

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 17401  
 研究種目 : 新学術領域研究  
 研究期間 : 2008～2010  
 課題番号 : 20200013  
 研究課題名 (和文) 骨髄間質細胞-未分化間葉系細胞-への ex vivo 遺伝子操作と細胞治療  
 研究課題名 (英文) ex vivo gene manipulation of mesenchymal stem cell and application to cell therapy  
 研究代表者  
 前田 寧 (MAEDA YASUSHI )  
 熊本大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号 : 60346997

研究成果の概要 (和文) : 筋ジストロフィーモデルマウス骨髄より間葉系細胞を採取・培養しヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターを用いることで遺伝子操作が可能であることを示した。更に重要なことに、この細胞は遺伝子操作を加えずとも、筋ジストロフィーモデルマウスに移植を繰り返すことで明らかな治療効果をもたらすことを証明した。この細胞は骨格筋や骨再生に影響を与える多様な成長因子を発現しており、骨格筋の変性・壊死を軽減させるだけでなく、肥大させていることを見出した。

研究成果の概要 (英文) : Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) could be isolated and cultured from muscular dystrophy model mouse. And it was proved that gene manipulation by helper-dependent adenovirus of was possible without any tricky technique. Moreover, we found MSC's novel competence to treat muscular dystrophy. MSC has intrinsic ability to modify muscle degeneration and regeneration. We found various growth factors are produced from MSC, and some growth factors of them give effects on muscle regeneration.

交付決定額

(金額単位 : 円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,000,000  | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2009年度 | 5,900,000  | 1,770,000 | 7,670,000  |
| 2010年度 | 5,900,000  | 1,770,000 | 7,670,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 19,800,000 | 5,940,000 | 25,740,000 |

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・神経内科学

キーワード : 筋ジストロフィー・細胞治療・遺伝子操作・間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (以下 DMD) は 3,500 新生男児あたり 1 人が罹患し 20 歳代で呼吸不全、心不全で死亡する患者数が多

い致命的疾患である。1987 年に原因遺伝子がジストロフィンと同定され 20 年以上経たが根本治療は無い。現在研究中の根本的治療方法には、a) 正常ジストロフィン cDNA を骨

格筋へウイルスベクターで導入する *in vivo* gene therapy b)骨格筋へ分化可能な細胞を、多様な細胞ソースから誘導し移植する cell therapy c)完全長では無いが、短くとも部分的に機能を果たす短縮型ジストロフィンを誘導するエクソンスキッピングなどがある。

しかし、ウイルスベクターを用いた *in vivo* gene therapy では、いずれのウイルスベクターにも免疫原性という重大な問題が生じた。cell therapy にも iPS や ES などの治療応用が考えられたが、腫瘍形成などの問題があり、この問題解決も容易いことでない。エクソンスキッピングについては、実現化に最も近いと考えられるが、導入効率改善には更なるオリゴヌクレオチドの改良が必要であった。また、全てのジストロフィン遺伝子変異には対応できず、オーダーメイド治療の様相があり、患者選択の必要性がある。

我々も以前よりウイルスベクター、特にヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターに完全長ジストロフィン cDNA を組み込ませ DMD モデルマウス骨格筋へ遺伝子導入し、治療効果が得られていた。しかしこのベクターを用いても免疫原性の問題に直面していた。

他方、骨髄由来の間葉系幹細胞 MSC といわれる多能性幹細胞がげっ歯類をはじめ、ヒトでも採取できることが報告され、にわかに再生医療のツールとして認知されるようになった。骨格筋細胞にも分化誘導法も報告されたが、更に免疫修飾機能も有する多様な生物学的特性が報告され始めていた。

## 2. 研究の目的

DMD 治療は、原因遺伝子発見から 20 年以上経過するにも関わらず有効なものがない。研究の背景でも述べたように多様なアプローチがされているが、いずれも問題点を有しており、新たな治療戦略たてることを目的とした。

