

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 アデノ随伴ウイルスベクターを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに
対する遺伝子治療法の開発

指導教官 辻 省次教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

吉村 まどか

序論

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、筋ジストロフィーのなかで最も頻度が高く、また重篤な症状を示す致死的な疾患である。原因遺伝子は X 染色体上短腕 21 のジストロフィン遺伝子で、遺伝子産物であるジストロフィンが完全に欠損している。ジストロフィンは細胞骨格蛋白質として形質膜に存在し、アクチン (コスタメアの F-actin) と基底膜をつなぐことにより、筋収縮の際に加わる機械的ストレスから筋形質膜を保護し安定化させ、膜の破綻を防ぐ役割を果たしている。また、細胞膜にジストロフィン結合蛋白質 (dystrophin-associated proteins; DAP) と結合してジストロフィン-糖蛋白複合体 (dystrophin-glycoprotein complex; DGC) を形成し、DAP の発現を安定させて機械的安定性を強めると共に、DAP を介したシグナル伝達などの生体機能を安定させる作用がある。筋ジストロフィーの病態は、ジストロフィンの欠損による筋の機械的な脆弱性に起因するのみならず、二次的な DAP の減少による生体機能障害によっても引き起こされると考えられている。

現在 DMD の根治療法は見いだされていないが、実現可能な治療の候補として遺伝子治療がある。本研究では、骨格筋への導入に有利とされるアデノ随伴ウイルス (AAV)ベクターを用いて、DMD への遺伝子治療の可能性を探った。

AAV ベクターの導入遺伝子サイズは 4.9 kb 以下であり、14 kb のジストロフィン cDNA を挿入できない。超軽症の Becker 型筋ジストロフィー患者からクローニングされた 6.4 kb の mini-dystrophin 遺伝子を参考に、ジストロフィン本来の 3 重ヘリックス構造を再構成した上で更に短縮した micro-dystrophin を作成し、トランスジェニック (Tg) マウスの手法で検定した。cDNA が 4.9 kb の micro-dystrophin CS1 を CAG プロモーター (cytomegalovirus enhancer + chicken b-actin promoter, rabbit b-globin poly A signal) によって発現させた場合、DMD モデルマウスである、ジストロフィン欠損 *mdx* マウスの表現型はほぼ正常化する。

そこで本研究では、micro-dystrophin CS1 を元に蛋白質としての機能を保存した 3.8 kb の Δ CS1 を作成し、2 型 AAV (AAV2) ベクターにより筋組織へ導入した。この際、組織非特異的な導入による免疫応答の惹起を防ぐため、筋特異的 muscle creatine kinase (MCK) プロモーターを用いて発現させた。 Δ CS1 導入筋で治療効果を得たため、発現量と機能改善について検討した。

また、特に幼若齢での導入効率を増すため、異なる血清型の AAV ベクターを検討した。現在ベクターとして利用されている AAV のうち、AAV2 と DNA の相同性や tropism が大きく異なる 5 型 AAV (AAV5) に注目し、骨格筋での導入遺伝子発現を、AAV2 ベクターでの発現が少なかった幼若マウスを中心に検討した。血清型の変更による発現量の変化は、これまでは分泌蛋白質や色素マーカーなどを用いて検討されており、細胞骨格蛋白質を発現させた場合の有効性は未知である。また、実験結果を通じ、DMD への遺伝子治療の臨床応用における今後の方向性を考察した。

方法

Tg マウスを用いた検定で十分な治療効果を持った 4.9 kb の短縮型ジストロフィン CS1 から、5', 3' 非翻訳領域と alternative splicing を受ける exon 71-79 を削除した、3.7 kb の遺伝子 Δ CS1 を作成した。短縮型 MCK プロモーターの下流に連結し、 Δ CS1 を発現する AAV2 ベクターとした。作成したウイルスを、ジストロフィンを完全に欠損した *mdx* マウス前脛骨筋 (TA) に導入し発現させた。導入の時期として、激しい筋変性の開始前である 10 日齢、および変性再生の過程である 5 週齢の二点を選んだ。発現解析は 8 週後および 24 週後に行い、組織所見、筋重量、筋張力、 Δ CS1 蛋白定量、および DAP の回復を観察した。検討に際し、同齢の C57BL/10 (B10) マウスを正常コントロール、ベクターを導入したマウスの対側 (非導入側) TA を未治療コントロールとした。

また、特に幼若齢での発現を AAV2 ベクターと比較する目的で、*LacZ* および Δ CS1 cDNA を発現する AAV2, AAV5 ベクターを作成し、*LacZ* を 3, 5, 10 日齢および 5

週齢、 Δ CS1 を 10 日日齢および 5 週齢に導入した。

結果

1. 5 週齢 *mdx* マウス骨格筋への Δ CS1 導入

5 週齢 *mdx* マウスへ導入した場合、免疫組織化学染色により検出した Δ CS1 陽性線維数は、8 週後では $39.2 \pm 15.8\%$ 、24 週後 $51.5 \pm 17.3\%$ であり、導入筋のウエスタンブロット解析による 24 週後の Δ CS1 蛋白定量では、正常 B10 マウスのジストロフィンと比較し $39.8 \pm 7.0\%$ の発現を得た。24 週後では、筋の変性再生の指標となる中心核線維の割合は減少した。筋病変を表す筋重量、および機能を示す筋張力は正常 B10 マウス同様に改善していた。*mdx* マウスは正常マウスに比べ、再生線維を反映し筋線維面積が小さくなる。 Δ CS1 陽性線維について筋線維面積を測定したところ、平均面積は正常 B10 マウスレベルに回復した。また、 Δ CS1 陽性線維では DAP が回復しており、DGC を形成するジストロフィンの機能も維持していることが示された。ジストロフィンの代償的な機能を果たすと考えられ、*mdx* 筋で過剰発現しているユートロフィンの発現は、 Δ CS1 陽性線維ではほとんど見られなかった。

2. 10 日日齢 *mdx* マウス骨格筋への Δ CS1 導入

10 日日齢の導入では、陽性線維の比率は 5 週齢での導入より少なく 20%程度であった。筋重量の改善は正常に及ばなかったが、筋張力は正常 B10 マウス同様に至るまで改善していた。 Δ CS1 陽性線維の中心核数は陰性線維と比較すると著しく減少し、5 週齢導入後の Δ CS1 陽性線維よりも少なかった。筋線維のレベルでは、 Δ CS1 陽性線維の筋線維面積は正常マウスより明らかに大きくなっており、筋線維の肥大が機能改善に奏功したと考えた。 Δ CS1 導入 TA での重量と筋張力の間には正の相関があったことも、肥大が機能改善に奏功した傍証と推察した。

3. 5 型 AAV ベクターを用いた場合の発現変化

AAV5 ベクターを用いた場合、*LacZ* 遺伝子導入では 10 日日齢以下の幼若 *mdx* マウスでの β -gal 発現効率が、AAV2 を用いた場合より有意に上昇した。 Δ CS1 を発現させた場合では、AAV2 ベクター使用時と比較して 10 日日齢 *mdx* マウスでの陽性線維数が有意に上昇した。

考察

AAV ベクターを用いた短縮型ジストロフィンの後天的な導入により、*mdx* マウスの筋変性発症前、変性過程いずれの時期でも治療効果を認めた。5 週齢での導入では、半数程度の筋線維に Δ CS1 の発現が得られ、発症後の治療によって機能および病態が回復することを示した。言い換えれば、micro-dystrophin Δ CS1 が、ジストロフィンの主要な機能である機械的な安定性をもたらし、かつ DGC と複合体を形成

する能力があることによると推察される。また発症前である 10 日齢の導入では、20% 程度の筋線維への発現でも機能的な改善が見られ、筋線維の肥大が機能改善に貢献していることが示唆された。

比較的低い発現率で治療効果が得られた点は、臨床応用に希望をもたらす。今まで Tg マウスを用いた導入遺伝子の機能検定、治療研究は多数行われてきたが、その遺伝子を後天的に導入した場合の効果は不明だった。我々の結果は、強力な CAG プロモーターで発現させた Tg-*mdx* マウスの結果が、出生後のウイルスベクターによる導入に置き換えた場合でも再現できる例を示した。またこの研究は、発現量と機能の対応を示した点から、ジストロフィンの発現を目的とする遺伝子治療、再生移植治療の到達点の手がかりにもなり得る。

少量のΔCS1 発現時に観察された筋線維肥大は、DMD 筋でこれまで観察された、膜機能が残存している筋線維の肥大と対応する。ジストロフィン欠損筋においては、筋線維肥大をもたらす分子の発現による治療効果があることが、不完全ながら示されていた。しかし実際には、ジストロフィンを欠いた肥大線維は膜にかかる物理的ストレスに耐えられず、いずれは壊死に陥ってゆくとされる。筋ジストロフィーの治療においては、筋肥大を目指す治療と同時に、細胞骨格蛋白質の発現と並列させることで両者の有効性が増す可能性がある。

DMD への臨床応用に展開するために、さらに考慮を要するいくつかの点がある。筋の大きさ、寿命の歴然たる相違が存在するため、ΔCS1 が人間に応用するに足る機能を持つか否か検討する必要はある。マウス TA の大きさは長径で 1cm 未満であり、人骨格筋への投与方法、投与経路など技術面も考慮せねばならない。また、*mdx* マウスは DMD より軽症で、成熟後は進行が緩徐である点は人と異なる。本研究では発症前および進行中での評価を行い、有効性を認めたが、人での筋変性の進行を熟慮した上、至適な投与時期を設定する必要がある。DMD のモデル犬として、Canine X-linked muscular dystrophy があり、進行性でマウスより症状が重篤である。このような新たな用いての検討も役立つであろう。また、delivery system の開発をはかり、効率よく筋組織へ遺伝子導入する方法も考える必要がある。

血清型による発現効率の変化は、細胞表面に分布するレセプターなど、細胞内への取り込みに関与する因子の発現と関連づけて説明されることが多い。しかし、AAV ベクターの場合、人を含む生体内で、発現と対応づけられる分子レベルの検討は十分でない。最近、DNA array を用いた検討が、AAV5 ベクターの感染効率について検討された。ウイルスベクター一般の使用について具体的な投与指針となりうる、包括的な検討も今後の課題と考えられる。