

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790614  
 研究課題名 (和文) mdx マウス横隔膜への治療用遺伝子 dystrophin の導入効率と治療効果  
 研究課題名 (英文) Effective dystrophin gene transfer into mdx diaphragm.

研究代表者  
 内田 友二 (UCHIDA YUJI)  
 崇城大学・薬学部・助教  
 研究者番号：70433026

## 研究成果の概要：

dystrophin 発現カセットとマーカーである LacZ 発現カセットをもつヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターを (Maeda ら. Virology, 2003) の方法に従い、作製した。その titer は約  $5 \times 10^{11}$  ～  $1 \times 10^{12}$  particles / ml であった。作製したウイルス溶液 40～50  $\mu$ l を 7 日齢のオスの mdx マウスの腹腔内に注入し、注入 1 週後に横隔膜を摘出して X-gal 染色を行い、横隔膜全体に対する  $\beta$ -gal の発現割合を評価したところ、その発現割合は 20～50% であった。次に、横隔膜の凍結筋切片を作製して dystrophin の免疫染色を行い、dystrophin 陽性の筋線維の割合を定量的に評価したが、その割合は約 10～20% であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋ジストロフィー、ジストロフィン、mdx マウス、アデノウイルスベクター、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルパーウイルス依存型アデノウイルス (以下 HDAd) ベクター (Parks et al., 1996) はアデノウイルスゲノムの DNA をほとんど欠いているために、cloning capacity が著しく拡大され、37 kb 程度までの導入遺伝子

の組み込みが可能である。その上、アデノウイルス (以下 Ad) ゲノム由来の蛋白をほとんど発現しないために、第 1 世代 Ad ベクターに比べて惹起される細胞性免疫反応が著しく減少した。作製の煩雑さとヘルパーウイルスの混入という問題点は残るものの、14 kb

の全長 dystrophin cDNA を組み込んだ HDAd を用いた *in vivo* での報告もあり (Gilbert et al., 2002)、本研究でもこの HDAd の系を利用することとした。

DMD のモデルマウスである *mdx* マウスの横隔膜へ経腹腔内投与により、上述の HDAd を用いて、治療用の遺伝子である dystrophin を簡便かつ広範囲に導入することは下記のような意義があるものと考ええる。我々も含めてこれまでの研究の多くは、体表から筋注しやすしい筋を治療対象としてきた。しかしながら、*mdx* マウスの四肢筋においては、DMD 筋とは異なり、筋病理変化が進行しないために dystrophin 導入による治療効果の判定が困難であった。*mdx* マウスの横隔膜では他の骨格筋とは異なり、筋病理変化が例外的に進行することがわかっている (Stedman HH et al, Nature, 352 (6335), 536-539, 1991)。DMD の主死因のひとつである呼吸筋麻痺との関連からも、*mdx* マウスの横隔膜への広範囲な遺伝子導入を可能にすることは臨床応用実現に向けて重要なステップの一つである。*mdx* マウスの横隔膜へのプラスミド DNA の直接導入 (Davis HL, et al, Human Gene Therapy, 4(2) 151-159, 1993) や、ウイルスベクターを用いて dystrophin を導入した報告は既にあるものの (Yang L et al, Gene Therapy, 5, 369-379, 1998, Matechi S et al, Am J Physiol Lung Cell Physiol, 287, L569-L576, 2004)、dystrophin 発現カセットを持つウイルスベクターを腹腔内に投与し、横隔膜に広範囲に導入した報告はない。

## 2. 研究の目的

治療用遺伝子である dystrophin 発現カセットを組み込んだヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター(以下HDAdLacZ-dys)を筋ジストロフィーのモデル動物である*mdx* マウスの腹腔内に注入する。注入後経時的に

、横隔膜での dystrophin の発現効率を評価する。その導入、発現持続により横隔膜の筋病理所見ならびに筋生理学的機能を改善させることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

*mdx* マウスのコントロールマウスである C57 black10 マウスおよび *mdx* マウスの横隔膜の筋張力(単収縮および強縮時)を測定して基礎 data とする。次に HDAdLacZ-dys 溶液 (40  $\mu$ l/1 個体) と、コントロールである同量 (40  $\mu$ l /1 個体) のウイルス粒子を全く含まないウイルス精製の透析液のみを *mdx* マウスの腹腔内に注入する。注入 2 週、8 週、16 週後の横隔膜全体へのマーカー遺伝子 (LacZ) の発現割合を、横隔膜全体に対する  $\beta$ -gal 発現面積の割合で半定量的に検討する。また、横隔膜の凍結筋切片を作製して dystrophin の免疫染色を行い、dystrophin が導入された筋線維の割合を定量的に評価する。ここまでで良好な導入効率を得られれば、さらに、dystrophin 導入による治療効果の判定に関して、中心核線維の割合を計算することにより筋病理所見の改善度を、筋張力(等尺性収縮)を測定することにより筋生理機能の改善度を評価する予定である。

## 4. 研究成果

まず基礎データとするために、6 週齢のオスの *mdx* マウスおよび C57black10 マウス(コントロール、以下 B10) の横隔膜の等尺性張力(単収縮、強縮)を測定した。単収縮時の張力は *mdx* では  $1.184 \pm 0.216$  (標準偏差) g 重、B10 では  $1.507 \pm 0.217$  g 重であった。強縮(刺激周波数 100Hz) 時の張力は、*mdx* では  $5.409 \pm 0.877$  g 重、B10 では  $9.030 \pm 0.060$  g 重であり、t 検定で明らかな有意差が得られた。そこで次に、*mdx* と B10 それぞれにおいて、刺激周波数を 1, 10, 20, 30, 50, 100, 150

(Hz)と漸増した際の周波数特性を評価した。その結果、mdx では B10 と比較して、周波数増に伴い、等尺性張力の差が明瞭となった。特に、刺激周波数が 50, 100, 150 (Hz)では、mdx でのその相対値は、それぞれ 0.617, 0.595, 0.579 であった。これらは、横隔膜に治療介入を行い、張力という機能面の治療効果判定を行う際に、非常に有用な指標となることが確認できた。

次に HDAdLacZ-dys 溶液を (Maeda ら, Virology, 2003) の方法で作製した。その titer は約  $1 \times 10^{12}$  particles/ml であった。作製したウイルス溶液  $40 \mu\text{l}$  を 1 週齢のオスの mdx マウスの腹腔内に注入し、2 週後に横隔膜全体に対する LacZ の発現割合を評価したところ、その割合は 30~50%であった。そこで、横隔膜の凍結筋切片を作製して dystrophin の免疫染色を行い、dystrophin 陽性の筋線維の割合を定量的に評価したが、その割合は 10~20%にとどまった。遺伝子導入がなされやすい幼若なマウスでの短期間の遺伝子発現効率を検討したにもかかわらず、横隔膜での dystrophin の発現効率は低値であった。

遺伝子導入効率の再検討のために、再度、HDAd を作製したところ、titer は約  $5 \times 10^{11}$  particles/ml であった。作製したウイルス溶液  $50 \mu\text{l}$  を 7 日齢のオスの mdx マウスの腹腔内に注入し、注入 1 週後に横隔膜を摘出して X-gal 染色を行い、横隔膜全体に対する  $\beta$ -gal の発現割合を評価したところ、その発現割合は 20~40%(Figure. 1) であった。次に、横隔膜の凍結筋切片を作製して dystrophin の免疫染色を行い、dystrophin 陽性の筋線維の割合を定量的に評価したが、その割合は約 10%(Figure. 2)にとどまった。今回作製した HDAd の titer が低かった影響も考えられるが、遺伝

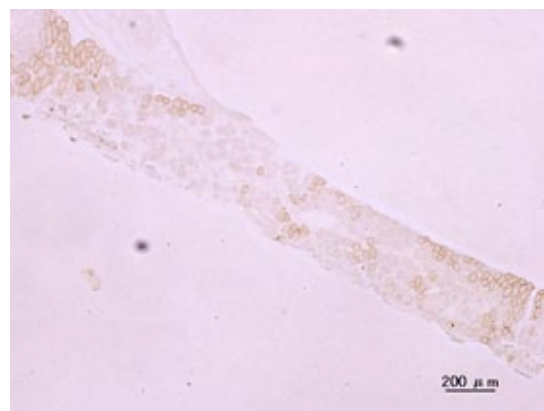
子導入がなされやすい幼若なマウスにおいて短期間での遺伝子発現割合を検討したにもかかわらず、横隔膜での dystrophin の発現割合は低値であった。

我々が過去に行った dystrophin 遺伝子導入実験の結果などから、上記の dystrophin 導入効率では病理学的、さらには筋生理学的な治療効果は期待できない。そのため、現在ウイルスベクターの titer を上げる工夫とともに、mdx マウス骨格筋の張力を改善させる可能性がある薬物について、遺伝子治療との併用療法を念頭に、培養細胞などを用いて研究を進めているところである。

Figure. 1 mdx 横隔膜での  $\beta$ -gal の発現



Figure. 2 mdx 横隔膜での dystrophin の発現



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2件)

① Kawano R, Ishizaki M, Maeda Y, Uchida Y, Kimura E, Uchino M: Transduction of full-length dystrophin to multiple skeletal muscles improves motor performance and lifespan in utrophin/dystrophin double knockout mice. *Molecular Therapy*, 16: 825-831, 2008.

② Ishizaki M, Suga T, Kimura E, Shiota T, Kawano R, Uchida Y, Yamashita S, Maeda Y, Uchino M: Mdx respiratory impairment following dystrophic change of diaphragm. *Neuromuscular disorders*, 18:342-348, 2008.

[学会発表] (計6件)

① Suga T, Ishizaki M, Kimura E, Uchino K, Koide T, Shiota T<sup>1</sup>, Uchida Y<sup>2</sup>, Maeda Y, Li S, Chamberlain JS, Uchino M: *Mdx* diaphragm muscle as a target of dystrophin gene therapy. 16<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Nov 13-16, 2008, Brugge, Belgium

② 石崎雅俊, 河野亮子, 前田 寧, 内田友二, 木村 円, 内野 誠: 新世代アデノウイルスベクターを用いた横隔膜への dystrophin 導入. 第49回日本神経学会総会, May15-17, 2008, 横浜

③ 河野亮子, 石崎雅俊, 阪本徹郎, 小出達也, 内田友二, 木村 円, 前田 寧, 内野 誠: 筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋への完全長 dystrophin 導入の効果. 第49回日本神経学会総会, May15-17, 2008, 横浜

④ 石崎雅俊, 河野亮子, 前田 寧, 内田友

二, 阪本徹郎, 小出達也, 木村 円, 内野 誠: 新世代アデノウイルスベクターを用いた進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療, 第25回日本神経治療学会総会, June 21-22, 2007, 仙台

⑤ Masatoshi Ishizaki, Ryoko Kawano, Yuji Uchida, En Kimura, Yasushi Maeda, Makoto Uchino: Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy by the Helper-Dependent Adenovirus vector (HDAdv)-Mediated Full-Length Dystrophin Expression, American society of Gene Therapy 10th annual meeting, May 30-June 3, 2007, Seattle, USA

⑥ 前田 寧, 石崎雅俊, 河野亮子, 内田友二, 阪本徹郎, 小出達也, 木村 円, 内野 誠: ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター (HDAdv) による DMD 遺伝子治療, 第48回日本神経学会総会, May 16-18, 2007, 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 友二 (UCHIDA YUJI)  
崇城大学・薬学部・助教  
研究者番号: 70433026

### (2) 研究分担者 なし