

200833018A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 伸 一

平成21(2009)年 3月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 伸 一

平成21(2009)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		
武田 伸一	-----	1
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		
武田 伸一	-----	21
2. レンチウイルスベクターを用いた筋前駆細胞に対する ex vivo 遺伝子導入に関する研究		
鈴木 友子	-----	30
3. 新生仔筋ジストロフィー犬の血清 CK 高値の機序の解明		
中村 昭則	-----	33
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		
岡田 尚巳	-----	36
5. 骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導		
出澤 真理	-----	41
6. 骨髄間質細胞から誘導した筋細胞の移植法の確立		
鍋島 陽一	-----	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49
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	東北大学大学院医学系研究科	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。誘導された筋細胞の移植による生着率、効果の確認、ガン化などの安全性の確認を進める共に、骨髄間質細胞からどのような機構で筋肉細胞が誘導されるかについての理解が細胞治療の可能性を更に発展させると考え、その分化転換機構の解析を進めた。
- 2) 増殖効率の高い間葉系幹細胞の調製法とベクター系を利用した新たな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、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。更に、動脈内からの細胞投与によって、骨格筋内の広い範囲への細胞移植が可能であることが期待された。
- 3) DMD モデル動物である筋ジストロフィー犬の骨格筋障害について選択的脂肪抑制 T2 強調画像の有用性について検討した。T2 強調画像や造影 T1 強調画像と比較した結果、壊死病変を主体とする病初期から脂肪浸潤を伴う病末期まで、選択的脂肪抑制 T2 強調画像により、選択的な壊死病変の検出が可能で、病態評価に有用と考えられた。

- 4) 筋ジス犬の出生時血清 CK 値が生後を通じて最も高く、生後 2 週間以内の死亡率が約 35%に達する。原因として胎仔への分娩のストレスが考えられていたため、予定帝王切開の導入し、臍帯血および呼吸開始前後の新生仔の血清 CK 値と横隔膜の病理学的・分子生物学的について検討した。その結果、新生仔筋ジス犬では、ジストロフィンの欠損に加えてユートロフィンの発現が少ないために、呼吸開始による急激な機械的負荷が呼吸筋に加わり筋変性が起こり、高 CK 血症および呼吸不全が誘発された可能性がある。
- 5) 筋衛星細胞と CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞との共移植で移植効率が著しく改善することを明らかにした。さらにそのメカニズムを解明すべく、MMP-2 ノックアウトマウスから SP 細胞を調整し、筋衛星細胞と移植した。MMP-2 欠損 SP 細胞との共移植では筋衛星細胞の移植筋での広がりが不十分で、MMP-2 が筋衛星細胞の拡散あるいは移動を促進することが明らかになった。

A. 研究目的

幹細胞移植治療は筋ジストロフィーなどの解決困難な筋変性疾患の治療法として期待されているが、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 遺伝子のウイルスベクターを用いた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検討すべき課題が数多く残されている。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、その方法を筋ジストロフィー犬に応用して将来的に DMD への応用を図ることを考えた。

一方、筋ジストロフィー犬 (CXMD₁) は Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に類似した進行性で重症の病態を示す犬のモデル動物である。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、今年度は昨年度に引き続き MRI を用いた評価法についてその検討を進めた。

また筋ジス犬については、出生直後の血清 CK 値が極めて高く、新生仔期の死亡率が約 35%にも及ぶ。新生仔筋ジス犬では横隔膜などの呼吸筋に高度の筋変性が見られ、要因として娩出による圧迫・低酸素の関与が考えられてきた。今回、出生直後の血清 CK 高値および高死亡率の原因機序を明らかにすることを目的とした。

幹細胞を用いた研究を進展させるためには、マウスを用いた研究も重要である。そこで、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自家細胞

移植の確立するために、移植効率を上げる条件の検討を行った。

B. 研究方法

1. 骨髄間葉系細胞からの筋細胞誘導

ヒト骨髄間葉系細胞 (米国 SanBio, Inc. からの提供、および Cambrex 社より購入; 東北大学倫理委員会承認済み)、ラット骨髄間葉系細胞、ビーグル犬骨髄間葉系細胞を用いる。高等哺乳類の筋ジストロフィーのモデルにはヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと同一症状を呈するビーグル犬があるために、イヌ骨髄間葉系細胞を用いた。いずれも、継代 4 代目にて誘導を開始する。細胞を $1,700\sim 1,900$ cells/cm² の密度で継代し、24 時間後に bFGF (10ng/ml)、forskolin (FSK) (5 μ M)、neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml) を含む 15% fetus bovine serum (FBS), alpha-MEM の培地で培養する。3-5 日後、PCI-neo vector に mouse Notch1 の細胞質ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) を組み込んだ plasmid をリポフェクションによって遺伝子導入し、G418 を用いて選択する。細胞数の回復を待ち、ほぼ 100% confluent になった段階で多核の骨格筋細胞を誘導するために、2%ウマ血清培地、ITS serum-free medium、あるいは無処理の骨髄間葉系細胞の培養上清のいずれかを投与し成熟骨格筋への誘導を開始する。ただし、上記の培養においては、ヒト骨髄間葉系細胞での誘導においてはヒト血清を用いた。

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。

犬の骨格筋損傷・変性モデルとして声帯筋の損傷モデルの作成方法を検討した。声帯を動かす筋肉は複雑であるが、外転筋は後輪状披裂筋という喉頭の裏面にある筋肉のみである。これを切断すると声帯は外転しなくなるが、両側の声帯が外転しないと窒息してしまうので、一侧のみを切断して、この部位に細胞移植して外転機能が再生するかどうかをファイバーで確認するという実験をおこなう。

2. Notch 結合蛋白の検索

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。特に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、質量分析を行った。一方、NICD-GFP キメラタンパクを多量に合成し、アフィニティーカラムを作成し、骨髄間葉系細胞の抽出液を通し、結合タンパクを分離し、質量分析を行った。更に NICD に結合する分子についての研究は進展しているため、それらの論文で記述されている分子について、我々のシステムにおける NICD の機能との関連を解析する目的で、発現、結合分子等の解析を行った。

3. 骨髄間葉系細胞を用いた新たな治療法の開発

(1) 骨髄間葉系細胞からの新たな筋前駆細胞の誘導法

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 α -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。さらに、アデノウイルスによる分化誘導遺伝子導入と筋分化誘導の効率を改善するため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HADCi)を併用した分化誘導法の検証を行った。

(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、移植前日にカルジオトキシンを大腿と下腿に注入した。 2.5×10^5 個の細胞を大腿と下腿に移植し、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。5日、10日、2週、4週間後に骨格筋を採取し、病理学的な解析を行った。

(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。正常犬から骨髄細胞を採取し、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。

(4)DLA 適合個体間の移植

骨髄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: 4311-4319, 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。今年度は正常犬由来細胞を用いて正常犬および筋ジストロフィー犬への同種移植を実施した。正常犬においては、局所的な筋変性と再生を促すため、移植5日前にカルジオトキシンを移植予定部位に注入した。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、 2×10^6 個の細胞を超音波診断装置のガイド下に左右の ECU ないし TA に移植した。

(5)動脈を介した幹細胞導入法の検討

GFP と MyoD を遺伝子導入した骨髄間質細胞 (MSC) を移植用細胞として調製した。移植5日前に正常ビーグル犬前脛骨筋にカルジオトキシンを筋注し、筋変性と再生を誘発させた。駆血操作後、浅大腿動脈から PBS に懸濁した 5×10^6 個の MSC を注入した。移植後は MMF (10 mg/kg/day) と cyclosporine (8 mg/kg/day) を投与し、移植2週後に標本を採取した。免疫組織染色により、MSC マーカーである CD44 が陽性の細胞を検索した。

4. 筋ジストロフィー犬に関する検討

(1)筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）のMRIによる検討

対象には3ヶ月齢の正常犬および筋ジス犬をそれぞれ3頭、および7歳齢の正常ビーグル犬1頭と筋ジス犬2頭を用い、全身麻酔下で撮像した。Siemens社製3.0 Tesla MRI装置およびヒト用膝コイルを用いて、下腿の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)、マルチエコーT2強調画像、Gd-DTPAを用いた造影T1WI(Gd-T1WI)および脂肪抑制造影T1WI(CHESS-Gd-T1WI)を撮像した。さらに、3ヶ月齢の右側の前脛骨筋(TA)および長趾伸筋(EDL)、7歳齢の右側のTAに3点の関心領域を設定し、T2緩和時間、CHESS-T1WI、CHESS-Gd-T1WI、CHESS-T2WIにおける信号強度(SI)、とbackground noiseのSIの標準偏差(SD_{air})を測定し、信号雑音比($SNR = SI/SD_{air}$)および造影剤増強率(CHESS-Gd-T1WI SNR/CHESS-T1WI SNR)を求め、統計学的に比較した。MRI撮像後、3ヶ月齢のTAおよびEDL、7歳齢のTAを生検し、HE染色を行い、抗IgG染色で壊死線維を、Oil red O染色で脂肪組織を同定した。

