

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究分野)

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を  
実現するための基盤的研究

総 括 研 究 報 告 書

(平成15年度)

主任研究者 武田伸一

平成16年(2004)年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を実現するための基盤的研究	----- 1
武 田 伸 一	
II. 分担研究報告	
1. ウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入法の開発	----- 15
武 田 伸 一	
2. ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの治療法の開発	----- 21
鈴 木 友 子	
3. Utrophin ノックアウト <i>mdx</i> マウス : デュシェンヌ型筋ジストロフィーの モデル動物としての有用性に関する研究	----- 24
埜 中 征 哉	
4. 免疫細胞の分化、活性化、細胞死に関与する機構および免疫組織の再生に 関する研究	----- 28
渡 邊 武	
5. 幹細胞の単離と移植	----- 31
山 元 弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を実現するための基盤的研究

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 鈴木 友子 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 室長

梶中 征哉 国立精神・神経センター 武蔵病院 院長

渡邊 武 九州大学生体防御医学研究所 教授

山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

1. AAV ベクターに機能的なマイクロジストロフィンを組み込み、高いタイターのウイルスベクターを調整した (AAV2-MCK $\Delta$ CS1)。
2. AAV2-MCK $\Delta$ CS1 の 10 日齢 *mdx* マウスへの導入は、発現効率は 20%程度で低かったが、ジストロフィン陽性線維の代償性肥大と、筋張力の回復が認められた。AAV2-MCK $\Delta$ CS1 の 5 週齢 *mdx* マウス前脛骨筋への導入では、50%近くの高い導入効率が得られ、筋張力も改善していた。
3. 国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、人工授精を用いた筋ジストロフィー犬の繁殖が可能になったことにより、筋ジストロフィー犬コロニーの確立をみた。
4. ジストロフィンを欠損した *mdx* マウス骨格筋に対して治療効果を見出したマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み換えたアデノ随伴ウイルスベクターについて、筋ジストロフィー犬骨格筋に対する導入を行ったが、過剰な免疫応答が誘導され、導入遺伝子産物の発現が認められなかった。免疫応答の機序を解明し、対抗策を見出すことが急務である。
5. 重症の筋ジストロフィーモデルであるジストロフィン・ユートロフィン二重欠損マウスについて系統維持に成功した。同マウスは、臨床症状、組織像、電顕像の上でも、重症の筋変性を示すことが明らかになった。二重欠損マウスは、治療研究を進める上で、重要な病態モデルである。
6. 骨格筋再生に働く細胞性・分子性機構を明らかにする目的で、筋再生時の炎症性細胞の役割を解析した。その結果、マクロファージ欠損をきたす二種類のモデル実験系で、筋再生にはマクロファージの浸潤が必須であることがわかった。マクロファージが産生する生理活性因子の同定は、遺伝性筋疾患の治療法開発に貢献できると考えられる。
7. 自己反応性未熟 B 細胞の分化、活性化、細胞死に関与する機構を明らかにする目的で、マウス未熟 B 細胞での抗原刺激による細胞死の機構を解明した。その結果、自己反応性未熟 B 細胞の細胞死とその除去には、抗原受容体からのシグナルによって誘導される新規タンパク *iWH37* の産生が関与しており、そのタンパクがミトコンドリアを障害することによって惹起されることを示した。
8. 免疫組織の人工的に再生することによりヒトにおける免疫強化の新たな方法を開発した。

## A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子の変異による X-連鎖性の進行性筋疾患である。DMD に対する有効な治療法はなく、ウイルスベクターを用いた dystrophin cDNA の遺伝子導入が有効な治療法の一つと考えられる。我々は、これまでジストロフィン欠損のマウスモデルを用いて、免疫原性が低く、導入遺伝子の長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、短縮型でありながら、筋ジストロフィーの表現型を改善する能力を持つ micro-dystrophin の遺伝子治療についての研究を行ってきた。本研究では、全長のジストロフィン分子の機能を損なわないようにデザインしたマイクロジストロフィン ( $\Delta$ CS1, Sakamoto *et al.*, 2002) を AAV-2 ベクターに組み込んだ AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 を作成し、筋ジストロフィーのモデル動物である *mdx* マウスに導入し、その治療効果を検討した。本年度は、並行して進めてきたジストロフィン欠損の中型モデル動物である筋ジストロフィー犬を用いて AAV ベクターの有効性を検討した。

これまで治療研究に用いられてきた *mdx* マウスはジストロフィンが欠損していて、病因は DMD と同じである。しかし臨床的には筋力低下がほとんどみられないことが、遺伝子治療などの治療実験を行う妨げとなっていた。この *mdx* マウスにさらに utrophin をノックアウト (KO) したマウスが Davies らにより作成され、それは進行性の筋力低下をみる。その実用性について実証する。

一方、筋ジストロフィーに対して遺伝子治療法を開発するためには、前提となる病態の理解が不可欠である。特にジストロフィン欠損筋では、筋再生は活発であることが知られている。骨格筋が再生する際、筋肉内に種々の炎症性細胞の浸潤が認められる。本研究では、浸潤する細胞の種類を免

疫組織化学的に検索し、炎症性細胞の一種、マクロファージの筋再生に及ぼす影響について検討し、その役割を明らかにすることから筋再生の効率上昇のための新しい手法を確立することを目的とする。

最後に、筋ジストロフィーに対して遺伝子治療を実現するためには、免疫応答の問題を克服する必要がある。そこで以下の点に絞って研究を行った。

- 1) 自己反応性未熟B細胞の分化、活性化、細胞死に関与する機構を明らかにする。
- 2) 従来よりヒト免疫細胞を試験管内で抗原刺激を行うことにより抗体の産生、キラーT細胞の誘導が行われているが、その効率は良くなく実際に広く臨床的に応用出来るものではない。生体内で機能するハイブリッド型人工リンパ節の構築を試みる。(1)病原微生物などに対して、特異的に強力、迅速に感染防御能を発揮し、緊急に患者に提供出来る免疫装置の開発、(2)体外でも体内でも手軽に使用することが出来、がん細胞(がん抗原)、あるいは毒素や病原性の強い微生物、AIDS などのウイルスなどに対して効率的に迅速で、強力な免疫反応が得られる免疫学的装置の開発、(3)後天的あるいは先天的免疫不全症の新しい治療法の開発、(4)濾胞形成、胚中心形成を試験管内で再現しうるリンパ節様臓器の開発をして、免疫組織のオルガノジェネシスをリアルタイムで空間的に分子レベル、細胞レベルで解明する。

