

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)

AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに
対する遺伝子治療の pre-clinical study
ー筋ジス犬骨格筋で認められた免疫応答の克服ー
(H16-遺伝子-003)

総括・分担研究報告書

(平成16年度)

主任研究者 武田 伸一

平成17年(2005)年 3月

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)

AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに
対する遺伝子治療の pre-clinical study
－筋ジス犬骨格筋で認められた免疫応答の克服－
(H16-遺伝子-003)

総括・分担研究報告書

(平成16年度)

主任研究者 武田 伸一

平成17年(2005)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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の pre-clinical study
- 筋ジス犬骨格筋で認められた免疫応答の克服- ----- 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 ----- 12
武 田 伸 一
2. 骨格筋に対する AAV ベクターの安全性の検討 ----- 18
鈴 木 友 子
3. 筋ジストロフィー心合併症の発症機序解明とその治療に関する研究 ----- 21
- ユートロフィン KO *mdx* マウスとエメリン KO マウスの心筋障害-
埜 中 征 哉
4. 骨格筋再生時の炎症・免疫学的解析 ----- 25
山 元 弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 28

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

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

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の pre-clinical study
－ 筋ジストロフィー犬で認められた免疫応答の克服－

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

埜中 征哉 国立精神・神経センター 武蔵病院 名誉院長
山元 弘 大阪大学大学院薬学研究科 教授

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、計 7 回の筋ジストロフィー犬の分娩を経験した。その内 1 回は筋ジストロフィー犬精子を用いた人工受精による。
2. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターについて、イヌ骨格筋に対する導入を行ったが、高度な細胞浸潤が観察され、導入遺伝子産物の発現が認められなかった。AAV ベクターはイヌ骨格筋に対する十分な感染性を持っていたことから、今後細胞毒性、免疫誘導の両面から検討を進めることが重要である。
3. 多くの AAV ベクターの血清型を自然宿主とするサル骨格筋へ AAV ベクターを用いて LacZ 遺伝子又はマイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入実験を行い、その有効性を検討した。
4. 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。二重欠損マウスは、骨格筋には変性が強いが、生後 20 週までは明らかな心筋障害は認められなかった。
5. エメリン KO マウスは、心伝導障害と心筋細胞の核膜の空胞化などの変性所見を認めた。
6. 骨格筋の再生における細胞性・分子性メカニズムを明らかにするために、筋衛星細胞の増殖・分化時に発現増強する遺伝子群の同定と、筋再生時に浸潤するマクロファージが発現増強する遺伝子群の同定を試みた。

A. 研究目的

1. AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発

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に

対して、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。

一方、AAV ベクターとマイクロ・ジストロフィン遺伝子を用いる方法論を将来ヒトへ臨床応用することを考えると、ヒトに近い動物を用いて、AAV ベクターの有効性と安全性を詳細に検討する必要がある。そこで、多くの AAV 血清型を自然宿主 (natural host) とするサルを用いて評価を行うことが重要と考えた。本年度は、サル骨格筋へ AAV ベクターを用いて LacZ 遺伝子又はマイクロジストロフィン遺伝子を導入し、骨格筋組織と血清を経時的に解析することにより、導入遺伝子の発現効率、導入遺伝子産物に対する免疫応答を検索し、AAV ベクターの骨格筋に対する局所注入がヒトへ応用できるか検討する。

2. 新たな筋疾患モデルマウス

mdx マウスはジストロフィンが欠損していて、病因はデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同じである。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。心筋に障害があるかどうか、問題として残された。さらに、エメリンは核膜蛋白で、その欠損は心伝導障害を主症状とする Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを起こす。エメリン遺伝子を KO したマウスの作成に成功したので、両モデルマウスでの心筋障害について検討した。

3. 骨格筋再生の分子機構

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、炎症性細胞のなかでも、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により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。

B. 研究方法

1. 筋ジストロフィー犬コロニーの維持と利用

昨年度までにキャリア犬を用いた自然交配と正常犬精子を用いる人工授精による筋ジストロフィー犬の繁殖法を確立した。今年度は、筋ジストロフィー犬をより効率的に作出するために、筋ジストロフィー犬精子を用いた人工授精による繁殖を試みた。

