

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-525576

(P2012-525576A)

(43) 公表日 平成24年10月22日(2012.10.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-507815 (P2012-507815)	(71) 出願人	508020203
(86) (22) 出願日	平成22年4月30日 (2010. 4. 30)		ザ ユニバーシティ オブ バーミンガム
(85) 翻訳文提出日	平成23年12月28日 (2011.12.28)		イギリス ウェスト ミッドランド B 1
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/000874		5 2 T T バーミンガム エッジバスト
(87) 国際公開番号	W02010/125358		ン
(87) 国際公開日	平成22年11月4日 (2010.11.4)	(74) 代理人	100100549
(31) 優先権主張番号	0907516.9		弁理士 川口 嘉之
(32) 優先日	平成21年4月30日 (2009. 4. 30)	(74) 代理人	100090516
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋ジストロフィーを診断及び治療する方法

(57) 【要約】

本発明は、筋ジストロフィーの症状を示している個体、又は筋ジストロフィーを発症する傾向を有する個体を特定するための方法であって、個体由来の組織試料中の、p a x - 7、カベオリン - 3、及び/又は速筋ミオシンから選択される1つ又は複数のタンパク質の発現レベルを決定することを含む方法を記述する。筋ジストロフィーを治療するためのカベオリン - 3の使用、及び該化合物を含有する組成物の使用も特許請求される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

筋ジストロフィーの症状を示している個体を特定するための、筋ジストロフィーの治療又は進行をモニターするための、又は筋ジストロフィーを発症する傾向を有する個体を特定する方法であって、前記個体由来の組織試料中の、p a x - 7、カベオリン - 3、及び / 又は速筋ミオシンから選択される 1 つ又は複数のタンパク質の発現レベルを決定することを含む方法。

【請求項 2】

p a x - 7 が測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

カベオリン - 3 が測定される、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

速筋ミオシンが測定される、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記組織試料中のインスリン様増殖因子 - 2 (I g f - 2)、C D K N 1 c / P 5 7 k i p 2、及び / 又は p A k t の 1 つ又は複数の発現レベルを決定することをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) 及び / 又は肢帯筋ジストロフィー (L G M D) である、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記組織試料が、乳児の出生前又は出生後の前記乳児に由来する、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記タンパク質の発現レベルが、イムノアッセイにより決定される、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記タンパク質の 1 つ又は複数の発現レベルが、
 (i) 前記試料を免疫染色することにより、及び / 又は
 (i i) タンパク質の免疫プロットにより、
 決定されることを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記各タンパク質の発現レベルが、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (Q P C R) で決定される、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

p a x - 7、カベオリン - 3、及び / 若しくは速筋ミオシンの 2 つ以上に特異的な 2 つ以上の抗体、又は p a x - 7、カベオリン - 3、及び / 若しくは速筋ミオシンの 2 つ以上をコードする m R N A に特異的な 2 対以上の P C R プライマーを含む、前記請求項のいずれかに記載の方法で使用するためのキット。

【請求項 12】

前記タンパク質が、p a x - 7 タンパク質又は p a x - 7 をコードする m R N A である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

前記タンパク質が、カベオリン - 3 又はカベオリン - 3 をコードする m R N A である、請求項 11 又は 12 に記載のキット。

【請求項 14】

前記タンパク質が、速筋ミオシン又は速筋ミオシンをコードする m R N A である、請求項 11 ~ 13 に記載のキット。

【請求項 15】

パラホルムアルデヒドとともに、p a x - 7 タンパク質に特異的な抗体を含む、請求項

10

20

30

40

50

1 ~ 7 に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項 16】

I g f - 2 に特異的な抗体又は P C R プライマー対を含む、請求項 11 ~ 15 に記載のキット。

【請求項 17】

チラミドシグナル増幅 (T S A) 用の 1 つ又は複数の試薬を含む、請求項 11 ~ 16 に記載のキット。

【請求項 18】

患者にカベオリン - 3 を投与すること、又は患者のカベオリン - 3 発現を増加させることを含む、筋ジストロフィーを治療する方法。

【請求項 19】

薬学的に許容される担体と組み合わせて、カベオリン - 3 を含む医薬製剤。

【請求項 20】

筋ジストロフィーを治療するために使用されるカベオリン - 3。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

アッセイ

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) 及び肢帯筋ジストロフィー (L G M D) 等の筋ジストロフィーを有するか又は発症する可能性が高い個体を特定するための方法、及びアッセイキットに関する。

【背景技術】

【0002】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) は、筋細胞膜貫通型ジストロフィン - 糖タンパク質複合体 (D G C) の機能障害に関連した衰弱性先天性疾患の最も重篤なファミリーである。典型的な D M D は、骨格筋肉組織全体に影響を与え、D G C、ジストロフィンの本質的な細胞内成分の喪失に起因する (Hoffman et al., 1987)。症状は、初期の (約 3 歳) 骨格筋機能の進行性障害を特徴とし、広範な筋損傷に結び付き、若年死 (通常は 20 歳代) を引き起こす。しかしながら、一般的に呼吸筋の機能不全から生じる合併症が死因となり、D M D を有する患者の 95% は心筋症を発生し、そのうち 10 ~ 30% の症例でそれが死亡の主原因となる (Cox and Kunkel, 1997)。D M D のジストロフィン欠損モデルである m d x マウスは、心筋症 ; 線維再生の勃発に関連する骨格筋ジストロフィー ; 線維症 ; 骨格筋筋芽細胞の過剰増殖及びアポトーシスを含む D M D の出生後特徴の多くを示す (Harper et al., 2002; Smith et al., 1995)。表現型は、m d x の寿命が野生型と比べて短縮されるものの、ヒト D M D ほど重篤ではない (Chamberlain et al., 2007)。カベオリン - 3 の喪失は、罹患筋肉群が主に肢帯及び心臓である軽度な形態の M D、L G M D - 1 c をもたらし、カベオリン - 3 欠損マウス (c a v - 3^{-/-}) は、L G M D、T 管欠損、心筋症、及び骨格筋アポトーシスを示す (Hagiwara et al., 2000; Minetti et al., 2002)。

【0003】

胚骨格筋は、体節の皮筋板領域に由来する (Cossu et al., 1996; Hollway and Currie, 2003)。ニワトリ胚では、真皮性筋節の全ての領域は、時間依存的な様式で筋原性前駆体をこのプロセスに提供すると考えられる (Gros et al., 2004)。ジストロフィンは、E 9.5 由来の胚体節で最初に発現され、従って初期筋形成に機能を有する場合がある (Huang et al., 2000; IIsley et al., 2002)。筋板は、周囲組織により分泌される誘導因子の制御下で、それぞれ (E 10.5 から) 軸上 (深背筋) 筋肉、及び (E 11.5 から) 軸下 (肢、腹部、横隔膜) 筋肉を生成する (m y f - 5⁺) 幹細胞集団になる細胞を産生する (Hollway and Currie, 2003 で概説されている)。

【0004】

哺乳類胚骨格筋分化では、軸下系統を生成して一次筋管の足場を産生し、その後多数の

10

20

30

40

50

二次筋管を産生する2つの筋形成急増があると考えられており、それらは新生筋肉の大部分を構成する(Cossu et al., 1996)。二次筋管は、単一のより大きな一次筋管の周囲でまとまって形成する、一次筋管より長くより薄い、形態学的に異なる筋管のサブセットである(Cho et al., 1994)。

【0005】

筋管分化は、機能的な筋肉幹細胞集団の存在に依存する。Myf-5は、体節で発現され、E8.5における最も初期の筋原性制御因子(MRF)であり、筋肉分化の前に見出される唯一のMRFであり、一次及び二次筋形成の両方の全体にわたって胚筋肉群全てにおいて存続する(Cossu et al., 1996)。従って、Myf-5は、胚筋芽細胞集団の良好なマーカーである。系統分析により、衛星細胞の大多数は、体節に由来することが示唆されている(Armand et al., 1983)。広範な証拠により、今では、成体衛星細胞集団の、特にその修復機能の正しい機能性に不可欠であるものとして、pax-7+細胞集団が関連付けられている(Zammit et al., 2006に概説されている)。Pax-7は、筋形成の転写因子、抑制因子であり、成体骨格筋幹細胞集団(「衛星」細胞)の維持及び特化に重要な役割を果たし、E11.5由来の体節から出現する未分化筋肉幹細胞で発現される(Merrick et al., 2007; Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000)。

10

【0006】

個々の骨格筋群の機能の特異性は、妊娠後期中に開始されるプロセスである、異なる筋管への速筋ミオシンアイソフォームの適切な局在化に依存する(Merrick et al., 2007)。哺乳動物胚では、発生中(胚性及び新生児性)ミオシンアイソフォームは、成体速筋ミオシンアイソフォームを有する新生二次筋管で同時発現される(Cho et al., 1994)。後期段階では、発生中ミオシンアイソフォームは下方制御され、筋肉特異的パターンで成体ミオシン重鎖(MyHC)アイソフォームにより置換され、このプロセスは出生後数週間になるまで終了しない(Agbulut et al., 2003; Merrick et al., 2007)。胚心臓は、時間的に制御された様式で、2つのミオシンアイソフォーム(心筋ミオシン及び遅筋/心筋ミオシン)を発現する。心筋ミオシンの突然変異は、心筋症に關与する(Geistfer-Lowrance et al., 1990)。

20

【0007】

ジストロフィンは、筋細胞膜の細胞内側でジストログリカンのベータサブユニットと結合し、細胞外マトリックスを骨格筋筋管のアクチン細胞骨格に結合させる多機能タンパク質複合体であるDGCの本質的な成分である(Ervasti and Cambell, 1993)。出生後の筋肉では、ジストロフィン欠乏は、DGCの完全な解体、及び大多数のDGCタンパク質の二次的下方制御をもたらす(Ohlendieck et al., 1993)。カベオリン-3は、骨格筋カベオラ及びDGCの両方に局在化し、特異的WWドメインにより、ジストロフィンを認識及び結合する。ジストログリカンc-末端の同じPPXYモチーフに結合し、従ってジストロフィンとジストログリカンの相互作用を阻止する(Jung et al., 1995; Sotgia et al., 2000)。

30

【0008】

ジストログリカン結合部位に対する、カベオリン-3とジストロフィンとの競合的相互作用は、筋肉発生の幾つかの局面に重要である可能性があるが、これは、広範には研究されていない。3つの遺伝子は全て、ニワトリ胚、マウス胚、ゼブラフィッシュ胚、及びツメガエル胚で発生の初期に発現される(Biederer et al., 2000; Houzelstein et al., 1992; Nixon et al., 2005; Razani et al., 2002; Shin et al., 2003; Anderson et al., 2007)。ゼブラフィッシュでは、これらタンパク質のいずれかの喪失が、筋形成に障害を起こし、肉眼的筋異常を引き起こすことが示されており、マウスでは、ジストログリカン欠乏が初期胚致死に結び付く(Bassett et al., 2003; Nixon et al., 2005; Parsons et al., 2002; Williamson et al., 1997)。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

50

- 【非特許文献 1】Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F. and Butler-Browne, G. (2003). Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol Cell* 95, 399-406.
- 【非特許文献 2】Anderson, C, Winder, S. J., and Borycki, A-G. (2007). Dystroglycan Protein Distribution Coincides with Basement Membranes and Muscle Differentiation During Mouse Embryogenesis *Devel. Dynamics* 236, 2627-2635.
- 【非特許文献 3】Aravamudan, B., Volonte, D., Ramani, R., Gursoy, E., Lisanti, M. P., London, B. and Galbiati, F. (2003). Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Hum Mol Genet* 12, 2777-88.
- 【非特許文献 4】Armand, O., Boutineau, A. M., Mauger, A., Pautou, M. P. and Kieny, M. (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 72, 163-81. 10
- 【非特許文献 5】Baghdiguian, S., Martin, M., Richard, I., Pons, F., Astier, C, Bourg, N., Hay, R. T., Chemaly, R., Halaby, G., Loiselet, J. et al. (1999). Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 5, 503-11.
- 【非特許文献 6】Bassett, D. L, Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G. and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* 130, 58 20
51-60.
- 【非特許文献 7】Biederer, C. H., Ries, S. J., Moser, M., Florio, M., Israel, M. A., McConnick, F. and Buettner, R. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factors myogenin and Id2 mediate specific induction of caveolin-3 gene expression during embryonic development. *J. Biol Chem* 275, 26245-51.
- 【非特許文献 8】Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D. and Faulkner, J. A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *Faseb J* 21, 2195-204.
- 【非特許文献 9】Chan, S., Head, S. and Morley, J. (2007). Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. *Am J Physiol Cell Physiol*. 30
- 【非特許文献 10】Cho, M., Hughes, S. M., Karsch-Mizrachi, I., Travis, M., Leinwand, L. A. and Blau, H. M. (1994). Fast myosin heavy chains expressed in secondary mammalian muscle fibers at the time of their inception. *JCell Sci* 107 (Pt 9), 2361-71.
- 【非特許文献 11】Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* 12, 218-23.
- 【非特許文献 12】Cox, G. F. and Kunkel, L. M. (1997). Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol* 12, 329-43.
- 【非特許文献 13】Cuda, G., Fananapazir, L., Zhu, W. S., Sellers, J. R. and Epstein, N. D. (1993). Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin Invest* 91, 2861-5. 40
- 【非特許文献 14】Cusella-De Angelis, M. G., Lyons, G., Sonnino, C, De Angelis, L., Vivarelli, E., Farmer, K., Wright, W. E., Molinaro, M., Bouche, M., Buckingham, M. et al. (1992). MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *J Cell Biol* 116, 1243-55.
- 【非特許文献 15】Ervasti, J. and Campbell, K. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *Journal of Cell Biology* 122, 809-823.
- 【非特許文献 16】Finsterer, J., Gelpi, E. and Stollberger, C. (2005). Left vent 50

ricular hypertrabeculation/noncompaction as a cardiac manifestation of Duchenne muscular dystrophy under non-invasive positive-pressure ventilation. *Acta Cardio* 1 60, 445-8.

【非特許文献 1 7】Frock, R. L., Kudlow, B. A., Evans, A. M., Jameson, S. A., Hauschka, S. D. and Kennedy, B. K. (2006). Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev* 20, 486-500.

【非特許文献 1 8】Galbiati, F., Engleman, J., Volonte, D., Zhang, X., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Kneitz, B., Edelmann, W. and Lisanti, M. (2001). Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-tubule Abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 21425-21433. 10

【非特許文献 1 9】Galbiati, F., Volonte, D., Chu, J. B., Li, M., Fine, S. W., Fu, M., Bermudez, J., Pedemonte, M., Weidenheim, K. M., Pestell, R. G. et al. (2000). Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9689-94.

【非特許文献 2 0】Geisterfer-Lowrance, A. A., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H. P., McKenna, W., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62, 999-1006.

【非特許文献 2 1】Glass, D. (2005). A signalling role for dystrophin: inhibiting skeletal muscle atrophy pathways. *Cancer Cell* 5, 351-2. 20

【非特許文献 2 2】Gros, J., Scaal, M. and Marcelle, C. (2004). A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* 6, 875-82.

【非特許文献 2 3】Gross, M. K., Moran-Rivard, L., Velasquez, T., Nakatsu, M. N., Jagla, K. and Goulding, M. (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* 127, 413-24.

【非特許文献 2 4】Hadchouel, J., Carvajal, J. J., Daubas, P., Bajard, L., Chang, T., Rocancourt, D., Cox, D., Summerbell, D., Tajbakhsh, S., Rigby, P. W. et al. (2003). Analysis of a key regulatory region upstream of the *Myf5* gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* 130, 3415-26. 30

【非特許文献 2 5】Hagiwara, Y., Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Yorifuji, H., Nonaka, L., Ozawa, E. and Kikuchi, T. (2000). Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum Mol Genet* 9, 3047-54.

【非特許文献 2 6】Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C, Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., Harper, H. A., Robinson, A. S., Engelhardt, J. F., Brooks, S. V. et al. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 8, 253-61.

【非特許文献 2 7】Hayashi, T., Arimura, T., Ueda, K., Shibata, H., Hohda, S., Takahashi, M., Hori, H., Koga, Y., Oka, N., Imaizumi, T. et al. (2004). Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 178-84. 40

【非特許文献 2 8】Hoffman, E., Brown, R. and Kunkel, L. (1987). Dystrophin: The protein product of the Duchenne Muscular Dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.

【非特許文献 2 9】Hollway, G. E. and Currie, P. D. (2003). Myotome meanderings. Cellular morphogenesis and the making of muscle. *EMBO Rep* 4, 855-60.

【非特許文献 3 0】Houzelstein, D., Lyons, G. E., Chamberlain, J. and Buckingham, M. E. (1992).

【非特許文献 3 1】Localization of dystrophin gene transcripts during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 119, 811-21. 50

【非特許文献 3 2】Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M. and Eck, M. (2000). Structure of a WW domain-containing fragment of dystrophin complexed with beta-dystroglycan. *Nat. Struct. Biol* 7, 634-638.

【非特許文献 3 3】Hlsley, J. L., Sudol, M. and Winder, S. J. (2002). The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 183-9.

【非特許文献 3 4】Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. and Campbell, K. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27305-27310.

【非特許文献 3 5】Kaufman, M. (1992). *The Atlas of Mouse Development*: London Academic Press.

【非特許文献 3 6】Kaufman, M. H. (1995). *The Atlas of mouse development*. Cambridge: Academic Press, Harcourt Brace & Company.

【非特許文献 3 7】Lehmann, R. (2001). Cell migration in invertebrates: clues from border and distal tip cells. *Curr Opin Genet Dev* 11, 457-63.

【非特許文献 3 8】Lindon, C, Montarras, D. and Pinset, C. (1998). Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *JCell Biol* 140, 111-8.

【非特許文献 3 9】Merrick, D., Ting, T., Stadler, L. and Smith, J. (2007). A role for Insulin-like growth factor 2 in specification of the fast skeletal muscle fibre. *BMC Developmental Biology* 7:65, doi:10.1186/1471-213X-7-65.

【非特許文献 4 0】Minetti, C, Bado, M., Broda, P., Sotgia, F., Bruno, C, Galbati, F., Volonte, D., Lucania, G., Pavan, A., Bonilla, E. et al. (2002). Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol* 160, 265-70.

【非特許文献 4 1】Nixon, S. J., Wegner, J., Ferguson, C, Mery, P. F., Hancock, J. F., Currie, P. D., Key, B., Westerfield, M. and Parton, R. G. (2005). Zebrafish as a model for caveolin-associated muscle disease; caveolin-3 is required for myofibril organization and muscle cell patterning. *Hum Mol Genet* 14, 1727-43.

