

厚生労働科学研究費補助金

(こころの健康科学研究事業)

骨髄間質由来筋前駆細胞と筋ジストロフィー犬を
用いた筋ジストロフィーに対する
細胞移植治療法の開発

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

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	
骨髄間質由来筋前駆細胞と筋ジストロフィー犬を用いた筋ジストロフィーに対する 細胞移植治療法の開発	----- 1
武 田 伸 一	
II. 分担研究報告	
1. 骨髄間質細胞の移植と筋ジストロフィー犬評価系の確立	----- 16
武 田 伸 一	
2. レンチウイルスベクターを用いた筋前駆細胞に対する ex vivo 遺伝子導入に関する研究	----- 23
鈴 木 友 子	
3. 筋ジストロフィー犬 (CXMD _J) の心筋障害の検討	----- 26
中 村 昭 則	
4. 新生児筋ジス犬の生存率改善への試み：帝王切開の効果	----- 28
島 津 美 樹	
5. 骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導	----- 30
出 澤 真 理	
6. 骨髄間質細胞から誘導した筋細胞の移植法の確立	----- 35
鍋 島 陽 一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39

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

骨髄間質由来筋前駆細胞と筋ジストロフィー犬を用いた筋ジストロフィーに
対する細胞移植治療法の開発

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
	中村 昭則	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
	島津 美樹	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
	出澤 真理	京都大学大学院医学研究科 助教授
	鍋島 陽一	京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

1. 骨髄間葉系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望できることから、再生医療の細胞ソースとして最適である。出澤らが開発したヒト骨髄間葉系細胞から骨格筋細胞を特異的に効率よく誘導する方法を用いてイヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導を試みた。
2. 筋ジス犬は出生時に血清 CK 値が非常に高く、生後 2 週間以内の死亡率が約 3 割以上に達する。この原因として胎児への分娩のストレスが考えられることから、予定的帝王切開を行なったところ、血清 CK 値は帝王切開により正常犬、保因犬で有意に低下していたが、筋ジス犬では低下していなかった。一方、死亡率は帝王切開によりいずれの犬でも低下していた。新生児筋ジス犬の呼吸筋の障害には、分娩時のストレスに加えて遺伝的要因や胎内環境が影響している可能性が考えられた。
3. ビーグル種を遺伝的背景にもつ筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) の心筋障害について検討した結果、CXMD_J はゴールデン・レトリバー種を背景にする GRMD に比べ心筋障害の進行が遅く、軽症であった。また、CXMD_J では、心電図の異常 Q 波が左室後壁の線維化に先行して出現することを明らかにした。
4. 骨髄間質細胞を用いた移植研究を推進する上では、治療用モデルとしての筋ジス犬の評価系を確立することが重要である。今回は MRI を用いた骨格筋障害の評価を試み、CHES-Gd-T1WI が有用であることを示すことができた。
5. DMD の動物モデルである *mdx* マウスから筋衛星細胞を FACS にて調整し、レンチウイルスベクターを用いて *ex vivo* でマイクロジストロフィンを導入し、*mdx* マウスへ移植する実験を行い、その有効性を確認した。更に、SP 細胞との共移植で移植効率が著しく改善することを明らかにした。

A. 研究目的

細胞移植治療は筋ジストロフィーなどの解決困難な筋変性疾患の治療法として期待されているが、骨格筋由来の ES 細胞や幹細胞は移植治療の候補として考えられているにもかかわらず、得られる細胞数が僅かであること、胎児から細胞を得ることが必要であること、あるいは細胞の安全性および倫理面など多くの問題が指摘されている。それらの細胞と比べて骨髄間質細胞は容易に採取できる骨髄液から培養可能であり、繁殖力が高く、移植治療に必要な細胞数の確保が容易である。また、患者本人の細胞を用いることが可能であるために免疫応答の問題も惹起されにくい。よって、これまで骨髄間質細胞は移植治療の候補として有力な細胞であると共に効率の良い分化誘導系の確立が期待されていたが、出澤らは骨髄間質細胞から効率よく骨格筋を誘導する方法を見出した。そこで、その方法を筋ジストロフィー犬に応用して将来的に DMD への応用を図ることを考えた。

Duchenne 型筋ジストロフィーモデル動物である筋ジス犬では、生後 2 週間以内の新生子期に死亡する個体が高頻度に認められた。死亡した筋ジス犬の剖検を行なうと、全頭で横隔膜や肋間筋に肉眼的に白色調に変性し、組織学的には高度の壊死/変性の所見が認められた。一方、他の骨格筋や心筋には明らかな異常はなかった。以上から、死亡原因として呼吸筋の変性に伴う呼吸不全が要因と考えられた。我々が以前に報告した筋ジス犬の血清 CK 値が出生直後に極めて高い値をとること併せて考えると、娩出時のストレスにより呼吸筋が傷害され、呼吸不全により死亡している可能性が考えられる。筋ジス研究に供する筋ジス犬の産出が少なければ、病態および治療研究に支障を来すため、娩出時ストレスの軽減化を目的に予定的帝王切開を導入して、自然分娩の成績と比較検討した。

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の心筋障害として、左室後壁から始まる心筋の

線維化や拡張型心筋症を呈する他、頻脈や突然死につながる心室性不整脈、深くて幅の狭い異常 Q 波、胸部第一誘導の R 波の増高、PQ 間隔の短縮などの心電図異常が知られている。これらの所見はゴールデンレトリバー種の筋ジス犬 (GRMD) でも見出されている。そこで、ビーグル種の筋ジス犬 (CXMD_J) の心筋障害について検討した。