新たな治療戦略をたてるにあたり我々は以下の二つの点に着目した。

①骨格筋は間葉系細胞から発生し、生後も骨格筋内に存在する衛星細胞といわれる未分化筋細胞に、筋変性が引き起こすシグナルが一旦加わると、発生と類似するメカニズムにて再生する臓器である。

②間葉系幹細胞は成人の多様な臓器から採取・培養できる。

すなわち、患者自身から骨格筋再生に関与しうる細胞が採取・培養できるので、この間葉系幹細胞を用い、*ex vivo* 細胞治療の可能性を探索することを本研究の目的とした。

間葉系幹細胞は、成人の多様な臓器から採取・培養可能であるが、その中でも骨髄からは安全に採取できる。この安全性は、骨髄よ

り採取した血液幹細胞を用いた血液疾患治療が既に一般的治療法として確立していることから明白であり、臨床応用への超えるべきハードルの数が少ない。

## 3. 研究の方法

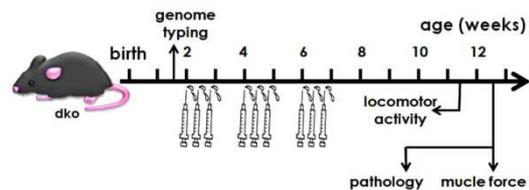
筋ジストロフィーモデル

マウス dystrophin mdx と utrophin を二重欠失するヒト DMD に類似する dko マウスを用いる。(右図)



このモデルマウス長管骨より骨髄由来間葉系幹細胞を Peister 等の方法 (Blood 2003 vol. 9) に従い採取・培養する。表面マーカーを調べると同時に、脂肪細胞や骨細胞へ分化誘導し、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) であることを機能的にも確認する。

MSC を dko マウス腹腔内への移植を次図のスケジュールで繰り返し、効果を骨格、運動量、寿命、骨格筋組織病理にて調べる。

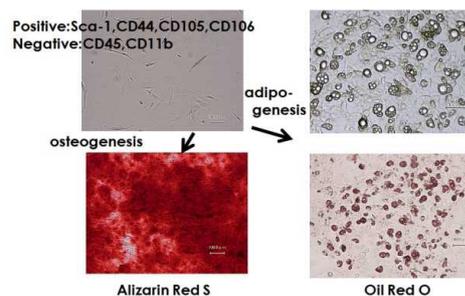


## 4. 研究成果

これまで MSC には多分化能や免疫修飾能が数多く示されてきた。しかし、我々は MSC に新たな能力を見出した。その能力は筋再生過程に影響を与え、筋ジストロフィーのような筋変性に引き続き怒る筋再生過程に影響を与えている可能性が見出された。この能力は骨格筋疾患治療に応用でき、これまでとは異なる概念の治療手段に広がってゆくと期待される。

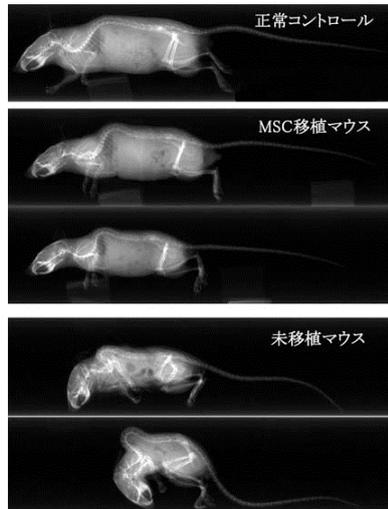
### (1) dko マウス骨髄からの MSC 採取・培養

細胞は脂肪細胞や骨細胞へ培養条件を変えることで、いずれの細胞にも分化させることが可能であった。これにより機能的に間葉系幹細胞であることが証明された。更に表面マーカーについても FACS にて調べ、Sca-1、CD44、CD105、CD106 が陽性で、CD45、CD11b が陰性の細胞で、これまでの報告に一致する細胞であった。(下図)



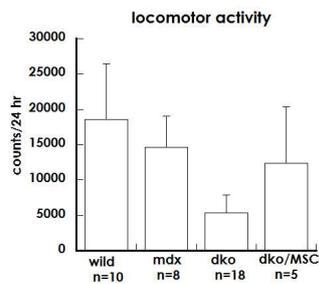
## (2) 骨格・体格の著しい改善

移植後 15 週齢時点での X 線像からも明らかなように、移植により体格が改善したのみならず、骨格の変形の改善していた。



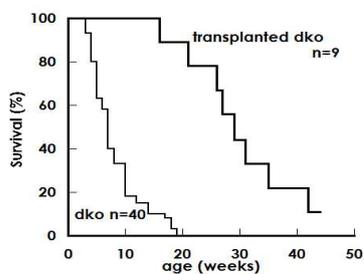
## (3) 運動量の改善

24 時間運動量を赤外線センサーモニターにて、11~12 週齢時に計測した (右図)。移植を受けた dko マウス (dko/MSC) は明らかに運動量が増加していることが分かる。



## (4) MSC 移植による延命効果

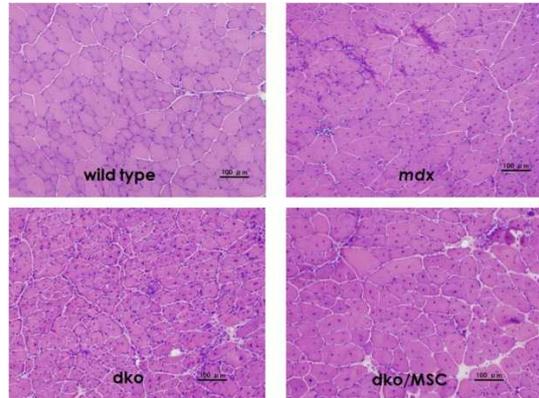
更に未移植マウス (dko) と移植マウス (dko/MSC) を通常的环境にて飼育し、それぞれの寿命を調べた。次の図でも明らかなように、著しい延命効果が確認できた。dko 群と dko/MSC 群の 50% 生存期間は、それぞれ 8 週と 29 週であった。また最長生存期間は dko 群では 19 週、dko/MSC 群では 47 週であった。



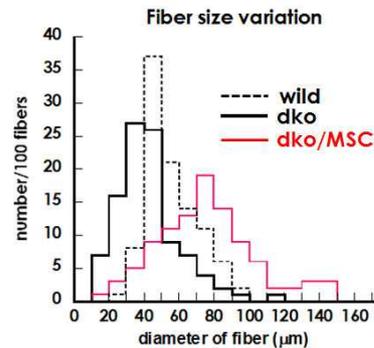
## (5) 組織学的検討

13 週齢において野生型、mdx マウス、dko マウス、dko/MSC マウス前脛骨筋を組織学的に

調べた。dko ではほとんどが小径線維で、中心核線維であったが、dko/MSC のそれは中心核線維であったが肥大しており、野生型マウスのそれよりも大きかった。



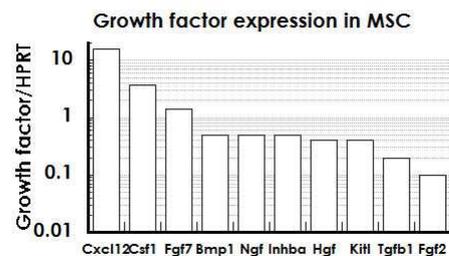
下グラフは筋線維径を計測し、その分布を各グループ毎に示したものである。一見して分かるように、移植することで筋線維径は野生型マウスのそれより大きくなっていった。



## (6) MSC からの多様な成長因子の発現

移植により筋線維は肥大化することや MSC は腹腔内へ移植されていることを考慮すると、液性因子によりこれらの現象が誘導されていると考えられた。我々は MSC が何らかの成長因子を発現していると仮定し、リアルタイム PCR アレイを用い 84 種類の成長因子の発現を調べた。

多様な因子が発現していたが、特に HGF, BMP-1, FGF-7 などの筋再生に関与すると考えられる因子が発現していることを確認した。



我々は本研究から、MSC は多様な液性因子、特に成長因子を分泌しており、それらが骨格筋の変性と再生過程に影響を与え、筋肥大をもたらす、運動機能改善、寿命の延長という治療効果メカニズムを提唱するにいたった。この MSC の新たな能力は、MSC の利用方法に根本的な変革をもたらすと予測される。

この治療法には次のような優れた点があり、今後は更にヒトへの応用に向け展開させるべきである。

- ①技術的容易性
- ②自己 MSC 利用による高い安全性
- ③多様な骨格筋疾患への広い応用性

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

①Rescue From Respiratory Dysfunction by transduction of Full-length Dystrophin to Diaphragm via the Peritoneal Cavity in Utrophin/Dystrophin Double Knockout Mice

Ishizaki M, Maeda Y, Kawano R, Suga T, Uchida Y, Uchino K, Yamashita S, Kimura E, Uchino M  
*Molecular Therapy* 19(7):1230-5 (2011)  
査読有

② Muscle fiber type-predominant promoter activity in lentiviral-mediated transgenic mouse

Suga T, Kimura E, Morioka Y, Ikawa M, Li S, Uchino K, Uchida Y, Yamashita S, Maeda Y, Chamberlain JS, Uchino M  
*PLoS One*. 6(3):e16908 (2011) 査読有

[学会発表] (計 19 件)

①Maeda Y, Repetitive allotransplantation of bone marrow stromal cells to muscular dystrophy model mice drastically improves the body build and life span, 19th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), Oct27-31, 2011, Brighton, UK

②Suga T, Muscle fiber type-predominant promoter activity in lentiviral-mediated transgenic mouse, 18<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 22-25, 2010, Milano Italy

③内野 克尚、幹細胞治療による骨格筋再生と筋ジストロフィーの治療研究、第 28 回日本神経治療学会総会、July15-16、2010、横浜 (パシフィコ横浜)

④木村 円、Lentiviral vector mediated delivery of full-length dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy、第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会、July 1-3、2010、宇都宮 (栃木県総合文化センタ

一)

⑤Ishizaki M, Transduction of full-length dystrophin to diaphragm ameliorates respiratory dysfunction in severe dystrophic mouse, 13<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, May19-22, 2010, Washington DC USA

⑥Kimura E, Lentiviral vector mediated delivery of full-length dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy, 3<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, May19-22, 2010, Washington DC USA

⑦菅 智宏、Lentiviral vector を用いた Duchenne 型筋ジストロフィー遺伝子治療研究、第 51 回日本神経学会総会、May 20-22、2010、東京 (東京国際フォーラム)

⑧Ishizaki M, Transduction of full-length dystrophin to diaphragm ameliorates respiratory dysfunction in severe dystrophic mouse, 17th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), Nov. 20-25, 2009, Hannover, Germany, Convention Center at Hannover Fairground

⑨Kimura E, Full-dystrophin packaging in lentiviral vector for a gene therapy of Duchenne muscular dystrophy, 17th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), Nov. 20-25, 2009, Hannover, Germany, Convention Center at Hannover Fairground

⑩前田 寧、横隔膜へのジストロフィン導入による筋ジストロフィーモデルマウスの呼吸機能改善効果、第 50 回日本神経学会総会、May20-22、2009、仙台国際センター

⑪前田 寧、筋ジストロフィー根本治療に向けての骨髄間質間葉系幹細胞へのウイルスベクターによる遺伝子操作、第 27 回日本神経治療学会総会、June11-12、2009、熊本市市民会館

⑫菅 智宏、Lentiviral vector を用いた Duchenne 型筋ジストロフィー遺伝子治療研究、第 27 回日本神経治療学会総会、June11-12、2009、熊本市市民会館

⑬木村 円、幹細胞治療による骨格筋再生と筋ジストロフィーの治療研究、第 27 回日本神経治療学会総会、June11-12、2009、熊本市市民会館

⑭木村 円、骨格筋幹細胞をターゲットとした Duchenne muscular dystrophy の治療研究、第 50 回日本神経学会総会、May20-22、2009、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 寧 (MAEDA YASUSHI)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60346997

(2) 研究分担者

内野 誠 (UCHINO MAKOTO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20117336

木村 円 (KIMURA EN)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60433025

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：