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 2 歳齢までの筋ジストロフィー犬、キャリア犬、正常対照犬の前・後肢筋に対し、AAV2-CMV₁LacZ、AAV2-MCK₁LacZ、AAV2-CMV-M3、AAV2-MCK Δ CS1 などの AAV ベクター ($1-2 \times 10^{13}$ vg/ml を 100-500 μ l) を導入し、導入後 2, 4, 8 週後に導入筋を採取し、組織学的に導入遺伝子の発現を検討した。また、プロモーター塩基配列を取り除くことにより遺伝子発現能を欠失した promoter-less AAV ベクターを作成して $1-2 \times 10^{13}$ vg/ml を 500 μ l 導入し、AAV 粒子による遺伝子発現への影響を検討した。さらに、AAV ベクター導入の 5 日前より免疫抑制剤シクロスポリン (20-50 mg/kg/day) を毎日経口投与し、免疫抑制により遺伝子発現が改善されるかどうか検討した。

3. AAV ベクターを用いたサル骨格筋への遺伝子導入

カニクイザルの左右の上腕筋及び前脛骨筋の計 4 箇所 AAV ベクター (3 箇所) と PBS (1 箇所) を直接注入する。コントロールとしては、導入遺伝子を発現しない promoter-less AAV vector を投与する。LacZ 遺伝子組換え AAV ベクター投与群及びマイクロ・ジストロフィン遺伝子組換え AAV ベクター投与群の 2 群は 3 頭ずつを設け、コントロール群は 2 頭を用いる。なお、使

用個体の雌雄は問わない。導入 1 及び 2 週後に筋組織の生検を、4 週後に安楽死後のサンプリングをそれぞれ行い、同時に各時点で採血も実施する。ベクターの投与及び採血は塩酸ケタミン、生検はイソフルランによる麻酔下で行う。サンプリングは、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下に放血死させた後に実施する。ジストロフィンの発現をウェスタンブロット法及び免疫組織化学染色法を用いて解析し、 β -ガラクトシダーゼの発現を組織化学染色法を用いて解析する。 β -ガラクトシダーゼ及びマイクロジストロフィンに対する血清抗体価の測定を ELISA またはウェスタンブロット法で行う。

4. 新たな筋疾患モデルマウスの作成と解析

対象：*mdx* マウスで *utrophin* 遺伝子が KO されたもの 10 匹、*mdx* マウスで *utrophin* があるもの（通常の *mdx* マウス）*mdx/utro* $-/+$ 10 匹を対象とした。すべてのマウスは生後 14-20 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。

エメリン KO マウスは神経研究所疾病研究第一部で neomycin resistance gene をエクソン 6 に挿入して作成された。

方法：両モデル動物とも、体重測定、筋力測定（金網保持時間、水中遊泳時間など）、血清 CK 値の測定を行った。骨格筋はひらめ筋（赤筋）、前頸骨筋、長指伸筋（白筋）に組織学的、組織化学的染色を行った。

心筋は通常の組織化学的染色のほかに、電子顕微鏡的に検討した。

5. 筋再生の分子機構

正常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。マクロファージを欠損するマウスでの筋再生の様子を調べた。新規モノクロナル抗体を用いて筋衛星細胞を特異

的に濃縮することを試みた。再生筋からマクロファージを高純度に精製することを試みた。

C. 研究成果

1. 筋ジストロフィー犬コロニーの維持と利用

今年度は、7 頭の異なったキャリア犬を用いて雄正常犬との自然交配を 4 回、正常犬精子による人工授精を 2 回、患犬精子による人工授精を 1 回、試みた。全 52 頭の産仔のうち患犬 10 頭を得ることができたが、10 頭中 3 頭は死産であった。得られたイヌを用いて、遺伝子治療研究と病態研究が行われた。

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

① ubiquitous な発現パターンを示す CMV プロモーター下で LacZ 遺伝子を発現する AAV2-CMV_{LacZ} を用いたイヌ正常骨格筋への導入では、2 日齢から 2 歳齢に至るまでの時期に導入した場合でも、導入遺伝子の発現は導入 2 週後でのみ認められ、4 週、8 週後ではほとんど検出されなかった。また、組織像については、導入 2 週後で強い細胞浸潤が認められ、8 週後まで観察された。CMV プロモーター下で micro-dystrophin 遺伝子を発現する AAV2-CMV_{M3} を筋ジストロフィー犬の骨格筋へ導入した場合でも、同様の結果が得られた。一方、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て LacZ 遺伝子（AAV2-MCK_{LacZ}）や micro-dystrophin 遺伝子（AAV2-MCK Δ CS1）を導入した場合では、遺伝子発現は全く認められなかった。

② 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存在・非存在下で AAV2-CMV_{LacZ} の感染を行ったが、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。更に、

