

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する

治療に関する基盤的研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成 13 年 (2001) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基盤的研究	----- 1
武田 伸一	
II. 分担研究報告	
1. 骨格筋細胞系譜幹細胞と筋再生	----- 7
武田 伸一	
2. 幹細胞の操作技術の確立に関する研究	----- 10
西野 一三	
3. 幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基礎研究	----- 12
加茂 功	
4. 幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基盤的研究	----- 14
鎌倉 恵子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 20

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基盤的研究

主任研究者	武田 伸一	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長
分担研究者	西野 一三	国立精神・神経センター 神経研究所 微細構造研究部 室長
	加茂 功	国立精神・神経センター 神経研究所 微細構造研究部 室長
	鎌倉 恵子	防衛医科大学第3内科

研究要旨

1. Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入マウスから骨格筋細胞あるいは胎児肝細胞を得て、放射線照射マウスもしくは新生児期マウスに投与した結果、再生筋では GFP 陽性の筋線維が検出され、一方、非再生筋では GFP 陽性の筋衛星細胞と考えられる細胞が検出された。
2. cDNA マクローレイを用いて筋再生過程を解析した結果、再生初期に macrophage 由来と考えられる Osteopontin の発現が劇的に高まることを見出した。
3. ラット骨髄由来筋幹細胞を Balb/c マウスに頻回免疫し、ハイブリドーマのクローンを3種樹立した。
4. 筋変性が認められる様々な筋疾患側の免疫組織学的な評価を行い、desmin の蓄積が認められた Danon 病において、LAMP-2 の欠損が見出された。
5. 末梢神経切断後の組織像を、GAP-43 の発現、電顕像を中心に詳細に検討したところ、NGF 髄腔内投与群では軸索再生が抑制された。

A. 研究目的

X染色体劣性の遺伝形式をとり、重症の遺伝病である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、発症頻度が高いが (出生男児 3,500 人に1人)、母体の卵細胞における突然変異が多い (発症者の約3分の1) ため、遺伝相談が必ずしも有効ではない。患者家族団体から根本的治療について、強い要請がある他、社会的にもその実現が待ち望まれている。治療の見通しが立つことは、DMD 患者・家族のみならず遺伝性神経筋疾患・患者全体に大きな希望を与え福音となる。

現在もっとも注目されている方法論の一つが、骨髄および骨格筋に見い出された中胚葉系の幹細胞を用いた治療である。胚性幹細胞 (ES cell) 研究の進展を前提として、再生医学を視野においた研究の進歩は著しいが、中胚葉系の幹細胞を DMD の治療に用いることの最大の利点は経静脈性の投与により、全身の骨格筋に幹細胞導入が可能点にある。但し、この分野の研究は開始されたばかりで、ジストロフィンを欠損した *mdx* マウスに、

正常のジストロフィン遺伝子を持つ幹細胞を移植しても、ジストロフィン陽性細胞の出現率は低く、治療域には達していない。従って、筋細胞系譜および筋再生に関する研究の集積を背景として、幹細胞の増殖と分化及び移植の操作技術に関する研究を進め、DMD の根治的治療法の開発に結び付けることが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入マウスから骨髄細胞あるいは胎児肝細胞を得て、放射線照射マウスもしくは新生児期マウスに投与した。次に一側の前脛骨筋については、再生刺激を行い、その後再生側、非再生側について組織学的な観察を行った。また、同筋からコラギナーゼ処理により単一筋線維を得て、培養に移し、筋衛星細胞の増殖・分化について検討した。
2. Cardiotoxin を用いた筋再生を惹起し、その24時間、48時間、96時間後の同側及び対側から total RNA 分画を得て、polyA 分画を精

製し、cDNA macro array (サイトカイン用) を用いて発現の増減する遺伝子に関する検討を行った。

3. ラット骨髄由来筋幹細胞を Balb/c マウスに頻回免疫し、この動物から脾臓を摘出し、さらに抗原細胞と4日間共培養し、マウスミエローマ細胞と定法通り融合し、効率良くハイブリドーマを樹立。クローン化は免疫細胞を標的とした ELISA 法により行った。分化増殖因子のアッセイは骨髄系継代細胞を標的に行った。
4. 筋変性が見られる様々な例の凍結筋標本を用いて、desmin に対する免疫組織学的な評価を行った。国立精神・神経センターにおいて筋病理診断が施行された例で、研究使用の承諾を得たもののみを対象とした。承諾書は国立精神・神経センター倫理委員会で承認を得たものを使用した。
5. 末梢神経再生に対する NGF の効果
12 週-13 週の Wistar rat で坐骨神経切断を行った。坐骨神経切断 2 日前より、くも膜下腔へ浸透圧ポンプにより NGF を持続的に投与した。対照は NGF 非投与群 (人工髄液投与群) と投与群の切断対側とした。切断端近位部、後根神経節、脊髄後角での growth associated protein-43 (GAP-43) 発現を経時的に検討した。GAP-43 は軸索再生の指標となるといわれ、抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また断端での再生神経の無髓神経線維数、有髓神経 thin myelinated fiber 数および電顕による形態を NGF 投与群と非投与群で比較検討した。

C. 研究成果

1. 10Gy の放射線を照射した *mdx* マウスに GFP 遺伝子導入マウス骨髄細胞を移入し、12 週後に再生側の骨格筋を精査したところ、標識タンパク質 GFP を発現する筋線維が検出できた。またこれらの多くがジストロフィン陽性であったことから、ドナー細胞が筋再生に参加していることが証明できた。一方、新生児マウスに GFP マウス骨髄細胞あるいは胎児肝細胞を投与したキメラマウスでも、再生側からは GFP 陽性の筋線維が検出できた。

投与した細胞数が、放射線キメラマウスの場合の 1/10~1/200 しかなくても、同程度の筋再生が認められた。一方、非再生側では筋線維に接して、小型の GFP 陽性細胞が観察された。ラミニンとの二重染色では基底膜下に存在しており、従って筋衛星細胞であると考えられた。同細胞が筋衛星細胞であることを確認するために、単一筋線維培養法を試みた。その結果、筋線維に接するように、デスミン陽性でかつ GFP 陽性の単核細胞が検出された。

2. 再生筋を用いた cDNA マクロアレイによる検討では Cardiotoxin 注入後 48 時間の検討で、対側に比べて、発現量が著しく増大している遺伝子として、Osteopontin, macrophage inflammatory protein-1 γ , Oncostatin M などと同定した。一方、Engrailed-2, GDF-1 などについては逆に再生途上筋で発現に減少が見られた。また、予想に反して、IGF-1, IGF-1R, LIF, LIFR, HGF には発現の増減は見られなかった。
3. 現在のところラット骨髄筋幹細胞と反応するクローンを3種樹立したが、さらに他細胞種、他動物種との反応特異性をパネルを作製し、検討するためクローン数を増やして検討している。また、胸腺由来の筋幹細胞は新規造血因子を含め、多種のサイトカインを産生するが、骨髄由来筋幹細胞も骨髄系細胞の分化増殖性因子を産生しており、新規因子の可能性をふくめその同定を行っている。
4. 一部の再生線維で desmin の発現が認められるだけでなく、cytoplasmic body, spheroid body, rimmed vacuole の周辺などに局所的に desmin の蓄積が認められた。また、desmin の蓄積が認められた Danon 病において、リソソーム膜蛋白である LAMP-2 の欠損が見出された。
5. 神経切断後の末梢神経切断近位側、後根神経節、後角での GAP-43 の発現は NGF を髄腔内へ投与した場合、非投与群に比べ低下していた。つまり初期 7 日間軸索再生は抑制された。また再生時は無髓神経線維、有髓繊維 thin-myelinate fiber が増加するが、これらの数も NGF 投与群では非投与群より少なか

った。これは電顕による形態学的観察からも証明された。

D. 考察

1. 放射線照射キメラマウスと新生児キメラマウスでの、筋再生へのドナー細胞の参加効率を比較したところ、いずれの場合も GFP 陽性筋はたかだか 1%程度でしかなく、現時点では決して効率のよい手法とはいえない。しかし定着した細胞の数から考えて、新生児キメラマウスの方が圧倒的に効率が良いことがわかった。一方、骨格筋細胞系譜の幹細胞が非再生期の骨格筋で、筋衛星細胞として分布することを強く示唆する結果を得た。今後、ドナー細胞中の筋前駆細胞を選択的に濃縮するか、あるいは筋へのリクルートを良くする手法の開発が必要である。前者に関しては、FACS と Hoechst dye を用いて単離可能な Side Population (SP) cell の利用が考えられる。後者に関しては筋再生刺激が最も重要と考えられる。
2. 筋再生の過程で発現の増減する遺伝子を cDNA マクロアレイを用いて検出しようとする試みは、骨格筋細胞系譜の幹細胞の骨格筋へのリクルートに役立つ可能性がある。筋再生の初期に発現が急増する因子として今回我々が見出された Osteopontin はこれまで一度も筋再生との関わりが注目されたことはない。しかし、macrophage が産生する分子であって、これが筋芽細胞の増殖あるいは幹細胞のリクルートに関与している可能性がある。
3. これまで、ラット骨髄由来筋芽細胞の継代可能なクローンを樹立した。さらに、この細胞に対するモノクローナル抗体を樹立し、筋の幹細胞固有の新規分化抗原の解析を行っている。また、骨髄の筋幹細胞は他のストロマ細胞、血球系の細胞と相互作用をし、骨髄を構築していると考えられるので、骨髄ネットワークの一員としての固有サイトカイン産生の可能性の解析している。
4. desmin は、様々な筋変性状態を反映して、発現が誘導され、局所的な蓄積を認める。desmin の蓄積を認める Danon 病では、

LAMP-2 欠損が原因であることが明らかとなった。ただし、これが筋変性に伴う再生現象の一部なのか、筋変性に伴う別の発現誘導経路が存在するのかは、今後の検討を要する。Danon 病は desmin の蓄積が認められる筋疾患の一つであるが、LAMP-2 欠損が認められることに加えて、別のグループにより作成された LAMP-2 欠損マウスで Danon 病と同様の病理学的変化を認めることから、LAMP-2 欠損が Danon 病の原因であると考えられた。

5. 末梢神経切断モデルで軸索再生は髄腔内 NGF 投与群では初期、対照群に比べ抑制された。通常切断後、障害部位で NGF は増加するが逆行性に中枢である後根神経節細胞へ運ばれる NGF は減少し、その信号をうけて GAP-43 は神経節細胞で増加する。そこから供給される切断端、後角でも GAP-43 は増加するが、髄腔内 NGF 投与群では GAP-43 発現はいずれでも抑制された。末梢での切断による信号が神経細胞付近での NGF 投与により修飾されたと考えた。我々の実験系は NGF の神経細胞以外の細胞への影響は除外できる系である。障害部位（末梢神経断端）で増加する NGF は再生を促すのに、神経細胞への信号より Schwann 細胞への信号が重要と思われる。Schwann 細胞の NGF 受容体 p75 を介して Schwann 細胞が動員され髄鞘形成、再生といった過程をとると推測される。

E. 結論

1. 骨格筋細胞系譜の幹細胞は筋衛星細胞の型で骨格筋に取り込まれた後、筋再生刺激の下で、再生現象に参加する。
2. 骨格筋再生の初期過程で macrophage 由来の osteopontin の発現が飛躍的に高まる。
3. ラット骨髄由来筋幹細胞と反応するクローンを 3 種樹立した。
4. desmin 蓄積が認められる Danon 病について LAMP-2 欠損を見出した。
5. 末梢神経切断モデルにおける軸索再生は、NGF 投与により抑制される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Miyagoe-Suzuki Y, Nakagawa M and Takeda S :
Merosin and congenital muscular dystrophy
Microsc Res Tech 48: 181-191, 2000
2. Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K,
Kameya S, Shibuya S, Matsuda R, Wakayama Y,
Takeda S :
Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at
perivascular astrocyte endfeet in α 1-syntrophin
knockout mice
Proc. Japan Acad 76, Ser.B No.2 22-27, 2000.
3. Yamamoto K, Yuasa K, Miyagoe Y, Hosaka Y,
Tsukita K, Yamamoto H, Nabeshima Y, and
Takeda S :
Immune response to adenoviral-delivered antigens
upregulates utrophin, and results in mitigation of
muscle pathology in mdx mice
Hum Gene Ther 11: 669-680, 2000
4. Takeda S :
Gene Therapy of Muscular Dystrophy, Reality and
Dream
Neuroscience News 3(1) : 51-56, 2000
5. Iwao M, Fukada S-I, Tsujikawa K, Yagita H,
Miyagoe Y, Takeda S, and Yamamoto H :
Thymic atrophy in laminin-alpha-2 chain deficient
mice is a result of selective death of CD4+8+
immature thymocytes.
Immunology 99: 481-488, 2000.
6. Takeda S:
Gene Therapy for Muscular Dystrophies.
BioDrugs (in press)
7. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C,
Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I,
Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K:
Space shuttle flight (STS-90) enhances
degradation of rat myosin heavy chain by
stimulating ubiquitin-dependent proteolysis.
FASEB J (in press)
8. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:
Thymic myoid cells induce myasthenia and
hyperplasia
Cell Biol. Internat. 24: 932-932, 2000
9. Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.:
Study on physiological roles of two novel
haemopoietic factors
Cell Biol. Internat. 24: 940-940, 2000
10. Nonaka, I., Iwakami, N. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan produced by brain cells
stimulates growth of microglial cells
J. Neuroimmunology 106: 78-86, 2000
11. Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M,
Nonaka I, Nishino I:
Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct
from Danon disease. Neurology (in press)
12. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M:
MNGIE : from nuclear DNA to mitochondrial
DNA.
Neuromuscul Disord 11:7-10, 2001
13. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S,
Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue
CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S,
Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano
M:
Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked
vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon
disease).
Nature 406:906-910, 2000
14. Amemiya S, Hamamoto M, Goto Y, Komaki H,
Nishino I, Nonaka I, Katayama Y:
Psychosis and progressing dementia: presenting
features of a mitochondriopathy.
Neurology 55: 600-601, 2000
15. Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A,
Hammans S, Steiner I, Hahn CD, Connolly AM,
Verloes A, Guimarães J, Maillard I, Hamano H,
Donati MA, Semrad CE, Russell JA, Andreu AL,
Hadjigeorgiou GM, Vu TH, Tadesse S, Nygaard
TG, Nonaka I, Hirano I, Bonilla E, Rowland LP,
DiMauro S, Hirano M:
MNGIE: an autosomal recessive disorder due to
thymidine phosphorylase mutations.
Ann Neurol 47:792-800, 2000
16. Masaki T, Matsumura K, Saito F, Sunada Y,

- Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K. Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration.
Acta Neuropathol 99: 289-295, 2000.
17. Masaki T, Matsumura K, Hirata A, Yamada H, Hase A, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K.
Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia.
Acta Neuropathol. 101:174-178, 2001.
18. Hirata A, Masaki T, Motoyoshi K, Kamakura K.
Intrathecal administration of nerve growth factor delays Gap-43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve.
On submission.
19. Masaki T, Matsumura K, Hirata A, Yamada H, Hase A, Arai K, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K.
Expression of dystroglycan and laminin-- α 2 chain in rat peripheral nerve during development.
On submission
- < 和 文 >
1. 武田伸一, 湯浅勝敏 :
筋疾患の遺伝子治療－Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に－
神経研究の進歩 44: 305-316, 2000
2. 武田伸一, 保坂幸夫 :
筋ジストロフィーのモデル犬
医学の歩み 193(8): 708-709, 2000
3. 武田伸一 :
骨格筋幹細胞と筋再生
BIOclinica 15 (6): 340-344, 2000
4. 武田伸一 :
筋ジストロフィーの遺伝子治療研究の現状
Clinical Neuroscience 18(6): 728-729, 2000
5. 猪部 学, 武田伸一 :
上皮増殖因子 (EGF)
蛋白質 核酸 酵素 45(13): 2116-2122, 2000
6. 武田伸一, 横田俊文 :
筋：裏打ちタンパク
生体の科学 51(5): 394, 2000
7. 武田伸一, 横田俊文 :
骨格筋：発生
生体の科学 51(5): 455-456, 2000
8. 宮越友子, 武田伸一 :
筋衛星 (サテライト) 細胞と遺伝子性筋疾患の遺伝子治療
神経研究の進歩 45: 54-62, 2001
9. 武田伸一 :
ポストゲノム医療の展望：総論
神経疾患
日本臨床 59: 19-30, 2001
10. 武田伸一, 坂本美喜
筋ジストロフィーに対する治療研究の進展
内科 87: 744-745, 2001
- II. 学会発表
1. Hosaka, Y., Miyagoe, Y., Yokota, T. and Takeda, S. :
Skeletal muscle of α 1-syntrophin knockout mice exhibits significant hypertrophy during regeneration.
Keystone Symposia. Keystone, USA; February 3-9, 2000
2. Yokota, T., Miyagoe, Y., Hosaka, Y., Tsukita, K., Kameya, S., Shibuya, S., Matsuda, R., Wakayama, Y. and Takeda, S. :
Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in α 1-syntrophin knockout mice. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000
3. Suzuki, Y., Leinwand, L. and Takeda, S. :
Myosin heavy chain isoforms are not major determinant of muscle regeneration in laminin alpha 2 chain-null mice. Molecular Biology of Muscle Development and Disease. Asilomar, California, USA; May 21-26, 2000
4. Ikezoe, K., Nakagawa, M., Suzuki, Y., Nonaka, I. and Takeda, S. :
Apoptotic cell death in regenerating process follows massive necrotic change

in early postnatal period of dy3K/dy3K (null mutant for laminin alpha 2 chain) skeletal muscle. Molecular Biology of Muscle Development and Disease. Asilomar, California, USA; May 21-26, 2000

5. 保坂幸男、鈴木（宮越）友子、横田俊文、武田伸一：
骨格筋形質膜における nNOS 発現の消失は筋再生過程の異常を招く 第 41 回日本神経学会総会 松本； 2000 年 5 月 24-26 日
6. 濑谷誠二、若山吉弘、村橋真、小嶋宏子、鬼木弘明、武田伸一：
 $\alpha 1$ -シントロフィンノックアウトマウス生後早期における骨格筋細胞膜 orthogonal array 密度 第 41 回日本神経学会総会 松本； 2000 年 5 月 24-26 日
7. 武田伸一、鈴木友子、甲斐和子：
Single fiber 法を用いた筋衛星細胞の増殖と分化の検討 厚生省遺伝子性筋疾患の根本治療への基盤研究班会議 東京； 2000 年 12 月 5 日
8. 横田俊文、保坂幸男、鈴木（宮越）友子、松田良一、武田伸一：
 $\alpha 1$ シントロフィンノックアウトマウス骨格筋の生理学的特性とその分子生物学的背景の解析 第 23 回日本分子生物学会年会 神戸； 2000 年 12 月 13-16 日
9. 真先敏弘、平田彰、鎌倉恵子、松村喜一郎：
Schwann 細胞発生・分化過程における β -dystroglycan、laminin-2 の発現。
第 41 回日本神経学会総会、松本、2000

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

骨格筋細胞系譜幹細胞と筋再生

分担研究者 武田伸一 国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

1. Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入マウスから骨格筋細胞あるいは胎児肝細胞を得て、放射線照射マウスもしくは新生児期マウスに投与した結果、再生筋では GFP 陽性の筋線維が検出され、一方、非再生筋では GFP 陽性の筋衛星細胞と考えられる細胞が検出された。
2. cDNA マクロアレイを用いて筋再生過程を解析した結果、再生初期に macrophage 由来と考えられる Osteopontin の発現が劇的に高まることを見出した。

A. 研究目的

筋ジストロフィーに対して幹細胞移植治療を行うためには、筋細胞系譜の幹細胞の増殖と分化について知ると同時に、移植後の骨格筋における振る舞いを追究する必要がある。一方では、幹細胞が定着するにはホスト側の筋再生が必要である。従って、筋再生そのものについても分子基盤の解明を進める必要がある。

B. 研究方法

1. Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入マウスから骨髄細胞あるいは胎児肝細胞を得て、放射線照射マウスもしくは新生児期マウスに投与した。次に一侧の前脛骨筋については、再生刺激を行い、その後再生側、非再生側について組織学的な観察を行った。また、同筋からコラゲナーゼ処理により単一筋線維を得て、培養に移し、筋衛星細胞の増殖・分化について検討した。
2. Cardiotoxin を用いた筋ジストロフィー再生を惹起し、その 24 時間、48 時間、96 時間後の同側及び対側から total RNA 分画を得て、polyA 分画を精製し、cDNA macro array (サイトカイン用) を用いて発現の増減する遺伝子に関する検討を行った。

C. 研究成果

1. 10Gy の放射線を照射した mdx マウスに GFP マウス骨髄細胞を移入し、12 週後に再生側

の骨格筋を精査したところ、標識タンパク質 GFP を発現する筋線維が検出できた。またこれらの多くがジストロフィン陽性であったことから、ドナー細胞が筋再生に参加していることが証明できた。一方、新生児マウスに GFP マウス骨髄細胞あるいは胎児肝細胞を投与したキメラマウスでも、再生側からは GFP 陽性の筋線維が検出できた。投与した細胞数が、放射線キメラマウスの場合の 1/10 ~ 1/200 しかなくても、同程度の筋再生が認められた。一方、非再生側では筋線維に接して、小型の GFP 陽性細胞が観察された。ラミニンとの二重染色では基底膜下に存在しており、従って筋衛星細胞であると考えられた。同細胞が筋衛星細胞であることを確認するために、単一筋線維培養法を試みた。その結果、筋線維に接するように、デスミン陽性でかつ GFP 陽性の単核細胞が検出された。

2. 再生筋を用いた cDNA マクロアレイによる検討では Cardiotoxin 注入後 48 時間の検討で、対側に比べて、発現量が著しく増大している遺伝子として、Osteopontin, macrophage inflammatory protein-1 γ , Oncostatin M などと同定した。一方、Engrailed-2, GDF-1 などについては逆に再生途上筋で発現に減少が見られた。また、予想に反して、IGF-1, IGF-1R, LIF, LIFR, HGF には発現の増減は見られなかった。

D. 考察

1. 放射線照射キメラマウスと新生児キメラマウスでの、筋再生へのドナー細胞の参加効率を比較したところ、いずれの場合も GFP 陽性筋はたかだか 1%程度でしかなく、現時点では決して効率のよい手法とはいえない。しかし定着した細胞の数から考えて、新生児キメラマウスの方が圧倒的に効率が良いことがわかった。一方、骨格筋細胞系譜の幹細胞が非再生期の骨格筋で、筋衛星細胞として分布することを強く示唆する結果を得た。今後、ドナー細胞中の筋前駆細胞を選択的に濃縮するか、あるいは筋へのリクルートを良くする手法の開発が必要である。前者に関しては、FACS と Hoechst dye を用いて単離可能な Side Population (SP) cell の利用が考えられる。後者に関しては筋再生刺激が最も重要と考えられる。
2. 筋再生の過程で発現の増減する遺伝子を cDNA マクロアレイを用いて検出しようとする試みは、骨格筋細胞系譜の幹細胞の骨格筋へのリクルートに役立つ可能性がある。筋再生の初期に発現が急増する因子として今回我々が見出された Osteopontin はこれまで一度も筋再生との関わりが注目されたことはない。しかし、macrophage が産生する分子であって、これが筋芽細胞の増殖あるいは幹細胞のリクルートに関与している可能性がある。

E. 結論

1. 骨格筋細胞系譜の幹細胞は筋衛星細胞の型で骨格筋に取り込まれた後、筋再生刺激の下で、再生現象に参加する。
2. 骨格筋再生の初期過程で macrophage 由来の osteopontin の発現が飛躍的に高まる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Miyagoe-Suzuki Y, Nakagawa M and Takeda S :

Merosin and congenital muscular dystrophy

Microsc Res Tech 48: 181-191, 2000

2. Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Kameya S, Shibuya S, Matsuda R, Wakayama Y, Takeda S :

Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in α 1-syntrophin knockout mice

Proc. Japan Acad 76, Ser.B No.2 22-27, 2000.

3. Yamamoto K, Yuasa K, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Yamamoto H, Nabeshima Y, and Takeda S :

Immune response to adenoviral-delivered antigens upregulates utrophin, and results in mitigation of muscle pathology in mdx mice

Hum Gene Ther 11: 669-680, 2000

4. Takeda S :

Gene Therapy of Muscular Dystrophy, Reality and Dream

Neuroscience News 3(1) : 51-56, 2000

5. Iwao M, Fukada S-I, Tsujikawa K, Yagita H, Miyagoe Y, Takeda S, and Yamamoto H :

Thymic atrophy in laminin-alpha-2 chain deficient mice is a result of selective death of CD4+8+ immature thymocytes.

Immunology 99: 481-488, 2000.

6. Takeda S:

Gene Therapy for Muscular Dystrophies.

BioDrugs (in press)

7. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K:

Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain by stimulating ubiquitin-dependent proteolysis.

FASEB J (in press)

<和文>

1. 武田伸一、湯浅勝敏 :
筋疾患の遺伝子治療 - Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に -
神経研究の進歩 44: 305-316, 2000
2. 武田伸一、保坂幸夫 :
筋ジストロフィーのモデル犬
医学の歩み 193(8): 708-709, 2000

3. 武田伸一 :
骨格筋幹細胞と筋再生
BIOClinica 15 (6): 340-344, 2000
 4. 武田伸一 :
筋ジストロフィーの遺伝子治療研究の現状
Clinical Neuroscience 18(6): 728-729, 2000
 5. 猪部 学、武田伸一 :
上皮増殖因子 (EGF)
蛋白質 核酸 酵素 45(13): 2116-2122, 2000
 6. 武田伸一、横田俊文 :
筋：裏打ちタンパク
生体の科学 51(5) : 394, 2000
 7. 武田伸一、横田俊文 :
骨格筋：発生
生体の科学 51(5) : 455-456, 2000
 8. 宮越友子、武田伸一 :
筋衛星 (サテライト) 細胞と遺伝子性筋疾患
の遺伝子治療
神経研究の進歩 45: 54-62, 2001
 9. 武田伸一 :
ポストゲノム医療の展望：総論
神経疾患
日本臨床 59: 19-30, 2001
 10. 武田伸一、坂本美喜
筋ジストロフィーに対する治療研究の進展
内科 87: 744-745, 2001
- II. 学会発表
1. Hosaka, Y., Miyagoe, Y., Yokota, T. and Takeda, S. :
Skeletal muscle of $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice exhibits significant hypertrophy during regeneration. Keystone Symposia. Keystone, USA; February 3-9, 2000
 2. Yokota, T., Miyagoe, Y., Hosaka, Y., Tsukita, K., Kameya, S., Shibuya, S., Matsuda, R., Wakayama, Y. and Takeda, S. :
Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in $\alpha 1$ -syntrophin knockout mice. COE Symposium 2000. Tokyo, Mar. 14-16, 2000
 3. Suzuki, Y., Leinwand, L. and Takeda, S. :
Myosin heavy chain isoforms are not major determinant of muscle regeneration in laminin alpha 2 chain-null mice. Molecular Biology of Muscle Development and Disease. Asilomar, California, USA; May 21-26, 2000
 4. Ikezoe, K., Nakagawa, M., Suzuki, Y., Nonaka, I. and Takeda, S. :
Apoptotic cell death in regenerating process follows massive necrotic change in early postnatal period of dy3K/dy3K (null mutant for laminin alpha 2 chain) skeletal muscle. Molecular Biology of Muscle Development and Disease. Asilomar, California, USA; May 21-26, 2000
 5. 保坂幸男、鈴木 (宮越) 友子、横田俊文、武田伸一 :
骨格筋形質膜における nNOS 発現の消失は筋再生過程の異常を招く 第 41 回日本神経学会総会 松本; 2000 年 5 月 24-26 日
 6. 澁谷誠二、若山吉弘、村橋真、小嶋宏子、鬼木弘明、武田伸一 :
 $\alpha 1$ -シントロフィンノックアウトマウス生後早期における骨格筋細胞膜 orthogonal array 密度 第 41 回日本神経学会総会 松本; 2000 年 5 月 24-26 日
 7. 武田伸一、鈴木友子、甲斐和子 :
Single fiber 法を用いた筋衛星細胞の増殖と分化の検討 厚生省遺伝子性筋疾患の根本治療への基盤研究班会議 東京; 2000 年 12 月 5 日
 8. 横田俊文、保坂幸男、鈴木 (宮越) 友子、松田良一、武田伸一 :
 $\alpha 1$ シントロフィンノックアウトマウス骨格筋の生理学的特性とその分子生物学的背景の解析 第 23 回日本分子生物学会年会 神戸; 2000 年 12 月 13-16 日
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

幹細胞の操作技術の確立に関する研究

分担研究者 西野一三 国立精神神経センター 神経研究所
微細構造研究部 室長

研究要旨：筋細胞分化の重要なマーカーである desmin の発現を各種生検筋で検討した。再生線維で発現が見られるだけでなく、様々な変性状態で desmin の発現が増加していた。また、desmin の蓄積が見られる疾患の一つ Danon 病でリソソーム膜蛋白 LAMP-2 の欠損が見出され、本疾患が LAMP-2 欠損により起こることが明らかとなった。

A. 研究目的

幹細胞治療を行うに当たり、筋細胞の分化を押さえておくことは重要である。筋細胞分化の過程の中で、筋芽細胞期に desmin を一次的に発現することが知られており、有用なマーカーとなっている。そこで、desmin に注目し、骨格筋の変性が見られる様々な骨格筋標本を用いて、desmin の発現を調べた。

B. 研究方法

国立精神・神経センターにおいて筋病理診断が施行された例で、研究使用の承諾を得たもののみを対象とした。承諾書は国立精神・神経センター倫理委員会承認を得たものを使用した。筋変性が見られる様々な例の凍結筋標本を用いて、desmin に対する免疫組織学的な評価を行った。

C. 研究結果

一部の再生線維で desmin の発現が認められるだけでなく、cytoplasmic body、spheroid body、rimmed vacuole の周辺などに局所的に desmin の蓄積が認められた。また、desmin の蓄積が認められた Danon 病において、リソソーム膜蛋白である LAMP-2 の欠損が見出された。

D. 考察

desmin は、筋発生および再生の一時期に発現することが知られているが、それに加えて、様々な筋変性状態で出現することが明らかとなった。ただし、これが筋変性に伴う再生現象の一部なのか、筋変性に伴う別の発現誘導経路が存在するのかは、今後の検討を要す

る。Danon 病は、desmin の蓄積が認められる筋疾患の一つであるが、LAMP-2 欠損が認められることに加えて、別のグループにより作成された LAMP-2 欠損マウスで Danon 病と同様の病理学的変化を認めることから、LAMP-2 欠損が Danon 病の原因であると考えられた。

E. 結論

desmin は、様々な筋変性状態を反映して、発現が誘導され、局所的な蓄積を認める。desmin の蓄積を認める Danon 病では、LAMP-2 欠損が原因であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I: Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. Neurology (in press).
- 2) Nishino I, Spinazzola A, Hirano M: MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. Neuromuscul Disord 11:7-10, 2001.
- 3) Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M: Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon

- disease). *Nature* 406:906-910, 2000.
- 4) Amemiya S, Hamamoto M, Goto Y, Komaki H, Nishino I, Nonaka I, Katayama Y: Psychosis and progressing dementia: presenting features of a mitochondriopathy. *Neurology* 55: 600-601, 2000.
 - 5) Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A, Hammans S, Steiner I, Hahn CD, Connolly AM, Verloes A, Guimarães J, Maillard I, Hamano H, Donati MA, Semrad CE, Russell JA, Andreu AL, Hadjigeorgiou GM, Vu TH, Tadesse S, Nygaard TG, Nonaka I, Hirano I, Bonilla E, Rowland LP, DiMauro S, Hirano M: MNGIE: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann Neurol* 47:792-800, 2000.

2 学会発表

- 1) Nishino I: A puzzling lysosomal disease - Danon disease; LAMP is out. Third Egyptian-Japanese International Meeting; Muscle & Nerve 2001, Cairo, Egypt, 2/23/2001.
- 2) Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamamoto A, Shanske S, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M: Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). 50th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Philadelphia, PA, USA, 10/7/2000.
- 3) Nishino I, Fu J, Tanji K, Sue CM, Shanske S, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M: Primary LAMP-2 deficiency causes vacuolar cardiomyopathy, myopathy, and mental retardation (Danon's disease). 5th International Congress of World Muscle Society, Greenway Woods, South Africa, 6/29/2000.
- 4) Nishino I, Spinazzola A, Hirano M: Clinical features of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. 52nd Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Diego, CA, USA, 5/3/2000.
- 5) 斎藤陽子、西野一三、埜中征哉: Spheroid body myopathy は desmin-related myopathy なのか? 第42回日本神経学会総会にて発表予定.
- 6) 鈴木貴士, 中川雅裕, 山本綾香, 西野一三, 石浦章一, 吉森保, 大隅良典, 埜中征

哉: Apg8 ホモログ LC3 のヒト骨格筋における細胞局在. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12/13/2000.

- 7) 西野一三, Spinazzola A, 平野道雄: MNGIE の原因遺伝子. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5/25/2000.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基礎研究
(幹細胞の単離)

分担研究者 加茂 功 国立精神神経センター 神経研究所
微細構造研究部 室長

研究要旨： ラット骨髄より継代可能な筋分化能を有する筋の幹細胞のクローン化に成功している。筋-骨髄血球系細胞との相異や、骨髄-筋発生の分化過程を理解するため、本クローン化骨髄筋芽細胞に対するモノクローナル抗体を作成し、その解析を行い、併せて分化増殖機構に関する解析を行う。

A. 研究目的

骨髄や、胸腺は従来血球系の造血器官としてのみ注目されてきた。しかし、近年我々は、骨髄、胸腺には血球系以外にも筋細胞分化能を有する幹細胞が存在することを報告し、筋分化の観点から興味を持たれている。このような細胞はストロマ由来なのか、ストロマー血球系と共通のヘマンギオブラスの様な幹細胞から分化してくるのか、独自の分化経路をとるのか不明である。また、他種骨髄細胞にも類似の分化抗原を有する細胞が、筋の幹細胞として存在する事が考えられるので、本年度はヒトへの応用を含めて、この幹細胞の有効な検索子となる特異分化抗原に対するモノクローナル抗体を作成する。また、樹立した骨髄筋幹細胞にはストロマとしての性質を有するので産生する分化増殖因子の検討も行う。

B. 研究方法

ラット骨髄由来筋幹細胞を Balb/c マウスに頻回免疫し、この動物から脾臓を摘出し、さらに抗原細胞と4日間共培養し、マウスミエロマ細胞と定法通り融合し、効率良くハイブリドーマを樹立。クローン化は免疫細胞を標的とした ELISA 法により行った。分化増殖因子のアッセイは骨髄系継代細胞を標的に行った。

C. 研究結果

現在のところラット骨髄筋幹細胞と反応するクローンを3種樹立したが、さらに他細胞種、他動物種との反応特異性をパネルを作製

し、検討するためクローン数を増やして検討している。また、胸腺由来の筋幹細胞は新規造血因子を含め、多種のサイトカインを産生するが、骨髄由来筋幹細胞も骨髄系細胞の分化増殖性因子を産生しており、新規因子の可能性をふくめその同定を行っている。

D. 考察

血球系細胞の分化増殖器官である骨髄からクローン化した細胞は、既存の特徴ある CD 抗原の発現は認められていないが、自然融合し、アセチルコリン受容体を発現し、横紋形成能を有する。これらの特徴から、この細胞は筋細胞の幹細胞と考えられる。この様な筋分化能を有する細胞は、T細胞の増殖器官である胸腺にも認められ、重症筋無力症との関連が示唆されている。このような異所性の筋幹細胞の発生学的、生理的存在意義を追求する上でも分化抗原の研究は重要と考えられる。

E. 結論

これまで、ラット骨髄由来骨芽細胞の継代可能なクローンを樹立した。さらに、この細胞に対するモノクローナル抗体を樹立し、筋の幹細胞固有の新規分化抗原の解析を行っている。また、骨髄の筋幹細胞は他のストロマ細胞、血球系の細胞と相互作用をし、骨髄を構築していると考えられるので、骨髄ネットワークの一員としての固有サイトカイン産生の可能性の解析している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- ・ Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.
Thymic myoid cells induce myasthenia
and hyperplasia
Cell Biolol. Internatl. 24: 932-932,
2000
- ・ Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.
Study on physiological roles of two
novel haemopoietic factors
Cell Biol. Internatl. 24: 940-940, 2000
- ・ Kikuchi, A., Tomoyasu, H., Kido, I.,
Takahashi, K., Tanaka, A., Nonaka, I.,
Iwakami, N. and Kamo, I.
Haemopoietic biglycan produced by brain
cells stimulates growth of microglial
cells
J. Neuroimmunology 106: 78-86, 2000

2 学会発表

- ・ 加茂功、友安浩、菊池愛子：胸腺筋様細胞からみた重症筋無力症（MG）と胸腺過形成。第59回日本癌学会総会、横浜、2000, 10, 4
- ・ 菊池愛子、加茂功：新規 80 kDa, 100 kDa 造血因子の研究。第73回日本生化学会大会、横浜、2000, 10. 4
- ・ 友安浩、谷村繁雄、河野匡、加茂功、菊池愛子：重症筋無力症発症における胸腺筋様細胞由来造血因子の研究。第53回日本胸部外科学会総会、大分、2000, 10. 27
- ・ Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.
Thymic myoid cells induce myasthenia
and hyperplasia. International
Congress on Differentiation & Cell
Biology , Australia Gold Coast 9, 24
2000
- ・ Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.
Study on physiological roles of two
novel haemopoietic factors
International Congress on
Differentiation & Cell Biology ,
Australia Gold Coast 9, 24 2000.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基盤的研究

分担研究者 鎌倉 恵子 防衛医大第三内科 助教授

研究要旨：末梢神経組織は軸索と髄鞘(Schwann 細胞)よりなり、髄鞘 Schwann 細胞膜には筋細胞膜と同様 dystrophin 相当の Dp116、dystroglycan complex (DG)が存在する。DG は laminin と細胞外で、Dp116 と細胞内で連絡しているがその機能は未だ不明である。末梢神経切断、再生における Schwann 細胞膜蛋白の変化を検討した。また一方で、一般に神経成長因子(NGF)は末梢神経再生に有効で治療にも使えるとも言われているが、これは未だ議論のあるところである。そこで adult rat の軸索再生への NGF の影響を in vivo で検討した。

末梢神経切断後の β -DG、laminin- $\alpha 2$ について免疫組織学的方法(蛍光および電顕)で検討した。 β -DG は有髄、無髄ともに、基底膜に面した Schwann 細胞膜直下の細胞質に存在する(abaxonal)。この発現は軸索変性により軸索との接触を失った Schwann 細胞で減少し、再生で髄鞘化が進につれ up-regulate する。Laminin の動態も β -DG と平行した。 β -DG は laminin- $\alpha 2$ との関係で Schwann 細胞と基底膜の接着に関与し、髄鞘形成に関与していると考えた。

ラット脊髄くも膜下腔へ坐骨神経を切断前2日より NGF を持続投与し、軸索再生を growth associated protein-43(GAP-43)を指標に検討した。再生は切断端での thin-myelinated fiber 数、無髄神経繊維数で検討した。GAP-43 発現は切断端、後根神経節、脊髄後角で NGF 投与群の方が減少し軸索伸展は抑制された。断端での無髄神経線維数、有髄神経線維再生を示す thin-myelinated fiber 数も NGF 投与群の方が少なかった。神経切断で断端からの逆行性 NGF 量がへりその信号が神経細胞に軸索再生を促すと考えられるが、くも膜下腔に高濃度の NGF が存在するとその信号が修飾されたと考えられる。末梢神経再生では NGF は主として Schwann 細胞 p75 へ作用して髄鞘形成、再生を促すと推測される。

A 研究目的

末梢神経の髄鞘 Schwann 細胞膜には筋細胞膜と同様 dystrophin 相当の Dp116、dystroglycan complex (DG)が存在する。DG は α -DG と β -DG よりなり、髄鞘を形成しつつある Schwann 細胞で発現することが判明している。また α -DG は細胞外で laminin-2(Schwann 細胞基底膜成分)と β -DG は細胞内で Dp116(Schwann 細胞にある dystrophin 相当のもの)と結合しているが未だ機能は不明である。 α -DG と laminin が mycobacterium leprae の受容体であり病における髄鞘形成異常に関与しているこ

と、DG complex が Schwannoma 細胞の laminin への接着に関与していることなどが報告されている。DG、laminin-2 がシグナル伝達に関与しているとの仮説を証明する目的で、ラット末梢神経で DG、laminin-2 の局在の検討、末梢神経切断による軸索変性および再生での変化の検討を行った。

一方、神経成長因子(NGF)は末梢神経再生を促すとされているが明確な証明はいまだなく議論のあるところである。末梢神経切断端に NGF を直接作用させた場合は再生を促すといわれている。軸索再生における NGF の

役割を明らかにする目的で adult rat を用い in vivo で中枢側に NGF を作用させ軸索再生への影響を検討した。

B 研究方法

1) 12-13 週の Wistar rat の坐骨神経を切断し軸索変性モデルとした。一方坐骨神経を糸で縛ることにより挫滅し 24 時間後に解放し軸索再生モデルとした。

経日的に動物を灌流固定し神経断端遠位部の末梢神経組織を免疫電顕による検討に用いた。また灌流固定しない神経断端遠位部を免疫蛍光組織化学と immunoblotting による検討に用いた。切断、挫滅は同一個体の一方で行い、対側を対照とした。免疫組織化学、immunoblotting には β -DG、laminin- α 2 への抗体を用い、Schwann 細胞膜内外での免疫発現性を検討した。

2) 12-13 週の Wistar rat で上記と同様に坐骨神経切断を行った。坐骨神経切断 2 日前より、くも膜下腔へ浸透圧ポンプにより NGF を持続的に投与した。対照は NGF 非投与群（人工髄液投与群）と投与群の切断対側とした。切断端近位部、後根神経節、脊髄後角での growth associated protein-43 (GAP-43)発現を経時的に検討した。GAP-43 は軸索再生の指標となるといわれ、抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また断端での再生神経の無髄神経線維数、有髄神経 thin myelinated fiber 数および電顕による形態を NGF 投与群と非投与群で比較検討した。

倫理面への考慮

手術時、灌流固定時は腹腔内 sodium pentobarbital 投与を行った。動物の扱いは当

校の倫理委員会の規定に基づく。

C 研究結果

1) β -DG は有髄神経、無髄神経ともに Schwann 細胞で発現していた。前者では基底膜に接する髄鞘の最も外側の Schwann 細胞外膜直下の細胞質に、後者では無髄神経をとりまく Schwann 細胞の基底膜に面した外膜直下の細胞質に存在した。切断後の軸索変性過程では軸索との連絡がとぎれるに従い Schwann 細胞内で down-regulate していった。一方、軸索再生時に髄鞘形成されていくに従い up-regulate された。軸索変性時も再生時も β -DG は基底膜に面した、外側の膜直下の Schwann 細胞質に発現した。Laminin- α 2 の発現も軸索変性、再生時に β -DG と平行した。

2) 神経切断後の末梢神経切断近位側、後根神経節、後角での GAP-43 の発現は NGF を髄腔内へ投与した場合、非投与群に比べ低下していた。つまり初期 7 日間軸索再生は抑制された。また再生時は無髄神経線維、有髄線維 thin-myelinate fiber が増加するが、これらの数も NGF 投与群では非投与群より少なかった。これは電顕による形態学的観察からも証明された。

D 考察

β -DG と laminin- α 2 は Schwann 細胞が軸索と接触している限りは発現していることが軸索変性、再生モデルで明らかとなった。末梢神経からの α -DG は in vitro で laminin-2 と結合することがわかっているが、今回の我々の実験結果とともに考えると、DG complex は β -DG も含め Schwann 細胞外膜と基底膜 (laminin-2) との接着に関与していると考え

られる。また DG complex は Schwann 細胞の髄鞘形成に laminin-2 と共に関与していると考えた。髄鞘が巻いていくとき、接着していく役割か細胞質へ信号を送って髄鞘形成を促すのかは不明である。

一方、末梢神経切断モデルで軸索再生は髄腔内 NGF 投与群では初期、対照群に比べ抑制された。通常切断後、障害部位で NGF は増加するが逆行性に中枢である後根神経節細胞へ運ばれる NGF は減少し、その信号をうけて GAP-43 は神経節細胞で増加する。そこから供給される切断端、後角でも GAP-43 は増加するが、髄腔内 NGF 投与群では GAP-43 発現はいずれでも抑制された。末梢での切断による信号が神経細胞付近での NGF 投与により修飾されたと考えた。我々の実験系は NGF の神経細胞以外の細胞への影響は除外できる系である。障害部位（末梢神経断端）で増加する NGF は再生を促すのに、神経細胞への信号より Schwann 細胞への信号が重要と思われる。Schwann 細胞の NGF 受容体 p75 を介して Schwann 細胞が動員され髄鞘形成、再生といった過程をとると推測される。

E 結論

Schwann 細胞 DG は Schwann 細胞と基底膜の接着に関与し、基底膜 laminin と共に髄鞘形成に関与していると考えられる。また末梢神経再生において、NGF は神経細胞への作用よりは Schwann 細胞への影響で再生、髄鞘形成を促すと推測された。Schwann 細胞 NGF 受容体 p75 への NGF の作用と DG、laminin との関係は今後の問題である。

F 研究発表

1, 論文発表

1) Masaki T, Matsumura K, Saito F, Sunada Y, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K. Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration. *Acta Neuropathol* 99: 289-295, 2000.

2) Masaki T, Matsumura K, Hirata A, Yamada H, Hase A, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K. Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia. *Acta Neuropathol.* 101:174-178, 2001.

3) Hirata A, Masaki T, Motoyoshi K, Kamakura K. Intrathecal administration of nerve growth factor delays Gap-43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve. On submission.

4) Masaki T, Matsumura K, Hirata A, Yamada H, Hase A, Arai K, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K. Expression of dystroglycan and laminin-- α 2 chain in rat peripheral nerve during development. On submission

2, 学会発表

真先敏弘、平田彰、鎌倉恵子、松村喜一郎。

Schwann 細胞発生・分化過程における β -dystroglycan、laminin-2 の発現。

第 41 回日本神経学会総会、松本、2000

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<英文>					
1.	Miyagoe-Suzuki Y, Nakagawa M and <u>Takeda S</u> : Merosin and congenital muscular dystrophy Microsc Res Tech 48: 181-191, 2000				
2.	Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Kameya S, Shibuya S, Matsuda R, Wakayama Y, <u>Takeda S</u> : Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in α 1-syntrophin knockout mice Proc. Japan Acad 76, Ser.B No.2 22-27, 2000.				
3.	Yamamoto K, Yuasa K, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Yamamoto H, Nabeshima Y, and <u>Takeda S</u> : Immune response to adenoviral-delivered antigens upregulates utrophin, and results in mitigation of muscle pathology in mdx mice Hum Gene Ther 11: 669-680, 2000				
4.	<u>Takeda S</u> : Gene Therapy of Muscular Dystrophy, Reality and Dream Neuroscience News 3(1) : 51-56, 2000				
5.	Iwao M, Fukada S-I, Tsujikawa K, Yagita H, Miyagoe Y, <u>Takeda S</u> , and Yamamoto H : Thymic atrophy in laminin-alpha-2 chain deficient mice is a result of selective death of CD4+8+ immature thymocytes. Immunology 99: 481-488, 2000.				
6.	<u>Takeda S</u> : Gene Therapy for Muscular Dystrophies. BioDrugs (in press)				
7.	Ikemoto M, Nikawa T, <u>Takeda S</u> , Watanabe C, Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K: Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain by stimulating ubiquitin-dependent proteolysis. FASEB J (in press)				

8. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:
Thymic myoid cells induce myasthenia and hyperplasia
Cell Biol. Internat. 24: 932-932, 2000
9. Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.:
Study on physiological roles of two novel haemopoietic factors
Cell Biol. Internat. 24: 940-940, 2000
10. Nonaka, I., Iwakami, N. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan produced by brain cells stimulates growth of microglial cells
J. Neuroimmunology 106: 78-86, 2000
11. Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I.:
Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. Neurology (in press)
12. Nishino I., Spinazzola A, Hirano M:
MNGIE : from nuclear DNA to mitochondrial DNA.
Neuromuscul Disord 11:7-10, 2001
13. Nishino I., Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M:
Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease).
Nature 406:906-910, 2000
14. Amemiya S, Hamamoto M, Goto Y, Komaki H, Nishino I., Nonaka I, Katayama Y:
Psychosis and progressing dementia: presenting features of a mitochondriopathy.
Neurology 55: 600-601, 2000
15. Nishino I., Spinazzola A, Papadimitriou A, Hammans S, Steiner I, Hahn CD, Connolly AM, Verloes A, Guimarães J, Maillard I, Hamano H, Donati MA, Semrad CE, Russell JA, Andreu AL, Hadjigeorgiou GM, Vu TH, Tadesse S, Nygaard TG, Nonaka I, Hirano I, Bonilla E, Rowland LP, DiMauro S, Hirano M:
MNGIE: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations.
Ann Neurol 47:792-800, 2000
16. Masaki T, Matsumura K, Saito F, Sunada Y, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K.
Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration.
Acta Neuropathol 99: 289-295, 2000.
17. Masaki T, Matsumura K, Hirata A, Yamada H, Hase A, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K.:
Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia.
Acta Neuropathol. 101:174-178, 2001.
18. Hirata A, Masaki T, Motoyoshi K, Kamakura K.: Intrathecal administration of nerve growth factor delays Gap-43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve.
On submission.