

201446030A

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業

(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))

G-C S Fによる筋ジストロフィー治療方法の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 福田 恵一

慶應義塾大学

平成27(2015)年 3月

様式第18

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））による委託業務として、清家篤が実施した平成26年度「G-CSFによる筋ジストロフィー治療方法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	1
福田 恵一	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	9
1. 筋ジストロフィーモデルマウス；mdx マウスにおける検討	
2. 重症筋ジストロフィーモデルマウス；mdx/utrophin ノック アウトマウスにおける検討	
湯浅 慎介	
III. 学会等発表実績	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

I. 委託業務成果報告（総括）

及び

II. 委託業務成果報告（業務項目）

G-CSFによる筋ジストロフィー治療方法の開発

業務主任者：福田 恵一 慶應義塾大学医学部循環器内科 教授

研究要旨

1980年代後半にデュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子として dystrophin が同定され、分子生物学的手法を用いた基礎研究が進み病態の解明に至り、治療法の確立が期待されが、未だ治療法は確立されていない。G-CSFは主に化学療法後の白血球低下に対してもしくは造血幹細胞の動員に用いられている薬剤である。広く用いられている薬剤であるがG-CSFの骨格筋に対する作用の検討は成されておらず、全く未知であった。我々はカルジオトキシンによる筋傷害モデルにおいて、再生筋芽細胞にG-CSF受容体が一過性に発現し、G-CSF投与により筋再生の促進を確認した。本研究においては、G-CSFの筋ジストロフィーに対する効果と安全性を詳細に検討することにある。様々な筋ジストロフィーモデル遺伝子改変マウスを用いて、G-CSFの効果（生存延長、筋力回復）を確認する。また最も効果を示す最適な投与方法、投与量、投与間隔等の詳細な検討を行うことを目的とする。

研究分担者

湯浅 慎介 慶應義塾大学医学部循環器内科 学部内講師

A. 研究目的

我々は顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体がマウス胎仔筋芽細胞において発現していることを見出した。また成獣における再生筋芽細胞においても G-CSF 受容体は発現しており、G-CSF を添加することにより傷害後再生筋肉の増殖を促すことを報告してきた。本研究は、様々な筋肉疾患の中でも最も重篤で治療方法がない筋ジストロフィーにおいて、G-CSF 投与により筋肉再生を促し、筋力回復および生命予後の回復を検討することを目的としている。

B. 研究方法

マウス筋ジストロフィーモデルとして mdx マウスを用いて、G-CSF の作用を検証する。mdx マウスにおける骨格筋傷害の時間経過を再度検証し、骨格筋傷害時における G-CSF 受容体の発現変化を時間空間的に検証する。同解析により G-CSF 受容体が筋芽細胞において強く発現している時期を同定し、同時期に G-CSF を投与することにより筋再生に対する影響を検証する。具体的には G-CSF 投与による再生骨格筋線維数の変化、筋肉の大きさの変化、筋力の変化を検証していく。また G-CSF 受容体欠損マウスを用いることにより、G-CSF シグナルが無い場合の骨格筋の作用を検討することが可能となる。G-CSF 受容体欠損 mdx マウスを作製し、G-CSF シグナルが筋ジストロフィーモデルマウスにおいて必須な因子であるかどうかを検討する。同マウスにおける再生骨格筋の数の変化、筋肉の大きさの変化、筋力の変化を検証していくこととした。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験のみであり、動物実験は大学の動物実験委員会に申請し、同規則及び NIH のガイドラインに従っている。

C. 研究結果

mdx マウスにおいては生後 3 週～5 週程の期間において骨格筋の変性が顕著に認められ、また同時期に再生骨格筋細胞の増加も観察される。またデュシャンヌ型筋ジストロフィーモデルにおける再生時の小型再生骨格筋細胞においても G-CSF 受容体の発現が認められた。同時期において G-CSF を投与することにより、再生骨格筋細胞数の増加、筋肉径と重量の増大、および筋力の増加が有意に観察された。G-CSF 受容体欠損 mdx マウスにおいては、3～5 週において再生骨格筋細胞が著明に減っており、同期間を過ぎても変性細胞が存在していることが観察された。また筋肉径と重量も低下しており、筋力も著明に低下していることが観察された。

