

## MRL-MpJ 創傷治癒形質導入はデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋病変を改善する

藤野 雅広<sup>1,2)</sup>, 大澤 裕<sup>2)</sup>, 岡田 只士<sup>2)</sup>, 久我 敦<sup>2,3)</sup>, 林 紗織<sup>2)</sup>  
力丸 満恵<sup>2)</sup>, 村上 龍文<sup>2)</sup>, 砂田 芳秀<sup>2)</sup>, 長尾 光城<sup>1)</sup>

1) 川崎医療福祉大学健康体育学科, 〒701-0192 倉敷市松島288

2) 川崎医科大学内科学 (神経), 〒701-0192 倉敷市松島577

3) 神戸大学病院神経内科, 〒650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-2

**抄録** MRL-MpJ マウスは耳穴が閉鎖するというユニークな表現型から発見された自然発症変異マウスで創傷治癒促進及び組織再生モデルとして盛んに研究されているが, その責任遺伝子は未だ不明である. 本研究ではこの創傷治癒形質 MRL-MpJ を交配によってジストロフィン欠損デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル (*mdx*) マウスに導入し, 骨格筋の筋ジストロフィー病変について解析した. 6週齢の導入マウス四肢筋 (大腿四頭筋) では, *mdx* マウスで認められた単一筋線維断面積減少は有意に改善し, また再生 (中心核) 線維数も有意に増加していた. 14週齢の導入マウス呼吸筋 (横隔膜) でも同様に単一筋線維断面積減少の改善と中心核線維数の増加を認めた. 更に導入マウス横隔膜では線維化の指標であるヒドロキシプロリン含有量が有意に減少していることが明らかとなった. これらの結果から MRL-MpJ 創傷治癒形質の導入は, ジストロフィン欠損筋の線維化を抑制し筋再生を促進するため, 現在有効な治療法がないデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者に対する新しい治療法となる可能性が示唆された.

(平成21年9月4日受理)

**キーワード:** 創傷治癒促進モデル (MRL-MpJ) マウス,  
デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル (*mdx*) マウス, 単一筋線維断面積,  
中心核線維, ヒドロキシプロリン含有量

### 緒言

筋ジストロフィーとは病理学的には骨格筋細胞の変性と壊死を主病変とし, 二次的に骨格筋線維の再生と間質の線維化を来す遺伝性疾患群の総称である. 進行性の全身筋力低下を呈し多くは最終的に致死的となるため, 有効な治療法の開発が強く望まれている難病である. 代表的疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) はX染色体劣性遺伝形式を示し, 出生男児3,500人あ

たり1人と発症頻度が高い<sup>1)</sup>. DMD患者は, 生下時には異常はないが2~5歳時に下肢近位筋の筋力低下で発症し, 床から立ち上がる時には大腿部に手をつく登攀様起立 (Gowers 徴候) を呈し, 筋逸脱酵素である血清クレアチンキナーゼ (Creatine Kinase : CK) が高値を示す<sup>2)</sup>. 次第に全身の骨格筋の筋力低下が進行し11歳前後で独立歩行が不可能になり車椅子生活となる. 脊椎側彎や関節拘縮を併発し, 最終的には呼吸不全や心不全によって20歳前後で死に至

別刷請求先  
砂田芳秀  
〒701-0192 倉敷市松島577  
川崎医科大学内科学 (神経)

電話: 086 (462) 1111  
ファックス: 086 (462) 1199  
Eメール: ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp

るという悲惨な経過をとる。この DMD の責任遺伝子として 1986 年に米国の Kunkel のグループによって X 染色体短腕に位置するジストロフィン (dystrophin) 遺伝子が同定された<sup>3)</sup>。ジストロフィンは筋形質膜と細胞骨格アクチンフィラメントを強固に結合している筋形質膜の裏打ち蛋白質であるが、その後の研究によって DMD では、ジストロフィンが欠損することによって筋形質膜が脆弱となり筋細胞の変性壊死が生じ筋力低下に至るといった疾患パラダイムが考えられるようになった。

1984 年に Bulfield が血清 CK 高値を示すマウスとして発見した *mdx* マウスは自然発症ジストロフィン欠損マウスである。このマウスはジストロフィン遺伝子の exon 23 の 3185 番目のシトシンがチミンにナンセンス変異をおこし劣性遺伝形式を示す<sup>4)</sup>。*mdx* マウス骨格筋では筋細胞の壊死再生及び間質の線維化などの筋ジストロフィー変化が認められることから DMD の疾患モデルと考えられている。DMD の治療研究としては、従来この *mdx* マウスを用いて、ウイルスベクターによってジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子療法や、正常骨格筋前駆細胞を患者に移植する細胞治療が試みられてきた。しかし、これらの根治療法の臨床応用については、安全性や倫理性など克服すべき問題点が山積しているのが現状である。一方、根治療法とはならないものの、筋ジストロフィーに至る細胞内シグナル異常を是正することを目的とする分子標的療法として、筋特異的 TGF- $\beta$  分子であるマイオスタチン (myostatin) の阻害抗体治療<sup>5)</sup>や、筋細胞変性を引き起こすヒストン脱アセチル化酵素の低分子阻害剤投与治療<sup>6)</sup>が試みられ、その有効性が確認されてきた。これらの結果から筋ジストロフィーに対する分子標的療法は現実に臨床への応用が可能な治療法として期待を持たれるようになった。

1998 年に米国 Whister 研究所で、マウスの個体識別のために耳穴を開けたところ、約 4 週間で耳穴が傷跡も残さず完全閉鎖するというユニークな自然変異マウスが発見された<sup>7)</sup>。こ

の MRL-MpJ (以下 MRL) マウスは、劣性遺伝形式を示し、角膜損傷や心筋損傷に対して“線維化を来さない”創傷治癒促進効果、即ち哺乳類でありながら創傷組織がほぼ完全に再生するという極めてユニークな形質を示すことが報告され脚光を浴びている<sup>8, 9)</sup>。この創傷治癒促進形質の責任遺伝子については現在様々なグループが同定を目指して競争しているが未確定である<sup>10-13)</sup>。将来この遺伝子が同定できれば、組織再生を目指す分子標的療法へ応用されることが期待されている<sup>10)</sup>。

そこで本研究では「創傷治癒形質 MRL は DMD の骨格筋病変を改善する」という作業仮説を設定し、この創傷治癒形質 MRL を DMD モデル *mdx* マウスに導入することによって *mdx* マウスで認められる骨格筋病変が改善するか否かについて検証をおこなった。将来的には、筋ジストロフィーに対する MRL 責任遺伝子を標的とする分子標的療法の開発を目的として研究を進めた。

## 材料と方法

### 実験動物

ジストロフィン欠損 *mdx* マウスは実験医学中央研究所 (神奈川) から、創傷治癒形質 MRL マウスは Jackson 社 (米国) から購入し川崎医科大学医用生物センターで飼育した。本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を得て、その指針を遵守し施行した。

### 創傷治癒形質 MRL 導入 *mdx* マウスの作出

(1)*mdx* マウスと MRL マウスの交配: *mdx* マウスと MRL マウスを交配することにより F1 世代で、それぞれのヘテロ変異マウスを誕生させた。次いでこのマウス同士を交配することにより F2 世代で、野性型, *mdx*, MRL 導入 *mdx* (MRL-*mdx*), 及び MRL の 4 種類の遺伝子型を示すマウスを誕生させた。

(2)MRL 遺伝子型の解析: MRL 形質は Clarkらの方法<sup>7)</sup>に従い 6 週齢マウスに耳穴形成器で 4mm の耳穴を穿ち、10 週齢でその閉鎖の程度

を確認し決定した。

(3) *mdx* 遺伝子型の解析: *mdx* 遺伝子型は、マウス X 染色体上のジストロフィン遺伝子の 3185 番目のシトシンからチミンへのナンセンス変異 (C3185T) の有無によって決定した。我々はまず 1996 年に Amalfitano らが開発した変異特異的プライマーを用いたアレル特異的 PCR 法<sup>14)</sup>を改変して変異の有無についてスクリーニングを行った。まずマウスジストロフィン遺伝子の intron 22 にフォワードプライマー F: 5' -AACTCATCAAATATGCGCGTGTAGTG-3' を設定した。これに対し exon 23 の 3185 番目の塩基であるシトシンを 3' - 末端にもつ正常アレル特異的リバースプライマー R1: 5' -GTCACCTCAGATAGTTGAAGCCATTTAG-3' 及びこの 3185 シトシンがチミンに変異した変異アレル特異的リバースプライマー R2: 5' -GTCACCTCAGATAGTTGAAGCCATTTAA-3' をそれぞれ設定した。これらのプライマーを用いてマウス尾ゲノムをテンプレートとして正常アレル特異的 PCR 増幅 (F x R 1) 及び変異アレル特異的 PCR 増幅 (F x R 2) をそれぞれ溶解温度 (T<sub>m</sub>) 58°C, 35 サイクルで施行した。この増幅産物を電気泳動で確認し遺伝子型を推定した。更にはこの 3185 シトシンを挟む 150bp の DNA 断片を PCR 法で増幅し直接シークエンス法によって 3185 変異の有無を決定した。最終的には 14 週齢マウスの大腿四頭筋を採取してジストロフィン C 末端ペプチドに対する抗体 (Dys2, NovoCastra) で免疫組織染色を行いジストロフィン欠損の有無を確認した。同時にジストロフィン欠損筋の特徴である筋形質膜カベオリン-3 蛋白質発現上昇<sup>15)</sup>についても抗カベオリン-3 抗体 (Alexis) による免疫組織染色を行い検証した。

#### 創傷治癒形質 MRL 導入 *mdx* マウスの骨格筋表現型の解析

(1) 骨格筋筋線維解析: F2 世代で誕生した野性型, *mdx*, MRL-*mdx*, 及び MRL の 4 種類の遺伝子型を示すマウスについて雄雌に分けて

解析した。*mdx* マウスではヒト DMD 患者と同様に呼吸筋の筋ジストロフィー変化は年齢依存性に終生進行していくが、一方、四肢筋の筋ジストロフィー変化は DMD 患者と異なり生後 6 週齢で最大となりその後改善する<sup>16)</sup>。そこでまず 6 週齢と 14 週齢マウスについて四肢筋 (大腿四頭筋) 及び、呼吸筋 (横隔膜) を採取した。次いで採取した筋組織を小コルクに立て TissueTek で組織が倒れない程度に固定した。これを液体窒素によって十分に冷却したイソペンタン内で凍結した。この凍結筋組織をクリオスタットで 4  $\mu$ m 乃至 10  $\mu$ m に薄切してシリコンでコートしたスライドガラスに載せて風乾した。この凍結切片をヘマトキシリン・エオジン (H&E) によって染色し光学顕微鏡 (BX21, OLYMPUS) で観察し DP manager ソフトウェア (Mitani) で写真撮影を行った。次いで H&E 染色像における筋細胞と間質を 2 色反転法 (NIH image 6 ソフトウェア) による画像処理によって識別した。この処理画像をもとに 1 個体につき大腿四頭筋では 2,000 個、横隔膜では 300 個の筋線維について単一筋線維断面積 [single-myofiber area (SMA):  $\mu$ m<sup>2</sup>] を測定した (n=7)。更に測定した筋線維中の再生筋の比率を示す % 中心核線維 [%centrally-nucleated fiber (%CNF)] についても定量的解析を行った (n=7)。これにより 4 種類の遺伝子型を示すマウスの筋線維サイズ及び骨格筋再生能について評価した。

(2) 骨格筋筋線維解析: 四肢筋 (大腿四頭筋) 及び、呼吸筋 (横隔膜) の凍結切片を Masson トリクローム変法 (MT) によって染色し青色に染まる膠原線維を観察し線維化について解析した。次いで、14 週齢マウスの横隔膜を採取し膠原線維の主要構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン含有量 (H-P content) を測定して骨格筋筋線維化を定量的に解析した (n=7)。1997 年に Niedelmoeler らが皮膚を材料にコラーゲンを粗精製してそのヒドロキシプロリン含有量を測定している<sup>17)</sup>が、我々はこの原法を以下のように改変することによって骨格筋のヒドロキシプロ

リン含有量を測定した。まず横隔膜を採取し乾燥重量を測定した。次いでこの骨格筋を液体窒素下で破碎し10倍容（容量/乾燥重量比）の食塩水を加えホモゲナイズし4℃で24時間振蕩した。これを1,100 x g で10分間遠心分離し沈渣を得た。この沈渣に20倍容のリンゲル液を加え再懸濁し65℃で60分温浴振蕩した。その後1,100 x g で10分間遠心分離し二次沈渣を得た。この沈渣を更に25倍容の超純水で再懸濁しドライオープンで125℃、60分間煮沸した。これによって得られたコラーゲン粗分画について、アルカリ加水分解処理を行いHPLCで解析することによってヒドロキシプロリン含有量を測定した。

#### 統計学的解析

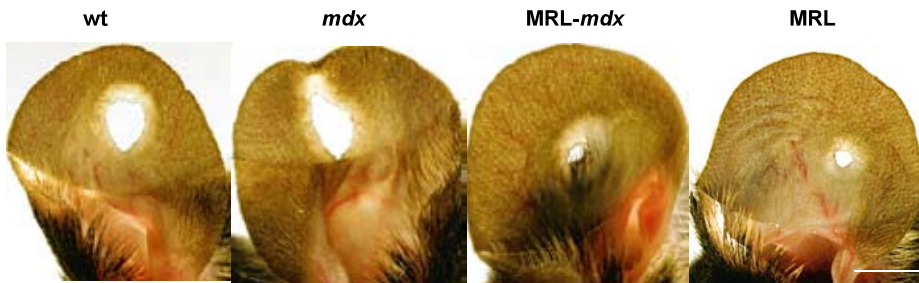
各群の値は平均値（Mean）±標準偏差（SD）で示した。各群間の有意差検定は一方向階乗ANOVA、Bonferroni法を用いて、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

#### 結果

##### MRL 導入 *mdx* マウスの作出

*mdx* マウスと MRL マウスを交配し F1 世代でそれぞれのヘテロ変異マウスが誕生した。次いでこの F1 世代間の交配により F2 世代で、野性型、*mdx*、MRL 導入 *mdx* (MRL-*mdx*)、及び MRL の 4 種類の遺伝子型を示すマウスが誕生した。MRL 遺伝子型は Clark らの方法<sup>7)</sup>に

A



B

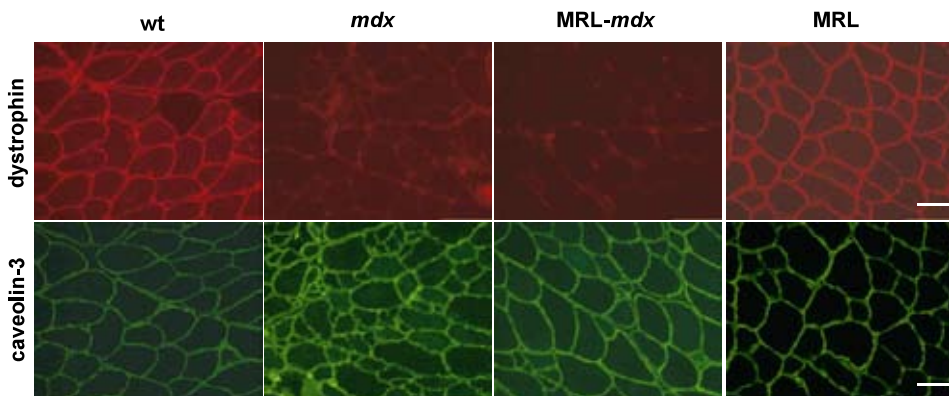


図1 4 遺伝子型を示すマウスの作出 (A)MRL genotyping: 耳穴閉鎖の比較: 6 週齢マウスに直径4mm の耳穴を穿ち 4 週後に写真撮影した。バー: 4 mm。 (B)14 週齢大腿四頭筋の免疫組織染色所見。バー: 50  $\mu$ m。野生型 (wt)、ジストロフィン欠損筋ジストロフィーモデル (*mdx*)、創傷治癒 MRL、創傷治癒 MRL 導入 *mdx* (MRL-*mdx*)。

従い6週齢マウスに耳穴形成器で4mmの耳穴を穿ち, 10週齢でその閉鎖の程度を写真撮影で確認し決定した(図1A). 野生型マウス及びmdxマウスでは耳穴は閉鎖しないが, MRL及びMRL-mdxマウスでは耳穴は大部分閉鎖した. mdx遺伝子型は, マウスX染色体上のジストロフィン遺伝子の3185番目のシトシンからチミンへのナンセンス変異(C3185T)の有無を直接シーケンス法によって判定した. このマウスの骨格筋について14週齢マウスの大腿四頭筋を採取してジストロフィンC末端ペプチドに対する抗体で染色したところ, 野生型マウス及びMRLマウスではジストロフィン筋形質膜

にそって染色されるが, mdxマウス及びMRL-mdxマウスでは欠損が認められ, 遺伝子型判定が正確であることが確認された(図1B). また筋形質膜カベオラ構成蛋白質カベオリン-3に対する抗体で免疫組織染色を施行したところmdxマウス及びMRL-mdxマウスではカベオリン-3染色性の増強が認められ, ジストロフィン欠損筋におけるカベオリン-3蛋白質発現上昇という過去の報告<sup>15)</sup>と一致した.

MRL 導入 mdx マウス四肢筋病変の改善

野性型, mdx, MRL-mdx, 及びMRLの4種類の遺伝子型を示す雄マウスについて骨格筋解

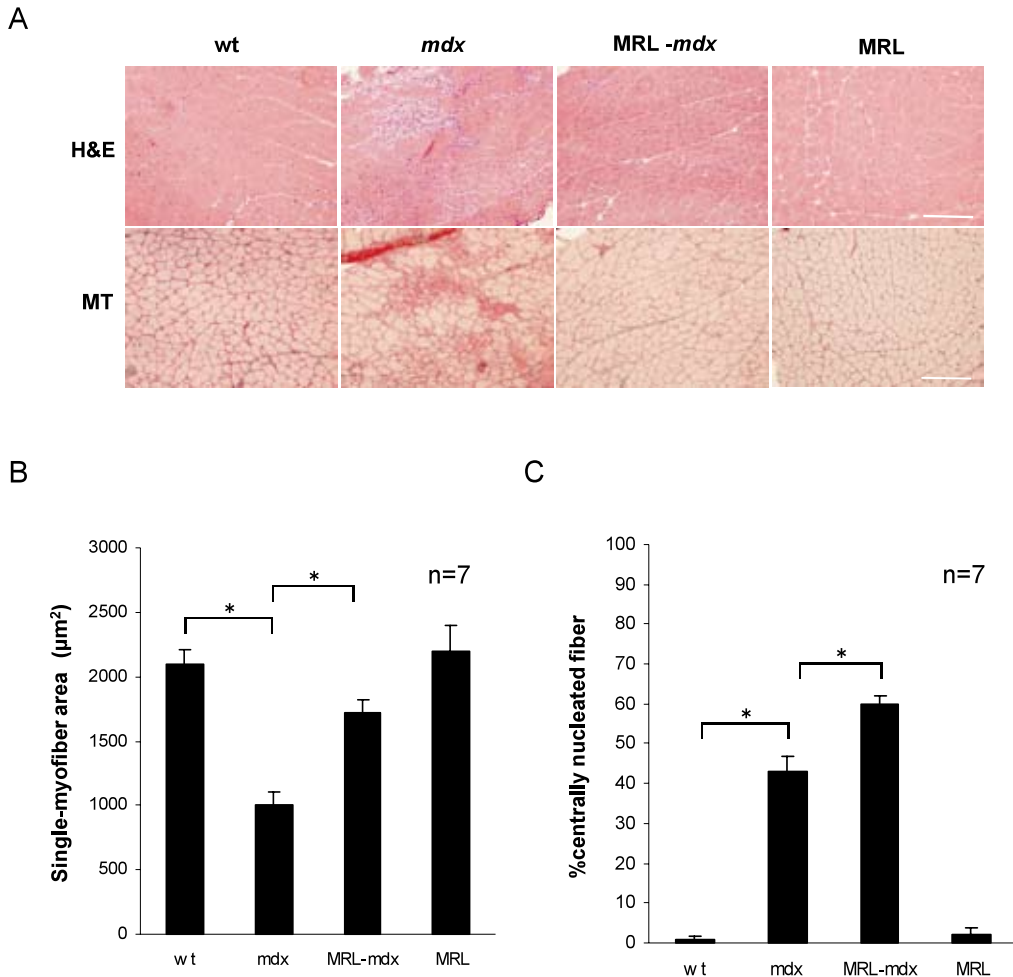


図2 6週齢マウス大腿四頭筋解析 (A)Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色 (上段), Masson's Trichrome (MT) 染色 (下段). バー; 100 µm. (B)単一筋線維断面積 (C)中心核線維比率 \* P <0.05.

析を行った。mdx マウスにおいて四肢筋の筋ジストロフィー病変が最も著明であると報告されている6週齢<sup>12)</sup>の時点でマウス大腿四頭筋を比較解析した。H&E 染色では野生型マウスと比較して、mdx マウスで筋線維の変性、壊死、細胞浸潤が著明で、筋線維サイズの減少が認められた。また一部では中心核を有する再生線維の出現が認められた。一方、MRL 創傷治癒形質を導入した MRL-mdx マウスでは、mdx マウスと比較し筋線維の変性及び壊死は減少してい

た。また筋線維萎縮は改善し、中心核を有する再生線維の増加が認められた(図2A)。

次いでこの H&E 染色をもとに単一筋線維断面積 (SMA) を統計学的に解析した (n=7, 図2B)。SMA は野生型マウス ( $2102.5 \pm 107.9 \mu\text{m}^2$ ) 及び MRL マウス ( $2201.6 \pm 189.9 \mu\text{m}^2$ ) と比較して mdx マウス ( $1000.5 \pm 107.7 \mu\text{m}^2$ ) では有意に減少し著明な筋線維萎縮が生じることが示された。MRL-mdx マウス ( $1721.0 \pm 103.7 \mu\text{m}^2$ ) では mdx マウスと比較し有意に筋線維

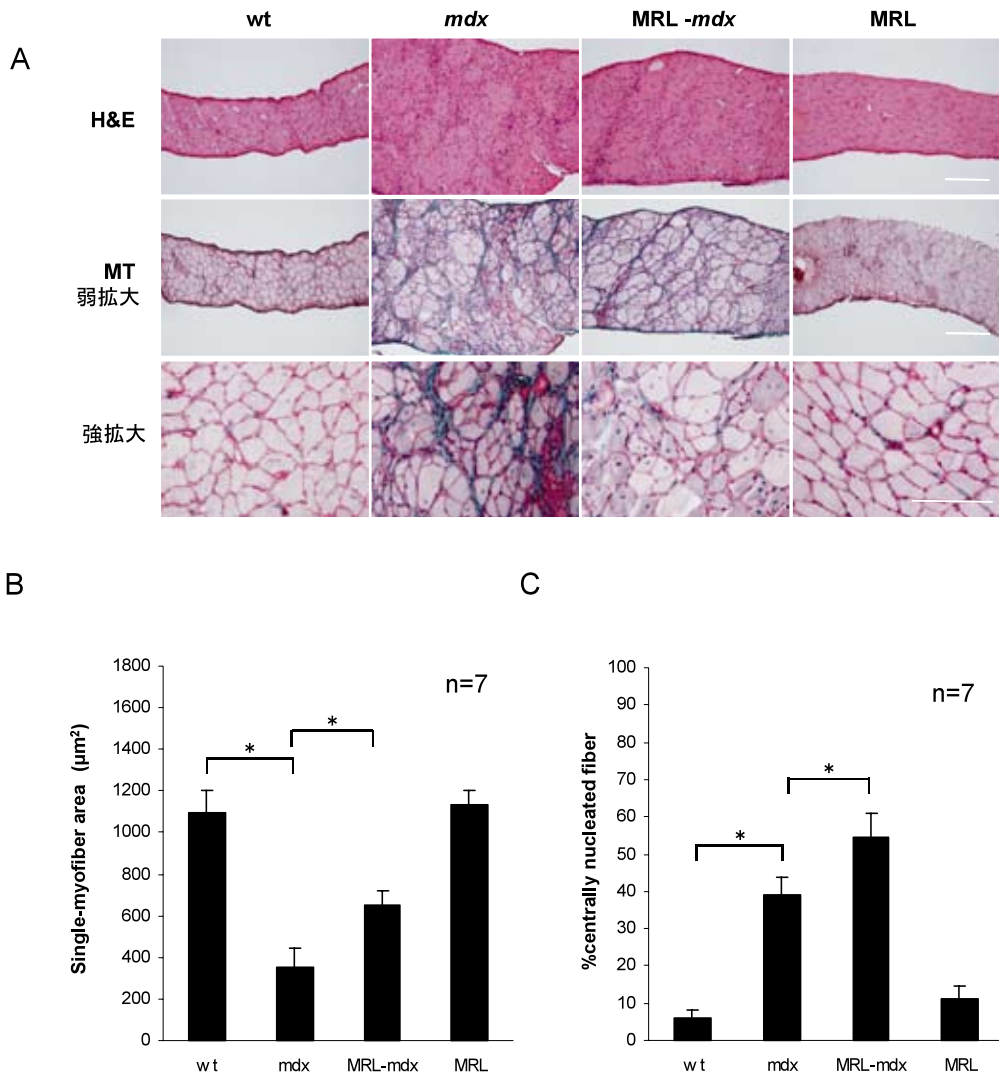


図3 14週齢マウス横隔膜解析 (A) Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色 (上段), Masson's Trichrome (MT) 染色 (中段: 弱拡大, 下段: 強拡大)。バー: 100 µm。 (B) 単一筋線維断面積 (C) 中心核線維比率 \* P < 0.05。

萎縮の改善が認められ MRL 形質導入によってジストロフィン欠損筋の筋線維萎縮が改善することが明らかとなった。

更に筋再生の指標である中心核を有する線維数の割合 (% CNF) について解析を行った ( $n=7$ , 図 2 C). %CNF は野生型マウス ( $1.0 \pm 0.6\%$ ) では殆ど認められないが MRL マウス ( $2.0 \pm 1.6\%$ ) でも同様であった。これらと比較して *mdx* マウス ( $43.0 \pm 3.7\%$ ) では有意に増加していた。更に MRL-*mdx* マウス ( $60.0 \pm 2.2\%$ ) では *mdx* マウスと比較して有意に %CNF の増加が認められ MRL 形質導入によってジストロフィン欠損筋の筋線維再生が促進されることが証明された。雌マウスの解析でも雄マウスと同様の結果であった ( $n=7$ , データ非表示)。

MRL 創傷治癒形質導入は, 6 週齢若年 *mdx* マウス四肢筋の筋線維萎縮を軽減し, 骨格筋再生を促進した。

#### MRL 導入 *mdx* マウス呼吸筋の筋ジストロフィー病変の改善

*mdx* マウス呼吸筋の筋ジストロフィー病変は年齢依存性に進行すると報告されている。14 週齢雄マウス横隔膜について H&E 染色と MT 染色で解析を行った。H&E 染色では *mdx* マウス横隔膜では筋変性及び壊死が進行し, 著明な間

質の線維化のため横隔膜は著明に肥厚していた (図 3 A)。MT 染色では青色で染色される著明な間質の膠原線維が明瞭に描出された。一方, MRL-*mdx* マウスでは *mdx* マウスで認められた筋線維の変性及び壊死は減少し CNF は増加していた。更に間質線維化は減少し横隔膜肥厚の改善も認められた。

SMA を統計学的に解析すると (図 3 B), *mdx* マウス ( $350.7 \pm 89.9 \mu\text{m}^2$ ) は野生型マウス ( $1095.2 \pm 107.4 \mu\text{m}^2$ ) 及び MRL マウス ( $1136.6 \pm 65.8 \mu\text{m}^2$ ) に比較し有意に減少が認められ著明な筋線維萎縮が明らかであった。一方, MRL-*mdx* マウス ( $650.8 \pm 72.5 \mu\text{m}^2$ ) では *mdx* マウスと比較し有意に SMA の増加を認め, MRL 導入によってジストロフィン欠損筋の筋線維萎縮は改善した。

%CNF の統計学的解析 (図 3 C) では, 野生型マウス ( $6.0 \pm 2.1\%$ ) および MRL マウス ( $11.2 \pm 3.4\%$ ) と比較して *mdx* マウス ( $39.2 \pm 4.4\%$ ) では有意に増加が認められた。一方 MRL-*mdx* マウス ( $54.6 \pm 6.5\%$ ) では *mdx* マウスと比較し有意に %CNF の増加が認められ, 筋再生の促進が示された。雌マウスの解析でも雄マウスと同様の結果であった ( $n=7$ , データ非表示)。

MRL 創傷治癒形質導入によって 14 週齢 *mdx* マウスの呼吸筋の筋線維萎縮は軽減し, 骨格筋

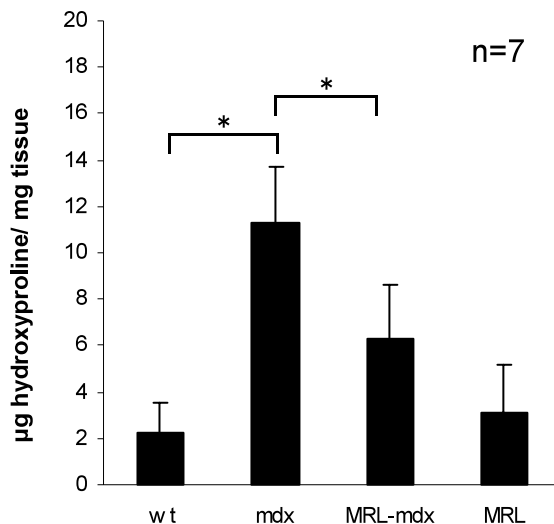


図 4 14 週齢マウス横隔膜ヒドロキシプロリン含有量解析 \*  $P < 0.05$ .

の再生は促進された。

#### MRL 導入 *mdx* マウス呼吸筋の骨格筋線維化の改善

骨格筋線維化について14週齢横隔膜の乾燥重量あたりのヒドロキシプロリン含有量を指標として比較した (n=7, 図4)。野生型マウス (2.2 ± 1.3 μg/mg of tissue) 及び MRL マウス (3.1 ± 2.1 μg/mg of tissue) と比較して *mdx* マウス (11.3 ± 2.4 μg/mg of tissue) は有意に増加が認められた。一方, MRL-*mdx* マウス (6.03 ± 2.3 μg/mg of tissue) は *mdx* マウスと比較し有意に減少を認めた。雌マウスの解析でも雄マウスと同様な結果であった (n=7, データ非表示)。

MRL 創傷治癒形質導入によって *mdx* マウスで認められる骨格筋線維化は軽減した。

#### 考 察

本研究は近年注目されている創傷治癒形質 MRL を遺伝的に導入した筋ジストロフィーモデルマウスを作出してその骨格筋について解析をおこなった。

MRL マウスの耳穴閉鎖というユニークな形質は, 様々な純系野生型マウスと交配しても保存されると報告されてきたが<sup>10-13)</sup>, これまで疾患モデルマウスとの交配の報告はない。我々はまず MRL マウスとジストロフィン欠損 DMD モデルである *mdx* マウスを交配し耳穴閉鎖を指標に, 4 種類の遺伝子型 (野生型, *mdx*, MRL, MRL 導入 *mdx*) を示すマウスを作出することに成功した。

*mdx* マウスについては四肢筋の筋ジストロフィー変化 (変性・壊死・筋線維萎縮・再生) は6週齢をピークとしその後改善する。一方, 呼吸筋の筋ジストロフィー変化は年齢依存性に進行すると報告されている<sup>7)</sup>。今回の交配によって誕生した *mdx* マウスについても, この骨格筋病変の経時的変化が認められることを確認した。

そこでこの結果をもとに, 各遺伝子型を示すマウスの骨格筋について6週齢及び14週齢の2

つのタイムポイントで比較解析をおこなった。

6週齢大腿四頭筋の解析からは, *mdx* マウスと比較して MRL 導入 *mdx* マウスでは変性壊死は減少し再生線維の増加が認められ筋線維萎縮にも改善が認められた。また14週齢横隔膜の解析によっても同様に壊死の減少, 再生線維増加, 筋線維断面積の増加が明らかとなった。従って MRL 形質の遺伝的導入によって DMD モデルの骨格筋病変が改善することが明らかとなった。

MRL 形質導入による筋ジストロフィー改善の細胞組織学的な機構については現時点では不明である。注目されるのは MT 染色及びヒドロキシプロリン含有量測定から MRL 導入によって骨格筋間質の線維化が有意に減少することが明らかとなった点である。この結果は, これまでの MRL マウス研究で再生促進が報告されている耳穴損傷<sup>4)</sup>, アルカリ角膜損傷<sup>9)</sup>, 手指切断<sup>18)</sup> 骨折後関節炎<sup>19)</sup>, 心筋損傷<sup>8)</sup> で報告されている炎症反応や線維化を伴わない創傷治癒促進現象, 即ち哺乳類でありながらもほぼ完全な組織の再生が生じるという特徴<sup>8-10)</sup> と一致していた。しかしながらこれまでの報告は MRL マウスに一時的な損傷を与え短期間の創傷治癒及び再生を観察しているのに対し, 我々の研究は筋ジストロフィーモデルという長期間にわたって組織損傷が進行する疾患モデルに対してこの MRL 形質を導入しても同様な現象が一貫して認められることを明確とした点に新規性がある。

一方, MRL 形質によってなぜ創傷治癒促進現象及び組織再生促進現象が生じるのかという分子機構については, これまで原因遺伝子が未確定であることが障害となって十分な解明が進んでいない。MRL マウスの耳穴損傷に伴う遺伝子発現解析やプロテオミクス解析などからは, TGF-β ファミリー分子やマトリックスメタロプロテアーゼ分子の発現が抑制され炎症及び線維化抑制を反映していると想定されている<sup>10, 11, 20-22)</sup>。同様に MRL マウス角膜の解析からは, コントロールマウスと比較して細胞外マトリックシリモデリング分子が高発現していると報告されている<sup>23)</sup>。一方, MRL マウスの心筋



虚血後の遺伝子解析からは, 血管新生因子, 心筋特異的転写因子などの心筋再生因子の発現が上昇していると報告されている. 以上の報告と併せると, MRL 創傷治癒形質は, DMD におけるジストロフィン欠損に対して二次的に生じると考えられている炎症・線維化という再生阻害機構を強力に抑制することによって, 骨格筋再生を促進し筋ジストロフィー変化を改善させた可能性が考えられる. 今後は実際に骨格筋の遺伝子解析をおこなって, 骨格筋病変再生に至る分子機構を検討していく予定である.

将来の MRL 形質導入による筋ジストロフィー治療を考えると本研究のジストロフィン欠損筋の骨格筋病変の改善が実際に筋力低下の改善に至るのかについて生理学的に解析することが必要となる. ジストロフィン遺伝子をウイルスベクターで導入することにより筋張力低下が改善するという報告<sup>16, 24)</sup>があり, 我々は現在このグループと共同で MRL 導入 *mdx* マウスの前脛骨筋及び横隔膜の筋張力について検討を開始している.

本研究によって創傷治癒形質 MRL 導入による DMD の間質線維化抑制及び筋再生増強を目指す新規治療法の可能性が示された. 今後はこの MRL 形質を標的とする新規治療法と根治療法である欠損遺伝子導入や細胞治療を組み合わせることによって筋ジストロフィーの有効な治療が可能となることが期待される.

## 謝 辞

御指導を頂きました川崎医科大学分子生物学西松伸一郎講師, 技術協力を頂きました内科学(神経)実験補助員直江奈実様, 剣持登美子様, 医用生物センター, 医用実験センター, 生理機能センターの皆様には感謝いたします. 本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費(18-602, 19-607 S, 20-604, 21-602)により施行した.

## 利益相反

関連事項なし.

## 引用文献

- 1) Duchenne GB : Studies on pseudohypertrophic muscular paralysis or myosclerotic paralysis. Arch Neurol 19 : 629-636, 1968
- 2) Moser H, Emery AE : The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. Clin Genet 5 : 271-284, 1974
- 3) Kunkel LM, Hejtmanck JF, Caskey CT, *et al.* : Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 322 : 73-77, 1986
- 4) Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ : X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 81 : 1189-1192, 1984
- 5) Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS : Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature 28 : 418-421, 2002
- 6) Minetti GC, Colussi C, Adami R, *et al.* : Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. Nat Med 12 : 1147-1150, 2006
- 7) Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E : A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. Clin. Immunol Immunopathol 8898 : 35-45, 1998
- 8) Leferovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB, Heber-Katz E : Heart regeneration in adult MRL mice. Proc Natl Acad Sci U S A 98 : 9830-9835, 2001
- 9) Ueno M, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Shaffer DJ, Roopenian DC, Shultz LD : Accelerated wound healing of alkali-burned corneas in MRL mice is associated with a reduced inflammatory signature. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 4097-4106, 2005
- 10) McBrearty BA, Clark LD, Zhang XM, Blankenhorn EP, Heber-Katz E : Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. Proc Natl Acad Sci U S A 95 : 11792-11797, 1998
- 11) Li X, Mohan S, Gu W, Miyakoshi N, Baylink DJ : Differential protein profile in the ear-punched tissue of regeneration and non-regeneration strains of mice: a novel approach to explore the candidate genes for soft-tissue regeneration. Biochim Biophys Acta 1524 : 102-109, 2000
- 12) Masinde GL, Li X, Gu W, Davidson H, Mohan S, Baylink DJ : Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple

- time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ and SJ/J) mice F<sub>2</sub> population. *Genome Res* 1195 : 2027-2033, 2001
- 13) Yu H, Baylink DJ, Masinde GL, Li R, Nguyen B, Davidson HM, Xu S, Mohan S : Mouse chromosome 9 quantitative trait loci for soft tissue regeneration: congenic analysis and fine mapping. *Wound Rep Reg* 15 : 922-927, 2007
  - 14) Amalfitano A, Chamberlain JS : The mdx-amplification-resistant mutation system assay, a simple and rapid polymerase chain reaction-based detection of the mdx allele. *Muscle Nerve* 19 : 1549-1553, 1996
  - 15) Vaghy PL, Fang J, Wu W, Vaghy LP : Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *FEBS letters* 431 : 125-127, 1998
  - 16) Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S : AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther* 10 : 821-828, 2004
  - 17) Niedermüller H, Skalicky M, Hofecker G, Kment A : Investigations on the kinetics of collagen-metabolism in young and old rats. *Exp Gerontol* 12 : 159-168, 1977
  - 18) Chadwick RB, Bu L, Yu H, Hu Y, Wergedal JE, Mohan S, Baylink DJ : Digit tip regrowth and differential gene expression in MRL/MpJ, DBA/2, and C57BL/6 mice. *Wound Rep Reg* 15 : 275-284, 2007
  - 19) Ward BD, Furman BD, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F, Olson SA : Absence of posttraumatic arthritis following intraarticular fracture in the MRL/MpJ mouse. *Arthritis Rheumatism* 58 : 744-753, 2008
  - 20) Li X, Mohan S, Gu W, Baylink DJ : Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mammalian Genome* 12 : 52-59, 2001
  - 21) Masinde G, Li X, Baylink DJ, Nguyen B, Mohan S : Isolation of wound healing/regeneration genes using restrictive fragment differential display-PCR in MRL/MPJ and C57BL/6 mice. *BBRC* 330 : 117-122, 2005
  - 22) Metcalfe AD, Willis H, Beare A, Ferguson MW : Characterizing regeneration in the mammalian external ear. *J Anat* 209 : 436-446, 2006
  - 23) Tucker B, Klassen H, Yang L, Chen DF, Young MJ : Elevated MMP expression in the MRL/MpJ mouse retina creates a permissive environment for retinal regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1686-1695, 2008
  - 24) Ishizaki M, Suga T, Kimura E, Shiota T, Kawano R, Uchida Y, Uchino K, Yamashita S, Maeda Y, Uchino M : Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul Disord* 18 : 342-348, 2008

## Introduction of the MRL-MpJ wound-healing phenotype improves skeletal muscle pathology in Duchenne muscular dystrophy model mice

Masahiro FUJINO<sup>1, 2)</sup>, Yutaka OHSAWA<sup>2)</sup>, Tadashi OKADA<sup>2)</sup>

Atsushi KUGA<sup>2, 3)</sup>, Saori HAYASHI<sup>2)</sup>, Mitsue RIKIMARU<sup>2)</sup>

Tatsufumi MURAKAMI<sup>2)</sup>, Yoshihide SUNADA<sup>2)</sup>, Mitsushiro NAGAO<sup>1)</sup>

1) Department of Health and Sports Science Faculty of Health Science and Technology, Kawasaki University of Medical Welfare, 288 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

2) Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

3) Department of Neurology, Kobe University Hospital, 7-5-2 Kusunoki-chou, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

**ABSTRACT** MRL-MpJ mice are uniquely characterized by complete closure of ear punch wounds and have been highlighted as a mammalian model of accelerated wound-healing

and tissue regeneration. However, the deficient gene in the MRL-MpJ mice has not yet been determined. In this study, we mated dystrophin-deficient Duchenne muscular dystrophy (DMD) model *mdx* mice (*Dys<sup>mdx</sup>*) with MRL-MpJ mice to generate and characterize offspring carrying *Dys<sup>mdx</sup>/MRL-MpJ* to investigate the effect of the MRL-MpJ wound-healing phenotype on the DMD phenotype. Single-myofiber areas (SMA) and centrally nucleated myofibers (CNF) of the quadriceps femoris muscle from the *Dys<sup>mdx</sup>/MRL-MpJ* mice had significantly increased at six weeks of age compared to those of the *mdx* mice. In addition, SMA and CNF of the diaphragm in 14-week-old *Dys<sup>mdx</sup>/MRL-MpJ* mice also significantly increased compared to those in the *mdx* mice. Moreover, the hydroxyproline content, a marker of tissue fibrosis, was significantly decreased in the 14-week-old *Dys<sup>mdx</sup>/MRL-MpJ* mouse diaphragm. These data suggest that introduction of the MRL/MpJ wound-healing phenotype decreases myofiber hypotrophy and accelerates myofiber regeneration by decreasing muscle fibrosis in dystrophin-deficient muscles, thereby could become a novel therapeutic option for patients with DMD.

(Accepted on September 4, 2009)

Key words : **Accelerated wound-healing model (MRL-MpJ) mouse,**  
**dystrophin-deficient Duchenne muscular dystrophy model (*mdx*) mouse,**  
**single-myofiber area (SMA), centrally nucleated myofiber (CNN),**  
**hydroxyproline content**

---

Corresponding author  
Yoshihide Sunada, MD, PhD  
Division of Neurology, Department of Internal  
Medicine, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima,  
Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111  
Fax : 81 86 462 1199  
E-mail : ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp