

厚生労働科学研究費補助金

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 砂田芳秀

平成 19 (2007) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

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 砂田芳秀	1
--	---

II. 分担研究報告書

1. TGF- β type I 受容体低分子阻害薬の筋ジストロフィー治療への応用 砂田芳秀	7
2. myostatin の生体内阻害分子 follistatin の作用を基にした myostatin の活性遮断と 筋ジストロフィー治療 土田邦博	12
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薬の開発 野地澄晴	16
4. 優性欠損型 activin 受容体を用いた myostatin 作用の特異的遮断 濃野 勉	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25

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： 本研究では多面的なアプローチにより myostatin 阻害による筋ジストロフィー治療薬開発を目指している。myostatin 阻害活性を prodomain 領域内の 63 アミノ酸まで絞り込みペプチド薬開発の可能性がでてきた。TGF- β type I 受容体阻害薬投与により筋ジストロフィーモデルマウスに治療効果がみられ、新たな治療薬としての可能性が示された。Prodomain より更に myostatin 阻害活性の高い follistatin 変異体分子を開発した。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。Myostatin 阻害骨格筋では CTP-1 発現は上方制御されていることをみいだした。この知見は myostatin 阻害療法が代謝性ミオパチーにも有効である可能性を示唆している。優性欠損型 II 型 activin 受容体 A 型(ActRIIA)の腹腔内投与により筋量が増大した。siRNA の局所投与によって筋肥大を誘導することに成功した。これらの多面的な myostatin 阻害戦略の中から、より安全で有効な治療薬開発を実現させることが必要である。

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①myostatin に結合しその活性化を阻害する組換えタンパクあるいはペプチド医薬、②優性欠損型 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、経口あるいは経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。

また経口投与あるいは経静脈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

Myostatin 前駆体蛋白の prodomain 領域(36kDa)は *in vitro* で myostatin 活性化阻害作用を持つことが知られていた。われわれは、prodomain 領域だけを過剰発現するトランスジェニックマウスを作出し、*in vivo* での myostatin 活性化阻害効果を確認し、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治療効果を得ることに成功した。Prodomain を創薬標的としたペプチド医薬品を開発するため、①HEK293 細胞に導入した pGL3-(CAGA)₁₂-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として、細胞レベルで myostatin 活性測定系を確立した。

②prodomain 領域からオーバーラップする複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。それを上記の培養細胞に導入し、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. TGF- β type I 受容体阻害薬による分子標的療法の検討

われわれは、骨格筋特異的な caveolae 構成蛋白である Caveolin-3 が、type I myostatin 受容体と結合しその活性化を阻害することによって、myostatin シグナルを抑制し筋萎縮を阻止していることをみいだした。この知見を端緒として、type I myostatin 受容体を分子標的として、myostatin シグナルを阻害する治療戦略を着想した。

①入手することができた3種類の TGF- β type I 受容体阻害剤 (SB-431542, LY364947, Ki26894) について、myostatin シグナル阻害活性を HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)12-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として *in vitro* で解析した。

②さらに、この中で最も阻害効果の高い ki26894 を変異 Cav-3 Tg マウスに10週間投与して、筋萎縮に対する治療効果を *in vivo* で解析した。

3. 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 activin などの阻害活性を欠き myostatin 阻害の特異性の高い変異体分子を見出した。

①follistatin 変異体遺伝子導入マウスを作出し、表現型を解析した。さらに、筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスとの交配を行い、筋ジス病態の軽減あるいは改善効果について検討した。

②follistatin 変異体発現により肥大した骨格筋における代謝調節分子の変動解析を行い、myostatin 阻害による細胞内代謝変動の分子病態の解明を試みた。

4. RNAi による myostatin 発現抑制療法

①myostatin に対する siRNA を設計し、この siRNA を培養細胞に導入して、細胞レベルで myostatin の発現抑制効果を解析した。

②*in vitro* での 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) と混和してマウスに頸静脈投与し、myostatin 阻害効果を *in vivo* で解析した。

③siRNA をアテロコラーゲンと混和して、マウス咬筋および大腿二頭筋に局所注射し、myostatin 阻害効果を検討した。

5. 欠損型 myostatin 受容体の治療応用の検討

昨年度までの研究で、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・空間的に解析したところ、A 型は主に筋肉で特異的に発現して、B 型は主に神経管で発現することを明らかにした。

①myostatin 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と考え、リガンド結合部位を含む ActRIIA の細胞外ドメインを Fc 融合タンパクの形にして、筋ジストロフィーモデルマウスに腹腔内投与し、治療効果を検討した。

②myostatin ノックアウトマウスでのマイクロアレイ解析から、myostatin の下流で Wnt シグナルが筋分化に関与することが示唆されている。中でも Wnt4 とその結合タンパク質である sFrp1,2 などの発現が変動する。そこでニワトリ胚に Wnt4 発現ウイルスベクターを注射して、筋芽細胞の増殖、分化および骨格筋形態形成について解析した。

C. 研究結果・考察

1. Myostatin prodomain 関連ペプチド薬の開発

①HEK293 細胞に導入した pGL3-(CAGA)12-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として、細胞レベルで myostatin 活性測定系を確立した。

②上記のシステムを用いて昨年度は90アミノ酸断片まで絞り込んだ myostatin 阻害活性部位を今年度はさらに68アミノ酸断片まで絞り込むことができた。

今後この68アミノ酸領域内の機能配列を詳細に検討することにより30アミノ酸程度のペプチド薬が開発できる可能性が見えてきた。

2. TGF- β type I 受容体阻害薬による分子標的療法の検討

① myostatin(GDF8) 刺激によるヒト胎児腎

HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)₁₂-luc レポーター遺伝子転写活性は、TGF- β type I 受容体阻害剤 (SB-431542, LY364947, Ki26894) により用量依存性に抑制され、このうち Ki26894 による抑制が最も強力であった。一方、TGF- β 1, GDF11 刺激によるレポーター遺伝子転写活性抑制については、Ki26894 は SB-431542, LY364947 に比較し軽度であった。

②6 週齢の変異 CAV-3 Tg マウスに、Ki26894 (0.08%Ki26894 含有粉餌, n=7) を 10 週間、16 週齢まで投与し、非投与群と比較した。投与群では 12 週齢から 16 週齢まで体重が有意 ($P < 0.05$) に増加した。握力も 12 週齢から 16 週齢までコントロールに比し増加していた。16 週齢における投与群変異 CAV-3 Tg マウスの骨格筋量は、非投与群に比較し有意 ($P < 0.05$) に増大していた。筋病理組織切片で単一筋線維断面積を計測したところ、投与群で有意な増大を認めた。

今回の研究成果は低分子阻害化合物を用いた type I 受容体の分子標的療法が、筋ジストロフィー治療に応用可能であることを、世界に先駆けて示したといえる。今後の課題として、至適投与量の titration、至適投与期間や投与方法、休薬後の効果持続時間、および安全性について検討を進める必要がある。

3. Follistatin 由来ペプチドの治療効果

①follistatin 変異体遺伝子を導入したトランスジェニック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。

②follistatin 変異体トランスジェニックマウスの筋組織に、F4/80 や Mac1 陽性のマクロファージが増加することを見いだした。炎症像は観察されないことから、何らかの機構で筋分化に影響していると考えられる。

③follistatin 変異体トランスジェニックマウス骨格筋組織で変動する分子を DNA アレイ等で解析し、マクロファージマーカーのガレクチン 3、オステオポンチンや脂肪酸代謝系の酵素に著明な発現変動が見られた。特に、カルニチンパルミトイル転移酵素-1 (CPT-1) の mRNA は顕著に上昇していた。CPT-1 は、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送を司る重要な酵素であり、その欠損は、脂肪酸代謝異常によるミオパチー、筋肉痛を起こす。CPT-1 の上昇は結果として、

β 酸化の亢進も引き起こす可能性が高い。従って、我々の開発した因子によってマイオスタチンを阻害することで、脂肪酸輸送系やミトコンドリアでの β 酸化酵素系障害によるミオパチーにも有効である可能性が大いに考えられる。この知見は、ミオスタチン阻害で、DMD, LGMD に加えて、代謝性ミオパチーへの適応をも示唆するものであり、治療適応の拡大が考えられ重要な発見であると考えている。

4. RNA 干渉による myostatin 抑制

①myostatin に対する 3 種類の異なる siRNA をカチオンポリマー-jetPET を使用して、マウス腹腔に注射した。体重および骨格筋の myostatin mRNA 量を定量したが、残念ながら、現在の条件では siRNA による有意な myostatin 阻害効果は得られなかった。

②20 週齢のマウス左側咬筋および大腿二頭筋に myostatin-siRNA とアテロコラーゲンを混合して筋肉注射を行った。マウスの骨格筋を形態組織学的に比較したところ、対照群に比べ myostatin-siRNA を導入した咬筋および大腿二頭筋では明らかな骨格筋増大が観察された。また、マウス咬筋におけるマイオスタチンの発現をウェスタンブロット法にて解析したところ、アテロコラーゲンのみを導入した同一個体の右側部位 (以下対照群と略す) と比較して、myostatin-siRNA を導入した咬筋では顕著なマイオスタチンの発現抑制が認められた。

5. 欠損型 myostatin 受容体の治療応用

①ActRIIA の細胞外ドメイン Fc 融合タンパクを筋ジストロフィーモデルマウス (変異 caveolin-3 Tg マウス) に 15 日間に 4 回腹腔内投与したところ、骨格筋重量、筋線維断面積、の顕著な増大がみられ、骨格筋における myostatin シグナル (リン酸化 smad2, p21) の抑制が確認された。

②ニワトリ胚で Wnt4 を過剰発現すると筋芽細胞の増殖、分化が促進され、対照に比べて 10% 程度の筋分化の促進が見られた。この効果は MSTN 阻害で見られたのと同様に、速筋型に対してより顕著であった。myostatin の下流シグナルである Wnt4 の強制発現は myostatin 遮断の場合と同等またはそれ以上に、筋疾患の治療へ直接利用できる可能性が高い。

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するため、筋ジストロフィー治療への応用が考えられる。Prodomain の myostatin 活性化阻害領域を 68 アミノ酸断片まで絞り込むことができた。

(2) TGF- β type I 受容体阻害剤は myostatin シグナルを *in vitro*, *ex vivo* 双方で抑制する。また阻害剤経口投与により変異 CAV-3 Tg マウスの体重は有意に増加し、筋萎縮改善効果も認められた。従って、筋ジストロフィーに対して、TGF- β type I 受容体阻害剤による低分子医薬 myostatin 阻害療法が期待できる。

(3) Follistatin よりも低分子で、myostatin に対する阻害特異性の高い follistatin 変異体分子を開発した。遺伝子導入マウスにおける骨格筋量の増大の分子機序を解析する中で、CPT-1 が上昇するという新知見を得た。CPT-1 は脂肪酸のミトコンドリアへの輸送を司る重要な酵素であり、myostatin 阻害はミトコンドリア病の治療にも有効である可能性が示唆された。

(4)myostatin に対する siRNA をアテロコラーゲンを担体として、骨格筋に局所投与することで、骨格筋量を増大させることに成功した。

(5)細胞外リガンド結合ドメインのみからなる欠損型 activin IIA 受容体タンパクの腹腔内投与により筋量を著明に増大させることに成功した。また、myostatin の下流で機能する Wnt4 の過剰発現により筋分化が促進することを見出した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara H, Ohsawa Y, Asakura S, Murakami T, Teshima T, Sunada Y : Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy. FEBS Lett, 580(18) : 4463-8 (2006)
- 2) Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y : Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. J Clin Invest, 116(11) :2924-2934 (2006)
- 3) Wakayama Y, Takahashi J, Shibuya S, Inoue M, Kojima H, Oniki H, Arata S, Hara H, Jimi T, Shioda S, Sunada Y, Ohi H, Shimizu T : Generation of muscle aquaporin 4 overexpressing transgenic mouse: Its characterization of RNA and protein levels including freeze-fracture study. Micron, 38(3): 257-267 (2007)
- 4) Tsuchida K, Sunada Y, Noji S, Murakami T, Uezumi A, Nakatani M : Inhibitors for the TGF-beta superfamily and their clinical applications. Mini Rev Med Chem, 6(11): 1255-1261 (2006)
- 5) Arai KY, Tsuchida K, Li CM, Watanabe G, Sugino H, Taya K, Nishiyama T : Purification of recombinant activin A using the second follistatin domain of follistatin-related gene (FLRG). Protein Purification and Expression, 49(1): 78-82 (2006)
- 6) Liu ZH, Tsuchida K, Matsuzaki T, Bao YL, Kurisaki A, Sugino H : Characterization of splicing variants of activin receptor-interacting protein 2 that augment activin signaling. J. Endocrinology, 189(2):409-421 (2006)
- 7) Kogame M, Matsuo S, Nakatani M, Kurisaki A, Nishitani H, Tsuchida K, Sugino H : ALK7 is a novel marker for adipocyte differentiation. J. Med. Invest, 53(3-4): 238-245 (2006)
- 8) 土田邦博 筋萎縮をきたす神経・筋難病の新しい治療法の開発 日本神経精神薬理学雑誌 (Jpn J Neuropsychopharmacol) 26, 229-233 (2006)
- 9) 土田邦博 骨格筋形成抑制因子、マイオスタチン作用機序とその応用- 化学と生物 45(3): 186-190 (2007)
- 10)和田直之、濃野 勉、野地澄晴：四肢骨格パターン形成における BMP の機能. Clinical Calcium, 16(5): 53-60 (2006)
- 11)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. 両備てい園記念財団

研究助成金による報告書. 生物学に関する試験論叢, 21: 20-33 (2006)

- 12)高田温行、寺田久美子、山本康弘、笹岡俊輔、宇田川潔、和田直之、森口隆彦、濃野勉：欠損型マイオスタチン受容体による筋分化の促進効果. 川崎医学会誌, 32(4): 175-186 (2006)

2. 学会発表

- 1) Yoshihide Sunada: Regulation of myostatin signaling by caveolin-3. The XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 2006.7.3
- 2) Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada: Myostatin inhibition can delay the onset of muscle weakness in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 2006.7.4
- 3) Yoshihide Sunada: Molecular pathogenesis of caveolinopathy in a mouse model of LGMD1C. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 4) Hiroki Hagiwara, et all: Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 5) Yutaka Ohsawa, et all: MRL/MpJ wound-healing phenotype increases the myofiber size in mdx mouse skeletal muscle. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 3) 砂田芳秀：Myostatin 阻害による筋ジストロフィー阻害戦略：第47回日本神経学会総会, 東京, 2006.5.12
- 4) 大澤 裕、砂田芳秀他：Caveolin-3 欠損症で認められる myostatin signal 活性化による筋萎縮機構. 第47回日本神経学会総会, 東京 2006.5.13
- 5) 萩原宏毅、大澤裕、村上龍文、河瀬朋華、直江奈美、黒田ユカ、小野陽子、砂田芳秀：MRL-MpJ (創傷治癒促進形質) 導入による mdx マウス骨格筋病変の検討 (第1報). 第

47回日本神経学会総会, 東京, 2006.5.11

- 6) 砂田芳秀. 筋ジストロフィーに対する経口 TGF- β タイプ I 受容体阻害剤の治療効果の検討：平成18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, 2006.12.1
- 7) 大澤 裕. マウス脱神経筋萎縮モデルに対するマイオスタチン阻害効果の検討：平成18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, 2006.12.1
- 8) 砂田芳秀. Myostatin 阻害による筋ジストロフィー治療：現状と展望. 筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 2007. 1. 19.
- 9) Nakatani M, Sawada H, Murakami T, Tsuchida K : Adipose tissue mass and adipocyte size are reduced by transgenic expression of a follistatin-derived molecule to skeletal muscle due to myostatin inhibition. 20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 the FAOBMB Congress, Kyoto, 2006. 6. 21
- 10)Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T, Sawada H : Prevention of muscle atrophy and muscle degeneration in muscular dystrophy and ALS model mice by myostatin blockade. Neurons and Disease. The 4 th Neuron Satellite Meeting. Atlanta, USA, 2006 .10. 12-13
- 11)土田邦博：ミオスタチン作用の分子機構と制御機構、日本畜産学会第106回大会企画シンポジウム、ルミネントバイオロジーの新展開, 福岡, 2006. 3. 28
- 12)土田邦博：筋萎縮を来たす神経・筋難病の新しい治療法の開発、第41回「脳の医学・生物学研究会」名古屋, 2006. 7. 15
- 13)土田邦博：神経・筋難病による筋萎縮を防ぐ新しい治療方法の開発、愛知県心身障害者コロニー公開シンポジウム2006「神経・筋変性の動物モデルから治療戦略へ」春日井市, 2006. 11. 17
- 14)土田邦博、上住聡芳、中谷直史、村上達也、澤田浩秀、武田伸一：マイオスタチン阻害によるマクロファージの動態解析及び骨格筋と脂肪組織の相互作用解析. 厚生省精

神・神経疾患研究会議, 東京, 2006. 11. 30

- 15) Kinouchi N, Tanimoto Y, Noji S, Moriyama K.
Regulation of skeletal muscle by myostatin
specific RNA interference (RNAi). The 1st
International symposium and workshop on the
future direction of oral sciences in the 21th
century, Hyougo, 2007.3.2-3

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

TGF- β type I 受容体低分子阻害剤の筋ジストロフィー治療への応用

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- β superfamily 分子で、骨格筋量の負の制御因子である。Myostatin に対する阻害抗体を用いて、筋ジストロフィーを治療しようとする試みが欧米で本格化してきている。われわれは、骨格筋特異的な caveolae 構成蛋白である Caveolin-3 が、type I myostatin 受容体と結合しその活性化を阻害することによって、myostatin シグナルを抑制し筋萎縮を阻止していることをみいだした。この知見を端緒として、type I myostatin 受容体を分子標的として、myostatin シグナルを阻害する治療戦略を着想した。TGF- β type I 受容体阻害薬は既に数種類が開発されていて、いずれも ALK5 の serine/threonine kinase domain の ATP-binding site に結合して活性化を抑制することを作用機序としている。今回入手することができた 3 種類の TGF- β type I 受容体阻害剤 (SB-431542, LY364947, Ki26894) について、myostatin シグナル阻害活性を HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)12-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として *in vitro* で解析した。さらに、最も阻害効果の高い ki26894 を変異 Cav-3 Tg マウスに 10 週間投与して、筋萎縮に対する治療効果を *in vivo* で解析した。Ki26894 はマウス血清中の myostatin 活性を 54%まで抑制し、筋重量と筋線維径の有意な増加、myostatin の下流シグナルである p21 の発現増加をもたらすことが明らかとなった。従って、TGF- β type I 受容体阻害剤は筋ジストロフィーに対する新たな治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

myostatin は骨格筋特異的な TGF- β 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。昨年度われわれは、常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1C の動物モデルである Pro104Leu 変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウス (CAV-3^{P104L}) 骨格筋において、caveolin-3 が著減し、骨格筋量を減少させる TGF- β superfamily 分子である myostatin の細胞内シグナルが著明に活性化にしていることを明らかにした。さらに、caveolin-3 が myostatin の type I 受容体である ALK4/ALK5 に結合してそのリン酸化を阻害することにより、myostatin シグナルを抑制することを見出した。従って、われわれが作出した CAV-3^{P104L}Tg マウスは、myostatin シグナルの亢進により筋萎縮をきたすことから、myostatin 阻害効果を *in vivo* で解析する理想的なモデルマウスであることがわかった。

興味深いことに、TGF- β 1 の type I 受容体阻

害剤は、ALK5 の serine/threonine kinase domain の ATP-binding site に結合して活性化を抑制することをその作用機序としている (図 1)。この TGF- β type I 受容体阻害剤は、ヌードマウスに移植された癌細胞の増殖抑制作用があることから TGF- β シグナル阻害による抗がん剤としての臨床応用が考慮されている³。

そこで、本年度は TGF- β type I 受容体阻害剤を筋ジストロフィー治療における myostatin シグナル阻害に応用できないか、その可能性について CAV-3^{P104L}Tg マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

入手することができた 3 種類の TGF- β type I 受容体低分子阻害剤、すなわち SB-431542, LY364947, Ki26894 の myostatin シグナル阻害活性ならびに特異性をヒト胎児腎 HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)12-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として *in vitro* で解析した。次いで、TGF- β type I 受容体阻害剤 Ki26894 を CAV-3^{P104L}Tg マウスに 10 週間投与し、マウス血清における myostatin シグナル活性をヒト胎児腎 HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)12-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として *ex vivo* で検討した。さらに CAV-3^{P104L}Tg マウ

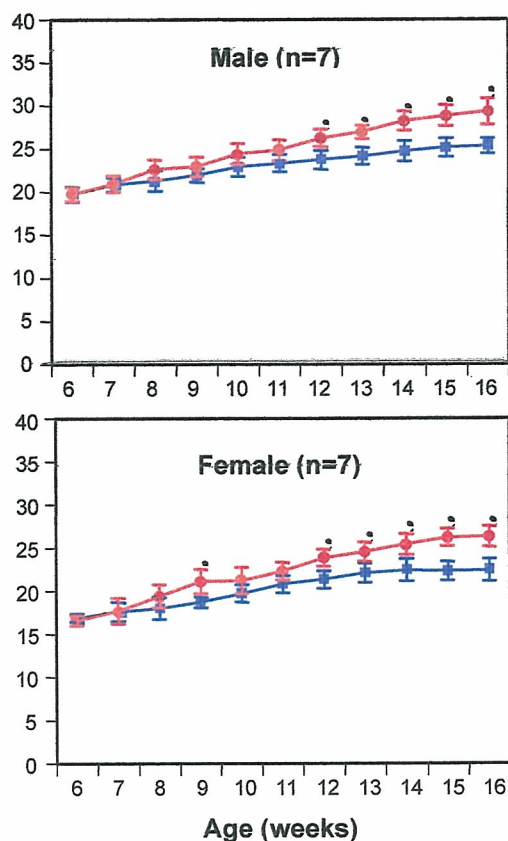


図 1. 0.08%Ki26894 含有粉餌投与変異 caveolin-3 Tg マウス体重増加曲線：
* $P < 0.05$, Bonnferroni's test

スの筋萎縮に対する TGF- β type I 受容体阻害の *in vivo* の治療効果について、体重、筋力、筋量、筋病理組織学を指標として解析した。

C. 研究結果

(1) myostatin(GDF8)刺激によるヒト胎児腎 HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)12 -luc レポーター遺伝子転写活性は、TGF- β type I 受容体阻害剤 (SB-431542, LY364947, Ki26894) により用量依存性に抑制され、このうち Ki26894 による抑制が最も強力であった。一方、TGF- β 1, GDF11 刺激によるレポーター遺伝子転写活性抑制については、Ki26894 は SB-431542, LY364947 に比較し軽度であった。(2) 6 週齢の変異 CAV-3 Tg マウスを、Ki26894 投与群 (0.08%Ki26894 含有粉餌投与, n=7)、Ki26894 非投与群 (粉餌投与, n=7)にわけ、10 週間、16 週年齢まで観察した。投与群と非投与群のマウス血清を採取し HEK293 細胞における転

写活性測定系に添加し *ex vivo* myostatin 活性を測定した。投与群では、非投与群に比し、54%と有意に抑制されていた。(3) 投与群では非投与群に比し、体重は、12 週齢から 16 週齢まで有意 ($P < 0.05$)に増加していた (図 1)。(4) 握力はコントロールに比し、12 週齢から 16 週齢まで増加していた。(5) 16 週齢変異 CAV-3 Tg マウスの骨格筋量は、投与群では非投与群に比較し有意 ($P < 0.05$)に増大していた。(図 2)

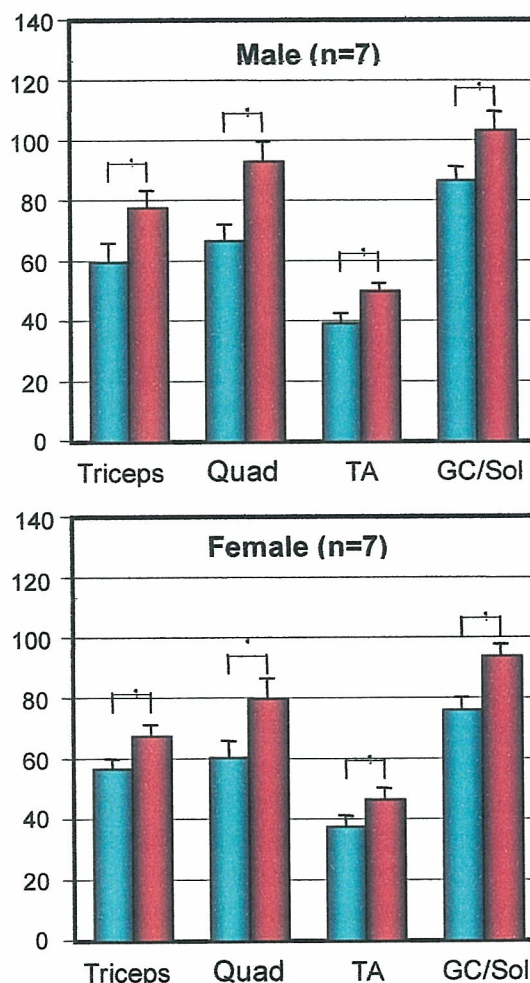


図 2. Ki26894 経口投与変異 caveolin-3 Tg マウス筋量：Triceps：上腕三頭筋、Quad：大腿四頭筋、TA：前脛骨筋、GC/Sol：腓腹筋/ヒラメ筋 * $P < 0.05$, Bonnferroni's test

(6) 16 週齢大腿四頭筋の H & E 染色では、投与群では、骨格筋萎縮は改善を認め (図 3)、単一線維面積の検討でも、雄・非投与群 624.3 ± 40.4 vs. 投与群 $898.3 \pm 72.3 \mu\text{m}^2$; 雌・非投与群 578.4 ± 37.6 vs. 投与群 $792.3 \pm 65.6 \mu\text{m}^2$ と、それぞれ有意 ($P < 0.05$)に筋萎縮の改善

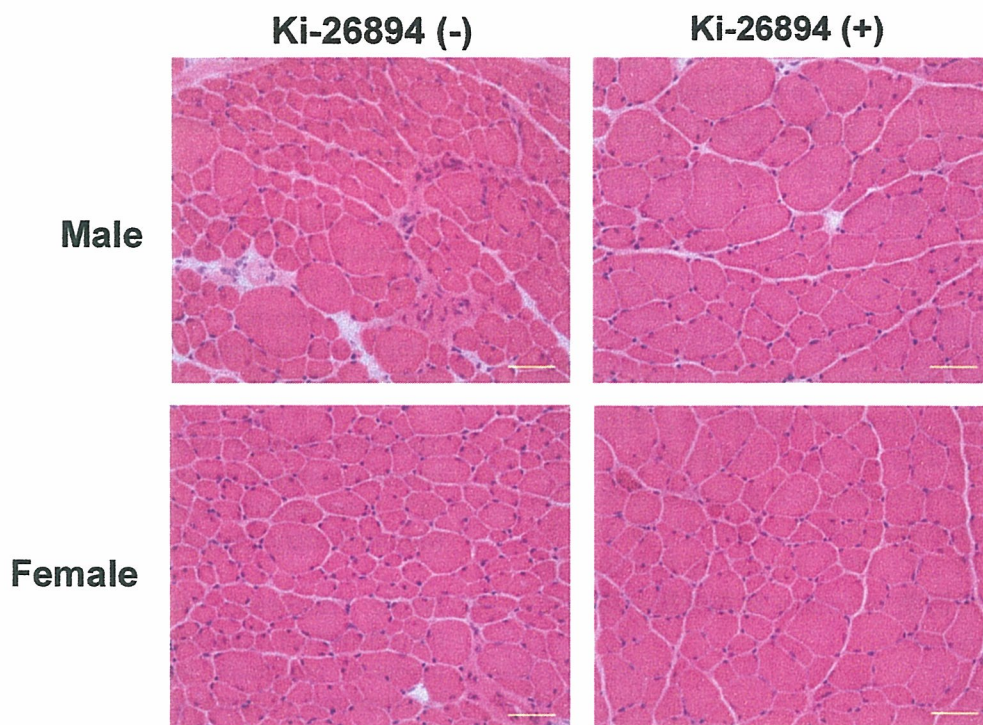


図 3. 16 週齢 Ki26894 経口投与変異 caveolin-3 Tg マウス大腿四頭筋 H&E 染色像、Bar. 50 μ m

を認めた。(7) 投与群骨格筋の myostatin の細胞内シグナル (p21 遺伝子発現) は非投与群に比較し減少していた。

D. 考察

昨年度までの研究で、caveolin-3 が myostatin の type I 受容体である ALK4/ALK5 のリン酸化を阻害することにより、myostatin シグナル伝達を抑制することを明らかにした。このことから、受容体レベルで myostatin シグナルを抑制できれば、阻害抗体や prodomain を用いるリガンドレベルでの阻害と同じような治療効果が期待できるのではないかと考えられる。そこで最近、肝硬変や悪性腫瘍治療への臨床応用が研究されている、TGF- β type I 受容体の低分子阻害薬を筋ジストロフィー治療にも応用することができるか検討した。

今回は入手可能であった 3 種類の化合物について、まず培養細胞を用いた pGL3-(CAGA)₁₂-luc レポーター遺伝子転写活性を指標として、*in vitro* での myostatin シグナル抑制効果を検討した。また、阻害効果の特異性を検討するため、TGF- β 1 と GDF11 シグナルについても解析した。その結果、3 種類の化合

物中で経口投与可能な Ki26894 が最も myostatin シグナル抑制効果が高く、かつ TGF- β 1 や GDF11 シグナル抑制効果が低いことがわかった。従って、実際のモデルマウスへの投与実験には、Ki26894 が最も有用であると考えられた。

ついで、過剰な myostatin シグナルが筋萎縮を引き起こすことがわかっている変異 CAV-3 Tg マウスに 10 週間にわたって Ki26894 を経口投与して、治療効果を検討した。投与群マウスの血清中の myostatin 活性を HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)₁₂-luc レポーター遺伝子転写活性を指標に測定すると、非投与群の 54%まで活性が抑制されていることがわかり、経口投与した Ki26894 の強力な myostatin シグナル抑制という薬理効果が確認された。

実際に、投与群のマウスは投与 6 週後より有意な体重増加傾向を示し、採取した骨格筋の病理組織解析でも、筋重量と筋線維径の有意な増加がみられた。更に骨格筋における myostatin の下流シグナルである p21 mRNA 発現も上方制御されていることが確認された。従って、経口投与された Ki26894 により、骨格筋内でも実際に myostatin シグナルが抑制され、筋量増大という生理機能が発現することが証明された。

今回の研究成果は低分子阻害化合物を用い

た type I 受容体の分子標的療法が、筋ジストロフィー治療に応用可能であることを、世界に先駆けて示したといえる。今後の課題として、至適投与量の titration、至適投与期間や投与方法、休薬後の効果持続時間、および安全性について検討を進める必要がある。

E. 結論

TGF- β type I 受容体阻害剤は myostatin シグナルを *in vitro*, *ex vivo* 双方で抑制する。また阻害剤経口投与による *in vivo* の検討でも、変異 CAV-3 Tg マウスの体重を有意に増加させ、筋萎縮改善効果も認められた。従って、筋ジストロフィーに対して、TGF- β type I 受容体阻害剤による低分子医薬 myostatin 阻害療法が期待できると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara H, Ohsawa Y, Asakura S, Murakami T, Teshima T, Sunada Y : Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy. FEBS Lett, 580(18) : 4463-8, (2006)
- 2) Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y : Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. J Clin Invest, 116(11) 2924-2934, (2006)
- 3) Wakayama Y, Takahashi J, Shibuya S, Inoue M, Kojima H, Oniki H, Arata S, Hara H, Jimi T, Shioda S, Sunada Y, Ohi H, Shimizu T : Generation of muscle aquaporin 4 overexpressing transgenic mouse: Its characterization of RNA and protein levels including freeze-fracture study. Micron, 38(3): 257-267 (2007)
- 4) Tsuchida K, Sunada Y, Noji S, Murakami T, Uezumi A, Nakatani M : Inhibitors for the TGF-beta superfamily and their clinical applications. Mini Rev Med Chem, 6(11): 1255-1261 (2006)

2. 学会発表

- 1) Yoshihide Sunada: Regulation of myostatin signaling by caveolin-3. The XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 2006.7.3
- 2) Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada: Myostatin inhibition can delay the onset of muscle weakness in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 2006.7.4
- 3) Yoshihide Sunada: Molecular pathogenesis of caveolinopathy in a mouse model of LGMD1C. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 4) Hiroki Hagiwara, et al. Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 5) Yutaka Ohsawa, et al. MRL/MpJ wound-healing phenotype increases the myofiber size in mdx mouse skeletal muscle. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 2006. 10. 6
- 3) 砂田芳秀 : Myostatin 阻害による筋ジストロフィー阻害戦略 : 第 47 回日本神経学会総会、東京 2006.5.12
- 4) 大澤 裕、砂田芳秀他 : Caveolin-3 欠損症で認められる myostatin signal 活性化による筋萎縮機構。第 47 回日本神経学会総会、東京 2006.5.13
- 5) 萩原宏毅、大澤裕、村上龍文、河瀬朋華、直江奈美、黒田ユカ、小野陽子、砂田芳秀。MRL-MpJ (創傷治癒促進形質) 導入による mdx マウス骨格筋病変の検討 (第 1 報)。第 47 回日本神経学会総会、東京 2006.5.11
- 6) 砂田芳秀. 筋ジストロフィーに対する経口 TGF- β タイプ I 受容体阻害剤の治療効果の検討 : 平成 18 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、2006.12.1
- 7) 大澤 裕. マウス脱神経筋萎縮モデルに対するマイオスタチン阻害効果の検討 : 平成

18 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、2006.12.1

- 8) 砂田芳秀. Myostatin 阻害による筋ジストロフィー治療：現状と展望. 筋ジストロフィー総合班会議、東京、2007.1.19.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

myostatin の生体内阻害分子 **folliculin** の作用を基にした **myostatin** の活性遮断と
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り筋量の増大と共に筋分化促進効果や抗炎症効果が望めるため、筋ジストロフィーに対する新規治療法として有望視されている。フォリスタチン分子を基にして、マイオスタチン阻害活性を有する組み換え蛋白質を設計し、治療薬候補を作製した。その遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、骨格筋の増量を確認した。筋ジストロフィーモデル動物との交配により病態の改善効果が確認できた。マイオスタチン阻害による筋肥大と脂肪量低下の分子機構を精査し、骨格筋へのマクロファージの動員の増加、脂肪酸代謝経路の酵素群の変化、脂肪細胞でのミトコンドリアの量の増加といった興味ある知見が得られた。マイオスタチン遮断が、Duchenne 型、筋肢帯型筋ジストロフィーに加えて、代謝性ミオパチーやミトコンドリアミオパチーにも適応がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、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、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にある。また、マイオスタチン阻害によって生じる骨格筋や脂肪組織の分子生物学的及び微細構造の変化を詳細に解析し、適応となる筋疾患を精査する事も目的としている。

B. 研究方法

マイオスタチンを阻害する方法としては、マイオスタチン阻害抗体、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、マイオスタチン受容体の阻害剤などがある。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存在する。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。さらに、肥大した筋肉での代謝調節分子の変動解析を行った。ヒトやマウスの血清中や骨格筋内のマイ

オスタチンの定量は、量が少ない事や使用可能な抗体がないために、必ずしも良好な検出法は開発されていない。そこで、われわれは、フォリスタチン様因子 FLRG が生体内でマイオスタチンと会合している事に着目し、マイオスタチン結合領域の決定を行った。その結果、FLRG の1番目のフォリスタチン領域に結合活性があることがわかった。次年度以降、ヒトの血清を用いて、マイオスタチンの定量に着手予定である。その際には、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成15年厚生労働省告示第255号）及び所属研究機関で定めた倫理規定等を遵守する。

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。筋組織に、F4/80 や Mac1 陽性のマクロファージが増加することを見いだした。炎症像は観察されないことから、何らかの機構で筋分化に影響していると考えられる。骨格筋組織で変動する分子を DNA アレイ等で解析し、マクロファージマーカ

一のガレクチン3、オステオポンチンや脂肪酸代謝系の酵素に著明な発現変動が見られた。特に、カルニチンパルミトイル転移酵素-1(CPT-1)の mRNA は顕著に上昇していた。

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していた。上記の脂肪酸代謝の変化によって生じている可能性が高く、次年度精査予定である。マイオスタチン阻害により肥大化した骨格筋および量の低下した脂肪組織について、透過型および走査型顕微鏡を用いた形態学的観察を開始した。内蔵白色脂肪組織は、本来ミトコンドリアに乏しいが、マイオスタチン阻害により脂肪滴の縮小と共にミトコンドリアの数が顕著に増大する事が判明した。ミトコンドリアの生成過程と骨格筋分化や脂肪分化の関連を考える際に興味ある発見である。

D. 考察

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。本研究において、フォリスタチンというホルモンを改変することで、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。

マイオスタチン阻害で筋肥大した骨格筋でCPT-1が上昇するという新知見を得た。脂肪酸輸送・ β 酸化系酵素欠陥によって、骨格筋・心筋などのエネルギー供給の低下が生じる。CPT-1は、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送を司る重要な酵素であり、その欠損は、脂肪酸代謝異常によるミオパチー、筋肉痛を起こす。CPT-1の上昇は結果として、 β 酸化の亢進も引き起こす可能性が高い。従って、我々の開発した因子によってマイオスタチンを阻害することで、脂肪酸輸送系やミトコンドリアでの β 酸化酵素系障害によるミオパチーにも有効である可能性が大いに考えられる。この知見は、ミオスタチン阻害で、DMD, LGMDに加えて、代謝性ミオパチーへの適応をも示唆するものであり、治療適応の拡大が考えられ重要な発見であると考えている。

E. 結論

筋ジストロフィーの治療法開発には、ここ数年で長足の進歩が見られている。特

にマイオスタチン阻害療法については、欧米では、Wyeth社が開発したヒト型マイオスタチン阻害抗体のMYO-029の患者への投与が行われており、いよいよDuchenne型ジストロフィーも治験対象に加わる予定である。本研究では、独自に開発したマイオスタチン阻害因子について、遺伝子導入マウスの作製、詳細な表現型の解析、筋ジストロフィーモデル動物との交配による病態改善効果が検証された。ヒトへの応用が行える段階まで研究を推進させることが次の目標である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K.Y.Arai, K. Tsuchida, C.M. Li, G. Watanabe, H. Sugino, K. Taya, T. Nishiyama. Purification of recombinant activin A using the second follistatin domain of follistatin-related gene (FLRG). Protein Purification and Expression. 49(1), 78-82 (2006)
- 2) Z.H. Liu, K. Tsuchida, T. Matsuzaki, Y.L. Bao, A. Kurisaki, H. Sugino. Characterization of splicing variants of activin receptor-interacting protein 2 that augment activin signaling. J. Endocrinology 189(2), 409-421 (2006)
- 3) M. Kogame, S. Matsuo, M. Nakatani, A. Kurisaki, H. Nishitani, K. Tsuchida, H. Sugino. ALK7 is a novel marker for adipocyte differentiation. J. Med. Invest. 53(3-4), 238-245 (2006)
- 4) K. Tsuchida, Y. Sunada, S. Noji, T. Murakami, A. Uezumi, M. Nakatani. Inhibitors for the TGF-beta superfamily and their clinical applications. Mini. Rev. Med. Chem. 6(11), 1255-1261 (2006)

5) Y. Ohsawa, H. Hagiwara, M. Nakatani, A. Yasue, K. Moriyama, T. Murakami, K. Tsuchida, S. Noji, Y. Sunada. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J. Clin. Invest.* 116(11), 2924-2934 (2006)

6) 土田邦博 筋萎縮をきたす神経・筋難病の新しい治療法の開発 日本神経精神薬理学雑誌 (Jpn. J. Neuropsychopharmacol.) 26, 229-233 (2006)

7) 土田邦博 骨格筋形成抑制因子、マイオスタチン作用機序とその応用— 化学と生物 45(3), 186-190 (2007)

2. 学会発表

1) M. Nakatani, H. Sawada, T. Murakami, K. Tsuchida. (2006) Adipose tissue mass and adipocyte size are reduced by transgenic expression of a follistatin-derived molecule to skeletal muscle due to myostatin inhibition. 20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 th FAOBMB Congress, Kyoto, June 21.

2) K. Tsuchida, M. Nakatani, A. Uezumi, T. Murakami, H. Sawada. (2006) Prevention of muscle atrophy and muscle degeneration in muscular dystrophy and ALS model mice by myostatin blockage. *Neurons and Disease. The 4 th Neuron Satellite Meeting.* Atlanta, USA, October 12-13

3) 土田邦博 (2006). ミオスタチン作用の分子機構と制御機構、日本畜産学会第106回大会企画シンポジウム、ルミナントバイオロジーの新展開、福岡、March 28.

4) 土田邦博 (2006). 筋萎縮をきたす神経・筋難病の新しい治療法の開発、第41回「脳の医学・生物学研究会」名古屋、July 15.

5) 土田邦博 (2006). 神経・筋難病による筋萎縮を防ぐ新しい治療法の開発、愛知県心身障害者コロニー公開シンポジウム 2006「神経・筋変性の動物モデルから治療戦略へ」春日井市、November 17.

6) 土田邦博、上住聡芳、中谷直史、村上達也、澤田浩秀、武田伸一 (2006). マイ

オスタチン阻害によるマクロファージの動態解析及び骨格筋と脂肪組織の相互作用解析. 厚労省精神・神経疾患研究班会議 東京、November 30.

6) 砂田芳秀、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、岡田只士、河瀬朋華、土田邦博、野地澄晴 (2006). Caveolin-3 による myostatin シグナルの制御と myostatin 阻害療法. 厚労省精神・神経疾患研究班会議 東京、November 30.

7) 砂田芳秀、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、岡田只士、河瀬朋華、土田邦博、宮園浩平 (2006). 筋ジストロフィーに対する経口 TGF- β タイプ I 受容体阻害剤の治療効果の検討 厚労省精神・神経疾患研究班会議 東京、December 1.

G. 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薬の開発

分担研究者 野地澄晴 徳島大学大学院 教授

研究要旨： マイオスタチンは筋肉形成の抑制因子であることから、この因子を抑制することにより、骨格筋量が増大することがわれわれも含め、多くの報告がある。そこで、筋肉量が減少する疾患に対する治療法の一つとして、マイオスタチン mRNA を標的とする RNAi を利用した治療法を検討することを目的に、siRNA のマウスへの投与実験を行なった。その結果、全身投与実験では、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、局所投与実験では、筋肉を増大させることに成功した。siRNA を利用した筋ジストロフィーの治療が可能になるかもしれない。

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、研究を継続している。昨年度は、*in vitro* においてマイオスタチンの mRNA に対する shRNA を用いた RNAi の効果を調べた。その結果、shRNA によりマイオスタチンのタンパク質の発現が抑制されることを報告した。また、マイオスタチン遺伝子に対する siRNA を用いたマウスに対する RNAi 治療法を検討していることを報告した。本年度は、さらに研究を継続し、siRNA をアテロコラーゲンとともに局所投与すると、筋肉が増大する効果があることを発見した。しかし、全身投与については、まだ良い結果は得られていない。これらの研究成果を報告する。

B. 研究方法

1. 実験動物およびマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA の導入

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* での 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。詳細は前年度に報告した。この実験を本年度も継続した。一方、jetPEI の代わりにアテロコラーゲンを用いる実験も下記のように行った。20 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウス (日本

クレア社, 東京) を試料として用い、ネンブタール® (25mg/kg *i.p.* 大日本製薬, 大阪) 麻酔後、左側咬筋および大腿二頭筋に 10 μ M のマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) とアテロコラーゲン (AteloGene™: 高研, 東京) を混合し、筋肉注射を行った。また、同一個体の右側部位にはアテロコラーゲンのみを導入し、対照群として用いた。導入から 2 週間後に各筋組織を採取し、種々の解析を行った。

2. 切片作製

マウスの各咬筋はエタノールで脱水、キシレンで脱脂後、パラフィン (融点 56°C, Oxford Labware, St. Louis, MO, U. S. A.) にて包埋し、組織学的検索のために筋組織の最大直径部において厚さ 5 μ m の横断切片を作製した。

3. 骨格筋の解析

1) 骨格筋の重量測定

20 週齢マウスの咬筋および大腿二頭筋を採取し、対照群 (アテロコラーゲンのみを導入) と Mst-siRNA 導入群 (Mst-siRNA とアテロコラーゲンを混合して導入) においてそれぞれの骨格筋重量を、上皿自動天秤 (LIBROR, 島津製作所, 京都) を用いて測定した。

2) 骨格筋の組織学的解析

咬筋の最大直径部でのパラフィン切片は、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色と略す) により観察した。横断面の筋線維直径幅は画像ソフトウェア NIH image (NIH, U. S. A.) を用いて解析した。

4. 統計処理

細胞増殖反応および骨格筋の解析におけるデータは、平均 \pm S. D. で表示し、Student's

t-testにより有意差検定を行った。

C. 研究結果

1. jetPET を用いたマイオスタチン遺伝子に対する siRNA のマウスへの投与実験

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。そのマウスについて、体重およびマイオスタチンの mRNA 量を定量したが、残念ながら、現在の条件では siRNA による有意な効果は得られなかった。

2. アテロコラーゲンをを用いたマイオスタチン遺伝子に対する siRNA のマウスへの投与実験

マイオスタチン遺伝子に対する siRNA (st-siRNA) がマウス骨格筋形成に及ぼす影響を検討するため、20 週齢のマウス左側咬筋および大腿二頭筋に Mst-siRNA とアテロコラーゲンを混合して筋肉注射を行った。マウスの骨格筋を形態組織学的に比較したところ、対照群に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋および大腿二頭筋では明らかな骨格筋増大が観察された (図 1a)。

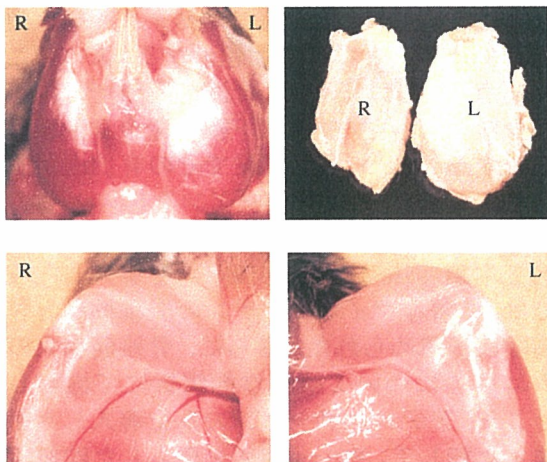


図 1a マウス左側咬筋 (L) および大腿二頭筋が siRNA/アテロコラーゲンの処理により肥大。右 (R) はコントロール。上段右は摘出したものを比較している。

Fig.1b Weights of mouse muscles

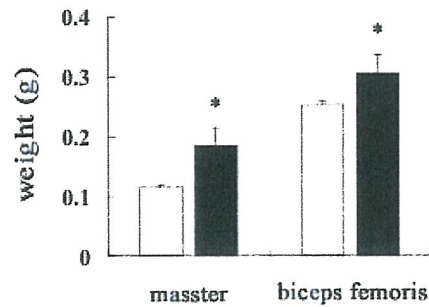


図 1b 筋肉の重量の比較

骨格筋重量を比較するため、咬筋および大腿二頭筋を採取しそれぞれの重量を測定したところ、Mst-siRNA を導入した骨格筋では対照群に比べいずれも重量の増加が認められた (図 1b)。

また、マウス咬筋におけるマイオスタチンの発現をウェスタンブロット法にて解析したところ、アテロコラーゲンのみを導入した同一個体の右側部位 (以下対照群と略す) と比較して、Mst-siRNA を導入した咬筋では顕著なマイオスタチンの発現抑制が認められた。

Fig.2 Western blot analysis

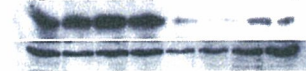


図 2 マイオスタチンのウェスタンブロット解析。右の 4 つのレーンが siRNA 処理したマウスのタンパク質。左はコントロール。下のバンドはアクチンのコントロールバンド。

次に、この Mst-siRNA 導入による骨格筋量増大のメカニズムについて詳細に検討するため、咬筋の最大直径部における横断切片を作製した。骨格筋は、筋管の成熟体である筋線維が束となって筋線維束という一つの単位を形成し、さらにこの筋線維束が多数集まることによって構成されている。対照群に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋の各筋線維は肥大傾向を示した (図 3a)。

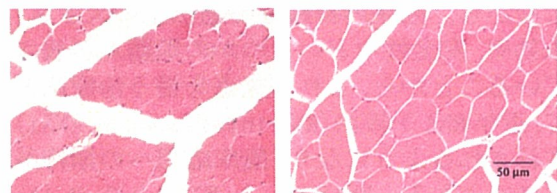


図 3a 咬筋の HE 染色。各筋線維は肥大傾向を示した (右図)。左図はコントロール

さらに、NIH image を用いて各筋線維の直径を測定・定量化し、その分布と平均値について比較検討を行ったところ、Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維 ($33.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$) は対照群 ($24.4 \pm 1.1 \mu\text{m}$) に比べ約 1.3 倍増加していた (図 3b)。

Fig. 3b Morphometric analysis

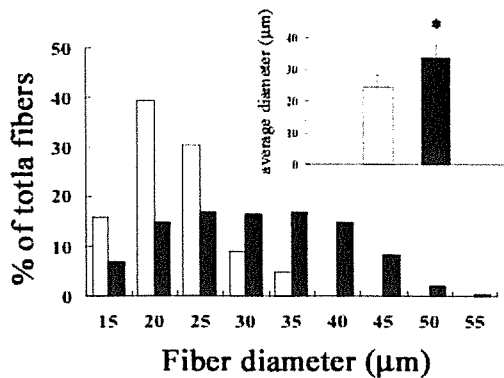


図 3b 筋繊維の解析 黒が siRNA を投与した群。

D. 考察

進行性の筋萎縮と筋力低下を主徴とする筋ジストロフィーは、その原因遺伝子が既に分らなくなっているにもかかわらず未だ有効な治療法が確立されていない重篤な遺伝性疾患で、全身の自律的な活動を制限するだけでなく呼吸障害をきたし死の転帰をとることもある。これまでに筋疾患、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する様々な治療法の開発に関する研究が進められ、生体における骨格筋量の制御機構が分子レベルで解明されつつある。例えば、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子、あるいは本遺伝子の機能領域のみから成るミニジストロフィン遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターに組み込んだ遺伝子治療や³⁷⁻³⁹⁾、ジストロフィンと類似した構造を有し、幼若な筋や再生した筋肉にのみ一過性発現する細胞骨格タンパク質であるユートロフィンの発現を増強させる試みなどが挙げられる⁴¹⁻⁴³⁾。しかしながら、効果の持続性や遺伝子の大きさ、導入効率、安全性などいくつかの問題点が残されていることから、これら欠点を補う治療法として、近年 RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi) が注目されるようになり、臨床応用への期待が高まりつつある。RNAi は、A. Fire と C. Mello らにより 1998 年に線虫を用いた実験で初めて見いだされた 2 本鎖 RNA によって引き起こされる遺伝子配列特異的な発現抑制の現象である。

また、この RNAi を遺伝子医薬として応用する利点として、標的遺伝子とは無関係の遺伝子発現に影響を及ぼすことのない高い選択性が挙げられる。

骨格筋形成に関する研究が進められる中、Artaza らは、骨格筋形成の抑制遺伝子であるマイオスタチン特異的な siRNA 発現ベクターの作製を行い、マウス胎仔線維芽細胞由来 C3H10T1/2 細胞において、マイオスタチンの発現を効果的に抑制することを報告している。最近われわれは、骨格筋の著しい萎縮を呈する Caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウスに、このマイオスタチン突然変異型トランスジェニックマウスを交配させると筋力の回復を示すマウスが出生することが報告した。また他の研究グループにおいて、筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスにマイオスタチン抗体を投与してその作用を阻害すると、骨格筋の再生能力が高まり筋萎縮レベルの改善が認められるとの報告がある。これらのことから、マイオスタチンの機能を阻害することによって骨格筋形成の調節が可能となり、今後さまざまな筋疾患に対する治療として応用される可能性が示唆された。このような背景を踏まえ、本研究では、マイオスタチンを標的遺伝子とした RNAi がマウス骨格筋に与える影響を検討した。従来、骨格筋への siRNA の導入法にはエレクトロポレーションやウイルスベクターが多く用いられてきたが、実際の臨床応用を想定した場合、導入効率が高い反面、特殊な装置の必要性や病原性、条件検討やベクターの作製が困難であることなどが問題となる。よってこの問題点を解決するべく、今回の実験では為害性が少なく、近年マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する siRNA 導入実験でその有効性が確認されているアテロコラーゲンを担体として用い siRNA の導入を行った。マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) を導入した咬筋では、顕著なマイオスタチンの発現抑制と骨格筋増大が認められた。さらに、骨格筋増大のメカニズムについて組織学的解析にて検討したところ、アテロコラーゲンのみを導入した対照群と比較して、Mst-siRNA を導入した咬筋では各筋線維の肥大が認められた。マウスの筋線維数は胎生期に決定され、出生後は変化しないことが知られていることから、今回得られた骨格筋増大の所見は hypertrophy が原因であることが示唆される。過去の報告によると、骨格筋の hypertrophy には筋衛星細胞や成長因子などの相互作用が関連しており、マイオスタチ