

新世代アデノウイルスベクターとトランスポゼースによる進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療

課題番号 18590951

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

平成20年3月31日

研究代表者 内野 誠

（熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野教授）

はしがき

遺伝子治療は現在主として遺伝性疾患や各種の癌など他に治療法のない致死性疾患を対象に実施ないし基礎研究が進められており、移植再生医療とならび将来の有望な治療法のひとつとなると考えられる。我々はこれまでに標的細胞へアデノウイルスレセプターを導入することにより発現効率を高め、ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターに改良を加え、発現効率のよいより安全なウイルスベクターの開発を進めてきた。すなわちアデノウイルスゲノムがもつ全ての蛋白遺伝子を欠失させ、代わりに治療用遺伝子のみ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（以下 HDAV）を開発し、full-length dystrophin およびアデノウイルスのアタッチメントレセプターである CAR を含む HDAV CAR-dys を作製し、反復投与により dystrophin の導入効率が上がり、成熟 mdx マウスでも一定レベル以上の dystrophin の発現を長期間維持することができることを明らかにした (Gene Therapy 2001, J Gene Med 2005)。ただ mdx マウスは臨床症状（筋力低下、筋萎縮、関節拘縮、歩行障害、体重減少、生存期間の短縮など）を殆ど示さないため、運動機能の改善、生存期間の延長などの臨床効果を確認することは困難であった。今回よりヒト Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）に DMD に類似した症状を呈する utrophin/dystrophin double knockout マウス(dko マウス)を用いて多方面から検討した。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、Sleeping Beauty トランスポゾンのシステムを用いて目的遺伝子を染色体に組み込むことで、dystrophin 遺伝子の長期発現が可能になるか否かについても検討した。これらの検討を通じて、ヒト疾患の遺伝子治療への臨床応用の可能性をさぐるものである。

研究組織

研究代表者： 内野 誠（熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野）

研究分担者： 前田 寧（熊本大学医学部附属病院）

研究経費

平成18年度	1,800千円
平成19年度	2,210千円
計	4,010千円

研究発表

（1）学会誌等

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. *Mol Ther* 2008 in press.

2. Sakamoto T, Arima T, Ishizaki M, Kawano R, Koide T, Uchida Y, Yamashita S, Kimura E, Hirano T, Maeda Y, Uchino M. Regions downstream from the WW domain of dystrophin are important for binding to postsynaptic densities in the brain. *Neuromuscul Disord* 2008 in press

3. Ishizaki M, Suga T, Kimura E, Shiota T, Kawano R, Uchida U, Uchino K, Yamashita S, Maeda Y, Uchino M. Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul disord*, 2008 in press

4. 内野 誠、河野亮子、石崎雅俊、内田友二、木村 円、前田 寧. 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への遺伝子治療. 平成18年度厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーに関連する疾患の病態生理と治療薬物の開発に関する研究 清水班 平成18年度班会議抄録集、pp 42. 2006

（2）口頭発表

1. Uchida Y, Maeda Y, Kimura E, Uchino M. Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a

helper-dependent adenovirus vector expressing the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and dystrophin, American Society of Gene Therapy 9th annual meeting, May 31-June 4, 2006, Baltimore, USA.

2. Kawano R, Ishizaki M, Uchida Y, Kimura E, Maeda Y, Uchino M. Restoration of physical performance in symptomatic utrophin/dystrophin double knockout (U/D dko) mice by the helper-dependent adenovirus vector (HDAAdv)-mediated full-length dystrophin expression. 11th European Society of Gene Therapy Annual meeting, Nov 9-12, 2006, Athens, Greece.

3. Ishizaki M, Kawano R, 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. American Society of Gene Therapy 10th annual meeting, May 30-June 3, 2007, Seattle, USA.

4. 内田友二、前田 寧、木村 円、内野 誠. Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a helper-dependent adenovirus vector expressing CAR and dystrophin. 第 12 回日本遺伝子治療学会、Aug 24-26, 2006, 東京

5. 河野亮子、石崎雅俊、前田 寧、阪本徹郎、小出達也、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進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療の効果. 第 47 回日本神経学会総会、May 11-13, 2006, 東京

6. 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. 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(1). 第 25 回日本神経治療学会総会、June 21-22, 2007, 仙台

7. 石崎雅俊、河野亮子、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進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療(2). 第 25 回日本神

経治療学会総会、June 21-22, 2007, 仙台

8. 前田 寧、河野亮子、石崎雅俊、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進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療(3). 第25回日本神経治療学会総会、June 21-22, 2007, 仙台

9. 小出達也、前田 寧、木村 円、内野 誠. DNA transposon system、adenovirus vector を用いた染色体への dystrophin 遺伝子の組み込み. 第25回日本神経治療学会総会、June 21-22, 2007, 仙台

10. 内野 誠、河野亮子、石崎雅俊、内田友二、木村 円、前田 寧. 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への遺伝子治療. 平成18年度厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーに関連する疾患の病態生理と治療薬物の開発に関する研究 清水班 平成18年度班会議 2006.12.1-2、東京

11. 内野 誠、石崎雅俊、河野亮子、阪本徹郎、小出達也、内田友二、木村 円、前田 寧. 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. 平成19年度厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 武田班 平成19年度班会議 2007.12.5-6、東京

研究成果の概要

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、dystrophin 遺伝子の欠失により進行性に筋萎縮が起こる致死性疾患であり、今日まで有効な治療方法は確立されていない。現在、根本的治療の開発に向けて多くの遺伝子治療が研究されており、その一つの手段として用いられるウィルスベクターの中で、唯一ヘルパーウィルス依存型アデノウィルスベクター(HDAdv)のみが、14Kb という巨大な完全長の dystrophin cDNA を含蓄することが可能である。さらに、自身のゲノムの大部分を削除することで、これまでのアデノウィルスベクターよりも免疫原性が低い HDAdv が開発されている。

我々は、この HDAdv に myc-tag を標識したマウスの完全長 dystrophin cDNA を挿入して HDAdv-myc-mFLdys を作成した。これを DMD 類似の重篤な進行性の筋萎縮、筋力低下をきたす utrophin/dystrophin double knockout マウス(dko マウス) (7 日齢) に筋肉注射した。注射は、DMD で最もつよく障害される近位筋をターゲットとし、複数箇所に行った。dco マウスは、DMD 患者と極めて類似した臨床症状および経過を呈することから、治療効果を評価するうえで非常に有用である。

注射後 8 週で、注射した筋肉において導入した dystrophin の発現を確認し、さらに dystrophin 関連蛋白である β -sarcoglycan や α -dystroglycan、neuronal nitric oxide synthase(nNOS)の発現も回復した。また、筋肉の異常な壊死再生を示す中心核線維数の減少を認め、発現している dystrophin が機能的に有効であることが示唆された。加えて dco マウス治療群では、体重の増加や運動機能の有意な改善を認め、寿命も延長していた。

今回我々は、HDAdv を用いた複数箇所の筋肉への完全長 dystrophin 導入によって、DMD のモデルマウスの治療に成功した。この結果は、この方法によって DMD 患者の症状を軽減し失われた機能を回復する有用な治療方法となりうる可能性を示唆している。

一方、アデノウィ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、Sleeping Beauty トランスポゾンのシステムを用いて目的遺伝子を染色体に組み込む研究については、2 年間施行錯誤を繰り返しながら実験を継続したが、transposon DNA の形状は circular である必要があり、linear の DNA は殆ど機能しないことが明らかになり、所期の目的を達成することは困難であることが判明した。

Summary

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal progressive muscle wasting disease caused by defects in the dystrophin gene. No viral vector except the helper-dependent adenovirus vector (HDAAdv) can package 14kb full-length dystrophin cDNA and HDAAdv is considerably safer than old-generation adenovirus vectors due to the large-size deletion in its genome. We have generated HDAAdv that carries myc-tagged murine full-length dystrophin cDNA (HDAAdv-myc-mFLdys). We injected it into the multiple proximal muscles of 7-day-old utrophin/dystrophin double knockout mice (dko mice), which typically show symptoms quite similar to human DMD because the proximal muscles are organs affected in DMD patients. Eight weeks after injections, the transduced dystrophin was widely expressed and we found a significant reduction of centrally nucleated myofibers and the restoration of dystrophin associated proteins, β -dystroglycan (β -DG) and α -sarcoglycan (α -SG), as well as neuronal nitric oxide synthase (nNOS). The injected dko mice also showed an increase in body weight, an improvement in motor performances, and prolonged lifespan. Using HDAAdv, we could treat DMD model mice, even when the therapeutic gene was transferred into multiple skeletal muscles. Our results suggest that multiple intramuscular administrations of HDAAdv carrying full-length dystrophin may reduce symptoms and compensate for lost functions in DMD patients.

For the long expression of target gene product, we tried to integrate the dystrophin gene into chromosome by using the sleeping beauty-transposone system and HDAAdv. However, it revealed that the DNA construct of HDAAdv is linear and it does not fit the circular DNA of the sleeping beauty-transposone system. So, further study is necessary to integrate the dystrophin gene into chromosome.

Key words : dystrophin, nNOS, helper-dependent adenovirus vector, gene therapy, Duchenne muscular dystrophy(DMD), *mdx* mouse, dko mouse

新世代アデノウイルスベクターとトランスポーゼによる進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療

[研究の背景と目的]

(1) 筋ジストロフィー

筋ジストロフィー（進行性筋ジストロフィー; progressive muscular dystrophy, PMD）は「筋線維の変性・壊死を主病変とし、進行性に筋力低下と筋萎縮を来す遺伝性疾患である」と定義され、遺伝形式、発症年齢、罹患筋の分布、臨床経過などにより、Duchenne 型(DMD)、Becker 型(BMD)、肢帯型(LGMD)、顔面肩甲上腕型(FSHD)、眼咽頭型(OPMD)、遠位型、先天性(CMD)などに分類されている。筋ジストロフィーの研究は、1987 年にアメリカの Kunkel らによって DMD 患者で dystrophin 遺伝子の変異が発見され、翌 1988 年には杉田らによって筋形質膜の dystrophin 欠損が証明されたことによって大きく発展し、現在では DMD/BMD のみでなく、他の筋ジストロフィーも次々に遺伝子座位の決定ないし原因遺伝子が単離されている(表 1)。

(2) dystrophin と dystrophin 結合蛋白

dystrophin 遺伝子は Xp21.2 に存在し、サイズは 2.6Mb にも及ぶ。エクソン数は 79、mRNA は 14 kb であり、ヒト X 染色体の 1%(ゲノム全体の約 0.1%)を占める。dystrophin は 427 kDa の巨大な細胞骨格蛋白であり、全長が約 150 nm の細長い棒状の構造をとる。N 端からアクチン結合、ロッド、システインリッチ、C 端の 4 つのドメインに分けられる。ロッドの部分は主として α -ヘリックスでできており、繰り返し単位が 24 個連なっている。それらの両端と中間に 4 個のヒンジとよばれる非 α -ヘリックス部分が存在する。上述の 427 kDa の筋型の dystrophin は骨格筋、心筋、平滑筋に存在するが、筋型の他に脳型(脳皮質に存在)、プルキンエ型(小脳のプルキンエ細胞に存在)、リンフォイド型(分布や機能は不明)という 3 種類の dystrophin が知られている。その他にも様々なイントロンにそれぞれの第一エクソンが存在する短い dystrophin がコードされており、現在のところ 4 種類が知られている。これらにはアクチン結合部位がなく非筋細胞で発現している。

筋型 dystrophin は筋形質膜の直下に存在し、N 末端側ではアクチンと結合し、筋線維の収縮・弛緩時に筋線維に弾力を与える働きを有していると考えられている。C 末端に近いシステインリッチドメインでは dystrophin 結合蛋白(dystrophin-associated proteins, DAPs)の一つである糖蛋白の β -dystroglycan(β -DG)と結合し、 α -dystroglycan(α -DG)、ラミニンを介して基底膜と連結している。sarcoglycan(SG)複合体に属する α -sarcoglycan(α -SG)、 β -sarcoglycan(β -SG)、 γ -sarcoglycan(γ -SG)、 δ -sarcoglycan(δ -SG)も正確な機能は解明されていないが DG と密接な関連を持つとされている。syntrophin 複合体は筋形質膜の内側で

dystrophin の C 末端に結合し neuronal nitric oxide synthase (nNOS)とも関与している。基底膜と細胞骨格蛋白を結ぶ軸には上述の dystrophin 軸の他に integrin 軸が存在している(図 1)。

(3) 筋ジストロフィーに分類される代表的な疾患

a) Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) / Becker 型筋ジストロフィー (BMD)

DMD と BMD はいずれも X 染色体劣性の遺伝形式をとり、同じ dystrophin 遺伝子の異常を原因とする疾患であるが、臨床的にはその病像、経過、予後は著しく異なる。DMD は PMD の中で最も頻度が高く、PMD 全体の約 6 割を占め、有病率は 2.6～5.5 人/10 万人で新生男児約 3500 人に 1 人の割合で発症する。通常 2～5 歳頃に転びやすい、走れない、階段を昇れないなどの歩行異常で気付かれ、初期より腰部部が障害されるために登はん性起立 (Gowers' 兆候)が認められる。腓腹筋の仮性肥大は本症に特徴的で例外なくみられる。また、約 20%の症例では知能障害の合併が報告されている。筋力低下と筋萎縮は常に進行性で、10 歳前後で自力歩行が不可能となり車椅子生活になる。従来は 20 歳前後に呼吸不全などで死亡する症例が多かったが、最近では人工呼吸器の普及や合併症の管理により平均寿命は若干延び、心不全で死亡する症例の割合が増加している。しかしながら極めて予後の悪い疾患であることに変わりはない。一方、BMD は症例によりばらつきはあるものの、発症年齢は DMD より遅く 5～10 歳頃に歩行異常で気付かれることが多い。筋力低下の進行は遅く、40 歳以前に歩行不能となる症例は約 10%に過ぎない。生命予後は DMD よりはるかによいが、四肢筋の筋力低下に比べて心筋障害の進行が早く心不全を来す症例がみられる。

DMD と BMD は allelic であり、欠失、重複、点変異などの dystrophin 遺伝子の異常により dystrophin 蛋白に欠陥を認める。dystrophin 遺伝子は巨大であるが故に突然変異をおこす頻度が高くなり、約 65 % の症例では欠失をみるが、とりわけエクソン 45～52 には欠失が多く認められる(hot spot)。dystrophin 遺伝子の欠失の大小と DMD/BMD の臨床的な重症度の間に明らかな相関はなく、遺伝子異常の結果新たに生じた premature termination codon などによって、dystrophin 蛋白が完全に欠損した場合に DMD となる。それに対して遺伝子変異がインフレームであった場合には、たとえ大きな遺伝子欠失が存在しても、短いが部分的に機能する dystrophin 蛋白がつくられ、BMD になると考えられている。現在までに有効な治療方法は確立されておらず、治療方法の開発へ向けてさまざまな研究が行われており、詳細は後述する。

b) 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD)

LGMD は、現在 17 種類が報告されている。そのうち多数を占め常染色体劣性遺伝形式をとるもの(LGMD2)と、常染色体優性遺伝形式をとるもの(LGMD1)に大きく分類される。発症年齢は

小児から成人までと幅があり、症状の進行速度も症例によって様々である。初発症状は肩甲帯もしくは腰帯部いずれかの筋力低下や筋萎縮であることが多い。近年、LGMD の遺伝子座ならびに原因遺伝子が相次いで同定されている(表 1)。しかしながら、各々の原因蛋白は細胞内の局在(図 1) や機能が異なるにも関わらず、臨床病型が近似している理由は不明である。

