

子欠失例の80%がカバーできるようになった。DMDにおけるジストロフィン遺伝子の異常は、エクソン45-55に集中しており、ホットスポットと呼ばれている。そこで我々が開発してきた筋ジス犬を用いてジストロフィン遺伝子エクソン6と8のスキップ治療の有効性と安全性を確立して、臨床治験につなげるのみならず、我々が開発保存に参加してきたジストロフィン遺伝子のエクソン52を欠損したmdx52マウス、DMD由来の培養筋細胞を用いてエクソン51をスキップするための前臨床試験を行ない、臨床における治療を実現したい。DMDに対して臨床治験を行うことは、DMD患者・家族に対し、大きな喜びと福音を与えるのみならず、他の遺伝子性疾患に対しても治療の可能性を拓く。

## B . 研究方法

### 1. 諸外国の研究の現状

07/08年に出版された論文の検索及び、研究集会への参加により、諸外国での研究の進展状況を知る。

### 2. AVI社との研究打ち合わせ

現在GMPレベルでのMorpholino設備を持つ施設は、世界中でもAVI社に限られている。そこで、Morpholinoの臨床応用を図るためには、AVI社との研究打ち合わせを行う必要がある。

### 3. 臨床評価系の導入

国内においてMorpholinoを用いた臨床治験を行うためには、既に諸外国で行われている臨床評価系を国内に導入する必要がある。そこで、Morpholinoを用いた実験について、共同研究先である米国Washington D.C.のChildren's National Medical CenterのEric Hoffman博士が主宰している研究集会に出席することとした。

### 4. エクソン・スキップの対象となるDMD患

## 者のリクルート

臨床治験を行うためには、エクソン・スキップの対象となる患者を見出す必要がある。

#### (1) エクソン7欠失患者

筋ジス犬で得られた結果を直接応用することができるが、これまでの検索で、対象となる患者は極めて少ないことが予想される。

#### (2) エクソン51スキップの対象患者

これまでの検索から、エクソン51スキップの対象患者は、ジストロフィン遺伝子のエクソン50欠失、52欠失、48-50欠失、45-50欠失など遺伝子欠失によるDMD例の約20%に達すると考えられる。

## C . 研究成果

### 1. 諸外国の現状

2007年6月オランダで開催されたTREAT-NMDによる臨床評価に関するmeeting、前日にオランダで開催されたDMD患者のregistrationを進めるためのDPP (Duchenne Parent Project)のmeeting及び同年10月イタリアのシシリー島で開催されたWorld Muscle Societyの年次総会に参加、並びに2007年4月～2008年3月に発刊されたJournalからの論文情報を総合すると、エクソン・スキップを用いた臨床治験に関して次のような進展が認められた。

#### (1) オランダにおけるclinical trial

Van Dentekom博士を中心とする研究グループは、オランダにおいて、2'-O-メチルantisense oligonucleotides (AO)を用いてジストロフィン遺伝子のエクソン51スキップについて、局所的投与による有効性と安全性を検証した。NEJMに12月発表された結果に依れば、高い有効性が観察され、局注に伴う有害事象は観察されなかった。オランダのグループは、引き続き全身投与法を目指している。

#### (2) 英国におけるclinical trial

英国では、F. MuntoniをPrincipal investigatorとしてエクソン51スキップの準備が進行し

ていることが伝えられている。彼らは 30 mer の Morpholino を用いてエクソン 51 スキップを企図している。彼らは AVI 社から Morpholino の供給を受けているので、我々の研究の直接の競合相手である。彼らも局所治療で有効性と安全性の実証ができれば、全身投与に進むと考えられる。

しかし、エクソン 51 スキップについては一つ懸念がある。それは例えばエクソン 48-50 の欠失 DMD の場合、エクソン 51 のスキップによってインフレーム化するため、エクソン 48-51 に相当する部分を欠失した短縮型のジストロフィンが合成されることになる。しかし、データ・ベースに戻ってエクソン 48-51 欠失例 DMD の表現型を調べてみると、その多くは Duchenne 型であると登録されており、Becker の比率は必ずしも高くない。データ・ベースには、遺伝子レベルの欠損のみが記載されていることが多く、mRNA 及び蛋白質レベルでの検索が必要であることは言うまでもないが、留意すべき事項であると思われる。

### (3) 米国における取り組み

米国においても、幾つかの臨床治験の試みが進行している。一つはオランダのグループと同じ 2-0-メチル AO を用いた方法であり、Prosenza という会社を介して準備が進められている。AVI 社も又、英国で進行中の trial を米国でも実施する計画があると聞く。従って、Children's National Medical Center と共に、治験を目指している我々もエクソン・スキップの標的を明瞭にして研究を進めていく必要がある。

## 2. AVI 社との研究打ち合わせ

2008 年 9 月 29 日米国ワシントン州シアトルのシータック空港において、AVI 社及びこれまで共に研究を進めてきた Children's National Medical Center の Eric Hoffman 教授、clinical trial において幾たびも principal investigator を勤めている Paula Clemens 博士と研究打ち合わせを行った。AVI 社の研究者並びに経営陣

