

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 17 年度)

主任研究者 武田 伸一

平成 18 年 (2006) 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 ー筋ジストロフィー骨格筋で認められた免疫応答の克服ー	----- 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	----- 19
鈴 木 友 子	
3. 縁取り空胞型筋変性の発生機序に関する研究	----- 22
埜 中 征 哉	
4. 骨格筋再生時の炎症・免疫学的反応の解析	----- 25
山 元 弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31

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. Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）はジストロフィン欠損によって起こる進行性の筋変性疾患である。DMD に対する遺伝子治療法を確立するために、我々は組換え アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いたマイクロ・ジストロフィン遺伝子の骨格筋への導入実験を行ってきた。これまでの実験結果では、マウス骨格筋に対する導入は有効で安全性も高いが、イヌ骨格筋に対する導入では高度の免疫応答が誘導された。
2. 免疫応答に対する方策として、新たな AAV の血清型である 8 型を用いて遺伝子導入を行ったところ、マウス・モデルでは、導入筋を超えた広い範囲での遺伝子発現が観察された。一方、イヌ骨格筋に導入した場合には、免疫応答が低い傾向があった。
3. 免疫抑制剤である cyclosporine と mycophenolate mofetil を併用して組換え AAV のイヌ骨格筋に対する遺伝子導入を試みたところ、免疫応答が軽減していた。
4. イヌに対する遺伝子導入実験について、より抗原性が低いと考えられるイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入実験を進めた。
5. 霊長類を用いて、組換え AAV の有効性と安全性をさらに詳細に検討した。従来よく用いられてきた AAV-type 2 に LacZ 遺伝子又はマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み込んだものをカニクイザル骨格筋へ導入し、その骨格筋組織と血清を経時的にサンプリングし、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、組換え AAV による治療が安全であるか検討した。
6. 縁取り空胞変性には、核内に 20 nm のフィラメント様封入体を入れ、アミロイドタンパクが沈着するタイプ（縁取り空胞型ミオパチー、封入体筋炎）と強い核の変性、それに続く筋原線維の変性をみるが、アミロイドの沈着のないタイプ（Marinesco-Sjögren 症候群）、そのほか（眼咽頭筋ジストロフィー）に分類された。
7. hmutGNETg-GNE (-/-) マウスは、縁取り空胞型ミオパチー（DMRV）患者で見られる筋病理所見を再現しており、世界で初めて DMRV のモデルマウス作製に成功した。
8. 骨格筋が再生する際におこる炎症反応の意義を明らかにするために、筋再生時に浸潤する炎症性細胞の役割について解析した。その結果、骨格筋での線維化の亢進は、マクロファージ由来の線維化抑制因子の産生低下が原因であることが示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する遺伝子治療に関して、十分な機能を保持した小型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子 (micro-dystrophin 遺伝子) を開発し、アデノ随伴ウイルス血清 2 型 (AAV2) へ組み込んだ recombinant AAV2-micro-dystrophin を用いることでジストロフィン欠損マウス (*mdx* マウス) の筋変性が抑制されることを示した。しかし、AAV2-micro-dystrophin を重症で進行性の筋ジストロフィー犬の骨格筋へ導入すると免疫応答が引き起こされ、導入遺伝子の発現は、極めて短期間に留まっていた。そこで、免疫応答を克服するために、以下のような方法論を立案した。

第一は、これまでに用いられてきた cyclosporine による免疫抑制に加えて mycophenolate mofetil を使用することである。

第二は最近見出された新たな血清型の AAV を用いることである。AAV2 は局所的な遺伝子導入には有効で、導入遺伝子の長期的な発現は可能であるが、血流を介した全身の骨格への導入には適していないことが課題となっていた。一方、新たな血清型として発見された血清 8 型は、抗原性が低く、全身の骨格筋及び心筋における遺伝子導入発現が可能であることが明らかにされた。そこで、我々はジストロフィン欠損による DMD 及び DMD に類似した肢帯型筋ジストロフィーに対する治療研究を行った。

第三に、より抗原性の低い治療用遺伝子として、イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子に注目した。これまで、ヒトに対する治療を前提として、ヒト型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子を使用してきたが、筋ジストロフィー犬における組換え AAV を用いた治療実験において少しでも抗原性を低下させるために、イヌ型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングした。

さらに、組換え AAV とマイクロ・ジスト

ロフィン遺伝子を臨床応用する前に、よりヒトに近い霊長類で組換え AAV の導入に伴う細胞毒性/免疫応答を検討し、その有効性と安全性を詳細に検討する必要がある。本研究では、カニクイザル骨格筋へ組換え AAV 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、組換え AAV が DMD 治療に応用できるか検討することにした。

骨格筋に対する遺伝子導入法を開発することは、筋ジストロフィーばかりでなく、他の筋疾患に対する治療も可能にすると考えられる。筋ジストロフィーに次いで多くみられるのが縁取り空胞 (rimmed vacuoles: RV) 型筋変性である。両者の筋変性過程、変性後の再生は全く異なっている。両者を比較、検討することは、筋疾患の病因・病態を考える上にきわめて重要である。RV は遠位型ミオパチー (DMRV), 封入体筋炎, 眼咽頭型筋ジストロフィー, Marinesco-Sjögren (MSS) 症候群など数多くの疾患で認められる。今回は RV 形成について、まず上記各疾患での変性過程の相違を検討した。

