

200833018B

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

総合研究報告書

(平成18年度～平成20年度)

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

総合研究報告書

(平成18年度～平成20年度)

主任研究者 武 田 伸 一

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 33

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 37

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総合研究報告書

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
	島津 美樹	国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部	室長
	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(*Science*, 2005)。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。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。

- 3) DMD モデル動物である筋ジストロフィー犬を用いて、筋ジストロフィー犬の骨格筋障害について選択的脂肪抑制 chemical shift selective (CHESS) T2 強調画像の有用性を検討した。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可能で、病態評価に有用と考えられた(*Muscle Nerve*, in press)。
- 4) 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。原因として胎児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考えられた。
- 5) ビーグル種を遺伝的背景にもつ筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) の心筋障害について、心電図検査、心臓超音波検査および病理学的検査を用いて検討した。CXMD_J は、ゴールデン・レトリバー種を背景にする GRMD に比べ心筋障害の進行が遅く、軽症であった。また、CXMD_J では、心電図の異常 Q 波が左室後壁の線維化に先行して出現し、刺激伝導系 Purkinje 線維の空胞変性との関係が考えられた(*Circulation*, 2008)。
- 6) Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する治療として、患者自身の筋前駆細胞あるいは幹細胞に ex vivo でジストロフィンを導入して、患者に戻す autologous cell transplantation が期待されている。我々は DMD の動物モデルである mdx マウスから筋衛星細胞を FACS にて調整し、レンチウイルスベクターを用いて ex vivo でマイクロジストロフィンを導入し、mdx マウスへ移植する実験を行い、その有効性を確認した(*Mol Ther*, 2007)。
- 7) 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(*Am J Pathol*, 2008)。

A. 研究目的

1. 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、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。

2. 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 (CXMD_J) 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、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。

3. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の心筋障害として、左室後壁から始まる心筋の線維化や拡張型心筋症を呈する他、頻脈や突然死につながる心室性不整脈、深くて幅の狭い異常 Q 波、胸部第一誘導

の R 波の増高、PQ 間隔の短縮などの心電図異常が知られている。これらの所見はゴールドンレトリバー種の筋ジストロフィー (GRMD) でも見出されている。そこで、ビーグル種の筋ジストロフィー (CXMD_J) の心筋障害について検討した。

4. 筋ジストロフィー犬 (CXMD_J) 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、MRI を用いた評価法についてその検討を進めた。

5. 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 autologous cell transplantation の確立するために、レンチウイルスベクターを用いた ex vivo の遺伝子導入法の確立と安全性の検討を行った。更に、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
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 1,700~1,900 cells/cm² の密度で継代し、24 時間後に bFGF (10ng/ml)、forskolin (FSK) (5μM)、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り、両側の声帯が外転しないと窒息してしまうので、一側のみを切断して、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。

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 に結合する蛋白質の解析を進めた。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 キメラ蛋白質を

発現させ、結合蛋白質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、骨髄間質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。

2. 骨髄間質細胞を用いた新たな治療法の開発

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 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。

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。2.5x10⁵ 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。

2-4. 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、 2×10^6 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。

2-5. 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。

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) および筋ジストロフィー犬 (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. 筋ジストロフィー犬の表現型に関する検討

①呼吸開始による血清 CK 値への影響に

ついて、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、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。

4. 筋ジス犬の心障害に関する検討

対象は第 3 世代の同腹犬 3 頭 (内訳は正常犬 1 頭および CXMD₃ 2 頭を用いて 2、3、4、6、9、12、15 および 21 ヶ月齢時に心電図と心エコー検査を施行した。21 ヶ月齢時に全頭に安楽殺を行なった後に心筋病理についても検討した。さらに、その他に正常犬 3 頭、CXMD₃ 6 頭についても心電図、心エコー検査および病理学的検討を行なった。

5. 治療モデルとしての筋ジス犬評価系の確立

5-1. トレッドミル

筋ジス犬の走行能力を検定するためにトレッドミルを使用した。一方、平地走行テストとして 15 m 走を選択し、走行に要する秒数を測定すると共にビデオで記録した。

5-2. MRI

治療評価のために、MRI (3.0T/Siemens 社製 Trio) を使用した骨格筋の画像解析を行った。対象は正常ビーグル犬 2 頭 (6 および 14 ヶ月齢) および CXMD₃ (2、4、8 ヶ月齢および 6 歳齢) とした。撮像前にチオペンタールナトリウムの静脈投与にて麻酔導入後イソフルランの吸入にて維持麻酔と呼吸管理を行った。MRI は超伝導磁石型 3.0 Tesla MRI 装置 (MAGNETOM Trio、Siemens-Asahi Medical Technologies, Japan) を用い、送受信型膝コイルを使用して大腿、下腿について撮像した。撮像法は、T1 強調画像 (T1WI)、T2 強調画像 (T2WI)、選択的

脂肪抑制 T1 強調画像 (CHESS-T1WI)、Gd-DTPA (0.2 ml/kg) を用いた造影 T1 強調画像 (Gd-T1WI) および選択的脂肪抑制造影 T1 強調画像 (CHESS-Gd-T1WI) を用いた。CHESS-Gd-T1WI は、通常の T1WI では脂肪を高信号として捉えるために、まずプリサチュレーションを印可することで脂肪の信号を抑制し、造影剤によりジストロフィー変化領域の信号を増強させて差別化を計ることが可能な方法である。

6. レンチウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子治療

6-1. 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。

6-2. 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。

6-3. 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。

7. マウス骨格筋由来の幹細胞

7-1. 幹細胞の調整

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、ヘキスト 33342 で染色

して、ヘキストで染色されないSP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、移植実験に供した。

7-2. 幹細胞移植と移植結果の解析

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。

(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. 骨髄間質細胞からの筋細胞誘導

1-1. Notch 遺伝子による筋細胞の誘導

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-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-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（donor #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。

1-2. Notch 結合蛋白質の検索

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。

2. 骨髄間質細胞を用いた新たな治療法の開発

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。

2-2. 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-1 β 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。

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。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。

2-4. 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 に移植した。この際、移植期間中は免疫抑制剤 mycophenolate mofetil 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。

2-5. 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 陽性細胞を広く認めた。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。

3. 筋ジス犬の繁殖/維持とその病態

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 (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。

3-4. 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、免疫組織化学とウェ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。

4. 筋ジス犬の心障害について

4-1. 心電図の解析

心拍数およびPQ間隔は15ヶ月齢以降のCXMD_J2頭でそれぞれ増加および短縮していた。QRS間隔は両者の間に差は見られなかった。6ヶ月齢時の正常犬とCXMD_Jの心電図では、CXMD_JのII、IIIおよびaVF誘導で深く幅の狭いQ波が観察された。そこで、II、IIIおよびaVF誘導でQ/R比を経時的に測定したところ、6ヶ月齢以降のCXMD_Jでは正常犬に比べて一定して高値を示した。

4-2. 心エコー検査の結果

拡張期左室内腔径、左室後壁厚および心室中隔厚は、正常犬とCXMD_Jの間に差はなかった。左心室の短縮率(FS)は、CXMD_J1頭で月齢と共に低下していたが、21ヶ月齢時の値は正常範囲内であった。異常Q波が出現していた6および9ヶ月齢のCXMD_J2頭にエコー輝度の異常は見られなかったが、12ヶ月齢で左室後壁に線維化を示す高輝度病変が見られた。

4-3. 病理学的検討

CXMD_J2頭とも肉眼的には左心室内腔の拡張および心室壁の菲薄化は見られず、左右の心室壁内にも明らかな病変はみられなかった。しかし、組織学的には左室後壁に局所的に線維化の所見が認められた。

5. 筋ジス犬を対象とした治療評価系の確立

5-1. トレッドミドルと平地走行

トレッドミドルと15m平地走行テストを筋ジス犬に対して行い、並行して進めているantisense morpholinoを用いた治療法に応用して良い結果を得た。

5-2. 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T1WIでI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。

6. レンチウイルスベクターを併用した幹細胞移植

6-1. ジストロフィン遺伝子の発現ベクターの構築

我々の研究室で開発した短縮型マイクロジストロフィンをレンチウイルスベクターに組み込み、高タイターのウイルスベクターを調製できた。

6-2. ex vivo 遺伝子導入

レンチウイルスベクターを in vitro で筋衛星細胞へ感染させた。レポーター遺伝子 (Venus) の発現で判断すると MOI 100-200 程度で 99% 近くの筋衛星細胞に transduce 可能であった。この MOI 数では、細胞毒性はみられないか極軽度であった。

6-3. 移植実験

マイクロジストロフィンを発現するレンチウイルスベクターを感染させた後、mdx マウス骨格筋へ移植した細胞は、筋線維を形成し、その筋線維膜にはジストロフィンの発現が回復していた。レンチウイルスベクターを感染させたことによる筋衛星細胞の筋再生能力の低下は認められなかったが、再生線維はクラスターを形成し、移植した筋衛星細胞が広く筋組織内を移動することはないと思われた。

7. マウス骨格筋由来の幹細胞

7-1. CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞

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。

7-2. 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、細胞の広がりには 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. 骨髄間質細胞からの筋細胞誘導

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、本誘導方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を期待している。

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した個体を得られ、移植実験を行うことができたが、その効率は必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。

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. 筋ジストロフィー犬の繁殖/維持とその病態

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。

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. 筋ジス犬の心障害

CXMD_J の心電図所見は、DMD や GRMD と同じく心拍数の増加や PQ 間隔の短縮、II、III、aFV 誘導で異常 Q 波が確認された。しかし、異常 Q 波が出現する 6 ヶ月齢では心エコー輝度異常は見られず、12 ヶ月齢ではじめて左室後壁に高輝度病変が認められた。また、6-7 ヶ月齢の CXMD_J 8 頭で異常 Q 波が認められたが、その内 7 頭は同齢でもエコー輝度異常はみられなかった。GRMD では、6-7 ヶ月齢の 73% に左室後壁の高輝度病変が認められ、病理学的検討でも 6.5 ヶ月齢より左室壁、左室乳頭筋に急性期病変が出現し、12 ヶ月齢で広汎な線維化が起こることが報告

されている。しかし、2 頭の CXMD_J では 21 ヶ月齢でも肉眼的異常は見られず、左室後壁に局所的な線維化を認めたのみであった。以上から、心筋の線維化は GRMD に比べて CXMD_J が遅いと思われる。DMD や GRMD の異常 Q 波は左室後壁の線維化による心筋の起電力の低下に起因するとされてきたが、異常 Q 波が左室後壁の線維化に先行して出現することを始めて明らかにした。CXMD_J は心筋障害は軽症であることからの発症早期について検討するのに適したモデル動物であると考えられる。

5. 治療モデルとしての筋ジス犬の治療評価系に関しては、トレッドミドル、平地走行テストを用いる方法を確立した。MRI による時空間的評価では、大腿は薄筋が最も早期に障害され、半腱様筋、半膜様筋、大腿二頭筋が続き、大腿直筋が最も遅かった。下腿では前脛骨筋の方が腓腹筋よりも障害進行が早いことが示唆された。しかしながら、DMD 患者の CT 値を基にした断面あたりの筋肉量および脂肪量を算出した報告では、大腿では大腿二頭筋や大腿直筋が早期に、薄筋は遅く障害され、下腿では腓腹筋が前脛骨筋よりも早期に障害されるとされており、これはヒトとイヌの間で、筋肉間で筋線維タイプの分布、筋線維の大きさ、収縮のタイプ、再生能力、糖代謝あるいは物理的負荷による影響などが異なっている可能性が考えられる。また、ジストロフィー変化が早期かつ高度に起こったとしても、脂肪浸潤への移行が早く起こるとは限らないことも示唆された。このことから、筋障害の評価では脂肪変化のみではなくジストロフィー変化も同時に捉える必要があり、この点でも CT に比べ MRI による評価の方が優れていると考えられる。

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。

6. 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。

7. 骨格筋由来の幹細胞について

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. 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. IL-10 発現 AAV ベクターの併用により、局所的な免疫制御が可能になった。

5. 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。

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. CXMD₁ の心筋障害は GRMD の所見に合致していたものの、よりも軽度と考えられた。また、心電図異常 Q 波が、左室後壁の線維化に先行して出現することをはじめて明らかにし、異常 Q 波の成因を考える上で重要な知見を得たと考えている。

8. 治療モデルとしての筋ジス犬の評価系を確立するために 3.0T MRI を用いた骨格筋障害の評価を行い、脂肪変化との鑑別が可能な CHESS-Gd-T1WI が有用であるとの結果を得た。

9. 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。

10. 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, Manya 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 $\alpha 2$ 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, Sheykholeslami 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