に細胞間隙への移動を促進し (図 5A)、筋芽細胞の走化的遊走を刺激する活性を有していた (図 5B)。したがって、T $\beta$ 4 は損傷部位に筋芽細胞を動員する役割を担っている可能性が示唆された。

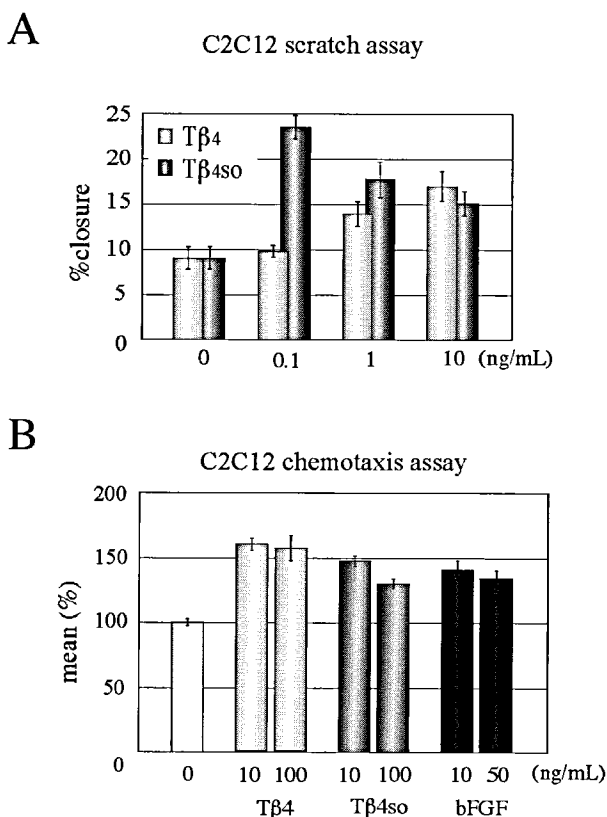


図5 Thymosin b4 による筋芽細胞の遊走促進 (A) 滴杯になった C2C12 筋芽細胞株の中央部を針を用いて溝状に細胞層を剝離し、異なる濃度の Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) を添加し 8 時間培養した後の溝の長さを測定した (scratch assay, n=9)。T $\beta$ 4 およびその酸化型 (T $\beta$ 4so) はいずれも C2C12 細胞の遊走・移動を促進した。(B) C2C12 筋芽細胞株をケモタキセルの上層に培養し、下層に異なる濃度の T $\beta$ 4、T $\beta$ 4so を加えて 6 時間培養後、フィルター裏面に移動してきた細胞数を測定した (chemotaxis assay, n=6)。陽性コントロールとして持った bFGF と同様に、C2C12 細胞は T $\beta$ 4、T $\beta$ 4so に対して走化性を示した。

**FRP-2**：Wnt アンタゴニストのひとつで細胞死を抑制する活性も知られている。Mdx 筋細胞株では発現上昇していたが、DMD/BMD 患者筋細胞株では逆に発現低下していた。mRNA は脾臓、心臓、骨格筋、脳で主に発現し胎児期で高い。骨格筋の損傷治癒過程において顕著に発現誘導された (図 4A)。

**BRAX**：単球と B 細胞に作用するケモカインで統一名称は CXCL14。Mdx 筋細胞株では発現上昇していたが、DMD/BMD 患者筋細胞株では逆に発現低下していた。mRNA は脳、卵巣、肺、骨格筋で主に発現。筋損傷時に発現誘導はおこらず、C2C12 細胞の遊走刺激活性は検出されなかった。

**TSP-2**：血管や結合組織の形成に関与。Mdx 筋細胞株で発現低下していたが、骨格筋の損傷治癒過程においては強く発現誘導された (図 4A)。

## 6. 遺伝子改変動物の作出

本研究で着目した 5 種類の分泌性タンパク質の *in vivo* での役割を知るために、muscle creatine kinase プロモーターを使った筋特異的トランスジェニックマウスおよび遺伝子破壊 (KO) マウス (BRAX, RAMP) の作製を開始した。現在までに、T $\beta$ 4、TSP-2、RAMP トランスジェニックマウスの第一世代が誕生した。また BRAX KO マウスは germ line transmission し、ヘテロ個体が成育している。

## 【考察】

mdx-sm 筋細胞株と正常 B10-sm 筋細胞株の遺伝子発現比較により、mdx 筋細胞では筋再生に関与する代謝酵素、転写因子、そしてサイトカイン遺伝子群が転写誘導され、逆に筋膜の維持や炎症阻止に関与する分子の発現が mRNA レベルで弱まっている可能性が示唆された。特に、最近 Selenoprotein N の遺伝的欠損をもつ筋ジストロフィーが同定されたこと、またセレンウム欠乏症は筋萎縮症状を示すということからも、mdx 筋細胞における Selenoprotein P の発現低下が酸化ストレス応答の弱体化を介して筋細胞のアポトーシスをもたらしているかもしれない。また、osteopontin 上昇と MCP-1 低下は Th1 優勢の免疫系誘導に作用するため、これが筋変性部位の炎症反応の異常に寄与している可能性がある。

培養筋細胞の大半はジストロフィン陰性であるにも関わらず、多くの mRNA 発現がジストロフィン欠損筋細胞株で昂進あるいは低下していた。その中でも DMD/BMD 患者筋細胞株より Mdx マウス筋細胞株でより高く発現していた遺伝子 9 個には、これまで筋再生・筋分化に関しては調べられていない T $\beta$ 4、TSP-2、FRP-2、BRAX という分泌性タンパク質 4 種類が含まれていた。筋再生促進に作用する IGF-1 や BMP-4 が Mdx マウスの場合で発現昂進しているのと同様に、それらも Mdx マウスの高い筋再生能と直接関連している可能性がある。

事実, T $\beta$ 4, TSP-2, FRP-2は筋再生時に発現誘導され, T $\beta$ 4には筋芽細胞を遊走させる活性が検出された。BRAKは筋細胞には直接作用しないが, 単球を集める活性を持つことは注目に値する。筋変性部位には多くのマクロファージが集積している上に, 最近単球から血管内皮細胞への分化転換も報告された。また我々はマクロファージ分化誘導サイトカインであるM-CSFに, 血管内皮前駆細胞の増殖促進活性があることを見出している<sup>5)</sup>。筋組織全体の修復には血管も必須である。

一方, mdx-smおよび8例のDMD/BMD患者筋細胞株とで共通して発現低下していた新規分子RAMPは, 分泌性セリンプロテアーゼ様分子で骨格筋と脳に特異的に発現していた。RAMPの基質や生理的役割はまだ不明であるが, RAMPが再生筋で発現誘導されることからこの分子も筋再生のメディエーターである可能性がある。これらの分泌性タンパク質が協調的に働くことで, Mdxマウス筋変性部位の修復が効率的に行われているものと推察される。我々は最近, 生理的リモデリングがおこる妊娠時の子宮筋層で特異的に発現するStathminがやはり骨格筋再生時に誘導されることを発見した<sup>6)</sup>(未発表データ)。これらの多くの筋再生関連遺伝子の発現をトリガーする転写制御機構にも興味を持たれる。

それぞれの分子の筋再生における役割を結論付けるには個体での解析が必須である。現在作出中の遺伝子改変マウスを, 筋損傷実験やMdxマウスとの交配実験に供することで, 上述の仮説を検証できるものと期待している。その上で, 筋再生に最も効果のある分泌性タンパク質あるいはagonistを, 筋ジストロフィー患者の骨格筋や心筋に補充する方法の開発へと進めていきたいと考えている。

### 【結 論】

Mdxマウス筋細胞株およびDMD/BMD患者由来筋細胞株を新規に樹立し, そこで特異的にmRNA発現変動する代謝系・骨格系・サイトカイン遺伝子群を同定した。それらの発現変動はジストロフィンとは直接関連しない筋芽細胞内での遺伝子プログラム変化であった。Mdxマウス筋細胞株で発現変動する遺伝子の中から, DMD/BMD患者筋細胞株でも共通して発現低下する新規分泌性プロテアーゼRAMPをクローニングした。一方, DMD/BMD患者筋細胞株と比較してMdxマウス筋細胞株で発現量の多い分泌性タンパク質としてT $\beta$ 4, FRP-2, BRAKを同定した。RAMP, T $\beta$ 4, FRP-2, それからMdxマウス筋細胞株で発現低下していたTSP-2はいずれも筋再生過程で発現誘導された。これらの分泌性タンパク質の発現レベルの差異が, Mdxマウス骨格筋の

高い再生力に寄与していると推察される。今後, これらの分子群の筋再生や筋変性における機能を実験動物個体レベルで詳細に解析していくことで, 筋ジストロフィーの進行を阻止する新たな治療法の開発に挑みたい。

### 【参考文献】

- 1) Tamura H, Okamoto S, Iwatsuki K, et al: In vivo differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow. *Exp Hematol* **30**: 957-66, 2002.
- 2) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, et al: Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myologica* **20**: 154-58, 2001.
- 3) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, et al: Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem* **134**: 751-58, 2003.
- 4) Nakayama Y, Nara N, Kawakita Y, et al: 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.* (in press)
- 5) Minehata K, Mukouyama Y, Sekiguchi T, et al: Macrophage-colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region. *Blood* **99**: 2360-68, 2002.
- 6) Tamura K, Hara T, Yoshie M, et al: Enhanced expression of uterine stathmin during the process of implantation and decidualization in rats. *Endocrinol* **144**: 1464-73, 2003.

# 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

塚原俊文\*

研究協力者 野口 悟\*\*, 西野 一三\*\*, 辻本 敦美\*\*\*, 長澤 浩\*\*\*\*

## 【緒言】

筋ジストロフィーにはジストロフィン, サルコグリカン, ラミニン $\alpha$ 2等の細胞膜・基底膜関連のタンパク質の他に, エメリン, ラミンA/Cの様な核膜関連タンパク質, ミオトニンキナーゼ, カルパイン3といった細胞質に存在する酵素群, さらにはフクチンの様な糖鎖修飾関連タンパク質, と極めて多岐にわたる分子が関与していることが明らかになっている. 一方でこの様な多種・多様な遺伝子の異常がなぜ筋ジストロフィーという共通の病態像を示すのかについては解明されていない点が多い.

疾患の病理像を分子レベルで理解するためには, 正常および疾患筋組織でどのような遺伝子(群)が優位に発現し, あるいは抑制されているかについての情報を知ることが必要である. 我々は分子病理像を明らかにするためのデバイスとして, ヒト筋cDNAマイクロアレイの開発を行い, これまでに少量の生検筋を用いてヒト骨格筋に発現する4,000種類の遺伝子発現を解析可能なマイクロアレイを作成した. 我々のマイクロアレイは症例一例ごとの遺伝子発現解析を可能にし, またその解析結果が筋の壊死・再生の度合を反映している事を明らかにした.

一方, 同一家系内で症状の異なる例やディスフェルリン異常症における三好型と肢帯型筋ジストロフィー等, 遺伝型が同じであるにもかかわらず表現型が異なる場合が知られている. この様な現象はSNPsの違いよると考えられることから, 筋ジストロフィーにおいてもSNPs解析の必要性が指摘されている. 我々は, 安価で安定的なオリゴ型DNAチップの供給を可能にするため, 一体化したオリゴヌクレオチド担体プローブである「プローブオンキャリア」を開発し, このプローブオンキャリアごとスライドガラス等に固着させることによってSNPsを含む遺伝子の点変異検索が可能なオリゴ型DNAアレイを安価に作製する方法についても考案した.

我々の開発したこれらマイクロアレイは筋疾患の分子病態解明に有用な新しいツールを提供すると期待される.

## 【方法】

### ヒト筋cDNAマイクロアレイの開発

独自の筋cDNAマイクロアレイを作製するために, NCBI等の公開されたデータベースよりヒト骨格筋・心筋に発現する既知のcDNA情報を収集し, *in silico*でクロスハイブリダイズを出来るだけ排除したターゲット遺伝子配列候補を集めた筋発現遺伝子のデータベースを構築した. 相同配列を極力排除し, また増幅長も450~550 bpに均一化した独自のデータベースに基づいてそれぞれのcDNAに特異的なPCRプライマーをデザインし, ヒト骨格筋・心筋のcDNAをテンプレートにしてそれぞれの増幅断片を得た. さらにこれら増幅断片をクローン化してシーケンスで検証を行った. 収集されたcDNAクローンを用いて, 最終的に4,281遺伝子, 5,309プローブの大規模ヒト筋cDNAマイクロアレイを作成した. ターゲットの作成および検出にはパーキン・エルマー社のチラミドシグナル増幅(TSA)システムを採用した. 1 $\mu$ gのRNAを用いてcDNAプローブを合成し, cDNAマイクロアレイとハイブリダイズした.

### DMDの分子病理学的解析

6例のデュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)患者由来の凍結生検筋および正常筋10~30 mgよりそれぞれの細胞質RNAを精製し, TSA法に基づきcDNAを調製した. 対照にヒト正常骨格筋全RNAを用いた競争的ハイブリダイズによって遺伝子発現解析を行った. 遺伝子発現プロファイルの解析には“Gene Spring”ソフトウェアを用いた. 病理像は連続切片をヘマトキシリン-エオジン染色およびジストロフィン染色する事によって確認した.

\*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

\*\*国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第一部

\*\*\* DNAチップ研究所

\*\*\*\* (株) 荏原製作所 精密・電子事業本部

## プローブオンキャリアの開発

高度に細孔径の均一化を計った微小多孔質ガラスをグリシドキシプロピトリメトキシシランで処理後、ヘキサエチレングリコールリンカーを付加した。ガラス表面における官能基密度は  $1 \mu\text{mole}/\text{m}^2$  であった。これを基材として通常の固相 DNA 合成法と同様にオリゴヌクレオチド合成を行いプローブオンキャリアとした。対象としては点突然変異細胞株が存在するヒトガン抑制遺伝子、*p53* の 947-966 nt の配列を用いた。(野生型: GGCATGAACCGGAGGCCCAT, HSC-4 変異: GGCATGAACCAGAGGCCCAT, Ca9-22 変異: GGCATGAACTGGAGGCCCAT) 判定は三種類のプローブオンキャリアを FITC 標識したそれぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、0.1X SSC で洗浄後に残存する蛍光を検出して行った。簡易型 DNA チップの作成は、スピコートしたポリブタジエン接着剤上に懸濁したプローブオンキャリアをスポットし、熱固定後に超音波洗浄して作成した。チップ型のプローブオンキャリアも同様に蛍光標識アンチセンスオリゴヌクレオチドの残存蛍光を観察して判定した。

## 【結果】

### 開発したヒト筋 cDNA マイクロアレイの検証

我々の開発したヒト筋 cDNA マイクロアレイは、同量のプローブを用いた実験で相対蛍光強度 100 ~ 100,000 のレンジで再現性 ( $R=0.94 \sim 0.98$ ) のある結果が得られた。また、cDNA プローブ量が全 RNA 1 ~ 4  $\mu\text{g}$  のレンジにおいて、ターゲットスポットの蛍光強度に直線性が得られた。さらに、ヒト骨格筋全 RNA から cDNA プローブで検出された各遺伝子ターゲットスポットの相対強度及び遺伝子発現順位は、Bortoluzzi らが示した EST データベースからの転写プロフィールおよび大久保らの BodyMap の骨格筋発現での結果とよく一致していた。また、複数のターゲットスポットがあ

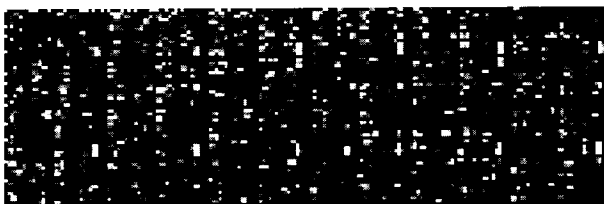


図1 我々が開発したヒト筋 cDNA マイクロアレイ  
約 500 bp 長の冗長性の無いヒト筋 cDNA 断片を用いて作成したヒト筋 cDNA マイクロアレイ。5,309 プローブで 4,281 遺伝子をカバーしている。二検体からの RNA からそれぞれ Cy3 あるいは Cy5 で標識した cDNA を合成し、ハイブリダイズ後にスキャナーで観察した。各スポットはそれぞれ別のプローブに由来しており、蛍光強度で発現量の増減が判定できる。

る遺伝子においては、各々のターゲットスポットで同様の強度が得られた。

筋ジストロフィーに伴う骨格筋での遺伝子発現変化を解析するため、より単純化された培養骨格筋細胞の系を試みた。ヒト骨格筋初代培養細胞を用いて、筋管細胞への分化に伴う遺伝子発現の変化を調べた。その結果、次の 6 種類に分類された。I) 分化とともに漸進的に発現が上昇する遺伝子 (1,314 クローン)、II) より急速に発現が上昇する遺伝子 (410 クローン)、III) 分化の初期に発現の極大値をもつ遺伝子 (48 クローン)、IV) 変化しない遺伝子 (1,821 クローン)、V) 増殖期に発現があり分化すると減少する遺伝子 (478 クローン)、VI) 増殖停止期に発現の極大値をもつ遺伝子 (392 クローン) であった。この情報はターゲット遺伝子の分類の指標として使用しうる。次に 5 人の DMD 患者筋からの初代培養細胞から増殖筋芽細胞、分化筋管細胞での遺伝子発現のプロファイリングをおこなった。特に分化後において各患者細胞で遺伝子発現変化に共通性が強かった。また、筋細胞内のシグナル活性化経路をモニタリングした結果、IGF-1 刺激に伴う Akt 系と MAPK で特徴的な遺伝子の発現変化が観察された。

### DMD 筋における遺伝子発現の変化

6 例の DMD 筋から得られたマイクロアレイデータを平均すると、3,500 遺伝子の内 77 遺伝子の発現が正常筋と比較して 2 倍以上に上昇していた。一方、同様に 327 遺伝子では 1/2 以下に減少していた。それぞれの遺伝子を分類すると、免疫応答、サルコメア、細胞外マトリックスおよびシグナル伝達・細胞増殖に関連した遺伝子群で顕著な発現上昇が観られた。免疫応答関連で最も発現が上昇したのは抗原提示細胞に発現する MHC I

Category	Increased gene	Decreased gene
energy metabolism	0	53
transcription/translation	1	45
signal/cell growth	5	39
sarcomere	8	24
enzyme	7	24
cytoskeleton	6	15
receptor/channel	2	14
immune response	11	2
proteasome	1	10
ECM	9	1
chaperone	0	8
unknown	27	92
Total	77	327

表1 DMD で 2 倍 (1/2 倍) 以上変化した遺伝子  
ヒト筋 cDNA マイクロアレイを用いて 6 例の DMD 患者生検筋における発現遺伝子変化を解析した結果。

および II の HLA-DR 遺伝子であった。サルコミア関連では  $\alpha$ -心筋型アクチンとミオシン軽鎖 4 および 1 など筋発達に応じて発現する遺伝子群であった。これら遺伝子の発現上昇は細胞浸潤や筋線維の壊死・再生を反映していると考えられた。一方、発現が低下したのはエネルギー産生、転写・翻訳、シグナル伝達とプロテアソーム経路に関連した遺伝子であった。これらには解糖系酵素や電子伝達系、転写因子、タンパク質合成の開始因子・伸長因子等が含まれていた。従って、筋組織の機能やホメオスタシスの慢性的な低下の反映であると考えられた。

#### 各症例による分子病理学的検討

6 例の DMD 患者の筋病理を比較すると、筋線維の壊死・再生像が顕著で、大小不同や線維化を伴う症例と、これら変化がよりマイルドな症例が存在していた。各症例の遺伝子発現プロファイルは全体的には良く似ていたが、より詳細にそれぞれの症例を比較すると、重症例と軽症例の二つのグループに別ける事ができた。この結果は、疾患の重症度を反映して幾つかの遺伝子発現が変化したことを示唆する。そこで、筋壊死のマーカーとして HLA 関連遺伝子に着目して遺伝子発現プロファイルを作成したところ、壊死変化の増加に従っ

て HLA 関連遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。また同様に、分化によって発現する分子種が切り替わるミオシン軽鎖とトロポニン T 遺伝子群に着目した遺伝子発現プロファイルでは、重症例では全ての分子種が強く発現しているのに対して、軽症例ではミオシン軽鎖 2 とトロポニン T2 遺伝子の発現が低いままであった。上記の結果は、これら遺伝子の発現が疾患の重症度と密接に関連していることを示唆した。

#### プローブオンキャリアの開発

スライドガラス等の基盤上に高密度にオリゴヌクレオチドを結合させた、いわゆる DNA チップには短いオリゴヌクレオチドを用いるオリゴ型 DNA チップと、比較的長鎖の cDNA を用いる cDNA 型マイクロアレイがあるが、このうちオリゴ型は少量のサンプルで一度に多くの一塩基多型 (SNPs) を含む多型や変異を検出することを可能にするデバイスである。しかしこの場合、DNA 鎖が短いため基盤と共有結合させて固定する必要があり、その製造には特別な技術が必要である。我々は合成オリゴヌクレオチドを、合成時の担体である多孔質ガラスに固定化されたまま、基盤スライドガラスに固着することで安価で簡便なオリゴ型 DNA チップが実現できないかと考え、そのための担体となるプロー

