

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 18 年度)

主任研究者 武田伸一

平成 19 年 (2007) 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	
- 筋ジストロフィー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	----- 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(第 2 報)	----- 22
埜 中 征 哉	
4. 骨格筋再生時の炎症・免疫学的反応に関する研究	----- 25
山 元 弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 27
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. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター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るという大きな限界があった。新たな血清型として 8 型の AAV ベクターを用いて遺伝子導入実験を進めたところ、イヌ骨格筋に導入した場合にも、免疫応答が低い傾向にあった。
2. 8 型の AAV ベクターは、マウスに対する尾静脈経由の導入、皮下注、イヌに対する limb perfusion を用いた導入実験により、全身的な遺伝子導入に有用であることが示された。
3. 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。
4. AAV ベクターを用いる方法論を臨床に応用する前提としてカニクイザル骨格筋に対する投与実験を行った。
5. 縁取り空胞型遠位型ミオパチー(distal myopathy with rimmed vacuoles: DMRV)のモデルマウス *hmutGNETg-GNE(-/-)*の作成に成功した。このマウスでは生後 32 週以降に後肢の筋力低下をきたし、DMRV 患者で見られる筋病理所見（縁取り空胞の出現、アミロイドの沈着）を再現していた。
6. 骨格筋の再生時には、炎症性細胞以外に線維芽細胞が増殖し、骨格筋線維の安定化に必須のラミニン α 2 鎖を産生していることが明らかになった。

A. 研究目的

1. AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発

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、充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) ベクターへ組み込んだ recombinant AAV2-micro-dystrophin がジストロフィン欠損マウス (*mdx* マウス) の筋変性を抑制することを示した。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。

第一に、最近見出された新たな血清型の AAV ベクターを用いることとした。AAV2 ベクター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筋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。そこで、我々は AAV 血清 8 型 (AVV8) ベクターを用いたジストロフィン欠損の骨格筋 (*mdx* マウス、筋ジストロフィー犬) に対する遺伝子導入を行う。

第二に、これまでの局所的な導入に加えて、AAV8 ベクターを用いることにより始めて可能になった血管からの全身投与、limb perfusion による導入、さらに皮下注射による導入を試み、それぞれによる導入効果の検討を行う。

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 AAV ベクター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する。

第四に、従来よく用いられてきた AAV-type 2 ベクターに 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、AAV ベクターによる治療が安全であるか検討した。

2. 新たな筋疾患モデルマウス

筋線維変性過程の代表的なものは、筋ジストロフィーに代表される筋線維壊死である。次に

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¹⁾。RV 形成について、まず上記各疾患での変性過程の相違を過去 2 年間検討してきた。本年度は遺伝子操作によるモデルマウスの作成に成功したので、その解析を中心に研究を進めた。

DMRV 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。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。

3. 骨格筋再生の分子機構

骨格筋が再生するとき、種々の炎症性細胞の浸潤が認められる。筋障害初期 (~24時間) では顆粒球が、続いてマクロファージ (48時間以降) が浸潤し、マクロファージの浸潤と同期して筋衛星細胞の増殖が始まる。これまで本研究者らは、マクロファージ減少下の条件で骨格筋再生を誘導したとき、筋再生不全とともに線維産生の亢進を認めたが、今回 CD90 陽性の線維芽細胞が線維産生に働いていることを明らかにした。本研究は、CD90 陽性線維芽細胞の機能についてさらに検討し、遺伝性筋疾患の進行予防や治療法の開発に役立つ機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. AAV 血清 8 型ベクターの組換え

導入遺伝子として LacZ 遺伝子, micro-dystrophin 遺伝子 ϵ -Sarcoglycan(SG)遺伝子を選択し, CMV プロモータの下流に組み込んで AAV8 のウィルス粒子を作製した。lacZ 遺伝子及びマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターについては, それぞれ正常骨格筋あるいは筋ジストロフィー骨格筋 (*mdx* マウスあるいは筋ジストロフィー犬) への導入を行い, ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターについては, α -SG 欠損マウス骨格筋への導入を行った。

