

201027064B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 23(2011) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告

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 砂田芳秀	1
--	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
-----------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	31
---------------------------	----

I. 総合研究報告

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
研究代表者 砂田芳秀 川崎医科大学 神経内科学 教授

研究要旨

マイオスタチンは、骨格筋量を負に、体脂肪量を正に制御している骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子である。本研究ではマイオスタチン活性の分子機構を探るとともに、その活性阻害によって骨格筋萎縮と脂肪変性を特徴とする筋ジストロフィーに対する画期的な治療法の開発を目標とした。マイオスタチン活性阻害戦略として、①可溶性コラーゲンナノキャリアーを用いたマイオスタチン RNA 干渉、②マイオスタチンの生理的活性阻害蛋白質プロドメインに由来する阻害ペプチド、③マイオスタチンの細胞膜受容体キナーゼに対する低分子阻害剤、④マイオスタチン阻害内分泌ホルモンであるホリスタチン誘導体、⑤マイオスタチン修飾分子 furin 及び Wnt シグナル遮断、の 5 つのアプローチで研究を進めた。① RNA 干渉法は siRNA が容易に分解を受けることから *in vivo* の臨床応用には問題が山積している。そこで陽性電荷を有するナノキャリアーとして最近注目されている可溶性コラーゲンとマイオスタチン siRNA との複合体を作成して野生型及び LGMD1C モデルマウス(変異 caveolin-3 Tg)に局所及び全身投与した。それぞれ筋量増加と筋力増強に成功した。更に、この可溶性コラーゲンが極めて高価であることから、臨床応用への突破口として廉価な特殊人工加工コラーゲンの開発にも挑み局所投与の有効性を確認し特許出願した。②マイオスタチンの N 末端 2/3 の構造物であるプロドメインは 262 アミノ酸から構成され、C 末端 1/3 からなる活性型マイオスタチン二量体を強力に阻害している生理的阻害蛋白質である。独自に開発した HEK293 細胞マイオスタチン転写活性アッセイ系を用いて、このプロドメインの阻害中心領域である 29 アミノ酸を同定した。次いでこれに相当する合成アミノ酸(Rp29)を野生型及び LGMD1C モデルマウス骨格筋に局所投与して骨格筋量の 15%の増加を達成した。③抗癌剤として注目されている TGF- β タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤がマイオスタチンを含む複数の TGF- β ファミリーによる筋芽細胞分化抑制作用を強力に阻害することを世界に先駆け証明した。この低分子阻害剤を野生型及び LGMD1C モデルマウスに経口投与したところ筋量増加、筋力増大が達成され投与骨格筋では筋衛星細胞数が増加した。④ホリスタチン誘導体高発現トランスジェニックマウスが著明な筋肥大を呈し同時に高脂肪食による糖代謝異常やメタボリック症候群の強力な抑制効果を有することを示した。更にこのホリスタチン誘導体蛋白質をジストロフィン欠損 *mdx* マウスへ投与すると筋ジストロフィー病変が改善することを明らかとした。また骨格筋脂肪化の前駆細胞として筋衛星細胞とは全く異なる PDGFR α 陽性間葉系細胞を同定することに成功した。⑤マイオスタチン修飾分子 furin を Myf5 陽性細胞で欠損させたマウスでは四肢近位筋の筋肥大が生じることが明らかとなった。また Wnt4a/ β カテニン TCF 経路を標的とする骨格筋分化を促進する新たな低分子薬剤が得られた。以上の多面的な解析によって本邦から発信するマイオスタチン阻害筋ジストロフィー治療の基盤を確立することができた。また廃用性筋萎縮症やメタボリック症候群といった現在の医療費や介護負担を押し上げる二大要因に対してもこのマイオスタチン阻害療法の効果が期待できる。

研究分担者

砂田芳秀 川崎医科大学神経内科学・教授
土田邦博 藤田保健衛生大学
総合医科学研究所・教授
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
濃野 勉 川崎医科大学分子生物学・教授
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

A. 研究目的

骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子として発見されたマイオスタチンはノックアウトマウスや、牛、犬、ヒトのドミナントネガティブ変異体が著明な筋肥大を来すことから、骨格筋量を負に制御する液性因子と考えられている。

マイオスタチンは他の TGF- β ファミリー分子と同様に N 末端 2/3 のプロドメインと C 末端 1/3 の活性

型ペプチドから構成される前駆体蛋白質として合成される。これが furin 蛋白分解酵素によってプロセッシングされ最終的には活性型マイオスタチン二量体となる。この活性型二量体はプロドメインや内分泌ホルモンであるホリスタチンなどの様々な生理的阻害蛋白質と結合し潜在型となり流血中を循環している。骨格筋においては BMP1 などの作用によってこれらの分子と解離して筋細胞膜のタイプ II セリン/スレオニンキナーゼ受容体 (アクチビン受容体 ActRIIB) と結合する。この複合体が更にタイプ I セリン/スレオニンキナーゼ受容体 (アクチビン様キナーゼ ALK4/ALK5) をリン酸化する。こうして形成されたりガンド受容体複合体が細胞内エフェクターである Smad2/3 をリン酸化し、この分子が核内へ移行して最終的に様々な標的遺伝子の転写を制御し骨格筋量を負に制御すると考えられている。

2003年にペンシルバニア大学の Khurana らはマイオスタチン特異的中和抗体の腹腔内投与によってジストロフィン欠損筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスの筋ジストロフィー病変が改善することを報告した。一方、我々は独自に作出した筋萎縮を主症状とする常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー 1 C

(LGMD1C) モデル 変異 caveolin-3 Tg マウスの骨格筋でマイオスタチンシグナルの活性化が認められることを見出した。またその機構として caveolin-3 欠損によって、これと結合するマイオスタチンのタイプ I セリン/スレオニンキナーゼ受容体が活性化する機構を証明した。更にこの LGMD1C モデルマウスの筋萎縮は、プロドメイン高発現マウスとの交配やデコイ型タイプ II 受容体 (ActRIIB-Fc) の腹腔内投与によって劇的な改善が得られた。これらの報告を契機に、マイオスタチン阻害は筋ジストロフィーに対する有効な治療戦略として脚光を浴び、現在世界的に阻害薬の開発競争が行われている。マイオスタチンのヒト化特異阻害抗体 MY0-029 (米国 Wyeth 社) については、Becker 型筋、顔面肩甲上腕型及び肢帯型筋ジストロフィー患者を対象とした欧米での第二相臨床研究が終了し、筋線維肥大は達成するものの筋力上昇については部分的であると報告されている。

一方、米国 Acceleron 社が開発したデコイ型タイプ II 受容体 (ActRIIB-Fc) ACE-031 については、筋ジストロフィー及び癌悪疫質に対する治験が FDA で承認され 2010 年に入り、米国で治験が開始された。

しかし、これら抗体やデコイ受容体といった高分子医薬を用いたマイオスタチン阻害は、阻害力価が必ずしも高くないこと、反復投与による効果減弱や抗原性惹起など随伴する問題点が想定されている。そこで我々はこれらの問題を回避した低分子医薬によるマイオスタチン阻害として、① 新規デリバリーシステムを用いたマイオスタチン RNA 干渉、② マイオスタチンの生理的活性阻害蛋白質であるプロドメイン由来阻害ペプチド、③ マイオスタチンの膜受容体キナーゼに対する低分子阻害剤 (TBR1 kinase 阻害剤)、の 3 つのアプローチで基盤研究を推進した。

一方、これまでにマイオスタチンノックアウトマウスで著明に体脂肪が減少していることが知られていたが、最近マイオスタチン阻害によって糖代謝や高脂血症が著明に改善することが報告されている。そこで我々はマイオスタチン阻害戦略のメタボリック症候群に対する適応拡大の可能性を探るため、④ マイオスタチン阻害内分泌ホルモンであるホリスタチン誘導体のトランスジェニックマウスを用いた代謝解析を行った。更に筋ジストロフィーの特徴的な変化である骨格筋脂肪変性について、その前駆細胞の同定に取り組んだ。

また、新しい観点からのマイオスタチン阻害療法の候補標的分子としてマイオスタチン前駆体蛋白質のプロセッシングを司る furin 蛋白分解酵素と、マイオスタチン拮抗分子である Wnt に着目した。これらの分子の遺伝子改変マウスを作出し骨格筋解析によって治療への展望の可否について検討した。

更に開発した阻害薬の前臨床研究として大型動物である筋ジストロフィー犬を準備した。

以上の多面的なアプローチによって最終的には筋ジストロフィーのみならず、骨格筋減少症 (サルコペニア) による廃用性筋萎縮症やメタボリック症候群といった現在の医療費や介護負担を押し上げる二大要因に対しても、マイオスタチン阻害療法の臨床

応用基盤の確立を目標として研究を進めた。

B. 研究方法

1. 可溶性コラーゲンナノキャリアーを用いたマイオスタチン RNA 干渉の検討

陽性荷電している可溶性コラーゲン（アテロコラーゲンATCOL）に陰性荷電しているマイオスタチンに対するsiRNA（Mst-siRNA）を混合し複合体を形成させた。この複合体の*in vivo*のマイオスタチンRNA干渉効果について解析した。コントロールとしてスクランブルsiRNA（scr-siRNA）/ATCOL複合体を投与し比較した。可溶性アテロコラーゲンが高価であるため廉価な特殊加工コラーゲン[poly（Pro-Hyp-Gly），SYCOL]も作出しRNA干渉効果が得られるか否かについて検討した。① 野生型マウスへMst-siRNA/ATCOL複合体局所投与：24-28 週齢の野生型雄マウスの右側咬筋と大腿二頭筋に Mst-siRNAとATCOL複合体の局所投与を行い、2週間後に咬筋と大腿二頭筋を摘出しその筋重量及び筋組織学的解析を実施した。② 野生型マウスへのMst-siRNA/ATCOL複合体全身投与：24-28週齢の野生型雄マウスにMst-siRNA/ATCOL複合体を眼窩静脈叢への注射によって全身投与した。2週間の間に4回注射を行い最終投与から1週間の待機期間の後に大腿四頭筋を摘出しその筋重量及び筋組織学的解析を実施した。同様に、③ LGMD1Cモデル変異caveolin-3 Tg マウス骨格筋への局所投与、④ 変異caveolin-3 Tg マウスへの全身投与、を行いそれぞれ骨格筋解析及び筋張力解析を行った。⑤ 皮膚毛色解析による可溶性コラーゲンナノキャリアーのRNA干渉増強効果の検討：可溶性コラーゲンナノキャリアーを用いたsiRNA導入の機構について検討するために蛍光標識したscramble siRNA（scr-siRNA）と毛色を調節する遺伝子であるメラノコルチン1レセプター（Mc1r）に対するsiRNA（Mc1r-siRNA）をマウス上皮に局所投与を行って、毛色を解析した。⑥ RNaseプロテクションアッセイ：siRNAと特殊加工コラーゲン（SYCOL）及びATCOLの複合体にRNaseを接触させ、siRNAが完全に分解するまでの時間を計測し、

RNaseプロテクション能力を比較検討した。⑦ ルシフェラーゼsiRNA（Luc-siRNA）/SYCOL複合体のRNA干渉効率の検討：複合体をルシフェラーゼ発現B16-F10-luc-G5 細胞へトランスフェクションしてルシフェラーゼ発現量を定量解析した。

⑧ Mst-siRNA/SYCOL複合体局所投与：野生型マウスへのMst-siRNA/SYCOL複合体を骨格筋へ局所投与し骨格筋を解析した。⑨ ルシフェラーゼsiRNA/SYCOL複合体全身投与：ルシフェラーゼ発現B16-F10-luc-G5 癌細胞を生着させたヌードマウスに、Luc-siRNAとSYCOLまたはATCOLの複合体を眼窩静脈叢へと注射してルシフェラーゼ蛍光によってRNA干渉効率を検討した。

2. プロドメインのマイオスタチン活性阻害中心ペプチド領域の同定とペプチド投与

① プロドメインについて既に報告されているシグナルペプチド（アミノ酸 23）、N鎖糖鎖修飾部位（アミノ酸 91）、BMP1 プロテアーゼ切断部位（アミノ酸 99）をそれぞれ挟む形で合計 33 種類の領域をデザインした。② この 33 領域をコードする cDNA を、それぞれ CMV プロモーター下でヒト免疫グロブリン上流に挿入して発現ベクター（Prodomain-Fc pcDNA3.1）を構築した。③ このベクターと Smad 感受性レポーター遺伝子 pGL3-（CAGA）₁₂-luc をヒト胎児腎 HEK293 細胞に共発現した。④ この細胞のマイオスタチン刺激によるレポーター転写活性についてルシフェラーゼ発光によって測定した。⑤ 阻害活性の強い領域を絞り込み最終的には 29 アミノ酸領域からなる阻害活性中心を同定した。⑥ この領域に相当するペプチド（Rp29）を合成し HEK293-（CAGA）-luc に添加しマイオスタチン刺激による転写活性阻害を確認した。⑦ Rp29 局所投与：この Rp29 を 12 週齢野生型及び変異 caveolin-3 Tg マウス前脛骨筋へ用量を振って 1 回注射した。2 週間後に前脛骨筋筋重量、単一筋線維断面積（Single-myofiber area, SMA, 1 個体あたり 2,000 筋線維, n=7）を統計学的に解析した。更に骨格筋マイオスタチンシグナル分子である p21 を解析した。⑧ Rp29 全身投与：Rp29 を 6 週