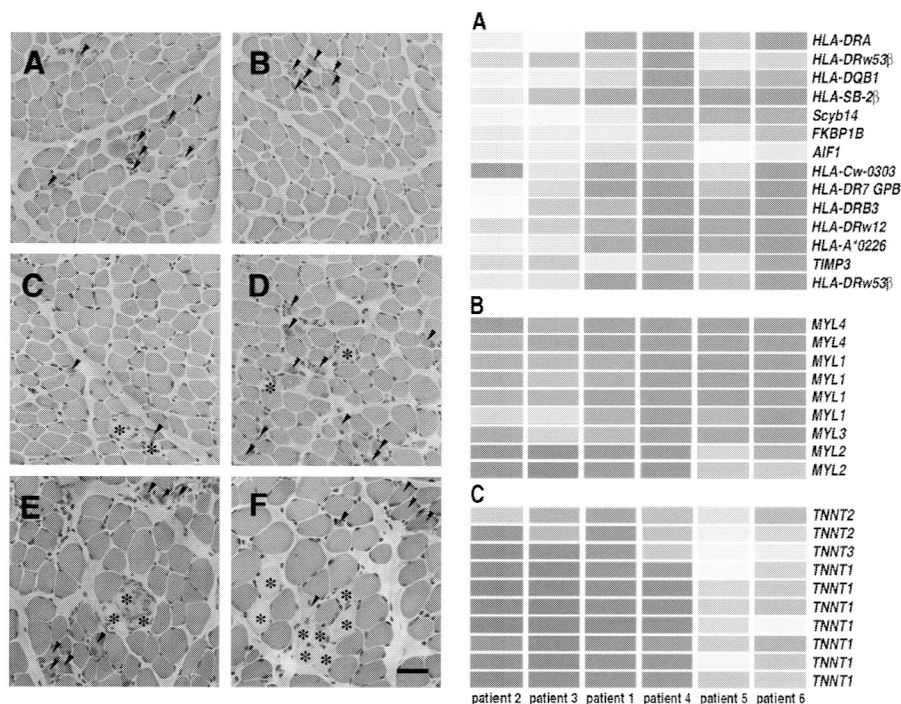
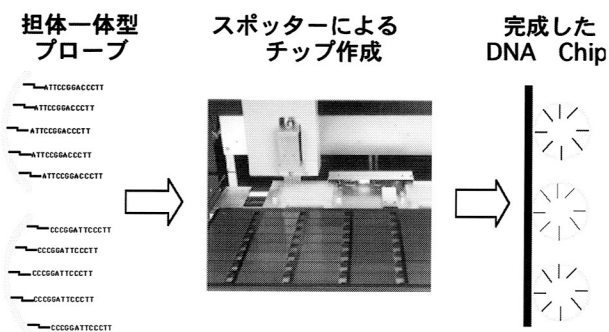


図 2 DMD 筋の分子病理学的解析

DMD 患者 6 例の生検筋の H&E 染色像 (左図)。同一疾患でも細胞浸潤や大小不同の度合は様々である。

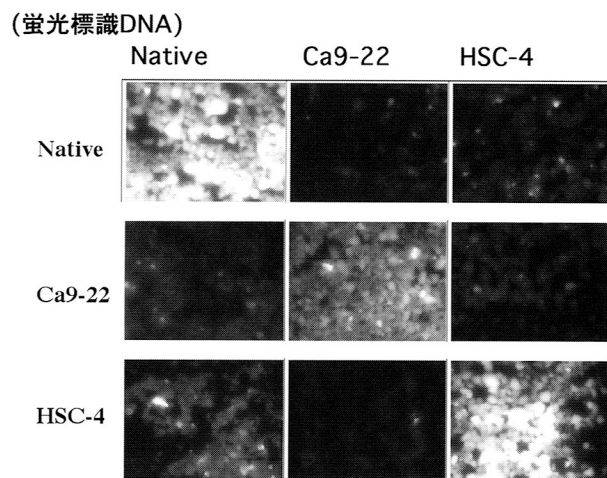
6 症例における HLA 関連遺伝子 (A)、ミオシン軽鎖遺伝子 (B)、トロポニン T 遺伝子 (C) の発現解析結果 (右図)。免疫応答遺伝子である HLA 関連遺伝子や分化度合を反映するミオシン軽鎖とトロポニン T 遺伝子の発現は細胞浸潤や壊死・再生の良いマーカーとなりうる。



**図3 新しいオリゴ型 DNA チップ作製法の概念図**  
 高度に細孔径の均一化と大孔径化をはかった多孔質ガラスを固相として化学合成したオリゴDNA を切り出すことなく、そのままスライドガラス基盤に配置することで、安価で簡便なオリゴ型 DNA チップが作成できる。

ブオンキャリアの開発を行った。

我々は遺伝子の変異が多発ガンを誘発する p53 腫瘍抑制遺伝子を標的として「プローブオンキャリア」の試作研究を行った。Ca9-22 変異と HSC-4 変異は腫瘍細胞株で確認された同遺伝子の一塩基変異である。まず、細孔径 200 nm の多孔質ガラスをオリゴヌクレオチド合成用担体とするため、多孔質ガラスを 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane 処理し、Hexaethylen-glycol をリンカーとして導入した。これに通常オリゴヌクレオチド合成と同様の手順で野生型および二種類の変異型 Sense オリゴヌクレオチドを合成した。これらの試作プローブオンキャリアを蛍光標識した三種類の Anti-sense オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、洗浄後残存した蛍光を調べた。三種類のプローブオンキャリアは、それぞれの蛍光 Anti-sense オリゴヌクレオチドと最も良く結合し、他のオリゴヌクレオチドにはほとんど結合しなかった。さらに、これらを細粉化し、スライドガラスに固着したチップを用いて行ったハイブリダイズ実験でも全体に S/N 比が低いものの、僅か一塩基の変異が認識可能であった。これらの結果は、プローブオンキャリアを固定化してオリゴ型 DNA アレイを作成する事が可能である事を示唆している。しかし、これまでの成果では全体に S/N 比が低いため実用化のためにはさらなる努力が必要である。S/N 比の低下は、細孔径が小さいため、あるいはハイブリダイズ条件が最適化されていないため、と考えられる。実際、より細孔径の大きい微小多孔質ガラス担体を用いてプローブオンキャリアを試作したところ、これまでより S/N 比が改善した。



(オリゴ担体一体型プローブ)

**図4 担体一体型プローブによる単塩基変異の検出**  
 正常と二種の点突然変異した p53 遺伝子の配列を持つ担体一体型プローブを作成し、蛍光標識したそれぞれの DNA とハイブリダイズした。プローブに残存する蛍光を観察して、一塩基置換の DNA 配列を認識可能か否かを調べた。お互いに僅か一塩基の置換にもかかわらず、正常プローブには正常の、Ca9-22 変異プローブには Ca9-22 変異の、HSC 変異プローブには HSC 変異の蛍光標識 DNA が最も良く結合し、残存蛍光で明るい。

### 【考 察】

#### ヒト筋 cDNA マイクロアレイに関する研究

我々のヒト筋 cDNA マイクロアレイによる解析結果は、Bortoluzzi らや大久保らの示した骨格筋発現での結果とよく一致しており、また複数のターゲットスポットの各々で同様の強度が得られた。この結果は我々の開発したマイクロアレイの信頼性の高さを実証している。

実際に DMD 患者 6 例の生検筋を我々が開発したヒト筋 cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルは疾患筋の病理変化を反映しており、まさに「分子病理像」であると考えられる。また、上記の解析結果は我々のマイクロアレイの信頼性の高さを実証している。このマイクロアレイによって症例ごとの遺伝子発現解析が可能となったことから、マイクロアレイを用いた患者生検筋の分子病理的研究という新しい可能性が拓けた。

#### 安価なオリゴ型 DNA チップ開発に関する研究

オリゴヌクレオチド担体一体型プローブの作成と、その細粉化および固定化に関する研究を行い、DNA Chip の試作に成功した。それぞれの担体一体型プローブはその相補的 DNA とのみ結合し、一塩基置換による変異を認識可能であった。従って、我々の開発した担体一体型プローブは DNA Chip の作製に有効であることが確かめられた。しかし S/N 比が低いため、実用化のためにはさらなる努力が必要であると考え、引き続き研究を行う必要がある。

## 【文 献】

- 1) Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**: 219-26, 1988.
- 2) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**: 503-11, 2000.
- 3) Greenberg A: DNA microarray gene expression analysis technology and its application to neurological disorders. *Neurology* **57**:755-61, 2001.
- 4) Bortoluzzi S, d'Alessi F, Romualdi C, et al: The human adult skeletal muscle transcriptional profile reconstructed by a novel computational approach. *GenomeRes* **10**: 344-9, 2000.
- 5) Sese J, Nikaidou H, Kawamoto S, et al: BodyMap incorporated PCR-based expression profiling data and a gene ranking system. *Nuci AcidsRes* **29**: 156-8, 2001.
- 6) Chen YW, Zhao P, Borup R, et al: Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* **151**: 1321-36, 2000.
- 7) Tkatchenko AV, Pietu G, Cros N, et al: Identification of altered gene expression in skeletal muscles from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* **11**: 269-77, 2001.
- 8) Bowtell D, Sambrook J editors: DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003
- 9) Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, et al: cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *HumMol,Genet* **12**: 595-600, 2003.
- 10) The Chipping Forecast II. *Nature Genetics suppl* **32**, 2002.
- 11) Tsukahara T, Nagasawa H: Probe-on-carriers for Oligonucleotide microarrays (DNA Chips). *Sci Techno Adv Mater* (in press), 2004.

## IV. 筋ジス犬を中心とした新たな モデル動物の開発



# 核移植技術を用いたマウスES細胞由来個体の作出

角 田 幸 雄\*

## 【緒 言】

これまで、マウス体細胞の核移植によって産子は得られているが、家畜の場合と異なって、継代培養した体細胞から産子を得ることは困難である<sup>1)</sup>。ES細胞の場合は、長期間継代培養した細胞の核移植によって産子が得られているが、産子生産率は低く、得られた産子の多くが分娩直後に死亡している<sup>2) 3) 4)</sup>。そこで本研究は、マウスES細胞から個体を安定して作出する核移植技術を確立することを目的に実施した。

## 【方 法】

### 1. 個体への発生能の向上

#### 1) 核移植卵の集合が発生能に及ぼす影響

核移植卵2個を8細胞期で集合して細胞数を増加させることによって、産子への発生能が向上するか否かを調べた。

#### 2) ドナー細胞の遺伝的背景、細胞周期ならびに核移植方法の影響

ドナー細胞は、遺伝的背景が近交系であるNR22, 交雑系であるTT2, TMA-39, 41ならびに45の計5株を用いた。M期への同調は、3µg/mlのNocodazole添加培地で3時間培養後、形態的に丸くなって細胞塊から浮き上がってくる細胞を用いた。また、G1期の細胞はES細胞コロニーをトリプシンで単離後、ゼラチンでコートしたディッシュに播種後短時間培養して上清を回収し、形態的に小さい細胞を選別して用いた。核移植の方法は、従来から用いている不活化センダイウイルス(HVJ)を用いた細胞融合法と、除核未受精卵への直接注入法を用いた。

#### 3) 核移植卵の発生速度の影響

ES細胞を核移植後、12時間目から22時間目まで1時間ごとに2細胞期への卵割時期を調べるとともに胚盤胞への発生率を検討した。ついで、卵割時期によって3区に分けて受胎雌へ移植し、個体への発生能を調べた。

#### 4) 融合方法の影響

ES細胞をセンダイウイルスならびに電気刺激によって除核未受精卵に融合させ、発生能を比較した。

#### 5) 活性化刺激方法の影響

強度の異なる電気刺激ならびにストロンチウム処置

によって核移植卵を活性化させ、発生能を比較した。

## 2. 個体への発生能が低い原因の解明

### 1) ICMとTEの置換

個体を形成する能力に原因があるのか、胎盤を形成する能力に原因があるのかを明らかにするための検討を行った。ES細胞由来胚盤胞から単離した内細胞塊(ICM, 将来胎子を形成する)を、4倍体胚盤胞へ注入した(B区)。また、正常な受精卵由来胚盤胞のICMを、核移植卵由来4倍体胚盤胞へ注入した(C区)。対照として、正常な胚盤胞のICMを、受精卵由来4倍体胚盤胞へ注入したものをを用いた(A区)。いずれの区の胚盤胞も、偽妊娠雌へ移植し、妊娠満期で胎子への発生状況を検査した。

### 2) 初期化因子

これまでの実験から、第2減数分裂中期(M期)卵細胞質には体細胞核を初期化する因子が存在し、活性化刺激を与えた未受精卵細胞質には存在しないことが知られている<sup>5)</sup>。M期卵と活性化刺激卵細胞質間で異なる代表的な蛋白質は、MPF(maturation promoting factor)とMAPK(mitogen-activated protein kinase)であることから、この両者が初期化に関与するか否かを検討した。すなわち、ウシM期末受精卵に種々の活性化刺激を与えた後、0~6時間目の卵細胞質にG0/G1期またはM期の培養卵丘細胞を核移植して発生能を調べた。ついで、活性化刺激後0~6時間目の卵細胞質におけるMPF活性をcdc2 kinase活性を指標にして、またMAPK活性をWestern Blot法で測定し、核移植卵の発生能との関係を検討した。

## 【結 果】

### 1. 個体への発生能の向上

#### 1) 核移植卵の集合が発生能に及ぼす影響

集合区における核移植卵の胚盤胞への発生率は60%であり、1回核移植区(59%)および再置換区(63%)の発生率と比べて大差はみられなかった。

集合区における受胎雌へ移植後の着床率は53%であり、1回核移植区(29%)および再核置換区(37%)と比べて有意に高かった。しかしながら、胎子が得られた割

\*近畿大学農学部

合は集合区で17%であり、他区（7および11%）と比べて有意差はみられなかった。

2) ドナー細胞の遺伝的背景、細胞周期ならびに核移植方法の影響

細胞融合法を用いた核移植卵の胚盤胞への発生率は2～67%であり、M期の細胞を用いた方がG1期の細胞を用いた場合よりも高かった。しかしながら、受胚雌へ移植後の産子への発生率には大差がなかった。注入法の場合も、M期の細胞を用いた方がG1期の細胞を用いた場合よりも胚盤胞への発生率は高かったが、融合法と比較すると低い傾向がみられた。しかしながら、細胞の遺伝的背景、細胞周期や核移植方法の違いによって核移植卵の産子への発生率は大差がみられなかった。

3) 核移植卵の発生速度の影響

核移植卵では、体外受精卵に比べて卵割時期にばらつきが大きく、中間区の卵子の胚盤胞への発生率は、早く卵割した卵子や遅く卵割した卵子に比べて高かった。受胚雌へ移植後の胎子への発生率も、中間区で高い傾向がみられたが、顕著な差ではなかった。

4) 融合方法の影響

センダイウイルスを用いた場合のES細胞と除核卵細胞質の融合率は、電気刺激を用いた場合に比べて高かった。しかしながら、融合卵の胚盤胞への発生率は相異せず、また受胚雌へ移植後の産子への発生率にも大差はみられなかった。

5) 活性化刺激方法の影響

電気刺激あるいはストロンチウム処置によって活性化刺激を与えた核移植卵の胚盤胞への発生率には、大差はみられなかった。また、受胚雌へ移植後の産子への発生率にも、有意な差はみられなかった。

## 2. 個体への発生能が低い原因の解明

1) ICMとTEの置換

ES細胞由来胚盤胞ICMを4倍体胚盤胞へ注入したB区における着床率(76%)は、対照区(71%)と大差なく高かった。しかしながら、産子への発生率(5%)は、これまでの結果(1～3%)と比べて向上したが、対照区(45%)に比べて有意に低かった。

また、正常受精卵由来胚盤胞ICMを核移植卵由来胚盤胞へ注入したC区では、着床率(24%)も低く、産子は全く得られなかった。

2) 初期化因子

核移植卵の発生率は、ドナー細胞が核膜をもつか否かによって異なっていた。G0/G1期の核の場合は、活性化刺激後1～2時間目で発生率が低下したが、M期の核を用いた場合は5時間目まで低下しなかった。

MPF活性は、活性化刺激後1時間で最低値まで低下することから、MPFはドナー核の核膜の崩壊に必要なであるが、核の初期化因子とは考えられなかった。また、MAPKカスケードであるp90RSK1、MEK1/2、ERK1/2の活性と核移植卵の発生能とは相関しなかったことから、MAPKも体細胞核の初期化に直接は関与していないと考えられた。

### 【考察】

平成13年度から3年間実施した研究の結果、マウスES細胞の核移植によって確実にクローンマウスを得ることができるようになった。現在の技術では、未受精卵の染色体除去率は100%、ES細胞と除核未受精卵の融合率は80～90%、活性化刺激後の核形成率は95～100%、胚盤胞への発生率は60～80%と高いが、受胚雌へ移植後の産子発生率は1～5%ときわめて低い。しかも、得られたマウスの多くは、条件によっては分娩直後に死亡している。核移植卵における遺伝子発現は、受精卵とは相同ではないことが明らかにされており、これが低い産子への発生率や異常産子の出現につながると考えられている。その原因として、核移植前のES細胞ですでに非可逆的な変異が生じていること、未受精卵細胞質における核の初期化が不適切であることの2点が考えられている。本研究期間中に、核の初期化の引き金となるのはMPFとMAPKではないことが明らかになった<sup>6)</sup>が、初期化因子の実体は不明である。

### 【結論】

マウスES細胞の核移植によって、確実に産子を作出できるようになったが、成功率はなお低い。今後、核の初期化機構を明らかにするとともに、正常な個体へ発生する能力の高いドナー細胞を選別する技術、正常な個体へ発生する能力を持つ核移植卵を作出し、選別する技術を確立することが必要と考えられる。

### 【文献】

- 1) Tsunoda Y, Kato Y: Nuclear transfer technology. In *Transgenic Animal Technology; A Laboratory Handbook, 2nd edition* (C.A. Pinkert ed.), Academic Press 195-231, 2002.
- 2) Amano T, Kato Y, Tsunoda Y: Comparison of heat-treated and tetraploid blastocysts for the production of completely ES-cell-derived mice. *Zygote* 9: 153-7, 2001.
- 3) Amano T, Kato Y, Tsunoda Y: Full term development of enucleated mouse oocytes fused with embryonic stem cells from different cell lines. *Reproduction* 121: 729-

33, 2001.

- 4) Amano T, Tani T, Kato Y, et al: Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. *J Exp Zool* **289**: 139-45, 2001.
- 5) Tani T, Kato Y, Tsunoda Y: Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* **64**: 324-30, 2001.
- 6) Tani T, Kato Y, Tsunoda Y: Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biol Reprod* **69**: 1890-4, 2003.

