

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

骨髄間質細胞からの神経並びに筋細胞の選択的誘導と
パーキンソン病・筋ジストロフィーへの自家移植治療法の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 出沢 真理

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書	
骨髄間質細胞からの神経並びに筋細胞の選択的誘導とパーキンソン病・筋ジストロフィーへの自家移植治療法の開発	1
出沢 真理	
II. 分担研究報告	
1. 骨髄間質細胞からの神経分化機構の解明	8
星野 幹雄	
2. 骨髄間質細胞からの神経細胞誘導とパーキンソンモデル動物への移植	10
菅野 洋	
3. 幹細胞としての筋衛星細胞の単離と遺伝子発現解析	12
武田伸一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	24

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

骨髄間質細胞からの神経並びに筋細胞の選択的誘導とパーキンソン病・筋ジストロフィーへの自家移植治療法の開発（課題番号 H16 こころ-025）

主任研究者 出沢真理 京都大学医学研究科・助教授

研究要旨 骨髄間質細胞は患者本人からの採取が可能であり、旺盛な増殖力を有するので細胞移植治療に必要な細胞数確保が可能である。骨髄バンクの利用も展開できることから、再生医療の細胞ソースとして最適である。我々は、ヒト骨髄間質細胞から神経細胞及び骨格筋細胞を、他の要素を含まず特異的に効率よく誘導する方法を開発した。本研究は有効な治療法の開発が切望されているパーキンソン病や筋ジストロフィーに対して、倫理問題や免疫拒絶の制限から開放された「自己細胞移植治療」の実現を目的とするものである。

A. 研究目的 組織としての再生能力の無い神経および筋肉の変性疾患の多くは、根本治療法のないまま現在に至っている。骨髄間質細胞は倫理問題無く患者から容易に採取可能であり、旺盛な増殖能力を備えているので、細胞移植治療に必要な細胞数確保が可能である。また神経・筋肉など特定の細胞への有効な誘導法を開発を行うことによって、免疫拒絶や倫理問題から開放された「自己細胞移植治療」が可能となり、有効な治療法の無い難病及び高齢化に伴い増大する変性疾患治療の突破口となる。

本研究では臨床的導入を視野に入れて16年度から18年度の間に(1)分化誘導機構の解明 (2)Notch 遺伝子導入に換わる合成蛋白質を用いた誘導法の探索 (3)パーキンソン及び筋ジストロフィーモデル動物における移植評価の研究項目を推進する。平成17年度は以下の構成で研究を推進した。

- 1) 骨髄間質細胞からの神経誘導と脳梗塞モデルへの移植（出沢）
- 2) 神経細胞の誘導機構および神経細胞移動（星野）
- 3) 骨髄間質細胞からの骨格筋および骨格筋幹細胞誘導の確立（出沢）

- 4) 骨格筋幹細胞である筋衛星細胞の特性（武田）
- 5) 神経幹細胞における神経誘導と骨髄間質細胞における本誘導との共通機構（菅野）

B. 研究方法 ラット、ヒト、イヌ、サル骨髄穿刺液から樹立した骨髄間質細胞を用いた。

(1) 骨髄間質細胞からの神経誘導：Notch 遺伝子は神経や筋肉などの多くの発生分化を制御しており、未分化細胞の維持、神経・グリア分化の制御、骨格筋分化の制御、後期発生における形態形成に関与している。我々は骨髄間質細胞にNotch 細胞質ドメイン(NICD) 遺伝子を導入することによって細胞が神経幹細胞様に変化することを見いだした。さらにこれらの細胞の細胞密度を下げ、継代培養しサイトカイン (bFGF, CNTF, 細胞内 cAMP 上昇剤である Forskolin) を投与することによって選択的に神経細胞が誘導される。誘導された神経の特性を解析し、また脳梗塞モデル動物において移植効果を確認した。(2) 神経細胞の誘導機構：神経細胞誘導機構を正常神経発生の視点から解析した(分担報告書、星野参照)。また神経幹細胞と本研究における神経誘導との共通機構を探る

ことを目的とし、Von Hippel Lindau (VHL) 遺伝子に着眼し、神経幹細胞からの成熟神経誘導における働きを解析した(分担報告書、菅野参照)。

(3) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導：神経誘導とは逆にサイトカイン投与(bFGF, Forskolin, PDGF, Neuregulin)を行い、その後Notch遺伝子導入を行い、100% confluentに達したところで分化培地(ウマ血清2%)を投与することによって多核の骨格筋を誘導することが可能となる。誘導された骨格筋の性質を解析するとともに、筋ジストロフィーモデルマウスであるmdx-nude mouseにヒトから誘導した骨格筋細胞を移植し、細胞の生着と生体内での分化を調べた。

(4) 骨格筋幹細胞の特性解析：骨格筋幹細胞である筋衛星細胞に特異的に発現されている因子を解析し、また筋再生過程におけるそれらの因子の変動を調べた(分担報告書、武田参照)。

(5) 大型動物における誘導系の検証：ヒトに近い高等哺乳類の骨髄間質細胞から神経や筋肉を誘導し、それらの有効性と安全性の検証を行う実験に着手した。神経細胞誘導はサル骨髄間質細胞を用いて行い、サルパーキンソンモデルでの移植と有効性・安全性の検証を予定している。また骨格筋誘導はビーグル犬において行い、ヒトのDuchenne型筋ジストロフィーと全く同一の症状を示す筋ジストロフィー犬を用いて移植実験を行う予定である。