## B. 研究方法

### 1. *mdx* マウスに対する AAV ベクターの導入

#### 1) マウス

筋変性の始まる前の 10 日齢の *mdx* マウスと筋変性・壊死が活発に起きている 5 週齢の *mdx* マウス、及びそのコントロールとして C57BL/10 マウスを使用した。

#### 2) ウイルス

以前報告した方法で (Yuasa *et al.*, 2002, Gene

Ther. 9, 1576-) AAV ベクター (AAV2-MCK ΔCSI) を作成した。

### 3) 組織学的解析

骨格筋組織片は、凍結ブロックを 6-10 μm に薄切し、ヘマトキシリン・エオシンで染色、あるいは抗ジストロフィン抗体で染色した。また筋線維径は、Image Pro Plus (Media Cybernetics) を用いて計測した。

### 4) 筋張力測定

TA 筋を膝骨に付けたまま、遠位側は腱を付けたまま、採取し、以前報告した手法で (Hosaka et al., 2002, JCB 16, 1097) 強縮時の最大張力を測定した。

## 2. 筋ジストロフィー犬を用いた研究

### 1) 筋ジストロフィー犬コロニーの確立

平成 13 年 3 月厚生労働省によって国立精神・神経センター内に中型実験動物研究施設が建設され、同年 11 月より筋ジストロフィー犬の飼育が開始された。さらに、同 14 年 6 月から同施設内の繁殖を開始したが、同 15 年 6 月から人工授精による繁殖を開始する。

### 2) 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する AAV ベクターの導入

2 日齢から 1 歳齢の筋ジストロフィー犬、キャリア犬、正常対照犬の前肢筋及び後肢筋に対し、AAV CMV-lacZ AAV MCK lacZ、AAV CMV-M3、AAV MCK ΔCSI などの AAV ベクターを導入し、組織学的に導入遺伝子の発現を検討した。更に、発現カセットを欠いた空の AAV ベクターを導入し、解析した。AAV ベクターの導入前より Cyclosporin を経口連続投与し、その AAV ベクター導入に対する影響についても検討した。

### 3. 新たなマウスモデルに関する研究

対象: *mdx* マウスで utrophin が KO されたもの *mdx/utro* <sup>-/-</sup> 3 匹、*mdx* マウスで utrophin があるもの (通常の *mdx* マウス) *mdx/utro* <sup>-</sup>

4-3 匹を対象とした。すべてのマウスは生後 14-17 週齢のものであった。実験に使用した全てのマウスは実験動物中央研究所の日置研究員らから供与された。

方法: 体重測定を行い、筋力低下の有無を閉鎖箱の中の運動量、金網よじ登り試験で確認した。動物は安楽死させ、前頸骨筋 (白筋)、長指伸筋 (白筋)、ヒラメ筋 (赤筋)、心筋、横隔膜を採取して、組織化学染色、電子顕微鏡検索用に固定した。

### 4. マクロファージの筋再生に及ぼす影響

正常 C57BL/6 マウス前脛骨筋にカルジオトキシン (CTX) を投与し、経時的に筋を組織化学的に解析した。筋再生時のマクロファージの機能を調べるために、*op* (osteopetrosis) マウスを *mdx* マウスと交配し、*op/op mdx* およびそのパートナー遺伝子型マウスを得た。*op* マウスは、M-CSF に遺伝子変異を起こし、その結果マクロファージ系の細胞分化が抑制されるため、骨代謝に異常を来し、大理石 (骨) 病を自然発症するマウスである。また、M-CSF 受容体に対する抗体を投与することでマクロファージ系への分化を一時的に抑制する手法で、骨格筋の再生に及ぼすマクロファージの役割について解析した。

### 5. 自己抗原反応性未熟 B 細胞の細胞死についての解析

マウス B 細胞株 WEHI-231 を抗 IgM 抗体で架橋し、24 時間以降にアポトーシスに陥る系を用いた。また、抗 IgM 抗体で架橋して刺激した 12 時間後 WEHI-231 細胞から cDNA ライブラリーを作製し、ミトコンドリア膜をアタックする新規の蛋白分子の探索を行った。

### 6. 人工リンパ節の構築

ストローマ細胞、生体適合性材料の三次元骨格、種々のケモカイン、サイトカインを

用いて再構成することにより、自然のリンパ節と構造上、類似した人工リンパ節の構築が可能となった。すなわちストローマ細胞 (TEL-2 細胞) と酸性コラーゲン溶液を混合して培養液中で 1 週間培養を続けると、コラーゲングル内で細胞が増殖すると共に、細胞の収縮力によってゲルが収縮して細胞を取り込んだ人工組織 (コラーゲングルハイブリッド組織) ができる。このようにして作成したコラーゲングルハイブリッド組織をマウスの腎皮膜下に移植し、移植された組織にリンパ球が集ってくるかどうかを検討した。

## C. 研究成果

### 1. *mdx* マウスに対する AAV ベクターの導入

1) AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 は *mdx* 骨格筋形質膜に長期に安定してマイクロジストロフィンを発現させる

発現効率は、10 日齢で *mdx* 筋に導入した場合、24 週後で 20% 程度であった。一方 5 週齢で導入した場合、24 週後でも約 50% の筋線維でジストロフィンの発現が認められた。

2) AV2-MCK  $\Delta$ CS1 は、*mdx* 筋の中心核線維の割合を低下させる

10 日齢での AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 の導入により、 $\Delta$ CS1 陽性線維の中心核線維の割合は対照群の 90% に比べ、約 10% 程度に減少しており、 $\Delta$ CS1 の発現が、筋変性を抑制したと考察される。

3) 10 日齢に導入した場合、AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 陽性 *mdx* 筋は、代償性に肥大する。

4) AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 は *mdx* 筋の筋張力 (specific tetanic force) を回復させる。AAV2-MCK  $\Delta$ CS1 を導入した *mdx* TA 筋では、specific tetanic force (mN/mm<sup>2</sup>) が対照群と比較し著明に改善していた。

### 2. 筋ジストロフィー犬を用いた研究

1) 筋ジストロフィー犬のコロニーの確立  
平成 15 年度内にキャリア犬を用いた計 3 回の分娩を経験した。産仔数の多い点も消失した。また、平成 16 年 3 月で長野県諏訪市にある中外医科学研究所の筋ジストロフィー犬コロニーの閉鎖もあって、同月の時点で筋ジストロフィー犬 7 匹、キャリア犬 29 匹、正常ビーグル犬 2 匹が飼育され、病態研究と遺伝子治療研究が行われた。