# 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

鍋 島 陽 一\*

## 【緒 言】

神経・筋疾患の多くは遺伝子の変異が原因であり、その発症、病態の解析、治療法の開発のためには、原因遺伝子の様々な配列に起こっている変異が原因となっている。また、疾患の発症には主要な原因遺伝子の変異のみならず、複数の修飾遺伝子の関与が推定されており、それが発症、病態の個体差を生んでいる。さらに、ヒトゲノムには数百万に及ぶ遺伝子多型が存在し、各種の疾患と連鎖していると推定されている。よって、ヒト疾患の理解と治療法の開発のためには、原因遺伝子の変異が病態を引き起こすメカニズム、複雑な遺伝子間の相互作用、遺伝子多型と疾患の関連など詳細な解析が必要であるが、現在の実験システムでは極めて不十分であると言わざるをえない。また、神経・筋疾患の発症、病態の解析、治療法の開発のためには解析に活用するモデル動物が必須である。

そこで、本研究では神経筋疾患をはじめとする(1)ヒト遺伝性疾患の分子機構の解析と臨床応用の道を切り開くためのモデル動物の開発、(2)モデル動物の変異表現型の解析と分子機構の解明、及び、(3)新たなモデル動物作成法の開発、(4)疾患の発症、症状の個体差に関与する遺伝子素因の研究(5)遺伝子多型とヒト関連疾患との連鎖に関する研究を取り上げた。

## 【方 法】

(1) 疾患モデル動物の開発に関する研究の一環として新しい遺伝子改変動物の作成を試みた。又、既に作成した遺伝子改変マウスについては、その変異表現型の解析とその分子機構を検討した。具体的には、神経細胞の発生、移動、ネットワークの形成に関与する遺伝子、並びにプレセニン結合蛋白遺伝子、筋衛星細胞で発現する転写因子(遺伝子ノックアウトマウスの作成と筋衛星細胞のマーキングを目的として、翻訳開始コドン下流にEGFPを挿入するタイプの相同組み替えベクターを構築した)、また、骨格筋、心筋でのみ発現するTBP結合蛋白についても相同組み替えにより遺伝子ノックアウトマウスを作成した。

(2) klothoは腎臓、脈絡膜、副甲状腺で発現しており、

電解質代謝、とりわけカルシウムホメオスタシスの制御に関与していることから、脳脊髄液の電解質濃度の測定、脈絡膜におけるカルシウム輸送制御分子の解析、klotho結合蛋白を免疫沈降と質量分析により解析した。また、klotho変位マウスについては、学習機能の解析により学習機能の低下が観察されたことからMnSODの活性について検討し、海馬における細胞死について検討した。

(3) 新たな個体レベルの遺伝子機能解析システムの開発に関する研究

複雑な統合的現象を解析するためには、培養細胞や試験管内実験と共に個体レベルの遺伝子機能の解析が必須である。また、解析対象となる遺伝子は多岐に及び、しかも、それぞれの分子の詳細な解析が不可欠である。ところが、これまでの個体レベルの実験システムでは、ターゲット遺伝子の詳細な解析や多数の遺伝子を解析対象とするのは困難であることから、新たな方法の開発なしには、ポストシーケンス時代のゲノム研究に対応できない。そこで研究では「二本鎖RNAの発現を利用した遺伝子機能欠損誘導系の開発(マウスにおけるRNAiの利用)」、「任意の組織や任意のタイミングで遺伝子変異を導入する方法の開発」を行い、個体レベルの遺伝子機能解析能力の飛躍的発展を図ることを計画した。また、多数の遺伝子の機能を動物個体、あるいは細胞を用いて解析する新たな方法として電気穿孔法による子宮内遺伝子導入法を確立した。本方法では子宮内の胎仔の脳室に発現プラスミド溶液を入れ、電気穿孔によりventricular zoneの細胞に遺伝子を導入し、処理しないものと同様に発育を継続させ、解析に供することができる。

(4) 疾患の発症、症状の個体差に関与する遺伝子素因の研究

ヒト遺伝病においても主要な疾患遺伝子に加えて多数の修飾遺伝子が関与しており、病態のより深い理解にとって、主要疾患遺伝子や修飾遺伝子間の相互作用の解明が不可欠であることを示している。同様に、マウス突然変異の表現型は、その変異がどのような系統の遺伝的背景にあるかによって大きく変化する。この

現象は、変異表現型が修飾遺伝子と呼ばれる複数の遺伝子によって影響を受けること、また、それらの修飾遺伝子がマウス系統間で多型的であることを示している。そこで、多彩な変異表現型をもつ *Klotho* 変異マウスを遺伝的背景の異なる MSM マウス（日本産のマウス）と掛け合わせ、遺伝的背景の影響を解析した。この結果、*Klotho* 変異を修飾する遺伝子の存在が推定され、その遺伝子座の特定を進めている。

#### (5) 遺伝子多型とヒト関連疾患との連鎖に関する研究

多数のヒト *Klotho* 遺伝子座のシーケンスを行い、遺伝子多型を示す配列を同定したところ、9カ所の配列において、SNP's を同定した。ついで2000例を越えるヒト遺伝子において、これらの多型の解析を行い、臨床検査データとの相関を解析した。今回の対象では骨密度、肺機能、肥満、血糖などの生活習慣、年齢が影響する事象との相関を解析したことから、喫煙、食習慣、妊娠歴、閉経などの違いも考慮した解析を行った。

### 【結果】

#### (1) 新たな遺伝子改変動物の作成

プレセニン結合蛋白遺伝子については、ショウジョウバエのホモログの RNAi による機能欠失株の解析により、結合蛋白が神経細胞の発生に重要な役割を担っている可能性が示唆され、ノックアウトマウスの作成を決断し、相同組み替え細胞を分離し、マウスを作成した。しかし、マウスの本遺伝子は複雑な構造をとっており、遺伝子欠失部位を越えて遺伝子が転写され、一部を欠いた蛋白が合成され、明瞭な変位表現型が観察されなかった。

第2の分子である  $\beta$ -*klotho* 遺伝子を同定した。脂肪細胞、肝臓などで発現しており、ノックアウトマウスを作成した。 $\beta$ -*klotho* ノックアウトマウスはやや体重が軽い以外は特に外観的には異常がない。発現部位から脂肪、コレステロール代謝との関連を注目し、コレステロール、胆汁酸代謝を制御する機構を検討した結果、コレステロールを胆汁酸へと変換する *Cyp7A1* 遺伝子の発現が亢進しており、コレステロールの腸肝循環の新たな制御因子として機能していることを示唆する結果を得た。また、高コレステロール餌を与えると、野生型では胆嚢にコレステロール結石が観察されるが、ノックアウトマウスでは、コレステロール結石が観察されなかった。

グリア細胞の発生、運動神経の発生に重要な役割を担う *Olig2* 遺伝子のノックアウトマウスの解析により運動神経の発生異常が見いだされた。神経細胞の移動、神経突起の伸展とネットワークの形成に機能する GDP-GTP exchanger である *STEF* 遺伝子のノックアウトを作

成し、その変異表現型を解析したが、現時点では明瞭な変異表現型が観察されていない。

筋衛星細胞で発現する転写因子は発生過程の筋芽細胞、あるいは筋衛生細胞で発現しており、培養筋細胞を用いた実験では *MyoD* の機能を阻害する活性を示すことから、未分化な筋芽細胞や筋衛生細胞の維持にとって重要と考え、ノックアウトマウスを作成したが、ホモ変異マウスも生まれ、外見上、野生型と変わらない。筋衛星細胞で発現する遺伝子であることから、筋再生を誘導し、再生能、再生の時間経過、再生に伴う遺伝子発現等を解析している。

TBP 結合蛋白は普遍的に発現する A 型と骨格筋、心筋でのみ発現する B 型が知られており、B 型は骨格筋、心筋において特殊な役割を担っていると推定される。B 型は筋発生過程より成熟した筋細胞における特異な転写制御に関与していると推定されており、*Not* ファミリーの *Not3* と強く結合している。ノックアウトマウスは外見上、野生型と区別ができない。

(2) 多彩な老化症状を呈する *klotho* 変異マウスを樹立し、ヒトの老化疾患解析の重要なモデルマウスであると提唱した。次いで、生命維持機構における *klotho* ファミリーの役割の解明、ヒト加齢関連疾患との連鎖解析を中心に研究を行い、以下の結果をえた。

#### ① *Klotho* 発現細胞の同定とその解析

*klotho* 遺伝子はカルシウムホメオスタシスの中枢である腎遠位尿管、脳の脈絡膜、副甲状腺で強く発現している。腎遠位尿管ではカルシウム輸送を担うカルシウムチャンネル (*EcaC*)、カルシウムの細胞内輸送を担うカルペンデイン D28K、カルシウム・ナトリウム交換因子、*Klotho* 蛋白が共発現しており、また、*Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase* が強く発現していた。この結果から *Klotho* 発現細胞はカルシウム輸送において特殊な機能を担う細胞であることが強く示唆された。

#### ② *Klotho* 結合分子の同定と機能解析

抗 *Klotho* 蛋白抗体を用いた免疫沈降により野生型マウスサンプルでは共沈するが、*Klotho* 変異マウスサンプルでは共沈しない蛋白を分離し、質量分析により *Klotho* 蛋白結合分子を同定した。*Klotho* 蛋白は GRP78、カルネキシン、*Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase* と結合していた。GRP78、カルネキシンはシャペロンとして *Klotho* 蛋白の成熟、細胞内輸送の制御に関わっている。*Klotho* 蛋白は *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase* と複合体を形成し、この複合体の機能制御を介して遠位尿管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御しており、実際に、*klotho* 欠損マウスでは、尿へのカルシウムの漏出（再吸収障害）、脳脊髄液のカルシウム濃度の低下（脈絡膜の輸送能低下）がお

こる。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaseは細胞内外のK, Naのバランス制御, 浸透圧を制御する極めて重要な分子であるが, 遠位尿細管, 脈絡膜細胞では特別に高発現しており, Klothoと複合体を形成してカルシウムホメオスタシスを調節することに機能していることが明らかとなった。

### ③ Klotho 蛋白によるカルシウムホメオスタシスとビタミンD合成の制御

活性型ビタミンD合成の新たな調節回路が見いだされ, Klotho 蛋白がその回路の鍵を握る因子として機能していることが明らかとなった。Klotho 変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進している。しかし, その制御因子として知られているPTH, CT, 活性型ビタミンDのシグナルはKlotho 変異マウスにおいても作動しており, 新たな制御システムを想定することとなった。解析の結果, Klotho 蛋白の欠失がその発現上昇の要因であること, Klotho 蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylase (活性型ビタミンD合成の律速酵素)の発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル, カルビンデイン D28K, *klotho* 遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす, ついで, 発現上昇したKlotho 蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっている。

ビタミンD欠乏餌により血清ビタミンD, カルシウム濃度を正常化すると多くの変異症状が消失することから, 血清ビタミンD濃度の亢進が多様な変異症状の重要な要因となっていることが明らかとなった。また, 血清ビタミンD, カルシウム濃度の亢進が $\mu$ カルパインの過剰な活性化を誘導し, 細胞死, 組織の分解を引き起こすことを証明した。これによりビタミンDがカルシウム制御のみならず, 多彩な老化症状の発症につながる多面的な生体制御機構に関与していることが明らかとなった。また, *klotho* 変異マウスでは明らかに学習機能が障害されており, その要因として活性酸素を除去に働くSOD活性の海馬における低下と海馬の神経細胞死の亢進が観察された。

### ④ Klotho 蛋白の酵素活性

Klotho 蛋白はType 1 glycosylaseの一員であることから, Klotho-Fcキメラ蛋白を培養細胞で高発現させ, 酵素活性を解析したところ,  $\beta$ -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く,  $\beta$ -Glucuronidase阻害剤で阻害される。グルクロン酸をもつ分子が基質の候補と推定され, 生体内分子としてはプロテオグリカン, アルカロイド, ステロイドホルモン, 糖脂質, フラボノイドなどが解析対象となり, steroid glucuronides ( $\beta$ -

Estradiol 3- $\beta$ -glucuronide,  $\beta$ -Estradiol 17- $\beta$ -glucuronide, Androsterone glucuronide, Eticholan-3 $\alpha$ -ol-17-one glucuronide, Testosterone  $\beta$ -D glucuronide, Estrone 3- $\beta$ -glucuronide, 5 $\beta$ -Pregnane-3 $\alpha$ , 20  $\alpha$ -diol glucuronide, Dehydroisoandrosterone 3-glucuronide, 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol 17 $\beta$ -D-glucuronide, Estriol 17 $\beta$ -D-glucuronide, Estriol 16 $\alpha$ - $\beta$ -D-glucuronide and Estriol 3 $\beta$ -D-glucuronide), proteoglycan-disaccharides, intact proteoglycans (chondroitin, chondroitin sulfate, chondrosine, Keratan sulfate and heparan sulfate)を入手し, 競合阻害活性により候補分子を絞り, 基質候補分子を解析したところ,  $\beta$ -Estradiol 3- $\beta$ -D-glucuronide, Estrone 3- $\beta$ -D-glucuronide, Estriol 3 $\beta$ -D-glucuronideなどのステロイドホルモンのグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。Klotho 蛋白はステロイド-グルクロナイドからグルクロン酸を切り取る $\beta$ -グルクロナダーゼ活性を有している。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho 蛋白の作用機構の本質であると推定され, 新たな生理活性ステロイドの探索へと研究を展開している。

### ⑤ Klotho 蛋白のプロセッシングと分泌型 Klotho 蛋白

ヒト *klotho* 遺伝子の解析からN端側のドメインよりなる70kdの分泌型Klotho 蛋白の存在が推定された。そこで, 70kd分泌型Klothoを高発現するマウスを作成したが, 全く機能を見いだせなかった。また, マウス, ヒト血清中より分泌型Klotho 蛋白の同定を試みたが, 見いだせなかった。そこで, 新たな抗体を作成し, 検討したところ, 130kdの分泌型蛋白を見いだした。この分泌型Klothoは全長型よりプロセスされたものである。(3) 新たな個体レベルの遺伝子機能解析システムの開発に関する研究

点突然変異をターゲット遺伝子にコンディショナルに導入するシステムを開発し, 目的通りにアミノ酸の変異を導入できることを確認し, 変異表現型の解析から, 変異を導入したアミノ酸が担う機能を解析することに成功した。2個の異なるloxP配列をターゲット遺伝子に組み込んだ相同組換えマウスを作成した。一方, このマウスの作成に利用した相同組み替えES細胞を用いて2個の異なるloxP配列に囲まれた遺伝子を交換できることを確認した。更に同様の実験を受精卵を用いて行っている。

子宮内電気穿孔法により, *Stef*, *Rac1*, *JNK*などの発現ベクター, あるいはそのドミナントネガティブベクターを導入し, 神経細胞の挙動を観察した。*Stef*シグナルは*Rac1*を活性化し, 神経細胞の先端突起の形成, 伸展の制御と, *JNK*の活性化を介した細胞内骨格のダイナミクスの制御に関与することによって神経細胞の移動

を制御していることが明らかとなった

(4) 疾患の発症、症状の個体差に関与する遺伝子素因の研究

#### ① Klotho 表現型の MSM 系統による遺伝的修飾について

MSM.Klotho 系統の表現型を病理学的に解析した結果、血清中のカルシウム及びリン濃度が亢進していた。したがって、標準的実験用マウス系統の遺伝的背景におけるオリジナル Klotho マウスの中心的な病態と考えられるカルシウムホメオスタシスの異常は MSM.Klotho 系統でも同様に認められた。しかし、興味深いことに、他の表現型については、オリジナル klotho マウスと大きく異なっていた。それは、特定の表現型の緩和と悪化の二つに大別される。

#### ② 表現型の緩和

MSM.Klotho 系統は、性成熟期まで正常個体と同様に成長し、平均寿命も標準的な実験用マウス系統の遺伝的背景上の Klotho マウスに比較して約 30 日延長する。また雌雄生殖器内には正常な形態の精子や二次卵胞が認められ、生殖器系の異常が緩和されていた。これらの特徴はオリジナル klotho マウスの病態を改善する特徴と考えられる。

#### ③ 腎機能表現型の悪化

MSM.Klotho 系統は、多飲多尿で、全身の組織への異所性石灰沈着が klotho マウスよりも重度であった。特に腎臓は細動脈の石灰化と共に尿細管萎縮、糸球体硬化など組織形態の異常が顕著であった。この組織所見を裏付けるように血中の BUN は異常に高値で、尿中の糖の排泄量も増加していた。これらの病態はオリジナル klotho マウスの病態よりも重篤であった。

#### ④ 遺伝的修飾に関する考察

以上の特徴から、MSM.kloth 系統は、オリジナル klotho マウスよりも病態が緩やかに進行するため、老化の過程をより忠実に再現しているモデルマウスであると考えられる。また Klotho 遺伝子の変異による詳しい病態の進行や死因を検討する為にも、より有力なツールとなる。特に腎臓の表現型は klotho 遺伝子の変異により受ける障害の感受性が MSM で高い事を示している。このことは、人の腎疾患において腎不全や透析導入に至るまでの病態の進行スピードが人種により差があることと対応している。

(5) 遺伝子多型とヒト関連疾患との連鎖に関する研究

ヒト klotho 遺伝子座の解析により 9 カ所の遺伝子多型 (SNP's) を見いだしており、少なくとも、7 カ所は老化関連疾患や代謝関連指標との連鎖が推定されている。まお、ホモに変異配列をもつ集団はヘテロの集団に比

べてより高い相関を示すことが確認された。これらは特定の疾患との連鎖解析ではないことから、詳細な解析により日本人閉経後女性においても、promoter 領域および exon4 の多型が骨密度の低下と有意な相関を示したことから、klotho 遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。

#### 【考察】

(1) 新たに作成したノックアウトマウスはいずれも外見上は野生型と同様に成長しており、今後は筋細胞の特性、収縮蛋白遺伝子発現、再生能力などの検討を進めることが重要である。また、STEF 遺伝子については機能重複遺伝子が推定されることから、二重ノックアウトが必要と思われる。

$\beta$ -klotho ノックアウトマウスはコレステロール代謝に関与しており、成人病の発症機構の解析、予防法の開発に結びつくことを期待している。

(2) Klotho については予想を超えたことが次々に明らかになり、全く新しい領域の発展に結びつくと考えている。これまで、 $1\alpha$ -hydroxylase の発現上昇により血清中のビタミン D 濃度が上昇し、上昇したビタミン D は  $1\alpha$ -hydroxylase の発現を抑制することにより、local negative circuit が成り立っていると考えられてきたが、この制御回路に新たな役者、Klotho が必要であるらしい。このサーキットにおける Klotho 蛋白の占める位置、その占め方はどのようなものであるかは次の課題である。

試験管内の  $\mu$  カルパインの活性化には  $10 \mu\text{mol}$  を越えるカルシウムが必要とされるが、細胞内のカルシウム濃度は  $1 \mu\text{mol}$  以下で、簡単には増加しないと考えられ、確かに klotho 変異マウスでは血清中のカルシウム濃度が亢進しているが、この結果から細胞内のカルシウム濃度が上昇すると考えるのは早計である。 $\mu$ カルパインの動物個体における活性化機構は不明であるが、おそらく、klotho 変異マウスでは細胞内へのシグナルが誤って伝えられ、細胞内の  $\mu$  カルパインのカルシウムに対する感受性が亢進し、活性化が引き起こされたと推定している。

カルシウムの制御は生命維持にとって必須の機構であることから膨大な研究が積み重ねられてきたが、今回の研究により、Klotho 蛋白と Na/K ATPase の複合体によるカルシウム制御機構の発見やビタミン D 合成の新たな制御回路の発見、Klotho 蛋白のステロイド  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性の解析など、これまでの予想を超えた全く新しい事実が次々と明らかとなり、新たな展開が推定される。

(3) Cre-loxP システムの利用により新たな遺伝子操作技術が可能となった。これらの技術の発展により遺伝子機能の詳細な解析と構造と機能の連関を個体レベルで解析することが可能である。また、症候学的にヒト疾患に近いモデルマウスの作成や疾病の成り立ちを理解するためのマウスの開発がすすむものと推定される。点突然変異の導入に成功したが、今後はこの方法を一般化できるかどうかである。

子宮内遺伝子導入法は、量、スピードにとどまらず、解析の質的な進歩をもたらすと推定される。RNAi のメカニズムについて知見、活用法に関する工夫が多数、報告されており、RNAi と子宮内遺伝子導入法を組み合わせられることによって、更に詳細な解析が可能となると推定される。

(4) 標準的な実験用マウスの遺伝的背景にあるオリジナル Klotho マウスと MSM/klotho 系統を用いることにより、腎障害の進行に関連する修飾遺伝子を遺伝学的に解析する事が可能である。その遺伝子を特定できれば、人の腎障害進行の個人差を生むメカニズムの解明にも繋がると思われる。また、腎臓の表現型に限らず、同じ手法を用いれば寿命の延長や生殖器系の改善に関連する修飾遺伝子の特定もできる。我々のグループは、MSM 系統の全染色体を一つずつ標準的な実験系統である C57BL/6J 系統の遺伝的背景に導入したコンソミック系統を樹立した。通常の QTL 解析で可能性のある染色体領域を同定した段階で、速やかにコンソミック系統を利用することで、修飾遺伝子同定の効率を大幅に上げることが可能である。現在、QTL 解析の準備を進めている。

(5) 本研究からは、klotho 以外にも遺伝子多型解析の対象となる遺伝子が浮かび上がる可能性があり、それらを含めて遺伝子多型と疾患の相関を解析する。この研究の進展は各個人の「罹患率の将来予測」や「遺伝子素因にあわせたライフスタイルの検討」につながるかと推定され、倫理問題を考慮しつつ、QOL の改善に役立てる方向を模索したい。

#### 【結 論】

得られていた遺伝子改変マウスの解析、新たな遺伝子ノックアウトマウスの開発、遺伝子改変マウスの新たな作成法の開発を試み、重要な成果が得られ、神経・筋肉系の形成、崩壊の分子機構解明の手がかりが得られ、病態モデルの開発が前進した。

#### 【参考文献】

1) Koh N, Fujimori T, Tamori A, et al: Severely reduced

expression of Klotho gene in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Comm* **280**: 1015-1020, 2001.

