

表 1. ニワトリ胚発生における発現パターンのまとめ

Probe	Site	St. 23	St. 24	St. 25	St. 26	Comment
Myostatin	Limb bud	+	++	+	—	*Partial
	Myotome	+	+	±*	±*	
	Neural tube	—	—	—	—	
Pax7	Limb bud	+	++	++	++	Intense at St. 24 Dorsal half
	Myotome	++	+++	++	++	
	Neural tube	++	++	+	+	
ActRIIA	Limb bud	+	++	++	++	
	Myotome	+	++	++	++	
	Neural tube	—	—	+	+	
ActRIIB	Limb bud	+	+	+	+	Weak in myoblast Intense at St. 24 Intense at St. 23, 24
	Myotome	±	+	±	±	
	Neural tube	++	++	+	+	

では筋肉塊での発現は低下するが、発現している細胞が筋肉塊の中に部分的に散在するようになる。

皮筋節でのMyHCの発現はステージ25から認められるようになり、速筋型では軸下の細胞に

限局しているが、遅筋型では軸上領域まで発現が見られる（図3）。その後、肢芽へ移動した筋芽細胞での発現が始まるが、その発現領域は速筋型の方が広範囲である。従って、MSTNの発現は時間的、空間的に遅筋の発現と関連して

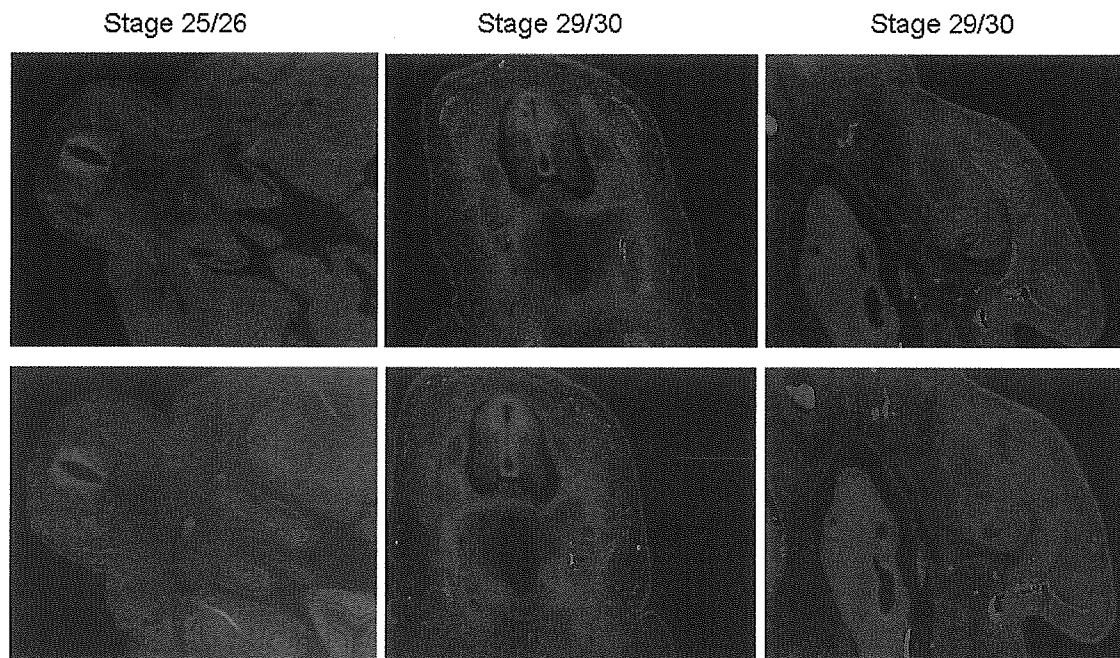


図3. 蛍光抗体染色によるニワトリ胚における速筋型（上）および遅筋型（下）MyHCの発現パターン。肢芽レベルでの横断面を示す

いる可能性がある。

2. MST-MAT、MST-PRO、AR2A-DN、AR2B-DN の DF-1 細胞での発現

全長 cDNA に HA タグ用の配列を追加してヒト MSTN タンパク質の産生を試みたが、分泌効率もプロセシングの効率も極めて低い。それゆえアミノ酸(aa) 19-266 (MST-PRO)と aa 267-375 (MST-MAT)の間で分断し、それぞれ C 末端側に

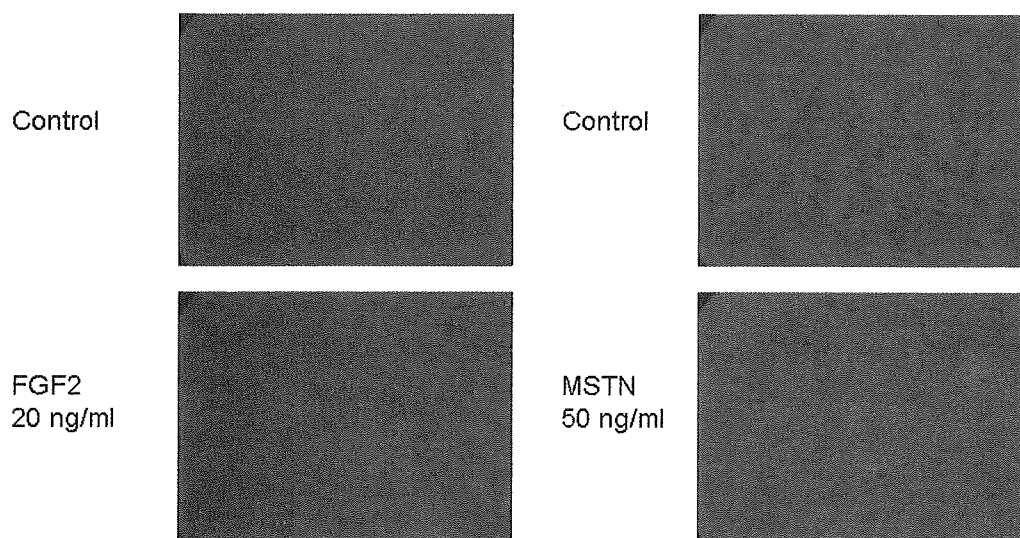


図4. 肢芽間充織細胞の初代培養におけるMSTNとFGF2の効果。ステージ24の肢芽細胞にMSTN、FGF2を加えて3日培養し、抗速筋型MyHC抗体とAlexa Fluor 594標識の二次抗体で染色、その後DAPIで核染色

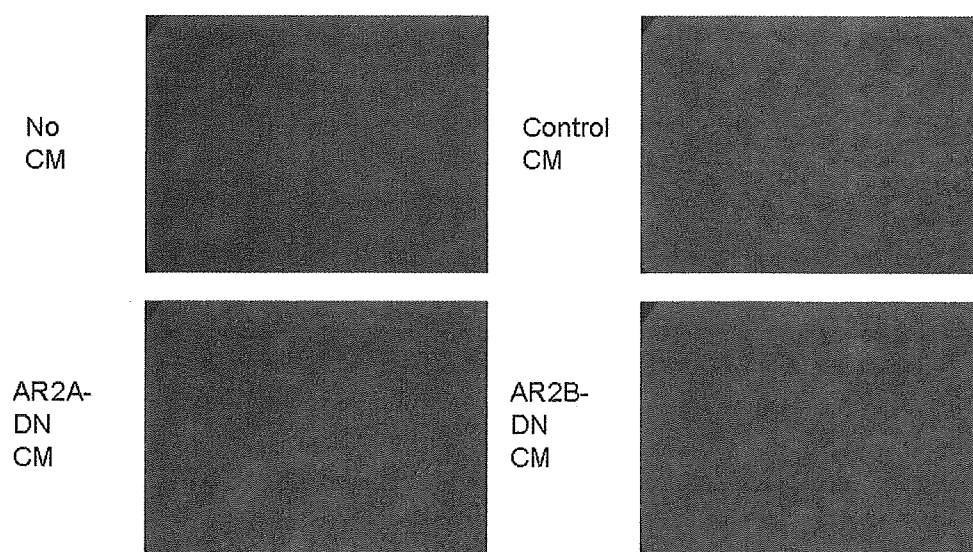


図5. 肢芽間充織細胞の初代培養におけるAR2A-DNとAR2B-DN の作用。無血清培地で発現した培養上清（CM）を加え培養。Alexa Fluor 594標識二次抗体による抗速筋型MyHC抗体での染色とDAPIでの核染色

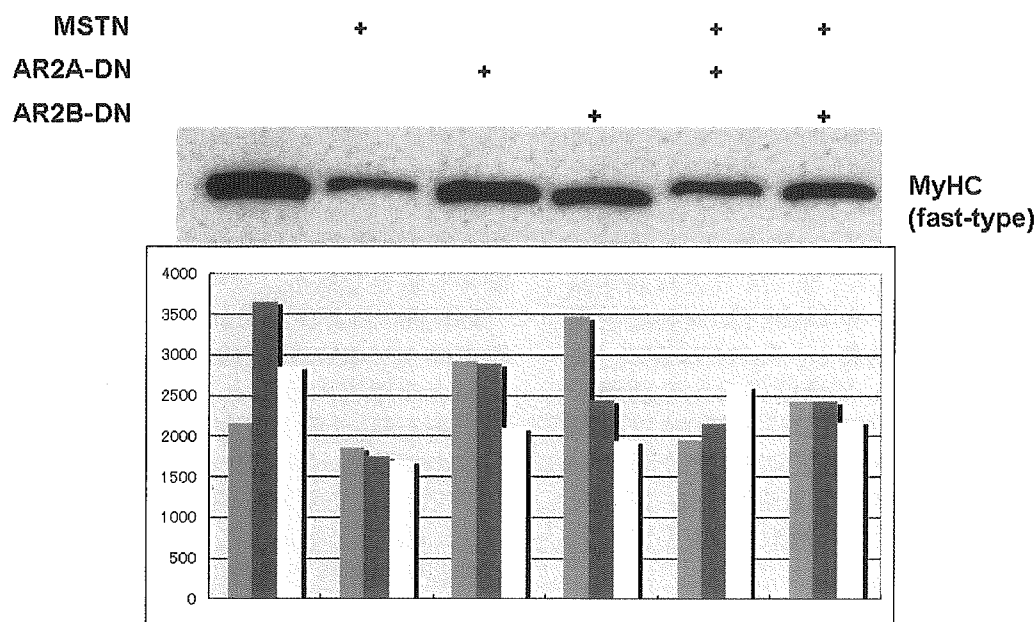


図6. 肢芽間充織の初代培養細胞におけるAR2A-DN、AR2B-DNの培養上清とMSTNの相互作用。3日間培養後、全タンパク質を抽出し、抗速筋型MyHC抗体でWestern blotを検出

HA タグを付けて別々に発現した。しかし、この場合でも細胞内にタンパク質は認められるが、培養液中へはほとんど分泌されていなかった。

一方、細胞外ドメインのみの配列に V5 タグを付けたヒト ActRIIA の aa 20-137 (AR2A-DN) も、ヒト ActRIIB の aa 23-133 (AR2B-DN) も培養液中への分泌が極めて高く、特に AR2A-DN では合成されたタンパク質がほとんど分泌されており、細胞内への残存はあまり見られなかった。このように、AR2A-DN も AR2B-DN も産生タンパク質は効率よく分泌されているのが確認された。この結果はシグナル配列の違いによるものと推測される。CM 中への産生効率は AR2B-DN > AR2A-DN であった。

次に、ActRIIA と ActRIIB のシグナル配列 (SP) に HA タグ配列を持つ MST-PRO と MST-MAT をつなぎ、AR2A (SP)-PRO、AR2A (SP)-MAT、または AR2B (SP)-PRO、AR2B (SP)-MAT として発現させた。その結果、タンパク質産生のタグ抗体による検出では、どちらのシグナル配列の場合でも効率よく MST-PRO、MST-MAT のいずれについても CM 中へ十分量が産生されていた。産生量は AR2B (SP)-PRO > AR2A (SP)-PRO > AR2B (SP)-MAT > AR2A (SP)-MAT の順であった。

これら ActRII のシグナル配列を持つクローンはいずれも RCAS ベクターへ組換えてウイルスとしての発現を試みた。

3. 筋分化に対する効果 (MSTN 作用の阻害)

マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて MSTN 作用を検証した。2%ウマ血清または 2.5%ウシ胎児血清で分化誘導をかけて検定した時、組換えタンパク質 (rMST-MAT) に対する応答が悪く、50~400 ng/ml では MyHC 抗体での染色で見える限りほとんど筋分化の抑制効果は見られなかった。10%ウシ胎児血清存在下での細胞増殖に対する抑制効果も、M 期のマーカーである histone H3-P 抗体でのラベリングで調べて差は見られなかった。細胞分化の誘導をかけたとき、C2C12 では MyHC の遅筋型の方が速筋型よりも優先して多数出現してくる。MSTN 阻害の効果は速筋型に対して効果が現れやすく、遅筋型ではあまり効果がないと言われているので、C2C12 は MSTN 作用の検定系として感度が悪く、あまり適していないと考えられる。

次に、ニワトリ胚の初代培養細胞 CLM を用いて検定した。その結果、rMST-MAT 50 ng/ml で筋分化の抑制が見られ、その効果は速筋型に対して顕著であった (図4)。DF-1 細胞で発現した AR2B-DN も AR2A-DN もこの細胞へ加えると分化の促進効果が見られた (図5)。このことは速筋型 MyHC で調べた Western blotting でも確認された (図6)。

MST-PRO と AR2A-DN、AR2B-DN では筋分化促

進活性に違いがあるかどうかをさらに確認する必要がある。これらを RCAS に組み込んで発現した。CLM での検定では AR2A-DN が有効である証拠が得られている。最終的には生体内で発現させるために、ウイルスベクターを用いた持続的な発現法を開発する必要がある。

ニワトリ胚での実験や CLM で判明していたように、Wnt ファミリーによっても筋分化に対する促進効果が見られる。すなわち、 β カテニン経路を作動する Wnt3a、Wnt7a などは筋芽細胞の増殖を促進し、一方 Wnt5a は Ca 経路を作動して遅筋の分化を誘導し、Wnt11 は逆に JNK 経路を優先的に作動して速筋の分化を誘導する。このような影響は弱いながらも C2C12 細胞で確認された。MSTN 作用を抑制するだけでなく、Wnt ファミリーの効果も併用することで、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. 考察

発現パターンから、MSTN の筋分化に対する抑制作用は主に ActRIIA を介していると考えられる。すなわち、筋肉細胞へと分化する前駆細胞が最初に皮筋節から遊走するのに一致して MSTN の発現が見られる。一方、類似の構造を持つ ActRIIB は MST-MAT との結合親和性は高いが、筋肉に分化する細胞で全く発現していない。従って、筋分化に対する特異的な効果を得るためには、MSTN が ActRIIA へ結合するのを遮断することが重要であり、一方で ActRIIB へのシグナルを遮断する場合には神経細胞などに対して望ましくない効果が現れる可能性がある。欠損型受容体の MSTN に対する阻害活性が高いかどうかのみで判断するのではなく、他のシグナル分子に対する影響が出にくいという点も考慮して、MSTN 阻害活性を評価すべきである。

MSTN タンパク質の産生、分泌はシグナルペプチドに大きく依存している。すなわち、MSTN 自身のシグナル配列では培養液中への分泌効率が低く、元来 MSTN は生合成された細胞内に大部分が留まり、極めて少量しか分泌されていない。MSTN の生理活性は C 末端側のペプチド MST-MAT にあり、N 末端側 MST-PRO はその活性を阻害する。そのためプロセッシングを受けていなければ受容体との結合活性はない。さらに、細胞によっては切断の活性が極めて低い。以上のように、転写された MSTN mRNA から MST-MAT

タンパク質が分泌されて標的細胞で作用するまでの道筋には多くの段階がある。この活性化に至る各段階で調節を受けているので、それぞれの段階を妨げることで生理活性を調節することができる。筋芽細胞で発現している MSTN 自身の自己増殖抑制、分化抑制作用を MST-MAT との結合タンパク質を使って阻害するのみならず、プロセッシングの阻害や分泌の阻害によっても達成することができるので、この方面での開発も必要である。

MST-PRO および Follistatin とその関連ペプチドは MST-MAT に直接結合してその受容体への結合を阻害することで筋分化を促進する作用があるが、このような作用は MST-MAT の膜受容体の細胞外ドメインを用いても達成することができる。リガンドが最初に結合する受容体は ActRII であるが、ここで示したように B 型が神経に分化する細胞で発現しているのに対し、A 型が筋分化の過程では優先して発現している。MST-MAT との結合親和性は B 型の方が高いが、欠損型の AR2A-DN でも AR2B-DN と同等の筋分化促進作用が確認された。発現パターンを考慮すると、AR2B-DN では神経系の発生に対する影響が現れると思われるが、AR2A-DN では MSTN 活性に対する効果が筋肉組織に対して特異的に現れるであろうと推測される。

これらの阻害ペプチドの過剰発現による遮断作用を MSTN に対して十分発揮するには、それを恒常的に発現し、供給し続けなければならない。MSTN 阻害抗体やプロペプチドを用いた実験動物での効果はタンパク質製剤の直接投与が行われているために 1 回に大量を使用する必要があった。臨床研究でも同様である。この点が MSTN 阻害タンパク質による治療法開発の大きな障害となっている。

これを克服する 1 つの方法として、ニワトリのレトロウイルス由来のベクターである RCAS とその受容体をコードする tva 遺伝子を利用する方法がある。複製可能な RCAS ベクターはこれまでにニワトリ胚などの実験系で研究用に使用され、その安全性が確認されてきた。これらは鳥類の細胞では増殖複製可能型の感染性ウイルスであり、力価の高い組換えウイルスが効率よく産生できる。しかし、哺乳動物の細胞へこのウイルス粒子が感染するためには、細胞膜受容体をコードする tva 遺伝子の産物がウイルス受容体として必要であるが、これはマウスやヒトのゲノムには存在せず、鳥類に固有である。さらに、この tva 遺伝子をマウス細胞などへ導入した場合でも、RCAS の感染は起こ

るが、ウイルス遺伝子の構造の違いのためウイルスの複製が極めて悪く、実質上複製が起こらないことが確認されている。この発現系をヒトへ応用する方法としては、間充織系の幹細胞などへ tva を導入して強制発現させ、細胞をウイルス感受性にしてから患者へ戻す。その後、AR2A-DN を持つ RCAS ウイルスを直接適用すると tva を発現している細胞へのみ感染して AR2A-DN が効率よく産生、分泌される。AR2A-DN はタンパク質の産生と分泌の活性が高いので、それが循環血液中の MSTN と結合して活性を抑制し、その結果、筋分化が促進される可能性が高い。このような手順で恒常的に阻害ペプチドを供給し続ける方法であれば、筋ジストロフィーなどの筋疾患の有効な治療法になると考えられる。

このウイルスは哺乳動物の細胞内では複製することはないので、周辺の細胞へ感染が広がる可能性はなく、レトロウイルスの感染による細胞癌化などの危険性はほとんどない。このような遺伝子治療のためのデリバリー方法は開発途上にあり、詳細については以下を参照できる。

<http://rex.nci.nih.gov/RESEARCH/basic/varmus/tva-web/tva2.html>

E. 結論

MSTN とその受容体の発現パターンおよび生物活性の検定から、欠損型の ActRIIA が内因性 MSTN 作用をブロックするのに最適であることの根拠が示された。これを筋分化に対する正の調節因子である Wnt ファミリーと併用することで、効果的な筋疾患の治療が可能となる。

遺伝子治療を適用するには導入遺伝子の発現効率の改善と安全性の確保が必要である。その方法として、鳥類のウイルスベクター RCAS の利用と、ウイルス受容体の遺伝子 tva の導入があり、その基礎的な発現条件の検討を行った。この方法は組換えタンパク質や抗体を全身投与方法に比べて作用が持続的であるためより有効である。

F 研究発表

1 論文発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

2 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

研究成果の刊行に関する一覧表 (1)

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
土田邦博	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			2005	p 262-268 およ び p 276-280
土田邦博	TLO 推薦のバイオサイズ&技術 集 筋力を up させ、体脂肪を減 らすバイオ分子サイズ		Bio テクノロジー ジャーナル			2005	VOL.5 204-206
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	中外医学社		2006	19-26

研究成果の刊行に関する一覧表 (2)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Bao Y L, Tsuchida K, Liu B, Kurisaki A, Matsuzaki T, Sugino H	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	2005
Takamura K, Tsuchida K, Miyake H, Tashiro S, Sugino H	Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in Rat	J Surgical Res	126	3-11	2005
Tsuchida K	The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders	Expert Opinion on Biological Therapy	6	147-154	2006
Liu Z H, Tsuchida K, Matsuzaki T, Yamakawa N, Bao Y L, Kurisaki A, Sugino H.	Characterization of splicing variants of activin receptor-interacting protein 2 that augment activin signaling	J Endocrinology		in press	2006
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
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
土田邦博	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	2005
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