DMRV はシアル酸合成の律速段階酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase をコードする *GNE* 遺伝子の機能喪失型変異による疾患である。罹患筋の病理観察ではリソソーム酵素活性を示す縁取り空胞の形成に加え、筋線維の大小不同、核内封入体形成、 β アミロイドタンパク質の沈着などの特徴が見られる。しかし、*GNE* 変異からこれらの病理像や筋萎縮に至るプロセスは全く不明である。本疾患の病態解析と治療法開発を目的に、DMRV のモデル動物として変異 *GNE* のみを発現するマウスを作製し、その表現型を解析した。

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、筋ジストロフィーの分子病態において、筋変性・壊死と並んで

重要な筋再生機構について充分に知る必要がある。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、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、筋ジストロフィーの病態改善のための新しい手法を確立することを目的とする。

あわせて、筋ジストロフィーに伴い認められる脂肪細胞の出現様式、および骨格筋組織の構築に必須の細胞外基質膜構成分子メロシンの産生にあずかる細胞の同定を試みた。

B. 研究方法

1. 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する組換え AAV の導入

1) 免疫抑制剤の併用療法の開発

これまで組換え AAV の導入 5 日前より骨格筋の生検を終えるまで、免疫抑制剤シクロスポリン (20-50 mg/kg/day) を連日経口投与し、遺伝子発現が改善されるかどうか検討してきた。今回は cyclosporine に mycophenolate mofetil (MMF) (30 mg/kg/day) を併用投与した場合の遺伝子発現について検討を加えた。

2) 8 型組換え AAV の導入

導入遺伝子として LacZ 遺伝子あるいは ϵ -SG 遺伝子を選択し、CMV プロモーターの下流に組み込んで AAV8 のウィルス粒子を作製した。lacZ 遺伝子を組み込んだ AAV については、正常犬骨格筋への導入を行い、 ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ AAV については、 α -SG 欠損マウス骨格筋への導入を主として行った。

3) イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の作製

これまでに作製したヒト型マイクロ・ジストロフィン遺伝子を前提として、完全な N 端と 4 回リピート構造 / 3 回ヒンジ構造から成るロッド・ドメイン、cysteine rich ドメイン、alternative splicing を受ける exon 71~78

を delete した C 端からなるイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングし、同遺伝子を組み込んだ 2 型及び 8 型の組換え AAV を作製した。

2. 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エ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 またはウエスタンブロット法で行う。

3. 新たな筋疾患モデルマウスの作成と解析

対象 : DMRV, 封入体筋炎 : 各 10 例, 眼咽頭型筋ジストロフィー : 5 例, MSS : 10 例の生検筋を対象とした。生検に当たっては、患者から生検、研究用使用の許可を書類 (国立精神・神経センター倫理委員会承認) にて得たものを使用した。生検筋には組織化学的染色、免疫組織化学的染色、電子顕微鏡的検索を行った。

胎生致死である GNE 遺伝子ノックアウト

マウス遺伝形質 (GNE^{-/-}) と、本邦 DMRV 患者で最も頻度の高いヒト V572L 変異 GNE を発現するトランスジェニックマウス (hmutGNETg) の掛け合わせにより、ヒト V572L 変異 GNE のみを発現するマウス (hmutGNETg-GNE^{-/-}) を作製した。動物の作成、解析は神経研究所疾病研究第一部 (西野一三部長, May C. V. Malicdan 研究員) の協同研究によって行われた。

4. 筋再生の分子機構

- 1) 正常マウス前脛骨筋にカルジオトキシン (CTX) を投与し、骨格筋の再生を誘導した。
- 2) 再生筋からマクロファージを高純度に精製し、線維化に関連する遺伝子について遺伝子チップ解析した。
- 3) 線維化に関連する遺伝子について、定量的 RT-PCR 法で遺伝子発現の変動を、また分子については免疫組織化学的に調べた。
- 4) マクロファージ不在下での筋再生時に脂肪細胞がどの程度出現してくるかを組織化学的に検討した。
- 5) メロシン欠損マウスへの筋細胞移植を試み、主たるメロシン産生細胞の同定を試みた。

C. 研究成果

1. 筋ジストロフィー犬骨格筋に対する組換え AAV の導入

1) 免疫抑制剤の併用療法

cyclosporine に MMF を併用することにより、イヌ骨格筋導入 2 週目では、 β -gal の発現が改善され、細胞浸潤の程度についても、免疫抑制剤を使用しない場合と比較して軽減していた。しかし、組換え AAV 導入 4 週後には、 β -gal の発現は低下し、細胞浸潤が出現した。大変興味深いことには、遺伝子発現及び細胞浸潤の程度は導入遺伝子の量と関連していた。今後、さらに免疫抑制剤の併用療法の例数を増やす必要がある。

2) 8 型組換え AAV の導入結果

ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ 8 型組換え

AAV を α -SG 欠損マウスに導入した結果、予期しない結果が得られた。すなわち、導入された ϵ -SG 遺伝子は、導入筋である前脛骨筋ばかりでなく、隣接する長指伸筋を始め、腓腹筋、ひらめ筋等でも認められた。一方、2 型組換え AAV の導入では、遺伝子発現は導入部である前脛骨筋に限られていた。

一方、LacZ 遺伝子を組み込んだ 8 型組換え AAV のイヌ骨格筋に対する導入では 2 型 AAV を用いた場合と比較して、 β -gal の発現が高く、しかも細胞浸潤が少ない傾向にあった。今後、この所見を確認するためには、導入筋組換え AAV の導入量等について、例数を増やして検討を重ねる必要がある。

3) イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の作製

ヒト・マイクロ・ジストロフィン遺伝子を前提としてイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングし、2 型及び 8 型の AAV を作製した。この組換え AAV をマウス及びイヌ・モデルに導入し、その有効性について検定中である。