2) 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する micro-dystrophin 遺伝子組み換え AAV ベクターの導入

ジストロフィン欠損のマウスモデルについて良好な成績を上げた AAV ベクターを筋ジス犬及びその対照犬の骨格筋に導入し、その発現効果を検討した。大変残念なことには、2 日齢から 1 歳齢に至るどの時期の実験犬に導入した場合でも、強い細胞浸潤が見出され、導入遺伝子産物の発現はほとんど見られなかった。しかも、その結果は、lacZ 遺伝子を導入した場合でも、micro-dystrophin 遺伝子を導入した場合でも、あるいは ubiquitous な発現パターンを示す CMV プロモーターを使用した場合でも、筋特異的な発現パターンを示す MCK プロモーターを使用した場合でも基本的に変わることがなかった。組織学的に浸潤細胞について詳細に検討すると、CD4、CD8 陽性細胞が多数観察された。そこで、免疫応答の原因を検討するために、発現カセットを欠いた空の AAV ベクターを導入したところ、ほとんど細胞浸潤を生じていなかった。更に、マウス及びイヌ骨格筋から初代骨格筋培養細胞を樹立し、ヘルパーウイルスとしてのアデノウイルスの存在・非存在下で AAV ベクターの導入を行ったが、むしろイヌ培養細胞ではマウスに比べて発現の効率は高い傾向が認められた。そこで、導入 5 日前から、連続した免疫抑制剤の投与下に AAV ベクターの投与を行ったところ、全例ではないが、導入遺伝子産物が顕著に発現

する場合があった。

### 3. 新たなマウスモデルに関する研究

1) 成長：通常の *mdx* マウス(-/+)では生後14-17週の体重は22.0-27.1g(平均24.7g)であったのに、*utrophin KO mdx* (-/-マウス)では15.3-17.1g(平均16.4g)と優位に体重が軽かった。さらに脊柱の変形もみられた。別の一匹は15週でるいそうのため死亡した。

2) 筋力低下：-/-マウスでは筋力低下は歴然としていた。閉鎖箱の中の動きは少なく、-/+の1/5以下であった。また金網よじ登り試験でも、金網にしがみついても移動はほとんどなく落下した。-/+のものでは金網をつたっての移動が可能で、筋力低下による落下は30秒以内にはみられなかった。

3) 組織所見：いずれのマウスでも赤筋、白筋とも同程度に侵されていた。筋線維の大小不同、壊死・再生、結合織の増加がみられ、その程度は-/-にはるかに強かった。また-/-、-/+いずれも横隔膜が強く侵されていて、-/-ではtarget/targetoid構造がみられた。電子顕微鏡的には筋線維の壊死、再生像がみられたが-/-に特異的な変化はみられなかった。

### 4. マクロファージの筋再生に及ぼす影響

正常 C57BL/6 マウスに CTX による筋再生を誘発し、経時的に筋組織を観察したところ、障害初期(12-24時間目)には多数の顆粒球(好中球)の浸潤が認められ、筋再生が始まる頃(48-72時間目)には、顆粒球の消失と入れ替わるようにマクロファージの浸潤が認められた。マクロファージの浸潤時期に同期して、筋再生の徴候が認められ、72時間目には中心核を持った多数の細い筋線維形成が始まり、96時間目には線維の肥大化が観察された。このことは、マクロファージの浸潤が筋再生のきっかけを作っている可能性が強く示唆している。

そこでもし、マクロファージ分化能が低下したとき、どのような筋再生の様相を示すかを調べる目的で、*op/op mdx* マウス骨格筋を組織化学的に検討した。その結果、*op/op mdx* マウスは *op/+ mdx* マウスに比べて筋再生が遅延することがわかった。こうした表現型を定量的に比較する目的で、マウスに Evans Blue を腹腔内投与した後還流により血液を洗浄除去し、採取した骨格筋中に含まれる色素を抽出して分光光学的に定量した。*op/op mdx* マウス筋は *op/+ mdx* マウスに比べて多量の色素を含有していることがわかり、マクロファージの欠如は筋再生の効率を著明に低下させていることが明らかになった。さらに組織マクロファージを一過性に減少させる目的で、抗 M-CSF 受容体抗体を投与したマウスについて筋組織を免疫組織化学的に調べた。抗体を投与したマウスでは、CTX による筋再生がほとんど認められず、また多くの膠原繊維の造生が観察できた。以上の事実から、骨格筋の再生にはマクロファージの浸潤が必須であることが判った (Segawa et al, manuscript in preparation)。

### 5. 自己抗原反応性未熟B細胞の細胞死についての解析

マウス未熟B細胞株である WEHI-231 細胞では BCR 刺激後、膜透過性の亢進に先立って、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加が生ずる。BCR からの Death signal はまずミトコンドリアに伝達され、その後にカスパーゼの活性化と DNA 切断及び膜透過性の亢進が生ずると考えられた。この系にタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを加えておくと、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加は60-70%抑制された。抗原受容体からのシグナルによる新たな蛋白の合成が、抗-IgM抗体の架橋によるアポトーシス誘導には深く関わっていることがわかった。抗-IgM抗

体で架橋して刺激(12時間)した WEHI-231 細胞から cDNA library を作製し、ミトコンドリア膜電位の変化を指標として、ミトコンドリア膜をアタックする新規のタンパク分子の探索を行い、iWH37 という cDNA クローンに注目した。iWH37 は WEHI-231 細胞を抗 IgM 抗体で架橋することによりその発現が誘導されること、未熟骨髄 B 細胞では、抗 IgM 刺激で発現が誘導されること、成熟 B 細胞ではその発現が抗 IgM 抗体で架橋で強く抑制されること、Flag-tag iWH37 タンパクはミトコンドリアに局在すること、iWH37 タンパクはミトコンドリア膜に存在するイオンチャンネル VDAC に結合すること、さらに Bak タンパクと結合すること、iWH37 を高発現させた WEHI231 細胞や COS7 細胞では細胞死が誘導されることなどから、ミトコンドリア膜をアタックして細胞死を誘導する分子の可能性が高いことを示した。

## 6. 人工リンパ節の構築と応用

遺伝子を導入してケモカインを産生する TEL-2 細胞を含むコラーゲンゲルハイブリッド組織には、親株の TEL-2 細胞を含むコラーゲンゲルハイブリッド組織に比べて、優位に多数のリンパ球が集ってくることが分かった。このことより、(1)腎皮膜下は、人工リンパ節構築のための組織の移植場所として結果が期待できること、(2)ケモカイン産生 TEL-2 細胞にはリンパ球がより多く集ってくることが示された。そして、現在までに、この 3 要素の組み合わせに工夫を重ね、マウスの腎皮膜下に移植することによって、3 週間でリンパ節の基本構造に類似した組織構造物を 70% 以上の確率で構築することが可能になった。さらに、得られたリンパ組織において強い二次免疫反応が誘導された。我々は、この方法によって人工的に構築されたリンパ節に類似した組織を「人工リンパ節」と呼ぶことにした。

## D. 考察

### 1. AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

AAV2-MCK $\Delta$ CSI は、*mdx* 骨格筋に長期に発現し、発現が認められた筋線維では病理学的な改善が認められ、また筋張力もコントロールマウスに近い値を示した。よって、AAV2-MCK $\Delta$ CSI は、有効であると考えられる。しかし、現在は、局所の治療に留まり、全身的な治療効果は認められない。今後は、経静脈的、経動脈的な delivery が有効な AAV ベクターに切り替えていく必要がある。

イヌにおいては、AAV ベクターを用いて遺伝子導入を行った場合に、マウスとは比較にならない程度で導入遺伝子産物に対する強い免疫応答を生じていることは確定的であり、今後、分子免疫学的背景を追究し、対抗策を見出すことが急務である。AAV ベクターを用いた遺伝子治療法は筋ジストロフィーばかりでなく、血友病 B に対してもイヌモデルを用いて研究が行われている。したがって、筋ジストロフィー犬において、生じていた免疫応答の原因を明らかにすることは、血友病の治療研究に対しても、十分なインパクトを持つと考える。

### 2. 筋ジストロフィーに対する治療研究のための新たなマウスモデル動物

*mdx* マウスではジストロフィン遺伝子に点変異があるために、筋線維にジストロフィンが欠損し、筋線維は壊死する。そのプロセスはデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同じであるが、*mdx* マウスでは再生が壊死を代償するために筋力低下がこない。ジストロフィン欠損ではジストロフィン類似性が高い utrophin が過剰発現していて、これは壊死を多少なりとも抑制していると考えられていた。Kay Davies らはこの *mdx* マウスで utrophin を KO すれば、*mdx* マウスはより重症化すると考え、この *mdx* が作成さ



れた。しかし、その後、このマウスは系統維持が一般化されず入手が困難となった。今回、実験動物中央研究所で体外受精を応用して、系統維持に成功し、今後大量のモデル動物が供給される体制ができたことは画期的なことである。上述したように、進行性の筋力低下をみるので遺伝子治療などで臨床的な効果をみるのには不可欠の動物であろう。

### 3. 筋再生の分子機構

筋再生時には、多数の炎症性細胞の浸潤が認められる。本研究では、炎症性細胞のうち特にマクロファージに着目し、その役割を調べた。マクロファージは炎症後期に浸潤が盛んになり、特にマクロファージ浸潤時期に一致して筋再生が始まる。そこでマクロファージ機能が低下したマウスを作出し、その筋組織を調べたところ著明な筋再生の遅延が観察され、筋再生にはマクロファージが不可欠の機能を果たしていることが明らかになった。このことは、マクロファージが崩壊した筋を貪食処理し、その結果空間的・細胞接触的な刺激が筋衛星細胞に伝わり筋再生のきっかけになると考えることが可能である。しかし一方、マクロファージが産生する何らかの生理活性分子が筋衛星細胞の増殖・分化に働いていると考えることもできる。もし生理活性分子が同定できれば、細胞移植による筋再生手法に新しい考え方を導入することもできる。消化管での炎症反応は、顆粒球浸潤が主たる場合は軽症であるのに対し、マクロファージ浸潤が主たる場合は重症化することが判っている。炎症細胞の種類が症状の違いの原因であることは興味深い (Tsuchiya et al, 2003)。今後、初期に浸潤する顆粒球、遅れて浸潤するマクロファージを局所に誘導する因子の検索、マクロファージが産生する因子の検索などを進める予定であり、筋再生の効率を上昇させる手法の開発に役立つものと考えている。

### 4. 免疫学的背景

1) 自己反応性未熟B細胞の細胞死との除去には、抗原受容体からのシグナルによって新規タンパク iWH37 の産生が誘導され、そのタンパクがミトコンドリアを障害することによって惹起されることを示した。今後はその機能と誘導の機構の解明が必要である。

2) 我々の目指す人工リンパ節の構築は、本来のリンパ節の高度に組織化された三次元構造とその専門的な機能を考え、リンパ節の発生に関する様々な内外の研究報告を検討した結果、リンパ節構築に必須の要素を(1)リンパ節のストローマ細胞を代替する細胞 (2)リンパ節形成に重要だと考えられているサイトカイン (3)生体適合性高分子材料から成る三次元構造骨格、と考えて構築した。

現在、この「人工リンパ節」が実際にリンパ節として機能的な組織であると考えられる理由は、抗原で刺激をして抗原特異的な抗体産生などの二次免疫反応が起こることである。また、いままでの研究経過において、生体適合性高分子材料や組み合わせる細胞によって、移植組織に集積するリンパ球等の細胞の種類や程度、また、リンパ節様の組織構造が構築される確率が大きく左右されることを経験している。より効率良く、リンパ節に類似した組織構造と免疫機能を有する人工リンパ節組織構築の条件の検索を続けている。

### E. 結論

1. AAV2-MCK $\Delta$ CSI は *mdx* マウスの筋変性を抑制するのに有効であった。今後は全身的なウイルスベクターの delivery 法の開発が必要である。中型実験動物研究施設において、人工授精により筋ジストロフィー犬の繁殖を開始し、よ

って我が国における筋ジストロフィー犬コロニーの確立をみた。

2. 筋ジストロフィー犬及びその対照犬の骨格筋に対する AAV ベクターを用いた遺伝子導入を試みたが、強い免疫応答により、導入遺伝子の発現が認められないという結果を得た。
3. Utrophin ノックアウト *mdx* マウスは、進行性の筋力低下、強い筋ジストロフィーの病理変化をみるので、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物としてきわめて有用性が高いことが確認できた。
4. 筋再生過程におけるマクロファージの役割を調べ、再生にはマクロファージが必須の役割を果たすことを明らかにした。マクロファージの筋再生への役割を分子レベルで明らかにすることで、筋再生の効率を向上させ得ることが予想される。
5. 自己反応性未熟 B 細胞の細胞死との除去には、抗原受容体からのシグナルによって新規タンパク iWH37 の産生が誘導され、そのタンパクがミトコンドリアを障害することによって惹起されることを明らかにした。
6. ヒトにおける免疫強化の新たな方法を開発する目的で、免疫組織を人工的に再生することに成功した（人工リンパ節）。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

#### < 英文 >

1. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E,

Nonaka I, Ogawa T, Adams G, Baldwin K, Yasui N, Kishi K, Takeda S:

Skeletal muscle gene expression in space-flown rats.

*FASEB J* 18:522-4, 2004.

2. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R:  
Negamycin Restores Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of *mdx* Mice.  
*J Biochem* (Tokyo) 134(5): 751-8, 2003.
3. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T:  
Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression.  
*J Biol Chem* 279: 10286-92, 2004.
4. Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K:  
Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts.  
*Biochem Biophys Res Commun* 311(1): 32-8, 2003.
5. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K:  
Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat.  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(1): 89-97, 2003.
6. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Motoyoshi K, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role

- for osteopontin.  
*Am J Pathol* 163(1): 203-15, 2003.
7. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, Takeda S: Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD). *Experimental Animals* 52(2), 93-97, 2003.
  8. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M : Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy. *Lab Invest* 83(5): 711-9, 2003.
  9. Kano M, Kitano T, Ikemoto M, Hirasaka K, Asanoma Y, Ogawa T, Takeda S, Nonaka I, Adams GR, Baldwin KM, Oarada M, Kishi K, Nikawa T: Isolation and characterization of a novel gene sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS-90). *J Med Invest* 50(1-2): 39-47, 2003.
  10. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E: Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice *Neuromuscul Disord* 13(3): 207-15, 2003.
  11. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 211: 23-28, 2003.
  12. Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I: A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology* 61: 128-131, 2003.
  13. Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, Takano R, Kawai H, Kamakura K, Mochizuki H, Shizuka-Ikeda M, Nakagawa M, Yoshida Y, Akanuma J, Hoshino K, Saito H, Nishizawa M, Kato S, Saito K, Miyachi T, Yamashita H, Kawai M, Matsumura T, Kuzuhara S, Ibi T, Sahashi K, Nakai H, Kohnosu T, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y: Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: Relationship to phenotype. *Neurology* 60: 1799-1804, 2003.
  14. Ikezoe K, Furuya H, Ohyagi Y, Osoegawa M, Nishino I, Nonaka I, Kira J: Dysferlin expression in tubular aggregates: their possible relationship to endoplasmic reticulum stress. *Acta Neuropathol (Berl)* 105: 603-609, 2003.
  15. Sasaoka T, Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Mizuno Y, Takagoshi N, Hama H, Wakabayashi-Takai E, Yoshimoto-Matsuda Y, Nonaka I, Kaneko K, Yoshida M, Ozawa E: Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 13: 193-206, 2003.
  16. Mimaki M, Ikota A, Sato A, Komaki H, Akanuma J, Nonaka I, Goto Y: A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy. *J Hum Genet* 48: 47-50, 2003.
  17. Furukawa Y, Hashimoto N, Yamakuni T, Ishida Y, Kato C, Ogashiwa M, Kobayashi M, Kobayashi T, Nonaka I, Mizusawa H, Song SY: Down-regulation of an ankyrin repeat-containing protein, V-1, during skeletal muscle differentiation and its re-expression in the regenerative process of muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 13: 32-41, 2003.
  18. Nakashima K, Nonaka I, Masaki S: Effects of serum deprivation on myofibrillar proteolysis in chick myotube cultures.

- Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2455-2458, 2003.
19. Nagasawa T, Sudo A, Fukumizu M, Hanaoka S, Sasaki M, Sugai K, Nonaka I: Congenital monomelic neurogenic disorder with calf muscle hypertrophy. *Brain Dev* 25: 571-573, 2003.
  20. Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 13: 708-711, 2003.
  21. Nakada C, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M: Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathol Int* 53: 653-658, 2003.
  22. Ikeda K, Iwasaki Y, Kuwajima A, Iguchi H, Sunohara N, Nonaka I, Tamura M: Preservation of branchiomotor neurons of the nucleus ambiguus in multiple system atrophy. *Neurology* 61: 722-723, 2003.
  23. Minaguchi K, Hanaoka Y, Maruyama S, Nonaka I, Kajiwara M, Takagi T, Sato Y: DNA analysis of neonatal human remains wrapped and kept in a vinyl bag for 15 years. *Leg Med (Tokyo)* 5 Suppl 1: S183-186, 2003.
  24. Ishikawa H, Nonaka I, Nishino I: Negative result in search for human alpha-dystrobrevin deficiency. *Muscle Nerve* 28: 387-388, 2003.
  25. Nambu M, Kawabe K, Fukuda T, Okuno TB, Ohta S, Nonaka I, Sugie H, Nishino I: A neonatal form of glycogen storage disease type IV. *Neurology* 61: 392-394, 2003.
  26. Schroder R, Reimann J, Salmikangas P, Clemen CS, Hayashi YK, Nonaka I, Arahata K, Carpen O: Beyond LGMD1A: myotilin is a component of central core lesions and nemaline rods. *Neuromuscul Disord* 13: 451-455, 2003.
  27. Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I: A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology* 61: 128-131, 2003.
  28. Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Koçdo E, Mizuno T, Onodera Y, Takano R, Kawai H, Kamakura K, Mochizuki H, Shizuka-Ikeda M, Nakagawa M, Yoshida Y, Akanuma J, Hoshino K, Saito H, Nishizawa M, Kato S, Saito K, Miyachi T, Yamashita H, Kawai M, Matsumura T, Kuzuhara S, Ibi T, Sahashi K, Nakai H, Kohnosu T, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y: Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 60: 1799-1804, 2003.
  29. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004.
  30. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M: Altered expression of ARPP protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology* 71: 43-51, 2004.
  31. Sudo A, Honzawa S, Nonaka I, Goto YI: Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan. *J Hum Genet* 49: 92-96, 2004.
  32. Ikezoe K, Nakagawa M, Osoegawa M, Kira JI, Nonaka I: Ultrastructural detection of DNA fragmentation in myonuclei of fatal reducing body myopathy. *Acta Neuropathol* 2004; (in press)
  33. Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M,

- Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto YI, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 2004; (in press)
34. Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, Nakamura A, Kohama Y, Ishikawa H, Tsujikawa K, Yamamoto H: Role of  $\gamma \delta$  T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice. *J Immunol* 171:5507-5513, 2003.
35. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S-I, Yamamoto H. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle, by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res*, in press, 2004.
36. Oya K, Wang J-Y, Watanabe Y, Koga R, Watanabe T: Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role. *Immunology* 109: 351-359, 2003.
- 筋ジストロフィー治療の進歩  
小児科 44(1): 26-37, 2003.
6. 池本 円、武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療  
ゲノム医学 3(4): 37-43, 2003.
7. 湯浅勝敏、武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療  
内科 91(6): 1326, 2003.
8. 伊藤由佳、武田伸一：  
先天性筋ジストロフィーとジストログ  
リカン糖鎖修飾  
内科 91(6): 1327-1328, 2003.
9. 平田 彰、武田伸一：  
封入体肺炎  
内科 91(6): 1329, 2003.
10. 伊藤由佳、武田伸一：  
筋ジストロフィーの分子病態と治療  
「神経難病に対する治療の試み」  
BIO Clinica 18(12): 47-52, 2003.
11. 深田宗一朗、武田伸一：  
マスター遺伝子と骨格筋分化「循環器  
を理解するうえで重要な分子・現象」  
Heart View (増刊号) 7(12): 98-99, 2003.
12. 望月靖史、武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療の可能  
性  
小児科 44(13): 2081-2088, 2003.
13. 武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療  
特集 第 45 回日本小児神経学会総会  
シンポジウム I: ミオパチーの治療—  
マネジメントから遺伝子治療まで  
脳と発達 36: 117-123, 2004.
14. 武田伸一：  
遺伝性筋疾患とゲノム特集にあたって  
ゲノム医学 4: 4-5, 2004.
15. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する治療研究の  
現状「筋ジストロフィー広がる分子治  
療のターゲット」  
Molecular Medicine 41: 313-315, 2004.
- <和文>
1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 佐藤克二郎、武田伸一：

16. 鈴木友子、武田伸一：  
骨格筋組織幹細胞の性質と治療への応用「筋ジストロフィー広がる分子治療のターゲット」  
Molecular Medicine 41:338-343, 2004.

## II. 学会発表

### <国外>

1. Fukada S, Segawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Yamamoto H, Takeda S:  
Transcriptional profiling of the highly purified quiescent muscle satellite cells.  
Stem Cells, Keystone Symposia, USA. 1. 24-28, 2004.
2. Takeda S:  
Gene Transfer Therapy in DMD.  
3rd Asian & Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting, Singapore. 1. 8, 2004.
3. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, Matsuda R:  
Negamycin-Therapy in Skeletal and Cardiac Muscles of *mdx* Mice.  
3rd Asian & Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting, Singapore. 1. 9, 2004.
4. Imamura M, Nishiyama, Takeda S:  
Expression of  $\epsilon$ -Sarcoglycan in the Murine Central Nervous System.  
The American Society for Cell Biology 43rd Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec.14, 2003.
5. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, M Suzuki Y, Takeda S:  
Migration and myogenic differentiation of bone marrow-derived side population cells during skeletal muscle regeneration.  
The American Society for Cell Biology 43rd Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec. 17, 2003.
6. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mothizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
An AAV Vector-mediated Micro-dystrophin Expression Ameliorates Dystrophic Pheno-types of *mdx* muscles.  
The 11th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Edinburgh, UK, Nov 16, 2003.
7. Itoh Y, Takahashi J, Fujimori K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine.  
The 11th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Edinburgh, UK, Nov 16, 2003.
8. Sato K, Yokota T, Takeda S:  
Shear stress-induced vasodilation of arterioles is dependent on nNOS expression, but not on nNOS localization at the sarcolemma.  
8th Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, Sep 5, 2003.
9. Takeda S, Urasawa N, Yuasa K, Yoshimura M, Tomohiro M, Sugie K, Yuasa S, Nonaka I:  
Molecular pathology of cardiac impairment in canine X-linked muscular dystrophy.  
8th Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, Sep 6, 2003.
10. Takeda S, Sakamoto M, Yoshimura M, Yuasa K, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y:  
An AAV vector-mediated micro-dystrophin expression ameliorates dystrophic pheno-types of *mdx* muscles.  
Molecular Biology of Muscle Development and Regeneration, Banff, Canada, June 4, 2003.
11. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Ojima K, Masuda A, Fukase A, Takeda S:  
Distinct fractions of muscle side population (SP) cells in regenerating muscle.  
Molecular Biology of Muscle Development and Regeneration, Banff, Canada, June 3, 2003.
12. Yoshimura M, Sakamoto M, Yuasa K,

- Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
AAV vector-mediated micro-dystrophin  
expression in dystrophin-deficient  
muscular dystrophy.  
Vth Japanese-French workshop on  
muscular dystrophies, Tokyo, Japan, June  
12, 2003.
13. Ojima K, Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A,  
Fukada S, Fukase A, Masuda S, Takeda S:  
Myogenic potential of side population (SP)  
cells.  
Vth Japanese-French workshop on  
muscular dystrophies, Tokyo, Japan, June  
12, 2003.
14. Nonaka I:  
Immunohistochemical staining in  
diagnosis of muscle disorders. The 8th  
Asia Pacific Association of Societies of  
Pathologists Congress, Bali, Indonesia, 9.3,  
2003.
15. Fukada S, et al.:  
Transcriptional profiling of the high  
purified quiescent muscle satellite cells.  
Keystone Symposium, Keystone, CO,  
USA, 1. 26, 2004.
- <国内>
1. 深田宗一朗、瀬川将司、増田智、幸田  
健一、鈴木友子、山元弘、武田伸一：  
骨格筋特異的幹細胞（筋衛星細胞）の  
遺伝子発現解析  
第3回日本再生医療学会総会 千葉 3.  
24, 2004.
2. 上住聡芳、尾嶋孝一、増田智、深瀬明  
子、鈴木友子、武田伸一：  
骨格筋 side population (SP)細胞におけ  
る sub-fraction の解析  
第3回日本再生医療学会総会 千葉 3.  
24, 2004.
3. 望月靖史、尾嶋孝一、上住聡芳、増田  
智、佐藤克二郎、武田伸一：  
脱神経による筋病変に対する骨髄由来  
細胞の関与  
第3回日本再生医療学会総会 千葉 3.  
24, 2004.
4. 武田伸一、深田宗一朗：  
微小重力による筋萎縮の分子メカニ  
ズム：微小重力によって誘導される  
MuRF1 遺伝子の発現機序の解析  
第26回日本分子生物学会サテライト  
シンポジウム「重力感知/応答におけ  
るシグナリング機構の解明」  
～宇宙実験を目指して～ 神戸 12.  
10, 2003
5. 二川健、深田宗一朗：  
無重力による筋萎縮の分子メカニ  
ズム：無重力に対する筋肉の特異な遺伝  
子応答と細胞内シグナリング  
第26回日本分子生物学会サテライト  
シンポジウム「重力感知/応答におけ  
るシグナリング機構の解明」  
～宇宙実験を目指して～ 神戸 12.  
10, 2003
6. 深田宗一朗、瀬川将司、増田智、樋口  
才飛、幸田健一、伊藤由佳、鈴木友子、  
山元弘、武田伸一：  
骨格筋特異的幹細胞（筋衛星細胞）の  
純化と遺伝子発現解析  
日本炎症・再生学会 京都 11. 27,  
2003
7. 上住聡芳、尾嶋孝一、増田智、深瀬明  
子、鈴木友子、武田伸一：  
骨格筋再生過程における Side  
population (SP) cells の動態  
日本炎症・再生学会 京都 11. 27,  
2003
8. Suzuki Y, Takeda S:  
Myogenic Protein of Bone Marrow Stem  
Cells and Muscle Regeneration.  
第76回日本生化学会大会 横浜  
10.15, 2003
9. Sakamoto M, Yoshimura M, Yuasa K,  
Ikemoto M, Takeda S:  
An AAV Vector-Mediated Micro-  
Dystrophin Expression Ameliorates  
Dystrophic Phenotypes of MDX Muscles.  
第9回日本遺伝子治療学会 東京 7.  
19, 2003
10. Itoh Y, Takahashi J, Fujimori K, Miyagoe-  
Suzuki Y, Takeda S:  
Molecular Mechanism of Over-Expression

of Endogenous Utrophin In AxCALacZ-  
Injected Neonatal MDX Skeletal Muscles.  
第 9 回日本遺伝子治療学会 東京 7.  
19, 2003

11. 吉村まどか、湯浅勝俊、杉江和馬、西  
野一三、埜中征哉、辻省次、武田伸一：  
canine X-linked muscular dystrophy の組  
織学的検討  
第 44 回日本神経学会 横浜 5. 15,  
2003

12. 平田彰、増田智、尾嶋孝一、上住聡芳、  
深瀬明子、鈴木友子、鎌倉恵子、武田  
伸一：  
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  
第 44 回日本神経学会 横浜 5. 16,  
2003

13. 武田伸一：  
シンポジウム：筋ジストロフィーの遺  
伝子治療  
第 45 回日本小児神経学会 福岡 5.  
12-23, 2003

14. 西山章代、武田伸一、今村道博：  
中枢神経系におけるε-サルコグリカン  
分子種の発現  
第 56 回日本細胞生物学会 大津 5. 15,  
2003

15. 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、長崎、3. 29, 2003

16. 幸田健一、他：  
マウス筋前駆細胞の検出法に関する基  
礎的検討  
第 53 回日本薬学会近畿支部大会、11.  
1, 2003

17. 山本有希子、他：  
骨格筋の再生に関与するマクロファ  
ージの役割  
第 53 回日本薬学会近畿支部大会、11.  
1, 2003

18. 瀬川将司、他：

筋組織の再生過程に関与する炎症細胞  
の機能解析  
第 24 回日本炎症・再生医学会、京都、  
11. 27, 2003

19. 瀬川将司、他：  
骨格筋の再生過程におけるマクロファ  
ージ機能の解析  
日本薬学会第 124 年会、大阪、3. 29, 2004

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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

ウイルスベクターを用いた骨格筋に対する遺伝子導入法の開発

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. 国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設において、人工授精を用いた筋ジストロフィー犬の繁殖が可能になったことにより、筋ジストロフィー犬コロニーの確立をみた。
2. ジストロフィン欠損した *mdx* マウス骨格筋に対して治療効果を見出したマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み換えたアデノ随伴ウイルスベクターについて、筋ジストロフィー犬骨格筋に対する導入を行ったが、過剰な免疫応答が誘導され、導入遺伝子産物の発現が認められなかった。免疫応答の機序を解明し、対抗策を見出すことが急務である。

**A. 研究目的**

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子の変異による X-連鎖性の進行性筋疾患である。DMD に対する有効な治療法はなく、ウイルスベクターを用いた dystrophin cDNA の遺伝子導入が有効な治療法の一つと考えられる。我々は、これまでジストロフィン欠損のマウスモデルを用いて、免疫原性が低く、導入遺伝子の長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、短縮型でありながら、筋ジストロフィーの表現型を改善する能力を持つ micro-dystrophin の遺伝子治療についての研究を行ってきた。本年度は、並行して進めてきたジストロフィン欠損の中型モデル動物である筋ジストロフィー犬を用いて AAV ベクターの有効性を検討した。

**B. 研究方法**

1. 筋ジストロフィー犬コロニーの確立

平成 13 年 3 月厚生労働省によって国立精神・神経センター内に中型実験動物研究施設が建設され、同年 11 月より筋ジストロ

フィー犬の飼育が開始された。さらに、同 14 年 6 月から同施設内の繁殖を開始したが、同 15 年 6 月から人工授精による繁殖を開始する。

2. 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する AAV ベクターの導入

2 日齢から 1 歳齢の筋ジストロフィー犬、キャリア犬、正常対照犬の前肢筋及び後肢筋に対し、AAV CMV-lacZ AAV MCK lacZ、AAV CMV-M3、AAV MCK ΔCSI などの AAV ベクターを導入し、組織学的に導入遺伝子の発現を検討した。更に、発現カセットを欠いた空の AAV ベクターを導入し、解析した。AAV ベクターの導入前より Cyclosporin を経口連続投与し、その AAV ベクター導入に対する影響についても検討した。

**C. 研究成果**

1. 筋ジストロフィー犬のコロニーの確立

平成 15 年度内にキャリア犬を用いた計 3 回の分娩を経験した。産仔数の多い点も消失した。また、平成 16 年 3 月で長野県諏

訪市にある中外医科学研究所の筋ジストロフィー犬コロニーの閉鎖もあって、同月の時点で筋ジストロフィー犬 7 匹、キャリア犬 29 匹、正常ビーグル犬 2 匹が飼育され、病態研究と遺伝子治療研究が行われた。

## 2. 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する micro-dystrophin 遺伝子組み換え AAV ベクターの導入

ジストロフィン欠損のマウスモデルについて良好な成績を上げた AAV ベクターを筋ジストロフィー犬及びその対照犬の骨格筋に導入し、その発現効果を検討した。大変残念なことには、2 日齢から 1 歳齢に至るどの時期の実験犬に導入した場合でも、強い細胞浸潤が見出され、導入遺伝子産物の発現はほとんど見られなかった。しかも、その結果は、lacZ 遺伝子を導入した場合でも、micro-dystrophin 遺伝子を導入した場合でも、あるいは ubiquitous な発現パターンを示す CMV プロモーターを使用した場合でも、筋特異的な発現パターンを示す MCK プロモーターを使用した場合でも基本的に変わることがなかった。組織学的に浸潤細胞について詳細に検討すると、CD4、CD8 陽性細胞が多数観察された。そこで、免疫応答の原因を検討するために、発現カセットを欠いた空の AAV ベクターを導入したところ、ほとんど細胞浸潤を生じていなかった。更に、マウス及びイヌ骨格筋から初代骨格筋培養細胞を樹立し、ヘルパーウイルスとしてのアデノウイルスの存在・非存在下で AAV ベクターの導入を行ったが、むしろイヌ培養細胞ではマウスに比べて発現の効率は高い傾向が認められた。そこで、導入 5 日前から、連続した免疫抑制剤の投与下に AAV ベクターの投与を行ったところ、全例ではないが、導入遺伝子産物が顕著に発現する場合があった。

## D. 考察

イヌにおいては、AAV ベクターを用いて遺

伝子導入を行った場合に、マウスとは比較にならない程度で導入遺伝子産物に対する強い免疫応答を生じていることは確定的であり、今後、分子免疫学的背景を追究し、対抗策を見出すことが急務である。AAV ベクターを用いた遺伝子治療は筋ジストロフィーばかりでなく、血友病 B に対してもイヌモデルを用いて研究が行われている。したがって、筋ジストロフィー犬において、生じていた免疫応答の原因を明らかにすることは、血友病の治療研究に対しても、十分なインパクトを持つと考える。

## E. 結論

1. 中型実験動物研究施設において、人工授精により筋ジストロフィー犬の繁殖を開始し、よって我が国における筋ジストロフィー犬コロニーの確立をみた。

2. 筋ジストロフィー犬及びその対照犬の骨格筋に対する AAV ベクターを用いた遺伝子導入を試みたが、強い免疫応答により、導入遺伝子の発現が認められないという結果を得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

#### < 英文 >

1. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams G, Baldwin K, Yasui N, Kishi K, Takeda S: Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J* 18:522-4, 2004.
2. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K,

- Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R:  
Negamycin Restores Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of *mdx* Mice.  
*J Biochem* (Tokyo) 134(5): 751-8, 2003.
3. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T:  
Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression.  
*J Biol Chem* 279: 10286-92, 2004.
  4. Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K:  
Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts.  
*Biochem Biophys Res Commun* 311(1): 32-8, 2003.
  5. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K:  
Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat.  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(1): 89-97, 2003.
  6. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Motoyoshi K, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin.  
*Am J Pathol* 163(1): 203-15, 2003.
  7. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, Takeda S:  
Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD<sub>J</sub>).  
*Experimental Animals* 52(2): 93-97, 2003.
  8. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M:  
Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy.  
*Lab Invest* 83(5): 711-9, 2003.
  9. Kano M, Kitano T, Ikemoto M, Hirasaka K, Asanoma Y, Ogawa T, Takeda S, Nonaka I, Adams GR, Baldwin KM, Oarada M, Kishi K, Nikawa T:  
Isolation and characterization of a novel gene sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS-90).  
*J Med Invest* 50(1-2): 39-47, 2003.
  10. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E:  
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice  
*Neuromuscul Disord* 13(3): 207-15, 2003.
- <和文>
1. 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.
  2. 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.
  3. 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.
  4. 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.
  5. 佐藤克二郎、武田伸一：  
筋ジストロフィー治療の進歩  
小児科 44(1): 26-37, 2003.
  6. 池本 円、武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療  
ゲノム医学 3(4): 37-43, 2003.

7. 湯浅勝敏、武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療  
内科 91(6); 1326, 2003.
8. 伊藤由佳、武田伸一：  
先天性筋ジストロフィーとジストログ  
リカン糖鎖修飾  
内科 91(6); 1327-1328, 2003.
9. 平田 彰、武田伸一：  
封入体肺炎  
内科 91(6); 1329, 2003.
10. 伊藤由佳、武田伸一：  
筋ジストロフィーの分子病態と治療  
「神経難病に対する治療の試み」  
BIO Clinica 18(12): 47-52, 2003.
11. 深田宗一朗、武田伸一：  
マスター遺伝子と骨格筋分化「循環器  
を理解するうえで重要な分子・現象」  
Heart View (増刊号) 7(12): 98-99, 2003.
12. 望月靖史、武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療の可能  
性  
小児科 44(13): 2081-2088, 2003.
13. 武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療  
特集 第 45 回日本小児神経学会総会  
シンポジウム I: ミオパチーの治療ー  
マネージメントから遺伝子治療まで  
脳と発達 36: 117-123, 2004.
14. 武田伸一：  
遺伝性筋疾患とゲノム特集にあたって  
ゲノム医学 4: 4-5, 2004.
15. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する治療研究の  
現状「筋ジストロフィー広がる分子治  
療のターゲット」  
Molecular Medicine 41: 313-315, 2004.
16. 鈴木友子、武田伸一：  
骨格筋組織幹細胞の性質と治療への応  
用「筋ジストロフィー広がる分子治  
療のターゲット」  
Molecular Medicine 41:338-343, 2004.

## II. 学会発表 <国外>

1. Fukada S, Segawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Yamamoto H, Takeda S:  
Transcriptional profiling of the highly purified quiescent muscle satellite cells.  
Stem Cells, Keystone Symposia, USA. 1. 24-28, 2004
2. Takeda S:  
Gene Transfer Therapy in DMD.  
3rd Asian & Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting, Singapore. 1. 8, 2004
3. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykhosslami K, Kondo K, Kaga K, Takeda S, Matsuda R:  
Negamycin-Therapy in Skeletal and Cardiac Muscles of *mdx* Mice.  
3rd Asian & Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting, Singapore. 1. 9, 2004
4. Imamura M, Nishiyama, Takeda S:  
Expression of  $\epsilon$ -Sarcoglycan in the Murine Central Nervous System.  
The American Society for Cell Biology 43rd Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec.14, 2003
5. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, M Suzuki Y, Takeda S:  
Migration and myogenic differentiation of bone marrow-derived side population cells during skeletal muscle regeneration.  
The American Society for Cell Biology 43rd Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec. 17, 2003
6. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mothizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
An AAV Vector-mediated Microdystrophin Expression Ameliorates Dystrophic Phenotypes of *mdx* muscles.  
The 11th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Edinburgh, UK, Nov 16, 2003