D. 考察

我々は、以前報告した研究の中でカルジオトキシンによる筋肉傷害モデルにおいて G-CSF が強い筋再生促進作用と、それによる機能回復を来すことを発見した。また筋肉疾患の中で我々が可及的速やかに治療方法を開発すべき疾患として筋ジストロフィーがある。幼少期に発症し、進行していく同疾患に対する有効な治療法は現在まで確立されていない。同疾患に対する G-CSF による筋再生療法の開発は、早期に患者に還元できる可能性がある研究であり精力的に取り組んでいる。これまでの研究結果からは G-CSF の投与は筋ジストロフィーモデルマウスの組織学的、機能学的回復に極めて有効であることが確認された。今後はさらなる分子機序を解明し、治療方法として確立していきたい。

E. 結論

本研究により、筋ジストロフィーモデルマウスにおいては、G-CSF の投与が有効な

治療法となる可能性が示された。

F. 健康危惧情報

本研究は動物実験のみであり、健康危惧情報は特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H. Reprogramming Suppresses Premature Senescence Phenotypes of Werner Syndrome Cells and Maintains Chromosomal Stability over Long-Term Culture. **PLoS One**. 9(11),2014 Nov 12
2. Kimura T, Takatsuki S, Miyoshi S, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Jinzaki M, Fukuda K. Pericardial Endoscopy-Guided Left Atrial Appendage Ligation: A Pilot Study in a Canine Model. **Circ Cardiovasc Interv**. [Epub ahead of print] 2014 Nov 11.
3. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **J Am Heart Assoc**. 3(6). 2014 Nov 11
4. Booka E, Takahashi T, Tokizawa K, Uchi Y, Okamura A, Fukuda K, Nakamura R, Wada N, Kawakubo H, Saikawa Y, Omori T, Takeuchi H, Sasaki A, Mikami S, Kumai K, Kameyama K, Kitagawa Y. A case of late lymph node metastasis after three endoscopic mucosal resections of intramucosal gastric cancers. **World J Surg Oncol**. 12(1):339. 2014 Nov 11
5. Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Hydrogen Inhalation During Normoxic Resuscitation Improves Neurological Outcome in a Rat Model of Cardiac Arrest, Independent of Targeted Temperature Management. **Circulation**. [Epub ahead of print] 2014 Nov 3.
6. Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A Massive Suspension Culture System With Metabolic Purification for Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Stem Cells Transl Med**. [Epub ahead of print] 2014 Oct 29.
7. Inohara T, Kohsaka S, Shiraishi Y, Goda A, Sawano M, Yagawa M, Mahara K, Fukuda K, Yoshikawa T; West Tokyo Heart Failure Registry Investigators. Prognostic impact of renal and hepatic dysfunction based on the MELD-XI score in patients with acute heart failure. **Int J Cardiol**. 176(3):571-3. 2014 Oct 20

8. Inohara T, Kohsaka S, Miyata H, Ueda I, Ishikawa S, Ohki T, Nishi Y, Hayashida K, Maekawa Y, Kawamura A, Higashi T, Fukuda K. Appropriateness ratings of percutaneous coronary intervention in Japan and its association with the trend of noninvasive testing. **JACC Cardiovasc Interv.** 7(9):1000-9. 2014 Sep
9. Sano M, Aizawa Y, Katsumata Y, Nishiyama N, Takatsuki S, Kamitsuji S, Kamatani N, Fukuda K. Evaluation of differences in automated QT/QTc measurements between Fukuda Denshi and Nihon Kodan systems. **PLoS One.** 9(9):e106947. 2014 Sep 17
10. Sako H, Fukuda K, Saikawa Y, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Takeuchi H, Ohmori T, Kitagawa Y. Antitumor effect of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib on gastrointestinal stromal tumor (GIST) and imatinib-resistant GIST cells. **PLoS One.** 9(9):e107613. 2014 Sep 15
11. Kaneko Y, Horie M, Niwano S, Kusano K, Takatsuki S, Kurita T, Mitsuhashi T, Nakajima T, Irie T, Hasegawa K, Noda T, Kamakura S, Aizawa Y, Yasuoka R, Torigoe K, Suzuki H, Ohe T, Shimizu A, Fukuda K, Kurabayashi M, Aizawa Y. Electrical Storm in Patients with Brugada Syndrome is Associated with Early Repolarization. **Circ Arrhythm Electrophysiol.** [Epub ahead of print]2014 Sep 14.
12. Shiraishi Y, Kohno T, Egashira T, Maekawa Y, Yamada Y, Yoshitake A, Shimizu H, Sano M, Jinzaki M, Fukuda K. Thrombus in acute aortic dissection with atrial fibrillation: a treatment dilemma. **Am J Emerg Med.** [Epub ahead of print]2014 Aug 7.
13. Yamakawa H, Murata M, Suzuki T, Yada H, Ishida H, Aizawa Y, Adachi T, Kamiya K, Fukuda K. Suppression of Rad leads to arrhythmogenesis via PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor activity in the heart. **Biochem Biophys Res Commun.** 452(3):701-7. 2014 Sep 26
14. Kuno T, Tamura Y, Ono T, Murata M, Kuwana M, Satoh T, Fukuda K. Recurrent right atrial thrombosis due to Behçet disease. **Can J Cardiol.** 30(10):1250.e1-3. 2014 Oct
15. Maekawa Y, Jinzaki M, Anzai A, Tsuruta H, Matsumura K, Yamada Y, Tabei R, Kawakami T, Hayashida K, Yuasa S, Murata M, Suzuki M, Kuribayashi S, Fukuda K. Successful second attempt multidetector computed tomography-guided percutaneous transluminal septal myocardial ablation for an octogenarian with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. **Int J Cardiol.** 176(3):e131-2. 2014 Oct 20
16. Aizawa Y, Sato M, Ohno S, Horie M, Takatsuki S, Fukuda K, Chinushi M, Usui T, Aonuma K, Hosaka Y, Haissaguerre M, Aizawa Y. Circadian pattern of fibrillatory events in non-Brugada-type idiopathic ventricular fibrillation with a focus on J waves. **Heart Rhythm.** [Epub ahead of print]2014 Aug 15.

17. Sano M, Kamitsuji S, Kamatani N, Hong KW, Han BG, Kim Y, Kim JW, Aizawa Y, Fukuda K; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium (JPDSC). Genome-wide association study of electrocardiographic parameters identifies a new association for PR interval and confirms previously reported associations. **Hum Mol Genet.** 23(24):6668-76. 2014 Dec 15
18. Endo J, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Kang JX, Arai H, Arita M. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. **J Exp Med.** 211(8):1673-87. 2014 Jul 28
19. Kohno T, Kohsaka S, Ohshima K, Takei Y, Yamashina A, Fukuda K. Attitudes of early-career cardiologists in Japan about their cardiovascular training programs. **Am J Cardiol.** 114(4):629-34. 2014 Aug 15
20. Inohara T, Hayashida K, Fukuda K. Double balloon aortic valvuloplasty in TAVI era: insight from intracardiac echocardiography and multidetector computed tomography findings. **J Invasive Cardiol.** 26(7):E95-7. 2014 Jul
21. Matsuda S, Takeuchi H, Kawakubo H, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Kitagawa Y. Cumulative Prognostic Scores Based on Plasma Fibrinogen and Serum Albumin Levels in Esophageal Cancer Patients Treated with Transthoracic Esophagectomy: Comparison with the Glasgow Prognostic Score. **Ann Surg Oncol.** [Epub ahead of print] 2014 Jun 21.
22. Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Isomi M, Nakashima H, Akiyama M, Wada R, Inagawa K, Nishiyama T, Kaneda R, Fukuda T, Takeda S, Tohyama S, Hashimoto H, Kawamura Y, Goshima N, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M. MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. **EMBO J.** 33(14):1565-81. 2014 Jul 17
23. Egashira T, Shimizu H, Yamada Y, Fukuda K. Successful aortic root replacement and shunt closure in a case with rare coexistence of congenital cardiac malformations: bicuspid aortic valve with annuloaortic ectasia, single coronary artery, and patent foramen ovale. **Int J Cardiovasc Imaging.** 2014 Oct;30(7):1267-8.
24. Okamura A, Takahashi T, Saikawa Y, Mayanagi S, Fukuda K, Nakamura R, Wada N, Kawakubo H, Omori T, Takeuchi H, Sasaki A, Kitagawa Y. Intra-abdominal desmoid tumor mimicking gastric cancer recurrence: a case report. **World J Surg Oncol.** 12:146. 2014 May 10
25. Yanagisawa R, Kataoka M, Inami T, Shimura N, Ishiguro H, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T. Safety and efficacy of percutaneous transluminal pulmonary angioplasty in elderly patients. **Int J Cardiol.** 175(2):285-9. 2014 Aug 1
26. Anzai A, Yuasa S, Kanazawa H, Kodaira M, Arai T, Kawakami T, Hayashida K, Maekawa Y, Kawamura A, Fukuda

- K. "Phantom vessel" running parallel to the culprit artery in a case of acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 7(6):e51-2. 2014 Jun
27. Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One.* 9(5):e97397. 2014 May 13
28. Yamamoto W, Hashimoto N, Matsuura J, Machida T, Ogino Y, Kobayashi T, Yamanaka Y, Ishiwata N, Yamashita T, Tanimoto K, Miyoshi S, Fukuda K, Nakaya H, Ogawa S. Effects of the selective K_{ACh} channel blocker NTC-801 on atrial fibrillation in a canine model of atrial tachypacing: comparison with class Ic and III drugs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63(5):421-7. 2014 May
29. Negi S, Sawano M, Kohsaka S, Inohara T, Shiraishi Y, Kohno T, Maekawa Y, Sano M, Yoshikawa T, Fukuda K. Prognostic implication of physical signs of congestion in acute heart failure patients and its association with steady-state biomarker levels. *PLoS One.* 9(5):e96325. 2014 May 6
30. Aizawa Y, Takatsuki S, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda Y, Sato T, Ogawa S, Fukuda K. Thoracic impedance as a therapeutic marker of acute decompensated heart failure. *Int J Cardiol.* 174(3):840-2. 2014 Jul 1
31. Egashira T, Yuasa S, Kimura M, Sawano M, Anzai A, Hayashida K, Kawamura A, Kimura T, Nishiyama N, Aizawa Y, Takatsuki S, Tsuruta H, Murata M, Yamada Y, Kohno T, Maekawa Y, Sano M, Kosaki K, Fukuda K. Coexistence of two distinct fascinating cardiovascular disorders: heterotaxy syndrome with left ventricular non-compaction and vasospastic angina. *Int J Cardiol.* 174(2):e54-6. 2014 Jun 15
32. Irino T, Takeuchi H, Matsuda S, Saikawa Y, Kawakubo H, Wada N, Takahashi T, Nakamura R, Fukuda K, Omori T, Kitagawa Y. CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 14:291. 2014 Apr 26
33. Fujita J, Fukuda K. Future prospects for regenerated heart using induced pluripotent stem cells. *J Pharmacol Sci.* 125(1):1-5. 2014
34. Meguro S, Kawai T, Matsubashi T, Sano M, Fukuda K, Itoh H, Suzuki Y. Basal-Supported Oral Therapy with Sitagliptin Counteracts Rebound Hyperglycemia Caused by GLP-1 Tachyphylaxis. *Int J Endocrinol.* 2014:927317. 2014
35. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y,

- Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*. [Epub ahead of print]2014 Apr 15.
36. Inami T, Kataoka M, Ando M, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T. A new era of therapeutic strategies for chronic thromboembolic pulmonary hypertension by two different interventional therapies; pulmonary endarterectomy and percutaneous transluminal pulmonary angioplasty. *PLoS One*. 9(4):e94587. 2014 Apr 11
37. Inaba Y, Shimizu H, Yoshitake A, Kawamura A, Fukuda K, Yozu R. Benefit of minimally invasive treatment of concomitant multiple aortic aneurysms, atrial septal defect and colon cancer. *Ann Vasc Dis*. 7(1):79-82. 2014
38. Maekawa Y, Jinzaki M, Anzai A, Matsumura K, Tsuruta H, Kawakami T, Hayashida K, Yuasa S, Murata M, Suzuki M, Kuribayashi S, Fukuda K. Utility of the reverse wire technique in multidetector computed tomography-guided percutaneous transluminal septal myocardial ablation. *Int J Cardiol*. 173(3):e33-4. 2014 May 15
39. Hashimoto H, Yuasa S, Tabata H, Tohyama S, Hayashiji N, Hattori F, Muraoka N, Egashira T, Okata S, Yae K, Seki T, Nishiyama T, Nakajima K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Fukuda K. Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol*. 72:241-9. 2014 Jul
40. Shirakawa K, Egashira T, Ieda M, Kawaguchi S, Okamoto K, Kudo M, Yokoyama K, Tsuruta H, Murata M, Mikami S, Anzai A, Hayashida K, Kohno T, Maekawa Y, Sano M, Yozu R, Fukuda K. Multidisciplinary approach to the treatment of cardiac AA amyloidosis and aortic stenosis due to Castleman's disease: a hybrid therapy with tocilizumab and aortic valve replacement. *Int J Cardiol*. 173(2):e9-e11. 2014 May 1
41. Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, Fukuda K, Akimoto S, Hayashida T, Okabayashi K, Tsuruta M, Hasegawa H, Kitagawa Y. Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 31(5):2115-22. 2014 May
42. Kimura T, Takatsuki S, Inagawa K, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Fukumoto K, Aizawa Y, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda K. Serum inflammation markers predicting successful initial catheter ablation for atrial fibrillation. *Heart Lung Circ*. 23(7):636-43. 2014 Jul
43. Kimura T, Takatsuki S, Tanimoto K, Katsumata Y, Nishiyama T, Inagawa K, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Fukuda K. Thrombus formation in the left atrial appendage during catheter ablation for atrial fibrillation under sufficient

heparinization. **Can J Cardiol.**

30(4):465.e5-6. 2014 Apr

44. Aizawa Y, Takatsuki S, Negishi M, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Tanimoto K, Kohsaka S, Sano M, Fukuda K. Clinical characteristics of atrial fibrillation detected by implanted devices and its association with ICD therapy. **Int J Cardiol.** 172(3):e529-30. 2014 Apr 1

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

G-CSFによる筋ジストロフィー治療方法の開発

－筋ジストロフィーモデルマウス；mdxマウスにおける検討－
－重症筋ジストロフィーモデルマウス；mdx/utrophin ノックアウトマウスにおける検討－

担当責任者：湯浅慎介 慶應義塾大学医学部循環器内科 学部内講師

研究要旨

1980年代後半にデュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子として dystrophin が同定され、分子生物学的手法を用いた基礎研究が進んだが、未だ治療法は確立されていない。我々はカルジオトキシンによる筋傷害モデルにおいて、再生筋芽細胞に G-CSF 受容体が一過性に発現し、G-CSF 投与により筋再生の促進を確認した。本研究においては、G-CSF の筋ジストロフィーに対する効果と安全性を詳細に検討することにある。様々な筋ジストロフィーモデル遺伝子改変マウスを用いて、G-CSF の効果(生存延長、筋力回復)を確認する。また最も効果を示す最適な投与方法、投与量、投与間隔等の詳細な検討を行うことを目的とする。

A. 研究目的

我々は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体がマウス胎仔筋芽細胞において発現していることを見出した。また成獣における再生筋芽細胞においても G-CSF 受容体は発現しており、G-CSF を添加することにより傷害後再生筋肉の増殖を促すことを報告してきた。本研究は、様々な筋肉疾患の中でも最も重篤で治療方法がない筋ジストロフィーにおいて、G-CSF 投与により筋肉再生を促し、筋力回復および生命予後の回復を検討することを目的としている。

B. 研究方法

我々は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体がマウス胎仔筋芽細胞において発現していることを見出した。また成獣にお

ける再生筋芽細胞においても G-CSF 受容体は発現しており、G-CSF を添加することにより傷害後再生筋肉の増殖を促すことを報告してきた。本研究は、様々な筋肉疾患の中でも最も重篤で治療方法がない筋ジストロフィーにおいて、G-CSF 投与により筋肉再生を促し、筋力回復および生命予後の回復を検討することを目的としている。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験のみであり、動物実験は大学の動物実験委員会に申請し、同規則及び NIH のガイドラインに従っている。

C. 研究結果

mdx マウスにおいては生後3週～5週程の期間において骨格筋の変性が顕著に認めら

れ、また同時期に再生骨格筋細胞の増加も観察される。またデュシャンヌ型筋ジストロフィーモデルにおける再生時の小型再生骨格筋細胞においても G-CSF 受容体の発現が認められた。同時期において G-CSF を投与することにより、再生骨格筋細胞数の増加、筋肉径と重量の増大、および筋力の増加が有意に観察された。G-CSF 受容体欠損 mdx マウスにおいては、3~5 週において再生骨格筋細胞が著明に減っており、同期間を過ぎても変性細胞が存在していることが観察された。また筋肉径と重量も低下しており、筋力も著明に低下していることが観察された。

D. 考察

我々は、以前報告した研究の中でカルジオトキシンによる筋肉傷害モデルにおいて G-CSF が強い筋再生促進作用と、それによる機能回復を来すことを発見した。また筋肉疾患の中で我々が可及的速やかに治療方法を開発すべき疾患として筋ジストロフィーがある。幼少期に発症し、進行していく同疾患に対する有効な治療法は現在まで確立されていない。同疾患に対する G-CSF による筋再生療法の開発は、早期に患者に還元できる可能性がある研究であり精力的に取り組んでいる。これまでの研究結果からは G-CSF の投与は筋ジストロフィーモデルマウスの組織学的、機能学的回復に極めて有効であることが確認された。今後はさらなる分子機序を解明し、治療方法として確立していきたい。

E. 結論

本研究により、筋ジストロフィーモデルマウスにおいては、G-CSF の投与が有効な治療法となる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Egashira T, **Yuasa S**, Tohyama S, Kuroda Y, Suzuki T, Seki T, Fukuda K. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models: Characterization of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol.* 2014 Dec 18.
- Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, **Yuasa S**, Fukuda K, Oka C, Iwata T. HTRA1(High Temperature Requirement A Serine Peptidase 1) Gene Is Transcriptionally Regulated by Insertion/Deletion Nucleotides Located at the 3 Prime End of the ARMS2(Age-Related Maculopathy Susceptibility 2) Gene in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *J Biol Chem.* 2014 Dec 17.
- Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, **Yuasa S**, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H. Reprogramming Suppresses Premature Senescence Phenotypes of Werner Syndrome Cells and Maintains Chromosomal Stability over Long-Term Culture. *PLoS One.* 2014 Nov 12;9(11):e112900.
- Tanaka A, **Yuasa S**, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces

- myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc.* 2014 Nov 11;3(6).
- Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, **Yuasa S**, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Dec;3(12):1473-83.
 - Maekawa Y, Jinzaki M, Anzai A, Tsuruta H, Matsumura K, Yamada Y, Tabei R, Kawakami T, Hayashida K, **Yuasa S**, Murata M, Suzuki M, Kuribayashi S, Fukuda K. Successful second attempt multidetector computed tomography-guided percutaneous transluminal septal myocardial ablation for an octogenarian with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2014 Oct 20;176(3):e131-2.
 - Anzai A, **Yuasa S**, Kanazawa H, Kodaira M, Arai T, Kawakami T, Hayashida K, Maekawa Y, Kawamura A, Fukuda K. 'Phantom Vessel' Running Parallel to the Culprit Artery in a Case of Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol Interv.* 2014 Jun;7(6):e51-2.
 - Kishino Y, Seki T, Fujita J, **Yuasa S**, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e97397.
 - Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, **Yuasa S**, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia.* 2014 Dec;28(12):2344-54.
 - Hashimoto H, **Yuasa S**, Tabata H, Tohyama S, Hayashiji N, Hattori F, Muraoka N, Egashira T, Okata S, Yae K, Seki T, Nishiyama T, Nakajima K, **Sakaue-Sawano A**, Miyawaki A, Fukuda K. Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jul;72:241-9.
 - Egashira T, **Yuasa S**, Kimura M, Sawano M, Anzai A, Hayashida K, Kawamura A, Kimura T, Nishiyama N, Aizawa Y, Takatsuki S, Tsuruta H, Murata M, Yamada Y, Kohno T, Maekawa Y, Sano M, Kosaki K, Fukuda K. Coexistence of two distinct fascinating cardiovascular

disorders: Heterotaxy syndrome with left ventricular non-compaction and vasospastic angina. *Int J Cardiol.* 2014 Jun 15;174(2):e54-6.

- Maekawa Y, Jinzaki M, Anzai A, Matsumura K, Tsuruta H, Kawakami T, Hayashida K, Yuasa S, Murata M, Suzuki M, Kuribayashi S, Fukuda K. Utility of the reverse wire technique in multidetector computed tomography-guided percutaneous transluminal septal myocardial ablation. *Int J Cardiol.* 2014 May 15;173(3):e33-4.
- Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e97397.

2. 学会発表

- Yuasa S: ET-1 Induces Myofibrillar Disarray and Contractile Vector Variability in Hypertrophic Cardiomyopathy-iPS

Cell-derived Cardiomyocytes. Medical Research Institute 40 th Anniversary. 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium. 28/Nov/2014. Tokyo, Japan.

- Yuasa S: Role of iPS cells in understanding mechanisms of LQTS. 7th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. 30/October/2014. New Delhi. India.
- Yuasa S: G-CSF has a pivotal role in long-term skeletal muscle regeneration. The 18th International Vascular Biology Meeting. Symposium. 17, Kyoto, Japan, April, 2014.
- 湯浅慎介: Disease modeling using hiPS cells. 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会シンポジウム. 岡山. 2014年7月3日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

Ⅲ. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「G-CSFによる筋ジストロフィー治療方法の開発」

機関名 学校法人慶應義塾

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
ET-1 Induces Myofibrillar Disarray and Contractile Vector Variability in Hypertrophic Cardiomyopathy-iPS Cell-derived Cardiomyocytes.	Yuasa S	Medical Research Institute 40 th Anniversary. 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium.	28-Nov-14	国内
Role of iPS cells in understanding mechanisms of LQTS.	Yuasa S	7th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session.	30-Oct-14	国外
Disease modeling using hiPS cells.	Yuasa S	第50回日本小児循環器学会総会・学術集会シンポジウム	3-Jul-14	国内
G-CSF has a pivotal role in long-term skeletal muscle regeneration.	Yuasa S	The 18th International Vascular Biology Meeting. Symposium.	17-Apr-14	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models: Characterization of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes.	Egashira T, Yuasa S, Tohyama S, Kuroda Y, Suzuki T, Seki T, Fukuda K.	Methods Mol Biol.	2014 Dec	国外
HTRA1 (High Temperature Requirement A Serine Peptidase 1) Gene Is Transcriptionally Regulated by Insertion/Deletion Nucleotides Located at the 3 Prime End of the ARMS2 (Age-Related Maculopathy Susceptibility 2) Gene in Patients with Age-Related Macular Degeneration.	Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C, Iwata T.	J Biol Chem.	2014 Dec	国外

<p>Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.</p>	<p>Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K.</p>	<p>J Am Heart Assoc.</p>	<p>2014 Nov</p>	<p>国外</p>
<p>Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients.</p>	<p>Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H.</p>	<p>Leukemia.</p>	<p>2014 Dec</p>	<p>国外</p>
<p>Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte.</p>	<p>Hashimoto H, Yuasa S, Tabata H, Tohyama S, Hayashiji N, Hattori F, Muraoka N, Egashira T, Okata S, Yae K, Seki T, Nishiyama T, Nakajima K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Fukuda K.</p>	<p>J Mol Cell Cardiol.</p>	<p>2014 Jul</p>	<p>国外</p>

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV. 研究成果の刊行物・別刷