常染色体優性遺伝形式をとる LGMD1 の遺伝子座は現在までに 7 箇所が報告されている(LGMD1A~1G)。LGMD1A は成人発症で構音障害や顔面筋罹患が認められ、染色体 5q31 にある myotilin 遺伝子の異常によることが明らかになった(Hauser et al.,2000; Salmikangas et al.,1999)。57kDa の myotilin 蛋白はサルコメアに存在し α -アクチンと結合している。LGMD1B は心伝導障害を合併し、遺伝子座は染色体 1q21 に存在する。原因遺伝子として常染色体優性遺伝形式をとる Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(EDMD)(後述)と同じ核内蛋白質である lamin A/C の異常が明らかとなった(Muchir et al.,2000)。LGMD1C は染色体 3p25 に存在する caveolin3 遺伝子の異常が原因であることが判明している(Minetti et al.,1998)。caveolin は細胞膜のカベオラと呼ばれる陥入部分に存在する蛋白質で、caveolin3 は主として骨格筋に発現している。シグナル分子をはじめ種々の蛋白質や脂質と結合している。また nNOS や α -syntrophin、dystrobrevin を介して SG 複合体との関与が示唆されている。

常染色体劣性遺伝形式をとる LGMD2 の遺伝子座は現在までに 10 箇所が報告されている(LGMD2A~2J)。LGMD2A は染色体 15q15-21 にある筋特異的プロテアーゼである calpain3 (p94)の遺伝子異常による疾患である(Richard et al.,1995)。calpain3 は細胞内で筋原線維の弾性を保つ巨大な蛋白質である connectin/titin と結合しうる。最近 calpain3 の欠損が筋細胞核のアポトーシス変化を引き起こす可能性が報告されているが、calpain3 の異常が筋ジストロフィーの発症にどのように関与しているのかは定かではない。LGMD2B の原因遺伝子は染色体 2p12 に存在する dysferlin である(Bashir et al.,1998)。dysferlin は 230kDa の筋細胞膜に局在する蛋白であり、筋形質膜が障害を受けた際に、その形質膜の修復に関与するとされるが、その詳細な機能はいまだ不明である。desferlin は下腿後面の筋群が強く障害される遠位型(三好型)筋ジストロフィー(後述)の原因遺伝子として同定されており、LGMD2B が临床上は全く別の疾患とされている遠位型(三好型)筋ジストロフィーと同じ遺伝子の異常に起因することは極めて重要な知見である。LGMD2C~F は、DAPs の一つである SG の異常によって生じる重症の LGMD である(Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Matsumura et al.,1992; Ervasti et al.,1990)。骨格筋では 4 つの SG (α -, β -, γ -, δ -SG) が集まって複合体を形成しているが、これらの異常がそれぞれ LGMD2D, 2E, 2C, 2F に分類されている。いずれも SG の異常によるので sarcoglycanopathy と呼ばれる。臨床症状は、DMD 類似の北アフリカに多い小児重症型筋ジストロフィーあるいは悪性肢帯型筋ジストロフィーと呼ばれている重症例から、より良性の経過を

とるものまで様々である。同一家系内でも重症度が異なるという特徴がある。DMD/BMD とは異なり心筋障害はまれであり、知能障害は認めない。腓腹筋の仮性肥大はしばしばみられ、SG ノックアウトマウス(Araishi et al.,1999) で筋の肥大が出現することと一致している。重要なのは、一次的な異常がどの SG の異常であっても結果的には SG 複合体全体が影響を受け、免疫染色を行うとすべての SG が欠損あるいは著減していることである。DMD でも SG は著減するが、sarcoglycanopathy では dystrophin 染色には明らかな異常がないことが多く、DMD との鑑別診断のポイントになる。なお、我が国での sarcoglycanopathy の頻度は筋ジストロフィー全体の約 2%、LGMD の約 10%である。その他、LGMD2G の原因遺伝子は染色体 17q11-12 に存在する telethonin であることが明らかになっている(Moreria et al.,2000)。LGMD2I は最も多く見られるタイプであり、fukutin-related protein gene (FKRP)の変異によって起こる(Laval et al.,2004)。腓腹筋仮性肥大や、心不全、呼吸不全を呈し、臨床像は dystrophinopathy に類似するが、近年ステロイドに良好に反応する症例も報告され、今後の検討が期待されている(Darlin et al., 2007)。

c) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD)

FSHD は PMD のなかで 3 番目に多い疾患である。常染色体優性遺伝で浸透率が高い (約 95%)。発症年齢は小児から成人までと幅広いが思春期までに気付かれる例が多い。顔面頬部、肩甲、上腕筋の筋萎縮や筋力低下が強く、翼状肩甲が特徴的である。進行は比較的緩徐で筋症状は左右差を認めることが多い。網膜症や神経性難聴の合併が約 50%にみられる。遺伝子座は 4q35-qter (Weiffenbach et al.,1993; Wijmenga et al.,1992)にあり、この部位で D4Z4 repeat が短縮していることがわかっている(van der Maarel et al.,2005)。最近の研究で、FSHD ではこの D4Z4 に map されている double homeobox 4 gene (DUX4)や paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1)が、up-regulate していることが新たに判明し、これらの関与が示唆されている(Kowaljow et al.,2007; Dixit et al.,2007)。

d) 眼咽頭型筋ジストロフィー (OPMD)

OPMD は常染色体優性遺伝で、中高年で発症し、進行性の外眼筋麻痺、眼瞼下垂、嚥下障害が主症状であるが、生命予後は良好である。骨格筋の筋病理所見ではジストロフィー変化に加え、いわゆる rimmed vacuole がみられる。また、筋核内に特徴的な 8.5nm のフィラメント状封入体が認められる(Uyama et al.,2000)。染色体 14q11 にある poly(A) binding protein nuclear 2 (PABPN2) 遺伝子のエクソン 1 に存在する 3 塩基反復配列(GCG) n の延長がみられることが明らかになっている(正常では $n = 6, 7$ であるが、OPMD 患者では $n = 8 \sim 13$ である)(Brais et

al.,1998)。この(GCG) n の延長の長さ重症度は相関する傾向にあるが疾患の本質的な原因が、polyAの伸展にあるのか *PABPN2*の変異にあるのかははまだわかっていない。最近、OPMDモデルマウスが開発され(Hino et al.,2004)、病態の解明や治療法が開発が期待されており、ubiquitin-proteasome pathway (UPP)や cellular RNA metabolismの関与が示唆されている(Abu-Baker et al.,2007)。なお、OPMDと類似する眼咽頭遠位型ミオパチー(OPDM)が我が国では知られているが、後者では(GCG) n の延長はみられない。

e) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD)

EDMDは緩徐進行性の筋ジストロフィーで、アキレス腱、肘関節、脊椎の拘縮や心伝導障害、心筋症の合併が特徴的である。心伝導障害による突然死が50%にも及ぶことから、ペースメーカー装着が必須である。X染色体劣性の遺伝形式をとるX-EDMDが多いが、常染色体優性の遺伝形式をとるAD-EDMDもある。EDMDの原因遺伝子として最初に判明したのは、Xq28に存在するSTA遺伝子(Bione et al.,1994)で、この遺伝子にコードされる蛋白はエメリンと呼ばれている。エメリンは正常骨格筋や心筋では核二重膜の核質面に局在しているが、EDMD筋では欠損している(Nagano et al.,1996)。一方、AD-EDMDの原因遺伝子は染色体1q11-21にあり、同じく核内蛋白質である laminA/C をコードすることが判明した(Bonne et al.,1999)。laminA/CはLGMD1Bの原因遺伝子でもあり、筋形質膜や基底膜に関連する蛋白質ではない核膜関連蛋白質の一次的な異常によっても筋ジストロフィーが発症することが注目されていたが、最近の研究で nesprin という spectrin-repeat protein との相互作用の破綻が影響する可能性が指摘されている(Zhang et al.,2007)。

f) 遠位型筋ジストロフィー (遠位型ミオパチー, distal myopathy)

筋ジストロフィーの多くは近位筋優位の筋力低下を生じるが、遠位筋優位の筋力低下を特徴とする一群が存在し、これらは遠位型筋ジストロフィーと呼ばれている。大別すると三好型と rimmed vacuole 型遠位型ミオパチー(DMRV)に分けられる。三好型は常染色体劣性遺伝で、15~20歳で発症することが多く、血清CK(creatin kinase)値著高が特徴的である。下腿屈筋群(腓腹筋とヒラメ筋)が強く侵されるため、早期からつまさき立ちができなくなる。染色体2p13に存在する dysferlin と名付けられた原因遺伝子が同定されている(Liu et al.,1998)。前述のように LGMD2B と原因遺伝子が同じであり、この他に下腿伸筋が障害される distal anterior compartment myopathy も同じ遺伝子異常であり、これらをあわせて dysferlinopathy と呼ぶが、表現型の違いがどのような要因によって生じるのか現在までのところわかっていない。有効な治療法は確立されていないが、筋トーンや筋力改善を期待して使用される dantrolene に良

好に反応する症例の報告も散見されており、今後の大規模なコホート研究が待たれる(Hattori et al.,2007)。

DMRV は筋病理所見上、rimmed vacuole と呼ばれる細かい顆粒状の物質で縁取られた空胞を特徴とし、本邦で多くみられる疾患である。常染色体劣性遺伝であり、9 番染色体に連鎖することが知られている。発症は 20 歳代が最も多く、しばしば前脛骨筋が侵されるため、垂れ足を初発症状とすることが多い。一方、大腿四頭筋は比較的後期まで保たれる。進行は比較的早く、発症 10 年以内で歩行不能となることが多い。近年、DMRV モデルマウスの作成が成功したことで(Malicdan et al.,2007)、更なる病態の解明と治療法開発が期待される。なお、rimmed vacuole は本症に特異的ではなく、前述の OPMD や封入体筋炎などでもみられる。

g) 先天性筋ジストロフィー (CMD)

CMD は生下時あるいは乳児期早期から筋緊張の低下と進行性の筋力低下を呈し、発育、発達の遅れを認める疾患群であり、筋線維の壊死・再生など筋ジストロフィーの特徴を有するものをいう。乳児期に死亡するような重篤な例から、成人期になってごくわずかな筋力低下にとどまる良性のものまで幅広く、以下のような疾患がある。

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は無脳回や小多脳回などの脳の形態異常を伴った知能障害を合併する重症の CMD である。わが国では DMD に次いで多く認められるが外国からの報告はまれである。戸田らによって、FCMD の原因遺伝子は染色体 9q31 に存在し、461 アミノ酸からなる fukutin という蛋白をコードしていることが明らかにされた(Kobayashi et al.,1998)。FCMD のほとんどの症例では fukutin 遺伝子 3' 非翻訳領域に約 3kb のレトロトランスポゾンの挿入変異が認められる。fukutin の局在や機能については研究が重ねられており、糖鎖形成において α -DG に作用する可能性が示唆されているが、いまだ明らかではない(Yamamoto et al.,2006)。

メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーは、非福山型 CMD のうち原因遺伝子や病態が明らかになっているものの一つである。欧米に多く、古典型 CMD の約半数をしめるが、本邦における頻度は CMD のわずか 3% にすぎない。CMD の中でも重症の臨床経過を示し、歩行を獲得することは稀である。基底膜の主成分の一つにラミニンがあるが、本症は染色体 6q22-23 に存在するラミニン α 2 鎖遺伝子に異常が認められる(Helbling-Leclerc et al.,1995)。ラミニンは α -DG と結合し、基底膜を支えている重要な蛋白である。 α 2 鎖を含むラミニン分子をメロシンと呼ぶことから、この名がつけられた。本疾患は FCMD とは異なり、明らかな知能異常は認めないが、頭部 MRI で大脳白質に広範な高吸収域を認めるのが診断上有用である。抗ラミニン α 2 鎖抗体を用いて免疫染色を行うと、筋細胞周囲の基底膜での染色が欠損または著減している。しかし、

FCMD を含め二次的にラミニン $\alpha 2$ 鎖が欠損、減弱する疾患もあるため、診断には注意が必要である。筋病理所見は FCMD と近似しており、電顕で骨格筋細胞の基底膜が菲薄、分断化された極めて特異的な所見を認める。

(4) 現在行われている筋ジストロフィーの治療

現在行われている筋ジストロフィーに対する治療は、対症的な補助療法や支持療法にとどまっている。最も患者数の多い DMD では、生命予後に直結する呼吸筋の筋力低下による呼吸不全に対しては、以前は体外式陰圧人工呼吸が行われていた。しかし最近では、呼吸筋麻痺の初期には非侵襲的陽圧式人工呼吸(non-invasive (or nasal) intermittent positive pressure ventilation, NIPPV) が、より進行すれば気管切開下の人工呼吸器装着(tracheal intermittent positive pressure ventilation, TIPPV) が行われることが多くなった。これらの呼吸不全対策により平均寿命が延びており、30 歳以上の生存例も増えている。心不全に対しては、 β 遮断剤が有する心筋保護作用が注目され、少量の本剤投与が行われている例もある。副腎皮質ステロイド剤は現時点で筋障害に対する臨床的有効性が証明されている唯一の薬物である(プレドニゾン 0.36~0.75mg/kg/day)(Manzur et al.,2006; Moxley et al.,2005)。その作用機序はいまだ明らかではないが、筋力増強や運動機能の改善効果を期待して一部では使用されている。しかしながら、特に成長期の患児に使用する際の長期投与による副作用の問題がある。これらの治療法の進歩とともに、QOL の改善を目的として、残存する筋力を最大限に利用して意思伝達を可能にするための補助装置やコンピュータ機器も充実してきているが、根本的治療は行われていないのが現状である。今日、さまざまなアプローチによる遺伝子治療の研究が行われており、1 日も早く有効な治療法の確立が望まれている。

(5) 遺伝子治療の歴史的背景

遺伝子治療の概念は Tatum(1966)や Lederberg(1968)らにより提唱されたのが最初である。1926 年にバクテリオファージの注入による細菌感染治療の試みがなされているが、*in vivo*での遺伝子導入法の最初の臨床応用例は、従来からのワクチンの使用であったともいえる。その後、ポリヌクレオチドを導入する試みや、プラスミド発現ベクター、リポーター遺伝子、*in situ* 検出系の改良を基礎に、*in vivo*での直接的遺伝子導入が試されるようになった。ヒト遺伝子治療の最初の試みは 1960 年代の終わり頃に、Rogers が、ショープパピローマウイルスがアルギナーゼ遺伝子を含んでいるという研究結果をもとに、アルギナーゼ欠損症の患者にこのウイルスを投与したが、同症の 3 人の兄弟のアルギニンレベルにはなんら影響を及ぼさないという結果に終わった。1980 年、Cline は β グロビン遺伝子をヒト骨髄細胞に導入し、イスラエルとイタリ

アの 2 人の女性サラセミア患者に移植を行ったが効果はなかった。基礎研究が不十分であり、また大学(UCLA)の倫理委員会で承認が得られなかったためにエルサレムとナポリで見切り発車的に遺伝子治療実験を始めており、自然科学と方法論の両面から激しい非難を浴びた。このことをうけて米国では遺伝子治療を行うためのガイドラインの整備が進み、National Institutes of Health (NIH)は今後すべてのヒト遺伝子治療の治験は、組み換え DNA 諮問委員会(recombinant DNA advisory committee, RAC)で承認を受けなければならないと定めた。また 1985 年にヒトの遺伝子治療のガイドラインを定め、その後も技術の進歩に合わせて度々改定がなされている。RAC の承認を得て米国で最初の遺伝子治療が行われたのは 1990 年に入ってからであった。NIH の Blaese らは遺伝子マーキングの技術を応用して、単一遺伝子欠損の免疫不全症である adenosine deaminase(ADA)欠損症の患児のうち ADA の補充療法で効果がみられない症例に対して、本人のリンパ球に *ex vivo* で ADA 遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させ、患児の静脈内に繰り返し投与方法で治療を試みた(Blaese et al.,1995)。この方法は極めて有効であったために、それ以後遺伝子治療の臨床試験が加速した。当初は遺伝子治療のターゲットは単一遺伝子の異常による遺伝病であったが、そのアイディアは、他の分野(分子遺伝学、免疫学、腫瘍学など)の研究結果を応用する形で、癌や後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)、動脈硬化症、糖尿病、高血圧などへも広がりを見せている。

