

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 伸一

平成 20 (2008) 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	----- 20
武 田 伸 一	
2. レンチウイルスベクターを用いた筋幹細胞に対するex vivo 遺伝子導入法の確立	----- 28
鈴 木 友 子	
3. 筋ジス犬劇症型の病態機序の解明に関する研究	----- 32
中 村 昭 則	
4. 骨髄間質細胞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	-- 34
岡 田 尚 巳	
5. 骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導	----- 40
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	----- 45
鍋 島 陽 一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 48
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51

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
	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
	出澤 真理	京都大学大学院医学研究科 准教授
	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。我々は、ヒトおよびげっ歯類の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大型哺乳類での筋変性モデルでの有効性と安全性の検証を行なう。(以上、出澤、鍋島)
2. CD271 陽性細胞に着目した増殖効率の高い間葉系幹細胞の調製法とアデノウイルスベクター系と MyoD を利用した分化誘導スイッチを開発した。これを用いて大量の間葉系幹細胞を分化誘導することが可能であり、dog leukocyte antigens (DLA) の match した同種移植にて移植細胞の生着が確認された。また、IL-10 発現 AAV ベクターの併用によって局所的な免疫制御が可能であり、免疫抑制剤の全身投与による副作用を回避できることが示唆された。本研究で開発した培養および分化誘導技術は前臨床的試験に用いる移植細胞の調製に極めて有用であり、細胞治療における有効性と安全性が期待される。(以上、岡田、武田)
3. 筋ジストロフィー犬の血清 CK 値は出生時が生涯を通じて最も高く、生後 2 週間以内の死亡率は約 3 割以上に達する。原因として胎児への分娩のストレスが考えられたことから、予定的帝王切開を導入し、筋ジストロフィー犬の血清 CK 値および死亡率に与える影響について検討したところ、帝王切開群で有意な低下は見られなかった。そこで、帝王切開後の臍帯血と蘇生後の静脈血を用いて血清 CK 値を測定したところ、筋ジストロフィー犬では、蘇生後静脈血の血清 CK 値が臍帯血に比べ約 230 倍にも増加することが分かった。これは、肺呼吸の開始に伴い呼吸筋に高度の負荷が掛かることを示唆している。(以上、中村)
4. 筋ジストロフィー犬に対する MRI を用いた画像解析法について、chemical shift selective (CHESS) 法と T2WI を組み合わせると、特異的に壊死病変を検出できるこ

とが明らかになった。この方法を用いて、今後、筋ジストロフィーの治療効果の判定を進めることが可能である。(以上、武田)

5. DMD モデルである mdx マウスから FACS にて筋衛星細胞を調整し、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、新生仔 mdx マウス前脛骨筋へ移植し、5 週間後に移植効率を解析した。ジストロフィンの発現が回復した筋線維では有意に中心核線維数が減少していた。そこで更に治療効果を上げるために、より機能的に優れていると思われるベッカー型筋ジストロフィー由来のミニジストロフィンを組み入れたレンチウイルスベクター作製を行った。(以上、鈴木)

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。ES 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。最近、我が国の研究者による顕著な研究成果として確立された iPS 細胞については、生体皮膚の fibroblast から採取可能であり、胎児を要しない点に特徴がある。しかし、iPS 細胞を誘導するためには、4 ないし 3 の遺伝子導入を要することから、再生医療への応用にあたっては、腫瘍化の否定など安全性の確保のために多くの課題を解決する必要がある。それらの細胞と比べて組織幹細胞の供給源である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、出澤らの方法を筋ジストロフィー犬に応用して将来的に DMD への応用を図ると共に、より効率良く骨髄間

質細胞を筋細胞に分化させる方法に関しても、アプローチすることにした。

移植用のモデル動物として使用する筋ジストロフィー犬 (CXMD₁) 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が、出生直後の血清 CK 値が極めて高い値を示し、生後 2 週間以内の新生子期の死亡率が 30% 以上と高い。剖検では、四肢骨格筋や心筋には明らかな異常はないものの横隔膜や肋間筋に高度の壊死・変性の所見が認められた。娩出時のストレスが関与している可能性を考えて予定的帝王切開を導入した。血清 CK 値は帝王切開群の正常犬、保因犬で有意に減少したものの、筋ジストロフィー犬では低下しなかった。またいずれのイヌの死亡率も両群で差は見られなかった。そこで、昨年よりさらに 10 回の帝王切開術を追加して同様に検討を行い、その中の 9 分娩について肺呼吸の開始の影響を検討するため、蘇生前の臍帯血と蘇生後の静脈血の血清 CK 値について比較した。

