

- 京, 12. 4, 2008
9. 横田俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge, 小林正典, 浦澤延幸, 中村昭則, Ryszard Kole, Peter Szani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田 伸一: アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィー治療の試み. 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, 東京, 12.3-4, 2008
  10. 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ノ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. 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, 東京, 12.3-4, 2008
  11. 裏出良博, 有竹浩介, 林正裕, 鎌内慎也, エリザベス・コー・三田村, 永田奈々恵, 武田伸一, 中村昭則: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発-プロスタグランジン D 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの2次炎症軽減療法の開発. 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, 東京, 12.3-4, 2008
  12. 万年英之, 松本大和, 笹崎晋史, 藤原哲, 市原伸恒, 菊池建機, 中村昭則, 武田伸一: ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子に関する検討-WWPI 関連蛋白質に対する発現解析. 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, 東京, 12.3-4, 2008
  13. 高橋明男, 中村昭則, 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーコロニーの確立・維持と病態解析-筋ジストロフィー犬新生子劇症型の病態機序に関する検討-. 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, 東京, 12.3-4, 2008
  14. 吉田幹晴, 谷端淳, 本橋紀夫, 矢田英理香, Matthias Mueller, 武田伸一: BL/6 マウス骨格筋のグリセリンによる再生誘導と脂肪細胞. 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」(主任研究者: 砂田芳秀)平成20年度班会議東京, 12. 15, 2008
  15. 関口 正幸, 和田 圭司, 山本 和弘, 高橋 明男, 吉田 幹晴, 武田 伸一: ジストロフィン欠損マウス情動行動異常に対する治療研究-モルフォリノオリゴヌクレオチド脳内投与による行動異常の軽減. 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年度班会議東京, 12. 3, 2008
  16. 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, 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究, 研究班会議 平成20年12月3日, 東京
  17. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する分子治療の展望, 第62回国立病院総合医学会, 11.22.2008
  18. 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田 尚巳, 武田 伸一: 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 第3回筋ジストロフィー治療研究合同発表会 平成20年10月25日, 山梨
  19. 矢田 英理香, 本橋 紀夫, 鈴木 友子,

- 武田 伸一：  
Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立とその筋分化能の検討，第 3 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会，山梨，10.25, 2008
20. 武田伸一：  
筋ジストロフィー研究の進歩：ラボ・ベンチからベッド・サイドへ，第 17 回なにわ脳神経内科懇話会（なにわ会），大阪，10.11, 2008
21. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する新たな治療の進歩，第 16 回阪神小児神経筋疾患研究会，大阪，7.19, 2008
22. 中村昭則，武田伸一：  
モルフォリノを用いた筋ジストロフィーに対する新しい治療，第 5 回筋ジストロフィー市民公開講座，東京，6.14.2008
23. Kasahara Y, Nishiyama A, Shin JH, Ohshima S, Okada T, Takeda S:  
Myogenic differentiation of mesenchymal stem cell and cell therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008.
24. 辛鎮洪，大島幸子，笠原優子，岡田尚巳，武田伸一：  
Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated microdystrophin transduction in mdx mice, 第 14 回日本遺伝子治療学会，6.13, 2008
25. 武田伸一：  
筋ジストロフィーの治療に向けて，筋ジストロフィー協会神奈川県総会，横浜，6.8.2008
26. 武田伸一：  
Gene Therapy for Muscular Dystrophy, 第 50 回日本小児神経学会総会，東京，5.28.2008
27. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する分子治療の現況，第 49 回日本神経病理学会総会学術研究科，東京，5.20.2008
28. 武田伸一：  
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，第 45 回日本筋ジストロフィー協会全国大会，東京，5.18.2008
29. 増潤菜弥，宮本香織，和田倫子，花岡和則，遠藤玉夫，鈴木友子，武田伸一：  
alpha-ジストログリカンの O-マンノース型糖鎖修飾は骨格筋幹細胞の増殖と移動に重要である，第 6 回幹細胞シンポジウム，東京，5.16.17.2008
30. 青木吉嗣，武田伸一：  
アンチセンス・モルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの試み，第 49 回日本神経学会総会，横浜，5.16.2008
31. 福島和広，宮崎大吾，本橋紀夫，吉田邦広，中村昭則，鈴木友子，武田伸一，池田修一：  
骨格筋再生における matrix metalloproteinase (MMP)-2, -9 の役割の検討，第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日，横浜
32. 宮崎大吾，福島和広，中村昭則，吉田邦広，武田伸一，池田修一：  
ジストロフィン遺伝子 (DMD) exon 45-55 欠失例の臨床的、分子遺伝学的検討，第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日，横浜
33. 中村昭則，小林正典，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法の検討，第 49 回日本神経学会総会，横浜，5.16.2008
34. 八幡由美子，北秀樹，小林正典，市川慎一，中山隆幸，大島幸子，辛鎮洪，齊藤崇，弓削田直子，岡田尚巳，中村昭則，武田伸一：  
新生子筋ジストロフィー犬の呼吸筋障害の検討，第 55 回日本実験動物学会総会、第 42 回日本実験動物技術者公開総会 2008 年 5 月 15-17 日，仙
35. 岡田尚巳：  
AAV ベクターの作製と筋疾患遺伝子治療への応用 第 14 回日本遺伝子治療学会学術集会 平成 20 年 6 月 13 日，札幌
36. 岡田尚巳：  
AAV ベクター作製法の工夫と筋疾患遺伝子治療への応用 日本医科大学ハイテクリサーチセンターセミナー 平成 20 年 6 月 23 日，東京

37. 岡田尚巳:  
生活習慣病・神経筋疾患に対する細胞遺伝子治療の開発 第 12 回 小児分子内分泌研究会 平成 20 年 7 月 5 日, 小樽
38. 岡田尚巳:  
骨髄間質細胞を用いたがん遺伝子治療第 7 回遺伝子治療シンポジウム「幹細胞の機能制御と難病治療への応用」平成 21 年 1 月 30 日, 大阪
39. 大澤真木子, 齊藤崇, 青木吉嗣, 横田俊文, 中村昭則, 武田伸一:  
Duchenne 型筋ジストロフィーの臨床研究に向けた antisense oligonucleotide を用いたエクソン・スキッピングのインビトロ解析。平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーの臨床試験実施体制に構築に関する研究 平成 20 年 12 月 5 日, 東京
40. 出澤真理:  
骨髄間葉系細胞における胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦, 第 113 回日本解剖学会, 大分, 3 月, 2008
41. 出澤真理:  
骨髄間葉系細胞の胚葉を越えた分化転換の誘導と自己細胞移植治療への可能性, 第 59 回東北臨床超微形態懇話会, 仙台, 6 月, 2008
42. 出澤真理:  
骨髄間葉系細胞の神経系細胞・筋細胞への誘導システムと変性・損傷疾患への応用の可能性, 第 31 回日本神経科学会, 東京, 7 月, 2008
43. 出澤真理:  
思わぬ発見のもたらした骨髄間葉系細胞の分化転換システムと自己細胞移植治療の可能性, 女性研究者の現状とこれから。Educational Cardiology in Chiba, 千葉, 9 月, 2008
44. 出澤真理:  
自己細胞移植による神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発, 医薬基盤研究所基礎研究推進事業研究成果発表会, 大阪, 12 月, 2008
45. 出澤真理:  
骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植による神経・筋変性疾患の根本治療法の開発, シンポジウム「再生医療のブレークスルーを目指して」, 東京工業大学, 1 月, 2009
46. 出澤真理:  
骨髄間葉系細胞の胚葉を越えた分化転換と神経・筋変性疾患への自己細胞移植治療の可能性, 第 32 回仙台 BMT 懇話会, 仙台, 1 月, 2009

H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

骨髄間質細胞の移植と筋ジストロフィー犬評価系の確立

分担研究者 武田 伸一

国立精神・神経センター神経研究所  
遺伝子疾患治療研究部 部長

**研究要旨**

1. 骨髄間質細胞の動脈を介した移植により、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。
2. DMD モデル動物である筋ジストロフィー犬を用いて、筋ジストロフィー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、T2 強調画像や造影 T1 強調画像と比較した結果、選択的脂肪抑制 T2 強調画像のみが、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。

**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。

筋ジストロフィー犬 (CXMD<sub>J</sub>) 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。今年度は、幹細胞を導入する上で、有効性が高い手段であると考えられる動脈を経由した投与方法について検討した。一方、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。