現在、遺伝子治療のストラテジーとして考えられているのは、1) 遺伝子異常を有する細胞の修復；異常遺伝子を正常遺伝子と置換、正常遺伝子や異常遺伝子の発現を抑える遺伝子の付加、2) 細胞の特定機能の増強；リンパ球の抗腫瘍免疫能の増強など、3) 細胞への新しい機能の賦与；癌細胞への co-stimulatory 分子遺伝子の導入による癌ワクチンの強化、線維芽細胞への凝固因子遺伝子の導入など、である。

(6) DMD モデル動物

1987 年に dystrophin 遺伝子がクローニングされると(Hoffman et al.,1987, Kenwick et al.,1987, Koenig et al.,1987)、DMD は遺伝性疾患治療のモデルとなり、様々なアプローチで遺伝子治療実験が行われた。その際重要であったのがモデル動物の確立である。筋ジストロフィーのモデル動物には、マウス、ハムスター、ニワトリ、イヌなどが挙げられるが、現在 DMD モデル動物として最も広く使用されているのはマウスであり、dystrophin を発現していない *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy)マウスが頻用されている。この *mdx* マウスは、1984 年にアメリカの Bulfield らによって、C57BL/10ScSn のコロニー内に血清 PK(pyruvate kinase)および CK(creatine kinase)高値のマウスがいることが発見されたことに始まった

(Bulfield et al.,1984)。その後の研究でこれらのマウスが dystrophin 遺伝子に point mutation を有し、エクソン 23 において premature termination codon をもつことが明らかになった (Sicinski et al.,1989)。mdx マウスは、生後 3 週頃より筋線維の壊死、細胞浸潤などがみられ始め、それらの所見は生後 5~6 週にピークになる。以後、程度はやや弱くなるが、死ぬまでそれらの所見を呈する。血清 PK および CK 値もまた生後 5~6 週頃にピークとなり、ずっと高い値を維持する。一方で、筋力低下などの症状は死ぬまでほとんどみられない。血清 CK 高値や筋病理学的には DMD と類似するものの、骨格異常や運動機能低下、寿命の短縮を認めず、DMD のモデル動物として不十分であることは当初から指摘されていた (Cooper et al.,1989; Bulfield et al.,1984)。mdx マウスに臨床症状がほとんど表れない原因として、筋線維の壊死-再生サイクルがはやく、しかも再生線維が比較的良好な機能をもつことや、dystrophin に高い相同性をもつ utrophin が up-regulation することで dystrophin の機能を代償しているためと考えられている (Hoffman et al.,1994; Tinsley et al.,1993)。utrophin は、dystrophin と同様に細胞骨格蛋白であり、その遺伝子座は 6q24 に位置する。胎生期には筋線維膜直下に局在するが、生下時に dystrophin に置き換わり、その後は神経筋接合部と筋腱接合部にのみ局在することが知られている (Law et al.,1994; Bewick et al,1993; Bewick et al,1992)。utrophin の機能は、dystrophin と同様にアクチンと細胞膜蛋白の連結と考えられ、神経筋接合部においてはアセチルコリン受容体と共在することからシナプスの細胞骨格の安定に関与していると考えられている。筋肉内での utrophin と dystrophin の相補作用を解明するために、utrophin knockout マウスと mdx マウスを交配して utrophin/dystrophin double knockout マウス(dko マウス)が作成された (Deconinck et al.,1997)。dco マウスは、mdx マウスではまだ筋病理異常が表れていない生後 6 日頃より、まず横隔膜で壊死像がみられ始め、生後 4 週頃には小さな体躯、脊椎変形など明らかな骨格異常を呈し、体重減少、関節拘縮、呼吸機能や運動機能低下が著しくみられ、寿命も約 20 週と極めて短い。死因は DMD 同様に呼吸不全や心不全と考えられており、DMD の臨床像と一致する。DMD の治療法を開発するうえで、病理学的改善ばかりではなく臨床像の改善も含めて評価することが求められるが、mdx マウスではこれは困難であり、DMD 臨床像のモデルマウスとして、dco マウスを用いて dystrophin 導入を試みた報告も増えつつある (Yue et al.,2006; Gregorevic et al.,2006; Wakefield et al.,2000)。

筋ジストロフィー犬について最初に報告されたのは 1958 年であった。その後自然発生する筋ジストロフィー犬の報告が散見されたが、1983 年、Cooper らによってゴールデンレトリバーの筋ジストロフィー犬が詳しく調べられ、コロニーがつけられた (CXMD; canine X-linked muscular dystrophy)。dystrophin 遺伝子に変異をもち遺伝形式は X 染色体劣性で、生後 8 週頃より筋力低下、開口障害、こわばった歩行など明らかな異常を呈する。その後数ヵ月間で症状

はさらに進行し、著明な筋萎縮、肘関節外反、踵関節内反、手根骨過伸展、足根骨過屈曲などがみられ、関節可動域制限も顕著になる。呼吸状態が悪くなり、脊椎や胸郭の変形もしばしば呈する。心エコー上、心筋の収縮性に異常を認め、心不全症状も呈する。生後 6 ヶ月頃までこれらの症状は進行するが、母犬が異なる個体間で症状の程度に差がある。血清 CK、AST、ALT はきわめて高値で、とくに CK 値は生後 2 日目ですでに高く、筋病理所見も DMD に類似する。寿命は長くて約 5~6 年である。日本では、2003 年にビーグル犬種のコロニーが確立されている (Shimatsu et al.,2003)。現在、筋ジストロフィー犬は一部の施設でのみ飼育可能であり、病態の解明とともに dystrophin 導入など遺伝子治療が試みられている (Wang et al.,2007; Sampaolesi et al.,2006; Shimatsu et al.,2005; Cerletti et al.,2003)。

(7) DMD の根本的治療に向けての歩み

筋ジストロフィーの有効な治療方法の確立を目指して、様々な遺伝子治療が研究されている。

骨格筋の修復過程において形成される新しい筋線維は、休眠状態の筋芽細胞である筋衛星細胞に由来する。そこで筋ジストロフィー患者の筋線維形成時に、正常の筋衛星細胞由来の核を病的な筋線維の中に入れることができれば、正常な遺伝子産物を供給できジストロフィー筋を正常な筋に変換できるのではないかと考えられた。この方法は、正常の筋芽細胞の中には治療に必要な遺伝子が存在し、またそれぞれの発現は正常なメカニズムでコントロールされているために、基礎的な遺伝的欠陥が明らかでない場合にも応用するという利点がある。Partridgeらは正常マウスの骨格筋を培養してヌードマウス化した *mdx* マウス筋内に筋芽細胞を注入した (Blaveri et al.,1999)。その結果 *mdx* マウスの筋線維では壊死後に活発な再生がみられるが、その再生途中の筋に培養した正常な筋芽細胞が取り込まれ、dystrophin を発現する筋線維が多数出現した。しかし多くの研究者が追試した結果では、ヌードマウス化していない *mdx* マウスの筋では拒絶反応が引き起こされるために取り込み効率は悪く、十分な dystrophin の発現はみられず、治療効果は確認されなかった。また 1999 年には、骨髄由来の幹細胞の一部には筋細胞に分化する能力があり、再生筋に取り込まれていることがわかり注目を集めた。骨髄幹細胞は、血流によって目的である骨格筋まで運ばれるため、経静脈的投与による有効性が期待され、患者から得られた骨格筋の幹細胞に *ex vivo* 操作で dystrophin 遺伝子を組み込み、それを増殖して経静脈的に返すというストラテジーが考えられたものの、筋への分化ではなく fusion ではないかという疑念や、たとえ分化するとしても筋細胞へ分化する骨髄幹細胞の割合の低さやその選別方法などの問題があり、現段階ではその有効性は明らかではない。骨格筋細胞へと分化する能力をもつ幹細胞は皮膚真皮細胞、血管細胞、神経細胞にも認められ、皮膚線維芽細胞に *MyoD* 遺伝子を組み込んで筋芽細胞へ変換する研究も行われたが、これらも実用化には至っていない。また最近の ES 細胞

を用いた再生医療の流れから、ES細胞に種々の遺伝子を発現させ筋細胞への分化を誘導する技術(Prelle et al.,2000)を用いて、移植する筋芽細胞を作成する実験も行われている。

また、プラスミドを直接マウスの骨格筋内に注入する方法(Wolff et al.,1990)を用いて、短期間ながら骨格筋に dystrophin を発現させることに成功した報告がある(Acsadi et al.,1991)。この方法は多くの研究施設で追試されたが、結果として筋ジストロフィーを治療するためには dystrophin の発現が量的にも期間の面からも不十分であった。しかしながらこれらの研究で集積された知見から導き出された結果として、骨格筋は他の臓器と比較してプラスミドの取り込み効率がよいことが明らかになった。この事実は、分泌蛋白(Rizzuto et al.,1999)や血管新生を促す因子(Tsurumi et al.,1996) を産生する場として骨格筋を用いる方法に応用されている。現在までに臨床試験も行われ、完全長 dystrophin を発現しているプラスミド DNA を、9人のDMD患者の radial muscle に筋肉注射で導入する方法が第I相まで終了している。結果として、免疫反応を始めとする副作用はみられなかったものの、dystrophin の発現率は、6%と非常に弱く、より効率のよい遺伝子導入法の開発が期待されている(Romero et al.,2004; Romero et al.,2002)。

抗マイオスタチン療法は、骨格筋量をネガティブに調節する増殖抑制因子であるマイオスタチンを阻害することで筋肉の肥大を期待する方法である。*mdx* マウスにマイオスタチン阻害抗体を投与すると、ジストロフィー変化が改善したという報告から(Khurana et al.,2003)、新たな筋ジストロフィーの治療法として注目され、欧米では BMD、LGMD、FSH を対象とした臨床試験も行われている(Sunada,2006)。近年、マイオスタチン機能阻害手段として、特異的にマイオスタチンを阻害できる改変 follistatin の開発(Nakatani,et al.,2007)に成功し、創薬のターゲットとして期待されている。

エクソンスキッピング誘導療法は、premature termination codon を含むエクソンか、欠失部位に隣接するエクソンに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてスキッピングを人工的に誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠のアウトオブフレームをインフレームに修正して短縮型 dystrophin を発現させる方法である。*mdx* マウスで行った研究では、比較的高率に dystrophin の発現を得ることができた(Lu et al.,2003)が、対象となるのは欠失部位が判明している症例に限定され、DMD 遺伝子変異の hot spot といわれるエクソン 51 でも、それ単独では DMD 患者の 17%しか対象とならない。しかしその後、DMD 患者の細胞において multiple skipping が成功し、この方法によって DMD 患者の最大 85%にエクソンスキッピングが有効である可能性がでてきた(Aartsma-Rus et al.,2004)。さらに最近の研究では、エクソン 45~55 の multiple skipping によって実に 63%の DMD 患者が治療可能となるといわれている(Beroud et al.,2007)。世界で初めてエクソン 19 のスキッピングに成功したのは神戸大学のグループで

あり(Pramono et al.,1996)、2003年には日本でエクソン 20 を欠失した DMD 患者に対して、エクソン 19 のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの静脈投与が実施された。しかし骨格筋での dystrophin の発現効率は低く、治療後の血清 CK 値にも改善はみられず、さらなる研究が期待されている(Takeshima et al.,2006)。現在、スイスとイギリスで臨床試験が進行中であり、両者ともエクソン 51 単独のスキッピングであるが、ともに全身投与が計画されており結果報告が待たれる(Arechavala-Gomez et al., 2007; Foster et al.,2006; Mutoni et al.,2005)。また、dystrophin の遺伝子にナンセンス突然変異を有する症例に対しては、premature termination codon を薬剤などで read-through させて、dystrophin 蛋白を合成させる方法が考えられている。ゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質の read-through 活性が高いため、これらの薬剤を用いた検討がなされているが、薬剤の毒性や read-through 効率の問題があり、臨床応用には至っていない。

(8) ウイルスベクターを用いた治療

DMD の遺伝子治療を実現するために期待されている方法の一つがウイルスベクターを用いた治療である。その中で最も歴史があるのはレトロウイルスベクターで(Dunckley et al.,1993; Dunckley et al.,1992)、前述した筋芽細胞移植とレトロウイルスベクターを組み合わせた *ex vivo* 遺伝子導入法が主体であった。これは、高力価のウイルス液をとるために感染した細胞を薬剤で選別する必要があったからである。しかし、この方法では筋芽細胞が再生筋に取り込まれる効率が悪く十分な効果は得られなかった。最近では、技術の進歩とともに、高力価のウイルス液をとることが可能となり、条件付きながら *in vivo* での使用も可能となっている。

レンチウイルスベクターはよく研究されている human immunodeficiency virus type 1(HIV1)を元に作成され、非分裂細胞への遺伝子導入と染色体へ挿入される点が特徴である。プロウイルスゲノムを以下の3つに分割し 293T 細胞にトランスフェクションして作成する。3つのプラスミドとは、LTR(long terminal repeats)を CMV プロモーターと poly(A)シグナルに置き換え HIV1 本来のエンベロープを欠いたパッケージングプラスミド、vesicular stomatitis virus G glycoprotein(VSV-G)をコードするエンベローププラスミドおよび導入遺伝子をコードするベクタープラスミドである。VSV-G をエンベロープに置き換えているためにターゲットが広がり、理論的に野生型の HIV1 が出現することはない。また比較的高力価のウイルス液の回収が可能である。DMD の遺伝子治療としてこれまでに報告されているのは、mini-dystrophin をパッケージングしたレンチウイルスベクターを *mdx* マウスの骨格筋に筋肉注射で導入し、少なくとも6ヵ月間、遺伝子の有効な発現を維持できたというものや(Li et al.,2005)、レンチウイルスベクターを用いて micro-dystrophin を様々な未分化幹細胞に導入し *mdx* マウスに静脈内

投与を行ったところ、骨格筋に dystrophin の発現を認めたというものがあり(Barchrach et al.,2004)、今後の進展が期待されている。

アデノ随伴ウイルスベクター(Adeno-associated virus, AAV)は、ヒト 19 番染色体に特異的に挿入される性質を持つために、発現が長期に及ばないとされるアデノウイルス(Ad)の欠点を補うことができる可能性があり、注目を集めている。ウイルスゲノムが小さいためにパッケージングサイズが約 4.7kb に制限され、またベクター化したものはウイルスゲノムを欠くために 19 番染色体に特異的に挿入される性質に必要な Rep 蛋白質遺伝子を失っており、長期発現と安全性の両立という最も期待されていた機能が欠けている。しかしながら、Ad やヘルペスウイルスとのハイブリッドベクターにすることで Rep 蛋白を発現させる試みや(Liu et al.,2006; Liu et al.,2005; Bakowska et al.,2003; Wang et al.,2002)、dystrophin 遺伝子を AAV ベクターに組み込むことが可能なように、巨大な dystrophin 遺伝子のロッドドメインをコードする部分の一部を短縮した短縮型 dystrophin (mini-dystrophin, micro-dystrophin)を用いた研究も進んでいる。最近では、dco マウスへの血管内投与で全身への dystrophin 導入に成功したという良好な結果を得ており(Gregorevic et al.,2006)、今後の研究が期待されている。

