

厚生労働科学研究費補助金  
(こころの健康科学研究事業)

内因性ユートロフィンの発現増強による  
筋ジストロフィーの画期的治療法の開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成17年(2005)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発

武田 伸一 ----- 1

### II. 分担研究報告

1. ユートロフィン遺伝子の発現調節の解析 ----- 9

鈴木 友子

2. RNA リピート結合タンパク質と筋強直性ジストロフィー ----- 12

石浦 章一

3. 治療用モデル動物としての筋ジストロフィー犬の開発 ----- 14

武田 伸一

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総括研究報告書

内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発

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  
石浦 章一 東京大学大学院 総合文化研究科  
教授

研究要旨

1. ユートロフィンプロモーター領域を LacZ 遺伝子に連結したトランスジーンに更にイントロンエンハンサーを組み込んだ transgene を組み換え、トランスジェニックマウスを作出した。現在までに2ラインのトランスジェニックマウスが得られたので、同マウスの各組織での $\beta$ -gal の発現を解析中である。
2. 筋強直性ジストロフィー (DM) は、リピート RNA が新しい機能を獲得することによって発症することが明らかになった。私たちは、MBNL1 (muscleblind-like 1) が CUG/CCUG リピートに結合することを発見し、種々の遺伝子のスプライシングを調節していることを証明した。これによって、DM の症状がスプライシング異常によって説明できることになった。
3. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系 Purkinje 線維では、calpain により cardiac Troponin-I が分解していることを初めて見出した。しかも、血清 cardiac Troponin-I は筋ジストロフィーにおける心筋障害のマーカーとなる可能性がある。
4. 米国 Pennsylvania 大学 Khurana 博士と共同して、イヌ型 pro-myostatin 遺伝子のクローニングを行った。

A. 研究目的

ユートロフィンは、ジストロフィンのホモログであり、骨格筋形質膜直下に発現し、ジストロフィン結合蛋白複合体を膜に局在させる。ウイルスベクターや発生工学的手法を用いて骨格筋に高く発現させると、ジストロフィン欠損 *mdx* マウスの系では、筋変性を抑制する事が報告されている。我々は以前アデノウイルスベクター導入筋でユートロフィンが高発現し、その一部は IL-6 の作用によると報告してきた (Yamamoto et al., Hum Gene Ther 2000, 11, 669 ; Fujimori et al., Hum Gene Ther 2002, 13, 509)。そこでジストロフィン欠損による筋ジストロフィーにおいて内因性ユートロフィンの発現を増強する

治療法を確立する目的で、ユートロフィンの発現調節機序をトランスジェニックマウスを用いて解析したが、骨格筋においては $\beta$ -gal の発現が認められず、他の発現制御領域の存在が示唆された (Takahashi et al., J Gene Med. 2005; 7(2): 237-48)。次のステップとして、新たにイントロンエンハンサー (Galvagni et al., 2000, JBC, 275, 3168-3172) をクローニングし、前回用いたユートロフィンプロモーター/LacZ コンストラクトの上流に組み換えて、新たにトランスジェニックマウスを作出した。

ユートロフィンの発現増強を目指すためにには、プロモータを中心とした転写制御機構と同時に、mRNA の安定性には遺伝子の 5', 3'-UTR が重要な役割を果た

す。筋ジストロフィーの中でも筋硬直性ジストロフィーに関しては、3'-UTRに関連して RNA 結合蛋白蛋白質の重要性が指摘されている。

筋強直性ジストロフィー1型 (DM1) は、筋強直などを特徴とする全身性疾患で、原因は第 19 染色体にある DM キナーゼ (DMPK) の 3' 非翻訳領域にある CTG リピートの伸長である。また最近、筋強直性ジストロフィー2型 (DM2) も発見されたが、これは第 3 染色体にあるジンクフィンガータンパク質 ZNF9 遺伝子中のイントロン1にある CCTG リピートの伸長であることがわかり、DM という症状が責任遺伝子産物の機能異常ではなく、3 または 4 塩基リピートの伸長に深く関係していることが明らかになってきた。私たちは、これらの RNA リピートに結合するタンパク質として MBNL1 を同定した。また最近、MBNL1 のノックアウトマウスが作成され、これに DM 症状が見られることから、RNA 機能異常説が強く示唆されている。本研究では、筋強直性ジストロフィー発症に関わる RNA 結合タンパク質を同定し、その遺伝子の機能を解析した。

確かに、ジストロフィン欠損の筋ジストロフィーに対して遺伝子治療、幹細胞移植治療を行うための研究は活発に行われている。しかし、これらの研究は、ほとんど全て小型の *mdx* マウスを対象として行われてきた。*mdx* マウスを治療用のモデルとして用いるには、二つの大きな問題がある。一つは小型のモデル動物の限界であり、他の一つは比較的軽症で臨床的に進行性が目立たないことである。その点で注目されるモデル動物に筋ジストロフィー犬がある。筋ジストロフィー犬は、DMD と類似した重症で進行性の臨床症状を示し、四肢を利用した筋生検も可能であることから、治療用のモデルと

して優れている。そこで、本研究では、筋ジストロフィー犬の分子病態を明らかにし、治療用モデルとして確立することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ユートロフィンの転写調節

