

2-6 疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター
青木 吉嗣

総括研究報告

1. 研究目的

希少神経・筋難病の Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、全身の骨格筋と心筋のみならず、末梢および中枢神経系も障害される疾患であり、全身的な治療法を開発することが最も重要である。DMD を対象に、エクソン 53 スキップ薬 (NS-065/NCNP-01) に続く、エクソン 44 スキップ薬 (NS-089/NCNP-02) の開発を、精神・神経疾患研究開発費を財源に整備した NCNP の治験実施基盤を活用し推進した。R3 年度中に NS-089/NCNP-02 の医師主導治験パート 2 の投与と解析は完了し、協力製薬企業による継続試験が進行中である。今後は心筋も治療可能な次世代エクソン・スキップ薬の開発に加えて、ウイルスベクターや、RNA あるいはゲノム編集治療等の遺伝子治療の有効性と安全性を検証し、治験のプロトコルやマニュアルの準備を進めて、社会的、倫理的問題についても十分な検証を進めながら、新規治療モダリティを臨床応用することを目指す。さらに、エクソン・スキップ薬の開発技術を、DMD 以外の遺伝性神経・筋疾患に応用することを目的に、エクソン・スキップのデータベースおよび機械学習モデルに基づいた予測システムである eSkip-Finder を世界で初めて開発のうえ、ウェブ上で公開した (<https://eskip-finder.org/cgi-bin/input.cgi>)。

また、筋前駆細胞への分化誘導法を確立する必要がある尿由来細胞や間葉系幹細胞を用いた幹細胞移植治療ならびに筋ジストロフィーの病態解明に基づく薬物治療についても、これまで研究班で開発したモデル動物を駆使して研究を進め、臨床に展開することを目指し、以下の構成で研究を進めた。

1. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

- エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発 (青木、宮田、越後谷、堀田、岡田、中村、千葉)
- 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立 (林、深田、上住、鈴木)
- 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究 (野口、村松、関、川内、

金川、山田、進藤、森)

- 筋ジストロフィーモデル動物の維持 (保田)
- 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究 (貝谷)

2. 研究組織

主任研究者

青木 吉嗣

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
分担研究者

野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
村松 里衣子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
関 和彦

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
川内 大輔

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
林 晋一郎

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
森 まどか

国立精神・神経医療研究センター病院

鈴木 友子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

上住 聡芳

東京都健康長寿医療センター

深田 宗一郎

大阪大学 大学院薬学研究科

宮田 完二郎

東京大学大学院工学系研究科

稲田 全規

東京農工大学大学院工学研究院

岡田 尚巳

東京大学 医科学研究所

越後谷 祐介

日本大学生物資源科学部

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

山田 崇史

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科

中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター

進藤 英雄

国立国際医療研究センター研究所

千葉 峻太郎

理化学研究所計算科学研究センター

保田 昌彦

実験動物中央研究所

貝谷 久宣

日本筋ジストロフィー協会

3. 研究成果

2021 年度開発費研究班会議を 11 月 27 日～28 日にかけてウェビナーで開催し、参加登録者数は約 250 名であった。さらに、11 月 27 日午前中を中心に、班会議との合同開催として、産官学患の連携を促し希少難病の治療法開発を促進させる取り組みである第 2 回希少疾患カンファレンスを、多数のアカデミアに加えて製薬系企業人、患者会、官からの参加を得て行った。同カンファレンスは、希少神経筋難病の克服に向けて、非臨床・非競合領域での連携を強化する取り組みであると共に、国民との科学・技術対話に対する取り組みでもある。創薬エコシステムや、研究への患者・市民参画等の重要なテーマについて活発な意見交換を行った。

1. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

a. エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発(青木、千葉、横田、堀田、宮田、越後谷、岡田)

- ① mdx52 マウスを対象に Dp140 mRNA を扁桃体に直接投与し Dp140 を発現させると、興奮性シナプス応答や社会性行動異常が改善した。さらに、エクソン 53 スキップ薬を脳室内に投与すると、扁桃体で Dp140 が回復し、これらの異常も同様に改善した(橋本、青木)(revised)。
- ② アンチセンス核酸配列データベース・配列予測のための機械学習モデルである eSkip-Finder の作成およびウェブ一般公開・運用を実現した(Nucleic Acids Res. 2021:gkab442)(千葉班員)。
- ③ 新規 CRISPR システムとして、DNA 二本鎖切断を誘導せずに標的の一塩基を変換可能な一塩基編集

システム(Base Editor)の開発を進めた。ウイルス様粒子送達システム NanoMEDIC に各種 Base Editor を搭載し、エクソンスキップレポーターを用いてエクソン 45 スキップ誘導活性を測定した(堀田班員)。

- ④ 2 分岐型ポリエチレングリコールとポリリンから成る Y 字型高分子を合成し、1 分子の核酸医薬を封入する最小スケール(約 18 nm 径)のナノ医薬(ユニットポリイオンコンプレックス:uPIC)を創製した。マウスへ静脈内投与された uPIC は核酸医薬単体と比して、10 倍以上の高い筋組織集積効率を示すこと、筋肉内投与された uPIC は 2 倍のエクソン・スキップ効率を示すことを確認した(宮田班員)。
- ⑤ DG9 ペプチド付加モルフォリノ核酸を用いた心筋治療およびマルチエクソン・スキップ治療の可能性を、ヒト細胞およびマウスを対象に実証した(越後谷班員、横田協力班員)(in press)。
- ⑥ AAV を用いた μ Dys 補充療法の実用化に向けて、固相支持担体を用いた AAV 発現培養系の構築、同発現系で作製した AAV ベクターの精製方法の検討および純度解析系構築を行った。間葉系幹細胞治療について、臨床試験に向けた準備を行った(*Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021)。

b. 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立(青木、川内、深田、上住、鈴木、林、若月、稲田)

- ① 尿由来細胞から運動ニューロンを分化させる手法を確立した。ヒト多能性幹細胞を用いた 3D オルガノイド研究を開始した(邦武、青木)。
- ② CRISPR-Cas9 と電気穿孔法を組み合わせた生体内ゲノム編集法を用いて小児脳腫瘍に特異的に発現する融合遺伝子の発がん能を検証した。結果として、小児悪性脳腫瘍である上衣腫において ZFTA 型融合遺伝子の発がん能と腫瘍進展に関わる下流遺伝子を同定した(川内班員)。
- ③ 運動に依存的な筋サテライト細胞増殖メカニズムとして、Yap1/Taz 依存的な間葉系前駆細胞由来因子が筋サテライト細胞を増殖し、その中の一つ Thrombospondin-1 アゴニストは Calcitonin receptor の発現低下した全身の筋サテライト細胞を増殖可能であることを示した(深田班員)(*Cell Stem Cell*, 2022)。
- ④ レチノイン酸(RA)は間葉系前駆細胞で産生され、間葉系前駆細胞自信にシグナル伝達するとともに筋幹細胞にもシグナルを伝えることを明らかにした(上住班員)(*J Clin Invest*, 2021)。

- ⑤ ヒト iPS 細胞から誘導した間葉系前駆細胞が分泌する uPAR がヒト筋前駆細胞の DMD モデルマウスへの移植効率を上げることを明らかにした (Stem Cell Res Ther.12:532, 2021)(鈴木班員)。
- ⑥ シングル核 RNA-seq 解析により、DMD では健常者と比較して筋幹細胞の割合が増加したが、増殖期の筋幹細胞は殆ど存在せず、その多くは休止期にあることが明らかとなった(林班員)。
- ⑦ ヒト iPS 細胞を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞の共培養系を確立した。60 日間に渡る長期培養過程での神経筋接合部の成熟化過程を調べた(若月班員)。
- ⑧ ヒト骨格筋を対象に質量分析計によるジストロフィン高度定量法を確立した(稲田班員)。

c. 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究(山田、村松、中村、越後谷、横田、野口、進藤、関、森、金川)

- ① 九州大学医学研究院と静岡県畜産技術研究所との共同研究として、ゲノム編集により新規作出した DMD マイクロブタの病理解析と論文作成を進め、NCNP への個体導入準備を進めた。
- ② イヌ用およびマウス用の下肢筋トルク測定のための刺激・評価系を2種類新たに開発した。DMD マウスにおいて、伸張性収縮に対する損傷感受性の亢進が高感度に検出できること、そのメカニズムに、Ca²⁺依存性の三つ組み構造タンパク質の分解が関与することを明らかにした(山田班員)。
- ③ ALS モデルマウス(SOD1G93A)で認める血中脂肪酸量の低下は、オリゴデンドロサイトの細胞死を誘導することで ALS 症状の発症や悪化に寄与する可能性を見出した(村松班員)。
- ④ ベッカー型筋ジストロフィーの自然歴を踏まえ、ゲノム編集により、exon 45-49 欠失(ヒトでは重症)、exon 45-47 欠失(ヒトでは中等症)、exon 45-48 欠失(ヒトでは軽症)を有するマウスを作製した(中村班員)。
- ⑤ Rogers 博士らと共に、エクソン 52 欠失変異を有する DMD ミニブタを作製し、エクソン 51 または 53 スキップの検証に有用であることを示した(越後谷班員、横田協力班員)(Int. J. Mol. Sci. 2021)。
- ⑥ PolyQ 病トランスジェニックマーマーモセットの骨格筋力低下は、脱神経、核内及び筋線維内の封入体形成により、主に速筋の萎縮を介して、引き起こされることが判明した(野口班員)。
- ⑦ リン脂質生合成酵素であるリゾホスファチジルコリン

アシル転移酵素 2 の構造予測を行い、阻害剤開発への道筋をつけた(進藤班員)(FASEB J. 2021)。

- ⑧ 齧歯類の下肢筋群にワイヤー電極を植え込み、無線で自由行動下の筋電図活動を記録する実験系を構築し、歩行だけでなく、跳躍運動時においても安定的な記録が可能であることを確認した(関班員)。
- ⑨ CDP-リビトールのプロドラッグ治療は ISPD 欠損筋ジストロフィーを改善することを示した(金川班員)。
- ⑩ DMD 患者脳を対象に、MRI、CT、血流 SPECT 画像所見を調査したところ、DMD 患者の過半数に前頭葉優位の脳萎縮・脳血流低下が見られ、進行性である可能性が示唆された(森班員)。

4. 筋ジストロフィーモデル動物の維持(保田)

筋ジストロフィー関連モデルマウスを継続的に高品質で維持し、班内外の研究機関に供給した。令和 3 年において 24 機関に、のべ 109 回、動物 983 匹および胚 60 個の過去最高数の供給を実施した(保田班員)。

5. 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究(貝谷)

遺伝子治療への患者の意識調査を実施し、さらには患者と家族が円滑に新規治療を受け入れるための教育として、令和 3 年度オンラインセミナー「筋ジストロフィーと遺伝子(DNA)教育講座」を開催した。

今後の研究の進め方

NCNP が誇るマウス、イヌ、マイクロブタ等の神経筋疾患モデル動物を対象に、引き続き以下を検討する。

- ① モデル動物の作出/維持(マウス、イヌ、マイクロミニブタ等)と評価系の作成
- ② 治療効果および組織標的性向上のための遺伝子・核酸医薬のデリバリー研究
- ③ 骨格筋幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立
- ④ 骨格筋、心筋、神経筋接合部、脳等の 3D 組織モデルを用いた疾患病態研究
- ⑤ 実験モデル動物の安定供給と、研究成果の臨床展開のための社会環境整備

最後に、学際性、国際性、公平性、倫理性、公開性を原則として、筋ジストロフィーに対して治療を開発するための伝統ある開発費研究班(武田伸一班)を引き継ぐ機会を頂いたことに深く感謝したい。

ポリグルタミン病モデルマーモセットの骨格筋内神経束の超微細構造解析
国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部
野口 悟

緒言

ポリグルタミン病は遺伝子コーディング領域にある CAG 反復配列の伸長によって引き起こされる遺伝性の神経疾患である。ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性の脊髄小脳失調症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症などが知られており、不随意運動や認知症（ハンチントン病）、歩行障害（遺伝性脊髄小脳変性症）などの症状が引き起こされる。このうち、ハンチントン病や球脊髄性筋萎縮症では、骨格筋にも障害が起こることが知られている。これまでモデルマウスが作製され、骨格筋病態が分子レベルで解析されてきた。それらの研究から、①CAG が伸長した RNA の核内蓄積により引き起こされる遺伝子発現変化、②ポリグルタミン発現による細胞毒性、③末梢神経障害による脱神経、の3つの病態機序が提唱されてきた。昨年度、モデルマーモセットの骨格筋病理解析から、脱神経が主たる病態機序である可能性を示唆する所見が得られた。本年度は、筋内神経をより緻密に解析することを目的に、光学顕微鏡および電子顕微鏡による解析を進めた。

方法

マーモセット骨格筋

CMV プロモーター下で CAG リピートが 120 回伸長したヒト Atxn3 ORF を発現するトランスジェニックマーモセット (PQD11 (1y4m) 及び PQD16

(1y5m)) から骨格筋を採取した。同齡の正常個体 (2y3m) から骨格筋を同様に採取し、実験に供した。

組織染色、電子顕微鏡観察

定法に従って、凍結骨格筋組織から切片を作製し、化学染色および抗ミエリン塩基性タンパク質およびニューロフィラメント H 鎖抗体染色を行った。骨格筋組織のグルタルアルデヒド固定サンプルを用いて、定法に従って、電子顕微鏡用のサンプルを調製し、semi-thin section トルイジンブルー染

色、および透過型電子顕微鏡での超微細構造の観察を行った。

結果

ポリグルタミン病モデルマーモセット腓腹筋の免疫染色では、骨筋内神経束内に間質の増生が見られ、神経の脱落が観察された。semi-thin section では、ミエリン（髄鞘）の肥厚と神経線維の形態異常が観察された。電子顕微鏡観察では、間質の増生、ミエリンの肥厚、comma-shaped outfoldings, tomacula 様構造など髄鞘の形態異常が観察されたが、軸索自体の変性の所見は得られなかった。

考察

これまでの結果から、モデルマウスにて提唱されてきたようにポリグルタミン病モデルマーモセット骨格筋でも、伸長 RNA の核内蓄積、ポリグルタミン細胞毒性、脱神経の3つの病態機序の可能性が示唆されていた。その中でも、末梢神経障害による脱神経が引き起こす筋萎縮が生理学的、病理学的所見であり、筋力低下に寄与するものと思われていた。今回の解析から末梢神経の異常は主にミエリン髄鞘の形態変化によって引き起こされているものと考えられた。さらに慢性的な変化により神経線維自体の脱落を引き起こしているものと思われる。また、免疫染色でのポリグルタミンタンパク質の核内の蓄積はシュワン細胞核では明確でなかったが、p62、LC3 の免疫染色が神経束内で観察された。このことから、筋内神経は、筋線維と同様に、タンパク質の異常蓄積と分解経路の不全によって、変性が引き起こされているものと考えられた。

結論

ポリグルタミン病モデルマーモセット骨格筋の筋内神経の観察から、髄鞘の構造異常により末梢神経障害が引き起こされている可能性が示唆された。

参考文献

Inoue M et al. A recurrent homozygous ACTN2 variant associated with core myopathy. Acta Neuropathol 142, 785-788, 2021.

神経筋疾患の臓器間ネットワーク解明ならびに低分子薬開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 神経薬理研究部
村松 里衣子

緒言

筋萎縮性側索硬化症は難治性の神経筋疾患で患者の一部は遺伝的素因を有することから、疾患の原因遺伝子の機能解析という形で知見が蓄積している。これらで得られたメカニズムに基づき治療薬の開発が試みられているが、現時点で根本的な治療薬は見出されていない。我々は、筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子が病巣以外の部位にも発現する点に着目し、原因遺伝子の病態における作用の解明を通して、疾患形成のメカニズムの新しい機序の存在を検討している。

臓器間連関の制御機構には神経回路と液性因子を介した経路が存在するが、病態では、病巣で器質的な変化が生じる。血管のバリア機能の破綻は多くの病態に共通する器質的な変化で、その結果、血液を介した液性因子が患部に届きやすい状態になる。液性因子が筋萎縮性側索硬化症の病態形成に関わる可能性を考え、初年度に、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス(SOD1^{G93A})の血液に対する網羅的な解析を実施した。症状の発症前、発症時、重症化した後のサンプルを対象にした血中の成分解析と pathway 解析の結果、複数の分子や pathway が症状が現れる前から減少・減弱する様子を見出した。そこで、本年度は、これらの変動があった分子群の神経系細胞に対する作用を *in vitro* で検討した。

方法

筋萎縮性側索硬化症の患者検体およびモデルマウスの組織解析の既報から、グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトの細胞死が生じることが知られる。本研究でも、見出した分子群のオリゴデンドロサイトの細胞死への作用を検討した。幼若マウス脳より採取したオリゴデンドロサイト初代培養に対して、グルタ

ミン酸興奮毒性による細胞死を誘導し、候補分子を補充することで細胞死が抑制できるか検討した。候補分子の機能を抑制するため、候補分子に対する受容体の siRNA ライブラリーを作成し、各 siRNA を導入したオリゴデンドロサイトにおける細胞死は Propidium iodide (PI) 染色で検出した。

結果

筋萎縮性側索硬化症では成熟オリゴデンドロサイトでの細胞死が検出されることから、まず *in vitro* でオリゴデンドロサイトを分化させ、成熟したオリゴデンドロサイトの細胞死を誘導する条件を確立した。本手法に対して候補となる siRNA 20 種類の作用を検討した結果、複数の遺伝子に対する siRNA 導入群で、グルタミン酸興奮毒性に対する細胞死に対する抑制効果が認められた。それらの遺伝子が単独で（グルタミン酸興奮毒性なしで）細胞死に対して影響を与えるか検討し、グルタミン酸興奮毒性に対してのみ細胞死抑制効果を発揮する受容体を一種類同定した。また、本受容体に対する siRNA のノックダウン効果をオリゴデンドロサイトで確認した。

考察

血中因子がオリゴデンドロサイトに直接作用して、その機能を制御することが示唆される。血中因子が中枢へ作用するには、作用部位周辺で血管の透過性が亢進するか、あるいは中枢移行性を高める機序（トランスポーターなど）が亢進する必要がある。今後リガンドの同定とその機能解析を通じて、血中因子のオリゴデンドロサイトの細胞死への作用を、*in vivo* で検討する。

結論

筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスの血液に含まれ、オリゴデンドロサイトの細胞死を制御する分子を見出した。

参考文献

なし

2-6「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」

(分担課題名) ラットやマウスを対象とした筋電図記録や神経刺激の技術供与

分担研究者 関 和彦

(所属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所モデル動物開発研究部

緒 言

本研究班では筋疾患の病態解明や治療法解明が主目的であるが、筋機能の発現や維持は中枢神経系からの持続的な制御、及び運動感覚連関によって実現している。従って、上記の包括的な理解のためには、骨格筋だけでなく、骨格筋活動を左右する中枢神経系機能の評価が必要となる。そこで本研究では、筋電図計測・誘発電位計測などヒト患者においても行われている電気生理学的診断技術をモデル動物においても確立することを目的とする。確立された技術を、本研究班で用いられる様々な動物モデルにおいて適用することにより、筋疾患病態やその遺伝子治療戦略について、より広い視点からの理解が得られる。

方法と結果

まず、前年度確立したラットの下肢筋群にワイヤー電極を外科的手術によってインプラントし、無線で自由行動下の筋電図活動を記録する実験系を拡張した。具体的には足関節筋群に加えて膝関節に関わる筋にも、ステンレスワイヤー(cooner wire)を外科的手術によって慢性的に埋め込み、電極中枢端についているコネクタをラット頭部に固定した。頭部コネクタに Multichannel Systems 社の無線記録装置のトランスミッターを頭部に接続し、歩行時の筋活動を非拘束下で記録した。大腿と足首の筋は連続的な交代性の活動が認められた。

次に、ラットの末梢感覚神経に慢性的にカフ電極を設置する実験技術を確立した。具体的にはドイツ Cortec 社と共同で、ラットジャンプ実験用のマイクロカフ電極を設計し、それを慢性留置する手術及び個体管理方法を開発した。そして、前年度確立した筋電図記録と同様、刺激一記録をすべてオンラインで行うことができる実験系を確立した。そのシステ

ムを用いて、ケージ内で自由行動を行っていたラットへの電気刺激が可能なことを実証した。

考察

本研究によって確立されたシステムは広く歩行や跳躍運動時の神経系の活動評価に利用可能である。そこで今後は、ラット皮質上に ECoG 電極を埋め込む技術を確立し、感覚誘発反応や皮質運動出力の運動中の変化を評価できる実験系を確立する。

結論

行動下のげっ歯類を対象とした、慢性的筋電図記録と同時に、末梢神経を刺激する実験技術が確立された。

今後の展望

筋疾患病態などの評価のためには、歩行だけでなく、より多くの部分を用いるタスクが必要である。また、筋萎縮などの形態面の評価との相関を確認するためには、最大筋力に近い筋力発揮様式(ジャンプ)や、低重力下での計測 (tail suspension)などが筋病態研究では用いられているので、そのようなタスク下でも筋活動記録が可能のように、技術を発展させる。さらに筋疾患に並行した中枢神経系の変性評価に、運動出力と直接連関するような末梢神経刺激に対する応答は有用である。同技術は、運動系の異常をもたらす多くの疾患モデル動物の表現系解析に有効なので、本研究班の他研究者との共同研究によって同技術の供与を行なってゆく。

研究発表

1. Kudo M, Sidikejiang W, Fujiwara M, Saito Y, Kubota S, Inoue K, Takada M, Seki K (2021). Specific gene expression in unmyelinated dorsal root ganglion neurons in nonhuman primates by intra-nerve injection of adeno-associated virus 6 vector. Molecular Therapy Methods & Clinical Development. Volume 23, 10: pp 11-22.
2. Saito T, Ogihara N, Takei T, and Seki K (2021): Musculoskeletal modeling and inverse dynamic analysis of precision grip in the Japanese macaque, Front. Syst. Neurosci., 08 December 2021, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.774596>,
3. Kudo M, Wupuer S, Kubota S and SEKI K (2021): Distribution of large

and small dorsal root ganglion neurons in common marmosets, *Front. Syst. Neurosci.*, 02 December 2021, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.801492>,

4. Koizumi M, Nogami N, Owari K, Kawanobe A, Nakatani T, Seki K (2021): Motility profile of captive-bred marmosets revealed by a long-term in-cage monitoring system. *Front. Syst. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.645308>, 15 April 2021.

知的所有権の出願・取得状況

なし

モデル動物を基盤とした脳腫瘍の新しい治療法開発に関する研究

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所・病態生化学研究部
川内大輔

緒言

上衣腫は小児脳腫瘍のうち主要な悪性脳腫瘍の一つであり、腫瘍発生部位と分子解析データを元に分類されている。大脳皮質に生じるテント上上衣腫のうち約7割を占める ZFTA 型上衣腫は、上衣腫の中でも悪性度が高く、主に外科的手術による腫瘍の除去率に依存する形になっている。そこで上衣腫モデル動物を開発し ZFTA 型上衣腫の腫瘍形成メカニズムを理解することにより、腫瘍増殖シグナルを見出し、それらを基盤とした新規の分子標的薬を用いた治療法の確立を目指す。

方法

ZFTA 型上衣腫では腫瘍特異的な融合遺伝子が発現することが知られている。前年度は、ヒトテント上上衣腫>1000 検体から同定した複数の ZFTA 融合遺伝子をマウス脳内に誘導することで、発がん性を検証した。ヒト初代腫瘍組織と本研究で開発したマウス腫瘍の遺伝子発現解析から共通して働く細胞増殖シグナル GLI2 を治療標的分子として同定したが、今年度は生体内で GLI2 を抑制する核酸医薬を開発する目的でアンチセンスオリゴ(ASO)に着目し、高分子ミセルで輸送する技術の開発準備を行う。

結果

GLI2 遺伝子の ASO を高分子ミセルに封入する方法論は、共同研究者の東京大学安楽泰孝先生によって開発される。特に上衣腫の表面に CD276 抗原が発現することを踏まえ、高分子ミセルの表面に抗体を付加した上衣腫特化型 DDS システムを開発する。一方で、生体内でこの DDS をテストするモデル系を開発するために、陽性対照として Grp4 髄芽腫 OTR396 を培養下でレンチウイルスにより感染させ、GFP と Luciferase 遺伝子を発現させる。感染した細胞は免疫不全マウス的大脑に移植し、その腫瘍増殖を Luciferin により非侵襲的に解析する系を確立した。

この技術を基盤として ZFTA 型上衣腫細胞株 EP1NS にウイルスを感染させた細胞株を作成中である。

考察

現存する治療に使用可能な GLI2 阻害剤は一般的に副作用が多く特異性が低い。核酸医薬を用いた腫瘍特化型 DDS を開発することで効果的な脳腫瘍の治療につなげることが可能になると思われる。

結論

悪性度の高い ZFTA 型上衣腫細胞株を用いたプレクリニカルモデルの開発を順調に進めている。

参考文献

Zheng T, Ghasemi DR, Okonechnikov K, Korshunov A, Sill M, Maass KK, Benites Goncalves da Silva P, Ryzhova M, Gojo J, Stichel D, Arabzade A, Kupp R, Benzel J, Taya S, Adachi T, Shiraishi R, Gerber NU, Sturm D, Ecker J, Sievers P, Selt F, Chapman R, Haberler C, Figarella-Branger D, Reifenberger G, Fleischhack G, Rutkowski S, Donson AM, Ramaswamy V, Capper D, Ellison DW, Herold-Mende CC, Schüller U, Brandner S, Driever PH, Kros JM, Snuderl M, Milde T, Grundy RG, Hoshino M, Mack SC, Gilbertson RJ, Jones DTW, Kool M, Deimling AV, Pfister SM, Sahm F*, **Kawauchi D***, Pajtler KW*. Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas. *Cancer Discov.* 11(9):2230-2247.(2021) (IF:39.397)
*Co-corresponding author.

Kupp R, Ruff L, Terranova S, Nathan E, Ballereau S, Stark R, Sekhar Reddy Chilamakuri C, Hoffmann N, Wickham-Rahrmann K, Widdess M, Arabzade A, Zhao Y, Varadharajan S, Zheng T, Murugesan MK, Pfister SM, **Kawauchi D**, Pajtler KW, Deneen B, Mack SC, Masih KE, Gryder BE, Khan J, Gilbertson RJ. ZFTA-translocations constitute ependymoma chromatin remodeling and transcription factors. *Cancer Discov.* (IF:29.497) 11(9):2216-2229. (2021)

Arabzade A, Zhao Y, Varadharajan S, Chen HC, Jessa S, Rivas B, Stuckert AJ, Solis M, Kardian A, Tlais D, Golbourn BJ, Stanton AJ, Chan YS, Olson C, Karlin KL, Kong K, Kupp R, Hu B, Injac SG, Ngo M, Wang PR, De Leon LA, Sahm F, **Kawauchi D**, Pfister SM, Lin CY, Hodges HC, Singh I, Westbrook TF, Chintagumpala MM, Blaney SM, Parsons DW, Pajtler KW, Agnihotri S, Gilbertson RJ, Yi J, Jabado N, Kleinman CL, Bertrand KC, Deneen B, Mack SC. ZFTA-RELA Dictates Oncogenic Transcriptional Programs to Drive Aggressive Supratentorial Ependymoma. *Cancer Discov.* (IF:29.497) 11(9):2200-2215. (2021)

R3 開発費青木班 報告書

分担研究課題名

骨格筋幹細胞の未分化性維持機構の解明と筋ジストロフィー治療への応用

分担研究者 林 晋一郎

所属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部

緒言

筋ジストロフィーの根治療法として骨格筋幹細胞を用いた移植療法が期待されている。移植された筋幹細胞は、増殖した後に分化・融合して筋再生に寄与するだけでなく、一部は休止状態に入り、組織幹細胞として定着することができる。しかしながら、生体外で培養した筋幹細胞の多くは移植後に融合も幹細胞としての定着もせず、その寄与率の低さが問題となっている。一方、単離直後の筋幹細胞は高い寄与率を示すが、筋幹細胞の未分化な状態を維持したまま長期培養することが難しく、移植に必要な数の未分化性を維持した筋幹細胞の確保が本療法の課題となっている。これまで申請者は、レチノイン酸受容体アゴニストを添加した培養法により、骨格筋幹細胞の未分化性を高く保持したまま長期間培養可能であることを新たに見出している。しかしながら、過去にはレチノイン酸が筋分化を促進するとの報告もあり(Skeletal Muscle, 2015)、筋細胞に対するレチノイン酸の作用に関するコンセンサスは得られていない。そこで本研究では骨格筋幹細胞の未分化性維持および分化制御機構におけるレチノイン酸シグナルの解明を目的とした。さらに本年度はシングル核 RNA-seq を用いた、筋ジストロフィー病態における筋幹細胞の性状解析も行った。