更に、CXMD_J について治療モデルとしての評価系を確立するために MRI を撮像し、時空間的な骨格筋障害の検討を行なった。

また、筋ジストロフィー患者から筋前駆細胞を調製し、ジストロフィン遺伝子を導入して患者自身に移植する autologous cell transplantation の確立するために、レンチウイルスベクターを用いた ex vivo の遺伝子導入法の確立と安全性の検討を行った。

B. 研究方法

1. 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導

骨髄間葉系細胞を特定の密度で経代培養した後、サイトカイン投与 (bFGF (10ng/ml), forskolin (FSK) (5 μM), neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml) を含んだ培地 (10% FBS, alpha-MEM)) を行い、その後に Notch 細胞質ドメイン (Notch intracellular domain; NICD) plasmid 導入を lipofection 用いて行い、G418 にて選択する。その後、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 RT-PCR などで解析するとともに、cardiotoxin で変性させたラットの前脛骨筋にラット骨髄間質細胞から誘導した骨格筋細胞を GFP-レトロウイルスで標識した後移植し、細胞の生着と生体内での分化を調べた。

2. イヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導

約 4 ヶ月齢の正常ビーグル犬を用いて実験を行った。骨髄採取前にチオペンタールナトリウム (7.5 mg/kg) の静脈投与にて麻酔導入

後イソフルランの吸入にて維持麻酔を行った。

犬から骨髓を採取する前にあらかじめ細胞保存液(RPMI1640 Medium 100ml: Gibco 11875-093+ヘパリンナトリウム 2000 単位: 持田製薬ノボヘパリン注 1000)をシリンジに 0.5 ml、採取した骨髓細胞を入れる容器にも 0.5 ml 入れておき、骨髓細胞を骨髓穿刺針を用いて 8 ml 採取し、上記の細胞に入れる。さらに ACD-A 液 (テルモ: 生物学的製剤規準血液保存液 A、主成分はクエン酸ナトリウム) 1 ml を混和し、4°C で保存して京大に輸送した。

骨髓間質細胞はラット、ヒトの骨髓穿刺液から樹立した接着性細胞を用いた。

3. 筋ジス犬の繁殖と維持

2002 年 7 月から 2007 年 1 月までに行なわれた 29 分娩の中で、自然分娩中に帝王切開に切り替えた 3 分娩および多数の胎内死亡を認めた 1 分娩を除いた計 25 分娩(自然分娩 20 回、帝王切開 5 回)について、正常犬(自然分娩 71 頭、帝王切開 10 頭)、保因犬(自然分娩 35 頭、帝王切開 3 頭)および筋ジス犬(自然分娩 37 頭、帝王切開 9 頭)を対象とした。出生時血清 CK 値および生後 2 週齢までの死亡率を自然分娩と帝王切開で比較した。統計処理は、F 検定を行なったあと、Welch's t-test を用いて有意差検定を行なった。p<0.05 を有意差ありとした。

4. 筋ジス犬の病態

対象は第 3 世代の同腹犬 3 頭(内訳は正常犬 1 頭および CXMD_J 2 頭)を用いて、2、3、4、6、9、12、15 および 21 ヶ月齢時に心電図と心エコー検査を施行した。21 ヶ月齢時に全頭に安楽殺を行なった後に心筋病理についても検討した。さらに、その他に正常犬 3 頭、CXMD_J 6 頭についても心電図、心エコー検査および病理学的検討を行なった。

5. 治療モデルとしての筋ジス犬評価系の確立

a) トレッドミル

筋ジス犬の走行能力を検定するためにトレッドミルを使用した。一方、平地走行テストとして 15m 走を選択し、走行に要する秒数を測定すると共にビデオで記録した。

b) MRI

治療評価のために、MRI (3.0T/Siemens 社製 Trio) を使用した骨格筋の画像解析を行った。対象は正常ビーグル犬 2 頭 (6 および 14 ヶ月齢) および CXMD_J (2、4、8 ヶ月齢および 6 歳齢) とした。撮像前にチオペンタールナトリウムの静脈投与にて麻酔導入後イソフルランの吸入にて維持麻酔と呼吸管理を行った。MRI は超伝導磁石型 3.0 Tesla MRI 装置 (MAGNETOM Trio、Siemens-Asahi Medical Technologies, Japan) を用い、送受信型膝コイルを使用して大腿、下腿について撮像した。撮像法は、T1 強調画像 (T1WI)、T2 強調画像 (T2WI)、選択的脂肪抑制 T1 強調画像 (CHESS-T1WI)、Gd-DTPA (0.2 ml/kg) を用いた造影 T1 強調画像 (Gd-T1WI) および選択的脂肪抑制造影 T1 強調画像 (CHESS-Gd-T1WI) を用いた。CHESS-Gd-T1WI は、通常の T1WI では脂肪を高信号として捉えるために、まずプリサチュレーションを印可することで脂肪の信号を抑制し、造影剤によりジストロフィー変化領域の信号を増強させて差別化を計ることが可能な方法である。

6. レンチウイルスベクターを用いた幹細胞移植

細胞の調整: GFP トランスジェニックマウス及び mdx マウスの骨格筋をコラゲナーゼで消化し、単核細胞を調整し、筋衛星細胞特異的抗体である SM/C-2.6 を用いて FACS で筋衛星細胞を分離した。CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞は単核細胞を調整後、ヘキスト 33342 で染色して、ヘキストで染色されない細胞分画の中から、さらに CD31 陰性 CD45 陰性サブセットを FACS でソーティングした。

レンチウイルスの調整と感染: マイクロジス

トロフィンを発現するレンチウイルスベクタープラスミドと各種ヘルパープラスミドを293T細胞に導入し高タイトーのウイルス粒子を調整した。in vitro で、mdx マウスからFACS を用いて調整した筋衛星細胞へ感染させた