筋ジストロフィー犬 (CXMD₁) について効率的な移植を可能とするために、dog leukocyte antigens (DLA) のタイピングと、DLA が match した個体を見出すための検討を行った。又、筋ジストロフィー犬を治療に対するモデル動物として使用するためには、その評価系を確立することが重要である。そこで、今年度は MRI を用いた評価法についても検討を進めた。

最後に、幹細胞を調整してジストロフィン遺伝子を導入し、患者自身に移植する

autologous cell transplantation の確立するためには、レンチウイルスベクターを用いたジストロフィン遺伝子の導入法が必要であるので、並行して検討を行った。

B. 研究方法

1. 骨髄間質細胞からの筋細胞誘導

1-1 Notch 遺伝子を用いた筋細胞誘導

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。

誘導細胞の性質を調べるために FACS において CD34, CD45, c-Kit 陰性の細胞を採取し同様に筋誘導を来ない解析した。

さらに誘導した細胞における骨格筋マーカーの発現を real-time PCR, 免疫染色等で検証を行なった。また誘導骨格筋の安全性を確認するために、核型解析によって染色体の変異、欠損等の有無を調べ、さらに、ヌードマウスの大腿筋にヒトからの誘導細胞を注入し、6 ヶ月後に全身状態と病理検査を行い、腫瘍形成などの有無を確認した。

骨格筋が誘導されるメカニズムの解析として、ラットおよびヒトでの骨髄間葉系細胞に bFGF, FSK, PDGF, Neuregulin を投与し NICD-GFP plasmid を導入して 24 時間後に細胞を採取し、GFP の免疫沈降を行い、Notch に特異的に結合する蛋白の解析を行なった。

1-2 Notch 結合蛋白質の検索

筋細胞への分化転換の鍵は Notch の役割を解明することであり、その一環として Notch に結合する蛋白の解析を進めた。骨格筋誘導に必要な領域がアンキリンドメインであったことから、このドメインと

GFP キメラ蛋白を発現させ、結合蛋白の候補を免疫沈降により分離し、質量分析により解析を進めている。

2. 新たな筋細胞の誘導法とその移植

2-1 骨髄間質細胞からの新たな筋細胞の誘導法

分化誘導スイッチとして、一過性の遺伝子発現を行うアデノウイルスベクターが有用と考え、組換えアデノウイルス Ad.MyoD を構築した。ラットおよびイヌ由来間葉系幹細胞に MyoD 発現ベクターを感染させ、免疫染色により、筋分化マーカーである myogenin および alpha-actinin の発現を確認した。精製した組換えアデノウイルス Ad.MyoD を、MOI=1、20 pfu/cell(MOI)の条件にて、2 時間、SD ラットおよびイヌ由来間葉系幹細胞に感染させ、4 日後に免疫染色にて筋分化マーカー myogenin および α -actinin の発現と筋管形成を確認した。

2-2 局所的な免疫抑制法の確立

IL-10 を用いた移植効率の改善を目的として、mdx-mouse への移植実験を試みた。骨髄間質細胞に eGFP ないし MyoD 発現ベクターを導入し、移植前日に cardiotoxin 導入した。移植の際には、抗アポトーシス効果および抗炎症作用を有する IL-10 発現 AAV ベクターを細胞と同時に筋注した。2.5 $\times 10^5$ 個の細胞を大腿と下腿に移植し、3 日ないし 10 日後に筋肉を採取した。

2-3 イヌ骨髄細胞から間葉系幹細胞を調製する新たな方法の確立

イヌを用いた移植実験において効率よく必要数の移植細胞を調製するために、骨髄細胞から増殖能力の高い間葉系幹細胞を分離した。マウスとヒトの細胞では、CD271 陽性の骨髄間質細胞の増殖能が非常に高いことが知られていることに着目し、その応用を試み

た。正常犬から骨髓細胞を採取し、MACS (magnetic cell sorting) を用い、磁気ビーズによって CD271 陽性細胞を濃縮した。その後、CD271 陽性細胞と陰性細胞を培養し細胞数を経時的に計測した。

2-4 DLA のタイピングの検討

骨髓由来間葉系幹細胞を高い効率で移植するためには、免疫応答を考慮して移植を実施する必要がある。イヌにおける同種移植については、dog leukocyte antigens (DLA) を適合させることにより、免疫応答を抑制させることが可能と報告されている(Dell 'Agnola *et al.*, Blood 104: 4311-19, 2004)。DLA を適合させた個体間での移植を行うために、まず DLA のタイピングを行った。MHC class II に分類される DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1 の各アレルには、HVR (hyper variable regions) と呼ばれる多様性の高い領域が各三箇所存在し、その各々の塩基配列が合致すると、細胞移植時の免疫応答を抑制させることが可能となる。そこで、当施設で飼育しているビーグル犬の血液よりゲノムを抽出し、これらの (DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1) 領域に関し、各個体それぞれの塩基配列を比較することにより、DLA の適合を判断した。

2-5 DLA 適合個体間の移植

前項で、DLA のタイピングを行って DLA が適合した犬について、正常犬由来細胞を用い正常犬への同種移植を実施した。骨髓由来間葉系幹細胞に eGFP 発現レトロウイルスベクターおよび MyoD 発現アデノウイルスベクターを導入し、 1×10^6 個の細胞をエコーガイド下に左右の ECU に移植した。

3. 筋ジストロフィー犬に関する検討

3-1 新生子の解析

2002 年 7 月から 2008 年 2 月までに行なわれた 39 分娩の中で、自然分娩中に帝王切開に切

り替えた 4 分娩および多数の胎内死亡を認められた 1 分娩を除いた計 35 分娩(自然分娩 20 回、帝王切開 15 回)について、正常犬(自然分娩 71 頭、帝王切開 35 頭)、保因犬(自然分娩 37 頭、帝王切開 24 頭) および筋ジス犬(自然分娩 41 頭、帝王切開 29 頭) を対象とした。娩出子の蘇生中の全身管理にはマスクによる酸素の投与と心拍数モニターを行い、心拍数が低い場合は硫酸アトロピンを、十分な呼吸ができない場合には呼吸促進剤を投与した。また、娩出後の臍帯血と蘇生後 30 分~1 時間以内の静脈血を採取し、血清 CK 値を測定した。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統計学的に解析した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3-2 MRI による検討

3 ヶ月齢及び 7 歳齢の正常ビーグル犬及び筋ジス犬各 1 頭を用いた、撮像前にチオペンタールナトリウムを静注し、イソフルランの吸入で維持麻酔を行った。

Siemens 社製 3.0 Tesla MRI 装置及びヒト用脛コイルを使用し、下腿に T1 強調画像

(T1WI)、T2 強調画像 (T2WI)、脂肪抑制 T1WI (CHESS-T1WI)、脂肪抑制 T2WI

(CHESS-T2WI)、T2 緩和時間測定、Gd-DTPA を用いた造影 T1WI (Gd-T1WI) 及び脂肪抑制造影 T1WI (CHESS-Gd-T1WI) を撮像した。

3 ヶ月齢の右側の前脛骨筋 (TA) 及び長趾屈筋 (FDL) に、3 点の関心領域を設定し、T2 緩和時間、CHESS-T1WI・CHESS-Gd-T2WI における信号強度 (SI) と background noise の SI の標準偏差 (SDair) を測定し、信号雑音比 (SNR) および造影剤増強率を算出した：

$SNR = SI / SD_{air}$, 造影増強率 = $CHESS-Gd-T1WI \text{ SNR} / CHESS-T1WI \text{ SNR}$ 。各筋の T2 の緩和時間、造影剤増強率および CHESS-T2WI SNR の有意差検定には two-way ANOVA Bonferroni / Dunn's post-hoc test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. レンチウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子治療

4-1 細胞の調整

GFPトランスジェニックマウス及び*mdx*マウスの骨格筋組織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抗体で染色してセルソーターで筋衛星細胞を分離した。

4-2 レンチウイルスベクターの調整と*ex vivo* 遺伝子導入

ヒト由来マイクロジストロフィン及びミニ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ヘルパープラスミドを293T細胞に導入しウイルス粒子を調整した。*in vitro*で、*mdx*マウス由来筋衛星細胞へ感染させた。

4-3 細胞移植

6日齢、10日齢の*mdx*マウスの前脛骨筋にシリンジを用いて遺伝子導入後の筋衛星細胞を直接移植した。5週間後、筋の凍結切片を抗ヒトジストロフィン抗体(Dys3)あるいはGFP抗体で染色し、移植効率を評価した。また、H.E.染色を行ない中心核線維の割合を算出した。

(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筋細胞誘導

1-1 Notch遺伝子を用いた筋細胞の誘導

ヒトおよびラット骨髄間葉系細胞にbFGF, フォルスコリン, neuregulin およびPDGFを含

んだ培地で培養すると、この段階で筋肉発生の初期に認められるPax7が発現しており、筋前駆細胞様に分化したと考えられた。この細胞にNICDを導入すると骨格筋細胞へと分化転換し、MyoD, myogeninなどの骨格筋特有のマーカの発現が認められる。さらに分化培地(2%ウマ血清を含むDMEM培地、あるいはITS medium (Insulin-Transferrin-Selenate))に切り替えることにより、一部の細胞が融合を開始し、成熟した多核の筋管細胞に分化し、Myosin-heavy chain, skeletal myosin, troponinなどの細胞骨格蛋白と共に成熟マーカーとして知られているMRF4/Myf6も発現するようになる。これらのことから、本誘導は筋肉発生と類似した機構によって骨髄間葉系細胞から骨格筋が誘導されているものと思われた。この分化した最終産物には増殖可能な①単核の筋芽細胞(MyoD陽性)、②骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞(Pax7陽性)、そして③成熟した多核の骨格筋細胞の3種類の骨格筋系譜の細胞が含まれていた。

骨髄には造血系幹細胞の中には一部、筋系の幹細胞の存在が示唆されている。我々は本誘導がこれらの極く少数の幹細胞から分化したのか、あるいは接着性の大量に増殖している骨髄間葉系細胞から分化したのかを調べるためにCD34, CD45, c-kit陰性の細胞をFACSによって分離し、同様の誘導操作をおこなったところ、同様の時間経過で多核の成熟した骨格筋を誘導することが出来た。従って、本誘導は骨髄間葉系細胞に含まれる極一部の筋系幹細胞が分化したものではなく、大多数を占める接着性の骨髄間葉系細胞から誘導されるものと考えられた。

健常犬のビーグル犬骨髄液から骨髄間葉系細胞を誘導したところ、ヒトおよびラットと同様にPax7, MyoD, Myogenin陽性の骨格筋系細胞群を得ることが出来た。骨格筋マーカの発現を定量的に調べるためにヒトおよびビーグル犬から誘導した細胞におけるMyoD, Pax7, Myogenin, MEF2Aの発現を検討した。その結果、誘導前の無処理の細胞では、ヒト、イヌいずれにおいてもMyoD, Pax7, Myogeninの発現は見

られず（ただし MEF2A は発現が認められる）、誘導に伴って顕著な定量的上昇が確認された。免疫染色においてもほぼ同様の傾向が見られた。

安全性の確認としてヒトおよびイヌから誘導した細胞の核型検査を行なった。その結果、いずれのサンプルにおいても染色体の欠損、転座などの変異は認められないことが確認された。

また腫瘍形成の有無をみるために、ヒトから誘導した細胞（donar #1 (n=10), #2 (n=7) いずれも 10～50 万細胞）、positive control としてヒト腫瘍性細胞である rhabdomyosarcoma (10～50 万細胞, n=10), negative control として PBS (n=10) を注入し、6 ヶ月間体重推移、全身状態の観察および移植 6 ヶ月後の全身および移植した大腿筋の病理検査を行なった。その結果、rhabdomyosarcoma では 2 匹で死亡、2 匹で腫瘍形成が認められたが PBS では全匹異常がなかった。さらに donar #1, #2 から誘導したヒトの細胞でも全く異常がみられず、病理変化でも腫瘍形成は認められなかった。

1-2 Notch 結合蛋白質の検討

骨髄間質細胞にサイトカイン投与後、NICD、ラムドメイン、アンキリンドメイン、転写活性化ドメインを個別に発現させ、筋細胞分化誘導活性を測定したところ、アンキリンドメインに基本的な活性があることが明らかとなった。そこで、NICD-GFP、アンキリン-GFP からなるキメラ蛋白を発現させ、抗 GFP 抗体により免疫沈降を行った。次いで、得られた沈降物を SDS ゲル電気泳動で分離し、コントロールと比較し、特異的に見いだされるバンドを切り出し、質量分析にて解析した。多数の候補蛋白がノミネートされているが、その中のどれが中心的な役割を担っているか結論が得られていない。また、アンキリン-GFP キメラ蛋白を多量に合成し、アフィニティカラムを作成し、細胞抽出液をかけて結合する蛋白を回収し、質量分析を進めている。

骨髄間質細胞から分化転換によって誘導された筋細胞分画には多核の筋管細胞、筋芽細胞、筋衛生細胞が含まれており、筋衛生細胞を分離増殖させることが重要と考えており、効率的に精製する方法を検討し、新しい方法の確立にとって重要な点が明らかになりつつあり、2008 年度中には確立できると考えている。

2. 新たな筋細胞の誘導法とその移植

2-1 骨髄間質細胞からの効果的な筋前駆細胞の誘導法

MyoD 発現ベクターを構築し、ラットおよびイヌ由来由来間葉系幹細胞を用いて、筋分化誘導効果を検証した。 α -actinin 陽性で、かつ形態的に多核の筋管細胞が形成されることが確認された。この結果から、筋分化誘導因子 MyoD を強制発現することにより、従来法に比べて短期間で簡便に、大量の細胞を一度に高い効率で筋分化誘導できることを確認した。

2-2 局所的な免疫抑制法の確立

移植した細胞の存在は、eGFP 抗体による免疫染色にて確認した。その結果、組織障害の強い部位に移植細胞が巣状に局在することが観察された。また、IL-10 導入により、生着効率が約 4 倍高くなることが示された。

2-3 イヌ骨髄細胞から間葉系幹細胞を調製する新たな方法の確立

骨髄細胞採取直後に CD271 陽性細胞を分離し、得られた間葉系幹細胞の増殖効率を比較した。CD271 陽性細胞を用いることで、簡便かつ大量に増殖能の高い細胞を調製出来ることが示された。CD271 陰性細胞に比べ、陽性細胞では培養開始後 20 日前後で約 25 倍の増殖が認められた。この際、両細胞間で形態の差異は認められず、CD271 陽性分画の骨髄間質細胞の増殖能は、陰性分画に比べ有意に高いことが確認された。

2-4 DLA のタイピングの検討

DLA のタイピングを行った結果、保因犬雌 2 頭と純系ビーグル犬雄 1 頭が 100% 適合した。そこで、これらの犬を用いて交配を行ったところ、正常犬 4 頭、保因犬 2 頭、患犬 2 頭が得られた。得られた個体間で同様に塩基配列を比較したところ、全てが適合していた。

2-5 DLA 適合個体間の移植

DLA のタイピングを行った結果、DLA が適合していた個体が得られたので、これらの個体間で細胞移植を行うこととし、まず正常犬由来細胞を用いて正常犬への同種移植を実施した。骨髄由来間葉系幹細胞に eGFP 発現レトロウイルスベクターおよび MyoD 発現アデノウイルスベクターを導入し、エコーガイド下に、左右の ECU に移植した。この際、移植期間中は免疫抑制剤 Mycophenolate mofetile と Cyclosporine を服用させた。移植 3 日ないし 10 日後に筋生検を行い、eGFP 抗体による免疫染色にて移植細胞を確認した。移植 10 日後の組織でも、移植細胞の生着を確認した。

3. 筋ジストロフィー犬に関する検討

3-1 自然分娩と帝王切開の血清 CK 値の比較

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: 2,817±293 および 954±138、保因犬: 8,028±1,990 および 1,490±281、筋ジス犬: 278,778±46,751 および 177,075±29,443 であった。正常犬 ($p < 0.0001$)、保因犬 ($p = 0.0025$) では両群間に有意差が認められたが、筋ジス犬には有意差はなかった ($p = 0.0706$)。

3-2 自然分娩と帝王切開の新生子死亡率

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: 5.6% および 2.9%、保因犬: 2.7% および 2.9%、筋ジス犬: 36.6% および 27.6% であった。いずれの群においても、自然分娩と予定的帝王切開の間に統計学的有意差は認められなかった。

3-3 臍帯血と蘇生後の血清 CK 値の比較

臍帯血および蘇生後の静脈血における各群の血清 CK 値 (U/l) (平均±標準誤差) はそれぞれ、正常犬群: 522±103、591±84、保因犬群: 1,182±508、1,357±380、筋ジス犬群: 2,001±426、

123,351±27,580 であった。各群の臍帯血と静脈血の血清 CK 値を比較すると、筋ジス犬の臍帯血の血清 CK 値は正常犬と比較して 4 倍に増加 ($p = 0.0036$) していた。また、筋ジス犬の蘇生後静脈血の血清 CK 値は臍帯血の 230 倍にも上昇 ($p = 0.0005$) していた。

3-4 MRI による検討

(1) 3ヶ月齢の正常犬および筋ジス犬

a. 下腿 MR 画像

筋ジス犬の T1WI では正常犬と比較し、顕著な信号強度の差はなかった。T2WI では、筋ジス犬の EDL、腓腹筋 (GAS) および浅趾屈筋 (FDS) で高信号領域が認められたが、TA の信号変化は軽度であった。CHESS-Gd-T1WI や CHESS-T2WI では、T2WI で高信号を示した領域と一致して、増強効果及び高信号領域が認められた。

b. TA・EDL の MR 信号解析

正常犬の TA・EDL と比較し、筋ジス犬の TA・EDL は T2 緩和時間・造影剤増強率・CHESS-T2WI SNR が有意に増加していた。また、全ての解析方法で、筋ジス犬では TA よりも EDL で有意に高値を示した。

(2) 7歳齢の正常犬および筋ジス犬

a. 下腿 MR 画像

筋ジス犬の T1WI では正常犬と比較し、TA および EDL において T1WI で強い高信号、脂肪抑制 T1WI で抑制される領域を認め、脂肪浸潤が示唆された。T2WI や Gd-T1WI では、EDL、FHL、FDL、GAS および FDS で高信号または信号増強を認めたが、T1WI で脂肪浸潤が疑われた TA でも高信号が認められた。CHESS-Gd-T1WI や CHESS-T2WI では、TA や EDL で示唆された脂肪浸潤領域の信号が抑制され、FDL や FHL では T2 高信号領域および増強領域が描出された。

b. TA・FDL の MR 信号解析

正常犬の TA や FDL と比較し、筋ジス犬の TA や FDL は T2 緩和時間および造影剤増強率が有意に増加していた。一方、筋ジス犬の TA

の CHESS-T2WI SNR は、正常犬の TA と比較し、有意な増加はなかった。またこの3つの解析方法で、筋ジストロフィーの TA よりも FDL の法が有意に高値を示した。

4. ex vivo 遺伝子治療に関する検討

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筋衛星細胞を6日齢及び10日齢の mdx マウス骨格筋へ移植すると、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。マイクロジストロフィン陽性筋線維のほとんど (>90%) は辺縁核線維であるのに対し、コントロールでは 60-70% 程度であった。マイクロジストロフィンは筋の変性・壊死を防ぐ機能があると考えられた。しかし、今回行なった新生仔 mdx マウスへの移植実験では、以前報告した成体への移植より (Ikemoto et al., 2007)、ジストロフィン陽性線維の割合は低かった。

D. 考察

1. Notch 遺伝子を用いる骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導法について

骨髄間葉系細胞は再生医療に用いる候補として多くの利点があるために、本研究で見出された方法(出澤による方法)は筋ジストロフィーの治療方法につながる可能性が期待される。我々の方法ではヒト、ラットのみならず、イヌなどの高等哺乳類の骨髄間葉系細胞からも誘導されていることから、本誘導法は汎用性の高い方法であると同時に「自己細胞移植治療」への発展が期待される。ただし、筋ジストロフィーは遺伝子変異があるために、おそらく近親者や同じ HLA サブタイプの骨髄間葉系細胞を利用した同種移植が現実的であろうと思われる。

安全性はヒトへの応用において重要な要点であるが、誘導細胞の核型検査やヌードマウスでの腫瘍化試験の結果、際立った危険性は無

いと推察される。さらに犬での有効性・安全性の確認はヒトへの応用に向けて非常に大きな意義があると考えられ、今後の推進すべき課題として認識している。

一方、出澤による方法で key となっている Notch は Hes の発現を誘導して分化を抑えると考えられてきたが、本誘導システムでは Notch が筋細胞、神経細胞への分化を誘導するシグナルとなっており、しかもアンキリンドメインのみでもゆうどうできる事実は Notch にはこれまで知られていない未知の機能があることを示唆しており、極めて興味深い。

2. 骨髄間質細胞から筋細胞を誘導する新たな方法について

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。本年度は、分担研究者である岡田らと協力して骨髄間質細胞から、CD271 抗体を利用して間葉系幹細胞を濃縮し、安全性の高い MyoD 遺伝子を用いて筋細胞を誘導する方法を確立したが、最近 iPS 細胞が確立されたため、iPS 細胞の確立のために得られた知識をも動員して研究を進める必要がある。また、この細胞を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必要がある。今回の研究で、DLA の match した個体が得られ、移植実験を行うことができたが、その効率はずしも高いとは言えないので、更に効率の高い方法を模索したい。

3. 移植用モデル動物としての筋ジス犬について

筋ジス犬では、予定的帝王切開術の回数を増やしても血清 CK 値および死亡率には有意な変化は認められなかったことは、その他に因子が関与していることを示唆している。DMD 胎児の臍帯血 CK 値が高値であること、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が、筋ジス犬の臍帯血 CK 値も正常犬や保因犬と比べてわずかではあるが有意に増加していた。このことは、胎内においても既に筋壊死が起こっている可能性を示唆している。しかし、筋ジス犬では蘇生後静脈血の血清 CK 値が臍帯血の 230 倍にも増加していたことは、剖検所見も併せて考えると、肺呼吸の開始が呼吸筋の急激な筋壊死を誘発させている可能性が考えられる。今回、筋ジストロフィーの病態として、機械的障害説を裏付ける重要な結果が得られたが、筋ジス犬における病態機序の解明や治療の開始時期を検討する上での重要な知見であると考えられた。

一方、筋ジス犬の MRI に関する評価については、従来、壊死病変の検出には Gd-BSA を用いた造影剤による増強効果が頻用されてきた。しかし、この方法は侵襲性もあり、間質に対する増強効果を過大評価する可能性も高い。その点、本研究で用いた chemical shift selective (CHESS) による脂肪抑制は、非侵襲的であり、特異的に壊死病変を検出できる可能性が高い。今後の筋ジストロフィー犬の治療評価のみならず、臨床での応用も期待される。

4. レンチウイルスベクターを用いた ex vivo 遺伝子治療について

レンチウイルスベクターは組み込める遺伝子が約 9 kb と大きいので、今後はマイクロジストロフィン (4.9 kb) より機能的に優れているミニジストロフィン (6.3 kb) を組み替えて、

治療用遺伝子としていく。

幼若な mdx マウスへの移植実験では、成体へ移植したときより (Ikemoto et al., 2007)、ジストロフィン陽性線維の割合は低かった。生後間もない mdx マウスの筋衛星細胞は、まだ高い増殖能を維持しており、マウスの成長過程で活発に増殖し、ジストロフィンを導入した筋衛星細胞と競合したと考えられる。さらに、移植した細胞が自己複製能を持つ筋衛星細胞となる効率は低い可能性がある

ジストロフィン陽性線維 (Dys3 陽性線維) の殆どは (>90%) 辺縁核線維であったことから、マイクロジストロフィン (4.9 kb) は筋線維の変性壊死を阻止する効果があると判断された。

E. 結論

1. 骨髄間質細胞から、骨格筋を効率よく誘導する実用性の高い方法を見出した。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. CD271 陽性細胞を用いた効率の良い骨髄間葉系細胞の選択法及び MyoD を用いた分化誘導技術を確立した。

3. 筋ジス犬コロニーについて、dog leukocyte antigens (DLA) の検索法を確立し、DLA の match した個体間の移植を行うことが可能になった。

4. 筋ジス犬では、予定的帝王切開の導入でも死亡率・血清 CK 値は低下しなかったが、臍帯血と蘇生後の血清 CK 値とを比較検討した結果、胎盤呼吸から肺呼吸への移行により呼吸筋に対する過度のストレスが起こるために筋壊死が誘発され、その結果、呼吸不全が生じた可能性がある。

5. 筋ジス犬の MRI を用いた画像評価法について、CHESS-T2WI の有効性を見出した。

6. Autologous stem cell transplantation の実現のためには 1) 効率がよく安全な遺伝子導入法と、2) 筋再生に効率よく参加する幹細胞の調整方法が重要である。レンチウイルスベクターは 1) の条件を満たしていると考えられるが、長期の発現と安全性を確認していく必要がある。

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. 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 $\alpha 2$ 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.
13. 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)
14. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, 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)
15. 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)
16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun.* 359: 915-920, 2007.
24. Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C. Administration of Bone Marrow-Driven Mononuclear Cells After Spinal Cord Injury Suppresses Cavity Formation and is Followed by Functional Recovery. *J Neurotrauma* 24: 1026-1036, 2007.
25. Ishikawa N, Suzuki Y, Ohta M, Cho H, Suzuki S, Dezawa M, Ide C. Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge. *J Biomed Mater Res A.* (in press) 2007
26. 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. Naoki Suzuki, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda.
Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.
Future Neurology. January 2007, Vol. 2(1), 87-96.
2. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S (2007) Side Population (SP) cells and skeletal muscle differentiation. Recent advances of skeletal muscle differentiation, *Reserach Signpost*
3. Okada, T.
Vector-producing mesenchymal stem cells for cancer gene therapy.
Gene Therapy and Cancer Research Focus. (in press)
4. Okada, T. and Ozawa, K.
Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy.
Front Biosci 13: 1887-1891, 2008.
5. Dezawa M, Nabeshima Y-I.
Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy.
“Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation” in *Research Signpost* (in press)
6. Dezawa M
Induction system of neuronal and muscle cells from bone marrow stromal cells and applications for degenerative diseases.
Inflammation and Regeneration, 27(2), 96-101, 2007.
7. Dezawa M.
The unexpected discovery of neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells; insights into auto-transplantation therapy.
Medical Molecular Morphology (in press)
8. Kidata M & Dezawa M.
Differentiation system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases
Histology and Histopathology (in press)

<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
3. 出澤真理
骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞の誘導
田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK (in press)
4. 出澤真理、
骨髄間葉系細胞からの神経細胞の誘導
田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK (in press)

【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.
 7. 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)
 8. 国府田正雄、出澤真理
骨髄間葉系細胞を用いた脊髄損傷修復の
試み 脳 2 1 10 (2); 144-147, 2007
 9. 石川裕人、出澤真理
視神経移植とは 「視覚と眼球運動のすべて」
メディカルビュー社p. 216-221, 2007
 10. 出澤真理
骨髄間葉系細胞を用いた筋ジストロ
フィーへの再生医療の可能性 *BRAIN*
and *NERVE*-神経研究の進歩 59; 503-508,
2007
 11. 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」52 (2) :
158-165, 2007.
 12. 出澤真理
骨髄間葉系細胞からの神経・骨格筋系
細胞の誘導 再生医療 16: 19-25
2007
 13. 北田容章 出澤真理
神経・筋変性疾患における細胞移植治
療；骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞
移植への可能性 *Clin Neurosci*, (in
press)
- ## 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 α -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 Mtohashi, 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:
Hdac1l 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 α -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. Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda:
MRI imaging, Clinical trial endpoints discussions,
Annual Meeting Muscular Dystrophy Programs, Washington DC, March 2008
17. Yoshitugu Aoki, Shin'ichi Takeda:
Multi-exon skipping, Pre-clinical discussion of potential interventions,
Annual Meeting Muscular Dystrophy Programs, Washington DC, March 2008
18. 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 10th Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
19. 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 10th Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
20. 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 10th Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
21. 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 10th Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 30-June 3, 2007.
22. 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.
23. 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.
- <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 α -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、兵庫県、5.17-19, 2007
 6. 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

7. 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
8. 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 α -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
9. 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
10. 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
11. 増渕菜弥、宮本香織、花岡和則、遠藤玉夫、鈴木友子、武田伸一
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
12. 鈴木友子、不動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 \square 「不動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

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. 高橋明男、小林正典、中村昭則、武田伸二、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
5. 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
6. 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。