齢変異 caveolin-3 Tg マウスの腹腔内に週 3 回、合計 16 回の全身投与を行った。経時的に体重、筋力を評価し、7 週間後（12 週齢）で骨格筋解析を行った（男女、各 n=7）。コントロールとして 29 アミノ酸残基の配列を逆向きに並べた Rev-Rp-29 を腹腔内投与し同様に骨格筋を解析した。

3. 低分子 TβRI kinase 阻害剤による筋芽細胞分化解析とモデルマウスへの経口投与

① TGF-βファミリー発現マウス筋芽細胞の樹立と筋分化解析：C2C12 筋芽細胞は低ウマ血清に交換することによって、次第に細胞膜が融合して多核となって、筋管細胞様に形態変化を起し分化していくことが知られている。まず東京大学医科学研究所北村俊雄博士が開発したレトロウイルス発現系を用いてマイオスタチンと関連 TGF-βファミリーであるアクチビン、TGF-β1 を C2C12 マウス筋芽細胞に高発現し筋分化に対する影響を検討した。② 筋芽細胞分化抑制に対する低分子 TβRI kinase 阻害剤の効果：この *in vitro* 細胞融合・分化系に低分子 TβRI kinase 阻害剤である Ki 化合物を添加することによる筋融合及び筋分化作用への影響について解析をおこなった。まず Ki 化合物の濃度について条件設定をおこない、0.5-30μM までは用量依存性に細胞融合・分化が促進することを確認した。20 μM に条件を統一し、細胞形態、ライトギムザ染色による細胞融合指数（fusion index）解析を行った。次いで筋分化マーカーであるマイオジェニン（myogenin）、クレアチンキナーゼ（CK）、ミオシン重鎖（MyHC）の発現について、免疫組織化学的に解析を行った。③ Ki 化合物を 6 週齢から 16 週齢の野生型及び変異 caveolin-3 Tg マウスに粉餌に混ぜて経口投与（0.05%）を行い体重、骨格筋量及び筋力について生理学的解析を行った。④ 筋線維解析：16 週齢で野生型及び変異 caveolin-3 Tg マウス骨格筋の SMA を統計学的に解析した。⑤ 筋衛星細胞解析：Ki 化合物投与骨格筋の筋衛星細胞の動向についてマーカー蛋白質である M-cadherin 免疫染色によって検討した。

4. ホリスタチン誘導体による筋ジストロフィー治療効果及びエネルギー代謝の検討

① ホリスタチン変異体の作出：ホリスタチンはマイオスタチンの他、関連 TGF-βファミリーである GDF11 及びアクチビンに阻害活性を有するが、アクチビンに阻害活性がない変異体（FS I-I）を作製した。② 骨格筋特異的 FS I-I 導入ジストロフィン欠損 *mdx* マウスの筋ジストロフィー病態解析：*mdx* マウスと比較して筋ジストロフィーが改善するか否かについて骨格筋組織解析、握力・筋力測定などにより検討した。③ FS I-I Tg マウスへの高脂肪食投与：高脂肪食投与による耐糖能、血中脂質及び脂肪肝形成について野生型と比較し解析した。④ マイオスタチン阻害筋における miRNA プロファイリング：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、ノックアウト及び対照マウスの前頸骨筋から miRNA を抽出して変動する miRNA を網羅的に探索した。また C2C12 細胞の筋分化に伴って上昇する miRNA の検索も行った。⑤ 骨格筋内脂肪変性前駆細胞の同定：マウスやヒトの骨格筋サンプルから、FACS セルソーターで単核細胞を分離し分化培養法と移植実験を行い検討した。

5. マイオスタチン修飾分子 furin 及び Wnt シグナル遮断の検討

① 筋芽細胞における Wnt4 の機能解析：Wnt4 はマイオスタチンの欠損変異により発現が上昇する。C2C12 マウス筋芽細胞における Wnt シグナルの経路について、増殖培地で培養した場合と分化培地で培養した場合の遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。また Wnt4 を恒常的に発現する細胞株を樹立し、スクラッチテストにより細胞動態の変化を分析した。また Wnt/β カテニン経路を遮断する低分子阻害薬を用いて筋分化促進作用を検討した。② Wnt4 過剰発現解析：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 及びコントロールとして GFP 組換えアデノウイルスを作成した。8 週齢野生型雄マウスの前脛骨筋にウイルスを注射し、2 週後と 4 週後の筋組織標本を作成しヘマトキ

シリウム・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。

③ 骨格筋特異的な Wnt4 過剰発現マウスの作出：Wnt4 をマウスの骨格筋特異的に過剰発現させるために、組換えアデノウイルスを作成した。また MCK プロモーターの下流に Wnt4 cDNA を連結したコンストラクト (MCK-Wnt4) をマウス受精卵前核に顕微注入し Tg マウスの作出を試み、それぞれの骨格筋を解析した。④ 骨格筋特異的 furin ノックアウトマウスの作出と解析：furin 遺伝子のエクソン 2 の両端に loxP 配列を挿入したマウスと Myf5 プロモーター下で Cre 酵素を発現するマウスを交配することにより、筋衛星細胞において furin 遺伝子が破壊されたマウスを作出した。成長速度、筋量、握力について解析した。

6. 大型動物に対するマイオスタチン阻害療法への準備：筋ジストロフィー犬解析

マイオスタチン阻害治療の前臨床研究の準備として大型筋ジストロフィーモデル動物である筋ジストロフィー犬の詳細な解析を行った。① 経口ステロイド difluzacort 投与：正常犬及び筋ジストロフィー犬に difluzacort を 0.9mg/kg/day の経口投与を行い投与3ヶ月で安楽殺の後に剖検し全身臓器及び骨格筋を解析した。② イヌ血清CRP値を用いた早期妊娠診断及び胎仔数との関連性についての検討：1~7歳齢までの筋ジス保因犬、及び1~2歳齢の正常犬3交配について、発情出血確認後、Witness LH (Synbiotics社) を用いてLHサージを検出。LHサージ検出から3日後と6日後に交配を実施し、1回目の交配日をDay 0とし、Day 15、から50で採血し血清分離しDog C-Reactive Protein (CRP) ELISA Test Kit (Life Diagnostics社) を用いて血清CRP値を測定し統計学的に解析した。③ 筋ジス犬における側頭筋障害の分子メカニズムに関する解析：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、筋ジス犬を用い、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MRI画像より側頭筋、