細胞移植と解析：mdx マウス前頸骨筋にシリンジを用いて筋衛星細胞を直接移植した。め免疫抑制は行っていない。移植後筋の凍結切片をジストロフィン抗体あるいは GFP 抗体で染色することで移植効率を評価した。

(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。

C. 研究成果

1. 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導

出澤らは骨髄間質細胞に NICD を導入・選択し、その後サイトカインを投与することによって神経細胞が誘導されることを報告した (Dezawa et al., J. Clin. Invest, 2004)。しかし、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ことを見出した。サイトカイン刺激を行うと、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。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。

ラットの骨髄間質細胞から誘導したこれら骨格筋細胞にレトロウイルスを用いてGFPで標識し、cardiotoxinで変性させたラット前脛骨筋に移植した。移植方法は、局所注入と尾静脈からの注入の2つの方法を用いた。その結果、移植細胞は成体の筋肉に生着し、2週目では中心核線維に、4週で辺縁核線維に分化していた。生着率は2週目で局所注入が42.4±8.5%、静脈投与が33.7±7.1%であった。またGFPで標識された細胞の中には筋細胞膜と基底膜の間、すなわち筋衛星細胞の位置に生着しているものがあつた。これらの細胞はPax7を発現していたので、筋衛星細胞として生着したものと思われた。そこで、一旦cardiotoxinで変性させたラット前脛骨筋にGFPで標識した細胞を移植し、4週後にバイオプシーでGFP陽性の細胞の生着と成熟を辺縁核線維の有無にて確認する。その直後、2度目のcardiotoxinを投与するが、このときには細胞移植を行わない。すると、2度目の変性の2週後でGFP陽性の細胞からの中心核線維が認められた。このことは、移植された細胞の一部（おそらく筋衛星細胞として生着したものが）、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と考えられる。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。

2. イヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導

正常犬から採取した骨髄間質細胞を、骨格筋細胞へ分化誘導を試みているところである。この事が可能となれば、正常犬の骨髄間質細胞から骨格筋に分化誘導した細胞を、筋ジストロフィー犬に移植する方法や、筋ジストロフィー犬から得られた骨髄細胞を骨格筋に分化誘導させた後にレトロウイルスを用いてジストロフィン遺伝子を導入し、同一の筋ジストロフィー犬に移植する方法を確立する事により、筋ジストロフィーの治療のための有力なツールになり得ると考えられる。

3. 筋ジス犬の繁殖と維持

a) 血清 CK 値

自然分娩および帝王切開における血清 CK 値 (U/l) (平均±標準誤差) はそれぞれ、正常犬: 2,612±280 および 1,195±112、保因犬: 7,110±1,925 および 1,945±279、筋ジス犬: 280,803±47,915 および 273,333±17,003 であった。正常犬 ($p<0.0001$), 保因犬 ($p=0.0118$) では両群間に統計学的有意差が認められたが、筋ジス犬では、有意差はなかった ($p=0.358$)。

b) 新生子死亡率

自然分娩および帝王切開における新生子死亡率はそれぞれ、正常犬: 7.4% および 0%, 保因犬: 2.9% および 0%, 筋ジス犬: 32.5% および 22.2% であり、いずれも減少していた。

4. 筋ジス犬の病態

a) 心電図の結果

心拍数および PQ 間隔は 15 ヶ月齢以降の CXMD_J 2 頭でそれぞれ増加および短縮していた。QRS 間隔は両者の間に差は見られなかった。6 ヶ月齢時の正常犬と CXMD_J の心電図では、CXMD_J の II、III および aVF 誘導で深く幅の狭い Q 波が観察された。そこで、II、III および aVF 誘導で Q/R 比を経時的に測定したところ、6 ヶ月齢以降の CXMD_J では正常犬に比べて一定して高値を示した。

b) 心エコー検査の結果

拡張期左室内腔径、左室後壁厚および心室中隔厚は、正常犬と CXMD_J の間に差はなかった。左心室の短縮率 (FS) は、CXMD_J 1 頭で月齢と共に低下していたが、21 ヶ月齢時の値は正常範囲内であった。異常 Q 波が出現していた 6 および 9 ヶ月齢の CXMD_J 2 頭にエコー輝度の異常は見られなかったが、12 ヶ月齢で左室後壁に線維化を示す高輝度病変が見られた。

c) 病理学的検討

CXMD_J 2 頭とも肉眼的には左心室内腔の拡張および心室壁の菲薄化は見られず、左右の心室壁内にも明らかな病変はみられなかった。

しかし、組織学的には左室後壁に局所的に線維化の所見が認められた。

d) 多数例の CXMD_J での心筋障害の検討

2-21 ヶ月齢の CXMD_J 8 頭で施行した心電図、心エコー、病理学的検討の結果、異常 Q 波の出現は心エコー上の高輝度病変や病理上の心筋の線維化の出現よりも先行していた。