- 2) Yamashita T, Sekiya I, Kawaguchi N, et al: klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J Endocrinology* **168**: 347-351, 2001.
- 3) Uchida A, Komiya Y, Tashiro T, et al: Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J Neurosci Res* **64**: 364-370, 2001.
- 4) Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, et al: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* **167**: 2625-2631, 2001.
- 5) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, et al: Combinational roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neural and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**: 757-771, 2001.
- 6) Yoshida S, Ohbo K, Takakura A, et al: Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice. *Dev Biol* **240**: 517-530, 2001.
- 7) Morishita K, Shirai A, Kubota M, et al: The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutrition* **131**: 3182-3188, 2001.
- 8) Yamagishi T, Saito Y, Nakagawa T, et al: Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res* **24**: 705-709, 2001.
- 9) Matsuo N, Hoshino M, Yoshizawa M, et al: Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth. *J Biol Chem* **272**: 2860-2868, 2002.
- 10) Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y: Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* **143**: 683-689, 2002.
- 11) Ito S, Fujimori T, Hayashizaki Y, et al: Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochem Biophys Acta* **1576**: 341-345, 2002.
- 12) Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, et al: The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Current*



- Biology* **12**: 1157-1163, 2002.
- 13) Kashimada K, Yamashita T, Tsuji K, et al: Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to growth hormone treatment. *J Endocrinology* **174**: 403-410, 2002.
  - 14) Takebayashi H, Ohtsuki T, Uchida T, et al: Non-overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube. *Mechan Develop* **113**: 169-174, 2002.
  - 15) Manya H, Fujimori T, Nabeshima Y, et al: Klotho protein deficiency leads to overactivation of (Mu)-calpain. *J Biol Chem* **277**: 35503-35508, 2002.
  - 16) Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matsuzaki F: Refinement of wingless expression by a Wingless- and Notch-responsive homeodomain protein. *Dev Biol* **249**: 44-56, 2002.
  - 17) Kawano K, Ogata N, Chiano M, et al: Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Mineral Res* **17**: 1744-1751, 2002.
  - 18) Yamashita T, Okada S, Higashio K, et al: Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology* **143**: 4711-7, 2002.
  - 19) Takeshita K, Yamamoto K, Ito M, et al. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, Klotho mouse. *Semin Thromb Hemost* **28**: 545-553, 2002.
  - 20) Yoshizawa M, Hoshino M, Sone M, et al: Expression of stef, an activator of Rac1, correlates with the stages of neuronal morphological development in the mouse brain. *Maichanisms of Development* **113**: 65-68, 2002.
  - 21) Momose S, Kobayashi T, Mitani H, et al: Identification of the coding sequences responsible for Tsc2-mediated tumor suppression using a transgenic rat system. *Human Molec Genetics* **11**: 2997-3006, 2002.
  - 22) Nagai T, Yamada K, Kim H-C, et al: Cognition impairment in the genetic model of aging, klotho gene mutant mice: A role of oxidative stress. *Faseb J* **17**: 50-52, 2003.
  - 23) Yang J, Matssukawa N, Rakugi H, et al: Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **301**: 424-429, 2003.
  - 24) Kurisaki T, Masuda A, Sudo K, et al: Phenotypic analysis of meltrin a (ADAM12)-deficient mice; Involvement of meltrin a in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol* **23**: 55-61, 2003.
  - 25) Yoshizawa M, Sone M, Matsuo N, et al: Dynamic and coordinated expression profile of dbI-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. *Gene Expr Patterns* **3**: 375-381, 2003.
  - 26) Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima YI, et al: The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J* **22**: 4190-4201, 2003.
  - 27) Wakimoto K, Fujimura H, Iwamoto T, et al: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger-deficient mice have disorganized myofibrils and swollen mitochondria in cardiomyocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **135**: 9-15, 2003.
  - 28) Yahata K, Mori K, Mukoyama M, et al: Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 128-34, 2003.
  - 29) Seki K, Fujimori T, Savagner P, et al: Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte extracellular matrix, type II collagen and aggrecan. *J Biol Chem* **278**: 41862-41870, 2003.
  - 30) Fujimori T, Kurotaki Y, Miyazaki J, et al: Analysis of cell lineage in the 2-cell and 4-cell mouse embryo. *Development* **130**: 5113-5122, 2003.
  - 31) Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, et al: Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular Endocrinology* **17**: 2393-2403, 2003.
  - 32) Tohyama O, Imura A, Iwano A, et al: Klotho is a novel  $\beta$ -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid  $\beta$ -glucuronides. *J Biol Chem* (in press)
  - 33) Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, et al: Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of Klotho Gene Expression. *Circulation* (in press)

# 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

日 置 恭 司\*

研究協力者 筒本 まりこ\*, 外丸 祐介\*, 小倉 智幸\*, 伊藤 守\*

## 【諸 言】

筋ジストロフィー症の要因解明や治療研究のため、筋ジストロフィー（筋ジス）モデルマウス・ハムスターならびに、そのコントロール系を微生物的、遺伝的統御のもとで維持し、研究班を初めとする研究グループに供給した。また、筋ジス研究に適したモデル動物の育成を目的に育種繁殖技術、生殖工学技術およびクローン動物作製技術の開発に努め、これら技術を応用した実験動物学的改良を行った。

動物の維持と供給では、1.として筋ジス動物を3年間に渡り研究者に繁殖用タネ動物として供給した。2.として個体で維持していた筋ジスハムスターから受精卵（胚）採取と凍結保存を行った。実験動物学的改良では、3.としてヒトを初めとする異種細胞を生着させたマウスの作製は、種々の病態発生機序の解析やその治療、予防のために重要な役割を果たすと考え、異種細胞の生着と増殖を支持するマウスの開発を試みた。4.として遺伝子操作ES細胞から作出されたクローンマウスの次世代以降への操作遺伝子の伝達を確認した。5.としてES細胞での相同組換えを利用した遺伝子改変マウスの作製は、重要且つ効果的な手法となり得ることからC57BL/6J-*dy*マウスからのES細胞の樹立を試みた。以上1～5について報告する。

## 1. 筋ジスモデル動物の維持とタネ動物の供給

筋ジスモデル動物 [マウス C57BL/6J-*dy*, C57BL/10-*mdx*, ハムスター (NSJ×NSH) -*my*] およびコントロール動物 [マウス C57BL/10ScN, C57BL/6J, ハムスター (NSJ×NSH)] をビニールアイソレーター装置ならびに胚の凍結保存によって維持繁殖し、班員の要望に応じて供給した。供給は原則として繁殖用タネマウスとした。平成13年度は16機関に延べ34回、C57BL/10-*mdx* (332匹), C57BL/10ScN (41匹), C57BL/6J-*dy* (18匹), 平成14年度は18機関に延べ32回、C57BL/10-*mdx* (303匹), C57BL/10ScN (74匹), C57BL/6J-*dy* (12匹), 平成15年度 (4月～12月) は15機関に延べ31回、C57BL/10-

*mdx* (195匹), C57BL/10ScN (36匹), C57BL/6J-*dy* (28匹), 3年間の合計で延べ49機関, 97回, 1,038匹を供給した。

## 2. 筋ジスハムスター胚の凍結保存

### 【目 的】

筋ジストロフィー症シシリアンハムスターは、1962年Dr. Humburgerらによって育成された。当研究班では、筋ジスハムスター BIO14.6系、ならびにコントロールとして BIOF1B系を米国の BIO Research Consultants Inc. から輸入し、1982年から研究班に配布した。その後、育種の改良を行い、現在の筋ジスハムスター (NSJ×NSH) -*my* とコントロール (NSJ×NSH) を育成し維持を行ってきた。しかし、近年は研究者からの要望がなくなってきたことから個体での維持を中止して、凍結保存胚での維持に置き換える試みを行った。

### 【方 法】

筋ジスハムスター (NSJ×NSH) -*my* /*my* とコントロール (NSJ×NSH) +/+ を用いた。

受精卵の採取：12週齢以上に達した雌ハムスターを無作為に選抜して、同じく12週齢以上の同系の雄と1:1で同居させ、自然交配を設定した。すなわち、同居開始の翌日から9:00-10:00に雌の膈スメアを観察し、精子の有無により交尾を確認した。交尾が確認された雌は翌日の14:00-15:00に頸椎脱臼により安楽死させて卵管部を採材し、これをPBI液にて灌流することで2細胞期胚の採取を実施した。

受精卵の保存：得られた2細胞期胚は、PBI液にて37℃ (培養器中) で10-30分間培養した後、ガラス化法を導入した。すなわち、胚を5 μlの1M DMSO添加PBI液とともに凍結チューブに移して氷上に3分間静置した。次いで95 μlのDAP213液 (2M DMSO, 1M アセトアミド, 3M プロピレングリコール) を添加し、氷上でさらに3分間静置した後、液体窒素中に投入することで凍結保存を実施した。融解操作は、凍結チューブを室温

\* (財) 実験動物中央研究所

に30-60秒間静置した後、900  $\mu$ l の0.25M Sucrose 添加PBI液で希釈することで実施し、胚は回収後にPBI液に移して顕微鏡下で形態を観察した。

### 【結果・考察】

受精卵の採取と保存：*my/my* と *+/+* ハムスターの雌雄をそれぞれ同居させることで、供試した雌の83% (24/29匹) および84% (16/19匹) について交尾の確認ができた。交尾確認された *my/my* の24匹および *+/+* の16匹の雌から2細胞期胚を採取した結果、合計127個および101個が採取でき、それぞれの受精卵採取効率は6.3個および5.3個/匹であった。

受精卵の保存：得られた2細胞期胚は、雌の個体ごとに個別の凍結チューブにてガラス化保存を実施し、*my/my* の127個を14チューブに、一方の *+/+* の101個を11チューブに保存することができた。また、保存した *+/+* の胚のうち3本の凍結チューブについて融解試験を実施した結果、100.0% (13個) が回収され、53.8% (7個) が形態的に正常であり、高い生存率が得られた。さらにこの内の7個について偽妊娠雌への移植試験を実施した結果、全て胚の着床が確認された。

以上より、最終的に *my/my* ハムスターについては127個 (14チューブ)、*+/+* については88個 (8チューブ) の2細胞期胚を凍結保存することができ、個体での維持を中止した。

### 3. NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO マウス が示す移入ヒト細胞に対する高生着性について

#### 【目的】

我々が開発した NOD/Shi-*scid* マウス (以下 NOD-*scid*) がNK活性、補体活性およびマクロファージ機能を著しく減退していること、異種細胞の生着性が極めて高いこと、さらに NOD-*scid* への抗NK抗体投与が、その生着をさらに向上させることを明らかにした。このことから、NOD-*scid* の生着性をより向上させる目的でNK細胞を消失させた IL-2R $\gamma$  変異体を導入した NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO マウス (以下 NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO) を育成し、繁殖性および異種細胞の生着性を検討した。

#### 【方法】

NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO の育成：NOD-*scid* と C57BL/6J-IL-2R $\gamma$ KO を交配させ、その産仔の中から IL-2R $\gamma$  変異体遺伝子を持つマウスをPCR法にて選別した。そのマウスをさらに NOD-*scid* と交配して変異体遺伝子を持っているマウスの選別を繰り返すことで育成した。さらに、育成された NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO の繁殖性を調査した。

末梢血リンパ球の再構築：NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO, NOD-*scid* 抗NK抗体投与および NOD-*scid* に正常ヒト末梢血より分離した単核球  $1 \times 10^7$  を腹腔内に移入し、2週後の各マウス腹腔細胞中のヒト CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 細胞を Flow cytometry で産出した。

ヒト臍帯血幹細胞の分化と増殖：前者同様のマウスにヒト臍帯血より分離した CD34<sup>+</sup> 細胞  $1 \times 10^5$  を尾静脈より移入し、4週後の各マウス末梢血におけるヒト CD45<sup>+</sup> および CD41<sup>+</sup> 細胞を産出した。

### 【結果・考察】

NOD-*scid* への戻し交配を8回行った NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO を育成した。その繁殖成績は、出産率68.5%、平均産仔数6.8匹、離乳率96.9% および生産指数4.5と高い繁殖値であった。

ヒト末梢血リンパ球およびヒト臍帯血幹細胞の移入実験では、NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO が、双方ともに生着、増殖また分化においてNK抗体処理した NOD-*scid* よりも優れていることが明らかとなった。このことは、NOD-*scid*, IL-2R $\gamma$ KO の高生着にNK活性以外の活性の消失が関連していることを示唆するものと思われる。

### 4. 核移植により遺伝子操作ES細胞から作出されたクローンマウスの子孫への操作遺伝子の伝達

#### 【目的】

遺伝子操作ES細胞から作出されたクローンマウスの次世代以降への操作遺伝子の伝達様式は詳細に示されていない。そこで、クローン技術の実験動物における有用性を評価するために、遺伝子組み換えES細胞由来クローンマウスの操作遺伝子の仔への伝達を調べた。

#### 【方法】

変異型卵管特異的糖タンパク (oviduct-specific glycoprotein: OGP) 遺伝子を有する (OGP-*+/+*) ES細胞から核移植により直接作出した OGP-*+/+* クローンマウス (♂7: ♀1) を用いて次のような交配を行った。① ♂OGP-*+/+* クローンマウスと ♀C57BL/6J の交配、②は①由来 OGP-*+/+* マウスの♂と♀の交配、③ OGP-*+/+* クローンマウスの♂と♀の交配の組み合わせを行った。なお、♂クローンマウスはY染色体を欠いたXO型である。

### 【結果・考察】

①で得られた産仔89匹中50匹 (56.2%) が OGP-*+/+* マウスであった。②では37匹中、OGP-*-/-* が9匹 (25.8%)、OGP-*+/+* が18匹 (48.6%) および OGP-*+/+* が10匹 (27.0%) であった。操作遺伝子の伝達は、ほぼメンデルの法則

に従っていた。③のクローン♀♀間で26匹の仔が得られ、OGP<sup>-/-</sup>が10匹、OGP<sup>+/-</sup>が12匹およびOGP<sup>-/-</sup>が4匹であった。また、③の交配でXOマウスの伝達も確認された。キメラマウスを介した遺伝子組み換えマウス作出法に比べ、クローン技術を用いることで少なくとも一世代早く遺伝子組み換えマウスを得ることが可能であった。また、今回のようにXOマウスを使うことによって、より早くホモ欠損マウスを得ることも可能であった。

## 5. C57BL/6J-dy マウスの ES 細胞樹立の検討

### 【目的】

ES 細胞での相同組換えを利用した実験動物の遺伝子改変は、極めて重要かつ効果的な生物学的手法となっている。そこで、疾患モデル動物の直接的な遺伝子改変に向け C57BL/6J-dy マウスの胚盤胞から ES 細胞の樹立を試みた。

### 【方法】

C57BL/6J-dy マウスの凍結受精卵を急速融解し、M2 培地で 3.5 日間培養し、胚盤胞まで発生させた。ES 細胞の樹立または培養にはフィーダー細胞を播種した plate または dish を使用した。フィーダー細胞は、使用する前にマウス 14.5 日齢由来の胎児繊維芽細胞を 10 µg/ml マイトマイシン C で 3 時間処理した後、0.1% gelatin コートしておいた 4well Plate などに播種した。

ES 細胞性状検定：作製された ES 細胞はアルカリフォスファターゼ染色キットによる未分化細胞コロニーの検出を行った。また、ES 細胞の核型検査は常法に従い染色体標本作製し、観察される ES 細胞の染色分体をランダムに 50 核選び、カウントした。

キメラマウスの作出：凍結 ES 細胞を 37°C 温湯で融解し、浮遊液を ESM に懸濁して、1,200 rpm 5 分間遠心後、ESM で細胞数を  $5 \times 10^5$ /dish に調整し 3.5 cm dish に播種した。培養 2～3 日後に対数増殖期の ES 細胞を 0.25% EDTA-Trypsin で解離し、パスツールピペットで良く攪拌し、6.0 cm dish に浮遊液を入れ、20～30 分間培養することによってフィーダー細胞を除去した。回収した ES 細胞を ICR マウスの胚盤胞にマニピュレーターで常法に従いインジェクションし、8 時間ほど培養後、卵膜が修復されたら偽妊娠 ICR の子宮に移植した。

### 【結果・考察】

胚盤胞まで進んでいる 17 個の受精卵を培養し、12 個の ICM をピックアップし 4well plate に播種した。培養 5 日後に 2well に形状の良い ES 様コロニーが 9 個確認された。その後、これらのコロニーをそれぞれ 2～3 回の

解離、継代によって増殖した結果、ES 細胞株のコンパクトなコロニーを形成しながら増殖している細胞株を 7 つ得ることができた。この 7 細胞株の性状は、全てにおいて高い正常核型の保有 (>80%) と未分化率 (96 ± 2%) であった。

胚盤胞への ES 細胞移入によるキメラマウス作出では、各細胞株で 60 個前後の移入胚移植したところ 6 つの細胞株でキメラを含む産仔が生まれ (平均キメラ率 38%) そのうち、4 つの細胞株で、キメラ個体への dyES 細胞の寄与率が 80% を超えるキメラマウスが得られた。しかし、これら寄与率の高いキメラマウスでも、移入 ES 細胞に由来する筋ジストロフィー症状、即ち、2 週齢以降下肢を引きずるような症例は観察されなかった。

今回樹立された C57BL/6J-dy マウスの ES 細胞株の性状検定の結果から明らかに高い未分化率、正常核型率は、目的遺伝子の組換え体作製時の長期培養でも安定な性状維持が期待できるものと考えられる。また、ES 細胞を遺伝子改変動物作製に用いるためには、キメラ個体の生殖細胞系列に導入 ES 細胞が分化し、次世代に伝わるのが最も重要である。今回のキメラマウス作出率と寄与率は、生殖細胞系列への寄与が認められている既知の ES 細胞の寄与率などと比べても遜色なく、キメラ寄与率の高い 4 株には生殖細胞系列への寄与が期待される。現在、得られたキメラマウスを交配し、その産仔での生殖細胞系列への寄与の有無を解析している。

### 【結論】

筋ジストロフィーモデル動物 (マウス C57BL/6J-dy, C57BL/10-mdx, ハムスター NSJ × NSH-my) およびコントロール動物 (マウス C57BL/10ScN, C57BL/6J, ハムスター NSJ × NSH) をビニールアイソレーター装置ならびに胚の凍結保存によって維持繁殖し、班員の要望に応じて平成 13～15 年度の 3 年間に延べ 49 機関、合計 97 回、1,038 匹を供給した。

筋ジストロフィーハムスターは 1982 年から研究班に配布を開始した。その後、育種の改良を行い、現在の筋ジストロフィーハムスター (NSJ × NSH) -my とコントロール (NSJ × NSH) を育成し維持を行ってきた。しかし、近年は研究者からの要望がなくなってきたことから個体での維持を中止して、凍結保存胚での維持に置き換えた。

NOD-scid, IL-2R $\gamma$ KO マウスは従来の免疫不全マウスの中でも異種細胞の生着性に最も優れており、免疫学的な基礎研究だけでなく、異種細胞を用いた種々の病態機序の解析に有用である。また、幹細胞移入などによる再生治療のためのレシピエントとしての可能性を秘めているマウスを作出した。

遺伝子操作 ES 細胞から作出されたクローンマウス技術の実験動物における有用性を評価するために、遺伝子組み換え ES 細胞由来クローンマウスの操作遺伝子の仔への伝達を調べた。その結果、キメラマウスを介した遺伝子組み換えマウス作出法に比べ、クローン技術を用いることで少なくとも一世代早く遺伝子組み換えマウスを得ることが可能であった。

疾患モデル動物の直接的な遺伝子改変に向け、C57BL/6J-*dy* マウスの胚盤胞から ES 細胞の樹立を試みた。その結果、7つの ES 細胞株が得られ、全ての細胞株において正常核型、未分化状態の維持が示された。マウスの胚盤胞に移入しキメラマウスを作出したところ、高いキメラ率と寄与率を示した。このことは、生殖細胞系列への寄与が認められる ES 細胞が得られることによって、疾患モデル動物での直接的な遺伝子改変研究が可能になることを示唆している。

#### 【参考文献】

- 1) Hioki K, Kuramochi T, Endoh S, et al: Lack of B cell Leakiness in BALB/cA-nu,scid Double Mutant Mice. *Exp Anim* **50**: 67-72, 2001.
- 2) Ono Y, Shimozawa N, Muguruma K, et al: Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase. *Reproduction* **122**: 731, 2001.
- 3) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al: NOD/SCID/rnull mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *BLOOD* **100**: 93175-3182, 2002.
- 4) Shimozawa N, Ono Y, Muguruma K, et al: Direct Production of Gene-targeted Mice from ES Cells by Nuclear Transfer and Gene Transmission to their Progeny. *Exp Anim* **51**: 375-381, 2002.

# 遺伝子改変マウスを用いた神経・筋疾患モデルの作出

笹岡俊邦\*

研究協力者 今村道博\*\*, 新石健二\*\*, 野口悟\*\*, 水野裕司\*\*, 濱裕\*\*,  
高越奈緒美\*\*, 高井恵理子\*\*, 松田由喜子\*\*, 金子清俊\*\*, 吉田幹晴\*\*,  
小沢鉄二郎\*\*, 武田伸一\*\*, 埜中征哉\*\*, 石田靖雅\*\*\*\*

## 【緒言】

肢帯型筋ジストロフィーであるサルコグリカノパチー (SGP) は, サルコグリカン (SG) が責任分子であり, SGはデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 原因分子ジストロフィン (DYS) と複合体を形成する. これまで我々は,  $\beta$ -SG ノックアウト (BSG<sup>-/-</sup>) マウス, 及び  $\gamma$ -SG ノックアウト (GSG<sup>-/-</sup>) マウスを作成し, 筋線維膜上の DYS 複合体の解析, 筋病変の解析を行った<sup>1)2)</sup>. また, 本マウスを用いて E.P.Hoffman 教授と共同し, 遺伝子治療実験も進めてきた<sup>3)</sup>.  $\epsilon$ -SG (ESG) は,  $\alpha$ -SG のホモログとして見いだされ, 骨格筋に加えて臓器に広く分布し, SG 複合体を形成する. Myoclonus-dystonia syndrome に ESG の変異がみられ, ESG が形成する SG 複合体の神経系における機能も注目されている. 本研究では, (A) GSG<sup>-/-</sup> マウスにみられる筋肥大の成因の解析, (B) DYS と SG の二重欠損マウスの作成による DYS 複合体の役割の解析, (C) *mdx* マウス, BSG<sup>-/-</sup> マウス及び GSG<sup>-/-</sup> マウスのコンジェニック系統の作成による遺伝背景の均一化, (D) ESG のノックアウトマウス作成を行った.

## 【方法】

BSG<sup>-/-</sup> マウス及び GSG<sup>-/-</sup> マウスは, 遺伝子ターゲティング法により我々が作成した<sup>1)2)</sup>. *mdx* マウスは, (財) 実験動物中央研究所から供与された. *mdx* マウスと BSG<sup>-/-</sup> マウスとの二重欠損マウス (BSG-*mdx* マウス), ならびに *mdx* マウスと GSG<sup>-/-</sup> マウスとの二重欠損マウス (GSG-*mdx* マウス) を交配により作成した. また, BSG<sup>-/-</sup> マウス, GSG<sup>-/-</sup> マウス及び *mdx* マウスのそれぞれを C57BL/6J マウス系統に 10 世代戻し交配を行い, コンジェニック系統を作成した. また, 奈良先端科学技術大学院大学の石田助教授らが進めている, 独自のベクターを用いたジーントラッププロジェクトによる

ES 細胞プールの中で, ESG 遺伝子がノックアウトされた ES 細胞が同定された. この ES 細胞を用いて, ESG ノックアウトマウスの作成を行った.

