

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21300157

研究課題名（和文）筋ジストロフィー犬新生子劇症型の病因解明と胎子治療の検討

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of neonatal fulminant dystrophic dog and fetal therapy

研究代表者

中村 昭則（NAKAMURA AKINORI）

信州大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10303471

研究成果の概要（和文）：

Duchenne型筋ジストロフィーのモデルである筋ジストロフィー犬は、出生直後の血清CK値と死亡率が極めて高い。臍帯血と呼吸開始後の血清CK値の比較から、呼吸開始による横隔膜の機械的傷害がよることが分った。横隔膜を用いてcDNAマイクロアレイを行ったところ、呼吸開始前ではオステオポンチンが、呼吸開始後では*c-fos*、*egr-1*、IL-6、IL-8が著明に増加し、筋傷害に関連する分子と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The dystrophic dog, a model of Duchene muscular dystrophy, shows a high mortality rate with a marked increase in serum creatine kinase (CK) levels in the neonatal period. By measuring serum CK levels in cord and venous blood, we found initial respiration resulted in massive diaphragm damage and lead to the high serum CK levels. cDNA microarray revealed that osteopontin was prominently upregulated even prior to the initial respiration and *c-fos*, *egr-1*, IL-6, and IL-8 were distinctly overexpressed after the respiration. These molecules could be associated with muscle damage in dystrophic muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは進行性に全身の筋萎縮と筋力低下を引き起こす遺伝性疾患の総称である。筋ジストロフィーの中において、Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）はX染色体連鎖性遺伝を示し、出生男児 3,500人に1人と最も頻度が高い。一般に、2～5歳に歩行障害で発症し 13歳までに歩行不

能となり、30歳前後で呼吸不全あるいは心不全により死亡する極めて重篤な疾患である。DMDは、筋形質膜に存在するジストロフィンをコードするジストロフィン遺伝子の変異により発症する。ジストロフィンは筋収縮および弛緩の間に筋線維の安定化と細胞内カルシウムの恒常性を維持する機能を有しているとされるが、ジストロフィ

ンの欠損によって筋形質膜は脆弱となり、筋細胞内カルシウム濃度が増加して、様々なプロテアーゼの活性化により筋壊死が起こると考えられている。治療法の開発には筋ジストロフィーの病態機序の理解が重要であり、このためにはモデル動物が必要不可欠である。しかし、最も頻用される DMD の動物モデルである *mdx* マウスは、筋壊死同様に筋再生も非常に活発であり、筋変性の分子機構は十分には明らかにされていない。新生児 DMD において血清または血漿クレアチンキナーゼ (CK) 値が高値であることが古くより報告されているが、その原因については十分解明されてはおらず、DMD の新生児診断も確立されていない。一方、他の DMD モデル動物である筋ジストロフィー犬 (以下、筋ジス犬) は、出生時の血清 CK 値が著しい高値を示す上、新生仔期の死亡率が高い。

2. 研究の目的

我々は、新生仔筋ジス犬の病態機序を明らかにすることにより、筋変性の機序を解明できる可能性があると考えた。健常新生児においても DMD ほどではないが、出生時に血清 CK 値は高く、帝王切開により低下することから、高 CK 血症の原因として胎児が娩出時の産道からの圧迫、外傷、あるいは低酸素症が関与していると考えられている。そこで、分娩時のストレスあるいは出生直後の呼吸開始が新生仔筋ジス犬の高 CK 血症に関連している可能性について検討を行った。また、胎仔期は既に有効性が認められているステロイド剤や遺伝子治療の有効性について検討できる適期と考え、検討を行った。

3. 研究の方法

【対象】

国立精神・神経センター (現国立精神・神経医療研究センター)、神経研究所中型実験動物研究施設の筋ジス犬繁殖コロニーにおいて 2001 年 12 月から 2008 年 4 月の間に自然分娩 (39 回) によって得られた正常犬 71 頭、保因犬 37 頭、筋ジス犬 34 頭、および予定帝王切開 (28 回) より得られた正常犬 39 頭、保因犬 26 頭、筋ジス犬 41 頭を用いた。予定帝王切開は、LH サージ法 (Witness® LH Synbiotics, Kansas City, MO) により想定された日時、または妊娠保因犬の体温が急速に低下した時点で施行した。妊娠保因犬の帝王切開における麻酔の導入から維持にはイソフルラン (2.0–3.0%) を用いた。新生仔の蘇生術は、獣医師および獣医師の監視下で動物取り扱い技術者の資格を有し、蘇生術の経験を有する者が行った。蘇生後の犬に対し呼吸促進剤であるドキシプラムを使用し、酸素補給が行われた箱内で、乾燥かつ保温されたタオ

ルの上に置かれた。血清 CK 値の経時的変化 (臍帯血および蘇生後 30 分、1、2、4、8、24 および 48 時間後) を見るために、予定帝王切開 (3 回) から得られた正常犬 5 頭、保因犬 3 頭、および筋ジス犬 6 頭を用いた。また、帝王切開で得られた各群の犬各 4 頭を病理学的および分子生物学的解析に供した。本研究は、国立精神・神経センター (現国立精神・神経医療研究センター) 神経研究所中型実験動物倫理問題検討委員会により承認 (承認番号: 13-03、14-03、15-03、16-03、17-03、18-03、19-04、および 20-04) を受け、同研究所の動物実験指針に従い実施した。

【血清 CK 値の測定】

臍帯血あるいは静脈血を室温で 10 分間の 1,800g の遠心を行って血清を分離した後、比色法 (FDC3500, FujiFilm, Tokyo) により CK 値を測定した。

【一般病理および免疫組織化学】

安楽死後、横隔膜を凍結固定し、7 μ m に薄切した後にヘマトキシリン・エオジン染色およびカルシウム染色法であるアリザリン・レッド染色 (pH 4.1) を行った。また、免疫組織化学は、薄切した凍結固定標本を 15 日間乾燥後、5%ウシ血清アルブミン (BSA) または熱不活化正常ヤギ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.4) で洗浄し、1 次抗体で 4°C で 16 時間のインキュベーションを行った。1 次抗体には、CD18 (MCA1780, AbD Serotec, Oxford)、CD68 (M0876, Dako, Denmark)、CD11b (MCA1777S, AbD Serotec)、C5b-9 (ab66768, Abcam, Cambridge)、cleaved-caspase 3 (#9661, Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、LC3 (#4108, Cell Signaling Technology)、osteopontin (Rb-9097, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、c-Fos (#2250, Cell Signaling Technology)、EGR-1 (#4153, Cell Signaling Technology)、IL-6 (sc-80108, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) および IL-8 (109-401-311, Rockland Immunohistochemical, Gilbertsville, PA) を用いた。PBS を用いて室温で洗浄後、FITC で標識 2 次抗体を用いて室温でインキュベーション後に再び PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

【ウエスタンブロット】

凍結固定した横隔膜をサンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール) でホモジナイズし、遠心分離 (15,000g、10 分間) 後に上澄を採取した。DC Assay キット (BioRad, CA) を用いてタンパク質濃度を測定した後、95°C で 5 分間の熱変性を行い、40 μ g をウエスタンブロットに供した。PVDF 転写膜は 0.1% Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBST) + 5% スキムミルクでブロッキングを行い、1 次抗体を用いて 4°C で 16 時間のインキュベーションを行った。1 次抗体には、オステオポンチ

ン (Rb-9097, Thermo Fisher Scientific)、c-Fos (#2250, Cell Signaling Technology)、EGR-1 (sc-189, Santa Cruz Biotechnology)、IL-6 (AF1609, R&D Systems, Minneapolis, MN) および IL-8 (ab34100, Abcam) を用いた。転写膜を TBST で洗浄後、2 次抗体 (マウスまたはウサギ特異的 HRP 標識抗体) でインキュベートを行い、再度 TBST で洗浄し、ECL-Plus Western Blotting Detection System (GE HealthCare, Buckinghamshire) で検出した。

【cDNA マイクロアレイ】

呼吸開始前後の正常犬および筋ジス犬 (各 4 頭) から採取し、凍結保存した横隔膜から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) を用いて total RNA を抽出した。RNA 濃度は、NanoDrop ND-1000 UV- 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) を用いて測定した。RNA の質は Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Cruz, CA) で検定した。個々の total RNA (500ng) は犬用の whole genome oligo microarray 44K (Agilent Technologies) にアプライし、ハイブリダイゼーションは Bio Matrix Research 社 (流山、千葉) で行った。蛍光イメージは Agilent Technologies microarray scanner (Agilent Technologies) を用いた。標準化は GeneSpring 10.0 (Tomy Digital Biology, Denver, CO) を用いてチップ間の遺伝子を比較した。正常犬と筋ジス犬の呼吸開始前および後との間で発現量に違いのある遺伝子を、ANOVA 検定を行った後に Benjamini and Hochberg 法による多群間検定を行って選別した。

【Real-time RT-PCR】

マイクロアレイの結果から各群間で 10 倍以上に発現が増加していた遺伝子について定量的 PCR 法を用いて検定を行った。用いた各個体の total RNA は cDNA マイクロアレイに用いたものと同じ total RNA を使用した。18s RNA (内部コントロール)、オステオポンチン、c-fos、egr-1、IL6 および IL8 の各遺伝子の増幅用プライマーを設計した。Real-time PCR は、SYBR mixed Ex Taq II kit (Takara) を用いて 95C、20 秒間、60C、1 分間の 40 サイクルの PCR 反応を BioRad iCycler system (BioRad) で行った。遺伝子の発現量は 18s RNA に対する相対値 [(Ct/18s RNA - Ct/目的の遺伝子)] を求め、呼吸開始前後の正常犬および筋ジス犬との多群間比較を行った。

【胎仔治療】

3 頭の妊娠保因犬に対して強力な抗炎症作用を有するデキサメサゾン (デカドロン注) を用い、1 頭には帝王切開 1 時間前に 2 mg、別の 1 頭には自然分娩前日に 2.72mg を 2 回、最後の 1 頭には帝王切開前日に 1.98 mg 及び当日に 1.98 mg を追加投与した。娩出された筋ジス犬の出生 1 時間後の血清 CK 値について検討した。

【統計解析】

2 群間のデータの比較には *student-t* 検定を、死亡率の検定にはカイ二乗検定を用いた。また、real-time PCR のデータにおける多群間比較には、ANOVA 検定を行った後、Tukey's 法による多群間検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

分娩時のストレスが新生児に筋障害を与えること、帝王切開によりそのストレスが減少するとの報告をもとに、予定的帝王切開を導入し、正常犬、保因犬および筋ジス犬において自然分娩と帝王切開後の血清 CK 値の違いについて検討した。その結果、帝王切開後の血清 CK 値は正常犬および保因犬では有意に低下していたが、筋ジス犬では低下は見られなかった。以上の結果は、分娩時のストレスが新生児筋ジス犬の高 CK 血症の主たる原因ではないことを示唆している。出生直後には呼吸開始という重要な過程があるため、高 CK 血症の原因が肺呼吸開始に関連しているか否かを検討する目的で、帝王切開により得た新生児に対し臍帯血 (呼吸開始前の条件を反映) と呼吸開始 1 時間後の頸静脈血の血清 CK 値を比較検討した。

呼吸開始後の血清 CK 値の値は、正常犬および保因犬の臍帯血 CK 値との間に違いは見られなかった。一方、筋ジス犬の臍帯血 CK 値は正常犬の帯血に比べて既に約 5 倍高値を示していたが、筋ジス犬の呼吸開始後の静脈血 CK 値はさらに筋ジス犬臍帯血の 35 倍、正常犬の呼吸開始後静脈血の 150 倍に増加していた。各犬群で血清 CK 値は、呼吸開始後 30 分までに急速に増加し、呼吸開始後 4~8 時間後の間にピークに達して 48 時間後には臍帯血 CK 値のレベルまでに戻っていたが、一定して筋ジス犬で高値を示していた。呼吸開始前の横隔膜の病理では、カルシウム陽性 opaque 線維数が散見されるのみで、筋の基本的構築は保たれていたが、呼吸開始後では、多数のカルシウム陽性 opaque 線維数、間質の増大を示し、硝子様変性像を呈し、好中球などの炎症細胞の浸潤はほとんど見られなかった。以上の結果から、呼吸開始による急激な機械的負荷により横隔膜の筋線維の断裂を含む著しい筋障害が起こったと考えられた。一般に、DMD では出生時に呼吸障害は認めないが、未熟児においては呼吸障害が高度であることが報告されている。筋ジス犬と DMD の呼吸障害の出現時期の違いは、筋ジス犬を含めイヌでは筋発達に他の動物やヒトに比べてかなり遅れていることから、出生時の筋成熟の違いが関連している可能性がある。また、血清 CK 値の経時的観察から生後 48 時間後には全犬で臍帯血のレベルまで戻っていたが、筋ジス犬は高値を示していた。

ことは、少なくとも生後2日以降には正常犬や保因犬で見られた分娩の影響はなくなっていると考えられ、同時点での血清CK値を用いた新生児のスクリーニングが可能であることを示唆している。DMDの早期診断は、将来の家族計画や今後開発されるうる治療法を早期より検討する上で重要と考えられるため、新生児期の様々な時点において血清CK値を測定することで、DMDの新生児スクリーニングの時期について新たな知見が得られる可能性がある。

次に、cDNA マイクロアレイを用いて筋ジス犬の横隔膜において呼吸開始前後で発現が増加している遺伝子について検討した。また、マイクロアレイの結果において、呼吸開始前の正常犬と筋ジス犬の比較、および筋ジス犬の呼吸開始前後の比較で10倍以上に増加していた遺伝子については、定量的RT-PCR法を用いて発現量を確認し、タンパク質レベルおよび局在についてそれぞれウェスタンブロット法および免疫組織化学法で検討した。その結果、呼吸開始前の筋ジス犬ではオステオポンチンが正常犬横隔膜の約27倍に著しく発現しており、タンパク量の増加と筋細胞質内および間質に局在することを確認した。また、オステオポンチンは呼吸開始後の筋ジス犬横隔膜においても高い発現を有していた。オステオポンチンは、ジストロフィン欠損筋の再生早期に高発現していることや、線維化の促進に関連することが報告されている。オステオポンチンの活性化は、stretch-activated channelにより流入した細胞内カルシウムイオンによって起こり、好中球やマクロファージを誘導するサイトカインとしての役割を有している。我々のデータと既報告を考え合わせると、オステオポンチンは筋ジストロフィーの病態のより早期の段階から発現して炎症細胞を誘導などに関連し、さらに後期に起こる線維化にも関与していると考えられ、DMDの病態に本質的な役割を担っている可能性がある。現在、DMDに対する治療における標的分子の一つとして考えられている。

呼吸開始後の筋ジス犬横隔膜では、転写因子/シグナル伝達分子である *c-fos* および *egr-1* が筋細胞核および細胞質に強く発現していた。即初期遺伝子である *c-fos* および *egr-1* は局所的な細胞内カルシウムイオン濃度により制御され、下流の様々な遺伝子を誘導する。また、炎症/免疫応答遺伝子である *IL-6* および *IL-8* の発現も筋ジス犬横隔膜で著しく増加し、筋細胞質に局在していた。*IL-6* および *IL-8* は、それぞれ *EGR-1* および *c-Fos* の下流遺伝子であり、ともに筋細胞内で産生されるサイトカイン(マイオカイン)として運動後の正常骨格筋において発現が増加することが報告されている。*IL-6* は、正常骨格

筋の代謝恒常性の維持に関わっている可能性が指摘されているが、機械的負荷後のジストロフィー筋における炎症誘発的な役割を担っているかもしれない。*IL-8* は傷害部位における好中球の誘導に関連する主なケモカインである。抗体を用いた好中球の除去が *mdx* マウス筋壊死を減少させたことから、好中球がジストロフィーの初期の病態の中心的な役割を担っていることが報告されている。以上から、ジストロフィー筋における機械的負荷から炎症性細胞が浸潤するまでの分子機構を明らかにすることができた。

我々は、新生仔筋ジスの高CK血症の原因を究明することで、呼吸開始による機械的負荷前の横隔膜においてはオステオポンチンの発現が増加していること、呼吸開始による機械的負荷後の横隔膜では、筋形質膜の破綻とカルシウムの流入がはじめに起こり、次いで即初期遺伝子が発現して下流の分子である *IL-6* や *IL-8* のサイトカイン、ケモカインの発現を増加させて好中球などの炎症性細胞が誘導されるという二段階仮説を提案する。筋ジストロフィーでは筋障害や壊死により血清CKが著しく高い値を示すことから診断に用いられてきたが、運動により値が容易に変動するために診断や病勢の把握には問題がある。そこで、その他の分子マーカーが求められてきた。本研究で同定した遺伝子および分子は、筋ジストロフィーの病態機序に新たな視点を与えるのみならず病勢や治療効果の評価を得る上で新たな分子マーカーとなる可能性がある。

胎仔治療については、抗炎症作用の強いデキサメサゾン注を用いて胎仔治療を試みた。帝王切開1時間前に2mgを投与した保因犬から生まれた筋ジス犬の血清CK値は115,200 U/L、12,170 IU/L、自然分娩前日に2.72mgを2回投与した保因犬から生まれた筋ジス犬の血清CK値は66,000 U/L、18,270 IU/L、56,200 IU/L、帝王切開前日に1.98 mg及び当日に1.98 mgを追加投与した保因犬から生まれた筋ジス犬の血清CK値は199,000 U/L、117,800 IU/Lであった。同じ分娩でも血清CK値に大きな開きが認められた上、投与量および投与間隔に一定の傾向は認められなかった。高度な筋傷害に対しては、ステロイド剤では筋壊死を抑制することは困難と考えられた。そこで、胎仔期にジストロフィンを発現させることが可能なAAVベクターを用いたジストロフィン遺伝子治療を計画し進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H,

- Shin JH, Ohshima-Hosoyama S, Nishiyama A, Kobayashi M, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S. Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 20: 168-177, 2012. doi: 10.1038/mt.2011.181. (査読有)
2. Yokota T, Nakamura A, Saito T, Nagata T, Partridge T, Hoffman E, Takeda S. Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther* 22: 306-315, 2012. doi: 10.1089/nat.2012.0368. (査読有)
 3. Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Nagaraju K, Hoffman E, Partridge T, Takeda S. Demonstration of systemic exon 45-55 multiple skipping in dystrophic mdx52 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13763-13768, 2012. doi: 10.1073/pnas.1204638109. (査読有)
 4. Ito D, Kitagawa M, Jeffery N, Okada M, Yoshida M, Kobayashi M, Nakamura A, Watari T. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an Alaskan malamute. *Vet Rec* 169: 127, 2011. doi: 10.1136/vr.d2693. (査読有)
 5. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscle reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet* 20: 1787-1799, 2011. doi: 10.1093/hmg/ddr062. (査読有)
 6. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 6: e18388, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0018388. (査読有)
 7. Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 378: 546-547, 2011. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61028-3. (査読有)
 8. Nakamura A, Takeda S. Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications. *J Biomed Biotech* 2011: 187393, 2011. doi: 10.1155/2011/184393 (査読有)
 9. Aoki T, Nakamura A, Yokota T, Saito 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: 1995-2000, 2010. doi: 10.1038/mt.2010.186. (査読有)
 10. 中村昭則, 武田伸一. 遺伝性神経・筋疾患, 診断と治療の最前線, Duchenne型筋ジストロフィーに対するアンチセンス・モルフォリノを用いたエクソン・スキッピング治療, 前臨床試験の成果と臨床応用への展開. *脳と発達* 42: 117-123, 2010. (査読無)
- [学会発表] (計 9 件)
1. 宮崎大吾, 中村昭則, 福島和広, 吉田邦広, 武田伸一, 池田修一: Matrix Metalloproteinase (MMP)-2欠損による骨格筋再生障害とそのメカニズムの解明. 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月19日, 名古屋
 2. 中村昭則, 小林正典, 池田修一, 武田伸一: 筋ジストロフィー犬横隔膜におけるジストロフィー変化の二段階制御機構. 第52回日本神経学会学術大会. 2011年5月19日, 名古屋
 3. 永田哲也, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン53スキッピングの試み. 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月19日, 名古屋
 4. 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノ人工核酸が筋線維に取り込まれる機構の解明. 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月18日, 名古屋
 5. Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping exon 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequence found in study with canine muscular dystrophy/ 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), 10.15, 2010, Kumamoto
 6. 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. America society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, 5.21, 2010, Washington DC, USA
 7. Yokota T, Saito T, Urasawa N, Nagata T, Nakamura A, Kore R, Sazani P, Partidge T, Takeda S, Hoffman E: Multiple-exon skipping using cell-penetrating morpholinos for dystrophic dogs. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting,

- 5.20, 2010, Washington DC, USA
8. 中村昭則、小林正典、武田伸一：筋ジストロフィー犬新生仔劇症型の病態機序に関する検討（第2報）．第51回日本神経学会総会、2010年5月20日、東京
 9. 宮崎大吾、福島和広、中村昭則、吉田邦広、武田伸一、池田修一：Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 欠損の dystrophin 欠損骨格筋再生への影響．第51回日本神経学会総会、2010年5月20日、東京

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：筋ジストロフィーの病態及び治療法評価のための分子マーカー
発明者：武田伸一、中村昭則、小林正典、岡田尚巳
権利者：独立行政法人国立精神神経医療研究センター
種類：特許
番号：特願 2011-142312
出願年月日：2011年6月27日
国内外の別：国内
2. 名称：筋変性疾患の検出方法、及び治療効果判定方法
発明者：裏出良博、有竹浩介、丸山敏彦、鎌内慎也、武田伸一、中村昭則
権利者：公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所及び国立精神神経センター
種類：特許
番号：特願 2011-503802
出願年月日：2010年3月8日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

1. 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部
http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html
2. 国立大学法人信州大学医学部第三内科
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-3nai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 昭則 (NAKAMURA AKINORI)
信州大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10303471

(2)研究分担者

武田 伸一 (TAKEDA SHIN'ICHI)
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
研究者番号：90171644

(3)連携研究者
なし