2. 組換え AAV を用いたサル骨格筋への遺伝子導入

最初に、最も効率よく遺伝子が導入できかつ免疫反応が許容可能な組換え AAV の投与量を確認するために、カニクイザル (3 頭) の両側の上腕二頭筋と前脛骨筋の計 4 カ所に、LacZ 遺伝子組み換え AAV の濃度をそれぞれ 10^{11} vg, 10^{12} vg, 10^{13} vg と段階的に変えて投与し、1, 2, 4 週後に生検を行った。切片作成後 HE 染色を行い、 β -gal 染色を施し、injection の有無と β -gal の発現を確認した。 β -gal に対する血清抗体価の測定は ELISA 法を用いて行った。その結果、 10^{11} vg を投与したサルでは 1, 2, 4 週後とも β -gal の発現は認められず、抗体価の上昇もなかった。 10^{12} vg を投与したサルでは 2 週目に最も強い β -gal の発現が筋周膜に沿って認められ、4 週後には抗体価の上昇とともに、細胞浸潤な

どの免疫反応が認められた。 β -gal 発現細胞の濃淡および細胞浸潤などから筋注部位は容易に同定可能であった。 10^{13} vg を投与したサルでは、1 週後から β -gal の発現が筋周膜に沿って認められたが、すでに細胞浸潤が認められ、4 週後にはかなり広範に β -gal 発現細胞の周囲を中心に細胞浸潤が認められ、一部に壊死や間質の線維化が認められた。以上より、 10^{11} vg では導入遺伝子の発現が認められず、 10^{13} vg では遺伝子発現効率はよいが、細胞浸潤などの免疫反応が強いため、 10^{12} vg の投与濃度がもっとも望ましいと考えられた。

次に、 10^{12} vg の LacZ 遺伝子組換え AAV を投与した場合の、遺伝子発現と免疫反応の経時的変化を調べるために、もう1頭のサルに 10^{12} vg の LacZ 遺伝子組換え AAV を投与し、4、8、16 週後に生検を行った。その結果、4 週目には β -gal の発現が認められたが、8 週後には β -gal の発現はなく、細胞浸潤が広範に認められた。16 週後には発現はなく、細胞浸潤は経度残存していたが、8 週後より改善していた。血清の β -gal 抗体価は4週にも上昇していたが、8 週後にさらに上昇が認められた。

実験中に血液生化学的検査を定期的に施行したが、肝・腎障害、貧血など検査値の異常や他の全身状態の悪化などは認められなかった。

3. 新たな筋疾患モデルマウスの作成と解析

1) DMRV、封入体筋炎では変性線維の核内に約 20 nm の tubulo-filamentous な封入体を入れていた。核の変性が強い場所ではアミロイド様物質の沈着、筋原線維の変性、自己食空胞がみられた。これらの疾患では、核の変性が一次的な意味をもつと考えられた。MSS は強い核の変性（空胞化など）をみ、さらに筋原線維の変性をみたがアミロイド様物質の沈着は認められなかった。眼咽頭型筋ジストロフィーでは、核内の封入体は 8-10

nm と細く、アミロイドの沈着はみられなかった。

2) hmutGNETg-GNE^{-/-}は、やや出生率が劣るが、生下時の外観および発達は、野生型とほぼ同様であった。前肢筋力測定では、30 週齢以降で、野生型より低値を示した。また、30 週齢以降、血清 CK 値が上昇していた。筋力低下と血清 CK 値上昇は、進行性であった。30 週齢マウスでは、血清・骨格筋ともに、シアル酸量が低下していた。骨格筋の病理解析では筋線維の大小不同が観察され、また、38 週齢で筋線維内に β アミロイドタンパク質の蓄積が観察された。さらに、50 週齢以上のマウスの腓腹筋、大腿四頭筋では縁取り空胞が観察された。また、リソソーム膜タンパク質、ポリユビキチン、筋鞘膜タンパク質の筋線維内での強い免疫反応も観察された。電子顕微鏡的には RV の特徴とされる自己食空胞、ミエリン小体の出現とともに、アミロイド構造の出現も確認できた。

4. 筋再生の分子機構

マウス骨格筋に CTX を投与し、72 時間目の筋から浸潤単核細胞を採取した。またここから FACS でマクロファージを精製するため、F4/80 陽性分画を採取した。一方対照とするマクロファージは、正常腹腔内から同様の方法で精製した。その後両者から mRNA を得、Affymetrix GeneChip 解析し、線維化に関連する分子群を調べた。

その結果、線維形成に関わる因子として、CTGF が興味ある変動を示すことがわかった。CTGF は、CFS98 抗体の投与（マクロファージ浸潤を抑制）+CTX 誘導筋再生 7 日目に著明に上昇していた。またコラーゲン産生量も、CTGF 発現とパラレルな関係にあった。このことは、マクロファージ不在下でおこる線維形成には、CTGF が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

一方、マクロファージ不在下では筋再生は正常にはおこらず、線維の増生とともに、脂

肪細胞が出現してくることがわかった。そこで筋前駆細胞を特異的モノクロナル抗体 SM/C-2.6 で精製し、増殖条件下で維持した後 single cell manipulation 法でクローニングした。クローン化細胞を脂肪細胞分化誘導条件下で培養すると、程度の差はあるものの全てのクローンで、脂肪細胞が出現した。

