

筑波大学

博士（医学）学位論文

寄	贈
石井亜紀子氏	平成 年 月 日

DA
1719
1996
H4

Duchenne型筋ジストロフィーに対する
遺伝子治療の基礎的研究

1996

筑波大学大学院博士課程医学研究科

石井亜紀子

98000077

目次

序 章	1
図表	13
第1章 アデノウイルス・ベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入	16
1. 目的	17
2. 対象と方法	19
3. 結果	27
4. 考察	35
図表	41
第2章 カチオン性脂質を用いた骨格筋への遺伝子導入	59
1. 目的	60
2. 対象と方法	61
3. 結果	67
4. 考察	73
図表	75
終 章	97
謝 辞	102
引用文献	103
参考文献	117

本論文では以下の略号を用いる。

ADA	Adenosine deaminase	アデノシンデアミナーゼ
BMD	Becker type muscular dystrophy	Becker型筋ジストロフィー
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CAT	chloramphenicol acetyltransferase	クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ
CFA	complete Freund's adjuvant	完全フロイントアジュバント
DAG	dystrophin-associated glycoprotein	ジストロフィン結合糖蛋白
DAP	dystrophin-associated protein	ジストロフィン結合蛋白
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的DNA
DMD	Dchenne muscular dystrophy	Duchenne型筋ジストロフィー
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	ダルベッコ変法イーグル培地
DRP	dystrophin related protein	ジストロフィン関連蛋白
ECL	Enhanced chemiluminescence	化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FACS	Fluorescence activating cell sorter	フローサイトメーター
FBS	Fetal Bovine Serum	ウシ胎仔血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate	フルオロセインイソチオサイアネート
GPC	glycoprotein complex	糖蛋白質複合体
HBS	Hepes buffer saline	ヘペスバッファー
HRP	Horseradish peroxydase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
MHC	Major Histocompatibility Complex	主要組織適合遺伝子複合体
MOI	Multiplicity of Infection	感染の多重度
NOS	Nitric oxide synthase	NO合成酵素

PBS	Phosphate buffer saline	リン酸バッファー
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PFU	plaque forming unit	プラーク形成単位
PPL	poly-L-lysine	ポリリシン
PVDF	polyvinylidene difluoride	ポリビニリデンジフルオライド
SCARMD	severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy	重症小児常染色体劣性筋ジストロフィー
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SSCP	single strand conformation polymorphism	一本鎖DNA構造多形
SSPE	sodium phosphate EDTA solution	リン酸ナトリウムEDTA液
TBS	Tris buffer saline	トリスバッファー
TCID50	median tissue culture infection dose	50%培養細胞感染量

序 章

はじめに

進行性筋ジストロフィーは、骨格筋の変性・壊死を本態とし、臨床的には進行性の筋力低下を生ずる遺伝性の疾患である（埜中 1993）。そのうち、Duchenne型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy : DMD）は、他に有効な治療法のない重篤な遺伝性疾患であること、胚細胞レベルでの突然変異率が高いこと、原因遺伝子が判明し、遺伝子異常と病態との関連の解明が進んでいること、治療実験のためのモデル動物（mdxマウス： Bulfield G et al. 1984）が存在することから、現在遺伝子治療の対象として研究が進められている。

1. DMDとDMD遺伝子

DMDは進行性の筋壊死を本態とし、新生男児3,000～3,500人に1人の割合で生ずる、X染色体連鎖性劣性の遺伝性疾患である。患者は2～5歳で歩行障害により発症し、次第に筋力低下が進行し、10歳前後で歩行不能となる。その後、筋萎縮と筋力低下、関節拘縮、脊柱変形等の症状が進行し、多くが30歳以前に心不全や呼吸不全で死亡することが多い。病理学的には、筋線維の変性・壊死が主体で、初期には活発な再生像が認められるが、末期には筋線維は脂肪組織や結合織に置き換わる。血液生化学的には、血清クレアチン・キナーゼの高値が認められる。1987年、慢性肉芽腫症について、逆遺伝学（reverse genetics, 原因となる蛋白質が不明の疾患で病因遺伝子を得る方法として名付けられたが、最近ではポジショナルクローニングと呼ばれる）の手法を用いて、Xp21.2に存在するDMD遺伝子がとられ、それにコードされる膜関連細胞骨格蛋白であるジストロフィンの欠損がDMDの原因であることが明らかにされた（Koenig et al. 1987）。また、同じ

DMD遺伝子の変異により，より軽症型のBecker型筋ジストロフィー

(Becker type muscular dystrophy : BMD) が生じるが，臨床症状は遺伝子欠失の大きさとは必ずしも比例しないことが知られている．その説明として，DMDではフレームシフトのためジストロフィン欠損するが，BMDではin frameの欠失により，短縮したジストロフィンが作られるためと考えられている．事実，BMDの約2/3の症例でジストロフィン分子の大きさや量に異常が認められ，組織学的にも存在パターンの異常を示すことが知られている (Ahn AH et al. 1993, 小沢 1992) ．

2．ジストロフィンの構造と機能

1) ジストロフィンの構造

2400kbにもおよぶ巨大なDMD遺伝子から転写されるmRNAは14kbであり，427kDの蛋白，ジストロフィンをコードしている．ジストロフィンは棒状の蛋白質であり，actin-binding domain, triple helical segments, cysteine-rich domain, C-terminal domainの4つの部位で構成される(図 1b) ．N端はFアクチンと，C端は数種の結合蛋白 (dystrophin-associated protein : DAP, Ervasti JM et al. 1990, Yoshida M et al. 1990) と結合し，筋細胞膜内側に固定されている．DAPの構成要素のうち，156, 50, 43, 35kDの分子量を持つDAG (dystrophin-associated glycoprotein) は糖蛋白質複合体

(glycoprotein complex : GPC) を形成し，ジストロフィンはGPCを介して，細胞外マトリックスの構成要素であるラミニンと結合している (図 1c, Worton R 1995, Ozawa E et al. 1995) ．DMD遺伝子はX染色体のなかでも突然変異をおこしやすい部位と考えられるが，特にDMD・BMDではexon45-55に欠失が多く認められる (hot spot) ．

2) 転写およびスプライシングの機構 (図 1a)

DMD遺伝子の転写調節およびmRNAのプロセッシングの機構はたいへん複雑で、少なくとも5種類の独立したプロモーターが存在し、細胞によって特徴的なジストロフィンを発現している。さらにmRNAのPCR

(polymerase chain reaction) 法からジストロフィンのC端は少なくとも3つの異なる部位でalternative splicingを受けていることがわかってきている。

3種類の全長型のプロモーター (脳型, 筋型, プルキンエ細胞型) はそれぞれの第一エクソンを持ち、脳および筋において427kDの蛋白をつくる。

2種類のC端のプロモーターからの転写, 翻訳により, Dp116, Dp71と名付けられた蛋白がつくられる (Ahn AH et al. 1993)。脳におけるジストロフィンの発現は中枢神経症状との関連で注目されている。脳型のプロモーターは海馬および大脳皮質で発現しているが、海馬と大脳新皮質は感情, 記憶, 認知に直接かかわっており, DMDの約1/3に合併する知能障害との関連を考えている研究者も多い (Lidov HGW et al. 1993)。

3) Dp116, Dp71とDp260 (図 1b)

Dp71 (Rapaport D et al. 1993) の転写開始部位はDMD遺伝子のexon63の8kb上流に存在する。ジストロフィンのC端の抗体を用いたウエスタンブロットでは、産生される蛋白の分子量は70.8kDである。Dp71は多くの組織に広く発現しているが、分化した骨格筋では認められない。脳においては星状膠細胞, 歯状回の顆粒細胞, 神経膠腫の培養細胞などに発現している。一方, Dp116 (Blake DJ et al. 1992, Byers TJ et al. 1993) のプロモーターはDMD遺伝子のエクソン55と56の間に存在し, ジストロフィンの後半946アミノ酸を共有している。Dp116は末梢神経のシュワン細胞の外層, 特にランビエ絞輪の細胞膜下に存在し, 構造的役割のみならず神経伝導などの生理学的役割を担っていることが示唆されている。

最近，網膜のシナプス部位（外網状層）では，新しく同定されたエクソンから，エクソン30までスプライシングされた網膜型ジストロフィン，Dp260が分離され，正常な網膜機能の保持に重要と考えられている

（D'Souza VN et al. 1995）．また，中枢神経で発現している，イントロン44から転写されるアイソフォームであるDp140が報告されている（Lidov HGW et al. 1995）．

4) ジストロフィン関連蛋白

Loveら（1993）はジストロフィンのC端の83%とホモロジーのある塩基配列を持つ，ヒト第6染色体に存在するジストロフィン関連遺伝子を発見し，その遺伝子産物をutrophinまたはジストロフィン関連蛋白（dystrophin related protein : DRP, Tinsley JM et al. 1992）と名付けた．DRPは神経筋接合部，筋腱接合部の膜に分布しており，脳では血液脳関門を形成する星状膠細胞の足突起に認められる．一方，このDRPは，DMD患者やDMDのモデル動物であるmdxマウスでは増加が認められることと，その発現パターンから，ジストロフィンのembryonic formである可能性やジストロフィンの代用蛋白として機能している可能性がある（Matsumura K et al. 1992b）．

5) DAG/DAPについて（図 1c）

ジストロフィンはN末端で細胞骨格のFアクチンと，Fアクチンはさらにタリンやビンキュリン，インテグリンとともに，いわゆる筋形質膜直下のcostamereを形成している（Masuda T et al. 1992）．ジストロフィンと複合体を形成する蛋白群であるジストロフィン結合糖蛋白（DAG）およびジストロフィン結合蛋白（DAP）は3つのグループに分けられる（Tinsley JM et al. 1994）．第1のdystroglycan（ α -dystroglycan／ β -dystroglycan）は，同じ遺伝子にコードされている産物であるが， α -dystroglycan（156DAG）

は細胞基底膜の主要構成要素であるラミニンと結合している。一方、 β -dystroglycan (43DAG) はcystein-rich domainと C-terminal domainの前半でジストロフィンと結合している。

第2のsarcoglycan complexはadhalin (50DAG) , 35DAG (A4) , A3bから成るが、骨格筋・心筋に特異的に発現しているという点で筋ジストロフィーの発症機構との関連が注目されている。Matsumuraら (1992a) は北アメリカにみられるDMD類似の重篤な小児の常染色体劣性遺伝形式の筋ジストロフィー (SCARMD) では、ジストロフィンは正常であるが、adhalin (50DAG) が欠損し35DAGも減少していることを報告した。また、dystrophic hamsterはジストロフィンは正常だが、adhalin (50DAG) , 35DAGはほとんどなく、dystroglycanも減少していることが示されている。さらに、ジストロフィンの欠損しているDMD患者やmdxマウスにおいてもsarcoglycanの発現が低下している。第3のグループはジストロフィンに直接結合する α 1-, β 2-syntrophinから構成される。最近、 α 1-syntrophinは、nNOSと結合し、nNOSはジストロフィンのtriple helical segmentsと結合することが報告され、筋崩壊の一因としてNOの関与が考えられている

(Brenman JE et al. 1995, Brenman JE et al. 1996, Chao DS et al. 1996) 。また、 β 2-syntrophinは神経筋接合部に存在する。

DMDにおけるDMD遺伝子の欠失部位の検索から、ジストロフィンのDAGとの結合部位がなくなるとDMDとして発症すること、一方ではジストロフィンに一次的な異常がなくともDAGや細胞外マトリックスに欠陥が存在すれば、結果としてジストロフィン欠損に類似の病像を呈しうることが明らかにされつつある。

3. 診断（荒畑ら，1990）

DMD/BMDでは遺伝子の部分欠失が60～70％に，重複が6～10％に認められる．現在では，PCR法による遺伝子増幅技術の導入により，微量のサンプルからでも迅速にDMD/BMDでは遺伝子診断が可能となった．実際には複数のプライマーミックスを一本の反応チューブ内で使用し，1レーンで電気泳動するマルチプレックスPCR法が用いられる．この方法をDMD遺伝子の18種類のエクソンについて行えばサザンブロットで見い出される遺伝子欠失の88％までが発見できる．この方法で欠失を発見できなかった症例については点突然変異が原因であると考えられるが，SSCP（single strand conformation polymorphism，一本鎖DNAが塩基配列の差により異なる高次構造をとることの多型を読み取る方法）も試みられている．

4. 筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

1) 治療の歴史

DMDの平均死亡年齢は1972年には 18.0 ± 3.6 歳であったが，1982年には 20.4 ± 3.7 歳と次第に延長している．この延長には，療育面での改善，適切な生活指導，栄養状態の改善，感染予防，心不全・呼吸不全に対する処置などが大きく貢献している．薬物療法では，蛋白酵素阻害剤，蛋白同化ステロイド，カルシウム拮抗剤，ビタミン剤，ダントロレンなど多くの薬物の投与が試みられてきたが，十分な治療効果を上げられていない（江橋ら1990）．

最近，prednisoneの長期投与群で，自然経過群よりも有意に筋力低下や，筋量の減少が少ないとの報告がある（Fenichel GM et al. 1991）．しかし，体重増加，白内障等の副作用があり，副作用の少ないステロイド剤が試み

られつつある。

2) 動物モデル

治療のモデルとしては、DMD遺伝子の点突然変異により、停止コドンを生ずるmdxマウスが用いられることが多い (Sicinski P et al. 1989)。mdxマウスではジストロフィンの発現はrevertant線維 (1%以下) に認められるのみで、DAG/DAPの発現も減少している。しかし、横隔膜以外では筋再生が活発で筋力低下も軽度であり (Stedman HH et al. 1991)、病態解明および治療の検討のためには他のモデル — transgenic mouseやジストロフィー犬 (Ervasti JM et al. 1994) など — が検討されている。

3) DMDに対する遺伝子治療

DMDの2/3はcarrierである母親からの遺伝で生ずるが、1/3はDMD遺伝子の胚細胞レベルでの新たな突然変異により生ずることが知られている。この突然変異率の高さおよび有効な薬物などによる治療法がない致死的な疾患であるため、出生前診断が求められるだけでなく、体細胞遺伝子治療の対象となる。しかも、酵素欠損を来す疾患の場合は遺伝子を導入し酵素を発現させれば十分であるが、構造蛋白の欠損であるDMDではDAGなどの関連蛋白の発現量も低下しているため、DMD遺伝子を導入するだけで治療になるのかという問題があった。Leeら (1993)、Coxら (1993) はその疑問に答えるべくDMDのモデル動物であるmdxマウスに筋クレアチンキナーゼのプロモーターを用いて全長型のジストロフィンcDNAを導入したtransgenic mouseを作り、ジストロフィンのみならずDAGの発現も正常化し、病理学的にも生理学的にもDMDの所見が改善することを実証した。これにより、DMDのDMD遺伝子による遺伝子治療が有効かつ妥当であることが確認された。

4) 遺伝子治療の前段階としての筋芽細胞注入移植

遺伝子治療の方法には筋芽細胞注入移植 (Karpati G et al. 1993) と遺伝子導入という 2 つのアプローチが考えられる。正常の遺伝子を持つ筋芽細胞を患者の骨格筋に注入しようという筋芽細胞注入移植は遺伝子そのものを導入するステップを踏んでいないため、厳密には遺伝子治療とは言えず、本格的な遺伝子治療の前段階にあると考えられる。1989年, Partridgeらは、正常筋芽細胞をmdxマウスに注射することにより、筋線維にジストロフィンが発現するのを確認した。この実験は、mdxマウスの筋線維に正常の核が取り込まれ、その結果、正常のDMD遺伝子がジストロフィンを作り、細胞骨格のネットワークに組み込まれたことを意味し、筋芽細胞注入移植がDMDに対する治療法として用いることができるという根拠を与えた。

ヒトへの筋芽細胞注入移植には正常donorからの筋芽細胞の移植 (Karpati G et al. 1993) , 患者自身の筋芽細胞または線維芽細胞に正常のDMD遺伝子を導入し、自己移植を行うという 2 つの方法が考えられる。しかし、これらの方法は局所療法に留まるうえに、前者は拒絶反応のため免疫抑制剤が必要で、後者は拒絶反応はないが、培養細胞に対する遺伝子導入を要するという問題点がある。前者は既に試みられているがDMD患児に認められる強い線維化に妨げられて良い成績を挙げるに至っていない。

5) 筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の方法には、大きく 2 つのアプローチが考えられる。一つは遺伝子を培養細胞に導入し、その遺伝子操作を行った細胞を移植する、ex vivo遺伝子治療であり、もう 1 方は個体に直接遺伝子を導入する、in vivo遺伝子治療である。これまで、ジストロフィン cDNAについては、直接生体へプラスミドなどを注入する方法と、ウイルス

などのベクターを用いる方法が用いられてきた。各種導入法の特徴を表 1 に示す。

直接導入は導入遺伝子の長さに制限がなく、細胞に対する傷害性が低い安全な系であるが、効率が悪く、大量の遺伝子が必要で、拡散制限があり、全身の治療にはなりがたいという問題点がある。Acsadiら（1991）が mdx マウス骨格筋にジストロフィンcDNAを筋注したところ、1 %以下の筋細胞にジストロフィン陽性線維が認められたに過ぎなかった。一方、Davisら（1993a）は25 %のsucroseをあらかじめ投与することにより、導入遺伝子を拡散させ、導入効率を50 %近く増加できたと報告している。また、塩酸ブピバカインなどの前処置を行い筋再生を惹起することにより、再生筋に多くの遺伝子を取り込まれることが明らかになってきている。

他の物理・化学的遺伝子導入法としては、リピッドを用いる方法があり、培養細胞に対する高い遺伝子導入効率のために注目されている。これには、リポソームを作り、DNAを封入して細胞と融合させる方法（リポソーム法）と、陽性荷電した脂質とDNAの複合体を形成させ、細胞に取り込ませる方法（リポフェクション法）がある。リポソーム法では、不活化したセンダイウイルスとジストロフィンcDNAを封入したリポソームを用いてmdxマウス骨格筋に筋注した報告がある（柳原ら 1993, Yanagihara et al. 1996）が、短期間の発現しか得られていない。リポフェクション法では、mdxマウスの初代骨格筋細胞へDMD遺伝子を導入した報告がある（Trivedi RA et al. 1995）。

ウイルスベクターとしてはアデノウイルス、レトロウイルスをはじめ遺伝子工学により開発された感染力はあるが病原性のないウイルスが用いられる（表 2, Breakefield XO 1993）。ウイルスベクターを用いる方法は全身投与が可能であるが、ウイルスの病原性および組み換えによる発癌性への疑念、また、導入できる外来遺伝子の長さに制限がある。

特にジストロフィン(cDNAが14kbあり、ウイルスベクターに組み込む場合には、軽症のBMDの患者からえられたtriple helical segmentsの約1/2が欠損した6.3kbのDMD遺伝子(minigene/minidystrophin gene: England SB et al.1990)が用いられることが多い。

アデノウイルスは導入可能な遺伝子サイズは7-8 kbではあるが、筋細胞のような分裂後細胞にも取り込まれること、染色体に積極的に取り込まれる機構を持たず、核内でエピゾームとして長期間安定した発現が期待できること、高い力価を得やすく、組織特異的なプロモーターと組み合わせが可能なことなどより、ベクターとして注目され、主にin vivoにおける導入に使用されている。Ragotら(1993)はminidystrophin geneをアデノウイルスに組み込んで、mdxマウス(5日齢)に導入し、5日齢最高50%の筋線維に発現を確認している。しかし、その後の研究では、成熟マウス骨格筋での発現は低く、その理由として、アデノウイルスが細胞内に取り込まれるのに必要な αv インテグリンの発現が幼若筋のみに認められたことがあげられた。また、アデノウイルス・ベクター自体の組織傷害性、抗原性が指摘されている。

一方、レトロウイルスは、分裂中の細胞に取り込まれ、染色体に組み込まれることにより、安定した導入遺伝子の発現が期待でき、Adenosine deaminase(ADA)欠損症の遺伝子治療に用いられてから、ex vivo遺伝子治療に多用されている。レトロウイルスはin vitroでの遺伝子導入効率が高いが、高い力価のウイルスが得られにくいこと、分裂後の細胞からなる骨格筋へのin vivo導入は困難であること、染色体に組み込まれるためinsertional mutagenesisの危険性があること、親ウイルスの混入などの問題がある。Dunckleyら(1993)はレトロウイルスを用いて、dystrophin minigeneをmdx筋に注入後、平均6%の筋線維にジストロフィンの発現を確認し、その発現は9カ月後も認められたと報告している。しかし、不完全なジストロ

フィンcDNAの導入はDMDに対する根本的な治療とはなりえず、全長型のジストロフィンcDNAを導入可能なベクターや導入方法の開発が期待されている。

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の試みはまだ始まったばかりであり、解決しなくてはならない問題が数多く存在する。効果的な遺伝子治療を行うためには、骨格筋細胞にたいして、効率の高い遺伝子導入法の確立が重要である。我々は、分裂後細胞への遺伝子導入が可能なアデノウイルス・ベクターと、導入遺伝子の長さに制限がなく、比較的簡便なカチオン性脂質に着目し、lacZ遺伝子を用いて骨格筋細胞に遺伝子導入を行った。

表1 遺伝子導入法の特徴

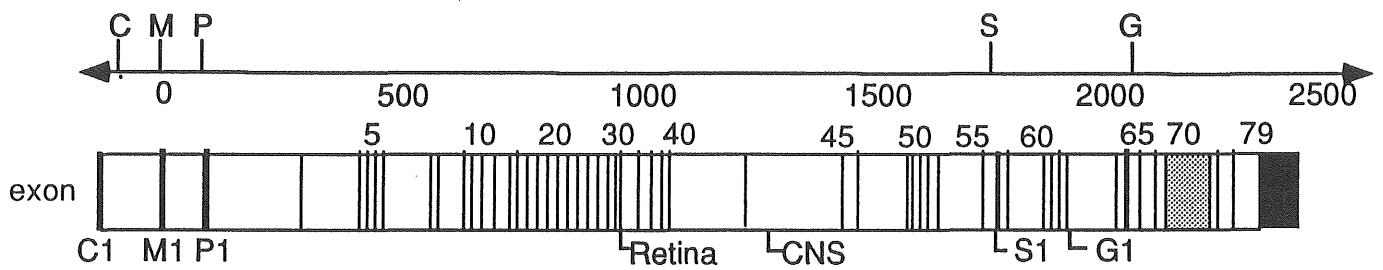
物理・化学的遺伝子導入法

名称	in vitro 導入法	in vivo 導入法	利点および欠点
リン酸カルシウム法	◎	X	培養細胞に対しては有効
DEAE-デキストラン法	○	X	細胞毒性が強い
microinjection法	◎	X	熟練が必要、細胞数に限りがある
electroporation法	◎	X	細胞障害性が強い
リビッド法	◎	○	試薬が高価
直接導入法 (direct injection)	X	◎	再現性低い
生物学的遺伝子導入法			
レトロウイルス・ベクター	◎	○	非増殖細胞には不適、力価が低い
アデノウイルス・ベクター	○	◎	非増殖細胞にも取り込まれるが、短期間発現に留まる

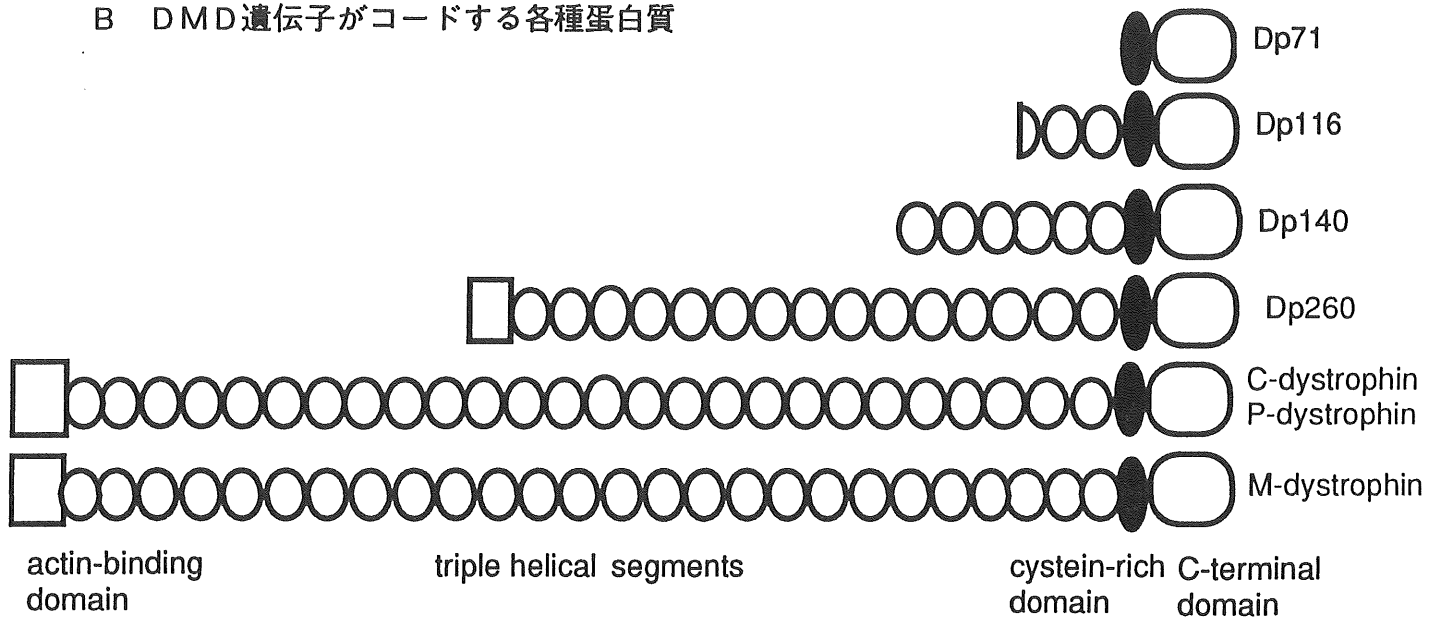
表2 ウイルスベクターとその特徴 (Breakfield XOより改変)

ウイルス	挿入可能な遺伝子 サイズ (kb)	核内存在 様式	病現性の 有無	特 徴
アデノウイルス	8	episomal	—	高力価、分裂後細胞に感染
レトロウイルス	≒8	integrate	+	低力価、分裂中細胞に感染
ヘルペスウイルス	>30	episomal	+	
EB ウイルス	>20	integrate	+	
アデノ随伴 ウイルス	0.5	integrate	—	アデノウイルスが感染しないと 発現しない

A DMD遺伝子



B DMD遺伝子がコードする各種蛋白質



C ジストロフィンとDAG, 細胞外マトリックスとの模式図

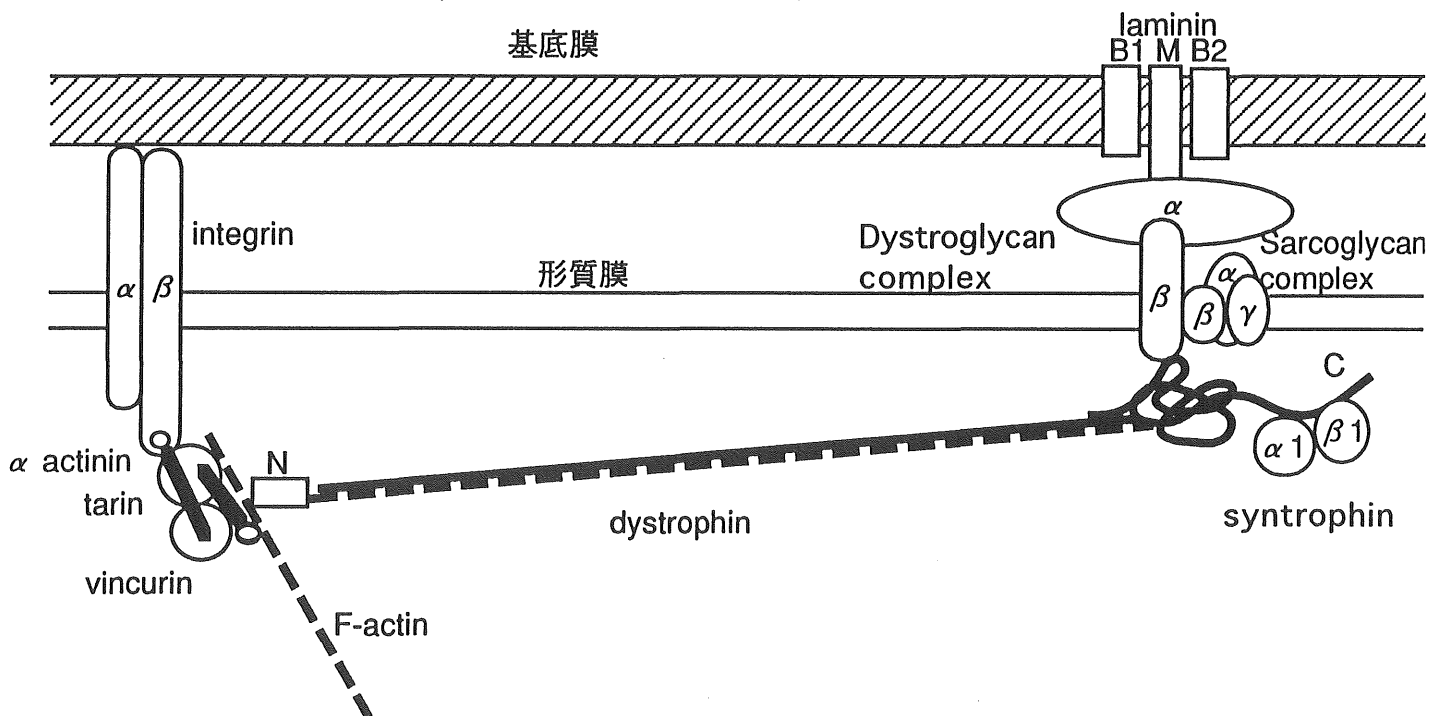


図1 DMD遺伝子と転写されるisoform、ジストロフィンとDAGの模式図
(Worton R, 1995, Ozawa E 1995より作図)