(2)筋ジス犬の表現型に関する検討

①娩出のストレスの軽減を目的に2006年10月の分娩から予定的帝王切開を導入し、2001年12月～2008年4月に施行した自然分娩21回(正常犬71頭、保因犬35頭、筋ジス犬29頭)と帝王切開18回(正常犬38頭、保因犬26頭、筋ジス犬33頭)の新生仔の静脈血血清CK値と死亡率を比較した。次に、呼吸開始による血清CK値への影響について、②帝王切開で産出された正常犬23頭、保因犬18頭、筋ジス犬22頭の臍帯血と呼吸開始後の静脈血の血清CK値を比較した。

また、③呼吸前に安楽殺した正常犬5頭、保因犬3頭、筋ジス犬6頭の臍帯血と静脈血の血清CK値(IU/l)を比較した。また、呼吸開始前後の横隔膜を病理学的、分子生物学的に検討した。

5. マウス骨格筋からの幹細胞の採取と遺伝子導入

(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。またMMP-2ノックアウトマウスの骨格筋からもCD31陰性CD45陰性SP細胞を分離し、移植実験に共した。

(2)細胞移植と解析

mdxマウス前脛骨筋にシリンジを用いて筋衛星細胞を直接移植した。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。

(3) CD248P-sDTR/GFPトランスジェニックマウス作成のためのプラスミドの構築
サル・ジフテリア毒素レセプターのcDNAがGFPに連結されているcDNAはイスラエル Weizmann InstituteのSteffen Jung博士から共与された。CD248のプロモーター領域(約1.8 kb)はPCRでゲノムDNAを鋳型に増幅し、TAベクターにクローニングした。

(倫理面への配慮)

DNA組み換え実験については、実験開始前に各施設(国立精神・神経センター神経研究所並びに京都大学)に研究計画書を提出し、承認を受けた上で実施した。

また実験動物を用いた研究に関しては、各年度の始めに、それぞれの研究施設で（神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会、中型実験動物倫理問題検討委員会、京都大学）へ提出し、承認を受けた上で、実験動物倫理指針に従って実験を行なった。

C. 研究成果

1. 骨髄間葉系細胞からの筋細胞誘導

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ー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る。

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。

健康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。骨格筋マーカー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 real-time PCR にて検討した。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。

ビーグル犬の声帯筋損傷モデルの作成を行った。反回神経や他の組織を傷つけずに選択的に後輪状披裂筋のみを切除できるのか、また、切除したのち外転麻痺がファイバーで確認できるのか、を検証したところ、見事にコントロール実験は成功したことを確認した。

ラット、ヒト、サル、イヌから骨格筋細胞を誘導することに成功し、ヒト骨格筋細胞の安全性試験を行い、高い安全性を確認した。

2. Notch 結合蛋白の検索

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た。また、コントロールサンプルについても同様の処理を行い、SDS ゲル電気泳動で分離した。質量分析技術の感度が大きく上がったことから、全ゲル解析を行い、分化誘導サンプルとコントロールサンプルより得られた結合タンパクの候補をリストした。また、Pathway 解析等により、得られた結果からどのシグナル経路が筋細胞誘導に関わるかを解析しているが、いまだ結論には至っていない。また、別の方法としてアンキリン-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。

3. 骨髄間質細胞を用いた新たな治療法の開発

(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。また、アデノウイルス感染前に HADCi として FK228 を処理することにより遺伝子導入効率が 10 倍以上改善し、さらに分化培地にバルブロ酸を添加することで分化誘導が促進された。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

