

20020920

厚生労働科学研究費補助金
(こころの健康科学研究事業)

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成15年(2003)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	----- 11
武田 伸一	
2. 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	----- 15
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盤的研究	----- 17
鎌倉 恵子	
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礎研究	----- 19
加茂 功	
5. 骨格筋における再生機構の解明に関する研究	----- 22
林 由起子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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
	鎌倉恵子	防衛医科大学第3内科 助教授
	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
	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. 骨格筋の SP 細胞をソーティング及び特異抗体を用いた免疫組織学的染色により解析し、筋衛星細胞とは異なる population であることを明らかにした。
2. 骨髄細胞及び骨髄 SP 細胞をマウスに移植して検討した結果、再生の初期に骨髄細胞が骨格筋に流入することが判明した。
3. 筋前駆細胞の新たな濃縮法の開発のために、筋前駆細胞を認識するモノクロナル抗体の作成を試みた結果、新規抗体 SM/C-2.6 を得た。
4. 筋再生の分子機構を追究するために cardiotoxin の注入を用いた筋再生系を cDNA array を用いて解析し、osteopontin の発現が特異的に増加していることを明らかにした。
5. 胸腺の筋様細胞前駆細胞が産生する新規のサイトカインの一つがバイグリカンであることを同定し、過剰発現が重症筋無力症を発症することを見出した。
6. 再生が分子病態の上で重要な役割を果たす dysferlinopathy について、その頻度、臨床分子病理学的特徴をまとめた。

A. 研究目的

筋ジストロフィーについては、原因遺伝子が明らかにされ、病態の研究が進んでいるにもかかわらず、根治的な治療法がない。現在、進められている遺伝子治療法の開発では、安全で効率の高い遺伝子導入を行う上で問題が多い上に、当面局所の治療に留まる。

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いわざるを得ない。

そこで、主任研究者の武田は分担研究者の山元と協力して、骨格筋に分化する幹細胞の性質を明らかにし、幹細胞移植による筋構築実験系の確立を試みた。

一方、主任研究者の武田は分担研究者の鎌倉と協力して、移植した細胞が効率よく生着する微小環境の条件即ち筋再生の分子機構を解明することを試みた。幹細胞が骨格筋に取り込まれるためには筋再生を必要とするからである。再生については satellite cell に関係した研究が多数存在するが、サイトカインに注目したものは少ない。特に、どのサイトカインが骨格筋への幹細胞の誘引に関与しているかが期待される。特に武田らは既に

cardiotoxin の注入を用いた再現性の高い筋再生系を確立している。cardiotoxin は satellite cell、神経、血管に障害が少なく、基底膜を温存するため、再現性のよい筋変性・再生過程を観察することができる。この cardiotoxin を用いた骨格筋再生のモデルで cytokine 遺伝子の発現変化の検討を行った。

一方、分担研究者の加茂は以前から、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、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。前年度に引き続き本年度も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の解析を行う、一方これまで、このような幹細胞が如何にして自己複製と分化能力を有するのかその機構は不明な点が多い、胸腺から樹立した筋様細胞前駆幹細胞は多種サイトカインを産生していた。これらのサイトカインが、オートクライムの産生されそれぞれ自身の分化増殖因子として、またはパラクライムの産生され周囲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詳細な作用について検討する。

最後に、分担研究者の林は、これまで筋ジストロフィーの分子病態における再生の役割を検討してきたが、今年度は特に先天性筋ジストロフィーと肢帯型筋ジストロフィーについて検討を行った。

8. 研究方法

1. 骨格筋に分化する幹細胞の解明 (武田、山元)

(1) 骨格筋 SP 細胞の調整と解析

骨格筋をコラゲナーゼで処理して、単核細胞を回収し、ヘキスト色素で染色し、SP 細胞を FACS でソーティングした。また、CD31, CD45, Sca-I, c-kit 等の発現を同時に解析した。SP 細胞の色素排出能を担う BCRP-1 に対する抗体を作製し、再生筋および通常の骨格筋切片を免疫染色した。更に、CTX 投与後 3 日、5 日及び 7 日後の再生骨格筋から、単核細胞を調整し、FACS で解析した。また、ソーティングした SP 細胞を、in vitro で MethoCult TM で培養し、一部は NOD/Scid マウスの前脛骨筋に移植した。

(2) in vivo 骨髄移植実験

C57Bl/6 マウスに 5-10Gy の放射線を当て、GFP トランスジェニック マウスの骨髄細胞あるいは骨髄 SP 細胞を経静脈的に移植した。骨髄における

キメリズムを決定し、一方の前脛骨筋に CTX を打って筋再生を引き起こした後に、骨格筋における GFP 陽性筋線維の出現率を抗 GFP 抗体で検討した。

(3) 胎児肝細胞移植実験

GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子導入(GFP-Tg)マウス由来骨髄細胞、胎児肝細胞をドナー細胞に用いた。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、10 Gy の γ 線を成雄マウスに照射し、照射後 3 時間以内に骨髄細胞を移植した。新生児キメラマウスは、妊娠母マウスに busulfan を腹腔内投与しておき、生後 16 時間以内に骨髄細胞、もしくは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、免疫組織化学的検索とともに、GFP 蛍光を観察した。筋繊維培養は、新生児キメラマウス骨格筋を用いて、Rosenblatt らの方法に準じた。

(4) モノクローナル抗体作成と筋前駆細胞の濃縮

マウス筋芽細胞株 C2C12 をラットに免疫し、モノクローナル抗体を作成した。クローンは、C2C12 への反応性と筋免疫組織化学的手法を組み合わせることで選び、SM/C-2.6 抗体を樹立した。次に SM/C-2.6 抗体を用いた cell sorting 法によって、マウス筋から SM/C-2.6 陽性細胞を単離した。さらに SM/C-2.6 陽性細胞を培養し、筋への分化を in vitro で調べた。また GFP-Tg マウス由来 SM/C-2.6 陽性細胞を mdx マウスに移植し、in vivo での筋分化を観察した。更に Flow cytometry 法で、SM/C-2.6 陽性細胞が持つ表面マーカー抗原を検索した。

2. 筋再生の分子基盤 (武田、鎌倉)

Cardiotoxin をラットの前脛骨筋に注射し 48、96 時間、及び 7 日後に mRNA を抽出した。Reverse transcriptase 反応にて ^{32}P -radiolabelled cDNA probe を作成し、522 個の cytokine cDNA を含んだ array membrane (R & D systems) へと hybridize し、 ^{32}P の信号を測定、対側筋の信号と比較定量した。増加していた cytokine 遺伝子について cardiotoxin 注射後 48-96 時間後の筋を用いて、免疫組織化学的手法を用いて確認をした。

3. 多能性幹細胞の制御機構 (加茂)

(1) 多能性幹細胞を認識する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、脾臓細胞とマウスミエローマ

細胞を定法通り融合し、ハイブリドーマを樹立。R613BM 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。陽性クローンをさらに、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、特異モノクローナル抗体の同定につとめた。

(2) 胸腺筋様細胞の分化増殖因子のアッセイ

造血因子の精製は骨髓系継代細胞 NFS-60 を用い、トリチュームチミジンの取り込みによる増殖アッセイで行った。造血因子の免疫機能に対する作用は T 細胞の欠落しているヌードマウスの脾臓細胞による *in vitro* の抗体産生法を利用し、調べた。

4. 筋ジストロフィーの病態における再生の関与 (林)

筋ジストロフィーの中でも特に強い筋障害を生後早期に呈する先天性筋ジストロフィー (CMD) と頻度の高い肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) を中心に、ヒト生検骨格筋を用い筋ジストロフィー関連タンパク質並びに筋壊死・再生にかかわる因子の発現および遺伝子変異の検索を行い、病態との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた研究については、各施設で定められた実験指針に従って、実験計画を作成して各施設に設けられた動物実験倫理問題検討委員会に提出し、審議、了承を受けた上で実施している。ヒト組織を用いる研究については、必要なインフォームドコンセントの得られたものに限り、匿名化した上で使用した。

C. 研究成果

1. 骨格筋に分化する幹細胞の解明 (武田、山元)

(1) 骨格筋の SP 細胞

骨格筋 SP 細胞の表面マーカーを解析すると、95% 以上の骨髓 SP が CD45 を発現しているのに対し、骨格筋 SP は CD45 陰性の分画が 80-90% と多かった。これらの CD45-SP 細胞を更に CD31 を使って、さらに 4 つの分画に分けることができた。また、SP 細胞のマーカーとして有効であると考えられる *Bcrp-1* に対する抗体を作製し、正常骨格筋と再生過程にある骨格筋を免疫染色すると、*Bcrp-1* 陽性細胞は、筋線維と筋線維の間の間質、あるいは血

管に沿って認められ、筋衛星細胞とは異なる細胞であることが確認された。骨格筋 SP 細胞が、筋再生時に増殖している像が認められた。筋再生時に骨格筋 SP が増殖するかを検討するために、CTX を打った後の細胞を FACS で検討すると、CD45+SP 及び CD45-SP 共に再生過程で増加しており、CD45-CD31-の SP 細胞が特に増加していることが明らかになった。現在これらの SP subpopulation をマウスに移植して、その分化能を検討中である。

(2) *in vivo* 骨髓移植実験

GFP 陽性骨髓 SP 細胞を移植したマウスにおいて、骨格筋に生着した単核細胞を FACS で検討したところ、多くは CD11b 陽性細胞であった。また、GFP 陽性の SP 細胞が認められ、それらの細胞は CD45 陽性であった。よって、CD45 陽性の骨格筋の SP 細胞は骨髓 SP 細胞に由来する可能性が高い。CD45 陽性骨髓 SP 細胞を移植したマウスにおける GFP 陽性骨格筋線維を蛍光及び、抗 GFP 抗体による免疫染色で検索したところ、頻度は低いが、全骨髓を移植したマウスと同様に GFP 陽性線維が認められた。筋再生刺激を与えて再生した筋においてその陽性率が高く、骨髓 SP 細胞は、筋再生の過程で筋細胞へ分化すると考えられた。筋衛星細胞の位置には GFP 陽性細胞は認められなかったので、骨髓 SP 細胞が筋衛星細胞に分化する頻度は極めて低いと考えられる。

(3) 胎児肝細胞移植実験

mdx マウスを宿主とした放射線キメラマウスでは、GFP 陽性筋繊維は、1-2 % であった。新生児キメラマウスの場合でも、またドナー細胞に骨髓細胞、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 % しか検出できなかった。骨髓細胞、胎児肝細胞中の前駆細胞数の頻度を計算したところ、筋前駆細胞の含量は胎児肝細胞の方が 10-30 倍程度高いことがわかった。新生児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。筋繊維培養でも GFP 陽性、*desmin* 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。これらの結果は、ドナー細胞が筋衛星細胞として筋肉中に分布した可能性を強く示唆している。

(4) 筋前駆細胞の濃縮

筋前駆細胞を濃縮し、ドナー細胞の筋再生への寄与率を高めるために、マウス筋前駆細胞を認識す

る SM/C-2.6 モノクロナル抗体を作成した。

SM/C-2.6 抗体は、骨髄細胞の約 10% に反応したため、骨髄中の筋前駆細胞のみに反応しているわけではないことが推定された。筋免疫組織化学的検索では、SM/C-2.6 抗体は骨格筋のラミニンの内側にあって筋繊維の外縁に存在する単核細胞に反応性を示し、唯一知られている筋衛星細胞抗原、M-cadherin の染色と一致した。この位置は、筋衛星細胞が存在する場所である。骨格筋繊維の single fiber culture 法でも、fiber に付着し M-cadherin 陽性の単核細胞を染色した。以上の結果は、SM/C-2.6 抗体が筋衛星細胞に反応していることを強く示唆する。新生児マウス骨格筋から SM/C-2.6 陽性細胞を単離し、4 日間増殖培養した。SM/C-2.6 陽性細胞は筋分化の調節に関わる核内因子 MyoD を発現したが、陰性細胞には MyoD の発現は認められなかった。SM/C-2.6 陽性細胞を 11 日間分化培養すると、desmin 陽性の筋管の形成が認められ、MyoD 陽性の核が筋管に沿って並んでいる様子が観察された。陰性細胞は筋管を形成しなかった。GFP-Tg マウス由来 SM/C-2.6 陽性細胞を単離し、mdx マウス前脛骨筋に移植したところ、GFP 陽性の筋繊維の形成が認められた。陰性細胞では筋繊維の形成は全く認められなかった。

SM/C-2.6 陽性の筋衛星細胞を種々の抗体で染色し、Flow cytometry 法で染色パターンを解析した。その結果筋衛星細胞は、c-kit、Sca-1、CD45、CD34⁺ であることを確定した。

2. 筋再生の分子基盤 (武田、鎌倉)

48 時間後では 40 個の遺伝子が 5 倍以上発現増加を示していた。この中で osteopontin(OPN) が最も増加していた。96 時間後では 64 個の遺伝子が 5 倍以上発現が増加していた。IGF-1、-2 といった satellite cell 増加に関与する遺伝子もこの時点では up-regulate していた。96 時間後も OPN の発現増加は著明であった。更に、OPN タンパク質についてはその発現変化が、cDNA array とほぼ同一な変化であることをノーザンブロットでも確認した。OPN について免疫組織化学を行うと、24 時間以降より OPN 免疫染色性が観察され、48 時間後では壊死巣と正常巣との境界領域で OPN の強い染色性がみられた。浸潤した単核球及びその浸潤を受けている筋線維で染色性が認められた。単核球の浸潤していない、壊死線維では OPN 染色性はみられ

なかった。筋注 7 日後では OPN 染色性は認めなかった。

3. 多能性幹細胞の制御機構 (加茂)

- (1) 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を抗原とし 18 種のモノクローナル抗体産生細胞株を樹立した。
- (2) 6 種の細胞を用いて特異性の幹細胞特異抗体をスクリーニングした。
- (3) 重症筋無力症胸腺に於ける B 細胞増殖と筋幹細胞増殖との関連を胸腺由来の筋幹細胞を用い、新規造血因子 80-kDa、100-kDa の造血性パイグリンを含め、多種のサイトカインを産生することを見出した。さらに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から、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、胸腺内での 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し、B 細胞を活発に増殖させると考えられる結果を得た。
- (4) そこで、この胸腺内に産生されるサイトカインを同定したところ、T 細胞のサイトカインは IL-2 のみが単独で産生され、他には筋様細胞のサイトカイン特に、造血性パイグリンの産生が見られた。
- (5) ノードマウス脾臓細胞による in vitro 抗体産生系を用いて、これら二因子の作用を調べたところ、それぞれ単独では微弱な抗体産生誘導能しか発揮しないが、両者の組み合わせで、数百倍にもものぼる著しい相乗効果があることをはじめて見出した。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が抗原である AChR と造血性パイグリンのようなサイトカインを胸腺局所に産生することにより胸腺を抗体産生 B 細胞増殖の主要機関に変化させているためと考えられることを実験的にも証明できた。

4. 筋ジストロフィーの病態における再生の関与 (林)

(1) 先天性筋ジストロフィー

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は我が国特異的な疾患で中枢神経障害を伴う重症の CMD である。我々は FCMD 類縁疾患である muscle-eye-brain 病(MEB)、Walker-Warburg 症候群(WWS)、LGMD2I 型の遺伝子変異を同定し、またその骨格筋においても細胞表面膜蛋白質 α -dystroglycan (α -

DG)の糖鎖修飾異常が認められることを報告した。

(2) 肢帯型筋ジストロフィー

LGMD2B および三好遠位型ミオパチー(MM)はともに *dysferlin* 遺伝子の異常による疾患であるが、筋障害部位は同一家族内でも異なっている。我々は本邦 *dysferlinopathy* 患者について *dysferlin* 蛋白質の発現と遺伝子変異の検索をおこなった。その結果 LGMD2B が本邦の LGMD の中でも2番目に頻度の高い疾患であることをみだし、また、本邦で頻度の高い遺伝子変異の同定、遺伝子変異と臨床像との関連について報告した。

D. 考察

1. 骨格筋に分化する幹細胞の解明 (武田、山元)

骨髄 SP 細胞は骨髄移植すると骨格筋の再生に関与する事がわかったが、その効率は低い。今後は我々の *in vitro* および *in vivo* の系を用いてその効率を高める分子を探す必要がある。また、骨髄細胞を移植する際には、より効率的に骨髄あるいは末梢血液から幹細胞を骨格筋にリクルートし、筋分化を誘導する因子が重要であると考えられるが、我々が分担研究者の鎌倉と共に行った cDNA cytokine array 解析において再生筋で発現が増加しているものの中に、その候補があると考えられる。今後その検討を行っていきたい。今回、我々の解析から、骨格筋 SP 細胞には、様々な活性を持つ数種類の細胞が混在していると考えられる。今後はこれらの細胞を分けて、機能解析を行っていく必要がある。

一方、マウス移植実験系の検討から、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。特に骨髄だけではなく、胎児肝臓中にも筋前駆細胞が存在すること、新生児キメラマウスでは、骨髄細胞が筋衛星細胞として正常な筋の発達に関わっている可能性を示す結果が得られた。筋発達の細胞生物学的研究の観点から、また再生医療の際の移植時期を検討するうえで興味深い。

更に、前駆細胞の濃縮法の開発を目的に、新規の興味深い抗体 SM/C-2.6 の樹立に成功した。SM/C-2.6 抗体は、免疫組織化学的検索において、また単離した細胞の *in vitro*、*in vivo* での実験において、筋衛星細胞を特異的に認識していることを明らかにした。この抗体を用いて単離した筋衛星細胞に欠損遺伝子を導入することで、筋ジストロ

フィーの治療に繋がるものと期待できる。

筋の再生は、筋肉中の幹細胞、筋衛星細胞の活性化・増殖からはじまる。筋衛星細胞は組織化学的手法から見いだされた細胞で、単独に分離同定する手法は知られていなかった。今回 SM/C-2.6 抗体を用いることで、筋衛星細胞の表面マーカー抗原を確定することに成功した。SM/C-2.6 抗体が認識する分子についてはまだ不明である。少なくとも *M-cadherin* ではないことが判っており、現在対応抗原分子の同定を目指して研究を進めている。また骨髄中の SM/C-2.6 陽性細胞についても、ほとんど解析が進んでいない。今後の重要課題である。

2. 筋再生の分子基盤 (武田、鎌倉)

500 以上の cytokine 及びその関連遺伝子について *cardiotoxin* 障害筋で検討したが、これまで骨格筋再生との関わりにおいて議論されたことのない cytokine 遺伝子の発現変化を多数検出することができた。また OPN の発現変化が最も著明であり、これについてはノーザンブロット及び免疫組織化学でも確認した。OPN の発現変化は骨格筋再生の初期よりパラレルに変化していることがわかった。OPN はリン酸化糖蛋白質でこれまでは、骨代謝での役割が知られていたが、近年きわめて多様な役割を持つ cytokine であることがわかってきている。筋再生での詳細な役割は未だ不明だが、*macrophage* や *satellite cell* を走化性因子としての役割や *macrophage* の食能へ及ぼす影響などが推測される。また、*knockout mice* で *collagen* 生成に異常があるとの報告もあることより、線維化へおよびす役割も推測される。

3. 多能性幹細胞の制御機構 (加茂)

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、特異性の高いクローンに対する抗原の生化学的特徴を解析中である。一方、胸腺の筋様細胞前駆細胞は種々のサイトカイン特に造血性バイグリカンを多量産生し、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、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。この一連の研究により、重症筋無力症発症機構と、胸腺摘出の有効性が論理的にはじめて説明できた。更に、骨髄、胸腺から見出した筋に分化する幹細胞はり

ンパ球、脂肪細胞へも分化する多分化能を有する細胞であることが判明した。特定の分化抗原の研究と、自己複製、分化に至る機構の解明が今後の課題である。

4. 筋ジストロフィーの病態における再生の関与 (林)

骨格筋の壊死・再生には細胞外基底膜と細胞間の情報伝達が重要な役割を担っていると考えられる。特に merosin と α -DG との関連は筋細胞の生存・維持に不可欠である。我々の研究成果により、FCMD のみならずその類縁疾患においても α -DG の糖鎖修飾が病態に深く関わっていることを示した。一方、筋細胞内外の情報伝達と再生機構との詳細な関連、また糖鎖の具体的機能については今後検討していく必要がある。また、中枢神経系の発生においても同様の機構が重要であることが示唆され、今後神経系の発生・発達の分野へと研究の展開されることが期待される。

また、*dysferlinopathy* の研究では、本邦における頻度とその臨床病理学的特徴をまとめた。本疾患では、活発な筋細胞壊死・再生現象が生じているが、*dysferlin* の具体的機能や疾患病態に関しては今後検討していく必要がある。

E. 結論

1. 骨髄及び骨格筋の SP 細胞は、骨格筋に移植すると骨格筋線維に分化するが、その分子メカニズムを今後解明していく必要がある。
2. 幹移植の確立のためには、移植細胞の遊走、生着、分化を促すサイトカインや細胞外マトリックス等の微小環境の研究を進めていくことが重要であると考えられる。
3. 骨髄のみならず胎児肝臓中にも筋前駆細胞が存在することを明らかにした。
4. 新生児キメラマウスでは、ドナー細胞が正常な筋形成過程に参加している可能性を示した。
5. しかし筋再生へのドナー細胞の寄与率は低く、より効率の良い手法を開発していくことが必要であることが判った。
6. 再生への寄与率を向上させる目的で、発達期のケモカインを調べ、SDF-1 β をその候補の一つとして同定した。
7. 筋衛星細胞を認識するモノクローナル抗体の作成に成功した。この抗体を用いて筋衛星細胞

が持つ表面抗原マーカー分子の一部を確定した。

8. *Cardiotoxin* の局所投与による筋変性・再生モデルを用い、発現の変化するサイトカイン遺伝子を cDNA array を用いて調べた。*Cardiotoxin* 投与 48、96 時間後の細胞浸潤の多い時期の筋では *osteopontin* (OPN) が最も増加し、OPN 抗体による免疫組織化学でも、単核球とその浸潤を受けた筋線維で強い免疫染色性がみられた。筋再生における OPN の重要な役割が推測された。
9. 骨髄幹細胞由来細胞に対するモノクローナル抗体産生細胞を樹立、さらに胸腺筋幹細胞からは造血性パイグリカンが産生されており、胸腺内 B 細胞の増殖に重要であることが判明した。
10. 先天性筋ジストロフィーの発症機序に細胞表面膜蛋白質 α -DG の糖鎖修飾が重要な役割を担っていることを示すとともに、本邦の *dysferlinopathy* の臨床分子病理学的特徴について報告した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S: Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) *Experimental Animals* (in press) 2003
2. Yuge R, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K: Simulated microgravity inhibits p38^{MAPK} cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* (in press) 2003
3. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E: Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in

- mutant mice.
Neuromuscul Disord 2003 13(3):207-15
4. Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S:
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product.
Gene Ther 9: 1576-88, 2002
 5. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S:
Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice.
Biochim Biophys Acta 1588:195, 2002
 6. Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S:
 α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration.
J Cell Biol 158: 1097-1107, 2002
 7. Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill VJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G:
Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in *mdx* mouse muscle.
Hum Mol Genet 11: 1719-30, 2002
 8. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S:
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene.
Biochem Biophys Res Commu 293(4): 1265-72, 2002
 9. 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
 10. Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and Takeda S:
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle.
J Appl Physiol 92(5): 1936-42, 2002
 11. Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, and Ikeda S:
Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in *mdx* mice hearts by physiological exercise.
FEBS Letter 520(1-3): 18-24, 2002
 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, 36:22-33, 2002.
 15. Nishiyama, Y., et al. Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes.
J. Immunol., 168:2626-2633, 2002.
 16. Tsujikawa, K., et al. Regulation of Lck and Fyn tyrosine kinase activities by transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR.
Mol. Cancer Res., 1:155-163, 2002.
 17. Kohama, Y., et al. Isolation of proliferation factor of immature T cell clone in concanavalin A-stimulated splenocyte culture supernatant.
Immunology, (in press), 2003.
 18. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:
Cytokine field of hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis,
J. Neurological Sci. 199: s95, 2002.
 19. Kikuchi, A., Kikuchi, T., Tomoyasu, H., Iwakami, N., Fukushima, T. and Kamo, I.:
Potential roles of two new haemopoietic factor in brain physiology,
J. Neurological Sci. 199: s95, 2002.
 20. Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Analysis of B-cell proliferation mechanism in the myasthenic hypertrophic thymus,
Differentiation 70: 375-375, 2002
 21. Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan and IL-2 synergistically induce antigen-specific B-cell proliferation - A potential mechanism of anti-AChR antibody production in the myasthenic thymus.

Tohoku J. Exp. Med. In press. 2003

22. Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan in Recent Research
Developments in Immunology
In press 2003, ed: *S.G. Pandali, Research
Signpost, India*
23. Driss A, et al. Fukutin-related protein gene
mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I.
Neurology (in press).
24. Tagawa K, et al. Protein and gene analyses of
dysferlinopathy in a large group of Japanese
muscular dystrophy patients.
J Neurol Sci (in press).
25. Taniguchi K, et al. Worldwide distribution and
broader clinical spectrum of muscle-eye-brain
disease.
Hum Mol Genet, 12:527-534, 2003.

< 和 文 >

1. 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
2. 武田伸一、平田 彰：
筋ジストロフィー
臨床検査 46(5): 467-478, 2002
3. 尾島孝一 武田伸一：
骨格筋幹細胞と再生移植治療
血液・腫瘍科 44(6): 442-448, 2002
4. 高橋丈二、武田伸一：
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療
医学のあゆみ 204: 174-178, 2003
5. 武田伸一、坂本美喜：
神経・筋疾患に対する遺伝子治療
Medical Science Digest 29(3): 104-108, 2003
6. 鈴木友子、武田伸一：
筋衛星細胞と多能性幹細胞からの再生
Molecular Medicine 40: 257-264, 2003
7. 吉村まどか、武田伸一：
神経変性疾患の遺伝子治療の現状
Practical Ophthalmology 91: 100-101, 2003

II. 学会発表

1. 尾島孝一、他：
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の発現パ
ターンについてについて
第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002
2. 平田彰、他：
cDNA array を用いた骨格筋変性・再生過程に

おけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の
検討

第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002

3. 武田伸一：
「筋ジストロフィーに対する治療研究の進
展」
三多摩神経懇話会 4/20, 2002
4. 平田彰、他：
cDNA array を用いた骨格筋再生過程における
サイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討
日本神経学会 札幌 5/29-31, 2002
5. 平田彰、他：
cDNA array を用いた骨格筋変性・再生過程に
おけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の
検討
第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002
6. 尾島孝一、他：
骨格筋再生過程における筋衛星細胞の動態に
ついて
第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002
7. 鈴木友子、武田伸一：
筋ジストロフィーに対する治療戦略
第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002
8. Takeda S, Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y:
IL-6 activates the *utrophin* gene transcription
through promoter A in neonatal *mdx* skeletal
muscles.
5th Annual Meeting of American Society of Gene
Therapy, Boston, USA, 6 June, 2002
9. Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y,
Tanouchi A, Yoshimura M, Yamamoto H, Li J,
Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S:
Adeno-associated virus vector-mediated gene
transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles
evokes enhanced immune response.
5th Annual Meeting of American Society of Gene
Therapy, Boston, USA, 8 June, 2002
10. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T,
Masuda S, Ikemoto T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda
S:
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic
phenotypes when introduced into *mdx* mice as a
transgene.
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7,
2002
11. Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Utrophin mRNA stability can be involved in
Utrophin over-expression in AxCALacZ-injected
neonatal *mdx* skeletal muscles.

- The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7, 2002
12. Takeda S:
Molecular therapy for Duchenne muscular dystrophy.
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Symposia, Vancouver, Canada, 9 July, 2002
 13. Hirata A, Masuda Y, Miyagoe-Suzuki Y, Kamakura K, Takeda S:
Expression profiles of cytokine and cytokine-related genes in regenerating skeletal muscle induced by cardiotoxin-injection.
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 10 July, 2002
 14. Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S:
Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-Linked muscular dystrophy.
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 11 July, 2002
 15. Takeda S:
Molecular therapies of muscular dystrophies. Invited lecture.
5th National Conference on Neuromuscular Diseases. Beijing, China. 9.17, 2002
 16. Takeda S:
New therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy: International Symposium of "Molecular Therapy for muscular Dystrophy" 11/26, 2002 東京
 17. 尾嶋孝一、他:
骨髄 SP 細胞の骨格筋細胞への分化について
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
 18. 上住聡芳、他:
骨格筋再生過程における Side population (SP) cells の動態
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
 19. 武田伸一、他:
骨髄細胞はどのように骨格筋の再生に関与するのか?
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
 20. 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.
 21. Fukada,S., 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Yamamoto.H. and S.Fukada.
Myogenic potential of mouse fetal liver cells. "Development of New Therapy for Muscular Dystrophy - Progress in Basic Research". Tokyo, 1.17, 2002.
 25. Fukada,S., et al.
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells in the mouse. Experimental Biology 02 (EB 02), New Orleans, LA, USA, 4.23, 2002.
 26. 瀬川将司, 他,
筋肉再生過程におけるマクロファージの役割, 第 52 回日本薬学会近畿支部大会, 10.19, 2002.
 27. 深田宗一朗, 他,
骨髄細胞移植による遺伝性筋疾患治療のための基礎研究, 第 32 回日本免疫学会総会学術集会, 12.4, 2002.
 28. 瀬川将司, 他,
遺伝性筋疾患の再生医学的治療法の開発, 日本薬学会第 123 年会, 3.28, 2003
 29. Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.
Clinical features and anti-ganglioside antibodies in patients with Guillain-Barre syndrome requiring artificial ventilation.
127th Annual Meeting of the American Neurological Association at the Marriott Marquis Hotel in New York. New York, USA. October 13-16, 2002.
 30. Kamo, I., Tomoyasu, H., and Kikuchi, A.:
Cytokine field of hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis
10th International Congress of Neuromuscular Diseases, July 11, 2002, Vancouver Canada
 31. Kikuchi, A., Kikuchi, T., Tomoyasu, H., Iwakami, N., Fukushima, T. and Kamo, I.:
Potential roles of two new haemopoietic factors in brain Physiology
10th International Congress of Neuromuscular Diseases, July 11, 2002, Vancouver Canada
 32. Tomoyasu, H., Kikuchi, and Kamo, I.:

Analysis of B-cell proliferation mechanism in the myasthenic hyperplastic thymus
12th International Conference of the International Society of Differentiation Sep. 11, 2002, Lyon, France

33. 加茂功、友安浩、菊池愛子
重症筋無力症における胸腺内抗体産生機構
第61回日本癌学会総会、東京、2002、10、1
34. 菊池愛子、加茂功
新規 80-kDa と 100-kDa 造血因子の脳内に於ける生理作用
第74回日本生化学会大会、京都、2002、10、16
35. 友安浩、山本弘、菊池愛子、加茂功
重症筋無力症過形成胸腺における抗体産生B細胞増殖機構について
第55回日本胸部外科学会総会、福岡、2002、10、10
36. 林由起子,他:
福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)における α -ジストログリカン(α -DG)の選択的欠損. 日本神経学会総会 2002.5 東京
37. YK Hayashi, K Tagawa, M Ogawa, Y Keira, K Goto, K Kawabe, and I Nishino.
Dysferlinopathy in Japan. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases. Jul 7-12, 2002, Vancouver, Canada.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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. 骨髄細胞及び、骨髄 SP (side population)細胞を、X 線照射したマウスに移植して、骨格筋の再生における寄与率を比較検討した
2. 骨格筋に存在する SP 細胞を FACS でソーティングして、解析した。骨格筋 SP 細胞は、多様な集団であることが明らかになった。

A. 研究目的

筋ジストロフィーについては、原因遺伝子が明らかにされ、病態の研究が進んでいるにもかかわらず、根治的な治療法がない。現在、進められている遺伝子治療法の開発では、安全な効率の高い遺伝子導入を行う上で問題が多い上に、当面局所の治療に留まる。そこで全身的な幹細胞移植治療が注目される。筋ジストロフィーに対して幹細胞移植治療法を行うためには、1) 骨格筋に分化する幹細胞の性質を明らかにすること 2) 移植した細胞が効率よく生着する微小環境の条件を解明することが求められる。我々は、幹細胞の候補として、骨髄及び骨格筋 SP 細胞を FACS により調整し、筋細胞への分化能を解析した。

B. 研究方法

1. 骨格筋 SP 細胞の調整と解析

骨格筋をコラゲナーゼで処理して、単核細胞を回収し、ヘキスト色素で染色し、SP 細胞を FACS でソーティングした。また、CD31, CD45, Sca-I, c-kit 等の発現を同時に解析した。SP 細胞の色素排出能を担う BCRP-1 に対する抗体を作製し、再生筋および通常の骨格筋切片を免疫染色した。更に、CTX 投与後 3 日、5 日及び 7 日後の再生骨格筋から、単核細胞を調整し、FACS で解析した。また、ソーティングした SP 細胞を、in vitro で MethoCult TM で培養し、一部は NOD/Scid マウスの前脛骨筋に移植した。

2. in vivo 骨髄移植実験

C57Bl/6 マウスに 5-10Gy の放射線を当て、GFP トランスジェニック マウスの骨髄細胞あるいは骨髄 SP 細胞を経静脈的に移植した。骨髄におけるキメリズムを決定し、一方の前脛骨筋に CTX を打って筋再生を引き起こした後に、骨格筋における GFP 陽性筋線維の出現率を抗 GFP 抗体で検討した。

C. 研究成果

1. 骨格筋の SP 細胞

骨格筋 SP 細胞の表面マーカーを解析すると、95% 以上の骨髄 SP が CD45 を発現しているのに対し、骨格筋 SP は CD45 陰性の分画が 80-90% と多かった。これらの CD45-SP 細胞を更に CD31 を使って、さらに 4 つの分画に分けることができた。また、SP 細胞のマーカーとして有効であると考えられる Bcrp-1 に対する抗体を作製し、正常骨格筋と再生過程にある骨格筋を免疫染色すると、Bcrp-1 陽性細胞は、筋線維と筋線維の間質、あるいは血管に沿って認められ、筋衛星細胞とは異なる細胞であることが確認された。骨格筋 SP 細胞が、筋再生時に増殖している像が認められた。筋再生時に骨格筋 SP が増殖するかを検討するために、CTX を打った後の細胞を FACS で検討すると、CD45+SP 及び CD45-SP 共に再生過程で増加しており、CD45-CD31-の SP 細胞が特に増加していることが明らかになった。現在これらの SP subpopulation

をマウスに移植して、その分化能を検討中である。

2. in vivo 骨髄移植実験

GFP陽性骨髄SP細胞を移植したマウスにおいて、骨格筋に生着した単核細胞を FACS で検討したところ、多くはCD11b陽性細胞であった。また、GFP陽性のSP細胞が認められ、それらの細胞はCD45陽性であった。よって、CD45陽性の骨格筋のSP細胞は骨髄SP細胞に由来する可能性が高い。CD45陽性骨髄SP細胞を移植したマウスにおけるGFP陽性骨格筋線維を蛍光及び、抗GFP抗体による免疫染色で検索したところ、頻度は低いが、全骨髄を移植したマウスと同様にGFP陽性線維が認められた。筋再生刺激を与えて再生した筋においてその陽性率が高く、骨髄SP細胞は、筋再生の過程で筋細胞へ分化すると考えられた。筋衛星細胞の位置にはGFP陽性細胞は認められなかったので、骨髄SP細胞が筋衛星細胞に分化する頻度は極めて低いと考えられる。

D. 考察

骨髄SP細胞は骨髄移植すると骨格筋の再生に関与する事がわかったが、その効率は低い。今後は我々のin vitro およびin vivo の系を用いてその効率を高める分子を探す必要がある。また、骨髄細胞を移植する際には、より効率的に骨髄あるいは末梢血液から幹細胞を骨格筋にリクルートし、筋分化を誘導する因子が重要であると考えられるが、我々が分担研究者の鎌倉と共に行ったcDNA cytokine array 解析において再生筋で発現が増加しているものの中に、その候補があると考えられる。今後その検討を行っていききたい。今回、我々の解析から、骨格筋SP細胞には、様々な活性を持つ数種類の細胞が混在していると考えられる。今後はこれらの細胞を分けて、機能解析を行っていく必要がある。

E. 結論

1. 骨髄及び骨格筋のSP細胞は、骨格筋に移植すると骨格筋線維に分化するが、その分子メカニズムを今後解明していく必要がある。
2. 幹移植の確立のためには、移植細胞の遊走、生着、分化を促すサイトカインや細胞外マトリックス等の微小環境の研究を進めていくことが重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S: Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) *Experimental Animals* (in press) 2003
2. Yuge R, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K: Simulated microgravity inhibits p38^{MAPK} cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* (in press) 2003
3. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E: Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscul Disord* 2003 13(3):207-15
4. Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S: Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* 9: 1576-88, 2002
5. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S: Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1588:195, 2002
6. Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S: α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J Cell Biol* 158: 1097-1107, 2002
7. Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill VJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G: Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector

ameliorates the dystrophic pathology in *mdx* mouse muscle.

Hum Mol Genet 11: 1719-30, 2002

8. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S:

Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene.

Biochem Biophys Res Commun 293(4): 1265-72, 2002

9. 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

12. Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and Takeda S:

Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle.

J Appl Physiol 92(5): 1936-42, 2002

13. Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, and Ikeda S:

Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in *mdx* mice hearts by physiological exercise.

FEBS Letter 520(1-3): 18-24, 2002

< 和 文 >

1. 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

2. 武田伸一、平田 彰 :

筋ジストロフィー

臨床検査 46(5): 467-478, 2002

3. 尾島孝一 武田伸一 :

骨格筋幹細胞と再生移植治療

血液・腫瘍科 44(6): 442-448, 2002

4. 高橋丈二、武田伸一 :

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

医学のあゆみ 204: 174-178, 2003

5. 武田伸一、坂本美喜 :

神経・筋疾患に対する遺伝子治療

Medical Science Digest 29(3): 104-108, 2003

6. 鈴木友子、武田伸一 :

筋衛星細胞と多能性幹細胞からの再生

Molecular Medicine 40: 257-264, 2003

7. 吉村まどか、武田伸一 :

神経変性疾患の遺伝子治療の現状

Practical Ophthalmology 91: 100-101, 2003

II. 学会発表

1. 尾嶋孝一、他 :

骨格筋再生過程における筋衛星細胞の発現パターンについてについて

第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002

2. 平田彰、他 :

cDNA array を用いた骨格筋変性・再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討

第1回日本再生医療学会総会 4/18, 2002

3. 武田伸一 :

「筋ジストロフィーに対する治療研究の進展」

三多摩神経懇話会 4/20, 2002

4. 平田彰、他 :

cDNA array を用いた骨格筋再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討

日本神経学会 札幌 5/29-31, 2002

5. 平田彰、他 :

cDNA array を用いた骨格筋変性・再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討

第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002

6. 尾嶋孝一、他 :

骨格筋再生過程における筋衛星細胞の動態について

第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002

7. 鈴木友子、武田伸一 :

筋ジストロフィーに対する治療戦略

第23回日本炎症・再生医学会 7, 2, 2002

8. Takeda S, Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y:

IL-6 activates the *utrophin* gene transcription through promoter A in neonatal *mdx* skeletal muscles.

5th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 6 June, 2002

9. Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yoshimura M, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S:

Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response.

5th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 8 June, 2002

10. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Masuda S, Ikemoto T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:

Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene.

The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7,

2002

11. Itoh Y, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Utrophin mRNA stability can be involved in
Utrophin over-expression in AxCALacZ-injected
neonatal *mdx* skeletal muscles.
The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 19, 7,
2002
12. Takeda S:
Molecular therapy for Duchenne muscular
dystrophy.
Xth International Congress on Neuromuscular
Diseases, Symposia, Vancouver, Canada, 9 July,
2002
13. Hirata A, Masuda Y, Miyagoe-Suzuki Y,
Kamakura K, Takeda S:
Expression profiles of cytokine and cytokine-
related genes in regenerating skeletal muscle
induced by cardiotoxin-injection.
Xth International Congress on Neuromuscular
Diseases, Vancouver, Canada, 10 July, 2002
14. Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M,
Sugie K, Nonaka I, Takeda S:
Immunohistochemical analysis of skeletal muscles
from canine X-Linked muscular dystrophy.
Xth International Congress on Neuromuscular
Diseases, Vancouver, Canada, 11 July, 2002
15. Takeda S:
Molecular therapies of muscular dystrophies.
Invited lecture.
5th National Conference on Neuromuscular
Diseases. Beijing, China. 9.17, 2002
16. Takeda S:
New therapeutic approaches to dystrophin-
deficient muscular dystrophy: Internatiional
Symposium of "Molecular Therapy for muscular
Dystrophy" 11/26, 2002 東京
17. 尾嶋孝一、他：
骨髄 SP 細胞の骨格筋細胞への分化について
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
18. 上住聡芳、他：
骨格筋再生過程における Side population (SP)
cells の動態
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸
19. 武田伸一、他：
骨髄細胞はどのように骨格筋の再生に関与す
るのか？
第 2 回日本再生医療学会総会 3/12, 2003 神戸

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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盤的研究

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：筋ジストロフィーの再生医学的治療法の開発のために、筋前駆細胞を認識するモノクロナル抗体の作成を試みた。新規抗体 SM/C-2.6 は、筋の幹細胞、筋衛星細胞を特異的に認識した。SM/C-2.6 を用いて筋から単離した細胞は、*in vivo*、*in vitro* いずれでも、筋に分化する能力を持っていた。抗体を用いた選択的濃縮法を利用することによって、再生医療法の効率を上昇できると期待される。

A. 研究目的

近年、骨髄中に骨格筋細胞に分化可能な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ている。Ferrariら(1998)、Gussoniら(1999)は、骨髄細胞を移植するとドナー由来細胞が再生筋に見つかること、宿主を *mdx* マウスにしたとき、再生筋の一部がジストロフィンを発現することを報告した。われわれは、骨髄だけでなく胎児肝臓細胞中にも筋に分化する能力を持つ細胞があることを明らかにし、なおかつ新生児期の移植が筋衛星細胞の再生にも有効であることを示した(2002)。しかしいずれの研究でも、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いわざるを得ない。

そこで筋再生の効率を上昇させることを目的に、筋前駆細胞を選択的に濃縮する手法の開発を目指し、筋前駆細胞に対するモノクロナル抗体の作成を進めた。

B. 研究方法

1：モノクロナル抗体の作成

マウス筋芽細胞株 C2C12 をラットに免疫し、モノクロナル抗体を作成した。抗体クローンは、

①: C2C12 に反応性を示し、正常マウス細胞（胸腺リンパ球）には反応しないもの、②: 骨髄細胞の多くには反応しないものを選び、次いで、③: 筋免疫組織化学的手法で筋衛星細胞を認識するクローンを選び、SM/C-2.6 モノクロナル抗体を樹立した。

2：筋衛星細胞の単離

SM/C-2.6 抗体を用いた cell sorting 法によって、マウス筋から SM/C-2.6 陽性細胞を単離した。さらに SM/C-2.6 陽性細胞を培養し、筋への分化を *in vitro* で

調べた。また GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子導入(Tg)マウス由来筋衛星細胞を *mdx* マウスに移植し、*in vivo* での筋分化を観察した。

3：筋衛星細胞の性格

Flow cytometry 法で、筋衛星細胞が持つ表面マーカー抗原を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は全てマウスやラット等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、上記委員会承認を得て研究を実施した。

C. 研究成果

1：モノクロナル抗体の特異性

- ・ SM/C-2.6 モノクロナル抗体は、骨髄細胞の約 10% に反応したため、骨髄中の筋前駆細胞のみに反応しているわけではないことが推定された。
- ・ 筋免疫組織化学的検索では、骨格筋のラミニンの内側にあつて筋繊維の外縁に存在する単核細胞に反応性を示し、唯一知られている筋衛星細胞抗原、M-cadherin の染色と一致した。この位置は、筋衛星細胞が存在する場所である。
- ・ 骨格筋繊維の single fiber culture 法でも、fiber に付着し M-cadherin 陽性の単核細胞を染色した。以上の結果は、SM/C-2.6 抗体が筋衛星細胞に反応していることを強く示唆する。

2：モノクロナル抗体による筋衛星細胞の単離

- ・ セルソーターにより、新生児マウス骨格筋から SM/C-2.6 陽性細胞を分離し、4日間増殖培養した。SM/C-2.6 陽性細胞は筋分化の調節に関わる核内因子 MyoD を発現したが、陰性細胞には MyoD の発

現は認められなかった。

- ・ SM/C-2.6 陽性細胞を 11 日間分化培養すると、desmin 陽性の筋管の形成が認められ、MyoD 陽性の核が筋管に沿って並んでいる様子が観察された。陰性細胞は筋管を形成しなかった。
 - ・ GFP-Tg マウス由来 SM/C-2.6 陽性細胞を単離し、*mdx* マウス前脛骨筋に移植したところ、GFP 陽性の筋繊維の形成が認められた。陰性細胞では筋繊維の形成は全く認められなかった。
- 3: 筋衛星細胞の表面マーカー分子の検索
- ・ SM/C-2.6 陽性の筋衛星細胞を種々のモノクロナル抗体で染色し、Flow cytometry 法で染色パターンを解析した。その結果筋衛星細胞には、c-kit、Sca-1、CD45 などの血液系(幹)細胞に発現される分子は認められなかった。また幹細胞のマーカー抗原とされる CD34 については、SM/C-2.6 陽性(筋衛星)細胞は全て陽性であり、SM/C-2.6 陰性の骨格筋由来細胞にも発現が認められた。

D. 考察

筋の再生は、筋肉中の幹細胞、筋衛星細胞の活性化・増殖からはじまる。筋衛星細胞は組織化学的な手法から見いだされた細胞で、単独に分離同定する手法は知られていなかった。本研究は、細胞移植後の筋再生へのドナー細胞の寄与率を上昇させるために、筋前駆細胞を単離する手法の開発を目的とした研究を進めてきた。今回、マウス筋芽細胞株 C2C12 をラットに免疫して得たモノクロナル抗体 SM/C-2.6 が、免疫組織化学的検索において、また単離した細胞の *in vitro*、*in vivo* での実験において、筋衛星細胞を特異的に認識していることを明らかにした。この抗体を用いて単離した筋衛星細胞に欠損遺伝子を導入することで、筋ジストロフィーの治療に繋がるものと期待できる。

近年 Goodell のグループによって、ある種の薬物で分別標識される細胞群、side population (SP) 中に筋衛星細胞が存在することが示唆されたが、それ以後骨格筋中の単核細胞の解析が進み、SP はむしろ血液系の幹細胞に近く、筋衛星細胞とは異なった細胞群であることが判ってきた。最近 Asakura らは、SP が筋衛星細胞に分化する可能性を示し、ようやく SP と筋衛星細胞との関係が明らかにされようとしている。しかしこうしたいずれの研究も、筋衛星細胞を単独に分離して解析した結果ではなく、筋衛星細胞を純粋に解析する手法の開発が望まれていた。本研究で樹立した SM/C-2.6 抗体を用いることで、初めて筋衛星細胞の表面マーカー分子を同定できたことは、再生医学への応用面だけではなく、筋発生・分化の細胞学的・分子生物学的研究にも貢献できるものと思われる。

SM/C-2.6 抗体が認識する分子についてはまだ不明である。少なくとも M-cadherin ではないことが判っており、現在対応抗原分子の同定を目指して研究を進めている。また骨髄中の SM/C-2.6 陽性細胞についても、ほとんど解析が進んでいない。今後の重要課題である。

E. 結論

1. 筋衛星細胞を認識する新規モノクロナル抗体 SM/C-2.6 の樹立に成功した。
2. SM/C-2.6 抗体を用いることで、筋衛星細胞の表面マーカー分子の一部を確定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Miyauchi, K., et al. Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor. *Neuropeptides*, 36:22-33, 2002.
2. Fujimori, K., et al. Interleukin-6 induces over-expression of the sarcolemmal utrophin in neonatal *mdx* skeletal muscle. *Human Gene Therapy*, 13:509-518, 2002.
3. Tsujikawa, K., et al. Regulation of Lck and Fyn tyrosine kinase activities by transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *Mol. Cancer Res.*, 1:155-163, 2002.
4. Kohama, Y., et al. Isolation of proliferation factor of immature T cell clone in concanavalin A-stimulated splenocyte culture supernatant. *Immunology*, (in press), 2003. 他 2 編

II. 学会発表

1. Yamamoto, H. and S. Fukada. Myogenic potential of mouse fetal liver cells. "Development of New Therapy for Muscular Dystrophy - Progress in Basic Research". Tokyo, 1.17, 2002.
2. Fukada, S., et al. Muscle regeneration by reconstitution with BM or fetal liver cells in the mouse. EB 02, New Orleans, LA, USA, 4.23, 2002.
3. 深田宗一郎, 他, 骨髄細胞移植による遺伝性筋疾患治療のための基礎研究, 第 32 回日本免疫学会総会学術集会, 12.4, 2002.
4. 瀬川将司, 他, 遺伝性筋疾患の再生医学的治療法の開発, 日本薬学会第 123 年会, 3.28, 2003.

他 1 回

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)
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

筋再生のメカニズムは未だ不明であり、この解明は疾患の治療に重要である。筋再生に伴う炎症反応は、マクロファージ等の炎症細胞が分泌する種々のサイトカインにより媒介されていると考えられるが、その詳細はよくわかっていない。Cardiotoxin の局所投与による筋変性・再生のモデルを用いて、その過程で発現の変化するサイトカイン遺伝子を cDNA array を用いて調べた。Cardiotoxin 投与後 48 時間、96 時間、7 日のマウス前脛骨筋から mRNA を抽出し、逆転写反応により ³²P-cDNA probe を作成、cDNA array membrane へと hybridize してシグナルを定量し、対側前脛骨筋の遺伝子発現と比較した。Cardiotoxin 投与 48 及び 96 時間後の細胞浸潤の多い時期の筋では osteopontin (OPN) が最も増加していた。OPN への抗体による免疫組織化学でも、単核球とその浸潤を受けた筋線維で強い免疫染色性がみられた。OPN は元来骨代謝における役割が知られていたが、近年極めて多様な役割を持つ cytokine であることが判明しつつある。筋再生での重要な役割が推測された。

A. 研究目的

筋組織は外傷、疾患等による種々の障害時、再生する事が知られている。しかし、再生のメカニズムについては不明な点が多い。再生のメカニズムの解明は疾患・障害の治療に重要である。

再生については satellite cell に関係した研究が多数存在するが、炎症反応に注目したものは少ない。Macrophage は障害時、壊死組織、細胞の食食機能以外にも種々のサイトカインを分泌し、再生に関与していると考えられる。実際に骨格筋再生時、種々の成長因子、cytokine が筋組織内に発現する事が判明しつつある。

Cardiotoxin は satellite cell、神経、血管に障害が少なく、基底膜を温存するため、再現性のよい筋変性・再生過程を観察することができる。この Cardiotoxin 投与すると 48-96 時間後にマクロファージを中心とした炎症細胞浸潤を誘導することも判明している。この cardiotoxin を用いた骨格筋再生のモデルで cytokine 遺伝子の発現変化の検討を行った。

B. 研究方法

Cardiotoxin をラットの前脛骨筋に注射し 48、96 時間、及び 7 日後に mRNA を抽出した。Reverse transcriptase 反応にて ³²P-radiolabelled cDNA probe

を作成し、522 個の cytokine cDNA を含んだ array membrane (R & D systems) へと hybridize し、³²P の信号を測定、対側筋の信号と比較定量した。増加していた cytokine 遺伝子について cardiotoxin 注射後 48-96 時間後の筋を用いて、免疫組織化学的手法を用いて確認をした。

(倫理面への配慮)

筋を採取するにあたり、麻酔下に行った。

C. 研究結果

48 時間後では 40 個の遺伝子が 5 倍以上発現増加を示していた。この中で osteopontin(OPN)が最も増加していた。96 時間後では 64 個の遺伝子が 5 倍以上発現が増加していた。IGF-1、-2 といった satellite cell 増加に関与する遺伝子もこの時点では up-regulate していた。96 時間後も OPN の発現増加は著明であった。

OPN についてはその発現変化が、cDNA array とほぼ同一な変化であることをノーザンプロットでも確認した。

OPN について免疫組織化学を行うと、24 時間以降より OPN 免疫染色性が観察され、48 時間後では壊死巣と正常巣との境界領域で OPN の強い染色性がみられた。浸潤した単核球及びその浸潤を受けている筋線維で染色性が認められた。単核

球の浸潤していない、壊死線維では OPN 染色性はみられなかった。筋注 7 日後では OPN 染色性は認めなかった。

D. 考察

500 以上の cytokine 遺伝子について cardiotoxin 障害筋で検討したが、これまで骨格筋再生との関わりにおいて議論されたことのない cytokine 遺伝子の発現変化を多数検出することができた。また OPN の発現変化が最も著明であり、これについてはノーザンブロット及び免疫組織化学でも確認した。OPN の発現変化は骨格筋再生の初期よりパラレルに変化していることがわかった。

OPN はリン酸化糖蛋白でこれまでは、骨代謝での役割が知られていたが、近年きわめて多様な役割を持つ cytokine であることがわかってきている。筋再生での詳細な役割は未だ不明だが、macrophage や satellite cell を走化性因子としての役割や macrophage の貪食能へ及ぼす影響などが推測される。また、knockout mice で collagen 生成に異常があるとの報告もあることより、線維化へおよぼす役割も推測される。

E. 結論

Cardiotoxin の局所投与による筋変性・再生モデルを用い、発現の変化するサイトカイン遺伝子を cDNA array を用いて調べた。Cardiotoxin 投与 48、96 時間後の細胞浸潤の多い時期の筋では osteopontin (OPN) が最も増加し、OPN 抗体による免疫組織化学でも、単核球とその浸潤を受けた筋線維で強い免疫染色性がみられた。筋再生における OPN の重要な役割が推測された。

F. 研究発表

I. 論文発表

- 1) 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 944: 146-156, 2002
- 2) 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: 109-117, 2002

- 3) Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S.
Expression of cytokines and related genes in the regenerating skeletal muscle. On Submission.
- 4) Mochizuki H, Kamakura K, Kanzaki M, Nishii T, Matsuo H, Motoyoshi K.
Somatosensory evoked potential in neurosyphilis.
J Neurol 249: 1220-1222, 2002.
- 5) Mochizuki H, Kamakura K, Masaki T, Hirata A, Nakamura R, Motoyoshi K.
Motor dominant neuropathy in Sjogren's syndrome: report of two cases. Internal Medicine. 41: 142-146, 2002.

II. 学会発表

- 1) 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・再生におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討。第一回日本再生医療学会総会。神戸。2002, 4.18-19.
日本再生医療学会雑誌。11:p95, 2002
- 2) 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・再生過程におけるサイトカイン及び関連遺伝子の発現の検討。第23回日本炎症・再生医学会。東京。2002年 7月2-3.
- 3) Hirata A, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Kamakura K, Takeda S. Expression profiles of cytokine and cytokine-related genes in regenerating skeletal muscle induced by cardiotoxin-injection.
Xth International Congress on Neuromuscular Diseases. Vancouver, Canada, July 7-12, 2002.
J Neurological Sciences S199:S83, 2002.
- 4) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.
Clinical features and anti-ganglioside antibodies in patients with Guillain-Barre syndrome requiring artificial ventilation.
127th Annual Meeting of the American Neurological Association at the Marriott Marquis Hotel in New York. New York, USA. October 13-16, 2002.