## 【結果】

### (A) GSG<sup>-/-</sup> マウスの筋肥大の解析:

GSG<sup>-/-</sup> マウスは 22 週令以降, 約半数が筋力低下を示し, 筋肥大が顕著になり, 全身の骨格筋・骨の湿重量は, 対照より 20-25% 増加し, 肥大筋の一つである前脛骨筋の湿重量は約 1.5 倍に, 前脛骨筋横断面の筋線維数は, 約 2 倍に増加していた. しかし肥大筋の線維化・脂肪組織への置換は 104 週令にいたるまでわずかであり, GSG<sup>-/-</sup> マウスの筋肥大は, 筋壊死・再生過程を経た後の筋重量・筋線維数の増加によるものであった.

### (B) 二重欠損マウスの作成と所見:

BSG-*mdx* マウス, GSG-*mdx* マウスとも姿勢異常, 脊柱弯曲, 筋萎縮を示し, 病理組織像は, 同週令の BSG<sup>-/-</sup> マウス, GSG<sup>-/-</sup> マウスの組織所見より進行した所見であった. 生存期間は BSG<sup>-/-</sup> マウス, GSG<sup>-/-</sup> マウスより短縮していた.

### (C) コンジェニック系統の作成:

*mdx* マウス, BSG<sup>-/-</sup> マウスおよび GSG<sup>-/-</sup> マウスを C57BL/6J 系統へ 10 世代戻し交配を行ない, コンジェニック系統を作成した. これらの系統を用いて二重欠損マウスを作成した.

### (D) ESG ノックアウトマウスの作成:

ESG ノックアウト ES 細胞を用いて, マイクロインジェクション法によりキメラマウスを作成し, ES 細胞由来の ESG ノックアウトマウスを作成した. 当該 ES クローンは, ESG 遺伝子の最終エキソンを欠失しており, ESG ノックアウトマウスは当該エキソンにコードされる細胞質内 C 末端領域の機能解析に有用であり, また, マーカー遺伝子の発現による ESG 発現細胞の同定も可

\*岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所

\*\*国立精神・神経センター 神経研究所

\*\*\*国立精神・神経センター 武蔵病院

\*\*\*\*奈良先端科学技術大学院大学

能である。

### 【考 察】

(A) GSG<sup>-/-</sup> マウスの骨格筋の肥大は、筋重量・筋線維数の増加によるという結論を得た。この結果は、従来、筋肥大の成因とされていた、(1) 線維組織・脂肪組織の増加による仮性肥大によるもの、および(2) 筋線維自体の肥大によるものに加えて、(3) 筋再生による筋線維数の増加によるものがあることを明らかにした。

(B) BSG-*mdx* マウス及びGSG-*mdx* マウスに観察される筋ジストロフィーの所見は、単独の欠損マウスにはみられない外観の異常、進行した組織所見を示した。二重欠損マウスの筋ジストロフィーの所見を理解するため、今後、DYS欠損およびSG複合体欠損におけるDYS複合体の分子構築変化を明らかにしたい。

(C) BSG<sup>-/-</sup> マウス、GSG<sup>-/-</sup> マウス、*mdx* マウス、BSG-*mdx* マウス及びGSG-*mdx* マウスをC57BL/6Jコンジュニック系統とした。遺伝背景を均一に揃えた上で二重欠損マウスの表現型を解析することが可能なマウス系統とした。

(D) ESGノックアウトマウスは、骨格筋に加えて、神経系におけるSG複合体の機能解析に貢献するものである。

### 【結 論】

GSG<sup>-/-</sup> マウスの筋肥大の成因は、従来考えられていた成因とは異なるものであることが示された。SGとDYSの二重欠損マウスでは、進行した筋ジストロフィーの所見がみられ、DYS複合体の分子構築の変化と筋病変の関連の理解に寄与するものである。また、遺伝的背景を近交系としたコンジュニック系統を作成し、今後の研究に有用なモデルマウスとして確立した。ESGが形成するSG複合体の骨格筋ならびに神経系における機能の理解のため、ESGノックアウトマウスを作成した。

### 【参考文献】

- 1) Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, et al: Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 8: 1589-98, 1999.
- 2) Sasaoka T, Imamura M, Araishi K, et al: Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 13: 193-206, 2003.
- 3) Dressman D, Araishi K, Imamura M, et al: Delivery of

alpha- and beta-sarcoglycan by adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* 13: 1631-46, 2002.

# 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 — Dystrophinの中枢における役割の検討 —

関 口 正 幸\*

研究協力者 坂本 光伸\*, 吉田 瑞子\*, 上地 さり\*, 佐藤 栄一\*,  
山田 祐子\*, 山田 一之\*\*, 和田 圭司\*

## 【緒 言】

脳以外での機能異常が主な病因となる筋・神経疾患には高次脳機能の異常を併発する場合が数多く報告されている。実際、それら疾患の原因遺伝子はその主な病変部位のみではなく脳にも発現が見られる場合が多い。Duchenne 型筋ジストロフィーにおいても、およそ3分の1の症例で精神遅滞・感情障害等の中枢症状を伴うことが報告されており、その原因遺伝子 Dystrophin は脳でも発現が確認されている。興味深いことに Dystrophin は海馬神経細胞において GABA シナプス後膜の post synaptic density (PSD) に限局して存在することが報告されている<sup>1)</sup>。また、Dystrophin 欠損マウスである mdx マウスにおいて、海馬の GABA シナプスにおける GABA 受容体クラスタリング異常も報告されている<sup>2)</sup>。GABA ニューロンは神経細胞に抑制性のシグナルを伝達し、それ自身高次脳機能の発現に極めて重要である。又、GABA シナプスからの入力は興奮性シナプスにおけるシナプス可塑性に強い影響を持つことも良く知られており、シナプス可塑性の調節系としても重要である。以上の事実は、GABA シナプス異常を介して、Dystrophin が高次脳機能又はシナプス可塑性に関与している可能性を想像させるが証明はされていない。

我々の目的は Dystrophin の中枢神経系における役割を見出すことであり、そのために Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスを用い、動物行動学的・電気生理学的・免疫組織化学的検討を行った。動物行動学的には①記憶学習機能、②運動協調性、③情動性について異常の有無を検討した。電気生理学的には海馬 CA1 野シナプス可塑性について重点的に検討を加えた。また免疫組織化学的には特に動物の情動性に重要とされる扁桃体における Dystrophin の発現を検討した。

## 【方 法】

**動物：**変異型アリルを持つ♂とその同腹兄弟の野生型♂を交配により作出し比較検討に用いた。免疫組織化学を除く全ての実験は遺伝型に対してブラインドで行い、実験終了後 PCR 法で遺伝型の判定を行った<sup>3)</sup>。一部の個体については前脛骨筋の切片観察（中心核の存在）、血中 CK 値の測定も行い遺伝型を確認した。

**動物行動：**全ての動物行動実験には♂マウスを用い、試験1週間前までは同腹兄弟と同一ケージで飼育した。試験1週間前から1ケージに1匹ずつ個別飼育した。

**①記憶学習機能試験：**1 試行受動的回避試験 (One-trial passive avoidance test) を行った。試験1日目には明暗箱 (室町器械製) への馴化を5分間行った。2日目にマウスを明室に入れ暗室に移動するまでの時間を測定すると共に、暗室に移動直後に電気刺激 (0.3 mA, 3秒) を加えた。3日目に再びマウスを明室に入れ、暗室に移動するまでの時間を測定した。

**②運動協調性：**ロータロッド試験を行った。ロッドの回転速度は初速 3 rpm で終速 30 rpm まで5分間で直線的に加速した。試行を1日に1回3日連続して行った。小原医科産業製の装置を用いた。

**③情動性：**新奇環境に対する情動応答を検討する目的でオープンフィールド試験を行った。マウスを 50 cm 四方のフィールドに放し水平方向の自発運動量をコンピュータにより画像解析して測定した (小原医科産業製)。フィールドは白色で、フィールド面の照度は約 80 ルックスであった。テストにはこのフィールドが全く未経験のマウスを用いた。

**電気生理：**マウス脳 (2~3ヶ月齢、ただし LTD の検討においては1ヶ月齢) から海馬を摘出し切片とした後、CA1 野から field excitatory post-synaptic potential (fEPSP) を記録した。この後、入力繊維をテタヌス刺激 (100 Hz, 1秒) することにより Long term potentiation (LTP) を、低頻度刺激 (1 Hz, 15分) することにより Long term

\*国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部  
\*\*独立行政法人理化学研究所 先端技術開発グループ



depression (LTD) を、テタヌス刺激後 10 分経過時点で低頻度刺激することにより Depotentialization を誘起した。Depotentialization は、テタヌス刺激により増強されたシナプス伝達が、同一シナプスに再度印加された低頻度刺激により増強前のレベルにまで抑制される現象であり、記憶学習過程での有意義性が指摘されている。免疫組織化学：マウスを麻酔後、心臓から PBS を灌流し除血した。脳を摘出・凍結し厚さ 20mm のコ罗纳ールセクションを作成、定法に従い免疫染色を行った。1 次抗体にはマウス抗 Dystrophin 抗体 (CHEMICON 社 MAB1692) を用い、その検出には TSA キット (Molecular Probes 社) を用いた。核染色は PI で行った。

### 【結果と考察】

#### 動物行動：

① 1 試行受動的回避試験：この実験に用いたマウスは両遺伝型とも 13 匹 (88-103 日齢) であった。試験の成績は野生型と変異型マウスで有意な差がなかった (図 1-A, 値は平均値 + 標準誤差)。既報によれば、♀を用いた場合、mdx マウスは B10 マウスに比べ受動的回避試験の成績が低いことが知られている<sup>4)</sup>。今回♂マウスでは差異が見られなかったことから、mdx マウスにおいては記憶学習能力の異常に性差が存在する可能性もある。

② ロータロッド試験：この実験に用いたマウスは野生型 8 匹 (体重 28.7+0.8 g), 変異型 15 匹 (27.8+0.6 g) であった (71-94 日齢)。野生型と変異型マウスで試験の成績に差は見られなかった (図 1-B, 値は平均値 + 標準誤差)。従って今回使用した mdx マウスでは運動協調性の異常による運動機能障害は検出できなかった。

③ オープンフィールド試験：この実験に用いたマウスは野生型 24 匹, 変異型 22 匹 (71-100 日齢) であった。試験における自発運動量の時間経過は野生型と変異型マウスで顕著な差異が見出された (図 2, 値は平均値 + 標準誤差)。すなわち、野生型マウスは試験開始直後に最も高い自発運動性を示し時間と共に減衰一定化したのに対し、変異型では多くの個体でこの自発運動量の亢進が弱い、あるいは全く見られなかった。統計的にも、野生型では 0-3 分の自発運動量は 3-6 分の値より有意 (図 2 参照) に高いのに対し、変異型では平均値に殆ど差がなかった。また、0-3 分における自発運動量は野生型と比べ変異型で有意に低かった ( $p = 0.0004$ , t-test)。更に、繰り返し測定 ANOVA を用いて分析すると、0-3 分と 3-6 分の値の変動は遺伝型により有意な差のあることが見出された (図 2 参照)。本試験初期における自発運動量の亢進はマウスの情動性を強く反映するこ

とが広く知られている。従って、mdx マウスは新奇環境に対する情動応答が野生型と異なる可能性が示唆された。具体的には新奇環境に対する探索行動の減少とすみ行動と思われる運動の停止が顕著であった。特にフィールド導入直後の 1 分間においては、変異型では 22 匹中 8 匹 (36.4%) において運動停止が極めて顕著であった。野生型ではこのような顕著な運動停止は見られなかった。この運動停止は②で運動機能障害が見いだせなかった点を考え合わせると中枢性である可能性が高く、新奇環境への順応性の低下又は不安の亢進等が考えられる。

#### 電気生理：

海馬 CA1 野の Shaffer 側枝-錐体細胞間シナプスの出力関係、Paired-pulse facilitation の程度、シナプス可塑性 (LTP, LTD, Depotentialization) の程度は野生型マウスと変異型マウスで全く差がなかった (LTP:  $n = 8$ , LTD:  $n = 6$ , Depotentialization:  $n = 9$ )。また、その可塑性形成の初期過程も、LTP, LTD では全く差がなかったが、Depotentialization では有意な差が見出された。すなわち、低頻度刺激後 5 分まで変異型マウスにおいて有意 ( $p < 0.05$ ) 強いシナプス伝達の抑制が観察された。しかしその差は顕著ではなく極く小さいものであった。LTP に関しては既に他の研究者により mdx マウスを B10 マウスと比べた場合全く差がないことが報告されており<sup>5)</sup>、今回の結果はこれと一致する。

#### 免疫組織化学：

行動実験の結果を受け、情動性に中心的な役割を果たす脳領域である扁桃体における Dystrophin の分布を検討した。図 3 に示すように、野生型マウスでは Lateral-Basolateral amygdala に抗 Dystrophin 抗体の強いシグナルが観察された。一方、mdx では当該領域に殆どシグナルを見いだせなかったことから、野生型で見られたシグナルは mdx で欠損する 427 kD の脳型 Dystrophin に由来するものと思われた。扁桃体以外の脳部位では、海馬 CA1-CA3 野、皮質が強く染色されたのに対し、海馬歯状回、脳幹は殆ど陰性であった。この染色パターンは既報と良く一致する<sup>6)</sup>。高倍率で観察すると、Basolateral amygdala におけるシグナルは比較的大きな細胞の細胞体細胞膜付近や樹状突起と思われる構造に見られた (データ図示せず)。Lateral-Basolateral amygdala は情動性の発現に極めて重要な部位として知られており、この核における Dystrophin の発現は行動解析による情動性異常という結果と少なくとも矛盾はしない。

### 【結 論】

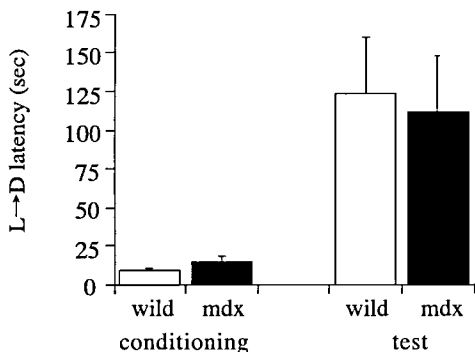
mdx マウスで欠損している脳型 427 kD Dystrophin の

機能の一つとして情動性への関与が示唆された。その関与のメカニズムはこれからの研究課題であるが、Lateral-Basolateral amygdalaにおけるDystrophinの分布はこの脳部位の情動性への関与の高さを考えると興味深い。この脳部位に存在する錐体細胞へのGABAニューロンからの入力についてはmdxマウスにおける詳細な検討が必要と思われる。一方、本研究ではDystrophinの記憶学習やシナプス可塑性への関与は見出すことが出来なかった。この点はこれまでの報告と一致する部分が多い<sup>5)</sup>。以上の結果はDystrophinの中枢における役割について新たな可能性を示唆すると共に、mdxマウスがDuchenne型筋ジストロフィーに併発する中枢症状のうち新奇環境への順応の低下や高い不安レベル等を示す症例<sup>7)</sup>に対して病態モデルとなる可能性も示唆すると考える。

【参考文献】

- 1) Levi S, et al: Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* **22**: 4274-4285, 2002.
- 2) Knuesel I, et al: Altered synaptic clustering of GABA<sub>A</sub> receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci* **11**: 4457-4462, 1999.
- 3) Amalfitano A, Chamberkain J S: The mdx-amplification-resistant mutation system assay, a simple and rapid polymerase chain reaction-based detection of the mdx allele. *Muscle Nerve* **19**: 1549-1553, 1996.
- 4) Muntoni F, Mateddu A, Serra G: Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders* **1**: 121-123, 1991.
- 5) Sesay A K, et al: Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. *Neurosci Lett* **211**: 207-210, 1996.
- 6) Lidov, HG, Byers, T.J. and Kunkel, L.M. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunohistochemical study. *Neuroscience* **54**: 167-187, 1993.
- 7) Roccella M, Pace R, De Gregorio M T: Psychopathological assessment in children affected by Duchenne de Boulogne muscular dystrophy, *Minerva Pediatr* **55**: 267-276, 2003.

A One-trial passive avoidance test



B Rota-rod test

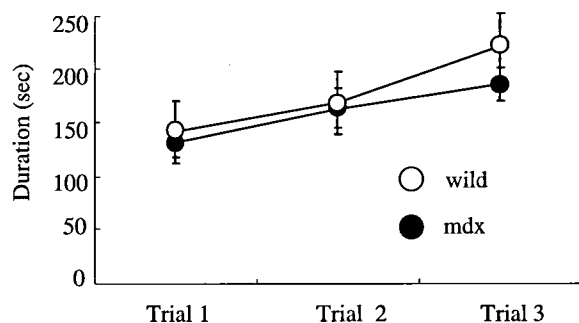


図1 Comparison of the results of one-trial passive avoidance and rota-rod tests between male wild and mdx mice. No significant differences were observed.

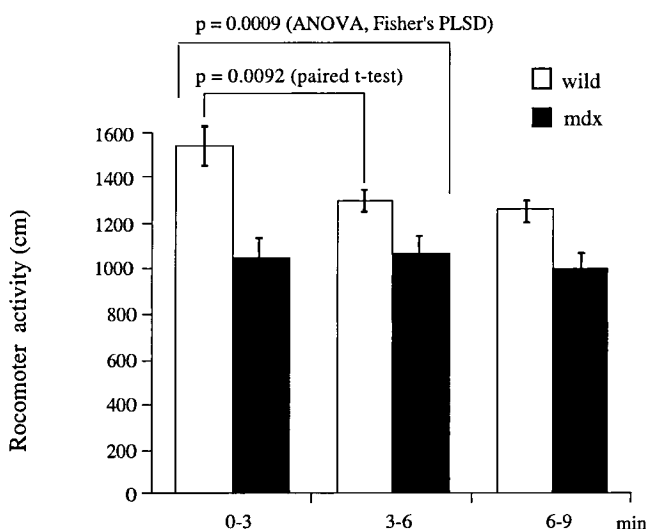


図2 Absence of initial augmentation of the rocomoter activity in mdx mice in an open-field test.



# 実験動物としての筋ジストロフィー犬の研究 —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—

谷 岡 功 邦\*

研究協力者 島津 美樹\*\*, 五十嵐 真一\*\*\*, 名倉 政雄\*\*\*

## 【緒 言】

我々は、1998年に、筋ジストロフィー犬凍結精子由来となる第一世代に当たる保因犬2頭を作出し、翌1999年には、初めて筋ジストロフィー犬（以下、患犬）を得ることに成功した。さらなる患犬作出を繰り返すことで、日本における筋ジストロフィー犬コロニーを確立した<sup>1)</sup>。

筋ジストロフィー犬コロニー維持のためには、生殖工学技術は必要不可欠である。しかし、犬は、単発情動物であり発情周期が非常に長い<sup>2)</sup>、未成熟な段階で卵子が排卵され成熟後に精子を受け入れる<sup>3)4)5)6)</sup>等の特性を有することから、生殖工学技術の確立が立ち後れているといわざるを得ない。

今回、患犬精子の凍結-融解後の受精能力と正常犬（ビーグル）を用いた発情誘起法について検討を行ったので報告する。

## 【方 法】

### 1. 患犬精子の凍結-融解後の受精能力

12ヵ月齢と18ヵ月齢の患犬1頭ずつの射出精液を用手法により採取し、既報<sup>7)8)</sup>に従い精子の凍結保存を行った。融解後の受精能力を検討するために、2頭の精子を5頭ずつ計10頭のビーグルに授精させた。人工授精

法は既報<sup>7)</sup>に従った。

### 2. 発情開始後の日数と発情誘起

繁殖に供さず発情開始から129 ± 1.95日目及び160 ± 6.20日目に当たるビーグル5頭ずつ計10頭を用いた。血中プロゲステロン濃度をオプチェック血液用EIAキットにより測定し<sup>9)</sup>、1 ng/ml以下の数値であることを確認した後、カベルゴリン（カバザール<sup>®</sup>、キッセイ薬品工業株式会社）処理を施した。5 µg/kg量のカベルゴリンを1日1回、最長42日間経口投与を継続し、外陰部からの出血の有無を確認した。発情出血が認められた場合、繁殖能力の明確な雄ビーグルとの自然交配により繁殖能力を検討した<sup>7)</sup>。

### 3. 妊娠・分娩後の日数と発情誘起

発情開始から161 ± 6.42日目に当たるビーグル10頭（繁殖に供さなかった個体5頭及び妊娠・分娩後の個体5頭）を用いた。既述に従い、発情誘起、繁殖能力について検討した。

## 【結 果】

患犬2頭の凍結-融解精子を用いた人工授精の成績は、それぞれ5例中4例ずつの分娩に成功し、産子数は5.0 ± 1.41及び6.0 ± 0.82であった（表1）。

表1 Fertilizing ability of frozen-thawed spermatozoa from two dogs affected with X-linked muscular dystrophy

Animal no.	No. of beagles whelped / inseminated	Litter size*
C04	4 / 5	5.0 ± 1.41
C12	4 / 5	6.0 ± 0.82

\*Values are mean ± SD.