方法

1)野生型 C57BL/6J マウスよりセルソーターで筋幹細胞を単離した。30%FBS を含む増殖培地にオールトランス型レチノイン酸を添加して48 時間培養後、totalRNA を抽出し、筋分化関連因子の発現を解析した。同様に C2C12 でもレチノイン酸処理後、同様に解析した。さらに、ヒト筋幹細胞を同様にレチノイン酸添加培地で培養し、NOG-mdx マウスに移植して移植効率を解析した。

2)ヒト DMD および正常凍結筋組織からセルソーターで細胞核のみを単離し、10X genomics 社のマニュアルに従いシングル核 RNA-seq ライブラリを作製した。シーケンス後、Seurat R パッケージにより筋幹細胞集団について解析を行った。

結果

1) 初代筋幹細胞ではオールトランス型レチノイン酸によりPax7の発現の上昇とMyogenin, Ckmの発現低下が見られ、筋分化の抑制が顕著に見られた。一方、C2C12は従来の報告にあるようにMyogeninの発現の増加が見られ、レチノイン酸による筋分化促進効果が確認された。さらにヒト筋幹細胞においてもレチノイン酸添加によって通常培養したものと比較してヒトSpectrin陽性の筋線維数増加が見られ、移植効率が上昇した。

2) 新鮮凍結筋組織より細胞核のみを単離し、シングル核RNA-seqライブラリを作製する手法を確立した。Seuratパッケージにより解析した結果、DMDの骨格筋では、筋細胞核の割合は正常コントロール筋と比較して減少する一方で、筋幹細胞や再生筋の筋核、マクロファージなどが増加した。興味深い事に、DMDの筋幹細胞は殆どがMKI67やPCNAといった細胞増殖マーカーを発現しておら

ず、休止状態のマーカーであるCALCRを発現しており、休止状態にあると考えられた。また、MyoD1やMyogeninを発現する活性化および分化途中にある筋細胞も殆ど存在しないことが明らかとなった。

考察

筋幹細胞および C2C12 を用いた今回の実験結果から、レチノイン酸の筋分化に対する作用は両者で異なることが明らかとなった。レチノイン酸レセプターには RAR- α 、 β 、 γ と RXR が存在することが知られており、オールトランス型レチノイン酸は主に RAR- α に結合し、下流のシグナルを伝達する。筋細胞におけるこれらレセプターの正確な発現量および筋細胞に対するレチノイン酸の効果の分子メカニズムを理解するには網羅的トランスクリプトーム解析が必要であると考え、現在は RNA-seq ライブラリを作製し、解析を進めている。また、ヒトにおいてもマウス筋幹細胞と同様にレチノイン酸添加培地による培養で移植効率が上がり、本培養法は有用であると考えられた。

シングル核 RNA-seq を用いた結果では、DMD 患者筋における筋幹細胞では、細胞数は増加しているもののその殆どが休止状態にあることが明らかとなった。これまで mdx マウスなどを用いた研究から DMD 病態では筋幹細胞はマクロファージなどの炎症性細胞が産生するサイトカインなどに応答し、活発に増殖するものと考えられてきた。しかしながら今回の結果では炎症性細胞数が増加している環境においても筋幹細胞は増殖せず、筋再生に寄与しないということが明らかとなった。この発見は、幹細胞治療を考える上で非常に重要な発見である。今後 DMD 病態での筋幹細胞トランスクリプトームの変化を詳細に解析す

ることでこれまで Dr. Rudnicki が提唱している、筋ジストロフィーにおける筋幹細胞の極性の異常などの”質の低下” (Trends Mol Med. 2016) がヒトでも起こっているのかを解析する予定である。

結論

本研究により初代培養筋幹細胞と C2C12 ではレチノイン酸の筋分化に対する作用が全く異なることが明らかとなった。また、DMD 患者筋における筋幹細胞は殆どが休止状態にあることが明らかとなった。

参考文献

1. Lamarche É, Lala-Tabbert N, Gunanayagam A, St-Louis C, Wiper-Bergeron N. Cite Share Retinoic acid promotes myogenesis in myoblasts by antagonizing transforming growth factor-beta signaling via C/EBP β . Skelet Muscle. 2015 Mar 18;5:8.
2. Chang NC, Chevalier FP, Rudnicki MA. Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. Trends Mol Med. 2016 Jun;22(6):479-496

新規治療開発に有用な臨床情報の抽出

国立精神・神経医療研究センター病院

脳神経内科 森まどか

緒言

Dystrophinopathy は筋骨格を担う dystrophin 遺伝子変異によって生じる筋疾患で、重症な Duchenne 型 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) と軽症な Becker 型 (Becker Muscular Dystrophy, BMD)、および中間型 (Intermediate Muscular Dystrophy, IMD) とそれぞれの保因者から成る。近年、DMD の骨格筋・心筋障害に対する新規および既存集学的治療が導入され、筋障害に対する予後は改善していくことが期待出来る。しかし、dystrophinopathy は中枢神経障害も伴っておりこちらも治療が必要な可能性があるが、病態・病状や自然歴が十分解明されているとは言えない。Dystrophinopathy の中枢神経障害について現状・背景因子を調査することを目的とした。DMD 画像研究の研究として、背景因子について検討した。

方法

頭部画像検査を行ったことのある当院脳神経内科の DMD 患者を抽出し、偶発症を除外した頭部画像所見の特徴と臨床像との関連を探った。歩行喪失年齢・人工呼吸器装着年齢、遺伝子診断、発達障害歴、IQ が利用出来る患者についてはこれらの臨床情報との関連を検討した。

結果

当院脳神経内科受診歴のある dystrophinopathy 患者のうち 12 歳以下で歩行喪失した 92 名のうち、画像検査が行われたのは 41 名、うち脳血管障害の合併があった 2 名を除外し 39 名だった。画像検査の平均年齢 24.9 +/- 76.6 (13-38, median 24)、歩行喪失年齢 9.8 +/- 1.6 (7-12, 10) 歳、37 名が人工呼吸器利用しており導入年齢 19.9 +/- 4.8 (12-32, 19) であった。

検査人数は頭部 MRI 13 名、頭部 Single Photon Emission CT (SPECT) 17 名、頭部 CT 32 名、SPECT は全例 CT と同時撮影されていた。MRI では 13 名中 7 名、CT では 32 名中 20 名に前頭葉優位の脳萎縮が見られたが、萎縮と IQ や発達障害の間に有意な関連は見られなかった。12 例で 3 年以上の間隔を開けて CT が撮像され、6 名で萎縮の悪化が見られた。SPECT では全例に局所の血流低下

を認め、18 例中 17 名は前頭葉だった。同時撮像 CT では血流低下部位主体の軽度の脳萎縮を 18 例中 9 例に認めた。CT と MRI の間に所見の乖離は見られなかった。1 名のみ経時的に SPECT が検索され、17 歳から 22 歳の間で血流低下の増悪が見られた。

遺伝子変異との関係で、dystrophin の isoform である Dp140 を欠くことが想定される変異を持っている患者は、CT で有意に萎縮を呈した。

考察

DMD 患者の SPECT 検査では全例、CT 検査では 32 例中 20 例、MRI では 13 名中 7 例に脳萎縮を認め、進行性が示唆された。Dp140 は CT 萎縮例で発現していない割合が高かったが、全例ではなく萎縮を説明する要因は他にも存在する。

DMD に対する画像検査は通常の T1, T2 画像等で波異常を認めず、拡散テンソル MRI [Doorenweerd 2014] や MRI 脳血流画像 [Doorenweerd 2017]、PET [Lee 2002] など臨床の場では使用しにくい方法だった。過去に DMD に対し保険収載されているこれらの検査方法で異常を検出した研究はない。本研究で異常の頻度が高かった理由として、対象患者が成人であり年齢が高かった可能性がある。今後は機能との関係や経時的変化を精査する予定である。

今回、SPECT が前頭葉優位の脳血流低下を呈し、脳萎縮に先行したことから、SPECT が最も鋭敏かつ早期に DMD の中枢神経障害を抽出できると考える。

研究の限界として、検査バイアス、高次機能評価が不十分であること、進行につれ MRI や SPECT 検査が困難になることから再検が難しいことがある。CT は比較的拘束時間が短く人工呼吸器を利用しながら検査できるため継続検査法として有用と考えた。

結論

DMD 患者の過半数に前頭葉優位の脳萎縮・脳血流低下が見られ、進行性である可能性がある。

参考文献

1. Lee JS, Pfund Z, Juhász C, et al. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. Muscle Nerve. 2002 26:506-12

2. Doorenweerd N, Straathof CS, Dumas EM, Spitali P, Ginjaar IB, Wokke BH, et al.
Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy.
Ann Neurol. 2014;76:403-11.

分担研究報告書

(課題名) 疾患 iPS 細胞を利活用した神経筋疾患の病態解明

(所属) 疾病研究第五部

(氏名) 若月 修二

緒言

神経筋接合部 (Neuromuscular junction, NMJ) は運動ニューロンの神経終末と骨格筋細胞をつなぐシナプスである。NMJ 形成メカニズムを明らかにする研究は、これまで主にマウスなどの実験動物モデルを用いて進められ、さまざまな有用な知見が得られてきた。そのなかで見つかった NMJ 形成に関わる分子群はヒトにおいても極めて重要であり、遺伝子変異によるそれら分子群の機能の変容・喪失は先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) などの筋疾患の発症と強く関連することも明らかにされている一方、NMJ の形態や分子構成を詳細に比較検討した研究報告では、ヒトとマウスとの間に明確な違いがあることが示唆されている。これらのことから、ヒト細胞を用いた NMJ モデルを開発することはヒトの NMJ 形成メカニズムを扱えるという点で、CMS などの病態解明ならびに治療法開発において極めて有用であると考えられる。本研究では、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞の共培養により、形態的・組織化学的に NMJ と判断される構造を作出し、NMJ 構造作出の再現性、ならびに運動ニューロン側の電気的興奮による筋管側の応答性を有する、構造的・機能的評価に資するヒト NMJ モデルを確立を目指した。

方法と結果

ヒト iPS 細胞を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞を個別に誘導し共培養した。共培養には Campenot チャンバーを用いた区画化培養法を採用し、運動ニューロン、骨格筋細胞を個別の培地で栄養す

ることにより、従来より長期の培養期間を実現した。形成される NMJ 数は培養日数に応じて増加し、個々の NMJ サイズが大きくなる傾向が確認された。また、NMJ 形成が確認された骨格筋細胞にカルシウム指示薬 fluo-4 を取り込ませて、細胞内カルシウム動態をモニタリングしたところ、運動ニューロンの興奮により fluo-4 蛍光強度の有意な増大を確認した。

結論と考察

本年度の研究では、区画化培養法や蛍光イメージングなどを駆使し、NMJ 構造作出、運動ニューロン側の電気的興奮による骨格筋細胞 (筋管) 側の応答を検討し、ヒト NMJ を作り出すことに成功した。前述のように、ヒト NMJ 培養モデルは神経筋疾患の病態生理の理解、ならびに治療法の探索に極めて有用であり、構造的・機能的評価に資するモデルの確立が求められる。近年、患者由来 iPS 細胞を用いた NMJ 形成モデルが報告されているが、多くは定量的再現性に乏しく、評価系として未だ十分とは言い難い。来年度以降の研究では、再現性をさらに向上させるとともに、客観的な定量法を確立する必要があると考えている。

参考文献 (業績)

1. Wakatsuki S and Araki T. Novel Molecular Basis for Synapse Formation: Small Non-coding Vault RNA Functions as a Riboregulator of MEK1 to Modulate Synaptogenesis. *Front Mol Neurosci.* (2021) 14: 748721.
2. 若月修二
small non-coding vault RNA によるシナプス形成の調節機構
生化学 (2022) 94: 78–81.
3. Hagihira H., et al. (Wakatsuki S. as co-authors)
Systematic analysis of brain lactate and pH levels in 65 animal models related to neuropsychiatric conditions.
bioRxiv. doi: [10.1101/2021.02.02.428362](https://doi.org/10.1101/2021.02.02.428362)

筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の開発

鈴木 友子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部

緒言

ヒト iPS 細胞から誘導される筋前駆細胞は、筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の細胞源として期待されている。我々は sphere 法（文献 1）を用いてヒト iPS 細胞から筋前駆細胞を誘導し、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウス *NSG-mdx^{4Cv}* マウス（文献 2）の骨格筋に移植する実験を行っているが、移植効率の低さが実用化を阻んでいる。そこで令和 3 年度はヒト iPS 細胞から誘導した間葉系幹細胞 (iMSCs) から放出される可溶性因子が筋前駆細胞の移植効率を上げるかを検討した。

方法

1. ヒト iPS 細胞由来筋前駆細胞誘導

文献 1 で発表した sphere 法を更に改良し（論文準備中）、京都大学で樹立されたヒト iPS 細胞 (201B7, 409B2, 454E2) から筋前駆細胞を誘導し、FACS Aria Fuaion (BD) を用いて CD271+CD82+ 分画をソーティングした。

2. ヒト筋前駆細胞の入手と培養条件

ヒト筋前駆細胞株 (Hu5/KD3) は橋本らの方法に従い培養した（文献 3）。ヒト骨格筋初代培養細胞は LONZA から入手した。

3. ヒト iPS 細胞からの iMSC の誘導

STEMCELL™ Technologie のキットを用いて iMSC を誘導した。間葉系幹細胞のマーカー CD105, CD73, CD90 の発現を FACS で解析した。human MSC functional identification kit (R & D Systems) を用いて脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞系譜への分化能を評価した。比較対象としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) (LONZA) を用いた。

4. 間葉系幹細胞とヒト筋前駆細胞の共培養とマウスへの移植

ヒト筋前駆細胞と iMSC を transwell (Corning) を用いて共培養した後、ヒト筋前駆細胞の増殖能を MTT アッセイで解析した。筋分化能は muscle myosin に反応する MF20 (R&D) を用いて免疫染色し、Fusion index を算出して評価した。ヒト筋前駆細胞を免疫不全 DMD モデルマウス (*NSG-mdx^{4Cv}*) あるいは免疫不全 *NOD/Scid* マウスの前脛骨筋内へ 29G シリンジを用いて移植した。以下の抗体を用いた、免疫組織化学的手法を用いて移植したヒト筋前駆細胞の筋再生への寄与を調べた。

抗ヒト・ラミン A/C 抗体	マウス mAb, Santa Cruz
抗ヒト・スペクトリン抗体	マウス mAb, Leica

抗ラミニン $\alpha 2$ 鎖抗体 (4H8-2)	ラット mAb, Enzo Life Science
抗ヒト・ラミン B1 抗体	ウサギポリクローナル抗体 HistoSure
抗ジストロフィン抗体	ウサギポリクローナル抗体, abcam

5. iMSC 由来サイトカインの同定

骨髄 MSC と iMSC の培養上清を用いて、120 個のサイトカインの発現を検出できるサイトカイン抗体アッセイを行った (abcam)。リコンビナント uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) (R&D systems), BDNF (Peprotech), IGF-BP6 (Peprotech), uPA (urokinase-type plasminogen activator) (R&D Systems) 存在下で Wound healing assay を行い、細胞の移動能を評価した。

結果

1. iMSC との共培養により、ヒト筋前駆細胞の増殖や分化が促進され、ヒト筋前駆細胞の移植効率が向上した。骨髄間葉系幹細胞との共培養では移植効率は変化なかった。
2. iMSC は、骨髄由来間葉系幹細胞に比べて、uPAR、BDNF、IGFBP-2 を細胞外に多く分泌していた。
3. uPAR、BDNF は筋前駆細胞の移動を *in vitro* で促進した。
4. uPAR をヒト筋前駆細胞株である Hu5/KD3 細胞の培養系へ加えて培養した後、*NOD/Scid* マウスの前脛骨筋に移植したところ、移植細胞の生着と筋分化が促進した。
5. uPAR のリガンドである uPA は、uPAR の効果をさらに向上させた。

考察

ヒト iPS 細胞から誘導した間葉系幹細胞は、uPAR を分泌することで、ヒト筋前駆細胞の DMD モデルマウス骨格筋への移植効率を上げたと考えられる。uPA はさらにその効率を上げたことから、uPAR が、uPA を活性化することで筋前駆細胞の移植効率を上げることが示唆された。

結論

ヒト iPS 細胞から誘導した間葉系幹細胞は、ヒト筋前駆細胞の DMD モデルマウス骨格筋への移植効率を上げた。筋ジストロフィーに対する細胞移植治療への応用が期待される。本研究成果は Stem Cell Research & Therapy 誌に原著論文として発表した（文献 4）。

参考文献

1. Sakai-Takemura F, et al., *Sci Rep.* 2018; 8:6555.
2. Arpke RW, et al. *Stem Cells.* 2013; 31:1611-1620.
3. Shiomi, K, et al. *Gene Ther.* 2011; 18:857-866.
4. Elhussieny A, et al. *Stem Cell Res Ther.* 2021; 12:532.

ゲノム編集技術を用いた筋ジストロフィー治療法の開発研究

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子変異が原因となって引き起こされる。したがって、この原因たる遺伝子変異を修復できれば根治に繋がると期待される。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は巨大で、従来の遺伝子治療用ベクターでは導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴを利用してジストロフィン遺伝子の特定のエクソンをスキッピングさせることによりジストロフィンの蛋白質読み枠を回復できることが知られており、世界中で研究開発と臨床研究が進められている。しかしながら、アンチセンスオリゴは mRNA に作用するため、効果は一過性であり、治療効果を生涯にわたって継続させるためには、頻回繰り返し投与が必要となる。そこで我々は、新たに登場した CRISPR ゲノム編集技術に注目し、ゲノムレベルでエクソンスキッピングを誘導する事を目指す。特に、DNA の二本鎖切断を伴わない Base Editor 技術は、より安全性の高いシステムとして注目されており、実際ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングへの応用についても研究報告があるが、どのように細胞や生体組織へ送達するかが鍵である [Taha E et al., J Cont Release, 2022]。

世界的には AAV ベクターを用いて CRISPR-Cas9 スクレアーゼや Base editor の送達が行われているが、AAV ベクターは数年以上にも渡って外来遺伝子が発現するため、Cas9 を発現させた場合にはオフターゲット変異導入やベクター断片挿入のリスクが高まる。我々はウイルス様粒子 NanoMEDIC を用いた独自の一過性導入技術 [Gee P et al., Nat Commun, 2020] の開発を進めており、安全性の高い治療法開発を目指す。特に、Base Editor は Cas9 単独と比較しても更にサイズが大きく、通常のウイルスベクター (AAV 等) での送達は困難である。そこで、我々が以前開発したウイルス様粒子を用いたタンパク質送達システム NanoMEDIC を活用し、Base Editor の搭載および送達を目指す。

方法

Base Editor にはアデニンを変換する Adenine Base Editor と、シトシンを変換する Cytosine Base Editor に大別されるが、融合するドメインやリンカー構造などに応じて複数のタイプが知られている。また、NanoMEDIC 中に標的タンパク質を内封して送達するためには、化合物によりヘテロ二量体形成を誘導する FRB ドメインを融合する必要がある。我々は Base Editor に FRB ドメインを融合する方法として、N/C 末端の他、様々なリンカー配列を検討し、NanoMEDIC 画分への Base Editor 内封効率をウェスタンブロット解析した。また、VSV-G 外皮タンパク質に加えて、BaEV 外皮タンパク質を添加することにより、NanoMEDIC 粒子の産生性および Base Editing 活性について検証を行った。エクソンスキッピング活性測定については、エクソンスキッピングが誘導されるとルシフェラーゼが発光するレポーターベクターを使用した。

結果

Base Editor に複数のリンカー (AS リンカー、GS リンカー、XTEN リンカー) を介して FRB ドメインを融合した所、何れのリンカーでも NanoMEDIC 粒子中に Base Editor を内封できることを見出した。また、従来の VSV-G 外皮に加えて、BaEV 外皮を添加した所、適切な比率で混合した時に、VSV-G 単独よりも NanoMEDIC の産生能力および一塩基編集能力が向上することを見出した。

考察

Base Editor はスクレアーゼタイプの Cas9 と比較して分子サイズが大きく、従来の NanoMEDIC 送達技術だけでは送達効率が十分でなかった。

結論

NanoMEDIC 送達システムを改良することにより、Base Editor を細胞内へと送達可能なシステムの開発に成功した。現在、論文執筆を準備中である。

参考文献

Taha E et al., J Control Release, 2022

Gee P et al., Nat Commun, 2020

間葉系前駆細胞を標的とした新たな筋ジストロフィーの治療法開発

上住聡芳
徳島大学

緒言

筋ジストロフィーでは、骨格筋の脂肪化・線維化が起こる。脂肪化・線維化はそれ自体が筋力・筋機能低下の要因となるだけでなく、他の治療法（細胞移植治療や遺伝子治療）の効率を低下させることにもつながり問題となる。骨格筋の脂肪化・線維化の原因は長らく不明であったが、分担研究者らは筋間質に存在し筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞の同定に成功し、この細胞が脂肪化・線維化の起源となることを世界で初めて明らかにした^{1, 2)}。間葉系前駆細胞は病態に寄与する一方、再生過程では筋衛星細胞を支持するニッチ細胞として機能し、筋再生を促進する³⁾。さらに、分担研究者らは定常状態の筋の維持に間葉系前駆細胞が必須の役割を果たしていることも明らかにしている⁴⁾。このことから、脂肪化・線維化の抑制を目的とする場合、単に間葉系前駆細胞の死滅を図るだけでは、間葉系前駆細胞の良性の機能を阻害することにつながりかねない。よって、真に効率的な筋ジストロフィーの治療には間葉系前駆細胞の二面性を理解し、制御することが必要になる。本研究では、脂肪化・線維化の原因となる間葉系前駆細胞を制御する手法の開発に取り組む。脂肪化・線維化の責任細胞に焦点を当て、研究開発を行うことで、これまで不可能であった脂肪化・線維化を抑制する画期的治療が可能になると期待される。また、間葉系前駆細胞による筋衛星細胞支持機能を明らかにできれば、筋再生促進療法へ発展することも期待できる。さらに、原因遺伝子の発現回復を図る他の根本的治療法の治療効果を向上させることにもつながるため、本研究は筋ジストロフィー治療の実現に資する有益な成果をもたらすと考えられる。

方法

本研究では、間葉系前駆細胞を制御することで脂肪化・線維化を抑制し、筋再生を促進する筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。

すでに、間葉系前駆細胞の二面性の解析、および、ヒト骨格筋由来の高品質な間葉系前駆細胞を利用した薬剤スクリーニングからレチノイン酸シグナルが間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制することを見出している。また、間葉系前駆細胞に効率よくレチノイン酸シグナルを活性化させる化合物を同定している。そこで、筋ジストロフィーモデルマウスを用いて本化合物の治療効果を検討するとともに、筋再生におけるレチノイン酸シグナルの機能的意義を追究し、本シグナルに基づいた筋ジストロフィー治療のさらなる効率化を図る。

結果

レチノイン酸シグナルの機能的意義を精査するため、間葉系前駆細胞特異的にレチノイン酸シグナルが阻害されるマウスを用いて筋再生過程を精査した。コントロールマウスと比較して、間葉系前駆細胞特異的レチノイン酸シグナル阻害マウスでは、間葉系前駆細胞における炎症関連遺伝子が高発現していた。この遺伝子発現を反映し、間葉系前駆細胞特異的レチノイン酸シグナル阻害マウスでは、炎症の収束に遅延が見られた。

考察

間葉系前駆細胞特異的レチノイン酸シグナル阻害マウスの表現型から、間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルが炎症関連遺伝子の発現を抑制しており、筋再生に伴う炎症の収束に必要であることが明らかとなった。

結論

間葉系前駆細胞は炎症の収束に必須の役割を果たしており、間葉系前駆細胞における cell-autonomous なレチノイン酸シグナルが、この炎症制御の中心的な分子機構であると考えられた。

参考文献

- 1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2):143-52. 2010.
- 2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-64. 2011.

- 3) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol* 5: 68. 2014.
- 4) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H et al., Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J Clin Invest*. 131(1):e139617. 2021.

筋サテライト細胞を用いた筋ジストロフィー治療開発の基盤研究 一 負荷依存的に筋サテライト細胞が増殖する分子機構一

深田 宗一郎

大阪大学大学院薬学研究科
筋幹細胞創薬プロジェクト

金重 紀洋*, 斎藤 隼人*, 中村 彩沙*,

上住 聡芳**

*大阪大学大学院薬学研究科
筋幹細胞創薬プロジェクト

**徳島大学医歯薬研究部

緒言

筋ジストロフィー治療開発において「遺伝子・核酸・ゲノム治療」, 「薬物治療」, 「幹細胞・再生治療」が3本柱としてあげられる。他の治療法にはない「幹細胞・再生治療」の最大の利点は、失った筋線維を新たに作ることができる点である。しかし、細胞移植による「幹細胞・再生治療」は局所に限定されるため、全身性の疾患である筋ジストロフィーにおいては常に課題となっている。筋サテライト細胞の機能低下は筋ジストロフィーの病態進行と密接に関わっているため、人為的に全身の筋サテライト細胞の再生能力を改善することができれば、新しい幹細胞・再生治療に資することが期待される 1)。申請者はマウス筋肥大モデルや運動モデルなどにおいて、負荷筋の筋サテライト細胞が実質的に増殖することを見出している 2)。実験的な筋再生モデルと比較してこれらモデルの筋サテライト細胞の周辺環境の変化は劇的には変化しないため、筋サテライト細胞の増殖・自己複製機構解明において非常に優れたモデルと考えた 3-5)。本年度は、外科的な過負荷モデルにおける筋サテライト細胞の増殖に間葉系前駆細胞が必須であることを明らかにした。

方法

マウス

C57BL/6, $P\alpha^{CreERT-Rosa-DTA}$ 6), $P\alpha^{CreERT::Yap^{flox/flox}}$:: $Taz^{flox/flox}$, $Pax7^{CreERT2::CD47^{flox/flox}}$ マウスを当該施設の倫理規定に従い飼育, 実験を行なった。

Tenotomy および SA モデル

マウス右後肢足首の皮膚を一部切開し同筋の協働筋である腓腹筋およびヒラメ筋の遠位腱であるアキレス腱をイソフルラン麻酔下にて約 1 mm 切除した後に皮膚を縫合した。また、同マウス左後肢には Sham 処置として皮膚の切開および縫合のみを実施した。長期的な筋肥大効率を検証するために、アキレス腱だけでなく、腓腹筋・ヒラメ筋の 80% を切除する synergistic ablation (SA) モデルも併用した。

筋サテライト細胞由来筋線維核の同定

EdU (5-ethynyl-27-deoxyuridine; Thermo Fisher Scientific) を 0.5 mg/mL となるよう PBS に溶解し、10 mL/kg の投与容量で一日一回解剖日まで腹腔内投与した。Tenotomy 7 日目に足底筋を摘出し、切片を作成後、添付書に従い EdU 検出を行なった。また、同時に dystrophin に対する染色と核染色も実施した。

間葉系前駆細胞由来分泌因子の同定

C57BL/6, $P\alpha^{CreERT::Yap^{flox/flox}}$:: $Taz^{flox/flox}$ マウスなどから、間葉系前駆細胞を単離し、RNA-seq 解析を行うことで、Yap/Taz 依存かつ間葉系前駆細胞由来の分泌因子を同定した。

結果

1. 筋肥大効率

間葉系前駆細胞の除去マウス、間葉系細胞特異的な Yap/Taz 欠損マウス、筋サテライト細胞特異的な CD47 欠損マウスでは、SA12 週後にそれぞれのコントロールと比較して、筋重量の増加抑制、筋線維サイズの増加抑制が観察できた。

2. 筋サテライト細胞由来筋線維核

Tenotomy 7 日目の足底筋において、sham ではほとんど検出できない EdU 陽性の筋サテライト細胞由来筋線維核が Ope 群で増加していた。しかし、間葉系前駆細胞の除去マウス、間葉系細胞特異的な Yap/Taz 欠損マウス、筋サテライト細胞特異的な CD47 欠損マウスとも、それぞれのコントロールと比較して EdU 陽性筋線維核数は顕著に抑制されていた。

3. 間葉系前駆細胞由来分泌因子

過負荷依存的に間葉系前駆細胞は沢山の分泌因子を発現することが明らかとなった。その中に

Yapにより制御されている遺伝子が数多くふくまれており、さらに、Yap/Taz欠損の間葉系前駆細胞ではTenotomy群であっても、変動する遺伝子がコントロールと比較して激減することも観察した。さらにCD47のリガンドとして働き、Yap/Tazによりその発現が制御されるThrombospondin-1 (Thbs1)を同定した。Thbs1のC末端由来ペプチド(PKHB1)を用いた実験より、in vitro, in vivoにおいてCD47刺激は筋サテライト細胞の増殖を促進することも明らかとなった。さらに、筋サテライト細胞の静止期シグナルとして機能するカルシトニン受容体(7-9)欠損マウスにPKHB1を投与すると、損傷も負荷のない状態で筋サテライト細胞の増殖および筋線維核数の増加が実現できることも明らかとなった。

考察

過負荷依存的な筋サテライト細胞の増殖には間葉系前駆細胞が必須であり、間葉系前駆細胞由来Thbs1が筋サテライト細胞上のCD47を刺激することでその増殖を制御していることが明らかとなった。また、間葉系前駆細胞内のYap/Tazも必須であることから、過負荷による力学的刺激を間葉系前駆細胞が機械刺激センサーであるYap/Tazにより感知しているモデルが考えられた。

結論

過負荷依存的な筋サテライト細胞増殖およびそれに伴う筋線維核数の増加、さらには筋肥大に、間葉系前駆細胞が必須である。また、骨格筋にかかる力学的負荷の変化を感知している細胞としても、間葉系前駆細胞は機能している(10)。

参考文献

- 1) Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, et al.: Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am. J. Pathol.* 176:2414-2424. 2010
- 2) Fukuda S, Kaneshige A, Kaji T, et al.: Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. *eLife* 8. pii: e48284. 2019
- 3) Fukada S, Akimoto T, Athanassia: Role of damage and management in muscle hypertrophy: different

behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy.

BBA-Mol Cell Res., (Review) 1867(9):118742. 2020

4) Fukada SI, Ito N. Regulation of muscle hypertrophy: Involvement of the Akt-independent pathway and satellite cells in muscle hypertrophy.

Exp Cell Res. (Review) 409(2):112907. 2021

5) Fukada SI, Nakamura A. Exercise/Resistance Training and Muscle Stem Cells. *Endocrinol Metab* (Seoul). (Review) 36(4):737-744. 2021

6) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M, Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Hino J, Fukada SI, Tsuchida K. Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J Clin Invest.* 131(1):e139617. 2021

7) Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche.

Cell Rep. 13(2):302-14. 2015

8) Zhang L, Noguchi YT, Nakayama H, Kaji T, Tsujikawa K, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Okada Y, Doi T, Watanabe S, Braun T, Fujio Y, Fukada SI. The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells.

Cell Rep. 29(8):2154-2163.e5. 2019

9) Baghdadi MB, Castel D, Machado L, Fukada SI, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche.

Nature. 557(7707):714-718. 2018

10) Kaneshige A, Kaji T, Zhang L, Saito H, Nakamura A, Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Tsujikawa K, Seno S, Hori M, Saito Y, Matozaki T, Maehara K, Ohkawa Y, Potente M, Watanabe S, Braun T, Uezumi A, Fukada SI. Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load.

Cell Stem Cell. 29(2):265-280.e6. 2022

筋組織を標的化する核酸医薬デリバリーシステムの開発

宮田 完二郎、内藤 瑞
東京大学大学院工学系研究科
マテリアル工学専攻

緒言

筋ジストロフィーに代表される難治性筋疾患治療に向けては、疾患原因遺伝子の発現を選択的に調節することができる核酸医薬に大きな注目が集まっている。一方で、核酸医薬などの中分子医薬は、血流を通じて腎臓から速やかに排泄されるため、筋組織への集積効率が非常に低いことが課題として挙げられる。

本研究では、核酸医薬を効率良く筋組織に集積させることを目指し、核酸医薬デリバリーシステムの開発に取り組んだ。本年度は、デリバリーシステムのサイズに注目し、筋組織への集積効率が最大となるサイズを明らかにする評価に取り組んだ。すなわち、8–32 nm の範囲でサイズの異なる高分子材料(モデルデリバリーシステム)を調製し、マウスの尾静脈投与後の筋組織集積量(Area Under Curve, AUC)を比較した。

方法

モデルデリバリーシステムの合成

サイズが異なるデリバリーシステムのモデルとして、分子量の異なるポリエチレングリコール(PEG)がポリアスパラギン酸(PAsp)の側鎖に導入されたグラフト共重合体 PAsp-g-PEG を合成した。合成の確認は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により反応前後での free PEG 量の変化を測定することで行った。また、各 PAsp-g-PEG を蛍光標識し、蛍光相関分光法(FCS)により流体力学径を測定した。

血中滞留性評価

各種蛍光標識 PAsp-g-PEG および PEG 単体(分子量 12 kDa)を正常マウス尾静脈より投与し、24, 48, 72 時間後に採血し、血液サンプルの蛍光強度を測定することで、血液中の PAsp-g-PEG(あるいは PEG 量)を算出した。

臓器分布

各種蛍光標識 PAsp-g-PEG および PEG 単体(分子量

12 kDa)を正常マウス、あるいは筋ジストロフィーモデルマウス(*mdx* マウス)の尾静脈より投与し、一定時間経過した後に、各種臓器を摘出・ホモジナイズし、組織懸濁液の蛍光強度を測定した。得られた各時間の蛍光強度値に基づいて AUC を算出した。

筋組織切片観察

蛍光標識 PAsp-g-PEG および PEG 単体(分子量 12 kDa)を *mdx* マウス尾静脈より投与し、48 時間後に筋組織を摘出・切片を作成し、核および細胞膜を染色した後に蛍光顕微鏡観察を行った。

結果と考察

SEC による解析から、得られた一連の PAsp-g-PEG は、100 量体の PAsp の側鎖カルボキシ基の 60–80% に PEG が導入されており、分子量分布が 1.3 以下の分布の狭いグラフト共重合体であることが確認された。また、FCS 解析より、各 PAsp-g-PEG の流体力学直径は、11 nm (分子量 2 kDa の PEG)、15 nm (分子量 5 kDa の PEG)、22 nm (分子量 12 kDa の PEG)、32 nm (分子量 20 kDa の PEG)と算出された。

各蛍光標識 PAsp-g-PEG を尾静脈投与したところ、投与後 96 時間後においては 10%以上が血流中に滞留していることが確認された。分子量の 12 kDa (8 nm)の PEG は投与後 24 時間以内に血中から消失したことから、PAsp-g-PEG の高い血中滞留性は、サイズが大きくなったことにより腎排泄を大きく抑制したためと考えられる。また、この際の閾値は、8–11 nm にあることが示唆された。

次いで、筋組織への集積量を比較したところ、8 nm の PEG はほとんど集積しなかった(<0.1%)一方で、一連の PAsp-g-PEG は~2%と相対的に高い修正量を示した。また、有意差は見られなかったものの、PAsp-g-PEG 同士の比較では、小さいもの程高い筋組織集積量を示すことが明らかになった。興味深いことに、PAsp-g-PEG の筋組織集積量は、正常マウスに比べ、*mdx* マウスでは 2–3 倍増加することが見出された。*mdx* マウスの筋組織切片観察より、PAsp-g-PEG は炎症性筋細胞を中心に集積している様子が観察されたことから、炎症性の筋組織においては、高分子量物質の透過性が大幅に亢進していることが明らかになった。

以上、本研究を通じて、11–15 nm 前後のデリバリーシステムは正常および炎症性筋組織への集積性に優れることが明らかになった。

研究課題名：疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

分担研究課題名：筋量制御におけるプロスタグランジンの関与

東京農工大学 工学研究院 稲田 全規

緒言

本研究の目的は、筋量制御におけるプロスタグランジンファミリー因子の機能を解析し、廃用性筋萎縮、筋ジストロフィー、サルコペニアなどの筋萎縮性疾患の治療法の開発につなげることである。プロスタグランジンであるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の産生動態と機能解析を行い、筋萎縮の主因となっているプロスタグランジンを明らかにする。さらに、標的となるそれぞれのプロスタグランジンの産生阻害剤を用い、筋萎縮性疾患の治療薬開発を目指す。

検討項目：

質量分析を用いた筋組織におけるプロスタグランジンの分布解析

昨年度、プロスタグランジン（PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α ）の検出法について、最適なマトリクスを用いてプロスタグランジンのイオン化最適条件の決定と質量分析イメージングへの適用条件を決定した。この測定方法を用いて、筋組織におけるプロスタグランジンの分布解析するため、下腿三頭筋および大腿四頭筋のサンプルの最適化を実施した。液体クロマトグラフィーを用いた分子カラムワークの後に、質量分析装置を用い、筋組織において産生されるプロスタグランジンとして、PGE2、PGD2、PGJ2、PGI2、PGF2 α の産生を解析した。

筋萎縮モデルマウスにおけるプロスタグランジンの産生動態

筋萎縮モデルマウスとして、尾部懸垂マウスを用い、筋組織サンプルとして下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を作製した。その後、これまでに確立したMALDI-TOF-MSを用いた定量解析法を用い、筋萎縮で影響する測定ポイントの設定について、最適な条件検討を進め、筋組織におけるプロスタグランジン産生を検出・同

定した。

結論

今年度、研究課題では、筋組織におけるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α ファミリー因子の産生動態をMALDI-TOF-MS質量分析を駆使して、その検出法の予備検討と測定を行った。これらの結果、下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を用い、筋組織において産生されるプロスタグランジンとして、PGE2、PGD2、PGJ2、PGI2、PGF2 α の産生を解析した。また、筋萎縮におけるプロスタグランジンの産生解析では、尾部懸垂マウスにおける筋萎縮の進展に伴って、PGE2とPGD2が産生されることを見出した。質量分析によりPGE2とPGD2産生細胞の解析を行ったところ、PGE2とPGD2の共発現が認められた。今後の詳細な検討を進めてゆく。

さらに、次年度では、筋萎縮モデルマウスにおけるプロスタグランジン阻害剤の効果を検証する。前年度までに得られた筋萎縮におけるプロスタグランジンの解析結果をもとに、標的プロスタグランジン候補の産生阻害剤を尾部懸垂マウスに投与し、筋萎縮の抑制効果を判定する。

さらに、これら同定されたプロスタグランジンの阻害剤を用いて、筋細胞分化の機能性実験を進め、将来の廃用性筋萎縮治療薬の開発につなげる。

参考文献

1. Tominari T, Ichimaru R, Taniguchi K, Yumoto A, Shirakawa M, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Itoh Y, Shiba D, Miyaura C and Inada M. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. (2019) *Sci. Rep.* 9: 6614.
2. Tominari T, Akita M, Matsumoto C, Hirata M, Yoshinouchi S, Tanaka Y, Karouji K, Itoh Y, Maruyama T, Miyaura C, Numabe Y, Inada M. Endosomal TLR3 signaling in stromal osteoblasts induces prostaglandin E2-mediated inflammatory periodontal resorption. (2022) *J. Biol. Chem.* 298:101603.

分担研究課題名：DMD に対する遺伝子細胞治療の基盤技術開発

岡田 尚巳
東京大医科学研究所
遺伝子・細胞治療センター
分子遺伝医学分野

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対する根治療法は未だ開発段階で薬物治療による対症療法が主であるが、AAV を用いた遺伝子治療の開発が期待される。本研究では、*mdx* マウスや筋ジストロフィー犬 CXMD_J に対しマイクロ・ジストロフィン発現 AAV ベクター (AAV-μDys) を用いたマイクロ・ジストロフィン補充療法の開発を進めることを目的とする。AAV を用いた遺伝子治療において、transgene に対する免疫応答が問題となっている。この課題を克服するために、1) 固相支持担体を用いた AAV 発現培養系の構築、2) 治療遺伝子の配列最適化、3) カニクイザルでの検討、4) Exosome-AAV (Vexosome) を用いた検討を行った。

方法

1. 固相支持担体を用いて AAV 発現培養系の構築と大量精製法の開発を行った。
2. ヒトおよびイヌマイクロ・ジストロフィン配列の最適化を検討した。
3. カニクイザルに対して体性幹細胞と AAV8-LacZ を併用投与を行うため、AAV ベクターの大量精製を行った。
4. MSC 由来 Vexosome による無細胞系免疫寛容誘導の技術開発を行った。

結果

1. 接着細胞系で大量に細胞を培養し、AAV を作製する手段として、日本ボール株式会社の iCELLis Nano バイオリアクターを用いて AAV の作製を行った。また、培養上清から AAV を精製する方法の開発を行った。
2. 臨床用ベクターの規格決定に向けた取り組みとして、これまで検討を行ってきた SPc5-12¹⁾ に加え、CK7, 8, 9 プロモーター²⁾ を検討した。マイクロ・ジストロフィン配列についても、ループ構造を取りにくい配列に最適化し、発現ベクターを構築、大量精製を行い、投与実験を行う準備が整った。
3. カニクイザル成体に MSCs と AAV-LacZ を併用投与し免疫寛容を誘導する実験を行うため、AAV-LacZ を大量精製した。また、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所で飼育中のカニクイザルの血清について、AAV 中和抗体価のスクリーニングを行った。
4. 前年度まで CXMD_J に対し MSC と AAV の併用投与法を用いて免疫寛容誘導の検討を行っていた項目について、MSC 由来のエクソソームを介した miRNAs、サイトカインによる免疫寛容誘導が可能かどうかについて実験系の構築、MSC 由来

エクソソームおよびベクソソームの形態観察を行った^{3),4)}。

考察

1. ヒトおよびイヌにおける発現を最適化した AAV-μDys を作製し、投与実験を行うための準備が整った。
2. カニクイザルにおいて MSCs と AAV を併用投与する実験の準備が整った。
3. エクソソーム封入・結合 AAV ベクターについて、分離と定量を行った。

結論

ヒトおよびイヌ AAV-μDys の規格について検討を行い、構築、精製した。今後、これらのベクターを用いて *in vitro*, *in vivo* における発現および機能を確認し、治療用ベクターの規格を決定する。AAV ベクター投与時の免疫寛容誘導法についてはカニクイザルを用いた検討を行うが、さらに発展して MSC 由来ベクソソームを用いた無細胞系で同様の効果があるかどうかについて今後検討を行う。

参考文献

- 1) Li X., Eastman E. M., Schwartz R. J., et al: Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nature Biotech.*, 17:241-245, 1999
- 2) Hauser M. A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., et al: Analysis of Muscle Creatine Kinase Regulatory Elements in Recombinant Adenoviral Vectors, *Mol. Ther.*, 2:16-25, 2000
- 3) Matsuzaka Y., Tanihata J., Ooshima Y., Yamada D., Sekiguchi M., Miyatake S., Aoki Y., Terumitsu M., Yashiro R., Komaki H., Ishiyama A., Oya Y., U-Inoue Y., Inoue T., Takeda S., Hashido: The nSMase2/Smpd3 gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in *mdx* mice, *BMC Medicine*, 18:343, 2020
- 4) Matsuzaka Y., Hirai Y., Hashido K., Okada T. Therapeutic Application of Extracellular Vesicles-Capsulated Adeno-Associated Virus Vector via nSMase2/Smpd3, Satellite, and Immune Cells in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 23(3):1551, 2022

筋ジストロフィーモデル動物の病態に基づいたアンチセンス療法の開発

越後谷 裕介

日本大学生物資源科学部 獣医学科

緒言

RNA のスプライシング制御または分解を誘導できるアンチセンス人工核酸(ASO)は、遺伝子変異が原因で発症する様々な疾患に対して有望な治療法になることが期待されている。スプライシング制御型 ASO においては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であるジストロフィン(DMD)遺伝子のアミノ酸の読み枠修正(エクソン・スキッピング)を目的とした核酸医薬が上市されており、現在では異なる変異に対する ASO の開発が期待されている(1)。一方、RNA 分解型 ASO については、筋強直性ジストロフィー1 型(DM1)に対して臨床試験が実施された実績はあるが、製剤化には至っていない。ASO の実用化を促進するためには、効果的な修飾核酸の開発と共に、ASO の配列特異的な効果を効率的かつ正確に評価できるスクリーニング系の開発や、ASO の効果を適切に評価できる動物モデルとその詳細な特徴づけが必要とされる。

有効性に関わる ASO の細胞への取り込み効率は、骨格筋細胞の状態によって異なる(2)。そのため、より効果的な ASO 療法の開発には、加齢と共に変化する筋ジストロフィー骨格筋の分子・組織病態を正確に理解する必要がある(3)。特に異常伸長した CTG リピート変異が原因で発症する DM1 は、成人で発症し病態進行が緩徐であること、異常リピート数に応じて重症度が異なることが特徴として挙げられる。このような変動要因を標準化し、病態の本質的要素を抽出するためには、モデル動物を用いた詳細な研究が不可欠である。そこで本分担研究では、DMD および DM1 におけるモデル動物の開発、および加齢に伴う病態変化を解析することで、ASO 療法の開発を促進する基礎的知見を得ることを目的とした。

方法

DM1 骨格筋の加齢性病態を調べるため、FVB/N 系統を遺伝的背景に持ち、異常 CTG リピートが付加されたヒト骨格筋アクチン遺伝子が導入された DM1 モデルマウス(HSA*LR マウス)を用いた。一連の実験は、研究実施機関に設置された動物実験委員会お

よび遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した。2, 6, 12 および 18 ヶ月と月齢の異なる HSA*LR マウスから、麻酔下の圧迫排尿または安楽死処置時の失禁尿を採取し、尿中タイチンを Mouse Titin N-Fragment Assay Kit (株式会社免疫生物研究所)を用いて測定した。HSA*LR マウス骨格筋におけるミオトニア電位は、筋電位測定計(ニューロパック n1, 日本光電株式会社)を用いて測定した。Dmd エクソン 52 欠損ミニチュアブタモデルの開発は、アルバータ大学 横田俊文教授および Exemplar Genetics 社 Christopher Rogers 博士らと共同で実施した。

結果

HSA*LR マウスにおいて、尿中タイチンは雌雄共に 6、12 および 18 ヶ月齢で増加することが明らかとなった。特に 12 ヶ月齢で最も高い値が示され、18 ヶ月齢においてもコントロールの FVB/N マウスと比べて、顕著に高い値を示した。

筋電位測定では、HSA*LR マウスの筋強直の指標であるミオトニア電位(活動電位の異常延長)の簡易測定系を構築した。本測定系により、前脛骨筋、腓腹筋および大腿四頭筋の筋電位を測定したところ、ミオトニア電位は前脛骨筋および大腿四頭筋に比べて、腓腹筋において発生頻度が高く、持続時間が長いことが示された。

今年度は Dmd エクソン 52 欠損ミニチュアモデルブタの開発研究を論文化した(4)。本ジストロフィン欠損ミニチュアブタが、生後すぐの高い血清クレアチンキナーゼ値など、早期にジストロフィノパシー症状を呈するモデルであることを報告した。また、*in vitro* ではあるが、PMO を用いたエクソン 51 および 53 スキッピングがエクソン 52 欠損ブタ Dmd 遺伝子において評価可能であることを報告した。

考察

HSA*LR マウスの尿中において骨格筋由来のタイチン分解産物の上昇が初めて確認された。CTG リピートによる骨格筋変性は、ジストロフィン欠損骨格筋に比べて、患者およびモデル動物共に顕著ではないことが報告されている(5)。HSA*LR マウスの尿中タイチン値の上昇から、CTG リピートが低侵襲的に骨格筋変性を誘導し

ている可能性が示唆された。

本研究において、HSA*LR マウスにおけるミオトニア電位は腓腹筋で効率的に観察されることが示された。HSA*LR マウスを用いた病態または治療効果をミオトニア電位で評価する場合には、適切な骨格筋部位で実施する必要があると示唆された。また 18 ヶ月齢の高齢 HSA*LR マウスにおいても明らかなミオトニア電位が検出されたことから、本 HSA*LR マウスは、CTG リピートが原因となる骨格筋病態と加齢の関連性を解明するための有用なモデルになる可能性が示唆された。今後は、上記測定系やモデル動物を活用し、加齢骨格筋における表現型と CTG リピートによる分子病態メカニズムの関連性を詳細に解析し、効果的なアンチセンス療法の開発を目指す。

Dmd エクソン 52 が欠損したブタモデルは他のグループからもいくつか報告されている(6)。今年度の青木班班会議でも報告されたように、静岡県畜産技術研究所の大竹 正剛先生らのグループによるジストロフィン欠損マイクロブタモデルなど、中型大型動物におけるジストロフィン欠損モデルの開発が進められ、DMD を中心に動物モデルを基盤とした新たな筋ジストロフィー研究の発展が期待される。本報告(4) は今後の DMD モデルブタの研究発展の一助になると考えられる。

結論

尿中タイチンが DM1 の代表的なモデルである HSA*LR マウス骨格筋の新たなバイオマーカーになることが示唆された。また、本研究において HSA*LR マウスのミオトニア放電を検出するための簡易の筋電位測定系を構築し、本モデルが加齢に伴う筋強直症状の解析に有用である可能性を示した。

参考文献

1. Takeda S, Clemens PR, & Hoffman EP (2021) Exon-Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.*
2. Aoki Y, *et al.* (2013) Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol*

Genet 22(24):4914-4928.

3. Echigoya Y, *et al.* (2013) Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic mdx and mdx52 mice. *PloS one* 8(7):e69194.
4. Echigoya Y, *et al.* (2021) A Dystrophin Exon-52 Deleted Miniature Pig Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Evaluation of Exon Skipping. *International journal of molecular sciences* 22(23).
5. Mankodi A, *et al.* (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science (New York, N.Y.)* 289(5485):1769-1773.
6. Yu X, Bao B, Echigoya Y, & Yokota T (2015) Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping. *American journal of translational research* 7(8):1314-1331.

糖鎖の修飾機序の解明と生理活性の治療応用

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

緒言

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は、重度の筋ジストロフィーに加え、脳奇形や精神発達遅滞等の中枢神経障害、心筋症を伴う常染色体性劣性遺伝性疾患で、フクチン遺伝子の変異によって発症する。FCMD では基底膜ラミニンの受容体であるジストログリカン（DG）の糖鎖に異常が生じている。同様の糖鎖異常を示す筋ジストロフィーも世界的にみられ、DG 異常症と総称される。分担者らは、DG 糖鎖にはリビトールリン酸という修飾体が含まれており、フクチンは糖鎖にリビトールリン酸を組み込む酵素、DG 異常症遺伝子のひとつ ISPD はリビトールリン酸の糖鎖前駆体 CDP-リビトールの合成酵素であることを解明した(1)。つまり、リビトールリン酸糖鎖の欠落によって、ラミニン結合性の糖鎖が伸長できず、基底膜－細胞膜の連携が破綻することが発症要因となる。本分担課題においては、糖鎖修飾の分子機序に着目し、糖鎖異常の解消を基盤とする DG 異常症の治療法を開発する。

方法

DG 異常症、特に ISPD 欠損型に対する治療法の開発を目指し、ISPD 酵素反応に基づく糖鎖補充療法の基礎研究を実施する。具体的には、①ISPD 欠損および点変異マウスを作出し、②CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法の有効性を明らかにする。ISPD はリビトール 5 リン酸から CDP-リビトールを合成する酵素である。従って、ISPD 欠損型には CDP-リビトールの補充が有効と考えられる。また、リビトール 5 リン酸への親和性が低下するような病変性変異体では、リビトール 5 リン酸の投与も有効と考えられる。本計画では、ISPD の骨格筋特異的 conditional KO（cKO）マウスと点変異のゲノム編集マウスを作出し、その病態を解析する。次いで、これらのマウスへの CDP-リビトールやリビトール 5 リン酸の投与で治療効果が認められるか検証する。

結果

本年度は、骨格筋選択的な ISPD-cKO マウスを用

いて CDP-リビトール補充療法を検証した。ISPD-cKO マウスは、筋組織内 CDP-リビトール量の低下と DG 糖鎖異常をみとめ、典型的な筋ジストロフィー病変を示した(2)。発症後の ISPD-cKO マウスにアデノ随伴ウイルスベクターを用いて正常 ISPD 遺伝子を発現させたところ、CDP-リビトール量と糖鎖の回復が認められ、筋病変も劇的に改善した(2)。この結果は、治療後の介入であっても ISPD 欠損型 DG 異常症は治療可能であることを示唆しているとともに、CDP-リビトール補充療法が有効であることも示唆された。

そこで、CDP-リビトールを筋組織内に送達するために、プロドラッグ化した CDP-リビトール誘導体を合成し、糖鎖回復を指標にしたプロドラッグ活性と毒性の点から治療に有効と考えられるテトラアセチル型 CDP-リビトールを選択した。テトラアセチル型を 3 週にわたり連続投与したところ、部分的ではあるが糖鎖の回復が認められ、筋病変も有意に改善した(2)。以上の結果から、CDP-リビトール補充療法の有効性が示唆された。

考察

CDP-リビトール補充療法はどのような ISPD 変異であっても適応可能であり、また、フクチン（福山型）や FKRП（肢帯型 2I）など CDP-リビトールを基質として用いる酵素に対しても、変異の種によっては残存酵素活性を増強させ治療につながる事が考えられる。一方で、プロドラッグとしては更なる改良を加え、低用量で治療効果を発揮する誘導体を開発する必要がある。

結論

ISPD 欠損型筋ジストロフィーに対する CDP-リビトール補充療法の有効性を実証した。

参考文献

- (1) Kanagawa, M., et al. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. Cell Rep. 14, 2209-2223 (2016).
- (2) Tokuoka, et al. CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates ISPD-deficient muscular dystrophy mouse model. Nat Commun. 13, 1847 (2022)

ジストロフィン欠損モデル動物における Ca^{2+} 依存性 STAC3 および JP1 の分解

山田 崇史
札幌医科大学

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に伴う筋力低下には、ジヒドロピリジン受容体 (DHPR) からリアノジン受容体 (RyR) への興奮収縮連関不全を要因とした、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量の低下が関与する。しかしながら、DMD 筋において、DHPR-RyR の連関不全が、どのような分子メカニズムで生じているかは不明である。また、筋が引き伸ばされながら収縮する伸張性収縮 (ECC) は、筋に強い機械的負荷が加わる収縮様式として知られており、DMD 筋では、ECC に対する感受性が増大することが報告されている (Allen *et al.*, 2016)。そこで本研究では、DMD モデル動物である mdx52 ならびに DMD-null/NSG マウスを用い、骨格筋の興奮収縮連関機能に重要な役割を果たす SH3 and cysteine-rich domain 3 (STAC3) および junctophilin 1 (JP1) に焦点をあて、DMD に伴う筋力低下や ECC に対する脆弱性亢進のメカニズムを検討した。

方法

本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け実施した (承認番号: 20-084)。実験には、8-11 週齢の野生型 C57BL/6J (WT, $n=8$) および mdx52 マウス ($n=8$)、NSG ($n=6$) および DMD-null/NSG ($n=6$) を用いた。マウスの飼育は、12 時間の明暗サイクルの照明下で室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ を常時維持した飼育室にて行い、水および試料は自由摂取とした。

麻酔下にてマウスを背臥位とし、予め剃毛した左後肢を小動物用トルク測定器 (竹井機器工業社製) に、足関節角度が底背屈 0 度となるように固定した (Yamada *et al.*, 2021)。その後、表面電極を下腿後面と下腿内側面の皮膚上から下腿三頭筋を挟むように貼付した。等尺性収縮トルクは、最大上刺激強度 (45V)、パルス幅 0.5 ms の電気刺激を、1-200 Hz の刺激頻度で 600 ms 間負荷することで測定した。一方、ECC トルクは、最大上刺激強度 (45V) の電気刺激をパルス幅 0.5 ms、刺激頻度 50 Hz で与えると

同時に、足底板と連結したモーターによって、マウスの足関節を角速度 $150^\circ/\text{s}$ で背屈させることで測定した (Himori *et al.*, 2021)。なお、関節の運動範囲は、底背屈 0° から背屈 40° とし、4 秒おきに 100 回の ECC を負荷した。

結果

1. ジストロフィン欠損筋における等尺性トルクの低下とカルパイン活性化を伴う STAC3/JP1 の分解

WT マウスに比べ、mdx52 マウスでは、ISO トルクの著しい低下が認められた。また、mdx52 マウス骨格筋における機能障害は、カルパイン 1 の活性化と、STAC3 および JP1 の減少を伴っていた。さらに、DMD-null/NSG マウスにおいても、mdx52 マウスと同様の変化が観察された。

2. ジストロフィン欠損筋における DHPR からの STAC3/JP1 の解離

免疫沈降法を用いた検討の結果、mdx52 ならびに DMD-null/NSG の骨格筋では、DHPR からの STAC3/JP1 の解離が生じることが明らかとなった。

3. Ca^{2+} 依存性の STAC3/JP1 の分解

STAC3/JP1 が Ca^{2+} 依存性の分解を受けるかどうかを、*in vitro* の系で検討した。NSG マウス骨格筋では、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 溶液に 60 分間曝露することで、STAC3 の分解が生じた。一方、DMD-null/NSG マウスの骨格筋においても Ca^{2+} 依存性の STAC3 分解が観察されたが、それは $20 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 溶液において生じた。また、JP1 に関しても同様の傾向が認められ、NSG マウス骨格筋では $0.2 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 溶液で、一方、DMD-null/NSG マウスの骨格筋では、 $2.5 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 溶液において分解が生じた。

ジストロフィン欠損筋において、 Ca^{2+} 依存性の STAC3/JP1 の分解が抑制されるメカニズムを検討するために、内因性のカルパイン抑制物質である calpastatin の発現量を測定したところ、NSG に比べ DMD-null/NSG において約 2 倍の発現量増大が認められた。

4. ジストロフィン欠損筋における伸張性収縮 (ECC) による Ca^{2+} 依存性の STAC3/JP1 の分解促進

DMD-null/NSG の骨格筋では、NSG 骨格筋に比べ、ECC 中のトルクが急激に低下した。また、ECC 負荷

後 3 時間における等尺性トルクは、NSG に比べ DMD-null/NSG において顕著に減少し、それは、Evans blue day 陽性線維数の増大、カルパイン 1 の活性化増大、DHPR, STAC3, JP1 の発現量低下を伴っていた。

考察

この 20 年ほどの間に、STAC3 ならびに JP1 が、DHPR と RyR との機能連関を担う重要なタンパク質であることが示され、興奮収縮連関の理解が大きく前進した(Ito *et al.*, 2001; Horstick *et al.*, 2013). 本研究の結果、安静時のジストロフィン欠損筋において、STAC3 および JP1 の減少や、STAC3/JP1 の DHPR からの解離が認められたことから、これが DHPR と RyR の連関不全や、それを原因とする筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量の低下に寄与することが示唆された。また、*in vitro* の実験系において、STAC3 および JP1 が Ca^{2+} 依存性タンパク分解酵素であるカルパインの基質となることが示された。一方、ジストロフィン欠損筋では、内因性のカルパイン抑制物質である calpastatin の増加により、カルパイン依存性の分解を受けにくくなることが示唆された。さらに、ジストロフィン欠損筋における ECC に対する脆弱性にも、細胞外からの Ca^{2+} 流入によるカルパイン依存性の STAC3/JP1 の分解が関与することが示された。

結論

本研究では、2 つの系統の DMD モデルマウスを用い、ジストロフィン欠損筋における Ca^{2+} /カルパイン依存性の STAC3/JP1 分解が、安静時の興奮収縮連関障害、ひいては筋力低下に寄与することを明らかにした。また、ジストロフィン欠損筋における ECC に対する脆弱性の亢進にも、これらの経路の活性化が関与することが示された。

参考文献

Allen DG, Whitehead NP & Froehner SC. (2016). Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca^{2+} , Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* **96**, 253-305.

Himori K, Ashida Y, Tatebayashi D, Abe M, Saito Y, Chikenji T, Westerblad H, Andersson DC & Yamada T. (2021). Eccentric Resistance Training Ameliorates Muscle Weakness in a Mouse Model of Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol* **73**, 848-857.

Horstick EJ, Linsley JW, Dowling JJ, Hauser MA, McDonald KK, Ashley-Koch A, Saint-Amant L, Satish A, Cui WW, Zhou W, Sprague SM, Stamm DS, Powell CM, Speer MC, Franzini-Armstrong C, Hirata H & Kuwada JY. (2013). Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nat Commun* **4**, 1952.

Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K & Takeshima H. (2001). Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* **154**, 1059-1067.

Yamada T, Kimura I, Ashida Y, Tamai K, Fusagawa H, Tohse N, Westerblad H, Andersson DC & Sato T. (2021). Larger improvements in fatigue resistance and mitochondrial function with high- than with low-intensity contractions during interval training of mouse skeletal muscle. *Faseb j* **35**, e21988.

DMD 遺伝子エクソン 3-9 スキップ治療の開発と BMD モデルマウスの作製

中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター
臨床研究部、脳神経内科

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子変異によりジストロフィンが欠損する致死性筋疾患である。DMD 遺伝子変異の約 10%が exon 3~7 の領域に集積しており、この領域内に変異を有する DMD に対し、exon 3-9 skip 治療が有望な治療法になる可能性について検討する。

また、BMD の重症度は遺伝子変異により異なることが分かってきたが、ジストロフィンの構造、機能、発現量の違いによるものか否かについて未だ明らかになってはいない。この検証は患者で行うことが困難であるため、ヒトで軽症や重症の遺伝子変異を持つ BMD モデルマウスを作製し、重症化メカニズムを解明する。

方法

1. DMD exon 3-9 スキップ治療の開発

令和 2 年度では理研 BRD から入手した健常者の iPS 細胞を用いゲノム編集により DMD の表現型を示す exon 3-7 欠失型及び exon 3-9 欠失型 iPS 細胞を作製した。本年度はこれらの iPS 細胞から分化誘導した骨格筋、心筋細胞について①両欠失型の RNAseq による網羅的遺伝子発現解析、②exon 3-7 欠失型細胞に対してアンチセンス核酸 (AO) およびゲノム編集による exon 8, 9 skip 治療の治療効果の比較および exon 3-9 skip 治療の有効性について検討した。

2. BMD モデルマウスの作製

BMD 自然歴調査研究 (MDCTN プロジェクト研究、AMED 難治性疾患実用化研究) の結果から、BMD では遺伝子型により、骨格筋、呼吸、心臓、中枢神経機能に違いが見られることが明らかになった。特に発生頻度の高い変異の中で exon 45-49 欠失は重症、exon 45-47 欠失は中等症、exon 45-48 欠失は軽症、exon 45-55 欠失は最軽症であったことから、各々のモデルマウスをゲノム編集により作製を行い、その表現型について解析した。

結果

1. DMD exon 3-9 スキップ治療の開発

RNA-Seq による網羅的遺伝子解析による exon 3-7 欠失 (DMD 型) と exon 3-9 欠失 (BMD 型) の比較では axon guidance、spliceosome などの遺伝子群の発現が増加していた一方で、cAMP signaling pathway、regulation of actin pathway などの遺伝子群の発現が低下していた。また、exon 3-7 欠失型心筋細胞に対し、exon 8, 9 の skip を誘導する PMO により量依存性にジストロフィンの発現回復を認めた。

2. BMD モデルマウスの作製

exon 45-47 欠失および exon 45-48 欠失マウスの作製に成功した。4 週齢で解析した結果、体重は野生型と同じで、mdx に比して有意に軽量であった。一方、上肢筋力は強い順から野生型、exon 45-48 欠失、exon 45-47 欠失、mdx であった。筋病理は中心核線維数、大小不同、間質の細胞浸潤は mdx、exon 45-45 欠失、exon 45-48 欠失で目立っていた。

考察

1. DMD exon 3-9 スキップ治療の開発

Exon 3-9 skip 治療はゲノム編集で作製した iPS モデル細胞を対照にして PMO による改善効果の検討が可能とする基盤ができた。このモデルを用いて治療後の機能的および遺伝子発現レベルでの検討を行うことが可能と考えている。

2. BMD モデルマウスの作製

各種の変異を有する BMD モデルマウスの作製に成功した。ヒト BMD の表現型の再現性を確認した上で重症化メカニズムを解明するとともに、臨床への応用とエクソン・スキップ治療を含めた治療法開発研究を行いたいと考えている。

参考文献

1. Nakamura A., et al. Deletion of exons 3-9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. J Hum Genet 2016; 61:663-7.
2. Kyrychenko V., et al. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing JCI Insight 2017; 2(18):e95918.

筋ジストロフィー関連モデルマウスの生産・供給システムの検討

保田 昌彦

公益財団法人実験動物中央研究所

緒言

筋ジストロフィーの要因究明や治療研究のために、我々は継続して、筋ジストロフィー関連モデルマウスならびにそのコントロール系統を微生物学のおよび遺伝学的統御のもとで維持し、研究班をはじめとする多くの研究グループに供給してきた。また、筋ジストロフィー研究に適したモデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術ならびに生殖工学技術の開発に努め、これらの技術を応用した実験動物学的改良を行ってきた。

1 として、より高い精度と再現性を得られる動物実験のために維持動物の品質管理を継続的に実施してきた。2 として、モデルマウスおよびコントロール系統マウスを永続的に維持し、国内研究機関へ継続的な供給を行った。3 として、既存モデルマウスの背景系統の改良ならびに置換、新規モデルマウスの作出を行った。

方法・結果

維持動物の品質管理

維持動物の品質管理のため、ビニールアイソレーター（VI）装置内で管理している維持動物の定期的な微生物学のおよび遺伝学的なモニタリング検査を定期的に継続的に実施している。令和3年度も微生物モニタリングは、VI あたり 1 ヶ月もしくは 3 ヶ月に 1 回の頻度で、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目の検査を実施し、全項目陰性であることを確認した。遺伝モニタリングは、年 1 回

もしくは 2-3 世代に 1 回の頻度で、STR マーカーによる遺伝的プロファイルを作成し、遺伝学的品質が守られていることを確認した。

2. 筋ジストロフィーモデルマウスの維持とタネ動物の供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J (B6)-*dy*、C57BL/10ScSn-*mdx* (B10-*mdx*)、B10-*mdx*.utrophin KO、NOG-*mdx*、DBA/2N (D2)-*mdx* およびこれらのコントロール系統マウスを VI 内での交配ならびに胚の凍結保存によって維持し、原則として繁殖用タネ動物を当班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給してきた。令和3年の供給実績は、国内 24 機関に 109 回供給し、B10-*mdx* を 933 匹、B10 を 40 匹、NOG-*mdx* を 10 匹等の累計 983 匹を分与・供給した。

3. 筋ジストロフィーモデルマウスの管理・供給体制の確立と新規モデルマウスの作出

モデルマウス供給数増加に対応するため、B10-*mdx* マウスの生産を実中研から日本クレア株式会社に移管した。また B10-*mdx* のコントロール系統の改良のため、C57BL/10ScN と B10 (C57BL/10ScSn)-*mdx* との戻し交配を 8 回実施し、*Tlr4* 変異および *mdx* を排除した B10-*mdx* の背景コントロール系統として C57BL/10ScSnJic を樹立した。加えて、B10-*mdx* の背景系統を C57BL/6JJc1 に置き換えた C57BL/6J-*mdx*/Jic を新たに樹立した。

再生医療研究により有用な筋ジストロフィー・モデル動物を作出することを目的として、筋ジストロフィーの免疫不全モデルである NOG-*mdx* (1) に加え、筋力低下を呈する D2-*mdx* を背景とした免疫不全モデル DBA/2N-*mdx*-IL-2RgKO, RAG2KO 系統を樹立し、頒布のための準備に取り掛かった。

考察・結論

筋ジストロフィーモデル動物の品質管理については、高い水準の微生物・遺伝モニタリング検査を定期的に実施することで、再現性あるモデル動物を研究班の班員を含めた筋ジストロフィー研究者に継続的に供給し、再生医療を含めた筋ジストロフィー治療の基礎研究に寄与することができた。その供給実績は、機関数および匹数ともに過去最多であった。近年の特徴として国内製薬メーカーへの供給数の増加が挙げられる。維持しているモデル動物について、既存の B10-*mdx* の背景コントロール系統の改良ならびに B6J 系統への置換を実施し、モデルマウスの遺伝的な信頼性の強化に努めた。また新規免疫不全モデルである DBA/2N-*mdx*-IL-2RgKO, RAG2KO 系統を樹立し、筋ジストロフィーの再生医療等研究に寄与するための供給体制整備を開始した。

参考文献

- 1) Nalbandian M, Zhao M, Sasaki-Honda M, Jonouchi T, Lucena-Cacace A, Mizusawa T, Yasuda M, Yoshida Y, Hotta A, Sakurai H. Characterization of hiPSC-derived muscle progenitors reveals distinctive markers for myogenic cell purification toward cell therapy. Stem Cell Reports, 16: 1-16, 2021.

筋ジストロフィー医療に対するアンケート調査について

貝谷 久宣

一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会

【研究協力者】

矢澤 健司¹⁾、貝谷 嘉洋²⁾、池上 香織¹⁾、川崎 奈緒子³⁾

1) 一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会

2) NPO 法人 日本バリアフリー協会

3) 医療法人和楽会 心療内科・神経科 赤坂クリニック

【緒言】

(社)日本筋ジストロフィー協会は、「一日も早く」をスローガンとして、筋ジストロフィーの根治療法の実現を願い活動している。本研究班における我々の主な任務は、遺伝子治療をはじめとする本研究班の成果が実現するための社会的環境を作ることである。

【はじめに】

日本筋ジストロフィー協会は、精神・神経疾患研究開発費の助成を受けて、平成4年から3年毎に筋ジストロフィー患者・家族を対象としたアンケート調査を実施している。患者・家族の視点から、遺伝子治療の現状を把握し、遺伝子治療などの先進医療に対するニーズや期待の一端を明らかにすることを目的として、同様の内容で改訂を加えながら継続的に調査している。

筋ジストロフィーの遺伝子治療をめぐる状況は、近年めまぐるしく変化してきている。患者や家族の意識の変遷を定期的に調査・記録することは、現在の課題の抽出に加えて、将来、遺伝子医療が社会に与えた影響について考察する際に重要な示唆を与えるデータとなり得る。

筋ジストロフィー協会会員の多くの皆様にご協力を頂きながら、今回で10回目となる遺伝子医療アンケート調査の集計結果を報告する。

【方法】

対象：日本筋ジストロフィー協会に属する患者・家族 1,500 世帯

対象者の抽出方法：支部長（36 支部）に委任

アンケート形式：無記名、自記式、郵送

1 世帯に 1 部配布（患者用／家族用の区別なし）

回収期間：令和2年6月5日～7月31日

回答率：670 部を回収（44.7%）

質問内容：基本的属性（14 問）、遺伝子検査について（4 問）、遺伝子治療による改善効果への期待について（1 問）、治験への参加に関する検討事項について（7 問）、遺伝子治療への関心（2 問）

【結果と考察】

本調査の結果、患者 290 名（18～85 歳、平均年齢 48 ± 15 歳）、家族 374 名（19～83 歳、平均年齢 50 ± 12 歳）の回答が得られた。患者は 40～50 歳代が多く、前回（平成 29 年時）の調査と比較すると年齢層は上がっていた。一方で家族は 40 歳代が多く、前回より年齢層が下がっていた。病型は患者・家族ともにデュシェンヌ型筋ジストロフィーが最も多く（患者 22%、家族 47%）、次いで患者は肢体型、家族は福山型が多く、これは前回とほぼ同じ結果となった。また、患者・家族ともに在宅者が 8 割以上で、前回よりも在宅者の割合が増加していた。

遺伝子検査に関する知識について、遺伝子検査で診断できる筋ジストロフィーがあることを「知っている」と回答した者は患者・家族とも 8 割以上と高い割合で、ともに年々増加しており、遺伝子検査に関する知識の広まりが確認された。「筋ジストロフィ

一の医療において遺伝子検査は必要だと思いますか」という問いに対して、「はい」と回答した者は患者 80%、家族 86%であり、前回とほぼ同程度であった。「遺伝子検査を受けたことがあるか」に対しては、「はい」と答えた者は患者 59%、家族（介護している患者が受けたことがあるかと質問）74%と前回よりやや増加しており、多くの人が遺伝子検査の必要性を感じ、検査も受けていることが示唆された。

遺伝子治療に関して、最低限どの程度の治療効果があれば治療を受けるかという質問に対して、患者・家族ともに最も多かった回答は「自覚症状は改善しなくても、検査により治療による改善が示され、進行が止まること」（患者 23%、家族 36%）であった。その他、検査による治療効果の証明、特に運動機能の改善を求める声が多く、病状の進行阻止への期待が高いことが示唆された。

治験参加を判断するための情報源としては、日本筋ジストロフィー協会（患者・家族含め全体の 36%）や Remudy（18%）の利用者が多かった。治験参加に関する検討事項に関して、5 件法の調査の結果、治験に関する詳細情報は全体の 8 割以上が「是非／少し欲しい」と回答し、治験に関する詳細情報の必要性が認められた。一方、治験に関する募集情報が入手出来ているかどうかは、患者や家族・病型・登録先によらず、ほぼ全ての群で「全く／あまり入手していない」と回答する者が 6 割を超し、情報不足と感じている者が多いことが示唆された。

治験薬単回投与後の通院頻度により参加懸念に差があるかどうかを調査したところ、「全く／あまり懸念がない」と回答したのは「毎月」が 45%、「3 か月に 1 回」が 56%となり、通院頻度がより少なく済む方が治験参加しやすい可能性が示唆された。そのため、将来は通院頻度の少なく済む治療（例えばウェアラブルデバイス等）の導入も期待される。

遺伝子治療への関心について、5 件法での調査によると、患者・家族とも筋ジストロフィーの遺伝子治療を「是非受けたい／受けたい」と回答した者は 6 割近く、研究の発展や効果への期待の声が散見された。一方、「どちらともいえない」が約 3 割、「絶対に受けたくない／受けたくない」が 1 割弱であった。自由回答も踏まえると、遺伝子治療に対して否定的

または懸案が必要と考える理由として、患者・家族ともに遺伝子治療の効果、費用、副作用、進歩や成果に関する疑問や心配が多く挙がり、高齢者または幼児への治療の安全性、通院や介護の負担に対する懸念、情報不足・理解が追いついていないこと等も挙げた。また、倫理的な観点や、本人が治療の意思決定を出来ない場合に家族の選択が難しいという懸念、治験に参加することで将来遺伝子治療が受けられなくなるかという疑問も見受けられた。これらの情報提供を患者や家族が求めていることが明らかとなった。

【結論】

本調査の結果から、筋ジストロフィーの患者・家族ともに、遺伝子治療をはじめとする先進医療への関心が総じて高く、基本的には遺伝子診断・治療の普及と発展が期待されていることが確認出来た。しかし、遺伝子治療に関する疑問・不安は未だに多くみられるため、遺伝子治療における費用や副作用、進歩や成果、安全性など先進医療に関する情報を、今後さらに提供していく必要がある。また、検査や治療法の発展とともに、患者・家族の身体的・精神的な負担軽減への対策（通院頻度の軽減、治療の選択判断指標の考慮、倫理的な配慮等）を検討していく必要性も示唆された。

今後も引き続き、筋ジストロフィーの治療発展のため、定期的な調査によって患者・家族の意見や動向、ニーズを調査する必要があると考える。さらにピアカウンセラー養成講座や教育講義のように、専門の医師から最新の情報を得る機会や、筋ジストロフィーの当事者やその家族が集まり、生活の様子について情報を共有し、意見を交わす場を設けることは、各個人が症状や治療にどのように向き合っていけばいいのか考えるきっかけとなる上、患者や家族が今後の選択・意思決定をする際の考慮に入れる材料を得る機会となり、有効な取り組みであると考え

【参考文献】

なし

リン脂質組成による筋機能調節に関する研究

進藤 英雄

国立国際医療研究センター

緒言

生体膜リン脂質はグリセロール骨格に一つの極性基と二種の脂肪酸が結合している。脂肪酸は結合様式や炭素数、二重結合数が様々で組み合わせから1000種程度のリン脂質が存在する。これらは各組織機能に影響すると考えられているが、分子レベルでの研究は未解決である。また、膜成分だけでなくリン脂質メディエーター、その貯蔵、他にも肺サーファクタント成分など様々な役割がある。

多様なリン脂質の生合成最終ステップを担う酵素はリゾリン脂質アシル転移酵素であり、近年13種同定された。我々は8種同定し欠損マウスも複数保有している。骨格筋機能やDuchenne muscular dystrophyなどの筋疾患とリン脂質組成の関連を研究できる。

今回、14種のリゾリン脂質アシル転移酵素の構造予測を行った。基質であるアシルCoAとの結合ポケットも予測した。また、リゾリン脂質アシル転移酵素は重複があり混乱を招いている。新たな名称提案も行った。

方法

リゾリン脂質アシル転移酵素の配列情報からAlphaFold2を用いて予測を行った。既知のリゾリン脂質アシル転移酵素ホモログ構造との比較も行った。

結果

AlphaFold2より、14種の酵素の膜貫通領域、膜表在性領域などがわかった。2つのファミリーのうち、AGPATファミリーは0から2、MBOATファミリーは11回膜貫通領域があった。それぞれ活性に必須

な、AGPAT motif と MBOAT motif の場所も確認され、基質（アシル CoA）との結合部位を囲っているような配置と予測できた。

考察

今回、構造予測ではあるが14種のリゾリン脂質アシル転移酵素の基質結合部位や膜貫通領域などが明らかとなった。また、構造情報の更新は、今後の阻害剤探索に有益である。本論文改訂中 LPLAT12(LPCAT3)の構造解明論文が別のグループから発表された。私たちの予測と基質のアクセスする向きが逆であったが、おおよその構造はほぼ一致していた。AlphaFold2により、精度良く構造予測できた。

酵素名提案では、(i)LPLATx (xは番号)とし、基質情報を含まない、(ii)xは酵素活性を示した論文が発表された順番にする、(iii)AGPAT と MBOAT ファミリーに属する酵素の名前とする、の3種のクライテリアを決めた。酵素名が異分野の研究者にもわかりやすくなった。

結論

リゾリン脂質アシル転移酵素の構造予測から基質結合ポケットや膜貫通領域を予測し、今後阻害剤開発に有益な情報となった。今後、筋組織における膜リン脂質生合成解析にも貢献できる。

参考文献

Valentine, WJ, Yanagida, K., Kawana, H., Kono, N., Noda-N, N., Aoki, J., **Shindou, H.**. Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases which create membrane phospholipid diversity. *J. Biol. Chem.* 2022 Jan;298(1):101470. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101470.

エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースの構築およびスキッピング予測に関する研究

千葉 峻太朗
理化学研究所

緒言

スプライシング制御（エクソンスキッピング）を利用した疾患の治療のためのアンチセンス核酸は、新しい創薬モダリティとして期待されている。スキップの対象とする mRNA 前駆体上のエクソンを、効率よくスキップさせるアンチセンス核酸の標的部位や長さは、通常、網羅的な実験によって決定されている。そこで、本研究では、この網羅的な実験による開発期間とコストの増大を抑制するため、高効率アンチセンス核酸のデザインを補助する計算ツールおよびデータベース構築を行っている。すでに、予測モデルとデータベースをウェブサーバーに実装・公開（<https://eskip-finder.org>）するとともに、論文としても公開した¹。この予測モデルは、比較的少数の実験データに基づき構築した。現在は、予測モデルを様々な遺伝子のスキップ効率予測に対して適用するために、学習データの拡充を行っている。

結果

論文及び特許などの文献からエクソンスキッピングに関連する情報を収集およびマニュアルキュレーションすることで、配列情報、スキップ効率、実験条件などをデータベースとしてまとめた（表 1）。今回

の更新によって、エントリー数が約 11,000、固有アンチセンス核酸の配列数が約 4,300 となった。前回更新時（2021 年 4 月、エントリー数：約 6,000、固有配列数：約 2,200）と比較して大幅に情報を拡充することができた。このデータは、ウェブサーバー上で公開されている。また、データベース更新に加えて、インターフェースの改善も実施した。

結論

本研究で公開したエクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースおよびアンチセンス核酸デザインのための予測ツールが、エクソンスキッピングの研究開発を加速するために有用であると期待している。現在もデータベースに収載すべき特許などの文献から情報抽出を継続しており、より多様な遺伝子、スキップデータを登録する予定である。今回の更新までに、データベースに多くの遺伝子のスキップ効率の情報が蓄積されたため、今後は複数の遺伝子の情報も学習に取り組みことで、予測モデルの適用範囲を広げていきたい。

参考文献

1. S. Chiba, K. Lim, N. Sheri, S. Anwar, E. Erkut, M.N.A. Shah, T. Aslesh, S. Woo, O. Sheikh, R. Maruyama, H. Takano, K. Kunitake, B. Duddy, Y. Okuno, Y. Aoki, T. Yokota, eSkip-Finder: a machine learning-based web application and database to identify the optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping, Nucleic Acids Res (2021) 49, W193.

表 1. データベース登録済みのスキップ効率のデータ数および固有配列数（2021 年 11 月 25 日現在。）

Available genes					
DMD, MSTN, DYSF, SCN1, COL7A1, LAMA2, MAPT, USH2A, DMPK, MS4A2, ATM, ALK2/ACVR1, NF1, PMM2, NPC1, NF2, MLC1, MFSD8					
# of skipping data (# of unique sequence of ASOs)					
DMD	MSTN	DYSF	SCN1	COL7A1	LAMA2
10076 (3829)	795 (276)	112 (69)	143 (49)	42 (14)	25 (23)
MAPT	USH2A	DMPK	MS4A2	ATM	ALK2/ACVR1
18 (13)	10 (3)	48 (21)	4 (2)	4 (4)	4 (1)
NF1	PMM2	NPC1	NF2	MLC1	MFSD8
3 (3)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)

Development of Molecular Therapies for Muscular Dystrophy using cellular and animal models

Principal Investigator: Yoshitsugu Aoki, MD, PhD

Director, Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology and Psychiatry

Project period: FY2020-FY2022

Human genetic therapies have come of age in curing rare neuromuscular diseases. The nationwide research group aims to better understand and improve the treatment of fatal and currently untreatable muscular dystrophies, including Duchenne muscular dystrophy (DMD). We are dedicated to elucidating the molecular pathogenesis of muscular dystrophies, especially Duchenne muscular dystrophy, and the development of advanced gene- and stem cell-based therapeutics for the diseases. For this purpose, we integrate molecular, pharmacologic, proteomic, and genomic methodologies using various types of unique animal models, including dystrophic dogs, mice, rats, and common marmosets. We are combating these diseases through research aimed at implementing promising novel therapeutic strategies, including oligonucleotide-based exon-skipping therapy and mesenchymal stem cell therapy, into clinical practice. One of the significant achievements of our research group is a successful completion of our antisense oligonucleotide-based exon 44-skipping drug, NS-089/NCNP-02, for DMD in Japan. In the trial, we succeeded first in the world in recovering the expression of human dystrophin protein over on average 15%, and attained results suggesting sufficient efficacy for motor function. Moreover, we have published an online resource eSkip-Finder (<https://eskip-finder.org/cgi-bin/input.cgi>) for helping researchers identify optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping (Nucleic Acids Res. 2021;49:W193-W198.).

RESEARCH & RELATED Senior/Key Person Profile

- Principal Investigator

National Center for Neurology and Psychiatry
Yoshitsugu Aoki, Director

- Co-Investigators

National Center for Neurology and Psychiatry
Satoru Noguchi, Section Chief
Rieko Muramatsu, Director
Kazuhiko Seki, Director
Daisuke Kawauchi, Section Chief
Shin'ichiro Hayashi, Section Chief
Madoka Mori, Section Chief
Yuko Suzuki, Section Chief

Kyoto University

Akitsu Hotta, Lecturer

Tokyo Metropolitan Health and Longevity Medical Center

Akiyoshi Uezumi, Associate Director

Osaka University
Soichiro Fukada, Associate Professor

Tokyo University
Kanjiro Miyata, Associate Professor

IMSUT, Tokyo University
Takashi Okada, Professor

Tokyo University of Agriculture and Technology
Masaki Inada, Associate Professor

Nihon University
Yusuke Echigoya, Lecturer

Ehime University Graduate School of Medicine
Motoi Kanagawa, Professor

Sapporo Medical University
Takashi Yamada, Associate Professor

National Hospital Organization Matsumoto Medical Center
Akinori Nakamura, Director

National Center for Global Health and Medicine
Hideo Shindo, Associate Professor

RIKEN
Shuntaro Chiba, PhD

Central Institute for Experimental Animals
Masahiko Yasuda, PhD

Japan Muscular Dystrophy Association
Hisanobu Kaiya, President

Tohoku University
Naoki Suzuki, Assistant Professor

Alberta University
Toshifumi Yokota, Professor

STATEMENT OF WORK

Specific Aim 1

Development of new therapeutic interventions using animal models of neuromuscular diseases

- a. Development of genetic therapies for muscular dystrophies
Investigators: Aoki, Miyata, Echigoya, Hotta, Okada, Nakamura, Chiba, Yokota
- b. Development of stem cell-based therapies for muscular dystrophies
Investigators: Hayashi, Fukada, Uezumi
- c. Discovery of new pathological mechanisms in neuromuscular diseases
Investigators: Noguchi, Muramatsu, Seki, Kawauchi, Kanagawa, Yamada, Shindo, Mori, Suzuki N

Specific Aim 2

Quality Control of Experimental Animals

Investigator: Yasuda

Specific Aim 3

Ethical and social studies to develop new treatments for muscular dystrophies

Investigator: Kaiya