前脛骨筋及び腓腹筋の断面積 (Cross sectional area: CSA) の経時的測定を行った。次に6-7ヶ月齢の正常犬及び筋ジス犬の側頭筋凍結サンプルの 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によって 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した。6ヶ月齢の正常犬及び筋ジス犬の側頭筋凍結サンプルの Myosin heavy chain について免疫組織化学解析、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。免疫組織化学解析には、Myosin heavy chain fast (Type IIA 及び IIB 筋線維で染色陽性)、slow (Type I で染色陽性)、developmental isoform (Embryonic 及び neonatal isoform で染色陽性) (Novocastrolaboratories) の抗体を用い、非染色領域を Type IIM 筋線維と判断した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各所属機関の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、遺伝子組み換え実験については、厚労省・文部省・経産省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関の定める倫理規定に基づいた倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果と考察

1. 可溶性コラーゲンナノキャリアーによる新規マイオスタチンRNA干渉法の開発

① 変異 caveolin-3 Tg マウス咬筋への Mst-siRNA/ATCOL 複合体局所投与の有効性：scr-siRNA/ATCOL 複合体投与コントロール群と比較して Mst-siRNA/ATCOL 複合体投与群では筋重量及び筋線維断面積とも有意に増加を認めた。咬筋ではマイオスタチン遺伝子発現の有意な低下が認められ、このナノキャリアーによって *in vivo* でもマイオスタチンRNA干渉が可能であることが明らかとなった。② 変異 caveolin-3 Tg マウスへの Mst-siRNA/ATCOL 複合体全身投与による筋力増大効

果：全身投与の前後で投与群マウスの体重及び筋力に有意差は得られなかった。しかし張力検査による生理学的解析では前脛骨筋及び横隔膜において投与群はコントロール群の約3倍の張力増大が認められた。この回復した張力は野生型マウスの55%に相当しLGMD1Cモデルの筋生理機能の改善が達成されたと考えられた。また大腿二頭筋の筋重量は増加していた。③ siRNA/ATCOL複合体の骨格筋局在の解明：Alexa-588 scramble-siRNA/ATCOL複合体を野生型マウス咬筋及び皮下へ局所投与し約3週間にその骨格筋局在を検討した。咬筋では複合体の筋線維間隙の局在が認められた。皮下では上皮組織と皮下結合組織間に複合体の局在が認められた。これらの結果から可溶性コラーゲンによってsiRNAは長期間安定して投与組織のコラーゲン局在に一致して留まるものと考えられた。④ 皮膚毛色解析による可溶性コラーゲンナノキャリアーのRNA干渉増強効果：蛍光標識したMc1r-siRNA/ATCOL複合体をマウス上皮に局所投与した。Mc1r遺伝子発現は有意に減少しRNA干渉増強効果が明らかとなったと考えられる。しかし予想と異なりMc1r-siRNA投与群は脱毛が激しく毛色を解析することが困難であり、脱毛の原因についても検討した。複合体処理群は未処理群と比べて毛のキューティクルの幅が広く、毛の直径も減少し毛包マーカークのWnt10bとβカテニン1の発現が減少したことから、Mc1rによる周期制御機構の存在が示唆された。⑤ 特殊加工コラーゲン[poly(Pro-Hyp-Gly), SYCOL]による新規RNA干渉の開発：Mst-siRNA/ATCOL複合体と同様にSYNCOL複合体の咬筋局所投与もマイオスタチンRNA量を有意に減少させ、筋重量、筋線維断面積の有意な増加が認められ筋は肥大した。

可溶性コラーゲンナノキャリアーは高価なATCOLばかりでなく廉価なSYCOLによってもマイオスタチンを標的としたRNA干渉を増強して筋肥大筋力増強をもたらすことが証明された。今後は更に大型の筋ジストロフィーモデル動物を対象としてこの戦略の有効性と安全性を検証する前臨床研究が必須となる。またこの結果は、マイオスタチン阻害療法だけでなくRNA干渉全般についての新規デリバリーシステム

を構築して幅広く疾患に応用できるとも考えられる。そこでこの新規可溶性コラーゲンナノキャリアーに対して特許を出願した。

2. プロドメイン由来マイオスタチン阻害ペプチド療法の骨格筋量増加効果

① プロドメインの活性阻害中心の同定：HEK293-(CAGA)-lucを用いた *in vitro* アッセイによって29アミノ酸からなる領域にプロドメイン全長 262 アミノ酸と比較して 70%のマイオスタチン阻害活性を認め、この領域が阻害活性中心と考えられた。これに相当するペプチド Rp29 を合成し HEK293-(CAGA)-luc に添加し実際にマイオスタチン刺激による転写活性阻害を確認した。② Rp29 局所投与による *in vivo* での有効性の証明：Rp29 を12週齢野生型及び変異 caveolin-3 Tg マウス前脛骨筋へ1回注射した。2週間後には用量依存性に前脛骨筋筋重量の増加と筋線維断面積(SMA)の増大が認められた。骨格筋マイオスタチン標的分子である p21 遺伝子発現はRp29投与によって有意に減少した。③ Rp29 全身投与による検討：6週齢LGMD1Cモデルマウスの腹腔内にRp29ペプチド投与を行った。6週間の検討ではコントロール(Rev-Rp29)と比較して体重、筋力の増加は認められなかった。各骨格筋重量、及びSMAの増大はなく筋萎縮性ミオパチーの改善は得られなかった。局所投与と異なり今回の全身投与ではマイオスタチン標的遺伝子である p21 の発現低下は得られなかった。

マイオスタチンに対する特異的阻害戦略として、プロドメインの阻害活性中心に相当する阻害ペプチドを作製して検討した。Rp29局所投与はマイオスタチンシグナルを抑制し骨格筋量を増大させたが、全身投与は骨格筋のマイオスタチンシグナル抑制が達成されないことが明らかとなった。従って全身投与によって、ペプチドが容易に分解を受ける、あるいはペプチドが骨格筋へ到達されていない等が想定される。そこで、今後は、このRp29ペプチドのアミノ酸組成を検討し分解を受けにくい構造に改変する、ビオチン化ペプチドを投与し体内動態を監視する、

新規のペプチドデリバリーシステムを構築する等によって、全身投与による骨格筋マイオスタチンシグナル抑制への取り組みを予定している。

3. 経口低分子 T β RI kinase 阻害剤による筋ジストロフィーマウス筋病変の改善

① 低分子 T β RI kinase 阻害剤による TGF- β ファミリー転写活性の抑制効果：HEK293- (CAGA)-luc アッセイ系を用いてマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 転写活性を測定した。低分子 T β RI kinase 阻害剤 (Ki 化合物) によってこれらは著明に抑制された。② T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞融合・分化促進作用：レトロウイルスベクターによる TGF- β ファミリー発現によって C2C12 筋芽細胞の細胞融合・分化系は著明に抑制された。一方この系に Ki 化合物を最終濃度 20 μ M となるように添加したところ、コントロール C2C12 細胞とほぼ同等まで細胞融合・分化が回復した。③ T β RI kinase 阻害剤の LGMD1C モデルマウス筋萎縮の改善：コントロール野生型マウス及び変異 caveolin-3 Tg マウスに 6 週齢から 16 週齢まで Ki 化合物を粉餌に混ぜて投与した。体重、握力の増大と筋張力の増加が認められ変異 caveolin-3 Tg マウスの筋萎縮の改善が証明された。この骨格筋について 2 種類の M-cadherin 抗体によって筋衛星細胞数を解析した。非投与群の比較では野生型マウスと比較して LGMD1C モデルマウスでは筋線維あたりの筋衛星細胞数は有意に減少していた (3.64 vs. 5.19 /100 fibers)。一方、Ki 化合物投与群では、野生型マウス、LGMD1C モデルマウスとも有意に増加が認められた (8.66 及び 7.39/100 fibers)。

マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害として、T β RI kinase に対する分子標的治療法が有効であることを証明した。この阻害剤が、成人骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞数を増加させること、マウス筋芽細胞 C2C12 分化抑制を強力に阻害することを証明した。その機構として骨格筋組織幹 (筋衛星) 細胞レベル及び筋芽細胞レベルでの骨格筋形成促進が考えられる。従ってこ

の阻害剤は、筋ジストロフィーのみでなくおそらく癌悪疫質などの筋消耗性疾患、正常人の老化 (サルコペニア) による筋萎縮などでも、幹細胞レベル及び筋芽細胞レベルの双方で筋萎縮阻害作用を有すると予想される。今後は長期投与の安全性も考慮した筋消耗性疾患に対する前臨床研究を検討する。

4. ホリスタチン誘導体導入による筋ジストロフィー及びメタボリック症候群の改善効果

① マイオスタチン阻害分子ホリスタチン変異体 (FS I-I) の骨格筋特異的遺伝子導入による筋肥大効果：老齢 FS I-I Tg マウスでも筋肥大が保たれることが示された。② FS I-I 導入マウスのメタボリック症候群抵抗性：FS I-I Tg マウスでは筋肥大の他、体脂肪量は減少し高脂肪食負荷によっても脂肪肝が生じないという驚くべき結果が得られた。③ FS I-I-Fc 融合蛋白質投与による *mdx* マウスの骨格筋病変の改善：筋ジストロフィー変化が減少した。④ アクチビンによる骨格筋量減少作用：プラスミド電気導入によってマイオスタチンよりは弱いものの、アクチビンにも骨格筋量を負に調節する作用があることを証明した。⑤ マイオスタチン阻害による筋肥大の新たな分子機構の発見：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。マイオスタチン阻害によって骨格筋で変動する 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 とされる筋特異的 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ことが明らかとなった。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タンパク合成が亢進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。⑥ 骨格筋内脂肪変性前駆細胞の同定：FACS 解析によって脂肪変性前駆細胞として従来考えられていた筋衛星細胞とは異なる CD31 (-) CD45 (-) SM/C2.6 (-) PDGFR α (+) 間葉系細胞を同定した。この細胞は骨格筋内の血管近傍の間質に存在し、脂肪分化能が極めて旺盛であることを示した (Nature Cell Biol. 2010)。この PDGFR α 細胞を TGF- β ファミリー分子で処理すると、TGF- β の刺激では、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、繊維化を起こすことが確認された。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。骨格筋における筋組織と脂肪組織のバランスを取る新しい前駆細胞の発見と考えられた。

FS I-I-Fc 融合蛋白質を用いたマイオスタチン阻害が、筋ジストロフィーに対する有効性のみならずメタボリック症候群に対する抵抗性をも有することを示した。またマイオスタチン阻害による筋肥大の分子機構として発現が変動する多様な miRNA を同定し S6 キナーゼ活性化によるタンパク合成亢進を明らかとした。デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老化 (サルコペニア)、肥満で骨格筋内脂肪変性が生じることがこれまで知られていたが、その細胞起源は不明であった。本研究で明らかにされた PDGFR α 陽性脂肪前駆細胞は筋ジストロフィーの病態解明や廃用性筋萎縮に対する治療標的細胞として意義深く、Nature Cell Biology の News&Views でも取り上げられ話題となった。

5. furin 及び Wnt4a を介した新規マイオスタチン阻害

- ① Wnt シグナルの筋芽細胞分化への多様な作用：C2C12 細胞を用いて筋分化における Wnt シグナル経路を解析したところ、Wnt9a の発現が顕著に上昇すること、Wnt タンパク質の分泌を促進する Porcupine の発現が著しく上昇することがわかった。また β カテニン経路に対し抑制的に働く Tle2 の発現が著名に増加することも判明した。Wnt9a は、Wnt4 とともに腱・関節領域で発現し、 β カテニン経路に対し抑制的に働くことが知られている。TOP/FOP アッセイにより β カテニン経路について更に検討したところ、Wnt4 の β カテニン経路に対する作用はなく、逆に Wnt4 は Wnt3a による β カテニン経路の促進に対して拮抗することがわかった。恒常的に Wnt4 を発現する C2C12 細胞株を樹立したところ、増殖培地での増殖速度が 1/2 以下に低下し、同時に自発的な筋分化が誘導された。抗癌剤として開発された β カテニン/TCF 複合体形成阻害薬 FH535 の効果を検証した。終濃度 1mM になるように FH535 を培養液に加えたところ、筋分化促進効果があることがわかった。FH535 は、高濃度 (15mM 以上) にすると細胞障害性が現われた。また筋分化の過程において 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を発見した。
- ② マウス骨格筋特異的 Wnt4 の過剰発現マウスの作出：アデノウイルスベクターに組み込んだ Ad-Wnt4 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 週齢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。Wnt4 の発現により骨格筋が脂肪組織化したのか、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なのか更に検討する必要がある。
- ③ Myf5 陽性細胞特異的 furin 欠損によるマウス近位筋肥大効果：Furin コンディショナル変異マウス (Furin^{flox/flox}) と Myf5 プロモーターの制御下で組換え酵素 Cre を発現するマウス (Myf5^{Cre}) を交配し産仔を得た。Myf5 は筋衛星細胞で発現することがわ

かっているが、その細胞で furin 遺伝子が破壊された雄マウス ($furin^{-/-}$) と対照群 ($furin^{+/+}$) の筋重量を比較したところ、16 週齢雄マウスでは $furin^{-/-}$ マウスでは四肢近位筋 (上腕二頭筋と大腿四頭筋) の筋重量増加が認められた。

マイオスタチン修飾分子である Wnt4a 及び β カテン/TCF 複合体形成阻害薬による筋分化促進作用を明らかとした。また Myf5 陽性細胞特異的 Furin 阻害によって四肢近位筋の筋肥大を認めた。これらの分子は新規マイオスタチン阻害療法の標的と成り得る。

6. マイオスタチン阻害の大型モデル動物に対する前臨床研究への展望

Duchenne型筋ジストロフィーの大型モデル動物である筋ジストロフィー犬について解析して、このモデルへのマイオスタチン阻害療法への糸口を探った。

① 筋ジス犬に対する deflazacort の効果：経口ステロイド剤である diflazacort 投与によって筋ジストロフィー犬ではコントロールの同齢筋ジストロフィー犬と比較して運動能力は保持され、血清CK値は低下していた。しかし成長遅延が認められた。経口ステロイド剤により運動能力保持と血清CK値低下は達成できたが、成長遅延の影響について勘案する必要がある。今後のRNA干渉、阻害ペプチド及び低分子阻害薬によるマイオスタチン阻害研究においても投与時期などの条件設定と適切な評価が必要と考えられる。② イヌ血清CRP値を用いた早期妊娠診断及び胎仔数との関連性解析：血清CRP値を用いた妊娠診断についてはDay 20で可能と考えられ、従来の妊娠診断法と比較しより早期診断が可能であった。またDay 20から胎仔数との関連性が出現するが特にDay30で最も信頼できる結果が得られた。血清CRP値測定によって筋ジス犬の大量供給及び繁殖効率化が図れると考えられた。③ 筋ジス犬における側頭筋障害の分子機構解析：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証明された。

mRNA発現解析及び蛋白質発現解析から筋再生時に発

現を認めるMyosin heavy chain embryonic及び neonatal isoformだけでなく、正常犬では発現していない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と比較したところ側頭筋筋線維の50-100%を占めた筋張力・ATPase活性が高く筋障害を受けやすいType IIM (masticatory isoform)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。

今後はこの大型モデル動物へのマイオスタチン阻害の前臨床研究が重要と考えられる。

D. 結論

(1) 陽性荷電の可溶性コラーゲンナノキャリアーを用いて骨格筋局所投与及び経静脈投与によって効果的なマイオスタチン RNA 干渉治療法を開発した。臨床応用への突破口として廉価な特殊人工加工コラーゲンの開発にも成功した。

(2) プロドメイン由来の 29 アミノ酸から構成される阻害ペプチドの骨格筋局所投与による有効性を証明した。全身投与に挑戦している。

(3) 抗癌剤として注目されている TGF- β タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤によるマイオスタチンを含む複数の筋分化抑制 TGF- β ファミリー阻害効果を証明した。経口投与によって野生型及び LGMD1C モデルマウスに筋量増加、筋力増大が達成され筋衛星細胞数増加や筋芽細胞分化促進によるものと考えられた。この低分子キナーゼ阻害剤の臨床応用が期待される。

(4) ホリスタチン誘導体高発現トランスジェニックマウスでは著明な筋肥大を呈し同時に高脂肪食による糖代謝異常やメタボリック症候群の強力な抑制効果を有することを示した。また miRNA と S6 キナーゼを介したマイオスタチン阻害による筋肥大の分子機構を明らかとした。更に骨格筋脂肪化の前駆細胞として筋衛星細胞とは全く異なる PDGFR α 陽性間葉系細胞を同定することに成功し、筋ジストロフィーやサルコペニアの脂肪変性治療の標的細胞となる可

能性がある。

(5) マイオスタチン活性化分子 furin のノックアウトマウスで近位筋肥大が生じることを明らかとし furin 阻害による新たなマイオスタチン阻害への展望が開けた。また Wnt4a/ β カテニン TCF 経路を標的とする新たな筋分化促進低分子阻害剤が得られた。

(6) 開発した阻害剤による大型動物への前臨床研究の対象となる筋ジストロフィー犬の投与前解析を実施した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. *Acta Myol.* 27:19-24, 2008
- 2) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 15(15):1126-30, 2008.
- 3) Tsuchida K. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11(4), 487-494, 2008
- 4) Tsuchida K. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myologica.* 27(1), 14-18, 2008
- 5) Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M, Inokuchi K. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS ONE.* e1869, 2008
- 6) Murakami T, Sawada H, Tamura G, Yudasaka M, Iijima S, Tsuchida K. Water-dispersed single-wall carbon nanohorns as drug carriers for local cancer chemotherapy. *Nanomedicine.* 3(4), 453-463, 2008
- 7) 村上達也、土田邦博 機能性リポタンパク質「機能性 DDS キャリア」の製剤設計 (岡田弘晃監修) pp150-157, 2008
- 8) Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res.* Oct 15; 314(17): 3232-44, 2008
- 9) Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct.* Oct 1; 33(2): 163-9, 2008
- 10) Katsumata O, Honma T, Sanda M, Kamata A, Takeda S, Kondo H, Sakagami H. Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res.* Oct 9; 1234:44-9, 2008
- 11) Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.* Sep;173(3):781-91, 2008
- 12) Sato K, Yokota T, Ichioka S, Shibata M, Takeda S. Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol.* Jul; 27:30-6, 2008
- 13) Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther.* Jul; 19(7): 719-30, 2008

- 14) Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, Ueda H, Urasawa N, Koyama J, Yazaki Y, Yazaki M, Sakai T, Haruta S, Takeda S, Ikeda S. Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Clin Neurosci*. Jul;15(7): 757-63, 2008
- 15) Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H. Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through β -synemin, α -dystrobrevin and actin. *J Cell Sci*. Jun 15;121(Pt 12): 2062-74, 2008
- 16) Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishibori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett*. Jun 25;582(15): 2212-8, 2008
- 17) Urasawa N, Wada MR, Machida N, Yuasa K, Shimatsu Y, Wakao Y, Yuasa S, Sano T, Nonaka I, Nakamura A, Takeda S. Selective vacuolar degeneration in dystrophin deficient canine Purkinje fibers despite preservation of dystrophin-associated proteins with overexpression of Dp71. *Circulation*. May 13; 117(19): 2437-48, 2008
- 18) Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med*. Mar 14; 10(6): 702-713, 2008
- 19) Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*. Feb; 22(2): 477-87, 2008
- 20) Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskelet Disord*. Jan 9;9(1):1, 2008
- 21) Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin alpha2 upon transplantation to dy(3k)/dy(3k) mice. *Exp Cell Res*. Jan 1;314(1):193-203, 2008
- 22) Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal*. 7(1), 15, 2009
- 23) H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, Tsuchida K, J. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol*. 297(1), 157-164, 2009
- 24) Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, D.R. Pimentel, K.N. Papanicolaou, K.D. Panse, Tsuchida K, E. Lara-Pezzi, S.-J. Lee, K. Walsh. Activin A and follistatin-like3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation* 120(16), 1606-1615, 2009
- 25) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2), 143-152, 2009
- 26) 田中伸吾, 高田温行, 森口隆彦, 濃野勉: Wnt4 による筋分化促進作用と今後の創傷治癒への展望、皮膚の科学 8(11) 21-24, 2009
- 27) Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens. *J. Poult. Sci*. 46: 95-99, 2009
- 28) Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S. Evaluation of

- dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. *Muscle Nerve*, 40: 815-826, 2009
- 29) Cui R, Duan XL, Anderson GJ, Qiao YT, Yu P, Qian ZM, Yoshida K, Takeda S, Guo P, Yang ZL, Chang YZ. Age-dependent expression of hephaestin in the brain of ceruloplasmin-deficient mice. *J Trace Elem Med Biol*. 23: 290-299, 2009
- 30) Guo P, Cui R, Chang YZ, Wu WS, Qian ZM, Yoshida K, Qiao YT, Takeda S, Duan XL. Hepcidin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides*. 30: 262-266, 2009
- 31) Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K. Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther*. 20: 1013-1021, 2009
- 32) Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A. CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal*. 3: 135-145, 2009
- 33) Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology*. 29: 494-501, 2009
- 34) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*. 17: 4798-4811, 2009
- 35) Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*. 65: 667-676, 2009
- 36) Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J*. 23: 1907-1919, 2009
- 37) Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S. Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009
- 38) Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, Takeda S, Ikeda S. Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45-55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet*. 54(2):127-30, 2009
- 39) Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S. Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech Dev*. 126, 107-116, 2009
- 40) Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet*. 18: 621-31, 2009
- 41) Sekiguchi M, Zushida K, Yoshida M, Maekawa M, Kamichi S, Yoshida M, Sahara Y, Yuasa S, Takeda S, Wada K. A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain*. 2009 Jan; 132(Pt 1):124-35
- 42) Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol*. Jan; 66(1): 32-8, 2009
- 43) 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
- 44) Ageta H, Ikegami S, Miura M, Masuda M, Migishima R, Hino T, Takashima N, Murayama A, Sugino H, Setou M, Kida S, Yokoyama M, Hasegawa Y, Tsuchida K, Aosaki T, Inokuchi K. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learning and Memory* 17(4), 176-185, 2010
- 45) S.-J. Lee, Y.-S. Lee, T. A. Zimmers, A. Soleimani, M. M. Matzuk, Tsuchida K, R. D. Cohn, E. R. Barton. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol. Endocrinol.* 24(10), 1998-2008, 2010
- 46) Ishikawa M, Nishijima N, Shiota J, Sakagami H, Tsuchida K, Mizukoshi M, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. 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
- 47) 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
- 48) Ageta H, Tsuchida K. Multifunctional roles of activins in the brain. *Vitamins and Hormones* Vol. 85: *Activins and Inhibins* 85, 185-206, 2011
- 49) 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. Metabol.* 300 (3), E543-553, 2011
- 50) 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.* Oct;52(8):693-699, 2010
- 51) 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
- 52) 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
- 53) 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)
- 54) 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)
- 55) Nakamura A, Takeda S. Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol.* (in press)
- 56) 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
- 57) 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
- 58) 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
- 59) 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
- 60) Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res.* 316: 3087-3092, 2010
- 61) 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
- 62) 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
- 63) 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
- 64) 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
- 65) 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
- 66) 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
- 67) Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanasaki 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
- 68) 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
- 69) Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12: 143-52, 2010
2. 学会発表
- 1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Sunada Y. A small-molecule inhibitor targeting transforming growth factor- β type receptor kinase ameliorate muscular atrophy in a mouse model of caveolin-3-deficient muscular dystrophy. 13th International Congress of World Muscle Society, Newcastle, UK, September 29-October 2(2008)
- 2) 久我敦、大澤裕、林紗織、村上龍文、砂田芳秀. cardiotoxin 筋再生モデルにおける caveolin-3 と dysferlin の動態. 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日
- 3) 大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、若山吉弘、澁谷誠二、砂田芳秀. caveolin-3 欠損筋の dysferlin/myoferlin 細胞内局在異常. 第 49 回日本神経学会総会、2008 年 5 月 15 日
- 4) Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T. Transgenic expression of myostatin inhibitor derived from follistatin ameliorates muscular dystrophy model mice. 7th International Conference on BMPs. 7th International Conference on BMPs. California, U.S.A. July 9-13 (2008)
- 5) 土田邦博 マイオスタチンが仲介する骨格筋と脂肪組織の相互作用 第 13 回アディポサイエンス研究会 大阪、8 月 22 日(2008)
- 6) Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Identification of mesenchymal progenitor cells responsible for fatty degeneration of skeletal

muscle. EMBO Myogenesis Conference, Barcelona, Spain. September 24-29 (2008)

7) Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A. Myostatin inhibiting peptide works as a magic bullet to increase skeletal muscle mass and to ameliorate muscle pathology in muscular diseases by transgenic expression. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II) Nuremberg, Germany. October 3-5 (2008)

8) 上住聡芳, 深田宗一郎, 土田邦博 Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. 内藤カンファレンス 幹細胞の維持と分化の分子基盤 [III] 湘南、11月11-14日(2008)

9) 上住聡芳、土田邦博:様々な組織における間葉系前駆細胞の予知的同定と分離 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会神戸、12月9-12日(2008)

10) 中谷直史、小久保正博、土田邦博:マイオスタチン阻害による脂肪組織の減少 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会神戸、12月9-12日(2008)

11) 土田邦博、中谷直史、常陸圭介、上住聡芳、山本直樹、山田治基、武田伸一、野地澄晴、砂田芳秀:マイオスタチン阻害による骨格筋肥大と脂肪量減少の分子機構 厚生労働省精神・神経疾患班会議 東京、12月14日(2008)

12) Takata H, Moriguchi T, Yamamura M, Nohno T :Interaction of Wnt4 with myostatin signaling during myogenic differentiation of skeletal muscle., Keystone Symposia: Signaling Pathways in Cancer and Development, Colorado, 3月(2008)

13) 田中伸吾, 高田温行, 岡博昭, 森口隆彦, 寺田久美子, 濃野勉: マイオスタチンの下流シグナル Wnt4 による筋分化に対する作用-第3報-, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸、12月(2008)

14) Takeda S: Muscle progenitor cells in skeletal muscle: their functions and potencies in therapy. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle development and

regeneration, First EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 9.24-29, 2008

15) 武田伸一: nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである、シンポジウム、メカニカルストレスに対する筋・骨格系の応答の分子機構, 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 12.12.2008

16) Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y.: Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

17) 大澤 裕、久我 敦、林 紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀 :TGF- β タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発 (第2報), 第27回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009

18) 砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績: 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「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」平成21年度「砂田班」班会議, 東京, 12.11, 2009

19) 砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績: 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成21年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2010

20) 池本円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘 Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日(2009)

21) 上住聡芳、深田宗一郎、山田治基、西野一三、武田伸一、土田邦博 Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日(2009)

22) H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, Tsuchida K. J.P. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell

proliferation and inhibition of both myostatin and activin. 91 th Annual Meeting of Endocrine Society. June 10-13 (2009)

23) Uezumi A, Fukada S, Yamada H, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. Making Muscle in the Embryo and the Adult. New York, U.S.A. May 28-June 2 (2009)

24) 中谷直史, 土田邦博:マイオスタチン機能阻害マウスにおける脂肪組織の減少 第14回 アデイポサイエンス研究会 大阪、8月22日(2009)

25) 土田邦博:マイオスタチン・シグナリングと骨格筋/脂肪組織の相互作用 ワークショップ「細胞による機械的ストレス感知の分子機構」 第32回日本分子生物学会年会 横浜、12月10日(2009)

26) 土田邦博、中谷直史、常陸圭介、上住聡芳、山本直樹、山田治基、濱田健太郎、武田伸一、砂田芳秀:マイオスタチン阻害による骨格筋量増加機構と脂肪細胞の動態解析 厚労省精神・神経疾患研究砂田班班会議 東京、12月11日(2009)

27) 川上 恵実、木内 奈央、田中 栄二、野地 澄晴:慢性筋委縮疾患制圧を目指したRNA干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. 先端歯学スクール2009、平成21年8月28-29日、淡路島。

28) 川上 恵実:慢性筋委縮疾患制圧を目指したRNA干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. Tokushima Bioscience Retreat 2009、平成21年9月17-19日、小豆島

29) Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Osawa Y, Ishimaru N, Ouchji H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Strategic study atelocollagen-mediated application of myostatin-targeting siRNA for therapeutic use for muscular atrophy diseases. QOL International Symposium 2010、平成22年2月9-10日、新潟。

30) 足立太郎、古谷拓磨、石丸直澄、林良夫、大内淑代、野地澄晴:色素細胞刺激ホルモン受容体 Mc1r の毛周期制御機構への影響. 第32回日本分子生物学会年会 平成21年12月9~12日、横浜

31) 田中伸吾, 高田温行, 山本康弘, 寺田久美子,

三棹聡美, 西松伸一郎, 濃野勉:マイオスタチンの下流シグナル Wnt4 による筋分化に対する作用-第4報-、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月

32) Nishimatsu S, Tanaka S, Kiyonari H, Hayashibara Y, Aizawa S, Ohsawa Y, Sunada Y, Nohno T :Muscle mass regulation by myostatin-signaling related molecules. 第8回日仏筋ジストロフィーシンポジウム (Paris, France) 2009年7月

33) Takeda S: Potential of muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.12, 2009

34) Takeda S: The dystrophic dogs as an excellent animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

35) Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.4, 2009

36) Miyagoe-Suzuki Y, Motohashi N, Yada E, Segawa M, Wang B, Harano C, Masuda S, Yoshida M, Takeda S: Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.3, 2009

37) Takeda S: Exon skipping, Panel introductions and Project summaries : Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6.26, 2009

38) Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009

39) Takeda S : Significance of the dystrophin-glycoprotein complex that connects the cytoskeleton to the basal lamina. Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, 6.6, 2009

- 40) Takeda S: Plenary Lecture: Advances of Molecular Therapy Research on Dystrophin-deficient Muscular Dystrophy. 8th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Mumbai, India, 5.23, 2009
- 41) Imamura M, Takeda S: Searching for Loss of Imprinting of the ϵ -Sarcoglycan Gene in Cells of ϵ -Sarcoglycan Partial Knockout Mice. Poster, The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, San Diego, USA, 12.10, 2009
- 42) Takeda S: Rodent vs. "Large Animal" models, Animal models assessment session, Bringing down barriers-translational medicine in inherited neuromuscular diseases, TREAT-NMD NIH International Conference, Brussels, Belgium, 11.18, 2009
- 43) Yokota T, Takeda S: PMO and PPMO in the dystrophic dog. CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) annual meeting, Washington D.C., USA, 11.7, 2009
- 44) Nakamura A, Kobayashi M, Yuasa K, Yugeta N, Takeda S: The opening of pulmonary respiration resulted in muscle degeneration of diaphragm in canine X-linked muscular dystrophy. Poster, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
- 45) Ito N, Ampong BN, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Neuronal nitric oxide synthase is an essential mediator for muscle hypertrophy, International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 7.29, 2009
- 46) Yada E, Harano C, Motohashi N, Segawa M, Wada MR, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adultmdx mice, 7th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Barcelona, Spain, 7.9, 2009
- 47) Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S. Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy for muscular dystrophy using normal primates. American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009
- 48) 鈴木 友子、武田 伸一: Molecular and cellular mechanisms of mechanosensing nNOS regulates skeletal muscle mass, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 49) 鈴木 友子, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 鈴木 直輝: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は骨格筋の可塑性の制御因子である, 第 17 回日本運動生理学会大会 シンポジウム V: 骨格筋の可塑性, 東京, 7.26, 2009
- 50) 武田 伸一: 筋疾患のトランスレーショナルリサーチ (基礎から臨床へ), シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」, 第 52 回日本神経化学学会大会, 伊香保, 6.24, 2009
- 51) 武田 伸一: 遺伝子治療と再生医療, 筋ジストロフィーの遺伝子治療~エキソンスキッピングを中心に, 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009
- 52) 武田 伸一: 難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ, モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.21, 2009
- 53) 武田 伸一: 遺伝子治療の夢と現実, 第 6 回日本神経学会生涯教育講演セミナー, 仙台, 5.19, 2009
- 54) 伊藤 尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤 明, 鈴木 友子, 武田 伸一: Neural nitric oxide synthase is an essential mediator for early stage of muscle hypertrophy, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 55) 瀬川 亮, 王 博, 原野 千加, 鈴木 友子, 松田 良一, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と筋分化条件の検討, 第 32 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 56) 笠原 優子, 喜納 裕美, 西山 章代, Jin-Hong Shin, 大島 幸子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植治療, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 10.26, 2009
- 57) 岡田 尚巳, 喜納 裕美, 笠原 優子, 岡田 浩典,