(倫理面への配慮) 本プロジェクト全般において組み換えDNA実験とモデル作成・移植における動物実験は各所属機関の組み換えDNA実験委員会と動物実験委員会の指針に従って研究計画書を提出し、医学部長、研究所長、委員長等の機関承認を得た後に実施した。

骨髄間質細胞の分化誘導並びに分子生物学的解析は京都大学を中心に行うが、すでに京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会の承認を得ている(「骨髄間質細胞の神経細胞への分化誘導とパーキンソンモデルへの

応用」承認番号：MedKyo06138 / 「骨髄間質細胞の骨格筋細胞への分化誘導と移植応用」承認番号：MedKyo06137) / 「間葉系細胞から分化転換した細胞のサルへの移植と安全性及び機能性評価」承認番号：MedKyo06145 / 「間葉系細胞から分化転換した細胞の犬への移植と安全性及び機能評価」承認番号：MedKyo06146。実験に際しては動物の苦痛の軽減を極力配慮し、麻酔等の徐痛処置を行った。ヒト骨髄間質細胞はBioWhittaker社の細胞を用いた。Notchの遺伝子導入実験は京大の組み換えDNA実験委員会の了承を得て行なっている(「神経系細胞への分化転換の遺伝子機構について」承認番号：(研研2第121-2号)。尚「体細胞の神経系および骨格筋細胞への分化転換の遺伝子機構について」も承認を受けている(承認番号：研研2第224-2号)。

C. 研究成果 (1) 骨髄間質細胞からの神経誘導：ヒトおよびラットの骨髄間質細胞においてNotch遺伝子を導入することによって神経幹細胞様に分化転換し、nestin, GLAST, 3-PGDHなどのマーカーを発現することを見いだした。それらの細胞にサイトカイン刺激を与えると96%の細胞が神経細胞となった。誘導された神経細胞は活動電位を示し、最終分裂を終えた機能的な神経細胞である。これらの神経細胞はMAP2-ab, Neurofilament, beta3-tubulinなどの神経マーカーを発現することが免疫染色およびWestern blotにおいて確認された。

さらにこの系の大きな特徴として、最終産物にグリア細胞が含まれないことが挙げられる。RT-PCRを用いて調べたところ、骨髄間質細胞はもともと神経誘導因子(Mash1, Math1, Neurogenin)の活性が高く、グリア誘導因子(Hes1/5, Stat1/3)が低いという性質がある。本誘導では、Notchを導入することによってSTAT1/3が、さらにサイトカイン刺激をすることによってHes1/5が抑制され、結果として神経

誘導因子が残り、細胞全体が神経に誘導されるのではないかと想定している。

誘導されたラット骨髄間質細胞由来の神経細胞をラット中大脳動脈結紮による脳梗塞モデルに移植した。細胞移植 (total 5万細胞) は、モデル作成7日後において梗塞領域に直接注入によって行った。移植後、行動評価を行ったところ、Morris Water Maze test (記憶学習行動) において顕著な改善が認められ、組織学的検討によって、移植された神経細胞は、その多くが海馬領域に生着していることが分かった。一方、グリア細胞に分化したものはほとんど存在しなかった。これらの事から、本方法で誘導された神経細胞はパーキンソンモデル (平成16年度報告済み) だけでなく脳梗塞モデルにおいても有効である事が示唆された。

(2) 神経細胞の誘導機構：神経誘導機構を正常神経発生の視点から分担者星野が解析した。細胞周期関連蛋白質 p27kip1 が神経上皮細胞から生み出された神経細胞の細胞分裂を停止させると同時に、神経細胞を移動させる働きがあることを示した。さらに神経細胞の移動には、P-Rex1-Rac1 シグナリングカスケードが中心的な働きを果たしている事を明らかにし、移植細胞の障害部位への定着を助けるために Neurotrophin-P-Rex1-Rac1 経路の活性化などが役に立つかもしれないことを示した (分担報告 星野参照)。

また、骨髄間質細胞からの神経誘導メカニズムを明らかにするために、神経幹細胞、正常神経発生との共通機構を探ることを目的とした。分担者菅野は Von Hippel Lindau (VHL) 遺伝子に着目し、神経幹細胞からの成熟神経誘導に働いていることを明らかにした。VHL 遺伝子が成熟神経細胞を誘導する際には HIF (heat inducible factor) を介して細胞周期を制御し、最終分裂を終えた神経を誘導することが示唆されている。一方、本研究では骨髄間質細胞に Notch 遺伝子を導入して神経や骨格筋を誘導しているが、Notch 分子が細胞膜直下で切断され細胞質ドメインが細

胞内で作用する際に同じく HIF と作用することが示唆されており、骨髄間質細胞からの神経誘導との共通機構につながるものと推察している (分担報告書 菅野参照)。

(3) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導：神経誘導とは逆の操作をすることによって骨格筋が誘導される。サイトカイン刺激 (bFGF, Forskolin, PDGF, Neuregulin) を行うと、骨髄間質細胞群では筋前駆細胞のマーカーである Pax7 が誘導される。さらに Notch 遺伝子を導入すると骨格筋特異的なマーカーである MyoD が誘導される。細胞はこの時点で形態を大きく変え、筋芽細胞様となるが、単核細胞のままである。これらに血清を低下させた分化培地を投与すると細胞の融合が開始され、多核の myogenin, MRF4/Myf6 陽性の筋管細胞が形成される。これらの筋管細胞では実際に培養条件で自発的な収縮を行うものもあった。筋管細胞を含んだ最終産物は、解析の結果、3種類の細胞から構成されていることが分かった。すなわち、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞、単核の筋芽細胞、そして多核の筋管細胞である。単核の筋衛星細胞、と筋芽細胞はその後、クローン培養を行い、骨格筋以外の要素を除くことに成功した。またクローン培養によって純化された細胞は、再び成熟した筋管細胞を形成する能力があることを確認している。