高い効率で筋分化誘導できることや、HADCi が MSCs への遺伝子導入や分化効率を促進することを確認した。

(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 の作用により、炎症性サイトカイン IL-6、IL-1b の産生が抑制され、細胞の生着効率が約 4 倍高くなることが示された。この結果から、IL-10 の抗炎症効果により間葉系幹細胞の移植効率が促進されることが示唆された。また、IL-10 の移植組織における濃度に比べ血中濃度は 1 万分の 1 以下であり、血液検査上も副反応は認められなかった。

(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。さらに、CD271 陽性細胞は間葉系幹細胞に特徴的な骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への多分化能を有していた。

(4)DLA 適合個体間の移植

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、初年度は正常犬 4 頭、保因犬 2 頭、患犬 2 頭、H20 年度はさらに正常犬 2 頭、保因犬 2 頭、患犬 1 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。そこで、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、エコーガイド下に、左右の ECU ないし TA 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、10 日後に筋生検を行い、eGFP 抗体および CD44 抗体による免疫染色にて移植細胞を確認した。さらに移植 4 週間後の組織でも、移植細胞の生着を確認した。次に、正常犬由来細胞を用いて患犬への同種移植を実施した。筋ジストロフィー犬においても正常犬と同様に免疫抑制剤を服用したが、副作用のため使用を中止した。移植から 10 日後、移植細胞の生着を確認できたが、IL-10 の作用等を応用した安全で有効な免疫制御措置の必要性が示唆された。

(5) 動脈を介した幹細胞導入法の検討

大腿動脈から細胞移植を行った 2 週間後の前脛骨筋組織像を観察したところ、カルジオトキシンを注入した線維化の強い部分において、GFP 陽性細胞を広範囲に認めた。移植細胞は基底膜下、細胞膜外のスペースに認められたが、それらのほぼ全てが CD44 陽性であった。

4. 筋ジス犬に関する検討

(1) 筋ジス犬の MRI について

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 は正常犬と比較して信号強度の差はなかった。T2WI では筋ジス犬の EDL に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、CHESS-T2WI では T2WI で高信号を示した領域と一致して

高信号領域が認められた。

b. TA および EDL の MR 信号解析

筋ジス犬の TA、EDL は正常犬と比較し 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、筋ジス犬では TA よりも EDL で有意に高値を示した。

c. TA および EDL の病理組織学的解析

筋ジス犬の TA では、中等度の変性・壊死線維と軽度炎症性細胞浸潤が認められた。一方、筋ジス犬の EDL では、高度の壊死線維と強い炎症性細胞浸潤が認められた。

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 TA、EDL 内に T1W で高信号、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、TA の同部位が高信号が認められた。CHESS-Gd-T1WI や CHESS-T2WI では脂肪浸潤領域の信号が抑制されていた。

b. TA の MR 信号解析

筋ジス犬の TA は正常犬と比較し、T2 緩和時間、造影剤増強率が増加傾向を示した。一方、筋ジス犬の TA の CHESS-T2WI SNR は、正常犬の TA との間に変化はなかった。

c. TA の病理組織学的解析

筋ジス犬では大部分が中心核を持つ再生線維で、壊死線維がほとんど認められず、間質の増大が見られた。Oil-red O 染色では脂肪細胞の増加が認められた。

(2) 筋ジス犬の表現型について

1) 自然分娩と帝王切開の血清 CK 値および新生仔死亡率の比較

自然分娩および帝王切開における血清 CK 値 (平均±標準誤差) はそれぞれ、正常犬: 2,692±852、852±108、保因犬: 8,028±1,99、1,539±265、筋ジス犬: 164,416±25,689、122,113±17,618であった。正常犬、保因犬

では両群間に有意差が認められたが、筋ジス犬に差はなかった。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：4.0%、2.6%、保因犬：5.7%、3.8%、筋ジス犬：34.4%、24.2%であり、いずれの犬においても両群間に有意差はなかった。

2) 臍帯血と静脈血の血清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(平均±標準誤差)はそれぞれ、正常犬：459±91、578±73、保因犬：1,075±452、1,314±335、筋ジス犬：2,177±366、86,058±16,900であった。各群の臍帯血と静脈血の血清CK値を比較では、筋ジス犬の臍帯血の血清CK値は正常犬の約5倍に増加し、筋ジス犬の蘇生後静脈血の血清CK値は臍帯血の約40倍に増加していた。

3) 臍帯血と呼吸開始前の静脈血との血清CK値の比較と横隔膜の病理の検討

臍帯血および呼吸開始前の静脈血の血清CK値(平均±標準誤差)はそれぞれ、正常犬：215±72、84±13、保因犬：444±60、131±12、筋ジス犬：3,139±1,141、3,391±961であり、いずれの犬においても両群間に有意差はなかった。筋ジス犬横隔膜の病理では呼吸後の著明な筋変性と比較して呼吸前では、opaque線維は散見されたが、筋の基本的構築は保たれ、免疫組織化学とウエスタン解析では新生仔筋ジス犬の横隔膜のユートロフィンの発現量は、3ヶ月齢の筋ジス犬と比較して少なく、正常犬と差がなかった。

5. マウス骨格筋からの幹細胞の採取と遺伝子導入

(1) 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細胞との共移植を、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と比較してGFP陽性線維の数が著明に増加した。SP単独移植ではドナー由来の筋線維はわずかであった。

(2) MMP-2は筋衛星細胞の移動を促進する

MMP-2ノックアウトマウスの骨格筋からもCD31陰性CD45陰性SP細胞を分離し、GFP陽性筋衛星細胞とともに移植したところ、GFP陽性筋衛星細胞の増殖は、野生型SP細胞との共移植群と変わらなかったが、細胞の広がりやGFP陽性筋衛星細胞の単独移植と同じであった。MMP-2は筋衛星細胞の移動を促進するが、増殖を直接促進していないと考えられた。

D. 考察

1. 分担研究者の出澤らと協力してNotch遺伝子を用いて骨髄間質細胞から機能的な骨格筋細胞を効率よく誘導する方法を見出したが、この誘導システムがどのような分子機構に制御されているのかを解明することが必要である。一方、本研究では当初から中心にしているcytokine cocktailとNotch遺伝子を用いる方法に加えて、骨髄間質細胞が間葉系細胞であることを考慮して、より一般的な誘導方法も行う必要があると考えている。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。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。

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誘導できる事実は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。また、筋細胞系の幹細胞である筋衛星細胞についての情報が蓄積され、細胞移植治療の発展に結びつくこと期待している。

2. 本研究ではNotch遺伝子を利用した筋細胞誘導法と並んで、新たな方法にチャレンジした。即ち、増殖効率の高い間葉系幹細胞の調製法とベクター系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、同種移植にて移植細胞の生着が確認された。現在さらに経過を観察し、移植・分化効率、などについて検討中である。また、*mdx*マウスへの移植実験において、IL-10発現AAVベクターの使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。筋ジストロフィー犬由来間葉系幹細胞への治療遺伝子導入とその移植に関しては、DLAの合致した筋ジストロフィー犬の繁殖計画が遅延したため、今後の検討課題とした。

骨髄間質細胞(MSC)を用いた動脈を介した導入では、分化に至らなかった未分化な細胞が組織幹細胞として生着した可能性が示唆された。動脈内からの細胞投与によって、骨格筋内の広い範囲への細胞移植が可能であることが期待された。この方法の問題点は、筋細胞を誘導するためにMyoD遺伝子をしようしていることであろう。安全な移植法の開発のためには、遺伝子の導入を要しない方法が求められており、そのことはiPS細胞の研究にも当てはまる。

3. 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。

3ヶ月齢の筋ジス犬では、病理上壊死が高度であったEDLのT2緩和時間、造影剤増強率およびCHESS-T2WI SNRは、壊死が軽度であったTAに比べ増加していたことから、T2緩和時間や造影剤増強率と同様に壊死病変を捉えることが可能と考えられた。

壊死と脂肪浸潤が混在する部位における壊死の評価については、病理学的に壊死筋線維がほとんど認められず大部分が再生筋線維で、間質や脂肪の顕著な増大が認められた筋ジス犬のTAのT2緩和時

間と造影剤増強率は、正常犬と比較し増加していたが、CHESS-T2WI SNRは有意な変化はなかった。以上から、T2緩和時間の延長や造影剤増強効果の増加は、脂肪浸潤や間質の増大に起因し、壊死病変を過大に評価しうる可能性がある。一方、CHESS-T2WIでは、脂肪浸潤や間質の増大領域においても壊死のみを評価することが可能と考えられた。

