

- 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, 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)
AFM Workshop, Evry, France, Jan 15-17,
2007

<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

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（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

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

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

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィンが欠損して、骨格筋膜が脆弱になり筋変性、壊死する、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の筋疾患である。治療として、患者自身の筋前駆細胞 あるいは幹細胞に ex vivo でジストロフィンを導入して、患者に戻す autologous cell transplantation が期待されている。我々は 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 細胞との供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

筋ジストロフィー患者から筋前駆細胞を調整し、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

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タ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)

本実験の実験計画書を神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会へ提出し、承認を得、同研究所の定める小型実験動物倫理指針に従って実験を行った。

C. 研究成果

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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. 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。
2. 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。
3. 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

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>

1. Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy *Future Neurology*, Jan 2007, Vol.2(1), 87-96
2. 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

II. 学会発表

<国外>

1. 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

2. 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

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 results in muscle atrophy during tail suspension

XIth International Congress of the World Muscle Society, Bruges, Belgium, October 4-7, 2006

4. 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

<国内>

1. 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

2. 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（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィー犬（CXMD_J）の心筋障害の検討

分担研究者

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

研究要旨

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、心電図検査、心臓超音波検査および病理学的検査を用いて検討した。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はじめて明らかにした。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究成果

1. 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。

2. 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 頭で月齢と伴に低下していたが、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。

3. 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. 考察

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はじめて明らかにした。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Naoko Yugeta, Nobuyuki Urasawa, Yoko Fujii, Madoka Yoshimura, Katsutoshi Yuasa,

Michiko R. Wada, Masao Nakura, Yoshiaki Shimatsu, Masayuki Tomohiro, Akio Takahashi, Noboru Machida, Yoshito Wakao, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda : Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies
BMC Cardiovasc Disord. 2006, 6:47.

II. 学会発表

<国外>

1. Toshifumi Yokota, Qi-long Lu, Terence Partridge, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda, Eric Hoffman: 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 in Athens, Greece, November 9-12, 2006

<国内>

1. 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
2. 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

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（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

新生子筋ジス犬の生存率改善への試み：帝王切開の効果

分担研究者

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

研究要旨

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て筋ジス犬、正常犬、保因犬の血清 CK 値および死亡率が減少するかについて検討した。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。筋ジス犬では、分娩時のストレスが呼吸筋の障害および死亡率に関与していた可能性が考えられるが、血清 CK 高値の原因には遺伝的要因や胎内環境が影響している可能性も考えられた。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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週間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。

C. 研究成果

1. 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)。

2. 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Naoko Yugeta, Nobuyuki Urasawa, Yoko

Fujii, Madoka Yoshimura, Katsutoshi Yuasa, Michiko R. Wada, Masao Nakura, Yoshiki Shimatsu, Masayuki Tomohiro, Akio Takahashi, Noboru Machida, Yoshito Wakao, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda : Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies
BMC Cardiovasc Disord. 2006, 6:47.

II. 学会発表

<国外>

1. Toshifumi Yokota, Qi-long Lu, Terence Partridge, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda, Eric Hoffman: 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 in Athens, Greece, November 9-12, 2006

<国内>

1. 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
2. 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

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（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導

分担研究者

出澤真理

京都大学医学研究科 助教授

研究要旨

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。我々は、ヒト骨髄間葉系細胞から骨格筋系細胞を、他の要素を含まず特異的に効率よく誘導する方法を開発した。この誘導方法を用いて筋変性モデルでの有効性と安全性の検証を行った。

A. 研究目的

筋ジストロフィーなど遺伝性筋変性疾患の細胞移植治療法開発の一環として、筋肉に含まれている増殖可能な筋衛星細胞の分離や ES 細胞、あるいは胎児の細胞から筋肉細胞を誘導する方法が検討されてきた。しかし、得られる細胞数が僅かであること、死亡胎児を必要とすること、あるいは細胞の安全性を巡って問題点が指摘されてきた。

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、増殖力が旺盛で移植治療に必要な細胞数の確保が可能である。また、患者本人の細胞を用いる自己細胞移植が可能である。よって、骨髄間質細胞は移植治療の候補としてはポテンシャルの高い細胞であり、効率の良い分化誘導系の確立が期待されていた。今回、我々は骨髄間質細胞から効率よく骨格筋細胞を誘導する方法を見出した。

B. 研究方法

骨髄間質細胞はラット、ヒトの骨髄穿刺液から樹立した接着性細胞を用いた。

(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), forskloin (FSK) (5 μ M), 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 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。

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

骨髄間質細胞の分化誘導並びに分子生物学的解析は京都大学を中心に行うが、すでに京都大学大学院医学研究科・医学

部動物実験委員会の承認を得ている（「骨髄間質細胞の骨格筋細胞への分化誘導と移植応用」承認番号：MedKyo04245）。ヒト骨髄間質細胞は BioWhittaker 社の細胞を用いるので倫理上問題はない。Notch の遺伝子導入実験は京大の組み替え DNA 実験委員会の了承を得て行なっている（「体細胞の神経系および骨格筋細胞への分化転換の遺伝子機構について」（承認番号：研研2第224-2号）。

C. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導

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 $42.4 \pm 8.5\%$ 、静脈投与が $33.7 \pm 7.1\%$ 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された。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。

D. 考察

骨髄間質細胞から機能的な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。骨髄間質細胞から機能的な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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

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)
- Ide C, Dezawa M, Matsumoto N, Itokazu Y. Regeneration (synopsis). *Encyclopedic Reference of Neuroscience*. Eds. MD Binder, N Hirokawa, U Windhorst, Springer (in press).
 - 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.

【和文総説】

- 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.
- 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.
- 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)
- 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).
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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>

- 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
- Dezawa M. A challenge to auto-cell transplantation therapy using bone marrow stromal cells. The 4th Catholic International Stem Cell Symposium. Seoul, Korea, 2006, July
- 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
- 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>

- 出澤真理 自己細胞移植治療への挑戦: 思わぬ発見を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 2006、12月。
2. 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、2006、
10月
 3. 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
 4. 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
 5. 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27回日本炎症再生医学会、東京、
2006、7月
 6. 出澤真理 自己細胞移植治療への挑
戦: 思わぬ発見を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
 7. 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。
 8. 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2
4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: 2
003207064 (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 University, 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

骨髄間質細胞が誘導した筋細胞の移植法の確立

分担研究者

鍋島陽一

京都大学医学研究科 教授

研究要旨

大量に培養可能な骨髄間質細胞から、骨格筋を極めて高い効率で誘導する画期的な方法を見出した。筋芽細胞、幹細胞にあたる筋衛星細胞が含まれており、これらの細胞は筋組織に生着、分化することから、筋ジストロフィーの細胞治療にとって大きな意義がある。

A. 研究目的

骨髄間葉系細胞は患者の骨髄液から容易に採取可能な接着性の間葉系細胞であり、旺盛な増殖能力を備えているので、細胞移植治療に必要な細胞数確保が可能である。よって免疫拒絶や倫理問題のハードルが低い。また骨髄バンクがすでに稼動しており、何らかの理由で本人の細胞が利用できない場合でも、骨髄バンクを用いることによって、供給源を広げることができる。

細胞移植治療の目的は、変性過程で失われた細胞を補充することであり、言うまでもなく、目的とする細胞への分化制御の開発が実用化に向けた重要な課題となる。本研究では骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞誘導法の開発を行い、次いで安全、かつ効率の良い誘導系を確立するために誘導システムの分子機構を検討している。

B. 研究方法

骨髄間質細胞はラット、ヒトの骨髄穿刺液から樹立した接着性細胞を用いた。

(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(1700~2000 cells/cm²)でまいた後、サイトカイン投与 (bFGF, Forskolin, PDGF, Neuregulin) を行い、その後 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、confluent に達したところで分化培地 (ウマ血清 2%) に移すことによって多核の格筋を誘導した。誘導された骨格筋の性質を解析するとともに、筋ジストロフィーモデルマウスである mdx-nude mouse の前脛骨筋を cardiotoxin で変性させ

ヒトから誘導した骨格筋細胞を移植し、細胞の生着と生体内での分化を調べた。

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

骨髄間質細胞の分化誘導並びに分子生物学的解析は京都大学を中心に行うが、すでに京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会の承認を得ている (「骨髄間質細胞の骨格筋細胞への分化誘導と移植応用」承認番号: MedKyo04245)。ヒト骨髄間質細胞は BioWhittaker 社の細胞を用いるので倫理上問題はない。Notch の遺伝子導入実験は京大の組み換え DNA 実験委員会の了承を得て行なっている (「体細胞の神経系および骨格筋細胞への分化転換の遺伝子機構に

ついて」(承認番号: 研研2第224-2号)。

C. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導 RT-PCR で解析すると、骨髄間質細胞はわずかではあるが Pax3 を発現している。しかしサイトカイン刺激 (bFGF, Forskolin, PDGF, Neuregulin) を行うと、筋前駆細胞のマーカである 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。ついで分化培地に移す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た。すなわち、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞、単核の筋芽細胞、そして多核の筋管細胞である。単核の筋衛星細胞と筋芽細胞はクローン培養を行い、骨格筋以外の細胞を除いた。またクローン培養によって純化された細胞は、再び成熟した筋管細胞を形成する能力があることが分かった。クローン化されたヒト由来の筋芽細胞と筋衛星細胞を筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx-nude mouse の前脛骨筋に移植した。その結果、筋芽細胞は成体の筋肉に生着し dystrophin の発現を認めるとともに、成熟した多核の筋線維と分化した。

D. 考察

骨髄間質細胞から機能的な格筋細胞を高い高率で誘導する方法が見いだした。その分化転換機構は骨格筋の発生過程とおおよそ一致したものであることが分かった。骨格筋では最初のサイトカイン投与によって Pax7 陽性の骨格筋幹細胞様マーカ発現が最初に認められ、次いで Notch が導入されることによって MyoD, Myogenin などの

骨格筋マーカが順次発現されることを見いだした。新たな Notch の機能を推定されるものであり、その機能解明を行っている。

E. 結論

大量に培養可能な骨髄間質細胞から、骨格筋を極めて高い効率で誘導する画期的な方法を見出した。特に幹細胞にあたる筋衛星細胞が含まれており、生体由来の骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) はこれまで培養が困難とされており、極めて興味深い。また、筋ジストロフィーの細胞治療にとって大きな意義がある。

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. 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.

【欧文総説】

1. 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).

【和文総説】

1. 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
2. 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.

3. 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.

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 inducing differentiation of skeletal muscle cell. International application number: PCT/JP2005/023598, 国際公開番号： WO 2006/069225 A1, Assignee: Kyoto University, Date of Patent: June 29, 2006

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名, 巻号: ページ, 出版年
Suzuki N, <u>Miyagoe-Suzuki Y.</u> <u>Takeda S</u>	Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy	<i>Future Neurology</i> , Vol 2(1), 87-96, 2007
Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, <u>Nakamura A</u> , Wada M, Nakura M, <u>Shimatsu Y</u> , Tomohiro M, Takahashi A, Machida N, Wakao Y, <u>Takeda S</u>	Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies	<i>BMC Cardiovasc Disord</i> , 4;6:47, 2006
Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, <u>Miyagoe-Suzuki Y</u> , <u>Takeda S</u>	Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle	<i>Biochem Biophys Res Commu.</i> 341: 864-73, 2006
<u>Dezawa M</u> , Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, <u>Nabeshima Y</u>	Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration.	<i>Science</i> , 309 (5732), 314-317, 2005
<u>Dezawa M.</u>	Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells.	<i>Cellular and Molecular Life Sciences</i> , 63: 2764-2772, 2006
<u>出澤真理</u>	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, Vol.52 No.2, 2007