クローン化されたヒト由来の筋芽細胞と筋衛星細胞を筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx-nude mouse の前脛骨筋に移植した。その結果、筋芽細胞は成体の筋肉に生着し dystrophin の発現を認めるとともに、成熟した多核の筋線維と分化した。一方ヒト由来の筋衛星細胞は本来の筋衛星細胞の位置 (筋線維の細胞膜と基底膜の間) に生着し、幹細胞として振舞った。すなわち、繰り返される筋変性刺激に対して、自己複製による自身の増殖とともに、分化した筋線維を繰り返し再生した。このことから、誘導された細胞をひとたび移植すると生体内では繰り返

し、筋肉を再生し続けることができることが分かった。このことは、日々変性が起きている筋ジストロフィー患者への移植において大きな利点であると思われる。

(4) 骨格筋幹細胞の特性解析： 骨髄間質細胞からの骨格筋ならびに骨格筋幹細胞 (=筋衛星細胞) の誘導機構の理解として分担者武田は正常筋肉発生の視点から解析を行った。Gene set enrichment analysisを行った結果、成体の筋組織から樹立される静止期筋衛星細胞では細胞接着、細胞外マトリックス、細胞増殖に関わる遺伝子が高く発現していること、さらに Calcitonin receptor (CTR) が筋衛星細胞では特異的に発現していることを見出した。この発現パターンを詳しく解析すると筋再生過程ではいったん消失し、自己複製した細胞には再び認められ、CTRは静止状態維持に関わることが分かった(分担報告書、武田参照)。

(5) 大型動物における誘導系の検証： カニクイザルとビーグル犬の骨髄液から接着性の骨髄間質細胞を培養した。サルの細胞からは現在神経細胞誘導を試みている。ビーグル犬のほうからはすでにラットやヒトと同様に骨格筋が誘導されており、MyoD, Myogenin, などの骨格筋特有マーカーの発現も確認している。

D. 考察 骨髄間質細胞から機能的な神経細胞および骨格筋細胞を非常に高い高率で選択的に誘導する方法が見いだされた。いずれも骨髄間質細胞の自発的な脱分化に Notch 遺伝子を一定の推論に基づいて経時的に投与する方法であり、その分化転換機構は神経および骨格筋の発生過程と部分的に一致したものであることが分かった。特に神経細胞誘導では骨髄間質細胞に Notch 遺伝子を入れることによって神経幹細胞様に一旦分化させ、特定のサイトカインを投与することによって神経細胞へ選択的に誘導するものであった。骨格筋では最初のサイトカイン投与によって Pax7 陽性の骨格筋幹細胞様マーカー

の発現が最初に認められ、次いで Notch が導入されることによって MyoD, Myogenin などの骨格筋マーカーが順次発現されることを見いだした。従って本方法は理論的な基盤に基づいた誘導システムであると考えられる。またサルや犬などの高等哺乳類においてもラット、ヒトと同様に誘導が再現されていることは、本システムが普遍的に作用することを示唆している。

E. 結論 申請者は倫理問題なく大量に培養可能な骨髄間質細胞から、神経細胞と骨格筋を極めて高い効率で誘導する画期的な方法を見出した。特に骨格筋誘導においては幹細胞にあたる筋衛星細胞が含まれており、生体由来の骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) はこれまで培養が困難とされていたので本研究は特に大きな意義がある。さらに誘導した細胞が生体で機能するという確固とした裏づけを持っている。いずれも申請者の独自の着想に基づいた世界的なレベルの萌芽的成果であり、新しい医療技術の創出となると思われる。

F. 健康危険情報 無し

G. 研究発表

1. 論文発表

【欧文原著】

1. Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Yoshihara T, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309: 314-317, 2005.
2. Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake SI. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with

- HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab.* (in press) 2006
3. Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, Watanabe T, Kajimoto Y, Furutama D, Kimura F, Dezawa M, Coffin RS, Otsuki Y, Kuroiwa T, Miyatake S. Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 36(12):2725-2730, 2005.
 4. Xu Y, Kitada M, Yamaguchi M, Dezawa M, Ide C. Increase in bFGF-responsive neural progenitor population following contusion injury of the adult rodent spinal cord. *Neurosci Lett.* 2006 Jan 6;
 5. Itokazu Y, Kitada M, Dezawa M, Mizoguchi A, Matsumoto N, Shimizu A, Ide C. Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat. *Glia* 53:32-42, 2006
 6. Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Yamamoto I. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 64(12):1108-17, 2005.
 7. Tanaka Y, Kanno H, Dezawa M, Mimura T, Kubo A, Yamamoto I. Differentiation of neural progenitor cells and the role of von Hippel-Lindau protein under normoxic and anoxic conditions. *Neurosci Lett*, 383: 28-32, 2005.
 8. Watanabe Y, Matsumoto N, Dezawa M, Itokazu Y, Yoshihara T, Ide C. Conditioned medium of the primary culture of rat choroid plexus epithelial (modified ependymal) cells enhances neurite outgrowth and survival of hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 379(3):158-63, 2005.
 9. Xu Y., Tamamaki N., Noda T., Kimura K., Itokazu Y., Matsumoto N., Dezawa M., and Ide C.: Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.* 192:251-64, 2005.
 10. Kamata T, Koda M, Dezawa M, Yoshinaga K, Hashimoto M, Koshizuka S, Nishio Y, Moriya H, Yamazaki M: Transplantation of Bone Marrow Stromal Cell-Derived Schwann Cells Promotes Axonal Regeneration and Functional Recovery after Complete Transection of Adult Rat Spinal Cord. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 64:37-45, 2005.
 11. Ishikawa H, Takano M, Matsumoto N, Sawada H, Ide C, Mimura O, Dezawa M: The effect of GDNF gene transfer into axotomized retinal ganglion cells using in vivo electroporation with contact type electrode. *Gene Therapy* , 12:289-298, 2005.