\* (財) 実験動物中央研究所

\*\* 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, (株) 中外医科学研究所

\*\*\* (株) 中外医科学研究所

表2 Relationship between days after last estrus and induction of estrus by cabergoline (5 µg/kg) treatment

Days after last estrus	Treatment period (days)	No. of beagles induced estrus / treated	Litter size
129 ± 1.95*	30 - 42	2 / 5	4, 6
160 ± 6.20*	14 - 42	4 / 5	6.5 ± 1.29*

\*Values are mean ± SD.

表3 Relationship between whelping at last estrus and induction of estrus by cabergoline (5 µg/kg) treatment

Whelping at last estrus	Treatment period (days)*	No. of beagles induced estrus / treated	Litter size
No	14 - 42	4 / 5	6.3 ± 1.50**
Yes	18 - 42	2 / 5	2, 6

\* Cabergoline treatment started at 161 ± 6.42 (mean ± SD) days after last estrus.

\*\*Value is mean ± SD.

発情開始後の日数と発情誘起に関して検討したところ、130日目前後のビーグル5例中2例の発情誘起に成功し、産子数は4及び6を示した。160日目前後の時期では、5例中4例の発情が誘起され、6.5 ± 1.29頭の産子を得た(表2)。

妊娠・分娩後の日数と発情誘起に関する検討では、繁殖に供さず発情開始後160日目前後のビーグル5例中4例の発情誘起に成功し、産子数は6.3 ± 1.50であった。一方、妊娠・分娩後の個体では、5例中2例の発情が誘起され、それぞれ2頭、6頭ずつの産子を得た(表3)。

### 【考 察】

患犬の凍結-融解精子による人工授精の成績は、ビーグル精子を用いた場合<sup>7)8)</sup>と同様であった。このような結果から、患犬精子の凍結保存が可能となった。

一方、発情誘起法については、発情開始後160日目前後に当たるビーグルの方が130日目前後の場合に比較して高率に誘起できることがわかった。さらに、繁殖に供さず妊娠・分娩後からの日数が長い個体であるほど高い誘起率を示した。なお、誘起発情時の繁殖能力に問題は生じなかったことから<sup>7)</sup>、カベルゴリンを用いた発情誘起法は有用であることが示唆された。

筋ジストロフィー犬コロニー維持のためには、患犬

精子の凍結保存は有用な技術である。さらに、正常犬(ビーグル)における高率な発情誘起法は保因犬の発情コントロールに利用可能な手法となりうる。本研究により、これら生殖工学技術を確立することができた。

### 【結 論】

患犬精子の凍結保存が可能となった。さらに、正常犬(ビーグル)における高率な発情誘起に成功し、保因犬の発情コントロールに有用な手法を確立した。これら生殖工学技術は、筋ジストロフィー犬コロニー維持のために必須なものである。

### 【参考文献】

- 1) Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, et al: Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD). *Exp Anim* 52: 93-7, 2003.
- 2) Andersen AC. Reproduction: In Andersen AC (eds.), *The Beagle as an Experimental Dog*. Ames, The Iowa State University Press: 31-39, 1970.
- 3) Holst PA, Phemister RD: The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol Reprod* 5: 194-206, 1971.
- 4) Phemister RD, Holst PA, Spano JS, et al: Time of

- ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* **8**: 74-82, 1973.
- 5) Tsutsui T: Studies on the reproduction in the dog. V. on cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn Anim Reprod* **21**: 70-5, 1975 (In Japanese).
  - 6) Van der Stricht O: Etude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse, d'après les travaux du Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Gand. *Arch Biol* **33**: 229-300, 1923.
  - 7) Shimatsu Y, Katagiri K, Arakawa H, et al: Fertilities from mating and artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa by indexing LH surge in beagle bitches. *J Reprod Dev* **46**: 315-8, 2000.
  - 8) Shimatsu Y, Yuzawa H, Aruga K, et al: Artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in dogs. *Vet Rec* **153**: 369, 2003.
  - 9) Eckersall PD, Harvey MJA: The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, ovine and canine plasmas. *Vet Rec* **120**: 5-8, 1987.

# 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

高橋 明 男\*

研究協力者 安蔵 友美\*\*、下屋 真弓\*\*、植竹 勝治\*\*、田中 智夫\*\*  
浦澤 延幸\*、湯浅 勝敏\*\*\*、島津 美樹\*\*\*、武田 伸一\*\*\*

## I. 筋ジストロフィー犬における定量的行動解析の検討

### 【緒 言】

筋ジストロフィーモデル犬（筋ジス犬）はヒトにおける Duchenne 型筋ジストロフィーと酷似した症状発現及び病態進行を示す優れたモデル動物<sup>1)2)</sup>であることから、従来マウスを主なモデル動物として行われてきた Duchenne 型筋ジストロフィー研究<sup>3)4)5)</sup>をさらに治療研究応用へと進展させる上で、その有用性について期待が高い。そこで、筋ジス犬における非侵襲的な病態解析ならびに治療効果評価方法として定量的行動解析手法の応用を試みた。また一方、筋ジス犬においては全身的な筋障害の進行が、高次脳機能である精神活動へも影響を及ぼすと考えられることから、精神活動が加味された演出型表現形解析手法としての観点からも、定量的行動解析手法の応用を検討した。

### 【方 法】

国立精神・神経センター 神経研究所 中型実験動物研究施設（以下、中型施設）で飼育<sup>3)</sup>されている14ヶ月齢同腹の筋ジス犬♂1頭と正常犬♂2頭さらに同月齢異腹の筋ジス犬1頭、合計4頭を選抜し、筋ジス犬2頭を実験群、正常犬2頭を対照群とした。なお、正常犬とは、筋ジス犬繁殖コロニーにおいて、発症しない（X染色体上のジストロフィン遺伝子異常を保有しない）♂犬と、同様に発症を見ないキャリア♀犬との交配で生まれる同一コロニー内の未発症♂個体である。

行動データ採取期間中は周辺環境の均一化を図る目的で、全ての対象犬を同一飼育室内において同型の犬用ケージ（W960×D1652×H1570mm、ステンレス製）による単独飼育とした。また、他の犬の行動から受ける視覚誘発刺激を回避するため、相互に他の犬が視野に入らないようケージ位置を選択した。飼育環境は中型施設での標準的環境であり、12時間明暗サイクル（7

時点灯・19時消灯）及び設置温度20－22℃、設定湿度50－60%をそのまま適用した。給水は自動給水装置からの自由摂取、また給餌は9時から10時の間で1日1回とした。

上記環境において対象犬の行動画像を各ケージ対面斜め上方に個別に取り付けた4台の無線ビデオカメラで同時撮影し、別室に設置した受信機に接続されたタイムラプス・ビデオレコーダーへその画像を記録した。画像記録は24時間連続撮影とし、筋ジス犬では22日間、正常犬では11日間の連続記録を行った。

初めに正常犬及び筋ジス犬全ての個体のビデオ記録から、記録期間中に発現する全ての行動を抽出することで定量的解析の基盤となる行動カテゴリを作製した。次に記録開始1, 5, 10日目の3日間＝72時間分の画像データについて行動カテゴリに基づく目視定量化により、各対象犬毎に1時間当りの生起回数及び持続時間を算出した。さらに算出した行動カテゴリ毎の生起回数及び持続時間の24時間集計値から1日当りの平均を求め、これをそれぞれ平均総生起回数（Bout）ならびに平均総持続時間（Duration）とした。最終的に、正常犬と筋ジス犬の間で定量的な行動比較を行うため、Non-Parametric 検定法による統計解析をこれら定量化データに対して適用した。即ち、行動カテゴリ毎の Bout 及び Duration に対し、有意差の有無のみを検出する Kruskal-Wallis 一元配置解析を施し、有意差を内含する行動カテゴリを検出し、有意差を内含すると検定された行動カテゴリに対し Steel 多重比較を用いて正常犬2頭の平均定量化データと各筋ジス犬間での有意差検定を行った。

### 【結 果】

1. 行動カテゴリの作製：全頭全期間のビデオ画像を基に、表1に示す新規な筋ジス犬行動解析用カテゴリを作製した。筋ジス犬特有の行動カテゴリとして、嘔吐及び身震いを含むことが今回樹立した行動カテゴリの

\*国立精神・神経センター 神経研究所 実験動物管理室  
\*\*麻布大学 動物応用科学科 動物行動管理学研究室  
\*\*\*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

特徴であった。

2. Kruskal-Wallis 一元配置解析により四足立位、二足立位、犬座位、休息、摂食、排泄様行動、嘔吐、ジャンプ、発声、移動、Oral Grooming が有意差を内含することが検出された (表1)。

3. 有意差を内含する各行動カテゴリに対し Steel 多重比較を適用することで、対照群 (正常犬平均化データ) と各筋ジス犬における定量化データとの間で、表2に示すような有意差を検出した。

4. 暗期 (夜間) と比較し、明期 (昼間) において有意差を示す行動カテゴリが多く認められた。

姿勢	四足立位* 二足立位* 犬座位* 伏臥位・横臥位 仰臥位 中間姿勢	四肢での立位 後肢での立位 前肢を立てた状態での座位 ケージ底面に腹部・体側部を着けて横たわった姿勢 ケージ底面に背部を着けて横たわった姿勢 その他の姿勢または移行姿勢
行動形	休息* 摂食* 飲水 排泄前駆行動 排便 排泄様行動* 嘔吐* 探索 ジャンプ* 発声* 移動* 身震い 伸び・あくび Oral Grooming (OG)* Non-oral Grooming (NOG)*	一定の姿勢で不動化し、他の行動が観察されない状態 給餌器から顔をくわえる、咀嚼する、嚥下する ノップルの先端をくわえて吸う、給水皿から飲水する 排泄前に床面を嗅ぎながら、せわしなく周囲する 糞塊が確認できる排泄行動 糞塊が確認できない排泄行動及び排尿様行動 口から胃内容物を吐出する行動 他の物体を探るような行動及び他の物体への接触等 主に後肢での躊躇 開口し発声を確認できる状態 特定の目標がなく歩行等を行う状態 身体や頭を振る行動 頸部や体幹を意識的に伸展する。あくびをする 口・舌を使い、身体を舐める、噛む及び嗅ぐ行動 他の物体に身体を擦り付ける及び四肢で身体を掻く

表1 筋ジス犬行動解析用行動カテゴリ及び Kruskal-Wallis 一元配置解析結果  
\*: Kruskal-Wallis 一元配置解析により検出された有意差を内含するカテゴリ (P<0.05) を示す。

		明期		暗期	
		D02	D10	D02	D10
四足立位	Bout	↓	↓		
	Duration				
二足立位	Bout			↓	↓
	Duration				
犬座位	Bout				
	Duration			↑	↑
休息	Bout				
	Duration	↑			
摂食	Bout	↑	↑		
	Duration		↑		
排泄関連	Bout	↓	↑		
	Duration				
嘔吐	Bout	↑	↑		
	Duration	↑	↑		
探索	Bout	↓	↓	↓	↓
	Duration			↑	↑
ジャンプ	Bout	↓	↓		
	Duration				
発声	Bout	↓	↓		
	Duration				
移動	Bout	↓	↓		
	Duration				
伸び・あくび	Bout				↓
	Duration				
OG	Bout	↓	↓		
	Duration				
NOG	Bout	↑	↓		
	Duration	↑	↓		

表2 Steel 多重解析結果  
D02及びD10は筋ジス犬の個体番号。Kruskal-Wallis 一元配置解析で有意差を内含すると検定されたカテゴリに対する Steel 多重解析を用いた2次解析結果を示す。正常犬の平均定量化データに対する有意な増加 (↑, P<0.05) 及び有意な減少 (↓, P<0.05) を示す。

【考察】

今回の定量的行動解析結果において示された筋ジス犬の行動の特徴は次の3点であると考えられた。第一に、全身性特に四肢における筋力低下が原因と推定される抗重力姿勢、即ち立位の減少である。これは、重力に逆らう姿勢を維持するために必要とされる持続的な筋緊張において、筋ジス犬ではその生理学的な筋の張力低下が速やかに低下する器質的な原因のほか、疲労感が急速に意識レベルにあがる可能性も考えられた。第二に、筋ジス犬において特異的な病態であることが報告されている巨舌を原因とする嚥下障害を反映すると考えられた摂食の生起回数の上昇と持続時間の延長である。これは一定量の飼料を全て摂食しようとした時に、1口での摂取量が少ないにも関わらず、その咀嚼から嚥下までに費やす時間が延長していることを示しており、咀嚼筋、舌、喉咽頭構成筋、さらには食道構成筋における機能低下を示唆している。第三には探索行動の低下・短縮に代表される自発行動の低下である。これも全身性の筋力低下による直接的な影響が大きいと考えられるが、人の入室により誘発される行動や強制歩行などは可能な状態で自発的な行動が低下することは、行動や運動により引起されると推測される疲労感や不快感の発生及びそれらが行動することにより引起されることを学習した結果としての、意識的な行動回避の現われとも推測される。

【結論】

今回、筋ジス犬の病態を解析するために検討を行った定量的行動解析手法は、これまで報告されている筋ジス犬の病態を良好に反映するものであったことから、今後、筋ジストロフィーの病態進行ならびに治療効果の判定において、客観的な評価手法として有用であることを明らかにした。示された。また、器質的な障害を反映するだけではなく、それらが原因となって発現すると考えられる精神活動を加味した演出型表現形の解析手法としても応用可能であることが示された。今後はさらに解析例数を増やすとともに、器質学的な病態解析との相互比較により病態解析手法としての精度向上ならびに演出型表現形の評価手法としての確立に努める。

【参考文献】

- 1) Kornegay Jn, Tuler SM, Miller DM, et al: Muscular Dystrophy in a Litter of Golden Retriever Dogs. *Muscle Nerve* 11: 1056-64, 1988.



- 2) Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, et al: Canine X-linked Muscular Dystrophy. An Animal Model of Duchenne Muscular Dystrophy: Clinical Studies. *J Neurol Sci* **88**: 69-81, 1988.
- 3) Grady RM, Teng H, Nicol MC, et al: Skeletal and Cardiac Myopathies in Mice Lacking Utrophin and Dystrophin: A Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell* **90**: 729-38, 1977.
- 4) Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, et al: X-Chromosome-Linked muscular (max) in the Mouse. *Proc Nat Acad Sci* **81**: 1189-92, 1984.
- 5) Stedman HH: The mdx Mouse Diaphragm Reproduced the Degenerative Change of Duchenne Muscular Dystrophy. *Nature* **352**: 536-9, 1991
- 6) Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, et al: Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan (CXMD). *Exp Anim* **52**: 93-7, 2003.

## II. 筋ジストロフィー犬における心筋障害の分子病理学的検討

### 【緒言】

筋ジストロフィーの中で、最も頻度が高くしかも重症な経過を辿る Duchenne 型筋ジストロフィー（以下、DMD）はジストロフィン遺伝子の異常に伴って、筋形質膜直下の細胞骨格蛋白質ジストロフィンの発現を欠損することにより、進行性の筋萎縮と筋力低下を示す X 連鎖性劣性の遺伝性疾患である。DMD では、全身の骨格筋、心筋の障害から重篤な呼吸不全、心不全を生ずるが、近年の呼吸筋障害に対する治療の進歩により、寿命が延長する傾向にある。代わって心不全が死因の第一位を占め、ジストロフィン欠損における心筋障害が注目されつつある。

DMD の心障害の特徴として心電図上の深く先鋭な異常 Q 波および左室後壁を中心とした心筋組織の線維化が挙げられる<sup>1)</sup>。DMD における異常 Q 波は 1952 年に Rubin と Buchberg によって指摘され、その後の多くの研究者によって DMD の実に 65-80% に認められる普遍的な現象であることが確認されている<sup>2) 3) 4)</sup>。この異常 Q 波は左室後壁の線維化による起電力の低下に起因すると考えられているが<sup>5) 6)</sup>、正確な機序は明らかにされていない。また、異常 Q 波の他にも様々な不整脈、伝導障害が指摘され、死因の 12% は突然死であるとの報告がありながら<sup>7)</sup>、ジストロフィン欠損における刺激伝導系の障害について詳細な検討を行った報告は皆無と言って良い。

我々はゴールデンレトリバー種に見出された DMD と同様にジストロフィンを欠損する筋ジストロフィー犬の凍結精子を用いて人工授精を行うことにより、ビーグル種の筋ジストロフィー犬（以下、筋ジス犬）コロニーを確立した<sup>8)</sup>。この大型のモデル動物は従来のマウスモデルに比べ、よりヒトに近い表現型を呈し、ヒトと同等の生理学的検査も可能である。我々は若齢筋ジス犬の臨床経過を観察する過程で、心エコー上は作業心筋の障害が非較的軽度であるにも拘らず、早期から心電図上異常 Q 波を呈すること、しかも少数ではあるが運動誘発性の突然死を呈する個体が存在することを見出した。そこでジストロフィン欠損における異常 Q 波、心臓突然死の発生機序に対し刺激伝導系の障害に注目し検討を行った。

### 【方法】

#### 1. 材料

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で維持されている筋ジス犬コロニーの中から

ら筋ジス犬13頭、正常対照犬9頭（ともに1-15ヶ月齢）を対象とし、国立精神・神経センター中型動物実験倫理問題検討委員会の規定に則し、心電図および心エコー解析施行後1週間以内にバルビタールの静脈内投与による深麻酔を施しNecropsyを施行した。

## 2. 組織学的解析

心臓をホルマリン固定後、洞結節を含む右心房、房室結節およびHis束を切り出し、Purkinje線維を含む左心室は基底部、乳頭筋レベル、心尖部の三層に横断面で全割した。大割組織片は通常のパラフィン切片作製後、10µmに薄切しヘマトキシリン/エオシン（H&E）で染色した。さらに4ヶ月齢の筋ジス犬、正常対照犬各1頭では一部の左心室で電顕固定を行い、エボン包埋後に超薄切片を作製し酢酸ウラン、クエン酸鉛による電子染色を施した後、H-7000 transmission electron microscopy (Hitachi) を用いて観察した。

## 3. 免疫組織化学染色

左心室の一部から凍結標本を作製し横断切片（7µm）をスライドガラス上に準備し、乾燥後にアセトン固定した。一次抗体としてジストロフィンに対するマウスモノクローナル抗体であるMANEX1A（筋型ジストロフィン amino acid (aa) 3-10を認識、North East Wales Institute G.E. Morris 博士からの供与）<sup>9)</sup>、NCL-DYSB（aa 321-494, Novocastra）、F22.9C5（aa 1840-2266, Alexis）、NCL-DYS2（aa 3669-3685, Novocastra）、 $\alpha$ -、 $\beta$ -ジストログリカン、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -サルコグリカンに対するマウスモノクローナル抗体であるVIA4-1（Upstate）、NCL- $\beta$ -DG、NCL- $\beta$ -SG、NCL- $\gamma$ -SG（Novocastra）、DSG-1（国立精神・神経センター神経研究所 今村博士からの供与）<sup>10)</sup>、 $\alpha$ -サルコグリカン、ユートロフィン、 $\mu$ -カルパインに対するウサギポリクローナル抗体である $\alpha$ -SG2、UT-2（今村博士からの供与）<sup>11) 12)</sup>、anti-calpain 1 large subunit domain IV（Sigma-aldrich）を反応させ、ヤギFITC標識抗マウスまたは抗ウサギIgG抗体（Molecular probes）を用いて検出した。シグナルはconfocal laser scanning microscopy TCS SP<sup>TM</sup>（Leica）を用いて記録した。

## 4. ウェスタン・ブロット解析

左心室の凍結標本をスライドガラス上に薄切し（15µm）エタノール/キシレンによる脱水処理を施した後、laser capture microdissection法によりLM200（Arcturus）を用いてCapSure<sup>TM</sup> Macro LCM Caps（Arcturus）上に作業心筋とPurkinje線維を分離し採取した。得られた検体からサンプルバッファー（10%SDS、70mM Tris-HCl、pH 6.8、5% 2-mercaptoethanol、10mM EDTA）によって蛋白質を抽出し、9% SDS-PAGEで分離、PVDF膜（Immobilon；Milipore）にエレクトロ・トランスファーさせた。蛋白

量はミオシン重鎖の染色により調整した。ジストロフィン、ユートロフィン、 $\alpha$ -サルコグリカン、 $\mu$ -カルパインに対する抗体（それぞれDYS2、UT-2、 $\alpha$ -SG2、anti-calpain 1 large subunit domain IV）と反応させた後、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体（Bio-Rad）または抗ウサギIgG抗体（Jackson）とECL plus Western Blotting detection system（Amersham）で検出した。

## 【結果】

### 1. 若齢筋ジス犬ではPurkinje線維の選択的空胞変性を生じる

対象とした全ての筋ジス犬で心電図上異常Q波を認めたにも拘らず、H&E染色による病理組織学的検討では、ほとんどの個体で作業心筋の変性所見は認めなかった。最高齢となる15ヶ月齢の1頭でのみ心室中隔から左室後壁にかけ小線維化巣が散在していた。刺激伝導系では房室結節とHis束に硝子化を認めた1頭を除き、洞結節からHis束まで変性所見は認められなかった。一方でPurkinje線維では全頭で辺縁不整なおびただしい空胞が観察された。このことはジストロフィン欠損の病初期にPurkinje線維の選択的変性を生じていることを示す（表1、図1）。

透過型電子顕微鏡では、筋ジス犬のPurkinje線維で筋原線維の断裂、崩壊が顕著であり、筋原線維が消失し残骸のみとなった部位が光顕上空胞として観察されることが示唆された（data not shown）。

表1 変性所見が認められた筋ジス犬の個体数（6-15ヶ月齢）

作業心筋		刺激伝導系			
右心房	左心室	洞結節	房室結節	His束	Purkinje線維
1/6	1/8	0/6	1/6	1/6	8/8

単位：頭

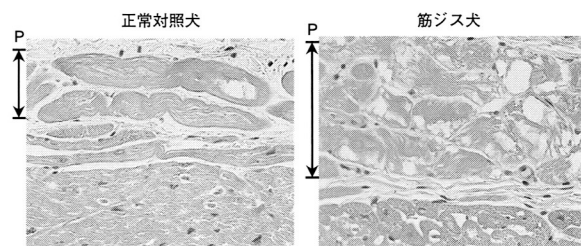


図1 正常対照犬（12ヶ月齢）および筋ジス犬（9ヶ月齢）の左室心筋心内膜側のH&E染色。P、Purkinje線維

## 2. 筋ジス犬 Purkinje 線維では形質膜直下および空胞内に $\mu$ -カルパインの発現が増加する

DMD のモデル動物である *mdx* マウスの骨格筋において  $\text{Ca}^{2+}$  依存性蛋白分解酵素である  $\mu$ -カルパインの発現増加および活性化が古くから知られている<sup>13)</sup>。そこで筋ジス犬 Purkinje 線維で観察される筋原線維の断裂、消失に対し  $\mu$ -カルパインの発現との関係を検討した。免疫組織化学染色では筋ジス犬 Purkinje 線維に局限して  $\mu$ -カルパインの発現増加が認められ、空胞を伴わない細胞では形質膜直下に (図 2A)、空胞を伴う細胞では空胞内に (図 2B) 局在性がみられた。ウエスタン・ブロット解析でも筋ジス犬 Purkinje 線維で  $\mu$ -カルパインの発現増加が確認された (図 2C)。

## 3. 筋ジス犬 Purkinje 線維の形質膜では全長型ジストロフィンが欠損し Dp71 が過剰発現する

筋ジス犬 Purkinje 線維に局限した  $\mu$ -カルパインの発現増加および空胞変性の背景を明らかにするため、ジストロフィン欠損との関係を検討した。エピトープの異なる抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学染色では、正常犬の作業心筋、Purkinje 線維では全ての抗体で染色性がみられたが、筋ジス犬の作業心筋では染色性はなく、Purkinje 線維では C 端を認識する抗体でのみ染色性された (図 3A)。この分子はジストロフィン C 端型アイソフォームと考えられ、さらにウエスタン・ブロット解析により確認した。結果、筋ジス犬では作業心筋、Purkinje 線維とも全長型ジストロフィンが欠損するが、Purkinje 線維でのみ Dp71 の過剰発現が見出された (図 3B)。

## 4. 筋ジス犬 Purkinje 線維ではユートロフィンが強く発現しジストロフィン結合糖蛋白質の発現も保持される

Dp71 の発現はジストロフィンのホモログであるユートロフィンの発現と競合することが予想され、筋ジス犬 Purkinje 線維におけるユートロフィンおよびジストロフィン結合糖蛋白質 (DAG) の発現状況を免疫組織化学染色およびウエスタン・ブロット解析にて検討した。筋ジス犬では作業心筋、Purkinje 線維ともユートロフィンの発現が増加し、特に Purkinje 線維では Dp71 の過剰発現にも拘らずユートロフィンはむしろ作業心筋より強く発現していた。また Dp71 やユートロフィンの発現に呼応して、DAG の一つである  $\alpha$ -サルコグリカンの発現は筋ジス犬 Purkinje 線維で保持されていた (図 4A, 4B)。他の  $\alpha$ -、 $\beta$ -ジストログリカン、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -サルコグリカンも同様の結果だった (*data not shown*)。

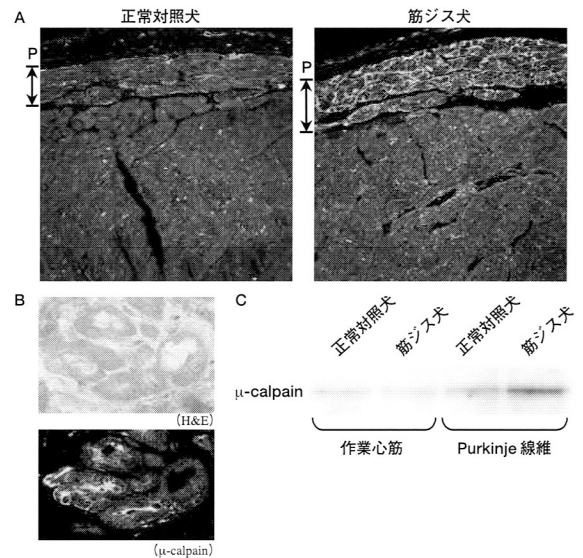


図 2 心筋組織における  $\mu$ -カルパインの発現  
正常対照犬および筋ジス犬 (ともに 4ヶ月齢) の作業心筋と Purkinje 線維の  $\mu$ -カルパインに対する抗体 (anti-calpain 1 large subunit domain IV) を用いた免疫組織化学染色 (A)、およびウエスタン・ブロット解析 (C)。(B) は筋ジス犬 (上記 A と同一個体) Purkinje 線維の空胞変性を伴う細胞の H&E 染色 (上段) および  $\mu$ -カルパインの免疫組織化学染色 (下段) を示す。P, Purkinje 線維

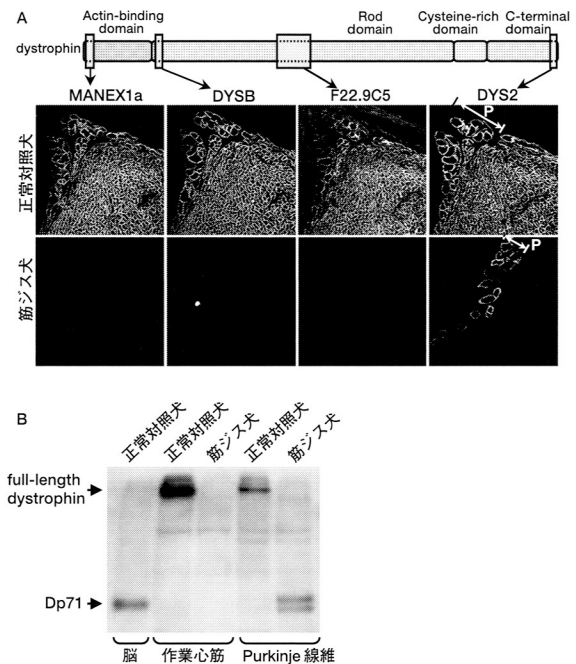


図 3 心筋組織におけるジストロフィンの発現  
(A) 正常対照犬および筋ジス犬 (ともに 4ヶ月齢) の作業心筋と Purkinje 線維のジストロフィンに対する抗体 (MAEX1a, NCL-DYSB, F22.9C5, NCL-DYS2) を用いた免疫組織化学染色。P, Purkinje 線維。上段のシェーマは完全長ジストロフィンおよびそれぞれの抗体が認識する部位を示す  
(B) 上記 A と同一個体の作業心筋および Purkinje 線維のジストロフィン C 端を認識する抗体 (NCL-DYS2) を用いたウエスタン・ブロット解析。脳は Dp71 の陽性コントロール

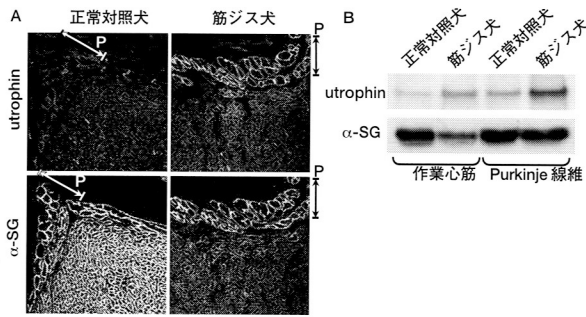


図4 心筋組織におけるユートロフィンおよびジストロフィン結合糖蛋白質の発現  
正常対照犬および筋ジス犬（ともに4ヶ月齢）の作業心筋とPurkinje線維のユートロフィン、 $\alpha$ -サルコグリカンに対する抗体（UT-2、 $\alpha$ -SG2）を用いた免疫組織化学染色（A），およびウエスタン・プロット解析（B）P、Purkinje線維

## 【考 察】

### 1. ジストロフィン欠損 Purkinje 線維における選択的空胞変性

我々は本研究によりジストロフィン欠損におけるPurkinje線維の特徴的な変化を報告した。正常Purkinje線維においても辺縁の整った空胞が若干観察されるが、筋ジス犬Purkinje線維の空胞は辺縁不整でかつ広範に及び進行性である。さらに超微構造では筋原線維の構造が崩壊している。以上から我々は筋ジス犬Purkinje線維にみられる空胞は変性であると結論した。

我々が知り得た範囲では、本研究はジストロフィン欠損の心臓において選択的にPurkinje線維が変性することを指摘した最初の報告である。Purkinje線維の空胞変性を指摘した報告は2報存在するが<sup>3) 14)</sup>、剖検例での検討であることから、作業心筋の線維化も顕著でPurkinje線維の選択的変性を指摘することは不可能であった。

今回見出されたジストロフィン欠損におけるPurkinje線維の選択的空胞変性は、若年DMD患者に対して、心不全を生ずる以前から、不整脈や伝導障害といった刺激伝導系の障害を慎重に観察する必要があることを示唆するものと考えられる。

### 2. Purkinje 線維の空胞変性と異常Q波

既にゴールデンレトリバー種の筋ジス犬で報告されている通り<sup>2)</sup>、今回対象とした筋ジス犬においても、DMDと同様の異常Q波が全頭で観察された。これまでの報告では異常Q波は左室後壁の線維化による起電力低下の鏡像と考えられてきたが<sup>5) 6)</sup>、今回の検討ではほとんどの個体で作業心筋の線維化が認められないにも拘らず異常Q波が観察された。この結果からdystrophin欠損における異常Q波が、Purkinje線維の選択的空胞変性に起因する可能性を検討する必要があると考えている。

### 3. 筋ジス犬 Purkinje 線維における空胞変性の分子機構

幼若筋ジス犬（1-4ヶ月齢）での経時変化を観察したところ、4ヶ月齢から空胞変性とDp71の過剰発現が観察され（data not shown）、 $\mu$ -カルパインの免疫染色でも4ヶ月齢から形質膜直下または空胞内に強い信号強度が得られた。蛋白量自体の増加は認められなかったことから、 $\mu$ -カルパインは4ヶ月齢でtranslocationを生じていると考えられる（data not shown）。

以上の結果およびDp71のトランスジェニックmdxマウスは筋変性が増強するという報告<sup>16)</sup>やmdxマウスの骨格筋では $\mu$ -カルパインが発現増加するとともに形質膜直下へのtranslocationによって活性化するという報告<sup>15)</sup>から、筋ジス犬Purkinje線維の空胞変性においてDp71の過剰発現および $\mu$ -カルパインのtranslocationが重要な役割を果たしていると考えられる。

更にユートロフィンが過剰発現するPurkinje線維が作業心筋より先に変性を生じることは、この変性がジストロフィン欠損による機械的抵抗の障害のみに起因するものではないことを示しており、ジストロフィン欠損またはDp71の過剰発現に由来するシグナル伝達の異常や $Ca^{2+}$ チャンネルの機能障害、 $\mu$ -カルパインによる膜蛋白質の修飾などが関与している可能性がある。今後、これらの問題を明らかにするためにPurkinje線維の培養細胞を用いたin vitroでの検討を進める必要がある。

## 【結 論】

我々はDMDのモデル動物である筋ジス犬の刺激伝導系障害を検討したことにより以下の知見を得た。

- 筋ジス犬の病初期の心臓ではPurkinje線維の選択的空胞変性が観察された。
- 筋ジス犬のPurkinje線維では完全長ジストロフィンが欠損する一方、Dp71とユートロフィンの過剰発現がみられジストロフィン結合糖蛋白質の発現は保持されていた。
- Dp71の過剰発現と $\mu$ -カルパインのtranslocationにより筋ジス犬Purkinje線維の選択的空胞変性を生じていることが示唆された。

## 【参考文献】

- Perloff JK, Moise NS, Stevenson WG, et al: Cardiac Electrophysiology in Duchenne Muscular Dystrophy: From Basic Science to Clinical Expression. *J Cardiovasc Electrophysiol* 3: 394-409, 1992.
- Sanyal SK, Johnson WW: Cardiac conduction abnormalities in children with Duchenne's progressive muscular dystrophy: electrocardiographic features and

- morphologic correlates. *Circulation* **66**: 853-63, 1982.
- 3) Perloff JK: Cardiac rhythm and conduction in Duchenne's muscular dystrophy: a prospective study of 20 patients. *J Am Coll Cardiol* **3**: 1263-8, 1984.
  - 4) Perloff JK, de Leon AC Jr, O'Doherty D: The cardiomyopathy of progressive muscular dystrophy. *Circulation* **33**: 625-48, 1966.
  - 5) Perloff JK, Roberts WC, de Leon AC Jr, O'Doherty D: The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. An electrocardiographic-pathologic correlative study. *Am J Med* **42**: 179-88, 1967.
  - 6) Sanyal SK, Johnson WW, Thapar MK, et al: An ultrastructural basis for electrocardiographic alterations associated with Duchenne's progressive muscular dystrophy. *Circulation* **57**: 1122-9, 1978.
  - 7) Yanagisawa A, Miyagawa M, Yotsukura M, et al: The prevalence and prognostic significance of arrhythmias in Duchenne type muscular dystrophy. *Am Heart J* **124**: 1244-50, 1992.
  - 8) Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, et al: Canine X-Linked Muscular Dystrophy in Japan (CXMD). *Exp Anim* **52**: 93-7, 2003.
  - 9) Le TT, Nguyen TM, Love DR, et al: Monoclonal antibodies against the muscle-specific N-terminus of dystrophin: characterization of dystrophin in a muscular dystrophy patient with a frameshift deletion of exons 3-7. *Am J Hum Genet* **53**: 131-9, 1993.
  - 10) Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, et al: Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 88-93, 1999.
  - 11) Imamura M, Ozawa E: Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6139-44, 1998.
  - 12) Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, et al: Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* **8**: 1589-98, 1999.
  - 13) Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG: Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* **270**: 10909-14, 1995.
  - 14) Nomura H, Hizawa K: Histopathological study of the conduction system of the heart in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Acta Pathol Jpn* **32**: 1027-33, 1982.
  - 15) Spencer MJ, Tidball JG: Calpain translocation during muscle fiber necrosis and regeneration in dystrophin-deficient mice. *Exp Cell Res* **226**: 264-72, 1996.
  - 16) Greenberg DS, Sunada Y, Campbell KP, et al: Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice. *Nat Genet* **8**: 340-4, 1994.

## V. 遺伝子医療に関する社会医学的研究

# 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 —2070名へのアンケート調査および31名への聞き取り調査の結果—

貝谷久宣\*

研究協力者 河端 静子\*, 福澤 利夫\*, 貝谷 嘉洋\*\*\*, 野村 忍\*\*, 陳 峻雯\*\*, 松尾 雅\*\*,  
今里 榮枝\*\*, 山崎 幸子\*\*, 山田 榮吉\*, 佐藤 隆雄\*, 榊枝 清吉\*, 名倉 由紀子\*,  
田口 智久\*, 藤井 康久\*, 山下 ヤス子\* 他, 大学院生\*\*\*

## 【緒言】

筋ジストロフィーの遺伝子治療の可能な日が着々と迫りつつある。この画期的な治療法が実現したときに生じる様々な倫理的および社会的問題について十分に認識を深め、この医療が円滑に社会に受け入れられるようにする必要がある。そのためにまず、被験者自身がこれらの問題について理解と自覚を高め、さらには、社会的啓発が必要である。このような目的で遺伝子医療に関するアンケート調査を患者・家族に行った。この結果を社会全体に広く情報発信することにより、遺伝子医療に関する社会全体のコンセンサスが得られ、ひいては遺伝子医療の円滑な実施が期待される。

本報告書においては、平成13年に施行した調査①および、平成15年度に実施した調査②についてまとめ、遺伝子治療の社会的啓蒙活動の一環として実施したシンポジウムの報告を行う。

## 【調査①】

2070名の筋ジストロフィー患者に対して遺伝子医療に関するアンケート調査を実施した。

## 【方法】

社団法人 日本筋ジストロフィー協会の会員である在宅患者・入所患者（各1797名、1645名）に対して平成13年秋にアンケート調査を実施した。質問項目の大部分は医学的・社会的・心理的な現状調査で、追加的に遺伝子医療に関する質問を加えた。アンケート用紙は在宅者と入所者にはそれぞれ異なったものが用意され、質問を始める前にアンケートの結果が協会の運営方針決定の重要な資料になることを記した。回答者は患者と限らず家族が回答することも認めた。

## 【結果】

アンケートの回収率は在宅者で56%（1106名）、入所者で67.2%（1007名）であった。回答者の平均年齢は在宅者36.1±16.4歳、入所者34.5±19.3歳であった。在宅者の最も多い年代は20代でこれが峰をなしていた。入所者の多い年代順は10代、20代、50代および40代で年代での差が比較的少なかった。診断されていた病名は、在宅者ではデシャンヌ型、肢体型、福山型、顔面肩胛上腕型の順に多く、入所者ではデシャンヌ型、肢体型、筋緊張性筋ジストロフィー、福山型の順に多かった。デシャンヌ型は在宅者より入所者の割合が高く、福山型は逆に入所者より在宅者の割合がやや高かった。「筋ジストロフィーが遺伝子変異による病気であることを知っているか？」の設問に対し知っているとは答えたのは全回答者（2070）の79%であった。知っている割合の最も高いのは福山型の86%であった。「筋ジストロフィーの遺伝子診断が出来ることを知っているか？」の設問に対し知っているとは答えたのは、全回答者の71.2%であった。知っている割合の最も高いのは福山型の85%であった。

「筋ジストロフィーの医療として遺伝子診断が必要だと思うか？」の設問に対し全回答者の52.2%が必要だと答えた。デシャンヌ型患者の60%が必要と答え、その比率は最も高かった。「遺伝子診断を受けたことがあるか？」の設問に対して在宅者の25%、入所者の15%が受けたと答え、在宅者に統計学的有意に多かった。また男性は女性より多く、福山型の比率が最も高かった（42%）。「臨床実験の段階でも遺伝子治療を受けたいか？」に対して受けたいと回答したのは全体の21%で、受けたくないとは回答した23.7%より少なかった。「遺伝子診断結果および検査した後の遺伝子（血液）は、どこが管理するのがよいか」国立神経センターと答えたのは全体の46.3%、受診している医療機関と答えたのは

\*社団法人 日本筋ジストロフィー協会  
\*\*早稲田大学大学院 人間科学  
\*\*\*上智大学大学院 社会福祉

22.9%であった。遺伝子医療に対する法的規制に関する賛否の比率は在宅者 50.9%、入所者 44.7%であった。

### 【結 論】

1. 自分たちの病気が遺伝子の変異によるものであり、遺伝子診断ができることを知っていたのは全回答者の **71.2%** であった。
2. 実験段階でも遺伝子治療を受けたいと思う回答者は、受けたくないと答えた回答者より少なく、それぞれ **21.0%**、**23.7%** であった。
3. **47%** の人は遺伝子医療に法的規制が必要であると考えていた。

### 【調査②】

31名の入所患者に対して、対面式の聞き取り調査による調査を実施した。

### 【方 法】

埼玉県・宮城県・京都府・愛知県・宮崎県の5府県にて、主に施設に入所中の筋ジストロフィー患者31名（男性20名，女性11名：平均年齢42±15歳）を対象に2003年6月から2003年11月にかけて調査を実施した。調査は医師，心理士および心理学を専攻する大学院生による1対1の対面方式の半構造化面接法（所用時間は約50分）で実施された。調査内容はこれまでの筋ジストロフィー患者への調査結果及び本研究の目的を考慮し，基本事項，心理社会的要因，遺伝子診断，遺伝子治療，カウンセリングの5要因から構成された。調査対象者は，事前に調査の趣旨と内容に関する説明を受け，同意した者を対象とした。

### 【結 果】

調査2の対象者の平均年齢は，調査1における入所患者の平均年齢よりやや高く，40代（8名），30代（7名），20代5名，50代（4名），10代（2名），60代以上（5名）の順に多かった。調査対象者31名の病型別の内訳は，デュシェンヌ型10名（32%），ベッカー型，筋緊張性型，顔面肩胛上腕型がそれぞれ3名（各10%），肢体型が2名（6%），Kugelberg-Welander型が5名（16%）であった。

#### 1. 遺伝子検査の実施・伝達状況

「遺伝子診断を受けたことがあるか？」の設問に対しては，23%が受けた，58%が受けていない，19%が不明と回答した。受けたと回答した7名を対象に行った「遺伝子診断時のインフォームドコンセントを受けたか？」の設問に対しては全員が受けたと回答したが，「インフ

ォームドコンセントの内容は十分だったか？」の設問に対しては，3名が十分，4名が不十分または分からないと回答した。「遺伝子検査の結果伝達を受けたか？」の設問に対しては，6名が受けたと回答し，1名が伝達なしと回答した。結果伝達を受けた6名は全員が医師から結果伝達を受けていた。結果伝達を受けた6名を対象に行った「遺伝子検査結果の説明は十分だったか？」の設問に対して3名が十分，3名が不十分または分からないと回答し，「結果の説明は理解できたか？」の設問に対して2名が理解できた，4名が理解できなかったと回答した。