第 1 章

アデノウイルス・ベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入

1. 目 的

アデノウイルス・ベクターはヒトやマウスなどの多くの動物種の神経、肝、筋細胞（Stratford-Perricaudet LD et al. 1992）など広範囲の細胞に高い効率で遺伝子導入が可能な、持続の長い一時的発現系である。このアデノウイルス・ベクターの作製は従来極めて非効率的で、一部の限られた特殊技術の域を出なかったが、斎藤らが開発した、効率の高い組換えアデノウイルス作製法（COS-TPC法, Miyake et al. 1996）により、急速に普及しつつある。遺伝子治療技術としては、すでに構築され機能している組織へ直接投与することにより生きた細胞に直接欠損した遺伝子を補う、いわゆるin vivo遺伝子治療の方法として研究が進められている。すでに、米国では、嚢胞性線維症の患者に対して実験的治療が開始されており（Zabner J et al. 1993）、その他、筋ジストロフィー（Acsadi G et al. 1991, Quantin B et al. 1992, Vincent N et al. 1993, Alameddine HS et al. 1994, Acsadi G et al. 1996）、家族性高コレステロール血症（Grossman M et al. 1994）、血友病治療（Dai Y et al. 1995）などの研究が報告されている。また、アデノウイルス・ベクターは、分裂後の分化した細胞へも遺伝子導入が可能であり、特に神経系への遺伝子導入法（Hasimoto M et al. 1996）として注目されている。

遺伝子治療に用いられている組換えアデノウイルスは非増殖型であり、ウイルスが複製するために必須である初期遺伝子E1A, E1B遺伝子を欠損し、その領域に目的遺伝子を導入している。このウイルスは、E1A, E1B遺伝子を恒常的に発現している293細胞では、 10^9 PFU（plaque forming unit）/mlまで増殖するが、293細胞以外のE1A, E1B遺伝子を持たない細胞ではウイルスとしては増殖できない。アデノウイルス・ベクターの特徴としては、遺伝子導入に細胞の増殖が必須でないため、分裂後の分化した細胞に遺伝子を導入することが可能であること、非常に高い効率でウイルス遺伝子を

核内に移行することが可能であること，外来遺伝子を発現させるプロモーターを任意に選択することが可能であることがあげられる．一方，染色体には組み込まれないため，insertional mutagenesisの危険性は少ないが，導入遺伝子の発現は一過性で，遺伝子治療を行うためには反復投与が必要となる．また，ウイルスおよび外来遺伝子産物に対する免疫反応による導入遺伝子発現の減少や，ウイルスに対する中和抗体による反復投与の際の導入効率の低下が問題となっている．

骨格筋細胞という分裂後細胞に導入が可能であること，組織特異的発現がプロモーターの選択により可能であることから，将来の筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を目的として，アデノウイルス・ベクターを用いた骨格筋に対するlacZ遺伝子の導入を行った．

2. 対象と方法

1) 組換えアデノウイルスの作製

多種類の細胞で β -galactosidase (β -gal) の高度の発現が可能な AxCALacZ (Kanegae Y et al. 1995) および AxSRLacZ (Hashimoto M et al. 1996) (図I-1) は、東京大学医科学研究所遺伝子解析施設斎藤研究室より供給を受けた。これらの組換えアデノウイルスは、ヒト・アデノウイルス 5 型の E1A, E1B, および E3 部位を欠失させ、E. coli-LacZ 発現単位を組み込んだベクターである。

成熟した骨格筋細胞（特に fast glycolytic fiber）でのみ発現する myosin heavy chain IIB (MHC IIB) プロモーター (Takeda et al. 1992) に LacZ 遺伝子を組み合わせた AxMHCLacZ は、斎藤研究室との共同研究により以下のように作製した (図I-2)。

p-192MHC-IIBCAT を制限酵素 *Xba*I で切断し、*Xho*I linker (New England Biolabs Inc) を同部位に挿入し、制限酵素 *Hind*III と *Xho*I の double digestion により、-192MHC-IIB プロモーターを切り出した。一方、paSRNlacZ から、制限酵素 *Hind*III と *Xho*I の double digestion により、SR プロモーターと lacZ 遺伝子を切り出し、同部位に -192MHC-IIB プロモーターを挿入した。その後、*Hind*III site に lacZ 遺伝子を挿入し、p-192MHC-IIBLacZ が得られた。完成した p-192MHC-IIBLacZ を *Hind* III と *Bgl* II で切断し、DNA polymerase の Klenow fragment を用いて断端を blunt end にした。この fragment をアガロースゲル電気泳動により精製し、モル比 3:1 で、1 μ g の *Swa* I 切断 pAx1w カセットコスミドと混合した。T4 DNA ligase により、最終容量 10 μ l で終夜 ligation 後、*Swa* I で切断した DNA を Gigapack XL (Stratagene) を用いて in vitro パッケージングを行った。組換えアデノウイルス作製のための親ウイルスには Ad5-dIX (E3 deletion: mu 79.6-84.8,

Saito I et al. 1985) を用いた。Ad5-dIXのDNA-TPC1 μ g をカセットコスミド8 μ g を混合し、6cm dishで培養した293細胞に、リン酸カルシウム法 (CellPfect Transfection kit, Pharmacia) でトランスフェクションした。1日後、細胞を10倍段階希釈し、未感染の293細胞 (Graham FL et al. 1977) と混合し、96穴プレートに捲き直した。培養10日～15日後にウイルスクロンを分離し、制限酵素による切断パターンやLacZ遺伝子の発現により目的のウイルスを同定した。ウイルスストックは、感染させた293細胞を密封型超音波破碎装置により破碎した上清を-80℃に保存した。

2) アデノウイルス・ベクターの力価測定 (Kanegae Y et al. 1994)

コンフルエントな状態の293細胞を10cm dish 1枚用意した (細胞数 2×10^6 個)。組換えウイルスを5%FBS添加DMEMを用いて $10^1 \sim 10^4$ まで段階希釈した。コラーゲンコート96穴各1枚のすべてのウェルに50 μ lずつ5%FBS添加DMEMを入れた。第1列目に 10^4 に希釈した組換えウイルスを25 μ lずつ加え、8ウェル用マルチチャンネルピペットを用いて25 μ lを2列目のウェルへ移した。同様の操作を11列目まで繰り返し、最後の25 μ lは捨てた。このようにして、3rdの段階希釈列を $3^{11} \times 10^4$ まで作製し、12列目は非感染細胞のコントロールとした。10cm dishの293細胞をPBS-EDTAではがし、5%FBS添加DMEM 6mlに再懸濁し、50 μ lずつ96ウェルに加えた。3日、6日、9日に各ウェルに10%FBS添加DMEMを50 μ lずつ加え、12日後に細胞変性の終末点を顕微鏡で判定した。ゲルバーの式を用いて統計学的に50%細胞変性終末点 (TCID₅₀) を計算した。

*ゲルバーの式：求める50%細胞変性終末点 (TCID₅₀) を 10^x とすると

$$X = \log a - \left(\text{各段階希釈における} \left[\frac{\text{変性ウェル数}}{\text{検体数}} \right] \text{の総和} - 0.5 \right) \times \log (\text{希釈率})$$

a: 1列目の希釈度 ($3^1 \times 10^4$)

3) 細胞とその維持

2ヵ月齢のC3Hマウスの大腿部骨格筋由来の細胞株であるC2細胞（Yaffe教授から譲渡，Yaffe D et al. 1977），C2C12細胞（Blau HM et al. 1983）からサブクロニングされた高分化型のC2/4細胞（国立精神・神経センター藤沢先生，吉田先生から譲渡，Yosida S et al. 1996）を使用した。

1%ペニシリン，2%ストレプトマイシンを添加したDulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM，pH7.4に調整後0.22 μ mフィルター滅菌）に10%ウシ胎仔血清（Fetal Bovine Serum：FBS）を使用時に加え調整し，維持培地とした。増殖培地として20%FBS添加DMEMを，分化誘導培地として5%ウマ血清（Horse Serum：HS）添加DMEMを使用した。C2/4細胞は5%HS添加DMEM培地で培養すると図I-3のように筋芽細胞が融合し，多核の筋管細胞を形成する（染色方法は第2章参照）。

293細胞は大日本製薬から購入し，維持培地として10%FBS添加DMEMを用いた。

4) 細胞への感染

5×10^4 個のC2およびC2/4細胞を35mm dish（コラーゲンIコート，Iwaki）にまき，20%FBS添加DMEM培地で1晩，37℃，5%CO₂下で培養した。翌日，細胞数を算定し，1細胞あたり10感染粒子相当（MOI 10: multiplicity of infection）のウイルス液を5%FBS添加DMEM培地で全量を100 μ lとして，培地を吸引除去した各dishに加えた。37℃，5%CO₂下で培養しつつ，20分ごとに3回，dishを振り動かし，ウイルスを感染させたのちに増殖または分化誘導培地に交換した。

5) β -galactosidase染色および活性測定法 (Rosenthal N 1987)

a. 培養細胞に対する β -galactosidase染色法

培養細胞の培地を吸引除去後、PBS(-) (phosphate buffer saline : 136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で、洗淨し、1%ホルムアルデヒド+0.25%グルタルアルデヒド/PBS(-)溶液で、25分間室温で固定した。固定後、PBS(-)で3回洗淨し、 β -galactosidase染色溶液 (500 μ g/ml X-gal, 5 mmol/l potassium hexacyanoferrate (III), 5 mmol/l potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate, 2 mmol/l MgCl₂) を加え、3-16時間、37℃で染色した。染色後、PBS(-)で洗淨、PBS(-)を加えて検鏡した。

b. 筋組織切片に対する β -galactosidase染色法

マウス前脛骨筋をウイルス筋注後、7日、14日、28日に取り出し、液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結した。10 μ mの組織切片をクリオスタットで作製し、PPL (poly-L-lysine) コートしたスライドにのせ、1.5%グルタルアルデヒド/PBS (-) で5分間固定した。PBS (-) で洗淨後に β -galactosidase染色液 (500 μ g/ml X-gal, 5 mmol/l potassium hexacyanoferrate (III), 5 mmol/l potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate, 2 mmol/l MgCl₂) 内で3~16時間染色した。PBS (-) 洗淨後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。3~7匹のマウスの最も β -galactosidase陽性細胞が多いcross-sectionの筋細胞をすべて数え、 β -galactosidase陽性筋線維の平均値と標準誤差を計算した。

c. 培養細胞における β -galactosidase活性測定

培養細胞の培地を吸引除去し、PBS(-)で3回洗淨した後、ラバーポリスマンを用いて、細胞をdishから剥離した。遠心後、250 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁し、3回のfreeze-thawing (液体窒素と37℃恒温槽) を繰り返し、14500 rpmで10分間の遠心を行い、細胞抽出液 (上清) を得た。細胞抽出

液の蛋白濃度を測定（後述）し，蛋白 $50\mu\text{g}$ 分の細胞抽出液にreaction buffer（60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2 ）を加え，1mlにした．また，検量線作製のために大腸菌由来 β -galactosidase（SIGMA）に，reaction bufferを加え1mlにしたものを準備した． $200\mu\text{l}$ ONPG（4 mg/ml in phosphate buffer, pH 7）と β -メルカプトエタノール $3.96\mu\text{l}$ を各サンプルに加え， 37°C の恒温槽で，色調が黄色になるまでインキュベーションした． 0.5 ml Na_2CO_3 を加えて反応を終了させた後， 420 nm で吸光度を測定し，検量線から β -galactosidaseの量（Unit）を計算した．

d. 筋組織切片からの β -galactosidase活性測定

30枚の筋組織切片に $100\mu\text{l}$ の溶解液（20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl_2 , 0.1% Triton-X100）を加え，凍結融解を3回繰り返した後に14500回転，10分遠心し，組織抽出液を得た．100倍希釈した組織抽出液 $20\mu\text{l}$ の蛋白濃度を測定し，同じ蛋白量の組織抽出液を用いて，上記と同様に β -galactosidase活性を測定した．

e. 蛋白濃度の測定

Bradford色素結合法（Bradford 1976）に基づいておこなった．Coomassie Brilliant Blue染色液をmilliQ水で5倍希釈した．細胞抽出液 $10\mu\text{l}$ に対し希釈した染色液 $500\mu\text{l}$ または，組織抽出液 $20\mu\text{l}$ に1 mlの染色液を加え，ボルテックス後室温で10分反応させた．定量のため，アルブミン（10 mg/ml）を用意した． 595 nm で吸光度を測定し，検量線から細胞抽出液の蛋白濃度を算定した．

6) マウス前脛骨筋への導入

5～6週齢のC57BL/10マウスとBALB/cマウスをジエチルエーテルで麻酔し，右下腿前面の皮膚を切開し，前脛骨筋を露出した．1 mlの注射器と

27gauge針を用いて、50 μ lのウイルス液を緩徐に軽く圧をかけながら注入し、注入後数秒間注射器を保持し、静かに針を抜去した。次に左下腿前面の皮膚を切開、前脛骨筋を露出し、同様の手技でコントロールとして、PBS(-)を50 μ l注入した。

7) CD 4, CD 8 抗体染色

ビオチン化したハイブリドーマGk1.5の上清をCD 4 抗体 (1:50希釈) とし、ビオチン化したLy 2 抗体 (clone YTS169.4, Cedarlane Lab.) をCD 8 抗体 (1:30希釈) として用いた。クリオスタットを用いて、6 μ mの組織切片を作製し、冷アセトンで5分間固定し、0.2規定の塩酸でアルカリフォスファターゼブロックを10分行った。20%FBS/PBS (-) (0.1%アジ化ナトリウム含有) で30分、室温でブロック後、4℃、1晩一次抗体と反応させた。0.05%Tween20/PBS (-) で洗浄後、ultra-avidin alkaline phosphatase conjugate (Leico, Manchesca Mo.) と室温、30分反応させ、PBS (-) で洗浄、アルカリバッファー(100 mM Tris-HCl pH9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) でバッファーを置換した。1mlのアルカリバッファーに3.5 μ l X-phos, 4.5 μ l NBTを加えた液で、5～8分反応させ、2%メチルグリーンで核染色を行い、検鏡した。

8) 再生筋の同定

中心核線維は、ヘマトキシリン・エオジン染色のみを行ったプレパラートで算定した。embryonic isoformのmyosin heavy chainの抗体染色は、BF45ハイブリドーマ細胞の上清 (1 倍, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) を用いて、モノクローナル抗体用Histostain-sp kit (Zymed lab.) で発色を行った。

9) ウエスタンブロット法

10 μ mの筋組織切片30～60枚 (5～10 mg) をクリオスタットで作製し、その重量の20倍量の溶解液 (10% SDS, 70 mM Tris-HCl pH 6.7, 10 mM EDTA, 5% β -mercaptoethanol) でホモジナイズした。蛋白濃度を定量後、同じ蛋白量のサンプルを、7.5%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDFメンブレン (Millipore) にブロットした (BioRad mini-protean system)。メンブレンを10%スキムミルクTBS-T (Tris buffer saline-Tween 20; 136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH7.4, 0.1% Tween20) を用いて、4℃で終夜ブロッキングした後に、抗ヒト α_v インテグリンモノクローナル抗体 (Clone VNR139 Gibco-BRL, 1:1000に10%スキムミルクTBS-Tで希釈) と室温で1時間反応させた。10分、3回の10%スキムミルクTBS-Tによる洗浄後、HRP (Horseradish peroxydase) 結合抗マウスIgG抗体 (1:5000に10%スキムミルクTBS-Tで希釈) と室温で1時間反応させた。TBS-Tで洗浄 (10分、3回) し、AmershamのECL化学発光キットにより検出した (Acsadi G et al.1994)。

10) 血清中 β -galactosidase抗体のELISA法による検出

96穴プレートに、PBSに溶解した β -galactosidaseを1ウエル当り50ngずつ4℃で1晩コートした。1%BSA-PBS-Tween20でブロッキング後、アデノウイルス・ベクターを筋注したマウス血清を段階希釈して加え、ペルオキシダーゼのついたウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (1:1000希釈, Dako) を加え、2時間、37℃で反応させた。2,2-azino-di [3-ethyl-benzthiazoline sulfonate] (ABTS) を加え、415 nmの吸光度を測定した。標準血清はBALB/cマウスに25 μ gの β -galactosidaseをCFAとともに2週間免疫して得た。

1 1) 脾細胞からのCD 4 およびCD 8 陽性細胞の分離

アデノウイルス・ベクターを筋注したマウスから無菌的に脾を取り出し、脾細胞を分離した。FITCでラベルした抗CD 3，抗CD 4，抗CD 8 抗体で脾細胞を染色し，FACSを用いて陽性細胞を検出した。

3. 結果

1) in vitro遺伝子導入

a. 培養骨格筋細胞（C2細胞）でのアデノウイルス・ベクターの発現

アデノウイルス・ベクターの導入効率を調べるため、マウス培養骨格筋細胞株であるC2細胞に、1細胞あたり10感染粒子（MOI 10）のアデノウイルス・ベクターAxCALacZ（Kanegae Y et al. 1995）、AxSRLacZ（Kanegae Y et al. 1994）、AxMHCLacZを感染させ、 β -galactosidase染色と活性測定を行った。

感染後、増殖培地を分化誘導培地に交換し、1, 3, 7, 10日後に β -galactosidaseの発現を比較検討した。AxCALacZを感染させたC2細胞での β -galactosidaseの発現は高率で、ほぼ100%の細胞が β -galactosidase染色陽性であった（図I-4a）。単位蛋白当りの β -galactosidase活性（表I-1）は感染後7日までは増加の傾向があり、10日目には減少していた。AxMHCLacZを感染させた場合には、7日目までは明らかな活性は観察されず、10日目に活性の上昇が認められた。これは、MHC-II Bプロモーター（Takeda S et al. 1992）の筋芽細胞では発現が低く、分化した筋管細胞では発現が高いという性質を反映していると考えられた。筋細胞で高い発現が認められるCAプロモーター（Niwa H et al. 1991）をもつAxCALacZを感染させた場合には、コントロールであるAx1wを感染させた場合と比較し、3日では232倍、7日では137倍の β -galactosidase活性が得られ、高い遺伝子導入高率を背景とした β -galactosidaseの安定した発現が確認された。

b. 培養骨格筋細胞（C2/4細胞）の増殖・分化と感染効率

アデノウイルス・ベクターが高度に分化した筋管細胞にも感染可能かどうかを調べるため、分化能に富んだC2/4細胞に、増殖を維持したまま、あるいは分化培地に交換し分化を誘導した、1, 2, 3, 4, 6日目に、アデノウイルス・ベクターの感染を行い、感染後3日目に β -galactosidase染色と活性測定を行った（図I-4c）。AxCALacZを用いた実験では、分化を誘導して6日目に感染を行った場合に、最も高い β -galactosidase活性が得られ、 β -galactosidase染色においてもほぼすべての筋管細胞、しかも大きなよく発達した筋管が高度に染色された（図I-4b）。増殖培地で維持した場合には、100%の細胞が β -galactosidase陽性であったにもかかわらず、 β -galactosidase活性は分化を誘導した場合より低値であった。この理由として、アデノウイルス・ベクターは染色体に組み込まれないため、細胞の分裂により、導入遺伝子が希釈されていまいことが考えられた。AxMHCLacZを用いた実験（図I-4d）では、分化誘導から感染までの時間が長いほど、 β -galactosidase活性は増加し、分化誘導後、6日目に感染させた場合に最も高い活性が得られた。しかし、その値はAxCALacZを用いた場合より明らかに低値であった。

以上より、アデノウイルス・ベクターは高度に分化した筋管細胞においても感染が可能で、 β -galactosidaseの発現レベルは導入遺伝子が持つプロモーターの強さで決まることが明らかになった。

2) in vivo遺伝子導入

a. β -galactosidase発現の経時的变化

in vivo導入での β -galactosidase発現の経時的变化を調べるため、5～6週齢のC57BL/10マウス右前脛骨筋にAxCALacZを50 μ l筋注し、 β -galactosidase活性を測定した。用いたAxCALacZの力価は 4.3×10^7 PFU

(plaque forming unit) /50 μ lで、マウスの前脛骨筋に含まれる筋線維数は 2.3×10^3 (Tissenbaum HA et al. 1991) であるので、1筋線維当り、 1.9×10^4 個 (MOI 1.9×10^4) の感染ウイルス粒子を筋注したことになる。

β -galactosidase活性は筋注後7日が最も高く、35日まで徐々に減少した (図I-5)。40日後に、左前脛骨筋に再度AxCALacZを50 μ l筋注したところ、7日目には β -galactosidase活性は35日よりも上昇したが、初回投与7日目の値には達しなかった。

b. C57BL/10マウス前脛骨筋での β -galactosidaseの発現

異なったプロモーターにより、lacZ遺伝子の転写を行っているアデノウイルス・ベクター、AxCALacZ (MOI 1.9×10^4) , AxSRLacZ (MOI 2.8×10^4) , AxMHCLacZ (MOI 1.0×10^4) を、5～6週齢のC57BL/10マウス右前脛骨筋に50 μ l筋注、 β -galactosidase活性染色を行い、プロモーターによる導入遺伝子発現の違いを比較検討した。コントロールとして、発現ユニットを持たないAx1w (MOI 1.5×10^4) を用いた。

AxCALacZを投与した場合、筋注7日では約66%、14日では約50%、28日では約10%と高率の β -galactosidase陽性筋線維が認められた。しかも、180日経過しても6.3%の筋線維は β -galactosidase陽性であった (表I-2)。

AxSRLacZの筋注では、7日目には約1%、14日には約0.5%の β -galactosidase陽性筋線維が認められたのみで、28日目には陽性筋線維は認められなかった。

AxMHCLacZは、骨格筋特異的プロモーターを持つにもかかわらず、投与

に β -galactosidase の発現は認められなかった。コントロールの Ax1w の投与では β -galactosidase 陽性筋線維は認められなかった。以上より、CAG プロモーターが、SR α (Takebe Y et al. 1988)、MHC-IIb プロモーターと比較し、骨格筋で強力であるために高度に β -galactosidase が発現していることが明らかになった。

次に AxCALacZ を投与した筋組織を詳しく見てみると (図I-6)、7日目の組織では β -galactosidase 陽性筋線維間で β -galactosidase 染色濃度に差が認められた。染色濃度は、高いウイルス濃度にさらされたと考えられる注射の中心部位で最も強かった。染色濃度が強い筋線維の周囲には部分的に染色された筋線維が認められたが、“染みだし”と考え、陽性筋線維数には含めなかった。14日目には7日目と同程度の濃度の β -galactosidase 陽性筋線維が認められ、これは、安定な β -galactosidase 蛋白の集積が関与していると考えられた。また、筋線維以外に、筋紡錘のカプセルや錐内線維、静脈の血管内皮細胞、筋膜下および筋線維周囲の浸潤細胞にも β -galactosidase が染色される部分が認められた。7日目には、少数の単核球の浸潤が注射部位や血管周囲を中心に認められた。14日には浸潤単核球は増加し、 β -galactosidase 陽性筋線維の周囲を取り囲む像が認められるようになった。この β -galactosidase 陽性筋線維周囲の単核球の浸潤は、 β -galactosidase 陽性筋線維が減少している28日目にも認められた。また、この時期には12.3%の中心核線維と、23.7%のembryonic myosin heavy chain陽性の筋線維が認められ、14日から28日の間に β -galactosidase 陽性筋線維の減少に伴い、筋の再生が起こっていることが示唆された。Ax1wの投与でも、7日目には AxCALacZ を投与した場合と同様、単核球の浸潤が認められた。この浸潤は、14日目には筋細胞周囲に移行したが、AxCALacZ を投与した場合より、軽度であった。28日目には単核球浸潤は減少した。

c. BALB/cマウス前脛骨筋での β -galactosidaseの発現

マウスstrain間の相違を調べるため、5～6週齢の雌のBALB/cマウス前脛骨筋にC57BL/10マウスと同量（MOI 1.9×10^4 ）のAxCALacZを投与し、 β -galactosidaseの発現を検討した。C57BL/10マウスと同様に、 β -galactosidase活性は7日目がピークであったが、C57BL/10マウスよりも低値であった（図I-5）。7日目には約30%の β -galactosidase陽性筋線維が認められたが、10日目には16%、14日目には2.3%と急速に減少し、28日目には陽性筋線維は認められなかった（表I-3, 図I-7）。7日目の単核球の浸潤はC57BL/10マウスよりも激しく、28日目にはほとんど消失した。28日目には、25%の中心核線維と、28.2%のembryonic type myosin heavy chain陽性の筋線維が認められた。

3) 浸潤単核細胞に対する免疫組織染色

浸潤細胞の性質を明らかにするため、CD4/CD8抗体を用いて免疫染色を行い（図I-8, 9），100筋線維当りの浸潤CD4/CD8細胞数を算定した（表I-4）。AxCALacZを投与したC57BL/10マウスでは、7日目にはCD8陽性細胞は血管周囲にわずかに認められるのみであるのに対し、CD4陽性細胞優位の浸潤は筋注部位、血管周囲を中心に、 β -galactosidase陽性筋線維とは必ずしも一致しないが、筋線維間にも認められた。14日目にはCD8陽性細胞数の増加はCD4陽性細胞のそれを上回り、 β -galactosidase陽性筋線維周囲にはCD4およびCD8陽性細胞が認められた。28日目には浸潤細胞数自体は減少したが、CD8陽性細胞優勢の β -galactosidase陽性筋線維周囲の浸潤が引き続き観察された。

Ax1wを投与したC57BL/10マウスでは、同様のパターンの浸潤が認められた。7日目にはやはり、CD4陽性細胞優位の浸潤が認められたが、細胞数はAxCALacZを投与した筋よりも少なかった。14日目にはCD8陽性細胞

は増加し、CD 4 陽性細胞を上回るが、28日目には減少した。

一方、AxCALacZを投与したBALB/cマウスでは、7日目から、非常に多くのCD 8 陽性細胞と、少数のCD 4 陽性細胞の浸潤が、 β -galactosidase陽性筋線維周囲に認められた。14日目には、CD 8 陽性細胞数はさらに増加したが、28日目には急速に減少した。

Ax1wを投与したBALB/cマウスにおいても、7日目にはCD 8 陽性細胞優位の浸潤が認められたが、14日目にはすでに減少していた（図I-10）。

4) α vインテグリンのウエスタンブロットによる解析

アデノウイルスは2つのレセプターで細胞に吸着・侵入するが、最初の吸着段階のレセプター（ほとんどの細胞に存在すると考えられる）はいまだ不明であるが、第2のinternalizationに関与するレセプターは、細胞表面のインテグリン、 α v β 3、 α v β 5であることが、最近、明らかにされた

（Wickham TJ et al. 1993）。すでにBALB/cマウスではアデノウイルス・ベクターは生直後には高い効率で遺伝子の導入が可能であるが、成熟した個体の骨格筋では発現効率が低いという理由の一つに、 α vインテグリンが骨格筋の成熟とともに発現が減少することが示されている（Acsadi G et al. 1994）。C57BL/10マウスとBALB/cマウスの β -galactosidase発現効率の差が、 α vインテグリンの発現の差であるかどうかを確認するために、 α vインテグリンの発現量を、生後1日、14日、60日のマウス前脛骨筋でウエスタンブロットを行い、比較検討した。

図I-11 に、ウエスタンブロットの結果を示すが、myosin heavy chainで補正した α vインテグリンの発現量は、C57BL/10マウスとBALB/cマウスで有意差は認められなかった。

5) 8週齢のC57BL/10マウスへの導入

C57BL/10マウスは、8週齢で成熟する。これまで用いてきた、C57BL/10マウスは5～6週齢で、adolescenceに相当すると考えられる。8週齢のC57BL/10マウスに同量 ($\text{MOI } 1.9 \times 10^4$) のAxCALacZを投与し、adult mouseでの遺伝子導入効率を検討した。

7日目の β -galactosidase陽性筋線維は、27.9%、14日目には35.4%といずれも5～6週齢のマウスの結果より、低値であった。その理由として、アデノウイルス・ベクターの調整から1年以上が経過しており、力価が低下している可能性が考えられた。また、検体数も少なく、新しく調整したウイルス・ベクターを用いて、5～6週齢と8週齢のマウスに投与し、比較検討することが必要と考えられた。

6) C57BL/10ヌードマウスへの導入

アデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子導入では、細胞性免疫により、遺伝子が導入された細胞が排除され则认为られている。細胞性免疫のない状態でのLacZ遺伝子の発現の時間経過を調べることを目的に、胸腺由来のT細胞を欠損したヌードC57BL/10マウスに同量 ($\text{MOI } 1.9 \times 10^4$) のAxCALacZを筋注し、 β -galactosidase陽性筋線維数を算定した。

7日目には、 $78.3 \pm 15.3\%$ 、14日目には $75.7 \pm 2.9\%$ 、28日目には $71.8 \pm 5.0\%$ 、120日目には17.3%と高い導入遺伝子の発現が長期間持続することが観察された。C57BL/10マウスで認められた β -galactosidase陽性筋線維数周囲の細胞浸潤は、経過中ほとんど認められなかった。