【欧文総説】

1. Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Nabeshima Y. Potential of bone marrow stromal cell in application to neurodegenerative and muscle degenerative diseases. *Current Neuropharmacology* 3: 257-266, 2005.

2. Dezawa M, Hoshino M, Nabeshima Y, Ide C. Marrow stromal cells: implications in health and disease in the nervous system. *Current Molecular Medicine*, 5: 653-662, 2005.
 3. Dezawa M, Matsumoto N, Ohta M, Itokazu Y, Suzuki Y, Ide C. Cell transplantation for neurodegenerative and neurotraumatic disorders. *Current Trends in Neurology*, 1: 37-49, 2005.
 4. Dezawa M, Hoshino M, Ide C. Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stem cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(4): 427-435, 2005.
2. Dezawa M. Specific induction system of neurons, Schwann cells and skeletal muscle cells and application for neuro- and muscle-degenerative diseases. *International Symposium on Healthy Aging: A Global Challenge for the 21st Century*, Hong Kong, 2006. March,
 3. 出澤真理 骨髄間質細胞の分化誘導システムの確立: 神経・筋変性疾患における自己細胞移植治療の開発に向けて。第2回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎、2006、2月
 4. Dezawa M. Bone marrow stromal cells: applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. 5th International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, Kanazawa, 2006, January
 5. 出澤真理 骨髄間質細胞を用いた自己細胞移植治療の可能性(基調講演) 第6回日本分子脳神経外科学会 大阪、2005.
 6. 出澤真理 神経・筋変性疾患における骨髄間質細胞を用いた自己細胞移植治療の可能性。平成17年度第一回COEセミナー、21世紀COEプログラム「融合的移植再生治療を目指す国際拠点形成」京都大学、2005。
 7. 出澤真理 再生軸索—グリア細胞間の構造的連結: 神経再生医療への展望 平成17年度顕微鏡学会関西支部総会特別講演 大阪、7月9日 2005。
 8. Dezawa M and Nabeshima Y. Specific induction of neurons and skeletal muscle cells from

【和文総説】

1. 出澤真理、鍋島陽一 自己細胞移植治療の実現化に向けて: 骨髄間質細胞を用いた筋細胞の誘導、難病と在宅ケア 11(11):56-59, 2006.
 2. 出澤真理、鍋島陽一 骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導: 自己細胞移植治療の実現化に向けて。医学のあゆみ 216(2): 188-190, 2006
 3. 出澤真理 細胞移植をもちいた末梢神経再生への挑戦と未来展望 臨床神経学 45: 877-879、2005。
 4. 出澤真理、鍋島陽一 自己細胞移植治療に向けて: 骨髄間質細胞を用いた筋細胞の誘導, 実験医学 23: 2811-2814, 2005.
 5. 出澤真理、骨髄間質細胞からの神経およびグリア細胞の選択的誘導と神経再生への応用、脳神経外科 33(7): 645-649, 2005.
2. 学会発表
- 【シンポジウム・特別講演】
1. Dezawa M. Specific induction of Schwann cells, neurons and