さらにメロシン欠損型 (dy^{3k}) マウスの治療法を探るため、SM/C-2.6 で精製した筋衛星細胞を骨格筋内に移植し、基底膜のメロシン発現を調べた。また SM/C-2.6 陽性分画、陰性分画のうち、いずれがメロシンを発現するか、定量的 RT-PCR 法で確認した。その結果、メロシンは骨格筋中の非筋系細胞が産生している可能性が強く示唆された。

D. 考察

1. 組換え AAV を用いた骨格筋への遺伝子導入

組換え AAV を用いた治療法の限界は、次の2点に要約することが可能である。

①全身投与方法が困難、②過剰な免疫応答
我々は小型の動物モデルでは組換え AAV を用いた方法論により良好な結果を得たが、より大型で重症かつ進行性の動物モデルである筋ジストロフィー犬の研究に進んだ段階で、上記の二つの問題と直面した。それらに対してこれまで進めてきた研究から、いくつかの解決策を検討し、提出することができた。

一つが新たな血清型の採用である。AAV には多くの血清型が存在することが知られているが、その内 8 型の AAV は静脈ないし腹膜経由で多くの組織に導入することが可能である。今回の我々の研究で、少なくとも筋ジストロフィーマウス・モデルでは、骨格筋に対する局所的な導入により、かなりの範囲まで導入遺伝子の発現が拡がることが明らかになった。

さらに注目されることは、8 型 AAV をイヌ骨格筋に導入した場合でも、免疫応答が 2 型 AAV を用いて導入した場合と比較して低

い可能性が出てきたことである。この点に関しては、筋線維に対する AAV particle の量などさらに検討を加える必要があるが、我々は骨格筋線維自身が抗原提示細胞となる可能性に注目している。

次に、我々は免疫抑制剤に関して検討を加えた。これまでの検討の結果では、cyclosporine に mycophenolate mofetil が有効であることが示されつつある。今後特に免疫抑制剤の投与期間を短縮できないかどうか注意しながら例数を増やして検討したい。

最後にイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子を利用することにより、少なくとも筋ジストロフィー犬に対する導入では、抗原性が低いことの効果が期待されるので、検討を続けたい。

カニクイザル骨格筋に対する組換え AAV を用いた遺伝子導入に関しては、今後、筋生検による導入遺伝子の発現解析、ウイルスベクターゲノムの有無（感染効率）を定量的かつシステムチックに解析する方法の確立が重要である。また、最近開発された新しい血清型の AAV には、免疫反応を惹起しにくいもの、血流のによって、広範な骨格筋組織に遺伝子導入可能なものが報告されている。今回、カニクイザルの導入に関しては、AAV type2 を用いたが、新しい血清型のベクターで同様の検討を行う事も意義深いと思われる。

2. 新たな筋疾患モデル

RV 型筋変性も一様ではなく、種々のタイプがあることが分かった。いずれも、核の変化を伴っており、今後核の変化が何を意味するのか、注目されるであろう。とくに DMRV ではシアル酸生合成の律速段階酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase をコードする *GNE* 遺伝子の機能喪失型変異による疾患であることが分かっている。この *GNE* 遺伝子産物は核内にも存在することが

明らかにされている。酵素異常がどのようにして、核に変化をきたし、筋原線維の変性、自己貪食機転、RV 形成に関与するのか、不明な点が多い。まだ解析は十分でないが、hmutGNETg-GNE-/-マウスは前述の疑問に答えを与えてくれるモデルマウスと評価出来る。

このマウスでは RV 形成と同じく、むしろ先んじてアミロイド形成がみられる。RV のアミロイド沈着は、タンパク変性の二次的な結果であると簡単に処理できない。MSS は著明な核の変化と、筋原線維の変化をみるがアミロイド沈着はみられない。MSS では SIL1 という小胞体機能の調節因子をコードする遺伝子に変異がみられている。この遺伝子変異と RV 形成の関係も今後明らかにされねばならない。

3. 筋再生の分子機構

骨格筋の再生時には、秩序だった細胞浸潤とそれに連動した筋再生が起こる。昨年度は、強力なマクロファージ機能障害モデルを用いて、この現象を確認した。本年度は、マクロファージ機能が障害された条件下で認められる線維形成の誘導にあずかる分子の探索を試み、CTGF がその強力な候補遺伝子であることを見出した。線維形成は、骨格筋の再生不良の問題にとどまらず、生体のさまざまな組織の構築・再構築に重要な役割を果たし、線維化を防ぐことができれば、筋再生にのみではない多くの疾患治療・予防に役立つ。今後 CTGF 以外の分子群との関連性を追及していきたい。

筋衛星細胞由来細胞が脂肪細胞に分化する能力を持っていることがわかった。このことは、筋ジストロフィーの発症後期では、骨格筋中に多くのコラーゲン線維が認められると同時に、多くの脂肪細胞浸潤が知られている。本研究では、マクロファージ機能の低下がこうした原因の一つである可能性を示すことができた。マクロファージ機能の改善

が筋ジストロフィーの進行を抑制する可能性について今後検討したい。

メロシン欠損型筋ジストロフィーモデルマウスでは、骨髄移植法はほとんど効果がないことを確認してきた。むしろ骨格筋から得た単核細胞の重要性について検討してきたが、メロシン産生にあずかる細胞種の同定は不明であった。今回 SM/C-2.6 を指標に、メロシン産生が筋衛星細胞に由来するかどうかの確認作業を進め、筋系譜以外の細胞種がメロシン産生にあずかっている可能性を示唆することができた。今後、より効率の良い移植法の検索を目指し、メロシン産生細胞の種類を明確にする予定である。

