

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790891

研究課題名(和文) レンチウイルスベクターを用いた筋ジストロフィー遺伝子治療

研究課題名(英文) Lentiviral vector mediated gene therapy for muscular dystrophy

研究代表者

菅 智宏 (SUGA, Tomohiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：90613521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、神経筋疾患に対する遺伝子治療、特に筋ジストロフィーへの遺伝子治療の開発を目指している。レンチウイルスベクターを用いて筋ジストロフィーモデル動物(mdxマウス)に直接遺伝子導入を行い、病理学的、生理学的機能評価により有効性の検討を行った。レンチウイルスベクターにより骨格筋、satellite cellの中で導入遺伝子の安定した発現が得られた。これにより筋線維の変性を防ぐことができ、永続的に治療用遺伝子が供給された。呼吸筋とくに横隔膜はin vivo遺伝子導入の有効なターゲットとなることを示した。MSCVプロモーター活性と筋のfiber typeとの間には相関関係が示された。

研究成果の概要(英文)：We are intended to develop the gene therapy for neuromuscular disease, especially about muscular dystrophy. Lentiviral vector can stably transduced therapeutic dystrophin gene into mdx muscle fibers and satellite cells. The transduced satellite cells can contribute to muscle regeneration process and keep providing a therapeutic gene product, dystrophin. Mdx respiratory muscle may be an appropriate target for in vivo direct gene delivery approach. LvMSCV-EGFP transgenic mice showed fiber type-dependent variations in EGFP protein expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：レンチウイルスベクター 筋ジストロフィー 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は重篤な遺伝性筋疾患であり、現在までに根本治療は確立されておらず、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が精力的に研究されている。我々の目的は dystrophin 遺伝子導入による筋ジストロフィーの改善であり、レンチウイルスベクターを用いた DMD 遺伝子治療研究に取り組んでいる。HIV-1 を改変したレンチウイルスベクターは VSVG pseudotyped のベクターであり、自己複製はせず、分裂期・非分裂期の哺乳動物細胞ゲノムに効率よく導入される。これまでの報告でレンチウイルスベクターは骨格筋に極めて長い期間発現させることができ、satellite cell にも導入可能であることが示された。これは治療効果の継続と患者の生命予後に極めて重要である。

また、遺伝子導入後の筋線維タイプ別のプロモーター/エンハンサー活性を解析した報告はなく、MSCV プロモーターについても、これまでに造血幹細胞や小脳のプルキンエ細胞で安定した遺伝子発現が得られた報告はあるものの筋線維での詳細な発現効率まで検討した報告はない。

研究代表者は臨床医学 (神経内科学) をバックグラウンドとしており、最終的には筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の臨床応用に向けた研究へと展開したいと考えている。

2. 研究の目的

今回我々はレンチウイルスベクターを用いて骨格筋をターゲットとし myofiber, satellite cell に遺伝子導入を行った。生命予後の改善のためにはまず呼吸機能を保持する必要があり、呼吸機能に直結する横隔膜をターゲットに遺伝子導入を試みた。

また、骨格筋での導入遺伝子の発現強度を測定することで、MSCV プロモーターの筋線維

タイプ別の活性を評価、検討を行った。

3. 方法

本研究では dystrophin の機能ドメインを保ったまま短縮した dystrophin cDNA を用いた。Muscle specific human skeletal-actin gene promoter でドライブした microdystrophin/eGFP (3.8kb) の fusion 蛋白質を発現するカセットを組み込んだ力価 1×10^8 TU/ml のレンチウイルスベクターを作製し、2 日齢の *mdx* マウス前脛骨筋に $5 \mu\text{l}$ 筋注した。筋注後 4 週、4 ヶ月、1 年後、2 年後に harvest して組織像を観察した。Satellite cell へ遺伝子導入されているか確かめるために microdystrophin で治療した 1 年後に *mdx* マウスの骨格筋から mono-nuclear cells を回収し primary culture を行った。

横隔膜への遺伝子導入を行うために、MSCV でドライブし eGFP を組み込んだ力価 1×10^8 TU/ml のレンチウイルスベクターを生後 2 日齢の *mdx* マウスに氷上麻酔下で $100 \mu\text{l}$ 腹腔内投与し、6 週後に harvest して横隔膜の切片を観察した。

MSCV プロモーターでドライブする EGFP を組み込んだレンチウイルスベクター (LvMSCV-EGFP) をマウス骨格筋をターゲットに直接遺伝子導入を行い、後日組織学的に評価、解析を行った。またより詳細に評価を行うために LvMSCV-EGFP を 2 細胞期胚へ導入することでトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウス骨格筋での遺伝子発現を評価、解析を行った。

4. 研究成果

生後 2 日齢で筋注後、2 年後に至るまで導入した dystrophin/eGFP fusion 蛋白質は筋形質膜にそって正常に局在した。治療 1 年後の *mdx* マウス骨格筋から mono-nuclear cells を回収し primary culture を行ったところ、micro-dystrophin/eGFP positive の多

核の myotube を認めた .