7) 抗CD4抗体を投与したC57BL/10マウスへの導入

アデノウイルス・ベクターにより、遺伝子を導入された細胞は細胞性免疫反応 (MHC classI 拘束性細胞傷害性CD8陽性T細胞による) により、排除

される。その際に、CD4陽性T細胞が重要な働きをされると考えられており、CD4陽性T細胞の除去により、細胞傷害反応が阻止できるとされる（Yang Y et al. 1995a）。CD4陽性細胞を除去する目的で、抗CD4抗体をアデノウイルス・ベクター筋注前日に1mg、筋注当日、1日目、3日目にそれぞれ0.5mgをマウス腹腔内投与し（Yamamoto H et al. 1987）、アデノウイルス・ベクター（AxCALacZ MOI 1.9×10^4 ）の発現の持続と、FACSを用いて脾細胞中のCD3/CD4/CD8細胞の比率を調べた。筋注後7日目にはCD4細胞は0.5%、14日目には1%とコントロール（12.1-19.8%）と比較し、有意に減少していた。28日には6.0%とCD4陽性細胞は増加したが、この時期の β -galactosidase陽性筋線維は $29.5 \pm 6.3\%$ と抗CD4抗体未投与群の $10.9 \pm 7.0\%$ と比べ有意に発現が持続していた（表I-5）。以上より、抗CD4抗体の使用により、アデノウイルス・ベクターによる導入遺伝子の発現の持続期間を延長することが可能であった。

8) β galactosidase抗体の測定

アデノウイルス・ベクターの問題点として、ウイルス中和抗体の作製により、反復投与が困難であることが上げられる。in vivo実験で用いたC57BL/10およびBALB/cマウスについてアデノウイルス・ベクター投与後の血清中の β -galactosidase抗体をELISA法で測定した。その結果、C57BL/10マウスでは14日目から β galactosidase抗体の上昇が認められたが、BALB/cマウスでは7日目にすでに抗体価の上昇が有意に認められた（表I-6）。

4. 考察

in vitro実験で、次の2点が明らかになった。まず、組み換えアデノウイルス・ベクターを培養骨格筋細胞へin vitro導入することにより、分化後の細胞であってもアデノウイルス・ベクターの感染が生じ、導入遺伝子である β -galactosidaseが良好に維持された。このことは、分裂後細胞であっても遺伝子導入が可能であるとした従来のアデノウイルス・ベクターの性質と一致している。また、同量のアデノウイルス・ベクターを感染させた場合でも導入遺伝子を転写するプロモーターの違いにより、導入遺伝子（ β -galactosidase）の発現に大きな差があり、骨格筋ではCAGプロモーターが強力であること、組織特異的なプロモーターであるMHC-IIBプロモーターは特異性はあるが、プロモーターとしては弱いことが明らかになった。

マウス骨格筋に対するin vivo遺伝子導入については、5～6週齢のマウス骨格筋にたいして、アデノウイルス・ベクターを用いた高度の遺伝子導入が可能であることをはじめて明らかにした。これまでの研究では、高度の導入遺伝子発現が得られたのは、新生児期マウスや、免疫抑制したマウスのみである。Acsadiら（1994）はBALB/cの新生仔ではアデノウイルス・ベクターの投与により、5～68%の筋線維に β galactosidaseの発現が得られたが、成熟したマウスでは0.1～3%の β galactosidase陽性筋線維がわずかに認められたのみであったと報告している。このような高度の β galactosidaseの発現が得られた背景としては、アデノウイルス・ベクターの性質、発現プロモーターの強度、ホストのマウスのストレインなどの影響が考えられる。

本実験で用いたアデノウイルス・ベクターは、E1/E3を欠損したベクターでCOS-TPC法（Miyake S et al. 1996）で作られたものである。COS-TPC法は親ウイルスを末端蛋白をつけたまま調整することにより、相同組換えをより起こしやすくする方法で、従来の方法よりも効率のよい組み換えア

デノウイルス・ベクターの作製が可能になった。また、E1遺伝子の欠失部位に挿入された遺伝子の方向はE1遺伝子とは逆方向（E4遺伝子と同方向）となっている。この場合、E1遺伝子と同方向であるよりも強い挿入遺伝子の発現が得られることが明らかにされている（Miyake S et al. 1996）。

次に、発現プロモーターの強度については、プロモーターの異なる3種類の組み換えアデノウイルス・ベクターを骨格筋に導入した実験から、CAGプロモーター（Niwa H et al. 1991）がマウス骨格筋で極めて強力であることが明らかになった。今までの報告で用いられたアデノウイルス・ベクターのプロモーターとほぼ同等の強さを持つと考えられるAxSRLacZの遺伝子発現効率、in vivoでも約1%と低値で、CAGプロモーターを持つAxCALacZとは60%以上の差が認められた。

ホストマウスのストレインも導入遺伝子の発現に大いに影響している可能性が考えられた。Tripathyら（1996）は、ヒトerythropoietinを組み込んだアデノウイルス・ベクターの筋注を行い、ヘマトクリットを測定したところ、BALB/cマウスに比べ、C57BL/6マウスではヘマトクリットの上昇が持続したと報告している。また、Barrら（1995）も、肝細胞に対するアデノウイルス・ベクターの投与において、BALB/cマウスに比べ、C57BL/6およびC57BL/10マウスで導入遺伝子の発現が持続することを報告している。この実験でも、mdxマウスと同じ遺伝子背景を持つために選択したC57BL/10マウスと他の報告で用いられてきたBALB/cマウスで、導入遺伝子の発現に大きな差が認められた。このC57BL/10とBALB/cマウスの差は、同じウイルス・ベクターを投与しているため、導入遺伝子の発現過程の差は考えにくく、アデノウイルス・ベクターのinternalizationに関与する αv インテグリンの発現にも差は認められなかったことから、導入遺伝子を発現した細胞の排除過程によると考えられた。

導入遺伝子が排除される過程は、アデノウイルス・ベクターを用いて導

入した遺伝子の長期発現を考える上で最も重要なステップである。本実験においても、BALB/cマウスではC57BL/10マウスに比べ、多くの単核球の浸潤と β -galactosidase陽性筋線維の急激な減少が観察された。これらの導入遺伝子の排除過程は、肝細胞や肺へのアデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子導入で次第に明らかにされてきた (Yang Y et al. 1994, 1995a, c, Rosenfeld MA et al. 1992)。アデノウイルス・ベクターに感染し、導入遺伝子を発現した細胞が排除される主な原因は、アデノウイルス・ベクターからわずかに発現するウイルス蛋白に対する細胞性免疫 – MHC class I拘束性の細胞傷害性T細胞 (ほとんどがCD 8 陽性T細胞) による細胞傷害 – によると考えられている (Yang Y et al. 1994, 1995a, c, Matloubian M et al. 1994)。また、CD 4 陽性細胞のMHC class Iの発現を活性化することによる標的細胞のsensitizationも重要で、CD 4 陽性細胞やCD 4 陽性細胞が産生するインターフェロン γ の除去により、細胞傷害性CD8陽性細胞が存在しても細胞傷害は起こらない (Yang Y et al. 1995a)。この実験でも、抗CD 4 抗体投与群では、 β -galactosidase陽性筋線維数は非投与群に比べ有意に高く、胸腺由来T細胞のないヌードマウスでは、筋注28日後にも70%以上の β -galactosidase陽性筋線維が認められた。

一方で、アデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子自体に対する免疫反応も惹起される。Tripathyら (1996) はヒト erythropoietinを組み込んだアデノウイルス・ベクターを筋注し、ヒト erythropoietinに対する、細胞性・液性免疫が導入遺伝子発現の持続期間を規定すると報告している。また、Yangら (1996) は肝細胞へのアデノウイルス・ベクターの導入では、導入遺伝子産物である β -galactosidaseに対しても細胞傷害性T細胞や、中和抗体が産生されるが、ウイルスに対する細胞傷害が感染細胞の排除に主に関与していると報告している。

C57BL/10マウスでは (表I-5, 図I-10), LacZ遺伝子を持たないAx1wの

投与では、7日目にはCD 4 陽性細胞優位の細胞浸潤が認められ、14日には浸潤細胞数は増加し、CD 8 陽性細胞優位となった。28日後には浸潤細胞数は減少したがCD 8 陽性細胞優位の浸潤が認められた。AxCALacZの投与では、Ax1wの投与の際と同様のパターンの細胞浸潤が認められたが、7日目のCD 4 陽性細胞、28日目のCD 8 陽性細胞の浸潤は有意に多く、この反応は導入遺伝子産物である β -galactosidase に対する反応と考えられた。

BALB/cマウスでは、Ax1wの投与、AxCALacZの投与とも7日目からCD 8 陽性細胞優位の細胞浸潤が認められた。Ax1wの投与では、14日以降はCD 8 陽性細胞数は減少するが、AxCALacZの投与では、14日目にCD8陽性細胞浸潤はピークに達した。この細胞浸潤は、 β -galactosidase に対する反応と考えられた。28日目には浸潤細胞数は減少し、Ax1w、AxCALacZの投与で差は認められなかった。

従来、アデノウイルス 5 型に対する免疫反応のマウスストレインの差は H-2 haplotype によるとされてきた (Rawle FC et al. 1991) が、congenic マウスの研究により、H-2 haplotype と導入遺伝子発現の持続期間は無関係であることがわかってきた (Barr D et al. 1995)。本実験で、C57BL/10マウスとBALB/cマウスに対するAx1wの投与ーウイルス蛋白に対する反応ーを比較すると、初期には、BALB/cマウスでCD8陽性細胞浸潤がC57BL/10マウスより広範かつ多量に認められた。一方、28日後には、BALB/cマウスでは、浸潤細胞は減少するが、C57BL/10マウスではCD 8 陽性細胞浸潤が持続していた。このことは、C57BL/10マウスではアデノウイルス蛋白に対する弱い持続的な免疫反応がおこるのに対し、BALB/cマウスでは短期間の激しい免疫反応がおこることを示していると考えられた。

BALB/cマウスは、 β -galactosidase に対する長期の細胞傷害性反応を起こしやすいとされている (Juillard V et al. 1995)。導入遺伝子である β -galactosidase に対する免疫反応をAxCALacZを投与することによって

C57BL/10マウスとBALB/cマウスで比較すると、Ax1wの投与に比べ、AxCALacZ投与筋では7日目ではCD 8 陽性細胞優位の細胞浸潤がBALB/cマウスで、CD 4 陽性細胞優位の細胞浸潤がC57BL/10マウスで認められた。14日目には、C57BL/10マウス、BALB/cマウスともCD 8 陽性細胞優位の細胞浸潤が認められたが、28日目にはCD 8 陽性細胞優位の細胞浸潤はC57BL/10マウスでのみ認められた。28日目のCD 8 陽性細胞優位の細胞浸潤は、C57BL/10マウスでのみ観察された β -galactosidaseの発現の持続と関係していると考えられた。また、特にBALB/cマウスでは、ウイルス蛋白に対する反応に β -galactosidaseに対する反応が加わることによってCD8陽性細胞浸潤がさらに増強されることが明らかになった。このような導入遺伝子産物に対する免疫反応は、遺伝子導入産物により異なることが予想され、また、ヒトへの遺伝子治療の応用を考えると、個体により治療効果が異なる可能性を示唆していると考えられた。

以上のようなアデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子導入法はどのようにDMDの遺伝子治療に結び付いていくのであろうか。アデノウイルス・ベクターの遺伝子治療へ応用する際の問題点として、まず、中和抗体産生による反復投与の困難さがあげられる。アデノウイルス・ベクターは染色体に積極的に取り込まれる機構をもたず、導入遺伝子はextrachromosomalにとどまるため、発現は一過性であり、発現を持続させるためには反復投与が必要である (Yang Y et al. 1995a, c)。最近の研究では、アデノウイルス蛋白に対するMHC class II依存性ヘルパーT・B細胞活性化により、中和抗体が産生されると報告されている (Yang Y et al. 1995a, c)。本実験で、40日後に2回目のアデノウイルス・ベクターの投与を行ったところ、 β -galactosidaseの発現は初回投与後35日目よりは高かったが、7日目よりは低値であった。静脈投与と比べて、筋注では、中和抗体が十分作用しない可能性が考えられた。

次に、アデノウイルス・ベクターには導入遺伝子の長さに制限があるため、14kbのジストロフィンcDNAを組み込めないという問題点がある。そのため、全長のジストロフィンcDNAを組み込み可能なベクターの開発が行われており、また、6.3kbのminidystrophin geneが利用されている。最近、mdxマウスに対して、minidystrophin gene (6.3kb) をトランス・ジーンとして導入した実験から、正常の20～30%の発現が得られれば、十分な効果が期待できるという報告がなされた (Wells DJ et al. 1995)。本実験でのC57BL/10マウスへのAxCALacZの投与では、89日で11.3%、180日6.3%の筋線維は β -galactosidase陽性であり、治療に近い値を実現していると考えられる。この高い遺伝子発現は、CAGプロモーターの使用に因ると考えられるが、全身投与への応用を考えると、強力な組織特異的プロモーターの開発や目的組織のみに組み換えアデノウイルス・ベクターを到達させる技術の開発が必要と考えられる。本実験では7日後の脊髄の観察では β -galactosidase陽性細胞は認められなかったが、実際に、骨格筋への組み換えアデノウイルス・ベクターの筋注により、脊髄に遺伝子を導入した報告や、神経のトレーシングにアデノウイルス・ベクターを応用した報告がある (Kuo H et al. 1995, Finiels F et al. 1995)。さらに、ウイルス蛋白を作らないアデノウイルス・ベクターの開発や免疫抑制剤や種々のサイトカインによる免疫修飾法の開発により、アデノウイルス・ベクターによる導入遺伝子の発現を持続させる試みがなされている。我々は、本実験で強力なプロモーターを用いることにより、導入遺伝子を高度にかつ持続的に発現できる可能性を明らかにした。

Recombinant Adenovirus	Days after infection			
	1	3	7	10
AxCALacZ	4.9±0.1	34.9±2.9	60.3±8.5	6.0±0.3
AxSRLacZ	0.0048±0.00064	3.65±0.31	1.98±0.11	1.06±0.036
AxMHCLacZ	0.0049±0.0035	0.15±0.02	0.44±0.08	1.37±0.32
Ax1W	0.0036±0.0033	0.12±0.026	0.36±0.051	0.51±0.11

表I-1 C2細胞にアデノウイルス・ベクターを感染させた際の β -galactosidase 活性の比較
C2細胞にAxCALacZ, AxSRLacZ, AxMHCLacZ, Ax1WをMOI 10で感染させ、1, 3, 7, 10日後に
 β -galactosidase 活性 (μ unit/50 μ g protein) を測定した。値は3施行の平均値±標準誤差。

*p<0.0001, Scheffe's F test

Adenovirus Vectors	AxCALacZ	AxSRLacZ	AxMHCLacZ	Ax1W
MOI	1.9×10^4	2.8×10^4	1.0×10^4	1.5×10^4
days after injection				
7	66.6±3.7(7)	1.12±0.07(3)	0(1)	0(3)
14	48.9±11.8(7)	0.51±0.04(3)	0(3)
28	10.9±7.0(10)	0(3)	0(1)	0(3)
35	6.3(1)
47	16.4(1)
89	11.3(1)
180	6.3(1)

表I-2 C57BL/10マウス前脛骨筋への遺伝子導入

C57BL/10マウスの前脛骨筋にAxCALacZ (MOI 1.9×10^4) , AxSRLacZ (MOI 2.8×10^4) , AxMHCLacZ (MOI 1.0×10^4) , Ax1w (MOI 1.5×10^4) , を筋注射し, β -galactosidase染色を行い, 1個体の最も多い β -galactosidase陽性筋線維の全筋線維数に対する比率(%)を算定した.

平均値±標準誤差, ()は個体数

表I-3 in vivo遺伝子導入における β -galactosidase
陽性筋線維の比率 (BALB/cマウス)

MOI 1.9×10^4 のAxCALacZを5～6週齢のBALB/cマウス前脛骨筋に投与し，7，10，14，28日目の β -galactosidase陽性筋線維数の全筋線維数に対する比率(%)を平均値 \pm 標準誤差で示した．7日，14日については6個体の，10日，28日についてはそれぞれ4個体で得られた値である．

AxCALacZ筋注後日数	β -galactosidase陽性筋線維 (%)
7	30.9 ± 8.3
10	16.3 ± 8.3
14	2.3 ± 3.0
28	0 ± 0

Adenovirus vectors	Days after injection	C57BL/10		BALB/c	
		CD4	CD8	CD4	CD8
AxCALacZ	7	79.6±5.8*	26.7±5.0	28.9±6.5	148.1±19.8*
Ax1W	7	48.7±8.7	26.6±0.5	22.9±8.0	126.8±24.3
AxCALacZ	14	51.0±6.8	84.0±8.8	27.0±5.0	234.7±20.0*
Ax1W	14	56.4±7.8	62.3±12.4	34.2±4.9	65.5±8.7
AxCALacZ	28	38.9±10.0	74.6±2.6	24.6±6.7	22.0±4.0
Ax1W	28	33.1±6.6	43.9±16.2	20.9±2.8	20.5±1.7

表I-4 アデノウイルス・ベクター投与後の前脛骨筋における

CD4 / CD8 陽性細胞数

AxCALacZあるいはAx1Wを筋注したC57BL/10およびBALB/cマウス前脛骨筋に抗CD4 / CD8 抗体染色を行い、筋線維100本当りのCD4 / CD8 陽性細胞数（個）を算定し、平均値±標準誤差で示した。 *p=0.001

表I-5 抗CD 4 抗体投与による脾細胞中のCD 3 / CD 4 / CD 8 陽性T細胞の比率の推移と AxCALacZを投与した前脛骨筋での β -galactosidase陽性筋線維数/全筋線維数 (%) 平均値±標準誤差。*1例のみ，28日目は3例から得られた値。

	CD 3 (%)	CD 4 (%)	CD 8 (%)	β -galactosidase陽性筋線維 (%)
7日	12.3	0.5	11.6	32.0*
(コントロール)	19.1	12.1	6.6	
14日	8.5	1.0	11.7	51.0*
(コントロール)	21.0	19.8	8.9	
28日	18.5	6.0	8.8	29.5±6.3
(コントロール)	34.6	21.5	9.3	

表I-6 AxCALacZ投与後の β -galactosidase抗体価の時間的推移

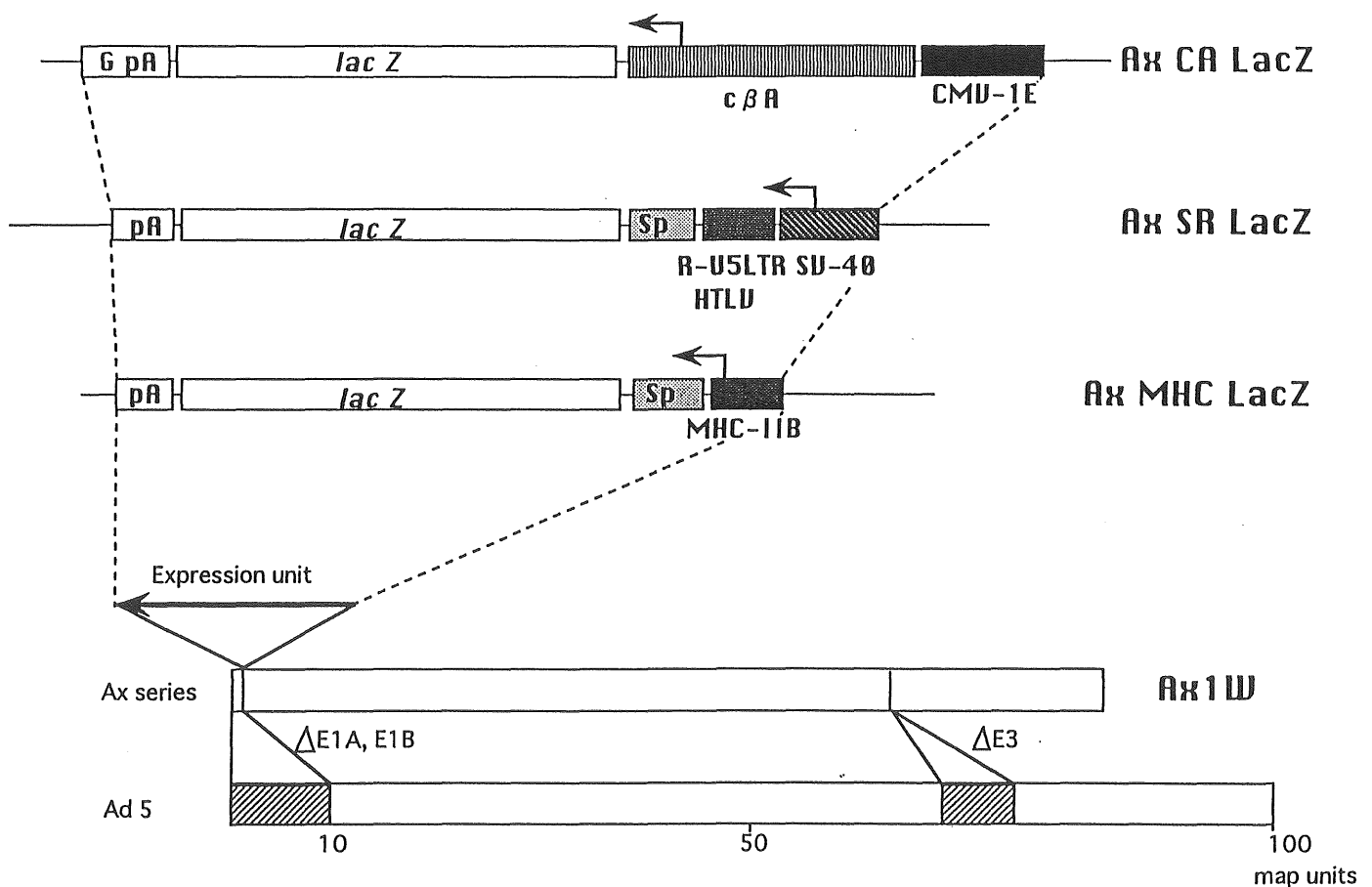
C57BL/10あるいはBALB/cマウスの前脛骨筋にAxCALacZ (MOI 1.9×10^4) を筋注し，屠殺時に採取した血清を用いて β -galactosidase抗体価 (Unit) を測定した。(平均値±標準誤差)

*p=0.001

筋注後日数	C57BL/10	BALB/c
7日	4.3±5.1	34.8±14.4*
14日	73.6±36.4	112.4±16.2
28日	205.1±30.6	135.0±13.6

図I-1 組み換えアデノウイルス・ベクターの構造

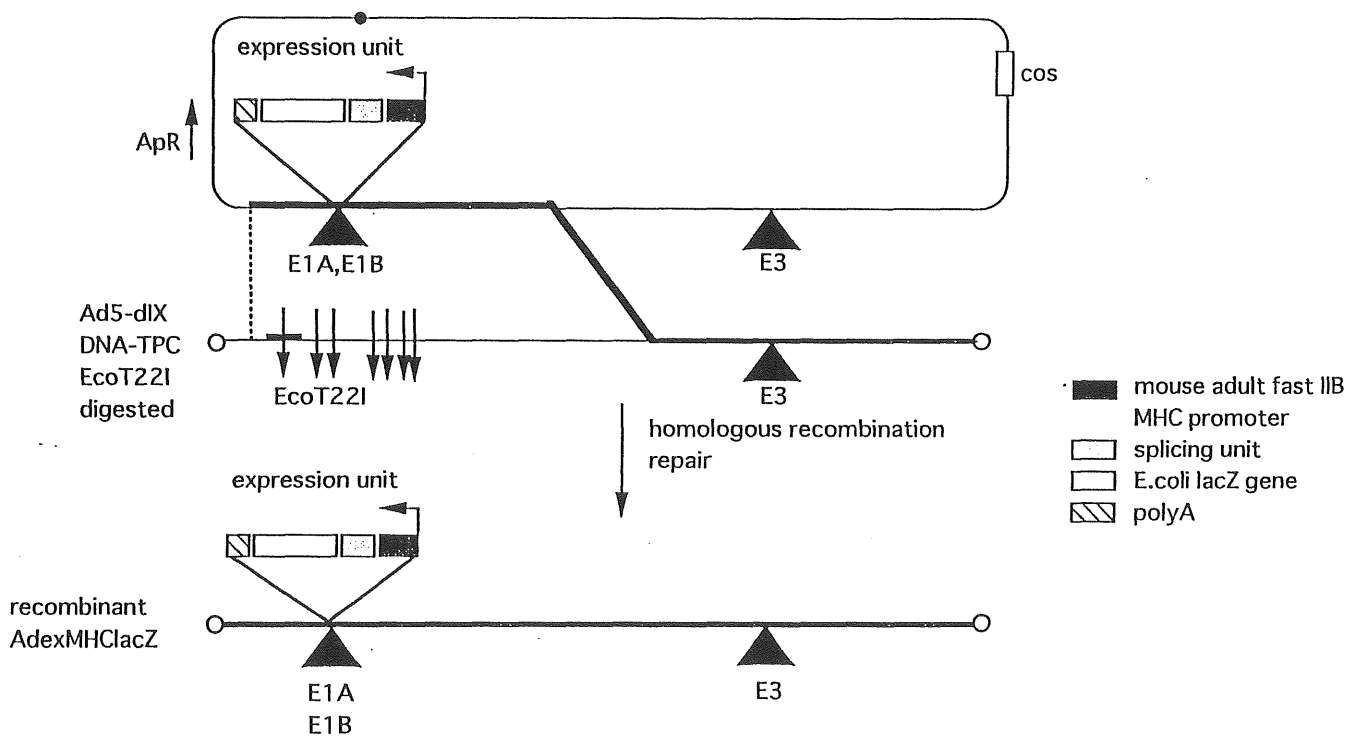
東京大学医科学研究所斎藤研究室より供与を受けたAxCALacZ, AxSRLacZ, Ax1および共同で作製したAxMHCLacZの構造を示した。組み換えアデノウイルス・ベクターAxは、ヒトアデノウイルス5型のE1 (1.3-9.3mu) , E3 (79.6-84.8mu) 遺伝子を欠損している。AxCALacZはchicken - β actin promoter(c β A)/cytomegalovirus enhancer(CMV-IE), E.coli β -galactosidase gene(the LacZ gene), rabbit β -globin polyadenylate signal(GpA)から構成される。AxSRLacZはsimian virus 40(SV 40) early promoter/type 1 human T-cell leukemia virusのlong terminal repeat のU5 sequenceの一部 (R segment, R-U5LTR HTLV) splicing unit(SP), the LacZ gene, SV 40 polyadenylate signal(pA)からなる。AxMHCLacZはadult mouse のfast MHC-IIb promoter, SP, theLacZ gene, pAから構成される。



図I-2 組み換えアデノウイルス・ベクターAxMHCLacZの作製

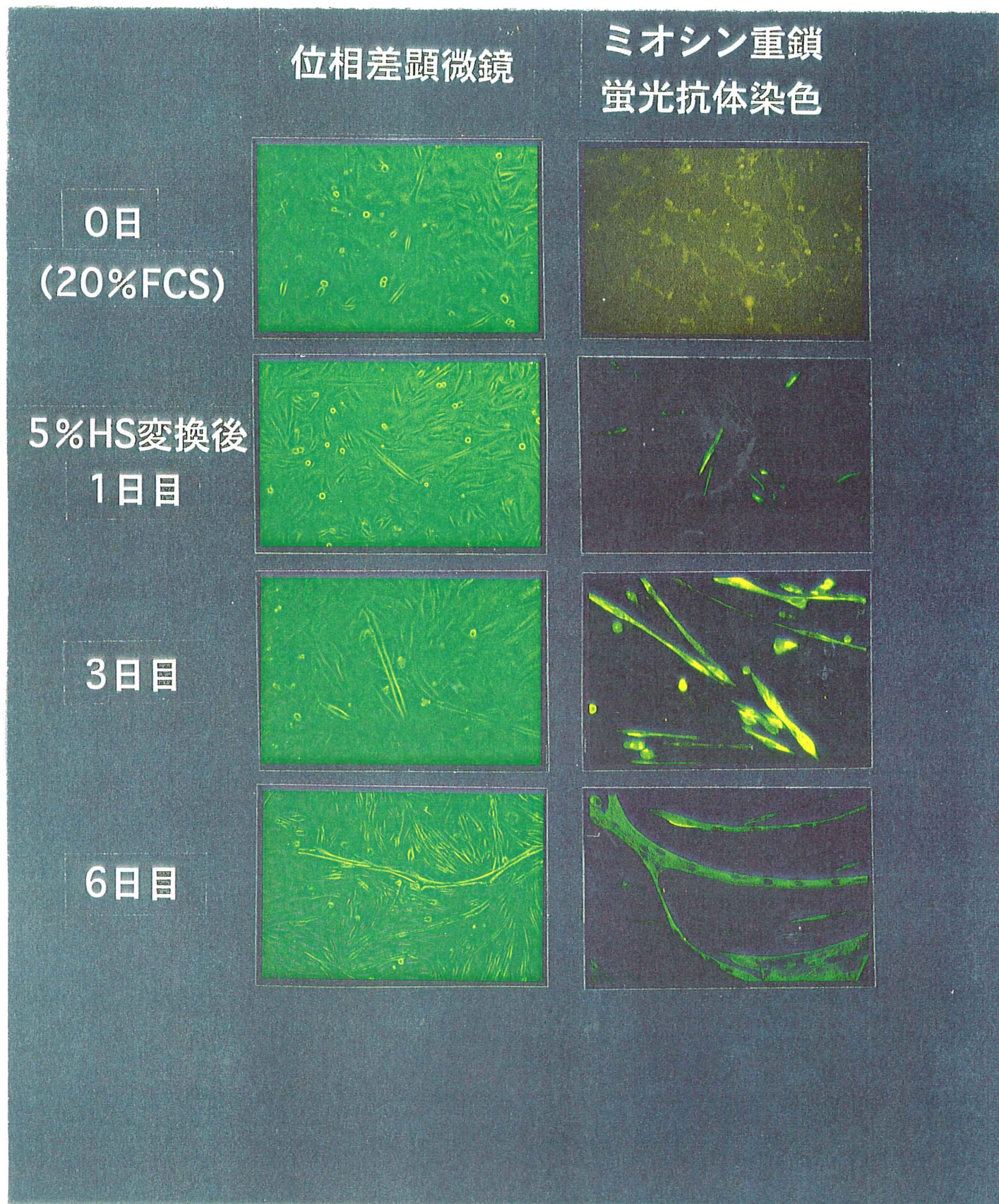
COS-TPC法による組み換えアデノウイルス作製法を示す。発現ユニットを組み込んだカセットコスミドDNAと、EcoT22I切断Ad5-dIX DNA-TPCを293細胞に同時にトランスフェクションすると、細胞内で相同組み換えを起こした分子が複製可能となり、目的とする組み換えウイルスが生成する。