本研究は、国立精神・神経センター 神経

研究所 中型動物実験倫理問題検討委員会  
の承認を受けて実施された。

## B. 研究方法

### 1. 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管細胞 (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射し、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  $5 \times 10^6$  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。

### 2. 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 ( $SD_{\text{nr}}$ ) を測定し、信号雑音比 ( $SNR = SI/SD_{\text{nr}}$ ) 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。

## C. 研究成果

### 1. 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。

### 2. 筋ジス犬の 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 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。

##### 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。

##### b. 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 T1WI 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 CHES-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。

#### D. 考察

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抑制剤の使用方法を確定する必要がある。

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。

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 (CHES) 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 CHES-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、CHES-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、CHES-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。

#### E. 結論

1. 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。

2. CHES-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。

## 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, Kanesaki 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 <math>\alpha</math>2 upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp Cell Res* 314:193-203, 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, 武田伸一:  
筋ジストロフィー犬(CXMDJ)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)



- 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

#### 【総説】

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

## II. 学会発表

<国外>

- Imamura M, S. Takeda: Analysis of Allele-Specific Expression of the Mouse  $\epsilon$ -Sarcoglycan Gene, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 13-17 December, 2008
- Takeda S: Characterization of adult progenitor cells in skeletal muscle, 8<sup>th</sup> International Conference, The biology of stem cells, Institut des Cordeliers, Paris, France, 27- 28<sup>th</sup> November 2008
- Takeda S: Management of DMD in Japan, Seminar at Santhera Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, 26 November 2008
- Takeda S: The 1<sup>st</sup> Scientific Council Meeting of the Institute Myology, University Pierre et Marie Curie Paris 6, Pitie-Salpetriere Hospital, France, 4 November 2008
- 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
- 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
- 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
- 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. 6<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2008. June 11, 2008. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA
- 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, 11<sup>th</sup> 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, 11<sup>th</sup> Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 5.28-6.1, 2008
  12. Takeda: 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
- <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, 東京, 12. 4, 2008
  9. 横田俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge,

- 小林正典, 浦澤延幸, 中村昭則, Ryszard Kole, Peter Sazani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田 伸一:  
アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィー治療の試み. 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, 東京, 12.3-4, 2008
10. 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ノ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. 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, 東京, 12.3-4, 2008
11. 裏出良博, 有竹浩介, 林正裕, 鎌内慎也, エリザベス・コー・三田村, 永田奈々恵, 武田伸一, 中村昭則:  
筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発-プロスタグランジン D 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減療法の開発. 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, 東京, 12.3-4, 2008
12. 万年英之, 松本大和, 笹崎晋史, 藤原哲, 市原伸恒, 菊池建機, 中村昭則, 武田伸一:  
ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子に関する検討-WWPI 関連蛋白質に対する発現解析. 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, 東京, 12.3-4, 2008
13. 高橋明男, 中村昭則, 小林正典, 武田伸一:  
筋ジストロフィーコロニーの確立・維持と病態解析-筋ジストロフィー犬新生子劇症型の病態機序に関する検討-. 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, 東京, 12.3-4, 2008
14. 吉田幹晴, 谷端淳, 本橋紀夫, 矢田英理香, Matthias Mueller, 武田伸一:  
BL/6 マウス骨格筋のグリセリンによる再生誘導と脂肪細胞. 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」(主任研究者: 砂田芳秀) 平成 20 年度班会議東京, 12. 15, 2008
15. 関口 正幸, 和田 圭司, 山本 和弘, 高橋明男, 吉田 幹晴, 武田 伸一:  
ジストロフィン欠損マウス情動行動異常に対する治療研究-モルフォリノオリゴヌクレオチド脳内投与による行動異常の軽減. 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 年度班会議東京, 12. 3, 2008
16. 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, 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究, 研究班会議 平成 20 年 12 月 3 日, 東京
17. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する分子治療の展望, 第 62 回国立病院総合医学会, 11.22.2008
18. 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田 尚巳, 武田 伸一:  
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 第 3 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会 平成 20 年 10 月 25 日, 山梨
19. 矢田 英理香, 本橋 紀夫, 鈴木 友子, 武田 伸一:  
Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立とその

- 筋分化能の検討, 第 3 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 山梨, 10. 25, 2008
20. 武田伸一:  
筋ジストロフィー研究の進歩: ラボ・ベンチからベッド・サイドへ, 第 17 回なにわ脳神経内科懇話会 (なにわ会), 大阪, 10.11, 2008
21. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する新たな治療の進歩, 第 16 回阪神小児神経筋疾患研究会, 大阪, 7.19, 2008
22. 中村昭則, 武田伸一:  
モルフォリノを用いた筋ジストロフィーに対する新しい治療, 第 5 回筋ジストロフィー市民公開講座, 東京, 6.14.2008
23. Kasahara Y, Nishiyama A, Shin JH, Ohshima S, Okada T, Takeda S:  
Myogenic differentiation of mesenchymal stem cell and cell therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008
24. 辛鎮洪, 大島幸子, 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一:  
Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated microdystrophin transduction in mdx mice, 第 14 回日本遺伝子治療学会, 6.13, 2008
25. 武田伸一:  
筋ジストロフィーの治療に向けて, 筋ジストロフィー協会神奈川県総会, 横浜, 6.8.2008
26. 武田伸一:  
Gene Therapy for Muscular Dystrophy, 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.28.2008
27. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する分子治療の現況, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究科, 東京, 5.20.2008
28. 武田伸一:  
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, 第 45 回日本筋ジストロフィー協会全国大会, 東京, 5.18.2008
29. 増淵菜弥, 宮本香織, 和田倫子, 花岡和則, 遠藤玉夫, 鈴木友子, 武田伸一:  
alpha-ジストログリカンの O-マンノース型糖鎖修飾は骨格筋幹細胞の増殖と移動に重要である, 第 6 回幹細胞シンポジウム, 東京, 5.16.17.2008
30. 青木吉嗣, 武田伸一:  
アンチセンス・モルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの試み, 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16.2008
31. 福島和広, 宮崎大吾, 本橋紀夫, 吉田邦広, 中村昭則, 鈴木友子, 武田伸一, 池田修一:  
骨格筋再生における matrix metalloproteinase (MMP)-2, -9 の役割の検討. 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日, 横浜
32. 宮崎大吾, 福島和広, 中村昭則, 吉田邦広, 武田伸一, 池田修一:  
ジストロフィン遺伝子 (DMD) exon 45-55 欠失例の臨床的, 分子遺伝学的検討. 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15-17 日, 横浜
33. 中村昭則, 小林正典, 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法の検討, 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16.2008
34. 八幡由美子, 北秀樹, 小林正典, 市川慎一, 中山隆幸, 大島幸子, 辛鎮洪, 齊藤崇, 弓削田直子, 岡田尚巳, 中村昭則, 武田伸一:  
新生子筋ジストロフィー犬の呼吸筋障害の検討. 第 55 回日本実験動物学会総会, 第 42 回日本実験動物技術者公開総会 2008 年 5 月 15-17 日, 仙台

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

レンチウイルスベクターを用いた筋前駆細胞に対する  
ex vivo 遺伝子導入に関する研究

分担研究者 鈴木 友子  
国立精神・神経センター神経研究所  
遺伝子疾患治療研究部 室長

**研究要旨**

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィンが欠損して、骨格筋膜が脆弱になり筋変性、壊死する、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の筋疾患である。治療として、患者自身の筋前駆細胞 あるいは幹細胞に ex vivo でジストロフィンを導入して、患者に戻す autologous cell transplantation が期待されている。我々は筋衛星細胞と 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。さらに SP 細胞の機能を解析する目的で SP 細胞特異的なマーカーである CD2488(endosialin)のプロモーター領域にサル由来ジフテリア毒素受容体と GFP の融合タンパク質の cDNA を連結したプラスミドを作成、現在トランスジェニックマウスを作出中である。

**A. 研究目的**

筋ジストロフィー患者から筋前駆細胞を調整し、ジストロフィン遺伝子を導入して患者自身に移植する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**

**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。  
**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。

**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)

本実験の実験計画書を神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会へ提出し、承認を得、

同研究所の定める小型実験動物倫理指針に従って実験を行った。

## C. 研究成果

### 1. 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に比較して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

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

DMD患者本人の筋前駆細胞あるは幹細胞を細胞移植治療に用いる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>

1. 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
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* 10:702-713, 2008
3. 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
4. Segawa M, 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.* 2008 [Epub ahead of print]
5. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Manyu 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: 621-631, 2009
7. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T:  
Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.*, 2009 [Epub ahead of print]

## II. 学会発表

### <国外>

1. 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

### <国内>

1. 増渕 菜弥, 宮本 香織, 和田 倫子, 花岡 和則, 遠藤 玉夫, 鈴木 友子, 武田 伸一:  
 $\alpha$ -ジストログリカンのO-マンノース型糖鎖修飾は骨格筋幹細胞の増殖と移動に重要である 第6回幹細胞シンポジウム 平成20年5月16-17日、学術総合センター
2. 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, 3.5-6, 2009

3. 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, 12.10, 2008

### <班会議及び関連研究会>

1. 矢田 英理香, 本橋 紀夫, 鈴木 友子, 武田 伸一:  
Mdx マウスからのiPS細胞の樹立とその筋分化能の検討, 第3回筋ジストロフィー治療研究合同発表会. 山梨, 10.25, 2008
2. 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, 東京, 12.3-4, 2008

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

新生仔筋ジストロフィー犬の血清 CK 高値の機序の解明

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**

筋ジストロフィー犬の出生時血清 CK 値が生涯を通じて最も高く、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、予定的帝王切開の導入し、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、新生仔筋ジストロフィー犬では、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。

**A. 研究目的**

Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬（筋ジストロフィー犬）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。新生仔筋ジストロフィー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。

**B. 研究方法**

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、筋ジストロフィー犬 29 頭）と帝王切開 18 回（正常犬 38 頭、保因犬 26 頭、筋ジストロフィー犬 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、筋ジストロフィー犬 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、筋ジストロフィー犬 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。

**C. 研究成果**

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、筋ジストロフィー犬：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、筋ジストロフィー犬に差はなかった。自然分娩および帝王切開における新生仔死亡率はそれぞれ、正常犬：4.0%、2.6%、保因犬：5.7%、3.8%、筋ジストロフィー犬：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。

## D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

<英文>

1. Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, and Hijikata T: MicroRNA-206 is overexpressed in newly formed muscle fibers: Implication of potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct* 33:163-169, 2008
2. Yokota T, Takeda S, Lu Qi, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP: A renaissance for anti-sense oligonucleotide drugs in neurology. *Arch Neurol-Chicago* 66:32-38, 2008

### II. 学会発表

<国内>

1. 八幡由美子、北秀樹、小林正典、市川慎一、中山隆幸、大島幸子、辛鎮洪、齊藤崇、弓削田直子、岡田尚巳、中村昭則、武田伸一:新生仔筋ジストロフィー犬の呼吸筋障害の検討。第55回日本実験動物学会総会、第42回日本実験動物技術者公開総会 仙台 2008.5
2. 高橋明男、中村昭則、小林正典、武田伸一:筋ジストロフィー犬の新生仔劇症型

の機序の解明。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

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

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**

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。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。

**A. 研究目的**

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する新規治療法として細胞移植治療が期待されているが、従来から移植細胞の供給源として用いられてきた筋衛星細胞、骨髄細胞、Side Population 細胞などは、必ずしも移植効率が高くないことが問題であった。そこで、より移植および分化効率の高い細胞として、骨髄間質細胞を用いた筋分化および移植システムを構築した。さらにモデル動物を用いた移植実験を行い、有効性の検証を行った。

**B. 研究方法**

骨髄間質細胞は患者本人から採取できることから倫理的問題が少なく、骨格筋由来の幹細胞と比べて細胞数確保が比較的容易であること、また免疫抑制効果により排除されにくいことから、現時点では最も現実的な細胞移植治療のツールと期待され、以下の研究を計画した。

(1)骨髄間質細胞からの効果的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 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  $\alpha$ -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、*mck*-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。2.5x10<sup>5</sup>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: 4311-19, 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。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、 $2 \times 10^6$  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。

### C. 研究結果

#### (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プ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-1β 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、血液検査上も副作用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、陰性分画に比べて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 ないし TA に移植