

細胞内外のマイオスタチン活性制御因子の作用機序と筋疾患診断治療への臨床応用

研究分担者 土田邦博

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療学 教授

研究要旨

マイオスタチン阻害療法は、全く新しい視点からの筋疾患の治療戦略である。欧米では、阻害抗体の臨床試験は忍容性に問題はなかったが、治療効果は限定的であった。国際的観点から見て、マウスや霊長類を用いた研究から、可溶性アクチビン IIB 型受容体やホリスタチンは、筋萎縮をきたす疾患の治療薬として大いに期待され研究が推進されている。本研究では、ホリスタチンに由来する分子のマイオスタチン阻害治療薬候補としての可能性を多角的に推進させた。マイオスタチン阻害マウスは、通常食でも、脂肪細胞が肥大化しないモデル動物であるため、脂肪組織と脂肪細胞の動態を詳しく解析した。マイオスタチンを阻害すると、筋量が増大するが詳細な機構については不明点が多い。筋崩壊と筋合成のバランスが変化すること、miRNA の発現が変動する事で筋分化や増殖に変化が生じる可能性が考えられたため、この点についての解析を行なった。また、筋疾患に関しては、筋衛星細胞による筋芽細胞分化細胞の研究と共に、骨格筋に浸潤する細胞の起源を明らかにし、新しい治療薬候補の探索を推進させた。骨格筋に浸潤する脂肪細胞や繊維化を惹起する細胞の起源を明らかにする独創的な研究を展開させた。

A.研究目的

筋ジストロフィーは、現在に至るまで良好な治療法に乏しく呼吸管理や対症療法に依存しているのが現状であるが、近年の分子細胞生物学的解析から、様々な治療標的が明らかになりつつある。マイオスタチン阻害療法は、筋萎縮をきたす様々な筋疾患に適応可能である点で特徴があり、変異遺伝子の回復と組み合わせる事で、根本的な治療法につながる事が期待されている。しかしながら、マイオスタチンが筋の増殖・分化を抑制する機構や、阻害により筋肥大する機構については不明点が多く、明らかにすべき点が多い。我々は、独自にホリスタチンを基にして作製したマイオスタチン阻害ペプチド発現マウス等やマイオスタチンノックアウトマウス（開発元の Johns Hopkins 大学の Lee 博士から供与を受けている。）を駆使して、マイオスタチン阻害による筋萎縮防止技術の開発に精力的に取り組む研究を計画し遂行した。

さらに、筋ジストロフィーの重要な病態として、骨格筋内に脂肪細胞が沈着したり、繊維化が引き起こされ、罹患患者の QOL に直接関与する。骨格筋内脂肪沈着は病態の進行を把握し筋疾患を評価する

方法として、MRI による画像診断で有用である。しかしながら、骨格筋内に変性し沈着する脂肪細胞や繊維化を起こす細胞の起源については、筋衛星細胞とする報告も散見されるものの、明確ではなかった。そこで、我々は、マウス骨格筋及び倫理委員会の承認を得てヒトの骨格筋を試料として、単核細胞を表面マーカーで網羅的に分画して、試験管内で脂肪分化能の高い細胞の同定に取り組んだ。骨格筋の血管近傍の間質に存在するユニークな間葉系前駆細胞の同定に成功した。同定した間葉系前駆細胞は、筋ジストロフィーや老化における骨格筋内脂肪化の機序の解明や脂肪化や繊維化抑制のための新たな治療標的となる事が期待される。

B.研究方法

マイオスタチンを阻害する手法として、細胞外でマイオスタチンに結合して、受容体 (ACVR2B) へのシグナル伝達を遮断するホリスタチンに着目した研究を行なった。マイオスタチン活性を効率よく阻害するホリスタチン改変体 (FS I-I, FS-N) を作製し、骨格筋特異的な遺伝子発現マウスを作製した。系統

樹立したマウスは、筋肥大を起こし、交配により筋ジストロフィーモデルの病態改善効果を持つ事を明らかにして来た。作出したマウスに、生後4週から9週間高脂肪食を負荷して、筋量、脂肪量、肝臓への脂肪の蓄積、耐糖能を検討した。

ホリスタチンのノックアウトマウスは出生時筋量が低下しているが、生後まもなく死亡するため、骨格筋の解析は困難であった。そこで、ホリスタチンノックアウトのヘテロ変異体を用いた骨格筋解析を行なった。その過程で、生体内で、アクチビンにマイオスタチン類似の筋量低下作用があるかを検討した。

マイオスタチンが筋量を調節する分子機構は不明点が多い。そこで、マイオスタチンノックアウト及びコントロールマウスの前頸骨筋から miRNA を抽出して、発現変動のみられる miRNA を網羅的に探索した。Argonaute (Ago) 抗体を用いた免疫沈降法を用いて、マイオスタチンおよびその下流で作用する miRNA や候補分子の絞り込みを行なった。

骨格筋内で脂肪変性や繊維化に関与する細胞を同定するため、マウスの下肢筋からコラゲナーゼ処理で単核細胞を分離し、種々の表面抗原に対する抗体を用いて染色後、FACS セルソーターを用いて細胞を純化し、脂肪分化培地、筋分化培地で培養し、脂肪細胞への分化能を評価した。間葉系幹細胞のマーカーである血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α) の抗体を用いて純化した細胞が非常に高い脂肪細胞への分化能を有する事が示された。ヒト骨格筋試料でも同様の手法で細胞を純化し脂肪分化することを示した。同定した細胞が、生体内で実際に脂肪分化することを確認するために、CAG プロモーターの下流に GFP を連結させた GFP マウスから、PDGFR α 陽性細胞を純化し、前頸骨筋にグリセロール注射により脂肪変性させた条件下で移植し、分化能を評価した。マウス及びヒトの骨格筋(中殿筋)標本作製し、同定した細胞の局在を免疫蛍光染色法を用いて筋衛星細胞と比較し詳細に解析した。同定した細胞の多分化能を評価するために、TGF- β や BMP などのマイオスタチンが属する TGF- β ファミリー

分子による刺激を行ない、多分化能や繊維化への関与を精査した。

なお、ヒト試料を用いる研究に関しては、学内の倫理審査で承認を得ており、また、動物実験二関しても、学内で承認を得て行なっており、倫理面の問題は無いと判断している。

C.研究結果

独自に作製したホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子発現マウスでは骨格筋量が增大し、*mdx* マウスでの治療効果が確認されている (Faseb J. 2008)。作製したマイオスタチン阻害マウスに高脂肪食負荷を施し、詳細な解析を行なった。野生型に比して、マイオスタチン阻害された際には、高脂肪食負荷時に、筋量のさらなる増加と脂肪量の蓄積の低下が確認された。脂肪細胞の肥大化は抑制傾向にあり、白色脂肪細胞で UCP3 やチトクローム C の発現が上昇しミトコンドリアの量が増加していた。インスリン抵抗性や耐糖能の改善が見られ、血中の中性脂肪やコレステロール値は低下し、アディポネクチンは増加していた。リン酸化 Smad3 を指標としてマイオスタチンシグナルを評価した結果、骨格筋でのみマイオスタチンシグナルが低下していた。従って、筋量が増加する事で、二次的に脂肪細胞や肝臓細胞での脂肪動態に変化が生じる事を明らかにした。肝臓での脂肪酸組成では、野生型に比べてオレイン酸の増加が顕著に低下していた。酸素消費量は、増加していたが、筋量で補正すると顕著な差は見られなかった (Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011)。

ホリスタチンのヘテロノックアウトマウスの解析では、15~20%程度の筋量低下、筋力の低下、筋繊維サイズの減少、筋障害に対する脆弱性と繊維化の促進が観察された。マイオスタチンは、生体内で筋量を負に制御するが、アクチビン A にもマイオスタチンには及ばないものの筋量低下作用があることが証明された (Mol. Endocrinol. 2010)。

関連研究として、脳内のアクチビンの量を制御する遺伝子改変動物を作製し、行動学的な解析や記憶に関する検討を加えた。その結果、アクチビンおよ

びその阻害分子であるホリスタチンは、記憶の再固定化や後期の長期記憶等脳内で重要な作用を有している事が示された (Learning & Memory 2010; Vitamins & Hormones 2010)。

マイオスタチン阻害で骨格筋で変動の見られる miRNA を同定するために、マイオスタチンノックアウトマウスと対照マウスの前頸骨筋から miRNA を抽出して、発現変動が見られる miRNA を網羅的に検索した。マイオスタチンノックアウトマウスで2倍以上の増加のある10種類以上の miRNA を同定した。Myo miRNA とされる miRNA の中では、miRNA206 の上昇が確認された。それ以外にも、従来骨格筋での役割がさほど解析されていなかった、miRNA300, 329, 486 等が同定された。C2C12 細胞の筋分化に伴って、発現誘導される数多くの miRNA が同定された。マイオスタチンノックアウトマウスでは、p70S6 キナーゼとその下流で作用する S6 キナーゼのリン酸化が亢進している事が明らかとなった。既報とは異なり、Akt のリン酸化には変化が見られないため、Akt とは異なった経路で、S6 キナーゼが活性化されて、タンパク合成の上昇することがマイオスタチン阻害による筋肥大の一因となることが推察された。

骨格筋内に脂肪沈着を起こす細胞の網羅的な解析を行なった。骨格筋内に存在する単核細胞の中で、PDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞が、増殖能が高くインスリン添加のみで脂肪細胞へ効率よく分化した。移植実験においては、脂肪変性環境下では脂肪分化を示した。しかしながら、カルジオトキシン処理による筋再生条件下では脂肪分化を示さなかった。この現象から、細胞がおかれる微小環境が、PDGFR α 細胞の運命決定に重要な役割を果たす事を示されたと言える。同定細胞はマウス及びヒトの骨格筋の間質の特に血管近傍に存在していた。筋基底膜直下に存在する筋衛星細胞とは局在も全く異なっていた。脂肪変性が生じる時期に呼応して、PDGFR α 陽性が見られた事も確認された。同定した細胞は、筋ジストロフィー病態で見られる脂肪細胞を供給する細胞であることが強く示唆された。PDGFR α 陽性細胞は

筋衛星細胞由来の筋繊維と共培養するとその脂肪分化が強く抑制された。骨格筋を作り出す筋衛星細胞と脂肪細胞を生み出す PDGFR α 陽性細胞が相互作用する事でお互いの運命や量的なバランスを取っている可能性が高い。PDGFR α 細胞は、細胞を TGF- β で処理すると、コラーゲン、CTGF 等繊維化の指標となるマーカー分子の発現が誘導され、 α -SMA 抗体で染色される繊維芽細胞様細胞に分化する。移植実験においても、繊維化を起こす事が確認された。一方、BMP の刺激や骨芽細胞分化培地では、骨芽細胞様細胞に分化する。このように、骨格筋内に存在する同定細胞は、多分化能を有するが、筋芽細胞分化は起こさない。一方、筋分化を担う筋衛星細胞は、脂肪細胞への分化はほとんど示さない。両者は、自らの細胞系譜は異なっているが、お互いに相互作用しながら骨格筋の恒常性維持や病態に関与していると考えている。

D. 考察

マイオスタチン阻害療法は、筋ジストロフィーに限定されず、筋萎縮をきたす疾患群、例えば、悪液質による筋萎縮、老化による筋量低下 (サルコペニア)、神経原性筋萎縮、さらには、糖尿病にも有効である可能性が示唆されている。筋疾患患者は、筋萎縮の進行に伴って、体を動かせない生活を余儀なくされる場合があり、代謝活性が低下する。また、筋硬直性ジストロフィーの病態として、耐糖能異常が見られる場合がある。糖原病では脂肪肝も見られる。従って、骨格筋肥大と共に耐糖能の改善が見られれば、筋疾患患者の QOL 向上も期待出来る。

本研究では、マイオスタチン阻害療法の基盤的研究と臨床応用展開するために、独自に開発したホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害ペプチド (FS I-I, FS-N) の解析、マイオスタチン阻害マウスの筋量増加、脂肪量低下、脂肪肝形成抑制効果について、詳細に検討を加えた。ホリスタチン分子は、1回の遺伝子治療で長期にわたり、筋量増加効果を保つ作用を有しており、可溶型マイオスタチン受容体 (ACVR2B) と共に、筋疾患治療薬剤として期待され

ている。マイオスタチン阻害マウスは、通常食でも、脂肪細胞が肥大化せず、高脂肪食を負荷しても、脂肪量の増加や脂肪肝の形成は抑制されていた。耐糖能やインスリン感受性は対照と比較して良好であった。また、筋量はさらに増大した。

マイオスタチンが筋量低下作用を有し、逆にマイオスタチン阻害で筋肥大することは明らかであるが、その分子機構は不明点が多い。近年、細胞分化制御に重要な役割を果たす分子として miRNA が注目されている。マイオスタチンノックアウトマウスと対照マウスの前頸骨筋から miRNA を抽出し、2倍以上発現に変動のある miRNA を網羅的に解析した。その結果、上昇する数多くの分子 (miRNA206, 486, 300, 329 など) が同定された。興味深い事に、染色体の 12qF1 領域の miRNA クラスターは一樣に上昇が確認された。また、miRNA206 は筋特異的 miRNA (myomiRNA) として最初に同定された分子であり、miRNA486 と共に、筋分化促進作用を有する事が知られている。マイオスタチン阻害による筋肥大に miRNA が大きな役割を有する事が明らかになって来たと考えられている。さらに、C2C12 細胞の筋分化に伴って発現上昇する miRNA も同定された。miRNA の標的の探索として、bioinformatics 解析と共に、対象とする miRNA を C2C12 細胞に導入後、Ago2 抗体で免疫沈降し、共沈する mRNA を同定する手法を取り入れた解析を行なった。miRNA の標的として Tardbp (TAR DNA binding protein) 等複数の候補分子が同定された段階である。

ホリスタチンのヘテロノックアウトマウスでは、筋損傷に伴う、筋繊維化部位が拡張されることも解析された。ホリスタチンによるマイオスタチン阻害で、筋量の増加、筋再生の促進、筋繊維化の抑制、生体内の脂肪蓄積の低下といった様々な効果が期待される事が明らかとなった。

マイオスタチン阻害では、筋損傷時の筋繊維化が抑制される。骨格筋内に存在し、筋内脂肪化や繊維化に関与する細胞の同定は、筋疾患の病態生理の解明の観点から極めて重要である。マウス及びヒトの骨格筋内に存在する間葉系前駆細胞 (PDGFR α 陽

性細胞) を同定し、脂肪細胞を供給する細胞である事が明確に示された。同定細胞が、繊維化を惹起するサイトカインである TGF- β 刺激で繊維化関連分子の発現上昇を示す事、骨格筋内で繊維化部位に局在する事、移植実験において実際に繊維化を起こす事が示された。

E. 結論

マイオスタチン阻害療法を医学応用するための基盤的及び応用研究を推進させた。マイオスタチン阻害による筋量増加機構が分子レベルで明らかになってきたことは、臨床応用を考える際に極めて重要な情報を与えるものと考えている。欧米では、可溶性 ACVR2B の治験が進行しており、様々なマイオスタチン阻害抗体医薬品が開発されているが、それらと比較しても遜色のない独創的な研究が展開されたと考察している。

さらに、本研究の成果の一環として、筋疾患や加齢で見られる、骨格筋内脂肪変性、繊維化に寄与する間葉系前駆細胞が同定された。筋ジストロフィーの仮性肥大で増加する脂肪細胞を供給する細胞である可能性が高く、新たな細胞標的、治療標的分子を同定したことであり、今後の筋疾患の新たな治療戦略の創出と応用展開を目指していきたい。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

H. Ageta, S. Ikegami, M. Miura, M. Masuda, R. Migishima, T. Hino, N. Takashima, A. Murayama, H. Sugino, M. Setou, S. Kida, M. Yokoyama, Y. Hasegawa, K. Tsuchida, T. Aosaki, K. Inokuchi. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learning and Memory* 17(4), 176-185 (2010)

S.-J. Lee, Y.-S. Lee, T. A. Zimmers, A. Soleimani, M. M. Matzuk, K. Tsuchida, R. D. Cohn, E. R. Barton. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol. Endocrinol.* 24(10), 1998-2008 (2010)

M. Ishikawa, N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K.

Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda, A. Tabuchi. Involvement of the SRF coactivator megakaryoblastic leukemia in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 285(43), 32734-32743 (2010)

上住聡芳、中谷直史、常陸圭介、土田邦博 老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用 基礎老化学会誌 34(4), 5-11 (2010)

H. Ageta, K. Tsuchida. Multifunctional roles of activins in the brain. *Vitamins and Hormones Vol. 85: Activins and Inhibins* 85, 185-206 (2011)

M. Nakatani, M. Kokubo, Y. Ohsawa, Y. Sunada, K. Tsuchida. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.* 300 (3), E543-553 (2011)

2. 学会発表

土田邦博 骨格筋と脂肪細胞の相互作用解析と筋疾患治療への応用 (独) 東京都健康長寿医療センター研究所、理研播磨研究所合同公開カンファレンス 東京、4月12日(2010)

K. Tsuchida. Neuromuscular diseases and behavior of progenitor cells. The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research. Taiwan, April 16-19 (2010)

常陸圭介、土田邦博 マイオスタチン欠損骨格筋肥大におけるマイクロ RNA の役割 第2回日本 RNAi 研究会 広島、8月26-28日(2010)

上田洋司、井ノ口馨、土田邦博 新しい躁鬱病モデル動物を用いたプロテオミクス解析 Neuro2010 第33回日本神経科学大会 神戸、9月2-4日(2010)

土田邦博、中谷直史、常陸圭介、上住聡芳、上田洋司、武田伸一、大澤裕、砂田芳秀 骨格筋の増殖分化調節因子の生理作用を基にした筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発 厚労省精神・神経疾患研究 砂田班班会議 東京、12月3-4日(2010)

M. Ishikawa, N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K. Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda, A. Tabuchi. Actin-binding coactivator MKL is involved in activin-induced transcriptional activity and alteration of dendritic morphology in rat cortical neurons. *BMB2010* 第

33回日本分子生物学会年回、第83回日本生化学会大会 合同大会 神戸、12月7-10日(2010)

土田邦博 骨格筋と脂肪細胞の臓器間クロストークによる脂肪細胞の動態解析 第7回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎、2月25-27日(2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

臨床応用のためのマイオスタチン siRNA デリバリーシステムの開発

研究分担者 野地 澄晴

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 教授

研究要旨

筋ジストロフィーなどの慢性筋萎縮疾患の治療に RNA 干渉を利用することを最終目的として、筋ジストロフィーモデル雄性マウスの筋肉に対して骨格筋形成抑制遺伝子マイオスタチンの siRNA とアテロコラーゲンの複合体を局所投与し、筋肉における RNA 干渉効果を検討した。また全身投与することによって前頸骨筋での RNA 干渉効果を検討し、機能的解析を行った。臨床応用考慮に入れ、siRNA とアテロコラーゲン複合体のコスト面での問題点を改善するため、アテロコラーゲンの代替となり得る安価で安全性のある特殊加工合成コラーゲンを使用した干渉効果の検討を行い、局所投与に使用できることがわかった。

A. 研究目的

当研究グループは筋ジストロフィーの現実的な治療法と臨床応用のための研究を行ってきた。治療法として選択したのは、RNA 干渉の利用である。21 から 25 塩基対の短い short interference RNA (siRNA) を生体内に導入すると RNA 干渉により標的遺伝子の発現が抑制することができる。RNA 干渉法を非侵襲的かつ安全に臨床応用に用いるために、アテロコラーゲン(ATCOL)を用いた siRNA の導入機構解析と特殊処理合成コラーゲン(SYCOL)での導入試薬の検討をおこなった。

最初に骨格筋形成抑制遺伝子であるマイオスタチン遺伝子(*Mst*)に着目し、その発現を RNA 干渉により抑制した。マイオスタチンの遺伝子発現を抑制し、筋肉の形成抑制を抑えることで慢性筋萎縮疾患である筋ジストロフィーの治療を想定し、siRNA (*Mst*-siRNA)をマウスの生体内に投与して下記3点の解析、検討を前年度に引き続きおこなった。

1) 筋ジストロフィーモデル雄性マウス(caveorin-3Tgマウス)咬筋に *Mst*-siRNA とアテロコラーゲンの複合体を局所投与し、咬筋での RNAi 効果を検討した。

2) 筋ジストロフィーモデル雄性マウス(caveorin-3Tgマウス)に *Mst*-siRNA 全身投与することによって前頸骨筋での RNAi 効果を検討、機能的解析した。

3) 臨床応用でのコスト面の問題点を改善する事を目的に、アテロコラーゲンの代替となり得る安価で安全性のある特殊加工合成コラーゲン(SYCOL)を *Mst*-siRNA の導入試薬として使用して RNAi 効果を検討した。

B. 研究方法

1) 24-28 週齢の筋ジストロフィーモデル雄性マウス(caveorin-3Tgマウス)および野生型(C57BL/6, C3H)雄性マウスの右側咬筋に *Mst*-siRNA とアテロコラーゲン複合体の局所投与を行い、2 週間後に咬筋を摘出し、その筋重量を測定するとともに、形態学的ならびに組織学的解析を実施した。なお、同一個体の左側咬筋を対照側としてスクランブル-siRNA (scr-siRNA)とアテロコラーゲン複合体を投与し、*Mst*-siRNA 導入を行った実験側との比較を行った。

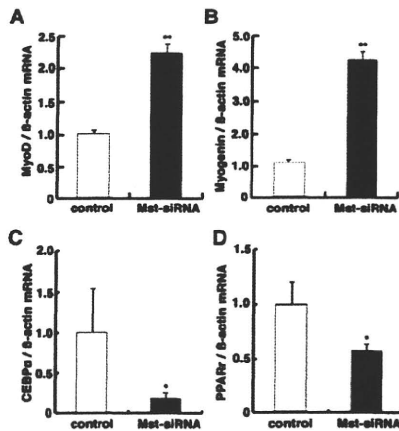
2) 24-28 週齢の筋ジストロフィーモデルマウス(caveorin-3Tgマウス)および野生型雄性マウス(C3H)の眼窩下静脈叢に *Mst*-siRNA と ATCOL 複合体の全身投与を 2 週間の間に計 4 回を行い、最終投与から 1 週間の待機期間を経た後、前脛骨筋と咬筋を摘出し、前脛骨筋は張力試験を、咬筋は局所投与の際と同様に形態学的ならびに組織学的解析、機能的解析を行った。全身投与における対照群は、同種マウスで体重がほぼ同じものを使用し、眼窩下静脈叢に scr-siRNA と ATCOL 複合体を全身投与して比較検討した。

3) 24-28 週齢の野生型(C57BL/6)雄性マウスの右側咬筋に *Mst*-siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与し、対照群として左側咬筋に scr-siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与し、形態学的・組織学的解析を行った。

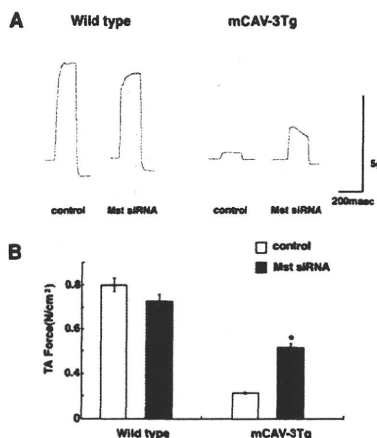
倫理面への配慮:動物に対する動物愛護上の配慮については、徳島大学動物実験施設の動物実験に関する規定に従った。また、遺伝子組換え実験に関しては、徳島大学の規定に従って実験を行った。

C. 研究結果

1) caveorin-3Tg マウスに対する咬筋局所投与において全てのマウスで、*Mst*-siRNA と ATCOL の複合体投与の右側咬筋は、対照側と比較して筋重量、筋線維断面積ともに有意に増加した。また、組織学的解析により、咬筋内のマイオスタチン発現抑制が認められた。次に、筋組織への分化マーカーである myogenin と MyoD、脂肪組織への分化マーカーである PPAR γ と CEBP α の発現について各遺伝子特異的プライマー対を用いてリアルタイム定量 PCR により解析した結果、myogenin と MyoD の発現は、対照側と比較して投与側で有意に大きいのに対し、PPAR γ と CEBP α の発現は有意に小さかった(下図)。



2) caveorin-3Tg マウスに対する全身投与では投与前後での体重、握力には有意差がなかったが(Fig. 2)、caveorin-3Tg マウスにおいて張力検査による筋機能解析の結果、*Mst*-siRNA とアテロコラーゲン複合体投与群において対照群の約 3 倍の張力増加が見られた。また、その回復した張力は野生型(C3H)マウスの約 55%に達することが認められた(下図)。



3) SYCOL を用いて *Mst*-siRNA をマウス咬筋に局所投与し、その影響を調べた結果、ATCOL と同様に一度投与しただけで、2 週間後には肉眼的に筋肉の増大を確認できた。*Mst*-siRNA と SYCOL の複合体投与の右側咬筋は、対照側と比較して筋重量、筋線維断面積ともに有意に増加し、mRNA の発現も有意に減少していた。また、SYCOL と ATCOL の mRNA サイレncing 能は同等の結果となった。

in vivo での siRNA/SYCOL 全身投与実験について全身での siRNA/SYCOL および ATCOL の RNAi 効力を検証するためにヌードマウスに全身転移させたルシフェラーゼ(Luc)発現メラノーマ細胞を *Luc*-siRNA でノックダウンし、バイオイメージング IVIS で撮影した結果、ATCOL は腹部のルシフェラーゼの発現も抑制したが、SYCOL は投与した付近の発現のみを抑制していた。

D. 考察

アテロコラーゲン、特殊加工合成コラーゲンを用いた咬筋への局所投与はともにマイオスタチン抑制による咬筋の肥大を認めたが、全身投与では局所投与ほどの有意差はみられなかったにも関わらず、機能的な回復を認める結果となった。その要因としては筋繊維タイプが関わっている可能性がある。筋繊維タイプについては今後の課題である。siRNA とアテロコラーゲン複合体を投与した部位で、siRNA が生体内で破壊されることなく留まることによって徐々に siRNA が細胞内に取り込まれる事によって持続した RNAi の効力が得られると考えられる。このことによって、siRNA とアテロコラーゲン複合体が咬筋以外の組織に対して優位に効力を発揮していることが示唆される。近年、核酸医薬、特に siRNA のデリバリーシステムの開発が進められているが、血中あるいは組織中において siRNA の安定化は困難だと考えられてきた。今回の実験でコラーゲンを基材としたトランスフェクション試薬の咬筋および大腿二頭筋への局所投与、全身投与は 1 週間を超える長期間での RNAi の効力を発揮することが認められた。また、筋ジストロフィーモデルマウスへの *Mst*-siRNA の局所投与においては筋肉萎縮の回復が認められた。*Mst*-siRNA/ATCOL の筋肉への局所投与では、形態的、機能的な回復を認めたものの、全身投与では局所投与でみられるような著しい形態的变化は認めなかった。また、新規 siRNA トランスフェクション試薬である SYCOL は in vitro, in vivo 局所投与で ATCOL と同等の効力を確認することができた。しかしなが

ら SYCOL の in vivo 全身投与に関してはこれからの課題である。今後、臨床応用していく上で、全身投与における導入効率や、フェノタイプとして現れるまでの期間の再検討を行うと同時に、最終的な致死要因となりうる骨格筋以外の心筋、呼吸筋への影響の検討が必要であると思われる。創薬開発に際して、安全面の確保はもちろんのこと、治療にかかるコスト面からも担体の再検討、新規開発を行い、より有効で安全安心な筋ジストロフィー症の治療法確立を目指す必要がある。

E. 結論

ATCOL および SYCOL と Mst-siRNA 複合体の局所導入は、筋肉内に発現するマイオスタチン遺伝子の特異的に抑制し、咬筋形成に影響を及ぼすことが示された。また、ATCOL と Mst-siRNA 複合体の全身投与において大腿二頭筋の肥大を示したことから、骨格筋形成量の制御法として有効であることがわかった。今後このような技術が直接成体に対して応用できる新たな治療法として進歩し、非侵襲的かつ安全に行うことが可能となれば、骨格筋異常を伴う疾患を持つ患者だけでなく様々な疾患に対する RNAi 創薬の可能性がますます広がるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Adachi T, Kawakami E, Ishimaru N, Ochiya T, Hayashi Y, Ohuchi H, Tanihara M, Tanaka E, Noji S. Delivery of small interfering RNA with a synthetic collagen poly(Pro-Hyp-Gly) for gene silencing in vitro and in vivo. *Dev Growth Differ.* 2010 Oct;52(8):693-699.

Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y,

Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 2011; 53(1):48-54.

野地澄晴、足立太郎、川上恵実、田中栄二、RNA 干渉法による治療を実現するための研究中・四国矯正歯科学会雑誌、22 巻、3-8 (2010)

2. 学会発表

1. Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Special processed collagen-mediated application of myostatin-siRNA for muscular atrophy diseases. 88th IADR, July 14-17, 2010, Barcelona, Spain.

2. Kinouchi N, Kawakami E, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin siRNA improves muscular dystrophy. 88th IADR, July 14-17, 2010, Barcelona, Spain.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許出願:

発明の名称: 放射線照射コラーゲン様ペプチドを用いた核酸導入法

発明人: 野地澄晴、足立太郎

出願番号: 2010-172711

出願日: 2010年7月30日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

マイオスタチン作用に拮抗する Wnt ファミリーによる筋疾患の治療

研究分担者 濃野 勉 川崎医科大学 分子生物学1 教授

研究要旨

骨格筋の成長を抑制するマイオスタチン (myostatin) の作用機序をもとに、Wnt4 と furin に注目し骨格筋形成における肥大効果を解析し、筋ジストロフィー治療薬開発の候補分子となりうるか検討した。

Wnt4 は、マイオスタチン欠損マウスでその発現が上昇し、ニワトリ胚で強制発現すると骨格筋が肥大化する。組換えアデノウイルスを作成し、マウス前脛骨筋で強制発現させたところ、筋組織中に脂肪組織が観察された。筋芽細胞 C2C12 を用いて Wnt4 のシグナル経路を解析したところ、Wnt4 は β カテニン/TCF 経路と拮抗することにより筋分化を促進していることがわかった。さらに抗がん剤として開発された β カテニン/TCF 複合体形成阻害薬 FH535 に筋分化促進作用があることを見つけ、新たな筋ジストロフィー治療薬になりうる可能性を見いだした。

Furin は、マイオスタチン前駆体を切断し活性化する酵素である。furin 遺伝子のコンディショナル変異マウスを作成し Myf5 系譜の筋細胞で破壊したところ、雄マウスで対照群と比べ3割ほど成長速度が低下するものの、大腿四頭筋など近位筋が相対的に肥大化することがわかった。局所的な筋肥大効果が現われたことから、furin 遺伝子が破壊されている Myf5 系譜の筋細胞の分布を解析したところ、ヒラメ筋などの特定の骨格筋および筋線維で furin 遺伝子が破壊されていることがわかった。Furin については、近位筋を肥大化させる効果があるものの、からだの成長が抑制されてしまうため、Furin 阻害を目的とした筋ジストロフィー治療薬の開発は難しいことが判明した。

A. 研究目的

マイオスタチンは、TGF- β ファミリーに属するサイトカインで、骨格筋形成を負に制御し、その機能が抑制されると骨格筋が肥大化する。この生理作用をもとに、マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療薬の開発が進められている。我々はマイオスタチンの上流と下流で作用してマイオスタチン活性に拮抗的な影響をおよぼすと考えられる Wnt4 と furin に注目し、これらの分子の骨格筋形成におよぼす影響を解析するとともに、筋ジストロフィー治療薬の創薬標的となりえるか検討した。

Wnt4 は、マイオスタチン遺伝子欠損マウスでその発現が上昇することが知られている。我々は、ニワトリ胚において Wnt4 を過剰発現すると、筋分化が促進され骨格筋が肥大化することを明らかにした。マウス成体の骨格筋修復再生においても同様の効果があるか検討する必要がある。また Wnt

ファミリーのシグナル伝達は、代表的な β カテニン経路以外にも複数の経路があることが知られているが、筋芽細胞の分化における経路はよくわかっていない。シグナル経路が明らかになれば、特異的な遮断薬を開発することが可能になる。

furin は、ズブチリシンによく似たセリンプロテアーゼで、マイオスタチン前駆体を切断し活性型タンパク質に変換する酵素と予想されているが実態は不明のままである。Furin 遺伝子をノックアウトしたマウスは、胎生致死となるため骨格筋修復再生における機能についても不明である。骨格筋特異的に furin 遺伝子を破壊したマウスを作成し、骨格筋形成に及ぼす影響を解析し、治療薬開発の標的分子となりうるか検討した。

B. 研究方法

1. 筋芽細胞における Wnt4 の解析

昨年までの研究でニワトリ胚および筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を使ったアッセイで Wnt4 にマイオスタチンと拮抗する作用があり筋分化を促進する活性があること、 β カテニン/TCF 経路に対し拮抗的に働くことを明らかにした。この結果にもとづき、本年度は、 β カテニン経路を遮断する低分子阻害薬を用いて C2C12 細胞の筋分化促進作用を検討した。またマウス骨格筋における Wnt4 過剰発現の効果を検証するために、Wnt4 を発現する組換えアデノウイルスを作成した。8 週令雄マウスの前脛骨筋に注射し、2 週後と 4 週後の筋組織標本を作成しヘマトキシリン・エオジン染色とオイルレッド O 染色により、過剰発現の効果を観察した。

2. 骨格筋における furin の解析

Furin 遺伝子のコンディショナル変異マウスと Myf5 系譜の筋衛星細胞において Cre 酵素を発現し furin 遺伝子が破壊されたマウスを作出した。さらに Cre 酵素特異的に β ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する Rosa26Cre reporter マウスと交配し、Furin 遺伝子が破壊されている Myf5 系譜の骨格筋と筋線維について解析した。

C. 研究結果

1. Wnt4 の解析

Wnt ファミリーのシグナル伝達は代表的な β カテニン/TCF 経路以外に複数の経路がある。C2C12 細胞を使って Wnt4 の細胞内シグナルについて解析したところ、Wnt4 は β カテニン TCF 経路を介さず、逆に Wnt3a による β カテニン TCF 経路の促進作用を抑制することを明らかにしている。またマイクロアレイにより内在の遺伝子発現プロファイルを解析すると、筋分化に伴って β カテニン/TCF の直接的な標的遺伝子である *cyclinD1* と *c-myc* の転写が抑制されることから、Wnt4 による筋分化の誘導は、 β カテニン TCF 経路を阻害することにより筋芽細胞の分化を制御していることが裏付けられた。

抗がん剤として開発された β カテニン/TCF 複合体形成阻害薬 FH535 (1 μ M) を培養液に加えたところ、筋分化促進効果があることを見つけた。FH535

は、高濃度 (15 μ M) 以上になると細胞障害性が現われた。筋分化の過程で、 β カテニンは細胞質から細胞膜や核内に移行し、筋芽細胞の増殖と分化を調節するスイッチ分子として機能していることがわかった (論文準備中)。

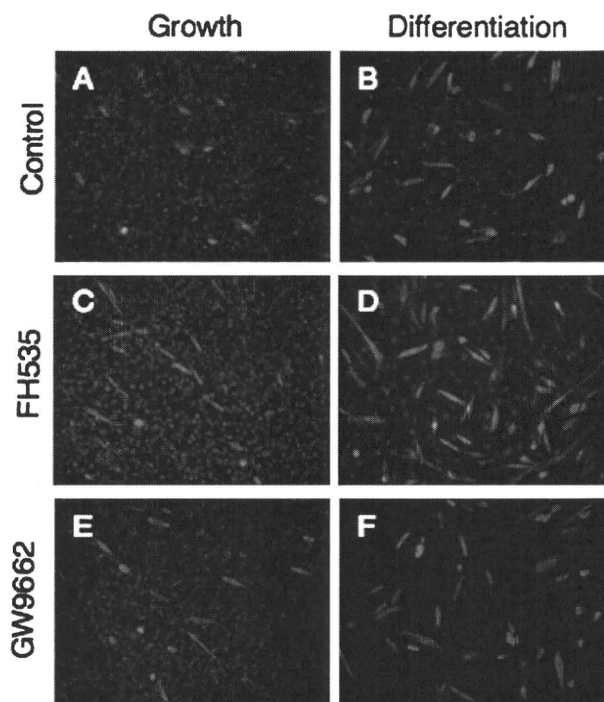


図1 β カテニン TCF 阻害低分子化合物 FH535 による筋分化促進効果。GW9662 は、FH535 と極めてよく似た化学構造をしているが、 β カテニン TCF 経路は阻害しない。GW9662 には、筋分化促進効果はなかった。

Wnt4 の cDNA をアデノウイルスベクターに組み込んだ Ad-Wnt4 については、C2C12 に感染させると筋分化の促進が見られた。この組換えアデノウイルス (Ad-Wnt4) を用いて、8 週令雄マウスの前脛骨筋に過剰発現したところ、筋組織中に脂肪組織が観察された。

2. 骨格筋における furin の解析

furin 遺伝子のコンディショナル変異マウスを、筋衛星細胞で Cre 酵素を発現する Myf5-Cre マウスと交配すると、雄のマウスで、対照群と比べ体重が 3 割ほど少なく成長速度が低下する。四肢の筋重量を体重あたりの筋重量に換算すると、大腿四頭筋など

の近位筋が肥大化していることがわかった。局所的に効果が出現したことから、Cre 酵素を発現し Furin 遺伝子が破壊されている筋細胞を解析したところ、ヒラメ筋など特定の筋肉および筋線維に限られていた。

D. 考察

Wnt4 および低分子阻害薬 FH535 により、 β カテニン/TCF による遺伝子発現が抑制されると、筋分化を促進することがわかった。組換えアデノウイルスにより Wnt4 の発現については、骨格筋が直接脂肪組織に分化したのか、間質細胞に組換えウイルスが感染したことによる間接的な影響をみているのかさらに検討が必要である。

Furin については、筋細胞の領域特異的な furin 遺伝子の破壊による局所的な筋肥大効果については、様々な筋ジストロフィーの病態と関連している可能性が示唆される。

E. 結論

Wnt4 のシグナル経路の解析から、FH535 などの β カテニン TCF 経路を遮断する低分子化合物が筋ジストロフィーの新たな治療薬の候補となりうることがわかった。Furin については、近位筋を肥大化させる効果があるものの、からだの成長が抑制されてしまうため、Furin 阻害を目的とした筋ジストロフィー治療薬の開発は難しいことが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 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（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析
－筋ジストロフィー犬における側頭筋障害の分子メカニズムに関する研究－

研究分担者 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

Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬の側頭筋萎縮は、他の四肢骨格筋と比較し筋萎縮が早期かつ重度に起こることが考えられてきたが、詳細な検討がなされていない。経時的 MR 撮像による側頭筋萎縮の定量的評価により、筋ジストロフィー犬の側頭筋における筋萎縮が他の下腿骨格筋よりも重度に進行する事が示唆された。さらに分子生物学的評価から、筋ジストロフィー犬の側頭筋では Myosin heavy chain isoform の発現パターンに差異があることが分かり、筋萎縮との関連が示唆された。

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）は、臨床症状や病理学的所見が DMD に類似し、全身骨格筋に進行性の筋萎縮が出現する。臨床グレーディング評価から、側頭筋の筋萎縮は他の近位および遠位の四肢骨格筋と比較し、早期かつ重度に起こると考えられている (Shimatsu et al. *Acta Myol.* 24:145-154, 2005)。また、骨格筋によって筋障害の重症度が異なるという知見は、DMD をはじめとして、他の遺伝性筋疾患（肢帯型筋ジストロフィーや顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー）でも認められ、筋線維径 (Karpati et al., *Am J Med Genet.* 25:653-8, 1986)、筋線維型 (Webster et al., *Cell* 52: 503-13, 1988)、および筋収縮タイプ (Edwards et al., *Lancet* 1: 548-52, 1984) の相違等が関与するものと考えられているが、未だ不明な点も多い。

犬の側頭筋や咬筋などの咀嚼筋群では、Myosin heavy chain masticatory isoform (MyHC IIM) が特異的に発現する。またこれらの isoform が発現する側頭筋では最大筋力や等尺性収縮が強いことが知られている (Rowlerson et al., *J. Muscle Res. Cell Motil* 2: 415-38, 1981)。MyHC IIM の責任遺伝子は、犬では第 6 染色体、ヒトでは第 7 染色体上に存在する MYH16 である。MyHC IIM は肉食動物や一部の霊長類の咀嚼筋で発現が認められるものの、ヒトやチンパンジーでは MYH16 のフレームシフト変異によ

り MyHC IIM の発現は認められず (Maccatrozzo et al., *Genomics* 89: 224-36, 2007)、その結果としてヒトやチンパンジーでは咀嚼筋群の volume が縮小したという報告もある (Stedman et al., *Nature* 428: 415-418, 2004)。

本研究では、はじめに MRI を用いて筋ジス犬の骨格筋萎縮の定量評価を行った。さらに筋ジス犬の側頭筋萎縮において Myosin heavy chain isoform の分布変化が関与しているという仮説を立て、myosin heavy chain isoform の発現様式について分子生物学的に検討した。

B. 研究方法

① 側頭筋および下腿筋 volume の定量評価

筋ジス犬における骨格筋萎縮について 3-Tesla MRI を用いた定量的 volume 評価を行った。対象には 2ヶ月齢の正常犬 3頭、筋ジス犬 1頭を用い、7ヶ月齢まで 1ヶ月ごとに下腿・頭部の MRI 撮像を行った。得られた MR 画像よりオープンソースの画像解析ソフトである OsiriX (Version 3.8.1; OsiriX Foundation) を用いて側頭筋、前脛骨筋、および腓腹筋の断面積 (Cross sectional area: CSA) の経時的測定を行った。

② Myosin heavy chain isoform の発現解析

次に Myosin Heavy Chain isoform の量的変化が、筋萎縮を示す筋ジス犬の側頭筋で認められるか検討を行った。本研究には 6-7ヶ月齢の正常犬および筋ジス犬の側頭筋凍結サンプルを用い、Myosin heavy

chainの免疫組織化学, mRNA発現解析, 電気泳動法/銀染色を用いた蛋白発現解析を行った. 免疫組織化学には, Myosin heavy chain fast (Type IIAおよびIIB筋線維で染色陽性), slow (Type Iで染色陽性), developmental isoform (Embryonicおよびneonatal isoformで染色陽性) (Novocastra Laboratories) の抗体を用い, 非染色領域をIIM筋線維と判断した.

C. 研究結果

① 側頭筋および下腿筋volumeの定量評価

正常犬の側頭筋の平均 CSA (cm²) (平均±標準偏差) は, 2ヶ月齢 (2.58±0.26), 3ヶ月齢 (3.06±0.13), 4ヶ月齢 (3.52±0.15), 5ヶ月齢 (4.45±0.52), 6ヶ月齢 (4.80±0.57), 7ヶ月齢 (5.17±0.79) であった. 一方, 筋ジス犬は 2ヶ月齢: 2.44, 3ヶ月齢: 2.60, 4ヶ月齢: 3.07, 5ヶ月齢: 2.99, 6ヶ月齢: 2.87, 7ヶ月齢: 2.81 であり, 4ヶ月齢以降で萎縮する傾向にあり, 7ヶ月齢の筋ジス犬側頭筋の CSA は, 同月齢の正常犬側頭筋の 54.4%となっていた.

次に正常犬の前脛骨筋の平均 CSA (cm²) (平均±標準偏差) は, 2ヶ月齢 (0.65±0.12), 3ヶ月齢 (0.73±0.08), 4ヶ月齢 (0.86±0.05), 5ヶ月齢 (0.93±0.08), 6ヶ月齢 (1.02±0.05), 7ヶ月齢 (1.14±0.06) であった. 一方, 筋ジス犬は 2ヶ月齢: 0.58, 3ヶ月齢: 0.71, 4ヶ月齢: 0.83, 5ヶ月齢: 0.94, 6ヶ月齢: 0.91, 7ヶ月齢: 0.89 であり, 6ヶ月齢以降で萎縮する傾向にあり, 7ヶ月齢の筋ジス犬前脛骨筋の CSA は, 同月齢の正常犬前脛骨筋の 78.2%となっていた.

正常犬の腓腹筋 (腓腹筋外側頭+内側頭) の平均 CSA (cm²) (平均±標準偏差) は, 2ヶ月齢 (1.18±0.19), 3ヶ月齢 (1.64±0.27), 4ヶ月齢 (1.98±0.29), 5ヶ月齢 (2.25±0.33), 6ヶ月齢 (2.53±0.33), 7ヶ月齢 (2.67±0.26) であった. 一方, 筋ジス犬は 2ヶ月齢: 1.07, 3ヶ月齢: 1.44, 4ヶ月齢: 1.82, 5ヶ月齢: 2.12, 6ヶ月齢: 1.97, 7ヶ月齢: 1.90 であり, 6ヶ月齢以降で萎縮する傾向にあり, 7ヶ月齢の筋ジス犬腓腹筋の CSA は, 同月齢の正常犬腓腹筋の 71.1%となっていた.

② Myosin heavy chain isoform の発現解析

6-7ヶ月齢の正常犬と比較し, 同月齢の筋ジス犬における Myosin heavy chain isoform の mRNA 発現は, Myosin heavy chain IIB, IIX, Embryonic および

Neonatal isoform で有意に上昇していたが, Myosin heavy chain I, IIA, および IIM では有意な変化は認められなかった.

また, Myosin heavy chain isoform の免疫組織化学, および蛋白電気泳動から, 筋ジス犬では Myosin heavy chain isoform のうち, Myosin heavy chain IIA および Embryonic isoform の発現上昇が認められた. 特に, Embryonic isoform の発現している筋線維では, Myosin heavy chain IIA が共発現している傾向にあることが示唆された.

D. 考察

側頭筋volumeのMRIを用いた経時的定量的評価から, 筋ジス犬側頭筋は他の骨格筋と比較し, 萎縮が早期かつ重度に起こることが示唆された. さらに, mRNA発現解析および蛋白発現解析から, 筋再生時に発現を認める Myosin heavy chain embryonic, および neonatal isoform だけでなく, 正常犬では認められない Myosin heavy chain IIA の発現が認められた. この理由として, 他の Myosin heavy chain isoform と比較し, 側頭筋筋線維の 50-100% を占め, 筋張力・ATPase 活性が高く, 筋障害を受けやすいと考えられる Type IIM に代わり, 筋張力の弱い Type IIA が代償的に増加したため, もしくは Type IIM は筋再生・筋成熟過程において, IIA を介する可能性が考えられた. この問題を解決するためには, 経時的な Myosin heavy chain isoform の発現解析が必要であると思われる.

E. 結論

筋ジス犬側頭筋では下腿骨格筋と比較し, 筋萎縮が早期かつ重度に起こることが分かった. この原因として筋線維における Myosin heavy chain isoform の発現分布の変化が関連している可能性が示唆された.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yada E, Motohashi N, Harano C, Segawa M, Bo W, Wada MR, Yoshida M, Nakagawa R, Masuda S,

- Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice (投稿中)
2. Shin J.H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther.* (in press)
 3. Nakamura A, Takeda S : Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol.* (in press)
 4. Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H: SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapses. *J Neurochem.* 116:1122-1137, 2011
 5. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 13:170-182, 2011
 6. Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, Partridge T : The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 19:9-15, 2011
 7. Yokota T, Hoffman E, Takeda S : Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol.* 709:299-312, 2011
 8. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res.* 316: 3087-3092, 2010
 9. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2005, 2010
 10. Kanagawa M, Omori Y , Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Post-translational Maturation of Dystroglycan Is Necessary for Pikachurin Binding and Ribbon Synaptic Localization. *J Biol Chem.* 285:31208-31216, 2010
 11. Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M : Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 294: 95-101, 2010
 12. Sugita H, Takeda S: Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:748-56, 2010
 13. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One.*;5(8). pii: e12239, 2010
 14. Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K: Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuroreport.* 21:447-451, 2010
 15. Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanesaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K: Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res.* 316: 2932-2944, 2010
 16. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H : Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol.* 176: 2414-2424, 2010
- 【欧文著書】
1. Okada T., Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, *Gene Therapy and Regulation* (ed. by Roger Bertolotti), World Scientific, NJ. 2010, 5(1), pp113-123.
 2. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal. *Mechanosensing Biology* (ed.Masaki Noda), Springer Japan, pp1-219, 2010
- <和文>
- 【和文著書】
1. 武田伸一：筋ジストロフィーの新しい治療戦略. *神経治療学*, Vol.27, No.6, PP788-790, 2010
 2. 鈴木友子, 武田伸一：筋ジストロフィーモデルマウス. 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック, 株式会社羊土社, PP378-393, 2011
- 【和文総説】
1. 小林正典, 武田伸一：筋ジストロフィーのエクソン・スキップによる分子治療. *医学のあゆみ* (in press)
 2. 鈴木友子, 武田伸一：筋ジストロフィー. *総合リハビリテーション*, Vol.39, No.1, pp25-29, 2011
 3. 青木吉嗣, 武田伸一：デュシェンヌ型筋ジストロフィーのエクソン・スキッピング療法. *神経難病の最新治療法 [第1部]*, 難病と在宅ケア, Vol.16, No.6, PP6-9, 2010
 4. 清水裕子, 武田伸一：筋ジストロフィーの分子治療. 一遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望一, *遺伝子診療学 (第2版)* 68巻 増刊号 8, PP650-653, 2010
- II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Treatment in Muscular Dystrophy: Exon Skipping. 10th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Auckland, New Zealand, 2.26, 2010
2. Takeda S: Advances in Molecular Therapy Research for Muscular Dystrophy. Lecture for Neurologists in Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.8, 2011
3. Takeda S: Antisense oligos therapy for muscular dystrophy. Lecture at the Symposium of the Rehabilitation, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2.7, 2011
1. Takeda S: Molecular and cellular control of muscle satellite cells, 2010 FASEB Summer Research Conference Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Arizona, USA, 7.19, 2010

【国際学会】

1. Uezumi A, Fukada S, Yamada H, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle, Keystone Symposia, Santa Fe, USA, 2.2, 2011
2. Imamura M, Matsumoto H, Inaba Y, Mannen H, Takeda S: Generation of transgenic mouse expressing mutated wwp1 gene responsible for chicken muscular dystrophy. The American Society For Cell Biology, 50th Annual meeting, Philadelphia, USA, 12.14, 2010
3. Ono Y, Luisa Boldrin, Paul Knopp, Jennifer E. Morgan, Peter S. Zammit, Yuko Miyagoe-Suzuki, Takeda S: Molecular aspects of functional heterogeneity in muscle satellite cells. BIT Life Sciences' 3rd Annual World Congress of regenerative medicine & Stem Cells. Shanghai, China, 12.5, 2010
4. Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori M, Ooya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY—DMD/BMD patient registry in Japan. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
5. Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
6. Kanagawa M, Omori Y, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T: Disruption of dystroglycan-pikachurin interaction underlies the molecular pathogenesis of eye abnormalities in dystroglycanopathy. 15th International Congress of World Muscle Society

(WMS), Kumamoto, 10.13, 2010

7. Wang B, Segawa M, Hrano C, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells, ISSCR 8th Annual Meeting, CA, USA, 6.19, 2010
8. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K: rAAV8-mediated protein-anchoring therapy for targeting collagen Q-tailed acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
9. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Induction of oral immunotolerance to rAAV9-microdystrophin in canine X-linked muscular dystrophy. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
10. Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S: Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
11. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
12. Yokota T, Saito T, Urasawa N, Nagata T, Nakamura A, Kole R, Sazani P, Partridge T, Takeda S, Hoffman E: Multiple exon-skipping using cell-penetrating morpholinos for dystrophic dogs. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
13. Hoffman E, Yokota T, Lu QL, Partridge T, Takeda S: Systemic anti-sense in DMD: Progress, and hurdles facing clinical implementation of exon-skipping. The Ottawa conference on new directions in biology & disease of skeletal muscle, Ottawa, Canada, 5.6, 2010

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 武田伸一, 伊藤尚基, 鈴木友子: nNOSは筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである。第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010
2. Takeda S: Molecular Characterization of Stem Cells in Skeletal Muscle. 8th RCGM International Symposium of Academic Frontier, Saitama, 11.3, 2010
3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療. 厚生労働科学研究費 成果

- 発表シンポジウム, 埼玉, 10.23, 2010
4. 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する治療は、どこまで近づいているのか. 世界筋学会熊本開催記念・筋ジストロフィー治療市民公開講座, 熊本, 10.11, 2010
 5. 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する新しい治療戦略. 第 121 回信州小児臨床談話会, 松本, 10.2, 2010
 6. 武田伸一: The significance of exons skipping therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Japan-Canada Joint Mini-Symposium; "Translational Neurosciences; current topics and future perspectives", Neuro 2010 第 33 回日本神経科学大会, 第 53 回日本神経化学学会大会, 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会, 神戸, 9.2, 2010
 7. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療の展開. 愛媛大学プロテオ医学研究センター学術講演会, 松山, 8.30, 2010
 8. 武田伸一: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センターと筋ジストロフィーの治療法開発, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーの臨床試験実施体制構築に関する研究班」(主任研究者: 川井充) 平成 22 年度 ワークショップ, 東京, 8.7, 2010
 9. 武田伸一: 筋ジストロフィー症の新しい治療戦略. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.15, 2010
 10. 武田伸一: Advances of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. 第 16 回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.1, 2010
 11. 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する分子治療学の進歩. 第 52 回日本小児神経学会総会, 福岡, 5.21, 2010
 12. 武田伸一: 筋萎縮と筋肥大の分子機構を巡って Molecular mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy. 第 3 回上肢の神経機能回復セミナー, 秋田, 5.14, 2010
- 【一般学会】
1. 伊藤尊仁, 米田智廣, 清水菜津子, 上住聡芳, 土田邦博, 鈴木友子, 武田伸一, 山元弘, 辻川和丈, 深田宗一郎: PDGFR α 陽性間葉系前駆細胞は病態形成・再生促進の 2 つの作用を有する. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 3.2, 2011
 2. 兼先宏典, 高橋永幸, 亀谷修平, 高橋浩, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: POMGnT1 欠損型マウスではアストロサイトの増殖に伴って網膜剥離が生ずる. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.10, 2010
 3. 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 過負荷によって活性化され, タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.8, 2010
 4. 矢島浩, 小野悠介, 鈴木友子, 武田伸一: Six 遺伝子群による筋衛星細胞の増殖・分化制御. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.8, 2010
 5. 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 田形勇輔, 竹鼻健司, 伊藤尚基, 武田伸一, 佐野元昭, 福田恵一, 森本幾夫, 田中廣壽: グルココルチコイドによる転写因子 KLF15 の骨格筋特異的発現活性化の意義. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010
 6. 小野悠介, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 筋衛星細胞集団から自己複製細胞を予期的に同定分離する方法. 第 65 回日本体力医学会大会, 千葉, 9.17, 2010
 7. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は過負荷によって活性化され, タンパク質合成の制御を介して筋肥大を促進する. 第 65 回日本体力医学会大会, 千葉, 9.16, 2010
 8. 正水 芳人, 岡田 尚巳, 川寄 圭祐, 石橋 英俊, 武田伸一, 湯浅 茂樹, 長谷川 功, 中原 潔: 霊長類中枢神経系への遺伝子導入: アデノ随伴ウイルスベクターによる神経細胞への順行性および逆行性感染. Neuro 2010, 神戸, 9.2, 2010
 9. 王博, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells 第 31 回日本炎症・再生医学会, 新宿, 8.5, 2010
 10. 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素は過負荷によって活性化され, タンパク質合成・分解の制御を介して筋肥大を促進する. 第 31 回日本炎症・再生医学会, 新宿, 8.5, 2010
 11. Wang B, Segawa M, Hrano C, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells: Poster, The 8th Stem cell research symposium, Awaji, 5.14, 2010

【その他】

1. 武田伸一, 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 中村昭則, 永田哲也: モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010
2. 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔遺伝子導入と機能解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010
3. 裏出良博, 有竹浩介, 鎌内慎也, 永田奈々恵,

- 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発～プロスタグランジン(PG)D2 情報伝達制御による筋ジストロフィーの2次炎症軽減と尿中 PGD2 代謝物を対象とした病態進行マーカーの開発～. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.14, 2010
4. 武田伸一, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田直子, 岡田尚巳, 永田哲也, 高橋明男: 筋ジストロフィー犬新生仔の蘇生前後の分子病態に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.14, 2010
 5. Takeda S, Wang B, Ito N, Ono Y, Kawaguchi N, Kanesaki H, Suzuki Y: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from muscle-derived fibroblasts at different ages of mdx mice. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
 6. 上住聰芳, 深田宗一郎, 山本直樹, 山田治基, 西野一三, 武田伸一, 土田邦博: 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の筋ジストロフィー病態への関与. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
 7. 深田宗一郎, 山口賢彦, 小久保博樹, 小川 遼, 上住聰芳, 伊藤尊仁, 辻川和丈, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋幹細胞移植実現を目指した基盤的研究～Hesr1/3 は骨格筋幹細胞の成立・維持に必須である～ 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
 8. 二川 健, 河野尚平, 原田晃子, 松尾侑季, 中屋 豊, 東端 晃, 奥村裕司, 武田伸一: SPORTS ラット(自発性高運動ラット)の筋肉特性と宇宙実験(MyoLab)の途中経過. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成22年度班会議, 東京, 12.13, 2010
 9. 川上潔, 矢嶋浩, 佐藤滋, 池田啓子, 小野悠介, 鈴木友子, 武田伸一: Six 遺伝子群による筋衛星細胞の増殖・分化の制御および筋再生へのかかわり. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成22年度班会議, 東京, 12.4, 2010
 10. 土田邦博, 中谷直史, 常陸圭介, 上住聰芳, 上田洋司, 武田伸一, 大澤裕, 砂田芳秀: 骨格筋の増殖分化調節因子の生理作用を基にした筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成22年度班会議, 東京, 12.3, 2010
 11. 松村喜一郎, 斉藤史明, 萩原宏毅, 金川基, 兼先宏典, 大熊文美, 池田美樹, 真先敏弘, 鈴木友子, 武田伸一, 戸田達史, 清水輝夫: Large に関連する α -dystroglycan のプロセッシングとその効用. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成22年度班会議, 東京, 12.3, 2010
 12. 遠藤玉夫, 萬谷博, 赤阪啓子, 鈴木友子, 武田伸一: α -ジストログリカノパチーの病態解明に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成22年度班会議, 東京, 12.3, 2010
 13. 青木正志, 高橋俊明, 鈴木直輝, 堅山真規, 割田仁, 八木沼智香子, 早坂美保, 佐藤仁美, 菅原瞳, 伊藤真理子, 阿部恵美, 吉岡勝, 今野秀彦, 小野寺宏, 武田伸一, 林由起子, 西野一三, 糸山泰人: ジスフェルリノパチー病態の解明およびその治療に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成22年度班会議, 東京, 12.3, 2010
 14. 武田伸一: DMD筋ジストロフィーの最新治療. 第7回筋ジストロフィーのピアカウンセラー養成講座—デュシェンヌ型を中心として—, 東京, 10.31, 2010
 15. 喜納裕美, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: AAVベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児遺伝子導入と機能解析. 第5回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010
 16. 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 第5回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010
 17. 王 博, 伊藤尚基, 兼先宏典, 川口奈奈子, 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデルマウスからのiPS細胞の誘導. 第5回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010
 18. 武田伸一: 近未来に迫った筋ジストロフィー治療, 第30回全国筋ジストロフィー東京浅草大会 ～平成22年度患者と家族の研修会～, 東京, 10.8, 2010
 19. 武田伸一: 筋ジストロフィー研究の最前線. 第6回国立精神・神経医療研究センター神経内科短期臨床研修セミナー, 東京, 7.14, 2010
 20. 武田伸一: 筋疾患に対するマイオスタチン阻

害療法の臨床応用基盤の確立.リサーチミーティング, 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業 (主任研究者: 砂田芳秀), 平成 22 年度リサーチミーティング, 岡山, 6.4, 2010

21. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究. 社団法人日本筋ジストロフィー協会 第 47 回全国大会, 新宿, 5.16, 2010
22. 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. 鍋島陽一教授退職記念シンポジウム. 京都, 5.9, 2010
23. 武田伸一: TMC (トランスレーショナル・メディカルセンター) について. 平成 22 年度国立精神・神経医療研究センター病院 新採用者オリエンテーション, 東京, 4.1, 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 (参考資料一覧表)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi S, Ohsawa Y, Takahashi T, Suzuki N, Okada T, Rikimaru M, Murakami T, Aoki M, Sunada Y	Rapid Screening for Japanese Dysferlinopathy by Fluorescent Primer Extension.	Int.Med.	49		2010
砂田芳秀	筋ジストロフィーの分子病態	神経治療学	Vol.27 No.6	781-784	2010
Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K.	Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis.	Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.	300(3)	E543-553	2011
Adachi T, Kawakami E, Ishimaru N, Ochiya T, Hayashi Y, Ohuchi H, Tanihara M, Tanaka E, Noji S.	Delivery of small interfering RNA with a synthetic collagen poly(Pro-Hyp-Gly) for gene silencing <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Dev Growth Differ.	52(8)	693-699	2010
Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S.	Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice.	Dev Growth Differ.	53(1)	48-54	2011
野地澄晴、足立太郎、川上恵実、田中栄二	RNA干渉法による治療を実現するための研究	中・四国矯正歯科学会雑誌	22巻	3-8	2010
Nakamura A, Takeda S	Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. J Biomed Biotechnol	In press			
Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S	Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient	PLoS One	5巻 8号	e12239	2010
武田 伸一	筋ジストロフィーの新しい治療戦略	神経治療学	Vol.27 No.6	787-790	2010