#### 2. 病気の診断・理解と年齢との関連

「遺伝子検査をもし行くとすれば，何歳ぐらいの時が最も適当だと思うか？」の設問に対して，44%が着床前診断，26%が症状の発現後，15%が1歳未満，11%が妊娠中，4%が10歳前後と回答した。「自分の病気の診断・説明を理解できた年齢はい何歳だったか？」の設問に対して，診断時に20歳以上であった11名を除く20名では，22%が12歳，15%が20歳，11%が15・16歳，11%が10歳未満と回答した。「本人に遺伝子診断の結果を伝達・説明するのに適した年齢は何歳ぐらいだと思うか？ またそれは何故か？」の設問に対して，57%が10歳～16歳（理由：病気の内容を理解できる時期），23%が18歳以上（理由：病気に対処可能になる時期），12%が5・6歳（理由：自分と他の子どもの違いを意識する時期），8%が回答不可能（理由：個人差がある）と回答した。

#### 3. 遺伝子治療に対する知識と態度

「遺伝子治療という治療法があることを知っているか？ またどこから情報を得たか？」の設問にたいし，79%（24名）が知っている，21%（7名）が知らないと回答した。知っていると回答した24名の内，18名がテレビ，新聞，雑誌，インターネットなどのマスメディアから，8名が（社）筋ジストロフィー協会から，5名が医師や病院スタッフ，家族や知人その他から情報を得たと回答した（複数回答）。「遺伝子治療の方法を知っているか？」という設問に対して，58%が知っている，42%が知らない，分からないと回答した。具体的には，遺伝子の配列を変える（6名），遺伝子組み換え食品のようなもの（3名），遺伝子の異常，遺伝子の修復（各2名）などの回答が多かった。「遺伝子治療に対して期待しているか？」の設問に対して，74%が期待している，26%が期待していない，分からないと回答した。期待内容としては，若い人や子どもの治療に期待（8名），進行を止める・現状維持に期待（7名），自分の治療に役立てたい（6名）などの回答が多かった。



「遺伝子治療に対して不安を感じているか？」の設問に対して67%が不安である、33%が不安ではない、分からないと回答した。不安内容としては、副作用が心配（6名）、遺伝子組み換え食品との違いが不明（5名）、よく分からないので不安、失敗した時の悪化（各4名）、治療に使用する遺伝子の悪影響（2名）などの回答が多かった。「臨床実験の段階でも遺伝子治療を受けたいか？」の設問に対しては、52%が受けたい、48%が受けたくない、分からないと回答した。

### 【結 論】

1. 現状の遺伝子検査前後のインフォームドコンセントと結果説明は、約半数の患者にとって内容が不十分または理解困難である。
2. 自分の病気に関して理解できたのは12歳の頃が最も多い。
3. 病気の認識に関して発達段階に応じた3段階の時期があることが示唆された（6歳前後：自他の違いを意識する時期、10代前半：病気を理解できる時期、18歳以上：病気に対処可能になる時期）。
4. 79%の患者は遺伝子治療の存在を知っており、58%の患者が方法を知っていると回答した。74%の患者は遺伝子治療に期待を感じており、67%は不安を感じている。
5. 遺伝子治療に関する情報はマスメディアや（社）日本筋ジストロフィー協会から得ている割合が高い。
6. 52%の入所患者が実験段階でも遺伝子治療を受けたいと思っていた。

### 【調査①・②についての総合考察】

#### 1. 遺伝子医療に対する認知度

遺伝子診断ができることを知っている患者は71.2%（2070名中）、遺伝子治療の存在を知っている患者は79%（31名中）であったことから、遺伝子診断、遺伝子治療に対する患者の認知度は比較的高いと考えられる。しかし、遺伝子治療の方法を知っている患者は58%（31名中）であり、正確な内容を理解している割合は認知している割合よりも低いことが考えられる。

#### 2. 遺伝子医療に対するニーズ

52%（2070名中）の患者が筋ジストロフィーの医療としての遺伝子治療が必要であると回答し、74%（31名中）が遺伝子治療に対して期待していると回答している。これらの結果から、患者は遺伝子診断によって診断すること自体の必要性はそれほど高く感じていないが治療への期待度は高いと考えられる。

#### 3. 実験段階の遺伝子治療への参加希望

臨床実験の段階でも遺伝子治療を受けたいと回答した患者と受けたくない・分からないと回答して患者の割合は21%：23%（2070名中）、52%：48%（31名中）であり、遺伝子治療希望者と非希望者の割合は、有効回答者のほぼ半数ずつであることが示された。

#### 4. 遺伝子診断前後の説明について

現状の遺伝子検査前後のインフォームドコンセントと結果説明は、約半数の患者にとって内容が不十分または理解困難であることが示された。これらの結果から、患者・家族にとって理解可能な内容と手続きの開発、および説明する医師に対する訓練プログラムなど、遺伝子診断前後の説明と結果伝達に関する研究の必要性が示唆された。

#### 5. 病気の診断・理解と年齢との関連

病型による差はあるが、自己の病気の理解が可能な年齢としては12歳が最も多く、病気の認識に関して発達段階に応じた3段階の時期があることが示唆された。これらの結果から、本人への告知と説明に関しては、年齢を考慮した段階的な説明の必要性が示唆された。

#### 6. 遺伝子治療に対する社会的啓蒙の必要性

62%の患者（31名中）は遺伝子治療に対して不安を感じており、治療の失敗や副作用などの治療への不安と、内容や遺伝子組み換え食品との違いが分からないなどの正確な知識の不足による不安が同程度に多いことが示された。これらの結果から、遺伝子治療の実施に際しては正確な知識と理解の促進が重要であると考えられる。また、遺伝子治療に関する知識は、マスメディアや（社）日本筋ジストロフィー協会から得ている割合が高いことが示されたため、このような媒体を通じて社会的な啓蒙活動を行うことの有用性が示唆された。

### 【調査①・②についての総合結論】

1. 患者における遺伝子診断、遺伝子治療への認知度は比較的高い（71～79%）が、内容に関する正確な知識の有無は不明である。
2. 遺伝子診断による診断へのニーズを感じている患者は52%だが、遺伝子治療への期待は高い（79%）。
3. 実験段階の遺伝子治療への参加希望者、非希望者の割合は約半数ずつである。
4. 遺伝子診断の説明・結果の伝達は、現状では約半数のケースで不十分、あるいは理解困難であり、患者に理解可能な説明内容および、伝達者の訓練プログラムの開発などの必要性が示唆された。
5. 遺伝子医療の円滑な実施のためには、社会的な啓

蒙活動による正確な知識と理解の促進が重要である可能性が示された。

6. 患者の遺伝子治療の知識はマスメディアや（社）日本筋ジストロフィー協会から得ている割合が高く、このような媒体を通じて社会的な啓蒙活動を行うことの有用性が示唆された。

### 【シンポジウム開催の報告】

#### 【緒言】

筋ジストロフィーの遺伝子治療の実現に際しては様々な倫理的および社会的問題が生じることが指摘されており、これらの予想される問題について十分に認識を深めることは重要な課題である。

遺伝子医療の円滑な実施のためには社会全体のコンセンサスを得ることが必要であり、患者のみならず、社会全体への啓蒙活動が重要であると考えられる。そこで、社会全体に広く情報を発信し、遺伝子医療の円滑な実施を促進する社会的啓蒙活動の一環として、本研究班および、社団法人日本筋ジストロフィー協会、日本生命倫理学会の共催によるシンポジウムを開催した。

#### 【シンポジウム内容】

第15回日本生命倫理学会年次大会の二日目（2003年11月16日）に、大会関連シンポジウムとして「遺伝子治療が可能になったときに…」を開催した。シンポジウムの開催に関しては、日本生命倫理学会、社団法人

日本筋ジストロフィー協会のホームページおよび、産経新聞、朝日新聞に予告を掲載した。

司会は貝谷久宣（社団法人 日本筋ジストロフィー協会 理事）が務めた。開会時の挨拶は河端静子（社団法人 日本筋ジストロフィー協会 理事長）、石原傳幸（平成15年度 厚生労働省 精神・神経疾患研究 依託費 筋ジストロフィー研究連絡協議会副議長）、閉会の挨拶は福澤利夫（社団法人 日本筋ジストロフィー協会 副理事）が行った。

シンポジストは、小澤敬也（自治医科大学医学部教授）が医学的な立場から、青木 清（上智が医学教授、日本生命倫理学会代表理事・会長）が生命倫理の立場から、杉浦美香（産経新聞社会部記者）が一般社会の立場から、名倉由紀子（患）が遺伝子治療の実現を願う患者の立場から、貝谷嘉洋（上智大学大学院生）が遺伝子治療を基本的に否定している患者の立場から講演を行った。その後、金澤一郎（国立精神・神経センター総長）による指定討論の後、フロアからの討論を行った。

### 【結果】

出席者に対して、シンポジウムに対するアンケート調査を実施した。回答の得られた22名の結果について報告する。

「このシンポジウムの満足度は5段階評価では何点くらいか？ その理由はなにか？」の設問に対しては、平均して3.6点という回答であった。

理由として多かった回答は、様々な立場からの話が聞けてよかった（7名）、フロアからの討論時間が短すぎる、最新の話が聞けた、治療の現実が分かった（各3名）などであった。

「このシンポジウムに関心をもったきっかけは何か？」の設問に対して多かった回答は、筋ジストロフィー協会の媒体で知った（9名）、自身の子どもが筋ジストロフィーであるため（8名）、自身が医師・研究者で関心があるため（4名）、背生命倫理・遺伝子の問題に関心がある（3名）、新聞を見て（2名）などであった（複数回答）。

「シンポジウムに出席してどのような感想を持ったか？」の設問に対して多かった回答は、当事者である患者の話聞いてよかった（4名）、治療の早い実現を望んだ（3名）、医師以外の話を聞いて良かった、当事者と研究者、他の専門家間の連絡調整の必要性を感じた、治療の実現のために周囲や社会の理解が必要であると感じた（各2名）などであった。

「遺伝子治療に対する疑問やもっと深く知りたい点にはどのようなものがあるか？」の設問に対しては、安全性と副作用、企業などの特許問題、医学部の倫理委員会の役割と位置づけ（各2名）、遺伝子治療・遺伝子診断・妊娠中絶の位置づけ、治療への参加方法、エクソスキップ法の適用患者、デュシェンヌ型以外の研究の進み具合、一般の人や患者の理解度、期待度、誤解度を知りたい（医療者として）などの回答が得られた。

### 【結論】

1. シンポジウムの満足度は平均3.6点であり、比較的満足度の高いシンポジウムであった。
2. 様々な立場からの講演内容は、患者・患家医師・専門家の双方から概ね好評であった。
3. アンケート回答者内では、患者・患家その他の割合が医師・専門家より多く（15名：7名）社会的啓蒙活動として有用であったと考えられた。

### 【参考文献】

- 1) 貝谷久宣：DNA診断に対する患者・家族の意識。

からだの科学 181:118-122, 1995.

- 2) 貝谷久宣、他：日本筋ジストロフィー協会 患者・  
家族討論会「遺伝子・胎児診断に対する期待と疑問」  
からだの科学 191:2-16, 1996.
- 3) 貝谷久宣／日本筋ジストロフィー協会 編集 遺  
伝子医療と生命倫理 日本評論社 東京 2001

# Summary

## Development of Molecular Therapy on Hereditary Muscle Diseases

Activity Report of a National Research Group Organized by National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), and the Ministry of Health, Labor and Welfare

Shin'ichi Takeda, M.D., Ph.D. (Principal Investigator)

The causative genes of muscular dystrophies have been largely identified, however neither molecular pathogenesis nor essential treatment of the diseases has been found. To develop molecular therapy of the diseases, we organized a national research group and I briefly summarize the progress pursued by our group.

### 1. Gene therapy toward various hereditary muscle diseases

Effective gene transfer into skeletal muscle is achieved by using adeno-associated virus (AAV) vector, however this vector has a limitation in the size of incorporated gene. Dr. Takeda's group (NCNP) previously found that small sized-dystrophin (micro-dystrophin) can effectively ameliorate dystrophic phenotypes in transgenic *mdx* mice study. Then, they made an AAV vector encoding micro-dystrophin cDNA and injected the vector into skeletal muscle of dystrophin-deficient *mdx* mice. They found the long-term expression of micro-dystrophin at least until 24 weeks after the injection and improvement of histology and specific tetanic force of injected muscle. They also injected the AAV vector into skeletal muscles of dystrophic dogs, but they encountered excess immune responses in injected muscles. It is indispensable to know the molecular background of immune response and to find the way to suppress the response.

### 2. Stem cell transfer for muscle diseases

Stem cell transfer can be applicable as a generalized treatment of hereditary muscle diseases. The stem cell of the muscle lineage has been found not only in bone marrow but also in skeletal muscle itself. Dr. Hashimoto's group (Mitsubishi Life Science Institute) established a clonal culture of mouse skeletal muscle satellite cells and found the cell has a multi-lineage potential and can differentiate into skeletal muscle cells as well as bone cells. Dr. Takeda's group had isolated Side Population (SP) cells from bone marrow and skeletal muscle itself and they tried to elucidate the localization and function of SP cells. They found that the SP cells were localized at interstitial tissue between muscle fibers. Therefore, the localization was distinct from that of satellite cells. They also found that bone marrow SP cells were migrated into an earlier stage of regenerating muscle. The efficiency of bone marrow transplantation is very low, therefore they tried to find particular SP cell fractions, which can effectively differentiate into muscle cells. CD45<sup>+</sup> Mac-1<sup>low</sup> SP cells, which were found at early stage of muscle regeneration, are one of candidates.

### 3. Development of new therapy based on elucidation of molecular pathogenesis of muscular dystrophy

Impairment of cognitive function in dystrophin-deficient Duchenne muscular dystrophy was well recognized, but the molecular background of the impairment has not been identified. Dr. Sekiguchi (NCNP) examined the ability of memory and learning in dystrophin-deficient *mdx* mice, and found that these functions were well maintained in the mice. He also examined emotional

condition of the mice and found that those mice were fragile to emotional stress. These findings might be key phenomenon to understand the central nervous system symptoms of the dystrophic patients.

#### **4. New animal models for therapeutic approach of muscle diseases**

The *mdx* mice have been used as a model of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for a long time, however a mild phenotype of this model is not suitable for the assessment of the treatment. Dystrophic dog (CXMD) reveals severe phenotypes seen in DMD. Dr. Tanioka (Research Center of Experimental Animal Models), his colleagues (Chu-gai Medical Institute) and NCNP have established a beagle dog-based CXMD colony in Japan. In the newly built facility in NCNP, they started not only clinical, and pathological examination of dystrophic dogs, but also introduction of therapeutic gene into skeletal muscle of the dogs. Selective involvement of Purkinje fibers in the heart conduction system has been noticed at earlier stage of dystrophic dogs.

#### **5. Social medical aspects of muscular dystrophies**

Dr. Kaiya (Muscular Dystrophy Association of Japan) forwarded a research related to socio-medical aspects of muscular dystrophic patients and their families. Most of patients have noticed that they were suffering from genetic disease and certain numbers of patients had an idea to receive an opportunity of gene therapy. It is very important to distribute recent knowledge about molecular pathogenesis and molecular therapy of the diseases among patients and families .

## 平成13～15年度研究班員名簿

# 遺伝性筋疾患に対する分子治療の基盤研究

## 平成 13～15 年度 研究者一覧表

区分	氏 名	所 属 施 設	職 名	所属施設所在地 (Tel・Fax・E-mail アドレス)
主任	武田 伸一	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	部 長	〒 187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 T E L 042-346-1720 F A X 042-346-1750 E -mail takeda@ncnp.go.jp
分担	井上 正康	大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態学	教 授	〒 545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3 T E L 06-6645-3720 F A X 06-6645-3721 E -mail inoue@med.osaka-cu.ac.jp
分担	遠藤 仁司	自治医科大学 医学部 生化学	助教授	〒 329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1 T E L 0285-58-7322 F A X 0285-44-1827 E -mail hendo@jichi.ac.jp
分担	小澤 敬也	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	教 授	〒 329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1 T E L 0285-58-7402 F A X 0285-44-8675 E -mail kozawa@jichi.ac.jp
分担	貝谷 久宣	㈱日本筋ジストロフィー協会	理 事	〒 102-0084 東京都千代田区二番町 11-1-505 T E L 03-5215-1485 F A X 03-5215-1735 E -mail office@fuanclinic.com
分担	金田 安史	大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝子治療学	教 授	〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2 T E L 06-6879-3901 F A X 06-6879-3909 E -mail kaneday@gts.med.osaka-u.ac.jp
分担	菊池 建機 (13年度)	国立精神・神経センター 神経研究所 モデル動物開発部	部 長	〒 187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 T E L 042-341-2711
分担	木村 重美	熊本大学医学部附属病院 発達小児科	助 手	〒 860-0811 熊本県熊本市本荘 1-1-1 T E L 096-373-5197 F A X 096-373-5200 E -mail kimusige@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp
分担	後藤 雄一	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第二部	部 長	〒 187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 T E L 042-346-1713 F A X 042-346-1743 E -mail goto@ncnp.go.jp
分担	斎藤 深美子 (小原) (13年度)	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝	助 手	〒 187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 T E L 042-346-1720 F A X 042-346-1750 E -mail takeda@ncnp.go.jp



区分	氏名	所属施設	職名	所属施設所在地 (Tel・Fax・E-mailアドレス)
分担	笹岡 俊邦	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	助教授	〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38 TEL 0564-55-7569 FAX 0564-55-7523・7569 E-mail sasaoka@nibb.ac.jp
分担	鈴木 聡 (13～14年度)	日本医科大学医学部 第二生化学教室	助手	〒113-0032 東京都文京区千駄木 1-1-5 TEL 03-3822-2131(内5240) FAX 03-5814-8156 E-mail bmsat@nms.ac.jp
分担	関口 正幸	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部	室長	〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 TEL 042-346-2711(内5142) FAX 042-346-1745 E-mail sekiguch@ncnp.go.jp
分担	高橋 明男	国立精神・神経センター 神経研究所 実験動物管理室	室長	〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 TEL 042-346-1417 FAX 042-346-1418 E-mail akio_tk@ncnp.go.jp
分担	谷岡 功邦	財実験動物中央研究所 動物実験センター	センター長	〒216-0001 神奈川県川崎市宮前区野川 1430 TEL 044-754-4480 FAX 044-754-4454 E-mail tanioka@cica.or.jp
分担	塚原 俊文	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	教授	〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台 1-1 TEL 0761-51-1440 FAX 0761-51-1149 E-mail tukahara@jaist.ac.jp
分担	辻野 精一	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部	室長	〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 TEL 042-341-2711(内5152) FAX 042-346-1746 E-mail tsujino@ncnp.go.jp
分担	角田 幸雄	近畿大学農学部 分子発生工学	教授	〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204 TEL 0742-43-1511(内3112) FAX 0742-43-1155 E-mail tsunoda@nara.kindai.ac.jp
分担	鍋島 陽一	京都大学大学院 医学研究科	教授	〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町 TEL 075-753-4422 FAX 075-753-4676 E-mail nabemr@lmls.med.kyoto-u.ac.jp
分担	西川 元也 (15年度)	京都大学大学院 薬学研究科	助教授	〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29 TEL 075-753-4616 FAX 075-753-4614 E-mail makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp
分担	橋本 有弘	三菱化学生命科学研究所 幹細胞研究ユニット	主任研究員	〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 TEL 042-724-6250 FAX 042-724-6316 E-mail nao@libra.ls.m-kagaku.co.jp

区分	氏名	所属施設	職名	所属施設所在地 (Tel・Fax・E-mail アドレス)
分担	原 孝彦	(財)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	室長	〒113-8613 文京区本駒込 3-18-22 TEL 03-3823-2105(内 5410) FAX 03-3823-1418 E-mail thara@rinshoken.or.jp
分担	日置 恭司	(財)実験動物中央研究所 飼育技術研究室	室長	〒216-0001 神奈川県川崎市宮前区野川 1430 TEL 044-754-4485 FAX 044-754-4454 E-mail hioki@cica.or.jp
分担	福田 恵一	慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学	講師	〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 TEL 03-5363-3874 FAX 03-5363-3875 E-mail kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp
分担	平家 俊男 (14～15年度)	京都大学大学院医学研究科 発生発達医学講座(発達小児科学)	助教授	〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 TEL 075-751-3305 FAX 075-752-2361 E-mail heike@Kuhp.kyoto-u.ac.jp
分担	北條 浩彦 (15年度)	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部	室長	〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 TEL 042-341-2711(内 5132) FAX 042-346-1744 E-mail hohjohh@ncnp.go.jp
分担	三好 浩之 (14年度)	理化学研究所筑波研究所 バイオリソースセンター 生体情報統合技術開発チーム	研究員	〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1 TEL 0298-36-9056・0298-36-9185 FAX 0298-36-9144 E-mail miyoshi@brc.riken.go.jp
分担	山元 弘	大阪大学大学院 薬学研究科 細胞生理学分野	教授	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6 TEL 06-6879-8190 FAX 06-6879-8194 E-mail hiroshiy@phs.osaka-u.ac.jp