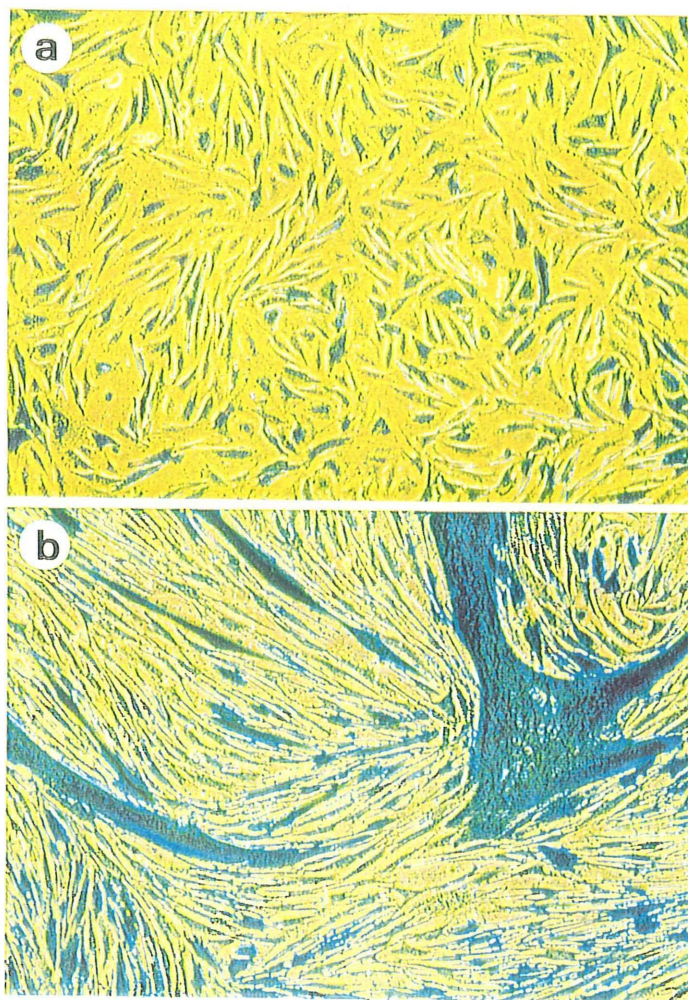
□ ウイルスDNA両端の○は末端蛋白（TP）を示す。ApR：アンピシリン耐性遺伝子。●：複製起点。▲：欠損部位。▽：挿入DNA



図I-3 C2/4細胞の分化

マウス骨格筋細胞株であるC2/4細胞に、増殖培地（20%FBS添加DMEM）から分化誘導培地（5%HS添加DMEM）に交換することにより、分化を誘導した。増殖状態（0日）、分化誘導後1、3、6日目に位相差顕微鏡（右列）およびMyosin heavy chain（F59）蛍光抗体染色（左列）を行い、観察した。

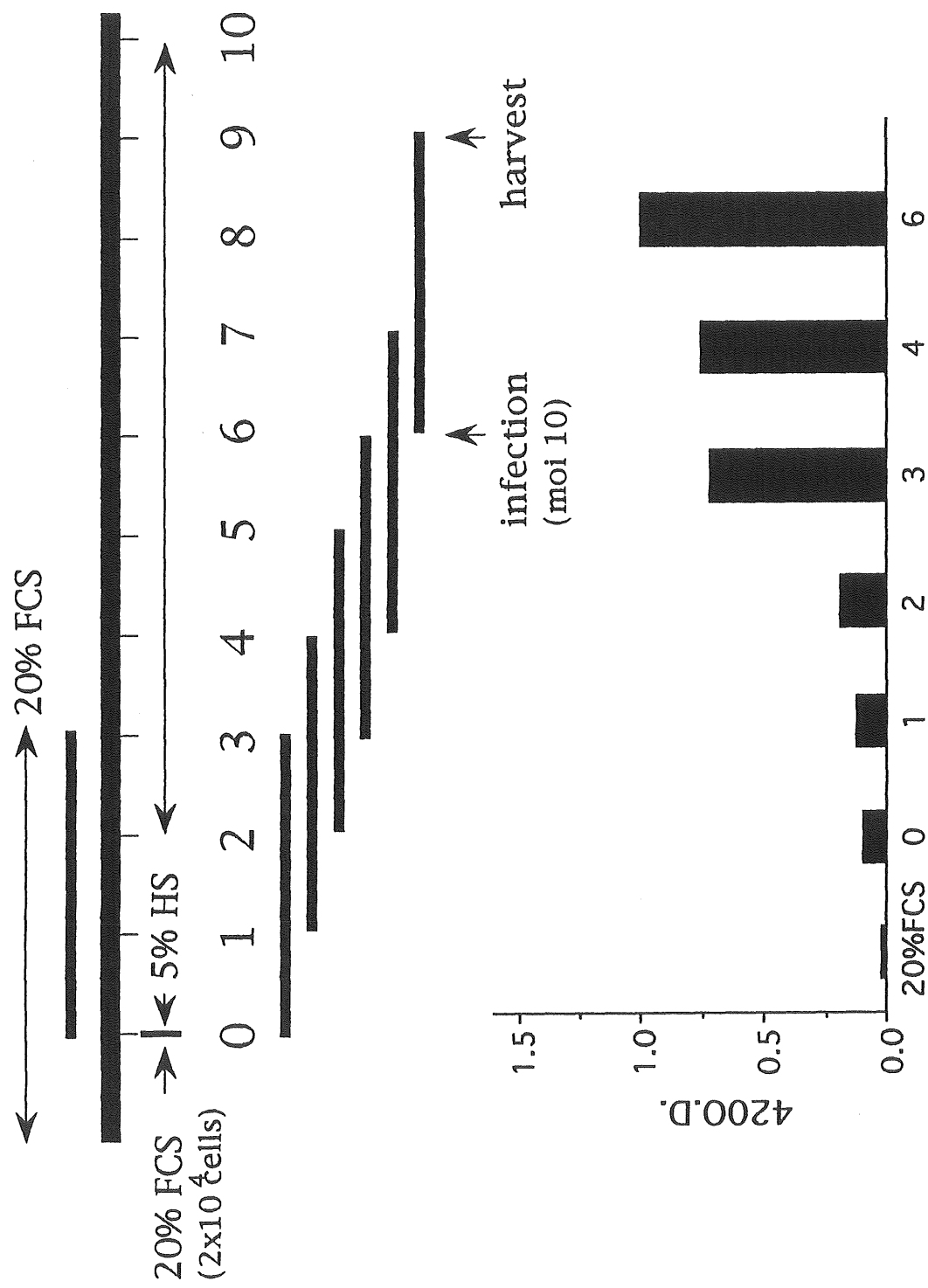




図I-4 in vitro遺伝子導入

a.C2細胞での β -galactosidaseの発現. AxCALacZ感染後3日目に β -galactosidase染色を行った。

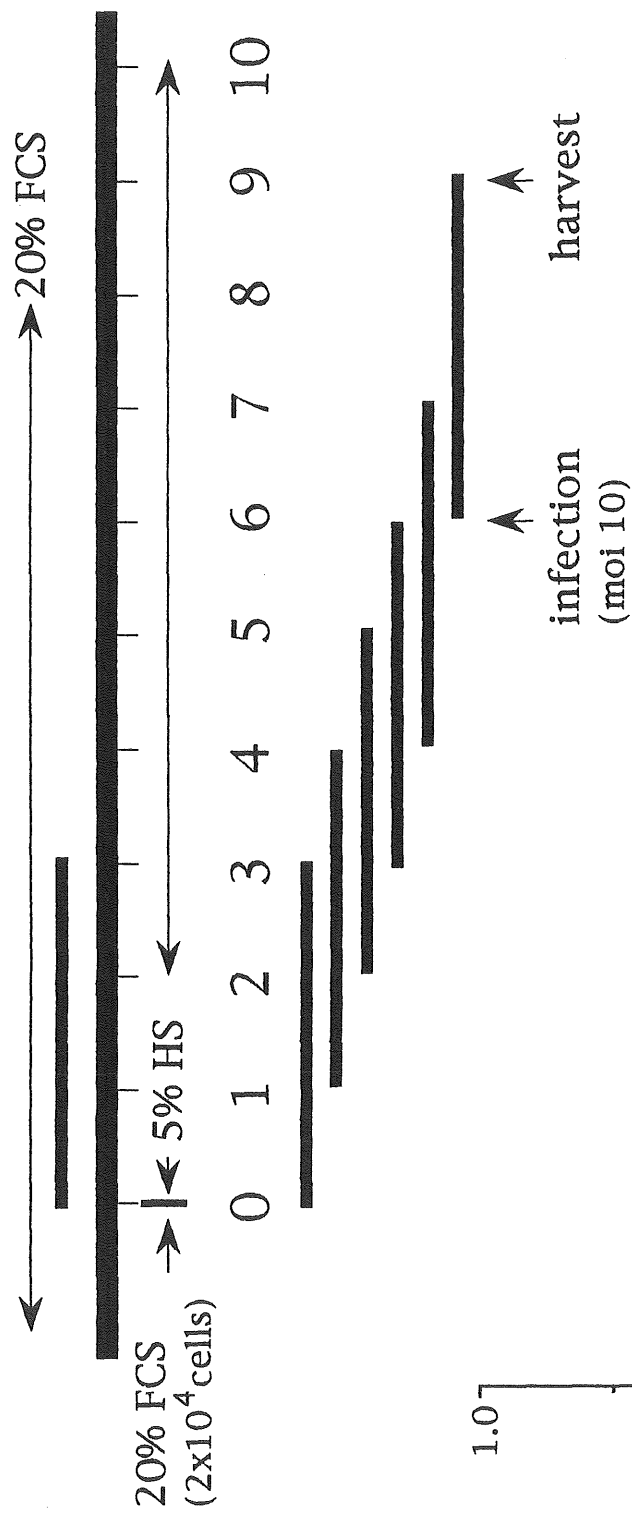
b.C2/4細胞での β -galactosidaseの発現. 分化誘導培地に交換し6日目に AxCALacZを感染し, その3日目に β -galactosidase染色を行った。



図I-4 in vitro 遺伝子導入

c. C2/4細胞の増殖・分化も各段階でAxCALacZを感染させた場合の β -galactosidaseの発現.

上段：感染の方法. 下段： β -galactosidase活性測定.

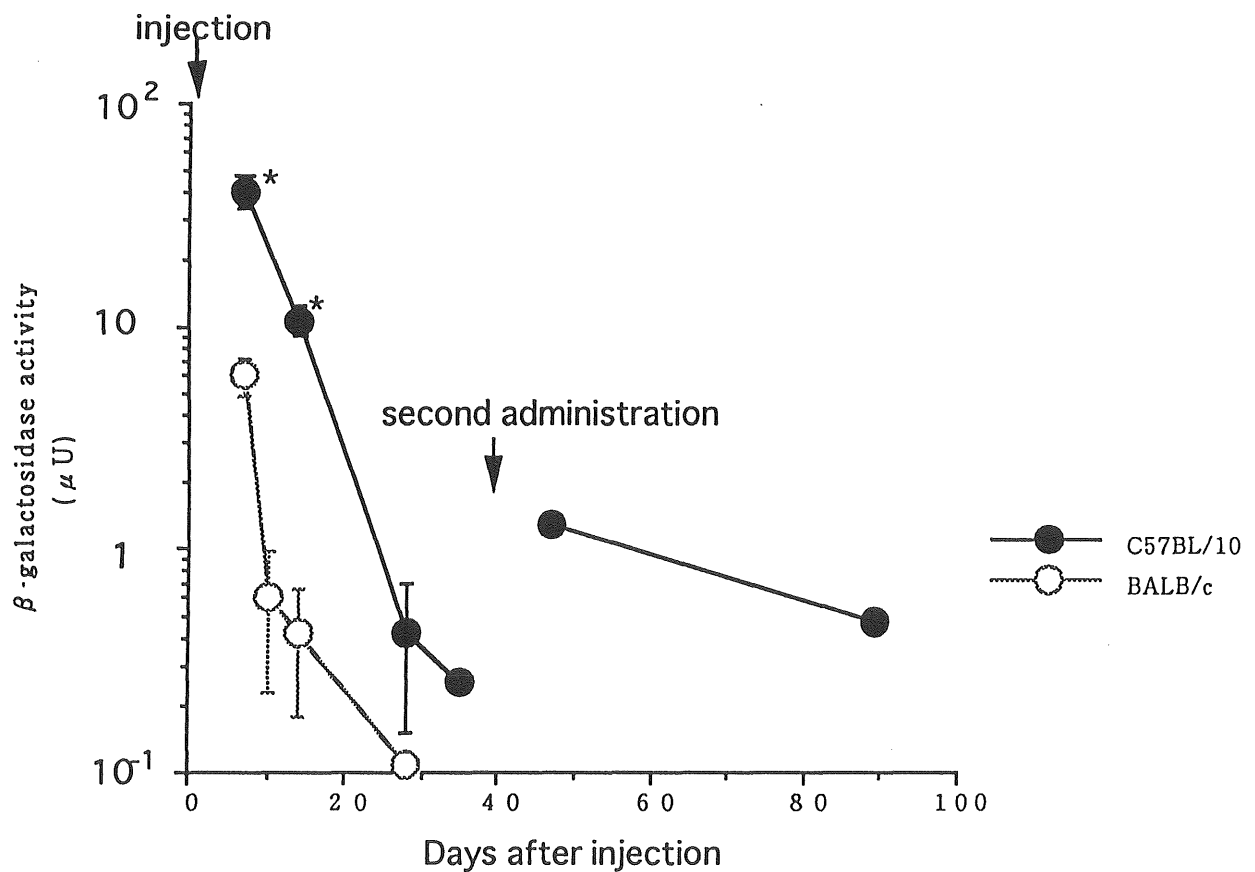


図I-4 in vitro遺伝子導入
d. C2/4細胞の増殖・分化も各段階でAxMHCLacZを感染させた場合の β -galactosidaseの発現。
上段：感染の方法. 下段： β -galactosidase活性測定.

図I-5 in vivo遺伝子導入における β -galactosidaseの 発現の時間的推移

AxCALacZ (MOI 1.9×10^4) を筋注した 5~6週齢のC57BL/10あるいはBALB/cマウスの前脛骨筋での β -galactosidase活性値 (μ U) を
平均値 \pm 標準誤差で示した。

C57BL/10 マウスでは7日, 14日が7個体, 28日が10個体,
35日, 47日は1個体, BALB/cマウスについては7日, 14日が6個体,
10日, 28日についてはそれぞれ4個体で得られた値を示した。* $p=0.001$

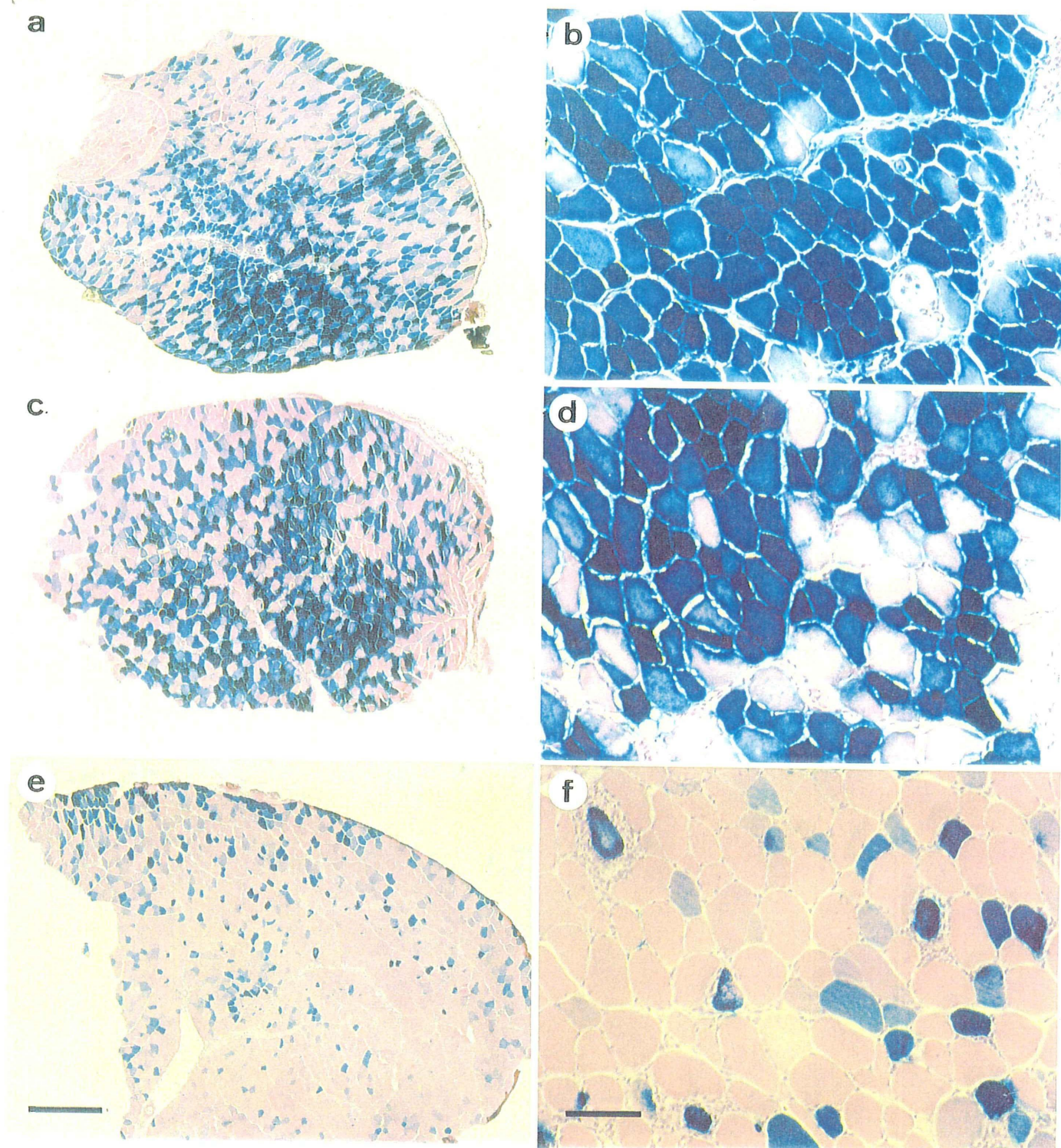


図I-6 C57BL/10マウス前脛骨筋への遺伝子導入

C57BL/10マウスの前脛骨筋にAxCALacZ (MOI 1.9×10^4) を筋注し、7日 (a, b) , 14日 (c, d) , 28日 (e, f) に筋を取りだし、固定、 β -galactosidase活性染色およびヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

a, c, e : 低倍率 (bar=500 μ m)

b, d, f : 高倍率 (bar=100 μ m)

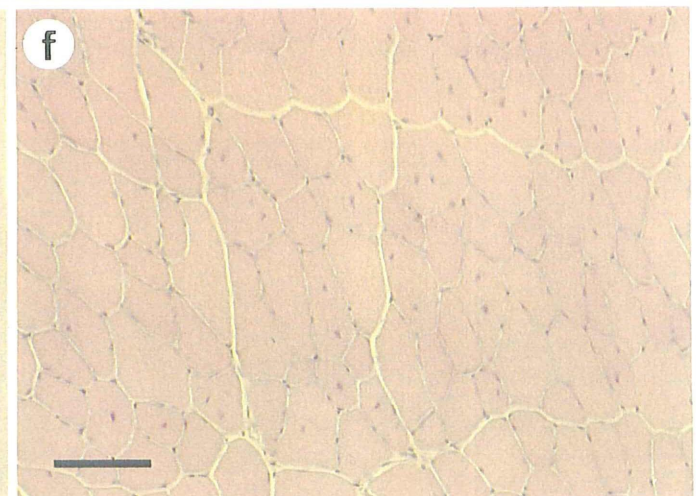
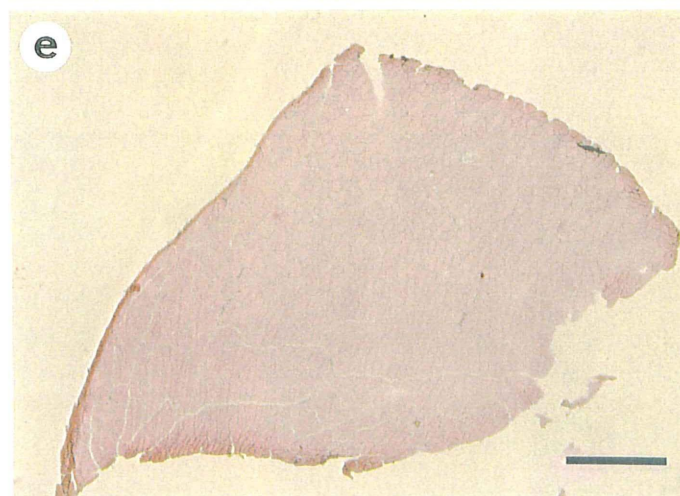
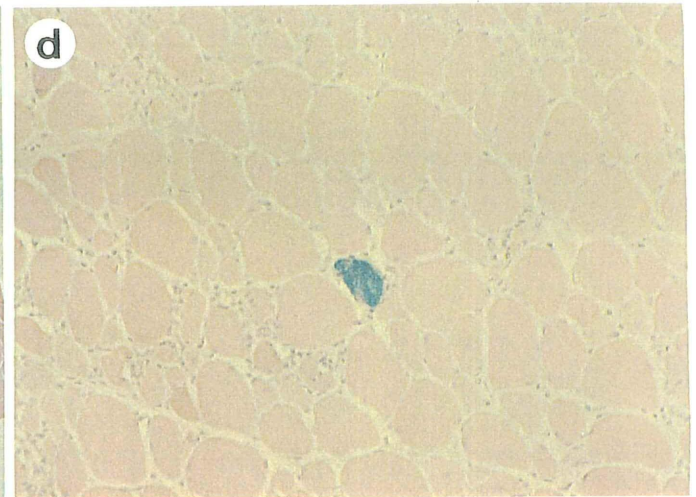
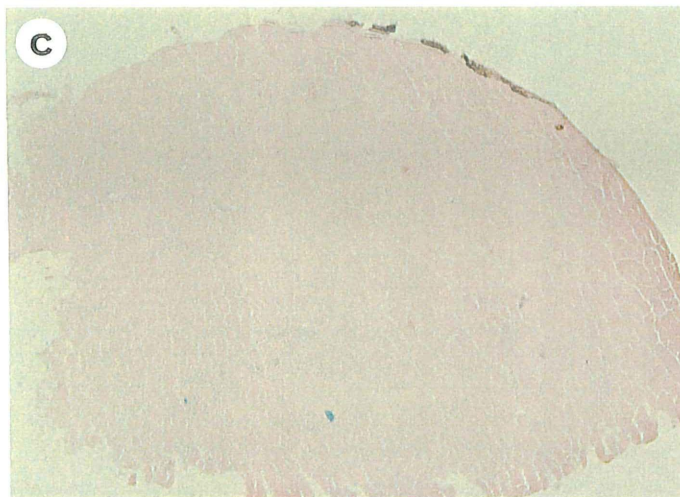
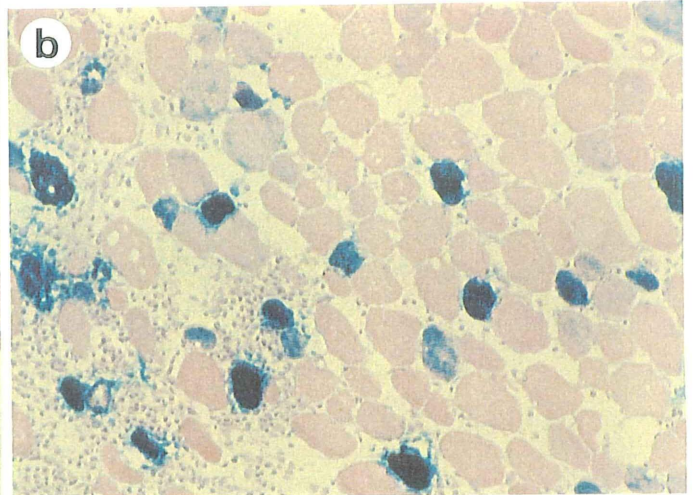
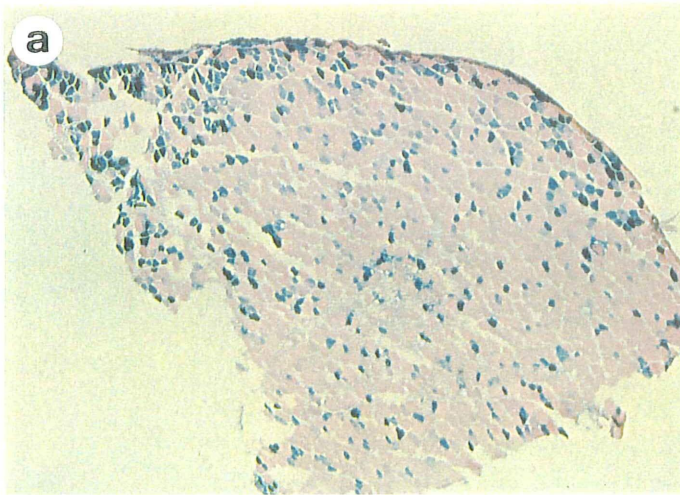


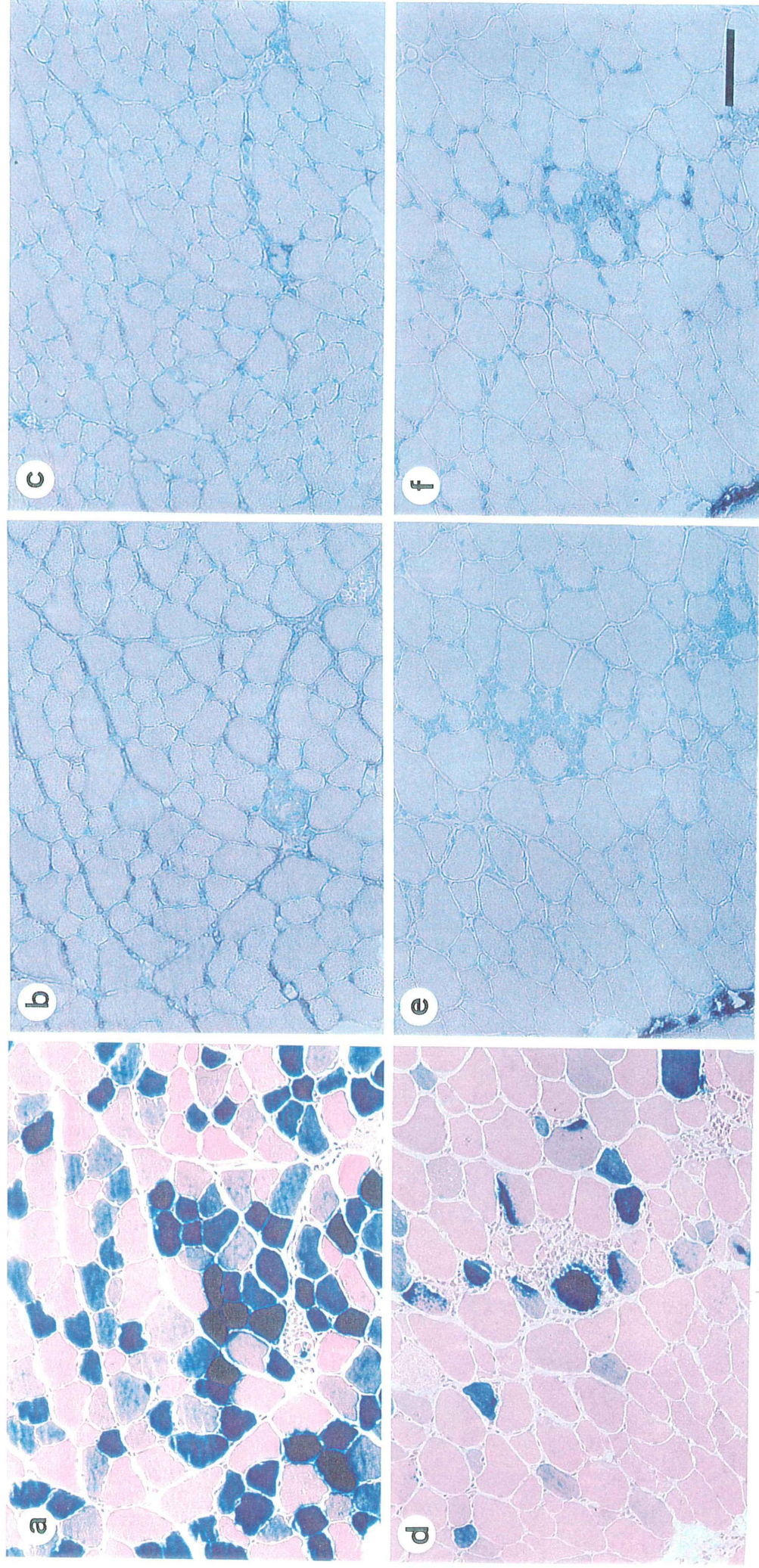
図I-7 BALB/cマウス前脛骨筋への遺伝子導入

BALB/cマウスの前脛骨筋にAxCALacZ (MOI 1.9×10^4) を筋注し, 7日 (a, b), 14日 (c, d), 28日 (e, f) に筋を取りだし, 固定, β -galactosidase活性染色およびヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

a, c, e : 低倍率 (bar=500 μ m)

b, d, f : 高倍率 (bar=100 μ m)

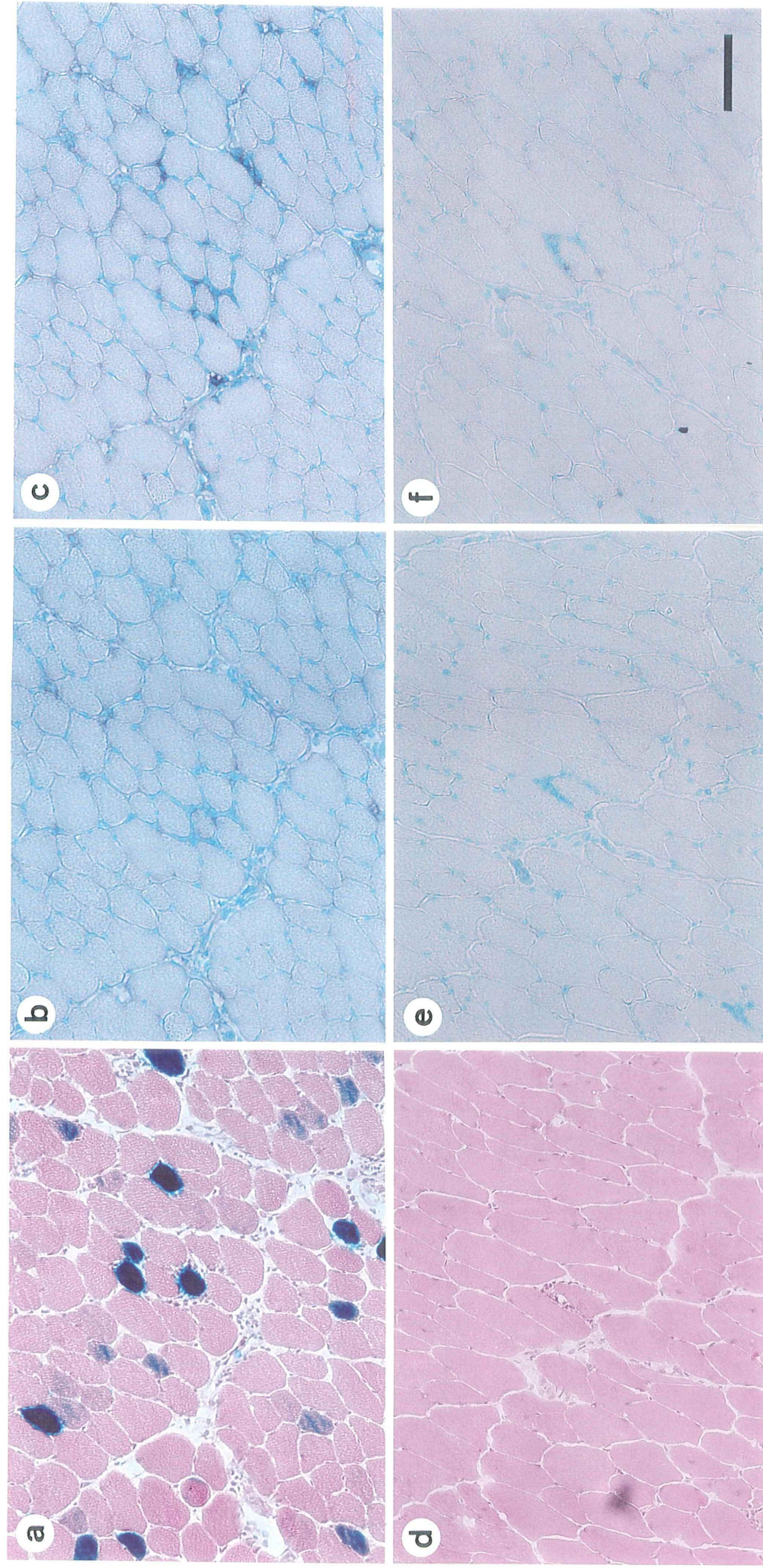




図I-8 AxCALacZを投与したC57BL/10マウスの前脛骨筋でのCD4, CD8抗体免疫染色
 クリオスタットで6 μ mの連続切片を作製し, β -galactosidase染色 (a,d),
 CD4抗体染色 (b,e), CD8抗体染色 (c,f)を行った. (bar=100 μ m)

a-c: 7日目の組織像

d-f: 28日目の組織像

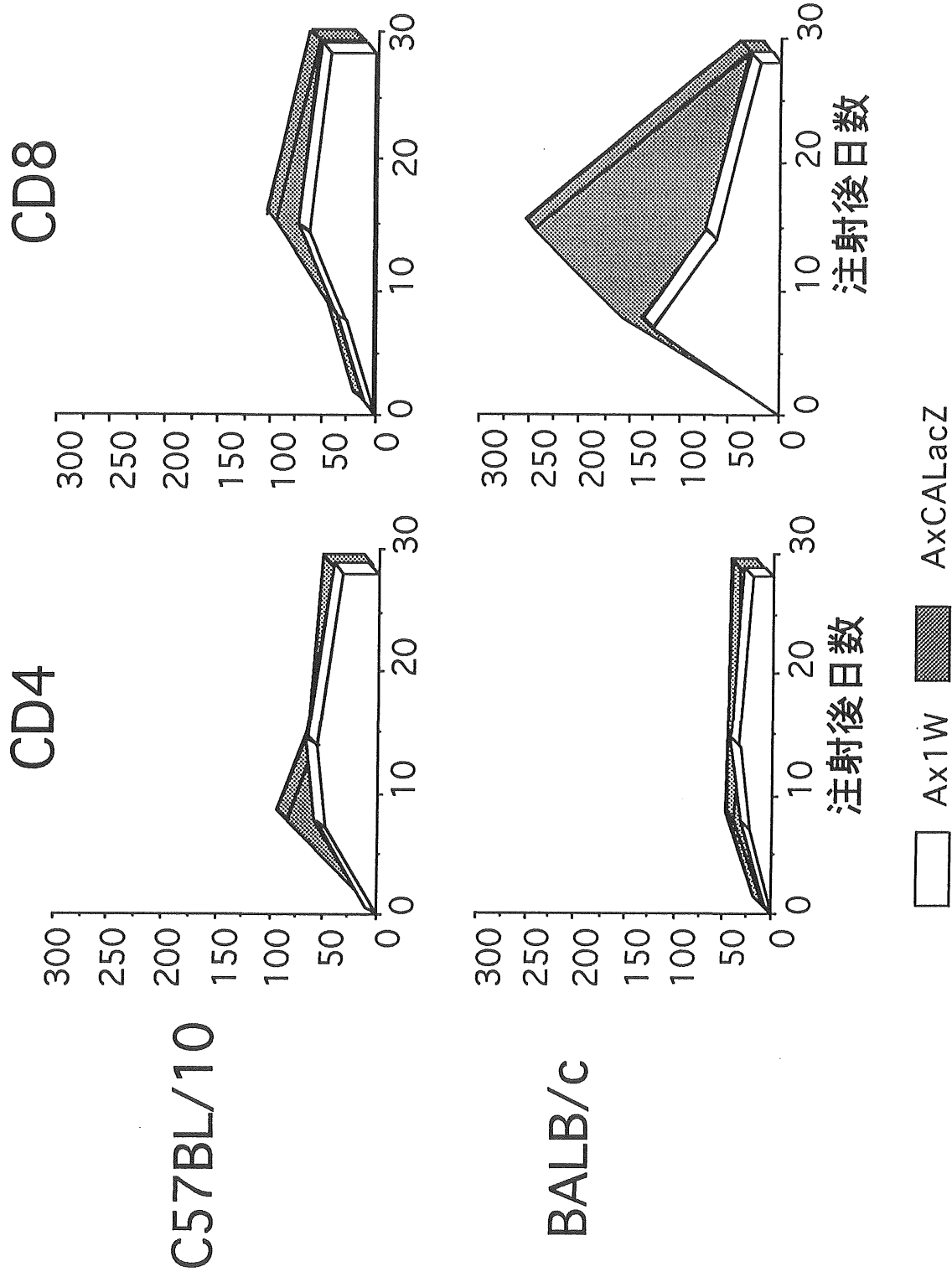


図I-9 AxCALacZを投与したBALB/cマウスの前脛骨筋でのCD4, CD8抗体免疫染色
 クリオスタットで6 μ mの連続切片を作製し, β -galactosidase染色 (a,d),
 CD4抗体染色 (b,e), CD8抗体染色 (c,f)を行った. (bar=100 μ m)

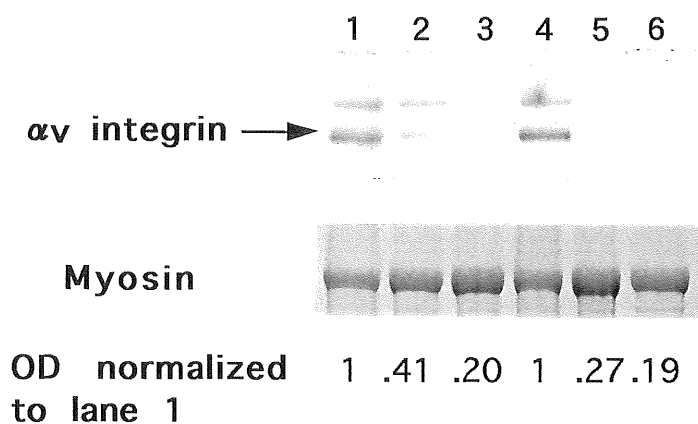
a-c: 7日目の組織像

d-f: 28日目の組織像

図I-10 AxCALacZ およびAx1W 筋注射後の
100筋線維当りのCD4／CD8陽性細胞数



図I-11 C57BL/10 (lane1-3) およびBALB/cマウス (lane4-6) の αv インテグリンのウエスタンブロットによる解析
 生後1日 (lane1, 4) , 14日 (lane2, 5) , 60日 (lane3, 6) のマウス前脛骨筋を解析した. myosin heavy chainで補正したoptimal densityを示した. 泳動条件により, 下のbandが αv インテグリンである.



第 2 章

カチオン性脂質を用いた骨格筋への遺伝子導入

1. 目 的

カチオン性脂質による遺伝子導入法（リポフェクション法: Malone RW et al. 1989, Innes CL et al. 1990, Zhu N et al. 1993）は、陽性荷電脂質などからなる脂質二重膜小胞（リポソーム）と導入するDNAで電氣的な相互作用により複合体を形成し、主にendocytosisにより細胞に遺伝子を導入する方法である。リポソーム法（柳原ら 1993, Yanagihara I et al. 1996）とは、必ずしもリポソーム内に導入遺伝子を封入しないという点で区別されている。リン酸カルシウム法（Chen C et al. 1987）、DEAEデキストラン法、電気穿孔法、microinjection 法などと比較し、遺伝子導入効率が高く、再現性が高い、導入遺伝子の長さに制限がない、ウイルス・ベクターのような病原性が少ない、比較的簡便で特別な装置・機具を必要としない、免疫反応を起こしにくい、付着細胞および浮遊細胞に導入可能であるなどの特徴がある。また、現在、カチオン性脂質は各種市販されており、細胞や用途に応じて選択が可能である。一方、短所として試薬が高価で、遺伝子導入の至適条件の検討が必要であるという点があげられる。

我々は培養骨格筋細胞に対する遺伝子導入法を確立することを目的として、種々のカチオン性脂質を用いて遺伝子導入を行い一過性発現と安定発現の効率を検討した。さらに、筋細胞増殖・分化のどの段階でカチオン性脂質遺伝子複合体が効率よく取り込まれるかを明らかにし、in vivoへの応用として塩酸ブピバカインにより壊死・再生を惹起した（Akiyama C et al. 1992, Saito et al. 1994）ラットひらめ筋およびカルジオトキシンにより壊死・再生を惹起した（Davis HL et al. 1993b）マウス前脛骨筋へのLacZ遺伝子導入を行った。

2. 対象および方法

1) カチオン性脂質

カチオン性脂質は、陽性荷電を持つカチオン基の数により、monocationic lipidとpolycationic lipidに分類することができる。

monocationic lipidと中性脂質の混合物である，DDAB/DOPE(lipofectACETM)，DOTMA/DOPE (lipofectinTM)，monocationic lipidであるDOTAP，polycationic lipidと中性脂質の混合物であるDOSPA/DOPE

(lipofectAMINETM)，リポスペルミン構造をもつpolycationic lipidであるDOGS (TransfectamTM)を用いた。(表II-1，図II-1) また，Pittsburgh大学Huang教授より，供与を受けたDC-chol liposomeを用いた。

2) 細胞とその維持

C2細胞，C2/4細胞については第1章2-2) 参照。

マウス繊維芽細胞株10T1/2細胞（国立精神・神経センター萩原先生から譲渡）については，1%ペニシリン，2%ストレプトマイシンを添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM，pH7.4に調整後0.22 μ mフィルター滅菌) に10%ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) を使用時に加え調整し，維持培地とした。

3) 培養細胞への遺伝子導入の方法

前日に35mm dish 1枚あたり 2×10^4 個の細胞をまき，必要な枚数のdishを用意する。

a. リン酸カルシウム法

導入2時間前に培地 (2.5ml) を交換した。

5mlのチューブにdish 1枚あたり5 μ l DNA, 31 μ l 1M CaCl₂, 89 μ l dH₂Oを入

れ、ボルテックス混和しながら125 μ l 2xHEPES buffer (42mM HEPES, 270mM NaCl, 10mM KCl, 1.4mM Na₂HPO₄, pH7.05, フィルター滅菌後 -20度保存) を滴下し, 10分ごとにボルテックス混和しつつ30分間室温で放置した. dish 1枚につき250 μ lずつ加え, 5%CO₂, 37℃で一晩培養した. 翌日, 培地を交換し, 培養を続けた.

b.DOTMA/DOPE, DDAB/DOPE, DOSPA/DOPE

エッペンドルフチューブにDNA (2 μ l) をとり, 無血清培地 (OptiMEM™) を加え, 100 μ lにした. ポリスチレンチューブにカチオン性脂質 (2-20 μ l) を入れ, OptiMEM™を加え, 100 μ lにした. 両者を混和し, 15分間室温に放置した. その間に, 準備したdishの培地をOptiMEM™に交換した. 15分後, DNA/カチオン性脂質複合体に0.8 mlOptiMEM™を加え, 1mlにした. dishの培地を吸引除去し, dishあたり1 mlのDNA/カチオン性脂質複合体を加え, 37℃, 5%CO₂下で5時間培養した. 5時間後, DNA/カチオン性脂質複合体を除去し, 増殖または分化誘導培地に交換した. (図II-2)

c.DOTAP

エッペンドルフチューブにDNA (5 μ l) をとり, HBS buffer (20 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, pH7.4) を加え, 33 μ lにした. ポリスチレンチューブにDOTAP (2-20 μ l) を入れ, HBS bufferを加え, 33 μ lにした. 両者を混和し, 10分間室温に放置した. 10分後, DNA/DOTAP複合体に10%FBS添加DMEMを加え, 2mlにした. dishの培地を吸引除去し, dishあたり2 mlのDNA・DOTAP複合体を加え, 37℃, 5%CO₂下で5時間培養した. 5時間後, DNA/DOTAP複合体を除去し, 増殖または分化誘導培地に交換した.

d.DOGS

DOGS 1 mgに99.5%エタノール250 μ lを加え, 4 mMのworking solutionを

作製した。

ポリスチレンチューブにDNA ($1\ \mu\text{l}$) をとり、 $50\ \mu\text{l}$ の2xDMEM (500 ml のdH₂Oで調整。抗生剤は添加しない) を加えた。もう一本のポリスチレンチューブにDOGS working solution ($0.5 - 2.0\ \mu\text{l}$) をとり、 $50\ \mu\text{l}$ の2xDMEMを加えた。両者を混和し、10分間室温で放置した。その間に、準備したdishの培地を1%FBS添加DMEM 0.8 mlに交換した。10分後、DNA/DOGS複合体に $100\ \mu\text{l}$ dH₂Oを加えた。dish 1枚当り、DNA/DOGS複合体 $200\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C 、5 %CO₂下で2時間培養した。2時間後、DNA/DOGS複合体を除去し、増殖または分化誘導培地に交換した。

e.DC-chol

ポリスチレンチューブにDC-chol (5-20 nmol) をとり、OptiMEM™を用いて1mlに希釈したDNA ($0.5 - 2\ \mu\text{g}$) を加え、10分間室温で放置した。10分後、用意したdishをOptiMEM™で洗浄し、DNA/DC-chol複合体を添加、 37°C 、5 %CO₂下で5時間培養した。5時間後、DNA/DC-chol複合体を除去し、増殖または分化誘導培地に交換した。

一過性発現実験では、48時間培養後に細胞をharvestした。安定形質発現系では48時間後に、細胞を回収し、1枚の35 mm dish当り10 cm dish 6枚に細胞を1000個ずつまきなおし、3枚は、G418 (1g/l : GIBCO BRL) 添加培地で選択し、もう3枚は通常の培地で維持し、コロニーを算定した (図II-3)

4) プラスミドDNAおよびプラスミドDNAの調整

この実験で用いたプラスミドDNAを図II-4に示す。paSRNlacZは東大医科研斎藤先生から、pCAGGSlacZは宮崎先生から供与していただいた。p-192lacZおよびpaSRNCATは以下のように作製した。

a. p-192MHC-IIβlacZの作製

第1章2-1) 参照。

b. paSRNCATの作製

paSRNLacZを *HindIII* と *PstI* で double digestion し、プロモーターおよび splicing unit を切り出した。pCAT を *HindIII* と *PstI* で double digestion し、同部位に paSRNLacZ から切り出したプロモーターおよび splicing unit を挿入した。

大量培養したプラスミドDNAは、陰イオン交換カラムを用いる市販のDNA精製キット (QIAGEN) で精製し、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に溶解 ($1 - 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) して使用した。

5) 培養細胞における β -galactosidase 染色法および活性測定法

a. β -galactosidase 染色法

第1章2-5) a 参照。

ランダムな3視野を選択し1 dish 当り500個の細胞中の β -galactosidase 陽性細胞数を算定、遺伝子導入効率とした。

b. β -galactosidase 活性測定

第1章2-5) c, d 参照。

6) 細胞抽出液中の蛋白濃度の測定

第1章2-5) e 参照。

7) CAT 活性の測定

蛋白濃度を測定し、一定の蛋白濃度を含む細胞抽出液に0.25M Tris-HCl (pH 7.5) を加え、 $90 \mu\text{l}$ にした。各サンプルに10mM Butyryl CoA (SIGMA) $5.3 \mu\text{l}$, 0.25M Tris-HCl (pH7.5) $2.7 \mu\text{l}$, ^{14}C -Chloramphenicol $2.0 \mu\text{l}$ を加え、 37°C で1時間インキュベートした。各サンプルに $200 \mu\text{l}$ の

TMPD/Xylene (TMPD:2,6,10,14-tetramethypentadecane, Aldrich-Chemie)を加え, 20秒間ボルテックス後, 4℃, 12000rpmで5分間遠心し, 上清170 μ lを6mlのOrganic Counting Scintillantに入れ, 液体シンチレーションカウンターを用いて 14 Cを測定した.

8) 抗デスミン抗体, 抗ミオシン重鎖抗体 (F59, BF45) による培養細胞の染色

メタノール (-20℃) 固定後, 0.1% casein / 0.1% gelatin in PBS(-)を用いて10分ブロッキングを行い, 一次抗体 (F59, 1:20希釈; Page S et al. 1992) と37℃で1時間反応させた. PBS(-)による洗浄後, 二次抗体 (FITCラベル抗マウスヤギ抗体, 1:50希釈) と室温で1時間反応させた. PBS(-)による洗浄後, 封入し検鏡した.

9) ラット・マウスへの導入法とブピバカイン/カルジオトキシン処理

8週齢の雄のウイスターラットをジエチルエーテルで麻酔後, 下腿外側の皮膚を切開, ひらめ筋を露出し, 1ml注射器と27ゲージ針 (テルモ) を用いて, 0.5%塩酸ブピバカイン200 μ lを遺伝子導入2日前に筋注した. 筋注後, オートクリップ (Becton Dickinson) で皮膚を縫合した. 塩酸ブピバカイン筋注, 2日後あるいは6日後に, 60 μ g DOGSと10 μ g DNA (モル比4.74:1) を最終濃度5%のglucoseに溶解し, 総量200 μ lを筋注した. 塩酸ブピバカイン筋注により惹起される筋の再生過程を図II-5に示す.

10) サザンブロット法による染色体への導入遺伝子の挿入の確認

G418による選択で得られた細胞コロニーからゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを制限酵素*HindIII*あるいは*XbaI*で切断後、アガロースゲル電気泳動（0.8%）を行い、メンブレンにアルカリ法でトランスファーした。pMC1neopolyA（Stratagene）から*EagI*と*HindIII*で切り出したNeo遺伝子（0.7kb）を、マルチプライム法を用いて³²PでラベルしNeo probeを作成、トランスファーしたメンブレンとハイブリダイゼーションを行った。0.1% SDS／0.1xSSPEで65℃、5分洗浄し、X線フィルムで検出した。

3. 結果

1) 一過性発現系における遺伝子導入効率

paSRNLacZ, paSRNCATをレポーター遺伝子としてリン酸カルシウム法, 6種類のカチオン性脂質を用いてマウス筋細胞系のC2細胞およびマウス線維芽細胞系の10T1/2細胞に導入し一過性発現の効率を比較した. 導入効率は β -galactosidase染色および活性, CAT活性を測定することにより比較検討した. 細胞毒性については細胞抽出液の蛋白濃度を測定し検討した.

一過性発現系においてはカチオン性脂質法はリン酸カルシウム法に比し, 有意に導入効率は高く, なかでも polycationic lipid であるDOGSおよびDOSPAはC2細胞, 10 T 1/2細胞とも高値であった (表II-2, 図II-6). polycationic lipidはmonocationic lipidと比較し, 細胞障害が強かったが, 反応時間の短縮により軽減することが可能であった.

次に, 遺伝子導入効率の高かった, DOSPA/DOPE, DOGSを用いて, 骨格筋特異的プロモーターを持つp-192MHC-IIBLacZをC2細胞, 10 T 1/2細胞に導入した. C2細胞では β -galactosidase陽性筋線維出現率は, DOSPA/DOPEでは $9.5 \pm 2.4\%$, DOGSでは $7.1 \pm 1.2\%$ であった. 10 T 1/2細胞では β -galactosidase陽性筋線維出現率は, DOSPA/DOPEでは $5.7 \pm 2.6\%$, DOGSでは $18.1 \pm 5.7\%$ であった. また, 10 T 1/2細胞で, p-192MHC-IIBLacZとmyogenin遺伝子をco-transfectionした場合にはDOSPA/DOPEでは $26.5 \pm 8.9\%$, DOGSでは $29.5 \pm 6.2\%$ で β -galactosidase陽性筋線維出現率の増加が認められた.

DC-cholを用いてpaSRNCATをC2細胞および10T1/2細胞へ, 導入した結果では, DOSPA/DOPE, DOGSに次ぐCAT assayの値が得られた. また, 遺伝子導入細胞の細胞抽出液の蛋白濃度測定では, DOSPA/DOPE, DOGSを用いた場合より減少度が低く, 細胞障害性が少なかった.

2) 安定発現系における遺伝子導入効率

安定発現の検討のためにはneo耐性遺伝子を用いG418存在下に3週間培養した。安定発現系においてもDOSPA, DOGSの導入効率は高く、C2細胞ではリン酸カルシウム法が0.02%, DOTMAが0.14%であるのに対し、それぞれ4.20%, 3.20%であった(表II-3)。一過性発現系では培養骨格筋細胞への遺伝子導入効率は線維芽細胞に比べ、有意に低値であったが、安定発現系では明らかな差は認められなかった。骨格筋細胞と線維芽細胞では核内への遺伝子の導入効率には差があるが、染色体内への組み込みには差がない可能性が考えられた。

3) サザンブロット法による核内導入遺伝子の存在様式の検討

選択された細胞に対し、核内での導入遺伝子の存在様式をNeo 遺伝子を一回切断する制限酵素*HindIII*とNeo 遺伝子を切断しない制限酵素*XbaI*でサザンブロット法を行い検討した。Neo 遺伝子の全長は3.8kbであり、Neo 遺伝子を一回切断する制限酵素*HindIII*および*XbaI*でゲノムDNAを切断すると、染色体に挿入された場合は3.8kbより大きいバンドとして検出されることが予想される。また、染色体に挿入されず、extrachromosomalの状態では細胞内に存在した場合は*HindIII*でゲノムDNAを切断すると、3.8kbの大きさのバンドとして検出されるはずである。*HindIII*でゲノムDNAを切断し、サザンブロットを行った結果、各コロニーにおいて3.8kbより大きいバンドが検出され、Neo 遺伝子が染色体にintegrateされていることを確認できた(図II-7)。

4) 筋細胞の増殖・分化と遺伝子導入効率

培養骨格筋細胞株であるC2/4細胞について増殖あるいは分化を誘導し、その各段階で、DOGSを用いてpaSRNlacZ遺伝子の導入を行い、 β -galactosidase活性を測定した。

カチオン性脂質による遺伝子導入を行った後に分化誘導培地に変換した場合に、最も高い β -galactosidase活性値が得られ（図II-8），しかも，分化誘導後2日目ないし3日目の遺伝子導入では低い導入効率しか得られなかったことから，カチオン性脂質によって遺伝子が導入されるためには，筋芽細胞が増殖中であることが必要と考えられた．遺伝子導入後も増殖培地で維持した場合には，導入効率は高いものの分裂によって導入遺伝子が希釈されるために β -galactosidase活性値が最高値をとらない可能性が考えられた．

5) カチオン性脂質を用いた10T1/2細胞のMyoD, Myogenin遺伝子による筋芽細胞への転換効率

線維芽細胞である10T1/2細胞は，MyoDファミリー遺伝子により，筋細胞への変換が可能であるとされる（Davis RL et al. 1987, Braun T et al. 1989）．

MyoDファミリー遺伝子のうち，筋発生の研究から，MyoDは幹細胞から筋細胞への決定の過程に，Myogeninは筋芽細胞から筋管細胞への分化の過程を制御していると考えられている（武田 1994）．DOTMA/DOPE, DOSPA/DOPE, DOGSを用いて10T1/2細胞に2 μ gのMyoD, Myogenin遺伝子を導入し，筋芽細胞への転換効率を調べた．遺伝子導入後分化誘導培地に交換し，5日目に抗デスミン抗体，10日目にBF45（embryonic MHC），F59抗体で染色し，500細胞当りの陽性細胞数を算定した．polycationic lipidであるDOSPA/DOPE, DOGSではMyoD, Myogenin遺伝子の導入により，2%前後の10T1/2細胞を筋芽細胞に転換できた．この値は一過性発現効率よりかなり低値であり，10T1/2細胞を筋芽細胞に転換するためには，MyoD, Myogenin遺伝子の持続的な発現が必要であると考えられた．

6) in vivo実験における遺伝子導入の効率

カチオン性脂質による遺伝子導入には筋芽細胞の増殖が必要であるというin vitroの実験結果を踏まえて、塩酸ブピバカインによる筋再生を引き起こした上で遺伝子のin vivo導入を行った。ウイスターラット（8週令，雄）の右ひらめ筋に0.5%塩酸ブピバカインを0.2ml注射した2日後，6日後，あるいは前処置なしにDOGS 60 μ gと混合したpaSRNlacZ遺伝子10 μ gを注射した（Saito Y et al. 1994）。対側は25% sucrose前処置15分後に，paSRNlacZ遺伝子100 μ gを直接注射した（Davis HL et al. 1993a）。遺伝子導入7日目にラットを屠殺し，ひらめ筋を取り出し，凍結後，クリオスタットで薄切し，固定， β -galactosidase染色，HE染色を行い， β -galactosidase陽性筋線維数を算定した。単核細胞が出現し，筋管細胞形成以前である塩酸ブピバカイン処置後2日目の β -galactosidase陽性筋線維出現率（表II-4）は，0.2～6.9%であり，一方，中心核線維が認められる塩酸ブピバカイン処置後6日目には β -galactosidase陽性筋線維の出現は認められなかった。 β -galactosidase陽性の筋線維を見る（図II-9）と，中心核線維，小径線維が多く，DOGS/DNA複合体を投与した場合には再生過程が遅延する傾向が認められた（図II-10）。DOGS/DNA複合体のみの投与により，筋細胞の変性，細胞浸潤を生じていることから，in vivoにおけるDOGS/DNA複合体の細胞毒性が強いことが考えられた。

7) 前処置なしのDOGS/DNA複合体の投与

DOGS/DNA複合体の投与により，筋線維の壊死・再生が惹起されることが，明らかになったので，塩酸ブピバカインの前処置なしにDOGS/DNA複合体をラットひらめ筋に導入し，遺伝子導入効率を検討した。DOGS/DNA複合体投与後7日，14日後にひらめ筋を取り出し，固定・染色を行ったが，

β -galactosidase陽性の筋線維はいずれも認められなかった。DNA100 μ gを筋注したものでは筋線維の壊死・再生像は認められなかった。DOGSのみ60 μ gを筋注した筋では、7日目に筋線維の再生像が認められたが、DOGS/DNA複合体を投与した場合より軽度であった。DOGS/DNA複合体(600 μ g/100 μ g)を筋注した筋では7日後には激しい細胞浸潤が認められ(図II-11)，14日後には中心部は再生のないまま線維化していた。以上より、DOGS/DNA複合体が筋細胞に取り込まれるには、塩酸ブピバカインなどの前処置により導入時に筋細胞の増殖を惹起する必要があることが明らかになった。