【非特許文献 4 2】Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V. V., Towbin, J. A., Bosch, E. P., Weinstein, S. L., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. (1993). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43, 795-800.

【非特許文献 4 3】Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, . and Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111, 1097- 107.

【非特許文献 4 4】Oustanina, S.,ause, G. and Braun, T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *Embo J* 23, 3430-9.

【非特許文献 4 5】Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M. and Stemple, D. L. (2002). Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 129 , 3505-12.

【非特許文献 4 6】Quinlan, J. G., Hahn, H. S., Wong, B. L., Lorenz, J. N., Wensich, A. S. and Levin, L. S. (2004). Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord* 14, 491-6.

【非特許文献 4 7】Razani, B., Park, D. S., Miyanaga, Y., Ghatpande, A., Cohen, J., Wang, X. B., Scherer, P. E., Evans, T. and Lisanti, M. P. (2002). Molecular cloning and developmental expression of the caveolin gene family in the amphibian *Xenopus laevis*. *Biochemistry* 41, 7914-24.

【非特許文献 4 8】Reimann, J., Irintchev, A. and Wernig, A. (2000). Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx

10

20

30

40

50

mice. *Neuromuscul Disord* 10, 276-82.

【非特許文献 4 9】Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *JCe// Biol* 172, 91-102.

【非特許文献 5 0】Roig, M., Roma, J., Fargas, A. and Munell, F. (2004). Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in mdx mice. *Acta Neuropathol* 107, 27-34.

【非特許文献 5 1】Roma, J., Munell, F., Fargas, A. and Roig, M. (2004). Evolution of pathological changes in the gastrocnemius of the mdx mice correlate with utrophin and beta-dystroglycan expression. *Acta Neuropathol* 108, 443-52.

【非特許文献 5 2】Schofield, J., Houzelstein, D., Davies, K., Buckingham, M. and Edwards, Y. H. (1993). Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 198, 254-64.

【非特許文献 5 3】Schofield, J. N., Gorecki, D. C, Blake, D. J., Davies, K. and Edwards, Y. H. (1995). Dystroglycan mRNA expression during normal and mdx mouse embryogenesis: a comparison with utrophin and the apo-dystrophins. *Dev Dyn* 204, 178-85.

【非特許文献 5 4】Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777- 86.

【非特許文献 1】Shin, D. H., Kim, J. S., Kwon, B. S., Lee, K. S., Kim, J. W., Kim, M. H., Cho, S. S. and Lee, W. J. (2003). Caveolin-3 expression during early chicken development. *Brain Res Dev Brain Res* 141, 83-9.

【非特許文献 5 5】Smith, J. (1996). Muscle Growth factors, ubiquitin and apoptosis in dystrophic muscle: Apoptosis declines with age in the mdx mouse. *B. Appl. Myol.* 6, 279-284.

【非特許文献 5 6】Smith, J., Fowke, G. and Schofield, P. (1995). Programmed cell death in dystrophic (mdx) muscle is inhibited by IGF-II. *Cell Death Differ.* 2, 243 -251.

【非特許文献 5 7】Smith, J., Goldsmith, C, Ward, A. and LeDieu, R. (2000). IGF-I ameliorates the dystrophic phenotype and coordinately down-regulates programmed cell death. *Cell Death & Differentiation* 7, 1109-1118.

【非特許文献 5 8】Smith, J. and Merrick, D. (2008). Embryonic skeletal muscle micro-explant culture and isolation of skeletal muscle stem cells: Humana Press.

【非特許文献 5 9】Smith, J. and Schofield, P. N. (1994). The effects of fibroblast growth factors in long-term primary culture of dystrophic (mdx) mouse muscle myoblasts. *Exp Cell Res* 210, 86-93.

【非特許文献 6 0】Smith, J. and Schofield, P. N. (1997). Stable integration of an mdx skeletal muscle cell line into dystrophic (mdx) skeletal muscle: evidence for stem cell status. *Cell Growth Differ* 8, 927-34.

【非特許文献 6 1】Smythe, G. M., Eby, J. C, Disatnik, M. H. and Rando, T. A. (2003). A caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci* 116, 4739-49.

【非特許文献 6 2】Sotgia, F., Lee, J., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T., Macioce, P., Sargiacomo, M., Dagna Bricarelli, F., Minetti, C, Sudol, M. et al. (2000). Caveolin-3 Directly Interacts with the C-terminal Tail of -Dystroglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 38048- 38058.

【非特許文献 6 3】Spencer, M. J., Walsh, C. M., Dorshkind, K. A., Rodriguez, E.

10

20

30

40

50

M. and Tidball, J. G. (1997). Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest* 99, 2745-51.

【非特許文献 6 4】Vaghy, P., Frang, J., Wu, W. and Vaghy, L. (1998). Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *FEBS Letters* 431, 125-127.

【非特許文献 6 5】Volonte, D., Peoples, A. J. and Galbiati, F. (2003). Modulation of myoblast fusion by caveolin-3 in dystrophic skeletal muscle cells: implications for Duchenne muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy-1C. *Mol Biol Cell* 14, 4075-88.

【非特許文献 6 6】Webster, C, Silberstein, L., Hays, A. P. and Blau, H. M. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52, 503-13.

【非特許文献 6 7】Weir, A. P., Morgan, J. E. and Davies, K. E. (2004). A-utrophin up-regulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. *Neuromuscul Disord* 14, 19-23.

【非特許文献 6 8】Wilding, J., Jurgen, E., Schneider, A., Sang, E., Davies, K., Neubauer, S. and K, C. (2005). Dystrophin- and MLP-deficient mouse hearts: marked differences in morphology and function, but similar accumulation of cytoskeletal proteins. *The FASEB Journal* 19, 79-81.

【非特許文献 6 9】Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C, Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnya, O. and Campbell, K. P. (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag 1 -null mice. *Hum Mol Genet* 6, 831-41.

【非特許文献 7 0】Woodman, S. E., Park, D. S., Cohen, A. W., Cheung, M. W., Chandra, M., Shirani, J., Tang, B., Jelicks, L. A., Kitsis, R. N., Christ, G. J. et al. (2002). Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277, 38988-97.

【非特許文献 7 1】Yue Y, Li Z, Harper SQ, Davisson RL, Chamberlain JS and D., D. (2003). Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glyco protein complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation* 108, 1626-32.

【非特許文献 7 2】Zammit, P. S., Partridge, T. A. and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *JHistochem Cytochem* 54, 1177-91.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、筋形成中のこれら2つのタンパク質の機能的役割を実証し、筋ジストロフィーを早期診断するためのアッセイを特定するために、骨格筋発生に対するカベオリン-3及びジストロフィン喪失の影響を調査した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、異なるが機能的に関連する2つの骨格筋ジストロフィー変異体(mdx及びcav-3^{-/-})を調査することにより、DMD及びLGMD1C型の病理の重要な要素が胚心筋及び骨格筋パターン形成過程の障害に起因すると初めて実証されることを示した。筋形成の障害は、cav-3^{-/-}よりmdxでより初期に生じ、LGMD-1cの表現型がより軽度であり、ジストロフィンが初期に(E9.5)発現されることと一致する。筋形成は、発生遅延、筋管形態及び置換欠損、並びに異常幹細胞挙動を示すmdx胚で重度の障害を受けた。カベオリン-3タンパク質は、mdx胚で上昇する。cav-3^{-/-}(E15.5から)及びmdx(E11.5から)は両方とも、myf-5+胚筋芽細胞の過剰増殖及びアポトーシス、in situでのpax-7+筋芽細胞の消耗、及

10

20

30

40

50

び妊娠後期での全 p a x - 7 タンパク質の枯渇を示す。両方とも、心臓欠陥を有する。 c a v - 3^{-/-}では、腹側筋欠乏、過剰、形成異常肥大筋管、筋核の2倍増、及び速筋ミオシン重鎖 (F M y H C) 含有量の低減を含む、より限定された表現型が存在する。筋管発育不全、筋管数の低減、及び F M y H C の増加を含む幾つかの m d x 胚病理は、 c a v - 3^{-/-}との相反性を示す。ジストロフィンが欠損し (m d x)、カベオリン - 3 がヘテロ接合性である (c a v - 3^{+/-}) 二重突然変異体 (m d x c a v^{+/-}) 胚では、カベオリン - 3 は、野生型の 5 0 % に低減され、これらの表現型は重度に悪化し、肋間筋線維密度は 7 1 % 低減され、 p a x - 7 陽性細胞は、下肢から完全に枯渇し、他所で著しく低減され、カベオリン - 3 レベルの上昇に対する貢献的役割ではなく代償的役割を示唆するデータが、 m d x 胚で見出された。これらのデータは、初期筋肉形成におけるジストロフィンの重要な役割を実証し、カベオリン - 3 及びジストロフィンが、正確な線維型特化及び幹細胞機能の創出にとって不可欠であることを実証する。これらのデータは、 M D の自然経過における重要なギャップを埋め、 D M D / L G M D の初期診断の確立、及びこれら患者のより良好な臨床転帰に結び付く初期治療プロトコルの設計に非常に有用である。

10

【 0 0 1 2 】

従来のデュシェンヌ型筋ジストロフィーのアッセイは、ジストロフィン遺伝子の多型性を捜すことを含む。この遺伝子は大型であり、全ての多型性について検査が実施されるわけではない。例えば、 1 9 個の突然変異の検査は、 6 5 % の症例を特定したに過ぎない。現在は、疾患の家族歴がある場合のみ、この検査が実施される。しかしながら、全症例のおよそ 3 分の 1 は、個体に自然発症的に生じる新規性である。

20

【 0 0 1 3 】

本発明者らにより特定された検査は、ジストロフィン遺伝子の多型性に基づくものではなく、筋ジストロフィーの全ての形態に潜在的に適用可能である。さらに、本検査は、出生前及び出生後のいずれの乳児にも適用可能である。より従来型の形態の診断は、小児が 3 ~ 5 歳に達するまで実施されない。本アッセイは、この疾患の早期診断を可能にし、それにより、この疾患の早期治療 (例えば、 p a x - 7 陽性幹細胞を置換することによる) を可能にする。

【 0 0 1 4 】

P a x - 7 / M y f 5 細胞幹細胞は、治療用途に使用されることが示唆されている (国際公開第 2 0 0 7 / 0 5 9 6 1 2 号) 。そのような細胞は、筋原性前駆細胞として、筋ジストロフィーを含む筋肉疾患の治療に使用されることが示唆されている。これらの細胞は、新しい筋細胞の供給源としてこの疾患の治療に使用される。しかしながら、筋ジストロフィーのマーカーとして P a x - 7 を使用することは示唆されていない。このタンパク質は、使用される幹細胞の垂集団を特定するための 2 つのマーカーのうちの 1 つとして単に使用される。

30

【 0 0 1 5 】

本発明は、筋ジストロフィーの症状を示している個体を特定するための、筋ジストロフィーの治療又は進行をモニターするための、又は筋ジストロフィーの症状を発症する傾向を有する個体を特定する方法であって、患者由来の組織試料中の、 p a x - 7、カベオリン - 3、及び / 又は速筋ミオシンから選択される 1 つ又は複数のタンパク質の発現レベルを決定することを含む方法を提供する。

40

【 0 0 1 6 】

本方法は、この疾患の症状を示している個体又は症状を発症する傾向を有する個体を特定するために使用することができる。

【 0 0 1 7 】

治療又は進行がモニターされる場合、試料中のレベルは、数日、数週間、又は数か月前等の、以前に採取された個体由来の試料中のレベルと比較することができる。

【 0 0 1 8 】

この又は各々のタンパク質の発現レベルは、例えば、筋ジストロフィーの症状を示していないか、又は筋ジストロフィーを発症する傾向を有していない個体に関連する所定のレ

50

ベルと比較してもよく、及び/又は筋ジストロフィーを示している又は発症する傾向を有する個体に関連していると以前に特定されている所定のレベルと比較してもよい。

【0019】

P a x - 7 及びカベオリン - 3 は、例えば、乳児又は早期産乳児が、筋ジストロフィーを発症する可能性が高いかどうかの初期決定に特に関連性を有すると特定されている。好ましくは、p a x - 7 及び/又はカベオリン - 3 の1つ又は両方が測定される。P a x - 7 が測定されてもよい。カベオリン - 3 が測定されてもよい。

【0020】

P a x - 7 及び/又はカベオリン - 3 は、速筋ミオシンの測定と共に又は速筋ミオシンを測定せずに、測定してもよい。

10

【0021】

これら2つのマーカー (p a x - 7 及びカベオリン - 3) は、特に、個体が筋ジストロフィーを発症する可能性を早期に特定することを可能にする。これまでは、この疾患の発症を待つ必要があり、この疾患は個体が数歳になるまで認識されないことが多い。或いは、例えば、ジストロフィン遺伝子の特定の多型性を捜す多数の従来技術のアッセイが存在する。しかしながら、そのようなアッセイは、典型的には、そのような多型性の家族歴がある特定の家族に関連した多型性向けである。さらに、そのようなアッセイの正確性は、典型的には依然として低い。

【0022】

このように、組織試料は、個体の出生前に個体から採取されてもよく、又は出生後に採取されてもよい。筋形成は、典型的には妊娠8~9週目から生じる。従って、潜在的には、その期以降の試料を採取してもよい。個体は、例えば小児、例えば16歳未満、12歳未満、10歳未満、6歳未満、3歳未満、2歳未満、又は1歳未満であってもよく、まだ子宮内にいてもよい。個々の患者は、年齢が出生から3又は6か月の間であってもよい。

20

【0023】

筋ジストロフィー (M D) は、ヒト等の哺乳動物の筋肉を衰弱させる一群の遺伝子的な遺伝性筋肉疾患を指す。M D は、通常、進行性骨格筋衰弱、筋タンパク質の欠損、並びに筋細胞及び組織の死滅を特徴とする。好ましい疾患には、デュシェンヌ型 (D M D) 、肢帯型 (L G M D) 、エメリードレフュス型、眼咽頭型、遠位型、筋緊張性、先天性、ベッカー型、及び/又は顔面肩甲上腕型が含まれる。疾患は、D M D 及び/又はL G M D であ

30

【0024】

典型的には、正常個体と比較した p a x - 7 の発現減少又はカベオリン - 3 の発現変更は、筋ジストロフィーの症状を示しているか又は症状を発症する傾向を有する個体を示す。

【0025】

個体は、ヒト個体であってもよいが、筋ジストロフィー様症状を発症する多くの様々な動物も存在する。そのような動物は、典型的には哺乳動物であり、マウス、ラット、ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、及び非ヒト霊長類が含まれる。

【0026】

速筋ミオシンが測定されてもよい。本発明者らは、速筋ミオシンが、異なる疾患で異なる発現レベルを示すことを決定した。例えば、速筋ミオシンは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのマウスモデルでは増加するが、肢帯筋ジストロフィーでは減少する。従って、そのタンパク質の発現レベルをアッセイすることにより、この疾患の発症可能性が高いことが示されると考えられる。好ましくは、速筋ミオシンは、p a x - 7 及び/又はカベオリン - 3 の1つ又は両方のアッセイと組み合わせてアッセイされる。速筋ミオシンを単独で使用して、例えば、D M D 及びL G M D 等の特定のタイプの筋ジストロフィーを診断することもできる。

40

【0027】

このアッセイは、組織試料中のインスリン様増殖因子 - 2 (I g f - 2) の発現レベル

50

を決定することをさらに含んでいてもよい。I g f - 2 は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーで過剰発現され、カベオリン - 3 欠乏型 L G M D では低減される。また、これは、この疾患の予後の指標をもたらす。

【 0 0 2 8 】

さらに、I g f - 2 の下流にある次の遺伝子産物をアッセイしてもよい：C D K N 1 c / P 5 7 k i p 2 及び / 又は p A k t 。

【 0 0 2 9 】

I g f - 2、C D K N 1 c / P 5 7 k i p 2、及び / 又は p A k t は、他のタンパク質とは別々にアッセイすることもできる。すなわち、例えば、I g f - 2 は、p a x - 7 及びカベオリン - 3 を測定せずに、別々にアッセイしてもよい。I g f - 2 は、C D K N 1 c / P 5 7 k i p 2 及び / 又は p A k t と共に使用してもよい。

10

【 0 0 3 0 】

Merrick D et al (BMC Develop. Biol. (2007), 7, page 65) には、インスリン様増殖因子 - 2 (I g f - 2) が、胎児期に発現される増殖因子であることが開示された。これは既知だったが、それが骨格筋筋管で特異的に発現されることは知られていなかった。この論文の主な知見は、I g f - 2 が、速筋ミオシン陽性線維の比率に影響を及ぼすということだった。

【 0 0 3 1 】

上述のタンパク質は全て、当技術分野で一般的に知られており、それらのタンパク質配列及びそのようなタンパク質をコードする核酸配列は、当技術分野で一般的に知られている。

20

【 0 0 3 2 】

組織試料は、典型的には、例えば生検試料の形態の筋組織試料である。しかしながら、個体内の筋線維が変性するため、速筋ミオシン及びカベオリン - 3 は、筋ジストロフィーを有する個体の血液内にも見出される場合があると考えられる。

【 0 0 3 3 】

タンパク質発現は、試料中の m R N A レベルを決定することによりタンパク質発現レベルを直接的又は間接的のいずれかで測定することにより決定することができる。

【 0 0 3 4 】

典型的には、タンパク質の発現レベルは、イムノアッセイにより決定することができる。上述のタンパク質に特異的な抗体は、当技術分野で一般的に知られている。そのような抗体は、当技術分野で一般的に知られている方法により、直接的又は間接的に標識することができる。例えば、組織試料は、適切に標識された抗体で免疫染色することができる。試料は、染色する前に固定することができる。本発明者らは、タンパク質に特異的な抗体、特に p a x - 7 に特異的な抗体と共に使用する場合、パラホルムアルデヒドが特に有効であることを見出した。従って、好ましくは、使用される固定剤は、パラホルムアルデヒドである。タンパク質と抗体との結合は、当技術分野で一般的に知られている方法により決定することができる。例えば、アビジン - ビオチン法は、当技術分野で一般的に知られている。そのようなアッセイでは、典型的には、ホースラディッシュペルオキシダーゼを、3', 3', 5', 5' テトラメチル - ベンジジン等の基質と組み合わせて使用して有色産物を形成させ、その後それを例えば顕微鏡で視覚化することができる。本発明者らは、特に、チラミドシグナル増幅 (T S A) が、例えば p a x - 7 と共に使用された場合、特に良好な染色をもたらすことを見出した。従って、好ましくは、T S A を免疫染色に使用する。