マウスゲノムからプライマーと PCR を用いて、2000 年に Galvagni らが報告したイントロンエンハンサー (128 bp) を増幅し、TA ベクターにクローニングし、シーケンスを確認し、前回作成した Tg の上流に挿入した。直線化したプラスミドを 523 個の受精卵に injection して 129 匹の F0 を得て、サザンブロッティングにて transgene の有無を確認した。トランスジェンの有無は、マウスの尻尾からゲノム DNA を調整して、サザンブロットにて行った。

### 2. 筋ジストロフィー関連遺伝子の 3'-UTR DMPK の 3'-UTR に存在する LTG リピートと関連した

本研究では、この RNA 機能異常を調べるため、ヒト cDNA ライブラリーから、9 種のリピート RNA 結合タンパク質 (MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, PKR, CELF3, PTB, FOX1) をクローニングし、まず、結合する RNA 配列の特異性を酵母 three hybrid 法で調べた。これらの実験では市販のヒト cDNA ライブラリーを用いたため、倫理規定に抵触することはない。

また、スプライシングアッセイには、塩素チャンネル、 $\alpha$ アクチニン、APP などの mini-gene を用いた (後 2 者は、北陸先端科学技術大学の塚原俊文教授から寄与していただいた)。

### 3. 新たなモデル動物の開発

#### (1) 材料

国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設で維持されている筋

ジス犬コロニーの中から正常対照犬 9 頭、筋ジス犬 13 頭（ともに 1-15 ヶ月齢）を対象とした。

## (2) 血清 cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出

筋ジストロフィー犬及びその対照犬について、3 ヶ月ごとに採血を行い、その血清について ELISA kit を用いて cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出を試みた。

## (3) 組織学的解析

心臓をホルマリン固定後、洞結節を含む右心房、房室結節及び His 束を切り出し、Purkinje 線維を含む左心室は、基底部分、乳頭筋レベル、心尖部の三層に横断面で全割した。大割組織片は通常のパラフィン切片作製後、10  $\mu$ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) で染色した。

## (4) micro-dissection を用いた解析

心筋凍結標本について、ARCTURUS 社の LCM (Laser-capture micro dissection system) 装置を用いて、作業心筋及び Purkinje 線維から 500-800 shot 集積した。

## C. 研究成果

### 1. ユートロフィンの転写調節：新たなユートロフィン遺伝子上流トランスジェニックマウスの作成

サザンブロットングにより 2 ラインの Tg のラインを確認、確立した。現在、同ラインのマウスの繁殖を精力的に進めており、年度内にも  $\beta$ -gal の発現解析を予定している。

### 2. 3'-UTR の重要性：

#### (1) RNA リピート結合特異性

酵母 three hybrid 法の結果、CUG 並びに CCUG リピートに強く結合したのは、従来報告のあった CUG-binding protein (CUG-BP) ではなく、MBNL1 (muscleblind-like 1)

であることが明らかになった。MBNL1 は、ミスマッチを持つヘアピン二重鎖 RNA に強く結合するという特異性が明らかになった。ミスマッチのない CAG/CTG リピートには結合しないこともわかった。同時に、MBNL1 のオーソログである MBNL2 と MBNL3 も、MBNL1 と同様の基質特異性を持つことも判明した。30 数種類のリピート RNA を調査した結果、MBNL1 の標的は、CHHG または CHG リピート (H は G 以外の塩基) であることがわかった。

#### (2) スプライシングへの寄与

これらの RNA 結合タンパク質の一部は、mRNA のスプライシングにも関わることが、以前の研究から示唆されている。そこで、塩素チャンネルや  $\alpha$  アクチニンなどの *in vitro* スプライシング系を用いて、これら RNA 結合タンパク質がスプライシングに関係するかを調べたところ、確かに MBNL1 の発現の有無によって mini-gene のスプライシングパターンが変化することが明らかになった。

## 3. 新たなモデル動物とその分子病態

### (1) 筋ジストロフィー犬では、cardiac Troponin-I が検出される。

ELISA 法を用いて、筋ジス犬の血清を検索したところ、正常対照犬からは全く検出されていないのに対し、筋ジス犬の血清から、最高値で 40 ng/ml の cardiac Troponin-I が検出された。そこで血清から Albinin 及び IgG を除去した後、SDS-PAGE を行って特異的抗体を用いた Western 解析を行った結果、calpain による cardiac TN-I の分解産物と考えられる 18 kDa 及び 14 kDa の band が検出された。なお、筋ジス犬の血清では cardiac Troponin-T が検出されることもあったが、non-specific と理解された。

### (2) 筋ジス犬 Purkinje 線維では cardiac

Troponin-I の分解を生じている

筋ジス犬の血清で、calpain によると考えられる cardiac Troponin-I の分解産物を検出したため、その分解がどの臓器・組織で生じているのか micro-dissection により検体を集積した上で解析した。その結果、筋ジス犬の Purkinje 線維においてのみ、cardiac Troponin-I の分解産物が検出された。しかし特異抗体を用いた免疫組織化学的な染色の結果では、大きな異常は見られなかった。

### (3) イヌ型 pro-myostatin 遺伝子の cloning

Pennsylvania 大学の Teji Khurana 博士と協同で、イヌ型の pro-myostatin 遺伝子のクローニングを進め、イヌ型の myostatin に対する抗体を樹立することは難しいので、promyostatin を大量生産するか、あるいは AAV ベクターに組み込んで、筋ジス犬に対する投与を考えたい。

## D. 考察

### 1. ユートロフィンの発現制御

ユートロフィンの発現調節は、転写レベルでの制御の他に mRNA の安定化による制御が知られている。今後はプロモーター解析に加え、5'-UTR や 3'-UTR のユートロフィン mRNA の安定化における役割を調べるとともに、その制御に関わっている RNA 結合蛋白質の解析も合わせて行っていく必要がある。

### 2. 3'-UTR の役割

例えば、 $\alpha$ アクチニンには非筋型と筋型エクソンが続いている個所があるが、これらは生体内では必ずどちらかしか転写されないことが知られている。一般に MBNL1 と CUG-BP のスプライシングに対する作用は逆方向であることが多いが、 $\alpha$ アクチニンの場合は MBNL1 も CUG-BP も同様の作用が認められた。一方、塩素チャネル（マウス）では MBNL1 がエクソン 7A のスキッ

プを優先させるのに対し、CUG-BP はエクソン 7A を含むようにスプライシングすることがわかった。

### 3. 新たなモデル動物の分子病態

前年度までの研究で、筋ジストロフィー犬の心刺激伝導系の Purkinje 線維では選択的な空胞変性を生じており、しかもその変性に  $\mu$ -calpain の発現が関わる可能性を指摘した。今年度の研究で、筋ジス犬 Purkinje 線維では、calpain による cardiac Troponin-I の分解を生じ、しかもその分解産物が血清で検出されることを明らかにした。この研究の意味するところは、次の4点に集約できる。

- (1) 血清 cardiac Troponin-I を筋ジストロフィーにおける心筋障害のマーカーとして利用できる可能性が生まれた。
- (2) calpain による cardiac Troponin-I の分解が筋ジストロフィー犬における Purkinje 線維の障害の原因である可能性がある。
- (3) 筋ジストロフィーの横紋筋障害において、calpain が中心的な役割を果たしている可能性がある。
- (4) calpain の作用を抑制することが筋ジストロフィーに対する新たな治療につながる可能性がある。

殊に、近年マウスで cardiac Troponin-I の機能不全が拡張型心筋症につながるということが指摘されているだけに大変興味深い結果といえる。今後は、なぜ Purkinje 線維において calpain の活性化が生ずるのか、その分子機構の解明を目指して研究を進展させたい。また、ごく最近 cardiac Troponin-I がユビキチン・リガーゼのモチーフを持ち、筋萎縮感受性遺伝子として知られている MuRF-1 の基質であるとされたことも注目される。

## E. 結論

1. ユートロフィンのプロモーターの上流に更にイントロンエンハンサーを連結したものをレポーター遺伝子 LacZ につなぎ、トランスジェニックマウスを作出し、2 ラインを得た。今後このマウスを解析する事で、イントロンエンハンサーのユートロフィン遺伝子発現制御における役割が明らかになっていくと期待される。
2. 筋強直性ジストロフィーの多岐にわたる症状は、原因遺伝子そのものではなく、リピート自身が引き起こしていることが明らかになった。そこで、伸長リピートに結合する因子を探したところ、CUG-BP や MBNL1 などいくつかの RNA 結合タンパク質が候補に挙がってきた。RNA 結合タンパク質 MBNL1 が DM に見られるリピート RNA に結合し、正常な機能である RNA スプライシングをおかしくすることで、DM の多彩な症状を発現させている可能性が指摘された。
3. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系を構成している Purkinje 線維では calpain の作用により、cardiac Troponin-I が分解し、それが心筋障害につながっている可能性を初めて指摘した。しかも、血清 cardiac Troponin-I が、筋ジストロフィーによる心筋障害マーカーとなる可能性がある。
4. イヌ型の pro-myostatin 遺伝子を cloning した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### < 英文 >

1. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:  
ε-Sarcoglycan compensates for lack of α-sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Equb ahead of print]

2. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL:  
Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. J Cell Biol, 168(4): 655-66, 2005

3. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004

4. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004

5. Hara H, Monsonego A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T:  
Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 6(5):483-8, 2004

6. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61

7. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M:  
Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice. Hum Mol Genet, 2004, 13(16): 1775-1784.

8. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y,

- Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H:  
Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.  
Exp Cell Res, 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
9. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:  
Identification and characterization of  $\epsilon$ -sarcoglycans in the central nervous system.  
Mol Brain Res, 125(1-2): 1-12, 2004
  10. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:  
alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.  
J Biol Chem, 279(15): 15091-5, 2004
  11. Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, Ishiura S:  
Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. Human Mol.Genet. 13, 495-507, 2004
  12. Watanabe T, Takagi A, Sasagawa N, Ishiura S, Nakase H: Altered expression of CUG binding protein 1 mRNA in myotonic dystrophy 1: possible RNA-RNA interaction. Neurosci.Res. 49, 47-54, 2004
- <和文>
1. 武田伸一:  
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望.  
第45回日本神経学会総会シンポジウム, 遺伝性筋ジストロフィーの根本的治療をめざして  
臨床神経, 44: 911-913, 2004
- II. 学会発表
- <国外>
1. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Molecular characterization of quiescent satellite cells and their application to cell therapy  
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 11, 2005
  2. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Identification of a novel subpopulation of SP cells during muscle regeneration.  
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
  3. Yoshioka H, Shiga K, Takeda S, Imamura M:  
In vitro analysis of assembly of the sarcoglycan complex containing  $\zeta$ -sarcoglycan.  
the American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, Dec 7, 2004
  4. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy  
Molecular Therapy of Muscular Dystrophy /Part II, International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Tokyo, Nov 12, 2004
  5. Takeda S:  
The role of muscle stem cells in muscle regeneration.  
Seminar at Hammer Smith Hospital, London, UK, Nov. 8, 2004
  6. Takeda S:  
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.  
The 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, Finland, Nov 5, 2004
  7. Takeda S:  
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar at Genethon, Evry, France, 7 Sep, 2004
  8. Takeda S:  
A novel sub-population of muscle Side Population (SP) cells and their roles in muscle regeneration.  
Seminar at Pasteur Institute, Paris, France, Sep 6, 2004
  9. Yoshida M, Ampong BN, Mochizuki Y, Imamura M, Takeda S:  
Dysferlin may interact with dihydropyridine receptor.  
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
  10. Takeda S, Mochizuki Y, Uezumi A, Ojima



- K, Masuda S:  
Contribution of bone marrow derived cells to denervated skeletal muscle.  
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
11. Takeda S:  
Gene transfer in Duchenne muscular dystrophy.  
Monaco Round Table Discussion -Microdystrophin from concept to clinical trials-, Monte Carlo, Monaco, 6.19, 2004
  12. Takeda S:  
AAV vector and microdystrophin. Lecture at the 7th Summer School of Myology, Institut de Myologie, Paris, France, 6.17, 2004
  13. Takeda S, Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y:  
An AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient *mdx* myofibers still improved the *mdx* phenotype through compensatory hypertrophy.  
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.4, 2004
  14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:  
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.  
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.3, 2004
- <国内>
1. 深田総一郎, 上住聡芳, 瀬川雅司, 増田智, 鈴木友子, 山元弘, 武田伸一:  
骨格筋特異的幹細胞(筋衛星細胞)の遺伝子発現解析。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
  2. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田総一郎, 増田智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの解析。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
  3. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田総一郎, 増田智, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再生における機能。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
  4. 武田伸一:  
AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の pre-clinical study -筋ジストロフィーで認められた免疫応答の克服-。  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会, 東京, 2.25, 2005
  5. 武田伸一:  
骨格筋・幹細胞と筋再生の分子機構。  
慶應大学医学部セミナー・日本横紋筋肉腫研究グループ(JRSG), 東京, 2.14, 2005
  6. 武田伸一, 石浦章一, 鈴木友子:  
内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発。  
こころの健康科学(神経分野)研究成果発表会(研究者向け), 東京, 2.9, 2005
  7. 武田伸一, 鈴木友子, 増田智, 深田総一郎, 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳:  
微小重力による筋萎縮の分子メカニズム。  
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
  8. 二川健, 平坂勝也, 久田記美子, 後藤淳平, 不老治治美, 大西ゆう子, 岸恭一, 小川貴之, 鈴江直人, 安井夏生, 石堂一巳, 埜中征哉, 武田伸一:  
Unloading による筋・骨萎縮におけるユビキチン・システムの重要性ユビキチンリガーゼの結合蛋白質の解析を中心に。  
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-第27回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
  9. 武田伸一:  
骨格筋幹細胞と筋再生。  
東京大学大学院セミナー, 11.19, 2004
  10. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する生殖医療と遺伝子治療。  
埼玉県筋ジストロフィー協会創立40周年記念大会関連シンポジウム「遺伝子

- 疾患（筋ジストロフィーなど）と生殖医療」, 9.18, 2004
11. 武田伸一 :  
骨格筋の幹細胞を巡る進歩。  
東北大学医学部セミナー, 宮城県仙台市, 9.17, 2004
  12. 武田伸一 :  
将来の治療。  
平成 16 年度神経・筋疾患政策医療ネットワーク研修会, 東京, 9.16, 2004
  13. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
An AAV-vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient *mdx* myofibers still improved the *mdx* phenotype.  
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
  14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:  
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.  
日本遺伝子治療学会, 東京, 8.5, 2004
  15. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一 :  
骨格筋再生過程における side population (SP) cells の解析。  
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.14, 2004
  16. 望月靖史, 尾嶋孝一, 上住聡芳, 増田智, 武田伸一 :  
骨格筋の脱神経病変に対する骨髄由来細胞の関与  
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2004
  17. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。  
三菱ウエルファーマ, 横浜, 5.28, 2004
  18. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。  
第 45 回日本神経学会総会シンポジウム 東京 5.14, 2004
  19. 吉村まどか, 池本 円, 坂本美喜, 望月靖史, 湯浅勝敏, 辻 省次, 武田伸一 :  
アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるマイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入効果  
第 45 回日本神経学会総会, 東京, 5.14, 2004
  20. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田宗一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一 :  
骨格筋再生過程による Side Population (SP) 細胞の解析  
第 2 回幹細胞シンポジウム, 4.26, 2004.
  21. 鈴木友子 :  
骨格筋幹細胞と再生。獣医生理学・生化学分科シンポジウム: 骨格筋研究への複合領域的アプローチ 第 137 回日本獣医学会学術集会, 4.4, 2004
- 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

ユートロフィン遺伝子の発現調節の解析

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**

ユートロフィンプロモーター領域を LacZ 遺伝子に連結したトランスジーンに更にイントロンエンハンサーを組み込んだ transgene を組み換え、トランスジェニックマウスを作出した。現在までに 2 ラインのトランスジェニックマウスが得られたので、同マウスの各組織での $\beta$ -gal の発現を解析中である。

**A. 研究目的**

ユートロフィンは、ジストロフィンのホモログであり、骨格筋形質膜直下に発現し、ジストロフィン結合蛋白複合体を膜に局在させる。ウイルスベクターや発生工学的手法を用いて骨格筋に高く発現させると、ジストロフィン欠損 *mdx* マウスの系では、筋変性を抑制する事が報告されている。我々は以前アデノウイルスベクター導入筋でユートロフィンが高発現し、その一部は IL-6 の作用によると報告してきた (Yamamoto *et al.*, *Hum Gene Ther* 2000, 11, 669 ; Fujimori *et al.*, *Hum Gene Ther* 2002, 13, 509)。そこでジストロフィン欠損による筋ジストロフィーにおいて内因性ユートロフィンの発現を増強する治療法を確立する目的で、ユートロフィンの発現調節機序をトランスジェニックマウスを用いて解析したが、骨格筋においては $\beta$ -gal の発現が認められず、他の発現制御領域の存在が示唆された (Takahashi *et al.*, *J Gene Med.* 2005; 7(2): 237-48)。次のステップとして、新たにイントロンエンハンサー (Galvagni *et al.*, 2000, *JBC*, 275, 3168-3172) をクローニングし、前回用いたユートロフィンプロモーター/LacZ コンストラクトの上流に組み換えて、新たにトランスジェニックマウスを作出した。

ランスジェニックマウスを作出した。

**B. 研究方法**

マウスゲノムからプライマーと PCR を用いて、2000 年に Galvagni らが報告したイントロンエンハンサー (128 bp) を増幅し、TA ベクターにクローニングし、シーケンスを確認し、前回作成した Tg の上流に挿入した。直線化したプラスミドを 523 個の受精卵に injection して 129 匹の F0 を得て、サザンブロッティングにて transgene の有無を確認した。トランスジーンの有無は、マウスの尻尾からゲノム DNA を調整して、サザンプロットにて行った。

**C. 研究成果**

1. 新たなユートロフィン遺伝子上流トランスジェニックマウスの作成

サザンブロッティングにより 2 ラインの Tg のラインを確認、確立した。現在、同ラインのマウスの繁殖を精力的に進めており、年度内にも $\beta$ -gal の発現解析を予定している。

**D. 考察**

ユートロフィンの発現調節は、転写レベルでの制御の他に mRNA の安定化によ

る制御が知られている。今後はプロモーター解析に加え、5'-UTR や 3'-UTR のユートロフィン mRNA の安定化における役割を調べるとともに、その制御に関わっている RNA 結合蛋白質の解析も合わせて行っていく必要がある。

#### E. 結論

今回ユートロフィンのプロモーターの上流に更にイントロンエンハンサーを連結したものをレポーター遺伝子 LacZ につなぎ、トランスジェニックマウスを作出し、2 ラインを得た。今後このマウスを解析する事で、イントロンエンハンサーのユートロフィン遺伝子発現制御における役割が明らかになっていくと期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

###### <英文>

1. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL:  
Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8.  
J Cell Biol, 168(4): 655-66, 2005
2. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine.  
J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004
3. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype.  
Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004
4. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration  
Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
5. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeek M:  
Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice.  
Hum Mol Genet, 2004, 13(16): 1775-1784.
6. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H:  
Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.  
Exp Cell Res, 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
7. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T:  
Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression.  
J Biol Chem, 279: 10286-92, 2004

##### II. 学会発表

1. 深田総一郎, 上住聡芳, 瀬川雅司, 増田智, 鈴木友子, 山元弘, 武田伸一:  
骨格筋特異的幹細胞(筋衛星細胞)の遺

伝子発現解析。

第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1,  
2005

2. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田  
総一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子,  
武田伸一 :

骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再  
荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの  
解析。

第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1,  
2005

3. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田総一郎, 増  
田 智, 鈴木友子, 武田伸一 :

骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再  
生における機能。

第 4 回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1,  
2005

4. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto  
H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:

Molecular characterization of quiescent  
satellite cells and their application to cell  
therapy

Keystone Symposia, Molecular Regulation  
of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb  
11, 2005

5. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-  
Suzuki Y, Takeda S:

Identification of a novel subpopulation of SP  
cells during muscle regeneration.

Keystone Symposia, Molecular Regulation  
of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb  
13, 2005

6. 鈴木友子 : 骨格筋幹細胞と筋再生。獣  
医生理学・生化学分科会シンポジウム:  
骨格筋研究への複合領域的アプローチ  
第 137 回日本獣医学会学術集会 4.4,  
2004

7. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:

Muscle stem cells as a tool for cell therapy  
of muscular dystrophy.

International Symposium: Molecular  
Therapy of Muscular Dystrophy/ Part II :

November 12(Fri)- 13(Sat), 2004 At  
Komaba Faculty House, University of  
Tokyo, Japan

#### 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

RNA リピート結合タンパク質と筋強直性ジストロフィー

分担研究者 石 浦 章 一  
東京大学大学院 総合文化研究科 教授

**研究要旨**

筋強直性ジストロフィー（DM）は、リピート RNA が新しい機能を獲得することによって発症することが明らかになった。私たちは、MBNL1（muscleblind-like 1）が CUG/CCUG リピートに結合することを発見し、種々の遺伝子のスプライシングを調節していることを証明した。これによって、DM の症状がスプライシング異常によって説明できることになった。

**A. 研究目的**

筋強直性ジストロフィー1型（DM1）は、筋強直などを特徴とする全身性疾患で、原因は第19染色体にあるDMキナーゼ（DMPK）の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長である。また最近、筋強直性ジストロフィー2型（DM2）も発見されたが、これは第3染色体にあるジンクフィンガータンパク質ZNF9遺伝子中のイントロン1にあるCCTGリピートの伸長であることがわかり、DMという症状が責任遺伝子産物の機能異常ではなく、3または4塩基リピートの伸長に深く関係していることが明らかになってきた。私たちは、これらのRNAリピートに結合するタンパク質としてMBNL1を同定した。また最近、MBNL1のノックアウトマウスが作成され、これにDM症状が見られることから、RNA機能異常説が強く示唆されている。本研究では、筋強直性ジストロフィー発症に関わるRNA結合タンパク質を同定し、その遺伝子の機能を解析した。

**B. 研究方法（倫理面の配慮含む）**

本研究では、このRNA機能異常を調べるため、ヒトcDNAライブラリーから、9種のリピートRNA結合タンパク質

（MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, PKR, CELF3, PTB, FOX1）をクローニングし、まず、結合するRNA配列の特異性を酵母three hybrid法で調べた。これらの実験では市販のヒトcDNAライブラリーを用いたため、倫理規定に抵触することはない。

また、スプライシングアッセイには、塩素チャンネル、 $\alpha$ アクチニン、APPなどのmini-geneを用いた（後2者は、北陸先端科学技術大学の塚原俊文教授から寄与していただいた）。

**C. 研究結果と考察**

1) RNAリピート結合特異性

酵母three hybrid法の結果、CUG並びにCCUGリピートに強く結合したのは、従来報告のあったCUG-binding protein（CUG-BP）ではなく、MBNL1（muscle blind-like 1）であることが明らかになった。MBNL1は、ミスマッチを持つヘアピン二重鎖RNAに強く結合するという特異性が明らかになった。ミスマッチのないCAG/CTGリピートには結合しないこともわかった。同時に、MBNL1のオーソログであるMBNL2とMBNL3も、MBNL1と同様の基質特異性を持つことも判明した。

30数種類のリピートRNAを調査した結果、MBNL1の標的は、CHHGまたはCHGリピート（HはG以外の塩基）であることがわかった。

## 2) スプライシングへの寄与

これらのRNA結合タンパク質の一部は、mRNAのスプライシングにも関わることが、以前の研究から示唆されている。そこで、塩素チャンネルや $\alpha$ アクチニンなどのin vitroスプライシング系を用いて、これらRNA結合タンパク質がスプライシングに関係するかを調べたところ、確かにMBNL1の発現の有無によってmini-geneのスプライシングパターンが変化することが明らかになった。

例えば、 $\alpha$ アクチニンには非筋型と筋型エクソンが続いている個所があるが、これらは生体内では必ずどちらかしか転写されないことが知られている。一般にMBNL1とCUG-BPのスプライシングに対する作用は逆方向であることが多いが、 $\alpha$ アクチニンの場合はMBNL1もCUG-BPも同様の作用が認められた。一方、塩素チャンネル（マウス）ではMBNL1がエクソン7Aのスキップを優先させるのに対し、CUG-BPはエクソン7Aを含むようにスプライスすることがわかった。

## D. 結論

筋強直性ジストロフィーの多岐にわたる症状は、原因遺伝子そのものではなく、リピート自身が引き起こしていることが明らかになった。そこで、伸長リピートに結合する因子を探したところ、CUG-BPやMBNL1などいくつかのRNA結合タンパク質が候補に挙がってきた。RNA結合タンパク質MBNL1がDMに見られるリピートRNAに結合し、正常な機能である

RNAスプライシングをおかしくすることで、DMの多彩な症状を発現させている可能性が指摘された。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kino, Y., Oma, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2004) Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Mol.Genet.* 13, 495-507
- 2) Watanabe, T., Takagi, A., Sasagawa, N., Ishiura, S. & Nakase, H. (2004) Altered expression of CUG binding protein 1 mRNA in myotonic dystrophy 1: possible RNA-RNA interaction. *Neurosci.Res.* 49, 47-54

## G. 知的財産権の出願・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

治療用モデル動物としての筋ジストロフィー犬の開発

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. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系 Purkinje 線維では, calpain により cardiac Troponin-I が分解していることを初めて見出した。
2. 血清 cardiac Troponin-I は筋ジストロフィーにおける心筋障害のマーカーとなる可能性がある。
3. 米国 Pennsylvania 大学 Khurana 博士と共同して, イヌ型 pro-myostatin 遺伝子のクローニングを行った。

A. 研究目的

ジストロフィン欠損の筋ジストロフィーに対して遺伝子治療, 幹細胞移植治療を行うための研究は活発に行われている。しかし, これらの研究は, ほとんど全て小型の *mdx* マウスを対象として行われてきた。*mdx* マウスを治療用のモデルとして用いるには, 二つの大きな問題がある。一つは小型のモデル動物の限界であり, 他の一つは比較的軽症で臨床的に進行性が目立たないことである。その点で注目されるモデル動物に筋ジストロフィー犬がある。筋ジス犬は, DMD と類似した重症で進行性の臨床症状を示し, 四肢を利用した筋生検も可能であることから, 治療用のモデルとして優れている。

そこで, 本研究では, 筋ジストロフィー犬の分子病態を明らかにし, 治療用モデルとして確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設で維持されている筋ジス犬コロニーの中から正常対照犬 9 頭, 筋ジス犬 13 頭 (ともに 1-15 ヶ月齢) を対象とした。

2. 血清 cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出

筋ジストロフィー犬及びその対照犬について, 3 ヶ月ごとに採血を行い, その血清について ELISA kit を用いて cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出を試みた。

3. 組織学的解析

心臓をホルマリン固定後, 洞結節を含む右心房, 房室結節及び His 束を切り出し, Purkinje 線維を含む左心室は, 基底部, 乳頭筋レベル, 心尖部の三層に横断面で全割した。大割組織片は通常のパラフィン切片作製後, 10  $\mu$ m に薄切し, ヘマトキシリン・エオシン (HE) で染色した。

4. micro-dessection を用いた解析

心筋凍結標本について, ARCTURUS



社の LCM (Lazer-capture micro dissection system) 装置を用いて、作業心筋及び Purkinje 線維から 500-800 shot 集積した。

### C. 研究成果

#### 1. 筋ジストロフィー犬では、cardiac Troponin-I が検出される

ELISA 法を用いて、筋ジス犬の血清を検索したところ、正常対照犬からは全く検出されていないのに対し、筋ジス犬の血清から、最高値で 40 ng/ml の cardiac Troponin-I が検出された。そこで血清から Albin 及び IgG を除去した後、SDS-PAGE を行って特異的抗体を用いた Western 解析を行った結果、calpain による cardiac TN-I の分解産物と考えられる 18 kDa 及び 14 kDa の band が検出された。なお、筋ジス犬の血清では cardiac Troponin-T が検出されることもあったが、non-specific と理解された。

#### 2. 筋ジス犬 Purkinje 線維では cardiac Troponin-I の分解を生じている

筋ジス犬の血清で、calpain によると考えられる cardiac Troponin-I の分解産物を検出したため、その分解がどの臓器・組織で生じているのか micro-dissection により検体を集積した上で解析した。その結果、筋ジス犬の Purkinje 線維においてのみ、cardiac Troponin-I の分解産物が検出された。しかし特異抗体を用いた免疫組織化学的な染色の結果では、大きな異常は見られなかった。

#### 3. イヌ型 pro-myostatin 遺伝子の cloning

Pennsylvania 大学の Teji Khurana 博士と協同で、イヌ型の pro-myostatin 遺伝子のクローニングを進め、イヌ型の myostatin に対する抗体を樹立することは難しいので、promyostatin を大量生産

するか、あるいは AAV ベクターに組み込んで、筋ジス犬に対する投与を考えたい。

### D. 考察

前年度までの研究で、筋ジストロフィー犬の心刺激伝導系の Purkinje 線維では選択的な空胞変性を生じており、しかもその変性に  $\mu$ -calpain の発現が関わる可能性を指摘した。今年度の研究で、筋ジス犬 Purkinje 線維では、calpain による cardiac Troponin-I の分解を生じ、しかもその分解産物が血清で検出されることを明らかにした。この研究の意味するところは、次の 4 点に集約できる。

(1) 血清 cardiac Troponin-I を筋ジストロフィーにおける心筋障害のマーカとして利用できる可能性が生まれた。

(2) calpain による cardiac Troponin-I の分解が筋ジストロフィー犬における Purkinje 線維の障害の原因である可能性がある。

(3) 筋ジストロフィーの横紋筋障害において、calpain が中心的な役割を果たしている可能性がある。

(4) calpain の作用を抑制することが筋ジストロフィーに対する新たな治療につながる可能性がある。

殊に、近年マウスで cardiac Troponin-I の機能不全が拡張型心筋症につながるものが指摘されているだけに大変興味深い結果といえる。今後は、なぜ Purkinje 線維において calpain の活性化が生ずるのか、その分子機構の解明を目指して研究を進展させたい。また、ごく最近 cardiac Troponin-I がユビキチン・リガーゼのモチーフを持ち、筋萎縮感受性遺伝子として知られている MuRF-1 の基質であると

されたことも注目される。

#### E. 結論

1. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系を構成している Purkinje 線維では calpain の作用により, cardiac Troponin-I が分解し, それが心筋障害につながっている可能性を初めて指摘した。
2. 血清 cardiac Troponin-I が, 筋ジストロフィーによる心筋障害マーカーとなる可能性がある。
3. イヌ型の pro-myostatin 遺伝子を cloning した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

<英文>

1. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:  
 $\epsilon$ -Sarcoglycan compensates for lack of  $\alpha$ -sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Equb ahead of print]
2. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL: Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. J Cell Biol. 168(4): 655-66, 2005
3. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. J Gene Medicine, 7(2): 237-48, 2004
4. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. Mol Ther, 10(5): 821-828, 2004
5. Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T: Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 6(5): 483-8, 2004
6. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration Biochem Biophys Res Commu, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
7. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M: Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice. Hum Mol Genet. 2004, 13(16): 1775-1784.
8. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H: Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. Exp Cell Res. 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
9. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M: Identification and characterization of  $\epsilon$ -sarcoglycans in the central nervous system. Mol Brain Res. 125(1-2): 1-12, 2004
10. Munchira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:

alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.  
J Biol Chem. 279(15): 15091-5, 2004

<和文>

1. 武田伸二 :  
筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望.  
第 45 回日本神経学会総会シンポジウム, 遺伝性筋ジストロフィーの根本的治療をめざして  
臨床神経, 44: 911-913, 2004

II. 学会発表

<国外>

1. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Molecular characterization of quiescent satellite cells and their application to cell therapy  
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 11, 2005
2. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Identification of a novel subpopulation of SP cells during muscle regeneration.  
Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
3. Yoshioka H, Shiga K, Takeda S, Imamura M:  
In vitro analysis of assembly of the sarcoglycan complex containing  $\zeta$ -sarcoglycan.  
the American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, Dec 7, 2004
4. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy  
Molecular Therapy of Muscular Dystrophy /Part II, International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Tokyo, Nov 12, 2004
5. Takeda S:  
The role of muscle stem cells in muscle regeneration.  
Seminar at Hammer Smith Hospital, London, UK, Nov. 8, 2004
6. Takeda S:  
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.  
The 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, Finland, Nov 5, 2004
7. Takeda S:  
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar at Genethon, Evry, France, 7 Sep, 2004
8. Takeda S:  
A novel sub-population of muscle Side Population (SP) cells and their roles in muscle regeneration.  
Seminar at Pasteur Institute, Paris, France, Sep 6, 2004
9. Yoshida M, Ampong BN, Mochizuki Y, Imamura M, Takeda S:  
Dysferlin may interact with dihydropyridine receptor.  
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
10. Takeda S, Mochizuki Y, Uezumi A, Ojima K, Masuda S:  
Contribution of bone marrow derived cells to denervated skeletal muscle.  
9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
11. Takeda S:  
Gene transfer in Duchenne muscular dystrophy.  
Monaco Round Table Discussion - Micro-dystrophin from concept to clinical trials-, Monte Carlo, Monaco, 6.19, 2004
12. Takeda S:  
AAV vector and microdystrophin.  
Lecture at the 7th Summer School of Myology, Institut de Myologie, Paris, France, 6.17, 2004
13. Takeda S, Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y:  
An AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient mdx myofibers still improved the mdx phenotype through

compensatory hypertrophy.

7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.4, 2004

14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S:  
Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses.  
7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.3, 2004

#### <国内>

1. 深田総一郎, 上住聡芳, 瀬川雅司, 増田 智, 鈴木友子, 山元 弘, 武田伸一:  
骨格筋特異的幹細胞 (筋衛星細胞) の遺伝子発現解析。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
2. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田総一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの解析。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
3. 上住聡芳, 尾嶋孝一, 深田総一郎, 増田智, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再生における機能。  
第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 3.1, 2005
4. 武田伸一:  
AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の pre-clinical study - 筋ジストロフィー骨格筋で認められた免疫応答の克服 -。  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会, 東京, 2.25, 2005
5. 武田伸一:  
骨格筋・幹細胞と筋再生の分子機構。  
慶應大学医学部セミナー・日本横紋筋肉腫研究グループ (J R S G), 東京, 2.14, 2005
6. 武田伸一, 石浦章一, 鈴木友子:  
内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発。  
こころの健康科学 (神経分野) 研究成果発表会 (研究者向け), 東京, 2.9, 2005
7. 武田伸一, 鈴木友子, 増田 智, 深田宗一郎, 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳:  
微小重力による筋萎縮の分子メカニズム。  
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
8. 二川 健, 平坂勝也, 久田記美子, 後藤淳平, 不老治治美, 大西ゆう子, 岸 恭一, 小川貴之, 鈴江直人, 安井夏生, 石堂一巳, 埜中征哉, 武田伸一:  
Unloading による筋・骨萎縮におけるユビキチン・システムの重要性ユビキチンリガーゼの結合蛋白質の解析を中心に。  
-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-第27回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12.10, 2004
9. 武田伸一:  
骨格筋幹細胞と筋再生。  
東京大学大学院セミナー, 11.19, 2004
10. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する生殖医療と遺伝子治療。  
埼玉県筋ジストロフィー協会創立40周年記念大会関連シンポジウム「遺伝子疾患 (筋ジストロフィーなど) と生殖医療」, 9.18, 2004
11. 武田伸一:  
骨格筋の幹細胞を巡る進歩。  
東北大学医学部セミナー, 宮城県仙台市, 9.17, 2004
12. 武田伸一:  
将来の治療。  
平成16年度神経・筋疾患政策医療ネットワーク研修会, 東京, 9.16, 2004
13. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
An AAV-vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-