

進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療にむけての臨床的基礎的研究
(課題番号07670906)

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成10年3月



研究代表者 齋藤加代子
(東京女子医科大学 医学部 小児科 助教授)



はしがき

我々は、平成7年度、8年度、9年度文部省科学研究費一基盤研究C「進行性筋ジストロフィーの遺伝子治療にむけての臨床的基礎的研究」の研究費を受けて、わが国の進行性筋ジストロフィーの病態、分子遺伝学的研究、遺伝子変異、特に臨床との関係について解析してきた。また、*ex vivo*トランスフェクションの可能性の検討と*in vitro*における遺伝子治療モデルの基礎的検討を目的として、種々のカチオニック・リポソームを用いて、筋ジストロフィー患者由来の培養骨格筋細胞に遺伝子を導入し、その発現を調べる研究を施行してきている。

筋ジストロフィーにおいて、臨床所見、即ち骨格筋の侵される領域や発症時期によって分類され、それぞれ遺伝形式が異なる。各型の遺伝子、分子レベルにおける研究の進歩は著しく、遺伝子の局在や原因蛋白質が明らかにされつつある。その結果、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)では遺伝子診断が臨床応用され、遺伝子変異の同定、保因者診断、出生前診断がなされ、診断確定のために、原因蛋白質、ジストロフィンの検討がなされるようになった。我々はDMDの分子遺伝学的研究によって、体細胞モザイクを遺伝子の解析と免疫組織学的検討の両方で証明し得た世界第一例として報告した。福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)では遺伝子が染色体9q31に存在することが解明され、臨床応用を行っている。従来の診断技術やこれら分子遺伝学的技術を駆使して、筋ジストロフィーを診断し、患者の予後の推定や療育、遺伝相談に役立てている。

DMDの根本治療としては、健全なジストロフィン蛋白を骨格筋細胞に導入する筋芽細胞の移植や、ジストロフィン遺伝子を骨格筋細胞に導入する体細胞遺伝子治療が最も期待されており、モデル動物において*in vivo*の実験がなされてきている。遺伝子治療の方法として、プラスミドの直接筋注、アデノウイルスベクターやレトロウイルスを用いた*in vivo transfer*などの方法が実験室レベルで検討されている。我々は、*ex vivo*トランスフェクションの可能性の検討と*in vitro*における遺伝子治療モデルの基礎的検討を目的として、種々のカチオニック・リポソームを用いてDMD患者由来の培養骨格筋細胞に β -ガラクトシダーゼ(β gal)遺伝子を導入し、その発現を β galの染色とELISA法を併用して調べた。DMDにおける遺伝子治療の基礎的研究は、FCMDなどの他の筋ジストロフィーに対しても、応用が可能である。ここに、筋ジストロフィーにおける分子遺伝学的研究の成果をまとめて報告し、遺伝子治療の基礎的研究の成果もあわせて報告する。

研究組織

研究代表者：斎藤加代子（東京女子医科大学 小児科 助教授）

研究分担者：池谷紀代子（東京女子医科大学 小児科 講師）

研究協力者：近藤恵里（東京女子医科大学 小児科 助手）

研究経費

平成7年度 1 3 0 0 千円

平成8年度 7 0 0 千円

平成9年度 5 0 0 千円

研究発表

（1）学会誌等発表

1. Saito K, Ikeya K, Kondo E, Komine S, Komine M, Osawa M, Aikawa E, Fukuyama Y. Somatic mosaicism for a DMD gene deletion. *Am J Med Genet* 56:81-86,1995
2. Saito K, Suzuki H, Shishikura K, Osawa M, Fukuyama Y. A milder form of Walker-Warburg syndrome. Fukuyama Y, Osawa M, Saito K, eds. *Congenital muscular dystrophies*, Elsevier Science, 345-354, 1997
3. Saito K, Kondo-Iida E, Kawakita Y, Ikeya Y, Osawa M, Fukuyama Y, Toda T, Nakabayashi M, Yamamoto T, Kobayashi M. Prenatal diagnosis in eight Fukuyama type congenital muscular dystrophy families by haplotype analysis using the new markers closest to the gene. *Am J Med Genet* (in press)
4. 斎藤加代子、池谷紀代子、近藤恵里、小国美也子、河北有規子、杜娟、大澤真木子、中林正雄、細田瑛一. 高度先進医療の実際—進行性筋ジストロフィーのDNA診断. *薬事新報*1833: 112-119, 1995
5. 斎藤加代子. 小児の治療指針—進行性筋ジストロフィー. *小児科診療*58: 524-526, 1995
6. 斎藤加代子. 進行性筋ジストロフィー. *臨床医*21: 608-612, 1995
7. 斎藤加代子. 分子遺伝学の基礎と臨床. *日本未熟児新生児学会雑誌*7: 43-52, 1995
8. 斎藤加代子. 福山型筋ジストロフィー研究の最近の進歩. *脳と発達*27: 447-454, 1995
9. 斎藤加代子. 福山型先天性筋ジストロフィー. *Molecular Medicine* 33: 8-9, 1996
10. 斎藤加代子. 遺伝子研究の進歩と臨床応用. 進行性筋ジストロフィー. *治療*78: 2161-2166, 1996

11. 斎藤加代子. 福山型筋ジストロフィー. 発達障害研究18: 122-127, 1996
12. 斎藤加代子、近藤恵里、戸田達史、大澤真木子. 福山型先天性筋ジストロフィー. 筋ジストロフィーにおける遺伝子診断・遺伝相談ガイドブック. 60-66, 1996
13. Izumi T, Hara K, Ogawa T, Osawa M, Saito K, Novo MLP, Fukuyama Y, Takashima S. Abnormality of cerebral gangliosides in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 17: 33-37, 1995
14. Osawa M, Kondo E, Suzuki H, Hirayama Y, Harada J, Suzuki N, Saito K, Fukuyama Y, Ishihara T. A Japanese CMD case with diffuse white matter hyperlucency on CT and normal mentality: A 16 year follow-up study. *J Tokyo Women's Medical College* 66: 95-109, 1996
15. Toda T, Miyake M, Kobayashi K, Mizuno K, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Kanazawa I, Nakagome Y, Tokunaga K, Nakahori Y. Linkage-disequilibrium mapping narrows the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region to <100kb. *Am J Hum Genet* 59: 1313-1320, 1996
16. Yamamoto T, Komori T, Shibata N, Kobayashi M, Kondo E, Saito K, Osawa M, Toda T. *Neuropathology* 16: 184-189, 1996
17. Fukuyama Y, Osawa M, Saito K. Congenital muscular dystrophies: an overview. *Trends in Child Neurology*. Arzimanoglou A & Goutieres F(eds). John Libbey Eurotext, Paris, 115-143, 1996
18. Kondo E, Saito K, Toda T, Osawa M, Yamamoto T, Kobayashi M, Fukuyama Y. Prenatal diagnosis of Fukuyama type congenital muscular dystrophy by polymorphism analysis. *Am J Med Genet* 66: 169-174, 1996
19. Yamamoto T, Toyoda C, Kobayashi M, Kondo E, Saito K, Osawa M. Pial-glial barrier abnormalities in fetuses with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 19: 35-42, 1997
20. Kondo E, Saito K, Toda T, Osawa M, Fukuyama Y. Polymorphism analysis of Fukuyama type congenital muscular dystrophy siblings with different phenotypes. *Brain Dev* 19: 181-186, 1997
21. Kondo-Iida E, Saito K, Tanaka H, Tsuji S, Ishihara T, Osawa M, Fukuyama Y, Toda T. Molecular genetic evidence of clinical heterogeneity in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Hum Genet* 99: 427-432, 1997
22. Kondo E, Saito K, Toda T, Osawa M, Tanaka H, Tsuji S, Yamamoto T, Kobayashi H, Nakamura Y, Fukuyama Y. Reconfirmation of the Fukuyama congenital muscular dystrophy

(FCMD) gene locus at chromosome 9q31, and a successful prenatal diagnosis of FCMD in two families. *Congenital muscular dystrophies*.1997 (in press)

23. Toda T, Miyake M, Nakahori Y, Masaya M, Nonaka I, Ikegawa S, Kondo E, Saito K, Osawa M, Fukuyama Y, Yoshioka M, Shimizu T, Kanazawa I, Nakamura Y, Nakagome Y. Toward identification of the Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD) gene. Fukuyama Y, Osawa M, Saito K, eds. *Congenital muscular dystrophies*, Elsevier Science, 1997
24. Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Kondo E, Saito K, Osawa M. *Ultrastructural Pathology* 21: 355-360, 1997
25. Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Kiyoko Ikeya, Kondo E, Saito K, Osawa M. *Acta Neuropathol* 94: 173-179, 1997
26. Osawa M, Sumida S, Suzuki N, Arai Y, Ikenaka H, Murasugi H, Shishikura K, Suzuki H, Saito K, Fukuyama Y. Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Fukuyama Y, Osawa M, Saito K, eds. *Congenital muscular dystrophies*, Elsevier Science, 31-68, 1997
27. 近藤恵里、斎藤加代子、戸田達史、中村祐輔、大澤真木子、福山幸夫 .多型解析による出生前診断を行った福山型筋ジストロフィーの2家系. *医学のあゆみ*173: 789-790, 1995
28. 斎藤加代子、河北有規子、池谷紀代子、杜娟、大澤真木子. カチオニック・リポソームを用いたヒト培養骨格筋細胞への遺伝子導入. *東京女子医科大学雑誌* (投稿中)

(2) 口頭発表

1. Saito K, Kondo-Iida E, Kawakita Y, Ikeya Y, Osawa M, Fukuyama Y, Toda T. Prenatal diagnosis in Fukuyama type congenital muscular dystrophy by polymorphism analysis. Vith Western Pacific Regional Conference of the Medical Women's International Association 1996.3.21-24, In: New Zealand
2. Saito K, Kondo-Iida E, Kawakita Y, Ikeya Y, Toda T, Osawa M, Fukuyama Y. Prenatal diagnosis in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. The first Congress of the World Muscular Society 1996.9.25-27, In London, UK
3. Saito K, Kondo-Iida E, Kawakita Y, Ikeya Y, Toda T, Osawa M, Fukuyama Y. Molecular evidence of clinical heterogeneity in Fukutama type congenital molecular dystrophy. The second Congress of the World Muscular Society 1997.10.16-18, In Tunis, Tunisia

4. 斎藤加代子、大澤真木子. 筋ジストロフィーの出生前遺伝子診断の被験者の考えと希望. 日本臨床遺伝学会第20回大会1996.5.23-24 於：横浜
5. 斎藤加代子、河北有規子、杜娟、飯田恵里、池谷紀代子、大澤真木子. 多型解析による福山型筋ジストロフィーの出生前診断. 日本人類遺伝学会第41回大会1996.10.23-25於：札幌
6. Saito K. Recent advances in Fukuyama type congenital muscular dystrophy (workshop in English) 第39回日本小児神経学会総会 1997.6.5 於：名古屋
7. 斎藤加代子. 神経筋疾患の遺伝子解析と臨床への応用—福山型筋ジストロフィーと脊髄性筋萎縮症について— (シンポジウム) 第37回日本先天異常学会.1997.7.16 於：京都