

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591003

研究課題名(和文) ヘルパー依存アデノ及び改変レンチウイルスを用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療

研究課題名(英文) Helper-dependent adenovirusvector and modified lentiviral vector mediated delivery of dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy

研究代表者

内野 誠 (UCHINO MAKOTO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20117336

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーの生命予後に直結する呼吸筋への遺伝子導入の可能性を探るために、mdx マウス並びに dko マウスを用いて、腹腔内へ HDAV myc-dys を投与し、組織学的、呼吸生理学的に治療効果を検討し、有効性を確認した。またアデノウイルスベクターの欠点である一過性発現を根本的に改善するために、full length-dystrophin を搭載するレンチウイルスベクターを開発し、in vivo/ex vivo 遺伝子治療について検討した

研究成果の概要(英文)：We showed that a highly efficient dystrophin-transduction to the mex and dko's diaphragm - achieved by simple intraperitoneal injection of a helper-dependent adenovirus vector (HDAV) containing the full-length dystrophin expression cassette - provided beneficial results. we carried out the packaging of the full-length dystrophin cDNA in a genetically modified lentivirus with a useful, sufficiently functional titer that was successfully transduced into myogenic cells derived from the transgenic mdx mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科

キーワード：筋ジストロフィー、遺伝子治療、ヘルパー依存アデノウイルス、改変レンチウイルス

1. 研究開始当初の背景

過去の Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)のモデル動物 mdx マウス及びより重症の utrophin/ dystrophin double knockout マウス(dko マウス)を用いた研究では、Adenoassociated virus(AAV)を用いた血管内投与による全身への短縮型 dystrophin 導入により良好な結果が得られている。しかし、筋ジストロフィー犬に mesoangioblast を用いて短縮型 dystrophin を導入した研究では、必ずし

も満足いく結果ではなかった。Dystrophin 遺伝子発現から約 20 年経過した今日でもその機能は解明されておらず、短縮型 dystrophin がヒトで十分な効果を発現するか未知数である。我々は完全長 dystrophin を導入することが重要であると考え、helper-dependent adenovirus (HDAV)を用いた遺伝子治療並びに完全長 dystrophin(mFLdys)を搭載できる lentivirus vector の作製と in vivo/ex vivo 遺伝子治療をめざしてきた。

2. 研究の目的

DMD の病態に則した根本治療法の開発と臨床応用を実現するため、遺伝子治療技術を応用し安全かつ有効な治療法の開発を目的としている。mdx マウス及び dko マウスを用い、四肢骨格筋に加えて、横隔膜への治療遺伝子の導入を行い、呼吸機能の改善がはかれるかを検討する。また治療用遺伝子の長期発現を可能にするため完全長 dystrophin cDMD を搭載できる lentivirus vector を作製し、in vivo/ex vivo 遺伝子治療について検討する。また横隔膜へ遺伝子導入するにあたってプロモーターによる発現効率の違いについても検討する。

3. 研究の方法

(1) HDAd を用いた遺伝子治療

7 日齢 dko マウスの両上肢・背側・両大腿・両下腿それぞれに HDAdv-myc-mFLdys を $5 \mu\text{l}$ ずつ 8 カ所、計 $40 \mu\text{l/body}$ 筋肉注射した。注射後 8 週 (9 週齢時) で組織学的評価、運動機能評価、生命予後評価を行った。7 日齢 dko マウスの腹腔内へ 計 $100 \mu\text{l/body}$ 投与した。注射後 8 週 (9 週齢時) で組織学的評価、横隔膜張力測定を行った。また非麻酔下で、非侵襲的に測定可能である wholebody pletysmography を用い、一回換気量、呼吸数の測定を行った。

(2) FLdys-lentivirus vector 作製と ex vivo 遺伝子治療

Packaging construct、Envelope & REV construct、SIN vector construct の 3 つのプラスミドを 293D 細胞に同時に共感染させる 3 システムプラスミド方式で FLdys cDNA を Lentivirus vector に packaging し、myc-tag で標識し、FLdys/myc が packaging されていることを RT-PCR ほかで確認し、mdx cell line に感染させ、セレクトした mdx-GFP/Lv-FLdys ($1 \times 10^5 \text{ TU/ml}$ $5 \mu\text{L}$) を mdx マウス (5 匹) の一側の前頸骨筋に筋注し、他側には PBS ($5 \mu\text{L}$) を筋注した。

(3) プロモーターとして、MSCV (murine stem cell virus) と骨格筋特異的とされる MCK (muscle creatine kinase) プロモーターを Lentivirus vector に EGFP を組み込んだもので、横隔膜、前頸骨筋、ヒラメ筋などで fiber type による導入効率の違いを検討した。Fiber type は ATPase10.6、4.6、4.2、NHDH、Myosin heavy chain 染色を行って、type I、IIA、IID/X、IIB を識別した。

4. 研究成果

(1) 9 週齢 dko マウス前脛骨筋の H.E 染色、dystrophin、myc-tag、 β -DG、 α -SG、nNOS の免疫染色の結果を図 1 に示す。

TA muscle

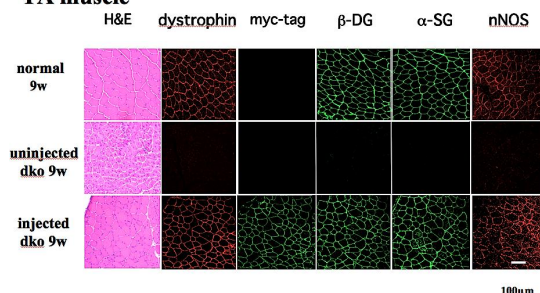


図 1. HDAdv-myc-mFLdys を導入した 9 週齢 dko マウス前脛骨筋の組織像

dko マウス注射群では、dystrophin 陽性筋線維を認め、wild-type と同様に細胞膜直下に dystrophin が局在していることを確認した。さらに同部位に一致して myc-tag も陽性であり、発現している dystrophin が導入されたものであることを確認した。Dystroglycan (DG) 並びに sarcoglycan (SG) も dko マウス注射群では dystrophin 発現部位に一致して発現の回復を認めた。dco マウス注射群の中心核線維数は、非注射群と比較して有意に減少していた ($p < 0.05$)。9 週齢時の身体的外見については、dco マウス非注射群は小さな体躯、顕著な脊椎後弯、筋肉の萎縮、関節の拘縮を呈しているが、dco マウス注射群では体躯も大きく、筋萎縮、脊椎後弯、関節拘縮、いずれも改善していた。赤外線自動センサーを用いて、運動量の定量化を行ったところ 24 時間運動量を測定した平均値は、dco マウス注射群では、非注射群と比較し、有意に運動機能改善をみとめた ($p < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲線では、dco マウス注射群は非注射群よりも有意に寿命が延長していた ($P < 0.05$)。

横隔膜への dystrophin 遺伝子治療に用いた HDAdv-myc-mFLdys の構造と横隔膜全体への dystrophin 染色パターンを図 2 に示す。

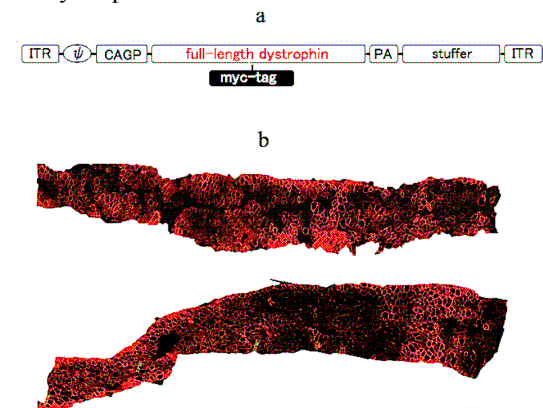


図 2. HDAdv-myc-mFLdys の構造(a)と横隔膜全体の dystrophin 染色(b)