筋ジス犬の血清CK高値と高死亡率の原因として分娩ストレスは主な原因ではなかった。筋ジス犬の臍帯血CK値が正常犬や保因犬と比べて約5倍と有意に増加し、呼吸前の新生仔の横隔膜で軽度の変性が見られたことは、胎仔期に筋変性が起きていることを示唆している。しかし、筋ジス犬の呼吸開始後の静脈血の血清CK値が臍帯血の約40倍に増加と呼吸後の横隔膜の変化を考えると、呼吸開始が呼吸筋の急激な筋変性を誘発した可能性がある。また、新生仔筋ジス犬の横隔膜におけるユートロフィンの発現を免疫組織化学、分子生物学的に検討した結果、出生直後の筋ジス犬は正常犬と同様にユートロフィンの発現が少なかった。*mdx*マウスの出生時のユートロフィンの発現は正常の5倍もあることから、新生仔犬の横隔膜のユートロフィンの発現が少ないことが病態に関連していると考えられる。

4. 幹細胞移植を中心とした再生医療を進めるためには、マウスを用いた研究も重要である。そこで、骨格筋由来の幹細胞についても研究を進めた。CD45陰性CD31陰性SP細胞と筋衛星細胞の共移植は、筋衛星細胞による筋再生を促進した。今回の解析でSP細胞の共移植による細胞移動の促進は、主としてMMP-2によると考えられた。生体から調整されるSP細胞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、サイトカイ

ン等でSP細胞の機能を代用できないか検討することが必要である。

E. 結論

1. 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. 本研究で開発した骨髄由来間葉系幹細胞の大規模培養および筋分化誘導技術は、移植細胞の調製において極めて有用であり、実用化に向け免疫制御処置の開発が期待される。

3. 増殖効率の高い間葉系幹細胞の調製法とベクター系を利用した新たな分化誘導スイッチを開発した。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。

4. 骨髄間質細胞(MSC)を用いた動脈を介する導入では、分化に至らなかった未分化な細胞が組織幹細胞として生着した可能性が示唆された。動脈内からの細胞投与によって、骨格筋内の広い範囲への細胞移植が可能であることが期待された。

5. CHESS-T2WI は、T2WI や Gd-T1WI と異なり、全病期を通じて選択的に壊死病変を検出することが可能であり、病態や治療評価のモニタリングに有用であると考えられる。

6. 新生仔筋ジス犬の血清CK高値および高死亡率の原因として、ジストロフィンの欠損に加えてユートロフィンの発現が少ないために、呼吸筋に呼吸開始に伴う急激な機械的負荷が加わり、高度な筋変性が起こった結果と考えられた。

7. DMD 患者本人の筋前駆細胞あるいは幹細胞を細胞移植治療に用いる自己細胞移植の実現のためには 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。CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞は筋衛星細胞の生着と移動を著しく促進した。今後はその分子メカニズムを解明することで、細胞移植治療の効率化を図っていきたい。

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. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E: Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*. 2009; in press
2. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J*, 2009, in press
3. Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP: A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol* 66: 32-38, 2009
4. Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, Takeda S, Ikeda S: Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45-55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet*. 54: 127-130, 2009
5. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanasaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S: Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech Dev* 126: 107-116, 2009
6. Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T: Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet*. 18: 621-31, 2009
7. Sekiguchi M, Zushida K, Yoshida M, Maekawa M, Kamichi S, Yoshida M, Sahara Y, Yuasa S, Takeda S, Wada K: A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain* 132: 124-135, 2009
8. Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S: Transduction Efficiency and Immune Response Associated With the Administration of AAV8 Vector Into Dog Skeletal Muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009
9. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H: Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res*: 314: 3232-3244, 2008
10. Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T: MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct*. 33:

- 163-169, 2008
11. Katsumata O, Honma T, Sanda M, Kamata A, Takeda S, Kondo H, Sakagami H:
Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res.* 1234:44-49, 2008
 12. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.* 173: 781-791, 2008
 13. Sato K, Yokota T, Ichioka S, Shibata M, Takeda S:
Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol.* 27:30-36, 2008
 14. Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S:
Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther.* 19: 719-730, 2008
 15. Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, Ueda H, Urasawa N, Koyama J, Yazaki Y, Yazaki M, Sakai T, Haruta S, Takeda S, Ikeda S:
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.* 15: 757-763, 2008
 16. Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H:
Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through {beta}-synemin, {alpha}-dystrobrevin and actin. *J Cell Sci.* 121: 2062-2074, 2008
 17. Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishibori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H:
The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 582: 2212-2218, 2008
 18. 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* 117: 2437-2448, 2008
 19. 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.* 10: 702-713, 2008
 20. 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.* 22: 477-487, 2008
 21. 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.* 9: 1, 2008
 22. 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 α-2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res.* 314:193-203, 2008

23. Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral Vector-Producing Mesenchymal Stem Cells for Targeted Suicide Cancer Gene Therapy. *J Gene Med*; in press
24. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholslami K, Nomoto T, Muramatsu S, 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* 16: 474-480, 2008.
25. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16: 383-391, 2009
26. 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* 10: 368-374, 2008
27. Nagane K, Kitada M, Wakao S, Dezawa M, Tabata Y: Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng*; in press
28. Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M: Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord. *J Neurosurg Spine* 9: 600-610, 2008
29. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y A: Vascular-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317: 1722-1726, 2007
30. Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S: Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev. Cell* 12: 1-12, 2007
31. Shiraishi S, Zhou C, Aoki T, Sato N, Chiba T, Tamura K, Yoshida S, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Tamura T: TBP-interacting protein 120B (TIP120B)/Cullin-associated and Neddylation Dissociated 2 (CAND2) inhibit SCF-dependent ubiquitination of myogenin and accelerates myogenic differentiation. *J Biol Chem* 282: 9017-9028, 2007
32. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M, Kimura T, Sasahara M: PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res* 23: 1519-28, 2008
- 【和文原著】
1. 北秀樹, 中村昭則, 市川慎一, 八幡由美子, 小林正典, 弓削田直子, 武田伸二: 筋ジストロフィー犬(CXMD)の飼育管理における胃内カテーテル投与法およびハンド・フィーディング法の有用性, 実験動物技術 43: 17-24, 2008
- 【著書】
1. Okada T, Takeda S: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in A Guide to Human Gene

Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), *World Scientific*, NJ, (in press)

2. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S: Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation Editors: Kunihiro Tsuchida and Shin'ichi Takeda. Research Signpost 378/661(2) Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India, 2008
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: メディカルドゥ社, pp.46-49, 2008
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: メディカルドゥ社, pp.54-56, 2008.

【総説】

1. 矢田英理香, 武田伸一: iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療の展望 難病と在宅ケア in press, 2009
2. 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療. 総合リハビリテーション 36: 1043-1049, 2008
3. 齊藤崇, 武田伸一: 高齢者の筋ジストロフィー/多発性筋炎のケア Modern Physician: 28, 656-660, 2008
4. 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一: ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの治療法開発 医学のあゆみ 226: 379-383, 2008
5. 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療 財団法人 精神・神経科学振興財団 News Letter No.3, 2008
6. 吉村まどか, 武田伸一: 筋ジストロフィー・ミオパチー 総合臨床 57: 606-608, 2008
7. 深田宗一朗, 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーの治療とケア: 筋衛星細胞の維持 活性化と自己複製の制御機構. 難病と在宅ケア 14: 50-52, 2008

8. 岡田尚巳: 間葉系幹細胞を利用した癌遺伝子治療 最新医学 63 巻 12 号、64-71、2008
9. Okada T, Ozawa K: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008
10. 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* 30: 121-127, 2008
11. 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
12. 出澤真理: 筋ジストロフィーと細胞移植治療, 医学のあゆみ 226: 393-396, 2008
13. 出澤真理: 骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性, 最新医学 63: 55-63, 2008
14. Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T. Stem Cell Heterogeneity: Actual and potential stem cell compartments in the mouse spermatogenesis. *Ann NY Acad Sci* PMID 17: 905-929, 2007

II. 学会発表

<国外>

1. Imamura M, S. Takeda: Analysis of Allele-Specific Expression of the Mouse ϵ -Sarcoglycan Gene, 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 13-17 December, 2008
2. Takeda S: Characterization of adult progenitor cells in skeletal muscle, 8th International Conference, The biology of stem cells, Institut des Cordeliers, Paris, France, 27-28th November 2008
3. Takeda S: Management of DMD in Japan, Seminar

- at Santhera Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, 26 November 2008
4. Takeda S:
The 1st Scientific Council Meeting of the Institute Myology, University Pierre et Marie Curie Paris 6, Pitie-Salpetriere Hospital, France, 4 November 2008
 5. Takeda S:
The significance of multi-exon skipping of the dystrophin gene by Morpholino treatment, Oligonucleotide-directed splicing: Therapeutic Strategies, Cold Spring Harbor Laboratory, 14-17 October 2008
 6. Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Orima H, Takeda S:
Noninvasive evaluation of necrotic change in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) by fat-suppressed T2-weighted imaging. 13th International Congress of the World Muscle Society, Newcastle Gateshead, UK, 29 September-2 October, 2008
 7. Takeda S:
Muscle progenitor cells in skeletal muscle: their functions and potencies in therapy. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle development and regeneration, First EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 9.24-29, 2008
 8. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Endo T, Takeda S:
Abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan results in poor proliferation and limited migration of muscle satellite cells. 6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2008. June 11, 2008. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA
 9. Shin JH, Ohshima S, Yuko K, Okada T, Takeda S:
Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated microdystrophin transduction in mdx mice. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 13, 2008
 10. Ohshima S, Shiin JH, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S:
Effective Transduction of Dystrophic Dogs with rAAV Serotype 8, Oral abstract session, 11th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 5.28-6.1, 2008
 11. Yokota T, Lu QL, Partridge TA, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman EP:
Body-wide Restoration of Dystrophin Expression and Amelioration of Pathology in Dystrophic Dogs Using a Morpholino Cocktail Presentation of the top abstracts, special plenary session, 11th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 5.28-6.1, 2008
 12. Takeda S:
Characterization of adult progenitor cells in skeletal muscle, Plenary Lectures, Myology 2008, Marseille, France, 5.26-30, 2008
 13. Nakamura A, Takeda S:
MRI imaging, Clinical trial endpoints discussions, Annual Meeting Muscular Dystrophy Programs, Washington DC, March, 2008
 14. Suzuki Y, Ito M, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K:
Recombinant extracellular matrix protein expressed in a limited number of cells propagates to the target organ throughout the body using its nascent tissue-targeting signal. 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland Aug 23-27, 2008
 15. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for

- Neuroscience, Washington DC, USA Nov 15-19, 2008
16. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
rAAV8-mediated protein anchoring of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. The ASGC 48th annual meeting, San Francisco LA, USA, Dec 13-17, 2008
 17. Dezawa M:
Insights into autotransplantation: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. Chicago Neural Repair Club, Children's Memorial Research Center, Northwestern Univ., Chicago, April, 2008
 18. Dezawa M:
A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases, The 21st Chinese SCI Academic Annual Meeting & The 3rd International SCI Treatments & Trials Symposium, Beijing, China, October, 2008
 19. Dezawa M:
A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells, Adult Stem Cells-Biology and Clinical Applications Conference, Brisbane, Australia, November, 2008.
- <国内>
1. 本橋 紀夫, 矢田 英理香, 鈴木 友子, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と骨格筋への分化誘導法の検討, 第 8 回日本再生医療学会総会, 東京, 3.5, 2009
 2. Takeda S:
The advance of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy, 50th Anniversary Symposium. Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy, Tokyo, 1.10, 2009
 3. 武田 伸一, 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田 尚巳:
9 型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2009
 4. 武田 伸一, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則:
mdx52 マウスを用いたモルフォリンによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの前臨床研究 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2009
 5. 大野 欽司, 伊藤 美佳子, 鈴木 優美, 岡田 尚巳, 武田 伸一, 福留 隆泰, 吉村 俊朗, Eric Krejci:
Protein anchoring therapy による終板 acetylcholinesterase 欠損症治療 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究、研究班会議, 東京, 12.15, 2009
 6. 武田伸一:
nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである、シンポジウム、メカニカルストレスに対する筋・骨格系の応答の分子機構, 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12.12, 2008
 7. 伊藤尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一:
神経型一酸化窒素合成酵素は Akt シグナルを介して筋肥大の進行を制御している, 一般口頭発表 2T13-5, ポスター発表 2P-0338, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12.10, 2008
 8. 武田 伸一, 矢田 英理香, 本橋 紀夫, 鈴木 友子:
mdx マウスからの iPS 細胞の樹立とその筋分化能の検討, 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」(主任研究者: 武田伸一)平成 20 年度班会議, 東