ヘルペスウイルスベクターは潜在的に大きなパッケージングサイズ(30~50kb)を有し、さらに元々もっている神経細胞の染色体外に長期に潜伏感染する性質を利用して研究が進められている。複製機能を有するタイプと有しないタイプがあり、中枢神経系を主なターゲットとして研究が進められている。本来のゲノムのサイズが約 150kb と大きいことや細胞毒性の面で実用化が遅れていたが、先述した AAV とのハイブリッドベクターや、最近ではとくにヘルペスウィルスの構造蛋白の一つである VP22 を融合させることで、より効率の良い発現を実現する方法が注目を集めている(Xiong et al.,2007)。

アデノウイルスベクター(Adv)は成熟した骨格筋のような非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり、比較的高い力価のウイルス液を得やすい点や染色体への組み込みがほとんど起こらないという安全性の面から、多くの遺伝子治療に使用されてきた。ヒトアデノウイルスは 1953 年に初めて発見されて以来、これまでに 47 種の異なった血清型が同定され、A~F の 6 つのグループに分類される。アデノウイルス(Ad)は一般的には眼、気道、消化管などの分化した上皮細胞に感染し、血清型によって組織特異性や毒性に違いがある。C 亜型の Ad2 と Ad5 は軽微な呼吸器感染症を引き起こすことが知られており、生化学かつ遺伝学的に最もよく研究されている。Ad は約 36kb の線状 2 本鎖 DNA を中心とする複雑な非エンベロープ 20 面体カプシド蛋白からなる(Philipson,1984)。宿主となる細胞への侵入様式は完全に明らかではないが、Ad は細胞内への取り込みに際して、効率的な細胞侵入機構と細胞の小胞体システムから逃れる手段を持ち合わせており、リソソームによる破壊を回避できうという点で、非ウイルスベクターによるト

ランスフェクションと遺伝子導入効率において決定的な差を有するものと考えられる。Adは理論的には比較的大きな外来のDNA断片を運ぶことが可能なゲノムを持っているので、早期から遺伝子導入用ベクターとして興味を持たれ、1977年にGrahamらによってAd5のE1領域を発現する細胞株(293)ができること(Graham et al.,1977)、ヘルパーウイルスを用いずに簡便に組み換えAdを構築することができるようになった。さらに斉藤らは、組換え体作成時のAd遺伝子として、ウイルス遺伝子に結合してウイルス複製の際にプライマーとして働く末端蛋白(terminal protein, TP)とAdゲノムDNAの複合体を用いることで、従来の方法より効率的かつ親ウイルスの出現がほとんどみられない方法(COS-TPC法)を開発し(Miyake et al.,1996)、本邦で用いられているほとんどの第1世代Advがこの方法で作成されている。しかしながら当初期待されていた非分裂細胞での導入遺伝子の長期発現はみられず、その原因としては宿主の免疫反応を惹起することや、導入遺伝子のプロモーター活性が低下するなどいくつかの問題が考えられている。Advに対する宿主免疫反応は、カプシド蛋白に対する中和抗体(液性免疫)の出現と、感染細胞がウイルス由来の蛋白質を発現することに対する細胞性免疫反応に大別される。これらを解決する方法としては、Advと免疫抑制剤(Lochmuller et al.,1996)やCTLA4Ig (Schowalter et al.,1997)との共投与で一定の効果がみられた報告や血清型が異なるAdを元にベクターを作成した報告がある(Parks et al.,1999)。

ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター (HDAAdv)は、第1世代Advで問題となっていたパッケージングサイズの制限(~8kb)とAdvにより惹起される細胞性免疫を解決するために考案され、ヘルパーウイルスを用いた新しい系(Chen et al.,1997; Clemens et al.,1996)とバクテリオファージのCre-loxP系を利用し、安定してCre recombinaseを発現している293細胞とパッケージングシグナル配列(ψ)をloxPで挟み込んだヘルパーウイルスを用いて、両端の繰り返し配列(inverted terminal repeat, ITR)と ψ を除くすべてのアデノウイルスゲノムを欠くベクターとして開発された(Parks et al.,1996)。この系を用いて作成されたHDAAdv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クローニングキャパシティが非常に大きく、37kb程度までの導入遺伝子の搭載が可能となった(Clemens et al.,1996; Kochanek et al.,1996; Mitani et al.,1995)。その上、Ad由来の蛋白質をほとんど発現しないために、第一世代Advに比べて惹起される細胞性免疫反応が著しく小さい。作成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、14kbという巨大な全長dystrophin cDNAを組み込むことが可能である。さらに前田らによって、よりゲノムの混入を抑えた改変ヘルパーウイルスが開発され(Maeda et al.,2003)、遺伝子治療の応用へ可能性が広がっている。HDAAdvを用いた遺伝子導入実験では、*mdx*マウスに対して完全長dystrophinを導入し、筋生理機能が改善したとの報告(Gilbert et al.,2003; DelloRusso et al.,2002)や、完全長dystrophinとともに自身のレ

セプターを組み込んだ HDAdv によって骨格筋の感受性を増強させ、反復投与の有効性を証明した報告がある(Uchida et al.,2005; Kimura et al.,2001)。

(9) 本研究の目的

本研究で我々は、dco マウスの四肢近位筋および体幹の骨格筋に HDAdv を用いて完全長 dystrophin を導入し、その治療効果を病理学的観点および運動機能の観点から評価、検討する。

発見から約 20 年が経過しているにもかかわらず、dystrophin 遺伝子の機能は完全に解明されていない。そこで私は、完全長の dystrophin を導入することがきわめて重要であると考え、14kb という巨大な完全長 dystrophin cDNA をすべてパッケージングすることが可能な HDAdv を用いて、完全長 dystrophin の導入を試みた。導入方法は、治療の対象となる筋肉以外の臓器へのベクターの暴露を回避するために筋肉注射とし、さらに、局所性を補うために複数箇所に行った。治療効果の評価には、病理学的検討はもちろん臨床症状の改善についても検討する必要があると考え、従来頻用されてきた mdx マウスよりも DMD に類似した症状を呈する dco マウスを用いて多方面から検討した。これらの結果をもとに、HDAdv による完全長 dystrophin 導入の可能性について考察する。

表 1. 主な進行性筋ジストロフィーの分類と遺伝子座・原因遺伝子

疾患名	遺伝子座	遺伝子産物
X 染色体劣性		
Duchenne 型	Xp21	ジストロフィン
Becker 型	Xp21	ジストロフィン
Emery-Dreifuss 型 (XR)	Xq28	エメリン
常染色体優性		
肢帯型成人型 (LGMD 1A)	5q31	ミオチリン
(LGMD 1B)	1q21	ラミン A/C
(LGMD 1C)	3q25	カベオリン-3
(LGMD 1D)	6q23	unknown
(LGMD 1E)	7q	unknown
(LGMD 1F)	7q32	unknown
(LGMD 1G)	4p21	unknown
Emery-Dreifuss 型 (AD)	1q11-21	ラミン A/C
顔面肩甲上腕型	4q35	unknown

眼咽頭型	14q11.2-13	ポリ A 結合蛋白 2 (GCG)6~7→8~13
筋強直性ジストロフィー type1	19q13	ミオトニンプロテインキナーゼ
type2	3q21	Zing finger protein 9
常染色体劣性		
肢帯型若年型 (LGMD 2A)	15q15.1-q21.1	カルパイン-3
(LGMD 2B)	2p12	ジスフェリン
(LGMD 2C)	13q12	γ - サルコグリカン
幼年型 (LGMD 2D)	17q12-q21.33	α - サルコグリカン
アマン族型 (LGMD 2E)	4q12	β - サルコグリカン
(LGMD 2F)	5q33-q34	δ - サルコグリカン
(LGMD 2G)	17q11-q12	テレソニン
(LGMD 2H)	9q31-q34.1	TRIM32
(LGMD 2I)	19q13.3	FKRP
(LGMD 2J)	2q24.3	Titin
遠位型 (三好型)	2p13	dysferlin
rimmed vacuole 型遠位型ミオパチー	9	unknown
眼咽頭型遠位型ミオパチー	unknown	unknown
先天性		
Welander 型	2p13	unknown
福山型	9q31	フクチン
インテグリン α 7 欠損症	12q-13	インテグリン α 7
ラミニン α 2 鎖 (メロシン) 欠損症	6q22-23	ラミニン α 2 鎖
メロシン正常型	unknown	unknown
Walker-Warburg 型	9q34	POMT 1/2
Muscle-Eye-Brain type	1p32-34	POMGn T1
Ullrich 病	21q22	Collagen VI α 2
	2q37	Collagen VI α 3

表 2. 遺伝子治療に用いられるウイルスベクターの特徴

遺伝子導入ベクターの種類	最大挿入サイズ	染色体への組み込み	非分裂細胞への遺伝子導入	生体内での発現期間	安全性に関する問題
--------------	---------	-----------	--------------	-----------	-----------

レトロウイルス	7-7.5kb	あり	不可能	短い?	発がん性など?
レンチウイルス	7-7.5kb	あり	可能	長い	発がん性など?
アデノウイルス	-37kb	なし	可能	短い	炎症反応
アデノ随伴ウイルス	-4.7kb	あり/?	可能	長い	炎症反応
ヘルペスウイルス	30-50kb	なし	可能	長い?	炎症反応
Naked DNA	制限なし	なし	可能	短い	なし

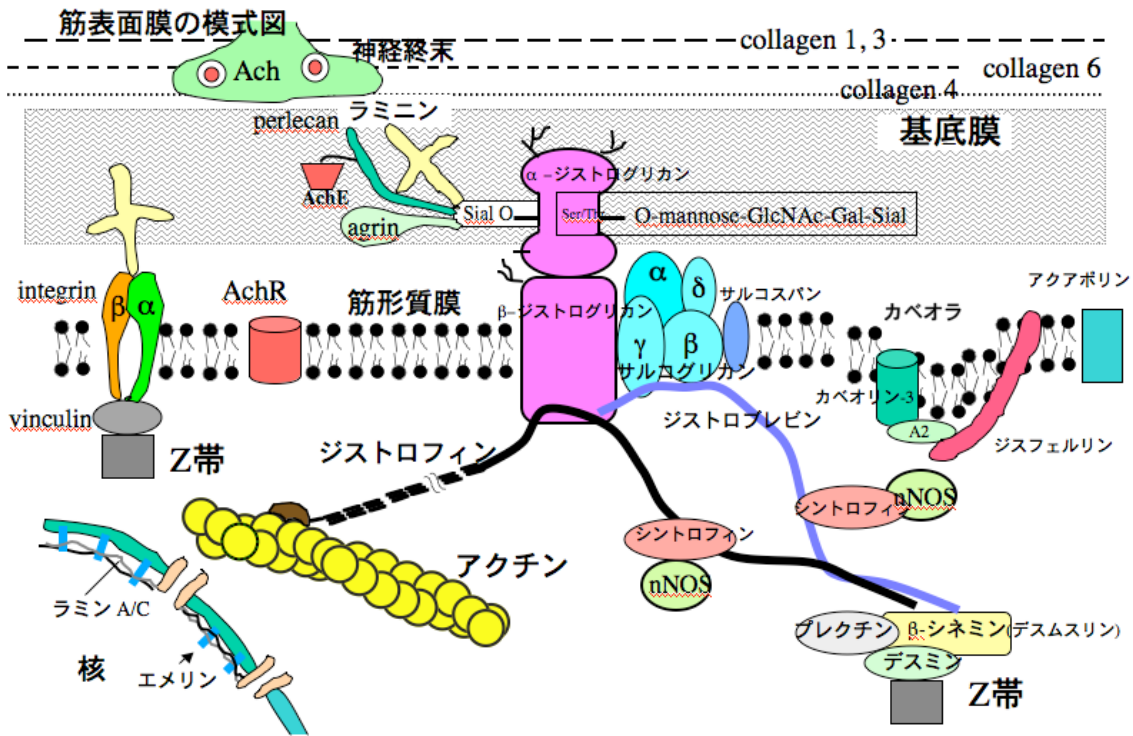


図 1. dystrophin と関連蛋白の局在

[実験方法]

本研究は、熊本大学遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則（課題名：

Utrophin-Dystrophin-Deficient Mice を用いて臨床症状や生理機能の経時的観察・評価および、アデノウィルスベクターを用いたジストロフィン導入の効果等に関する検討、平成 17 年 7 月 4 日承認、承認番号 17-17) および熊本大学動物実験指針 (課題名 : Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子治療に関する研究、承認番号 N18-031) を遵守して行われた。

(1) 培養細胞

本研究で使用した cell line は以下の 2 つである。COS7 ; monkey kidney cells (American Type culture Collection, Manassas, VA, USA) そして Cre recombinase を安定して発現している HEK293 ; human embryonic kidney cells (= Cre293) である(Maeda et al.,2003)。細胞はすべて 10% fetal bovine serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA),と 50 U/ml penicillin、50U/ml streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)を加えた DMEM (Dulbecco' s modified Eagle' s medium) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)で維持し、37℃、5% CO₂ 下で培養した。

(2) ヘルパーウィルスの作成

本研究で使用したヘルパーウィルス(AdASw)は、COS-TPC 法を用いて作成した(Miyake,et al., 1996)。まず、2 つの並行する *loxP* site をもつ pAdex-Asw-*lox* の *Swal* site に、 λ -phage の *EcoRV* fragment(4.6kb, nt 2087 to nt 6683)を挿入して、アデノウィルスのパッケージングシグナルである ψ をもつ cosmid pAdex-ASw-*lox*-4.6 λ を作製し、この cosmid がアデノウィルスの左側端領域の配列をもつことを確認した。つぎに、E3 領域をもつ wild-type のアデノウィルスゲノムを *EcoT22I* site で digest し、その 0.5 μ g を terminal protein(TP)と 14.5mg の pAdex-Asw-*lox*-4.6 λ とに共結合させ混合した(Maeda et al.,2003)。直径 60mm のディッシュ内で、HEK293 細胞と混合された DNA をリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした。Over night でトランスフェクションしたのち、ディッシュの細胞層を 0.5%アガロースゲルを含む細胞培地で覆った。組み換えたウィルスを標準的手法によって精製し増幅させた(Graham et.al,1991)。

(3) ヘルパーウィルス依存型アデノウィルスベクター(HDAdv)の作成

マウス full-length dystrophin cDNA fragment はプラスミド pCCL-DMD (Lee et al.,1991) からとり、pCAGGS (Niwa et al.,1991)に ligate した。このプラスミドは pCAG-mFLdys と名付けた(Uchida et al.,2005)。pBluescript を backbone とし、inverted terminal repeats(ITR)、 ψ および *Emx-2 gene*(Yoshida et al.,1997)の一部を 13kb の stuffer としてもつプラスミドを

pPN13 と名付け、これに pCAG-mFLdys から取り出した dystrophin 発現カセットだけを ligate した。さらに 10 アミノ酸からなる内在性 myc 蛋白由来の myc-tag オリゴヌクレオチド (EQKLISEEDL)(Campbell et al.,1992)を dystrophin cDNA の unique *Swa*I site に挿入し、こうしてできたプラスミドを pPN-myc-mFLdys と名付けた。myc-tag、dystrophin およびそれら周囲の配列はシーケンスで確認した。pPN-myc-mFLdys を *Not*I site で digest し、それをリン酸カルシウム法で Cre293 細胞にトランスフェクションしたのち、AdAsw をおよそ m.o.i.(multiplicity of infection) 3 で感染させ、増幅を繰り返す、最後に塩化セシウムの密度勾配法で精製した。精製された HDAdv の particle titer を 260nm の吸光度で測定し (Mittereder,et al.,1996)、最終的に vector titer 5.8×10^{12} (virus particles/ml)を得、これを HDAdv-myc-mFLdys と名付けた。AdAsw の混入は 1%以下であった。myc-tag と full-length dystrophin の発現は Western blotting 法で確認した。感染させた COS7 細胞と注射した筋肉から、cell lysis buffer を用いて蛋白を抽出し、同量の蛋白を SDS-PAGE で fraction し、ニトロセルロース膜(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)に転写した。dystrophin の検出には、rabbit polyclonal anti-dystrophin antibody である dystrophinH-300(1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA)を使用し、myc-tag の検出には monoclonal anti-c-myc (mouse IgG1 isotype)である clone9E10(1:50; SIGMA,USA)を使用した。HDAdv 作成の概要は図 2 に示す。

(4) 実験動物

本研究では、先述した dko マウスおよび wild-type コントロールとして C57BL/10 を用いた。

本研究で使用した dko マウスは、Deconinck らによって作成された dko マウスを(Deconinck et al.,1997)、日本実験動物中央研究所の埜中博士、国立精神神経センターの武田博士を通して供与していただいたものである。交配には utrophin heterozygous マウス (*utro*^{-/+},mdx) を使用し、産まれた仔の尻尾から DNA を抽出し、Deconinck らと同じくマウスユートロフィンエクソン 7 の forward primer (5' GTG AAG GAT GTC ATG AAA G 3')、イントロン 7 と PGK promoter の reverse primer である (5' TGA AGT CCG AAA GAG ATA CC 3')、(5' ACG AGA CTA GTG AGA CGT GC 3')の 3 つの primer を用いた PCR により遺伝子診断を行った (Deconinck,et al.,1997)。PCR は(94°C,30s; 53°C,30s; 72°C,25s; 30cycles)の条件下で行った。

(5) 注射計画

マウスは 6 日齢までに genome-typing を行い、7 日齢で dko マウスの両上肢・背側・両大

腿・両下腿それぞれにHAdv-myc-mFLdysを5 μ lずつ、計40 μ l/1body 筋肉注射した。具体的な注射筋は両側の上腕三頭筋、大腿四頭筋、前脛骨筋(tibialis anterior, TA)および傍脊柱筋または広背筋である。注射は1回のみ行った。注射にはマイクロシリンジ(Hamilton, Reno, NV, USA)と30G1/2の針(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を用い、深さ1~2mm刺入した。注射の前にマウスはon iceで麻酔をした。注射後8週(9週齢時)で運動機能評価を行い、その後頸椎脱臼で安楽死させ組織学的評価および筋張力測定を行った。

(6) 組織学的検討と免疫染色

マウスを安楽死させた後、注射した部位の筋肉を取り出して液体窒素で凍結した。凍結した筋肉はクリオスタットで10 μ mの厚さにスライスし、H.E.染色あるいは蛍光免疫染色した。

dystrophinの蛍光免疫染色の一次抗体は、dystrophin H-300(1:100; Santa Cruz Biotechnology)を用い、二次抗体はAlexa 546-labeled goat anti-rabbit IgG(H+L)(1:100; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いた。myc-tagの検出には、clone9E10(1:50; SIGMA, USA)を一次抗体として用い、二次抗体はAlexa 488-labeled goat anti-mouse IgG(H+L)(1:1000; Molecular Probes)を用いた。 β -DGの検出にはmouse monoclonal anti- β -dystroglycan(NCL-b-DG)(1:50; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)を一次抗体に用い、Alexa 488-labeled goat anti-mouse IgG(H+L)(1:1000; Molecular Probes)を二次抗体として用いた。 α -SGの検出にはmouse monoclonal antibody anti- α -sarcoglycan(Adhalin)(NCL-a-SARC)(1:100; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)を一次抗体に用い、Alexa 488-labeled goat anti-mouse IgG(H+L)(1:200; Molecular Probes)を二次抗体として用いた。nNOSの検出には、rabbit polyclonal anti-nNOS C-terminus antibody, NOS1(R-20)(1:50; Santa Cruz Biotechnology)を一次抗体として用い、二次抗体はdystrophinと同様にAlexa 546-labeled goat anti-rabbit IgG(H+L)(1:100; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いた。

細胞性免疫応答反応の指標として、dystrophin発現部位におけるCD4/CD8陽性細胞数を評価した。CD4とCD8の一次抗体には、順にrat monoclonal anti-mouse CD4 antibody(1:20; clone RM4-5, BD Bioscience)、rat monoclonal anti-mouse CD8 antibody(1:20; clone RM4-5, BD Bioscience)を用いた。

染色した切片は、confocal laser scanning microscope(LSM410, Carl Zeiss Microscopy, Sena, Germany)とoptical microscope(DP70-WPCXP, Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

組織学的改善については下腿の筋肉で評価した。評価にはコンピュータソフトウェア WinROOF(version 5.6, MITANI CORPORATION, Japan)を使用した。

(7) 運動機能評価

9 週齢のマウスの運動機能を評価するために footprint テストと赤外線自動センサーを利用した運動量の定量化を行った。

Footprint test は縦 25cm、横 7cm、高さ 14cm のプラスチック製の容器に 1 匹ずつマウスを入れて行き、マウスが自然に歩ける環境でつま先からつま先までの直線距離を一歩とみなし、数歩を計測して平均の歩幅を求めた。

運動量の定量化には locomotor activity を用いたが、これは automated activity counter (NS-AS01 ; Neuroscience, Inc., Tokyo) を使って測定した (Egashira et al., 2005; Matsushita et al., 2005)。縦 24cm、横 17cm、高さ 12cm の透明なアクリル製の容器に 1 匹ずつマウスを入れ、その 15cm 上方に counter を設置して、24 時間連続で計測し、1 匹あたりの平均を求めた。

寿命の評価には Kaplan-Meier 成長曲線を用いた。解析は Logrank 検定で行った。成長評価は週齢毎の体重を測定した。

いずれの項目も dko マウス注射群、非注射群、wild-type の 3 つのグループで行い、比較、検討した。

なお、すべてのマウスは、温度 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度 ($50 \pm 10\%$) が通年一定に保たれ、12 時間ごとの照明管理の元で飼育された。

(8) 筋張力の測定

筋肉の生理学的評価として筋張力を測定した。被検筋は前脛骨筋(TA)とし、9 週齢のマウスから剥離、摘出した。95% O_2 と 5% CO_2 で酸素化し、 30°C に保温したリンゲル液で満たしたチャンバー内へ注意深く筋肉を入れ、一方の腱を固定し、もう一方の腱は、dual-mode servomotor system (Electronic Stimulator, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan) のレバーアームに 5-0 外科用シルク糸で結び付けた。単一刺激で最大の振幅が得られる長さまで筋肉を伸展させ (optimal length; L_0)、tetanic force を測定した。Tetanic force は刺激の長さ 500ms、刺激の間隔は 120s として、20、50、100、150Hz で行った。これによって得られた結果をもとに specific force を求め、検討した。Specific force (S) の計算式は $S (\text{N}/\text{cm}^2) = \text{force}(\text{g}) \times 9.8 \times L_0(\text{cm}) \times 1.06 (\text{g}/\text{cm}^3) \times 10^{-3} \times M_0(\text{g})$ である。 M_0 は被検筋の重量(g)を示し、 $1.06 \text{ g}/\text{cm}^3$ は筋肉の密度を示す (Gilbert et al., 2003; Gregorevic et al., 2006; Liu et al., 2005; Yoshimura et al., 2004; Yue et al., 2006)。

(9) 統計学的処理

統計学的処理は two-factor analysis of variance(ANOVA)および Mann-Whitney' s U 検定で行った。

統計学的有意差は P 値 <0.05 とした。

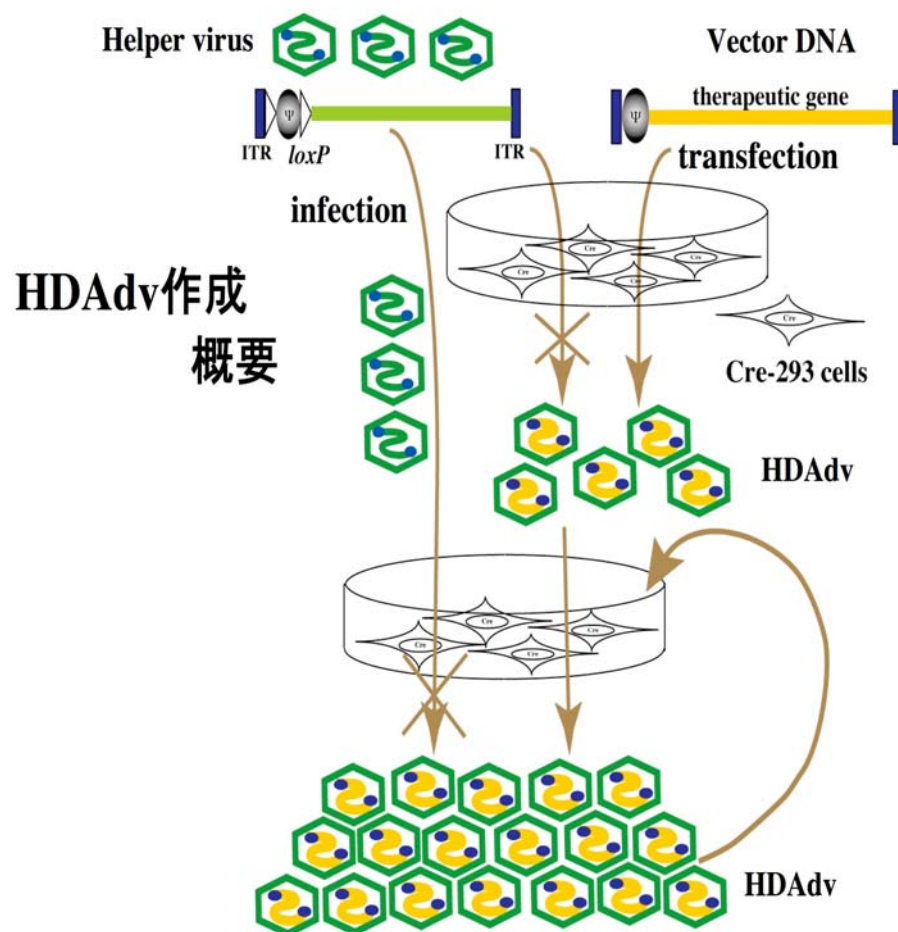


図 2. HDAdv の作成の概要

略語 : ITR, inverted terminal repeats of adenovirus

[実験結果]

(1) HDAdv-myc-mFLdys の構造と full-length dystrophin の確認

HDAdv-myc-mFLdys の構造を図 3 に示す。導入した dystrophin と内在する dystrophin を区別するために、dystrophin cDNA の塩基配列 6886 と 6887 の間にインフレームになるように myc-tag を挿入した。HDAdv-myc-mFLdys を感染させた COS7 細胞と、筋肉注射をした dko マウスの骨格筋から抽出した蛋白で Western blotting 解析を行った。COS7 細胞と dko マウス骨格筋ともに正常骨格筋で発現している内在性 dystrophin 蛋白と同じサイズである 427kDa のバンドを認め、さらに myc-tag 染色の結果とも一致することから、導入した full-length dystrophin が *in vitro* および *in vivo* で発現することを確認した(図 4)。

(2) dystrophin 導入による病理学的改善

1 週齢の dko マウスに HDAdv-myc-mFLdys を筋肉注射し、8 週後(マウスは 9 週齢)に筋肉の組織学的評価を行った。DMD では近位筋障害がとくに多いことから、両上肢・背側・両大腿・および両下腿の骨格筋をターゲットとした。

9 週齢の 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 5 に示す。dco マウスの切片はすべて連続切片を使用した。コントロールとして 9 週齢の wild-type の骨格筋も同様に染色を行った(図 5)。

dco 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。注射した筋肉における dystrophin の陽性率は、注射後 8 週であるにもかかわらず $25.3 \pm 6.7\%$ ($n=3$)であった。さらに、注射した筋肉のみならず隣接する筋肉においても、わずかではあるが dystrophin 陽性線維を認めた。導入した dystrophin の発現期間を検討するために、dco マウスよりも長期生存可能な *mdx* マウスで評価したところ、注射後 13 ヶ月でも dystrophin の発現を確認することができた。

次に、dystrophin 結合蛋白の一つである β -DG と α -SG について、dco マウス注射群では dystrophin 陽性部位と一致して両者ともに陽性線維を認めたが、dco マウス非注射群ではいずれも陽性線維は認めなかった。さらに nNOS についても、dco 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、wild-type と同様に細胞膜直下に局在していた。

改善度の指標として、筋線維の異常な壊死-再生を反映する中心核線維数で評価したところ、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 ($P<0.03$)(図 6-i)。

(3) HDAdv-myc-mFLdys 投与による細胞性免疫反応

細胞性免疫反応の評価は、CD4 陽性 T 細胞数と CD8 陽性 T 細胞数で検討した。9 週齢の wild-type と dko マウス注射群および非注射群の 3 グループで比較したところ、CD4 陽性細胞数は、wild-type 1.0 ± 1.2 (n=10)、dko マウス注射群 4.1 ± 2.2 (n=15)、dko マウス非注射群 13.0 ± 4.0 (n=15)であった。CD8 陽性細胞数は、wild-type 1.3 ± 1.8 (n=15)、dko マウス注射群 5.7 ± 2.7 (n=15)、dko マウス非注射群 7.5 ± 3.2 (n=15)であり、dko マウス注射群は、wild-type よりも炎症細胞数は多かった(CD4; $P=0.0004$, CD8; $P=0.0002$)が、非注射群よりも著明に減少していた(CD4; $P<0.0001$, CD8; $P=0.1548$)(図 6-ii)。

(4) HDAdv-myc-mFLdys 投与による身体的改善および寿命延長

wild-type、dko マウス注射群、dko マウス非注射群の 3 つのグループについて成長および寿命の評価を行った。

まず、9 週齢時の身体的外見については、dko マウス非注射群は小さな体躯(体重 13.8g)、顕著な脊椎後弯、筋肉の萎縮、関節の拘縮を呈しているが、dko マウス注射群では体躯も大きく(体重 21.8g)、筋萎縮、脊椎後弯、関節拘縮はいずれも改善していた。身体的改善が得られたことで、実際の体重の差よりも体躯の差は大きくみえる(図 7)。

dko マウスと age-match した wild-type の体重を週齢毎に測定しグラフ化したものを図 8 に示す。dko マウス注射群と dko マウス非注射群を比較すると、3 週齢頃より注射群の体重が非注射群より重くなり始め、以後 10 週齢になるまで、注射群の方が非注射群よりも重いものの、8 週齢時をピークに下降傾向にあるのは両群とも同じであった。また、両群とも同週齢の wild-type を超えることはなかった。

Kaplan-Meier 生存曲線では(図 9)、dko マウス注射群と非注射群との間に有意な差を認め、dko マウス注射群は非注射群よりも寿命が延長していることがわかった($P<0.05$)。

(5) HDAdv-myc-mFLdys 投与による運動機能の改善

先述した 3 つのグループについて、footprint test、locomotor activity で運動機能の評価した。

各グループの footprint の代表例を図 10 に示す。つま先からつま先までの直線距離の平均値は、dko マウス注射群 37.2 ± 3.1 mm (n=6)、dko マウス非注射群 27.3 ± 6.5 mm (n=7)、wild-type 52.5 ± 6.7 mm (n=10)であり、dko マウス注射群と dko マウス非注射群において、注射群の方が有意に距離がのびていた ($P<0.01$)。また、dko マウス注射群は dko マウス非注射群よりもケージ内で立ち上がる回数が圧倒的に多く、歩様についても、dko マウス非注射群では、なかなか歩こうとしない、歩いても wide-base でまっすぐ歩きづらく下腹部を引きずるよ