9 週齢治療群 dko 横隔膜の dystrophin 染色を行ったところ広範囲で dystrophin の導入が確認され、H.E 染色では、骨格筋への導入と同様に dystrophin 導入部位に一致して dystrophic な変化の改善をみとめた (図 3)。中心核線維は dco マウス治療群では非治療群と有意に減少した ($p < 0.05$)。横隔膜の線維化の割合は dco マウス治療群では dco マウス非治療群と比較し、有意に減少していた ($p < 0.05$) (図 4a、4b)。横隔膜の生理学的改善を評価するために、筋張力を測定したところ治療群では非治療群と比較して筋張力は有意に改善した ($p < 0.05$)。

wholebody plethymography を用い *mdx* マウスの呼吸機能解析を行った。一回換気量は、4 月齢 *mdx* マウスは同月齢 wild-type と比べ変わらないのに対し、7 月齢 *mdx* マウスは著明に低下していた(7 月齢 *mdx*; 6.4 ± 0.4 ml/kg, 7 月齢 wild-type; 7.8 ± 0.96

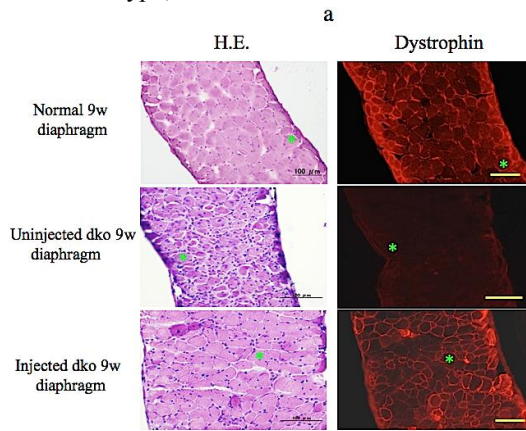


図 3. 9 週齢治療群 dko 横隔膜の dystrophin 染色

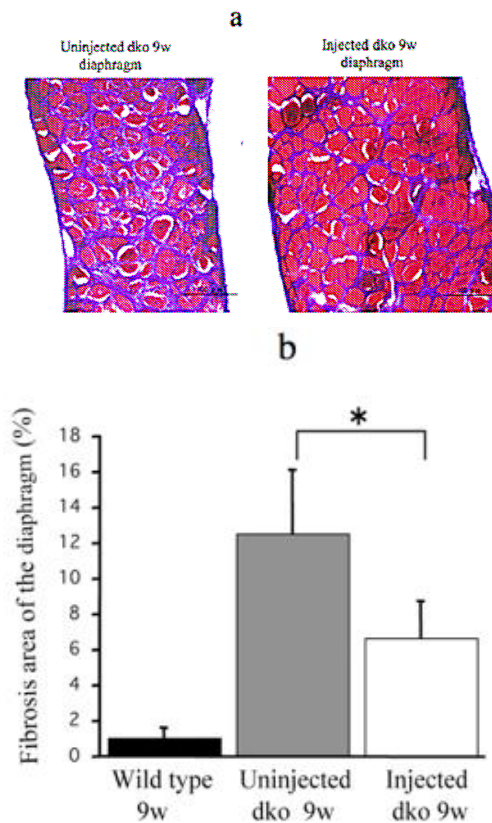


図 4. a. Masson trichrome 染色で、9 週齢未治療群に比べて、9 週齢治療群では青色に染まる間質の線維化の面積が著明に減少している。b. 画像解析ソフトでの線維化面積は治療群は未治療群に比べて、有意に減少している($p < 0.05$)。

ml/kg, $p < 0.0001$)。また呼吸数は 7 月齢 *mdx* マウスは同月齢 wild-type と比べ著明に増加してあり(7 月齢 *mdx*; 378 ± 46.5 回/分, 7 月齢

wild-type; 311 ± 75.8 回/分, $p < 0.0001$)、DMD 患者で見られる拘束性換気障害が早期に検出可能であった。

dko マウスの wholebody plethymography を用いた呼吸機能評価では、wild-type 9 週齢が呼吸数は 236 ± 100.5 (count/min)、未治療群 9 週齢は 345 ± 46.6 、治療群 9 週齢では 320 ± 57.8 と有意に呼吸回数は減少し($p < 0.05$)、一回換気量も wild-type 9 週齢が 7.5 ± 1.9 (ml/kg)、未治療群 9 週齢は 5.8 ± 1.2 、治療群 9 週齢では 6.6 ± 1.2 と有意に増加し($p < 0.05$)、明らかな治療効果がみられた(図 5a、5b)。

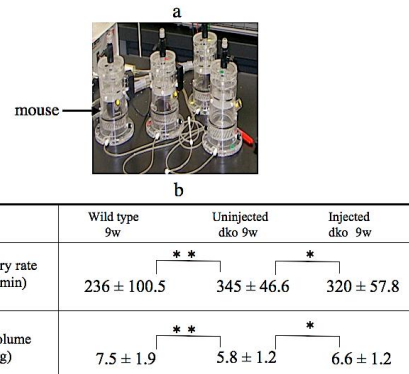


図 5. wholebody plethymography と dko マウス治療群(9 週齢)における一回換気量と呼吸数の改善

今回 HDAdv-myc-mFLdys の腹腔内投与を行った dko では、横隔膜の平均約 38%の筋線維、最大で 61%の筋線維で dystrophin の発現がみられた。2004 年 Matecki らは、完全長 dystrophin をパッケージングした HDAd (5×10^{10} vector particles) を 12 週齢の *mdx* マウスへ投与した。顕微鏡下で横隔膜へ $100 \mu\text{l}$ の体積で注射を行い、1 ヶ月後に観察した結果、約 23%の導入効率であった。しかし maximal tetanic force は未治療群と差異はなかった。本研究では、それを上回る dystrophin 導入効率をみとめ、maximal tetanic force も改善した。報告例と比較し、高い導入効率であった原因として注射時期、ベクターの力価や純度、注射液の体積などが考えられた。また dystrophin 導入部位では、四肢筋に導入した場合と同様に、dystrophic な変化の改善をみとめ、線維化も減少した。これは、幼弱期に dystrophin が導入され、筋の壊死、再生のサイクルに入ることが、妨げられた結果、炎症細胞浸潤や線維化など 2 次的な変化も抑制されたためと推察された。本研究では、完全長 dystrophin の有効性は示されたが、今後は、HDAd による免疫反応などの安全性の検討が必須である。免疫寛容のある幼弱期に投与することで、比較的安全に投与可能であったが、今後、若年期以降に投与し、長期的に効果的な dystrophin 発現レベルを保つためには、低容量かつ臨床的に可能なレベルの免疫抑制療

法が必要と考える。これらの課題について検討を重ね、有効で安全な治療方法の開発を目指したい。

(2) 完全長 dystrophin を搭載するベクターの作成に成功した。この Lv-CMV-FLdys 50 μ l を mdx cell line(1x10⁶)に transduction し、培養液から FGF2 を除去すると myotube に分化するが、抗 dystrophin 抗体(H-300)で細胞質全体が赤く染色された。分化していない myoblast を mdx マウスの一側の前頸骨筋に筋注し、2週後に検査したところ、生着した myoblast はお互いが fusion して myofiber に分化したもの、あるいは mdx の myofiber と fusion して myofiber に分化したと思われる筋繊維が観察された(図 6)。

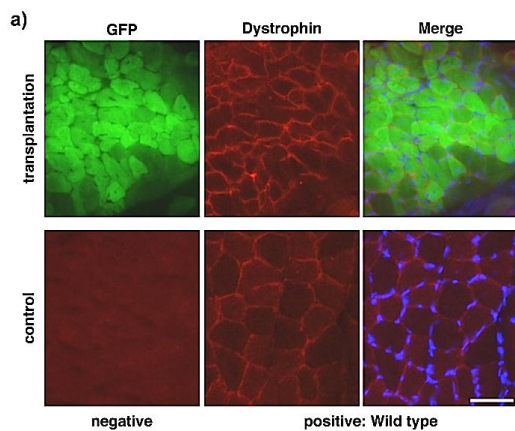


図 6. Lv-CMV-FLdys を transfection した mdx cell line(myoblast) を mdx マウス前頸骨筋に移植後 2 週目の組織所見

我々の strategy は、integrating ベクターを用いる点で腫瘍原性リスクに常に注意を払う必要がある。Hacein-Bey-Abina らが 2003 年に報告した SCID-X1 の幹細胞遺伝子治療研究で不幸にして起きた T 細胞性白血病は、LMO-2 locus への retroviral vector の insertion によって、LMO-2 gene が active になり腫瘍性増殖を来したことが原因であった。この結果遺伝子治療用ベクターの安全性の再検討がなされ、self inactivation 化された Lentiviral vector が治療研究の主流になっている。Naldini らによりベクター化された lentivirus はヒト後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome: AIDS)の原因と広く知られているが、これによって腫瘍を引き起こした報告はない。さらに insulator による enhancer 効果の遮断、Site specific integration、Tissue specific expression、miR based regulation の組み合わせによってより安全な利用が期待できる。我々は、骨格筋特異的に遺伝子発現をコントロールできる短縮型 dystrophin を搭載したレンチウイルスベクターを mdx マウスの骨格筋に導入した。少なくとも 2 年以上

安定して発現させ、かつ骨格筋幹細胞への安定した遺伝子導入も確認している。この間、腫瘍の発生はみられなかった。今後、寿命の長い中型動物や霊長類での長期的な観察などさらなる検討が必要であるが、レンチウイルスベクターはきわめて有望な遺伝子治療ツールと考えられる。

(3) MSCV プロモーターでは横隔膜やヒラメ筋などの type I、IIa が主体の筋で強い発現がみられ、GFP も強い発現がみられた。MCK プロモーターでは type IIB が主体の前頸骨筋で強い発現がみられ、type I では弱かった(図 7)。

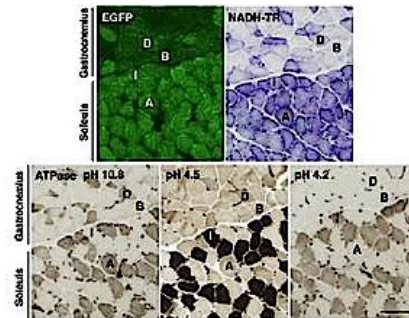


図 7. MSCV-EGFP transgenic mice の腓腹筋とヒラメ筋の境界部における EGFP の発現パターン。Type I、type IIA、type IIB、type IID/X(それぞれ I、A、B、D と表示)の全ての fiber type が認められる。各 fiber type は NADH-TR、ATPase(pH 10.8、4.5、4.2)染色と合わせて確認できる。

将来、HDAd による完全長 dystrophin 導入は、DMD の症状を軽減し失われた機能を補う有効な治療方法になりうると考えられた。

レンチウイルスベクターを利用し細胞の運命をコントロールする *ex vivo* 遺伝子治療にも応用可能である。将来、幹細胞移植治療と組み合わせることで筋ジストロフィーの安全で有効な治療法の一つの選択肢となり得る。今後、さらなる安全対策、効率の改善を加え臨床応用を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Suga T, Kimura E, Morioka Y, Ikawa M, Li S, Uchino K, Uchida Y, Maeda Y, Chamberlain JS, Uchino M. Muscle fiber type-predominant promoter activity in lentiviral-mediated transgenic mouse. PloS One、査読有、2011. in press
- ② Ishizaki M, Maeda Y, Kawano R, Suga T, Uchida Y, Uchida Y, Uchino K, Yamashita S, Kimura E, Uchino M. Rescue from

respiratory dysfunction by transduction of full-length dystrophin to diaphragm via the peritoneal cavity in utrophin/dystrophin double knockout mice. Mol Ther、査読有、2011. In press
〔学会発表〕(計 16 件)

① Kimura E, Uchino K, Suga T, Ishizaki M, Koide T, Uchida Y, Maeda Y, Yamashita S, Chamberlain JS, Uchino M. Lentiviral vector mediated delivery of full-length dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, May 19-22, 2010, Marriott Wardman Park Hotel, Washington DC, USA.

② 内野 誠. シンポジウム 2. 新しい神経治療をめぐってーミオパチー領域における最新の治療戦略. 第 26 回日本神経治療学会. June 26-27, 2008, 新横浜プリンスホテル

〔図書〕(計 1 件)

① 内野 誠. 最新神経病学 金芳堂 分担: 筋肉疾患 2008. 66 頁

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumamoto-neuro.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内野 誠 (UCHINO MAKOTO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 20117336