

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)

A A V 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 合 研 究 報 告 書

(平成16年度～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．総合研究報告

AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の pre-clinical study － 筋ジス犬骨格筋で認められた免疫応答の克服 －	----- 1
武 田 伸 一	

II．研究成果の刊行に関する一覧表	----- 28
-------------------	----------

III．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）

総合研究報告書

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、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いたマイクロ・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。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 型ベクターを用いて遺伝子導入を行ったところ、マウス・モデルに対する筋注では、導入筋を超えた広い範囲での遺伝子発現が観察された他、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。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。
4. 霊長類を用いて、AAV ベクターの有効性と安全性をさらに詳細に検討した。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でカニクイザル骨格筋へ導入し、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、安全性を検討した。
5. 重症の筋ジストロフィーモデルであるジストロフィン・ユートロフィン二重欠損マウスについて系統維持に成功した。二重欠損マウスは、骨格筋には変性が強いが、生後 20 週までは明らかな心筋障害は認められなかった。
6. エメリン KO マウスは、心伝導障害と心筋細胞の核膜の空胞化などの変性所見を認めた。
7. 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。
8. 骨格筋の再生における細胞性・分子性メカニズムを明らかにするために、筋衛星細胞の増殖・分化時に発現増強する遺伝子群の同定と、筋再生時に浸潤するマクロファージが発現増強する遺伝子群の同定を試みた。

A. 研究目的

1. AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発

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。

さらに、AAV ベクターとマイクロ・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 AAV ベクター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、カンクイザル骨格筋へ AAV ベクターを用いて LacZ 遺伝子又はマイクロ・ジストロフィン遺伝子を導入し、骨格筋組織と血清を経時的に解析することにより、導入遺伝子の発現効率、導入遺伝子産物に対する免疫応答を検索し、AAV ベクターが DMD 治療に応用できるか検討することにした。

2. 新たな筋疾患モデルマウス

mdx マウスはジストロフィンが欠損していて、病因はデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同じである。しかし臨床的には筋力低下がほとんどみられないことが、遺伝子治療などの治療実験を行う妨げとなっていた。この *mdx* マウスにさらに *utrophin* をノックアウト(KO)したマウスが Davies らにより作成され、それは進行性の筋力低下をみる。心筋に障害があるかどうか、問題として残された。さらに、エメリンは核膜蛋白で、その欠損は心伝導障害を主症状とする Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを起こす。エメリン遺伝子を KO したマウスの作成に成功したので、両モデルマウ

スでの心筋障害について検討した。

一方、筋疾患の中で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, 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。

その内、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

骨格筋が再生する際、筋肉内に種々の炎症性細胞の浸潤が認められる。本研究では、炎症性細胞のなかでも、マクロファージの筋再生に及ぼす影響について検討し、その役割を明らかにすることにより筋再生の効率上昇のための新しい手法を確立することを目的とする。

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. マウス及びイヌに対する AAV ベクターの導入

1) 血清 2 型 AAV ベクターの導入

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

2) 免疫抑制剤の併用療法の開発

AAV ベクターの導入 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た。更に cyclosporine に myco- phenolate 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。

3) 血清 8 型 AAV 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。

4) 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。

5) 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。

6) 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 またはウェ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

1) ジストロフィン—ユートロフィン欠損マウス

mdx マウスで *utrophin* 遺伝子が KO されたもの 10 匹, *mdx* マウスで *utrophin* があるもの(通常の *mdx* マウス)*mdx/utro* $-/+10$ 匹を対象とした。すべてのマウスは生後 14-20 週齢のものであった。実験に使用した全てのマウスは実験動物中央研究所の日置研究員らから供与された。

2) エメリン欠損マウス

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

1) 2) のモデルマウス共に体重測定, 筋力測定(金網保持時間, 水中遊泳時間など), 血清 CK 値の測定を行った。骨格筋はひらめ筋(赤筋), 前脛骨筋, 長指伸筋(白筋)に組織学的, 組織化学的染色を行った。

心筋は通常の組織化学的染色のほか、電子顕微鏡的に検討した。

3) hmutGNETg-GNE $-/-$ マウス

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) hmutGNETg-GNE $-/-$ 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、コンゴアレッド (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。

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。

6) 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 $\alpha 2$ 鎖

(LAMA2)欠損マウス(dy^{3k})、ドナーは GFP-tg マウスを用いた。

7) 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. マウス及びイヌに対する AAV ベクターの導入

1) 血清 2 型 AAV ベクターの導入

ubiquitous な発現パターンを示す CMV プロモータ下で LacZ 遺伝子を発現する AAV2-CMV LacZ を用いたイヌ正常骨格筋への導入では、2 日齢から 2 歳齢に至るどの時期に導入した場合でも、導入遺伝子の発現は導入 2 週間後でのみ認められ、4 週、8 週間後ではほとんど検出されなかった。また、組織像については、導入 2 週間後で強い細胞浸潤が認められ、8 週間まで観察された。CMV プロモータ下で micro-dystrophin 遺伝子を発現する AAV2-CMVM3 を筋ジストロフィー犬の骨格筋へ導入した場合でも、同様の結果が得られた。一方、筋特異的な発現パターンを示す MCK プロモータを使用して LacZ 遺伝子 (AAV2-MCK LacZ) や micro-dystrophin 遺伝子 (AAV2-MCK Δ CS1) を導入した場合では、遺伝子発現は全く認められなかった。

2) 血清 2 型 AAV ベクターの in vitro 導入

マウス及びイヌ骨格筋から初代骨格筋培養細胞を樹立し、ヘルパーウイルスとしてのアデノウイルス存在・非存在下で AAV2-CMV LacZ の感染を行ったが、む

しろイヌ培養細胞ではマウスに比べて発現の効率は高い傾向が認められた。更に、AAV2-CMV LacZ のウイルス量を減少して投与したところ、導入 2 週間後では遺伝子発現は低かったものの細胞浸潤は認められなかった。しかし、4 週間後になると遺伝子発現は消失し、浸潤細胞が出現した。そこで、細胞浸潤の原因が AAV 粒子あるいは導入遺伝子産物のどちらに起因するものかを検討するために、導入遺伝子を発現しない promoter-less AAV ベクターを導入したところ、ほとんど細胞浸潤を生じなかった。

3) 免疫抑制剤の併用療法

AAV2-CMV LacZ を導入した骨格筋の浸潤細胞について詳細に組織学的に検討すると、CD4, CD8 陽性細胞が多数観察され、MHC class I と class II 分子の過剰発現も認められた。また、AAV ベクター導入後のイヌでは、導入遺伝子産物や AAV 粒子に対する血中 IgG 抗体価が上昇していた。

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、AAV ベクター導入 4 週間後には、 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。

4) 血清 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。

5) 血清 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(cxmd_j)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(EDC)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。

6) 血清 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。

7) 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. AAV ベクターを用いたサル骨格筋への遺伝子導入

1) 予備的な実験結果

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、カンクイザル(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 週間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 週間から 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 週間にはかなり広範に 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。

2) 至適投与量による実験結果

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变化を調べるために、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) マイクロ・ジストロフィンへの遺伝子導入

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 -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。

3. 新たな筋疾患モデルマウスの作成と解析

- 1) ジストロフィン、ユートロフィン
- 2 重欠損マウス

① 成長：通常の *mdx* マウス (-/+) では生後 14-20 週の体重は 22.0-28.0 (25.0g) あったのに, *utrophin KO mdx* (-/-マウス) では 15.3-18.0 (平均 16.4g) と優位に体重が軽かった。さらに脊柱の変形もみられた。20 週以降にはるいそうのため死亡するものが出現した。

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

③ 電子顕微鏡所見：*utrophin/mdx* -/-マウスでは, 電子顕微鏡的にも心筋に顕著な変化はみられなかった。

2) エンメリ欠損マウス

エメリン KO マウスではコントロールの B10 マウスと成長はなんら変わらず, 早期に死亡するものはなかった。

エメリン KO マウスでは, 金網よじ登り試験でも, 遊泳試験でもコントロールの B10 マウスと異常はなかった。

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

一方, エメリン欠損マウスでは生後 21 週目頃から心筋細胞の核膜の離開, 空胞化がみられるようになり, それは加齢とともに顕著となった。空胞は必ずしも核膜の離開によるとは限らず, 核膜に接する小胞体の空胞化もみられた。障害の強いマウスでは核の 1/10 は変化していた。

3) hmutGNETg-GNE-/-マウス

*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。

4. 筋再生の分子機構

1) 筋再生に対するマクロファージの関与

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

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

マクロファージが産生し、筋衛星細胞に働く生理活性分子を同定するためには、再生途中の骨格筋から浸潤しているマクロファージのみを単離精製し、それが発現している遺伝子を同定しなければならない。

そこで、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。

2) 筋再生のラミニン $\alpha 2$ 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 ベクターを用いた骨格筋への遺伝子導入

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

我々は小型の動物モデルでは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。更に、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、これらの導入において骨格筋と並び、あるいはそれを上回って、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と共に、2型 AAV ベクターでは抗原提示細胞となりうる樹状細胞にも AAV の感染を生ず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 AAV ベクター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 ベクターには、免疫反応を惹起しにくいものの、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、カニクイザルの導入に関しては、血清2型の AAV ベクターを用いたが、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マウス

mdx マウスでは筋線維にジストロフィンが欠損し、筋線維は壊死する。そのプロセスはデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同じであるが、*mdx* マウスでは再生が壊死を代償するために筋力低下がみられない。ジストロフィンを代償している *utrophin* 遺伝子を KO すると明らかに進行性の筋力低下をきたす。治療実験で、症状の改善の有無をみるのには最適な動物モデルである。このマウスを今年度から全国の実験者に供給できる体制を整えたことは大きな成果であった。

一方、筋ジストロフィーには心筋障害が合併する。Utrophin KO *mdx* *-/-* マウス

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

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

縁取り空胞型遠位型ミオパチー (DMRV) シアル酸生合成の律速段階酵素 UDP-GlcNAc2-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

筋再生時には、多数の炎症性細胞の浸潤が認められる。本研究では、炎症性細胞のうち特にマクロファージに着目し、その役割を調べた。マクロファージは炎症後期に浸潤が盛んになり、特にマクロファージ浸潤時期に一致して筋再生が始まる。そこでマクロファージ機能が低下したマウスを作出し、その筋組織を調べたところ著明な筋再生の遅延が観察され、筋再生にはマクロファージが不可欠の機能を果たしていることが明らかになった。このことは、マクロファージが産生する何らかの生理活性分子が筋衛星細胞の増殖・分化に働いていると考えられる。筋衛星細胞上に、マクロファージで発現上昇する遺伝子産物に対する受容体遺伝子が発現上昇しておれば、筋再生に働く分子の同定につながると考えられ、今後、筋再生の効率を上昇させる手法の開発に役立つものと考えている。

そこで、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。

一方、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。

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血清 2 型の AAV 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. エメリン KO マウスでは加齢とともに Emery-Dreifuss 型にみられる心伝導障害が認められるようになった。本症の心合併症の病態解明と治療法開発に役立つモデル動物として価値あると評価できる。

6. 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(-/-)* マウスの作成に成功した。このマウスでは生後 3 2 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、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、自己貪食空胞の形成を認めた。

7. 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。

8. 筋再生過程におけるマクロファージの役割を調べた。マクロファージの筋再生への役割を分子レベルで明らかにすることで、筋再生の効率を向上させる新しい方法が開発できることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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.
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.
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.
19. 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
20. 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, CXMD_J. *Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 32. Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240kb deletion in Xq28 without male hypogonadism.
Neuromuscul Disord, 2005; 15: 245-252
 33. 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.
 34. 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.

35. 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.
36. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:
 ϵ -Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy.
Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Equb ahead of print]
37. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL: Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8.
J Cell Biol, 168(4): 655-66, 2005
38. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine.
J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004
39. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of *mdx* myofibers improved the *mdx* phenotype.
Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004
40. Hara H, Monsonego A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T: Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease.
J Alzheimers Dis, 6(5):483-8, 2004
41. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration
Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
42. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M:
Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice.
Hum Mol Genet, 2004, 13(16): 1775-1784.
43. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:
Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system.
Mol Brain Res, 125(1-2): 1-12, 2004
44. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:
alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.
J Biol Chem, 279(15): 15091-5, 2004
45. Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I:
Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240kb deletion in Xq28 without male hypogonadism.
Neuromuscul Disord, 2005; 15: 245-252

46. Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2005; 5: 61-65
47. Ikezoe K, Nakagawa M, Osoegawa M, Kira JI, Nonaka I: Ultrastructural detection of DNA fragmentation in myonuclei of fatal reducing body myopathy. *Acta Neuropathol*, 2004; 107: 439-442
48. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K, Takeda S: Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, 2004; 18: 522-524
49. Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto YI, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem*, 2004; 279: 11402-11407
50. Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Two novel CAV3 gene mutations in Japanese families. *Neuromuscul Disord*, 2004; 14: 810-814
51. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, Shimakawa S, Hagiwara T, Ouvrier R, Sparrow JC, Nishino I, North KN, Nonaka I: Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol*, 2004; 56: 689-94
52. Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology*, 2004; 62: 2209-2213
53. Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology*, 2004; 62: 1009-1011
54. Kawano F, Ishihara A, Stevens JL, Wang XD, Ohshima S, Horisaka M, Maeda Y, Nonaka I, Ohira Y: Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004; 287: R76-86
55. Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I: Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman. *Neuromuscul Disord*, 2004 15: 262-264
56. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Hayashi YK, Minami N, Nishino I, Nonaka I, Takahashi T, Sawa H, Aoki M, Nagashima K: Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology*, 2004; 24: 341-346
57. Nakae Y, Stoward PJ, Kashiwayama T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, Nonaka I: Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and *mdx* mice. *J Mol Histol*, 2004; 35: 489-499