うに歩くといった DMD 様所見がみられるが、dco マウス注射群ではそれらの所見は改善していた。

赤外線自動センサーを用いて、運動量の定量化を 3 つのグループについて行った(図 11)。24 時間連続測定した平均値は、dco マウス注射群 9643 ± 5948 回/24 時間 ($n=6$)、dco マウス非注射群 3859 ± 3189 回/24 時間 ($n=6$)、wild-type 18563 ± 7840 回/24 時間 ($n=10$) であり、dco マウス注射群と dco マウス非注射群において、注射群の方が有意に回数が多かった($P < 0.05$)。

筋肉の生理学的改善を評価するために、筋張力を測定した。被検筋は 9 週齢の前脛骨筋とした。Maximal tetanic force をもとに計算した specific force は、dco マウス注射群で 0.394 ± 0.115 N/cm³ ($n=4$)、非注射群で 0.278 ± 0.20 N/cm³ ($n=3$) であり、dco マウス注射群で改善している傾向を認めた($P=0.2888$)。

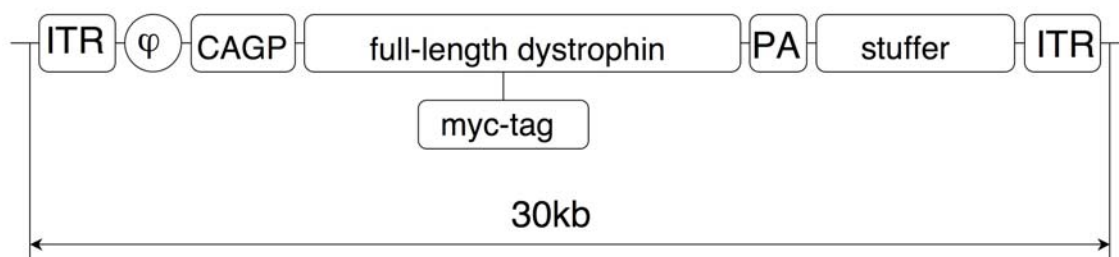


図 3. HDADv-myc-mFLdys の構造

略語 : ITR, inverted terminal repeats of adenovirus

ψ , packaging signal

PA, SV40 polyadenylation signal

full-length dystrophin, the murine full-length dystrophin cDNA

CAGP, the CAG promoter

stuffer, a part of the murine *Emx2* gene

myc-tag は dystrophin gene の塩基配列 6886 と 6887 間に挿入している。

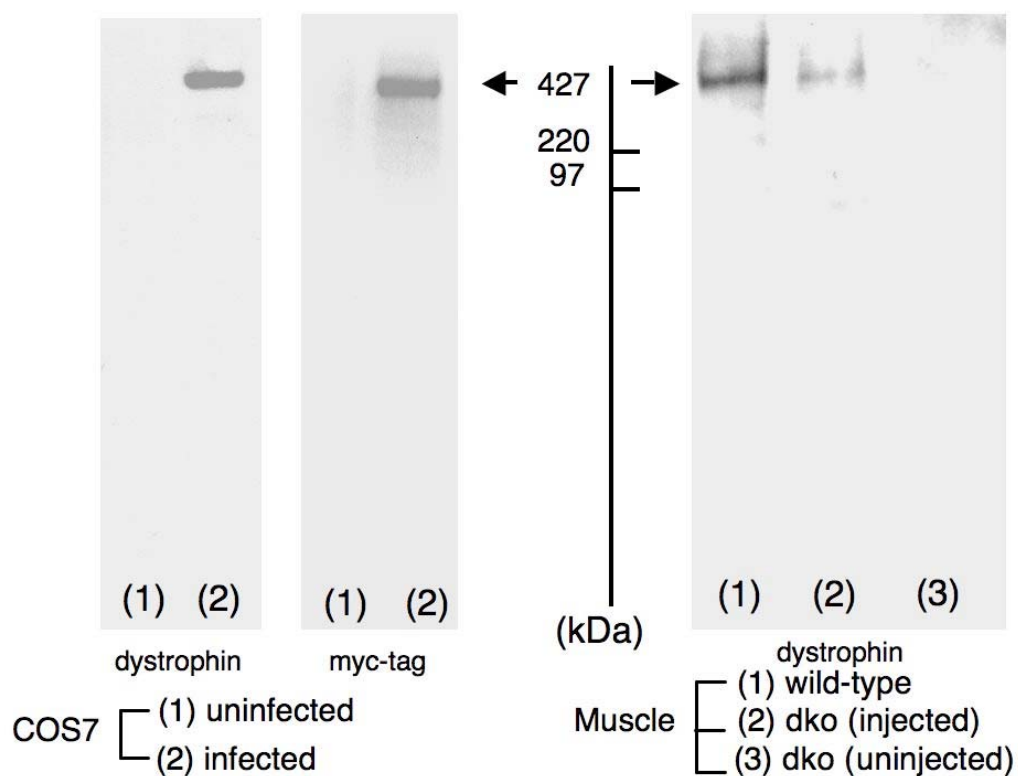


図 4. Western blotting 解析

Left. COS7 細胞から抽出した蛋白

(レーン 1) 非感染 COS7 細胞

(レーン 2) HDAdv-myc-mFLdys を感染させた COS7 細胞

Right. マウスの骨格筋から抽出した蛋白

(レーン 1) wild-type

(レーン 2) HDAdv-myc-mFLdys を注射した dko マウス

(レーン 3) 非注射 dko マウス

dystrophin の検出には dystrophinH-300 (1:100)、myc-tag の検出には clone9E10 (1:50) を使用した。

HDAdv-myc-mFLdys を感染させた COS7 細胞と HDAdv-myc-mFLdys を注射した dko マウス

から抽出した蛋白では、427kDa の大きさのバンドを認めた。これは、wild-type のマウス骨格筋からで検出された内在性 dystrophin 蛋白と同じ大きさであり、完全長 dystrophin が *in vivo*、*in vitro* ともに発現していることが確認された。

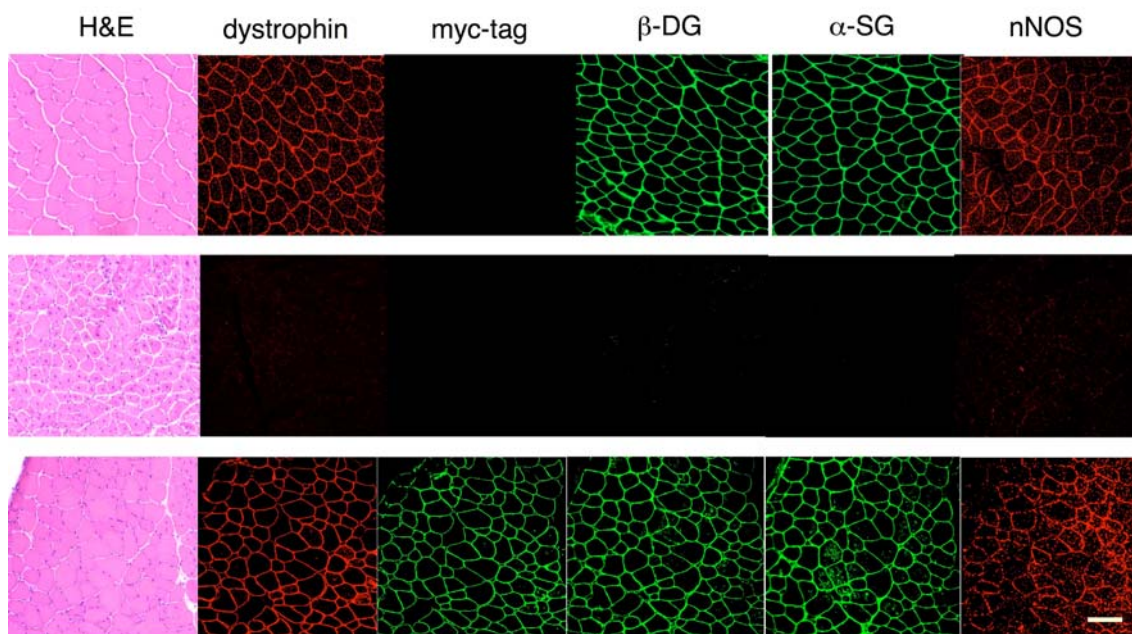


図 5. dystrophin および dystrophin 関連蛋白と nNOS の発現回復

上段 : wild-type

中段 : dko マウス非治療群

下段 : dko マウス治療群

列は左から順に、H.E.染色、dystrophin 抗体染色(dystrophinH-300; 1:100)、myc-tag 抗体染色(clone9E10; 1:50)、 β -DG 抗体染色(NCL-b-DG; 1:50)、 α -SG 抗体染色(NCL-a-SARC; 1:100)、nNOS 抗体染色(NOS1(R-20); 1:50)

Scale bar = 100 μ m

いずれも 9 週齢マウスの前脛骨筋(TA)である。

dystrophin 染色で、dystrophin は wild-type では細胞膜直下に局在しており、dko マウス治療群でも同様に細胞膜直下に局在している。連続切片を myc-tag 染色したところ、dystrophin 発現部位と myc-tag 発現部位は完全に一致している。さらに dystrophin 関連蛋白である β -DG

および α -SG と nNOS も、dco マウス治療群において dystrophin 発現部位と一致してその発現を認める。いずれも dco マウス非治療群では発現していない。

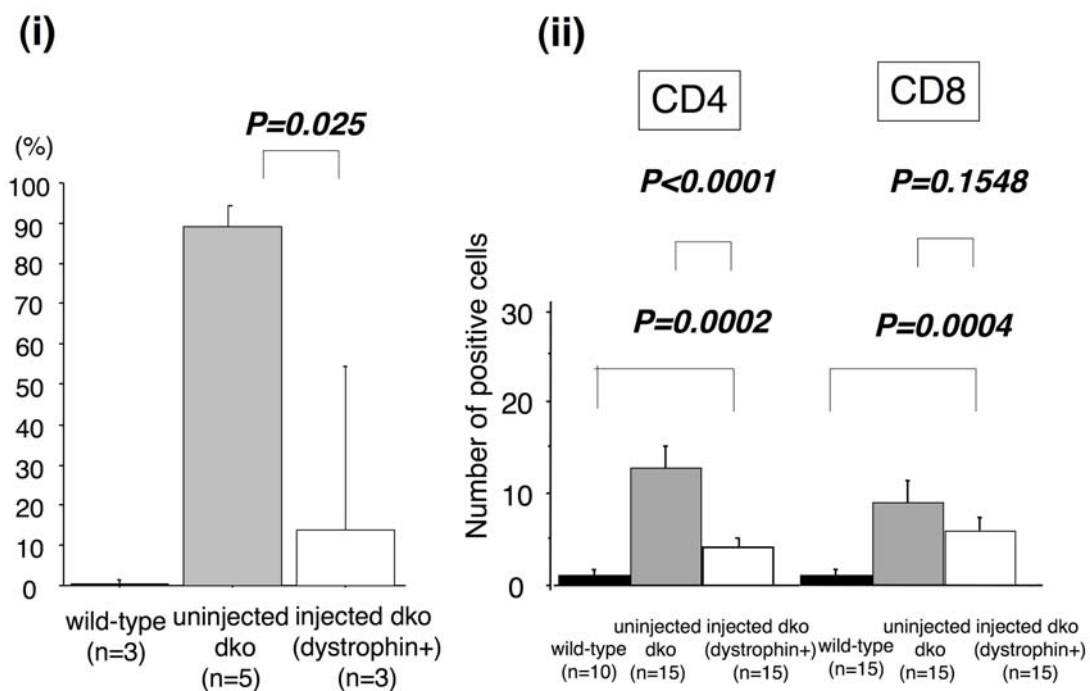


図 6. 組織学的評価

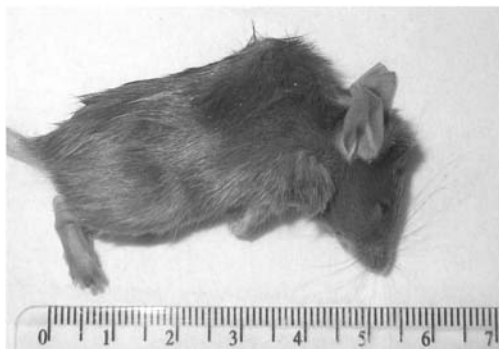
(i). 中心核線維の減少

dco マウス治療群では、非治療群と比較して、中心核線維数の有意な減少を認めた(wild-type: 0.51 ± 0.34 , dco 非治療群: 89.1 ± 4.3 , dco 治療群: 13.7 ± 16.4 , 非治療群 VS 治療群: $P<0.05$).

(ii). 免疫応答反応

9 週齢の wild-type、dco マウス治療群、dco マウス非治療群の筋肉における CD4 陽性細胞数と CD8 陽性細胞数のデータを示す。dco マウス治療群では、非治療群と比較して、いずれの陽性細胞数も著明に少ないことがわかる。

uninjected
dco
9w



injected
dco
9w

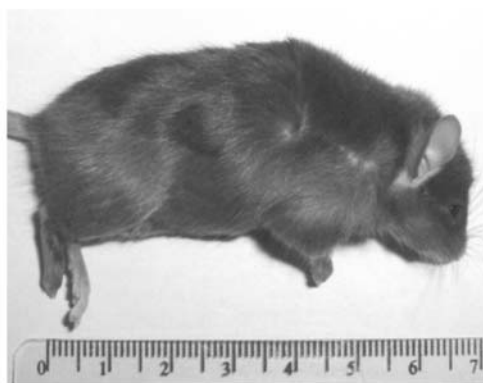


図 7. HDADv-myc-mFLys によってもたらされた身体的改善

治療した dco マウスと治療していない dco マウスを同週齢 (9 週齢) で比較すると、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、関節拘縮はいずれも改善していた。

呈示しているマウスの体重は、非注射 dco マウスが 13.8g、注射 dco マウスが 21.8g であった。

形態的改善が得られたことで、実際の体重の差よりも体躯の差は大きくみえる。

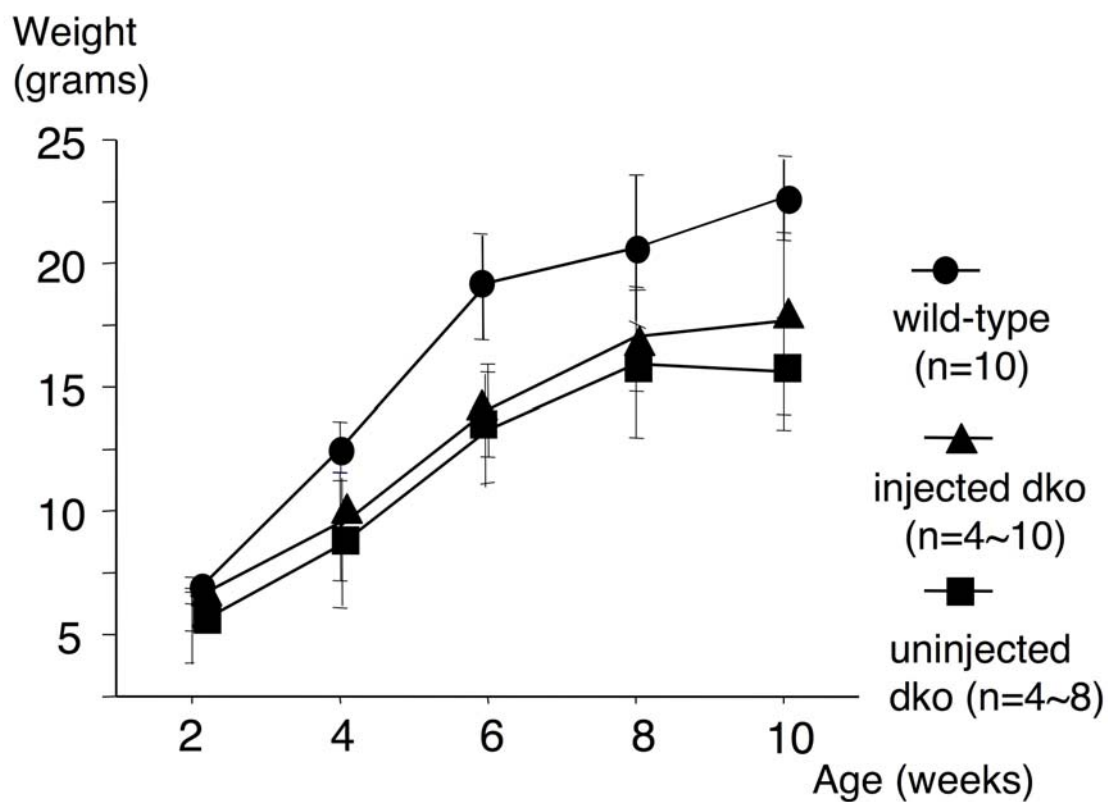


図 8. マウスの体重の推移

● : wild-type (2w: 6.6 ± 0.3 , 4w: 12.6 ± 1.0 , 6w: 19.2 ± 2.1 , 8w: 20.6 ± 2.9 , 10w: 22.6 ± 1.6) g

▲ : dko マウス治療群 (2w: 6.3 ± 1.1 , 4w: 9.4 ± 2.2 , 6w: 14.1 ± 1.9 , 8w: 17.0 ± 2.1 , 10w: 17.6 ± 3.6) g

■ : dko マウス非治療群 (2w: 5.3 ± 1.3 , 4w: 8.7 ± 2.6 , 6w: 13.3 ± 2.3 , 8w: 15.9 ± 3.0 , 10w: 15.6 ± 2.2) g

dco マウス治療群と非治療群との各測定ポイントでの P 値は、2w-0.1198, 4w-0.2614, 6w-0.6985, 8w-0.425, 10w-0.2482

dco マウス治療群は、非治療群よりも体重は重い傾向にあるが、wild-type は超えなかった。

Survival rate

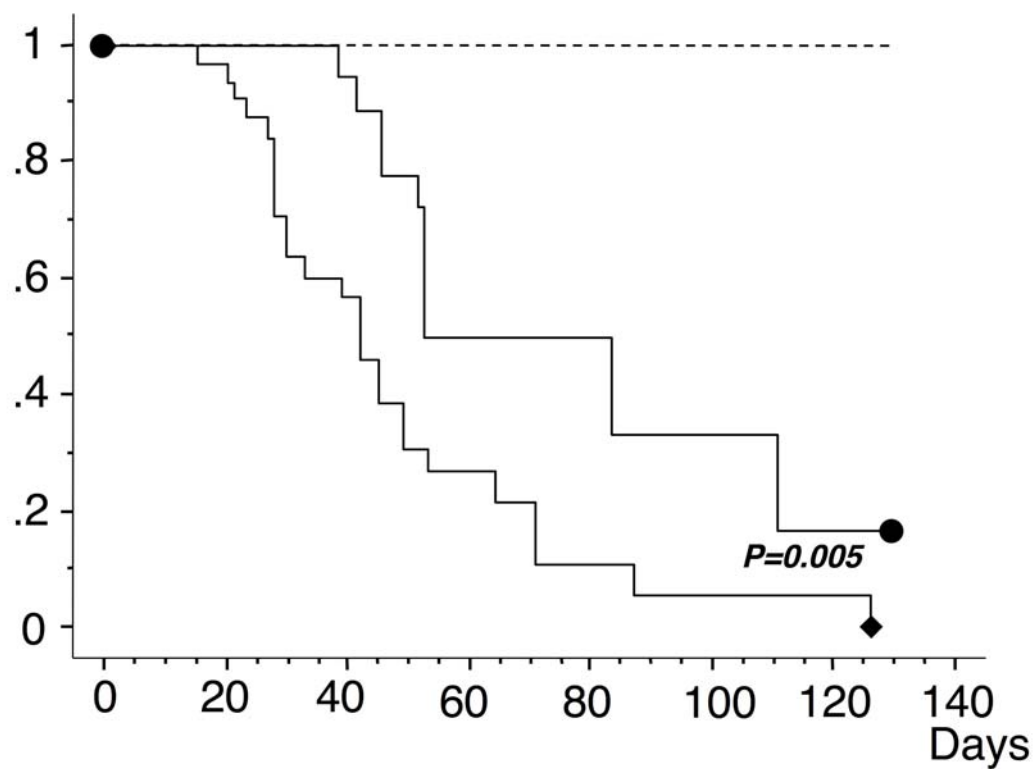


図 9. Kaplan-Meier 生存曲線

--- : wild-type (n=10)

● : dko マウス治療群 (n=18)

■ : dko マウス非治療群 (n=33)

dko マウス治療群は非治療群と比較して、有意に寿命が長いことがわかる($P<0.05$)。

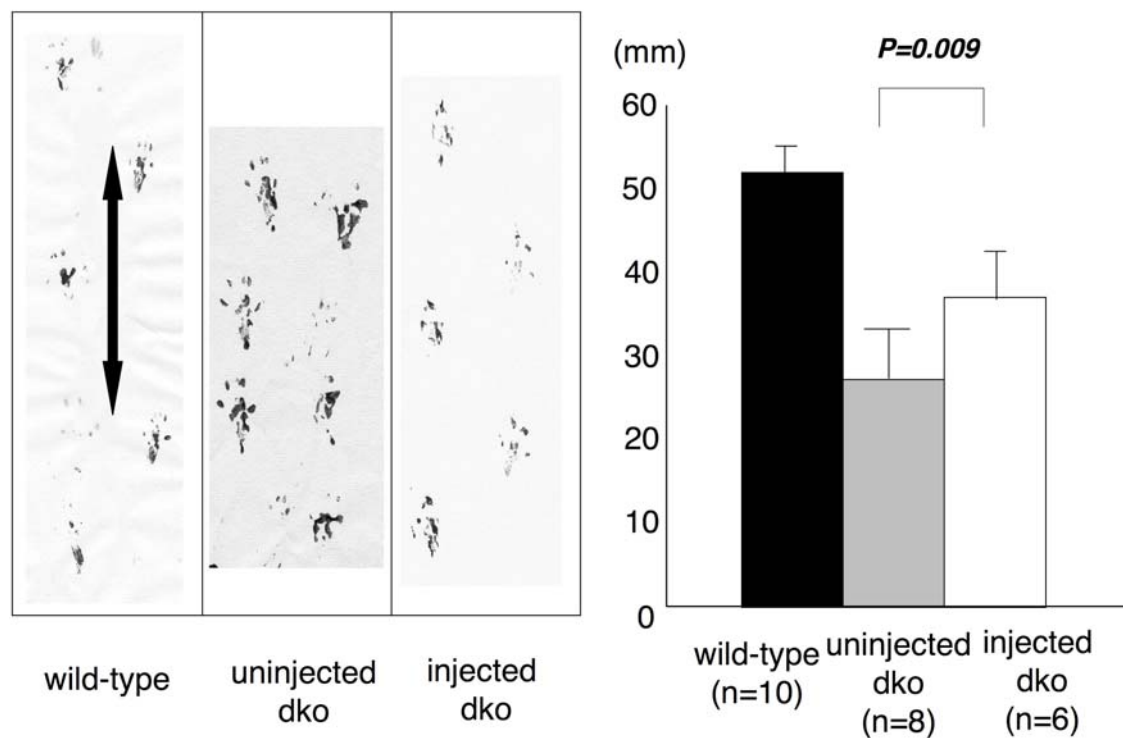


図 10. Footprint テスト

代表的なパターンを示す。

レーン左側より wild-type、dco マウス非治療群、dco マウス治療群

dco マウス非治療群は、歩幅がせまく wide-base で、下腹部に付着したインクもプリント紙上についており、下腹部を引きずるような歩様が伺える。一方、dco マウス治療群では歩幅も大きくなり、歩様の改善がみられる。

歩幅はつま先からつま先までを一步として測定している(図中矢印)。

■ : wild-type (52.5 ± 6.7) mm

■ : dco マウス非治療群 (27.3 ± 6.5) mm

□ : dco マウス治療群 (37.2 ± 3.1) mm

dco マウス治療群は、非治療群と比較して、有意に歩幅が大きいことがわかる($P < 0.01$)。

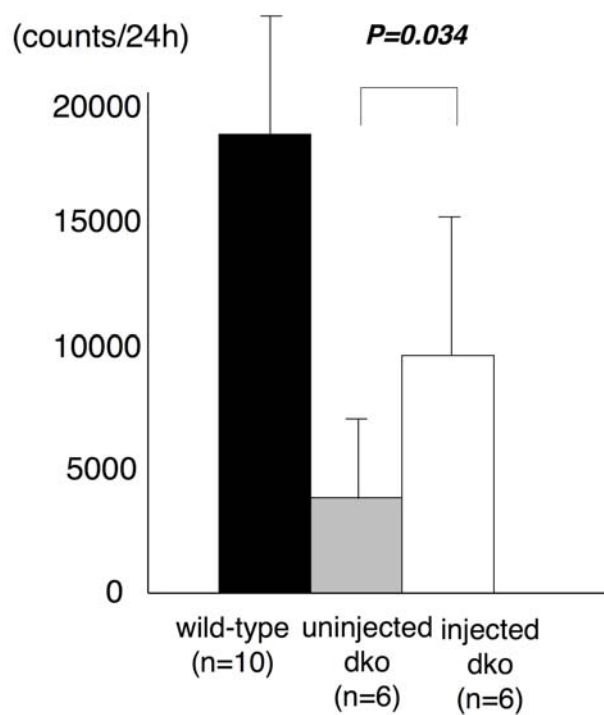


図 11. Locomotor activity

■ : wild-type (18563±7840) 回/24 時間

■ : dko マウス非治療群 (3858±3189) 回/24 時間

□ : dko マウス治療群 (9642±5947) 回/24 時間

dko マウス治療群は、非治療群と比較して、有意に運動量が多いことがわかる($P<0.05$)。

[考察]

(1) HDAdv による dko マウスへの完全長 dystrophin の導入

完全長 dystrophin の局所的導入による治療効果を、dco マウスを用いて病理学的観点および運動機能を含む身体的観点から評価し、有効性を確認した。

今回 我々はヒトへの応用にあたり、遺伝子治療の効果を病理学的観点のみならず症状の改善度で評価する必要があると考え、DMD にきわめて類似した症状を呈する dco マウスを用いた。これまでに dco マウスを用いた研究で、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たという報告がある(Gregorevic et al.,2006)。しかしながら、マウスよりも大型のモデル動物である筋ジストロフィー犬に mesoangioblast stem cell を用いて短縮型 dystrophin を導入した研究では、必ずしも満足のいく結果ではなかった(Sampaolesi et al.,2006)。発見から約 20 年が経過した今日でも dystrophin 遺伝子の機能はいまだ完全には解明されていないことから、完全長の dystrophin を導入することがきわめて重要であることが考えられる。先に報告した内田らの結果から、DMD で最もよく障害される骨格筋への HDAdv の直接的なアプローチの安全性は保たれていると考え、14kb という巨大な完全長 dystrophin cDNA をすべてパッケージングした HDAdv の筋肉注射による完全長 dystrophin の導入を行った。

(2) dystrophin 発現による病理学的改善

完全長 dystrophin を発現する HDAdv-myc-mFLdys を 1 週齢の dco マウスの骨格筋に局所的に注入し、8 週間後に dystrophin が発現していることを確認した。dystrophin 陽性線維はモザイク状に確認されたが、下腿筋断面における dystrophin の発現率は、1 回投与にもかかわらず平均 25%であった。過去の報告によると、完全長 dystrophin を *mdx* マウスに導入した場合、30%の発現率で部分的ではあるが病理学的改善が得られたのに対し(Phelps et al.,1995)、短縮型 dystrophin を 20%発現させた場合は形態学的改善は得られなかった(Liu et al.,2005)。25%の発現率で dco マウスの病理学的改善および身体的改善が得られたという今回の結果は、短縮型 dystrophin よりも完全長 dystrophin が、病理学的にも機能的改善にもより効果的であるという可能性を示唆する。また導入した dystrophin は、注射をした筋のみならず、わずかではあるが隣接する筋でも発現を認めた。これは、幼若な dco マウスに注射をしているため、筋線維間の隔壁の脆弱性や注射する際の圧力によってウィルス液が周囲へ漏出したことが一因と考えられる。このことは、筋肉注射という局所的投与にもかかわらず全身的な改善が得られた今回の結果を支持するものといえる。さらに、dystrophin 発現部位に一致して、 β -DG や α -SG とい

った dystrophin 結合蛋白や nNOS の発現も回復しており、導入された dystrophin が機能的に有効であることが組織学的に確認された。nNOS は、DMD 患者や *mdx* マウスでは筋線維膜にみられないことがわかっている(Brennan et al.,1995)。nNOS は、運動している筋肉において血管収縮神経の反応を鈍らせて血液の流れを調節していると考えられており、nNOS の欠損は dystrophic な病理変化に影響を及ぼすことが報告されている(Sander et al.,2000; Thomas et al.,1998; Chang et al.,1996)。平滑筋にのみヒト完全長 dystrophin を発現する transgenic *mdx* マウス(SMTg/*mdx* マウス)による研究でも、SMTg/*mdx* マウスは nNOS 発現が回復すると同時に、血清 CK 値の低下を認めた(Ito et al.,2006)。先に記した組み換え型 AAV を用いて短縮型 dystrophin を導入した研究では、nNOS の発現回復が得られなかったのに対し(Yue et al.,2006)、完全長 dystrophin を導入した今回の研究では dystrophin 発現部位に一致して nNOS の発現が回復したことは注目すべきことであり、完全長 dystrophin の発現による nNOS の回復が良好な結果をもたらす一因となった可能性がある。本研究の結果は、先述した SMTg/*mdx* マウスの結果とともに、いまだ完全には果たされていない dystrophin の機能解明や nNOS を介した dystrophin の役割を示唆するものといえる。

正常な筋線維は多角形で大きさはほぼ均一であり、核は辺縁に存在しているが、少なくとも 1 サイクルの壊死-再生過程を終えた筋線維は中心に核をもつ。DMD の特徴ともいえる中心核線維の増加は、病的な壊死-再生が起こっていることを示している。中心核線維数を病理学的改善度の指標として評価したところ、dco マウス治療群は、非治療群と比較して有意に中心核線維数は減少しており($P < 0.05$)、導入された dystrophin によって筋線維の壊死-再生が効果的にさまたげられ、筋線維の正常化が得られたと考えられた。つまり、今回行った方法によって筋線維の変性、壊死という DMD の本質的な病変を根本的に治療しうることが示唆された。

また、HDAAdv-myc-mFLdys による細胞性免疫反応を CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の浸潤で検討した結果、dco マウス治療群では wild-type よりもいずれの陽性細胞数も多く、dco マウス非治療群よりも少なかった。この結果から HDAAdv-myc-mFLdys によって免疫反応が惹起されることが否定はできないが、dco マウス非治療群で自然に起こってくる dystrophic な変化に伴う T 細胞活性化(Spencer et al.,2001)を超えることはなく、むしろ病理学的改善によってそれらの活性化を抑制している可能性が考えられた。免疫応答反応を抑えることは、よりよい発現効率やより長期の発現に影響すると考えられ、今後免疫抑制剤の併用などを検討していく必要がある。発現期間については、これまでに、アデノウィルスベクターにより導入された完全長 dystrophin が *mdx* マウスで 5 ヶ月間発現し続けたという報告があるが(Gilchrist et al.,2002)、今回の研究では、*mdx* マウスへの 1 回の HDAAdv-myc-mFLdys 投与で、13 ヶ月間の発現を確認することができた。内田らの報告で、dystrophin 発現 HDAAdv は筋肉注射による反復投与が

可能であり、かつそれを行うことにより、dystrophin の発現量が増加することが確認されており、その方法を用いることでより高い発現率と長期発現の可能性が期待される。

(3) dystrophin 発現による体重増加および寿命の延長

dko マウス治療群では、筋萎縮、脊椎変形、関節拘縮が明らかに改善していた。また週齢毎に測定した体重では、有意差はなかったものの、dco マウス治療群が非治療群より重い傾向を認めた。体重増加の原因としては、組織学的改善によって増えた筋肉の重量が体重に反映されたことや、脊椎変形、関節拘縮が改善することで餌や水への到達が容易になるなど摂食状況の改善などが考えられた。

さらに、dco マウス治療群において非治療群よりも有意に寿命が延長していた($P<0.05$)。dco マウスの死亡原因はDMDと同様におもに心不全や呼吸不全と考えられている。本研究では、心機能や呼吸機能に直接影響を及ぼす筋肉へのdystrophin導入は試みていないにもかかわらず寿命が延長する傾向を認めており、これは着目すべきことといえる。その原因は私にも十分は分かっていないが、摂食状況の改善がその一因として考えられた。

(4) dystrophin 発現がもたらす運動機能改善

dco マウス非治療群は、6週齢になる頃からケージ内を動き回ったり立ち上がることが著明に減り、開脚、wide-base で下腹部を引きずるようにして歩いているのに対し、dco マウス治療群ではそれらの所見は改善していた。運動量を定量化するために、まずfootprintテストによる解析を行ったところ、dco マウス治療群は非治療群よりも有意に歩幅が拡大していた($P<0.01$)。また、足跡から歩様の改善も確認された。これは、四肢や体幹の筋肉の機能が改善したことを示唆すると考えられ、病理学的結果と矛盾しない。さらに赤外線自動センサーの結果からも運動量の有意な増加を認め($P<0.05$)、今回のように四肢・体幹への筋肉注射であっても、複数箇所に行うことで全身的な運動機能が改善することが確認された。実際の筋力を評価するために行った筋張力測定でもdco マウス治療群は非治療群よりも筋張力がつよい傾向を認め、個々の筋肉の張力改善が全身的な運動機能改善につながったと考えられた。

(5) HDAdv による完全長 dystrophin 導入の可能性と課題

本研究でHDAdvによる完全長dystrophin導入がもたらした病理学的および臨床的改善は、様々な可能性を示唆している。完全長dystrophinを導入することで、短縮型dystrophinでは得られなかったnNOS発現回復が得られた点や、25%という導入率で病理学的改善および生理機能的な改善が得られた点は、dystrophinのいまだ解明されていない未知の機能を示唆してお

り、完全長 dystrophin 導入の重要性を示している。また、HDAdv を用いて完全長 dystrophin を導入することで得られた組織学的改善によって、dystrophic な筋肉で自然に起こる T 細胞活性化を抑える効果が示された。dystrophin 導入のアプローチ方法についても、筋肉注射という局所的導入であっても、複数箇所に行うことで全身的な改善が得られることが示され、HDAdv による完全長 dystrophin 導入は、DMD の有効な治療方法となりうると考えられた。

今後の課題として、導入効率や発現期間、また心筋や呼吸筋、消化管の筋肉といった生命予後に大きな影響を及ぼす部分での検討は必要不可欠である。導入効率や発現期間に関しては、先述したように反復投与によりある程度の効果が期待されるが、より高い効果を得るために免疫抑制剤や組織内での浸透性を高めるための補助剤などの併用も検討する必要があるだろう。また、骨格筋以外の臓器への導入については、筋肉注射という直接的な導入方法だけではなく、腹腔内投与や血管内投与などによる全身への導入も検討していく必要がある。さらに治療時期についても、幼若期のみならず若年期以降について検討を行う必要がある。これらの課題について検討を重ね、より有効で安全な治療方法の実現を目指していく。

[結語]

本研究で我々は、筋肉注射で完全長 dystrophin を導入することで、病理学的改善だけでなく臨床症状の改善を得ることに成功した。このことは筋肉注射という局所的治療でも、DMD の症状を軽減し失われた機能を補う治療になりうることを示唆しており、HDAdv による完全長 dystrophin 導入は、DMD の有効な治療方法となりうると考えられた。

今後、さまざまなアプローチによる研究によって、DMD の根本的治療の確立が実現することを切に望み、本研究がその一端を担えることを期待する。

[参考文献]

- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, den Dunnen JT, et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 83-92.
- Abu-Baker A, Rouleau GA. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 173-185.
- Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, et al. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991; 352: 815-818.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589-1598.
- Arechavala-Gomez V, Graham IR, Popplewell LJ, Adams AM, Aartsma-Rus A, Kinali M, et al. Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 798-810.
- Bachrach E, Li S, Perez A.I, Schienda J, Liadaki K, Volinski J, et al. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscular progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3581-3586.
- Bakowska JC, Di Maria MV, Camp SM, Wang Y, Allen PD, Breakefield XO. Targeted transgene integration into transgenic mouse fibroblasts carrying the full-length human AAVS1 locus mediated by HSV/AAV rep(+) hybrid amplicon vector. *Gene Ther* 2003; 10: 1691-1702.
- Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998; 20: 37-42.
- Beroud C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat* 2007; 28: 196-202.

- Bewick GS, Nicholson LV, Young C, O'Donnell E, Slater CR. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport* 1992; 3: 857-860.
- Bewick GS, Nicholson LV, Young C, Slater CR. Relationship of a dystrophin-associated glycoprotein to junctional acetylcholine receptor clusters in rat skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1993; 3: 503-506.
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8: 323-327.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-480.
- Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, et al. Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn* 1999; 216: 244-256.
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; 21: 285-288.
- Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tome FM, et al. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 18: 164-167.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; 82: 743-752.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 1189-1192.
- Campbell AM, Kessler PD, Fambrough DM. The alternative carboxyl termini of avian cardiac and brain sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases are on opposite sides of the membrane. *J Biol Chem* 1992; 267: 9321-9325.
- Cerletti M, Negri T, Cozzi F, Colpo R, Andreetta F, Croci D, et al. Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther* 2003; 10: 750-757.

- Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, et al. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9142-9147.
- Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1645-1650.
- Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, Chan S, Chen HH, Campbell KP, et al. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther* 1996; 3: 965-972.
- Cooper BJ. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 1989; 45: 703-718.
- Darin N, Kroksmark AK, Ahlander AC, Moslemi AR, Oldfors A, Tulinius M. Inflammation and response to steroid treatment in limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11: 353-357.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997; 90: 717-727.
- DelloRusso C, Scott JM, Hartigan-O'Connor D, Salvatori G, Barjot C, Robinson AS, et al. Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12979-12984.
- Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, et al. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18157-18162.
- Dunckley MG, Love DR, Davies KE, Walsh FS, Morris GE, Dickson G. Retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse myoblasts in vitro. *FEBS Lett* 1992; 296: 128-134.
- Dunckley MG, Wells DJ, Walsh FS, Dickson G. Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 717-723.
- Egashira N, Iwasaki K, Takashima A, Watanabe T, Kawabe H, Matsuda T, et al. Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons

- in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res* 2005; 1059: 7-12.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345: 315-319.
- Foster K, Foster H, Dickson JG. Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* 2006; 13: 1677-1685.
- Gilbert R, Dudley RW, Liu AB, Petrof BJ, Nalbantoglu J, Karpatis G. Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (guttated) adenovirus-encoding murine dystrophin. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1287-1299.
- Gilchrist SC, Ontell MP, Kochanek S, Clemens PR. Immune response to full-length dystrophin delivered to Dmd muscle by a high-capacity adenoviral vector. *Mol Ther* 2002; 6: 359-368.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
- Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ, (ed). *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols*, vol.7, The Humana Press, Clifton, NJ, 1991. 109-128.
- Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, et al. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* 2006; 12: 787-789.
- Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, Ito D, et al. A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *Eur J Neurol* 2007; 14: 1288-1291.
- Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, et al. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2141-2147.
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 1995; 11: 216-218.
- Hino H, Araki K, Uyama E, Takeya M, Araki M, Yoshinobu K, et al. Myopathy phenotype in

- transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 181-190.
- Hoffman EP. Dystrophin associated proteins fail in filling dystrophin's shoes. *Nat Genet* 1994; 8: 311-312.
- Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; 355: 696-702.
- Ito K, Kimura S, Ozasa S, Matsukura M, Ikezawa M, Yoshioka K, et al. Smooth muscle-specific dystrophin expression improves aberrant vasoregulation in mdx mice. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2266-2275.
- Kenwrick S, Patterson M, Speer A, Fischbeck K, Davies K. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy region using pulsed field gel electrophoresis. *Cell* 1987; 48: 351-357.
- Khurana TS, Davies KE. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 379-390.
- Kimura E, Maeda Y, Arima T, Nishida Y, Yamashita S, Hara A, et al. Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Ther* 2001; 8: 20-7.
- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-lida E, Nomura Y, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388-392.
- Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5731-5736.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-517.
- Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4

- gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord* 2007; 17: 611-623.
- Laval SH, Bushby KM. Limb-girdle muscular dystrophies--from genetics to molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 91-105.
- Law D.J., Allen D. L., Tidball J.G. Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at mdx myotendinous junctions following onset of necrosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 1477-1483.
- Lee CC, Pearlman JA, Chamberlain JS, Caskey CT. Expression of recombinant dystrophin and its localization to the cell membrane. *Nature* 1991; 349: 334-336.
- Li S, Kimura E, Fall BM, Reyes M, Angello JC, Welikson R, et al. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther* 2005; 12: 1099-1108.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 20: 31-36.
- Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 2005; 11: 245-256.
- Liu Q, Perez CF, Wang Y. Efficient site-specific integration of large transgenes by an enhanced herpes simplex virus/adeno-associated virus hybrid amplicon vector. *J Virol* 2006; 80: 1672-1679.
- Lochmuller H, Petrof BJ, Pari G, Larochelle N, Dodelet V, Wang Q, et al. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther* 1996; 3: 706-716.
- Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; 9: 1009-1014.
- Maeda Y, Kimura E, Uchida Y, Nishida Y, Yamashita S, Arima T, et al. Cre/loxP-mediated adenovirus type 5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packaging. *Virology* 2003; 309: 330-338.
- Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I. A Gne knockout mouse

- expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2669-2682.
- Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD003725.
- Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 1992; 360: 588-591.
- Matsushita M, Egashira N, Harada S, Okuno R, Mishima K, Iwasaki K, et al. Perospirone, a novel antipsychotic drug, inhibits marble-burying behavior via 5-HT_{1A} receptor in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 154-159.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 18: 365-368.
- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3854-3858.
- Mittereder N, March K.L., Trapnell B.C. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 7498-7509
- Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, et al. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1320-1324.
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 2000; 24: 163-166.
- Moxley RT, 3rd, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2005; 64: 13-20.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification

- of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1453-1459.
- Muntoni F, Bushby K, van Ommen G. 128th ENMC International Workshop on 'Preclinical optimization and Phase I/II Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy' 22-24 October 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 450-457.
- Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, et al. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1996; 12: 254-259.
- Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, et al. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *Faseb J* 2007.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; 108: 193-9.
- Parks R, Eveleigh C, Graham F. Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Ther* 1999; 6: 1565-1573.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13565-13570.
- Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, Rafael JA, Hinkle RT, Faulkner JA, et al. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1251-1258.
- Philipson L. Structure and assembly of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; 109: 1-52.
- Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 445-449.
- Prelle K, Wobus AM, Krebs O, Blum WF, Wolf E. Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation.

- Biochem Biophys Res Commun 2000; 277: 631-638.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell 1995; 81: 27-40.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, et al. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 6417-6422.
- Romero NB, Benveniste O, Payan C, Braun S, Squiban P, Herson S, et al. Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol. Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl 1: S45-48.
- Romero NB, Braun S, Benveniste O, Leturcq F, Hogrel JY, Morris GE, et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Hum Gene Ther 2004; 15: 1065-1076.
- Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. Hum Mol Genet 1999; 8: 1329-1336.
- Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nature 2006; 444: 574-579.
- Sander M, Chavoshan B, Harris SA, Iannaccone ST, Stull JT, Thomas GD, et al. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 13818-13823.
- Schowalter DB, Meuse L, Wilson CB, Linsley PS, Kay MA. Constitutive expression of murine CTLA4Ig from a recombinant adenovirus vector results in prolonged transgene expression. Gene Ther 1997; 4: 853-860.
- Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, et al. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). Exp Anim 2003; 52: 93-97.
- Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, et al. Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. Acta Myol 2005; 24: 145-154.

- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578-1580.
- Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 2001; 98: 235-243.
- Sunada Y. [Therapeutic strategies for muscular dystrophy by myostatin inhibition]. *Rinsho Shinkeigaku* 2006; 46: 942-944.
- Takehima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006; 59: 690-694.
- Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG. Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15090-15095.
- Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a potential replacement for dystrophin? *Neuromuscul Disord* 1993; 3: 537-539.
- Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-3290.
- Uchida Y, Maeda Y, Kimura E, Yamashita S, Nishida Y, Arima T, et al. Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a helper-dependent adenovirus vector expressing the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and dystrophin. *J Gene Med* 2005; 7: 1010-1022.
- Uyama E, Tsukahara T, Goto K, Kurano Y, Ogawa M, Kim YJ, et al. Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1549-1554.
- van der Maarel SM, Frants RR. The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 375-386.
- Wakefield PM, Tinsley JM, Wood MJ, Gilbert R, Karpati G, Davies KE. Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following

- adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene. *Gene Ther* 2000; 7: 201-204.
- Wang Y, Camp SM, Niwano M, Shen X, Bakowska JC, Breakefield XO, et al. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus rep(+) hybrid amplicon vector improves the stability of transgene expression in human cells by site-specific integration. *J Virol* 2002; 76: 7150-7162.
- Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, Blankinship M, Gregorevic P, Chamberlain JS, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 2007; 15: 1160-1166.
- Weiffenbach B, Dubois J, Storvick D, Tawil R, Jacobsen SJ, Gilbert J, et al. Mapping the facioscapulohumeral muscular dystrophy gene is complicated by chromosome 4q35 recombination events. *Nat Genet* 1993; 4: 165-169.
- Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 1992; 2: 26-30.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-1468.
- Xiong F, Xiao S, Yu M, Li W, Zheng H, Shang Y, et al. Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport. *BMC Neurosci* 2007; 8: 50.
- Yamamoto T, Kawaguchi M, Sakayori N, Muramatsu F, Morikawa S, Kato Y, et al. Intracellular binding of fukutin and alpha-dystroglycan: relation to glycosylation of alpha-dystroglycan. *Neurosci Res* 2006; 56: 391-399.
- Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, et al. Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 1997; 124: 101-111.
- Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, et al. AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther* 2004; 10: 821-828.
- Yue Y, Liu M, Duan D. C-terminal-truncated microdystrophin recruits dystrobrevin and syntrophin to the dystrophin-associated glycoprotein complex and reduces

muscular dystrophy in symptomatic utrophin/dystrophin double-knockout mice. *Mol Ther* 2006; 14: 79-87.

Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2816-2833.