生後 6 週の横隔膜をダイレクトに蛍光顕微鏡で観察したところ, 筋線維にそって非常に強い eGFP の発現が観察された . 横隔膜の断面でも両側で横隔膜全層にわたってほぼ 100% の筋線維で eGFP の発現が観察された .

生後 2 年に至るまで極めて長期間にわたり microdystrophin の発現を認めた . これは壊死再生のサイクルを経たにもかかわらず , microdystrophin が永続的に供給されているためと考えられた . 遺伝子導入した骨格筋で施行した primary culture で micro-dystrophin/eGFP positive の myotube 形成をみたことから , satellite cell へ遺伝子導入できたとみられ , 長期発現の要因と考えられた .

筋線維 , 初代培養筋芽細胞 , および注入された筋より分離した筋管細胞においていずれも導入遺伝子発現が観察された . また , 遺伝子発現は直接導入を行った筋組織において筋線維別に発現強度に差がみられ , トランスジェニックマウス骨格筋では type I 線維と type IIA 線維で最も強く , type IID/X 線維が中間で type IIB 線維で最も弱い傾向がみられた .

筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスで変性 , 壊死変化が強いヒラメ筋や横隔膜は type I 線維と type IIA 線維で構成されており , MSCV プロモーターを用いた更なる遺伝子治療研究は *mdx* マウスの表現型改善に寄与する可能性がある .

レンチウイルスベクターによる myofiber , satellite cell への遺伝子導入を確認した . レンチウイルスベクターは骨格筋に効率よく遺伝子を導入でき , 骨格筋幹細胞をターゲットとした dystrophin 遺伝子導入は治療効果の長期発現が期待でき , 有効な治療手段となる可能性がある . また , レンチウイルスベクターにより作製されたトランスジェニックマウスはプロモーター/エンハンサー活性

を評価するのに有用と思われる .

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 14 件)

菅 智宏 , 橋本 洋一郎 : 脳梗塞と脳出血の再発率はどのくらい ? . ブレインナーシング 30 : 24-25 , 2014 , 査読無

菅 智宏 , 橋本 洋一郎 : 脳梗塞後になぜ脳出血が起こることがあるの ? . ブレインナーシング 30 : 25-26 , 2014 , 査読無
橋本 洋一郎 , 渡利 茉里 , 菅 智宏 , 伊藤康幸 : 脳梗塞 . 診断と治療 102 (2014 年増刊号) : 129-137 , 2014 , 査読無

Nakahara K , Yamashita S , Ideo K , Shindo S , Suga T , Ueda A , Honda S , Hirahara T , Watanabe M , Yamashita T , Maeda Y , Yonemochi Y , Takita T , Ando Y : Drastic therapy for listerial brain abscess by combination of hyperbaric oxygen therapy and antimicrobial agents : a case report . J Clin Neurol , 2014 , in press , 査読有

Uchino M , Yamashita S , Uchino K , Mori A , Hara A , Suga T , Hirahara T , Koide T , Kimura E , Yamashita T , Ueda A , Kurisaki R , Suzuki J , Honda S , Maeda Y , Hirano T , Ando Y : Muscle biopsy findings predictive of malignancy in rare infiltrative dermatomyositis . Clin Neurol Neurosurg 115 (5) : 603-606 , 2013 , 査読有

doi : 10.1016/j.clineuro.2012.07.019
Sakaguchi H , Yamashita S , Suga T , Kimura E , Maeda Y , Hirano T , Uchino M : Multiple system atrophy in a patient with primary ciliary dyskinesia . Neurol Asia 18 (1) : 103-105 , 2013 , 査読有

橋本 洋一郎, 渡利 茉里, 菅 智宏, 伊藤 康幸: 第 Xa 因子阻害薬アピキサバンの登場. *ブレインナーシング* 29: 708-709, 2013, 査読無

橋本 洋一郎, 渡利 茉里, 菅 智宏, 伊藤 康幸, 徳永 誠: 喫煙. *Progress in Medicine* 33: 1765-1770, 2013, 査読無

橋本 洋一郎, 渡利 茉里, 菅 智宏, 伊藤 康幸: ワルファリンと新規経口抗凝固薬の切り替え-理論と実際-. *分子脳血管病* 12: 362-368, 2013, 査読無

橋本 洋一郎, 菅 智宏, 伊藤 康幸: 脳卒中. *medicina* 50 (2013 年増刊号): 290-295, 2013, 査読無

橋本 洋一郎, 菅 智宏, 伊藤 康幸: 皮質下脳梗塞. 別冊日本臨床 神経症候群 (第 2 版) I-その他の神経疾患を含めて-: 126-132, 2013, 査読無

Uchino M, Yamashita S, Uchino K, Hara A, Koide T, Suga T, Hirahara T, Kimura E, Yamashita T, Ueda A, Kurisaki R, Suzuki J, Honda S, Maeda Y, Hirano T: Long-term outcome of polymyositis treated with high single-dose alternate-day prednisolone therapy. *Eur Neurol* 68 (2): 117-121, 2012, 査読有

doi: 10.1159/000338474

Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S, Ishizaki M, Suga T, Fujino M, Murakami T, Uchino M, Tsuchida K, Noji S, Hinohara A, Shimizu T, Shimizu K, Sunada Y: An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. *Lab Invest* 92 (8): 1100-1114, 2012, 査読有

doi: 10.1038/labinvest.2012.78

Yamashita S, Mori A, Sakaguchi H, Suga T, Ishihara D, Ueda A, Yamashita T,

Maeda Y, Uchino M, Hirano T: Sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant FUS/TLS: possible association of mental retardation with this mutation. *J Neurol* 259 (6): 1039-1044, 2012, 査読有

doi: 10.1007/s00415-011-6292-6

[学会発表](計 22 件)

1. 宮川 展和, 菅 智宏, 渡利 茉里, 伊藤 康幸, 橋本 洋一郎, 安東 由喜雄: Osler-Weber-Rendu 病に伴う肺動静脈瘤を介して奇異性脳塞栓症を来した 1 例. 第 305 回日本内科学会九州地方会, May 31, 2014, 熊本
2. 菅 智宏, 渡利 茉里, 伊藤 康幸, 俵 望, 山本 文夫, 光藤 尚, 橋本 洋一郎, 安東 由喜雄: 脳脊髄液漏出症における RI 脳槽シンチグラフィ施行症例の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, May 21-24, 2014, 福岡
3. 渡利 茉里, 菅 智宏, 伊藤 康幸, 橋本 洋一郎: アルテプラゼ静注療法後の患者における急性期での新規経口抗凝固薬導入の検討. 第 39 回日本脳卒中学会総会, Mar 13-15, 2014, 大阪
4. 伊藤 康幸, 渡利 茉里, 菅 智宏, 橋本 洋一郎: 心房細動合併虚血性脳血管障害入院患者に対する急性期新規経口抗凝固薬の有効性と安全性の検討. 第 39 回日本脳卒中学会総会, Mar 13-15, 2014, 大阪
5. 菅 智宏, 渡利 茉里, 伊藤 康幸, 山本 文夫, 橋本 洋一郎, 田尻 征治, 高田 明, 安東 由喜雄: 出産後に両側硬膜下血腫を来した 2 例. 第 204 回日本神経学会九州地方会, Dec 21, 2013, 久留米
6. 中原 圭一, 井手尾 勝政, 進藤 誠悟, 菅 智宏, 植田 明彦, 本田 省二, 平原 智雄, 渡邊 聖樹, 山下 賢, 山下 太郎, 前田 寧, 米持 康寛, 田北 智裕, 安東 由喜

- 雄：高気圧酸素療法と抗菌薬投与で著明に改善したリステリア脳膿瘍。第31回日本神経治療学会総会，Nov 21-23，2013，東京
7. 伊藤 康幸，渡利 茉里，菅 智宏，橋本 洋一郎：心房細動合併急性期虚血性脳血管障害入院患者に対する新規経口抗凝固薬の有効性と安全性の検討。第31回日本神経治療学会総会，Nov 21-23，2013，東京
 8. 伊藤 康幸，渡利 茉里，菅 智宏，橋本 洋一郎：健忘のみを呈した胃全摘後の一例と他のWernicke脳症との相違点。第37回日本神経心理学会総会，Sep 12-13，2013，札幌
 9. 道鬼 つかさ，三隅 洋平，山下 太郎，大林 光念，神力 悟，田崎 雅義，大嶋 俊範，菅 智宏，平原 智雄，植田 光晴，渡邊 聖樹，山下 賢，前田 寧，安東 由喜雄：本邦初の家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP ATTR Ala45Asp) の1症例。第202回日本神経学会九州地方会，Jun 29，2013，佐賀
 10. 中原 圭一，森 麗，菅 智宏，植田 明彦，本田 省二，平原 智雄，渡邊 聖樹，山下 賢，山下 太郎，前田 寧，安東 由喜雄：重症筋無力症における抗 AchR 抗体価のレベルと胸腺組織との関連。第54回日本神経学会学術大会，May 29-Jun 1，2013，東京
 11. 中西 俊人，菅 智宏，池田 徳典，田山 親吾，山下 賢，山下 太郎，前田 寧，高橋 幸利，田中 恵子，片淵 秀隆，安東 由喜雄：抗 NMDA 受容体脳炎症例と非脳炎症例の卵巣奇形腫では，MHC class の発現が異なる。第54回日本神経学会学術大会，May 29-Jun 1，2013，東京
 12. 道鬼 つかさ，山下 太郎，大嶋 俊範，森 麗，菅 智宏，本田 省二，平原 智雄，山下 賢，前田 寧，神力 悟，大林 光念，安東 由喜雄：非集積地における家族性アミロイドポリニューロパチー患者の臨床症候の検討。第54回日本神経学会学術大会，May 29-Jun 1，2013，東京
 13. Yamashita T, Onishi K, Okumura K, Oshima T, Inoue Y, Misumi Y, Suga T, Ueda A, Ueda M, Yamashita S, Maeda Y, Shinriki S, Obayashi K, Sakashita N, Takeya M, Ando Y: An autopsy case of transthyretin Y114C-related cerebral amyloid angiopathy after liver transplantation. American Academy of Neurology 65th Annual Meeting, Mar 16-23, 2013, San Diego, USA
 14. 中原 圭一，三隅 洋平，山下 太郎，田崎 雅義，道鬼 つかさ，大嶋 俊範，菅 智宏，植田 光晴，渡邊 聖樹，山下 賢，前田 寧，大林 光念，安東 由喜雄：集積地の高齢発症家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の1例。第201回日本神経学会九州地方会，Mar 16，2013，福岡
 15. 井手尾 勝政，中原 圭一，進藤 誠悟，菅 智宏，植田 明彦，本田 省二，平原 智雄，渡邊 聖樹，山下 賢，山下 太郎，前田 寧，米持 康寛，田北 智裕，安東 由喜雄：高気圧酸素療法と抗菌薬投与で著明に改善したリステリア脳膿瘍の1例。第200回日本神経学会九州地方会，Dec 22，2012，熊本
 16. 森 由紀子，植田 明彦，菅 智宏，本田 省二，平原 智雄，渡邊 聖樹，山下 賢，山下 太郎，前田 寧，安東 由喜雄：ステロイド反応性筋不随意運動を合併した自己免疫性髄膜脳炎の1例。第200回日本神経学会九州地方会，Dec 22，2012，熊本
 17. Yamashita S, Mori A, Sakaguchi H, Suga T, Ishihara D, Ueda A, Yamashita T, Maeda Y, Uchino M, Hirano T, Ando Y: Sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant FUS/TLS:

possible association of mental retardation with this mutation. 23rd International Symposium on ALS/MND, Dec 5-7, 2012, Chicago, USA

18. 道鬼 つかさ, 山下 太郎, 森 麗, 菅 智宏, 本田 省二, 平原 智雄, 山下 賢, 前田 寧, 神力 悟, 大林 光念, 安東 由喜雄: 発症当初 CIDP が疑われた非集積地の FAP 患者 5 例. 第 199 回日本神経学会九州地方会, Sep 8, 2012, 北九州
19. 山田 祐歌, 堀 寛子, 前田 寧, 菅 智宏, 本田 省二, 平原 智雄, 山下 賢, 山下 太郎, 安東 由喜雄: 2 度の筋生検で診断に至った封入体筋炎の 1 例. 第 199 回日本神経学会九州地方会, Sep 8, 2012, 北九州
20. 山下 太郎, 奥村 幸祐, 大嶋 俊範, 三隅 洋平, 植田 明彦, 菅 智宏, 神力 悟, 植田 光晴, 城野 博史, 大林 光念, 山下 賢, 前田 寧, 安東 由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーにおける臨床症候に対する肝移植の長期的効果の検討. 第 23 回日本末梢神経学会学術集会, Aug 31-Sep 1, 2012, 福岡
21. 神宮 隆臣, 進藤 誠悟, 植田 明彦, 菅 智宏, 森 麗, 田中 恵子, 安東 由喜雄: 抗 NMDA 受容体抗体脳炎の 1 例. 第 198 回日本神経学会九州地方会, Jun 30, 2012, 長崎
22. 山下 賢, 森 麗, 坂口 秀哉, 菅 智宏, 石原 大二郎, 植田 明彦, 山下 太郎, 前田 寧, 内野 誠, 平野 照之: FUS/TLS 変異を有する孤発性若年性 ALS の 2 例: 変異蛋白の細胞内局在の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, May 22-25, 2012, 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 菅 智宏: 横紋筋融解症. 筋疾患診療ハンドブック, 内野 誠 監修, 青木 正志 編集, 中外医学社, pp51-56, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

熊本大学神経内科ホームページ

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/neurology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅 智宏 (SUGA, Tomohiro)

熊本大学・医学部附属病院

非常勤診療医師

研究者番号: 9 0 6 1 3 5 2 1

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者