E. 結論

1. 組換え AAV を用いた導入について、8 型の AAV を用いることにより、マウス・モデルでは局所導入により広い範囲の骨格筋に遺伝子発現が認められる傾向があり、イヌでは免疫応答が軽減する可能性がでてきた。
2. 免疫抑制剤である Cyclosporine に mycophenolate mofetil を併用することにより、組換え AzxAV を用いた遺伝子導入に伴う免疫応答が軽減する傾向があった。
3. より抗原性が低いと考えられるイヌ型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV を作製した。
4. 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。
5. 筋変性、壊死と並んで筋病変の重要な所見である縁取り空胞変性について検討を加えた。
6. 縁取り空胞変性を呈する代表的な疾患である縁取り空胞型ミオパチーの病態モデルをマウスで作製した。

7. マクロファージ機能を障害してみとめられる繊維形成に、CTGF が重要な役割を果たしていることがわかった。
8. 筋衛星細胞が脂肪細胞に分化する能力を有していることがわかった。
9. メロシンは、骨格筋中の非筋系細胞が産生している可能性が強く示唆された。したがってメロシン欠損型筋ジストロフィーの細胞移植の手法には、従来とは異なったアプローチが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N: Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation *J Bone Mineral Res* (in press)
2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle *Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S: Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor. *Acta Myologica*, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S: Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y: Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 2005; 309(5732): 314-7.
6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S: Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1740(3): 326-31.
7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S: Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle Nerve*, 2005; 32(2): 191-9.
8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S: Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle. *Am J Pathol*, 2005;166(6): 1721-32.
9. Murakami N, Sakuta R, Takahashi E, Katada Y, Nagai T, Owada M, Nishino I, Nonaka I: Early onset distal muscular dystrophy with normal dysferlin expression. *Brain Dev*, 2005; 27: 589-591
10. Yan C, Tanaka M, Sugie K, Nobutoki T, Woo M, Murase N, Higuchi Y, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A new congenital form of X-linked autophagic vacuolar myopathy. *Neurology*, 2005; 65: 1132-1134

11. Sakuta R, Murakami N, Jin Y, Nagai T, Nonaka I, Nishino I:
Diagnostic significance of membrane attack complex and vitronectin in childhood dermatomyositis.
J Child Neurol, 2005; 20: 597-602
 12. Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, von Figura K, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I:
Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies.
J Neuropathol Exp Neurol, 2005; 64: 513-522
 13. Takahashi N, Shimada T, Murakami Y, Katoh H, Oyake N, Ishibashi Y, Nishino I, Nonaka I, Goto Y:
Vascular involvement in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes.
Am J Med Sci, 2005; 329: 265-266
 14. Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I:
Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of alpha-dystroglycan in Japan.
Neuromuscul Disord, 2005; 15: 342-348
 15. Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I:
Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman.
Neuromuscul Disord, 2005; 15: 262-264
 16. 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 hypogenitalism.
Neuromuscul Disord, 2005; 15: 245-252
 17. Konishi N, M. Nakamura, E. Ishida, K. Shimada, E. Mitsui, R. Yoshikawa, H. Yamamoto, and K. Tsujikawa:
High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma.
Clin Cancer Res, 15: 5090-5097, 2005.
 18. Shimozato O, S. Ugai, M. Chiyo, H. Takenobu, H. Nagakawa, A. Wada, K. Kawamura, H. Yamamoto, and M. Tagawa:
Secreted form of p40 subunit of IL-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumor effects.
Immunology, 117: 22-28, 2005.
 19. Mohri T, Y. Fujio, M. Maeda, T. Ito, T. Iwakura, Y. Oshima, Y. Uozumi, M. Segawa, H. Yamamoto, T. Kishimoto, and J. Azuma : Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells.
J Biol Chem, 281:6442-6447, 2006.
- <和文>
1. 大島幸子, 武田伸一 :
筋ジストロフィーの動物の心筋障害.
神経内科, 62(6): 539-546, 2005
 2. 吉村まどか, 武田伸一 :
筋ジストロフィーの遺伝子治療.
BRAIN MEDICAL, 17(3): 221-228, 2005
 3. 西山章代, 武田伸一 :
筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療.
Neurological Science, 14(1): 8-9, 2005
 4. 武田伸一, 鈴木友子 :
筋ジストロフィーの発症メカニズムと治療研究. -疾患解明 Overview-
実験医学, 23(10): 1590-6, 2005
 5. 松尾雅文, 武田伸一 :
最近分かった筋ジストロフィーの病態

と治療.
脳と発達, 38(2): 129-131, 2006

II. 学会発表

< 国外 >

1. Takeda S:
Therapeutic approaches using micro-dystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Seminar in Faculté des Sciences, Université de Genève, Genève, Switzerland, Apr 14, 2005
2. Takeda S:
Muscle stem cells and muscle regeneration.
Seminar in the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
3. Takeda S:
Therapeutic approaches using micro-dystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Seminar in the Regional Conference Center of the Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
4. Takeda S:
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Seminar in the Department of Enzymology of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Hungary, Apr 21, 2005
5. Takeda S:
Muscle stem cells and muscle regeneration.
Seminar in the Agricultural Research Center of Molecular Biology, Gödöllő, Hungary, Apr 21, 2005
6. Takeda S:
The Japanese approach to molecular diagnosis and therapy; special reference to ethical and legal issues.
Ethics Conference of the Hungarian Medical Chamber in Pilisszentkereszt, Hungary, Apr 22, 2005
7. Takeda S:
Participation of muscle stem cells in muscle regeneration.
EMBO/FEBS workshop "The Molecular and Cellular Mechanisms underlying Skeletal Muscle Formation and Repair", Fontevraud, France, Sep 29, 2005
8. Takeda S:
Gene therapy approach to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Clinical Sciences Centre Symposium in honor of Terry Partridge "From Satellite Cells to Gene Therapy", The Zoological Society of London, London, UK, Oct 1, 2005
9. Takeda S:
Contribution of CD31-negative/CD45-negative Side Population cells to skeletal muscle regeneration.
Workshop "Musculo-Skeletal: Myogenic Stem Cells and Regeneration"
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
10. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Takeda S:
An AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
11. Takeda S:
AAV vector mediated micro-dystrophin transfer into dystrophin-deficient skeletal muscle.
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:
Increased ϵ -sarcoglycan expression ameliorates muscular dystrophy in α -sarcoglycan deficient mice, a model for LGMD2D.

- 6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
13. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S:
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.
13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech Republic, 10.30-11.1, 2005
 14. Nonaka I: Special Lecture: Congenital Muscular Dystrophy. The 4th Annual Scientific Meeting of Asian & Oceanian Myology Center (AOMC), 2005.3.4, Kaohsinung, Taiwan
- <国内>
1. 深田宗一朗, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一 :
骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.
第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 4.21, 2005
 2. 鈴木友子, 武田伸一 :
骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割.
第82回日本生理学会, 仙台市, 5.20, 2005
 3. 武田伸一 :
最近わかった筋ジストロフィーの病態と治療「ジストロフィン欠損における新たな分子病態」
第47回日本小児神経学会シンポジウム, 熊本市, 5.18, 2005
 4. 深田宗一朗, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一 :
骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
 5. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田宗一朗, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一 :
後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析.
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
 6. 鈴木友子, 武田伸一 :
骨格筋前駆細胞の維持, 増殖, 分化の分子機構: 横紋筋肉腫の分子的理解に向けて.
平成17年度厚生労働省がん研究助成金森川班第1回班会議, 東京, 7.29, 2005
 7. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S:
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.
The 11th Annual Meeting Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005
 8. 武田伸一 :
筋ジストロフィー治療の最前線.
シンポジウム“再生医療 (幹細胞移植など) の臨床的応用に関する倫理的・社会的問題” 東京, 9.9, 2005
 9. 武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の進歩.
日本筋ジストロフィー協会施設見学会, 東京, 9.11, 2005
 10. 武田伸一 :
筋ジス治療の現状と未来.
秋田筋ジストロフィー協会シンポジウム, 秋田市, 9.16, 2006
 11. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscular dystrophy (DMD).
“AAV and its application to Gene therapy & regenerative medicine” The 2nd Nikko International Symposium, 9.30, 2005

12. 武田伸一：
筋ジストロフィーの臨床遺伝学。
第2回遺伝医療倫理討論-ピアカウンセ
ラー養成講座-, 名古屋市, 10.22, 2005
13. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する治療戦略
-遺伝子治療から薬物治療まで-
帝人研究所, 1.25, 2005
14. 武田伸一：
これからの筋ジストロフィー治療。
市民公開講座第1回筋ジストロフィー
-デュシェンヌ型を中心に-
小平市, 2.25, 2006
15. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する治療法の開
発を目指して：遺伝子治療，幹細胞移
植再生治療，創薬の融合的研究。
健康医療セミナー
早稲田大学科健機構，東京 2.28, 2006
16. 深田宗一郎，他，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（大阪），3.1-2,
2005
17. 山本有希子，他，炎症性細胞機能の障害
による骨格筋の再生異常の解析骨格筋
再生過程に関わる炎症細胞の機能解析，
日本薬学会125年会（東京），3.29-31,
2005.

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. 組換え アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた骨格筋に対する遺伝子導入については、マウス骨格筋に対する導入は有効で安全性も高いが、イヌ骨格筋に対する導入では高度の免疫応答が誘導された。
2. 免疫応答に対する方策として、新たな AAV の血清型である 8 型を用いて遺伝子導入を行ったところ、マウス・モデルでは、導入筋を超えた広い範囲での遺伝子発現が観察された。一方、イヌ骨格筋に導入した場合には、免疫応答が低い傾向があった。
3. 免疫抑制剤である cyclosporine と mycophenolate mofetil を併用して組換え AAV のイヌ骨格筋に対する遺伝子導入を試みたところ、免疫応答が軽減していた。
4. イヌに対する遺伝子導入実験について、より抗原性が低いと考えられるイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入実験を進めた。

A. 研究目的

これまで我々は、Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する遺伝子治療に関して、十分な機能を保持した小型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子(micro-dystrophin 遺伝子)を開発し、アデノ随伴ウイルス血清 2 型(AAV2)へ組み込んだ recombinant AAV2-micro-dystrophin を用いることでジストロフィン欠損マウス (*mdx* マウス) の筋変性が抑制されることを示した。しかし、AAV2-micro-dystrophin を重症で進行性の筋ジストロフィー犬の骨格筋へ導入すると免疫応答が引き起こされ、導入遺伝子の発現は、極めて短期間に留まっていた。そこで、免疫応答を克服するために、以下のような方法論を立案した。

第一は、これまでに用いられてきた cyclosporine による免疫抑制に加えて mycophenolate mofetil を使用することである。

第二は最近見出された新たな血清型の AAV

を用いることである。AAV2 は局所的な遺伝子導入には有効で、導入遺伝子の長期的な発現は可能であるが、血流を介した全身の骨格への導入には適していないことが課題となっていた。一方、新たな血清型として発見された血清 8 型は、抗原性が低く、全身の骨格筋及び心筋における遺伝子導入発現が可能であることが明らかにされた。そこで、我々はジストロフィン欠損による DMD 及び DMD に類似した肢帯型筋ジストロフィーに対する治療研究を行った。

