

20050081PA

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

骨格筋増殖抑制因子 myostatin の活性阻害による
筋ジストロフィー治療薬の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 砂田 芳秀

平成18(2006)年 3月

目次

I. 総括研究報告

骨格筋増殖抑制因子 myostatin の活性阻害による筋ジストロフィー治療薬の開発

----- 1

砂田芳秀

II. 分担研究報告

1. Myostatin prodomain を用いた myostatin 阻害療法の開発

----- 6

砂田芳秀

2. myostatin の生体内阻害分子 follistatin の作用を基にした myostatin の活性遮断
分子の創製と筋ジストロフィー治療

----- 9

土田邦博

3. RNA 干渉を用いた myostatin 活性阻害による筋ジストロフィー治療法の開発

----- 12

野地澄晴

4. 欠損型 myostatin 受容体を用いた myostatin シグナル遮断

----- 15

濃野 勉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 24

骨格筋増殖抑制因子 myostatin の活性阻害による筋ジストロフィー治療薬の開発

主任研究者 砂田芳秀 川崎医科大学医学部 教授

研究要旨： myostatin 阻害活性を有する prodomain 領域を変異 caveolin-3 筋ジストロフィーモデルマウスに遺伝子導入すると、筋萎縮と筋力低下が著明に改善することを明らかにした。さらに、この改善メカニズムには caveolin-3 による myostatin 受容体の活性化抑制機構が関与することを解明した。Prodomain の myostatin 活性化阻害領域を 90 アミノ酸断片まで絞り込んだ。Myostatin に結合し、活性を抑制する生体分子 follistatin が知られているが、より低分子で、myostatin に対する阻害特異性の高い follistatin 由来ペプチドを開発した。この遺伝子導入マウスを作出し、骨格筋量の増大を確認した。さらに、筋ジストロフィーモデルマウスとの交配により筋ジストロフィー病態の軽減効果を認めた。マウス筋芽細胞由来の C212 細胞において、Myostatin の細胞膜受容体である II 型 activin 受容体 A 型 (ActRIIA) が筋特異的に発現していることを明らかにした。従って、細胞外のリガンド結合ドメインのみからなる欠損型 ActRIIA により myostatin シグナルを遮断できる可能性がある。

分担研究者

砂田芳秀 川崎医科大学医学部・教授
野地澄晴 徳島大学工学部・教授
土田邦博 藤田保健衛生大学医学部・教授
濃野 勉 川崎医科大学医学部・助教授

A. 研究目的

筋ジストロフィーでは多くの原因遺伝子が同定され病態メカニズムが解明されてきたが、未だに有効な治療法は確立されていない。本研究の目的は、骨格筋増殖抑制因子である myostatin 活性阻害による筋ジストロフィー治療薬を開発することにある。Myostatin 活性阻害の戦略として①活性抑制ペプチド薬、②欠損型 myostatin 受容体、③RNA 干渉による myostatin 発現抑制を 3 つの柱と位置づけ、多面的なアプローチにより治療薬を開発するとともに、筋ジストロフィーモデル動物を用いてその治療効果を解析し、至適な drug delivery system を構築する。一般臨床への普及や患者コンプライアンスの観点から、静脈投与可能な安全で有効性の高い治療薬の開発が必要とされている。安全かつ有効な治療薬が開発されれば、これまでまったく有効な治療法がなかった筋ジストロフィー患者には大きな福音となる。

また経静脈性に投与が可能であれば患者の負担も少なく、かつ一般の医療機関でも実施可能な普遍的な治療法になりうる。さらに myostatin 活性阻害という治療戦略は、筋ジストロフィーだけではなく、先天性ミオパチーなど他の筋疾患や神経原性筋萎縮、廃用性筋萎縮などに対する治療効果も期待できる。

B. 研究方法

1 Myostatin prodomain 関連ペプチド薬の開発

①筋ジストロフィーモデルマウスである変異 caveolin-3 トランスジェニックマウスを prodomain 過剰発現トランスジェニックマウスとの交配により prodomain 遺伝子を導入し、myostatin 阻害の治療効果を解析する。

②Myostatin 受容体と caveolin-3 の分子相互作用の解析 tag を付加した myostatin 受容体 (ALK4 または ALK5) と caveolin-3 の発現ベクターを培養細胞で共発現させて、二重免疫染色、免疫沈降法、リン酸化アッセイ、ルシフェラーゼ活性アッセイにより、分子相互作用を解析した。

③Myostatin 前駆体蛋白の prodomain 領域 (36kDa) は myostatin 活性化阻害作用を持つ。

prodomain 領域をオーバーラップする数個の断片に分割しそれぞれの発現ベクターを構築する。それを培養細胞に導入し、レポーター遺伝子アッセイ系により myostatin 阻害活性を解析し、阻害活性領域を特定する。

2. Follistatin 関連ペプチドによる myostatin 阻害療法開発

まず follistatin の主要ドメイン構造をシャッフルしたキメラ分子を数種類作出して、その中から myostatin 阻害の特異性の高い分子の選択を行なった。

こうして得られた follistatin 由来ペプチド遺伝子をマウス受精卵に注射してトランスジェニックマウスを作出し、その骨格筋表現型を解析した。

3. 欠損型 myostatin 受容体の治療応用の検討

ニワトリ胚の whole-mount in situ hybridization により個体発生における myostatin 受容体 ActRIIA および ActRIIB の発現分布を時間的・空間的に解析する。

4. RNAi による myostatin 発現抑制療法

myostatin cDNA の一部 400bp の shRNA を転写できるように pDECAP ベクターを構築し、このプラスミドを用いて myostatin の shRNA を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

C. 研究結果・考察

1 prodomain の治療効果

①筋ジストロフィーモデルマウス（変異 caveolin-3 マウス）に prodomain を導入すると、生後4週目から体重増加が正常対照マウスとほぼ同じレベルに改善した。生後 週での筋病理組織所見をみても、二重変異マウスでは caveolin-3 が欠損しているにもかかわらず、筋線維の数およびサイズともに正常化していた。握力測定では、やはり生後4週目から握力の改善がみられるようになり、正常対照マウスを凌駕した。

②骨格筋における myostatin シグナルを細胞内エフェクター分子であるリン酸化 smad-2 および myostatin シグナルの標的遺伝子である p21 の発現をそれぞれウエスタンブロット法とノザンブロット法で解析した。変異 caveolin-3 マウスではリン酸化 smad-2 および p21 がともに増加し myostatin シグナルが過剰

となっていたのに対して、prodomain を導入した二重変異マウスではリン酸化 smad-2 と p21 のレベルはともに正常化しており、prodomain により myostatin シグナルが抑制されたことが確認された。

③培養細胞系で caveolin-3 と myostatin 受容体（ALK-4, ALK-5）を共発現させると、共局在し、免疫沈降された。野生型 caveolin-3 の発現により myostatin シグナルが抑制される一方で、変異型 caveolin-3 を発現すると myostatin シグナルは増強された。このことから、caveolin-3 は II 型 myostatin 受容体に結合してその活性化を抑制的に調節していると考えられた。一方、変異 caveolin-3 はむしろ受容体の活性化を促進する gain of function を有すると考えられる。

④培養細胞におけるルシフェラーゼアッセイのシステムを用いて myostatin 阻害活性部位を 90 アミノ酸断片まで絞り込んだ。

2 Follistatin 由来ペプチドの治療効果

①まず follistatin の主要ドメイン構造をシャッフルしたキメラ分子を数種類作出して、その中から myostatin 阻害の特異性の高い分子の選択を行なった。こうして得られた follistatin 由来ペプチド遺伝子をマウス受精卵に注射してトランスジェニックマウスを作出し、その骨格筋表現型を解析した。その結果、myostatin 阻害により筋線維数の増大と筋線維径の増大の両方で筋肥大をきたすことが確認された

②follistatin キメラ分子マウスと筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスと交配を行い、二重変異マウスにおける治療効果、すなわち筋ジストロフィー病態の改善効果を解析した。その結果、筋線維サイズが増大し、rotarod での運動機能の改善も確認された。

3 欠損型 myostatin 受容体の治療応用

①myostatin が最初に結合する II 型受容体（ActRII）には A, B2 種類のタイプがある。今回ニワトリ胚の whole-mount in situ hybridization で検討した結果、A 型は主に筋肉で特異的に発現するのに対して、B 型は主に神経管で発現することが明らかになった。従って、myostatin シグナルを筋特異的に遮断するには ActRIIA をターゲットにすべきであることが示唆された。今後は ActRIIA の欠損型受容体の創薬化が期待される。

4 RNA 干渉による myostatin 抑制

pDECAP ベクターを用いて、マイオスタチン cDNA の一部 400bp の shRNA を転写できるように設計した。このプラスミドを用いて、マイオスタチンの shRNA を発現するトランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンがゲノムに組み込まれているクローンについて、体重の変化をモニターしたが、同腹の正常マウスと有意な差は得られなかった。なお、コントロールとして、FGF10 遺伝子についても同様の実験を行なったが、やはり変化は得られなかった。

筋ジストロフィーなどの萎縮性筋疾患に対処する必要がある。

D. 結論

近年、筋ジストロフィーの治療法として骨格筋増殖抑制因子 myostatin の活性阻害が有用であることが報告され、米国では myostatin 阻害抗体の臨床応用が始まっている。われわれは阻害抗体以外のアプローチにより、myostatin を治療標的とする治療薬開発をめざして研究を行なっている。

(1) myostatin 前駆蛋白における prodomain が myostatin の活性化を強力に阻害し、筋ジストロフィーモデルマウスに遺伝子導入すると、筋萎縮と筋力低下を著明に改善することを明らかにした。さらに、この改善メカニズムには caveolin-3 による myostatin 受容体の活性化抑制機構が関与することを世界に先駆けて解明した。Prodomain の myostatin 活性化阻害領域を 90 アミノ酸断片まで絞り込むことができた。

(2) Myostatin prodomain 以外に生体内で myostatin に結合し、その活性を抑制する生体分子として follistatin が知られている。Follistatin よりも低分子で、myostatin に対する阻害特異性の高い follistatin 由来ペプチドを開発した。遺伝子導入マウスを作出し、骨格筋量の増大を確認した。さらに、筋ジストロフィーモデルマウスとの交配で筋ジス病態の軽減効果を認めた。

(3) Myostatin は細胞膜受容体である II 型 activin 受容体に結合して、そのシグナルを細胞内へ伝え筋芽細胞の分化を調節している。従って、細胞外のリガンド結合ドメインのみからなる欠損型受容体を過剰に投与すれば、

myostatin シグナルを遮断できる可能性がある。Activin 受容体には A, B の二種類があるが、マウス筋芽細胞由来の C212 細胞で解析した結果、A 型が筋特異的に発現していることを見いだした。

(4) RNA 干渉 (RNAi) を用いて myostatin 発現を抑制する治療法開発にも取り組んでいる。しかし、Myostatin の shRNA を pDECAP を用いて in vivo で作成する方法による RNAi 治療では、有効な結果が得られなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bao Y.L., Tsuchida K., Liu B., Kurisaki A., Matsuzaki T., Sugino H. (2005). Synergistic activity of activin A and basic fibroblast growth factor on tyrosine hydroxylase expression through ERK1/ERK2 MAPK signaling pathways. *J Endocrinology* 184, 493-504
- 2) Takamura K., Tsuchida K., Miyake H., Tashiro S., Sugino H. (2005). Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in Rat. *J Surgical Res.* 126, 3-11.
- 3) Tsuchida K. (2006). The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6, 147-154.
- 4) Liu Z.H., Tsuchida K., Matsuzaki T., Yamakawa N., Bao Y.L., Kurisaki A., Sugino H. (2006) Characterization of splicing variants of activin receptor- interacting protein 2 that augment activin signaling. *J Endocrinology* (in press)
- 5) Ohuchi, H., Yasue, A., Ono, K., Sasaoka, S., Tomonari, S., Takagi, A., Itakura, M., Moriyama, K., Noji, S., Nohno, T.. Identification of cis-element regulating expression of the mouse Fgf10 gene during inner ear development. *Dev Dyn.* 233, 177-187 (2005)
- 6) Narita, T., Sasaoka, S., Udagawa, K., Ohyama, T., Wada, N., Nishimatsu, S., Takada, S., Nohno, T.. Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development. *Dev Dyn.* 233, 282-287 (2005)

- 7) 土田邦博 (2005) activin と inhibin、アクチビン受容体、follistatin、MIS と MIS 受容体、myostatin, サイトカイン・増殖因子、用語ライブラリー、p. 262-268 および p. 276-280.
- 8) 土田邦博 (2005) TLO 推薦のバイオシーズ & 技術集 筋力を up させ、体脂肪を減らす バイオ分子シーズ, Bio テクノロジージャーナル、VOL. 5, 204-206.
- 9) 土田邦博 (2005) フォリスタチンと FLRG による骨格筋量・体脂肪量調節機構とタンパク質創薬、生化学 77, 440-443
- 10) 大内淑代、野地澄晴 マイオスタチンの活性阻害によるミオパチー治療の展望、Annual Review 神経、pp19-26 中外医学社(2006)
- 11) 山本康弘, 高田温行, 森口隆彦, 和田直之, 本間隆義, 濃野 勉 顎顔面形態形成に関与する Wnt ファミリーの発現パターン 川崎医誌 31, 97-105 (2005)
- 12) 濃野 勉 形態形成にかかわる Wnt ファミリーの機能的多様性. 第 26 回両備てい園記念財団助成金報告書, 印刷中 (2006)
- 砂田芳秀 ミオスタチンプロドメインによる変異カベオリン-3 トランスジェニックマウス表現型の改善 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25-27
- 6) 大澤 裕、砂田芳秀他 Caveolin-3 による myostatin signal の制御 平成 17 年度厚生労働省・筋ジストロフィーおよび関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究 (清水班)・班会議 東京、2005.12.2
- 7) 砂田芳秀 (2006) Myostatin 阻害による肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの治療. 筋ジストロフィー総合班会議、東京、2006. 1. 20.
- 8) 土田邦博 (2005) 体脂肪蓄積低下とランスジェニックマウスを用いた新しい肥満治療戦略、文部科学省 特定領域研究「アディポミクス」班会議、大阪、July 29-30.
- 9) 土田邦博、中谷直史、澤田浩秀、村上達也、杉野弘、武田伸一 (2005) マイオスタチン阻害マウスを用いた骨格筋量増加作用と筋崩壊低下作用の解析 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 「筋ジストロフィーに対する根本的治療を実現するための技術集約的研究」班会議、東京、December 1.

2. 学会発表

- 1) Yoshihide Sunada: Regulation of myostatin signaling by caveolin-3, International workshop of Japan Muscular Dystrophy Research Council, Tokyo, Japan, 2005.11.29
- 2) Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada: Dramatic reversal of muscular atrophy in caveolinopathy by myostatin blockade. FASEB Summer Research Conferences. Snowmass, Colorado, USA, 2005.6.25-30
- 3) Tsuchida K., Nakatani M., Matsuo S., Sugino H. (2005) Generation of transgenic mouse models in which skeletal muscle mass is increased and adipocyte tissue mass and fat accumulation are decreased. The 10th Adiposcience Symposium Osaka, Japan, August 19-20.
- 4) Tsuchida K. (2005) Regulation of myostatin activity by follistatin and related molecules. International Workshop for Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophy by Myostatin Inhibition. Tokyo, Japan, October 29
- 5) 大澤 裕、萩原宏毅、土田邦博、村上龍文、砂田芳秀 ミオスタチンプロドメインによる変異カベオリン-3 トランスジェニックマウス表現型の改善 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25-27
- 6) 大澤 裕、砂田芳秀他 Caveolin-3 による myostatin signal の制御 平成 17 年度厚生労働省・筋ジストロフィーおよび関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究 (清水班)・班会議 東京、2005.12.2
- 7) 砂田芳秀 (2006) Myostatin 阻害による肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの治療. 筋ジストロフィー総合班会議、東京、2006. 1. 20.
- 8) 土田邦博 (2005) 体脂肪蓄積低下とランスジェニックマウスを用いた新しい肥満治療戦略、文部科学省 特定領域研究「アディポミクス」班会議、大阪、July 29-30.
- 9) 土田邦博、中谷直史、澤田浩秀、村上達也、杉野弘、武田伸一 (2005) マイオスタチン阻害マウスを用いた骨格筋量増加作用と筋崩壊低下作用の解析 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 「筋ジストロフィーに対する根本的治療を実現するための技術集約的研究」班会議、東京、December 1.
- 10) 中谷直史、澤田浩秀、村上達也、杉野弘、土田邦博 (2005) mdx 筋ジストロフィーモデルとフォリスタチン変異体発現マウスの交配による骨格筋への細胞浸潤の改善作用の解析、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、December 7-11.
- 11) Sumihare Noji, Nao Kinouchi, Akihiro Yasue, Hideyo Ohuchi, Keiji Moriyama, Regulation of myostatin gene expression by RNA interference, マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療戦略国際ワークショップ、東京、10 月 29 日 (2005)
- 12) 土田邦博 (2006) Myostatin 阻害分子の体系的開発と筋ジストロフィー治療実現への基盤研究、筋ジストロフィー総合班会議 (班員代表)、東京、January 20.
- 13) Nohno, T.. Inhibition of myostatin signaling through type II receptors for activin. International Workshop: Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophy by Myostatin Inhibition. Tokyo (Oct. 29, 2005)