とは、これまで研究集会等で何度も顔を合わせているが、今回は極めて濃厚な discussion を行った。研究打ち合わせの席で我々が明らかにした結果は以下の通りである。

- ① 筋ジストロフィー犬におけるジストロフィン遺伝子のエクソン 6/8 スキップ
- ② ジストロフィン遺伝子のエクソン 52 を欠損した mdx 52 マウスを用いたエクソン 51 のスキップ
- ③ 例外的に無症候性の表現型を取る症例を参考に、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 をスキップする予報的な試み。

殊に③については、エクソン・スキップにより極めて軽微な phenotype に変換できる可能性があること、しかも同じ核酸医薬品を極めて多くの DMD 患者(遺伝子欠損を示す DMD 患者の最大限 63%) に対し、応用できる可能性があることから、非常に多くの関心を引きつけることができた。その結果として、我々が考えているエクソン 6/8 スキップ、及びエクソン 51 スキップの臨床治験に向けて、基本的な合意が得られたものと考えている。

## 3. 臨床評価系の導入

基礎研究において、進展が認められるエクソン・スキップを実際の臨床場面において行うためには、臨床評価法が確立していることが必須である。Morpholino を用いた研究に関する共同研究の相手先である Eric Hoffman 教授は、臨床評価のための研究グループ Cooperative International Neuromuscular Research Group(CINRG)を 1999 年に設立し、世界各国との協調を深めている。そこで、2008 年 3 月 8 日、ワシントン DC で行われた CINRG の meeting 及び、それに前後して行われた clinical evaluator のトレーニング・コースについて、臨床治験を推進するためのメンバーである国立精神・神経センター武蔵病院の治験管理室長、小児神経科医師 2 名、理学療法士 1 名と共に参加した。既に臨床評価を行うための method は、定量的な筋力測定法である

quantitative muscle testing (GMT) を中心に確立しており、なるべく早く日本に導入することが我が国で臨床治験を行う上で必須である。

#### 4. 臨床治験を行うための DMD 患者のリクルート

##### (1) エクソン7欠失患者

筋ジストロフィー協会の集会等を通じて、幅広く筋ジストロフィー患者・家族の皆さんと交流を深める内、国内にエクソン7の単独欠失の DMD 患者さんが健在で、エクソン・スキッピングによる治療に強い関心をお持ちであることが判明した。

##### (2) エクソン 51 スキップの対象となる DMD

エクソン 51 スキップの対象となる患者さんは、欠失のスペクトラムが広いために数多く見出された。将来的にエクソン・スキップ治療の均てん化のためには、全国規模の registration システムを準備することが肝要である。ヨーロッパで治療を進めるための準備の主体となっている Treat-NMD では、患者さん発の minimum な情報を中心とする registration を start しようとしている。これらの成果を日本国内で幾たびか啓蒙した結果、厚生労働省による精神・神経疾患研究委託費による研究班会議を中心とし、筋ジストロフィー協会と協力して、全国的な registration を立ち上げることで一致をみた。

#### D . 考察

Antisense Morpholino を用いたエクソン・スキッピングを臨床で行うための要項を以下のように列挙することができる。

- (1) 有効性試験
- (2) 安全性 (毒性) 試験
- (3) 臨床治験を行うための準備 (臨床評価)
- (4) 対象となる DMD 患者のリクルート

この内、(1) (3) (4) について顕著な成果を挙げることができた。有効性試験の結果については、筋ジストロフィーについて分担研究者の横田が、

mdx52 マウスについて同じく分担研究者の岡田が詳述する。今後の問題は、筋ジストロフィーで障害される心筋における Morpholino の取り込みが低いことであろう。これについては、PPMO (peptide conjugated Morpholino) の使用により改善を見込むことができると考えられる。

一方、臨床評価については、米国を主体とした CINRG に参画することにより、一定の基準で評価する手がかりが得られたところである。又、エクソン・スキップの対象患者については、更に準備を加速する必要があるだろう。殊に皮膚線維芽細胞を用いた筋細胞への変換、筋細胞の mRNA を用いた deletion の範囲の同定、及び同細胞を用いたエクソン・スキップを積極的に推進する必要がある。将来的な治療の均てん化のためには registration のシステムが必要であることは言うまでもない。

最も大きな問題は、安全性 (毒性) 試験が進んでいないことである。一つには安全性試験を行うには莫大な資金を要することがネックとなっている。第二には、どのエクソン・スキップを優先するのか、その候補を絞り込むことが肝要である。第三には、そのための国際協調を欠かすことができない。AVI 社及び主要な提携先である Children's National Medical Center との協議を更に深める必要がある。

#### E . 結論

1. 2007/8 年に発表された論文及び世界各地で開かれた研究集会に参加することにより、エクソン・スキップを用いた臨床治験に関する情報収集に努めた。
2. 世界で唯一、GMP レベルでの Morpholino 生産設備を有する AVI 社との打ち合わせを進めた。
3. Morpholino を用いた臨床治験を行うについて、先進的な取り組みを早くから進めている

CINRG との交流を進めた。

4. 国内において、Morpholino を用いてエクソン・スキッピングを行うに当たり、対象となり得る DMD 患者さんを見出した一方で、こうした試みを全国に展開する上で重要となる registration の確立を図った。

## 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. Urasawa N, Wada MR, Machida N, Yuasa K, Shimatsu Y, Wakao Y, Yuasa S, Sano T, Nonaka I, Nakamura A, Takeda S. Selective vacuolar degeneration in dystrophin deficient canine Purkinje fibers despite preservation of dystrophin-associated proteins with overexpression of Dp71. *Circulation*. In press
2. Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med*. In press
3. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*. 2008 Feb;22(2): 477-87.
4. Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 Jan 9; 9(1): 1
5. So-ichiro FUKADA, Yukiko Yamamoto, Masashi Segawa, Kenta Sakamoto, Mari Nakajima, Masaki Sato, Daisuke Morikawa, Akiyoshi Uezumi, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda, Kazutake Tsujikawa, Hiroshi Yamamoto. CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin <math>\alpha</math>2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res*. 2008 Jan 1; 314(1): 193-203.
6. Fukada SI, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells In Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10): 2448-59.
7. Hirasaka K, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T. Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2007, Oct;56(10): 2511-22.
8. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Ohshima S, Howell JM, Nakamura A, Hijikata T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S.

Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products.

*Gene Ther.* 2007 Sep;14(17): 1249-1260.

9. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada SI, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S.

NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS.

*J Clin Invest.* 2007 Sep 4; 117(9): 2468-2476.

10. Ikemoto M, Fukada SI, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR, Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Autologous Transplantation of SM/C-2.6 (+) Satellite Cells Transduced with Micro-dystrophin CS1 cDNA by Lentiviral Vector into mdx Mice.

*Mol Ther.* 2007 Aug 28; 15(12): 2178-85.

11. Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda SI.

Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ).

*BMC Musculoskelet Disord.* 2007 Jun 28;8(1): 54.

12. 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.

#### 【欧文総説】

1. Naoki Suzuki, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Future Neurology.* January 2007, Vol. 2(1), 87-96.

#### <和文>

#### 【和文著書】

1. 武田伸一:  
筋ジストロフィー治療法研究の進歩  
こころの健康科学研究の現状と課題  
Ⅱ.3.3: 315-327, 2007
2. 武田伸一:  
ジストロフィン欠損における新たな分子態  
小児神経学の進歩  
第36集, 132-138, 2007

#### 【和文総説】

1. 湯浅勝敏、土方貴雄、武田伸一：  
筋ジストロフィーの遺伝子治療における骨格筋への遺伝子デリバリー  
*Drug Delivery System* 22(2): 140-147, 2007
2. 本橋紀夫、武田伸一：  
筋肉の再生  
*THE BONE* 21(4): 61-64, 2007
3. 辛鎮洪、武田伸一：  
筋ジストロフィーの治療戦略  
*BRAIN and NERVE* 59(4): 415-424, 2007
4. 武田伸一:  
国立精神・神経センターにおける筋ジストロフィー研究の成果  
週刊社会保障, No.2426: 31, 2007

5. 西山章代、武田伸一：  
骨格筋への *in vivo* 遺伝子導入  
バイオテクノロジージャーナル, 7:  
183-187, 2007
6. 岡田尚巳、武田伸一：  
遺伝子導入「筋ジストロフィー現在と未  
来」  
Clinical Neuroscience 26(2): 204-206, 2008.

## II. 学会発表

### <国外>

1. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
rAAV Type 8-Mediated Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of  $\alpha$ -Sarcoglycan Deficient Mice  
10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy in Seattle, WA, May 30-Jun 3, 2007
2. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Distinct Transduction Profiles in the Dystrophic Dogs with rAAV Serotype 8  
10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy in Seattle, WA, May 30-Jun 3, 2007
3. Noki Suzuki, Norio Motohashi, Yuko Miyagoe-Suzuki, Tetsuhiko Yoshimura, Yasuto Itoym, Masashi Aoki, Shin'ichi Takeda:  
Nitric oxide production results in disuse-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal nitric oxide synthase  
7th Japanese-French Workshop "Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy", 8-9 June 2007
4. Shin'ichi Takeda:  
AAV vector-mediated approaches to dystrophic dogs  
7th Japanese-French Workshop "Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy", 8-9 June 2007
5. Shin'ichi Takeda:  
Pre-clinical evidence from animal models-What preclinical evidence is needed from animal models to proceed to clinical trial: grip strength, exercise: physiological measurements?  
Treat-NMD workshop for "Outcome measures for experimental studies in Duchenne muscular dystrophy" in Naarden (Amsterdam)-The Netherlands, Jun-30-July 1, 2007
6. Shin'ichi Takeda:  
Molecular signature of quiescent satellite cells and their potential as a therapeutic tool for muscular dystrophy (July-15)  
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007  
Skeletal muscle Satellite and Stem Cells
7. Yuko Miyagoe-Suzuki, Norio Motohashi, Akiyoshi Uezumi, Erika Yada, So-ichiro Fukada, Kazuhiko Imaizumi, Shin'ichi Takeda:  
Co-transplantation of muscle-derived side population (SP) cells with myoblasts promoted the muscle regeneration (July-17)  
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007  
Skeletal muscle Satellite and Stem Cells
8. Erika Yada, Norio Motohashi, Makoto Miyagishi, Chika Harano, Yuko

- Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda:  
Hdac11 regulates differentiation of satellite cells (July-16)  
FASEB Summer Research Conference in Indian Wells, California, July 14-19, 2007  
Skeletal muscle Satellite and Stem Cells
9. Yoshimura, M.; Nakamura, A.; Kobayashi, M.; Takeda, S.:  
Deflazacort induced severe skeletal muscle wasting and inguinal herniation in normal Beagle dogs  
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY  
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
  10. Partridge, T., Yokota, T., Lu, Q., Hoffman, E., Alter, J., Takeda S., Kobayashi, M., Nakamura, A.:  
Systemic delivery of morpholino oligonucleotides to skip mutations in the dystrophin gene of the mouse and dog  
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY  
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
  11. Miyagoe-Suzuki, Y.; Miyamoto, K.; Saito, F.; Matsumura, K.; Many, H.; Endo, T., Takeda, S.:  
POMGnT1-null myoblasts poorly proliferate in vitro  
12th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY  
Giardini Naxos-Taormina, Italy 17-20 October 2007
  12. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Akinori Nakamura, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Transduction profile and immune response in the dystrophic dogs with rAAV serotype 8  
The XV Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, The Netherlands, October 27 – 30, 2007
  13. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Extensive  $\alpha$ -sarcoglycan expression by intramuscular and intravenous administration of rAAV type 8  
The XV Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, The Netherlands, October 27 – 30, 2007
  14. Shin'ichi Takeda:  
Muscle stem cells in muscle regeneration, Symposium "From transcription factor to gene therapy",  
Medical Research Center for Ischemic Tissue Regeneration, Pusan National University, Pusan, Korea, Nov.8, 2007
  15. Shin'ichi Takeda:  
Progress in gene therapy approaches to dystrophin deficient Duchenne muscular dystrophy (DMD),  
Symposium "Advances in Gene Therapy", at Medical Research Institute, Pusan National University Hospital, Pusan, Korea, Nov.9, 2007
  16. G Walter, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda:  
MRI imaging, Clinical trial endpoints

discussions,  
Annual Meeting Muscular Dystrophy  
Programs, Washington DC, March 2008

第5回幹細胞シンポジウム, 兵庫県, 5.17  
～19, 2007

17. Yoshitugu Aoki, Shin'ichi Takeda:  
Multi-exon skipping, Pre-clinical discussion  
of potential interventions,  
Annual Meeting Muscular Dystrophy  
Programs, Washington DC, March 2008

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

#### <国内>

1. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療,  
神経難病と難病ネットワーク —あきら  
めないで治療とケア—  
第27回日本医学会総会, 大阪, 4.7,  
2007
2. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する治療の現状と  
未来  
第43回筋ジストロフィー協会埼玉県大  
会, 埼玉, 4.29, 2007
3. 中村昭則, 武田伸一:  
筋ジストロフィー-1, 筋ジストロフィー  
犬を用いた Duchenne 型筋ジストロ  
フィーの心筋傷害の発症機序の解明  
第48回日本神経学会総会, 名古屋,  
5.16-17, 2007
4. 大島幸子, 武田伸一:  
筋ジストロフィー-2, rAAV を用いた犬  
骨格筋への遺伝子導入効果の検討,  
第48回日本神経学会総会, 名古屋,  
5.16-17, 2007
5. 宮本香織, 花岡和則, 遠藤玉夫, 鈴木友  
子, 武田伸一:  
ラミニンと $\alpha$ -dystroglycan の結合は骨格  
筋衛星細胞の増殖に必須である,



厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)  
分担研究報告書

筋再生能を促進する分子の探索

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**

骨格筋幹細胞である筋衛星細胞と side population (SP)細胞の相互作用を調べ以下の点を明らかにした。1) 骨格筋由来 SP 細胞は移植した筋衛星細胞の増殖と筋組織内での拡散を促進した。2) 骨格筋由来 SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、SP 細胞は間葉系細胞に特徴的な遺伝子を発現しており、MMP-2 や MMP-23 等のプロテアーゼを特異的に発現していた。これらの分子は細胞の移動を促進していると考えられた。内因性の SP 細胞も筋再生時、筋衛星細胞の増殖や移動を促進する事により、筋再生過程を促進していると考えられた。その分子メカニズムを検討し、低下している筋ジストロフィー筋の筋再生能を高めることができれば、アンチセンスモルフォリノ治療の効果を相乗的に上げうると期待される。

**A . 研究目的**

骨格筋 SP 細胞の筋再生過程に於ける機能を調べ、アンチセンスモルフォリノによる治療効果を高める筋再生促進治療の足がかりとする。

**B . 研究方法**

**1. 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とCD45, CD31, Sca-1抗体を用いてセルソーターを用いて筋衛星細胞を分離した。SP細胞はヘキスト33342色素とCD31, CD45で染色し、FACS VantageSE (BD)でソーティングした。

**2. 細胞移植と解析**

mdxマウスおよびNOD/Scidマウス前脛骨筋にシリンジを用いて筋衛星細胞と骨格筋由来SP細胞を共移植あるいは単独移植した。移植

後筋凍結切片をジストロフィン抗体、GFP抗体、抗Ki67抗体、抗ラミニン抗体等で染色することで移植効率を評価した。

**3. 遺伝子発現解析**

骨格筋由来SP細胞、筋芽細胞、マクロファージからRNAを調整し、アフィメトリクスGeneChipで解析した。さらにreal time PCR法でSP細胞特異的遺伝子発現の経時的変化を調べた。

**4. migration assay**

細胞の移動能を見る為にtranswell assayとwound healing assayを行なった。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、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. 研究結果**

**1. SP細胞を筋衛星細胞と共移植すると、筋衛星細胞による筋線維再生能を著しく上げた。**

また、SP細胞は筋衛星細胞の増殖と移動を促進していた。

2. 筋芽細胞やマクロファージに比べてSP細胞で特異的に発現する遺伝子を明らかにした。その中にMMP-2, MMP-23等のプロテアーゼが数多く含まれていた。

3. MMP-2はin vitroおよびin vivoにおいて筋衛星細胞の移動を促進した。増殖の促進効果は無かった。

#### D . 考察

筋ジストロフィーに対するアンチセンスモルフォリノの治療効果を高めるためには、骨格筋の再生能が維持されている必要がある。我々は筋再生に中心的な役割を果たす筋衛星細胞や壊死繊維の除去を行なうマクロファージ等の炎症性細胞の他に、Side Population細胞と呼ばれる細胞が筋芽細胞の増殖や移動を促進する事で筋再生を促進している事を見いだした。その分子機構を明らかにすれば、筋ジストロフィー筋の再生促進治療の応用が期待される。

#### E . 結論

骨格筋SP細胞は未分化な間葉系細胞であると考えられ、産生するサイトカインや MMPs 等は筋衛星細胞の増殖や移動を促進し、筋再生を促進していると考えられる。

#### 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. Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med. In press*
2. Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin  $\alpha$ 2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res.* 314:193-203.2008
3. Fukada SI, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells In Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells.* 25:2448-59. 2007
4. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Ohshima S, Howell JM, Nakamura A, Hijikata T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* 14:1249-1260.2007
5. Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada SI, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *J Clin Invest.* 117:2468-2476.2007

6. Ikemoto M, Fukada SI, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR, Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. (2007) Autologous Transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice.
7. *Mol Ther.* 15: 2178-85.

【欧文総説】

1. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S Side Population (SP) cells and skeletal muscle differentiation. Recent advances of skeletal muscle differentiation, *Reserach Signpost*, 2007
2. Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Future Neurology*. Vol. 2, 87-96.

II. 学会発表

<国外>

1. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Co-transplantation of muscle-derived side population (SP) cells with myoblasts promoted muscle regeneration. FASEB summer research conference, skeletal muscle satellite cells & stem cells. July 14-19, 2007
2. Yada E, Motohashi N, Miyagishi M, Harano C, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. HDAC11 regulates differentiation of satellite cells. FASEB summer research conference, skeletal muscle satellite cells & stem cells. July 14-19, 2007
3. Miyago-Suzuki Y, Miyamoto K., Saito F., Matsumura K., Many H. Endo T., Takede S.

POMGnT1-null myoblasts poorly proliferate in vitro. The 12th international congress of the world muscle society. Italy. 17-20 October 2007.

<国内>

1. 矢田英理香、本橋紀夫、宮岸真、原野千加、鈴木友子、武田伸一  
HDAC11 は筋衛星細胞の分化制御因子である 第 28 回日本炎症・再生医学会 平成 19 年 8 月 2-3 日
2. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田宗一郎、今泉和彦、鈴木友子、武田伸一  
骨格筋 Side population (SP) 細胞は筋衛星細胞による筋再生を促進する 第 28 回日本炎症・再生医学会 平成 19 年 8 月 2-3 日
3. 宮本香織、花岡和則、遠藤玉夫、鈴木友子、武田伸一  
ラミニンと $\alpha$ -dystroglycan の結合は骨格筋衛星細胞の増殖に必須である 第 5 回幹細胞シンポジウム 平成 19 年 5 月 17 日~19 日
4. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田総一郎、今泉和彦、鈴木友子、武田伸一  
骨格筋 Side Population (SP) 細胞は筋衛星細胞による筋再生を促進する 第 5 回幹細胞シンポジウム 平成 19 年 5 月 17 日~19 日
5. 矢田英理香、本橋紀夫、宮岸真、原野千加、鈴木友子、武田伸一  
HDAC11 は筋衛星細胞 (骨格筋幹細胞) の分化制御因子である 第 5 回幹細胞シンポジウム 平成 19 年 5 月 17 日~19 日
6. 増渕菜弥、宮本香織、花岡和則、遠藤玉

夫、鈴木友子、武田伸一  
α-ジストログリカンの糖鎖修飾は筋衛星細胞の増殖に必須である  
第 30 回日本分子生物学会年会 平成 19  
年 12 月 11 日～15 日

#### 班会議、シンポジウム等

1. 鈴木友子、武田伸一  
骨格筋間葉系幹細胞の同定と筋衛星細胞との相互作用  
日本横紋筋肉腫研究グループ (JRSG) 第 8 回研究会 平成 20 年 1 月 26 日
2. 武田 伸一, 本橋 紀夫, 上住 聡芳, 矢田 英理香, 深田 宗一郎, 福島 和広, 今泉 和彦, 鈴木 友子  
骨格筋 Side Population (SP) 細胞は筋衛星細胞による筋再生を促進する  
厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 平成 19 年度 研究班会議 平成 19 年 12 月 5 日 (水)～6 日 (木)
3. 本橋紀夫、上住聡芳、矢田英理香、深田宗一郎、福島和弘、今泉和彦、鈴木友子、武田伸一  
骨格筋 Side population (SP) 細胞は筋衛星細胞による筋再生を促進する  
第 2 回筋ジストロフィー治療研究会
4. 鈴木友子 ;  
不働化に伴う筋萎縮の分子構造 第 1 回学際的に痛みを考える会国際フォーラム：シンポジウムⅡ □「不働化と廃用に伴う痛みのメカニズムと治療」平成 19 年 12 月 1 日愛知医科大学

#### 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  
(医療技術実用化総合研究事業:基礎研究成果の臨床応用推進研究)  
分担研究報告書

DMD 遺伝子エクソン 45-55 欠失症例の骨格筋障害に関する検討

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**

無症候性あるいは軽微な骨格筋症状を呈する 3 家系、3 例について共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正することができれば、多くの DMD に対して新たな治療法となる可能性がある。

**A. 研究目的**

Duchenne 型筋ジストロフィーに対して、エクソン・スキッピングによる治療を進めるためには、遺伝子と表現型の関連を明らかにする必要がある。原則的に out of frame 型の変異は、重症の Duchenne 型の臨床例を呈し、in frame 型の変異は軽症の Becker 型の臨床型を呈するとされる。しかし、in frame 型の遺伝子欠失例症例についても、詳細に検討してみると必ずしも Becker 型の臨床例ではなく、重症の Duchenne 型症例を示すことが観察される。そこで、ジストロフィン遺伝子の変異について詳細に検討し、無症候型あるいは極めて軽微な臨床型を見出すことができれば、それは治療の目標として極めて重要である。但し、そのとき、遺伝子型のみでなく、mRNA 及び蛋白質のレベルで欠失を確認し、臨床型と比較することが極めて重要である。我々は臨床的に極めて軽微な経過を辿る 3 家系、3 症例を経験し、共通してジストロフィン遺伝子エクソン 45-55 を見出したので詳細に検討した。

**B. 研究方法**

症例 1、2 は各々 26 歳、36 歳に心不全症状で発症したが、骨格筋症状はなかった。症例 3 は 59 歳で四肢筋力低下を発症し、69 歳で初診。各症例の骨格筋・心筋障害について、初診時と症例 1 は 28 歳時、症例 2 は 40 歳時、症例 3 は 76 歳時と比較した。また、症例 1 の生検骨格筋・心筋について Western blot 法及び免疫組織化学を用いて検討した。

**C. 研究成果**

骨格筋障害の進展は症例 1、2 では見られず、症例 3 では軽度に行進したが ADL は保たれていた。心機能は症例 1、2 では薬剤により安定し、症例 3 では著変はなかった。ゲノム DNA を用いた PCR による検索では、3 症例に共にエクソン 45-55 の欠失が見出された。骨格筋から抽出した mRNA を用いて行った RT-PCR 及び産物のシーケンス分析の結果ではエクソン 44 から 56 へのスキップが確認された。又、蛋白質レベルに関しては、症例 1 の骨格筋・心筋の dystrophin の蛋白質量は正常の約 60% であり、dystrophin 関連蛋白質の染色性は比較的保たれていた。大変興味深いことに、骨格筋

と心筋の発現量はほぼ同じであり、ジストロフィン遺伝子の 5' 端付近の欠失によって生ずる X-linked delated cardiomyopathy の場合とは異なっていた。尚、ゲノム DNA レベルにおける詳細な deletion map については、信州大学医学部第 3 内科の吉田邦広准教授により検討が行われている。

#### D. 考察

無症候性あるいは軽微な臨床型を呈する 3 家系については、共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出した。フランスから報告されたエクソン 45-55 を示す 15 家系についても、年齢は様々であるが、全ての例で臨床型は軽微であった。Leiden の DMD データ・ベースに戻って検索してみると、エクソン 45-55 欠失は 97% が軽症型の Becker と記載されていた。従って、エクソン 45-55 欠失例が少なくとも軽微な経過を辿ることは確実のように思われる。そこで、エクソン・スキッピングにより同遺伝子型に修正できれば、多くの DMD を良性の表現型に修正できる。なぜ、エクソン 45-55 欠失例が軽微な臨床型を呈するののかに関しては、今後の詳細な検討が必要であるが、欠失によって、ロット・リピート数は減少するものの個々のリピートの構造は完全に保たれていることが関連している可能性がある。3 例のうち、2 例について治療可能ではあるが、心筋障害が認められた点については、二つの可能性がある。

① 遺伝子欠失によって、心筋におけるジストロフィンの発現調節領域が欠損している可能性

② エクソン 45-55 欠失によって生じた短縮型ジストロフィンの機能が骨格筋では充分であるが、心筋では不十分な可能性

この内、①については現在信州大学で進められているゲノム DNA レベルでの遺伝子欠失範囲の同定によって答えが得られる可能性がある。

次のステップとして、我々はエクソン 52

欠失マウスを用いて、エクソン 45-55 スキッピングが可能であることを mRNA レベルで確認し、更に検討を進めている。エクソン 45-55 のスキッピングを実現することは、臨床的に軽症化を明瞭に企図できるだけでなく、エクソン 45-55 が Dchenne 型の遺伝子変異のホット・スポットに一致することから、遺伝子欠失による Duchenne 症例の最大 63% を同じ核酸医薬品により治療できるとの可能性を生むことになる。

#### E. 結論

臨床的に無症候性あるいは軽微な経過を辿る 3 家系について、共通してジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 欠失を見出し、エクソン・スキッピング治療の目標となることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

<英文>

1. Nakamura A, et al. Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. J Clin Neurosci 2008 (in press)

##### II. 学会発表

<国内>

1. 八幡由美子、市川慎一、北秀樹、小林正典、弓削田直子、中村昭則、武田伸一：  
新生子筋ジストロフィー犬の生存率改善に対する試み：帝王切開導入の効果、第 41 回日本実験動物技術者協会総会、名古屋、2007
2. 高橋明男、小林正典、中村昭則、武田伸一、MRI を用いた筋ジストロフィー犬の骨格筋障害の非侵襲的評価、平成 19 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーに対する治

療研究を臨床に展開するための統括的  
研究

**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  
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)  
分担研究報告書

Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた *mdx52* に対する  
ジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの試みに関する研究

分担研究者 岡田 尚巳  
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

Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) の前脛骨筋への局所投与により、マウス・ジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスプライス・ドナーとアクセプターを標的に設計した PMO の組み合わせがエクソン 51 スキッピングに最適であることが判明した。最適の PMO を用いて 8 週齢の *mdx52* マウスに 1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与した結果、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、筋病理では筋肥大を中心としたジストロフィー変化が改善した。

A . 研究目的

*mdx52* マウスに対して Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) を投与し、エクソン 51 スキッピングによるジストロフィンの発現回復とその効果を検証した。

B . 研究方法

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 52 を欠失した *mdx52* マウスをモデル動物として用い、エクソン 51 スキッピングの効果を検討した。マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン 51 のスプライス・ドナーとアクセプター、exonic splicing enhancer (ESE)を中心に、エクソン 51 に対して網羅的に 25 mer の PMO を設計した。8 週齢の *mdx52* マウスの前脛骨筋に、単独あるいは 2 種類の PMO (計 1.25 nmoles) を 1 回投与し、2 週間後に RT-PCR、ジストロフィン免疫染色、ウエスタンブロットによる解析を行い最適な PMO 配列の組み合わせを決定した。最適の PMO (計 1000

nmoles) を、8 週齢の *mdx52* マウスに 1 週間ごとに計 7 回経尾静脈投与した。最終投与の 2 週間後に、剖検で採取した腓腹筋、前脛骨筋、大腿四頭筋、三角筋、上腕三頭筋、腰部傍脊柱筋、肋間筋、横隔膜、心筋についてジストロフィンの発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで検討した。

C . 研究成果

1. PMO の局所投与

ESE を標的にした 1.25 nmoles の PMO を単独で投与した場合に、mRNA レベルで 25% のスキッピング効率と野生型の 18% に相当するジストロフィンの発現が得られた。そこで、Wilton らの報告を参考に、合計 1.25 nmoles の 2 種類の PMO を同時に投与したところ、スプライス・ドナーおよびアクセプターを標的にした組み合わせで、mRNA レベルでの最高のスキッピング効率 (72%) とジストロフィンの発現 (野生型の 21%) が得られた。

2. PMO の全身投与



スプライス・ドナーおよびアクセプターを標的にした PMO を 7 回投与後、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復し、ジストロフィン陽性線維の割合は、三角筋と大腿四頭筋と腓腹筋では 60%以上、横隔膜では約 20~30%、前脛骨筋では 15%程度、心筋 2%未満であった。また、三角筋、腓腹筋、大腿四頭筋でのジストロフィンの発現は、野生型の 30%以上であった。筋病理では筋肥大を中心としたジストロフィー変化が改善した。

#### D . 考察

我々が得たスキッピング効率は最大 72%であり、Arechavala-Gomezら<sup>6</sup>が *Humanized DMD* マウスを用いて示したスキッピング効率 (22%) よりも高い可能性がある。今後は、高いスキッピング効率を生かして、ロタロッドや筋張力測定により治療後の *mdx52* マウスの筋機能評価を行う予定である。また、エクソン・スキッピングの臨床応用を念頭に、エクソン内に設計した PMO を用いた全身投与実験を計画中である。

#### E . 結論

PMO を用いた *mdx52* マウスに対するエクソン 51 スキッピングにより、全身の骨格筋でジストロフィンの発現が認められたことから、ジストロフィン遺伝子欠失を有する DMD 患者の約 20%に対してエクソン 51 スキッピングが有効な治療法となる可能性がある。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### I. 論文発表

<英文>

1. Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K. & Ozawa, K.  
Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea.  
*Mol Ther.* (in press)
2. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K. & Ozawa, K.  
Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats.  
*J Gene Med.* (in press)
3. Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H. & Kume, A.  
Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs).  
*J Autoimmun.*(in press)
4. Okada, T.  
Vector-producing mesenchymal stem cells for cancer gene therapy.  
*Gene Therapy and Cancer Research Focus.* (in press)
5. Okada, T. and Ozawa, K.  
Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy.  
*Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008.

6. Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kobayashi, E. and Morita, T. Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems. *Urology* 70: 1230-1236, 2007.
7. Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K. & Ozawa, K. Interleukin-10 Expression Mediated by an Adeno-Associated Virus Vector Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circ Res*, 2007.
8. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K. & \*Ozawa, K. Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-536, 2007.
9. Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K. & Xiao, S. Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp Mol Med* 39: 170-175, 2007.
10. Nakata, M., Okada, T., Ozawa, K. & Yada, T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 1046-1051, 2007.
11. Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S. & Ozawa, K. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19: 75-79, 2007.
12. Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M. & Ozawa, K. Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120: 278-284, 2007.
- 【和文総説】
1. 岡田尚巳  
癌幹細胞の同定法  
がんの浸潤・転移研究ハンドブック  
(in press)
1. 岡田尚巳、武田伸一  
遺伝子導入「筋ジストロフィー-現在未  
来」  
Clinical Neuroscience 26巻2号, 204-206,  
2008.
2. 学会発表  
<国外>
1. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., and Ozawa, K.: AAV vector-mediated sustained expression of prostacyclin synthase ameliorates obesity in Zucker fatty rats. American Society of Gene Therapy's 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
2. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita,

- T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.:  
Retroviral producing mesenchymal stem cells for tumor tracking and therapeutic gene amplification as systemic suicide cancer gene therapy.  
American Society of Gene Therapy' s 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
3. Shin-ichi Muramatsu, Hiroko Nishida, Yuko Nara, Naomi Takino, Sayaka Asari, Mika Kodera, Wei-zhong Xiao, Yasuo Sasaki, Satoru Kikuchi, Takashi Matsushita, Takashi Okada, Minako Hoshi, Imaharu Nakano, Keiya Ozawa:  
AAV8 Vectors Transduce Oligodendrocytes Efficiently.  
American Society of Gene Therapy' s 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
  4. Akihiro Kume, Takasahi Matsushita, Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Takashi Okada, Keiya Ozawa:  
Long-Term Efficacy of a Self-Complementary Adeno-Associated Virus Vector for Phenylketonuria Gene Therapy.  
American Society of Gene Therapy' s 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
  5. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
rAAV Type 8-Mediated Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of Deficient Mice-Sarcoglycan.  
American Society of Gene Therapy' s 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
  6. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Distinct Transduction Profiles in the Dystrophic Dogs with rAAV Serotype 8.  
American Society of Gene Therapy' s 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
  7. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., and Ozawa, K.:  
Sustained expression of prostacyclin synthase by an intramuscular injection of an AAV vector attenuates obesity in Zucker fatty rats.  
The 13th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
  8. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.:  
Tumor tracking and therapeutic gene amplification by using retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer gene therapy.  
The 13th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
  9. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Safe and extensive rAAV8-mediated alpha-sarcoglycan transduction of the limb-girdle muscular dystrophy type 2D model mice.  
The 13th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
  10. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Effective microdystrophin gene delivery into the dystrophic dogs with rAAV serotype 8.  
The 13th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
  11. Jin-Hong Shin, Sachiko Ohshima, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Efficient systemic delivery of rAAV8 into dystrophic animals by subcutaneous injection.  
The 13th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007.
  12. Sachiko Ohshima, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Katsutoshi Yuasa, Hiroyuki Nakai, Akinori Nakamura, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Transduction profile and immune response in the dystrophic dogs with rAAV serotype 8.  
15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy,

Rotterdam, Netherlands, October 27-30, 2007.

13. Akiyo Nishiyama, Beryl N. Ampong, Jin-Hong Shin, Hiroyuki Nakai, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda:  
Extensive alpha-sarcoglycan expression by intramuscular and intravenous administration of rAAV type 8.  
15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, Netherlands, October 27-30, 2007.

<国内>

1. 内堀亮介、岡田尚巳、松下卓、卜部匡司、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也。  
ベクター産生型間葉系幹細胞の開発と癌治療への応用。  
第5回幹細胞シンポジウム 2007年5月17日-19日、淡路
2. 内堀亮介、岡田尚巳、伊藤孝幸、卜部匡司、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也。  
ベクター産生型間葉系幹細胞の開発と自殺遺伝子療法への応用。  
第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

岡田尚巳、小澤敬也

ベクター産生型腫瘍標的細胞

PCT/JP2007/50013、平成19年1月5日出願

伊藤章、花園豊、岡田尚巳、小澤敬也

アデノウイルス吸着架橋剤

Agents for adsorption and bridging for adenovirus

米国特許 US 7238777 B2, Jul. 3, 2007 成立

2. 実用新案登録なし

3. その他、特記事項なし