30

40

【 0 0 3 5 】

アルカリホスファターゼを使用することもできる。これには、3つの酵素分子 (アルカリホスファターゼ) 及び2つの抗体分子で構成される、予め形成された環式酵素抗酵素免疫複合体が使用される。この技術は、典型的には青色染料 (F a s t B l u e B N) 又は赤色染料 (F a s t R e d T R) を使用することにより視覚化することができる。

50

【0036】

イムノアッセイは、直接的に標識された抗タンパク質抗体を使用して視覚化することができる。或いは、それらは、抗タンパク質抗体に結合する抗免疫グロブリン抗体を使用することにより、間接的に視覚化してもよい。その二次抗体は、それ自体が標識されていてもよい。

【0037】

この抗体又は各抗体は、蛍光体で標識されていてもよい。そのような蛍光体は、当技術分野で一般的に知られている。それらには、例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート(FITC)、及びローダミンが含まれる。そのような蛍光体は、異なる色の蛍光を発する。従って、好ましくは、このアッセイ(及び実際は下記で規定するキット)で使用される抗体は、異なる蛍光体を有しているか、及び/又は視覚化法が異なっており、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼを用いて、様々なタンパク質が、同じ組織試料からアッセイされることを可能にする。

10

【0038】

タンパク質は、組織試料、部分的に精製された試料、又は試料から得られた精製タンパク質に標識抗体を添加することにより視覚化して、試料に結合した全抗体を特定することができる。試料中のタンパク質は、免疫プロットにより精製及び視覚化してもよい。

【0039】

その代わり又はそれに加えて、タンパク質の発現レベルは、この組織試料で発現されたmRNAレベルを特定することにより決定してもよい。mRNA発現のレベルは、定量ポリメラーゼ連鎖反応(QPCR)又はリアルタイムPCR(RT-PCR)により決定してもよい。この技術では、タンパク質をコードするmRNAに特異的な1対のプライマーが使用される。そのような技術は、当技術分野で一般的に周知である。

20

【0040】

当技術分野には、例えば、SYBR(商標)染色を使用して、定量PCRを可能にする市販の系が多数存在する。製造業者には、Applied Biosystems Limited社及びPromega Corporation社が含まれる。

【0041】

本発明は、pax-7、カベオリン-3、及び/若しくは速筋ミオシンの2つ以上に特異的な2つ以上の抗体、又はpax-7、カベオリン-3、及び/若しくは速筋ミオシンの2つ以上をコードするmRNAに特異的な1対のPCRプライマーを含む、本発明による方法で使用されるキットも提供する。

30

【0042】

タンパク質は、pax-7タンパク質又はpax-7をコードするmRNAであってもよい。その代わり又はそれに加えて、タンパク質は、カベオリン-3又はカベオリン-3をコードするmRNAであってもよい。

【0043】

加えて、タンパク質は、速筋ミオシン又は速筋ミオシンをコードするmRNAであってもよい。

【0044】

抗体は、上述のものの1つ等の好適な標識で直接標識されていてもよい。そのような標識には、蛍光標識、及びアルカリホスファターゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素に基づく標識が含まれる。

40

【0045】

キットは、1つのタンパク質に対する抗体及び第2のタンパク質のための1対のプライマーを含んでいてもよい。或いは、キットは、2つ以上の他のタンパク質のためのPCRプライマーを含んでいてもよい。キットは、異なるタンパク質に対する2つ以上の抗体を含んでいてもよい。後者の場合は、抗体は、各タンパク質の量の実質的同時測定を可能にするために、異なる標識で標識されていてもよい。

【0046】

50

キットは、パラホルムアルデヒドをさらに含んでいてもよい。パラホルムアルデヒドは、筋肉試料の固定を可能にするのに特に効果的であることが見出されている。これは、p a x - 7 タンパク質に特異的な抗体と組み合わせて提供されてもよい。

【0047】

キットは、I g f - 2 に特異的な抗体又はP C R プライマー対をさらに含んでいてもよい。

【0048】

抗体がキットに提供される場合、キットは、チラミドシグナル増幅用の1つ又は複数の試薬を含んでいてもよい。これには、例えばビオチン化チラミドが含まれていてもよい。

【0049】

本発明によるキットは、試料を固定するための1つ又は複数の固定剤を含んでいてもよい。

【0050】

キットは、キットと共に使用説明書を含んでいてもよい。説明書は、例えば、筋ジストロフィーの症状を示しているか又は筋ジストロフィーを発症する傾向を有する個体に関連するタンパク質発現の典型的なレベルに関する詳細を含んでいてもよい。説明書は、正常個体における発現レベルに関する詳細を含んでいてもよい。これにより、取得されたデータの妥当性を開業医が評価することを可能にするために、比較される個体に由来する試料から得られたデータと所定の値との比較が可能になる。既知濃度のタンパク質を有する1つ又複数の対照が提供されていてもよい。

【0051】

P C R プライマーが提供される場合、キットは、定量P C R の実施を可能にするための1つ又は複数の標識又は他の試薬をさらに含んでいてもよい。これには、例えば、S Y B R (商標) g r e e n が含まれていてもよい。

【0052】

また、キットは、アッセイ内で標準物質として使用するために、所定の濃度の1つ又は複数のタンパク質対照試料を含んでいてもよい。

【0053】

本発明者らにより得られた結果は、カベオリン - 3 を使用して、筋ジストロフィーの症状を緩和することができることも示している。

【0054】

従って、本発明は、患者にカベオリン - 3 を投与すること、又は患者におけるカベオリン - 3 発現を増加させることを含む、筋ジストロフィーの治療方法を提供する。筋ジストロフィーの治療においてタンパク質の発現を増加させるか又はタンパク質を提示させる方法は、以前にユートロフィンについて実証されている。カベオリン - 3 を同様の様式で使用できることが予測される。

【0055】

ユートロフィンは、筋ジストロフィーの治療に有用であることが実証されている。例えば、米国特許出願第2009/054327号、米国特許出願第2008/160108号、及び国際公開第97122696号(参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)には、このタンパク質がそのような治療に使用される方法が開示されている。

【0056】

カベオリン - 3 を薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬製剤も提供される。本発明は、筋ジストロフィーを治療するため使用されるカベオリン - 3 も提供する。

【0057】

以降、以下の図面を例示の目的のみで参照して、本発明を説明することにする。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1-1】(A) m d x 筋管の骨格筋管分岐：(I C) 肋間、(L) 肢、(F) 顔面筋群；0：異常は非検出。(B) 筋管分岐、E 1 5 . 5 m d x 二頭筋。挿入図、切片の拡

10

20

30

40

50

大。染色：ヘマトキシリン及びエオシン。(C~H) 汎ミオシン(MF20)、近位筋、青色バーは野生型(WT)筋管幅を示す(C、F)WT；(D、G)mdx、発育不全筋管、黒色矢印は筋管分割；(E、H)cav-3^{-/-}、肥大筋管。(F~H)(F)WTと比較した(G)mdx及び(H)cav-3^{-/-}筋線維の様々な筋管直径。

【図1-2】(I)総計数の割合としての誤配置筋管(接線性筋管及び誤整列筋管の混合)。0：誤配置線維はない(J)誤配置筋管の得点化戦略：正中から>25°は接線性(T)、<25°は誤整列(M)。(K)E13.5における誤整列mdx筋管の割合。(L~N)E13.5 IC筋肉、MF20；(M)mdx誤整列筋管(黒色矢印、M)(L)WT(N)cav-3^{-/-}に筋管の誤配置はない。エラーバー：s.d. サイズバー 20マイクロメートル。スチューデントt-検定；*p<0.01；**p<0.001、WT値との比較。

【図2-1】(A~F、I~N) - 心筋ミオシン重鎖(N2.261)について免疫染色された中央切片心臓 E13.5 (A)WT；(B)mdx；(C)(D)WTと比較して(B)軽度の及び(C)広範な心室壁肥大を示すcav-3^{-/-}、E14.5心室頂端構造は、cav-3^{-/-}(E)では組織崩壊し、mdx(F)ではそれほど良好に発生していない。(G~H)MF20は、E15.5のcav-3^{-/-}心臓を染色し(G)心室壁の組織崩壊、(H)心筋細胞は互いに交差している。

【図2-2】(I~J)E14.5の心房小柱(tb)は、(I)cav-3^{-/-}では短くて太く、(J)mdxではかぎ形である。(K~P)E17.5の心房；(L~P)(K、N)WTと比較した、(L、O)cav-3^{-/-}小柱(tb)及び(M、P)mdx心房壁におけるN2.261標識の減少及び細胞層の拡張。サイズバー 20マイクロメートル。(Q)心臓の最も中央の部分を通して矢状断的に切片化された心臓の配向及び一致を例示するためのMF20標識mdx心臓の低倍率画像。

【図3-1】E15.5の近位筋における筋核の配置：(A)WT、螺旋状、間隔は均一；(B)mdx、中央位置；(C)cav-3^{-/-}、中央位置付近、間隔は不規則。重ねて示されている白色星印(*)、1つの筋管の筋核；小さな白色矢印、筋核。野生型では(A)、小さな白色矢印は、2つの別々の筋管の末梢核を示す。末梢核は、mdx及びcav-3^{-/-}筋肉(B~C)では明白ではない。(D)筋管端部での筋核の集群化、cav-3^{-/-}。(E~G)E15.5のWT(E)、mdx(F)、及び(G)cav-3^{-/-}低近位肢筋管の横断面は、末梢筋核(矢印)が、野生型と関連するが、この期のジストロフィー胚筋管とは関連しないことを示す。mdxの発育不全及びcav-3^{-/-}筋管の肥大も観察することができる；緑色線は、野生型筋管直径を示す。低近位肢領域の(H)WT、(I)mdx、及び(J)cav-3^{-/-}の低倍率画像は、一致した胚切片の野生型と比較して、mdxの線維密度の低減及びcav-3^{-/-}筋線維の密度増加を示す。

【図3-2】(K)筋核数は、野生型と比較して、cav-3^{-/-}(E13.5~E17.5)では2倍である；*p<0.05。mdx筋核(E13.5~E17.5)のわずかな(統計的に有意でない)低減。筋管の平均筋核含有量は、E13.5~E17.5で一定である。(L)野生型と比較したcav-3^{-/-}(E13.5~E17.5)筋管密度の増加、及びmdx(E13.5)筋管密度の減少。各系統及び期について、筋管を一定の一致した筋肉区域で計数した、*p<0.05。サイズバー 20マイクロメートル。

【図4-1】(A)筋肉外植片培養に由来する胚筋芽細胞のアウトグロース(outgrowth)率は、同時に培養された野生型外植片と比較して、E11.5に由来するmdx、及びE15.5~E17.5のcav-3^{-/-}で増加する。(B)Myf-5免疫染色された外植片。(C)Ki67+免疫反応性により決定された、E11.5に由来するmdx及びE15.5に由来するcav-3^{-/-}における胚筋芽細胞の過剰増殖(D)。(G~H)E15.5の一次培養野生型胚筋芽細胞(G)Myf-5染色(H)二次抗体対照。(I)E11.5の野生型外植片のアウトグロース率は、E11.5 mdx外植片馴化培地(mdxCM)で増加するが(p<0.05、*)、cav-3^{-/-}又はWT CMでは増殖しない。エラーバー、s.d.。

【図4-2】(E)mdxでのE11.5及びcav-3^{-/-}でのE15.5からのアポ

10

20

30

40

50

トーシス増加 (F) Dapi 染色、矢印はアポトーシス性細胞を示す。* $p < 0.05$ 、WT から；** $p < 0.01$ 、WT から；# $p < 0.05$ 、mdx 及び cav-3^{-/-}間。

【図5-1】WT、mdx、cav-3^{-/-}、及びmdxcav^{+/-}低近位肢における Pax-7 免疫染色；(A~F、MN、QR) E15.5 (G~L) E17.5。(A~E；G~K) 低倍率；(B~F；H~L) 高倍率；サイズバー 10マイクロメートル。Q~R WT (Q) 及びmdxcav-3^{+/-}低近位肢の全体領域視野。mdxcav^{+/-}、cav-3^{-/-}、及びmdxの推定アポトーシス性(断片化した)pax-7⁺核、E15.5のWT (B、D、及びF) 及び(L) E17.5のmdx (黒色矢印) ではアポトーシス性ではない。pax-7染色の減少、cav-3^{-/-}及びmdxcav-3^{+/-}の白色矢印(CD及びMN) E15.5；(I~J) E17.5。(M~R)。E17.5では、mdxcav-3^{+/-}低近位肢筋肉は、pax-7⁺細胞を欠いている(O~P)。(S) 免疫プロット、(i~iii) カベオリン-3、(iv) pax-7。接触(i) 10秒；(ii) 1分；(iii) 4分。(iv) pax-7タンパク質は、E15.5及びE17.5のジストロフィー胚で低減される。4分間の接触では、pax-7は、E15.5のWTでのみ検出される。(T) デンシトメトリー分析、カベオリン-3：-チューブリン比は、mdxにおけるカベオリン-3の増加を確認する。* $p < 0.05$ ；。

【図5-2】(U) 表は、3つの胚期を別々に分析した後の(1期当たり4回の実験)、mdxにおけるカベオリン-3の倍数増の推定を示す(野生型と比べて)。全ての期で $p = 0.05$ 。(V) デンシトメトリー分析、pax-7：-チューブリンは、cav-3^{-/-}及びmdx (E15.5~E17.5) におけるpax-7タンパク質の低減を実証する。E13.5のcav-3^{-/-}胚は、野生型より著しく多くのpax-7を含有する。* $p < 0.05$ ；(T、V) 2つの別々の実験の平均±s.d.。(W) 免疫プロットは、カベオリン-3タンパク質が、E15.5のmdxcav-3^{+/-}胚において低減され(WT#に対して50%)、カベオリン-3が増加するE15.5のmdx胚兄弟と比較して、著しく低減されることを実証する。ネオマイシン免疫染色は、cav-3^{-/-}及びmdxcav-3^{+/-}におけるcav-3 KO導入遺伝子の存在を確認する。cav-3^{-/-}と比較して、mdxcav-3^{+/-}胚で見られるネオマイシン染色の低減は、cav-3 KO導入遺伝子についてそれらがヘテロ接合性であることを反映している。# デンシトメトリー：カベオリン-3：-チューブリン比、トラック3及び4と比較したトラック1 WT、mdxcav-3^{+/-}。

【図6-1】(A~F) E13.5でのFM y HC免疫染色、(A~C) 横隔膜、(D~F) 肋間。(A、D) WT、(B、E) mdx、及び(C、F) cav-3^{-/-}は、(B、E) mdxにおけるFM y HCの低減、及び(C、F) cav-3^{-/-}呼吸筋におけるFM y HCの増加。(G~L) E15.5の呼吸筋におけるFM y HC (G~I) 横隔膜；(J~L) 肋間 (G、J) WT；(H、K) mdx (I、L) cav-3^{-/-}。(M) WT E17.5近位肢と比較した、(N) mdxにおけるFM y HC染色の増加、及び(O) cav-3^{-/-}におけるFM y HC染色の減少。(P~S) mdxcav-3^{+/-}では、FM y HCは、E17.5 (Q) 及び(S) (近位肢が示されている) 及びE15.5 (R) (肋間及び横隔膜が示されている) での野生型と比較しても増加する。E17.5のcav-3^{-/-} (P) 及び(Q) mdxcav-3^{+/-}の比較により、ジストロフィン欠乏が、cav-3^{-/-}胚及び野生型胚で見られたFM y HCの下方制御を抑制することが実証される。野生型胚(M)と比較して、E17.5のcav-3^{-/-}におけるFM y HCの過剰喪失も、はっきり見ることができる(Q)。

【図6-2】(T) 野生型、cav-3^{-/-}、及びmdxの免疫プロットは、野生型と比較して、cav-3^{-/-}におけるFM y HCの減少、及びmdx胚におけるFM y HCの産生遅延を示す。(U) デンシトメトリー、FM y HC：-チューブリン比は、それぞれE17.5のmdx胚及びcav-3^{-/-}胚における、統計的に有意なFM y HC含有量の増加及び低減を実証する。E13.5では、cav-3^{-/-}胚のFM y HCは著しく過剰である；2つの別々の実験の平均±s.d.。(V) 野生型胚、mdx胚、及びcav-3^{-/-}胚 (E13.5、E15.5、及びE17.5) における総計数の割合として

10

20

30

40

50

表された F M y H C 陽性筋管。エラーバー、s.d.。* p < 0.05 ; ** p < 0.01。サイズバー 20 マイクロメートル。

【図7-1】妊娠後期 (E17.5) 胚の筋肉における p a x - 7 筋芽細胞及び筋線維密度の広範な喪失を示すために、汎ミオシン (M F 2 0) (B、E、G、J) 又は p a x - 7 (A、C ~ D 及び F、H ~ I) で免疫染色された (A ~ E) 野生型及び (F ~ J) カベオリン - 3 がヘテロ接合性である m d x マウス (m d x c a v - 3^{+/-})。

【図7-2】(K ~ P) M F 2 0 標識肋間筋切片 (各胚の第4肋間と一致) のより高倍率の画像は、(K) W T、(L) m d x、(M) c a v - 3^{-/-}、及び (N ~ P) 3つの異なる m d x c a v - 3^{+/-} E 1 7 . 5 胚間の筋管密度の相異を示す。E 1 7 . 5 の W T、m d x、及び m d x c a v^{+/-} (h e t) 胚肋間筋の (R) 一定のグリッド区域で評価された線維密度、及び (S) 線維密度の低減パーセント。M y 3 2 抗体で標識された (T) W T 及び (U) m d x c a v^{+/-} の E 1 7 . 5 肋間は、ほとんど全ての線維が F M y H C 陽性であることを示す。線維は、多くの W T で F M y H C を下方制御するが、m d x c a v - 3^{+/-} 肋間線維は下方制御しないことに留意されたい。

【図8】P a x - 7 ヒト筋生検：P a x - 7 免疫染色をして、保管ヒト若年筋生検の p a x - 7 + 骨格筋幹細胞を識別する。P a x - 7 は細胞核を標識する。暗染色は、p a x - 7 + 核を示す。薄染色は、p a x - 7 陰性細胞核の位置を示すヘマトキシリン対比染色である。

【図9】R T - P C R 分析 (A) 6つの W T 及び6つの m d x マウス筋芽細胞単離物における p a x - 7 m R N A 発現のデンシトメトリー分析により、P a x - 7 発現がジストロフィー筋芽細胞で統計的に有意に抑制されることが実証される。示されているデータは、個々の筋芽細胞単離物のデンシトメトリー結果の平均及び標準偏差である。(B) R T - P C R は、6つの W T 及び6つの m d x 筋芽細胞における p a x - 7 m R N A の検出を示す。P a x - 7 発現は、W T と比較してジストロフィー (m d x) 筋芽細胞で一貫して抑制された。

【図10】I g f - 2 は M D マウスで障害を受けた胚骨格筋を、E 1 4 . 5 ~ E 1 7 . 5 期のインスリン様増殖因子 2 (I g f - 2) について免疫染色した。(A ~ D) 野生型 (W T) 筋肉は、I g f - 2 の特徴的な縞模様パターンを示し、線維の 50% は I g f - 2 免疫染色陽性である。(E ~ H) ジストロフィン欠損 (m d x) 筋肉は、E 1 4 . 5 ~ E 1 7 . 5 で I g f - 2 を過剰発現し、W T の「縞模様」免疫染色パターンを失う。対照的に (I ~ L) I g f - 2 は、カベオリン - 3 欠損 (c a v - 3^{-/-}) 筋肉では失われる。(M) 免疫染色パターンの定量化は、これらの結論を確認する。(N) R T - P C R は、I g f - 2 メッセージ (m R N A) が、m d x 及び c a v - 3^{-/-} 胚で上昇することを実証する。従って、カベオリン欠損胚における I g f - 2 の抑制は、転写後レベルにおいてである。

【図11】I g f 2 の下流遺伝子 I g f - 2 の下流遺伝子 (C D K N 1 c / P 5 7 k i p 2 及び p A k t) も、ジストロフィーマウスでは障害を受け、(この場合も R T - P C R 又は免疫検出するための) 一群の遺伝子に含めることができる。図を参照されたい。C D K N 1 c / p 5 7 k i p 2 のレベルは、ジストロフィン欠損及びカベオリン欠損マウス胚の両方で、野生型と比較して著しく及び再現性よく低減される。(B) p A k t は m d x で上昇し、c a v - 3^{-/-} マウス胚では抑制される。

【図12】ヒト骨格 D M D における P a x - 7 筋芽細胞の枯渇を示す図である。

【図13】対照と比較した、ヒト D M D 及び B M D における P a x - 7 筋芽細胞の枯渇を示すグラフを示す図である。

【図14】m d x においてカベオリン - 3 レベルが野生型に低減されることにより、重症度が増し、m d x マウス筋肉におけるジストロフィー表現型の進行を持続させる。

【図15】ジストロフィー筋芽細胞に対する I g f - 2 の影響；P a x - 7 及び P a x - 3 は、I g f - 2 処理により上方制御される。ジストロフィー筋芽細胞におけるカベオリン - 3 レベルの増加は、I g f - 2 処理により増強される。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0059】

方法

マウスモデル

野生型 (C57BL/10) 及び同質遺伝子型 *mdx* 及び *cav-3^{-/-}* マウス系統を使用し、C57BL/10を背景とする *cav-3^{-/-}* ジストロフィーマウスは、Yoshito Hagiwara (東京) (Hagiwara et al., 2000) から得た。*Mdx* 及び C57BL/10 は、自己施設で生成した (Merrick et al., 2007)。二重突然変異体マウス (*mdx cav-3^{-/-}*) は、ジストロフィンがヌルであり (*dys^{-/-}*)、カベオリン-3 がヘテロ接合性であり (*cav-3^{+/-}*)、*Igf-2* 導入遺伝子がヘテロ接合性のジストロフィン欠損変異体を生成するために以前に記述された戦略を使用して (*mdx Igf-2^{+/-}*; (Smith et al., 2000))、*mdx* 及び *cav-3^{-/-}* を交雑させることにより生成した。遺伝子型決定は、ネオマイシン (*cav-3* KO 導入遺伝子を検出するため) 及びカベオリン-3 (WT、*mdx*、及び *cav-3^{+/-}* により発現されるが、*cav-3^{-/-}* では発現されない; 図7) のPCRにより達成した。示されたデータは、およそ50:50比率の *mdx* 及び *mdx cav^{+/-}* 胚を含有する E15.5 及び E17.5 胚の各々の2匹の異なる同腹子に由来する。同腹子数 (1同腹子当たり7~9個の胚) は、WT 及び *mdx* から得られたものと同等だった。

10

【0060】

マウス胚の調製

載物台に載せた野生型 (WT)、*cav-3^{-/-}*、*mdx*、及び *mdx cav^{+/-}* 胚を、以前と同じように固定及び処理し、パラフィンろうで包埋した (Smith and Merrick, 2008)。プラグ検出の朝 (morning of plug detection) を、E0.5 と推定した。切片は全て矢状断だった (5 μ M)。切断の平面及び深さは、Kaufman's Atlas of embryology (Kaufman, 1992) を使用して、胚の正中線 (二分点) で確定した。1系統当たり少なくとも3つの別々の胚に由来する一致した野生型 (WT)、*cav-3^{-/-}*、*mdx*、及び *mdx cav-3^{+/-}* 切片を、全ての分析に使用した。

20

【0061】

免疫組織化学法

Igf-2、汎ミオシン (MF20)、速筋ミオシン重鎖 FMyc (My32)、及び *pax-7* 抗体の免疫染色及び条件は、以前に記述されており (Merrick et al., 2007)、CDNK1c/p57kip2の免疫染色も、以前に記述されている (Westbury et al., 2001)。*pAkt* 検出は、New England Biolabs (英国) Ltd 社から取得した抗 *pAkt* ウサギポリクローナル (No. 9277) を使用して、1/100の至適力価で達成した。長期にわたるペルオキシダーゼブロッキングステップは、全ての染色実行に含まれていた。二次抗体対照は、非染色を示した。B-心筋ミオシンは、N2.261抗体 (1/1000; DHSB社製、アイオワシティ) を使用して検出した。CDNK1c/p57kip2、*pAkt*、*IGF-2*、及び FMyc 染色を、FMyc 及び *IGF-2* について以前に記述されているように (Merrick et al., 2007)、一定のグリッド区域での抗体陽性筋管の割合を計数することにより定量化した。データを、スチューデント *t* 検定及び ANOVA を使用して分析した。少なくとも3000個の筋管を、各データポイントで計数した。

30

40

【0062】

Pax-7 免疫染色を、保管してあった若年ヒト筋肉生検でも実施した (図8を参照)。

【0063】

MF20染色切片における筋管形態及び定量化の分析

野生型 (WT)、*cav-3^{-/-}*、及び *mdx* に由来する矢状切断 MF20 染色胚を、切片の期、平面、及び角度に関して一致させた。アーチファクトを回避するために、本発明者らは、完全に切断面にある分割及び分岐のみを計数し、これは、切片間で注意深く制御された。この分析は、分割/分岐事象を過小評価する場合がある。E13.5、E15

50

． 5、及び E 1 7 . 5 胚に由来する矢状断切片は、一致を容易にするために胚の正中地点で、発表されているマウスアトラス (Kaufman, 1995) に対して形態学的特徴の位置を注意深く一致させた。切片は、誤整列及び分岐表現型の両方について、盲検法で及び 2 人の異なる観察者によって計数し、統計分析にかけた。得点化した各突然変異体及び野生型胚について、グリッド目盛りを使用して、肋間筋、上肢筋及び下肢筋、並びに顔面筋領域の同じ縦に伸びる筋肉の一定の区域で、分岐を得点化した。誤整列線維の得点化は、縦断面の筋線維方向をグリッド目盛りに対して配向させ、25度の角度を超えて逸脱した線維を一定の区域で得点化することにより達成した。本発明者らは、2人の実験者がスライドを計数し、第2の実験者は系統を知らされておらず、分割/分岐が m d x でのみ特定され、統計的に有意だった場合、データは、分割/分岐の信頼できる指標であると確信する。筋管を計数する場合、本発明者らは、全ての筋管端部の確定を試みることはしなかったが (胚切片では不可能な課題である)、その代わりに1系統当たり3つの異なる胚の近位、遠位、肋間、及び深背部筋の一致した切片を、一定の区域にわたって注意深く計数した (1系統当たりの計数された合計筋管: 2 ~ 3 0 0 0 個)。本発明者らは、これにより、筋管に対する筋核の比率、及び1切片当たりの筋管の平均数を評価することが可能だった。データ分析: A N O V A 及びスチューデント t 検定。

10

【 0 0 6 4 】

胚外植片

E 1 1 . 5 ~ E 1 7 . 5 胚を解剖して、骨格筋細胞が豊富な区域を単離した。全ての胚で、頭部、脊髄、及び内臓を取り除いた。より後期胚 (E 1 5 . 5 ~ E 1 7 . 5) では、皮膚及び軟骨/硬骨を取り除いた。筋肉が豊富な組織を顕微解剖して微小外植片にし、微小ウエルで培養した (Smith and Merrick, 2008; Smith and Schofield, 1994)。WT、m d x、又は c a v^{-/-} E 1 1 . 5 外植片馴化培地 (C M) を、コンフルエント培養から取り出し、ろ過し (0.2 μm Acrodisc (登録商標) 注射器フィルター; VWR International 社、英国)、標準的培地補完剤 (20% FCS; 2 mM グルタミン) を補充し、新しい E 1 1 . 5 野生型外植片に添加し、18日間培養した (Smith and Schofield, 1997)。3つの胚に由来する180個の外植片を、この研究に含めた3つの系統の各々について分析した。データは A N O V A により分析した。

20

【 0 0 6 5 】

アウトグロース分析

アウトグロースは、骨格筋外植片の増殖率の、信頼性があり高度に再現性のある尺度である (Smith and Schofield, 1994)。外植片を3週間養殖し、各ウエルの細胞のコンフルエンスレベルにより得点化した。Myf-5免疫染色 (Santa Cruz 社製; 力価 1 / 5 0 0 0、ウサギ抗 - Myf - 5 c 2 0) を使用して、E 1 1 . 5 ~ E 1 7 . 5 野生型 (WT)、m d x、及び c a v - 3^{-/-} 外植片培養の筋肉由来を実証し、85%を超える細胞が m y f - 5 + だった (Smith and Merrick, 2008)。各切片を用いて実施された二次抗体対照は、常に負に染色された。Myf-5 c 2 0 を使用して、筋形成を広範に実証する (Frock et al., 2006; Lindon et al., 1998)。

30

【 0 0 6 6 】

アポトーシス及び増殖の測定

筋芽細胞の形態学的特徴を有するコンフルエント外植片培養を、ディスペーゼと共に二次培養し (Smith and Schofield, 1994)、固定する前に6時間カバーガラスに播種した (5 × 1 0³ 細胞 / c m²)。アポトーシス性核細胞を 1 0 μ g / m L の D A P I で 3 分間染色した (Smith et al., 1995)。増殖細胞を、Ki 6 7 (ウサギ抗 Ki 6 7、力価 1 / 1 0 0 0; Novocastrolaboratories Ltd. 社製、英国) で上記のように免疫染色した。抗原回収の場合 (圧力鍋を使用した)、標準的紙クリップを使用して、カバーガラスをまずしっかりとスライドガラス上に取り付けた。3回の別々の実験を、各系統 (C 5 7 B L 1 0、c a v - 3^{-/-}、m d x) について重複して実施した。

40

【 0 0 6 7 】

50

タンパク質の単離及び免疫プロット

胚からタンパク質を直接的に抽出して、R I P A 緩衝液を含有するガラス製ホモジナイザー（1～5 mL；V W R I n t e r n a t i o n a l 社製、英国）に入れた。標準的プロトコルを使用して免疫プロットを実施し、E C L（P i e r c e 社製 E n d o g e n H y c l o n e）により検出した。抗体：速筋ミオシン（M y 3 2、1：1 0 0 0）； α -チューブリン（1：1 0 0 0、S i g m a 社製）；p a x - 7（1 / 1 0 0 0）；カベオリン - 3（1 / 1 0 0 0）。ヤギ抗マウス I g G - H R P（1：2 0 0 0、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y 社製）。タンパク濃度は、E L I S A 形式のブラッドフォードアッセイを使用して決定した（Merrick et al., 2007）。

【0068】

10

P a x - 7 R T（逆転写）リアルタイムPCR

逆転写（R T）PCRを実施して、野生型（W T）及びm d x マウス骨格筋から単離された筋芽細胞のp a x - 7 m R N A 量を定量化した（Smith & Schofield, 1994）。定量データを得るために、P a x - 7 産物の線形化及び等化を、I g f - 2 について記述されているように実施した（Merrick et al, 2007）。R T - P C R を、これら定量下で、野生型の6つの別々の単離物及びm d x 筋芽細胞の6つの単離物に対して実施した。ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）c D N A 試料を、Merrick et al, (2007)に記述されたR T - P C R 法により生成し、以下の試薬混合物中でのP C R にかけた：

- ・ 5 μ L の 5 x P C R 緩衝液（P r o m e g a 社製）
- ・ 1 . 5 μ L の 2 5 m M M g C l ₂（P r o m e g a 社製）
- ・ 5 μ L の 1 0 m M d N T P（P r o m e g a 社製）。
- ・ 1 μ L の 2 5 μ M プライマー混合物、P C R d H ₂ O（S i g m a 社製）中の 1 2 . 5 μ M 順方向及び 1 2 . 5 μ M 逆方向プライマー（A l t a B i o s c i e n c e s 社製）。
- ・ 1 μ L の c D N A
- ・ 1 μ L の T a q（P r o m e g a 社製） - 最後に添加された試薬

20

【0069】

T a q ポリメラーゼをP C R 混合物（上記のような）に最後に添加して、ランダム転写を防止した。試料をプログラム可能な熱コントローラーに負荷し、熱コントローラーを、以下の通り、この遺伝子について特別にプログラムした：

30

【0070】

【表1】

p a x 7

ステップ番号	温度（℃）	時間（分）
1	9 4	3
2	5 6	1
3	7 2	1
4	9 4	0 . 5
5	5 6	1
6	7 2	1
7	ステップ4へ行く、3 5回	
8	7 2	5
9	4	使用するまで

40

【0071】

プライマー配列：

p a x 7 - 順方向：g c t - a c c - a g t - a c a - g c c - a g t - a t g

p a x 7 - 逆方向：g t c - a c t - a a g - c a t - g g g - t a g - a t g

【0072】

I g f - 2

50

インスリン様増殖因子2 (Igf-2) は以前に報告されている。染色法及びPCR法は、Merrick D et al (2007)に考察されている。典型的には、筋生検をアッセイした。

【0073】

結果

分岐、線維誤整列、及び奇形筋管は、筋ジストロフィーの胚表現型を特徴付ける

野生型 (WT)、cav-3^{-/-}、及びmdxマウスを汎ミオシン抗体 (MF20) で免疫染色して、筋線維構造を明らかにした (図1)。分岐及び線維分割は、E13.5~E17.5のmdx軸上 (背部)、軸下 (肢筋、呼吸筋)、及び顔面筋で見出され、それが筋管形成に関連する初期事象であることと一致する、動的な時間的及び空間的パターンを示す (図1-1A~C及びG)。一致した期及び筋肉群では、mdx筋管は、野生型と比べてジストロフィー胚で発育不全であり、cav-3^{-/-}筋管は肥大性であり、筋管幅は様々である (図1-1C~E、青色バー)。最大の形態学的欠陥は、近位肢 (E15.5) よりmdx肋間 (E13.5) でより初期に生じ、これら筋肉の後期発生と一致する (図1-1A)。cav-3^{-/-}及び野生型胚筋管では、線維分割はない (図1-1A、C、E、及びF、H)。筋管整列も、mdx筋形成の初期に障害を受ける (図1-2I)。E13.5では、最大1/8のmdx筋管は、近位肢、肋間、及び顔面筋の正中線維整列から誤配置されている (図1-2I)。これは、筋管の5%未満が誤配置されていたE13.5の野生型及びcav-3^{-/-}筋肉とは統計的に異なる。筋管を、正中から25°を超えて逸脱しているもの (誤整列) 及び25°未満誤配置されているもの (接線性線維) に分類すると、半分を超える誤配置E13.5mdx筋管 (7~9%) が、誤整列しており (図1-2K)、残りは接線性であったが、野生型又はcav-3^{-/-}筋肉では、誤配置筋管は全て接線的に誤配置されていた。これは、調査した他の期にも該当した (データ非表示)。誤配置筋管の割合は、在胎齢と共に減少し、筋肉群に依存する (図1-2I)。E13.5では、mdx肋間筋の筋管の12%が不正確に整列しており、これは、在胎齢と共に減少するが、本発明者らは、全ての在胎期でmdx肋間筋における筋管の誤整列及び接線性の誤配置を見出した (E13.5~E17.5、図1-2I、M)。同じ期のWT及びcav-3^{-/-}の肋間筋管は、正中に対して正確に整列しており、WT又はcav-3^{-/-}の肋間に筋管の逸脱はなく、これら筋肉の整列機序がしっかりと制御されており、mdxでは重度に障害を受けることを示唆する (図1-2H~N)。

【0074】

ジストロフィー胚心臓の形態学的欠陥

心筋症は、LGM D (1C) 及びDMDの両方の重要な臨床的帰結である。本発明者らは、MF20及び心筋-ミオシン特異的抗体N2.261を使用して、ジストロフィー胚心臓及び野生型胚心臓の形態及びミオシン局在化パターンを実証した (図2)。文献と一致して、骨格速筋ミオシンアイソフォーム (FM y H C) は、E13.5~E17.5の胚心臓では検出することができなかった (My32抗体、データ非表示)。心筋-ミオシンは、E13.5~E17.5の野生型及びジストロフィー心室及び心房筋細胞に存在する (図2-1A~F、図2-2I~P)。両突然変異体は、心室壁肥厚 (図2-1A~F) 及び心筋細胞組織崩壊を示し、これは、cav-3^{-/-}において大幅により悪化しており、筋細胞が交差した様式で形成し互いに重なりあっている (図2-1E~F及びG~H)。心房小柱形成も、ジストロフィー胚では障害を受けており、長くてかぎ形のmdx小柱とは対照的に、E14.5のcav-3^{-/-}胚では短くて太い (図2-2I~J)。E17.5では、染色が均一であり2つの層がしっかりと隣接している野生型心房とは対照的に (図2-2K, N)、ジストロフィー心房の心筋及び心内膜細胞層の拡張又は分離、及び心筋-ミオシンの喪失がある (図2-2K~P)。2つのジストロフィー心臓間には明確な相異があり、E17.5のcav-3^{-/-}では、心筋壁の染色にムラ及び減少があり、それは小柱で最も顕著である (図2-2O)。mdxでは、染色の喪失は、心筋層の小柱間領域に広がっているが、小柱の端部では大部分が保持されている (図2-2P)。

【0075】

筋核誤配置及び融合異常

E 1 5 . 5 の野生型胚では、筋核は、筋管の長さに沿って均等に離間されており、新生筋管を除いて、縁部周辺では均等に及び螺旋形に配置されている（図 3 - 1 A、白色の星印）。m d x では、筋核は、野生型より中心により多く配置されており、わずかにさらに離間している（図 3 - 1 B）。対照的に、c a v - 3^{-/-}筋核は、互いにより近接しており、重度に障害を受けた筋核間隔及び核「集群化」を示し、それは筋管の端部で特に顕著である（図 3 - 1 C ~ D）。横断面は、野生型筋肉ではこの期（E 1 5 . 5）に末梢核及び中心核が存在することを実証し、m d x 及び c a v - 3^{-/-}筋肉では、中心核のみが存在することを示す（図 3 - 1 E ~ G）。これら表現型を定量化するために、本発明者らは、一定区域での筋核及び筋線維の合計を得点化して、c a v - 3^{-/-}筋管は、m d x 又は野生型の筋管の 2 倍の筋核を含有していたことを実証し、これは、E 1 3 . 5、E 1 5 . 5、及び E 1 7 . 5 において統計的に有意である（図 3 - 2 K ; $p < 0 . 0 5$ ）。これらの期では、c a v - 3^{-/-}にも筋管が大幅に過剰に存在し（ $p < 0 . 0 5$ ）、m d x の筋管数は、わずかだが有意に（ $p < 0 . 0 5$ ）より少ない（図 3 - 1 H ~ J、図 3 - 2 L）。c a v - 3^{-/-}胚及び m d x 胚の筋管数の不均衡は、E 1 3 . 5 ~ E 1 7 . 5 で減少するが、野生型とは全ての期で統計的に異なっている。

10

【 0 0 7 6 】

培養胚筋肉幹細胞の過剰増殖及びアポトーシス

胚筋肉幹細胞集団を特徴付けるため、本発明者らは、ジストロフィー及び野生型（E 1 1 . 5 ~ E 1 7 . 5）胚筋芽細胞培養を使用した（Smith and Merrick, 2008）。これら細胞の体節由来を、m y f - 5 染色を使用して実証した（図 4）。m d x 及び c a v - 3^{-/-}外植片は両方とも、野生型（W T）とは異なるアウトグロース率を示す（図 4 - 1 A ~ B）。野生型と比較して、m y f - 5⁺細胞のアウトグロースは、m d x では全ての期（E 1 1 . 5 ~ E 1 7 . 5）で、及び c a v - 3^{-/-}では E 1 5 . 5 ~ E 1 7 . 5 で有意により大きい。より初期の段階（E 1 1 . 5 ~ E 1 3 . 5）では、c a v - 3^{-/-}アウトグロース率は、野生型と判別不能であり、欠陥はこの突然変異体ではより後期に生じること示唆する。筋芽細胞増殖（k i 6 7 免疫反応性）及びアポトーシス（D a p i 染色）は両方とも、E 1 1 . 5 ~ E 1 7 . 5 の m d x で有意に上昇したが、c a v - 3^{-/-}では、アポトーシス及び増殖率は、両パラメーターが m d x 胚のアポトーシス及び増殖率に接近するレベルに急上昇する E 1 5 . 5 まで野生型のアポトーシス及び増殖率と同じである（図 4 - 1 C、図 4 - 2 E）。m d x では、増殖（及びアポトーシス）は、野生型レベルより依然として有意に高いままであるが、E 1 3 . 3 から E 1 7 . 5 まで減少し、しかしながら、c a v - 3^{-/-}筋芽細胞の増殖及びアポトーシスは、E 1 5 . 5 まで増加する（図 4 - 1 C ~ D、図 4 - 2 E ~ F）。E 1 7 . 5 では、c a v - 3^{-/-}の増殖率は、m d x レベルと一致してわずかに減少するが、アポトーシス率は、E 1 5 . 5 の c a v - 3^{-/-}筋芽細胞のレベルで維持される（図 4 - 2 E）。m d x 外植片由来の可溶性因子増殖因子は、E 1 1 . 5 W T 外植片のアウトグロースを増加させる（図 4 - 1 I）。

20

30

【 0 0 7 7 】

p a x - 7 骨格筋幹細胞集団は、ジストロフィー胚では減少及び組織崩壊される

E 1 7 . 5 では、p a x - 7⁺幹細胞集団は、骨格筋筋管間でより低密度で分散しているが、p a x - 7 タンパク質は、筋肉サイズと共に増加し続ける（（Merrick et al., 2007）；図 5 - 1 A ~ B、G ~ H、M 及び O）。野生型胚では、p a x - 7 染色強度は、在胎齢に関わらず均一及び一定である（図 5 - 1 A ~ B、G ~ H、及び Q；低近位肢）。E 1 5 . 5 ~ E 1 7 . 5 では、c a v - 3^{-/-}及び m d x は両方とも、それらの筋肉組織の全体にわたってそれらの p a x - 7⁺細胞集団の減少を起し、そのため、両突然変異体では E 1 7 . 5 まで p a x - 7 染色及び p a x - 7 タンパク質が有意に減少する（図 5 - 1 C ~ L、M、P；低近位肢について示されている）。これは、p a x - 7 陽性細胞が、E 1 7 . 5 ではほとんど存在せず、それら残りの染色が非常に弱い c a v - 3^{-/-}近位後肢筋肉で特に明白である（図 5 - 1 J、白色の矢印）。E 1 5 . 5（c a v - 3^{-/-}及び m d x）及び E 1 7 . 5（m d x）では、p a x - 7 陽性細胞断片が、ジストロフィー筋

40

50

肉で見出され(図5-1L、黒色矢印により示される)、これら細胞がアポトーシスを起こしている可能性を示唆する。ジストロフィンが欠損し(*mdx*)、カベオリン-3がヘテロ接合性だった(*cav-3^{+/-}*)突然変異胚(*mdx cav-3^{+/-}*)は、近位肢で非常により重度の表現型を示し、*pax-7*陽性細胞が、E15.5では非常に低密度で存在し(図5-1MN、及びR)、E17.5では低近位肢にほとんど全く存在せず(図5-1O~P)、筋組織全体にわたって非常に減少する(図7を参照)。

【0078】

全胚免疫プロットは、E11.5及び13.5と比較して、E15.5~E17.5のWT(及び*mdx*)胚でカベオリン-3タンパク質が増加することを実証し、*cav-3^{-/-}*では、カベオリン-3タンパク質が存在しないことを確認する(図5-1M~N)。10
*mdx*では、カベオリン-3は、4つの別々のゲル泳動でのデンシトメトリーにより測定したところ、E11.5では検出されないが(図5-1MN)、E13.5~E17.5のWTよりカベオリン-3含有量が数倍増加する(3つの期全てで、 $p = 0.05$; 図5-1O)。Pax-7含有量は、野生型胚では妊娠と共に増加するが、E15.5~E17.5の*cav-3^{-/-}*及び*mdx*では大幅に減少し、減少は、両期において*mdx*より*cav-3^{-/-}*でより大きく、カベオリン-3が、妊娠後期の*pax-7⁺*筋芽細胞生存を制御している可能性を示唆する。E15.5では、*mdx*及び*cav-3^{-/-}*ジストロフィー胚の*pax-7*バンド強度が、それぞれ15%及び60%低減する(図5-1N、P)。E13.5では、*pax-7*は、*cav-3^{-/-}*ではわずかに上昇し、*mdx*では低減し、これは、この期の*cav-3^{-/-}*胚及び*mdx*胚にそれぞれ見出だされる筋管数の増減に関連している可能性があり(図3を参照)、発生のタイミングが、これら胚で障害を受けている可能性を示唆する。20

【0079】

ジストロフィー胚の速筋ミオシンアイソフォームの誤局在化は、カベオリン-3及びジストロフィン欠乏胚筋肉で相反的パターンに従う

野生型では、FM y HCは、早ければE11.5において少数の二次筋管に存在し、E15.5までに、広範囲の筋肉群にわたって二次筋管の約45%に強く局在化する。筋管の約80%は、E17.5においてFM y HCを含有するが、染色強度は、多くの筋管で不均質で弱い(Merrick et al., 2007)。この動的で筋肉特異的な速筋ミオシン局在化パターンは、*cav-3^{-/-}*及び*mdx*突然変異体胚で障害を受けており、FM y HC染色の発生タイミング、存在する速筋ミオシン陽性筋管の総数、及び速筋ミオシン染色の強度に関する異常を示す(図6、図S1)。E13.5では、FM y HCは、幾つかの*cav-3^{-/-}*筋肉ではWTを超えて上昇するが(呼吸筋で顕著)、全ての*mdx*筋肉及び*cav-3^{-/-}*近位筋では大幅に減少する(図6-1A~F)。30

【0080】

FM y HC⁺筋管の出現は、*mdx*胚及びE13.5の*mdx*胚では遅延され、同じ期のWT又は*cav-3^{-/-}*胚と比較して、FM y HC⁺筋管は筋肉組織の全体にわたって非常に少数である(呼吸筋、図6-1A~F;近位筋は同様の表現型を示す(非表示))。この知見は、*mdx* E13.5バンドの強度が統計的に有意に低減される免疫プロットにより(図6-2T及びU)、及びE13.5*mdx*胚のFM y HC⁺筋管が統計的に有意に($p < 0.05$)欠乏していることを実証する筋管の計数(図6-2V)により支援される。合計6つの*mdx*及び4つのWT E13.5胚を使用して、これらのデータを実証した。*mdx*では、FM y HC陽性筋管の染色強度及び割合が大幅に増加し、そのためE15.5からE17.5まで、ジストロフィン欠乏筋管のMy32染色は、野生型と比較して大幅に過剰であり、全胚免疫プロットのFM y HCバンドの染色強度が増加する(図6-1G~O、図6-2T)。40
*mdx*胚FM y HC含有量の増加及び*cav-3^{-/-}*胚FM y HC含有量の減少を明らかにしたデンシトメトリーにより、この結論が確認された。これは、統計的に有意であり、それぞれ $P < 0.001$ 及び $p < 0.05$ である(図6-2U)。野生型胚及びジストロフィー胚の一致したFM y HC免疫染色筋肉切片の定量化により、FM y HC陽性筋管の割合が、*cav-3^{-/-}*胚及び*mdx*胚でかく乱され50

ることを実証した(図6-2V)。cav-3がヘテロ接合性であるmdx胚(mdx cav-3^{+/-})も、E15.5(図6-1R)及びE17.5(図6-1Q、S)では、筋管が著しく枯渇する肋間筋等の筋肉(図7-2T~U)においてでさえ、FMYHCを下方制御せず、筋肉組織の全体にわたってFMYHC染色を増加させた。

【0081】

mdxcav^{+/-}突然変異体胚における広範な肋間筋線維喪失及びpax-7枯渇

上方制御されたカベオリン-3が、mdx/DMD表現型に対して寛解性である可能性が高いか、又は寄与性である可能性が高いかを実証するために、本発明者らは、ジストロフィンが欠損し(mdx)、カベオリン-3ヌル突然変異がヘテロ接合性だった(cav-3^{+/-})二重突然変異体胚を生成した。E15.5では、これら胚は、野生型胚と比較して、カベオリン-3の50%低減を示す(図5)。MF20及びpax-7を用いた免疫染色により、E17.5ではmdxcav-3^{+/-}胚が、後肢pax-7筋芽細胞の喪失(図5を参照)に加えて、pax-7陽性肋間筋芽細胞の有意な減少(図7-1A~J)を伴うそれらの肋間筋線維の著しい枯渇も含む、より重度の表現型を示すことが実証される。線維喪失表現型は、野生型肋間筋線維では互いに密集しているmdxcav^{+/-}肋間の線維間に隙間(「白色の空間」)が存在することにより、低倍率でさえ識別することができる(図7-1A、D、及びF、I)。より高い倍率(図7-2K~P)では、この表現型が、野生型(WT)、mdx、又はcav-3^{+/-}肋間筋と比較して、線維クラスターがはるかに少数であることの結果であることは明らかである。この表現型は、非常に一貫しており、3つの異なるmdxcav^{+/-}胚が示されている(図7-2N~P; mdxcav-3^{+/-} 1、2、及び3)。mdxでも、肋間線維は、野生型よりも低密度に分布していると考えられ、この表現型のより軽度の形態であることが示唆される。線維密度の定量化は、一定のグリッド区域の肋間線維数を計数することにより達成し、mdx及びhet(mdx cav-3^{+/-})が両方とも線維密度の低減を示したことを実証した。これは、het突然変異体では統計的に有意な低減である(p<0.05; 図7-2R)。野生型の割合として表すと、mdxcav-3^{+/-}突然変異体胚が、E17.5までにそれらの肋間筋管の71.2%の大量枯渇を示すが(図7-2S; 3つの異なるE17.5 mdxcav-3^{+/-}胚数の平均)、mdxは、3分の1(37.5%)の枯渇を示すことを理解することができる。これら線維の大多数は、両突然変異体において速筋ミオシン(FMYHC)を発現する(図7-2U)。

【0082】

ヒト筋生検のPax-7染色

これは、図8として示されており、ヒト若年筋を上述の様式と類似した様式で染色することができることを実証する。

【0083】

Pax-7遺伝子発現研究

RT-PCRを使用してpax-7 mRNAレベルを定量化した。これにより、DMD個体のpax-7レベルが、正常個体より低いことが示された。

【0084】

Igf-2障害マウス

Merrick et al (2007)は、筋線維におけるIgf-2について記述している。図9は、障害マウスのIgf-2を示す。Igf-2メッセージ(mRNA)は、mdx胚及びcow-3^{+/-}胚で上昇する。カベオリン欠乏胚におけるIgf-2の抑制は、転写後レベルにおいてである。

【0085】

Igf-2の下流遺伝子

CDKN1/P57kip2の減少又はpAkt(リン酸化Akt)の発現変更は、図11の発現レベルにより示されているように、筋ジストロフィーに特徴的である。pAktは、MD疾患タイプ特異的な応答を示し、例えば、pAktは、カベオリン-3欠乏/LGMD-1cでは、正常筋肉と比較して低減され、mdx/DMDでは増加する。pAk

10

20

30

40

50

t の障害パターンは、I g f - 2 のパターンと同じである。

【 0 0 8 6 】

考察

本研究では、本発明者らは、m d x 及び c a v - 3^{+/-} ジストロフィーマウスの胚表現型を実証し、両タンパク質のマウス突然変異体 (m d x c a v - 3^{+/-}) では、胚表現型が著しくより重度であることを示す。本発明者らは、マウス胚発生におけるジストロフィン及びカベオリン - 3 の重要な役割を実証し、D M D 及び L G M D - 1 c の成体ジストロフィー表現型及び臨床像を規定する病理が、胚筋肉分化の不全に由来することを実証する。この分析の重要な知見は、表 2 に要約されている。

【 0 0 8 7 】

初期の筋肉パターン形成が、ジストロフィン欠損胚では障害を受ける

m y f - 5⁺ m d x 胚筋芽細胞の増殖挙動は、E 1 1 . 5 から障害を受け、m d x m y f - 5⁺ 筋芽細胞は、過剰増殖性であり、アポトーシス性である。M y f - 5 は、胚筋芽細胞集団を特徴付け、筋管分化が開始される前に、筋板で発現され (E 8 . 5)、筋形成の全体にわたって全ての筋肉群で見出される (Hadchouel et al., 2003; Ott et al., 1991)。ジストロフィンは、E 8 . 5 で M y f - 5 が発現された 1 日後であり、完全に分化した筋板 (軸上) 筋管が最初に出現し、ミオシン重鎖 (M y H C) が最初に出現される 2 4 時間前 (E 1 0 . 5) である、筋板分化中の重要な期 (E 9 . 5) で発現される (Houzelstein et al., 1992; Ott et al., 1991; Schofield et al., 1993)。初期の腹側筋形成及び二次筋形成は、F M y H C、p a x - 7、及び c a v - 3 タンパク質が後に出現することにより、及び E 1 1 . 5 ~ E 1 3 . 5 における m d x 筋肉組織の不完全形成及び組織崩壊により示されるように、m d x 胚において重度に障害を受け、遅延される (図 1; 図 6 及び補助データの図 S 1)。これらのデータは、ジストロフィンが、筋板分化に不可欠な役割を有しており、筋板分化は、m d x 胚で障害を受けると、筋肉組織全体のパターン形成及び機能に重篤な帰結をもたらされることを示唆する。

【 0 0 8 8 】

また、E 1 0 . 5 では、m y f - 5⁺ 筋芽細胞は、筋板から遊走して腹側筋形成を開始する (Cusella-De Angelis et al., 1992)。筋芽細胞は、h o x 遺伝子 (p a x 3 及び l b x) の制御下で遊走し、隣接組織により分泌される増殖因子 (w n t 1 及び s h h) に応答して分化する (Gross et al., 2000; Hadchouel et al., 2003)。胚筋芽細胞遊走を開始させる合図は未知であり、他の組織では、幹細胞遊走は、由来組織及び目的組織からの誘導合図により制御されており、胚構造の正確なパターン形成に不可欠であり、容易に障害を受ける場合がある (Lehmann, 2001)。E 1 0 . 5 ~ 1 1 . 5 の軸上筋管が、筋板からの m y f - 5⁺ 筋芽細胞の遊走を引き起こし、腹側筋形成及び二次筋形成を開始させるシグナル伝達の合図を提供すると考えることは可能である。ジストロフィンの非存在下では、これらの合図は存在せず、遊走及び開始プロセスは両方とも妨げられる。E 1 1 . 5 m d x C M で培養された E 1 1 . 5 野生型外植片の異常挙動 (図 4 - 1 I) は、E 1 1 . 5 筋板が、E 1 1 . 5 胚筋芽細胞集団の挙動を修飾する分泌因子を放出するという見解を支持する。m d x における初期筋形成の障害は、ジストロフィンのこれら初期の役割 (複数可) が、ユートロフィンの役割とは異なることを示唆する。この結論は、初期胚期で排他的であるジストロフィン及びユートロフィンの公開されている m R N A の i n s i t u パターンと一致する (Houzelstein et al., 1992; Schofield et al., 1993)。妊娠の後期段階では (以下を参照)、m d x 筋形成には、これら胚によるカベオリン - 3 のその後の過剰産生により、又は別のタンパク質、例えば a - ユートロフィンの代償性発現により媒介され得る「追い付き」プロセスがあると考えられる。生後の筋肉では、a - ユートロフィンは、ジストロフィン欠乏筋肉で上方制御され、m d x ではジストロフィンの幾つかの機能を引き継ぐことができる (Weir et al., 2004)。妊娠後期における二重突然変異体表現型 (m d x c a v - 3^{+/-}) の重症度増加により、妊娠後期の m d x 胚におけるカベオリン - 3 の代償性効果も主張される。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

カベオリン - 3 は、筋肉制御因子 (M R F) により制御され、筋管分化中に活性化され、E 1 1 . 5 筋板ではジストロフィンより後期で発現される (Biederer et al., 2000) 。これは、本発明者らが、E 1 1 . 5 の野生型胚でカベオリン - 3 を検出したことと一致している。M R F は、E 1 1 . 5 でも出現する p a x - 7 も制御する (Merrick et al., 2007) 。c a v - 3^{-/-}胚では、初期筋肉パターン形成プロセスは無傷であると考えられ、m y f - 5 + 筋芽細胞挙動は障害を受けておらず、腹側筋形成の局在化及びタイミングは、野生型と同等である。従って、カベオリン - 3 は、これら初期の筋形成に必要ではないと考えられる。m d x では、カベオリン - 3 及び p a x - 7 の出現は両方とも遅延され、これは、これら胚における筋形成の発生遅延の帰結であるか、又はジストロフィン活性化不全のより特異的な下流であり得る。

10

【 0 0 9 0 】

腹側筋形成及び二次筋形成

後期胚事象におけるジストロフィンの役割を解釈することは、E 1 3 . 5 から m d x 胚でカベオリン - 3 が上方制御されることにより複雑になる。出生後の組織では、カベオリン - 3 の過剰発現は、ジストロフィン下方制御及び D M D 様表現型を引き起こす (Galbati et al., 2000) 。ジストロフィンの喪失は、D G C の解体及びジストロフィン - 関連タンパク質の抑制を引き起こす (Ohlendieck et al., 1993 ; Vaghy et al., 1998) 。しかしながら、D M D 患者及び成体 m d x の筋肉は、それぞれ 1 . 5 ~ 2 . 4 及び 2 ~ 3 倍過剰なカベオリン - 3 を有する (Vaghy et al., 1998) 。E 1 3 . 5 ~ E 1 7 . 5 の m d x 胚において、本発明者らは、(期依存的な) 平均 3 ~ 5 倍過剰なカベオリン - 3 を見出し、カベオリン - 3 発現の障害が、ジストロフィン欠乏の初期の重要な帰結であることが示唆される。ジストロフィンの胚 m R N A 発現パターンは、野生型におけるジストログリカンの発現パターンと重なるが、ユートロフィンとは重ならず、このパターンは、m d x 胚では変化しない (Houzelstein et al., 1992 ; Schofield et al., 1995) 。従って、ジストロフィンは、- ジストログリカンに対して競合的に結合することにより、カベオリン - 3 を負に制御することができる (Ilsley et al., 2002) 。

20

【 0 0 9 1 】

ゼブラフィッシュの胚では、カベオリン - 3 突然変異体は、細胞骨格異常及び融合異常を示し、ジストロフィン突然変異体は、不安定な筋肉結合を示し、胚筋管の配置及び配向における役割を示唆する (Bassett et al., 2003 ; Nixon et al., 2005) 。E 1 3 . 5 筋形成は、c a v - 3^{-/-}及び m d x で障害を受け、表現型は、マウスカベオリン - 3 及びジストロフィンが、ゼブラフィッシュの対応する物質と同様の役割を有することを示唆する。E 1 3 . 5 の m d x において、本発明者らは、筋管の誤配置、分割、及び分岐を見出した。筋管配向性の異常は、カベオリン - 3 欠損突然変異体では見出されない。その代わりに、胚 c a v - 3^{-/-}筋核は、筋管端部に集群しており、c a v - 3^{-/-}で出生後に報告されている T 管異常を示唆する (Minetti et al., 2002) 。E 1 3 . 5 ~ E 1 7 . 5 の過剰な c a v - 3^{-/-}筋管産生は、筋核含有量の 2 倍増加及び肥大も見出された。これらのデータは、培養 c a v - 3^{-/-}筋芽細胞を使用した i n v i t r o 研究データと一致し、この研究では、相反的表现型 (筋管数の低減、より少数の筋核、及び肥大) が、カベオリン - 3 過剰発現筋芽細胞に見出され、カベオリン - 3 が筋芽細胞融合を抑制することを示唆する (Volonte et al., 2003) 。E 1 3 . 5 の m d x 胚は、発育不全筋管及び筋管数の低減を示す過剰発現表現型を部分的に再現する。筋核数は影響を受けない。しかしながら、後期段階 (E 1 5 . 5 ~ E 1 7 . 5) では、カベオリン - 3 レベルは依然として高いままであるが、m d x の筋管数は野生型と同等である。これは、カベオリン - 3 は、筋管サイズを制御することができるが、E 1 3 . 5 の筋管異常は、過剰なカベオリン - 3 によるものではなく、m d x の腹側筋形成の遅延によるものである (上記の項目を参照) ことを示唆する。

30

40

【 0 0 9 2 】

c a v - 3^{-/-}及び m d x における速筋線維特異化の相反的な障害

F M y H C + 筋管は、野生型軸上筋では E 1 1 . 5 で最初に出現し、二次筋形成の開始

50

を予告する (Merrick et al., 2007)。線維タイプの切り替えは、幾つかの筋管が遅筋及び速筋ミオシン発現間で切り替わり、成体線維タイプ比を実証するプロセスが始まる E 15.5 で始まる (Cho et al., 1994; Merrick et al., 2007)。mdx では、FMyHC + 筋管分化は、著しく障害を受け (上記の項目を参照)、速筋線維タイプ特異化は、mdx 及び cav-3^{-/-} の両方で障害を受ける (図 6)。E 15.5 ~ E 17.5 では、mdx が、WT と比較して著しく過剰な FMyHC タンパク質及びより高い割合の FMyHC + 筋管を有する相反的表現型が存在し、cav-3^{-/-} では、FMyHC が大幅に低減される。FMyHC の過剰産生は、カベオリン-3 の代償的增加により促進される、E 13.5 の mdx 筋肉における「追い付きプロセス」に起因する場合がある。しかしながら、E 15.5 ~ 17.5 の cav-3^{-/-} における FMYHC + 筋管の喪失は、カベオリン-3 も速筋線維特異化に必要であり、mdx におけるカベオリン-3 の過剰産生は、この表現型には病原性であり、E 15.5 ~ E 17.5 の mdx における FMyHC 線維の過剰産生を引き起こすことを示唆する。出生後の速筋線維は、DMD 及び mdx において優先的に変性し、筋肉機能に重篤な帰結をもたらされる (Webster et al., 1988)。カベオリン-3 はヘテロ接合性であるが、ジストロフィン完全に欠損している突然変異体 (mdxcav-3^{+/-}) では、FMyHC + 線維は、野生型 (WT) と比較して E 17.5 において依然として過剰に存在しており、これが、カベオリン-3 レベル単独ではなく、正確な速筋線維の割合に重要なジストロフィンとカベオリン-3 との均衡の取れた関係性であることを示唆する。

10

20

【0093】

成体組織では、カベオリン-3 及びジストロフィン、DGC では - ジストログリカンの競合的結合により直接的に相互作用する (Sotgia et al., 2000)。これらのデータは、筋形成においてジストロフィン及びカベオリンが別々の役割を果たすことを実証するが、両タンパク質及び機能的 DGC が、線維タイプ特異化に必要である可能性を示唆する。

【0094】

pax-7 筋芽細胞の喪失

E 15.5 ~ E 17.5 の cav-3^{-/-} 及び mdx は、pax-7⁺ 筋芽細胞の消耗及び pax-7 タンパク質の著しい枯渇を示す。pax-7 の喪失は、カベオリン-3 が野生型胚で強力に上方制御される時点である E 15.5 の cav-3^{-/-} で急速に生じ、この喪失は、E 15.5 の mdx よりも大きい。カベオリン-3 は、pax-7 自体と同じように、筋肉での生存シグナル伝達を誘発することができる。本発明者らのデータは、カベオリン-3 が、E 15.5 の cav-3^{-/-} で pax-7⁺ 筋芽細胞の急速な喪失に直接的な役割を果たすことを示唆し、pax-7⁺ 筋芽細胞の消耗は、それらのカベオリン-3 レベルの増加により、mdx 筋肉中で部分的に補償される場合があることを示唆する (Relaix et al., 2006; Smythe et al., 2003)。この結論は、mdxcav^{+/-} 突然変異体では、pax-7 が、いずれの単一突然変異体よりも大幅に枯渇し、そのため pax-7 細胞は、E 17.5 になるまで mdxcav^{+/-} 低近位肢筋肉には全く存在せず、他の筋肉中で非常に低減されていることにより支持される。Pax-7⁺ 筋芽細胞は、正常な出生後の衛星細胞出現に重要である (Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000)。pax-7 の非存在下では (pax-7^{-/-} マウス)、衛星細胞は、細胞数が低減され、アポトーシスが上昇する。しかしながら、pax-3⁺ 筋芽細胞が存在するため、衛星細胞は完全には失われず、これらマウスの (出生後の) 若年筋肉発達を達成及び持続させるのに十分な衛星細胞が存在すると考えられるが、成体での再生は妨げられる (Oustanina et al., 2004; Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000)。E 17.5 の mdxcav^{+/-} 胚肋間筋は、筋管並びに pax-7⁺ 細胞を著しく枯渇しているという知見は、pax-7 が、胚筋形成にも重要な役割を果たす可能性があることを示唆する。これらにより、ジストロフィー胚は、出生後の生命に受け継がれる可能性がある筋線維を妊娠後期から生成するための能力を低減させることが示唆される。ジストロフィー筋肉再生は、異常であることが知られており、筋芽細胞アポトーシス、過剰増殖、不規則な線維サイズ、及

30

40

50

び進行性線維沈着に関連する。mdx及びcav-3^{-/-}筋肉は両方とも、高いレベルのアポトーシスに関連するそれらの筋肉の変性及び再生の勃発を初期の出生後週で経験する。(Hagiwara et al., 2000; Smith et al., 1995) mdxでは、4か月目から筋肉再生の不全が進行し、それは、mdxでは、ユートロフィンの上方制御により部分的に媒介される場合がある変性プロセスの同時低減により軽減されるが、DMDでは軽減されない(Reimann et al., 2000; Roig et al., 2004; Roma et al., 2004)。再生は、成体cav-3^{-/-}では詳細に研究されていない。データによると、ジストロフィー突然変異体の再生機構は、これら突然変異体がpax-7を欠損しているため、出生時で異常であり、この早期喪失は、後になって成年期の再生プロセスの進歩性障害の根底をなす可能性があることが示唆される。pax-7+細胞の大量喪失と一緒に、E17.5のmdxcav^{+/-}胚の呼吸筋の筋線維密度が著しく喪失することは、この結論をさらに強化し、カベオリン-3レベルの増加が、mdxの(及び潜在的にはDMDの初期段階の)変性表現型において重要な代償的役割を果たすことを示唆する。

10

【0095】

ジストロフィーマウス表現型とMDの臨床病理との相関性

DMD及びLGMD-1cは、心筋及び骨格筋機能並びに筋肉安定性に影響を及ぼす早期発症性で進行性の小児骨格筋疾患である(Hoffman et al., 1987; Minetti et al., 2002)。DMDでは、全筋肉組織、異常なカベオリン-3発現、筋芽細胞アポトーシス、心筋症、及び再生異常の広範な進行性の機能不全である(Cox and Kunkel, 1997; Smith et al., 1995; Vaghy et al., 1998)。

20

【0096】

LGMD-1Cは、類似しているが制限された筋障害性変化を示し、特に肢、横隔膜、及び心臓の筋肉に影響を及ぼす(Galbiati et al., 2001; Hagiwara et al., 2000; Smythe et al., 2003)。mdx及びcav-3^{-/-}の出生後表現型は、DMD及びLGMDの臨床病理とほとんどの点で十分に類似しており、疾患モデルとして広く使用されている(Chamberlain et al., 2007; Chan et al., 2007; Galbiati et al., 2001; Hagiwara et al., 2000; Roig et al., 2004; Vaghy et al., 1998)。mdx及びcav-3^{-/-}のそれぞれの胚表現型は、LGMD及びDMDのモデルとして、これらのマウスの妥当性を強化し、MDの根底にある機序並びにジストロフィン及びカベオリン-3の機能様式に対する新しい洞察を提供し、この疾患のヒト形態とネズミ形態との相異を精査する新しい手法を示唆する。本発明者らは、重要な発生段階を特定する;ジストロフィン及びカベオリン-3がそれぞれ重要な役割を果たし、妊娠後期の2つの新規な病理を明らかにする筋板分化(E11.5)及び二次筋形成(E13.5);MD病理の根底にある機序に対する洞察力を提供し、MDの治療介入及び早期診断のための新規経路を示唆する速筋線維特異化及びpax-7筋芽細胞の消耗。

30

【0097】

心筋症、特に左室不全は、DMD及び多くの他のMDの重要な臨床的帰結であり、cav-3^{-/-}、mdx、及びカベオリン-3過剰発現マウスの実証されている病理である(Aravamudan et al., 2003; Cox and Kunkel, 1997; Hayashi et al., 2004; Quinlan et al., 2004; Woodman et al., 2002; Yue Y et al., 2003)。ジストロフィン及びカベオリン-3は、それぞれE9.5及びE10.5のマウス胚心臓で発現する(Biederer et al., 2000; Houzelstein et al., 1992)。E13.5において、mdxは、心尖部の中程度の肥厚及び心房小柱異常を有する。cav-3^{-/-}では、心室の著しい肥厚、心房異常、及び心筋症に特徴的な筋細胞組織の次第に悪化する障害があり、3~4か月のカベオリン-3欠損マウスに見られる早期発症性の出生後心筋症と一致している。これらのデータは、カベオリン-3が正常な心臓発生に必要であり、心筋症に役割(複数可)を有し、E17.5のmdx及びcav-3^{-/-}で、心筋ミオシンが誤局在化されており、小柱が異常であり、心筋ミオシン異常が幾つかのよく知られている心筋症の根底にあり、従ってジストロフィー心臓におけるその発現障害が重要であることを示唆する(Cuda et al., 1993)。心房障害は、以前にいずれのマウスでも報告されていない。このmdxに関

40

50

する知見は、28歳のDMDで小柱が過剰形成されるという最近の報告が発生に由来することを示唆する(Finsterer et al., 2005)。出生後のmdx心臓は、WTレベルのβ-心筋ミオシン、及びジストロフィン欠乏を補償することができるユートロフィンレベルの増加を示すことが報告されているが、これらマウスは、進行性の筋症を有する(Quinlan et al., 2004)。β-心筋ミオシンの局在化は、出生後にはまだ実証されておらず、従ってその心房局在化の障害は、成体でも持続される場合があり、又は出生時若しくは若年期に失われる場合がある(Wilding et al., 2005)。

【0098】

過剰増殖及び筋細胞アポトーシス上昇は、DMD/mdx及びLGMD-1c/cav-3^{-/-}のマウス及びヒト形態の両方並びにほとんどの他のMDタイプを特徴付ける、出生後のMD筋肉病理の十分に実証された広範な特徴である(Baghdiguian et al., 1999; Smith et al., 1995; Smith et al., 2000; Smythe et al., 2003)。ジストロフィン、ジストログリカン、及びカベオリン-3は、生存シグナル伝達に役割を有する(Glass, 2005; Smythe et al., 2003)。mdx筋肉では、高レベルの筋芽細胞アポトーシス及び筋芽細胞過剰増殖は、出生後1週間～成年期(Smith, 1996; Smith et al., 1995; Spencer et al., 1997)及び(この研究では)E11.5～E17.5の胚期中で実証される。これらのデータは、幹細胞挙動の障害を示唆し、アポトーシスは、ジストロフィン喪失の初期帰結及びDMD病理の重要な寄与要因である。筋芽細胞アポトーシスは、後にE15.5のcav-3^{-/-}で生じ、この表現型が、疾患の重症度の正確な予測因子である可能性を示唆する。

【0099】

新しい洞察 - MDに対する重要性

これらのデータは、筋ジストロフィーの病因に関する新しい展望を提示し、ジストロフィン及びカベオリン-3に関する胚の役割を実証し、それらは筋形成に関する理解を進歩させ、pax-7筋芽細胞の置換及び線維タイプ特異化の修飾を試みる治療戦略が、筋ジストロフィーの初期治療において生産的であり得ることを示唆する。早期診断及び治療介入は、筋ジストロフィー患者の生活の質を改善する可能性が高い。さらに、カベオリン-3、速筋ミオシン、Igf-2、CDKN1c/P57kip2、及びpAktをアッセイで使用することも示唆される。

【0100】

さらなる診断アッセイのデータ

本発明者らは、ヒト骨格筋試料でのpax-7染色を以下の通り実施した：対照(非疾患)小児、31日齢(図12A～C)；16週(図12D～F)及び12.7週(図12G～I)の(非疾患)ヒト胎児組織。これらのデータは、正常な胎児及び新生児の骨格筋でのPax-7染色パターンが、同じ期のマウス胚及び新生児組織に見出されるものと直接比較可能(同等)であることを実証する。Pax-7+筋芽細胞は、ヒト及びマウス胎児及び新生児組織の両方に豊富であり、均一に分布しており、pax-7抗体で強く標識される。本発明者らは、10種の異なる(非筋ジストロフィー)筋肉疾患におけるpax-7陽性筋芽細胞局在化も調査し、これら疾患の各々では、pax-7陽性筋芽細胞は豊富に存在し、非疾患筋肉試料の数は著しくは異なっていなかった。代表的な試料(筋細管ミオパチー)は図12(J～L)に示されている。しかしながら、デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー(DMD及びBMD)患者に由来する骨格筋試料では、結果は異なっていた(図12M～P及び図13)。DMD及びBMDでは、pax-7陽性筋芽細胞の数は、対照と比較して著しく枯渇しており、疾患重症度と一致していた(DMD筋肉は、Pax-7細胞では、より軽度のMD形態であるベッカー型のものより一貫して枯渇していた)。Pax-7染色強度も、正常試料と比較して低減され、これは、Pax-7陽性筋芽細胞の数が少なく、主にPax-7がわずかに発現するDMD患者筋肉で特に明白だった。DMD患者筋肉は、大きな領域がpax-7陽性筋芽細胞を全く含有していなかった(図12M～P、弱染色pax-7+細胞及びPax-7+細胞のない領域は、星印*により示されている)。これらのデータは、pax-7枯渇が、他の非MDミオパ

シー及び小児の非疾患筋生検とこれら疾患を識別するために使用することができるDMD及びBMDの初期マーカーであることを実証する。このマーカーは、単独で、又は筋肉分解のマーカー（例えば、クレアチンキナーゼ）、及び/又は筋肉再生のマーカー（例えば、発生中のミオシン、Igf-2）、及び/又はこの疾患の他のマーカー（例えば、カベオリン-3、速筋ミオシン）と組み合わせて使用して、明白な臨床徴候の発症前に（DMDでは、出生前、及び出生から5歳以下まで）、胎児、新生児、及び低年齢小児の筋ジストロフィーを識別することができる。これらのデータは、Pax-7を単独で、又は治療効果のマーカーとして及び疾患進行の指標として他のマーカーと組み合わせて使用することも強く支持する。

【0101】

さらなる治療データ

カベオリン-3は、mdx（マウス）胚及び出生後組織、並びにDMD（ヒト）筋肉で、正常（野生型）レベルを超えて上昇する。ジストロフィンが欠損しており（mdx）、カベオリン-3がヘテロ接合性である二重突然変異体マウス胚は、カベオリン-3のレベル低減、及びジストロフィン欠損（mdx）のみに見出されるものより重度の筋肉病理を示し、高レベルのカベオリン-3が、ジストロフィンの喪失を補償することができることを示唆する。図14は、カベオリン-3のレベルが低減されて、mdxマウスの非疾患（野生型）レベルに戻ると、mdxの出生後ジストロフィー表現型では重症度も増加し、これらマウスにおけるカベオリン-3レベル増加の治療効果を確認する（図14）。ウエスタンブロッティングを使用して、本発明者らは、これら（DM-二重突然変異体）動物に見出されるカベオリン-3タンパク質のレベルが、mdxマウスのみに見出されるものと比較して、一貫して低減され、野生型マウスに見出されるレベルと同等であることを実証した（図14A）。組織学的レベルでは、mdxマウスのジストロフィー病理は、出生後3~8週で最も重症である。重要なことには、この疾患の進行は、mdxと比較して、野生型レベルのカベオリン-3を有するジストロフィン欠損マウスで持続し、同じ年齢（9週齢）のmdx筋肉と比較して、又はカベオリン-3欠損マウス（cav-3^{-/-}）に見出される、より軽度の病理と比較して（図14D~E）、8週後（図14B~C）のDM（het）筋肉において進行性の重度の病理が持続する。まとめると、これらのデータは、カベオリン-3タンパク質レベルの増加が、ジストロフィン欠乏病理に対する治療効果を有し、カベオリン-3の上方制御をデュシェンヌ型筋ジストロフィーの有効な治療であると特定する。

【0102】

Igf-2は、ジストロフィー（mdx）表現型（Smith et al, 2000）に対する寛解効果を示すが、その機序は不明である。図15は、Igf-2が、ジストロフィー筋芽細胞におけるPax-7、Pax-3、及びカベオリン-3の発現を上方制御することができることを実証し、その治療効果の直接的機序を示唆し、このタンパク質を治療剤として別々に又はカベオリン-3等の他の治療と共に使用することに対する強力な支持を提供する（図15）。（A~B）Igf-2は、10~20µg/mLのIgf-2で処理した15分以内に、野生型（WT）及びジストロフィー筋芽細胞でPax-7の発現増加（mRNA）を誘導する。この効果は持続し、Pax-7は、少なくとも24時間後まで筋芽細胞で上方制御され続ける（統計的に有意である、 $p < 0.01$ 、スチューデントt検定）。（C~D）同様に、Igf-2は、15分以内のPax-3メッセージの上方制御を誘導し、これは、少なくとも24時間後まで持続する（20µg/mLのIgf-2： $p < 0.01$ ）。（E~F）Wt筋芽細胞のIgf-2治療の用量反応曲線は、Igf-2も、pax-7タンパク質の増殖を誘導する（本明細書では、処理後8時間を示す、 $p < 0.01$ ）。（G）ウエスタンブロッティングにより測定された、野生型（WT）及びジストロフィー筋芽細胞でのカベオリン-3タンパク質発現の比率は、ジストロフィー筋芽細胞でのカベオリン-3が、野生型で見出されるレベルを超えて2~3倍上昇することを例示する。15分以内に、Igf-2処理は、野生型と比較して、ジストロフィン筋芽細胞でのカベオリン-3タンパク質の最大8倍増を誘導し、これは、少なくとも24時間後

10

20

30

40

50

并で拮抗作用 ($p < 0.01$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ Igf-2)。

【0103】

【表2】

表1

1. 形態測定	野生型と比較した表現型	Mdx	cav-3 ^{-/-}	mdxcav ^{+/-}
筋管サイズ	发育不全	发育不全	肥大	发育不全
合計筋管数/筋肉	低減	低減	増加	低減
筋間線維密度 (E17.5)	37.5%低減	37.5%低減	未決定	71.2%低減 (統計的有意性、 $p < 0.05$)
線維密度 (肢)	減少	減少	増加 ($p < 0.05$)	未決定
中心に位置する筋核の数が多い (E17.5)	有	有	無	有
筋管誤整列	有 ($p < 0.01$)	有 ($p < 0.01$)	無	有
分岐及び線維分割	有 ($p < 0.001$)	有 ($p < 0.001$)	無	未決定
筋核の増加	無	無	有 ($p < 0.05$)	未決定
筋核のずれ (集群化)	無	無	有 ($p < 0.05$)	未決定
心左心室壁の肥厚	有 (最小限)	有 (最小限)	有	未決定
心房-小柱欠陥	有、短くて太い	有、短くて太い	有、長くてかぎ形	未決定
増殖	過剰増殖 (E11.5以降) $p < 0.01$	過剰増殖 (E11.5以降) $p < 0.01$	過剰増殖 (E15.5以降) $p < 0.01$	未決定
アポトーシス	E11.5以降上昇、 $p < 0.01$	E11.5以降上昇、 $p < 0.01$	E15.5以降上昇、 $p < 0.01$	未決定
Pax-7+細胞喪失	有 (+)	有 (+)	有 (++)	有 (+++)
総pax-7タンパク質 (WB)	15%低減 (E15.5) $p < 0.05$	15%低減 (E15.5) $p < 0.05$	60%低減 (E15.5) $p < 0.05$	未決定
発生遅延	有	有	無	有
FMyHC+筋管の%増加	有	有	無 (低減)	有
総FMyHCタンパク質 (WB)	増加 (統計的に有意、 $p < 0.01$)	増加 (統計的に有意、 $p < 0.01$)	減少 (統計的に有意、 $p < 0.05$)	未決定
総カベオリン3タンパク質	1.3~10倍増、 $p < 0.05$	1.3~10倍増、 $p < 0.05$	非存在	E15.5で低減 (50%)
発生遅延	有 (E13.5)	有 (E13.5)	該当しない	未決定

10

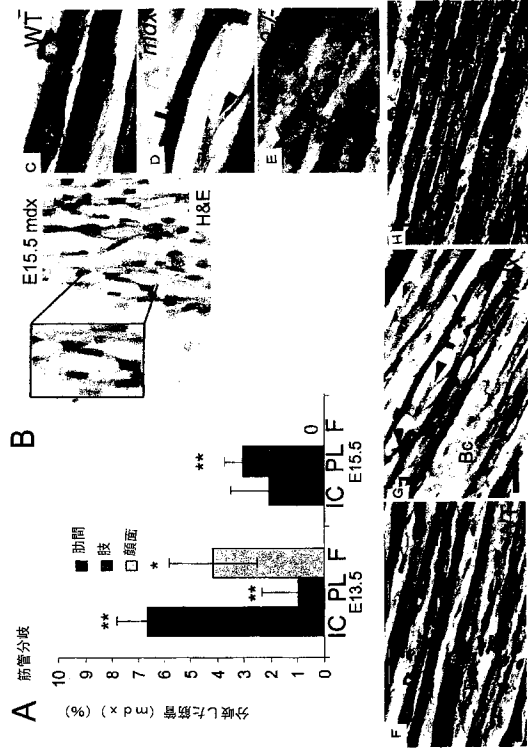
20

30

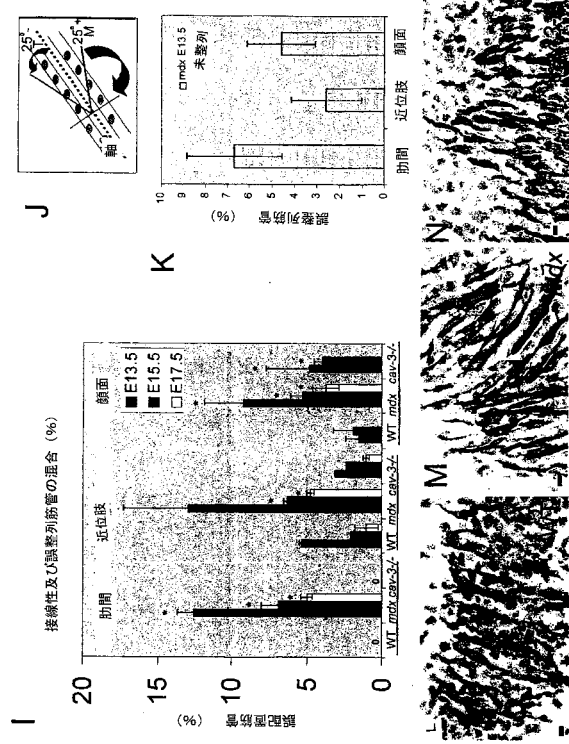
40

50

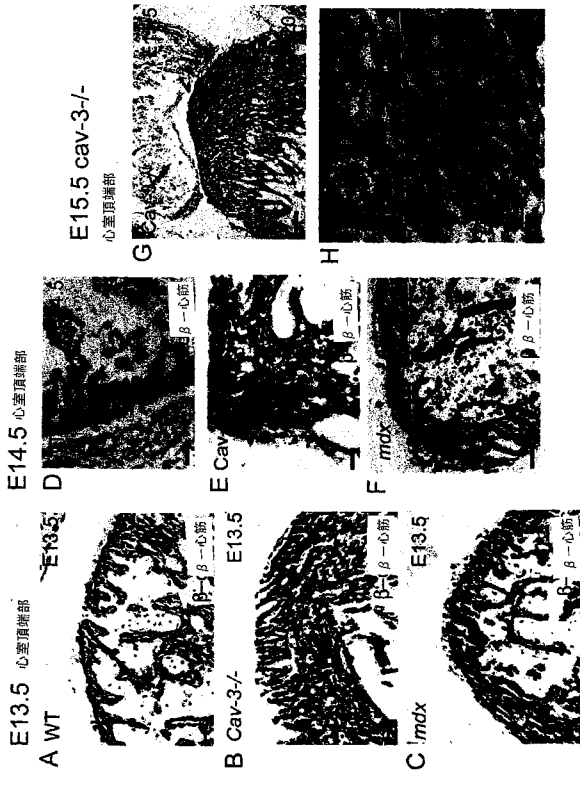
【図 1 - 1】



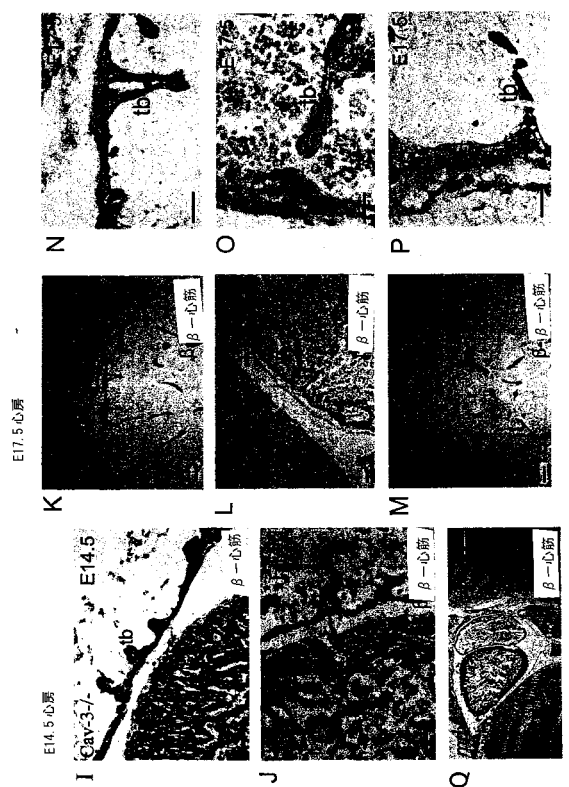
【図 1 - 2】



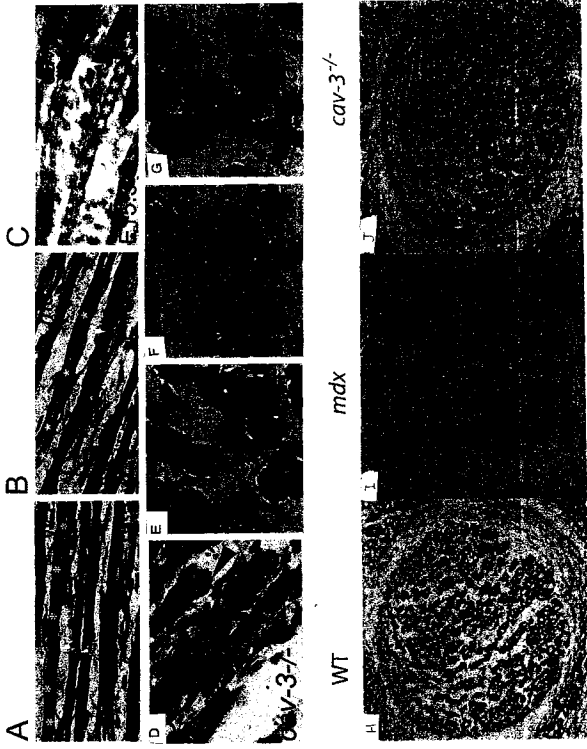
【図 2 - 1】



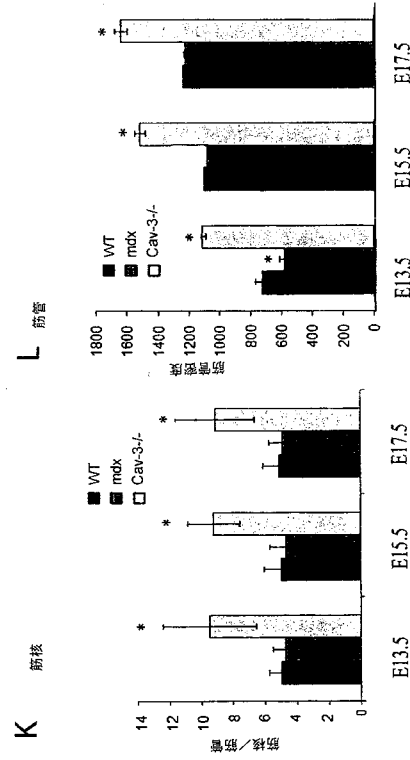
【図 2 - 2】



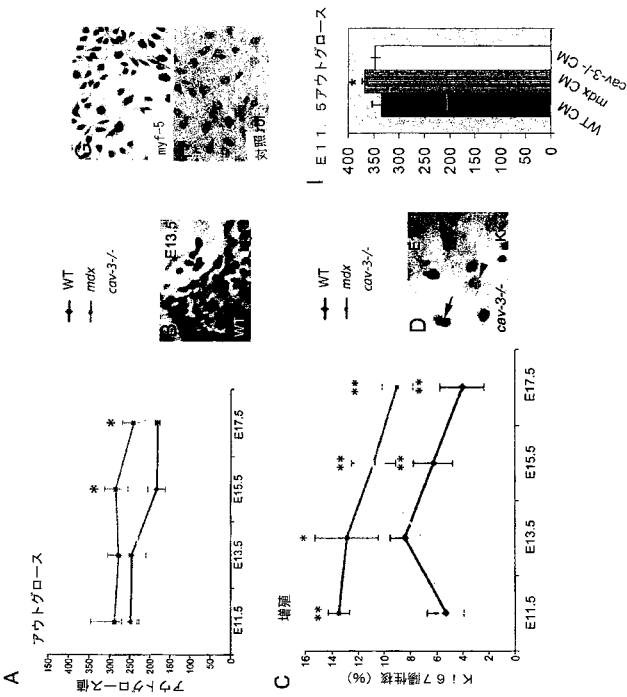
【図 3 - 1】



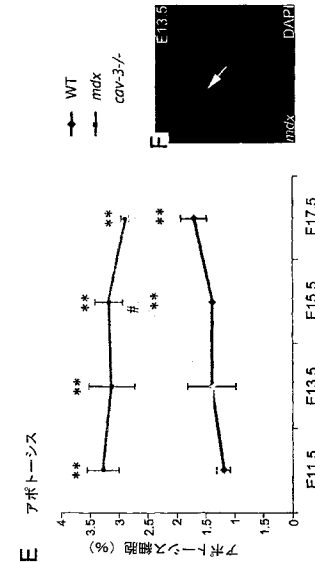
【図 3 - 2】



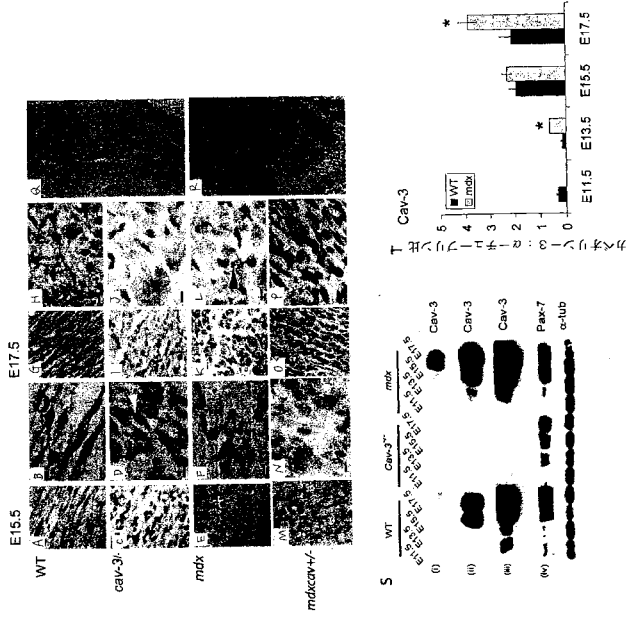
【図 4 - 1】



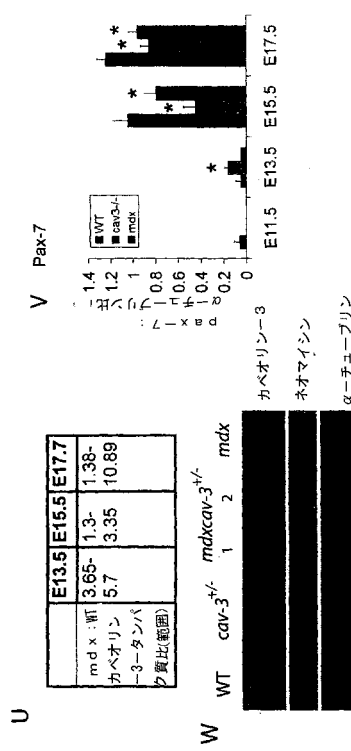
【図 4 - 2】



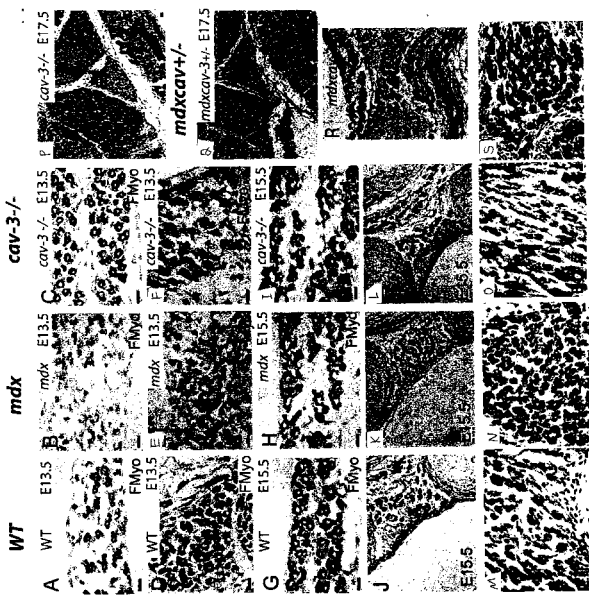
【 図 5 - 1 】



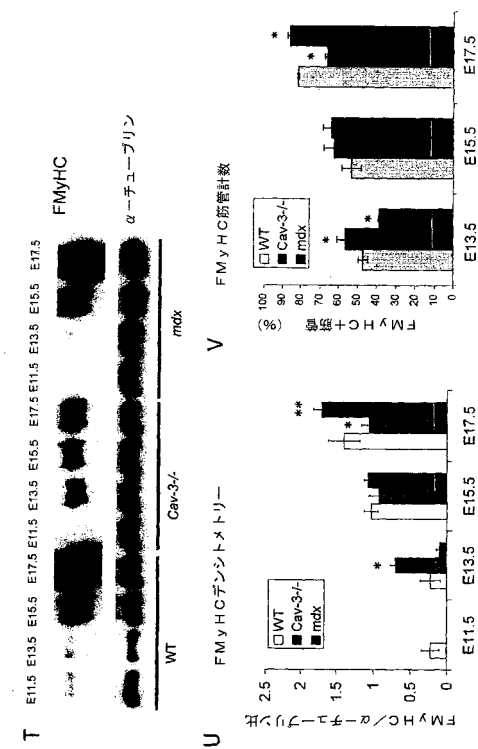
【 図 5 - 2 】



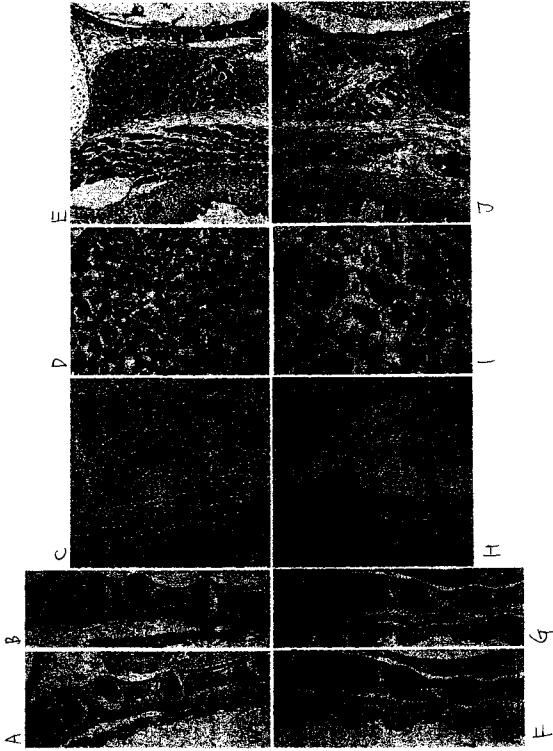
【 図 6 - 1 】



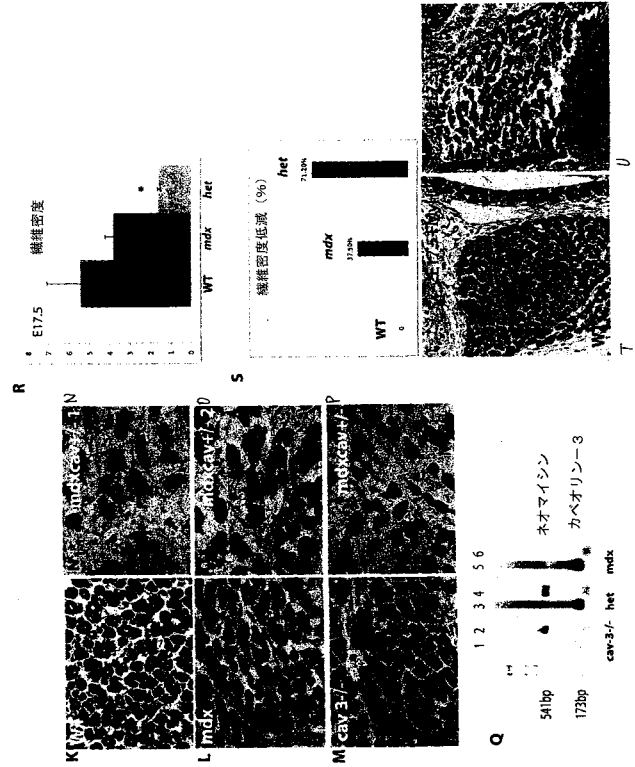
【 図 6 - 2 】



【 図 7 - 1 】



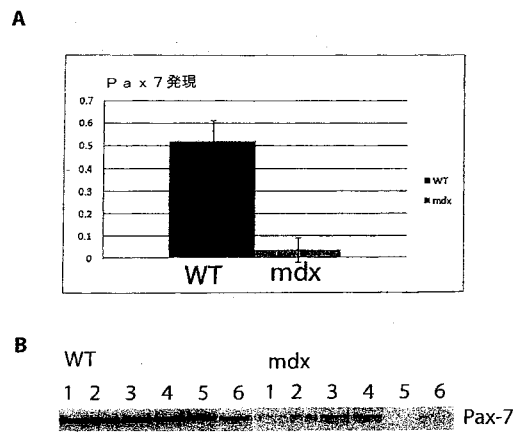
【 図 7 - 2 】



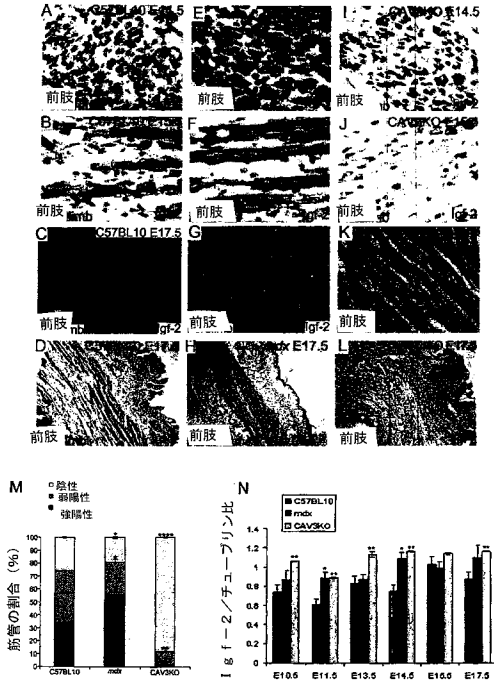
【 図 8 】



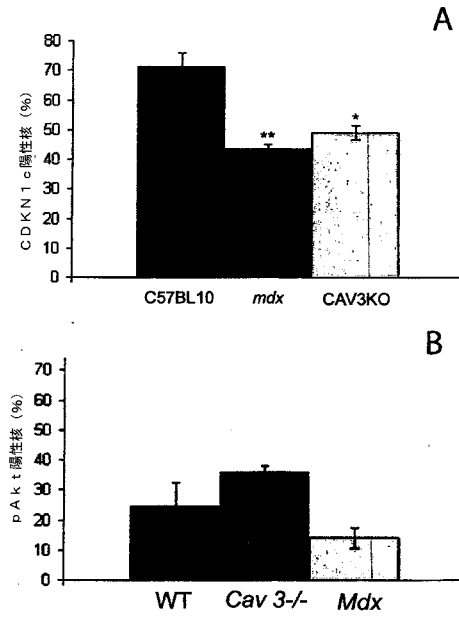
【 図 9 】



【 図 1 0 】

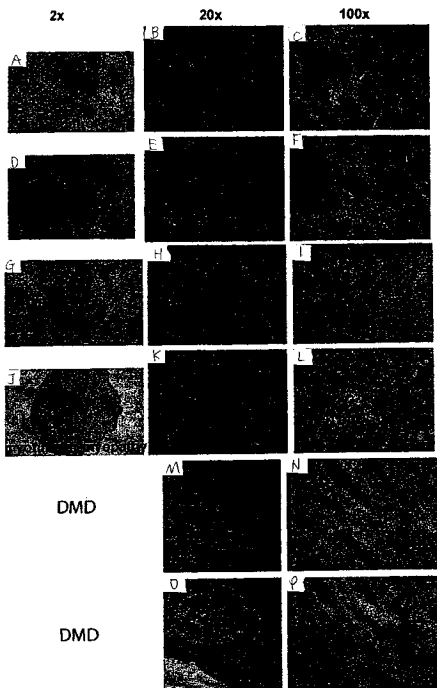


【 図 1 1 】



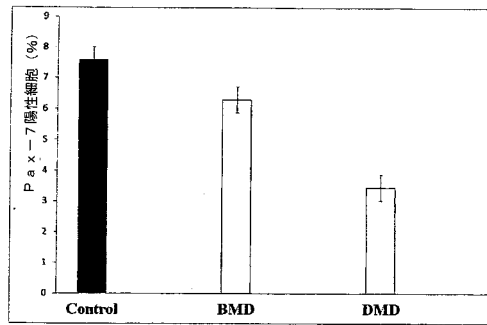
【 図 1 2 】

ヒト骨格DMD生検におけるPax-7筋芽細胞の枯渇



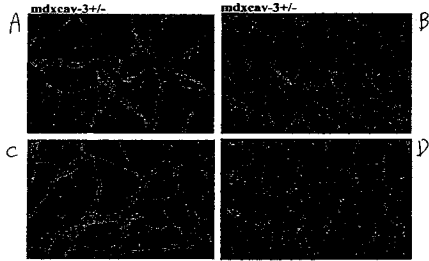
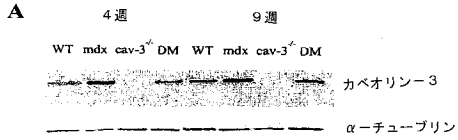
【 図 1 3 】

対照と比較した、ヒトDMD及びBMDにおけるPax-7筋芽細胞の枯渇を示すグラフ



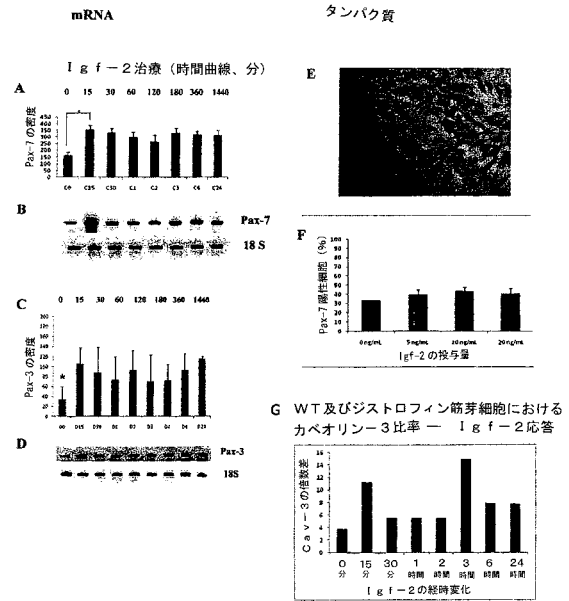
対照と比較した、ヒトDMD及びBMDにおけるPax-7筋芽細胞の枯渇を示すグラフ BMD及びDMDはいずれも、1%の有意水準で、対照と比較してPax-7筋芽細胞を有意に枯渇する (p<0.01, n=25)。エラーバーは、標準偏差を示した。

【 図 1 4 】



DMは二重ヘテロ接合性突然変異体 (mdx cav-3+/-) である。

【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

[2012525576000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2010/000874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 A61K48/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK YOUNG-EUN ET AL: "Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B." NEUROMUSCULAR DISORDERS : NMD JAN 2009 LNKD- PUBMED:19070492, vol. 19, no. 1, January 2009 (2009-01), pages 29-36, XP25927857 ISSN: 0960-8966	1,2, 6-10,15, 17
Y	abstract; p.33, col.1, par.4 ----- -/--	5,11,12, 16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 September 2010		Date of mailing of the international search report 16/09/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, Paolo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2010/000874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GALBIATI FERRUCCIO ET AL: "Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, vol. 7, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 435-441, XP002588843 ISSN: 1471-4914	1,3
Y	p.436, col.2, par.3-p.437, col.1, par.2; p.438, col.2, par.4-p.439, col.1, par.1; fig.3	11-13
X	KUNKEL L: "Caveolin-3 deficiency as a cause of limb-girdle muscular dystrophy." JOURNAL OF CHILD NEUROLOGY JAN 1999 LNKD- PUBMED:10223848, vol. 14, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 33-34, XP009138367 ISSN: 0883-0738	1,3, 18-20
Y	the whole document	11-13
X	WO 2009/031842 A1 (UNIV IND & ACAD COLLABORATION [KR]; KO YOUNG-GYU [KR]; YI JAE-SUNG [KR] 12 March 2009 (2009-03-12) p.15, par.2	11-13
X	US 2007/244067 A1 (BUDKER VLADIMIR G [US] ET AL) 18 October 2007 (2007-10-18) claims 1, 7, 10	18-20
Y	PETER A K ET AL: "Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.YEXCR.2006.04.024, vol. 312, no. 13, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 2580-2591, XP024945143 ISSN: 0014-4827 [retrieved on 2006-08-01] p.2583, col.2, par.3	5
Y	SUZUKI N ET AL: "Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL)" NEUROSCIENCE RESEARCH, ELSEVIER, SHANNON, IR LNKD- DOI:10.1016/J.NEURES.2005.01.006, vol. 52, no. 1, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 47-60, XP004823735 ISSN: 0168-0102 * abstract	16
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2010/000874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MERRICK DEBORAH ET AL: "Muscular dystrophy begins early in embryonic development deriving from stem cell loss and disrupted skeletal muscle formation." DISEASE MODELS & MECHANISMS 2009 JUL-AUG LNKD- PUBMED:19535499, vol. 2, no. 7-8, July 2009 (2009-07), pages 374-388, XP009135246 ISSN: 1754-8411 table 1	1-3, 5-13, 15-20
A	US 5 308 752 A (CAMPBELL KEVIN P [US] ET AL) 3 May 1994 (1994-05-03) claim 1	1
A	WO 97/33173 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 12 September 1997 (1997-09-12) claim 1	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2010/000874**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
2, 3, 12, 13, 15, 18-20(completely); 1, 5-11, 16, 17(partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2010/000874

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 12, 15(completely); 1, 5-11, 16, 17(partially)

Method for identifying an individual exhibiting symptoms of, monitoring the treatment of or progression of, or having a propensity to develop muscular dystrophy, comprising determining the level of expression in a tissue sample from the individual of pax-7. Kit comprising antibodies or pairs of PCR primers specific for pax-7 and caveolin-3 or fast-myosin. Kit comprising an antibody specific for pax-7 protein and formaldehyde.

2. claims: 3, 13, 18-20(completely); 1, 5-11, 16, 17(partially)

Method for identifying an individual exhibiting symptoms of, monitoring the treatment of or progression of, or having a propensity to develop muscular dystrophy, comprising determining the level of expression in a tissue sample from the individual of caveolin-3. Kit comprising antibodies or pairs of PCR primers specific for caveolin-3 and pax-7 or fast-myosin. Medical uses of caveolin-3.

3. claims: 4, 14(completely); 1, 5-11, 16, 17(partially)

Method for identifying an individual exhibiting symptoms of, monitoring the treatment of or progression of, or having a propensity to develop muscular dystrophy, comprising determining the level of expression in a tissue sample from the individual of fast-myosin. Kit comprising antibodies or pairs of PCR primers specific for fast-myosin and pax-7 or caveolin-3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2010/000874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009031842 A1	12-03-2009	EP 2185174 A1 KR 20090024656 A KR 20100077160 A	19-05-2010 09-03-2009 07-07-2010
US 2007244067 A1	18-10-2007	NONE	
US 5308752 A	03-05-1994	US 5449616 A	12-09-1995
WO 9733173 A1	12-09-1997	AU 2208097 A	22-09-1997

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, S I, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, I N, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM , PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 スミス, ジャネット
 イギリス バーミンガム B 2 9 7 H U セリー パーク サーペンタイン ロード 1 9

(72) 発明者 メリック, デボラ
 イギリス ノッティンガム N G 9 4 F F チルウェル リンキン ロード 3

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36
 4B024 AA11 BA80 CA09 CA12 HA12
 4B063 QA19 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48 QR55 QR62
 QS15 QS25 QS33 QS34 QX02
 4C084 AA02 AA03 BA44 CA18 NA14 ZA942

专利名称(译)	诊断和治疗肌营养不良症的方法		
公开(公告)号	JP2012525576A	公开(公告)日	2012-10-22
申请号	JP2012507815	申请日	2010-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	伯明翰大学		
申请(专利权)人(译)	伯明翰大学		
[标]发明人	スミスジャネット メリックデボラ		
发明人	スミス, ジャネット メリック, デボラ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/68 A61K38/00 A61P21/04 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/177 A61P21/04 G01N33/6893 G01N2800/2878 G01N2800/2885		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D C12Q1/68.A A61K37/02 A61P21/04 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA942		
代理人(译)	川口义行		
优先权	2009007516 2009-04-30 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是鉴定表现出肌营养不良症状的个体或具有发展肌营养不良倾向的个体的方法，包括pax-7，caveolin-3和/或来自个体的组织样品。或描述了一种方法，包括测定选自快肌肌球蛋白的一种或多种蛋白质的表达水平。还要求保护的是使用caveolin-3治疗肌营养不良症，以及使用含有该化合物的组合物。

p a x 7

ステップ番号	温度 (°C)	時間 (分)
1	94	3
2	56	1
3	72	1
4	94	0.5
5	56	1
6	72	1
7	ステップ4へ行く、35回	
8	72	5
9	4	使用するまで