AAV2-CMVlacZ のウイルス量を減少して投与したところ、導入 2 週後では遺伝子発現は低かったものの細胞浸潤は認められなかった。しかし、4 週後になると遺伝子発現は消失し、浸潤細胞が出現した。そこで、細胞浸潤の原因が AAV 粒子あるいは導入遺伝子産物のどちらに起因するものかを検討するために、導入遺伝子を発現しない promoter-less AAV ベクターを導入したところ、ほとんど細胞浸潤を生じなかった。

③ AAV2-CMVlacZ を導入した骨格筋の浸潤細胞について詳細に組織学的に検討すると、CD4、CD8 陽性細胞が多数観察され、MHC class I と class II 分子の過剰発現も認められた。また、AAV ベクター導入後のイヌでは、導入遺伝子産物や AAV 粒子に対する血中 IgG 抗体価が上昇していた。そこで、導入 5 日前から、連続した免疫抑制剤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. AAV ベクターを用いたサル骨格筋への遺伝子導入

カニクイザル（2 頭）の両側の上腕二頭筋と全脛骨筋の計 4 カ所に、LacZ 遺伝子組み換え AAV ベクターを投与し、ベクター導入箇所から筋生検を行った。切片を作成 HE 染色を行い、 β -ガラクトシダーゼ染色を施し、injection 部の細胞浸潤の有無と β -gal の発現を確認した。

4. 新たな筋疾患モデルマウスの作成と解析

① 成長：通常の *mdx* マウス (-/+) では生後 14-20 週の体重は 22.0-28.0 (25.0g) あったのに、*utrophin KO mdx* (-/-マウス) では 15.3-18.0 (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。20 週以降にはいるそうのため死亡するものが出現した。エメリン KO マウスではコント

ロールの B10 マウスと成長はなんら変わらず、早期に死亡するものはなかった。

② 筋力低下：*Utrophin KO mdx* -/-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。エメリン KO マウスでは、金網よじ登り試験でも、遊泳試験でもコントロールの B10 マウスと異常はなかった。

③ 心電図所見：エメリン KO マウスでは生後 30 週以降に P R 間隔が優位に延長するようになった (41.6 ± 4.9 n=51) (コントロール： 39.1 ± 3.5 n=15) ($p < 0.01$)。その延長は成長とともに顕著となった。

④ 電子顕微鏡所見：*utrophin/mdx* -/-マウスでは、電子顕微鏡的にも心筋に顕著な変化はみられなかった。一方、エメリン欠損マウスでは生後 21 週目頃から心筋細胞の核膜の離開、空胞化がみられるようになり、それは加齢とともに顕著となった。空胞は必ずしも核膜の離開によるとは限らず、核膜に接する小胞体の空胞化もみられた。障害の強いマウスでは核の 1/10 は変化していた

5. 筋再生の分子機構

マウス筋衛星細胞特異的モノクローナル抗体、SM/C2.6 を樹立し、これを用いてマウス骨格筋から筋衛星細胞を単離精製することに成功した (Exp. Cell Research, 2004)。さらに武田らとの共同研究で、静止期筋衛星細胞が発現する遺伝子について、遺伝子チップを用いた網羅的解析を進め、多数の遺伝子を同定した (深田ら, 2005)。一方これまでに、再生が始まる時期と同期して、再生筋組織にマクロファージが多量に浸潤すること、さらにマクロファージが欠損した条件下では筋再生はほとんど進行せず、

むしろ線維の増生が盛んになることがわかっていて(瀬川ら, 2004)。

そこでマクロファージが産生する何らかの因子が筋再生に働いている可能性があると考え、再生途中にある骨格筋のサイトカイン mRNA 解析(ノザンプロット法によるアレイ解析)を進めたが、TGF β 以外には特徴的な遺伝子発現の変化は認められなかった。TGF β は、筋再生過程で線維芽細胞に働き、膠原線維の増生を促進していると考えられ、筋衛星細胞に働き、筋衛星細胞の増殖分化に働くサイトカインとは考えられないことがわかった。

マクロファージが産生し、筋衛星細胞に働く生理活性分子を同定するためには、再生途中の骨格筋から浸潤しているマクロファージのみを単離精製し、それが発現している遺伝子を同定しなければならない。この目的のために、カルジオトキシンにより再生を誘導したマウス骨格筋から、マグネットビーズ法でマクロファージの精製を試み、90%以上の純度で精製することができた。

現在、精製マクロファージの網羅的遺伝子チップ解析を進めており、正常マクロファージもしくは活性化マクロファージと比較して、再生途中の骨格筋のマクロファージに特徴的に認められる遺伝子を調べている。

D. 考察

1. AAV ベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入

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。現在、マウスに比べイヌで免疫応答が強く賦活化される機構を調べるために、マウス及びイ

ヌの脾臓から Dendritic cell-enriched splenocyte を単離し、AAV ベクターを用いた *in vitro* 感染実験を行っている。また、これまでは β -ガラクトシダーゼやヒト micro-dystrophin を用いたのに対し、導入遺伝子産物による細胞毒性と免疫応答を検討するために今回新たにイヌ micro-dystrophin をクローニングした。現在、イヌ micro-dystrophin をコードする AAV ベクターを準備中である。

一方、AAV ベクターを用いたサル骨格筋への遺伝子導入では、AAVCMVLacZ の導入により、 β -gal 陽性の骨格筋線維が出現するとの結果を予報的に得ている。 β -gal は陽性線維の持続性、細胞浸潤の有無等について今後検討を進める必要がある。

2. 新たな筋疾患モデルマウス

mdx マウスでは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みられない。ジストロフィンを代償している utrophin 遺伝子を KO すると明らかに進行性の筋力低下をきたす。治療実験で、症状の改善の有無をみるのには最適な動物モデルである。このマウスを今年度から全国の実験者に供給できる体制を整えたことは大きな成果であった。

一方、筋ジストロフィーには心筋障害が合併する。Utrophin KO *mdx* マウスでは四肢筋の進行性の筋力低下をみて、マウスはるいそうで死亡する。本モデル動物で心筋障害が証明されれば、デュシェンヌ型の心合併の機序の解明と治療法の開発に大いに役立つことが期待できる。しかし、20 週までは心筋障害は証明されなかった。もっと年齢が高いマウスを検索する必要があるだろう。

さらに、エメリン KO マウスは期待通り

の心合併症を来した。このマウスは Emery-Dreifuss 型の心伝導障害病態解明に役立つだけでなく、治療実験にも利用されるであろう。現在系統維持に成功しているので、このマウスを使用しての治療（遺伝子治療を含む）実験を進めることができると期待される。

3. 筋再生とマクロファージ

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られる。筋衛星細胞上に、マクロファージで発現上昇する遺伝子産物に対する受容体遺伝子が発現上昇しておれば、筋再生に働く分子の同定につながると考えられ、今後、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。

E. 結論

1. 筋ジストロフィー犬の繁殖・飼育・実験を行うために設立された国立精神・神経センター神経研究所中型実験動物研究施設において、今年度は7回の分娩を経験し、その内1回は患犬精子を用いた人工授精による繁殖を試みた。

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、強い細胞浸潤を認めた一方、導入遺伝子の発現が認められなかった。今後、AAV ベクターによる細胞毒性

と免疫応答の両面から検討を進める必要がある。

3. 霊長類による AAV ベクターの安全性の検討は、AAV ベクターによる遺伝子治療の開発に重要である。今後も個体数を増やし、効率と安全性に関して検討を進める必要がある。

4. 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。系統維持ができ、大量に研究者に供給できるようになった。しかし、人にみられる心筋障害は生後20週まではみられなかった。

5. エメリン KO マウスでは加齢とともに Emery-Dreifuss 型にみられる心伝導障害が認められるようになった。本症の心合併症の病態解明と治療法開発に役立つモデル動物として価値あると評価できる。

6. 筋再生過程におけるマクロファージの役割を調べた。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る新しい方法が開発できることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

< 英文 >

1. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:
 ϵ -Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy.
Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Epub ahead of print]
2. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL:
Coordinate control of axon defasciculation

- and myelination by laminin-2 and -8.
J Cell Biol, 168(4): 655-66, 2005
3. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, 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.
J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004
 4. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of *mdx* myofibers improved the *mdx* phenotype.
Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004
 5. Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T:
Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease.
J Alzheimers Dis, 6(5):483-8, 2004
 6. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration
Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
 7. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M:
Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice.
Hum Mol Genet, 2004, 13(16): 1775-1784.
 8. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H:
Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.
Exp Cell Res, 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
 9. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:
Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system.
Mol Brain Res, 125(1-2): 1-12, 2004
 10. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:
 α 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.
J Biol Chem, 279(15): 15091-5, 2004
 11. Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I:
Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240kb deletion in Xq28 without male hypogonadism. Neuromuscul Disord, 2005; 15: 245-252
 12. Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. Curr Neurol Neurosci Rep, 2005; 5: 61-65
 13. 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; 107: 439-442
 15. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K, Takeda S: Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. FASEB J, 2004; 18: 522-524
 16. 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; 279: 11402-11407
 17. Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Two novel CAV3 gene mutations in Japanese families. Neuromuscul Disord, 2004; 14: 810-814
 18. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, Shimakawa S, Hagiwara T, Ouvrier R, Sparrow JC, Nishino I, North KN, Nonaka I: Actin mutations are one cause of congenital fibre

- type disproportion. *Ann Neurol*, 2004; 56: 689-94
19. Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology*, 2004; 62: 2209-2213
 20. Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology*, 2004; 62: 1009-1011
 21. Kawano F, Ishihara A, Stevens JL, Wang XD, Ohshima S, Horisaka M, Maeda Y, Nonaka I, Ohira Y: Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004; 287: R76-86
 22. Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I: Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman. *Neuromuscul Disord*, 2004 15: 262-264
 23. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Hayashi YK, Minami N, Nishino I, Nonaka I, Takahashi T, Sawa H, Aoki M, Nagashima K: Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology*, 2004; 24: 341-346
 24. Nakae Y, Stoward PJ, Kashiwayama T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, Nonaka I: Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and *mdx* mice. *J Mol Histol*, 2004; 35: 489-499
 25. Tokoyoda K., K.Tsujikawa, Y.Ono, H.Matsushita, T.Hayashi, Y.Harada, M.Kubo, R.Abe, H.Yamamoto. Upregulation of IL-4 production by the activated cAMP/PKA pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells. *International Immunology*, 16:643-653, 2004.
- <和文>
- I. 武田伸一 :
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望.
第 45 回日本神経学会総会シンポジウム, 遺伝性筋ジストロフィーの根本的治療をめざして
臨床神経, 44: 911-913, 2004
- II. 学会発表
- <国外>
1. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Molecular characterization of quiescent satellite cells and their application to cell therapy
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 11, 2005
 2. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Identification of a novel subpopulation of SP cells during muscle regeneration.
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
 3. Yoshioka H, Shiga K, Takeda S, Imamura M:
In vitro analysis of assembly of the sarcoglycan complex containig ζ -sarcoglycan.
the American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, Dec 7, 2004
 4. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy
Molecular Therapy of Muscular Dystrophy /Part II, International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Tokyo, Nov 12, 2004
 5. Takeda S:
The role of muscle stem cells in muscle regeneration.
Seminar at Hammer Smith Hospital, London, UK, Nov. 8, 2004
 6. Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.

- The 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, Finland, Nov 5, 2004
7. Takeda S:
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Seminar at Genethon, Evry, France, 7 Sep, 2004
 8. Takeda S:
A novel sub-population of muscle Side Population (SP) cells and their roles in muscle regeneration.
Seminar at Pasteur Institute, Paris, France, Sep 6, 2004
 9. Yoshida M, Ampong BN, Mochizuki Y, Imamura M, Takeda S:
Dysferlin may interact with dihydropyridine receptor.
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
 10. Takeda S, Mochizuki Y, Uezumi A, Ojima K, Masuda S:
Contribution of bone marrow derived cells to denervated skeletal muscle.
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
 11. Takeda S:
Gene transfer in Duchenne muscular dystrophy.
Monaco Round Table Discussion -Microdystrophin from concept to clinical trials-, Monte Carlo, Monaco, 6.19, 2004
 12. Takeda S:
AAV vector and microdystrophin. Lecture at the 7th Summer School of Myology, Institut de Myologie, Paris, France, 6.17, 2004
 13. Takeda S, Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y:
An AAV vector-mediated microdystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient *mdx* myofibers still improved the *mdx* phenotype through compensatory hypertrophy.
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.4, 2004
 14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.3, 2004
 15. Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I:
Recent advances in congenital muscular dystrophy research. The 4th AOMC Scientific Meeting, Kaohsiung, March 4, 2005
 16. 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. 深田総一郎, 上住聡芳, 瀬川雅司, 増田 智, 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 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
 2. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田総一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:
骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの解析。
第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
 3. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田総一郎, 増田智, 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再生における機能。
第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
 4. 武田伸一:
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の pre-clinical study - 筋ジストロフィー骨格筋で認められた免疫応答の克服 -。
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会, 東京, 2.25, 2005
 5. 武田伸一:
骨格筋・幹細胞と筋再生の分子機構。
慶應大学医学部セミナー・日本横紋筋肉腫研究グループ (J R S G), 東京,

2. 14, 2005
6. 武田伸一, 石浦章一, 鈴木友子:
内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発。
こころの健康科学 (神経分野) 研究成果発表会 (研究者向け), 東京, 2.9, 2005
7. 武田伸一, 鈴木友子, 増田 智, 深田宗一朗, 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳:
微小重力による筋萎縮の分子メカニズム。
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
8. 二川 健, 平坂勝也, 久田記美子, 後藤淳平, 不老治治美, 大西ゆう子, 岸 恭一, 小川貴之, 鈴江直人, 安井夏生, 石堂一巳, 埜中征哉, 武田伸一:
Unloading による筋・骨萎縮におけるユビキチン・システムの重要性ユビキチンリガーゼの結合蛋白質の解析を中心に。
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
9. 武田伸一:
骨格筋幹細胞と筋再生。
東京大学大学院セミナー, 11.19, 2004
10. 武田伸一:
筋ジストロフィーに対する生殖医療と遺伝子治療。
埼玉県筋ジストロフィー協会創立 40 周年記念大会関連シンポジウム「遺伝子疾患 (筋ジストロフィーなど) と生殖医療」, 9.18, 2004
11. 武田伸一:
骨格筋の幹細胞を巡る進歩。
東北大学医学部セミナー, 宮城県仙台市, 9.17, 2004
12. 武田伸一:
将来の治療。
平成 16 年度神経・筋疾患政策医療ネットワーク研修会, 東京, 9.16, 2004
13. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
An AAV-vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient *mdx* myofibers still improved the *mdx* phenotype.
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
15. 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 の解析。
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.14, 2004
16. 望月靖史, 尾嶋孝一, 上住聡芳, 増田 智, 武田伸一:
骨格筋の脱神経病変に対する骨髄由来細胞の関与
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2004
17. 武田伸一:
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。
三菱ウエルファーマ, 横浜, 5.28, 2004
18. 武田伸一:
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。
第 45 回日本神経学会総会シンポジウム 東京 5.14, 2004
19. 吉村まどか, 池本 円, 坂本美喜, 望月靖史, 湯浅勝敏, 辻 省次, 武田伸一:
アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるマイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入効果
第 45 回日本神経学会総会, 東京, 5.14, 2004
20. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田宗一朗, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋再生過程による Side Population (SP) 細胞の解析
第 2 回幹細胞シンポジウム, 4.26, 2004.
21. 鈴木友子:
骨格筋幹細胞と再生。獣医生理学・生化学分科シンポジウム: 骨格筋研究への複合領域的アプローチ 第 137 回日本獣医学会学術集会, 4.4, 2004
22. 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.
23. 瀬川将司, 他, 骨格筋の再生過程に認

められる炎症性細胞の役割, 第 5 回フ
ァーマコヘマトロジーシンポジウム
(大阪), 6.25, 2004.

24. 坂本健太, 他, 先天性筋疾患マウスを
用いた筋形成能力の解析と細胞移植療
法の検討, 第 54 回日本薬学会近畿支
部大会 (神戸), 10.23, 2004.
25. 瀬川将司, 他, 骨格筋再生過程に関わ
る炎症細胞の機能解析, 第 34 回日本
免疫学会総会学術集会 (札幌), 12.2,
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、計 7 回の筋ジストロフィー犬の分娩を経験した。その内 1 回は筋ジス犬精子を用いた人工受精によった。
2. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターについて、イヌ骨格筋に対する導入を行ったが、高度な細胞浸潤が観察され、導入遺伝子産物の発現が認められなかった。AAV ベクターはイヌ骨格筋に対する十分な感染性を持っていたことから、今後細胞毒性、免疫誘導の両面から検討を進めることが重要である。

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に対して、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維持と利用

昨年度までにキャリア犬を用いた自然交配と正常犬精子を用いる人工授精による筋ジストロフィー犬の繁殖法を確立した。今

年度は、筋ジストロフィー犬をより効率的に作出するために、筋ジストロフィー犬精子を用いた人工授精による繁殖を試みた。

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 2 歳齢までの筋ジストロフィー犬、キャリア犬、正常対照犬の前・後肢筋に対し、AAV2-CMV-LacZ, AAV2-MCK-LacZ, AAV2-CMV-M3, AAV2-MCK-ΔCS1 などの AAV ベクター ($1-2 \times 10^{13}$ vg/ml を 100-500 μ l) を導入し、導入後 2, 4, 8 週後に導入筋を採取し、組織学的に導入遺伝子の発現を検討した。また、プロモーター塩基配列を取り除くことにより遺伝子発現能を欠失した promoter-less AAV ベクターを作成して $1-2 \times 10^{13}$ vg/ml を 500 μ l 導入し、AAV 粒子による遺伝子発現への影響を検討した。さらに、AAV ベクター導入の 5 日前より免疫抑制剤シクロスポリン (20-50 mg/kg/day) を毎日経口投与し、免疫抑制により遺伝子発現が改善されるかどうか検討した。

C. 研究成果

1. 筋ジストロフィー犬コロニーの維持と利用

今年度は、7頭の異なったキャリア犬を用いて雄正常犬との自然交配を4回、正常犬精子による人工授精を2回、患犬精子による人工授精を1回、試みた。全52頭の産仔のうち患犬10頭を得ることができたが、10頭中3頭は死産であった。得られたイヌを用いて、遺伝子治療研究と病態研究が行われた。

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

①ubiquitousな発現パターンを示すCMVプロモーター下でLacZ遺伝子を発現するAAV2-CMVLacZを用いたイヌ正常骨格筋への導入では、2日齢から2歳齢に至るどの時期に導入した場合でも、導入遺伝子の発現は導入2週間後でのみ認められ、4週、8週間後ではほとんど検出されなかった。また、組織像については、導入2週間後で強い細胞浸潤が認められ、8週間まで観察された。CMVプロモーター下でmicro-dystrophin遺伝子を発現するAAV2-CMVM3を筋ジストロフィー犬の骨格筋へ導入した場合でも、同様の結果が得られた。一方、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てLacZ遺伝子(AAV2-MCKLacZ)やmicro-dystrophin遺伝子(AAV2-MCKΔCS1)を導入した場合では、遺伝子発現は全く認められなかった。

② 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存在・非存在下でAAV2-CMVLacZの感染を行ったが、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。更に、AAV2-CMVLacZのウイルス量を減少して投与したところ、導入2週間後では遺伝子発現は低かったものの細胞浸潤は認められな

かった。しかし、4週間後になると遺伝子発現は消失し、浸潤細胞が出現した。そこで、細胞浸潤の原因がAAV粒子或は導入遺伝子産物のどちらに起因するものかを検討するために、導入遺伝子を発現しないpromoter-less AAVベクターを導入したところ、ほとんど細胞浸潤を生じなかった。

③ AAV2-CMVLacZを導入した骨格筋の浸潤細胞について詳細に組織学的に検討すると、CD4、CD8陽性細胞が多数観察され、MHC class Iとclass II分子の過剰発現も認められた。また、AAVベクター導入後のイヌでは、導入遺伝子産物やAAV粒子に対する血中IgG抗体価が上昇していた。そこで、導入5日前から、連続した免疫抑制剤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。現在、マウスに比べイヌで免疫応答が強く賦活化される機構を調べるために、マウス及びイヌの脾臓からDendritic cell-enriched splenocyteを単離し、AAVベクターを用いたin vitro感染実験を行っている。また、これまではβ-ガラクトシダーゼやヒトmicro-dystrophinを用いたのに対し、導入遺伝子産物による細胞毒性と免疫応答を検討するために今回新たにイヌmicro-dystrophinをクローニングした。現在、イヌmicro-dystrophinをコードするAAVベクターを準備中である。

E. 結論

1. 筋ジストロフィー犬の繁殖・飼育・実験を行うために設立された国立精神・神経

センター神経研究所中型実験動物研究施設において、今年度は 7 回の分娩を経験し、その内 1 回は患犬精子を用いた人工授精による繁殖を試みた。

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、強い細胞浸潤を認めただ一方、導入遺伝子の発現が認められなかった。今後、AAV ベクターによる細胞毒性和免疫応答の両面から検討を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:
 ϵ -Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy.
Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Epub ahead of print]
2. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL:
Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8.
J Cell Biol. 168(4): 655-66, 2005
3. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, 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.
J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004
4. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype.
Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004

5. Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T:
Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease.
J Alzheimers Dis, 6(5):483-8, 2004
6. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration
Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
7. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M:
Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice.
Hum Mol Genet. 2004, 13(16): 1775-1784.
8. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H:
Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.
Exp Cell Res. 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
9. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:
Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system.
Mol Brain Res. 125(1-2): 1-12, 2004
10. Muehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:
 α 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.
J Biol Chem. 279(15): 15091-5, 2004

<和文>

1. 武田伸一:
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望.
第 45 回日本神経学会総会シンポジウム, 遺伝性筋ジストロフィーの根本的治療をめざして

II. 学会発表

<国外>

1. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Molecular characterization of quiescent satellite cells and their application to cell therapy
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 11, 2005
2. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Identification of a novel subpopulation of SP cells during muscle regeneration.
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
3. Yoshioka H, Shiga K, Takeda S, Imamura M:
In vitro analysis of assembly of the sarcoglycan complex containing ζ -sarcoglycan.
the American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, Dec 7, 2004
4. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy
Molecular Therapy of Muscular Dystrophy /Part II, International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Tokyo, Nov 12, 2004
5. Takeda S:
The role of muscle stem cells in muscle regeneration.
Seminar at Hammer Smith Hospital, London, UK, Nov. 8, 2004
6. Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.
The 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, Finland, Nov 5, 2004
7. Takeda S:
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Seminar at Genethon, Evry, France, 7 Sep, 2004
8. Takeda S:
A novel sub-population of muscle Side Population (SP) cells and their roles in muscle regeneration.
Seminar at Pasteur Institute, Paris, France, Sep 6, 2004
9. Yoshida M, Ampong BN, Mochizuki Y, Imamura M, Takeda S:
Dysferlin may interact with dihydropyridine receptor.
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
10. Takeda S, Mochizuki Y, Uezumi A, Ojima K, Masuda S:
Contribution of bone marrow derived cells to denervated skeletal muscle.
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
11. Takeda S:
Gene transfer in Duchenne muscular dystrophy.
Monaco Round Table Discussion -Microdystrophin from concept to clinical trials-, Monte Carlo, Monaco, 6.19, 2004
12. Takeda S:
AAV vector and microdystrophin. Lecture at the 7th Summer School of Myology, Institut de Myologie, Paris, France, 6.17, 2004
13. Takeda S, Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y:
An AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient mdx myofibers still improved the mdx phenotype through compensatory hypertrophy.
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.4, 2004
14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.3,

<国内>

1. 深田総一郎, 上住聡芳, 瀬川雅司, 増田 智, 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 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
2. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田総一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:
骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの解析。
第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
3. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田総一郎, 増田智, 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再生における機能。
第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
4. 武田伸一:
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の pre-clinical study - 筋ジストロフィーで認められた免疫応答の克服 -。
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会, 東京, 2.25, 2005
5. 武田伸一:
骨格筋・幹細胞と筋再生の分子機構。
慶應大学医学部セミナー・日本横紋筋肉腫研究グループ (J R S G), 東京, 2.14, 2005
6. 武田伸一, 石浦章一, 鈴木友子:
内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発。
こころの健康科学 (神経分野) 研究成果発表会 (研究者向け), 東京, 2.9, 2005
7. 武田伸一, 鈴木友子, 増田 智, 深田宗一郎, 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳:
微小重力による筋萎縮の分子メカニズム。
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
8. 二川 健, 平坂勝也, 久田記美子, 後藤淳平, 不老治治美, 大西ゆう子, 岸 恭一, 小川貴之, 鈴江直人, 安井夏生,
石堂一巳, 埜中征哉, 武田伸一:
Unloading による筋・骨萎縮におけるユビキチン・システムの重要性ユビキチンリガーゼの結合蛋白質の解析を中心に。
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
9. 武田伸一:
骨格筋幹細胞と筋再生。
東京大学大学院セミナー, 11.19, 2004
10. 武田伸一:
筋ジストロフィーに対する生殖医療と遺伝子治療。
埼玉県筋ジストロフィー協会創立 40 周年記念大会関連シンポジウム「遺伝子疾患 (筋ジストロフィーなど) と生殖医療」, 9.18, 2004
11. 武田伸一:
骨格筋の幹細胞を巡る進歩。
東北大学医学部セミナー, 宮城県仙台市, 9.17, 2004
12. 武田伸一:
将来の治療。
平成 16 年度神経・筋疾患政策医療ネットワーク研修会, 東京, 9.16, 2004
13. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
An AAV-vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient mdx myofibers still improved the mdx phenotype.
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
15. 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 の解析。
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.14, 2004
16. 望月靖史, 尾嶋孝一, 上住聡芳, 増田智, 武田伸一:
骨格筋の脱神経病変に対する骨髄由来細胞の関与

第 25 回日本炎症・再生医学会，東京，
7.13, 2004

17. 武田伸一：
筋ジストロフィーモデル動物における
遺伝子治療研究の現況と展望。
三菱ウエルファーマ 横浜 5.28, 2004
18. 武田伸一：
筋ジストロフィーモデル動物における
遺伝子治療研究の現況と展望。
第 45 回日本神経学会総会シンポジウ
ム 東京 5.14, 2004
19. 吉村まどか，池本 円，坂本美喜，望
月靖史，湯浅勝敏，辻 省次，武田伸
一：
アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター
によるマイクロ・ジストロフィン遺伝
子の導入効果
第 45 回日本神経学会総会，東京，5.14，
2004
20. 上住聡芳，尾嶋孝一，深田宗一郎，増
田 智，深瀬明子，鈴木友子，武田伸
一：
骨格筋再生過程による Side
Population (SP) 細胞の解析
第 2 回幹細胞シンポジウム，4.26, 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし