The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	筋ジストロフィーモデル(mdx)マウスに対するジストロフィン遺伝子導入
Author(s)	柳原, 格
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39889
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　柳原　格（やなぎはら　いたる）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　12411　号

学位授与年月日　平成8年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学研究科内科系専攻

学位論文名　**筋ジストロフィーモデル（mdx）マウスに対するジストロフィン遺伝子導入**

論文審査委員　（主査）
教　授　岡田伸太郎

（副査）
教　授　白倉　良太　　教　授　柳原　武彦

論文内容の要旨

［背景，目的］

デュシャンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は，男子出生4,500人に1人と比較的頻度の高い伴性劣性遺伝病である。多くの患者は，20歳前後に呼吸不全や，心不全のため死亡する。DMD患者では筋膜の裏打ち蛋白のジストロフィンが欠損している。本疾患の原因遺伝子（ジストロフィン遺伝子）は全長2300kb，そのcDNAだけでも14kbに及ぶ巨大遺伝子ジストロフィンである。近年，DMDに対する治療として大きく筋芽細胞移植，遺伝子治療の2つの方法が模索されている。筋芽細胞移植は，実際の患者に行われたが治療レベルに達してはいない。遺伝子治療は動物実験における遺伝子導入の効率がまだまだ低く効率よい導入方法の開発が待たれている。我々は，HVJ（hemagglutinating virus of japan）リポソーム法を用いて筋ジストロフィーモデルマウス（mdx）で高効率に全長ヒトジストロフィン遺伝子を発現することに成功したので報告する。

［方法］

ベクターはβ－galactosidase遺伝子をchicken－actin promoter下流に挿入したpAct－lacZ（細胞生体工学センター金田安史助教授より供与），全長ヒトジストロフィン遺伝子をRous sarcoma virus promoter，mouse leukemia virus promoter，human dystrophin promoter，下流に挿入したpRSV－Dy，pDMD8，pDyDy（G．Dickson教授より供与）を用いた。筋芽細胞は，mdxマウス新生児三角筋より採取し，5％fetal calf serum，2％ chick embryo extractを加えたDulbecco's modified Eagle's medium中で培養した。リポソームは，フォスファチジルセリン，フォスファチジルコリン，コレステロールより調整し，核移行蛋白質であるHMG1（high mobility group 1）と結合させたプラスミドを封入した後，UV照射により不活化したZ－strain HVJと混合HVJリポソームを作製した。

in vitroの実験は，1X10^6個のmdx筋芽細胞に対して80μgのプラスミドより作製したHVJリポソームを用いて反応を行い3日後にβ－galactosidase染色を行った。またベクターpRSV－Dyを導入7日後に筋管形成を確認後，ジストロフィン染色を行った。

in vivoの実験は，12－18週齢の軽くエーテル麻酔したmdxマウス大腿四頭筋数カ所に5μg或いは20μgのプラスミドを含んだHVJリポソームを26ゲージ注射針にて直接注入しリポソーム注入後3，5，7日後に凍結切片を作製した。

遺伝子の発現は，ジストロフィン蛋白のN端，ロッドドメイン，C端に対するモノクローナル抗体を用いてジストロフィン染色を行い確認した。

［結果］

in vitro 実験の結果，培養筋芽細胞へのβ－galactosidase 遺伝子導入効率は，50－80％であり従来の報告と比較しても非常に効率の良いものであった。また，pRSV－Dy ベクター導入の結果ジストロフィン遺伝子発現は，筋管形成筋線維においてのみ認められた。in vivo 実験の結果プラスミドとして20μg を含んだＨＶＪリポソーム導入３日後のジストロフィン発現線維の割合は，１切片あたり最大で26％，また筋線維内にリング様に染まるジストロフィン陽性線維の割合は16％であった。これらはいずれもジストロフィンのN端，ロッドドメイン，C端を認識する抗体全てで陽性であったことから全長のジストロフィンが発現しているものと思われた。他の２つのベクターpDMD８，pDyDy を導入した場合には，いずれも３－５％の筋線維でジストロフィン陽性となり，ジストロフィン発現効率は pRSV－Dy が最も高かった。さらに核移行蛋白であるＨＭＧ１を除いて発現実験を行ったが，その場合はジストロフィンの発現は３つの発現ベクター共に全く認められなかった。共焦点レーザー顕微鏡によるジストロフィンの mdx 筋線維におけるリング様の発現は筋線維中心部に高かったものの筋膜に向かって連続的に発現していることが解った。

［考察］

in vitro のβ－galactosidase 発現実験が高効率であったことからＨＶＪリポソーム法は，ジストロフィンの遺伝子導入に利用できる可能性を示唆した。また in vitro でジストロフィン導入後筋管を形成した筋線維でのみジストロフィンを発現したことは，正常筋の成熟過程においても筋管が形成された後にジストロフィンが発現されてくることと一致する。

ジストロフィンはその関連蛋白質と共に筋膜の裏打ち蛋白として存在する。in vivo の実験系で認められたリング様のジストロフィンの発現は，過剰発現による筋膜への輸送障害や，関連蛋白質との結合がなされず分布の異常を起こした可能性が考えられた。今回の実験ではＨＶＪリポソームを注入した一部の筋でのみジストロフィンが発現した。発現範囲の拡大をするためには，たとえば経血管的な遺伝子導入法を用いてジストロフィンの導入を行っていきたい。また筋ジストロフィーは四肢骨格筋，心筋，呼吸筋が主な罹患臓器である。今後，骨格筋のみならず心筋や呼吸筋でのジストロフィンの発現を目指したい。本法は，一過性の発現系であるがさらに長期間の発現を開発することが必要である。

論文審査の結果の要旨

本研究は，まだ治療法のない致死的な筋疾患であるデュシャンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）に対する新たな治療法の開発を行う上で重要と考える。

ジストロフィンの遺伝子導入による治療は現在世界中で精力的に行われつつあるが，遺伝子が巨大であるために全長のジストロフィン遺伝子を発現させることが非常に困難である。ＨＶＪリポソームを用いたマーカーlacZ 遺伝子導入では培養 mdx マウス筋芽細胞で最大50－80％で x－gal 染色陽性となり発現効率は非常に高かった。次いでジストロフィン遺伝子の in vitro 筋芽細胞内の発現及び in vivo での mdx 筋内にも発現を認めた。in vivo での発現は最大で26％の筋線維にジストロフィンの発現を認め，全長のジストロフィンを発現させたものとしては非常に効率の良い結果を得た。ＨＶＪ－リポソームを細胞骨格であるジストロフィンの発現に応用した報告は本研究が始めてであり，免疫染色を用いて全長のジストロフィンの発現を確認できたことは本法が巨大遺伝子発現を可能とすることを証明したものである。遺伝子治療の新しい方向付けを示したものとして本研究は学位に価すると思われる。