8) pCAGGSLacZを用いたin vivo遺伝子導入

遺伝子導入効率を高くするため、培養骨格筋細胞で強い発現が認められたpCAGGSLacZとDOGSの複合体を0.9%NaCl, 5%glucose, DMEMに溶解し、塩酸ブピバカイン筋注2日後のラットひらめ筋に投与した。25%sucrose処置群では有意に0.9%NaClでプラスミドDNAを溶解した場合に高い遺伝子導入効率を得られた。5%glucose, DMEMにDOGS/DNA複合体を溶解した場合は塩酸ブピバカイン処置群と25%sucrose処置群で差はなかった。塩酸ブピバカイン処置群ではDMEMにDOGS/DNA複合体を溶解した場合に最も高い遺伝子導入効率を得られた。paSRNLacZよりも β -galactosidaseを強く発現するpCAGGSLacZを用いることによって、 β -galactosidaseの検出率が上昇したことが一因と考えられた。

9) カルジオトキシンを用いたDOGS/DNA複合体のマウス前脛骨筋への遺伝子導入

塩酸ブピバカインを用いた遺伝子導入では、DOGS/DNA複合体が筋線維に取り込まれるためには、筋細胞の再生が必要であることが明らかになっ

た。しかし、塩酸ブピバカインではDOGS/DNA複合体が取り込まれる時期は短く、高い遺伝子効率を得ることが困難であった。カルジオトキシンは蛇毒であるが、骨格筋に壊死・再生を惹起し、その再生過程は、塩酸ブピバカインよりも緩徐で、DNAの直接導入では、筋注後5日～9日によく取り込まれるとされている (Davis HL et al. 1993b)。マウス前脛骨筋にカルジオトキシン筋注後、2, 5, 9日目にDOGS/DNA (DOGS 60 μ g/pCAGGSLacZ 10 μ g) 複合体を導入し、導入7日目に β -galactosidase染色を行った。その結果、カルジオトキシン筋注後、9日目にDOGS/DNA複合体を導入し、7日目に β -galactosidase染色を行った場合のみに β -galactosidase陽性筋線維が認められた (図II-12)。

4. 考察

一過性発現系・安定形質発現系において、polycationic lipidは、高い遺伝子導入効率を示し、従来の報告と一致した結果が得られ（Trivedi RA et al. 1995），培養骨格筋細胞への遺伝子導入法として有用と考えられた。polycationic lipidはmonocationic lipidと比較し、強い細胞障害性を示した。これは、カチオン基が負荷電の細胞膜と作用し、endocytosisにより、細胞内へ取り込まれるため、カチオン基が多いほど、導入効率も高いが、細胞障害も強い可能性が考えられた。

一過性発現系では、骨格筋細胞に比べ、線維芽細胞への遺伝子導入効率は高値であったが、安定形質発現系では差は認められず、遺伝子が核内で染色体へ取り込まれる効率には差がないことが予想された。

骨格筋細胞へのカチオン性脂質による遺伝子導入には、細胞が増殖中であることが必要であった。これは筋芽細胞と分化した筋管細胞でのendocytosis能の相違、細胞外多糖類の存在などが関与していると考えられた。

DMD患者骨格筋から筋芽細胞を取り出し、ジストロフィン遺伝子を導入、患者に移植するというex vivo遺伝子治療の筋芽細胞の供給源として、線維芽細胞に筋分化制御因子であるMyoDファミリー遺伝子をカチオン性脂質を用いて過剰発現させ筋芽細胞に変換できるかどうかを培養細胞系で試みたが、転換効率は数%であり、臨床への応用は困難と考えられた。

in vivo実験においては、筋の壊死・再生系を用いて、DOGS/DNA複合体を投与したが、単核の筋芽細胞が増殖している時期に導入した場合にのみ β -galactosidase陽性細胞が出現し、培養細胞で得られた事実と一致していた。しかし、その効率は低く、しかもばらつきが大きく、対側で実施した10培量のDNAの直接導入と変わることがなかった。しかも、DOGS /DNA

複合体の投与により、強い細胞障害性が観察されたことから、カチオン性脂質（少なくともDOGS）をrodentに対するin vivo遺伝子導入に応用することは困難と考えられた。

今後は、monocationic lipidのような遺伝子導入効率は低くても細胞毒性の低い安全なカチオン性脂質の開発が望まれる。特にDC-cholは、カチオン性脂質のなかで唯一人体への応用が許可されているが、本実験においても細胞傷害性が少なくin vivoへの応用が期待される。

現在、骨格筋に対する遺伝子直接導入法（plasmid direct injection）については、遺伝子導入の効率自体は低いですが、その抗体産生能により、DNAワクチンとして注目されている。ただし、この方法は霊長類では応用が困難とされている。カチオン性脂質を用いた骨格筋に対する遺伝子導入法が霊長類においてどのような効率を示すのかが注目される。

表II-1 この実験で用いたカチオン性脂質の種類とTransfectionの条件

monocationic lipids	without serum
DDAB/DOPE 1:2.5	
DOTMA/DOPE 1:1	without serum
DOTAP	with serum
polycationic lipids	
DOSPA/DOPE 3:1	without serum without antibiotics
DOGS	without serum

DOPE : dioleoyl phosphatidylethanolamine
DDAB : dimethyl dioctadecylammonium bromide
DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]n,n,n-trimethylammoniumchloride
DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTAP : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate
DOGS : dioctadecylamidoglycylspermine

表II-2 カチオン性脂質を用いた一過性発現系における遺伝子導入効率

各dishの500細胞中の β -galactosidase陽性細胞数を算定し、同条件での3施行の平均値±標準誤差を示した。

The methods of transfection	percent stained cells	
	C2 cells(%)	10T1/2 cells(%)
Calcium phosphate	0.2±0.1	1.4±0.3
Cationic lipids monocationic lipids DDAB/DOPE DOTMA/DOPE DOTAP	7.2±2.2	9.2±3.2
	4.7±1.1	6.4±2.0
	3.6±0.6	9.4±2.8
polycationic lipids DOSPA/DOPE DOGS	16.4±0.7	71.9±4.4
	9.7±3.6	83.0±9.0

表II-3 安定形質発現効率
安定形質発現効率 (%) [(Neo選択コロニー数 / 非選択コロニー数) x100]
(平均値±標準誤差)

	C2 cells(%)	10T1/2 cells(%)
Calcium Phosphate Precipitation	0.02±0.01	0.04±0.03
monocationic lipid DOTMA/DOPE	0.14±0.07	0.31±0.14
polycationic lipid DOSPA/DOPE	4.20±1.27	4.82±2.25
DOGS	3.20±1.71	3.71±2.99

表II-4 10T1/2細胞の*MyoD*, *Myogenin*遺伝子導入による筋芽細胞への転換効率
抗体陽性細胞数／全細胞数 (%)

	抗デスミン抗体 染色	BF45抗体染色 (embryonic MHC)	F59 (MHC) 抗体 染色
DOTMA/DOPE			
<i>MyoD</i>	0.07	0	0.8
<i>Myogenin</i>	-	3.6	0.6
DOSPA/DOPE			
<i>MyoD</i>	4.2	7.5	2.0
<i>Myogenin</i>	-	2.9	2.2
DOGS			
<i>MyoD</i>	1.3	2.5	1.8
<i>Myogenin</i>	-	2.3	1.8

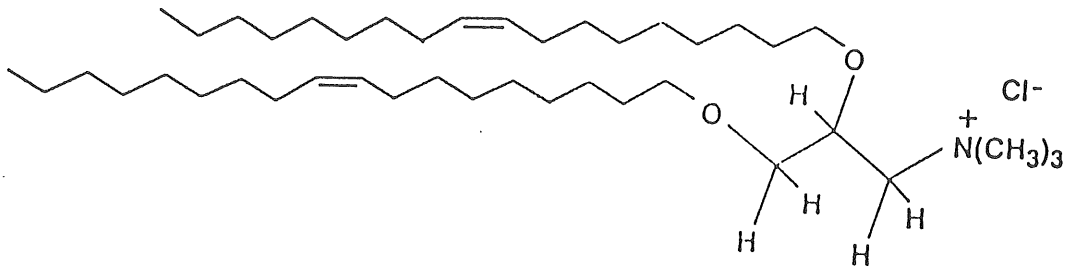
表II-5 β -galactosidase陽性筋線維出現率
 β -galactosidase陽性筋線維数／全筋線維数（％）の平均値（range）

塩酸ブピバカイン処置 ↓ 2日，6日後		対側コントロール
DOGS/DNA複合体筋注	25%sucrose 処置15分後 Plasmid DNA 筋注	
2日目の導入	2.0 (0.13-6.9)	1.7 (0.3-3.9)
6日目の導入	0	0.5 (0.3-0.6)
DOGS/DNA複合体 前処置なしの導入	0	0.2 (0.1-0.3)

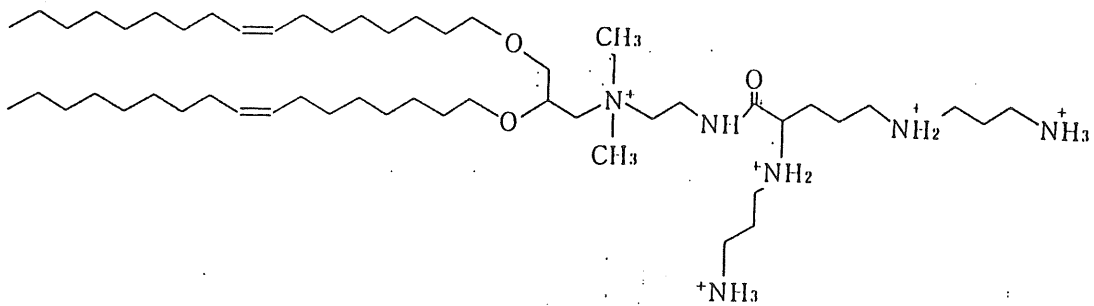
表II-6 pCAGGSLacZを用いたin vivo遺伝子導入
 β -galactosidase陽性筋線維数／全筋線維数（％）
 平均値±標準誤差

	塩酸ブピバカイン処置群 DOGS/DNA導入	25% sucrose処置群 DNA直接導入
0.9% NaCl	0.09±0.06	20.8±1.2
5% glucose	4.3±2.1	8.4±2.9
DMEM	7.1±2.6	10.9±3.7

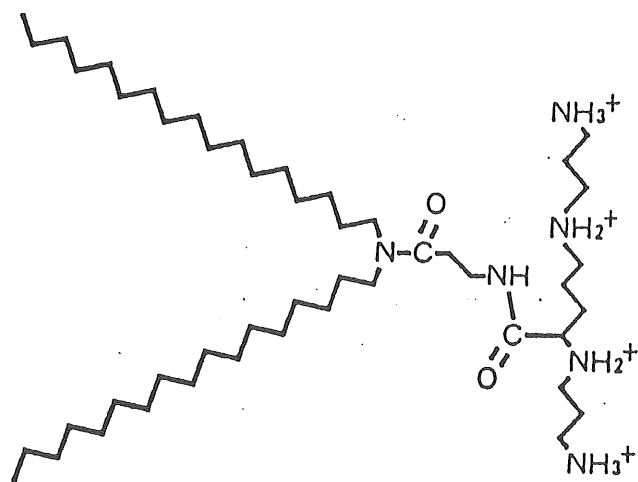
DOTMA



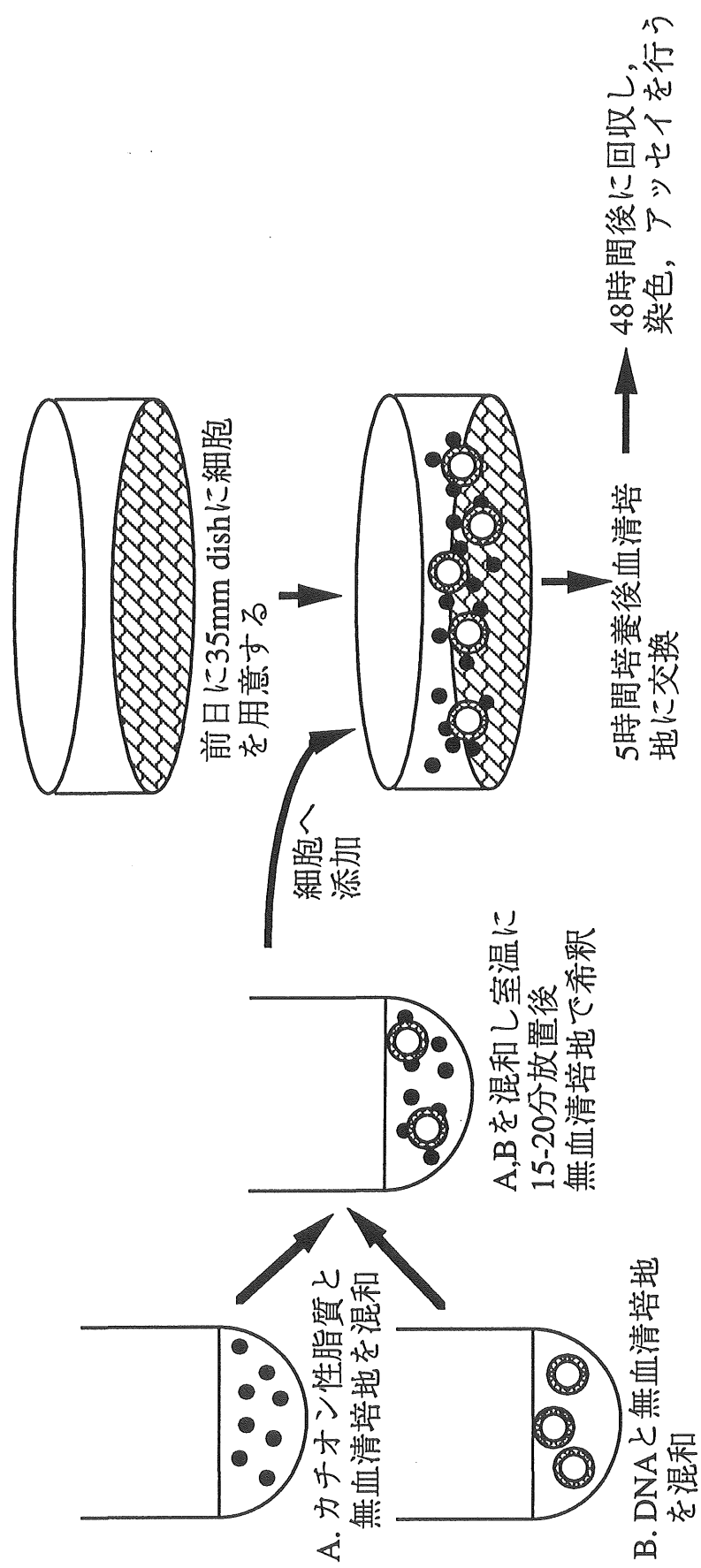
DOSP A



DOGS

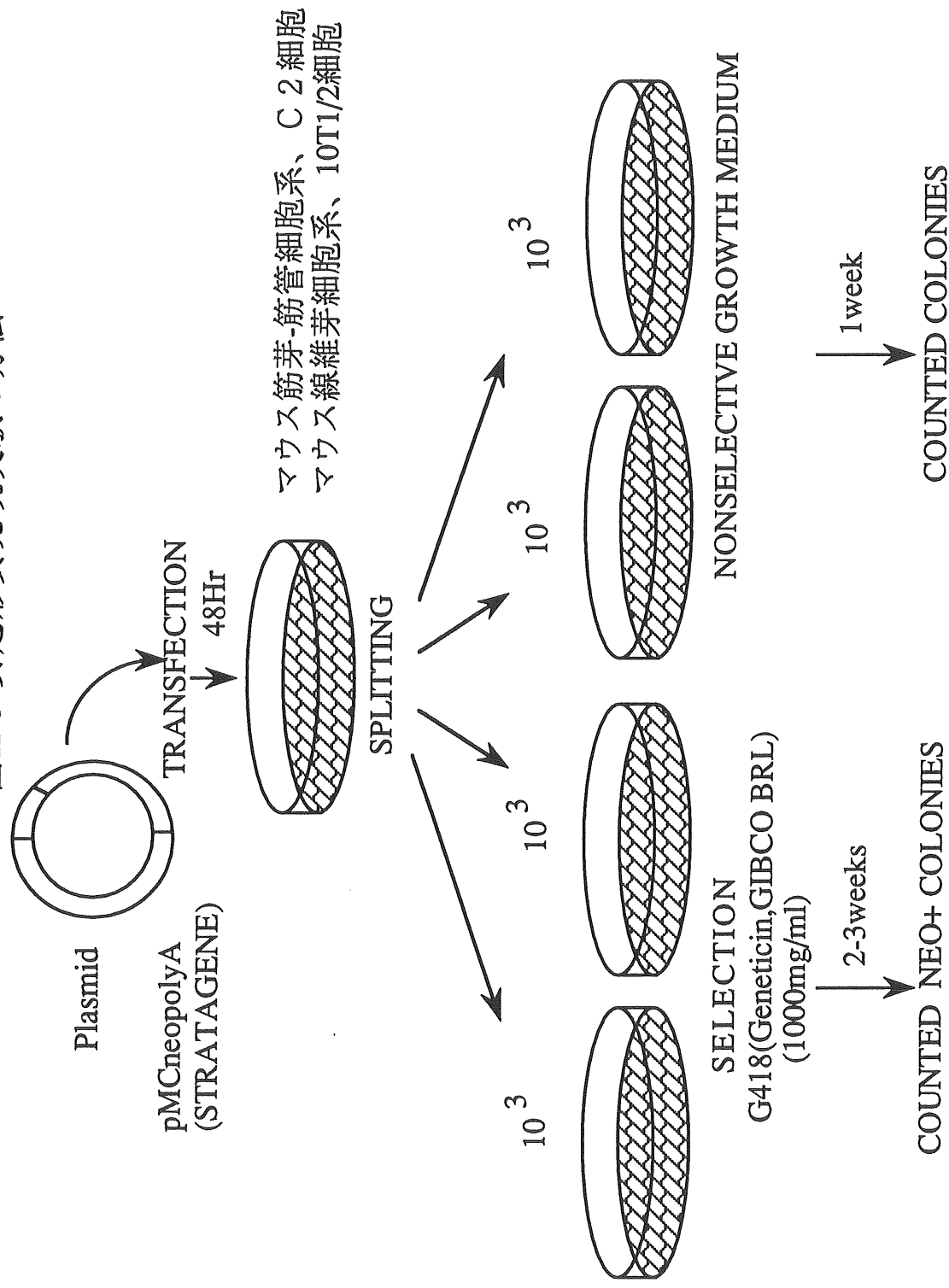


図II-1 カチオン性脂質の構造
DOTMA, DOSPA, DOGSの構造式を示す。

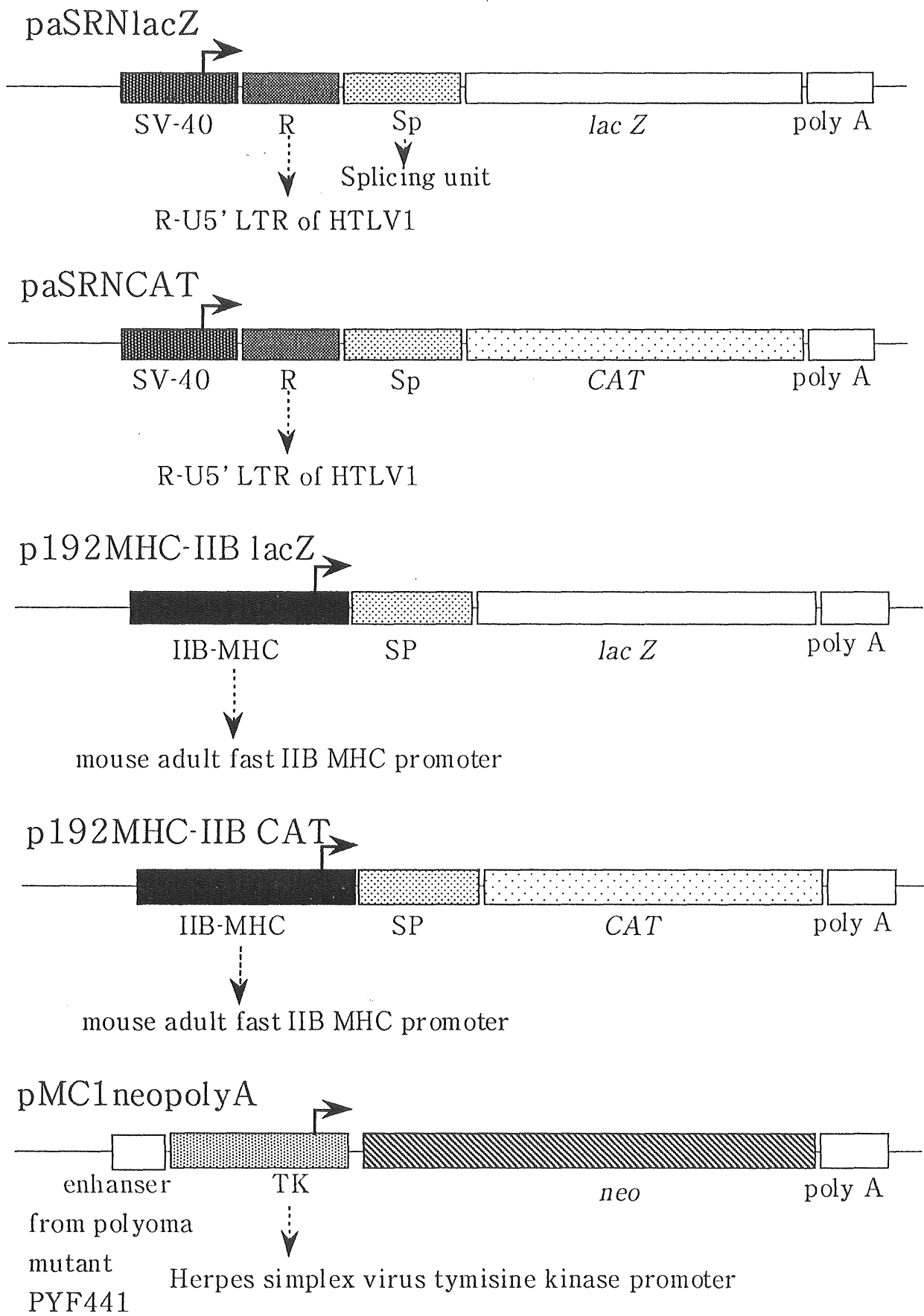


図II-2 DOTMA/DOPE, DDAB/DOPE, DOSPA/DOPEを用いた培養細胞への遺伝子導入法

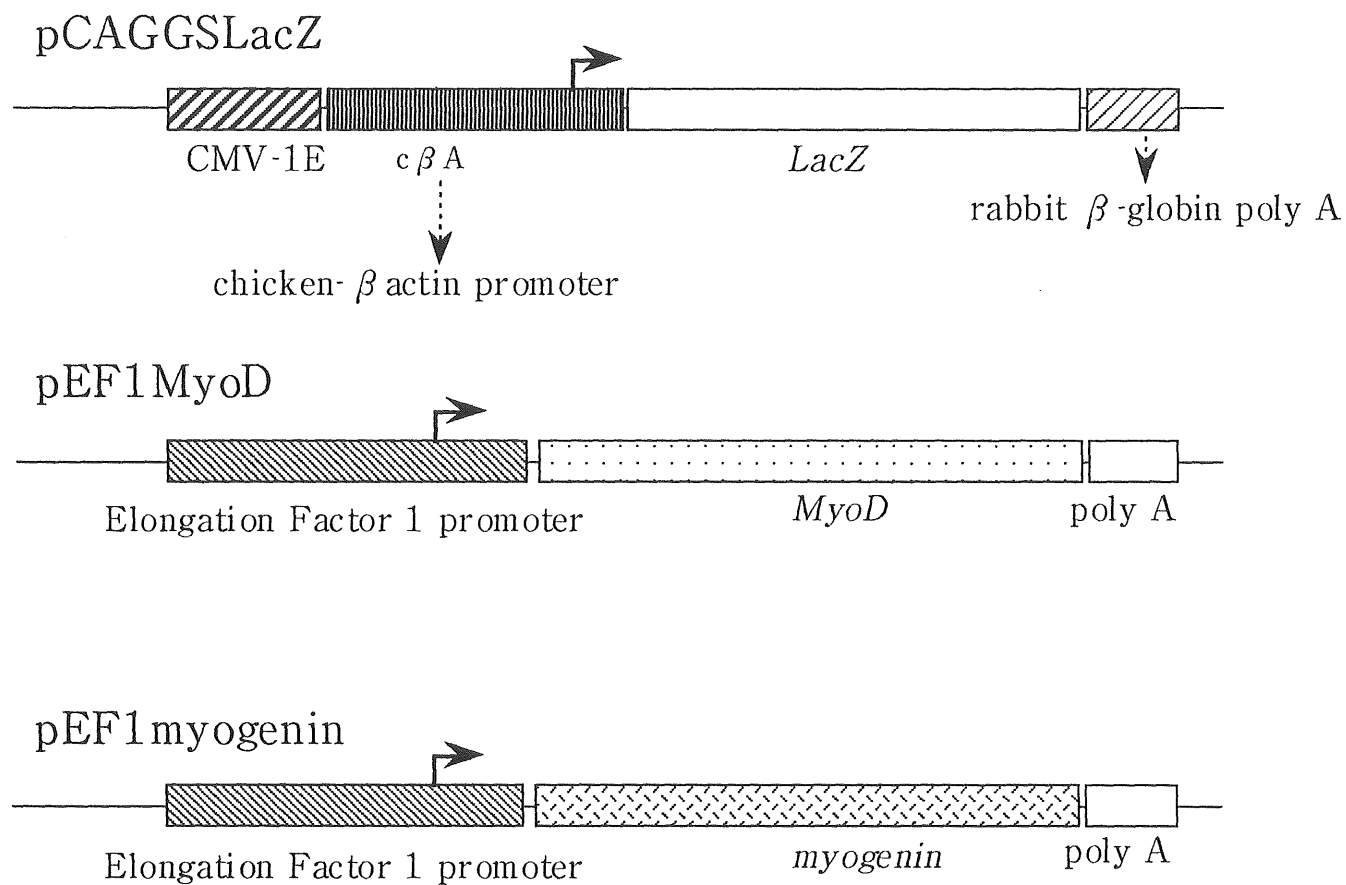
図II-3 安定形質発現実験の方法



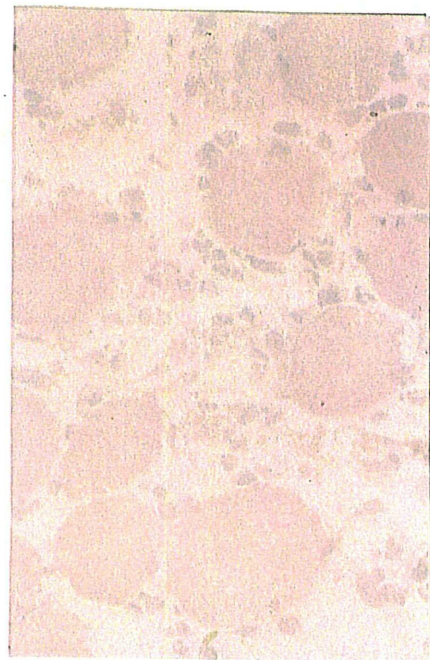
TRANSFORMATION FREQUENCY= $\frac{\text{COUNTED NEO+ COLONIES}}{\text{COUNTED COLONIES}} \times 100$



図II-4a 第2章の実験で用いたプラスミドDNAの構造



図II-4b 第2章の実験で用いたプラスミドDNAの構造



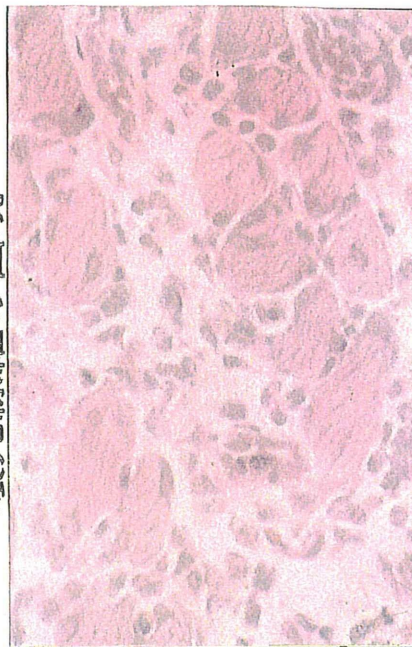
12時間後

壊死線維の出現



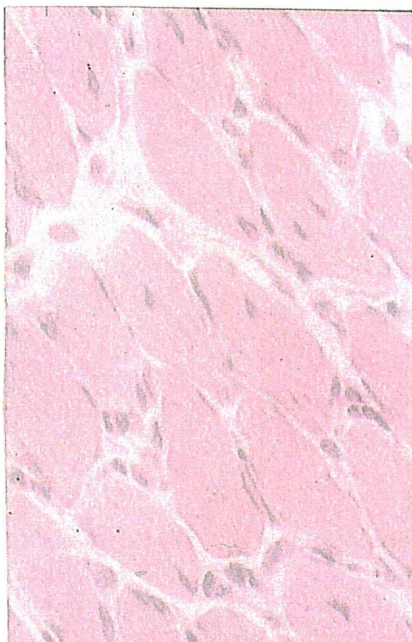
48時間後

筋芽細胞出現



4日目

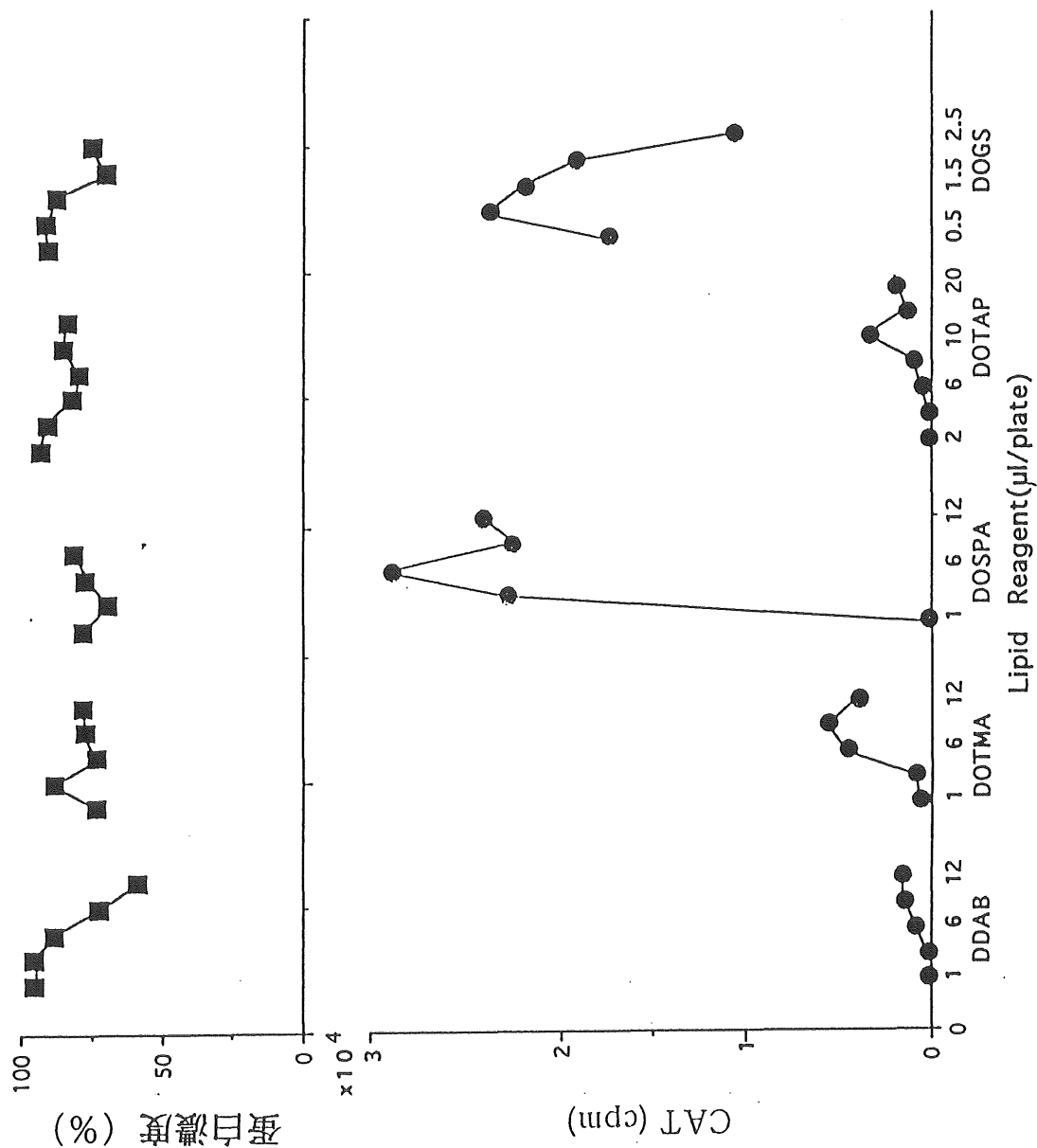
中心核線維が認められる



7日目

筋直径拡大 核は周辺へ移動

図II-5 塩酸ブピバカインによるラットひらめ筋の再生過程
ヘマトキシリン・エオジン染色 (50倍)

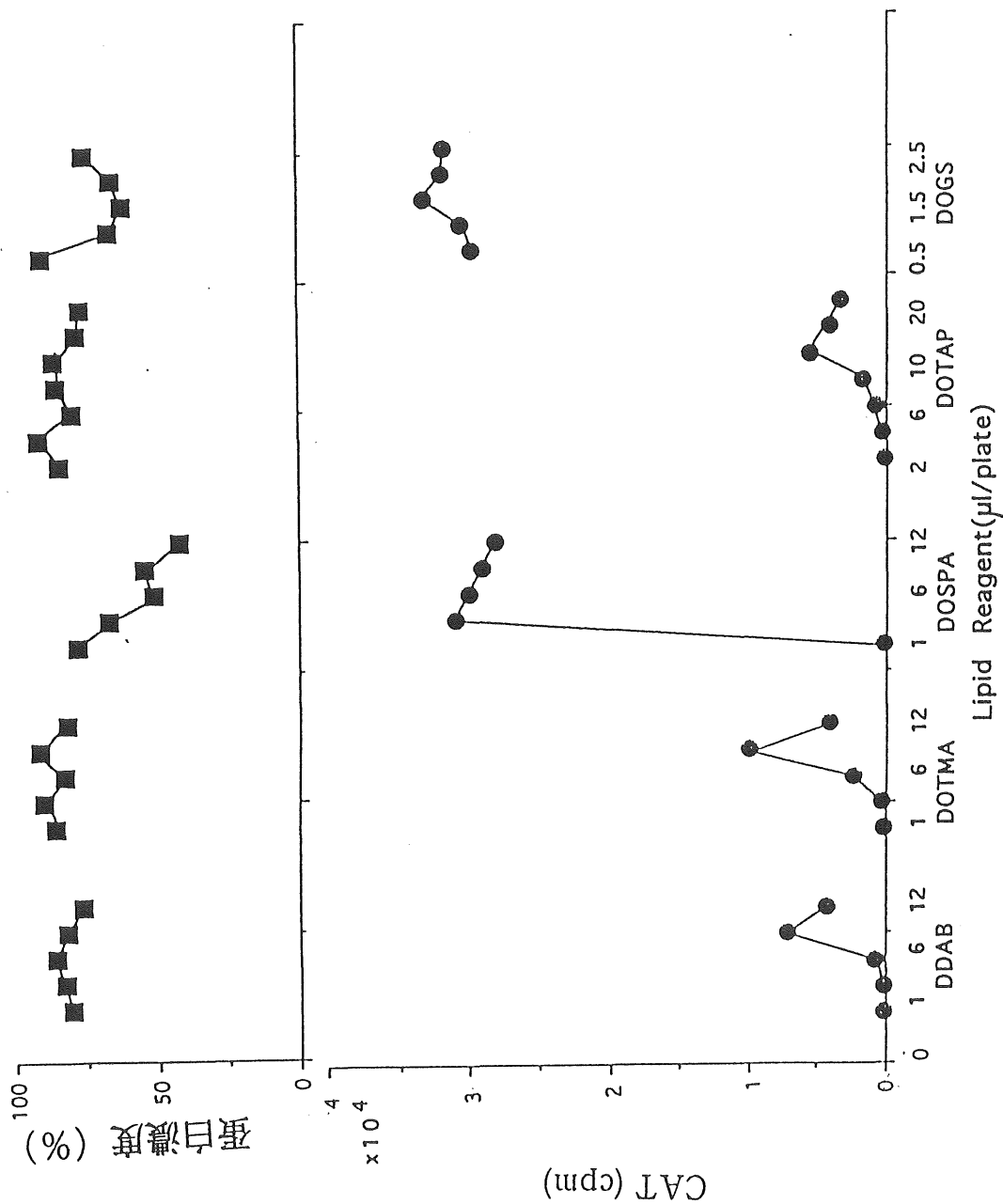


図II-6 一過性発現系における遺伝子導入効率

a. C2細胞に対するカチオン性脂質を用いた一過性発現系における遺伝子導入効率
 paSRNCATをC2細胞に5種類のカチオン性脂質を用いてCAT assayをおこなった。

上段：遺伝子導入細胞の蛋白濃度（遺伝子を導入しない細胞を100とする）

下段：CAT assay(cpm)

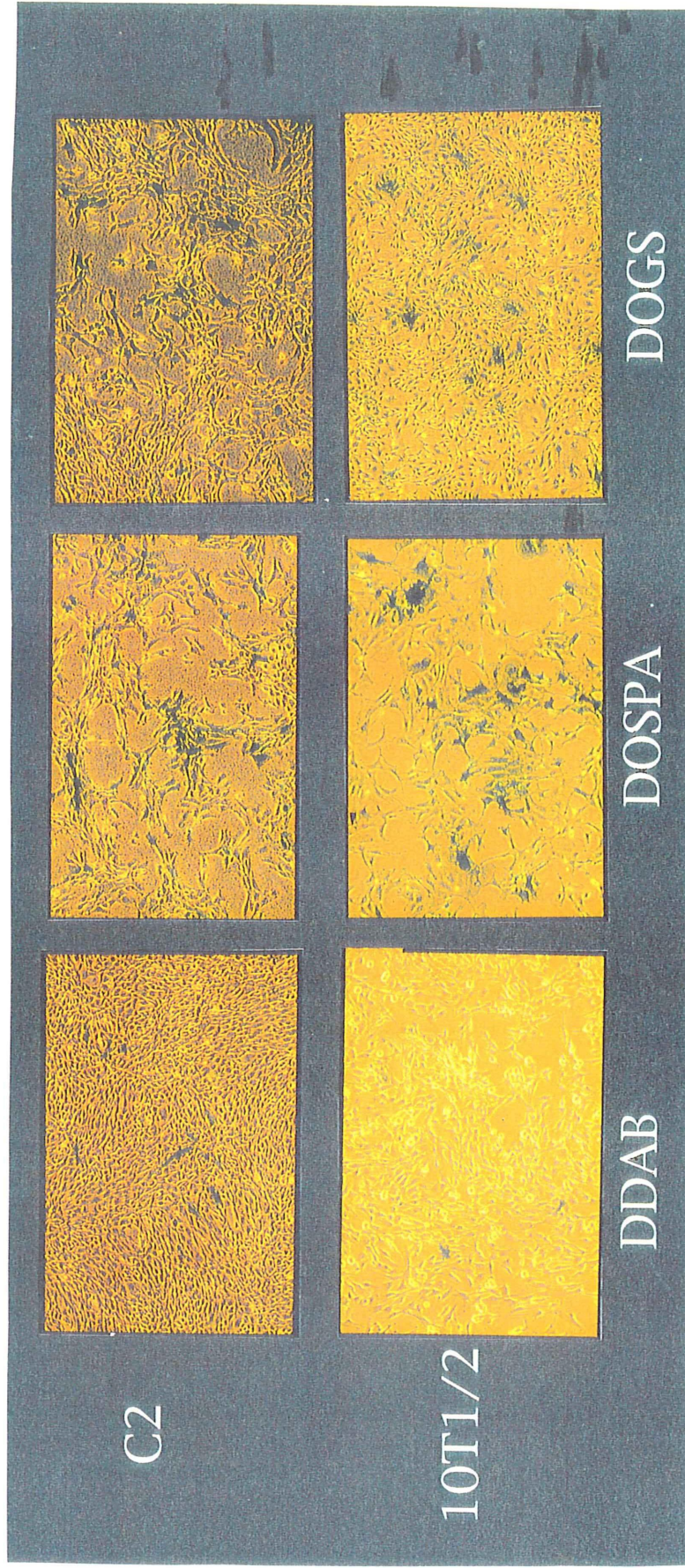


図II-6 一過性発現系における遺伝子導入効率

b. 10T1/2細胞に対するカチオン性脂質を用いた一過性発現系における遺伝子導入効率
 paSRNCATを10T1/2細胞に5種類のカチオン性脂質を用いてCAT assayをおこなった.

上段：遺伝子導入細胞の蛋白濃度（遺伝子を導入しない細胞を100とする）

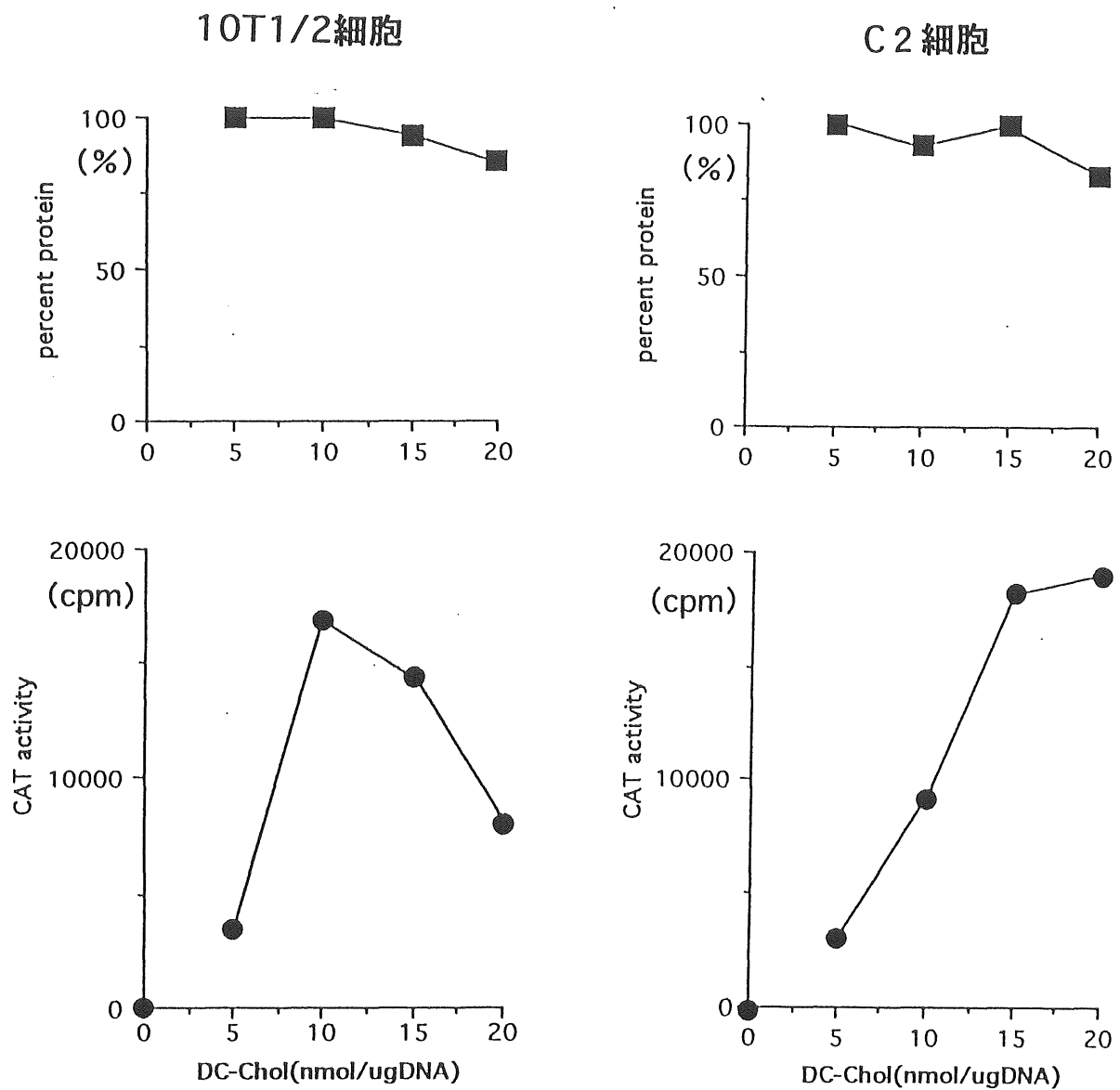
下段：CAT assay(cpm)



図II-6 一過性発現系における遺伝子導入効率

c. C2細胞, 10T1/2細胞に対するカチオン性脂質を用いた遺伝子導入効率

paSRNLacZをC2細胞および10T1/2細胞にDDAB/DOPE, DOSPA/DOPE, DOGSを用いて β -galactosidase染色をおこなった.



図II-6 一過性発現系における遺伝子導入効率

d. C2細胞および10T1/2細胞にDC-choiを用いてpaSRNCATを導入し、4 8時間後にCAT活性を測定した。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

lane 1 リン酸カルシウム法を用いてneo遺伝子を
導入し、3週間G418により選択したC2
細胞コロニーから抽出したゲノムDNA
(HindIII digestion)

lane 2 ~ 6

DOGSを用いてneo 遺伝子を導入し、3週
間G418による選択を行ったC2細胞コロニ
ーから抽出したゲノムDNA
(HindIII digestion)

lane 7 ~ 9

pMC1neo polyA(HindIII digestion)

7 20pg

8 40pg

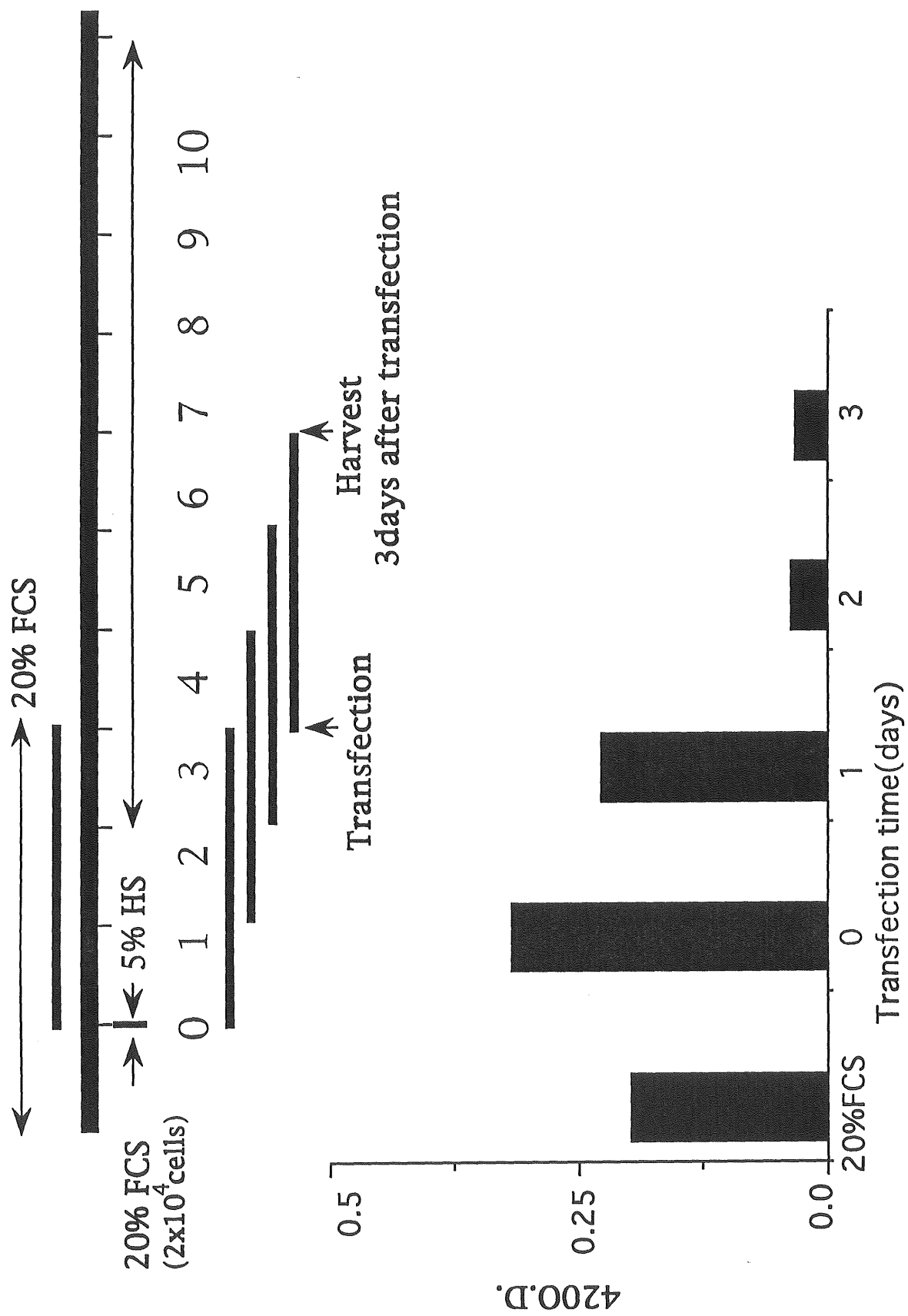
9 80pg

lane 10 pMC1neo polyA(uncut) 10pg

3.8kb →

図II-7 サザンブロット法による導入遺伝子の核内存在様式の検討

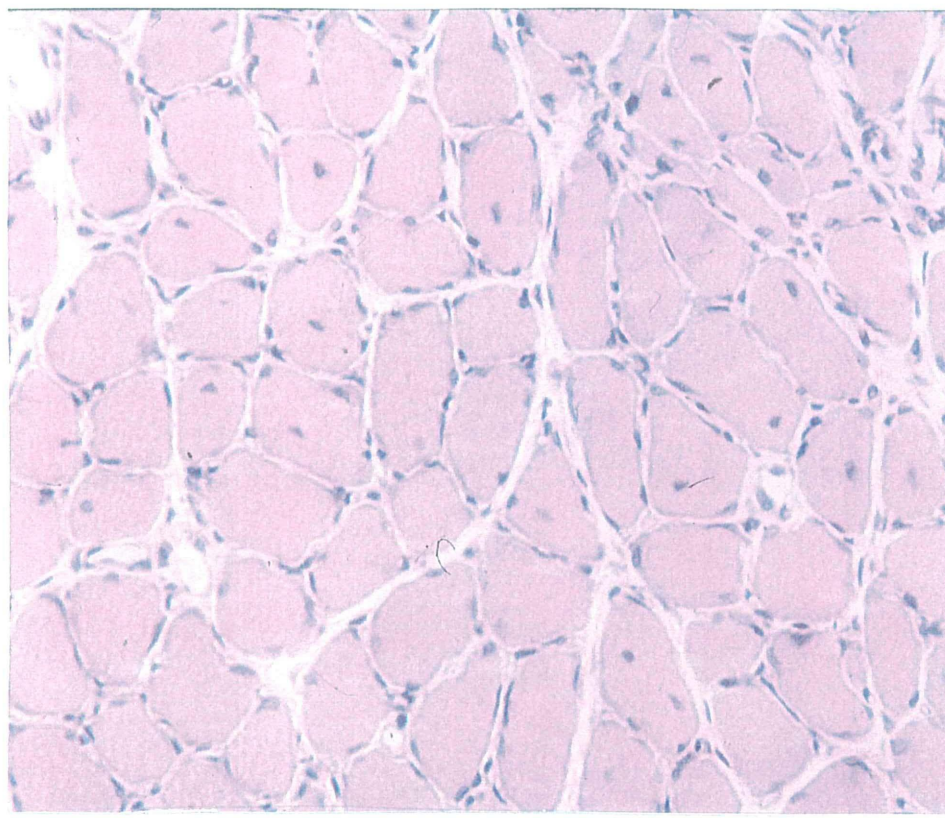
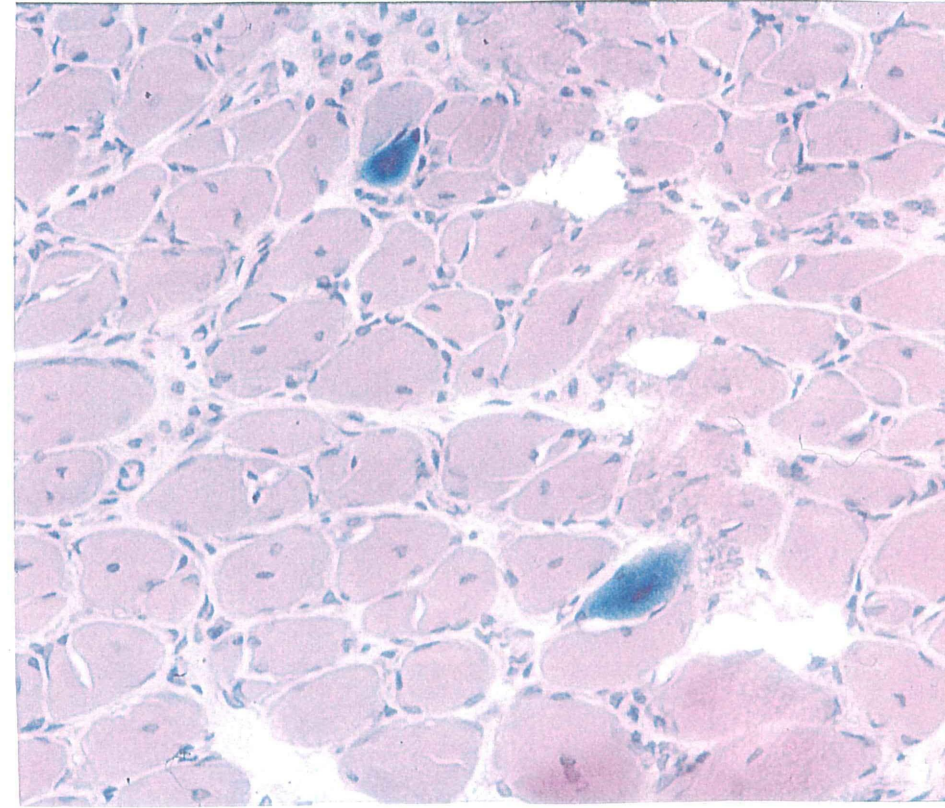
各コロニーにおいて3.8kbより大きいバンドが検出され、導入遺伝子は染色体内にintegrateされていることが確認できた。



図II-8 C2/4細胞の増殖・分化の各段階での遺伝子導入

DOGSを用いてC2/4細胞の増殖・分化の各段階でpaSRnLacZを導入した。

上段：導入の方法. 下段： β -galactosidase活性測定

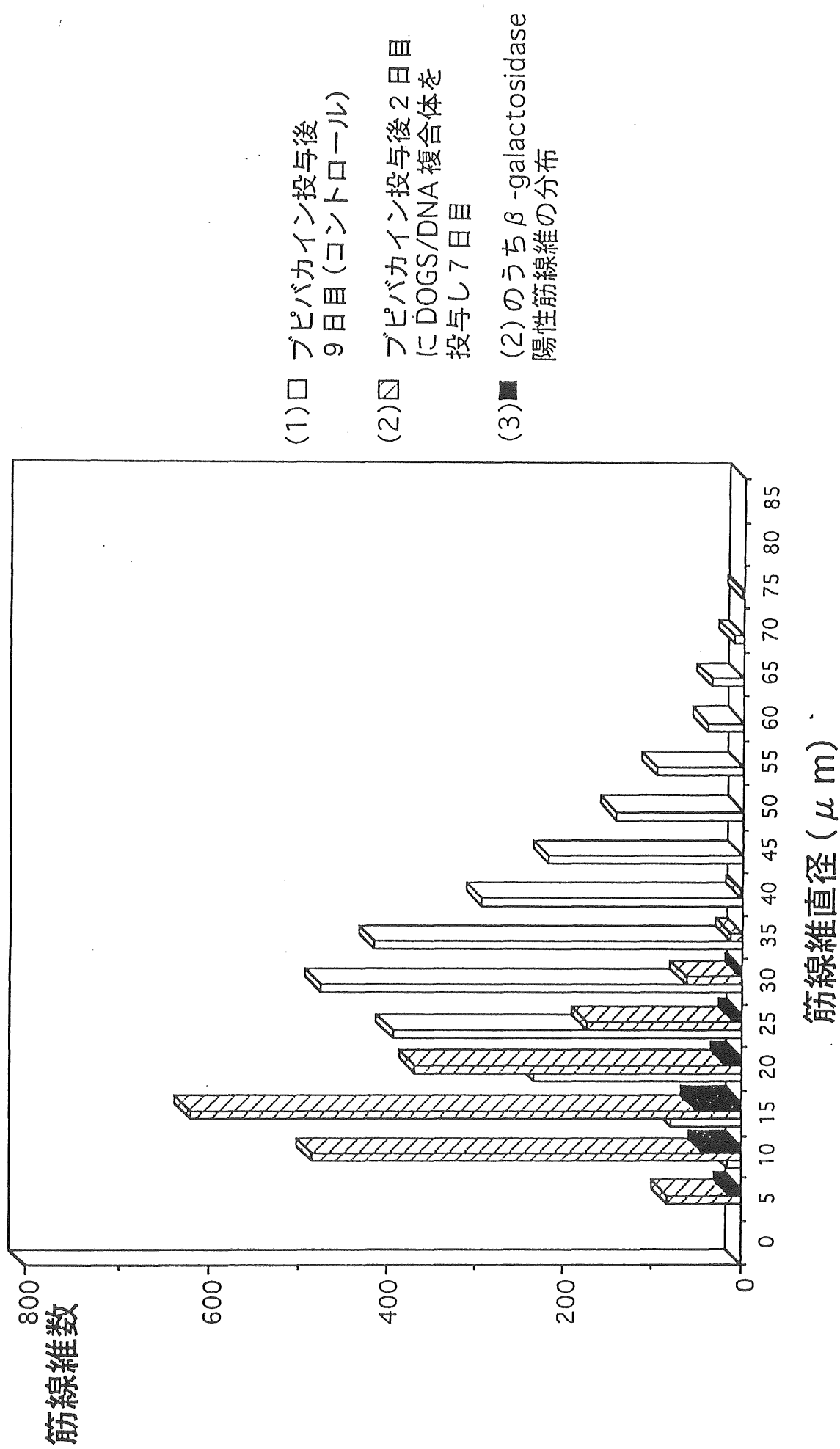


図II-9 in vivo 遺伝子導入

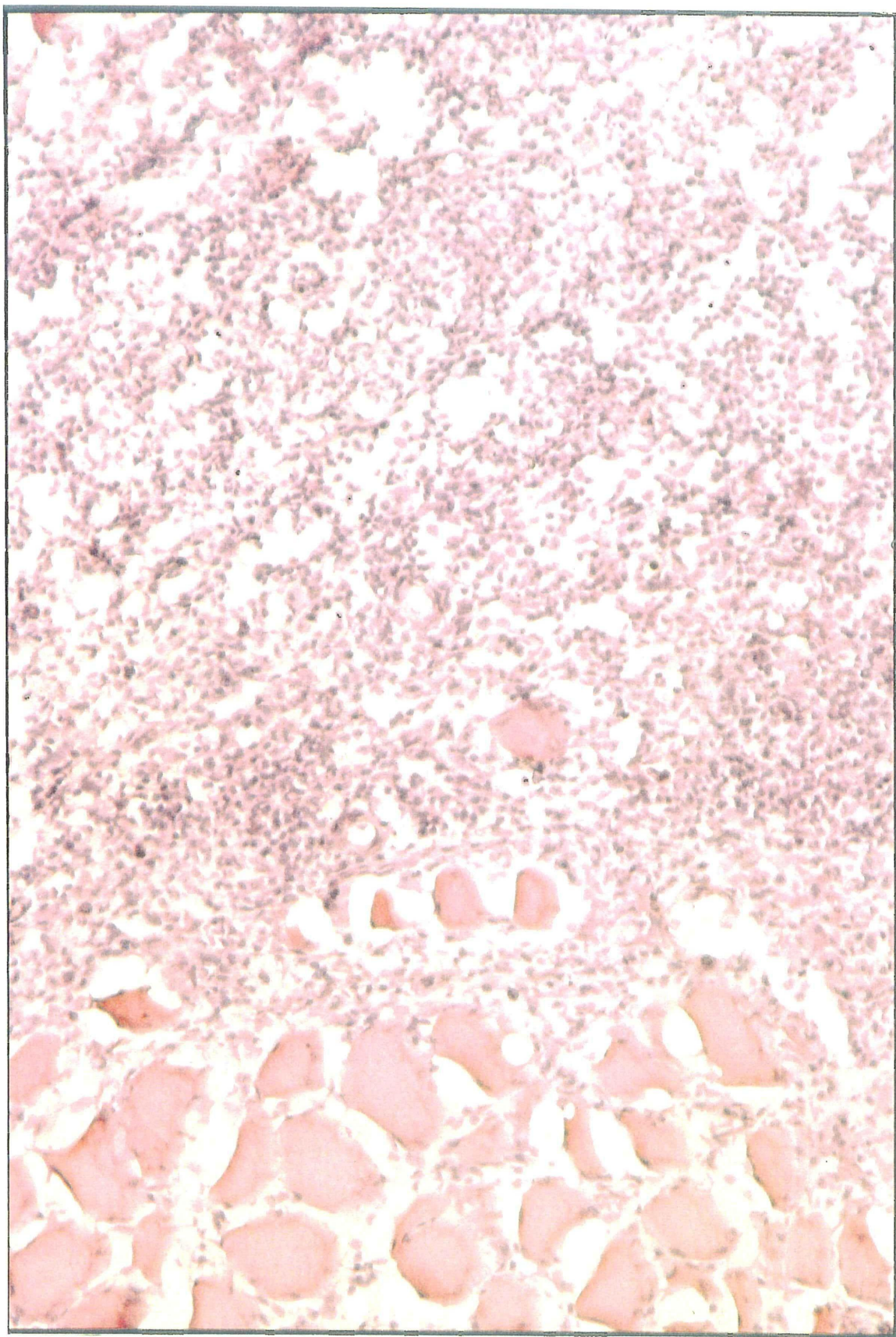
(β -galactosidase 染色 + ヘマトキシリン・エオジン染色)

左：塩酸ブピバカイン投与後2日目にDOGS/DNA複合体を投与し7日目の筋組織像

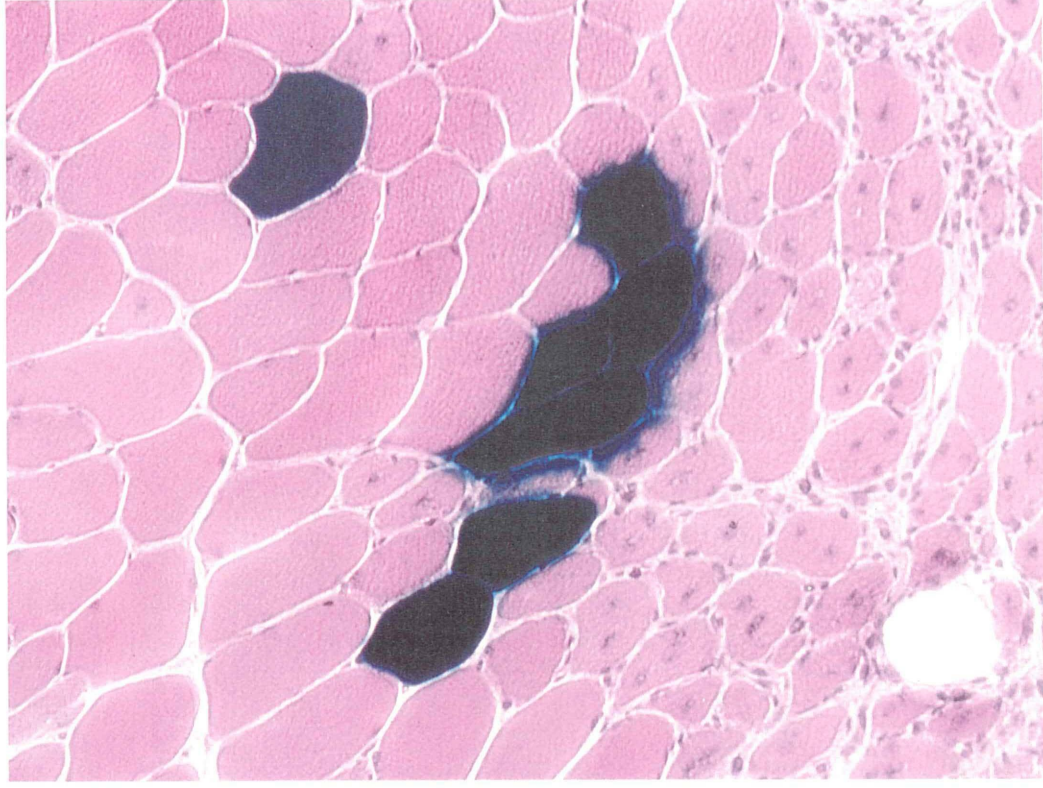
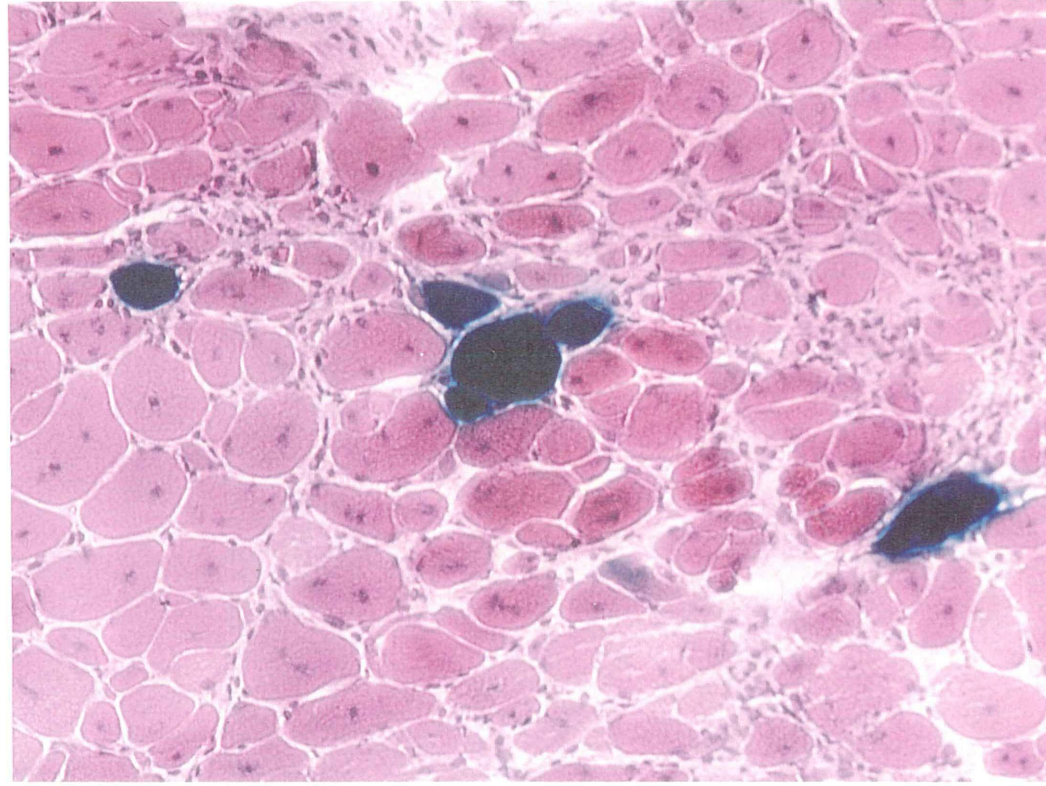
右：塩酸ブピバカイン投与後9日目の筋組織像 (コントロール)



図II-10 in vivo遺伝子導入でのβ-galactosidase陽性筋線維の筋線維直径分布



図II-11 前処置なしにDOGS/DNA複合体を投与し7日目の筋組織像
ヘマトキシリン・エオジン染色



図II-12 カルジオトキシシン前処置後9日目にDOGS/DNA複合体を投与し
7日目の筋組織像 (左)

右: 25% sucrose 前処置15分後にpCAGGSLacZ筋注し, 7日目の筋組織像
β-galactosidases 染色+ヘマトキシリン・エオジン染色

終 章

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の問題点と
将来の展望

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を将来の目的として、アデノウイルス・ベクターを用いて骨格筋細胞への効率の高い遺伝子導入法を確立した。しかし、臨床への応用までには、解決すべき問題が数多く残っている。今後、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究はどのように発展し、DMDに対する遺伝子治療に結び付いていくのであろうか。筋芽細胞注入移植と遺伝子治療の2つの方向から考えてみたい。

1. 筋芽細胞注入移植

筋芽細胞注入移植については、*in vitro*で筋芽細胞に遺伝子を導入する技術はすでに確立されている。そのため、いかに増殖性の高い筋芽細胞を得るかということが、最大の問題点となる。また、供給源として、胎児筋を用いるのか、成熟筋を用いるのかも問題となる。前者の場合には、倫理的な問題があり、後者の場合には、骨格筋の初代培養が困難であることから、純度の高い筋芽細胞を得るためには、FACS cell sortingやクローン培養などの手技が必要となる。また、分離された筋芽細胞を形質転換すると、高い増殖能を持つようになると考えられるが、逆に移植後に腫瘍を形成する危険性が出てくる。したがって、幹細胞のような高い増殖能を持った筋芽細胞の樹立が望まれる。

遺伝子導入技術については、現在ではレトロウイルス・ベクターが用いられているが、今後、アデノ随伴ウイルスのように染色体の決まった位置に導入が可能なベクターも検討されると考えられる。

また、成熟した筋線維は主要組織適合性複合体を発現しないとされるが、筋芽細胞はリンホカインの刺激により、class I抗原を発現し、抗原提示細胞となりうるとされている (Hohlfeld R et al. 1994)。したがって、組織適合抗原の合った筋芽細胞を用いるか、放射線照射や免疫抑制剤 (Cyclosporin A, Cyclophosphamide) などを組み合わせる必要がある。筋芽細胞注入移植

を行うためには、recipient側の筋細胞も幼弱であるか、成熟筋では再生状態が必要ではないかとされており、DMD患児に対し、どの時期・年齢に、どのような条件で筋芽細胞注入移植を行うべきかは、今後の課題である。

DMD患者骨格筋から筋芽細胞を取り出し、ジストロフィン遺伝子を導入し、患者に移植を行えば、筋芽細胞の供給源と免疫学的拒絶反応の問題点は解決が可能である。増殖力に富む線維芽細胞に筋分化制御因子であるMyoDファミリー遺伝子を過剰発現させることにより、筋芽細胞に変換できることが報告されており (Davis RL et al. 1987) , 応用が期待される。

確かに、筋芽細胞注入移植は全身的な治療への応用は困難で局所的な治療ではあるが、一部の骨格筋でも機能が回復したり、進行が遅くなれば患者にとって福音であり、将来の希望につながると考えられる。さらに、一時的な発現であっても、安全で、効率が高く、反復可能であれば試みる価値はあると考えられる。

2. 遺伝子治療

現在、in vivo遺伝子治療では、アデノウイルス・ベクターが用いられることが多い。アデノウイルス・ベクターの問題点としてウイルス蛋白の抗原性および導入遺伝子 (ジストロフィン：DMDではジストロフィンは欠損しているため、未知の蛋白となる) の抗原性がある。ウイルス蛋白の抗原性による免疫反応については、ウイルス蛋白を作らない従来のE1/E3遺伝子欠損に加えて、E2遺伝子やE4遺伝子を欠損した第2世代のベクター

(Engelhardt JF et al. 1994a, b, Armentato D et al. 1995) が開発されている。また、31種類あるアデノウイルスから抗原決定基の異なるベクターを作成し、それらを組み合わせて、中和抗体の産生を防止する試みがなされている (Kass-Eisler A et al. 1996) 。また、免疫修飾として、FK506 (Vilquin JT et al. 1995b, Lochmuller H et al. 1995, 1996) やCyclophosphamide

(Jooss K et al. 1996) の利用や、特定の抗原に対する免疫抑制を目的として、CTLA4Ig, IL12 (Kay MA et al. 1995, Yang Y et al. 1995b) などとも試みられている。

ジストロフィンの抗原性については、筋芽細胞注入移植やDNAの直接導入で、抗体産生がなかったという報告がなされている (Danko I et al. 1993, Vilquin JT et al. 1995a) 。

アデノウイルス・ベクターには導入遺伝子の長さに制限があり、この実験で使用したベクターでは7.5kbしか挿入できない。したがって、ジストロフィンcDNA全体を挿入することは不可能である。minidystrophinをさらに短くして挿入したり (Clemens PR et al. 1995) , アデノウイルス蛋白の塩基配列の大部分を取り去り、30kb以上の長さの遺伝子を挿入できるように工夫したベクター (Kochanek S et al. 1996) も報告されているが、後者はヘルパーウイルスが必要で、安定性を欠くため大量の調整が困難であり、さらなる改良が必要と考えられる。

また、新しい遺伝子治療の方法として、体細胞での相同組み換え (Arbones ML et al. 1994) や、アンチセンスDNAによる人為的スプライシング (Pramono ZAD et al. 1996) などの利用が考えられている。点突然変異によりstop codonが挿入される遺伝子異常を生じている場合、強制的なスプライシングによりframe shiftを避けて、遺伝子異常を持つエクソンのみをスキップできれば正常に近いジストロフィンを転写・翻訳することが可能である。

おわりに

最近米国NIHでの重篤な免疫不全症であるアデノシンデアミナーゼ欠損症に対してretrovirusを用いた遺伝子導入が成功を納め、遺伝子治療が現実のものとなってきた。DMDを巡ってジストロフィンの発現と機能・DMD

遺伝子の異常の解明遺伝子治療への試みは他の多くの遺伝子疾患の解明および治療の開発への良いモデルとなると考えられる。

謝辞

ここに稿を終えるに臨み、本論文作成にあたり、御教授、御鞭撻を賜った筑波大学臨床医学系神経内科 庄司進一教授に心から感謝いたします。

本研究は数多くの方々の著者に対する御指導と御援助なくしてはなしえなかったものです。特に著者の研究に対し、終始たゆまぬ御指導と御鞭撻を賜った国立精神・神経センター神経研究所遺伝子工学研究部5階遺伝子治療研究室室長 武田伸一先生に深く感謝の意を表します。また、共同研究者として終始御指導、御助力を賜った国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部 萩原康子先生、国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部 斎藤陽子先生、埜中征哉先生、国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 宮沢仁志先生、今田美恵先生、竹内保先生、山元弘先生、東京大学医科学研究所遺伝子解析施設 佐藤友美先生、鐘ヶ江裕美先生、斎藤泉助教授に心から深謝いたします。

また、本実験について御指導、御鞭撻を賜った国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第1部 荒畑喜一先生、国立精神・神経センター神経研究所遺伝子工学研究部 鍋島陽一先生、国立精神・神経センター神経研究所 小沢鉄二郎先生、国立精神・神経センター 杉田秀夫先生に深謝いたします。

引用文献

Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, Wolff JA and Davies KE (1991) Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352:815-818.

Acsadi G, Jani A, Massie B, Simoneau M, Holland P, Blaschuk K and Karpati G (1994) A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum.Mol.Genet.* 3:579-584.

Acsadi G, Lochmuller H, Jani A, Huard J, Massie B, Prescott S, Simoneau M, Petrof BJ and Karpati G (1996) Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 7:129-140.

Ahn AH and Kunkel LM (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* 3:283-291.

Akiyama C, Kobayashi S and Nonaka I. (1992) Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride- induced myonecrosis. *Acta. Neuropathol.*83:584-589.

Alameddine HS, Quantin B, Cartaud A, Dehaupas M, Mandel JL and Fardeau M (1994) Expression of a recombinant dystrophin in mdx mice using adenovirus vector. *Neuromusc. Disord.* 4:193-203.

Arbones ML, Austin HA, Capon DJ and Greenburg G (1994) Gene targeting in normal somatic cells : inactivation of the interferon-gamma receptor in myoblasts. *Nature Genet.*6:90-97.

Armentato D, Sookdeo CC, Hehir KM, Gregory RJ, George JAST, Prince GA, Wadsworth SC and Smith AE (1995) Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. *Hum. Gene*

Ther.6:1343-1353.

Barr D, Tubb J, Ferguson D, Scaria A, Lieber A, Wilson C, Perkins J and Kay MA (1995) Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: Comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains. *Gene Therapy*. 2:151-155.

Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH and Davies KE (1992) Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum.Mol.Genet*.1:103-109.

Blau HM, Chiu C.-P and Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32:1171-1180.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E and Arnold HH (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD 1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* 8:701-709.

Breakefield XO (1993) Gene delivery into the brain using virus vectors. *Nature Genet*.3:187-189.

Brenman JE, Chao DS, Aldape K, Xia H, and Brecht DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Haung F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, and Brecht DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein

PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

Bulfield G, Siller WG, Wright PAL and Moore KJ (1984)

X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:1189-1192.

Byers TJ, Lidov HG and Kunkel LM (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genet.* 4:77-81.

Chao DS, Gorospe JRM, Brenman JE, Rafael JA, Peters MF, Froehner SC, Hoffman EP, Chamberlain JS, and Brecht DS (1996) Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J.Exp.Med* 184:609-618.

Chen C and Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell.Biol.*7:2745-2752.

Clemens PR, Krause TL, Chan S, Korb KE, Graham FL and Caskey CT (1995) Recombinant truncated dystrophin minigenes:construction, expression, and adenoviral delivery. *Hum. Gene Ther.*6:1477-1485.

Cox GA, Cole NM, Matsumura K, Phelps SF, Hauschka SD, Campbell KP, Faulkner JA and Chamberlain JS (1993) Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature.*364:725-729.

Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zahng WW, Sarvetnick N and Verma IM (1995) Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene : Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.*92:1401-1405.

Danko I, Fritz JD, Lantendresse JS, Herwijer H, Schultz E and Wolff JA (1993) Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Hum.Mol.Genet.*2:2055-2061.

Davis HL, Whalen RG and Demencix BA (1993a) Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: Factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum. Gene Ther.* 4:151-159.

Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J and Whalen RG (1993b) Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* 4:733-740.

Davis RL, Weintraub H and Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblast to myoblasts. *Cell* 51:987-1000.

D'Souza VN, Man NT, Morris GE, Karges W, Pillers D-AM, and Ray PN (1995) A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 4:837-842.

Dunckley MG, Wells DJ, Walsh FS and Dickson G (1993) Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 2:717-723.

Engelhardt JF, Ye X, Doranz B and Wilson JM (1994a) Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:6196-6200.

Engelhardt JF, Litzky L and Wilson JM (1994b) Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a. *Hum. Gene Ther.* 5:1217-1229.

England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzyzcka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB and Davies JE (1990) Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahn SD, Graver MG and Campbell KP

(1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.

Ervasti JM, Roberds SL, Anderson RD, Sharp NJ, Kornegay JN and Campbell KP (1994) α -Dystroglycan deficiency correlates with elevated serum creatine kinase and decreased muscle contraction tension in golden retriever muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 350:173-176.

Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT 3rd, Griggs RC, Brooke MH, Miller JP, Robinson J, King-W, Signore L, Pandya S, Schierbecker J and Wilson B (1991) Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41:1874-1877.

Finiels F, Ribotta MG, Barkats M, Samolyk ML, Robert JJ, Privat A, Revah F and Mallet J (1995) Specific and efficient gene transfer strategy offers new potentialities for the treatment of motor neuron diseases. *Neuroreport* 6:2473-2478.

Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977) Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36:59-72.

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ and Wilson JM (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet.* 6:335-341.

Hashimoto M, Aruga J, Hosoya Y, Kanegae Y, Saito I and Mikoshiba K (1996) A neural cell-type-specific expression system using recombinant adenovirus vectors. *Hum.Gene Ther.* 7:149-158.

Hohlfeld R and Engel AG (1994) The immunobiology of muscle. *Immunology Today* 15:269-274.

Innes CL, Smith PB, Langenbach R, Tindall KR and Boone LA (1990) Cationic liposomes (lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. *J.Virol.*64:957-961.

Jooss K, Yang Y and Wilson JM (1996) Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Hum. Gene Ther.* 7:1555-1566.

Juillard V, Villefroy P, Godfrin D, Pavirani A, Venet A and Guillet JG (1995) Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur.J.Immunol.* 25:3467-3473.

Kanegae Y, Makimura M and Saito I (1994) A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn.J.Med.Sci.Biol.*, 47:157-166.

Kanegae Y, Lee Gwang, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakai T, Sugano S and Saito I (1995) Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nuc.Acids Res.*23:3816-3821.

Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M, Watters V, Abrahamowicz M, Duff C and Worton RG (1993) Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.*34:8-17.

Kass-Eisler A, Leinward L, Gall J, Bloom B and Falck-Pedersen E (1996) Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.*3:154-162.

Kay MA, Holterman AX, Meuse L, Gown A, Ochs HD, Linsley PS and Wilson CB (1995) Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression

in mice following CTLA4Ig administration. *Nature Genet.*11:191-197.

Kochanek S, Clements P, Mitani K, Chen HH, Chan S and Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and β -galactosidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:5731-5736.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.

Kuo H, Ingram DK, Crystal RG and Mastrangeli A (1995) Retrograde transfer of replication deficient recombinant adenovirus vector in the central nervous system for tracing studies. *Brain Res.* 705:31-38.

Lee CC, Pons F, Jones PG, Bies RD, Schlang AM, Leger JJ, Caskey CT (1993) Mdx transgenic mouse : Restoration of recombinant dystrophin to the dystrophic muscle. *Hum.Gene Ther.*4:273-281.

Lidov HGW (1993) The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 54:167-187.

Lidov HGW, Selig S and Kunkel LM (1995) Dp140 : a novel 140kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum.Mol.Genet.*4:329-335.

Lochmuller H, Petrof BJ, Allen C, Prescott S, Massie B and Karpatis G (1995) Immunosuppression by FK506 markedly prolongs expression of adenovirus-delivered transgene in skeletal muscles of adult dystrophic [mdx] mice. *Biochem.Biophys.Res.Com.*213,569-574.

Lochmuller H, Petrof BJ, Pari G, Larochelle N, Dodelet V, Wang Q, Allen C, Prescott S, Massie B, Nalbantoglu J and Karpatis G (1996) 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 Therapy* 3:706-716.

Love DR, Byth BC, Tinsley JM, Blake DJ and Davies KE (1993) Dystrophin and dystrophin-related proteins : a review of protein and RNA studies. *Neuromusc.Disord.*3:5-21.

Malone RW, Felgner PL and Verma IM (1989) Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*86:6077-6081.

Masuda T, Fujimaki N, Ozawa E and Ishikawa H (1992) Confocal laser microscopy of dystrophin localization in guinea pig skeletal muscle fibers. *J.Cell.Biol.*119:543-548.

Matloubian M, Concepcion RJ and Ahmec R (1994) CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J.Virol.*68:8056-8063.

Matsumura,K, Tome FMS, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan JC, Fardeau M and Campbell KP (1992a) Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature.*359:320-322.

Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD and Campbell KP (1992b) Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 360:588-591.

Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C and Saito I (1996) Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl.Acad.Sci.USA.* 93:1320-1324.

Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J (1991) Efficient selection for

high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-200.

Ozawa E, Yoshida Y, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y and Noguchi S. (1995) Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum.Mol.Genet.* 4:1711-1716.

Page S, Miller JB, DiMario JX, Hager EJ, Moser A and Stockdale FE. (1992) Developmentally regulated expression of three slow isoforms of myosin heavy chain: Diversity among the first fibers to form in avian muscle. *Dev. Biol.* 154:118-128.

Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP and Kunkel LM. (1989) Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337:176-179.

Pramono ZAD, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S and Matsuo M (1996) 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.Comm.* 226:445-449.

Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S and Mandel JL (1992) Adenovirus as expression vector in muscle cells in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 89:2581-2584.

Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrantz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaudet M and Kahn A (1993) Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 361:647-650.

Rapaport D, Greenberg DS, Tal M, Yaffe D and Nudel U (1993) Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is

associated with the cell membrane. FEBS let.328:197-202.

Rawle FC, Knowles BB, Ricciardi RP, Brahmacheri V, Duerksen H, Hughes P, Wold WS and Gooding LR (1991) Specificity of the mouse cytotoxic T lymphocyte response to adenovirus 5. E1A is immunodominant in H-2b, but not in H-2d or H-2k mice. J.Immunol. 146:3977-3984.

Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stradford-Perricaudet, Perricaudet M, Guggino WB, Pavirani A, Lecocq J-P and Crystal RG (1992) In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. Cell 68:143-155.

Rosenthal N (1987) Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. Methods Enzymol. 152:704-720.

Saito I, Oya Y, Yamamoto K, Yuasa T and Shimojo H (1985) Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase hepatitis B virus DNA near the right end of its genome. J.Virol. 54:711-719.

Saito Y and Nonaka. (1994) Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. Acta.Neuropathol. 88:252-257.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG and Barnard PJ (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science 244:1578-1580.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leterovich JM, Sladky JT and Kelly AM (1991) The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. Nature 352:536-539.

Stradford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M and Briand P(1992) Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart.

J.Clin.Invest.90:626-630.

Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M and Arai N (1988) SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Mol.Cell.Biol.8:466-472.

Takeda S, North DL, Lakich MM, Russell SD and Whalen RG (1992) A possible regulatory role for conserved promoter motifs in an adult-specific muscle myosin gene from mouse. J.Biol.Chem.267:16957-16967.

Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, Edwards YH and Davies KE (1992) Primary structure of dystrophin-related protein. Nature 360:591-593.

Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA and Davies KE (1994) Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:8307-8313.

Tissenbaum HA and Parry DJ (1991) The effect of partial denervation of tibialis anterior (TA) muscle on the number and sizes of motoneurons in TA motornucleus of normal and dystrophic (C57BLdy2j/dy2j) mice. Can.J.Physiol.Pharmacol. 69:1769-1773.

Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E and Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. Nature Med. 2:545-550.

Trivedi RA and Dickson G (1995) Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts. J.Neurochem.

64:2230-2238.

Vilquin JT, Wagner E, Kinoshita I, Roy R and Tremblay JP (1995a) Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J.Cell Biol.* 131:975-988.

Vilquin JT, Guerette B, Kinoshita I, Roy B, Goulet M, Gravel C, Roy R and Tremblay JP (1995b) FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum.Gene Ther.*6:1391-1401.

Vincent N, Ragot T, Gilgenkrantz H, Couton D, Chafey P, Gregoire A, Briand P, Kaplan JC, Kahn A and Perricaudet M (1993) Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nature Genet.*5:130-134.

Wells DJ, Wells KE, Asante EA, Turner G, Sunada Y, Campbell KP, Walsh FS and Dickson G (1995) Expression of human full-length and minidystrophin in transgenic mdx mice : implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Hum.Mol.Genet.*4:1245-1250.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA and Nemerow GR (1993) Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-319.

Worton R (1995) Muscular dystrophies:diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 270:755-756.

Yaffe D and Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscles. *Nature (Lond.)* 270:725-727.

Yamamoto H, Takata M and Fujimoto S. The role of L3T4-positive T

lymphocytes in the generation of anti-tumor immunity in the mouse. (1987)
Jpn.J.Cancer Res. (Gann) 78:176-184

Yanagihara I, Inui K, Dickson G, Turner G, Piper T, Kaneda Y and Okada S (1996) Expression of full-length human dystrophin cDNA in mdx mouse muscle by HVJ-liposome injection. *Gene Therapy* 3:549-553.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E and Wilson JM (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 91:4407-4411.

Yang Y, Xiang Z, Ertl HCJ and Wilson JM. (1995a) Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon γ is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 92:7257-7261.

Yang Y, Trinchieri G and Wilson JM. (1995b) Recombinant IL-12 prevents formation of blocking IgG antibodies to recombinant adenovirus and allows repeated gene therapy to mouse lung. *Nature Med.* 1:890-893.

Yang Y, Li Q, Ertl HCJ and Wilson JM. (1995c) Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J.Virol.* 69:2004-2015.

Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HCJ and Wilson JM (1996) Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther.* 3:137-144.

Yoshida M and Ozawa E (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem.* 108:748-752.

Yoshida S, Fijisawa-Sehara A, Taki T, Arai K and Nabeshima Y (1996) Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts. *J.Cell Biol.* 132:181-193.

Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE and Welsh MJ (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75:207-216.

Zhu N, Liggitt D, Liu Y and Debs R (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261:209-211.

荒畑喜一, 杉田秀夫 ジストロフィン pp72-99 神経科学レビュー4 (1990) 医学書院

江橋節郎 筋ジストロフィーはここまでわかった 厚生省研究班20年の歩み (1990) 筋ジストロフィー症研究連絡協議会編集 医学書院

小沢 二郎 ジストロフィン (1992) 学会出版センター

埜中征哉 臨床のための筋病理 第2版 (1993) 日本醫事新報社

柳原格, 藤井尚子, 酒井則夫ら (1993) リポソーム法を用いたmdx mouseへのDystrophin(cDNA)遺伝子導入の試み 臨床神経33:1356.

武田伸一 筋発生の遺伝子制御 Annual Review 神経 (1994) 中外医学社