- bone-marrow stromal cells and application for neurodegenerative and muscle degenerative diseases. Trilateral Stem Cell Meeting, RIKEN Center for Developmental Biology (CDB), Kobe, 5月13日 2005.
9. 出澤真理、骨髄間質細胞からの神経・シュワン細胞の誘導法開発：変性疾患における自己再生システム系の確立を目指して。第32回「中枢神経系の再生をめざして」岡山脳研究セミナー、岡山、7月30日 2005年。
 10. 出澤真理、骨髄間質細胞からの神経・骨格筋への選択的誘導と自己再生システム系を目指した開発。シンポジウム「神経発生と神経再生：分化転換における共通機構の解明に向けて」オーガナイザー兼シンポジスト、第110回日本解剖学会総会、富山、3月31日 2005年。
 11. 出澤真理、細胞移植を用いた末梢神経再生への挑戦と未来展望。第46回日本神経学会総会、鹿児島、5月25日 2005年。
 12. 出澤真理、骨髄間質細胞からの神経、グリア並びに骨格筋への選択的誘導法開発：変性疾患における自己細胞移植治療の確立を目指して。国立遺伝学研究所研究会「生命現象のエピジェネティクス」、三島、3月24日 2005年。
 13. 出澤真理、骨髄間質細胞からの神経並びに骨格筋への選択的誘導法開発：変性疾患における自己再生システム系の確立を目指して。第22回神経組織培養研究会 東京 2月19日 2005年。
- for degenerative diseases. EMBO/FEBS workshop, Fontevraud, France, 2005
2. 出澤真理、糸数裕、早瀬睦、味村俊郎、菅野洋。骨髄間質細胞からの神経細胞誘導と神経変性疾患への移植応用。第28回日本神経科学大会、横浜、2005年。
 3. 早瀬睦、高木康志、出澤真理、野崎和彦、橋本信夫。ラット骨髄間質細胞由来神経前駆細胞様細胞のラット脳虚血モデルへの移植。第64回日本脳神経外科学会総会、横浜、2005年。
 4. 竹内良平、斉藤知行、八木隆浩、白石俊彦、森下信、出澤真理、井出千束、糸数裕。振動とヒアルロン酸が3次元培養軟骨細胞に与える影響。第4回再生医療学会、大阪、2005
 5. 染谷幸男、国府田正雄、山崎正志、鎌田尊人、西尾豊、守屋秀繁、出澤真理、吉永勝訓。ラット脊髄圧挫モデルに対する骨髄間質細胞由来 Schwann 細胞移植の試み。第4回再生医療学会、大阪、2005
 6. 菅野洋、久保篤彦、味村俊郎、山本勇夫、前田和彦、山崎吉以、斎藤知行、中野修一、杉本直己、出澤真理。機能性VHLオリゴペプチドによる体性幹細胞の神経分化誘導とその神経再生医療への応用。第4回再生医療学会、大阪、2005.
 7. 鎌田尊人、国府田正雄、出澤真理、吉永勝訓、西尾豊、染谷幸男、大河昭彦、政木豊、守屋秀繁、山崎正志。ラット脊髄圧挫モデルに対するヒト骨髄間質細胞由来 Schwann 細胞移植の試み。第4回再生医療学会、大阪、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し

【一般講演】

1. Dezawa M and Y. Nabeshima. Specific induction of Schwann cells, neurons and skeletal muscle cells from bone marrow stromal cells and application

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（総括・分担）研究報告書

分担研究者 星野幹雄 京都大学医学研究科・助手

研究要旨 本研究分担者は、MSC から神経細胞へいかなる分子機構で誘導されるのかについて調べることを目的としている。本年度は、NICD を導入された MSC と同等の性質を持つと考えられる神経上皮細胞から、いかにして神経細胞へと誘導されるのかについて調べ、ある一定の成果を得た。そこで得られた知見が、MSC から神経細胞へと誘導される過程でも正しいのかどうかについて、今後精力的に調べていく。

A. 研究目的 骨髄間質細胞(MSC)から、神経細胞へと分化誘導する過程において、いかなる分子機構が作用しているのかについて明らかにする。特に、分裂を繰り返す MSC からいかにして細胞分裂を停止した神経細胞が生み出されるかに、着目する。さらに、様々な種類の神経細胞のうち、特定の種類の神経細胞を誘導するシステムの開発を目指す。また、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する移植治療のためには、移植細胞が障害部位へと遊走・細胞移動し定着することが必須であるため、特に神経細胞移動の分子機構についても調べ、その成果を移植の生着率の向上のために役立てていこうと考えている。

B. 研究方法

これまでに我々は MSC に Notch の細胞内ドメイン (NICD) を導入すると神経上皮細胞（神経幹細胞）のような性質を持つ細胞へと分化することを明らかにしてきた (JCI 2004)。そこで、神経上皮細胞をモデル系にして、子宮内エレクトロポレーション法による遺伝子導入法とセレベレス突然変異マウスを利用する事によって、以下のことについて調べた。1、神経上皮細胞から、いかにして細胞分裂を停止した神経細胞が生み出され、移動を開始するのか。2、GABA 作動性神経細胞へと分化誘導される分子メカニズム。3、神経細胞が目的の場所まで移動するしくみ。

（倫理面への配慮）

利用するマウス、ラット個体は、麻酔をかけてから速やかに処理をし、動物に苦痛が生じないように配慮している。

C. D. 研究成果および考察

1、細胞周期関連蛋白質 p27kip1 が神経上皮細胞から生み出された神経細胞の細胞分裂を停止させると同時に、神経細胞を移動させる働きがあることを示した (Nat. Cell Biol. 2006)。今後は MSC から神経細胞を誘導する際にも、この分子が関与しているのではないかと考えて、MSC から神経細胞への誘導過程において p27 のリン酸化や蛋白量などについても調べて行く。

2、新規小脳無形成マウス突然変異体を単離し、解析したところ、その原因遺伝子である *Ptf1a* が小脳神経上皮細胞から GABA 作動性神経細胞へと分化するのに必須な役割を果たしていることを明らかにした (Neuron 2005)。この遺伝子は bHLH 型の転写因子をコードしているが、MSC から GABA 作動性神経細胞を誘導するための系を開発するために、類似の bHLH 型転写因子 (*Ptf1a* の他には *Mash1* など) を活性化するという手段が使えるのではないかと考えている。これらの転写因子の遺伝子導入を MSC からの誘導系に組み合わせるなどの実験をしていくつもりである。

3、マウス胚への子宮内エレクトロポレーション法により、大脳皮質での Neurotrophin (NGF, BDNF) および EGF 依存的な神経細胞の移動には、P-Rex1-Rac1 シグナリングカスケードが中心的な働きを果たしている事を明らかにした (J. Neurosci. 2005)。これは、移植細胞の障害部位への定着を助けるために Neurotrophin-P-Rex1-Rac1 経路の活性化などが役に立つかもしれないことを示唆している。

E. 結論 NICD を導入された MSC と類似の神経上皮細胞についての分子機構については、一部明らかにすることができた。これが、実際の MSC にも適用できるかどうかを調べ、応用していくのは

が今後の課題である。いずれにせよ、未だに MSC から神経細胞への分化誘導の分子機構を全て概括できるだけの情報を得るには至っていない。今後は、分化誘導過程の MSC の様々な遺伝子の発現プロファイルを調べ、またそれらを遺伝子導入して分化誘導に与える影響を調べる事によって、より詳細な分子機構を明らかにする事を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

- M. Hoshino, S. Nakamura, K. Mori, T. Kawauchi, M. Terao, Y. Nishimura, A. Fukuda, T. Fuse, N. Matsuo, M. Sone, M. Watanabe, H. Bito, T. Terashima, C.V.E. Wright, Y. Kawaguchi, K. Nakao, Y. Nabeshima *Ptfla*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, 47, 201-213 (2005)
- T. Kawauchi, K. Chihama, Y. Nabeshima, M. Hoshino Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27^{kip1}, contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biol.* 8, 17-26 (2006)
- M. Yoshizawa, T. Kawauchi, M. Sone, Y. Nishimura, M. Terao, K. Chihama, Y. Nabeshima, M. Hoshino Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J. Neurosci.* 25, 4406-19 (2005)
- T. Kawauchi, K. Chihama, Y.V. Nishimura, Y. Nabeshima, M. Hoshino MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25 and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 331, 50-55 (2005)
- M. Dezawa, H. Ishikawa, Y. Itokazu, T. Yoshihara, M. Hoshino, S. Takeda, C. Ide, Y. Nabeshima, Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309, 314-317 (2005)

2. 学会発表

- Mikio Hoshino, *Pancreas transcription factor 1a* defines GABAergic neuronal fates in the cerebellum.
Keio Symposium "Dynamic Cortical Development and Neuronal Migration" (東京) 2006年1月30-31日
「神経回路網形成の分子機構 — 神経細胞サブタイプの獲得と神経細胞移動」星野幹雄
2005年4月25日 東京医科歯科大学 COE セミナー (東京)
神経細胞移動における Rac シグナル伝達系の果たす役割、星野幹雄 日本解剖学会 第110回総会・全国学術集会 シンポジウム (富山) 2005年3月29-31日
小脳における GABA 作動性ニューロンの運命決定機構 星野幹雄 日本解剖学会 第110回総会・全国学術集会 シンポジウム (富山) 2005年3月29-31日
A role of PTF1a, a bHLH transcription factor, in neuronal subtype specification. 星野幹雄
第48回日本神経化学学会大会 シンポジウム「転写因子による脳の構造と機能の制御」 (福岡)
2005年9月29-30日
Ptfla, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum.
Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, Kiyoshi Mori, Takeshi Kawauchi, Mami Terao, Yoshiaki V. Nishimura, Akihisa Fukuda, Toshimitsu Fuse, Naoki Matsuo, Masaki Sone, Masahiko Watanabe, Haruhiko Bito, Toshio Terashima, Christopher V.E. Wright, Yoshiya Kawaguchi, Kazuwa Nakao, Yo-ichi Nabeshima Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, USA) 2005年11月8-12日
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)
(分担) 研究報告書

骨髄間質細胞からの神経並びに筋細胞の選択的誘導とパーキンソン病・筋ジストロフィーへの自家移植治療法の開発

(分担) 研究者 菅野 洋 横浜市立大学大学院 助教授

研究要旨

骨髄間質細胞を遺伝子導入法を用いて選択的に神経細胞へ分化転換し、その細胞をパーキンソン病患者の脳内へ移植することにより、神経を再生させて、パーキンソン病を治療する方法の開発をパーキンソン病モデル動物を用いて検討した。

菅野 洋・横浜市立大学 大学院医学研究科
脳神経外科学 助教授

化した。行動学的評価では脳内へ移植されたパーキンソン病モデルラットの症状は劇的に改善した。

A. 研究目的

本研究は、多分化能を持つ組織幹細胞の一つで、臨床応用可能とされる自己骨髄細胞に対して、神経分化転換を引き起こす特定の遺伝子を導入することにより、神経細胞へ選択的に分化させたのち難治性疾患であるパーキンソン病患者の脳内へ移植してパーキンソン病において欠乏しているドーパミン産生神経細胞を補うことで、パーキンソン病を根本的に治療するために、そのための基礎的検討をパーキンソン病モデル動物を用いて行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 6-hydroxydopamine をラットの脳内に定量的に注入し、半側パーキンソンモデルを作成し、アポモルフィン投与により一定以上の回転数で回転するモデルを作成。

2) 骨髄間質細胞から Notch 遺伝子あるいは VHL 遺伝子/ペプチド導入により選択的に神経へ分化させた細胞を 1) の方法で作成したパーキンソン病モデルラットの脳内へ移植し、1 週間毎に移植 12 週間までアポモルフィン誘導回転等を検討した。

3) 移植 12 週後にパーキンソン病モデルラットの脳を取り出して、病理組織学的に移植した骨髄間質細胞が神経へ分化しているか、パーキンソン病で欠乏するドーパミンを分泌しているか検討した。

(倫理面への配慮)

実験にあたっては、本学の動物実験センターの認定を得て、実験動物に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

遺伝子/ペプチドを導入した骨髄間質細胞は、パーキンソン病モデルラットの脳内でドーパミンを分泌する神経細胞へ分

D. 考察

Notch 遺伝子、VHL 遺伝子/ペプチドの骨髄間質細胞への導入は選択的な神経細胞への分化を引き起こし、神経細胞へ選択的に分化誘導した骨髄間質細胞移植がパーキンソン病の画期的な治療として将来的に有望であることが示唆された。

E. 結論

自己骨髄間質細胞を選択的に神経細胞へ誘導後の脳移植はパーキンソン病の新しい治療法になりうる。

F. 健康危険情報：総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka Y, Kanno H, Dezawa M, Mimura T, Kubo A, Yamamoto I. The role of von Hippel-Lindau protein in the differentiation of neural progenitor cells under normoxic and anoxic conditions. *Neurosci Lett.* 383(1-2):28-32, 2005

2) Ito S, Sekido K, Kanno H, Sato H, Tanaka M, Yamaguchi K, Yamamoto I. Phenotypic diversity in patients with craniosynostoses unrelated to Apert syndrome: the role of fibroblast growth factor receptor gene mutations. *J Neurosurg.* 102(1 Suppl):23-30, 2005

3) Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Yamamoto

I. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells, J Neuropathol Exp Neurol 64(12):1108-17, 2005

4) Tajima N, Schonherr K, Niedling S, Kaatz M, Kanno H, Schonherr R, Heinemann SH. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1{alpha} and the von Hippel-Lindau protein. J Physiol. 571 (Pt 2):349-59. 2006

2. 学会発表

1) 久保篤彦、菅野洋、横山高玲、味村俊郎、山本勇夫、中野修一、杉本直己：ペプチドによる皮膚由来細胞の神経分化誘導と自家細胞移植治療、第6回日本分子脳神経外科学会（大阪）2005年9月

2) 菅野洋、久保篤彦、横山高玲、味村俊郎、前田和彦、山崎吉以、長瀬敬、松本大輔、中野修一、杉本直己、小林菜穂子、吉田徹彦、山本勇夫：VHL遺伝子／ペプチド導入体性幹細胞を用いた神経再生療法の開発、第64回日本脳神経外科学会シンポジウム（横浜）2005年10月

3) 久保篤彦、菅野洋、横山高玲、味村俊郎、山本勇夫、中野修一、杉本直己：ペプチドによる皮膚由来細胞の神経分化誘導と自家細胞移植治療、第64回日本脳神経外科学会（横浜）2005年10月

4) 菅野洋、久保篤彦、横山高玲、味村俊郎、前田和彦、山崎吉以、斎藤知行、長瀬敬、松本大輔、中野修一、杉本直己、川中紀邦、水木信久、Hoi-Sang U、小林菜穂子、吉田徹彦、山本勇夫：VHL遺伝子／ペプチド導入組織幹細胞を用いた神経再生療法、第5回日本再生医療学会（岡山）2006年3月

5) 久保篤彦、菅野洋、横山高玲、味村俊郎、山本勇夫、中野修一、杉本直己、小林菜穂子、吉田徹彦：皮膚由来幹細胞の未分化維持機構と神経分化誘導、第5回日本再生医療学会（岡山）2006年3月

H. 知的財産権の出願状況

1) 国際出願番号PCT/JP00/06668, 識別番号30306692国際出願日 2000年9月27日、取得2005年5月 英国発明者 菅野洋、出願人 菅野洋、東亜合成株式会社 発明の名称「ガン細胞または胚性幹細胞にVHL遺伝子を導入し、発現して得られる宿主細胞」

2) 出願番号：特願 2001-26958号、出願日 平成13年8月30日、発明者 出澤真理、澤田元、高野雅彦、菅野洋、出願人 よこはまティーエルオー株式会社、発明の名称「Notch遺伝子の導入を用いて骨髄間質細胞を神経細胞及び骨格筋細胞に分化誘導する方法」

3) 出願番号：特願2004-148907、提出日 平成1

6年5月19日、出願人 菅野洋、東亜合成株式会社、発明の名称 「VHLペプチド」

4) 特願2005-276795, 出願日 2005年9月22日、発明者 菅野洋、吉田徹彦、小林菜穂子 出願人 菅野洋、東亜合成株式会社、発明の名称 「神経分化誘導ペプチド及びその利用」

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

幹細胞としての筋衛星細胞の単離と遺伝子発現解析

分担研究者

武田伸一

国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

1. 骨格筋から FACS にて単離した静止期筋衛星細胞と活性化した筋衛星細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、gene set enrichment analysis を行った
2. 1. で明らかにした静止期筋衛星細胞特異的な発現をするカルシトニンレセプターの発現を筋再生過程で検討した。
3. カルシトニン・カルシトニンレセプターのシグナルの筋衛星細胞の活性化、増殖、分化における役割を検討し、このシグナルが筋衛星細胞の静止状態の維持に重要である事が明らかになった。

A. 研究目的

骨格筋の筋衛星細胞は筋障害時、活性化し、増殖し融合して多核の筋線維を形成し、筋線維を再生する。筋衛星細胞を静止期に維持する機構、自己複製の分子機構を理解する事は筋ジストロフィーの再生医療及び筋萎縮の治療開発の基盤になる。我々は静止期筋衛星細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、静止期に特異的に発現する遺伝子群の中で、カルシトニンレセプター(CTR)に注目し、その機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 静止期、活動期筋衛星細胞の網羅的遺伝子発現解析
8-12 週齢の C57BL/6 マウスの四肢筋から FACS を用いて静止期筋衛星細胞を純化した。4 日間培養したものを活動期筋衛星細胞とした。GeneChip (Affymetrix)を用いて遺伝子発現を行い、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)はみずほ情報総合研究所と共同で行った。筋再生はカルジオトキシンと言う蛇毒をマウス前脛骨筋に直接投与

し、その後筋切片を CTR 抗体、ラミニン抗体、M-カドヘリン抗体等で染色した。

2. CTR 発現実験

CTR の cDNA をクローニングし、レトロウイルスベクター-pMXs-IG へ組み込み、PLAT-E 細胞でウイルス粒子を作製し、筋衛星細胞及び C2C12 細胞株へ導入し、BRDU 取り込みや抗体染色を行った。

C. 研究成果

1. 静止期筋衛星細胞の網羅的遺伝子発現解析

GSEA を行い、静止期を特徴づける遺伝子群の抽出を行った。その結果、細胞接着、細胞外マトリックス、細胞増殖に関わる遺伝子群が静止期筋衛星細胞に高く発現している事が明らかになった。

2. カルシトニンレセプター (CTR) の発現の解析

作成した遺伝子発現プロファイルから、静止期筋衛星細胞に特異的に発現している遺伝子群 (Gene Set) を抽出した。そのうち CTR の発現を再生過程で調べ、CTR の発現

が筋再生初期に一旦消失し、自己複製した筋衛星細胞に再び認められた。

3. カルシトニン/CTR の筋衛星細胞の活性化、増殖、分化に及ぼす影響

カルシトニンは静止期にある筋衛星細胞に加え培養すると、その活性化を抑えた。またレトロウイルスベクターに CTR を組み込み、活性化筋衛星細胞に導入した場合、カルシトニンで刺激すると活性化筋衛星細胞の増殖が抑えられた。その下流には adenylylate cyclase/cAMP/PKA シグナリングパスウェイが働いている事が示唆された。MyoD の発現や、筋管細胞の形成能には影響がなかった。

D. 考察

静止期の筋衛星細胞に特異的に発現する遺伝子、カルシトニンレセプター (CTR) は筋衛星細胞の活性化、増殖を抑制し、筋衛星細胞の静止状態を維持するのに必要な遺伝子である事が示唆された。今後はその標的遺伝子、及び CTR の発現の制御機構を明らかにすることで、筋衛星細胞の自己複製のメカニズムと筋衛星細胞の niche が明らかになっていくと考えられる。

E. 結論

1. 静止期、活動期筋衛星細胞の網羅的遺伝子発現データから、静止期筋衛星細胞においてのみ発現する遺伝子群を同定した。
2. そのうち CTR はマウス骨格筋組織内で静止期筋衛星細胞と自己複製した筋衛星細胞に特異的に発現していた。
3. カルシトニン/CTR シグナリングは、筋衛星細胞の活性化と増殖を抑制する事がわかった。

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 Biochemical and Biophysical Research Communications, 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. Epub 2004 Dec
30.
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 Jun 2; [Epub
ahead of print]
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 MEDICAL17(3); 221-228,
2005-9
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

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.
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
- <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. 武田伸一:

- 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島市、
5. 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
 6. 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
 7. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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, 2005
 13. 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-、秋田市、10.22, 2005
 14. 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
 15. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S：
Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscucular dystrophy (DMD).
“AAV and its application to Gene therapy & resenerative medicine”
The 2nd Nikko International Smposium 2005, 9.30, 2005
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

(代表者：出沢分)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Yoshihara T, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y.	Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration.	Science.	309	314-317	2005
Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake SI.	Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector.	J Cereb Blood Flow Metab	In press		2006

Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, Watanabe T, Kajimoto Y, Furutama D, Kimura F, <u>Dezawa M</u> , Coffin RS, Otsuki Y, Kuroiwa T, Miyatake S.	Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats.	Stroke	36(12)	2725-2730	2005
Xu Y, Kitada M, Yamaguchi M, <u>Dezawa M</u> , Ide C.	Increase in bFGF-responsive neural progenitor population following contusion injury of the adult rodent spinal cord.	Neurosci Lett	In press		2006
Itokazu Y, Kitada M, <u>Dezawa M</u> , Mizoguchi A, Matsumoto N, Shimizu A, Ide C	Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat.	Glia	53	32-42	2005
Mimura T, <u>Dezawa M</u> , Kanno H, Yamamoto I.	Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells	J. Neuropathol. Exp. Neurol.	64(12)	1108-17	2005
Tanaka Y, Kanno H, <u>Dezawa M</u> , Mimura T, Kubo A, Yamamoto I	Mimura T, Kubo A, Yamamoto I. Differentiation of neural progenitor cells and the role of von Hippel-Lindau protein under normoxic and anoxic conditions.	Neurosci Lett ,	383	28-32	2005
Watanabe Y, Matsumoto N, <u>Dezawa M</u> , Itokazu Y, Yoshihara T, Ide C.	Conditioned medium of the primary culture of rat choroid plexus epithelial (modified ependymal) cells enhances neurite outgrowth and survival of hippocampal neurons.	Neurosci Lett ,	379(3)	158-63	2005
Xu Y., Tamamaki N., Noda T., Kimura K., Itokazu Y., Matsumoto N., <u>Dezawa M.</u> , and Ide C	Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle	Exp. Neurol	192	251-64	2005