14) Narita, T., Nohno, T.. A novel chicken Wnt3a isoform activates beta-catenin pathway and affects developmental events. International Symposium on "Dynamics of Developmental Systems." Kisarazu, Chiba (Nov. 3-6, 2005)

15) 寺田久美子, 和田直之, 高田温行, 大澤 裕, 砂田芳秀, 濃野 勉 欠損型 activin 受容体に

よる myostatin シグナルの遮断 第 28 回日本分子生物学会, 福岡 (Dec. 7-10, 2005)

16) 山本康弘, 高田温行, 和田直之, 本間隆義, 森口隆彦, 濃野 勉 ニワトリ胚の顎顔面形態形成における FGF-8 の役割. 第 28 回日本分子生物学会, 福岡 (Dec. 7-10, 2005)

myostatin prodomain を用いた myostatin 阻害療法の開発

分担研究者 砂田芳秀 川崎医科大学医学部 教授

研究要旨 . myostatin は骨格筋特異的 TGF-beta superfamily 分子で、骨格筋量の負の制御因子であるが、現在までに、myostatin signal 異常によって骨格筋萎縮に至ったというヒトの疾患の報告はない。Caveolin-3 は、骨格筋細胞に特異的な細胞膜 caveolae 構成蛋白であり、骨格筋のシグナル伝達系や、小胞輸送に重要な役割をになっている。Caveolin-3 のミスセンス変異によって常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー1C が生じるが、なぜ、caveolin-3 が著減し、一部細胞質に集積することが、筋萎縮に繋がるのかという分子機構については未だ不明であった。本研究により、caveolin-3 欠損が細胞内 myostatin シグナルを増強し、LGMD1C モデルマウスの筋萎縮に至ることが明らかとなった。即ち、Caveolin-3 は、type I myostatin 受容体と結合しその活性化を抑制することによって、下流の effector 分子の活性化と転写を制御し myostatin 筋萎縮シグナルを制御していることを示した。また、変異 caveolin-3 Tg マウス（ヘテロ）と、myostatin prodomain を過剰発現した myostatin 活性阻害 Tg マウス（ヘテロ）を掛け合わせて二重変異マウスを作出し、caveolin-3 変異で認められた細胞内 myostatin シグナル増強が正常化することにより、筋萎縮と筋力低下が著明に改善することを *in vivo* で証明した。以上の結果から、caveolin-3 が myostatin シグナルを抑制する結果、骨格筋萎縮を防止するという、新たな myostatin シグナル制御機構が明らかとなった。

A. 研究目的

細胞膜の特殊嵌入構造物である caveolae 構成蛋白質である caveolin-3 は、正常では 15 個から 20 個が homo-oligomer を形成し、細胞膜にターゲットして caveolae の形態形成に関わるとされる。この caveolin-3 のヘテロ変異により発症する常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD1C) では、caveolin-3 蛋白の著明な減少と、一部の蛋白が細胞質へ mislocalize することが知られているが、なぜこのことが筋萎縮に繋がるかという病態機序については解明されていない。

我々が作出した P104L 変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスは、骨格筋 caveolin-3 の著減と細胞質への集積が認められ著明な筋萎縮を特徴とするミオパチーを表現型とする LGMD1C のモデル動物である。dystrophin 欠損モデルである *mdx* マウスでも筋萎縮が認められるが、組織学的に筋線維断面積の縮小はあるが筋線維数は保たれると報告されている。我々の変異 caveolin-3 Tg マウスの筋萎縮で特徴的と考えられるのは、筋線維断面積の縮小 (hypotrophy) と、筋線維数の減少 (hypoplasia) の両者が認められることである。

一方、myostatin は骨格筋特異的な TGF-beta

superfamily 分子であり、高発現マウスが筋萎縮を来すことから、骨格筋量減少因子と考えられている。myostatin ノックアウトマウスは著明な筋肥大を来すが、組織学的には筋線維断面積の増加 (hypertrophy) と、筋線維数の増加 (hyperplasia) の両者をその特徴とする。

我々は、変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスと myostatin ノックアウトマウスが、全く正反対の筋線維の組織学的特徴を呈することから、caveolin-3 は myostatin 筋萎縮シグナルを制御しているのではないかと、caveolin-3 欠損によって myostatin 筋萎縮シグナルが脱抑制されることが、LGMD1C の筋萎縮に至る病態ではないかと仮定した。

この仮定を検証するために、我々は昨年度、変異 caveolin-3 Tg マウス（ヘテロ）と、myostatin prodomain を過剰発現した myostatin 活性阻害 Tg マウス（ヘテロ）を掛け合わせて二重変異マウスを作出し、caveolin-3 変異で認められた筋萎縮と筋力低下が著明に改善することを証明した。即ち myostatin 筋萎縮シグナルの阻害により caveolin-3 欠損による筋萎縮への病態が改善する。

そこで本年度は、この caveolin-3 変異による筋萎縮機構とその改善の至る分子機構に、

caveolin-3 と myostatin signal との直接のクロストークが関わっているか否かについて検証することを目的として、(1) caveolin-3 と myostatin serine/threonine kinase 細胞膜受容体との相互作用、(2) caveolin-3 の myostatin 細胞内シグナルへの影響、(3) マウス骨格筋の myostatin 細胞内シグナル分子の影響、について解析を行った。

これらの研究を通して、LGMD1C の病態機構を解明すると共に、最近注目されている myostatin 阻害による筋ジストロフィー治療の分子治療機構の解明を行い、臨床応用にむけて貢献したい。

B. 研究方法

caveolin-3 が myostatin signal に与える影響について、培養細胞を用いた *in vitro* の系で、まず、caveolin-3 と myostatin type I 受容体の相互作用について、(1)-I サル腎 COS-7 細胞に、FLAG-caveolin-3、caveolin-3 と、HA-type I myostatin 受容体 (HA-ALK4, HA-ALK5) を共発現させて、抗 caveolin-3 抗体と抗 HA 抗体で二重染色を行い caveolin-3 と受容体の細胞内局在を検討した。(1)-II FLAG-ないし HA-caveolin-3 と HA-ないし FLAG-type I 受容体を COS-7 細胞に共発現させ FLAG で免疫沈降-ウェスタンブロット解析で caveolin-3 と受容体の相互作用について検討した。(1)-III 常時活性型 type I myostatin 受容体と、caveolin-3 を COS-7 細胞に共発現させ、受容体の自己リン酸化レベルを *in vitro* kinase assay で解析し、myostatin 受容体活性化に対する caveolin-3 の影響を検討する。(2)-I caveolin-3 の細胞内 myostatin signal 分子に与える影響について、effector 分子 Smad2 リン酸化をウェスタンブロット解析で検討した。また(2)-II Smad 感受性ルシフェラーゼ遺伝子の転写アッセイにより解析した。次いで変異 caveolin-3 Tg マウス (ヘテロ) と myostatin 活性阻害 Tg マウス (ヘテロ) を掛け合わせて作出した4種類のマウス (野生型、変異 caveolin-3、二重変異、myostatin 活性阻害) の骨格筋を用いた *in vivo* の系で、(3)-I caveolin-3 の細胞内 myostatin の細胞内 effector 分子 Smad2 のリン酸化レベルをウェスタンブロット解析により検討した。また、(3)-II myostatin 依存性 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) である p21 の転写レベルをノザンブロット解析により検討した。

C. 研究結果

(1)-I COS-7 細胞に、caveolin-3 と、type I myostatin 受容体 (ALK4, ALK5) を共発現させると、細胞内で共局在していた。(1)-II この細胞抽出液の免疫沈降法により、caveolin-3 と type I myostatin 受容体の相互作用が認められた。(1)-III 常時活性型 type I myostatin 受容体と、caveolin-3 を COS-7 細胞に共発現させ、受容体の自己リン酸化レベルを *in vitro* kinase assay で解析した。リン酸化レベルは caveolin-3 共発現により、著明に減少を認めた caveolin-3 は type I 受容体活性化を抑制した。(2)-I 野生型及び P104L 変異 caveolin-3 導入 COS-7 細胞で、myostatin 刺激によって、effector 分子である Smad2 の活性化 (リン酸化レベル) を検討した。野生型 caveolin-3 導入細胞では、リン酸化レベルが低下し、逆に変異 caveolin-3 導入細胞では、上昇していた。(2)-II 野生型及び P104L 変異 caveolin-3 を導入したヒト胎児腎 293 細胞で、myostatin 刺激による Smad 感受性レポーター遺伝子 pGL3-(CAGA)₁₂-luc の転写レベルを検討した。野生型 caveolin-3 導入細胞では、転写レベルが低下し、逆に変異 caveolin-3 導入細胞では、上昇していた。(3)-I マウス骨格筋のリン酸化 Smad2 レベルは、野生型と比較し、変異 caveolin-3 Tg マウスでは著明に増加していた。一方、myostatin 活性阻害 Tg マウスでは、減少し、二重変異では、野生型と同等まで回復していた。(3)-II マウス骨格筋で myostatin 依存性転写因子である p21 の遺伝子発現を検討した。野生型と比較し、変異 caveolin-3 Tg マウスでは著明に増加していた。myostatin 活性阻害 Tg マウスでは減少、二重変異では、野生型と同等まで回復していた。

D. 考察

変異 caveolin-3 Tg マウスの筋萎縮は、myostatin 活性阻害マウスとの交配によって改善したため、LGMD1C は myostatin 阻害療法の適応疾患となる可能性がある。本年度の研究から、その改善の機構として、caveolin-3 と myostatin 筋萎縮シグナルには直接のクロストークがあるためと考えることができる。即ち caveolin-3 は myostatin の細胞膜 type I serine/threonine kinase 受容体と結合しその活性化を抑制することにより、細胞内

myostatin effector 分子の活性化及び myostatin 依存性遺伝子転写を負に制御する。一方、変異 caveolin-3 Tg では caveolin の欠損と変異 caveolin-3 蛋白の発現によって、myostatin signal が亢進し、筋萎縮に至ると考えられる。

Caveolin に結合するシグナル分子には、特定の caveolin binding motif があることが知られているが、我々は Type I myostatin 受容体の細胞内 serine/threonine kinase domain には、3カ所の caveolin binding motif と考えられるアミノ酸配列を確認している。また TGG-beta 1 signal はリガンド-受容体複合体の raft/caveolae を介する endocytosis により負の制御を受けるという報告がある。従って、Caveolin-3 は、myostatin type I serine/threonine kinase 受容体の細胞内 kinase domain に直接結合しその活性を抑制するか、リガンド-受容体複合体の raft/caveolae を介する endocytosis を促進するという myostatin signal 抑制機序が考え得る。Caveolin-3 の myostatin type I serine/threonine kinase 受容体抑制についての詳細な解析が、今後の課題となり、新たな myostatin 阻害療法の開発に繋がる可能性がある。

E. 結論

我々は caveolin-3 は、骨格筋細胞で、type I myostatin 受容体と結合しその活性化を抑制することによって、下流の effector 分子の活性化と転写を制御し myostatin 筋萎縮シグナルを制御していることを示した。LGMD1C の病態として、変異 caveolin-3 による、caveolin-3 蛋白の減少と細胞質への mislocalization が、myostatin 筋萎縮シグナル亢進を引き起こし、著明な筋萎縮に繋がる分子機構が考えられる。現在までに、myostatin 阻害療法は、mdx マウスの表現型を改善すると報告されるが、なぜ dystrophin 欠損による病態を myostatin 阻害が改善するかについての分子機構については明らかではない。また、laminin 欠損による dy マウスでは、myostatin 阻害療法は、効果がないと報告されている。本研究から我々は myostatin 阻害療法は LGMD1C の疾患病態に係する理にかなった治療法となると考える。今後 myostatin 阻害療法の各種筋ジストロフィーに対する臨床適応にあたり筋ジストロフィ

一の病態と myostatin signal との関連について、更に詳細な基礎的研究が必要となると考える。

F. 研究発表

1. 学会発表

1)Yoshihide Sunada: Regulation of myostatin signaling by caveolin-3, International workshop of Japan Muscular Dystrophy Research Council, Tokyo, Japan, 2005.11.29

2)Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada: Dramatic reversal of muscular atrophy in caveolinopathy by myostatin blockade. FASEB Summer Research Conferences. Snowmass, Colorado, USA, 2005.6.25-30

3)大澤 裕、萩原宏毅、土田邦博、村上龍文、砂田芳秀 ミオスタチンプロドメインによる変異カベオリン-3 トランスジェニックマウス表現型の改善 第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25-27

4)大澤 裕、砂田芳秀他 Caveolin-3 による myostatin signal の制御 平成17年度厚生労働省・筋ジストロフィーおよび関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究(清水班)・班会議 東京、2005.12.2

5)砂田芳秀(2006) Myostatin 阻害による肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの治療. 筋ジストロフィー総合班会議、東京、2006.1.20.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

myostatin の生体内阻害分子 follistatin の作用を基にした myostatin の活性遮断分子の創製と筋ジストロフィー治療

分担研究者 土田 邦博 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所

研究要旨： マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療法の開発を目指した研究を推進させた。myostatin 抑制作用を持つ組換え蛋白を設計し、治療薬候補を作製した。遺伝子導入による myostatin 抑制マウスを作製し、筋線維数とサイズの増加を確認した。筋ジストロフィーモデルマウスとの交配実験により、病態の軽減作用を確認した。

A. 研究目的

筋ジストロフィーの治療方法には、遺伝子治療、幹細胞移植治療、薬物療法がある。近年、薬物療法の中で、マイオスタチンを分子標的とする治療法が極めて有効であることが分かり、国内外で研究が推進されている。特に、米国では、マイオスタチン遮断による治療が、筋ジストロフィー治療法開発の最重要課題として研究開発が進んでいる。本申請研究の目的は、筋ジストロフィーの治療法開発に向けて、創製したマイオスタチン阻害分子による筋ジストロフィーモデル動物を用いた治療研究を推進させ、一日も早く、ヒトに使用可能な治療薬レベルにまで開発を推進することを目的としている。

B. 研究方法

マイオスタチンを阻害する方法としては、欧米で開発が推進されているマイオスタチン阻害抗体やマイオスタチン前駆体分子、マイオスタチン受容体の細胞外ドメインをマイオスタチンのアンタゴニストとして用いる方法がある。さらには、マイオスタチンの DNA ワクチン療法も考えられる。それらに加えて、マイオスタチンに生体内で結合し、その活性を抑制する天然由来の蛋白質としてフォリスタチンが知られている。フォリスタチンのマイオスタチン阻害活性は非常に強力であるが、マイオスタチン以外の TGFbeta ファミリーをも阻害するため副作用が懸念される。そこで、我々は、フォリスタチンに由来するペプチドを設計し、フォリスタチンよりも低分子で、かつ阻害活性がマイオスタチンに選択的なタンパク分子の開発に取り

組んだ。遺伝子導入マウスを作製し、モデルマウスとの交配を行ない、病態の軽減作用の検討を行なった。

C. 研究結果

フォリスタチンに由来するマイオスタチン阻害ペプチドを開発した。骨格筋に特異的に発現するマウスを作製し、骨格筋量の増大を確認した。筋繊維の数の増加（Hyperplasia）と骨格筋繊維のサイズの増大（hypertrophy）の両者が観察された。興味深いことに、マイオスタチン阻害したマウスの脂肪量は顕著に低下しており、脂肪細胞のサイズ自体が減少することも明らかになった。

また、myostatin prodomain に関しては、主任研究者との共同研究により、約 90 アミノ酸までペプチド断片を絞り込んだ。

D. 考察

近年の急速な遺伝家系の遺伝子解析から、筋ジストロフィーのほとんどすべての病型について、原因分子は明らかとなった。しかしながら、依然として有効な治療法は開発されていない。マイオスタチンを遮断することによって、筋萎縮を抑制し、骨格筋への炎症細胞浸潤を抑制する効果が期待出来る。この効果から、筋ジストロフィーの新しい治療法として、マイオスタチンを分子標的とする方法が有効であるとの研究報告が相次いでいる。本研究では、欧米が重点的に開発している、マイオスタチン阻害抗体とは異なったアプローチから、マイオスタチン遮断分子の開発を行なった。フォリスタチ

ンというホルモンを改変し、良好なマイオスタチン遮断分子が開発された。動物実験レベルでは、mdx の病態を軽減できることが確認された。マイオスタチン阻害によって、筋肉内の異常な脂肪沈着も抑制しうる。この所見は、骨格筋への細胞浸潤や脂肪沈着が見られる筋ジストロフィーの病態を、マイオスタチン遮断によって軽減出来る可能性を示唆している。今後は、マイオスタチン阻害が適応となる筋ジストロフィーの病型の検討を行なうと共に、ヒトに使用可能な治療薬レベルにまで開発を推進していきたいところである。

E. 結論

筋ジストロフィーの治療法開発で最も現実性が高いと考えられているのが、マイオスタチン阻害である。欧米では、マイオスタチン阻害抗体 (MYO-029) を筋ジストロフィー患者に投与する、phase I, II study が開始されている。本邦でも、安全性確認のための phase I study が開始された状況である。本研究において、良好なマイオスタチン阻害分子が開発された。近い将来に、厚生労働省の基準に準拠した筋疾患治療薬にすることを試み、ヒトへの phase study を行なう段階まで研究を推進させていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Bao Y.L., Tsuchida K., Liu B., Kurisaki A., Matsuzaki T., Sugino H. (2005). Synergistic activity of activin A and basic fibroblast growth factor on tyrosine hydroxylase expression through ERK1/ERK2 MAPK signaling pathways. *J. Endocrinology* 184, 493-504.

2) Takamura K., Tsuchida K., Miyake H., Tashiro S., Sugino H. (2005). Possible endocrine control by follistatin 315 during liver regeneration based on of activin receptor after partial hepatectomy in rat. *Hepato-Gastroenterology* 52, 60-66.

3) Takamura K., Tsuchida K., Miyake H., Tashiro S., Sugino H. (2005). Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in Rat. *J. Surgical Res.* 126, 3-11.

4) Tsuchida K. (2006). The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders.

Expert Opinion on Biological Therapy 6, 147-154.

5) Liu Z.H., Tsuchida K., Matsuzaki T., Yamakawa N., Bao Y.L., Kurisaki A., Sugino H. (2006) Characterization of splicing variants of activin receptor- interacting protein 2 that augment activin signaling. *J. Endocrinology* (in press)

6) 土田邦博 (2005) activin と inhibin、アクチビン受容体、follistatin、MIS と MIS 受容体、myostatin, サイトカイン・増殖因子、用語ライブラリー、p. 262-268 および p. 276-280.

7) 土田邦博 (2005) TLO 推薦のバイオシーズ & 技術集 筋力を up させ、体脂肪を減らすバイオ分子シーズ, B10 テクノロジージャーナル、VOL. 5, 204-206.

8) 土田邦博 (2005) フォリスタチンと FLRG による骨格筋量・体脂肪量調節機構とタンパク質創薬、生化学 77, 440-443.

2. 学会発表

1) Tsuchida K., Nakatani M., Matsuo S., Sugino H. (2005) Generation of transgenic mouse models in which skeletal muscle mass is increased and adipocyte tissue mass and fat accumulation are decreased. The 10th Adiposcience Symposium Osaka, Japan, August 19-20.

2) Tsuchida K. (2005) Regulation of myostatin activity by follistatin and related molecules. International Workshop for Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophy by Myostatin Inhibition. Tokyo, Japan, October 29

3) 土田邦博 (2005) 体脂肪蓄積低下とランスジェニックマウスを用いた新しい肥満治療戦略、文部科学省 特定領域研究「アディポミクス」班会議、大阪、July 29-30.

4) 土田邦博、中谷直史、澤田浩秀、村上達也、杉野弘、武田伸一 (2005) マイオスタチン阻害マウスを用いた骨格筋量増加作用と筋崩壊低下作用の解析 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 「筋ジストロフィーに対する根本的治療を実現するための技術集約的研究」班会議、東京、December 1.

5) 砂田芳秀、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、土田邦博、今村健志、宮園浩平、濃野勉、野地澄晴 (2005) Caveolin-3 による myostatin signal の制御 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

する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究」班会議、東京、December 3.

6) 中谷直史、澤田浩秀、村上達也、杉野弘、土田邦博 (2005) mdx 筋ジストロフィーモデルとフォリスタチン変異体発現マウスの交配による骨格筋への細胞浸潤の改善作用の解析、第28回日本分子生物学会年会、福岡、December 7-11.

7) 土田邦博 (2006) Myostatin 阻害分子の体系的開発と筋ジストロフィー治療実現への基盤研究、筋ジストロフィー総合班会議 (班員代表)、東京、January 20.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

RNA 干渉を用いた myostatin 活性阻害による筋ジストロフィー治療法の開発

分担研究者 野地澄晴 徳島大学 教授

研究要旨： マイオスタチンのノックアウトマウスは筋肉形成が促進されることから、マイオスタチンは筋肉形成の抑制因子であると考えられている。ヒトを含め他の生物種においてもマイオスタチン遺伝子の突然変異により、同様の表現型を呈することが報告されている。われわれは肉牛のマイオスタチン突然変異を参考にして、点突然変異型マイオスタチンを過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて骨格筋量が增大することを報告した。そこで、これの臨床応用として、ヒトマイオスタチンタンパク質を標的とした場合の突然変異マイオスタチンの投与方法およびマイオスタチン mRNA を標的として、RNA_i を利用した治療法を検討することを目的に、突然変異マイオスタチンをコードするレトロウイルスの作製、shRNA を発現するトランスジェニックマウスの作製、および siRNA のマウスへの投与方法を行なった。その結果、現在のところ、期待する効果を観察することができなかったが、その原因を究明し、実験を継続している。

A. 研究目的

骨格筋の形成を抑制する因子であるマイオスタチンを利用して、筋ジストロフィーなどの疾患の治療法を確立する目的で、研究を行なっている。以前にわれわれはドミナントネガティブタイプのマイオスタチンが骨格筋の形成を促進することを、トランスジェニックマウスを用いて報告した。また、そのマウスと筋ジストロフィーモデルマウスと交配させたマウスは、筋肉がかなり回復することを報告してきた。本研究では、マイオスタチンの活性を抑制する方法として、どのような方法が良いのかを検討している。本年度は、下記の 3 つの方法について検討ありは検討の準備を行なった。1) ヒトマイオスタチンのドミナントネガティブ型を用いた治療法。2) マイオスタチン遺伝子に対する shRNA を用いた RNA_i 治療法。3) マイオスタチン遺伝子に対する siRNA を用いた RNA_i 治療法。研究の結果を報告する。

B. 研究方法

1. ヒトマイオスタチンのドミナントネガティブ型を用いた治療法

ヒトマイオスタチンのドミナントネガティブ型タンパク質をコードする cDNA を作製した。その塩基配列は、以下のとおりである。

AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACCATGCAAAAACTGCA
ACTCTGTGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATTGTTGCTG

GTCCAGTGGATCTAAATGAGAACAGTGAGCAAAAAGAAAAT
GTGGA AAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTACTTGGAGACA
AAACACTAAATCTTCAAGAATAGAAGCCATTAAGATACAAA
TCCTCAGTAACTTCGTCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGC
AAAGATGTTATAAGACAACCTTTTACCCAAAGCTCCTCCACT
CCGGGAAGTGAATGATCAGTATGATGTCCAGAGGGATGACA
GCAGCGATGGCTCTTTGGAAGATGACGATTATCAGCTACA
ACGGAACAATCATTACCATGCCTACAGAGTCTGATTTTCT
AATGCAAGTGGATGGAAAACCCAAATGTTGCTTCTTTAAAT
TTAGCTCTAAAATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAA
CTATGGATATATTTGAGACCCGTCGAGACTCCTACAACAGT
GTTTGTGCAAACTCTGAGACTCATCAAACCTATGAAAGACG
GTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAACTTGACATG
AACCCAGGCACTGGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGAC
AGTGTGCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTAG
GCATTGAAATAAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTT
GCTGTAACTTCCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCC
GTTTTTAGAGGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCCA
GAAGGGATTTTGGTCTTGACTGTGACAGAATCACGATGCTG
TCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTGATTACAAGGATGACGA
CGATAAGTGAGTCGACGTTAACGCATGC

この cDNA をマウスに感染するレトロウイルスベクターに挿入した。現在、マウスに感染させる方法を検討している。

2 マイオスタチン遺伝子に対する shRNA を用いた RNA_i 治療法

理化学研究所において開発された pDECAP ベクターを用いて、マイオスタチン cDNA の一部 400bp の shRNA を転写できるように設計した。このプラスミドを持ちて、マイオスタチンの

shRNA を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

3. マイオスタチン遺伝子に対する siRNA を用いた RNAi 治療法

マイオスタチンに対して設計した siRNA が細胞レベルでは、マイオスタチンの発現を抑制することを確認した。このデータを参考に、in vitro で DNA/RNA トランスフェクション用試薬 (cationic polymer transfection reagent) である jetPEI (ポリエチレンイミン, PolyPlus 社) を N/P 比を 5 になるように混ぜて、マウスにインジェクションした。siRNA として 3 種類を用いた。コントロールマウス群として、jetPEI のみを投与した。I 群 (siRNA + jetPEI) として siRNA (INV_GDF8_SI455) を 1 nmol、II 群 (siRNA-MX + jetPEI) として、siRNA (GDF8_SI673+GDF8_SI297+GDF8_SI1380+GDF8_SI351) を 1 nmol、III 群 (siRNA-D + jetPEI) として、siRNA (DHARMACON siGENOME SMART pool) を 1 nmol を投与試薬とした。動物はマウス C57BC (4 週齢雄) を使用した。投与は、1 mL ポリプロピレン製注射筒及び 26G 注射針 (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用い、600 μ L を腹腔内に投与した。2 日間の間隔をあけて投与を行い、体重の変化、マイオスタチン遺伝子発現変化、血中のマイオスタチンの量を測定した。

C. 研究結果

1. ヒトマイオスタチンのドミナントネガティブ型を用いた治療法

得られた cDNA について、pDON-AI を用いて組み換えレトロウイルスを作製するベクターを構築した。そのベクターを pDON-AI-mutGDF8 と名付けた。このベクターとヘルパープラスミド pGP と pE-ampho を G3T-hi 細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクション開始から 24 時間後、新たな培地に交換し、さらに 24 時間培養をおこなった。培養後、上清を回収しフィルターでろ過した。得られた液を類する液とした。得られた組み換えウイルスの力価を測定した結果、ウイルス液 1 mL あたりのジェネティシン耐性コロニー形成能は、Ampho/DON-muGDF8 ウイルスについて、 1.6×10^6 cfu/mL であった。以上の結果を基に、マウスの血液細胞にレトロウイルスを感染し、その細胞をマウスに戻して、ドミナントネガティブマイオスタチンの効果を調べる予定である。

2. マイオスタチン遺伝子に対する shRNA を用いた RNAi 治療法

理化学研究所の石井らのグループは、通常の RNA ポリメラーゼ II を利用して、組織特異的に長い hRNA を発現し、しかもインターフェロン応答が生じない画期的なベクター pDECAP を構築するのに成功したと報告した。われわれはこのベクターを用いてマイオスタチンの産生を RNAi 法にて抑制することを計画した。pDECAP を石井から提供していただき、マイオスタチン cDNA の一部を hRNA が構築されるように組み込み、pDECAP-マイオスタチンを作製した。このベクターを用いてトランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンがゲノムに組み込まれているクローンについて、体重の変化をモニターしたが、同腹の正常マウスと有意な差は得られなかった。なお、コントロールとして、FGF10 遺伝子についても同様の実験を行ったが、やはり変化は得られなかった。現在、原因を究明中であるが、石井に私的に問い合わせたところ、彼の研究室でも論文で発表した例以外は成功していないとのことであり、これらのことから、ベクターに問題がある可能性もある。次ぎに、U6 プロモーターを持ったベクターを使用して、まず in vivo で効果を調べた。結果を図 1 に示す。レーン 5 のバンドがレーン 4 のバンドより弱いバンドになっていることから、in vivo では RNAi が生じている可能性が示唆された。

RNA interference of mouse myostatin in COS-1 cells

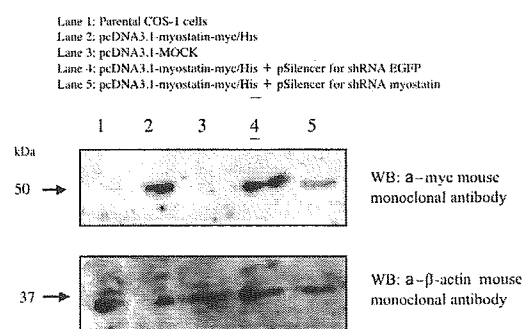


図 1. COS-1 細胞におけるマイオスタチン遺伝子に対する RNAi の効果

3. マイオスタチン遺伝子に対する siRNA を用いた RNAi 治療法

3 種類の異なる設計により得られた siRNA または siRNA 混合液を使用して、RNAi がマウ

スにおいて生じるかどうかを調べた。in vivo トランスフェクションには、筋肉細胞に siRNA が導入されるとの報告があるカチオンポリマー JetPET を使用した。さらに混合して、マウス腹腔に注射した。得られた結果は、現在の条件では効果は得られていない。現在、実験をさらに継続して、影響を観察中である。

D. 考察

現在、3 種類の方法により、治療法を模索しているが、マイオスタチンタンパク質のドミナントネガティブ型をコードするレトロウイルスについては、まだ in vivo での実験を行っていないので、今後の実験が楽しみである。投与方法として、血中への直接投与を考えているが、あらかじめ幹細胞にトランスフェクトしてから、血中にもどす方法も考える必要がある。

マイオスタチンの shRNA を pDECAP を用いて in vivo で作製することによる RNAi 治療法については、現在までに有効な結果がえられていない。ベクターの構造が複雑なため、遺伝子によっては効果が出ない可能性もある。石井らの情報からも非常に成功確率の悪い方法なようなので、この実験については中止することにした。非常に時間と経費を費やしたが、残念である。

ヒトの治療を考えると、できるだけ単純な方法が良いと考え、siRNA を直接投与する方法について実験を行なっている。陽イオンのポリマーであるポリエチルイミン(PET)は RNA と複合体を形成し、細胞内に取り込まれるとの報告があり、また実際にモデルマウスにおいて、ガン RNAi 治療効果があつたとの報告もあり、PET を使用して RNAi 効果を調べた。その結果については、まだ最終的な結果が得られていないので、結論は得られていないが、現在のところ、著しい効果は得られていない。今後、投与方法などを変更して、最も効果のある方法を調べる必要がある。

E. 結論

1) pDECAP ベクターを使用したトランスジェニックマウスにおけるマイオスタチンの RNAi 治療は、効果が現れない。

2) siRNA を直接投与する実験は、現在のところ有意な効果が現れていないが、実験を継続して条件を検討する必要がある。

G. 研究発表

1 論文発表

大内淑代、野地澄晴 マイオスタチンの活性阻害によるミオパチー治療の展望、Annual Review 神経、pp19-26 中外医学社(2006)

学会発表

Sumihare Noji, Nao Kinouchi, Akihiro Yasue, Hideyo Ohuchi, Keiji Moriyama, Regulation of myostatin gene expression by RNA interference, マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療戦略国際ワークショップ、東京、10 月 29 日 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

欠損型 myostatin 受容体を用いた myostatin シグナル遮断

分担研究者 濃野 勉 川崎医科大学 助教授

研究要旨： 胚発生において骨格筋形成は皮筋節に由来する前駆細胞が遊走しながら増殖し、筋芽細胞の増殖と分化によって進行する。この過程には種々の増殖因子、分化因子が関与し、これらの相互作用であらかじめ決められた場所に筋肉塊が形成される。この過程で一過性に発現するマイオスタチン（myostatin, MSTN）は筋芽細胞の増殖と分化を負に調節し、その欠失変異によって過剰な筋肉が形成されることが知られている。MSTN は成熟後、膜受容体である II 型アクチビン受容体（ActRII）にまず結合してからシグナルを伝え、筋芽細胞の分化を調節しているので、欠損型の受容体を過剰に適用すれば最初の段階でシグナルを遮断できる。この効果は MSTN に特異的であり、欠損型受容体は競合的に働く制御因子として使用できる。この作用をマウス筋芽細胞 C2C12 およびニワトリ胚の間充織初代培養細胞で検定した結果、ほぼ予想通りの効果が得られた。特に、A、B の 2 つある ActRII のうち、B 型は主に神経管で発現するが A 型は筋肉で特異的に発現しているので、筋肉特異的な遮断には A 型が有効である。

A. 研究目的

骨格筋の形成に対する負の調節因子として知られる MSTN は間充織系列の幹細胞から筋前駆細胞の分化、筋芽細胞の増殖と分化などを調節する因子であり、筋肉形成に対して抑制的に作用する。この作用は細胞膜の II 型受容体である ActRII、および I 型受容体として ALK4、ALK5、ALK7 を介してシグナルを細胞内へ伝える。リガンドである MSTN の受容体への結合を競合的に遮断するために、その結合を阻害するタンパク質や中和抗体などが利用されている。この分担研究課題では細胞外のリガンド結合ドメインのみからなる欠損型の II 型受容体の活性を調べた。MSTN と ActRIIA の両者は骨格筋の形成過程で共に発現しているので、この時期に MSTN シグナルを受け取る過程を特異的に遮断することで MSTN の筋分化抑制作用を阻害でき、結果的に筋肉形成を促進するので、この活性を利用すれば特異性の高い萎縮性筋疾患の治療が可能となる。

B. 研究方法

1 cDNA クローンの構築と発現

ヒト線維芽細胞 cDNA から増幅した ActRIIA、

ActRIIB の細胞外ドメインをコードする cDNA（それぞれ AR2A-DN、AR2B-DN）を V5 タグ付きの発現ベクター pcDNA3.2-DEST へ組み込み、ニワトリ由来 DF-1 細胞にトランスフェクトして発現させた。タグ抗体でタンパク質の産生効率を確認し、培養上清中（CM）に分泌されたタンパク質を回収して使用した。同様に、MSTN のプロ領域（MST-PRO）および成熟領域（MST-MAT）を発現するプラスミドを作成した。PCR プライマーの設計でこれらの C 末端領域には HA タグを導入し、発現ベクターに組換えた。元の MSTN 由来のシグナル配列ではタンパク質の産生効率が低く、また成熟タンパク質へのプロセッシングも極めて悪いので、これらは ActRII（A 型または B 型）のシグナルペプチドにつなぎ換えたクローンを構築した。

遺伝子発現系はニワトリの ASLV のサブグループ A に由来する RCAS ベクター、および動物の発現ベクター pCAGGS を一部改変して用いた。pCAGGS はクローニングサイトの下流に IRES-eGFP をつなぎ、pCAG-IEG を作成した。cDNA の入れ換えのためには Gateway System（Invitrogen）を使用した。すなわち、attR1 と attR2 を持つカセットを発現ベクターのクローニング部位へ導入し、それぞれ RCAS-DEST、pCAG-IEG-DEST を作製し、最終的な発現ベクターとして使用した。C 末端側への HA または V5 タグの導入は PCR プライマーに組み込んだ配

列、あるいはあらかじめベクターに組み込んだ配列を使用した。欠失変異の導入はPCRで増幅したDNA断片同士の直接接続で行なった。PCRによる変異の可能性を下げるためにKOD plusを使用し、最終的には塩基配列を確認した。

発現させるためのcDNAクローンの構築と改変にはattL1とattL2を持つpENTRを使用し、上述の発現ベクターまたはpcDNA3.2/V5/DESTへLR反応で入れ換えて発現系を構築した。

ニワトリ線維芽細胞CEFおよびDF-1細胞へのDNAの導入はそれぞれLipofectinおよびLipofectamine 2000 (Invitrogen)を使用した。DF-1の培養上清(CM)はトランスフェクション翌日に血清を含まない最少培地(D-MEMまたは α -MEM)に培地交換し、さらに24時間培養して調製した。

2 筋分化の検定

筋芽細胞の分化アッセイはニワトリ胚の肢芽間充織から調製した初代培養細胞(CLM)を用いて行った。発生ステージ23-24のニワトリ胚肢芽から近位側半分を切り出し、さらに筋芽細胞の移動経路である背側および腹側組織を切り出した。この組織塊を0.5% trypsin中で20分処理して、外胚葉をはがした。次いで筋芽細胞を含む間充織組織を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含Tyrode液中に移し、37°Cで40分処理した。Tyrode液を培養液に置換したのち、ピペッティングにより組織塊を単細胞に解離した。培養液はHam's F-12とD-MEMを等量混合したものを基本培地とし、ウシ胎児血清とニワトリ胚抽出液をそれぞれ5%添加して用いた。24-well plateに1穴あたり 3.0×10^5 個の細胞を播種した。37°C、5% CO_2 下で4時間培養して細胞を培養皿底面へ付着させ、目的とする細胞培養上清を添加して3~5日間培養を継続した。

筋芽細胞C2C12での検定は10%ウシ胎児血清を含むD-MEMで継代維持し、2%ウマ血清または2.5%ウシ胎児血清を含む培地で筋分化を誘導した。アッセイ用の小型4-well plateに 2×10^4 細胞を播き、翌日分化用培地(0.5 ml)に交換し、同時に組換えタンパク質MST-MAT、MST-PRO、またはAR2A-DN、AR2B-DNを発現したDF-1のCMを加えてさらに3~5日間培養を継続した。

3 蛍光抗体法での免疫染色(IHC)

ニワトリ胚はCa、Mg不含phosphate-buffered saline (PBS)中で羊膜を取り除き、4% paraformaldehyde/PBSで一晩固定した。そ

の後、PBSに置換し、10分間で2回振盪した。続いて25% ethanol/PBT (PBS + 0.1% Tween 20)、50% ethanol/PBT、75% ethanol/PBT、100% ethanolで順にそれぞれ5分間振盪し、最後に再度100% ethanolで10分間振盪した後、-20°Cで保存した。

この試料をethanolとxyleneでの行程を経てパラフィン包埋し、厚さ7 μm の組織切片を作製した。切片を脱パラフィン処理後、10 mM citrate buffered saline (pH 6)中で3分間3回マイクロウェーブ処理し、PBSで10分間2回洗浄した。TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)に1% ヤギまたはウマ血清を加えたブロッキング液で処理し、TBSで希釈した一次抗体と反応させた。TBSで洗浄後、同様に蛍光標識した二次抗体と反応させ、洗浄した。その後DAPIで核を染色し、蛍光顕微鏡で検鏡した。

培養細胞の蛍光抗体染色は細胞を70% ethanol-formaldehyde-acetic acid (20:2:1)で固定後、PBSで洗浄し、その後のブロッキングと抗体処理は組織切片の場合と同様に行った。

用いた抗体(メーカー)と希釈倍率は次の通り。抗MyHC速筋型(Sigma) 1/400、抗MyHC遅筋型(Sigma) 1/1000、抗histone H3 (Ser28)-P⁺ 1/1000、抗HA (Roche) 1/500、抗V5 (Bethyl) 1/200。

4 *in situ* hybridization (ISH)法

Digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche)を用いてT7またはSP6 RNAポリメラーゼで37°C、2時間反応して転写反応を行い、DIG-11-UTP標識されたantisense RNAプローブを合成した。DIG標識cRNAは必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

Whole-Mountの場合、-20°Cで保存してある試料は100% ethanolを75% ethanol/PBTに置換し、5分間振盪し再水和を行った。その後、50% ethanol/PBTで5分間、25% ethanol/PBTで5分間、PBTで5分間それぞれ振盪した後、再度PBTに置換し5分間振盪した。Proteinase K/PBT溶液(2 $\mu\text{g/ml}$)に置換し、37°Cで15分間振盪した。その後、glycine (2 mg/ml)/PBT溶液に置換後、室温で5分間、PBTで5分間2回振盪した。2% glutaraldehyde + 4% paraformaldehydeを含むPBTに置換し、20分間再固定した。その後、PBTに置換し5分間振盪した(2回繰り返す)。次いでPBT中68°Cで50分間熱処理した。十分に冷却したPBTに置換し、氷上で5分間振盪した。6% H_2O_2 /

methanol 溶液に置換し、氷上で 1 時間振盪した。その後、PBS で 5 分間、PBT で 5 分間振盪し、68℃ の pre-hybridization mix (50% formamide, 5×SSC pH 7.0, 50 μg/ml tRNA, 1% SDS, 50 μg/ml heparin) に置換し、1 時間振盪した。

Digoxigenin (DIG)-labeled RNA probe (0.35 μg) を含む pre-hybridization mix 溶液 (0.7 ml) に置換し、68℃ で一晩 hybridization を行った。その後、Hybridization Wash Solution 1 (5×SSC, 50% formamide, 1% SDS) に置換し振盪した。再度新たな Hybridization Wash Solution 1 に置換し、68℃ で 30 分間振盪して洗浄を行った。その後、Hybridization Wash Solution 2 (2×SSC, 50% formamide, 0.1% Tween20) で 5 分間、次いで同じ液を用いて 68℃ で 30 分間、さらに TBST (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で室温 5 分間を 3 回繰り返し、ブロッキング溶液 (1.5% Blocking Reagent を含む TBST) で 60~90 分間、それぞれ振盪した。最後にブロッキング溶液を除き、抗体を加え 4℃ で一晩抗体反応を行った。

TBST に置換し 5 分間振盪を 4 回行った。新たな TBST に置換して、30 分間振盪を 8 回、NTMT (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) に換えて 3 回、10 分間振盪による洗浄を行った。その後、NTMT を発色液 (NBT 4-Nitro blue tetrazolium chloride + BCIP 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate を含む NTMT) に換え、発色反応を開始した。発色開始 10 分後から発色状況を確認し、発色が完了したところで PBT に置換し、5 分間振盪を 3 回行い、発色反応を停止した。次に 50% ethanol/PBT に置換し、5 分間振盪後 100% ethanol に換え 1.5~3 時間振盪した。その後、50% ethanol/PBT で 5 分間、PBT で 5 分間振盪した後、撮影まで遮光して 4℃ で保存した。

切片での ISH は Whole-Mount ISH の手法に準じて行った。固定した胚を脱水後にパラフィン包埋し、厚さ 7 μm で切片を作製した。脱パラフィン処理して再水和後、Proteinase K (0.5 μg/ml) /PBT 溶液に置換し、37℃ で 10 分間、酵素処理を行った。その後、室温で glycine (2 mg/ml) /PBT 溶液に置換して 5 分間、PBT で 2 回 5 分間振盪した。4% PFA/PBT 溶液に置換し、再固定を 20 分間行った。その後、PBT に置換し 5 分間 3 回振盪した。0.1 M triethanolamine 中で無水酢酸を加えて 15 分間アセチル化を行った後、PBT に置換して 5 分間 5 回振盪した。

Whole-Mount ISH で用いた pre-hybridization mix に終濃度 10% dextran sulfate を加えたものを切片 ISH で使用し、65℃ で 1 時間処理した。DIG-labeled RNA プロブ (1.0 μg/ml) を含む pre-hybridization mix に置換し、65℃ で 16~17 時間 hybridization を行った。Hybridization Wash Solution 3 (2×SSC, pH 7.0, 50% formamide, 0.1% SDS) に置換し、65℃ で 20 分間 4 回洗浄を行った。その後、0.2×SSC + 0.1% Tween 20 に置換し 65℃ で 20 分間 4 回洗浄した。さらに TBST で室温 5 分間 2 回、ブロッキング溶液中で 15℃、1 時間、それぞれ振盪した。ブロッキング溶液を除き、抗体を加えて 15℃ で 2 時間抗体反応を行った。TBST に置換し、10 分 1 回、5 分 6 回振盪した。次に NTMT に置換し、5 分間 2 回の振盪による洗浄を行った。その後、NTMT 中に発色基質 (NBT + BCIP) を含む溶液に換え、発色反応を開始した。発色液は Whole-Mount の場合の 1/10 の濃度を用いた。発色時間は発色の状態を確認しながら 1~2 日間室温で行った。発色停止後に 0.1% Nuclear fast red/5% 硫酸アルミニウム水溶液で核を染色した。

C 研究結果

1 MSTN とその受容体の発現パターン

四肢が形成される段階で MSTN の発現パターンを調べると、皮筋節で発現が始まり、体幹部から四肢へ前駆細胞の移動が起きている場所で発現が維持されている (図 1、2)。その一方で、ActRIIA の発現は MSTN より少し早くから発現が始まり、発現の継続も MSTN よりは長い。すなわち、ニワトリ胚の肢芽では発生ステージ 23 から MSTN の発現が始まり、四肢の筋肉での発現はステージ 24 でピークになる。その後、ステージ 25 までは発現が見られるが、26 では消失する。

一方、ActRIIA の発現は皮筋節や肢芽での Pax7 の発現と重なり、ステージ 23 ではすでに有意な発現が見られる。その後、ステージ 24-26 で最も強く発現が見られ、ステージ 29-30 までは発現が持続する。

ActRIIB については、ステージ 23-26 で皮筋節、肢芽の筋肉部位での発現は全く見られず、ステージ 23-25 で神経管、肢芽の背側間充織などでの発現が見られるが、肢芽での発現はステージ 27 以降では弱くなる。

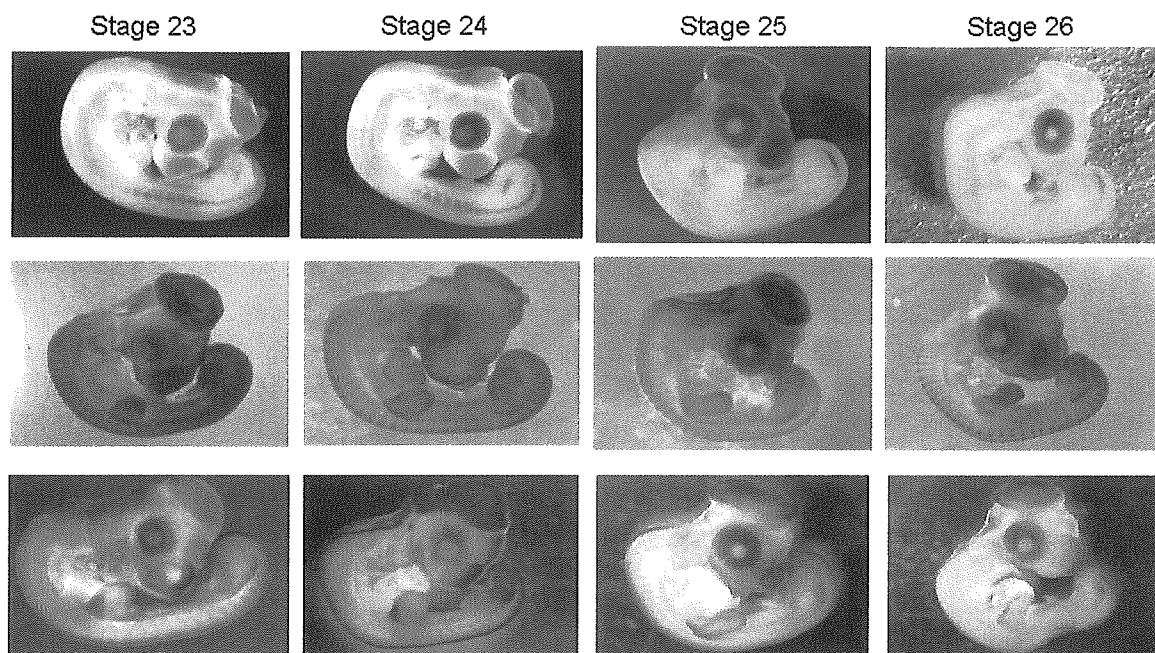


図 1. Whole-mount in situ hybridizationによるニワトリ胚におけるMSTN（上）、ActRIIA（中）、および ActRIIB（下）の発現パターン

このように、MSTN の発現は ActRIIA とはオーバーラップしているが、ActRIIB とはオーバーラップしていない。MSTN の発現は一過性であることが判明した（表 1）。

筋芽細胞へ分化する前駆細胞である衛星細胞

胞のマーカーであると言われている Pax7 の発現は、神経管背側での発現に加えて、ステージ 23 前後から皮筋節や肢芽の筋肉塊周辺で強い発現が見られる（図 1、2）。ここでの発現はステージ 26-27 まで継続し、ステージ 29-30

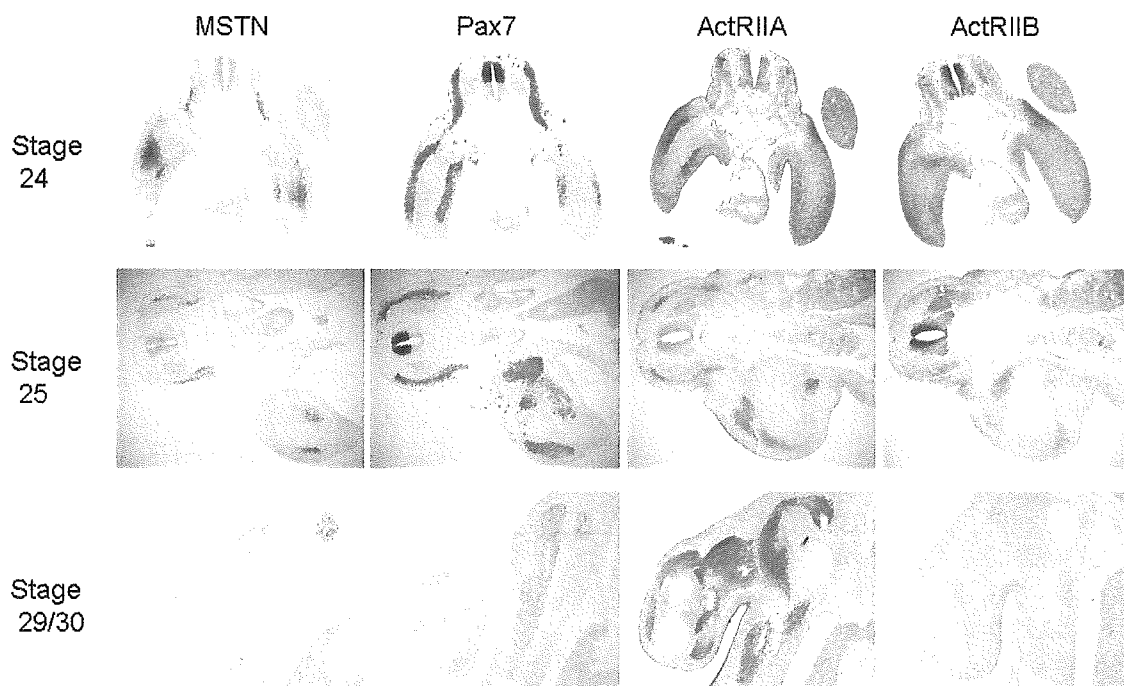


図 2. Section in situ hybridizationによるニワトリ胚におけるMSTN、Pax7、ActRIIA、および ActRIIBの発現パターン。肢芽レベルでの横断面を示す