

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田伸一

平成18年(2006)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 ----- 19

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. ユートロフィン遺伝子上流12.7 kbをLacZ遺伝子に連結したDNA constructを導入したトランスジェニック・マウスでは、LacZの発現はほぼ内因性のユートロフィン発現に近いものであったが、骨格筋、心筋では認められなかった。そこでユートロフィン遺伝子のイントロン2内に同定されているエンハンサー（DUE）を組み込んだconstructを作成し、再度トランスジェニック・マウスを作出した。新しいトランスジェニック・マウスでは骨格筋の神経筋接合部、心筋でLacZの発現が認められ、DUEがユートロフィンの骨格筋、心筋での発現に必須である事が証明された。このトランスジェニック・マウスは、ユートロフィンの発現を増強する化合物のhigh-throughputのスクリーニングにも有用であると期待される。
2. 筋強直性ジストロフィー（DM）は、異常な繰り返し構造を持つmRNAにタンパク質が結合しRNAスプライシングが異常になって発病する「RNA病」であることが明らかになった。リピートRNAに結合する因子としてMBNLファミリーとCELFファミリーという2つの遺伝子群から作られるタンパク質が関与しており、そのスプライシングに及ぼす影響は拮抗的であることが多い。
3. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系 Purkinje 線維では、 $\mu$ -calpainによりcardiac Troponin-Iが断片化を受ける。断片化を受けたcardiac Troponin-Iは、ubiquitin E3 ligaseであるMuRF-1によりユビキチン化を受けている可能性がでてきた。したがって筋ジストロフィーに対するカルパイン・インヒビターないしはユビキチン・プロテアソーム阻害剤による治療法の開発が注目される。

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質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、ユートロフィン遺伝子のの上流12.7 kbの領域をlacZに連結したトランスジェニック・マウスを解析したが、

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)。そこで新たにイントロン・エンハンサー (Galvagni et al., 2000, J. Biol Chem, 275, 3168-3172) をクローニングし、前回用いたコンストラクトの上流に挿入して、新たにトランスジェニック・マウスを作出し、LacZ の発現を解析した。

ユートロフィンの発現はユートロフィン mRNA の 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) 及び同領域に結合する RNA 結合蛋白質によっても制御を受けていると考えられる。3'-UTR に関わる制御機構について最も研究が進んでいるのは、筋強直性ジストロフィー関連遺伝子である。

筋強直性ジストロフィー (DM) は、DM キナーゼ (DMPK) またはジnkフィンゲータタンパク質 ZNF9 をコードする遺伝子の非翻訳領域にある CTG または CCTG リピートが伸長して発病することが明らかになっている。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 MBNL1-3 と CELF1-6 を同定した。しかし、これらがどのように働いているかについては、研究が行われていなかった。そこで、本研究ではこれら 9 種類の RNA 結合タンパク質の機能の差について明らかにすることを目的として研究を行った。また、これらの因子の量をリアルタイム PCR を用いて定量した結果も合わせて報告する。

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、X 染色体にコードされているジストロフィン遺伝子の変異により引き起こされる致死性の筋疾患である。本研究ではユートロフィン発現増強に関する研究を主題としているが新たな病態の解明に基づいて、新しい治療法を見出すことも重要である。DMD 患者の寿命が人工呼吸器の進歩により急速に伸

びた反面、死亡原因として心不全が問題となっている。しかし、ジストロフィン異常による心筋障害の発症機序は十分に明らかにされてはおらず、治療法の開発も進んでいない。我々はこれまでに、筋ジストロフィーの心筋を用いて、①左室心筋障害が明らかになる以前より心電図に異常 Q 波が出現する、②刺激伝導系 Purkinje 線維に空胞変性が認められる、③空胞変性した Purkinje 線維に Ca 依存性 protease の一種である  $\mu$ -calpain の蓄積が認められることを報告した。最近、心筋型トロポニン I (cTnI) が  $\mu$ -calpain の基質であることや cTnI に対する自己抗体の投与により心筋障害を来すこと、さらに、cTnI が筋萎縮に関連し、ubiquitin ligase の機能を持つ Muscle specific Ringfinger Protein-1 (MuRF-1) の基質であることが報告されたことから、筋ジストロフィー Purkinje 線維の変性機構において、cTnI の発現異常やユビキチン化が関連しているとの作業仮説を立てて、検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. トランスジェニック・マウスの解析