5. 筋ジス犬評価系の確立

a) トレッドミドルと平地走行

トレッドミドルと 15m 平地走行テストを筋ジス犬に対して行い、並行して進めている antisense Morpholino を用いた治療法に応用して良い結果を得た。

b) 下腿部 MRI

下腿の T1WI と CHESS-Gd-T1WI では、CXMD_J の 4 ヶ月齢の T1 強調画像では変化は認められなかったが、8 ヶ月齢では前脛骨筋の一部に軽度の高信号領域が認められた。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋および浅趾屈筋領域で T1WI 高信号として捉えられたが、特に前脛骨筋は顕著であった。これらの T1 高信号域は選択的脂肪抑制で信号抑制されたことから脂肪浸潤と考えられた。T2WI では、4 ヶ月齢の CXMD_J で下腿全域に渡り高信号域が認められた。8 ヶ月齢では、4 ヶ月齢の CXMD_J と比べて、長趾伸筋で若干高信号化したのみで、顕著な信号変化は認められなかった。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋および浅趾屈筋の高信号域は減少していたものの、腓腹筋では依然として高信号域が認められた。4 ヶ月齢の CHESS-Gd-T1WI では下腿広範に高信号域が認められ、特に長趾伸筋や腓腹筋で顕著であり、8 ヶ月齢でも顕著な変化はなかった。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋および浅趾屈筋の高信号域は減少していたものの、腓腹筋では依然として高信号域を認めた。

c) 大腿部 MRI

T1WI では、CXMD_J の 2 ヶ月齢では変化は認められなかったが、4 ヶ月齢では、薄筋、半腱様筋および半膜様筋の一部に高信号領域を

認めた。同部位は CHESST1WI で信号が抑制されたことから、脂肪浸潤であると考えられた。8 ヶ月齢の T1WI では、大腿直筋を除く大腿筋全域でびまん性に高信号化し、8 ヶ月齢と 6 歳齢の CXMD₁ の結果から薄筋が最も強く脂肪変化が起こっていると考えられた。T2WI では、2 ヶ月齢ではすでに薄筋が淡く高信号になり、4 ヶ月齢では大腿筋で高信号域が認められたが、特に両側の薄筋では顕著であった。8 ヶ月齢ではなおも薄筋の高信号が持続しており、大腿直筋や外側広筋を除くその他の筋では 4 ヶ月齢よりも高信号域が増強した。しかし、6 歳齢では薄筋の高信号が高度であったものの、ジストロフィー変化と脂肪変化の領域を区別することができなかった。引き続き行なった CHESST-Gd-T1WI では、T1WI で高信号を示した領域が信号抑制されたことから、T2 高信号領域がジストロフィー変化ではなく、脂肪浸潤によるものであることが示唆された。

6. レンチウイルスベクターを併用した幹細胞移植

a) ジストロフィン遺伝子の発現ベクターの構築

我々の研究室で開発した短縮型マイクロジストロフィンをレンチウイルスベクターに組み込み、高タイターのウイルスベクターを調整できた。

b) *in vitro*での遺伝子導入 (*ex vivo*遺伝子導入)

レンチウイルスベクターを *in vitro* で筋衛星細胞へ感染させた。レポーター遺伝子(Venus)の発現で判断すると MOI100-200 程度で 99% 近くの筋衛星細胞に transduce 可能であった。この MOI 数では、細胞毒性はみられないか極軽度であった。

c) 移植実験

マイクロジストロフィンを発現するレンチウイルスベクターを感染させた後、*mdx* マウス骨格筋へ移植した細胞は、筋線維を形成し、その筋線維膜にはジストロフィンの発現が回復していた。レンチウイルスベクターを感染させたことによる筋衛星細胞の筋再生能力の低下は認められなかったが、再生線維はクラスターを形成し、移

植した筋衛星細胞が広く筋組織内を移動することはないと思われた。

d) 移植効率を上げる条件の検討

GFP トランスジェニックマウス由来の筋衛星細胞の単独移植および、CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞との供移植を、*mdx* 及び免疫不全マウス NOD/Scid に対して行い、移植効率を検討したところ、GFP 陽性筋線維の本数が SP 細胞とともに移植した場合、筋衛星細胞単独移植に比較して著明に増加した。SP 単独移植ではドナー由来の筋線維はわずかであった。

D. 考察

1. 骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導と移植

骨髄間質細胞から機能的な骨格筋細胞を効率よく誘導する方法を見出したが、この誘導システムがどのような分子機構に制御されているのかを解明することが必要である。一方、本研究では当初から中心にしている cytokine cocktail と Notch 遺伝子を用いる方法に加えて、骨髄間質細胞が間葉系細胞であることを考慮して、より一般的な誘導方法も行う必要があると考えている。また、この細胞を筋変性疾患の一つである筋ジストロフィーの治療法に用いる際には、マウス、ラットのモデルではなくよりヒトに近い高等ほ乳類の筋ジストロフィー犬を用いることが重要である。そのためには骨髄間質細胞を分化させた後にジストロフィン遺伝子を導入し、元の筋ジストロフィー犬に戻す方法や、正常犬から得た骨髄間質細胞由来の筋細胞を筋ジストロフィー犬に移植する際の免疫制御剤の使用方法を確定することが重要である。

骨髄間質細胞から機能的な骨格筋細胞を高い高率で誘導する方法が見いだされた。しかしながら、この誘導システムがどのような分子機構に基づくのかを解明する課題がある。さらにはヒトに近い高等哺乳類の筋変性モデルとして筋ジストロフィー犬を用いて、本システムの安全性と有効性の検討が必要と思われ、

現在犬の細胞の誘導に着手している。

2. 筋ジス犬の繁殖と維持

帝王切開により正常犬、保因犬で出生時の血清 CK 値は低下していたことから、帝王切開により呼吸筋へのストレスは低下したと考えられる。しかし、筋ジス犬では、血清 CK 値で低下していなかったことは、その他に遺伝的要因や胎内環境などの因子が関与していることを示唆している。しかし、死亡率については正常犬、保因犬にみならず筋ジス犬でも帝王切開により減少していた。DMD 胎児の臍帯血で CK 値が有意に高値であること、20 週の DMD 胎児の剖検や DMD 胎児に対する子宮内筋生検で筋変性が見られたことが報告されている。しかし、DMD では筋ジス犬で見られる新生子劇症型の報告はなく、ヒトとイヌでは胎内環境や種の違いなどの何らかの要因が関与しているものと思われ、今後明らかにして行きたいと考えている。

3. 筋ジス犬の病態

CXMD_J の心電図所見は、DMD や GRMD と同じく心拍数の増加や PQ 間隔の短縮、II、III、aFV 誘導で異常 Q 波が確認された。しかし、異常 Q 波が出現する 6 ヶ月齢では心エコー輝度異常は見られず、12 ヶ月齢ではじめて左室後壁に高輝度病変が認められた。また、6-7 ヶ月齢の CXMD_J 8 頭で異常 Q 波が認められたが、その内 7 頭は同齢でもエコー輝度異常はみられなかった。GRMD では、6-7 ヶ月齢の 73% に左室後壁の高輝度病変が認められ、病理学的検討でも 6.5 ヶ月齢より左室壁、左室乳頭筋に急性期病変が出現し、12 ヶ月齢で広汎な線維化が起こることが報告されている。しかし、2 頭の CXMD_J では 21 ヶ月齢でも肉眼的異常は見られず、左室後壁に局所的な線維化を認めたのみであった。以上から、心筋の線維化は GRMD に比べて CXMD_J が遅いと思われる。DMD や GRMD の異常 Q 波は左室後壁の線維化による心筋の起電力の

低下に起因するとされてきたが、異常 Q 波が左室後壁の線維化に先行して出現することを始めて明らかにした。CXMD_J は心筋障害は軽症であることからの発症早期について検討するのに適したモデル動物であると考えられる。

4. 筋ジス犬の臨床評価系

治療モデルとしての筋ジス犬の治療評価系に関しては、トレッドミル、平地走行テストを用いる方法を確立した。MRI による時空間的評価では、大腿は薄筋が最も早期に障害され、半腱様筋、半膜様筋、大腿二頭筋が続き、大腿直筋が最も遅かった。下腿では前脛骨筋の方が腓腹筋よりも障害進行が早いことが示唆された。しかしながら、DMD 患者の CT 値を基にした断面あたりの筋肉量および脂肪量を算出した報告では、大腿では大腿二頭筋や大腿直筋が早期に、薄筋は遅く障害され、下腿では腓腹筋が前脛骨筋よりも早期に障害されるとされており、これはヒトとイヌの間で、筋肉間で筋線維タイプの分布、筋線維の大きさ、収縮のタイプ、再生能力、糖代謝あるいは物理的負荷による影響などが異なっている可能性が考えられる。また、ジストロフィー変化が早期かつ高度に起こったとしても、脂肪浸潤への移行が早く起こるとは限らないことも示唆された。このことから、筋障害の評価では脂肪変化のみではなくジストロフィー変化も同時に捉える必要があり、この点でも CT に比べ MRI による評価の方が優れていると考えられる。

5. レンチウイルスベクターを併用した幹細胞移植

レンチウイルスベクターは効率よく筋衛星細胞に感染し、遺伝子を導入した。AAV に比較してレンチウイルスベクターは組み込める遺伝子が大きいので、今後はマイクロジストロフィン (4.9 kb) より機能的に勝っているミニジストロフィン (6.3 kb) を組み替えて、治

療用遺伝子とする。

今後は長期の細胞の生着と筋線維内でのジストロフィンの発現を検討する必要がある。また、細胞移植により緊張力の回復を測定し、機能的な改善が認められるかを検討する。

CD45-CD31-SP と筋衛星細胞の供移植は、筋衛星細胞による筋再生を促進した。今後はこの効果が、細胞の生着促進、細胞死の回避によるものか、細胞増殖の促進によるものか、あるいは分化の促進によるものかを検討する必要がある。また、生体から調整される SP の数には限りがあることから、その筋再生促進作用の機序を解明し、細胞の代わりに、サイトカイン等で SP の機能を代用できないか検討することが必要である。

E. 結論

1. 実用性の高い骨髄間質細胞から、骨格筋を効率よく誘導する方法を見出した。特に Pax7 陽性の筋衛星細胞様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。
2. 出澤らが開発したヒト骨髄間葉系細胞から骨格筋細胞を特異的に効率よく誘導する方法を用いて正常犬骨髄間質細胞から筋細胞の誘導を試みた。
3. 治療モデルとしての筋ジス犬の評価系を確立するために 3.0T MRI を用いた骨格筋障害の評価を行い、脂肪変化との鑑別が可能な CHES-Gd-T1WI が有用であるとの結果を得た。
4. 予定的帝王切開の導入により死亡率は正常犬、保因犬のみならず筋ジス犬新生子でも減少したが、血清CK値は筋ジス犬のみ低下していなかった。筋ジス犬では、分娩時のストレスが死亡率に関与していると考えられるが、呼吸筋の障害は遺伝的要因や胎内環境なども関与している可能性がある。
5. CXMD_J の心筋障害は GRMD の所見に合致していたものの、よりも軽度と考えられた。

また、心電図異常 Q 波が、左室後壁の線維化に先行して出現することをはじめて明らかにし、異常 Q 波の成因を考える上で重要な知見を得たと考えている。

6. DMD 患者本人の筋前駆細胞あるは幹細胞を細胞移植治療に用いる autologous transplantation は免疫抑制剤の長期投与を回避できる点で期待される治療法である。その実現のためには 1) 有効で安全な遺伝子導入法と、2) 移植した細胞が有効に筋再生に参加するような方法の確立が重要である。レンチウイルスベクターは現在のところ 1) の条件を十分満たしていると考えられるが、長期の発現を確認していく必要がある。2) に関しては、筋衛星細胞移植には現在効率の点で限界がある。以後は骨髄細胞由来筋芽細胞への導入を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

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.
 1. 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 309(5732): 314-317, 2005.
 2. Takeuchi R, Saito T, Ishikawa H, Takigami H, Dezawa M, Ide C, Itokazu Y, Ikeda M, Shiraishi T, Morishita S: Effects of vibration and hyaluronic acid on activation of three-dimensional cultured chondrocytes.
Arthritis Rheum. 54(6) :1897-1905 2006
 3. 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
 4. Yu S, Tanabe T, Dezawa M, Ishikawa H, Yoshimura N: Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model.
Biochem Biophys Res Commun. 16;344(4):1071-9. 2006.
 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(1):32-42, 2006.

6. 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.* 397: 174-179, 2006

【欧文総説】

1. Dezawa M.:
Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2764-2772, 2006.
2. Dezawa M, Hoshino M, Nabeshima Y, Ide C.:
Marrow stromal cells: implications in health and disease in the nervous system. *Current Molecular Medicine* (in press).
3. Dezawa M, Matsumoto N, Ohta M, Itokazu Y, Suzuki Y, Ide C.:
Cell transplantation for neurodegenerative and neurotraumatic disorders. *Current Trends in Neurology* (in press).
4. Dezawa M, Hoshino M, Ide C.:
Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. *Expert Opinion on Biological Therapy* (in press)

【欧文著書】

1. Dezawa M, So KF. Regeneration of optic nerve. *Encyclopedic Reference of*

Neuroscience. Eds. MD Binder, N Hirokawa, U Windhorst, Springer (in press)

2. Ide C, Dezawa M, Matsumoto N, Itokazu Y. Regeneration (synopsis). *Encyclopedic Reference of Neuroscience*. Eds. MD Binder, N Hirokawa, U Windhorst, Springer (in press).
3. Dezawa M. Schwann cell interactions with the axon and with CNS glial cells during optic nerve regeneration, in Leif Hertz (eds): Non-Neuronal Cells in the Nervous System: Function and Dysfunction. *Advances in Molecular Cell Biology*. Vol 31, p.329-345 Elsevier, 2004.

<和文>

【和文総説】

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

5. 出澤真理: 骨髄間質細胞からの神経細胞, 骨格筋細胞への選択的誘導と自己細胞システムを目指した開発。顕微鏡, 41: 200-203, 2006.
6. 出澤真理: 思わぬ発見をもたらした分化誘導システム: 骨髄間質細胞を用いた自己細胞移植治療への挑戦。BIO Clinica, 21: 81-87, 2006.
7. 出澤真理: 筋ジストロフィーの再生医療への展望 BRAIN and NERVE-神経研究の進歩 (in press)
8. 出澤真理: 胚葉をこえた多分化能と自己細胞移植治療への可能性 蛋白質核酸酵素 シリーズ「幹細胞技術の現状と展望」(in press).
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

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, 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
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
 13. Dezawa M.:
Bone marrow stromal cells for auto-cell transplantation therapy: applications for neuro- and muscle-degenerative diseases. The 5th Asia-Pacific Symposium on Neural Regeneration, Shanghai, China, 2006, December
 14. Dezawa M.:
A challenge to auto-cell transplantation therapy using bone marrow stromal cells. The ht4 Catholic International Stem Cell Symposium. Seoul, Korea, 2006, July
 15. Dezawa M.:
Specific induction of Schwann cells, neurons and skeletal muscle cells from bone marrow stromal cells and application for degenerative diseases. FASEB meeting, San Francisco USA, 2006, April
 16. 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

<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. 和田倫子，浦澤延幸，弓削田直子，中村昭則，武田伸一：
筋ジストロフィー犬を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの心筋障害の発症機序の解明
第 47 回日本神経学会総会，東京，5.12, 2006
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 北 秀樹，中村昭則，市川慎一，八幡由美子，弓削田直子，武田伸一：
筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) コロニーの確立：新生子劇症型に関する検討
第 40 回日本実験動物技術者協会総会

- 京都, 10.11, 2006
12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 出澤真理 :
自己細胞移植治療への挑戦 : 思わぬ発見
のもたらした分化誘導システム
日本分子生物学会 2006 フォーラム
(シンポジスト兼オーガナイザー, 名古
屋市, 12, 2006
 17. 出澤真理 :
骨髄間質細胞の分化誘導システムの確立
と神経・筋変性疾患への自己細胞移植治
療の挑戦
第 51 回日本人類遺伝学会, 米子, 10, 2006
 18. Dezawa M. A challenge to auto-cell
transplantation: based on specific induction
system of bone marrow stromal cells. 8th
International Congress of
Neuroimmunology, Nagoya, 2006, October
 19. 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への挑戦。第 9 回日
本組織工学会、京都、2006、9 月
 20. 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を目指して。第 2
7 回日本炎症再生医学会、東京、2006、
7 月
 21. 出澤真理 : 自己細胞移植治療への挑戦 : 思
わぬ発見のもたらした分化誘導システム
Cutting Edge Lecture 文部科学省特定領
域研究『幹細胞』東京、2006、5 月
 22. 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。
 23. 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.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
 1. 「骨格筋細胞の誘導方法」(出願番号 : 特
願 2004-372656) 発明代表者 : 出澤真
理 発明者 : 出澤真理、星野幹雄、鍋
島陽一、出願人 : 社団法人芝蘭会 出願
日 : 2004 年 12 月 24 日
 2. Method of
differentiating/inducing bone marrow
interstitial cells into nerve cells and skeleton
muscle cells by transferring Notch gene.
European Patent Office

Application No. / Patent No. 03703224.0
-2405-JP0301260. Date of filing. 10.09.04.
Applicant/Proprietor Sanbio, Inc. Inventor:
Mari Dezawa

3. A Method of differentiating /inducing bone marrow interstitial cells into nerve cells and skeleton muscle cells by transfecting Notch gene. 登録日 : Oct 26, 2006, 登録番号 : 2003207064 (オーストラリア, オセアニア) 発明者 Dezawa Mari 申請者: SanBio, Inc.

4. Method of inducing differentiation of skeletal muscle cell. International application number: PCT/JP2005/023598, 国際公開番号 : WO 2006/069225 A1, Principal Inventor: Mari Dezawa, Assignee: Kyoto Univesity, Date of Patent: June 29, 2006

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

骨髄間質細胞の移植と筋ジストロフィー犬評価系の確立

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. 骨髄間質細胞は容易に採取できる骨髄液から培養可能であり、高い増殖力を有するため、移植に必要な細胞数を確保することが可能である。出澤らが開発したヒト骨髄間葉系細胞から骨格筋細胞を特異的に効率よく誘導する方法を用いてイヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導を試みた。
2. 骨髄間質細胞を用いた移植研究を推進する上では、治療用モデルとしての筋ジストロフィー犬の評価系を確立することが重要である。今回は MRI を用いた骨格筋障害の評価を試み、CHESS-Gd-T1WI が有用であることを示すことができた。

A. 研究目的

細胞移植治療は筋ジストロフィーなどの解決困難な筋変性疾患の治療法として期待されているが、骨格筋由来の ES 細胞や幹細胞は移植治療の候補として考えられているにもかかわらず、得られる細胞数が僅かであること、胎児から細胞を得ることが必要であること、あるいは細胞の安全性および倫理面など多くの問題が指摘されている。それらの細胞と比べて骨髄間質細胞は容易に採取できる骨髄液から培養可能であり、繁殖力が高く、移植治療に必要な細胞数の確保が容易である。また、患者本人の細胞を用いることが可能であるために免疫応答の問題も惹起されにくい。よって、これまで骨髄間質細胞は移植治療の候補として有力な細胞であると共に効率の良い分化誘導系の確立が期待されていたが、出澤らは骨髄間質細胞から効率よく骨格筋を誘導する方法を見出した。そこで、その方法を筋ジストロフィー犬に応用して将来的に DMD への応用を図ることを考えた。

筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) は Duchenne 型筋ジストロフィーに類似した進行性で重症の病態を示す犬のモデル動物である。今年度は CXMD_J について治療モデルとしての評価

系を確立するために MRI を撮像し、時空間的な骨格筋障害の検討を行なった。

B. 研究方法

1. イヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導

約 4 ヶ月齢の正常ビーグル犬を用いて実験を行った。骨髄採取前にチオペンタールナトリウム (7.5 mg/kg) の静脈投与にて麻酔導入後イソフルランの吸入にて維持麻酔を行った。

犬から骨髄を採取する前にあらかじめ細胞保存液 (RPMI1640 Medium 100ml: Gibco 11875-093+ヘパリンナトリウム 2000 単位: 持田製薬ノボヘパリン注 1000) をシリンジに 0.5 ml、採取した骨髄細胞を入れる容器にも 0.5 ml 入れておき、骨髄細胞を骨髄穿刺針を用いて 8 ml 採取し、上記の細胞に入れる。さらに ACD-A 液 (テルモ: 生物学的製剤規準血液保存液 A、主成分はクエン酸ナトリウム) 1 ml を混和し、4℃で保存して京大に輸送した。

2. 治療モデルとしての筋ジストロフィー犬評価系の確立

a) トレッドミル

筋ジストロフィー犬の走行能力を検定するためにトレッドミルを使用した。一方、平地走行テストとして 15m 走を選択し、走行に要する秒数を測

定すると共にビデオで記録した。

b) MRI

治療評価のために、MRI (3.0T/Siemens 社製 Trio) を使用した骨格筋の画像解析を行った。対象は正常ビーグル犬 2 頭 (6 および 14 ヶ月齢) および CXMD_J (2、4、8 ヶ月齢および 6 歳齢) とした。撮像前にチオペンタールナトリウムの静脈投与にて麻酔導入後イソフルランの吸入にて維持麻酔と呼吸管理を行った。MRI は超伝導磁石型 3.0 Tesla MRI 装置 (MAGNETOM Trio、Siemens-Asahi Medical Technologies, Japan) を用い、送受信型膝コイルを使用して大腿、下腿について撮像した。撮像法は、T1 強調画像 (T1WI)、T2 強調画像 (T2WI)、選択的脂肪抑制 T1 強調画像 (CHESS-T1WI)、Gd-DTPA (0.2 ml/kg) を用いた造影 T1 強調画像 (Gd-T1WI) および選択的脂肪抑制造影 T1 強調画像 (CHESS-Gd-T1WI) を用いた。CHESS-Gd-T1WI は、通常の T1WI では脂肪を高信号として捉えるために、まずプリサチュレーションを印可することで脂肪の信号を抑制し、造影剤によりジストロフィー変化領域の信号を増強させて差別化を計ることが可能な方法である。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立精神・神経センター神経研究所中型動物実験倫理問題検討委員会の承認を受けて実施された。

C. 研究成果

1. イヌ骨髄間質細胞から筋細胞への誘導

正常犬から採取した骨髄間質細胞を、骨格筋細胞へ分化誘導を試みているところである。この事が可能となれば、正常犬の骨髄間質細胞から骨格筋に分化誘導した細胞を、筋ジストロフィー犬に移植する方法や、筋ジストロフィー犬から得られた骨髄細胞を骨格筋に分化誘導させた後にレトロウイルスを用いてジストロフィン遺伝子を導入し、同一の筋ジストロフィー犬に移植する方法を確立する事により、筋ジストロフィーの治療のための有力

なツールになり得ると考えられる。

2. 筋ジス犬評価系の確立

a) トレッドミドルと平地走行

トレッドミドルと 15m 平地走行テストを筋ジス犬に対して行い、並行して進めている antisense Morpholino を用いた治療法に応用して良い結果を得た。

b) 下腿部 MRI

下腿の T1WI と CHESS-Gd-T1WI では、CXMD_J の 4 ヶ月齢の T1 強調画像では変化は認められなかったが、8 ヶ月齢では前脛骨筋の一部に軽度の高信号領域が認められた。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋および浅趾屈筋領域で T1WI 高信号として捉えられたが、特に前脛骨筋は顕著であった。これらの T1 高信号域は選択的脂肪抑制で信号抑制されたことから脂肪浸潤と考えられた。T2WI では、4 ヶ月齢の CXMD_J で下腿全域に渡り高信号域が認められた。8 ヶ月齢では、4 ヶ月齢の CXMD_J と比べて、長趾伸筋で若干高信号化したのみで、顕著な信号変化は認められなかった。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋および浅趾屈筋の高信号域は減少していたものの、腓腹筋では依然として高信号域が認められた。4 ヶ月齢の CHESS-Gd-T1WI では下腿広範に高信号域が認められ、特に長趾伸筋や腓腹筋で顕著であり、8 ヶ月齢でも顕著な変化はなかった。6 歳齢では前脛骨筋、長趾伸筋および浅趾屈筋の高信号域は減少していたものの、腓腹筋では依然として高信号域を認めた。

c) 大腿部 MRI

T1WI では、CXMD_J の 2 ヶ月齢では変化は認められなかったが、4 ヶ月齢では、薄筋、半腱様筋および半膜様筋の一部に高信号領域を認めた。同部位は CHESS-T1WI で信号が抑制されたことから、脂肪浸潤であると考えられた。8 ヶ月齢の T1WI では、大腿直筋を除く大腿筋全域でびまん性に高信号化し、8 ヶ月齢と 6 歳齢の CXMD_J の結果から薄筋が最も強く脂肪変化が起こっていると考えられた。T2WI では、2 ヶ月齢ではすでに薄筋が淡く高

信号になり、4ヶ月齢では大腿筋で高信号域が認められたが、特に両側の薄筋では顕著であった。8ヶ月齢ではなおも薄筋の高信号が持続しており、大腿直筋や外側広筋を除くその他の筋では4ヶ月齢よりも高信号域が増強した。しかし、6歳齢では薄筋の高信号が高度であったものの、ジストロフィー変化と脂肪変化の領域を区別することができなかった。引き続き行なった CHES-Gd-T1WI では、T1WI で高信号を示した領域が信号抑制されたことから、T2 高信号領域がジストロフィー変化ではなく、脂肪浸潤によるものであることが示唆された。

D. 考察

骨髄間質細胞から機能的な骨格筋細胞を効率よく誘導する方法を見出したが、この誘導システムがどのような分子機構に制御されているのかを解明することが必要である。一方、本研究では当初から中心にしている cytokine cocktail と Notch 遺伝子を用いる方法に加えて、骨髄間質細胞が間葉系細胞であることを考慮して、より一般的な誘導方法も行う必要があると考えている。また、この細胞を筋変性疾患の一つである筋ジストロフィーの治療法に用いる際には、マウス、ラットのモデルではなくよりヒトに近い高等ほ乳類の筋ジストロフィー犬を用いることが重要である。そのためには骨髄間質細胞を分化させた後にジストロフィン遺伝子を導入し、元の筋ジストロフィー犬に戻す方法や、正常犬から得た骨髄間質細胞由来の筋細胞を筋ジストロフィー犬に移植する際の免疫制御剤の使用方法を確定することが重要である。

治療モデルとしての筋ジス犬の治療評価系に関しては、トレッドミドル、平地走行テストを用いる方法を確立した。MRI による時空間的評価では、大腿は薄筋が最も早期に障害され、半腱様筋、半膜様筋、大腿二頭筋が続き、大腿直筋が最も遅かった。下腿では前脛骨筋の方が腓腹筋よりも障害進行が早いこと

が示唆された。しかしながら、DMD 患者の CT 値を基にした断面あたりの筋肉量および脂肪量を算出した報告では、大腿では大腿二頭筋や大腿直筋が早期に、薄筋は遅く障害され、下腿では腓腹筋が前脛骨筋よりも早期に障害されるとされており、これはヒトとイヌの間で、筋肉間で筋線維タイプの分布、筋線維の大きさ、収縮のタイプ、再生能力、糖代謝あるいは物理的負荷による影響などが異なっている可能性が考えられる。また、ジストロフィー変化が早期かつ高度に起こったとしても、脂肪浸潤への移行が早く起こるとは限らないことも示唆された。このことから、筋障害の評価では脂肪変化のみではなくジストロフィー変化も同時に捉える必要があり、この点でも CT に比べ MRI による評価の方が優れていると考えられる。

E. 結論

1. 出澤らが開発したヒト骨髄間葉系細胞から骨格筋細胞を特異的に効率よく誘導する方法を用いて正常犬骨髄間質細胞から筋細胞の誘導を試みた。
2. 治療モデルとしての筋ジス犬の評価系を確立するために 3.0T MRI を用いた骨格筋障害の評価を行い、脂肪変化との鑑別が可能な CHES-Gd-T1WI が有用であるとの結果を得た。

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,