2. AAV ベクターを用いた limb perfusion method

正常ビーグル(8 週齢, 3.25 kg)及び筋ジストロフィー犬 (*cxmdj*) (8 週齢, 3.6 kg)に対し, 外側伏在静脈あるいは橈側皮静脈から rAAV8-CMV-LacZ(1×10^{14} vg/kg), rAAV8-CMV-M3 (1×10^{14} /kg) を投与した。イソフルランによる深麻酔, 挿管, 呼吸管理下に右後肢大腿部に血圧計のカフを装着する。右外側伏在静脈に 24G カニューレを挿入する。カフを膨らませた後(> 300 mmHg), 塩酸パパベリン(0.44 mg/kg), ヘパリン(15.8 U/kg)を含む生理食塩水を注入する。5 分後に rAAV8-CMV-LacZ を PHD 2000 syringe pump を用いて注入する(0.6 ml/sec). 注入 2 分後にカフ圧を下げる。同様の手技を右橈側皮静脈に対しても続けて行った。

3. AAV ベクターを用いた全身投与

4 週齢ないし 8 週齢の *mdx* マウスに対し, 尾静脈からの静注あるいは背部からの皮下注により, 血清 8 型の AAV ベクターである rAAV8-CMV- Δ CS2 を 5.0×10^{10} ~ 10^{12} vg 投与した。

4. 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 回りリピート構造 / 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 AAV ベクターを作製した。

5. カニクイザ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について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。

6. 新たな筋疾患モデルマウスの作出

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。

7. モデルマウスの組織化学的・電子顕微鏡的検討

筋力低下をみたモデルマウスで、主に侵される腓腹筋と心筋をヘマトキシリン・エオジン染色、Gomori トリクローム変法染色、酸フォスファターゼ染色、コンゴレーッド (アミロイドの検出)、などを中心に染色した。電子顕微鏡的には腓腹筋をグルタルアルデヒド固定、オスミウム酸にて後固定、エポンに包埋した。

8. 筋再生実験

抗c-fms抗体 (抗M-CSF受容体抗体) を投与したマウス前脛骨筋にカルジオトキシンを投与し、骨格筋の再生を誘導した。再生時期の骨格筋からSM/C-2.6並びにCD90の発現に基づいて細胞を分画した。宿主はラミニン α 2鎖 (LAMA2)欠損マウス (dy^{3k})、ドナーはGFP-tgマウスを用いた。

C57BL/6マウスに6Gyの γ 線を照射し、直後にGFP-tgマウス由来骨髄細胞を移植した。このマウスについて、CD90陽性細胞を調べた。

(倫理面への配慮: すべてマウスでの実験であり、大阪大学動物実験指針に沿って実施した。)

C. 研究成果

1. 8型 AAV ベクターの導入結果

ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ 8 型 AAV ベクターを 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 AAV ベクターの導入では、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 AAV ベクターのイヌ骨格筋に対する導入では 2 型 AAV ベクターを用いた場合と比較して、 β -gal の発現が高く、しかも少なくとも導入初期には

細胞浸潤が少ない傾向にあった。また、マイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入では、これまで 2 型の AAV ベクターを用いた導入では遺伝子発現が認められなかったのに対し、8 型 AAV ベクターを用いて始めて遺伝子発現を観察することができた。

2. 8 型 AAV ベクター を用いた limb perfusion

正常ビーグル犬骨格筋に対する rAAV8-CMV-LacZ の導入では、2 週間後に採取した右前脛骨筋 (TA)、長趾伸筋 (EDL) において広範囲で強い β -gal の発現を認めた。

一方、筋ジス犬 (cxmdj) に対する rAAV8-CMV-M3 の導入では、2 週間後に採取した右橈側手根伸筋 (ECR) において micro-dystrophin (M3) の発現を認めた。4 週後の発現については現在検討中である。

3. 8 型 AAV ベクター を用いた *mdx* マウスに対する全身導入

5×10^{12} vg の経静脈性投与により骨格筋 (大腿四頭筋 > 下腿) にもまして心筋で、極めて高い効率で導入遺伝子の発現が観察された。一方、 5×10^{12} vg の皮下注では、注入部位に比較的近接した近位筋での発現が認められ、遠位筋のそれを上回っていたが、大変驚いたことには心筋でも極めて高い効率での発現が認められた。

4. 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 ベクターを作製した。これらの AAV ベクターをマウス及びイヌ・モデルに導入し、その有効性について検定中である。

5. カニクイザル骨格筋への遺伝子導入

前年度に行った予備実験により明らかにした至適投与量 (10^{12} vg) の LacZ 遺伝子組換え

AAV ベクター及びマイクロ・ジストロフィン遺伝子組換え AAV ベクターを、カニクイザルの両側の上腕二頭筋と前脛骨筋の計4カ所に投与し、1, 2, 4 週後に生検を行った。切片作成後 HE 染色を行い、LacZ 遺伝子組換え AAV ベクター投与群では β -gal 染色を施し、injection の有無と β -gal の発現を確認した。マイクロジストロフィン遺伝子組換え AAV ベクター投与群についてはマイクロジストロフィンの発現を確認するため、ジストロフィン染色、ウエスタンブロットおよび PCR 法を行った。 β -gal, AAV ベクター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、LacZ 遺伝子組換え AAV ベクター投与群では3頭中1頭に β -gal の発現が1週後、2週後に軽度認められたのみで、予備実験と比較し発現効率が低かった。また、細胞浸潤などの免疫反応も強く認められた。ELISA 法では AAV-type2 ベクターに対する抗体が1週間後から認められ、IgM 抗体の上昇も認められず、本実験で用いたサルは AAV-type2 既感染であったと考えられた。

次に、マイクロ・ジストロフィン遺伝子組換え AAV ベクターを3頭のカニクイザル骨格筋に投与した。1, 2, 4 週後ともウエスタンブロットでジストロフィンの発現は認められず、HE 染色では筋注部位に一致して細胞浸潤を認めた。PCR 法では AAV-type2 ベクターは検出された。ELISA 法では3頭中2頭に AAV-type2 ベクターに対する IgG 抗体の上昇が投与1週目から認められ、IgM 抗体の上昇はなく、AAV-type2 既感染であると考えられた。

今回の実験により、AAV ベクターの遺伝子導入効率は血清中の中和抗体の有無により左右されることが明らかとなった。また、ELISA 法では投与前血清における AAV-type2 に対する中和抗体の有無の判定は困難であった。

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。

6. 筋疾患モデルマウスの臨床症状

*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。

7. 筋疾患モデルマウスの骨格筋の病理解析

38 週齢以降に筋線維の大小不同が観察され、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、大腿四頭筋では酸フォスファターゼ陽性の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 の特徴とされる筋原線維の変性、自己貪食空胞、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。核内封入体は確認できなかったし、核の変かも確認できなかった。

8. 筋再生のラミニン α 2鎖との関連

SM/C-2.6抗体を用いて筋再生時の単核細胞を分画しLAMA2発現をRT-PCRで調べたところ、精製SM/C-2.6陽性細胞では弱いバンドしか見えないのに反し、SM/C-2.6陰性細胞では強い発現が認められた。

SM/C-2.6陰性細胞分画で認められたLAMA2発現は、筋再生時に増加するCD90陽性細胞が担っていることをRT-PCRで確認した。CD90陽性細胞は、培養すると線維芽細胞のマーカー分子の発現と形態を示した。また正常な骨格筋では基底膜の間隙に認められた。

骨髄キメラマウスでは、CD90陽性細胞は骨髄に由来する細胞ではなく、骨格筋に常在している細胞であることが示唆された。

CD90 陽性細胞を *dy^{3k}* に移植すると、GFP 陰性の筋線維の周辺に LAMA2 陽性の基底膜が観

察できた。

D. 考察

1. AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発
AAV ベクター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

我々は小型のジストロフィン欠損・マウスモデルでは2型 AAV ベクター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 ベクターを用いると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。実際に limb perfusion method、静脈からの投与が有効であるばかりではなく、皮下注によっても多くの骨格筋における発現が観察された。特筆すべきは、これらの導入に従って骨格筋と並んで心臓における発現が確認されたことである。

さらに注目されることは、8型 AAV ベクターをイヌ骨格筋に導入した場合でも、免疫応答が2型 AAV ベクター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。

またイヌ型マイクロ・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。

一方、カニクイザル骨格筋に対する AAV ベクターを用いた遺伝子導入に関しては、現在の ELISA 法では投与前に中和抗体の有無を確認できないため、中和抗体のスクリーニング法の

確立が重要である。さらに、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も重要である。また、最近開発された新しい血清型 AAV ベクターには、免疫反応を惹起しにくいもの、血流にのって、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い、遺伝子導入効率及び安全性を検討する事も意義深いと思われる。

2. 新たな筋疾患モデルマウスの作出

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

骨格筋の再生は、浸潤した炎症性細胞と筋衛星細胞との相互作用で進行すると考えられてきた。しかしこれら以外にも、マーカーが不明な

細胞が多数認められ、特にマクロファージ不在下で多く存在する。その一つがCD90陽性細胞であり、これが線維化の原因であることを報告してきた。

従来マウスCD90は、胸腺細胞やT細胞のみならず、神経細胞や線維芽細胞にも発現されていることが知られている。そこで本研究では、CD90陽性細胞が筋再生の場で果す役割を検討し線維関連成分以外に、LAMA2の主要な産生細胞であることを示した。またLAMA2産生能は、胸腺上皮細胞や皮膚線維芽細胞にも認められた。

この成果は、骨格筋の再生に新たな細胞集団が働いていることを示し得たと同時に、将来、LAMA2欠損型の常染色体性筋ジストロフィーの細胞治療法の研究に資すると考えられる。

E. 結論

1. AAV ベクターを用いた導入について、8型の AAV ベクター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. 8型の AAV ベクターを用いると経静脈性的のみならず、皮下注によっても広い範囲の骨格筋と心筋における発現が可能であった。筋ジストロフィー犬の場合にも、limb perfusion により比較的広い範囲での骨格筋における発現を実現した。
3. 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を組み込んだ AAV ベクターを作製した。
4. 従来よく用いられてきた AAV-type 2 ベクターに 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、AAV ベクターによる治療が安全であるか検討した。
5. 縁取り空胞変性は、筋原線維の変性、それ

に続く自己食食を主病変とする疾患であり、その代表的な疾患に縁取り空胞型遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles: DMRV)がある。われわれは、その疾患のモデルマウス *hmutGNETg-GNE(-/-)*マウスの作成に成功した。このマウスでは生後32週以降に後肢の筋力低下をきたし、DMRV患者で見られる筋病理所見(縁取り空胞の出現、アミロイドの沈着)を再現して、さらに電子顕微鏡的には筋原線維の変性、アミロイドの沈着、自己食食空胞の形成を認めた。今後このマウスを使用して治療実験が可能になると期待されている。

6. 筋再生時にCD90陽性細胞を検出した。CD90陽性細胞にLAMA2産生能を見出した。CD90陽性細胞は線維芽細胞であり、類似のLAMA2産生能は皮膚にも認められた。CD90陽性細胞を利用することで、先天性筋ジストロフィーの治療への可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy *Future Neurology*, Jan 2007, Vol.2(1), 87-96
2. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I, Shiga K: Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 2007 Jan 29;176(3):329-41.
3. Uezumi A, Ojima K, 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
4. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Kosaka 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 Miner Res*. 2006 May; 21(5):722-34.
 5. Yokota T, Lu QL, Morgan JE, Davies KE, Fisher R, Takeda S, Partridge TA: Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. *J Cell Sci*. 2006 Jul 1; 119(Pt 13): 2679-87.
 6. Shiga K, Yoshioka H, Matsumiya T, Kimura I, Takeda S, Imamura M: zeta-Sarcoglycan is a functional homologue of gamma-sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex. *Exp Cell Res*. 2006 Jul 1;312(11):2083-92. Epub 2006 Apr 25.
 7. Pramono ZA, Lai PS, Tan CL, Takeda S, Yee WC: Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1. *Hum Genet*. 2006 Oct;120(3):410-9.
 8. Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, Nakamura A, Wada M, Nakura M, Shimatsu Y, Tomohiro M, Takahashi A, Machida N, Wakao Y, Takeda S: Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies *BMC Cardiovasc Disord*. 2006 Dec 4;6:47.
 9. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I.: Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet*. 2007; 16: 115-28.
 10. Liewluck T, Hayashi YK, Ohsawa M, Kurokawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I.: Unfolded protein response and aggresome formation in hereditary reducing-body myopathy. *Muscle Nerve*. 2007; 35: 322-6.
 11. Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Ogawa M, Nonaka I, Tanabe Y, Ogino M, Takada F, Eriguchi M, Kotooka N, Campbell KP, Osawa M, Nishino I.: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol*. 2006 ; 60: 597-602.
 12. Wu S, Ibarra MC, Malicdan MC, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I.: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain*. 2006 J; 129: 1470-80.
 13. Scott AP, Allcock RJ, Mastaglia F, Nishino I, Nonaka I, Laing N.: Sporadic inclusion body myositis in Japanese is associated with the MHC ancestral haplotype 52.1. *Neuromuscul Disord*. 2006 ;

16: 311-5.

医学のあゆみ 216(10): 743-747, 2006

14. Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T.: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in alpha-dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 1279-89.

15. Ozawa R, Hayashi YK, Ogawa M, Kurokawa R, Matsumoto H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I.: Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol.* 2006; 168: 907-17.

16. Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S.: Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol.* 2005; 24: 80-3.

17. Nanno, M, Shiohara T, Yamamoto H, Kawakami K, Ishikawa H. $\gamma\delta$ -T cells: A fire fighter in front lines of defense? *Immunol. Rev.*, 215:103-113, 2007.

18. Israeli, D. et al.: Expression of mdrl is required for efficient long term regeneration of dystrophic muscle. *Exp. Cell Res.*, (in press), 2007.

<和文>

1. 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
2. 横田俊文、武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の試み.

3. 上住聡芳、鈴木直輝、武田伸一 :
筋疾患の病態と診断, 治療戦略の最前線
筋ジストロフィーの再生医療.
小児科診療・第 69 巻・4 号 : 570-574, 2006
4. 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.
CURRENT INSIGHTS IN Neurological Science VOL.14 No.1: 8-9, 2006

II. 学会発表

<国外>

1. Takeda S:
The NCNP dog facility
Wicker Project Workshop: Exon skipping in Muscular Dystrophy Workshop, Washington D.C., Jan 7-8, 2007
2. Takeda S:
An adeno-associated virus-mediated gene transfer into canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)
AFM Workshop, Evry, France, Jan 15-17, 2007
3. Takeda S:
The canine muscular dystrophy testing facility, Wellstone High Throughput Screening (HTS) Workshop
Children's National Medical Center (CNMC), Washington D.C., April 18, 2006
4. Takeda S:
Muscle stem cells and muscle regeneration
Seminar in Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, Washington D.C., April 19, 2006

5. Suzuki N, Motohashi N, Uezummi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Takeda S:
Dislocated neuronal nitric oxide synthase controls myofiber size during tail suspension.
Vth Asian and Oceanian Myology Center Meeting in Cebu, Philippines, May 25-27, 2006
6. Ikemoto M, Fukada S, Uezumi A, Masuda S, Ampong BN, Miyoshi H, Yamamoto H, Miyagoe-Syzuki Y, Takeda S :
Transplantation of SM/c-2.6+ satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice.
American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006
7. Takeda S:
Gene therapy in canine muscular dystrophy
Symposium, XIth International Congress on Neuromuscular Diseases
Istanbul, Turkey, July 3, 2006
8. Nishikawa M, Hirata K, Machida K, Takahashi Y, Yuasa K, Takeda S, Takakura Y:
Increased transgene expression of dystrophin in mdx muscle by RNAi-mediated silencing of calpain expression
American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006
9. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Takeda S :
Dislocated neuronal nitric oxide synthase results in muscle atrophy during tail suspension
XIth International Congress of the World Muscle Society, Bruges, Belgium, October 4-7, 2006
10. Yokota T, Qi Lu, Partridge T, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E:
Antisense morpholino injection restores extensive dystrophin expression to potentially therapeutic levels in canine muscular dystrophy in vivo
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
11. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Nakamura A, Miyagoe-Suzuki Y, Nakai H, Takeda S:
A recombinant serotype 8 AAV-mediated gene transfer into canine skeletal muscle
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
12. Nishiyama A, Ampong B, Kinoshita K, Nakai H, Takeda S:
Efficacy of adeno-associated virus serotype 8 in gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan deficient mice
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
13. Nonaka I:
Inflammatory myopathies. At the 9th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2006; 1.26, Cebu City Philippines.
14. Fukada,S. et al. :
Molecular regulation of Quiescent Satellite Cells Revealed by Gene Expression Profiling. *Frontiers in Myogenesis*.2006.4, (Pine Mountain, GA, USA)

<国内>

1. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する治療法開発東北大学医学部神経内科セミナー，仙台市，1.31, 2007
2. 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研究の進展
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会，東京，2.21, 2007
3. 武田伸一：
筋ジストロフィー治療の新戦略-筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療
第 47 回日本神経学会総会，東京，5.12, 2006
4. 鈴木直輝，武田伸一：
マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO を介した筋萎縮の分子機構の解析
第 47 回日本神経学会総会，東京，5.11, 2006
5. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療
第 27 回日本炎症・再生医学会，東京，7.11, 2006
6. 鈴木直輝，本橋紀夫，上住聡芳，深田宗一郎，鈴木友子，吉村哲彦，糸山泰人，青木正志，武田伸一：
マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO を介した筋萎縮の分子機構の解析
第 27 回日本炎症・再生医学会，東京，7.11, 2006
7. Oshima S, Nishiyama A, Yuasa K, Nakamura A, Yoshimura M, Miyagoe-Suzuki Y, Nakai H, Takeda S: A Recombinant AAV-mediated gene transfer into canine skeletal muscle 第 12 回日本遺伝子治療学会，東京，8.25, 2006
8. Nishiyama A, Beryl A.N, Yuasa K, Nakai H, Takeda S:
Efficacy of adeno-associated virus serotype 8 in α -sarcoglycan deficient mice
第 12 回日本遺伝子治療学会，東京，8.25, 2006
9. 武田伸一：
ジストロフィン欠損を巡る新たな分子病態
第 36 回小児神経学セミナー，神奈川，10.9, 2006
10. 武田伸一：
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療
日本人類遺伝学会第 51 回大会，米子市，10.18, 2006
11. 武田伸一：
筋ジストロフィーの臨床遺伝学
第 3 回遺伝医療倫理討論ピアカウンセラー養成講座，福岡市，10.28-29, 2006
12. 武田伸一：
筋ジストロフィーの治療法開発の現状
藤田保健衛生大学第 4 回 21 世紀 COE 国際ワークショップ，名古屋市，12.5, 2006
13. 谷端淳，鈴木直輝，鈴木友子，武田伸一：
内在性ユートロフィンの発現調節機構の解明
日本分子生物学会 2006 フォーラム，名古屋市，12.6, 2006
- 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. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター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 ベクターの血清型である 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. 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)ベクターへ組み込んだ recombinant AAV2-micro-dystrophin がジストロフィン欠損マウス(*mdx* マウス)の筋変性を抑制することを示した。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。

第一に、最近見出された新たな血清型の AAV ベクターを用いることとした。AAV2 ベクター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筋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。そこで、我々は AAV 血清 8 型(AAV8)ベクターを用いたジストロフィン欠損の骨格筋(*mdx* マウス、筋ジストロフィー犬)に対する遺伝子導入を行う。

第二に、これまでの局所的な導入に加えて、AAV8 ベクターを用いることにより始めて可能になった血管からの全身投与、limb perfusion による導入、さらに皮下注射による導入を試み、それぞれによる導入効果の検討を行う。

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、筋ジス犬における AAV ベクター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する。

B. 研究方法

1. AAV 血清 8 型ベクターの組換え
導入遺伝子として LacZ 遺伝子、

micro-dystrophin 遺伝子 ϵ -Sarcoglycan(SG)遺伝子を選択し、CMV プロモータの下流に組み込んで AAV8 のウィルス粒子を作製した。lacZ 遺伝子及びマイクロ・ジストロフィン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターについては、それぞれ正常骨格筋あるいは筋ジストロフィー骨格筋 (*mdx* マウスあるいは筋ジストロフィー犬) への導入を行い、 ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターについては、 α -SG 欠損マウス骨格筋への導入を行った。

2. AAV ベクターを用いた limb perfusion method

正常ビーグル(8 週齢、3.25 kg)及び筋ジストロフィー犬 (*cxmdj*) (8 週齢、3.6 kg)に対し、外側伏在静脈あるいは橈側皮静脈から rAAV8-CMV-LacZ(1×10^{14} vg/kg), rAAV8-CMV-M3 (1×10^{14} /kg) を投与した。イソフルランによる深麻酔、挿管、呼吸管理下に右後肢大腿部に血圧計のカフを装着する。右外側伏在静脈に 24G カニューレを挿入する。カフを膨らませた後(> 300 mmHg), 塩酸パパペリン(0.44 mg/kg), ヘパリン(15.8 U/kg)を含む生理食塩水を注入する。5 分後に rAAV8-CMV-LacZ を PHD 2000 syringe pump を用いて注入する(0.6 ml/sec)。注入 2 分後にカフ圧を下げる。同様の手技を右橈側皮静脈に対しても続けて行った。

3. AAV ベクターを用いた全身投与

4 週齢ないし 8 週齢の *mdx* マウスに対し、尾静脈からの静注あるいは背部からの皮下注により、血清 8 型の AAV ベクターである rAAV8-CMV- Δ CS2 を 5.0×10^{10} ~ 10^{12} vg 投与した。

4. 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 回りリピート構造 / 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 AAV ベクターを作製した。

C. 研究成果

1. 8 型 AAV ベクターの導入結果

ϵ -SG 遺伝子を組み込んだ 8 型 AAV ベクターを 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 AAV ベクターの導入では、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 AAV ベクターのイヌ骨格筋に対する導入では 2 型 AAV ベクターを用いた場合と比較して、 β -gal の発現が高く、しかも少なくとも導入初期には細胞浸潤が少ない傾向にあった。また、マイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入では、これまで 2 型の AAV ベクターを用いた導入では遺伝子発現が認められなかったのに対し、8 型 AAV ベクターを用いて始めて遺伝子発現を観察することができた。

2. 8 型 AAV ベクターを用いた limb perfusion

正常ビーグル犬骨格筋に対する rAAV8-CMV-LacZ の導入では、2 週間後に採取した右前脛骨筋(TA), 長趾伸筋(EDL)において広範囲で強い β -gal の発現を認めた。

一方、筋ジス犬 (*cxmdj*) に対する rAAV8-CMV-M3 の導入では、2 週間後に採取した右橈側手根伸筋 (ECR) において micro-dystrophin(M3)の発現を認めた。4 週後の発現については現在検討中である。

3. 8 型 AAV ベクターを用いた *mdx* マウスに対する全身導入

5×10^{12} vg の経静脈性投与により骨格筋 (大

腿四頭筋>下腿)にもまして心筋で、極めて高い効率で導入遺伝子の発現が観察された。一方、 5×10^{12} vg の皮下注では、注入部位に比較的近接した近位筋での発現が認められ、遠位筋のそれを上回っていたが、大変驚いたことには心筋でも極めて高い効率での発現が認められた。

4. 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ベクターを作製した。これらのAAVベクターをマウス及びイヌ・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

AAVベクター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
我々は小型のジストロフィン欠損・マウスモデルでは2型AAVベクター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ベクターを用いると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。実際にlimb perfusion method、静脈からの投与が有効であるばかりではなく、皮下注によっても多くの骨格筋における発現が観察された。特筆すべきは、これらの導入に従って骨格筋と並んで心臓における発現が確認されたことである。

さらに注目されることは、8型AAVベクターをイヌ骨格筋に導入した場合でも、免疫応答が

2型AAVベクター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。

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. AAVベクターを用いた導入について、8型のAAVベクター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. 8型のAAVベクターを用いると経静脈性のみならず、皮下注によっても広い範囲の骨格筋と心筋における発現が可能であった。筋ジストロフィー犬の場合にも、limb perfusionにより比較的広い範囲での骨格筋における発現を実現した。

3. 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を組み込んだAAVベクターを作製した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy
Future Neurology, Jan 2007, Vol.2(1), 87-96
2. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT,

- Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I:
Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo.
J Cell Biol. 2007 Jan 29;176(3):329-41.
3. Uezumi A, Ojima K, 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
4. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Kosaka 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 Miner Res. 2006 May; 21(5):722-34.
5. Yokota T, Lu QL, Morgan JE, Davies KE, Fisher R, Takeda S, Partridge TA:
Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration.
J Cell Sci. 2006 Jul 1; 119(Pt 13): 2679-87.
6. Shiga K, Yoshioka H, Matsumiya T, Kimura I, Takeda S, Imamura M:
zeta-Sarcoglycan is a functional homologue of gamma-sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex.
Exp Cell Res. 2006 Jul 1;312(11):2083-92.
Epub 2006 Apr 25.
7. Pramono ZA, Lai PS, Tan CL, Takeda S, Yee WC:
Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1.
Hum Genet. 2006 Oct;120(3):410-9.
8. Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, Nakamura A, Wada M, Nakura M, Shimatsu Y, Tomohiro M, Takahashi A, Machida N, Wakao Y, Takeda S:
Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies
BMC Cardiovasc Disord. 2006 Dec 4;6:47.
- <和文>
1. 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
2. 横田俊文、武田伸一 :
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の試み。
医学のあゆみ 216(10) : 743-747, 2006
3. 上住聡芳、鈴木直輝、武田伸一 :
筋疾患の病態と診断, 治療戦略の最前線
筋ジストロフィーの再生医療。
小児科診療・第69巻・4号 : 570-574, 2006
4. 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。
CURRENT INSIGHTS IN Neurological Science VOL.14 No.1: 8-9, 2006
- II. 学会発表
<国外>
1. Takeda S :

- The canine muscular dystrophy testing facility, Wellstone High Throughput Screening (HTS) Workshop
Children's National Medical Center (CNMC), Washington D.C., April 18, 2006
2. Takeda S :
Muscle stem cells and muscle regeneration
Seminar in Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, Washington D.C., April 19, 2006
 3. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Takeda S:
Dislocated neuronal nitric oxide synthase controls myofiber size during tail suspension.
Vth Asian and Oceanian Myology Center Meeting in Cebu, Philippines, May 25-27, 2006
 4. Ikemoto M, Fukada S, Uezumi A, Masuda S, Ampong BN, Miyoshi H, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S :
Transplantation of SM/c-2.6+ satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice.
American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006
 5. S. Takeda :
Gene therapy in canine muscular dystrophy
Symposium, XIth International Congress on Neuromuscular Diseases
Istanbul, Turkey, July 3, 2006
 6. Nishikawa M, Hirata K, Machida K, Takahashi Y, Yuasa K, Takeda S, Takakura Y:
Increased transgene expression of dystrophin in mdx muscle by RNAi-mediated silencing of calpain expression
American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006
 7. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Takeda S :
Dislocated neuronal nitric oxide synthase results in muscle atrophy during tail suspension
XIth International Congress of the World Muscle Society, Bruges, Belgium, October 4-7, 2006
 8. Yokota T, Qi Lu, Partridge T, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E:
Antisense morpholino injection restores extensive dystrophin expression to potentially therapeutic levels in canine muscular dystrophy in vivo
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
 9. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Nakamura A, Miyagoe-Suzuki Y, Nakai H, Takeda S:
A recombinant serotype 8 AAV-mediated gene transfer into canine skeletal muscle
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
 10. Nishiyama A, Ampong B, Kinoshita K, Nakai H, Takeda S:
Efficacy of adeno-associated virus serotype 8 in gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan deficient mice
XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006

11. Takeda S:
The NCNP dog facility
Wicker Project Workshop: Exon skipping in
Muscular Dystrophy Workshop, Washington
D.C., Jan 7-8, 2007
12. Takeda S:
An adeno-associated virus-mediated gene
transfer into canine X-linked muscular
dystrophy in Japan (CXMD_J)
AFM Workshop, Evry, France, Jan 15-17,
2007
- Nakamura A, Yoshimura M, Miyagoe-Suzuki
Y, Nakai H, Takeda S:
A Recombinant AAV-mediated gene transfer
into canine skeletal muscle
第 12 回日本遺伝子治療学会, 東京, 8.25,
2006
6. Nishiyama A, Beryl A.N, Yuasa K, Nakai
H, Takeda S:
Efficacy of adeno-associated virus serotype 8
in α -sarcoglycan deficient mice
第 12 回日本遺伝子治療学会, 東京, 8.25,
2006

<国内>

1. 武田伸一:
筋ジストロフィー治療の新戦略-筋ジ
ストロフィーに対する幹細胞移植治療
第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.12,
2006
2. 鈴木直輝, 武田伸一:
マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO
を介した筋萎縮の分子機構の解析
第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11,
2006
3. 武田伸一:
筋ジストロフィーに対する幹細胞移植
治療
第 27 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.11,
2006
4. 鈴木直輝, 本橋紀夫, 上住聡芳, 深田宗一
朗, 鈴木友子, 吉村哲彦, 糸山泰人, 青木
正志, 武田伸一:
マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO
を介した筋萎縮の分子機構の解析
第 27 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.11,
2006
5. Oshima S, Nishiyama A, Yuasa K,
Nishiyama A, Yoshimura M, Miyagoe-Suzuki
Y, Nakai H, Takeda S:
A Recombinant AAV-mediated gene transfer
into canine skeletal muscle
第 12 回日本遺伝子治療学会, 東京, 8.25,
2006
7. 武田伸一:
ジストロフィン欠損を巡る新たな分子病
態
第 36 回小児神経学セミナー, 神奈川, 10.9,
2006
8. 武田伸一:
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療
日本人類遺伝学会第 51 回大会, 米子市,
10.18, 2006
9. 武田伸一:
筋ジストロフィーの臨床遺伝学
第 3 回遺伝医療倫理討論ピアカウンセラー
養成講座, 福岡県, 10.28-29, 2006
10. 武田伸一:
筋ジストロフィーの治療法開発の現状
藤田保健衛生大学第 4 回 21 世紀 COE 国際
ワークショップ, 名古屋市, 12.5, 2006
11. 谷端淳, 鈴木直輝, 鈴木友子, 武田伸一:
内在性ユートロフィンの発現調節機構の
解明
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古
屋市, 12.6, 2006

12. 武田伸一：

筋ジストロフィーに対する治療法開発
東北大学医学部神経内科セミナー，仙台市，
1.31, 2007

13. 武田伸一：

AVV 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研究の進展
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果
発表会，東京，2.21, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし