

ンは骨格筋の再生部位において発現し、筋衛星細胞数の制御に関わると考えられている。また、骨格筋はそれ自身もつ収縮特性などの運動負荷に対して敏感に反応し、筋量を増すことも知られている。したがって、Mst-siRNAを導入した骨格筋では、マイオスタチンの発現抑制により筋衛星細胞の自己複製能および細胞増殖の抑制というマイオスタチンの機能が低下した結果、筋線維の肥大が生じた可能性が考えられる。近年、核酸医薬、特に siRNA のデリバリーシステムの開発が進められているが、血中あるいは組織中において siRNA を安定させることが困難であるため、臨床応用可能なデリバリー方法は未だ完全には確立されていない。また一般に、RNAi 効果は導入後最大約 1 週間程度といわれている。しかしながら、今回の実験では siRNA 導入は 1 回のみであり、2 週間を経過しても骨格筋増大が認められた。これは、siRNA をアテロコラーゲンとの複合体として導入することによって、細胞への取り込み効率が高まるとともに細胞内における siRNA の半減期が延長され、マイオスタチン遺伝子の発現を持続的かつ効果的に抑制したためと考えられる。

本研究により、マイオスタチンに対する RNAi は、筋芽細胞の増殖および分化を促進し、さらにはマウス骨格筋量を増大させたことから、成長因子の発現制御による新たな筋組織の再生促進法として有効な手段となりうる可能性が示唆された。また、より詳細な情報を得るためには、筋ジストロフィー疾患モデルマウスを用いて RNAi 効果の検討を行う必要があると考えられる。今後、このような技術が直接生体に対して応用できる新たな治療法として進歩し、非侵襲的かつ安全に行うことが可能となれば、骨格筋異常を伴う種々の疾患に対する RNAi 創薬の可能性がますます広がるものと期待される。

## E. 結論

- 1) マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA を導入した咬筋では、対照群と比較してマイオスタチンの発現が有意に抑制されていた。
- 2) マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA を導入した咬筋、大腿二頭筋の骨格筋重量および筋線維の直径は、対照群と比較してともに有意な増加を示した。

以上の結果よりマイオスタチンに対する RNA 干渉法は、筋芽細胞の増殖や分化、さらに個体レベルでの骨格筋量の調節に有用であったことから、今後種々の筋疾患への治療として

応用される可能性が示唆された。

なお、この研究は、徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部大内淑代、ヘルスバイオサイエンス研究部の木内奈央、森山啓司、川崎医科大学神経内科の大澤 裕、砂田芳秀との共同研究として行われた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.* 2006 Nov;116(11):2924-34.

### 学会発表

Nao Kinouchi, Yukiho Tanimoto, Sumihare Noji, Keiji Moriyama. Regulation of skeletal muscle by myostatin specific RNA interference (RNAi). The 1<sup>st</sup> International symposium and workshop on the future direction of oral sciences in the 21th century, 兵庫、3月2,3日 (2007)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 優性欠損型 activin 受容体を用いた myostatin 作用の特異的遮断

分担研究者 濃野 勉 川崎医科大学 助教授

**研究要旨：** 骨格筋は前駆細胞の増殖と筋芽細胞への分化によって形成される。この過程を負に調節する因子として知られるマイオスタチン (MSTN) は筋芽細胞の膜受容体である IIA 型アクチビン受容体 (ActRIIA) に結合して細胞内へシグナルを伝え、筋芽細胞の増殖、分化を負に調節しているが、欠損型 ActRIIA を適用すれば MSTN シグナルを特異的に遮断できる。MSTN ノックアウトマウスでのマイクロアレイ解析から、MSTN の下流で Wnt シグナルが筋分化に関与していると考えられ、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。MSTN 欠損で見られる骨格筋過形成の過程では Wnt4 の発現上昇と sFrp の発現低下が主な原因となっている可能性がある。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。MSTN の下流シグナルである Wnt4 の強制発現は MSTN 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。

### A. 研究目的

骨格筋の形成過程に関与する MSTN は筋前駆細胞や筋芽細胞の増殖と分化を負に調節する因子であり、筋肉形成に対して抑制的な作用を持つ。MSTN は II 型膜受容体である 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。この過程を競合的に遮断することで筋分化が促進され、その目的で阻害ペプチドや中和抗体などが用いられている。

MSTN のノックアウトにより Wnt4 の発現上昇とその結合タンパク質である sFrp1, 2 の発現抑制が起こり、その結果、Wnt シグナル経路のうち、Ca<sup>2+</sup>を介する経路の活性化を介して筋芽細胞の増殖と分化が促進されると言われている。MSTN はこの経路を負に調節することで筋分化を抑制している可能性が高い。

この分担研究課題では欠損型の II 型受容体による MSTN シグナルを遮断すれば筋分化に対する促進効果が得られること、およびその下流シグナルである Wnt4 の筋分化における作用を中心に調べた。これらのペプチドを投与することで骨格筋形成の増大が見られれば、筋疾患に対する特異性の高い治療となる。

### B. 研究方法

#### 1. cDNA クローンの構築と発現

遺伝子発現系はニワトリ ASLV のサブグループ A に由来する RCAS ベクター、および発現ベクター-pcDNA3.2/V5/DEST を用いた。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 増幅した DNA 断片同士の直接接続で行なった。PCR を用いて作製したクローンはすべて塩基配列を確認した。ニワトリ線維芽細胞 CEF およびマウス筋芽細胞株 C2C12 への DNA の導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。

#### 2. 筋分化の検定

筋芽細胞 C2C12 は RIKEN 細胞バンクより入手し、10% ウシ胎児血清を含む D-MEM で継代維持し、2% ウマ血清を含む培地に換えて筋分化を誘導した。アッセイ用の小型 4-well plate (24 mm 径) に 2×10<sup>4</sup> 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、AR2A-DN、AR2B-DN 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)

1% ヤギまたはウマ血清を加えたブロッッキング

グ液で処理し、一次抗体と反応させた。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、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。抗ミオシン重鎖 (MyHC) 速筋型 (Sigma): 1/400、抗 MyHC 遅筋型 (Sigma): 1/1000、抗 HA (Roche): 1/500。

#### 4. *in situ* hybridization (ISH) 法

Digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche) を用いて転写反応を行い、DIG-11-UTP で標識された antisense RNA プロブを合成し、必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

固定した胚を脱水後にパラフィン包埋し、厚さ 7  $\mu\text{m}$  で作製した切片を用いて ISH を行った。終濃度 10% の dextran sulfate を加えた pre-hybridization mix 中で 65°C で 1 時間処理し、DIG 標識 RNA プロブ (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、65°C で約 16 時間 hybridization を行った。2 $\times$ SSC, pH 7.0, .50% formamide, 0.1% SDS に置換し 65°C で 20 分間 4 回洗浄を行った。その後、0.2 $\times$ SSC + 0.1% Tween 20 に置換し 65°C で 20 分間 4 回洗浄した。さらにブロッキング溶液中で 15°C、1 時間処理し、抗体を加えて 15°C で 2 時間抗体反応を行った。洗浄後、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 液で核を染色した。

### C. 研究結果

#### 1. AR2A-DN、AR2B-DN の過剰発現

MSTN と ActRIIA の骨格筋形成の過程での発現パターンを調べると、ニワトリ胚では発生ステージ 23 から枝芽で MSTN の発現が始まり、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 の発現は皮筋節や枝芽での 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。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。

このように、MSTN の発現は一過性であり、一部 ActRIIA とオーバーラップしていることから、MSTN 活性阻害のためにはステージ 22 までに過剰発現させることが必要である。レトロウイルスベクターを用いた発現系では 1 回の細胞周期が回らなければ組換え体はゲノムへ組み込まれず、発現できないので、ニワトリ胚を用いて次のような手順で実験を行った。

優性欠損型の受容体として、ActRIIA の細胞外ドメインのみをコードする cDNA (AR2A-DN) を RCAS ベクターに組換えてウイルスを調製した。これをステージ 16 のニワトリ胚の予定肢芽領域へ注入し、右側のみで過剰発現を行った。ステージ 36 前後で固定して、ウイルスが感染していない左側の肢芽を対照として筋肉形成を比較したが、AR2A-DN を過剰発現した右側での有意な増大は見られなかった。C2C12 などの筋芽細胞の培養系では AR2A-DN の過剰発現で筋分化の促進が見られていたが、生体での効果はあまり顕著ではなかった。

一方、同様に ActRIIB の細胞外ドメインのみをコードする cDNA (AR2B-DN) を用いて過剰発現を試みたが、この場合は胚発生が途中で停止し、死亡する例が多く見られた。AR2A-DN では生存率が 11/12 であったのに対し、AR2B-DN では 9/15 であった。これは微量注入したウイルスが一部神経管などへも侵入し、ここで本来働いている ActRIIB の作用を阻害した可能性がある。すなわち、AR2A-DN では筋肉形成に対する効果よりも、神経分化などに対する致命的な副作用の方が大きかった。

#### 2. Wnt4 の過剰発現

MSTN ノックアウトマウスの骨格筋では遅筋型が減少し速筋型が上昇する。さらに、MSTN 欠損によって対照群に比べて Wnt/calcium 経路の構成因子の発現が上昇している。すなわち、Wnt4, sFrp5, Dickkopf1, Dishevelled, Calcineurin, CamKIIA, CamKIID, Catnbip などの発現が有意に上昇し、逆に Wnt 活性を阻害する sFrp1, sFrp2, Dickkopf2 の発現が有意に低下している。これら sFrp や Dickkopf は Wnt シグナル経路のうち、 $\beta$  catenin を介する経路に対しては抑制的に作用するが、Wnt/calcium 経路に対しては影響しないと言われている。

Wnt4 は衛星細胞の増殖を促進することが知られているので、この効果は筋芽細胞の分化に対する MSTN の作用に拮抗すると考えられる。

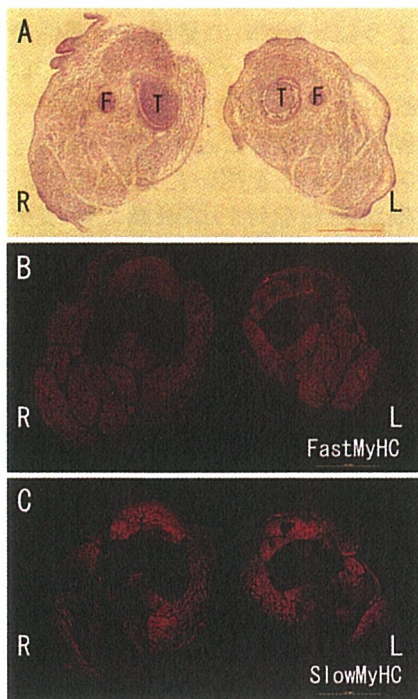


図 1. ニワトリ胚の右側肢芽へ過剰発現した Wnt4 の効果。ステージ 16 で過剰発現し、ステージ 37 で固定した下腿の HE 染色 (A)、速筋型 MyHC 抗体染色 (B)、遅筋型 MyHC 抗体染色 (C)。右側 (R) に過剰発現し、左側 (L) の対照と比較。

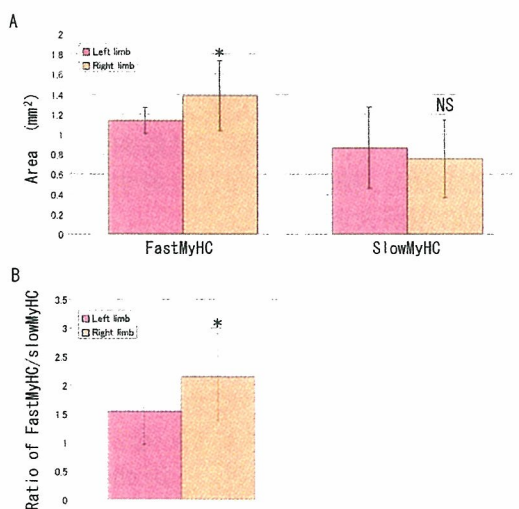


図 2. 右側肢芽での Wnt4 過剰発現による速筋型 MyHC と遅筋型 MyHC の抗体染色で染まる領域の比較。(A)速筋型は有意差があるが ( $P < 0.05$ )、遅筋型は有意差なし。(B)速筋/遅筋の比は有意に上昇。

これを検証するために、ニワトリ胚で Wnt4 を過剰発現して効果を調べた。ステージ 16 のニワトリ胚で C 末端に HA タグを付けた Wnt4 を RCAS で過剰発現し、ステージ 28~30 で発現を確認し、ステージ 37 で形質を調べた。

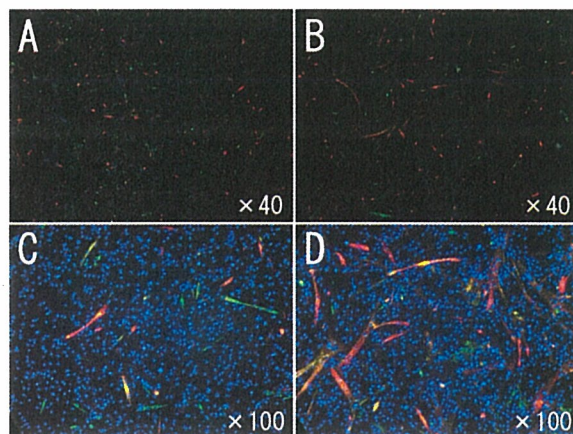


図 3. C2C12 細胞で発現した Wnt4 の筋分化に対する効果。(A, C) EGFP を発現した対照群。(B, D) Wnt4 を過剰発現した処理群。蛍光抗体法で速筋型 MyHC は赤色、遅筋型 MyHC は緑色に染色。核は DAPI 染色 (青色)。

Wnt4HA の過剰発現では AR2B-DN のような致命的な副作用は見られず、ほとんどが順調に生育する。約 3 日後のステージ 28 では Wnt4 の右側肢芽全体での発現が確認され、このとき衛星細胞のマーカーである Pax7 の発現も対照の左側肢芽に比べて上昇していた。MyoD の発現も同様に処理側で発現上昇が確認された。ステージ 37 前後での最終的な形質としては、下腿の外側への湾曲と下腿部の肥厚が見られる。下腿部の切片を作製し、HE 染色、MyHC 免疫染色で評価すると、対照の左側に比べて有意な筋肥大が見られた (図 1)。膝関節、足関節の形態には変化は見られず、下肢の背屈は関節の異常によるものではないと考えられる。免疫染色では、遅筋型の MyHC による領域が減少し、代わりに速筋型 MyHC による領域が有意に拡大していた (図 2)。

### 3. 筋芽細胞に対する効果

マウス筋芽細胞株 C2C12 は継代初期には 2% ウマ血清で分化誘導をかけて検定した時に、組換えタンパク質として加えた成熟型 MSTN、AR2A-DN、AR2B-DN などに対する応答がみられる。MSTN 添加により MyHC 抗体での染色で見て速筋型筋線維への分化が抑制されていた。AR2A-DN、AR2B-DN の添加では逆に速筋型筋線維への分化が促進された。これらの処理で遅筋型への分化はほとんど影響されていない。このような効果は C2C12 の未分化培地での継代を長期間続けると速筋型への分化能は徐々に低下する。

Wnt4HA を C2C12 にトランスフェクトして発

現し、筋分化への効果を検定すると、分化培地での4~5日間の培養後で筋肉細胞への分化が対照群のEGFPを発現した細胞と比べて有意に上昇していた（図3）。この効果は速筋型MyHCで染まる細胞が多く出現していたのに対し、遅筋型MyHCで染まる細胞は対照群と差が見られなかった。このような結果はAR2A-DNやAR2B-DNで得られた結果と一致しており、MSTNで発現抑制されて筋分化にかかわるWntシグナルとしてWnt4/calcium経路の重要性が示唆される。

#### D. 考察

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、その欠損型受容体(AR2A-DN)はMSTN作用を阻害し、筋分化を促進する。これまでに報告したように、このAR2A-DNの活性は筋芽細胞の培養系では確認できたが、ニワトリ胚では証明できなかった。発現効率が高くないために生体内ではMSTN/ActRIIAに対する結合阻害活性が十分発揮されなかった可能性がある。

MSTNのノックアウトで発現が上昇し、その下流で働く筋芽細胞に対する増殖促進と分化誘導を担う因子の1つと考えられるWnt4は $\beta$ catenin経路を部分的に活性化し、さらにcalcium経路も作動する。この効果はC2C12でも検証でき、さらに生体内でも有効であることがニワトリ胚の実験系で証明された。Wnt4の作用はMSTNの機能欠損で見られる効果と類似しており、筋線維の中でも速筋型に対してより顕著であった。このように、Wnt4は筋分化の促進因子として十分な活性を保持しているので、MSTN活性阻害と同等またはそれ以上に有望であると考えられる。

これまでに知られているWnt4の機能としては、ノックアウトマウスで腎臓の形成不全が起こることが知られているが、今回の報告書に示されているような筋肉形成に対する効果はまだ報告されていない。トランスジェニックマウスによる効果の確認と合わせて、筋分化に対する活性はさらに詳しく検証する意義がある。

今後の課題としては、このWnt4タンパク質を組換え体と産生すること、Wnt4の発現系を確立することがあげられる。前者に対しては、これまで精製が困難であったWntファミリーのメンバーの中でもWnt3a, Wnt5a, Wnt7aなど

が成功しているのも、他のメンバーも近い将来には活性型として精製され、使用できるようになると思われる。後者に関しては、現在レンチウイルス・ベクターを使用した発現系を構築しており、培養細胞での効果、さらに筋疾患マウスなど成体での効果を検定する予定で準備中である。このような発現系を利用すれば恒常的に筋分化促進因子を発現し、供給し続けることができ、さらに安全性が確認できればヒトへの応用も可能である。

培養細胞での発現系で調べた限りではWnt4はタンパク質の産生と分泌の活性が他のWntファミリーに比べて高いので、製剤としての供給は可能であろう。成体に適用したときに、筋分化が促進される確立は高いと考えられる。このような方法で恒常的に供給し続けられれば、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。

#### E. 結論

欠損型AR2A-DNでは内因性MSTN作用を完全にブロックすることが困難で、生体では筋分化に対する有意な効果は確認できなかった。それに比べて、MSTNの下流で働くWnt4を過剰発現すると、生体内での筋肉形成に対して有効であることが判明した。

遺伝子治療を適用するには導入した遺伝子の発現効率と安全性の確保が必要である。これらの改良方法としてレンチウイルス・ベクター系があり、それを利用した発現系の構築に向けて基礎的な検討を行い、Wnt4の利用が有望視された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

3) 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) Sasaoka, S., Terada, K., Wada, N., Nohno, T.: Interaction of Wnt and Frizzled during chick limb development. 9th International Conference on Limb Development and Regeneration, Awaji, Hyogo (Jul. 24-28, 2006)

2) Narita, T., Wada, N., Nishimatsu, S., Nohno, T.: Wnt3a and Wnt3 during AER formation of chick embryos. 9th International Conference on Limb Development and Regeneration, Awaji, Hyogo (Jul. 24-28, 2006)

3) 和田直之, 本間隆義, 濃野 勉: ニワトリ胚頭蓋底部を構成する軟骨性骨格の初期形成過程. 日本発生生物学会第38回大会, 広島 (May 31-Jun. 3, 2006)

4) Nishimatsu, S., Hino, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T. : PC6, a BMP-3b-processing enzyme, is involved in axial patterning of the Xenopus embryo. 11th International Xenopus Conference, Chiba (Sep. 12-16, 2006)

5) 高田温行, 森口隆彦, 濃野勉: 欠損型マイオスタチン受容体および Wnt4 による筋分化

の促進. 第62回岡山内分泌同好会, 岡山 (Sep. 13, 2006)

6) 和田直之, 本間隆義, 濃野勉: 神経堤細胞による, 頭蓋底を構築する軟骨性骨格の形成過程. 日本動物学会第77回大会, 松江 (Sep. 21-24, 2006)

7) 成田知弘, 和田直之, 西松伸一郎, 濃野勉: ニワトリ胚 AER 形成における Wnt3a と Wnt3. 日本動物学会第77回大会, 松江 (Sep. 21-24, 2006)

8) 高田温行, 山本康弘, 岡 博昭, 森口隆彦, 寺田久美子, 三棹聡美, 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. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋 (Dec. 6-8, 2006)

9) Takata, H., Moriguchi, T., Nohno, T.: Role of Wnt4 in myogenic differentiation and proliferation of skeletal muscle. Wnt Meeting 2007, San Diego, CA, USA (Jun. 21-23, 2007)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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	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			2006	229-233
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			2007	186-190

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	巻号	ページ	出版年
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
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.Endocrinol.	189(2)	409-421	2006
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
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
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
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
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	生物学に関する試験論叢  (両備てい園記念財団研究助成金による報告書)	21	20-33	2006
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
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		pp.19-26	2006
H. Hagiwara, Y. Ohsawa, S. Asakura, T. Murakami, T. Teshima, Sunada Y.	Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy	FEBS Lett.	580(18)	4463-8	2006