第三に、より抗原性の低い治療用遺伝子として、イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子に注目した。これまで、ヒトに対する治療を前提として、ヒト型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子を使用してきたが、筋ジストロフィー犬における組換え AAV を用いた治療実験において少しでも抗原性を低下させるために、イヌ型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングした。

B. 研究方法

1. 免疫抑制剤の併用療法の開発

これまで組換え AAV の導入 5 日前より骨格筋の生検を終えるまで、免疫抑制剤シクロスポリン (20-50 mg/kg/day) を連日経口投与し、遺伝子発現が改善されるかどうか検討してきた。今回は cyclosporine に mycophenolate mofetil (MMF) (30 mg/kg/day) を併用投与した場合の遺伝子発現について検討を加えた。

2. 8 型組換え AAV の導入

導入遺伝子として LacZ 遺伝子あるいは ϵ -SG 遺伝子を選択し、CMV プロモーターの下流に組み込んで AAV8 のウィルス粒子を作製した。lacZ 遺伝子を組み込んだ AAV については、正常犬骨格筋への導入を行い、 ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ AAV については、 α -SG 欠損マウス骨格筋への導入を主として行った。

3. イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の作製

これまでに作製したヒト型マイクロ・ジストロフィン遺伝子を前提として、完全な N 端と 4 回リピート構造 / 3 回ヒンジ構造から成るロッド・ドメイン、cysteine rich ドメイン、alternative splicing を受ける exon 71~78 を delete した C 端からなるイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングし、同遺伝子を組み込んだ 2 型及び 8 型の組換え AAV を作製した。

C. 研究成果

1. 免疫抑制剤の併用療法

cyclosporine に MMF を併用することにより、イヌ骨格筋導入 2 週目では、 β -gal の発現が改善され、細胞浸潤の程度についても、免疫抑制剤を使用しない場合と比較して軽減していた。しかし、組換え AAV 導入 4 週後には、 β -gal の発現は低下し、細胞浸潤が出現した。大変興味深いことには、遺伝子発現及び細胞浸潤の程度は導入遺伝子の量と関連していた。今後、さらに免疫抑制剤の併用療法の例数を増やす必要がある。

2. 8 型組換え AAV の導入結果

ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ 8 型組換え AAV を α -SG 欠損マウスに導入した結果、予期しない結果が得られた。すなわち、導入された ϵ -SG 遺伝子は、導入筋である前脛骨筋ばかりでなく、隣接する長指伸筋を始め、腓腹筋、ひらめ筋等でも認められた。一方、2 型組換え AAV の導入では、遺伝子発現は導入部である前脛骨筋に限られていた。

一方、LacZ 遺伝子を組み込んだ 8 型組換え AAV のイヌ骨格筋に対する導入では 2 型 AAV を用いた場合と比較して、 β -gal の発現が高く、しかも細胞浸潤が少ない傾向にあった。今後、この所見を確認するためには、導入筋組換え AAV の導入量等について、例数を増やして検討を重ねる必要がある。

3. イヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子の作製

ヒト・マイクロ・ジストロフィン遺伝子を前提としてイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子をクローニングし、2 型及び 8 型の AAV を作製した。この組換え AAV をマウス及びイヌ・モデルに導入し、その有効性について検定中である。

D. 考察

組換え AAV を用いた治療法の限界は、次の 2 点に要約することが可能である。

①全身投与法が困難、②過剰な免疫応答
我々は小型の動物モデルでは組換え AAV を用いた方法論により良好な結果を得たが、より大型で重症かつ進行性の動物モデルである筋ジストロフィー犬の研究に進んだ段階で、上記の二つの問題と直面した。それらに対してこれまで進めてきた研究から、いくつかの解決策を検討し、提出することができた。

一つが新たな血流型の採用である。AAV には多くの血清型が存在することが知られているが、その内 8 型の AAV は静脈ないし腹膜経由で多くの組織に導入することが可能である。

今回の我々の研究で、少なくとも筋ジストロフィーマウス・モデルでは、骨格筋に対する局所的な導入により、かなりの範囲まで導入遺伝子の発現が拡がることが明らかになった。

さらに注目されることは、8型 AAV をイヌ骨格筋に導入した場合でも、免疫応答が2型 AAV を用いて導入した場合と比較して低い可能性が出てきたことである。この点に関しては、筋線維に対する AAV particle の量などさらに検討を加える必要があるが、我々は骨格筋線維自身が抗原提示細胞となる可能性に注目している。

次に、我々は免疫抑制剤に関して検討を加えた。これまでの検討の結果では、cyclosporine に mycophenolate mofetil が有効であることが示されつつある。今後特に免疫抑制剤の投与期間を短縮できないかどうか注意しながら例数を増やして検討したい。

最後にイヌ型マイクロ・ジストロフィン遺伝子を利用することにより、少なくとも筋ジストロフィー犬に対する導入では、抗原性が低いことの効果が期待されるので、検討を続けたい。

E. 結論

1. 組換え AAV を用いた導入について、8型の AAV を用いることにより、マウス・モデルでは局所導入により広い範囲の骨格筋に遺伝子発現が認められる傾向があり、イヌでは免疫応答が軽減する可能性が出てきた。
2. 免疫抑制剤である Cyclosporine に mycophenolate mofetil を併用することにより、組換え AAV を用いた遺伝子導入に伴う免疫応答が軽減する傾向があった。
3. より抗原性が低いと考えられるイヌ型のマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV を作製した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N: Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation *J Bone Mineral Res* (in press)
2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle *Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S: Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor. *Acta Myologica*, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S: Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 2005 Jul 8; 309(5732): 314-7.
6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise.

Biochim Biophys Acta, 2005 Jun 10; 1740(3): 326-31.

7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S. Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle Nerve*. 2005 Aug; 32(2): 191-9.

8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S. Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle. *Am J Pathol*, 2005 Jun; 166(6): 1721-32.

<和文>

1. 大島幸子, 武田伸一 :
筋ジストロフィーの動物の心筋障害.
神経内科 62(6): 539-546, 2005
2. 吉村まどか, 武田伸一 :
筋ジストロフィーの遺伝子治療.
BRAIN MEDICAL 17(3): 221-228, 2005
3. 西山章代, 武田伸一 :
筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療.
Neurological Science 14(1): 8-9, 2005
4. 武田伸一, 鈴木友子 :
筋ジストロフィーの発症メカニズムと治療研究. -疾患解明 Overview-
実験医学 23(10): 1590-6, 2005
5. 松尾雅文, 武田伸一 :
最近分かった筋ジストロフィーの病態と治療
脳と発達 38(2): 129-131, 2006

II. 学会発表

<国外>

1. Takeda S:
Therapeutic approaches using microdystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular

dystrophy.

Seminar in Faculté des Sciences, Université de Genève, Genève, Switzerland, Apr 14, 2005

2. Takeda S:
Muscle stem cells and muscle regeneration. Seminar in the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005

3. Takeda S:
Therapeutic approaches using microdystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy. Seminar in the Regional Conference Center of the Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005

4. Takeda S:
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy. Seminar in the Department of Enzymology of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Hungary, Apr 21, 2005

5. Takeda S:
Muscle stem cells and muscle regeneration. Seminar in the Agricultural Research Center of Molecular Biology, Gödöllő, Hungary, Apr 21, 2005

6. Takeda S:
The Japanese approach to molecular diagnosis and therapy; special reference to ethical and legal issues. Ethics Conference of the Hungarian Medical Chamber in Pilisszentkereszt, Hungary, Apr 22, 2005

7. Takeda S:
Participation of muscle stem cells in muscle regeneration. EMBO/FEBS workshop "The Molecular and Cellular Mechanisms underlying Skeletal Muscle Formation and Repair", Fontevraud, France, Sep 29, 2005

8. Takeda S:
Gene therapy approach to dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Clinical Sciences Centre Symposium in honor of Terry Partridge "From Satellite Cells to Gene Therapy", The Zoological Society of London, London, UK, Oct 1, 2005
9. Takeda S:
Contribution of CD31-negative/CD45-negative Side Population cells to skeletal muscle regeneration.
Workshop "Musculo-Skeletal: Myogenic Stem Cells and Regeneration"
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
10. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Takeda S:
An AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
11. Takeda S:
AAV vector mediated micro-dystrophin transfer into dystrophin-deficient skeletal muscle.
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:
Increased ϵ -sarcoglycan expression ameliorates muscular dystrophy in α -sarcoglycan deficient mice, a model for LGMD2D.
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
13. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S:
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.
13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech

Ripublic, 10.30-11.1, 2005

<国内>

1. 深田総一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.
第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 4.21, 2005
2. 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割。
第82回日本生理学会, 仙台市, 5.20, 2005
3. 武田伸一:
最近わかった筋ジストロフィーの病態と治療「ジストロフィン欠損における新たな分子病態」
第47回日本小児神経学会シンポジウム, 熊本市, 5.18, 2005
4. 深田宗一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
5. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田宗一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:
後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析.
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
6. 鈴木友子, 武田伸一:
骨格筋前駆細胞の維持, 増殖, 分化の分子機構: 横紋筋肉腫の分子的理解に向けて.
平成17年度厚生労働省がん研究助成金森川班第1回班会議, 東京, 7.29, 2005
7. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S:
AAV vector-mediated gene transfer into

canine skeletal muscle.
The 11th Annual Meeting Japan Society of
Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005

健康医療セミナー
早稲田大学科健機構, 東京 2.28, 2006

8. 武田伸一 :
筋ジストロフィー治療の最前線.
シンポジウム “再生医療 (幹細胞移植など) の臨床的応用に関する倫理的・社会的問題” 東京, 9.9, 2005
9. 武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の
進歩.
日本筋ジストロフィー協会施設見学会,
東京, 9.11, 2005
10. 武田伸一 :
筋ジス治療の現状と未来.
秋田筋ジストロフィー協会シンポジウム,
秋田市, 9.16, 2006
11. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Recombinant Adeno-Associated Virus
(rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne
muscular dystrophy (DMD).
“AAV and its application to Gene therapy &
resenerative medicine” The 2nd Nikko
International Symposium, 9.30, 2005
12. 武田伸一 :
筋ジストロフィーの臨床遺伝学.
第2回遺伝医療倫理討論-ピアカウンセ
ラー養成講座-, 名古屋市, 10.22, 2005
13. 武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する治療戦略
-遺伝子治療から薬物治療まで-
帝人研究所, 1.25, 2005
14. 武田伸一 :
これからの筋ジストロフィー治療, 市民
公開講座第1回筋ジストロフィー -デュ
シェンヌ型を中心に- 小平市 2.25, 2006
15. 武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する治療法の開発
を目指して: 遺伝子治療, 幹細胞移植再
生治療, 創薬の融合的研究

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし