

200/0638

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成14年(2002)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	----- 9
武田 伸一	
2. 筋ジストロフィー治療のための幹細胞移植法の基礎研究	----- 13
山元 弘	
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	----- 15
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	----- 18
鎌倉 恵子	
5. 骨格筋における再生機構の解明	----- 21
林 由起子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 23

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	山元 弘	大阪大学大学院薬学研究科 応用医療薬科学専攻 教授
	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 助教授
	林由起子	国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第一部 室長

研究要旨

1. GFP transgenic mouse の骨髄より cell sorter と Hoechst dye を用いて SP 分画を採取し、あらかじめ in vitro で培養した筋衛星細胞と共培養することにより、骨髄由来の SP 細胞と筋衛星細胞由来の筋芽細胞が融合して、多核の筋管を形成することが観察された。
2. GFP transgenic mouse の骨髄を放射線骨髄キメラ mdx マウスあるいは新生児キメラマウスに投与したが、ドナー由来の GFP 陽性筋線維の出現率は比較的低率だった。
3. cardiotoxin による再生刺激後 48 時間、96 時間並びに 7 日後のサイトカインの再生筋での発現を cytokine cDNA expression array を用いて解析した。
4. クローン化骨髄由来筋芽細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 10 余株を作製し、特異性の解析を行った。
5. 筋再生が不十分であたるために、重篤な筋障害を呈する福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の分子病態を検討し、 $\alpha$ -ジストログリカンの選択的な欠損を見出した。
6. 末梢神経の再生の上で、beta-dystroglycan が laminin  $\alpha$ 2 chain との関連で、Schwann 細胞と基底膜の接着に関与し、髄鞘形成を担っていることを明らかにした。

A. 研究目的

近年、骨髄中に骨格筋細胞に分化できる細胞が存在することが明らかにされ、骨髄移植法により筋ジストロフィーを治療できる可能性が示唆されるようになった。Ferrari らは、免疫能を欠損したマウスに筋再生を誘導し、同時に骨髄細胞を移植すると骨髄由来細胞が再生筋中に見つかること (1998)、また Gussoni らは、放射線照射した mdx マウスに骨髄移植することで、ジストロフィン陽性の筋が再生することを報告し (1999)、骨髄移植による筋ジストロフィーの治療法が一躍注目を集めるようになった。

しかし、筋再生に参加するドナー細胞の数は極端に少ないので、治療法として応用するためには、幹細胞の増殖、分化がどのように制御されているか、特に 1) 幹細胞の可塑性 2) 骨髄にある筋前駆細胞の詳しい characterization について研究を

進める必要がある。そこで、骨髄細胞を移植して筋細胞に分化する効率を検討すると共に、骨髄から SP 分画を単離し、骨格筋に分化する能力があるかどうか検定した。

また、細胞はストロマ由来なのか、ストロマ、血球系と共通のヘマンギオブラストのような幹細胞から分化してくるのか、独自の分化経路を取るのか不明である。そこで、筋の幹細胞としての特異分化抗原認識モノクローナル抗体を作成する。

一方、移植治療の効率を決定するもう一つの因子であるホスト側の筋再生の分子メカニズムを解明するために、cDNA expression array を用いて筋再生の制御因子と考えられるサイトカインの発現プロファイルを解析する。

さらに、筋疾患に対する幹細胞の移植を実現するためには、背景となる筋疾患の分子病態を明らかにする必要がある。ところで、特に筋再生に障

害のある福山型先天性筋ジストロフィー骨格筋に関する検討を行う。

最後に多くの分子が共通して発現し、共に基底膜が重要な役割を果たすことが判明している末梢神経について、その再生の分子機構を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 骨髄細胞、胎児肝細胞の移植

GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子導入マウス由来骨髄細胞 (成マウス)、胎児肝細胞 (胎齢 14-15 日) をドナー細胞に用いた。宿主マウスは、*mdx* マウスもしくは正常 C57BL/6 マウスを用いた。骨髄細胞や胎児肝細胞は常法に従い調製した。

キメラマウスは 2 種類の 방법으로作成した。放射線骨髄キメラマウスは、 $^{137}\text{Cs}$  線源による 10 Gy のガンマ線を 8 週齢の成雄 *mdx* マウスに照射し、照射後 3 時間以内に  $40 \times 10^6$  個の骨髄細胞を尾静脈より投与した。新生児キメラマウスは、妊娠 17-18 日目の母マウスに busulfan (20-40 mg/kg) を腹腔内投与しておき、出産させ、生後 16 時間以内に  $2-5 \times 10^6$  個の骨髄細胞、もしくは  $0.2-0.5 \times 10^6$  個の胎児肝細胞を肝内投与した。

一定時間経過後に、前脛骨筋 (ATM) を採取して凍結切片を作成し、パラフォルムアルデヒド固定後、H-E 染色、免疫組織化学的検索とともに、GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

### 2. 骨髄 SP 細胞

GFP transgenic マウスから骨髄 SP 細胞をセルソーターで Hoechst dye の取り込みを基準として分取し、マウス骨格筋から調整した筋衛星細胞由来の筋芽細胞 (初代培養) と共培養した。次に、GFP transgenic マウスから採取した SP 細胞を、LacZ transgenic マウス骨格筋から調整した筋芽細胞と共培養した。また、骨髄 SP 細胞を CD45+ と CD45- に分け、同様に筋芽細胞と共培養した。次に、GFP transgenic マウスの骨髄 SP 細胞を、あらかじめ cardiotoxin で処理して筋壊死、再生を誘導しておいた *mdx/nude* の前脛骨筋 (TA) に直接 injection した ( $1000-3000$  SP cells)。

### 3. 筋再生の分子機構

ICR マウスの前脛骨筋 (TA) に Cardiotoxin を注入し、48 時間後、96 時間後および 7 日後の骨格筋から polyA+ RNA を調整し、cytokine cDNA expression array を用いてサイトカイン及び関連遺伝子の発現 profile を作成した。その結果、著明な上昇をみたオステオポンチン変異マウスを入手し、cardiotoxin を用いた同様の筋再生実験を行った。

### 4. モノクローナル抗体の作成

ラット骨髄由来筋幹細胞株を Balb/c マウス尾静脈、腹腔に頻回免疫し、この動物から脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞と定法通り融合し、ハイブリドーマを樹立。標的細胞を 96 well plate に培養し、標的抗原としてクローン化を行った。標的抗原にはラット由来筋分化能を有する細胞 4 種と、アストロサイト、胸腺上皮細胞をそれぞれ一種用いた。

### 5. 筋再生に障害のある疾患の分子病態

筋ジストロフィーの中でも重篤な症状を呈する先天性筋ジストロフィー (CMD) を中心に、診断目的で採取されたヒト生検骨格筋・末梢血ならびに疾患モデル動物の骨格筋・心筋を用いて免疫組織化学法、生化学法、分子生物学的手法を用いて検索した。

### 6. 末梢神経の再生機構の検討

胎生 18 日、出生直後、3 日、7 日、28 日の坐骨神経を採取した。この凍結標本を immunoblotting による検討、免疫組織化学による検討に用いた。固定した標本は電顕による検討に用いた。 $\beta$ -DG、Dp116、laminin- $\alpha 2$  への抗体を用い検討した。

### (倫理面への配慮)

ヒト組織を用いた研究はインフォームドコンセントを得た上でを行い、また遺伝子解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し施行した。また、動物実験については、各所属施設での倫理委員会の承認を得た上、倫理面に十分配慮し施行した。

## C. 研究成果

### 1. 骨髄幹・胎児肝細胞の移植

#### (1) キメラマウスでの解析

*mdx* マウスを宿主、GFP マウス骨髄細胞

をドナーとした放射線キメラマウスにおける ATM での GFP 陽性筋繊維は、1-2 % 検出できた。

新生児キメラマウスは、新生児期にドナー細胞を投与するという手法をとるため、ドナー細胞に対する免疫学的寛容状態を誘導できる。新生児キメラマウスの場合であっても、またドナー細胞を骨髄細胞、胎児肝細胞を用いても、GFP 陽性筋繊維の出現率は、たかだか 1-2 % であった。

新生児キメラマウスをもちいて、骨髄細胞、胎児肝細胞中の前駆細胞数の頻度を計算したところ、胎児肝細胞の方が 10-30 倍程度頻度が高いことがわかった。

## (2) 正常な筋形成への前駆細胞の関与

新生児キメラマウスの ATM を検索する過程で、正常な筋形成過程でドナー細胞が参加していることが判った。すなわち、キメラマウス正常筋中に、GFP 陽性筋、GFP 陽性単核細胞が検出できた。そこで、筋繊維培養を試みたところ、GFP 陽性、デスミン陽性の単核細胞が見つかった。キメラマウス正常筋から単核細胞を採取し、*mdx/scid* マウスに移植したところ、GFP 陽性筋が検出できた。以上の結果は、ドナー細胞が筋衛星細胞として筋肉中に分布している可能性を強く示唆している。

## 2. 骨髄 SP 細胞

### (1) in vitro 実験

骨髄 SP 細胞は、筋衛星細胞由来の筋芽細胞と共培養すると、3 週間の培養後に、GFP 陽性の筋管を形成した。しかし、その頻度は低く 1-2/3000 個程度であった。

次に、ROSA マウス(LacZ transgenic mouse) から single fiber を調整して、筋衛星細胞を培養し、GFP 陽性骨髄 SP 細胞と共培養すると、GFP 陽性筋管は、 $\beta$ -gal 染色で青染した。この結果は SP 細胞は単独で融合して筋管になるわけではなく、筋芽細胞または筋管と融合して GFP 陽性筋管を形成することを示唆している。

また、GFP 陽性の骨髄 SP 細胞を、CD45+ と CD45- の分画に分けて、筋芽細胞と共培養すると、どちらの SP 細胞分画も同程度に GFP 陽性の筋管を形成した。

### (2) in vivo 実験

SP 細胞を導入した *mdx/nude* の前脛骨筋から、1-3 ヶ月後に凍結切片を準備して、GFP 陽性筋繊維の有無を検討したが、ほとんど GFP 陽性線維は検出されなかった。

## 3. 筋再生の分子機構

### (1) expression file

Cytokine expression array によって、筋再生刺激後 48 時間、96 時間、7 日後のサイトカイン発現プロファイルを得ることができた。特に筋再生刺激後 48 時間の骨格筋では、コントロール側と比較して、オステオポンチンの発現が 100 倍以上に増加していた。

### (2) オステオポンチン

発現上昇が著明であったオステオポンチン変異マウス (OPN 変異マウス) の前脛骨筋に cardiotoxin を導入して筋再生過程を調べたところ、OPN 変異マウスでは、明らかな筋再生過程の遅延が認められた。

## 4. 抗体の作製

昨年来ラット骨髄幹細胞と反応するクローンの特異性並びに、交差性反応を調べた。すべてのクローンは多少の反応性に差があるものの 6 種の抗原細胞と反応することから、ラット細胞に共通した抗原を認識した抗体が得られていると考えられる。さらにパネル検討するためクローン数を増やして検討している。

## 5. 筋疾患の再生

CMD の中でもわが国に特異的に多い FCMD は未熟な筋線維が多く、筋の分化・再生が不十分であるが故に早期より強い筋ジストロフィー変化をきたすと考えられる。この一因として、基底膜形成および細胞膜内外のタンパク質連関に重要なタンパク質  $\alpha$ -DG が選択的に欠損していることを発見し、FCMD の原因遺伝子産物フクチンが  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾に関与している可能性を示唆した。また、現在関連疾患についても同様の検索を行っている。

## 6. 末梢神経の再生

胎児 18 日から出生直後にかけては末梢神経に  $\beta$ -DG と laminin-2 は発現されず、生後 7 日にかけてこれらの発現は増加した。生後 7 日より後は生後 28 日、アダルトと発現に差はなかった。これらの結果は immunoblotting、蛍光免疫組織化学で確認された。電顕での検討では、生後 7 日に向け、Schwann 細胞が増殖し、髄鞘化

していく過程であった。

## D. 考察

### 1. 骨髄細胞・胎児肝細胞の移植

筋再生のためのマウス実験系を検討し、新生児キメラマウスがよりすぐれた実験系となることが判った。しかし筋再生へのドナー細胞の寄与率は依然として低く、前駆細胞の濃縮法の改良やケモカインの解析が必要であることがわかった。これら問題点を解決する目的で、モノクロナル抗体の作成、ケモカインの同定とその役割を解析する準備を進めている。一方、再生筋での単球の役割を明確にするために、単球欠損マウス *op/mdx* を作成し、また抗 *c-fms* 抗体投与による単球除去も同時進行させている。

### 2. 骨髄 SP 細胞

SP 細胞は本来、血球系の幹細胞を多く含む細胞分画として報告されたが、その中に骨格筋へ分化する細胞が含まれることが示唆される。しかし我々の *in vitro* の培養の結果では、筋細胞へ分化する割合は極めて低く、しかも CD45 陽性細胞のみならず、CD45 陰性細胞の中にも筋細胞に分化した細胞があることから、その前駆細胞がどのような共通した性質を持つのか解明することが難しい。むしろ今回の GFP 陽性 SP 細胞と  $\beta$ -gal 陽性筋衛星細胞の共培養の結果からは、両者が融合して筋細胞を形成したと理解できる。したがって、SP 細胞の内のどの分画（あるいはどのマーカーを発現している細胞）が、筋衛星細胞から筋芽細胞を経て筋管に至るどのステージの細胞と融合するのか明らかにすることは、今後の幹細胞移植の効率を高めるために重要である。

### 3. 筋再生の分子機構

一方、再生筋組織にて発現するサイトカインのなかには、骨髄中の幹細胞の筋壊死組織への遊走、増殖、分化に関与するものが含まれると考えられる。今回 *expression profile* から同定されたオステオポンチンは、そうしたサイトカインの一つであるが、幹細胞のリクルート、筋衛星細胞の増殖、融合、分化のどの過程で機能しているのか明らかにすることが我々の重要な課題である。

### 4. モノクロナル抗体の作製

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、既存の血球系幹細胞固有の CD 抗原の発現は認められていないが、自然融合し、AchR を発現し、横紋筋成能を有する。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。このよう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る。

### 5. 再生に異常のある筋疾患の分子病態

$\alpha$ -DG の欠損はその後、他の CMD(MEB, フクチン関連タンパク質(FKRP)異常症)や筋ジストロフィーマウス(*myd*)でも報告され、筋細胞障害・再生過程に重要な役割を果たしていると考えられる。今後フクチンおよび FKRP の機能、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾とその機能の関連について筋細胞の再生との関連を検索していく予定である。

### 6. 末梢神経の再生

$\beta$ -DG と laminin- $\alpha$ 2 は Schwann 細胞が軸索と接触し、また外側では基底膜に接し、再生に関与していると推測していた。今回、後根神経節細胞と satellite cell の関係でも軸索と Schwann 細胞との関係と同様なことが証明された。また、発生過程は再生過程と同様なモデルと推測されるが、発生過程においても電顕で確認された髄鞘化過程と一致して、 $\beta$ -DG、laminin-2 が発現することが判明した。末梢神経からの  $\alpha$ -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  $\beta$ -DG も含め Schwann 細胞外膜と基底膜 (laminin-2) との接着に関与し、laminin-2 と共に再生、発生時の髄鞘形成に関与していると考えた。

## E. 結論

1. 骨髄に見出される幹細胞は骨格筋衛星細胞およびその下流にある筋芽細胞と融合することにより筋細胞に分化する。
2. Osteopontin は筋再生の過程において重要な役割を果たす。
3. クローン化骨髄由来筋芽細胞をマウスに免疫し、モノクロナル抗体の産生ハイブリドーマを作成した。
4. 筋細胞障害・再生過程における  $\alpha$ -DG の糖鎖の重要性を示した。

5. beta-dystroglycan は laminin alpha-2 chain と関連して、Schwann 細胞と基底膜の接着に関与し、筋鞘形成に参加している。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

<英文>

1. Takeda S and Miyagoe-Suzuki Y:  
Gene Therapy for Muscular Dystrophies:  
Current Status and Future Prospects  
*BioDrugs* 15: 635-644, 2001
2. Hoshino S, Ohkoshi N, Ishii A, Kameya S, Takeda S, and Shoji S:  
The expression of dystrophin and  $\alpha$ 1-syntrophin during skeletal muscle regeneration  
*J Muscle Res Cell Motil* 22: 185-191, 2001
3. Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, and Takeda S:  
Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin  $\alpha$ 2 chain-null mutant ( $dy^{3K}/dy^{3K}$ ) mice  
*Glia* 35: 101-110, 2001
4. 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* 15(7): 1279-1281, 2001
5. Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, Kaga K, Kondo S, Morita S, Kitamura T, Matsuda R:  
Negamaycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle  
*Acta Myologica* XX: 154-158, 2001
6. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K:  
Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification  
*Developmental Biology* 241(2):313-26, 2002
7. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T:  
Proapoptotic effect of presenilin2 overexpression is mediated by downregulation of Bcl-2 in cultured neurons  
*J Neurochem* 79(6) 1161-8, 2001
8. Nakagawa M, Ikezoe K, Miyagoe-Suzuki Y, Nonaka I, and Takeda S:  
Increased membrane permeability in early postnatal period of laminin  $\alpha$ 2 chain-null mice,  $dy^{3K}/dy^{3K}$   
*Acta Myologica* XX: 167-173, 2001
9. Miyagoe-Suzuki Y, and Takeda S:  
Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with  $\alpha$ 1-syntrophin at the sarcolemma  
*Microscopy Research and Technique* 55: 164-170, 2001
10. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:  
Interleukin-6 Induces Over-Expression of the Sarcolemmal Utrophin in Neonatal *mdx* Skeletal Muscle  
*Human Gene Therapy* 13: 509-518, 2002
11. Inobe M, Inobe I, Adams G R, Baldwin K M and Takeda S:  
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle  
*J Appl Physiol* (in press)
12. Tsujikawa, K., et al.:  
Distinct functions of the two protein tyrosine phosphatase domains of LAR on tyrosine-dephosphorylation of insulin receptor. *Mol. Endocrinol.*, 15:271-280, 2001.
13. Hamada, H., et al.:  
Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine.  
*J. Immunol.*, 168:65-72, 2002.
14. Miyauchi, K., et al.:  
Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor.  
*Neuropeptides*, (in press) 2002.
15. Fukada, S-I., et al.:  
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice.  
*J. Cell Science*, 115:1285-1293, 2002.
16. Nishiyama, Y., et al.:  
Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes.  
*J. Immunol.*, 168:2626-2633, 2002.
17. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:  
Analysis of B-cell proliferation mechanism in

- MG thymus hyperplasia.  
*J. Neuromimmunol.* 118: 156-156, 2001.
18. Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.:  
Potential roles of 80-kDa and 100-kDa haemopoietic factor in brain physiology.  
*J. Neuromimmunol.* 118: 28-28, 2001.
  19. Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I.:  
Immunohistochemical study of cytokines in the MG thymus hyperplasia.  
*J. Neuroimmunol.* 118: 161-161, 2001.
  20. Hayashi YK, Tezak Z, et al.:  
Massive muscle cell degeneration in the early stage of merosin-deficient congenital muscular dystrophy.  
*Neuromuscul Disord.* 11:350-9, 2001.
  21. Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, et al:  
The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression.  
*Hum Mol Genet.* 10:1129-39, 2001.
  22. Hayashi YK, Ogawa M, et al:  
Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy.  
*Neurology.* 57:115-121, 2001.
  23. Yamanaka G, Goto K, Matsumura T, Funakoshi M, Komori T, Hayashi YK, Arahata K.:  
Tongue atrophy in facioscapulohumeral muscular dystrophy.  
*Neurology.* 57:733-735, 2001.
  24. Matsuda C, Hayashi YK, et al:  
The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle.  
*Hum Mol Genet* 10: 1761-1766, 2001.
  25. Hayashi YK, Ogawa M, Arahata K.:  
Altered expression of  $\alpha$ -dystroglycan in congenital muscular dystrophy.  
*Acta Myologica* 20: 87-91, 2001.
  26. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, et al.:  
Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy.  
*Neurology* 58:323-325, 2002.
  27. 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.
  28. Hitoshi Mochizuki, Keiko Kamakura, Toshihiro Masaki, Akira Hirata, Takahiko Tokuda, Masahide Yazaki, Kazuo Motoyoshi, Syu-ichi Ikeda. :  
Nodular cutaneous amyloidosis and carpal tunnel syndrome due to the amyloidogenic transthyretin His114variant Amyloid:  
*J Protein Folding Disord* 8: 105-110, 2001
  29. Hitoshi Mochizuki, Ritsuko Hanajima, Hisatomo Kowa, Yasufumi Yotoyoshi, Hiroshi Ashida, Keiko Kamakura, Kazuo Motoyoshi, Yoshikazu Ugawa.:  
Somatosensory evoked potential recovery in myotonic dystrophy.  
*Clinical Neurophysiology* 112: 793-799, 2001
  30. Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Guillain-Barre syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a.  
*J Neuroimmunology* 2001, 113 260-267.
  31. 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.  
*Brain Research.* 2002 (in press).
  32. 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- $\alpha$ 2 chain in rat peripheral nerve during development.  
*Experimental Neurology* 174: 2002 (in press)
- II. 学会発表
1. Takeda S, Fujimori K, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Hosaka Y:  
Interleukin-6 up-regulates utrophin expression in mdx skeletal muscle.  
American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, May 30-June 3, 2001
  2. Takeda S, Fujimori K, Sakamoto M, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y:  
New therapeutic approaches of muscular dystrophy.  
4<sup>th</sup> Colloque Franco-Japonais sur les Dystrophies Musculaire: progrès vers la thérapie, Paris, France, 15-16 June, 2001
  3. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーに対する治療法の進展  
第 42 回日本神経学会総会 東京; 2001 年 5 月 13 日
  4. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの遺伝子治療の展望  
第 19 回日本神経治療学会 東京; 2001 年 6 月 28 日



5. 武田伸一他：  
Administration of interleukin-6 up-regulates the sarcolemmal utrophin in neonatal mdx skeletal muscle  
第7回日本遺伝子治療学会 東京；2001年7月7日
6. 湯浅勝敏他：  
Enhanced immune response inhibits long-term expression of transferred gene products in adeno-associated virus (AAV) vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient mdx skeletal muscle.  
第7回日本遺伝子治療学会 東京；2001年7月7日
7. 武田伸一：  
筋疾患の再生と治療への展望  
第18回小児神経筋疾患懇話会 東京；2001年8月25日
8. 伊藤由佳、藤盛圭太、鈴木友子、吉崎和幸、山元弘、武田伸一：  
IL-6 投与による mdx マウス骨格筋におけるユートロフィンの発現増強  
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月9日
9. 平田彰、増田智、鈴木友子、鎌倉恵子、武田伸一：  
cDNA array を用いた骨格筋変性再生過程における遺伝子発現変化の検討  
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月9日
10. 坂本美喜、湯浅勝敏、吉村まどか、横田俊文、田内亜紀、鈴木友子、武田伸一：  
短縮型ジストロフィン遺伝子は mdx マウスの表現型を改善する  
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月10日
11. 横田俊文、保坂幸男、宮越（鈴木）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は筋再生過程において神経筋接合部の異常及び筋肥大を呈する  
第24回日本分子生物学会年会 横浜；2001年12月12日
12. 深田宗一朗，他：  
骨髄細胞を用いた筋ジストロフィー治療の基礎研究，日本薬学会第121年会 3.29, 2001
13. Fukada, S-I., et al. :  
Muscle regeneration by the bone marrow or fetal liver cells from GFP-Tg mice. FASEB Summer Seminar, "Muscle Satellite and Stem Cells", Tucson, AZ, USA, 7.14-19, 2001.
14. 樋口才飛、他：  
骨髄移植による遺伝性筋疾患の治療研究，第51回日本薬学会近畿支部大会, 10.28, 2001
15. 平野あずみ、他：  
IL-12p40 鎖を組み込んだ発現ベクターによる細胞性免疫の抑制，第51回日本薬学会近畿支部大会, 10.28, 2001
16. 加茂功、友安浩、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60回日本癌学会総会、横浜、2001, 9.26
17. 菊池愛子、加茂功：  
新規 80 kDa 造血因子の多機能性・共同作用に関する研究  
第74回日本生化学会大会、京都、2001, 10. 28
18. 友安浩、谷村繁雄、河野匡、加茂功、菊池愛子：  
重症筋無力症胸腺内抗アセチルコリンレセプター抗体産生機構に関する研究  
第54回日本胸部外科学会総会、大分、2001, 10. 27
19. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A. :  
Analysis of B-cell proliferation mechanism in MG thymus hyperplasia,  
6th International Congress on Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.
20. Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I. :  
Potential roles of 80-kDa and 100-kDa haemopoietic factor in brain physiology,  
6th International Congress on Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.
21. Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I. :  
Immunohistochemical study of cytokines in the MG thymus hyperplasia,  
6th International Congress on Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.
22. YK Hayashi, et al :  
Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) in Japan. 1<sup>st</sup> Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Workshop. Tokyo, Jan. 20, 2001.
23. 林由起子，他. :  
福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)における $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG)の選択的欠損 日本神経学会総会 東京 2001年5月
24. YK. Hayashi, et al. :  
 $\alpha$ -Dystroglycan in Congenital Muscular Dystrophy. 4<sup>th</sup> French-Japanese Workshop. Paris, June 15-16, 2001.
25. YK. Hayashi, et al. :  
Frequency of 4q35 ; 10q26 subtelomeric interchromosomal exchanges~ comparison with

different ethnic healthy populations and Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients ~. 6<sup>th</sup> International Congress of World Muscle Society. Snowbird, Utah, USA Sep 6-8, 2001 .

26. YK Hayashi.

Clinical and protein analysis of dysferlinopathy.  
Small Group Workshop "Dysferlinopathy",  
Tokyo, Dec. 14, 2001

27. Kamakura K, Kaida K, Kusunoki S, Masaki T, Nakamura R, Motoyoshi K, Fukuda J.

Clinical characteristics of Guillain-Barre syndrome patients with anti-GalNAc-GD1a and effects of sera on cultured dorsal root ganglia.  
Xvii World Congress of Neurology. London 2001  
July 17-22. J Neurological Science 2001, 187: S470

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. GFP transgenic mouse の骨髄より cell sorter と Hoechst dye を用いて SP 分画を採取し、あらかじめ in vitro で培養した筋衛星細胞と共培養することにより、骨髄由来の SP 細胞と筋衛星細胞由来の筋芽細胞が融合して、多核の筋管を形成することが観察された。しかも血球系分画である CD45<sup>+</sup>SP と非血球系分画である CD45<sup>-</sup>SP いずれの分画にもその活性が認められた。しかし、SP 分画を *mdx/nude* マウスの前脛骨筋に導入した場合には、GFP 陽性の筋線維は殆ど観察されず、SP 細胞が筋細胞へ分化する効率が低いことが明らかになった。
2. cardiotoxin による再生刺激後 48 時間、96 時間並びに 7 日後のサイトカインの再生筋での発現を cytokine cDNA expression array を用いて解析した。

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、幹細胞の増殖、分化がどのように制御されているか、特に 1) 幹細胞の可塑性 2) 骨髄にある筋前駆細胞の詳しい characterization について研究を進める必要がある。そこで、骨髄から SP 分画を単離し、骨格筋に分化する能力があるかどうか検定した。一方、移植治療の効率を決定する宿主側の筋再生の分子メカニズムを解明するために、cDNA expression array を用いて筋再生の制御因子と考えられるサイトカインの発現プロファイルを解析した。

B. 研究方法

1. GFP transgenic マウスから骨髄 SP 細胞をセルソーターで Hoechst dye の取り込みを基準として分取し、マウス骨格筋から調整した筋衛星細胞由来の筋芽細胞（初代培養）と共培養した。次に、GFP transgenic マウスから採取した SP 細胞を、LacZ transgenic マウス骨格筋から調整した筋芽細胞と共培養した。また、骨髄 SP 細胞を CD45<sup>+</sup>と CD45<sup>-</sup>に分け、同様に筋芽細胞と共培養した。
2. GFP transgenic マウスの骨髄 SP 細胞を、あらかじめ cardiotoxin で処理して筋壊死、再生を誘導しておいた *mdx/nude* の前脛骨筋

(TA)に直接 injection した (1000-3000 SP cells)。

3. ICR マウスの前脛骨筋 (TA) に Cardiotoxin を注入し、48 時間後、96 時間後および 7 日後の骨格筋から polyA<sup>+</sup> RNA を調整し、cytokine cDNA expression array を用いてサイトカイン及び関連遺伝子の発現 profile を作成した。
4. 3 で著明な上昇をみたオステオポンチン変異マウスを入手し、cardiotoxin を用いた同様の筋再生実験を行った。

C. 研究成果

1. 骨髄 SP 細胞は、筋衛星細胞由来の筋芽細胞と共培養すると、3 週間の培養後に、GFP 陽性の筋管を形成した。しかし、その頻度は低く 1-2/3000 個程度であった。

次に、ROSA マウス(LacZ transgenic mouse) から single fiber を調整して、筋衛星細胞を培養し、GFP 陽性骨髄 SP 細胞と共培養すると、GFP 陽性筋管は、 $\beta$ -gal 染色で青染した。この結果は SP 細胞は単独で融合して筋管になるわけではなく、筋芽細胞または筋管と融合して GFP 陽性筋管を形成することを示唆している。

また、GFP 陽性の骨髄 SP 細胞を、CD45<sup>+</sup>と CD45<sup>-</sup>の分画に分けて、筋芽細胞と共培養

すると、どちらの SP 細胞分画も同程度に GFP 陽性の筋管を形成した。

2. SP 細胞を導入した *mdx/nude* の前脛骨筋から、1-3 ヶ月後に凍結切片を準備して、GFP 陽性筋線維の有無を検討したが、ほとんど GFP 陽性線維は検出されなかった。
3. Cytokine expression array によって、筋再生刺激後 48 時間、96 時間、7 日後のサイトカイン発現プロファイルを得ることができた。特に筋再生刺激後 48 時間の骨格筋では、コントロール側と比較して、オステオポンチンの発現が 100 倍以上に増加していた。
4. 発現上昇が著明であったオステオポンチン変異マウス (OPN 変異マウス) の前脛骨筋に cardiotoxin を導入して筋再生過程を調べたところ、OPN 変異マウスでは、明らかな筋再生過程の遅延が認められた。

#### D. 考察

SP 細胞は本来、血球系の幹細胞を多く含む細胞分画として報告されたが、その中に骨格筋へ分化する細胞が含まれることが示唆される。しかし我々の *in vitro* の培養の結果では、筋細胞へ分化する割合は極めて低く、しかも CD45 陽性細胞のみならず、CD45 陰性細胞の中にも筋細胞に分化した細胞があることから、その前駆細胞がどのような共通した性質を持つのか解明することが難しい。むしろ今回の GFP 陽性 SP 細胞と  $\beta$ -gal 陽性筋衛星細胞の共培養の結果からは、両者が融合して筋細胞を形成したと理解できる。したがって、SP 細胞の内のどの分画 (あるいはどのマーカーを発現している細胞) が、筋衛星細胞から筋芽細胞を経て筋管に至るどのステージの細胞と融合するのか明らかにすることは、今後の幹細胞移植の効率を高めるために重要である。

一方、再生筋組織にて発現するサイトカインのなかには、骨髄中の幹細胞の筋壊死組織への遊走、増殖、分化に関与するものが含まれると考えられる。今回 expression profile から同定されたオステオポンチンは、そうしたサイトカインの一つであるが、幹細胞のリクルート、筋衛星細胞の増殖、融合、分化のどの過程で機能しているのか明らかにすることが我々の重要な課題である。

#### E. 結論

1. 骨髄に見出される幹細胞は骨格筋衛星細胞およびその下流にある筋芽細胞と融合することにより筋細胞に分化する。
2. Osteopontin は筋再生の過程において重要な役割を果たす。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

<英文>

1. Takeda S and Miyagoe-Suzuki Y: Gene Therapy for Muscular Dystrophies: Current Status and Future Prospects *BioDrugs* 15: 635-644, 2001
2. Hoshino S, Ohkoshi N, Ishii A, Kameya S, Takeda S, and Shoji S: The expression of dystrophin and  $\alpha$ 1-syntrophin during skeletal muscle regeneration *J Muscle Res Cell Motil* 22: 185-191, 2001
3. Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, and Takeda S: Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin  $\alpha$ 2 chain-null mutant (*dy<sup>3K</sup>/dy<sup>3K</sup>*) mice *Glia* 35: 101-110, 2001
4. 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* 15(7): 1279-1281, 2001
5. Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, Kaga K, Kondo S, Morita S, Kitamura T, Matsuda R: Negamycin can restore dystrophin in *mdx* skeletal muscle *Acta Myologica* XX: 154-158, 2001
6. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K:

- Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification  
*Developmental Biology* 241(2):313-26, 2002
7. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirohani K, Takahashi K, Tabira T:  
Proapoptotic effect of presenilin2 overexpression is mediated by downregulation of Bcl-2 in cultured neurons  
*J Neurochem* 79(6) 1161-8, 2001
  8. Nakagawa M, Ikezoe K, Miyagoe-Suzuki Y, Nonaka I, and Takeda S:  
Increased membrane permeability in early postnatal period of laminin  $\alpha 2$  chain-null mice,  $dy^{3K}/dy^{3K}$   
*Acta Myologica* XX: 167-173, 2001
  9. Miyagoe-Suzuki Y, and Takeda S:  
Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with  $\alpha 1$ -syntrophin at the sarcolemma  
*Microscopy Research and Technique* 55: 164-170, 2001
  10. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:  
Interleukin-6 Induces Over-Expression of the Sarcolemmal Utrophin in Neonatal *mdx* Skeletal Muscle  
*Human Gene Therapy* 13: 509-518, 2002
  11. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H:  
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice  
*J Cell Sci* 115: 1285-1293, 2002
  12. Inobe M, Inobe I, Adams G R, Baldwin K M and Takeda S:  
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle  
*J Appl Physiol* (in press)
- < 和 文 >
1. 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
  2. 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
  3. 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
  4. 武田伸一、松尾雅文：  
IV. 筋ジストロフィーの臨床と基礎の最前線：  
責任遺伝子の解明とその臨床応用  
脳と発達 33: 221-223, 2001
  5. 武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療の展望  
神経治療学 18(5/6): 475-480, 2001
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 吉田邦広、武田伸一：  
ジストロフィノパチーによる X 連鎖性拡張型心筋症  
日本臨床 領域別症候群 35: 23-27, 2001
  10. 中村昭則、武田伸一：  
ジストロフィノパチーを伴うグリセロールキナーゼ欠損症  
日本臨床 領域別症候群 35: 28-30, 2001
  11. 武田伸一：  
遺伝性筋疾患を巡る進歩—原因遺伝子の追究と分子病態の解明から分子治療へ  
最新医学 増刊 臨床遺伝子学'01 2182-2194, 2001
  12. 中川雅裕、武田伸一：  
その他の筋ジストロフィー  
小児内科 増刊 33: 750-1, 2001
  13. 吉村まどか、武田伸一：

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

神経内科 56: 18-24, 2002

14. 尾嶋孝一、武田伸一 :

筋疾患の遺伝子・再生治療,  
神経・筋疾患の最新医療, 先端医療技術研究所, pp241-246, 2001

II. 学会発表

1. Takeda S, Fujimori K, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Hosaka Y:

Interleukin-6 up-regulates utrophin expression in mdx skeletal muscle.

American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, May 30-June 3, 2001

2. Takeda S, Fujimori K, Sakamoto M, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y:

New therapeutic approaches of muscular dystrophy.

4<sup>ème</sup> Colloque Franco-Japonais sur les Dystrophies Musculaire: progrès vers la thérapie, Paris, France, 15-16 June, 2001

3. 武田伸一 :

筋ジストロフィーに対する治療法の進展

第 42 回日本神経学会総会 東京; 2001 年 5 月 13 日

4. 武田伸一 :

筋ジストロフィーの遺伝子治療の展望

第 19 回日本神経治療学会 東京; 2001 年 6 月 28 日

5. 武田伸一他 :

Administration of interleukin-6 up-regulates the sarcolemmal utrophin in neonatal mdx skeletal muscle

第 7 回日本遺伝子治療学会 東京; 2001 年 7 月 7 日

6. 湯浅勝敏他 :

Enhanced immune response inhibits long-term expression of transferred gene products in adeno-associated virus (AAV) vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient mdx skeletal muscle.

第 7 回日本遺伝子治療学会 東京; 2001 年 7 月 7 日

7. 武田伸一 :

筋疾患の再生と治療への展望

第 18 回小児神経筋疾患懇話会 東京; 2001 年 8 月 25 日

8. 伊藤由佳、藤盛圭太、鈴木友子、吉崎和幸、山元弘、武田伸一 :

IL-6 投与による mdx マウス骨格筋におけるユートロフィンの発現増強

第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001 年 12 月 9 日

9. 平田彰、増田智、鈴木友子、鎌倉恵子、武田伸一 :

cDNA array を用いた骨格筋変性再生過程における遺伝子発現変化の検討

第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001 年 12 月 9 日

10. 坂本美喜、湯浅勝敏、吉村まどか、横田俊文、田内亜紀、鈴木友子、武田伸一 :

短縮型ジストロフィン遺伝子は mdx マウスの表現型を改善する

第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001 年 12 月 10 日

11. 横田俊文、保坂幸男、宮越(鈴木)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は筋再生過程において神経筋接合部の異常及び筋肥大を呈する

第 24 回日本分子生物学会年会 横浜; 2001 年 12 月 12 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

筋ジストロフィー治療のための幹細胞移植法の基礎研究  
分担研究者 山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 遺伝性筋疾患、特に筋ジストロフィーの治療のために、幹細胞移植による再生医学的治療法の開発を目的とした研究を進めた。本研究のマウス実験系ではいくつかの新しい知見が得られたものの、ドナー細胞の筋再生への寄与率が低いこともわかった。前駆細胞の新たな濃縮法の開発や、筋再生における細胞性機構の解析が重要であり、今後改良すべき点が明らかになった。

### A. 研究目的

近年、骨髄中に骨格筋細胞に分化できる細胞が存在することが明らかにされ、骨髄移植法により筋ジストロフィーを治療できる可能性が示唆されるようになった。Ferrari らは、免疫能を欠損したマウスに筋再生を誘導し、同時に骨髄細胞を移植すると骨髄由来細胞が再生筋中に見つかること(1998)、また Gussoni らは、放射線照射した *mdx* マウスに骨髄移植することで、ジストロフィン陽性の筋が再生することを報告し(1999)、骨髄移植による筋ジストロフィーの治療法が一躍注目を集めるようになった。しかし、筋再生に参加するドナー細胞の数は極端に少なく、全身性の骨格筋疾患である筋ジストロフィーを治療するには、まだ道のりは遠いと言わざるを得ない。

われわれは、標識マーカーとして GFP 遺伝子を導入したマウスを用いて、骨髄細胞移植による筋再生のための新しい再構築実験系の確立を試み、これまでの報告を検証するとともに、より効率のよい移植法を目指して筋ジストロフィー治療のための開発的基礎研究を進めた。

### B. 研究方法

GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子導入マウス由来骨髄細胞（成マウス）、胎児肝細胞（胎齢 14-15 日）をドナー細胞に用いた。宿主マウスは、*mdx* マウスもしくは正常 C57BL/6 マウスを用いた。骨髄細胞や胎児肝細胞は常法に従い調製した。

キメラマウスは 2 種類の方法で作成した。放射線骨髄キメラマウスは、<sup>137</sup>Cs 線源による 10 Gy のガンマ線を 8 週齢の成雄 *mdx* マウスに照射し、

照射後 3 時間以内に  $40 \times 10^6$  個の骨髄細胞を尾静脈より投与した。新生児キメラマウスは、妊娠 17-18 日目の母マウスに busulfan (20-40 mg/kg) を腹腔内投与しておき、出産させ、生後 16 時間以内に  $2-5 \times 10^6$  個の骨髄細胞、もしくは  $0.2-0.5 \times 10^6$  個の胎児肝細胞を肝内投与した。

一定時間経過後に、前脛骨筋 (ATM) を採取して凍結切片を作成し、パラフォルムアルデヒド固定後、H-E 染色、免疫組織化学的検索とともに、GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

筋繊維培養は、新生児キメラマウス骨格筋を Rosenblatt らの方法に順じ培養した。またケモカイン発現については RT-PCR 法で検索した。

本研究は全てマウスなどの実験動物を用いた研究であり、大阪大学動物実験指針、ならびに大阪大学大学院薬学研究科動物実験倫理問題検討委員会規定に沿ったものであり、上記委員会で承認を得て研究を実施した。

### C. 研究成果

#### 1: キメラマウスでの解析

*mdx* マウスを宿主、GFP マウス骨髄細胞をドナーとした放射線キメラマウスにおける ATM での GFP 陽性筋繊維は、1-2 % 検出できた。

新生児キメラマウスは、新生児期にドナー細胞を投与するという手法をとるため、ドナー細胞に対する免疫学的寛容状態を誘導できる。新生児キメラマウスの場合であっても、またドナー細胞を骨髄細胞、胎児肝細胞を用いても、GFP 陽性筋繊維の出現率は、たかだか 1-2 % であった。

新生児キメラマウスをもちいて、骨髄細胞、胎

児肝細胞中の前駆細胞数の頻度を計算したところ、胎児肝細胞の方が10-30倍程度頻度が高いことがわかった。

## 2: 正常な筋形成への前駆細胞の関与

新生児キメラマウスのATMを検索する過程で、正常な筋形成過程でドナー細胞が参加していることが判った。すなわち、キメラマウス正常筋中に、GFP陽性筋、GFP陽性単核細胞が検出できた。そこで、筋繊維培養を試みたところ、GFP陽性、デスミン陽性の単核細胞が見つかった。キメラマウス正常筋から単核細胞を採取し、*mdx/scid* マウスに移植したところ、GFP陽性筋が検出できた。以上の結果は、ドナー細胞が筋衛星細胞として筋肉中に分布している可能性を強く示唆している。

## 3: 筋前駆細胞の濃縮法

ドナー細胞の筋再生への寄与率が低いことは、臨床応用の際の大きな障害となる。そこで、筋前駆細胞を選択的に濃縮するために、マウス筋芽細胞株C2/4を免疫して、モノクロナル抗体の作成を試みた。現在、組織染色で筋衛星細胞に反応する抗体が得られており、更なる解析を進めている。

## 4: 筋が発現するケモカインの解析

筋発達時(出生直前から新生児期)にドナー細胞を投与すると、筋前駆細胞が筋に見つかることから、筋発達時に細胞移植する方法が有効であると思われる。そこで発達中の筋に前駆細胞を呼び寄せる因子があることを想定して、種々のケモカインを検索した結果、SDF-1 $\beta$ をその候補の一つとして同定した。SDF-1 $\beta$ は、正常筋には検出できず、発達途中の筋に発現が認められた。

## 5: 筋再生の効率と単球の関連性

筋再生が効率的に進むには、単球による障害筋の除去過程が必要であると考えられる。そこで、単球系細胞の役割を明らかにすることを目的に、単球分化に異常を来すマウス(*op/op*)を*mdx*と交配し、*op/mdx*を作成した。また抗c-fms抗体投与による単球除去実験も同時進行している。これらマウスについて組織検索を進める予定である。

## D. 考察

筋再生のためのマウス実験系を検討し、新生児キメラマウスがよりすぐれた実験系となることが判った。しかし筋再生へのドナー細胞の寄与率は依然として低く、前駆細胞の濃縮法の改良やケモカインの解析が必要であることがわかった。これら問題点を解決する目的で、モノクロナル抗体の

作成、ケモカインの同定とその役割を解析する準備を進めている。一方、再生筋での単球の役割を明確にするために、単球欠損マウス*op/mdx*を作成し、また抗c-fms抗体投与による単球除去も同時進行させている。

## E. 結論

1. 筋再生へのドナー細胞の寄与率を上げること、
2. 筋再生の細胞性機構の更なる解析から、より効率の良い手法を開発していくこと、の2点が重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tsujikawa, K., et al. Distinct functions of the two protein tyrosine phosphatase domains of LAR on tyrosine-dephosphorylation of insulin receptor. *Mol. Endocrinol.*, 15:271-280, 2001.
2. Hamada, H., et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.*, 168:65-72, 2002.
3. Miyauchi, K., et al. Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor. *Neuropeptides*, (in press) 2002.
4. Fujimori, K., et al. Interleukin-6 induces over-expression of the sarcolemmal utrophin in neonatal *mdx* skeletal muscle. *Human Gene Therapy*, (in press) 2002.
5. Fukada, S-I., et al. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Science*, 115:1285-1293, 2002.
6. Nishiyama, Y., et al. Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes. *J. Immunol.*, 168:2626-2633, 2002.

### 2. 学会発表

1. 深田宗一朗, 他, 骨髄細胞を用いた筋ジストロフィー治療の基礎研究, 日本薬学会第121年会 3.29, 2001
2. Fukada, S-I., et al. Muscle regeneration by the bone marrow or fetal liver cells from GFP-Tg mice. FASEB Summer Seminar, "Muscle Satellite and Stem Cells", Tucson, AZ, USA, 7.14-19, 2001.
3. 樋口才飛, 他, 骨髄移植による遺伝性筋疾患の治療研究, 第51回日本薬学会近畿支部大会, 10.28, 2001
4. 平野あずみ, 他, IL-12p40鎖を組み込んだ発現ベクターによる細胞性免疫の抑制, 第51回日本薬学会近畿支部大会, 10.28, 2001



## 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** 近年各種臓器の幹細胞の研究の一環として、骨髄から筋へ分化する能力を有する幹細胞の存在が指摘されている。我々はこれに先立ち、ウイスターラット骨髄と胸腺より筋分化能を有する筋の幹細胞をクローン化樹立している。クローン化骨髄由来筋芽細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ十余株を作成し筋—骨髄血球系細胞との相異、種差を超えた骨髄由来筋幹細胞共通分化抗原等の解析を目標に、一部モノクローナル抗体の特異性の解析を行った。一方胸腺の筋様細胞前駆細胞が新規のサイトカインを産生し、その数も増加しており、これらのサイトカインが正常閾値を超えた際に自己免疫疾患重症筋無力症発症が起こることが示唆された。

#### A. 研究目的

近年、各器官には幹細胞が存在し、これを治療の観点から、利用する試みがなされている。従来血球系の造血器官としてのみ注目されてきた骨髄や、胸腺に近年我々は、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見出し報告してきた。筋分化、筋疾患治療の観点からその重要性が指摘されている。このような細胞はストロマ由来なのか、ストロマ血球系と共通のへマンギオブラスト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ことが考えられるので、前年度に引き続き本年度はヒトへの応用を考慮し、この幹細胞の有効な検索子となる特異分化抗原認識モノクローナル抗体を作成する。一方これまで、胸腺から樹立した筋様細胞前駆細胞は多種のサイトカインプロデュサーとしての作用が確認されている。これらのサイトカインが、オートクライン的に産

生されそれ自身の分化増殖因子として、またはパラクライン的に分泌され周辺細胞の分化増殖に影響する事が考えられる。本年度は胸腺筋様細胞の分化増殖因子の作用についてもあわせて検討する。

#### B. 研究方法

モノクローナル抗体の作成：ラット骨髄由来筋幹細胞株を Balb/c マウス尾静脈、腹腔に頻回免疫し、この動物から脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞と定法通り融合し、ハイブリドーマを樹立。標的細胞を 96 well plate に培養し標的抗原として、クローン化を行った。標的抗原にはラット由来筋分化能を有する細胞 4 種と、アストロサイト、胸腺上皮細胞をそれぞれ一種用いた。胸腺筋様細胞の分化増殖因子のアッセイ：骨髄系継代細胞 NFS-60 を筋様細胞上清依存性に順化し、増殖アッセイに使用。

#### C. 研究結果

昨年来ラット骨髄筋幹細胞と反応するクローンを 18 株樹立した。これらクローンの特異性並びに、交差性反性を調べた。すべ

でのクローンは多少の反応性に差があるものの6種の抗原細胞と反応することから、ラット細胞に共通した抗原を認識した抗体が得られていると考えられる。さらにパネル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 80-kDa、100-kDa 因子を含め、多種のサイトカインを産生する。重症筋無力症ではこの筋に分化する能力を有する前駆細胞が多数増加していることをみいだした。これらの細胞からは正常閾値を超えて、多くのサイトカインが産生され、胸腺内の AChR に対する自己免疫反応を引き起こすサイトカインフィールドを形成することを見出した。

#### 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、既存の血球系幹細胞固有の 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。胸腺筋様細胞はアセチルコリン受容体発現ばかりでなく、種々のサイトカインを産生していることが判明した。胸腺摘出が極めて高い治療効果を示すのはこの様な異所性の筋幹細胞の異常増加と密接に関係していると考えられる。この様な筋様細胞が発生的に骨髄の筋幹細胞とどのような関係にあるのか、分化抗原の解析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18株の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い、特異性の高いものをスクリーニングしている。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。一方胸腺の筋様細胞前駆細胞は種々のサイトカインを産生し、その閾値を超えた産生が特有のサイトカインフィールドを形成し、このフィールドに入ったT、B細胞を活性化し、自己免疫発症を誘導すると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:  
Analysis of B-cell proliferation mechanism in MG thymus hyperplasia,  
J. Neuroimmunol. 118:156-156, 2001.

Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.:  
Potential roles of 80-kDa and 100-kDa haemopoietic factor in brain physiology,  
J. Neuroimmunol. 118:28-28, 2001.

Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I.:  
Immunohistochemical study of cytokines in the MG thymus hyperplasia,  
J. of Neuroimmunol. 118: 161-161, 2001

Kikuchi, A. and Kamo, I.:  
B-cell and myelocytic cell stimulatory roles of biglycan,  
Submitted, 2001

##### 2. 学会発表

加茂功、友安浩、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60回日本癌学会総会、横浜、2001、9、26

菊池愛子、加茂功  
新規 80 kDa 造血因子の多機能性・共同作用に関する研究  
第74回日本生化学会大会、京都、2001、10、

友安浩、谷村繁雄、河野匡、加茂功、菊池  
愛子

重症筋無力症胸腺内抗アセチルコリンレセ  
プター抗体産生機構に関する研究  
第54回日本胸部外科学会総会、大分、2001、  
10.27

Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:  
Analysis of B-cell proliferation mechanism in  
MG thymus hyperplasia,  
6th International Congress on

Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.

Kikuchi, A., Tomoyasu, H. and Kamo, I.:  
Potential roles of 80-kDa and 100-kDa  
haemopoietic factor in brain physiology,  
6th International Congress on  
Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.

Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I.:  
Immunohistochemical study of cytokines in the  
MG thymus hyperplasia,  
6th International Congress on  
Neuroimmunology, Edinburgh, UK, 9. 4, 2001.

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、dystoglycan 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昨年検討し再生に際し dystoglycan complex (DG)が重要な役割を果たすことを証明した。今回は、後根神経節内における dystoglycan complex (DG)の分布、ラットの発育過程における dystoglycan complex (DG)の動態を検討した。

後根神経節内の  $\beta$ -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。 $\beta$ -DG は神経節細胞を囲む satellite cell 周囲に存在し、基底膜直下に存在した。このことから、神経節細胞と satellite cell の関係は軸索と Schwann 細胞の関係と同様であることがわかった。一方、ラット末梢神経での dystoglycan complex (DG)発現の過程を胎児期、出生直後、生後3日、生後7日で生化学的、形態学的に検討した。dystoglycan complex (DG)は生後7日までに発現し、その後は変化のないことがわかった。Dystoglycan complex (DG)は髄鞘化に関与しており、Laminin の動態も  $\beta$ -DG と平行した。 $\beta$ -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いう仮説が更に証明された。

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、dystoglycan complex (DG)が存在する。DG は  $\alpha$ -DG と  $\beta$ -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  $\alpha$ -DG は細胞外で laminin-2(Schwann 細胞基底膜成分)と  $\beta$ -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。昨年度、我々は  $\alpha$   $\beta$ -DG は有髄神経、無髄神経ともに Schwann 細胞で発現し、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することを証明した。切断後の軸索変性過程では dystoglycan complex (DG)は down-regulate し、軸索再生時の髄鞘形成に従

い up-regulate され Laminin- $\alpha 2$  の発現も軸索変性、再生時に  $\beta$ -DG と平行した。

今回は後根神経節細胞と satellite cell における dystoglycan complex (DG)と laminin の分布、ラット発生から発育時の DG complex と laminin の動態を生化学的、形態学的手法を用いて検討した。

B 研究方法

1) 12-13 週の Wistar rat を灌流固定後、L5 の後根神経節を取り出した。免疫蛍光組織化学と immunoblotting による検討を行った。免疫組織化学、immunoblotting には  $\beta$ -DG、Dp116、laminin- $\alpha 2$  への抗体を用いた。

2) 胎生 18 日、出生直後、3日、7日、28 日の坐骨神経を採取した。この凍結標本を immunoblotting による検討、免疫組織化学による検討に用いた。固定した標本は電顕による検討に用いた。 $\beta$ -DG、Dp116、laminin- $\alpha$