2000 年に Galvagni らが J. Biol. Chem. に報告したイントロン・エンハンサー (128 bp) をクローニングし、前回作成した Tg 用コンストラクトの上流に挿入、トランスジェニック・マウスを作成した。得られた 2 ラインのマウスについて、X-gal 染色、RT-PCR 等を用いて、各臓器での transgene を発現する細胞の同定と発現のレベルを解析した。また、カルジオトキシンをトランスジェニック・マウスの前脛骨筋に投与して、筋再生を引き起こし、LacZ の発現増強が筋核で認められるか、調べた。

### 2. DUE エンハンサーに結合する因子の解析

128 bp のエンハンサー領域に結合する転写因子を転写因子の結合配列の data ベースをも

とに検索した（富士通株式会社に委託）。

### 3. RNA 結合タンパク質の検索

ヒト cDNA ライブラリーから、MBNL と CELF あわせて 9 種のリピート RNA 結合タンパク質（MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, CELF3, CELF4, CELF5, CELF6）をクローニングした。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。スプライシングアッセイには、塩素チャネル、インスリン受容体、 $\alpha$ アクチニン、c-src などの mini-gene を用いた。

### 4. 筋ジス犬プルキンエ線維に関する検討

筋ジス犬 7 頭および正常対照犬 7 頭（それぞれ 2-24 ヶ月齢）、および保因犬 1 頭（9 ヶ月齢）の血清と心筋を用いた。Purkinje 線維は Laser Capture Microdissection により採取し、ウェスタンブロットおよび免疫沈降法を用いて cTnI, ubiquitin, MuRF-1 の発現を解析した。また、上記各分子の局在については免疫組織化学的に検討を行った。

## 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・マウスの解析

新たに作成したトランスジェニック・マウス (DUE-Tg) では以前発現が確認されなかった心筋、骨格筋の神経筋接合部に  $\beta$ -gal の発現が認められた。心筋、骨格筋以外に臓器、例えば肺、小腸、小脳等でも  $\beta$ -gal の発現増強が認められ、DUE は筋特異的エンハンサーではなく、いろいろな臓器で活性を持つと考えられた。

### 2. 再生筋でのトランスジーン発現の解析

さらに、DUE-Tg の骨格筋に cardiotoxin を直接導入し、筋再生を誘発すると、トキシン投与 3 日後、5 日後に  $\beta$ -gal の mRNA のレベ

ルが上昇していた。またそれに一致して、筋核で  $\beta$ -gal の発現が認められた。

### 3. エンハンサー領域に結合する転写因子の検索

DUE (Downstream utrophin enhancer) 128 bp の塩基配列の解析から、AP-1, Oct-1, TEF-1 がその結合因子の候補である事がわかった。

### 4. RNA 結合タンパク質のスプライシングへの関与

まず、ミニ gene を用いた in vitro スプライシング系にこれら RNA 結合タンパク質を加え、mini-gene のスプライシングパターンが変化するかどうかを調べた。マウス塩素チャネル（マウス）では MBNL ファミリーの 3 つがエキソン 7A のスキップ方向に働くのに対し、CELF ファミリー（特に CELF3-6）はエキソン 7A を含むようにスプライスさせることがわかった。また、MBNL1 のスプライシングを CELF 型に変えるには、CELF4 が一番活性の高いことが判明した。

### 5. DM 筋における MBNL1 の発現

次に、リアルタイム PCR を用いて MBNL1 の量を、DM 患者 21 例と疾患対象者 12 例で調べたところ、DM の方が多少、少なかったが対照と比較しても有意差がなかった。

### 6. 筋ジス犬プルキンエ線維に関する検討

筋ジス犬のプルキンエ線維について検討を進め、以下の結果を得た。①ウェスタンブロットにより cTnI が  $\mu$ -calpain による断片化を受けた場合に出現する、約 18 kDa および 14 kDa の断片が検出された。また、血清サンプルにおいても同分子量の断片化された cTnI が検出された。②免疫組織化学では、筋ジス犬の Purkinje 線維では正常対照犬に比べ ubiquitin および MuRF-1 の強い染色性を認め、cTnI と共局在を示した。③免疫沈降法により、ユビキチン化を受けた断片化 cTnI が検出された。

#### D. 考察

骨格筋、心筋に於けるユートロフィンの発現調節には、ユートロフィン遺伝子のイントロン 2 に見つかった DUE と名付けられた 128 bp のエンハンサーが重要な役割を担っている事がわかった。今後はこのエンハンサーに結合する因子の同定を進める予定である。

また、このトランスジェニック・マウス由来の細胞に様々な化合物を加えて、ユートロフィンの発現を増強する可能性のある化合物を high-throughput のスクリーニングで探していく予定である。そうした化合物が見つければ、ジストロフィーが欠損して起こる筋ジストロフィーにおいて、筋膜を安定化させ、筋ジストロフィー患者に見られる筋変性を軽減する治療法の確立が期待される。

筋強直性ジストロフィーの多様な症状は、種々の遺伝子のスプライシングによる機能差から来るものであることが明らかになってきた。例えば、マウス塩素チャネル遺伝子では、エキソン 7A が入ると途中で停止コドンが入り、短縮されたタンパク質ができて機能が阻害されるが、エキソン 7A が飛ばされると正常型の塩素チャネルになる。前者は胎児筋で、後者は成熟筋で見られるスプライシングである。CELF4 が上がると短縮型ができ、MBNL1 が上がると正常型になる。このように、生体内ではこの 2 つのバランスがとれていると考えられる。

ところが、RNA 結合タンパク質の発現量が増えるとこのバランスが崩れ、どちらかに偏ってしまうことが本研究で明らかになった。今後は、これら RNA 結合タンパク質も治療の標的として検討すべきであることがわかった。

筋ジストロフィーの Purkinje 線維では、細胞内カルシウムの増加により活性化された  $\mu$ -calpain によって cTnI が断片化を受け、断片化され

た cTnI が MuRF-1 によってユビキチン化されてユビキチン-プロテアソーム系によってタンパク質分解を受けた結果、変性が生じている可能性が考えられる。また、これらの結果から、筋ジストロフィーの病態機構にも筋萎縮と同様のユビキチン化が関与している可能性が示唆された。さらに、これらの研究結果はカルパイン・インヒビターあるいはユビキチン・プロテアソーム阻害剤が筋ジストロフィーに対する治療法として検討されるべきことを示唆している。

#### 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。更にこのマウスの解析からこのイントロン・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た。
2. 筋強直性ジストロフィーでは、RNA 結合タンパク質の発現量が増えるためにさまざまな遺伝子のスプライシングのパターンが変化し、その結果として多様な症状を生ずることが明らかになった。
3. 筋ジストロフィー犬 Purkinje 線維及び血清では  $\mu$ -calpain によって断片化を受けたと考えられる cardiac Troponin-I (cTnI) が出現した。同線維では、ubiquitin および MuRF-1 の染色性を認め、cTnI と共有を示した。さらにユビキチン化した cTnI 断片が検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### < 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N:  
Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation  
*J Bone Mineral Res* (in press)
2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle  
*Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S:  
Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor.  
*Acta Myologica*, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S:  
Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ.  
*Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y.  
Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration.  
*Science*, 2005 Jul 8; 309(5732): 314-7.
6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S.  
Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise.  
*Biochim Biophys Acta*, 2005 Jun 10; 1740(3):326-31.
7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S.  
Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-I in muscle of mdx mice.  
*Muscle Nerve*. 2005 Aug; 32(2): 191-9.
8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S.  
Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle.  
*Am J Pathol*, 2005 Jun;166(6): 1721-32.
9. Ishiura, S., Kino, Y., Nezu, Y., Onishi, H., Ohno, E. and Sasagawa, N. (2005) Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein. *Acta Myologica*, 14, 74-77
10. Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2005) Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids. *Biochim.Biophys.Acta*, 1748, 174-179
11. Mitsuhashi, H., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Hayashi, Y. & Ishiura, S. (2005) Denervation enhances the expression of SHPS-1 in the rat skeletal muscle. *J.Biochem*, 137, 495-502

#### < 和文 >

1. 大島幸子, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの動物の心筋障害.  
神経内科, 62(6): 539-546, 2005
2. 吉村まどか, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの遺伝子治療.  
BRAIN MEDICAL, 17(3): 221-228, 2005
3. 西山章代, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療.  
Neurological Science, 14(1): 8-9, 2005

4. 武田伸一, 鈴木友子 :  
筋ジストロフィーの発症メカニズムと  
治療研究. -疾患解明 Overview-  
実験医学, 23(10): 1590-6, 2005
5. 松尾雅文, 武田伸一 :  
最近分かった筋ジストロフィーの病態  
と治療.  
脳と発達, 38(2): 129-131, 2006

## II. 学会発表

### < 国外 >

1. Takeda S:  
Therapeutic approaches using micro-  
dystrophin and an AAV vector to  
dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar in Faculté des Sciences, Univer-  
sité de Genève, Genève, Switzerland, Apr  
14, 2005
2. Takeda S:  
Muscle stem cells and muscle regeneration.  
Seminar in the Biological Research Center  
of the Hungarian Academy of Sciences in  
Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
3. Takeda S:  
Therapeutic approaches using micro-  
dystrophin and an AAV vector to  
dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar in the Regional Conference Center  
of the Academy of Sciences in Szeged,  
Hungary, Apr 19, 2005
4. Takeda S:  
Therapeutic approaches to dystrophin-  
deficient muscular dystrophy.  
Seminar in the Department of Enzymology  
of the Hungarian Academy of Sciences in  
Budapest, Hungary, Apr 21, 2005
5. Takeda S:  
Muscle stem cells and muscle regeneration.  
Seminar in the Agricultural Research  
Center of Molecular Biology, Gödöllő,  
Hungary, Apr 21, 2005
6. Takeda S:  
The Japanese approach to molecular  
diagnosis and therapy; special reference to  
ethical and legal issues.  
Ethics Conference of the Hungarian  
Medical Chamber in Pilisszentkereszt,  
Hungary, Apr 22, 2005
7. Takeda S:  
Participation of muscle stem cells in  
muscle regeneration.  
EMBO/FEBS workshop "The Molecular  
and Cellular Mechanisms underlying  
Skeletal Muscle Formation and Repair",  
Fontevraud, France, Sep 29, 2005
8. Takeda S:  
Gene therapy approach to dystrophin-  
deficient muscular dystrophy.  
Clinical Sciences Centre Symposium in  
honor of Terry Partridge "From Satellite  
Cells to Gene Therapy", The Zoological  
Society of London, London, UK, Oct 1,  
2005
9. Takeda S:  
Contribution of CD31-negative/CD45-  
negative Side Population cells to skeletal  
muscle regeneration.  
Workshop "Musculo-Skeletal:  
Myogenic Stem Cells and Regeneration"  
8th annual meeting, American Society of  
Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
10. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M,  
Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell  
JM, Takeda S:  
An AAV vector-mediated gene transfer  
into canine skeletal muscle.  
8th annual meeting, American Society of  
Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2,  
2005
11. Takeda S:  
AAV vector mediated micro-dystrophin  
transfer into dystrophin-deficient skeletal  
muscle.  
6th Japanese-French workshop on muscu-  
lar dystrophies, Paris, France, July 2, 2005

12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:  
Increased  $\epsilon$ -sarcoglycan expression ameliorates muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan deficient mice, a model for LGMD2D.  
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
13. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S:  
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech Republic, 10.30-11.1, 2005
5. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田宗一朗, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一:  
後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析。  
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
6. 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋前駆細胞の維持, 増殖, 分化の分子機構: 横紋筋肉腫の分子的理解に向けて。  
平成17年度厚生労働省がん研究助成金森川班第1回班会議, 東京, 7.29, 2005
7. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S:  
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
The 11th Annual Meeting Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005

#### < 国内 >

1. 深田宗一朗, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析。  
第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 4.21, 2005
2. 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割。  
第82回日本生理学会, 仙台市, 5.20, 2005
3. 武田伸一:  
最近わかった筋ジストロフィーの病態と治療「ジストロフィン欠損における新たな分子病態」  
第47回日本小児神経学会シンポジウム, 熊本市, 5.18, 2005
4. 深田宗一朗, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析。  
第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
8. 武田伸一:  
筋ジストロフィー治療の最前線。  
シンポジウム“再生医療(幹細胞移植など)の臨床的応用に関する倫理的・社会的問題” 東京, 9.9, 2005
9. 武田伸一:  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の進歩。  
日本筋ジストロフィー協会施設見学会, 東京, 9.11, 2005
10. 武田伸一:  
筋ジス治療の現状と未来。  
秋田筋ジストロフィー協会シンポジウム, 秋田市, 9.16, 2006
11. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscular dystrophy (DMD).  
“AAV and its application to Gene therapy & regenerative medicine” The 2nd Nikko International Symposium, 9.30, 2005

12. 武田伸一：  
筋ジストロフィーの臨床遺伝学.  
第2回遺伝医療倫理討論-ピアカウンセ  
ラー養成講座-, 名古屋市, 10.22, 2005
  13. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する治療戦略  
-遺伝子治療から薬物治療まで-  
帝人研究所, 1.25, 2005
  14. 武田伸一：  
これからの筋ジストロフィー治療.  
市民公開講座第1回筋ジストロフィー  
-デュシェンヌ型を中心に-  
小平市, 2.25, 2006
  15. 武田伸一：  
筋ジストロフィーに対する治療法の開  
発を目指して：遺伝子治療，幹細胞移  
植再生治療，創薬の融合的研究.  
健康医療セミナー  
早稲田大学科健機構，東京 2.28, 2006
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
準備中

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

ユートロフィン遺伝子上流 12.7 kb を LacZ 遺伝子に連結した DNA construct を導入したトランスジェニック・マウスでは、LacZ の発現はほぼ内因性のユートロフィン発現に近いものであったが、骨格筋、心筋では認められなかった。そこでユートロフィン遺伝子のイントロン 2 内に同定されているエンハンサー（DUE）を組み込んだ construct を作成し、再度トランスジェニック・マウスを作出した。新しいトランスジェニック・マウスでは骨格筋の神経筋接合部、心筋で LacZ の発現が認められ、DUE がユートロフィンの骨格筋、心筋での発現に必須である事が証明された。このトランスジェニック・マウスは、ユートロフィンの発現を増強する化合物の high-throughput のスクリーニングにも有用であると期待される。

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質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、ユートロフィン遺伝子上流 12.7 kb の領域を lacZ に連結したトランスジェニック・マウスを解析したが、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)。そこで新たにイントロン・エンハ

ンサー (Galvagni *et al.*, 2000, *J. Biol Chem*, 275, 3168-3172) をクローニングし、前回用いたコンストラクトの上流に挿入して、新たにトランスジェニック・マウスを作出し、LacZ の発現を解析した。

B. 研究方法

1. トランスジェニック・マウスの解析  
2000年にGalvagniらがJ. Biol. Chem.に報告したイントロン・エンハンサー (128 bp) をクローニングし、前回作成した Tg 用コンストラクトの上流に挿入、トランスジェニック・マウスを作成した。得られた 2 ラインのマウスについて、X-gal 染色、RT-PCR 等を用いて、各臓器での transgene を発現する細胞の同定と発現のレベルを解析した。また、カルジオトキシンをトランスジェニック・マウスの前脛骨筋に投与して、筋再生を引き起こし、LacZ の発現増強が筋核で認められるか、調べた。
2. DUE エンハンサーに結合する因子の解析  
128 bp のエンハンサー領域に結合する転写因子を転写因子の結合配列の data ベースを

もとに検索した（富士通株式会社に委託）。

## 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・マウスの解析

新たに作成したトランスジェニック・マウス（DUE-Tg）では以前発現が確認されなかった心筋、骨格筋の神経筋接合部に $\beta$ -galの発現が認められた。心筋、骨格筋以外に臓器、例えば肺、小腸、小脳等でも $\beta$ -galの発現増強が認められ、DUEは筋特異的エンハンサーではなく、いろいろな臓器で活性を持つと考えられた。

### 2. 再生筋でのトランスジーン発現の解析

さらに、DUE-Tgの骨格筋にcardiotoxinを直接導入し、筋再生を誘発すると、トキシン投与3日後、5日後に $\beta$ -galのmRNAのレベルが上昇していた。またそれに一致して、筋核で $\beta$ -galの発現が認められた。

### 3. エンハンサー領域に結合する転写因子の検索

DUE（Downstream utrophin enhancer）128 bpの塩基配列の解析から、AP-1, Oct-1, TEF-1がその結合因子の候補である事がわかった。

## D. 考察

骨格筋、心筋に於けるユートロフィンの発現調節には、ユートロフィン遺伝子のイントロン2に見つかったDUEと名付けられた128 bpのエンハンサーが重要な役割を担っている事がわかった。今後はこのエンハンサーに結合する因子の同定を進める予定である。

また、このトランスジェニック・マウス由来の細胞に様々な化合物を加えて、ユートロフィンの発現を増強する可能性のある化合物をhigh-throughputのスクリーニングで探していく予定である。

そうした化合物が見つければ、ジストロ

フィンが欠損して起こる筋ジストロフィーにおいて、筋膜を安定化させ、筋ジストロフィー患者に見られる筋変性を軽減する治療法の確立が期待される。

## 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。更にこのマウスの解析からこのイントロン・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た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

#### <英文>

1. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle  
*Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006

#### <和文>

1. 武田伸一, 鈴木友子:  
筋ジストロフィーの発症メカニズムと治療研究. -疾患解明 Overview-  
実験医学 23(10): 1590-6. 2005-6

### II. 学会発表

#### <国外>

1. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Takeda S:  
An AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005

2. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S: AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle. 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech Republic, 10.30-11.1, 2005
6. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S: AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle. The 11th Annual Meeting Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005

< 国内 >

1. 深田総一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析. 第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 4.21, 2005
2. 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割. 第82回日本生理学会, 仙台市, 5.20, 2005
3. 深田宗一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析. 第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
4. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田宗一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一: 後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析. 第26回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
5. 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋前駆細胞の維持, 増殖, 分化の分子機構: 横紋筋肉腫の分子的理解に向けて. 平成17年度厚生労働省がん研究助成金森川班第1回班会議, 東京, 7.29, 2005

7. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscular dystrophy (DMD). "AAV and its application to Gene therapy & regenerative medicine" The 2nd Nikko International Symposium 2005, 9.30, 2005

H. 知的所有権の出願・登録状況  
準備中

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、異常な繰り返し構造を持つ mRNA にタンパク質が結合し RNA スプライシングが異常になって発病する「RNA 病」であることが明らかになった。リピート RNA に結合する因子として MBNL ファミリーと CELF ファミリーという 2 つの遺伝子群から作られるタンパク質が関与しており、そのスプライシングに及ぼす影響は拮抗的であることが多いことが明らかになった。

**A. 研究目的**

筋強直性ジストロフィー（DM）は、DM キナーゼ（DMPK）またはジンクフィンガータンパク質 ZNF9 をコードする遺伝子の非翻訳領域にある CTG または CCTG リピートが伸長して発病することが明らかになっている。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 MBNL1-3 と CELF1-6 を同定した。しかし、これらがどのように働いているかについては、研究が行われていなかった。そこで、本研究ではこれら 9 種類の RNA 結合タンパク質の機能の差について明らかにすることを目的として研究を行った。

また、これらの因子の量をリアルタイム PCR を用いて定量した結果も合わせて報告する。

**B. 研究方法（倫理面の配慮含む）**

本研究では、ヒト cDNA ライブラリーから、MBNL と CELF あわせて 9 種のリピート RNA 結合タンパク質（MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, CELF3, CELF4, CELF5, CELF6）をクローニングした。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。

スプライシングアッセイには、塩素チャンネル、インスリン受容体、 $\alpha$ アクチニン、c-src などの mini-gene を用いた。

**C. 研究結果と考察**

1) RNA 結合タンパク質のスプライシングへの関与

まず、ミニ gene を用いた *in vitro* スプライシング系にこれら RNA 結合タンパク質を加え、mini-gene のスプライシングパターンが変化するかどうかを調べた。マウス塩素チャンネル（マウス）では MBNL ファミリーの 3 つがエクソン 7A のスキップ方向に働くのに対し、CELF ファミリー（特に CELF3-6）はエクソン 7A を含むようにスプライスさせることがわかった。また、MBNL1 のスプライシングを CELF 型に変えるには、CELF4 が一番活性が高いことが判明した。

2) DM 筋における MBNL1 の発現

次に、リアルタイム PCR を用いて MBNL1 の量を、DM 患者 21 例と疾患対象者 12 例で調べたところ、DM の方が多少、少なかったが対照と比較しても有意差がなかった。

## D. 結論

筋強直性ジストロフィーの多様な症状は、種々の遺伝子のスプライシングによる機能差から来るものであることが明らかになってきた。例えば、マウス塩素チャンネル遺伝子では、エキソン7Aが入ると途中で停止コドンが入り、短縮されたタンパク質ができて機能が阻害されるが、エキソン7Aが飛ばされると正常型の塩素チャンネルになる。前者は胎児筋で、後者は成熟筋で見られるスプライシングである。CELF4が上がると短縮型ができ、MBNL1が上がると正常型になる。このように、生体内ではこの2つのバランスがとれていると考えられる。

ところが、RNA結合タンパク質の発現量が変化するとこのバランスが崩れ、どちらかに偏ってしまうことが本研究で明らかになった。今後は、これらRNA結合タンパク質も治療の標的として検討すべきであることがわかった。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

## 1. 論文発表

1. Ishiura, S., Kino, Y., Nezu, Y., Onishi, H., Ohno, E. and Sasagawa, N. (2005) Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein. *Acta Myologica*, 14, 74-77
2. Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2005) Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids. *Biochim.Biophys.Acta* 1748, 174-179
3. Mitsuhashi, H., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Hayashi, Y. & Ishiura, S. (2005) Denervation enhances the expression of SHPS-1 in the rat skeletal muscle.

## 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、 $\mu$ -calpain により cardiac Troponin-I が断片化を受ける。
2.  $\mu$ -calpain により断片化を受けた cardiac Troponin-I は、ubiquitin E3 ligase である MuRF-1 によりユビキチン化を受けている可能性がでてきた。
3. 筋ジストロフィーに対するカルパイン・インヒビターないしはユビキチン・プロテアソーム阻害剤による治療法の開発が注目される。

**A. 研究目的**

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、X 染色体にコードされているジストロフィン遺伝子の変異により引き起こされる致死性の筋疾患である。人工呼吸器の進歩により DMD 患者の寿命が急速に伸びた反面、死亡原因として心不全が問題となっている。しかし、ジストロフィン異常による心筋障害の発症機序は十分に明らかにされてはならず、治療法の開発も進んでいない。我々はこれまでに、筋ジストロフィー犬の心筋を用いて、①左室心筋障害が明らかになる以前より心電図に異常 Q 波が出現する、②刺激伝導系 Purkinje 線維に空胞変性が認められる、③空胞変性した Purkinje 線維に Ca 依存性 protease の一種である  $\mu$ -calpain の蓄積が認められることを報告した。最近、心筋型トロポニン I (cTnI) が  $\mu$ -calpain の基質であることや cTnI に対する自己抗体の投与により心筋障害を来すこと、さらに、cTnI が筋萎縮に関連し、ubiquitin ligase の機能を持つ Muscle specific Ringfinger

Protein-1 (MuRF-1) の基質であることが報告されたことから、筋ジストロフィー犬 Purkinje 線維の変性機構において、cTnI の発現異常やユビキチン化が関連しているとの作業仮説を立てて、検討を行った。

**B. 研究方法**

筋ジストロフィー犬 7 頭および正常対照犬 7 頭 (それぞれ 2-24 ヶ月齢)、および保因犬 1 頭 (9 ヶ月齢) の血清と心筋を用いた。Purkinje 線維は Laser Capture Microdissection により採取し、ウェスタンブロットおよび免疫沈降法を用いて cTnI, ubiquitin, MuRF-1 の発現を解析した。また、上記各分子の局在については免疫組織化学的に検討を行った。

**C. 研究成果**

筋ジストロフィー犬のプルキンエ線維について検討を進め、以下の結果を得た。①ウェスタンブロットにより cTnI が  $\mu$ -calpain による断片化を受けた場合に出現する、約 18 kDa および 14 kDa の断片が検出され

た。また、血清サンプルにおいても同分子量の断片化された cTnI が検出された。②免疫組織化学では、筋ジス犬の Purkinje 線維では正常対照犬に比べ ubiquitin および MuRF-1 の強い染色性を認め、cTnI と共局在を示した。③免疫沈降法により、ユビキチン化を受けた断片化 cTnI が検出された。

#### D. 考察

筋ジス犬の Purkinje 線維では、細胞内カルシウムの増加により活性化された  $\mu$ -calpain によって cTnI が断片化を受け、断片化された cTnI が MuRF-1 によってユビキチン化されてユビキチン-プロテアソーム系によってタンパク質分解を受けた結果、変性が生じている可能性が考えられる。また、これらの結果から、筋ジストロフィーの病態機構にも筋萎縮と同様のユビキチン化が関与している可能性が示唆された。さらに、これらの研究結果はカルパイン・インヒビターあるいはユビキチン・プロテアソーム阻害剤が筋ジストロフィーに対する治療法として検討されるべきことを示唆している。

#### E. 結論

1. 筋ジストロフィー犬 Purkinje 線維及び血清では  $\mu$ -calpain によって断片化を受けたと考えられる cardiac Troponin-I (cTnI) が出現した。
2. 筋ジストロフィー犬 Purkinje 線維では、ubiquitin および MuRF-1 の染色性を認め、cTnI と共局在を示した。
3. 筋ジストロフィー犬心筋ではユビキチン化した cTnI 断片が検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

##### < 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N:  
Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation  
*J Bone Mineral Res* (in press)
2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle  
*Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S:  
Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor.  
*Acta Myologica*, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S:  
Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ.  
*Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y.  
Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration.  
*Science*, 2005 Jul 8;309(5732):314-7.

6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S.  
Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise.  
*Biochim Biophys Acta*, 2005 Jun 10; 1740(3):326-31.
7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S.  
Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice.  
*Muscle Nerve*. 2005 Aug; 32(2): 191-9.
8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S.  
Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle.  
*Am J Pathol*, 2005 Jun;166(6): 1721-32.

<和文>

1. 大島幸子, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの動物の心筋障害.  
神経内科 62(6): 539-546, 2005
2. 吉村まどか, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの遺伝子治療.  
BRAIN MEDICAL 17(3): 221-228, 2005
3. 西山章代, 武田伸一 :  
筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療.  
Neurological Science 14(1): 8-9, 2005
4. 武田伸一, 鈴木友子 :  
筋ジストロフィーの発症メカニズムと治療研究. -疾患解明 Overview-  
実験医学 23(10): 1590-6, 2005
5. 松尾雅文, 武田伸一 :  
最近分かった筋ジストロフィーの

病態と治療  
脳と発達 38(2): 129-131, 2006

II. 学会発表

<国外>

1. Takeda S:  
Therapeutic approaches using microdystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar in Faculté des Sciences, Université de Genève, Genève, Switzerland, Apr 14, 2005
2. Takeda S:  
Muscle stem cells and muscle regeneration.  
Seminar in the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
3. Takeda S:  
Therapeutic approaches using microdystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar in the Regional Conference Center of the Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
4. Takeda S:  
Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Seminar in the Department of Enzymology of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Hungary, Apr 21, 2005
5. Takeda S:  
Muscle stem cells and muscle regeneration.  
Seminar in the Agricultural Research Center of Molecular Biology, Gödöllő, Hungary, Apr 21, 2005
6. Takeda S:  
The Japanese approach to molecular

- diagnosis and therapy; special reference to ethical and legal issues. Ethics Conference of the Hungarian Medical Chamber in Pilisszentkereszt, Hungary, Apr 22, 2005
7. Takeda S:  
Participation of muscle stem cells in muscle regeneration.  
EMBO/FEBS workshop "The Molecular and Cellular Mechanisms underlying Skeletal Muscle Formation and Repair", Fontevraud, France, Sep 29, 2005
  8. Takeda S:  
Gene therapy approach to dystrophin-deficient muscular dystrophy.  
Clinical Sciences Centre Symposium in honor of Terry Partridge "From Satellite Cells to Gene Therapy", The Zoological Society of London, London, UK, Oct 1, 2005
  9. Takeda S:  
Contribution of CD31-negative/CD45-negative Side Population cells to skeletal muscle regeneration.  
Workshop "Musculo-Skeletal: Myogenic Stem Cells and Regeneration"  
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
  10. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Takeda S:  
An AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
  11. Takeda S:  
AAV vector mediated micro-dystrophin transfer into dystrophin-deficient skeletal muscle.  
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
  12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S:  
Increased  $\epsilon$ -sarcoglycan expression ameliorates muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan deficient mice, a model for LGMD2D.  
6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
  13. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S:  
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech Republic, 10.30-11.1, 2005
- < 国内 >
1. 深田総一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.  
第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 4.21, 2005
  2. 鈴木友子, 武田伸一:  
骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割。  
第82回日本生理学会, 仙台市, 5.20, 2005
  3. 武田伸一:  
最近わかった筋ジストロフィーの病態と治療「ジストロフィン欠損における新たな分子病態」  
第47回日本小児神経学会シンポジウム, 熊本市, 5.18, 2005
  4. 深田宗一郎, 上住聡芳, 池本 円, 増

- 田 智, 瀬川将司, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一 :  
骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)の純化, 動態, 網羅的な遺伝子発現解析.  
第 26 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
5. 鈴木直輝, 望月靖史, 上住聡芳, 深田宗一郎, 増田 智, 深瀬明子, 鈴木友子, 武田伸一 :  
後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析.  
第 26 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7.13, 2005
6. 鈴木友子, 武田伸一 :  
骨格筋前駆細胞の維持, 増殖, 分化の分子機構: 横紋筋肉腫の分子的理解に向けて.  
平成 17 年度厚生労働省がん研究助成金森川班第 1 回班会議, 東京, 7.29, 2005
7. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S:  
AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle.  
The 11th Annual Meeting Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005
8. 武田伸一 :  
筋ジストロフィー治療の最前線.  
シンポジウム“再生医療(幹細胞移植など)の臨床的応用に関する倫理的・社会的問題” 東京, 9.9, 2005
9. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の進歩.  
日本筋ジストロフィー協会施設見学会, 東京, 9.11, 2005
10. 武田伸一 :  
筋ジス治療の現状と未来.  
秋田筋ジストロフィー協会シンポジウム, 秋田市, 9.16, 2006
11. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscular dystrophy (DMD).  
“AAV and its application to Gene therapy & regenerative medicine” The 2nd Nikko International Symposium, 9.30, 2005
12. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーの臨床遺伝学.  
第 2 回遺伝医療倫理討論-ピアカウンセラー養成講座-, 名古屋市, 10.22, 2005
13. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーに対する治療戦略-遺伝子治療から薬物治療まで-  
帝人研究所, 1.25, 2005
14. 武田伸一 :  
これからの筋ジストロフィー治療, 市民公開講座第 1 回筋ジストロフィー -デュシェンヌ型を中心に-  
小平市 2.25, 2006
15. 武田伸一 :  
筋ジストロフィーに対する治療法の開発を目指して: 遺伝子治療, 幹細胞移植再生治療, 創薬の融合的研究  
健康医療セミナー  
早稲田大学科健機構, 東京 2.28, 2006
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし