

200730021 A

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 砂田芳秀

平成 20 (2008) 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. Myostatin prodomain における myostatin 阻害領域の解析 砂田芳秀	6
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	10
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	15
4. マイオスタチンの下流で働く Wnt ファミリーによる筋分化の促進 濃野 勉	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22

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た。Myostatin 前駆体タンパクの prodomain が myostatin 活性化を阻害する点に着目し、この阻害活性を prodomain 内の 30 アミノ酸領域にまで絞り込んだ。さらに同部位の合成ペプチドが用量依存性に myostatin 活性を抑制した。Prodomain より更に myostatin 阻害活性の高い follistatin 変異体分子 FSI-I を開発した。FSI-I 遺伝子導入マウスと筋ジストロフィーモデルマウスとの交配により筋量の増加、筋力の回復、炎症細胞浸潤の低下を確認し、治療効果があることを示した。Myostatin 阻害骨格筋の遺伝子発現プロファイリング解析を行い、マクロファージマーカーのガレクチンや脂肪酸代謝酵素 CTP-1 の発現上昇をみいだした。これらの知見は myostatin 阻害療法の適応が代謝性ミオパチーにも拡大する可能性を示唆している。野生型マウスに対し、atelocollagen と混和した myostatin-targeting siRNA の経静脈性投与によって全身性の筋肥大を誘導することに成功した。増殖因子である Wnt4 が myostatin 細胞内シグナルに拮抗して筋分化を促進することをみいだした。Wnt4 も筋ジストロフィーの治療標的分子となる可能性が示唆される。今後、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・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 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、
①prodomain 内をオーバーラップする 26 個の断片に分割し、それぞれの発現ベクターを構築する。

②これら prodomain 断片発現ベクターを HEK293 細胞培養細胞系に導入し、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。

③特定された阻害領域に相当する合成ペプチドを細胞培養系に添加して、myostatin 阻害活性を解析する。

2. Follistatin 改変体による myostatin 阻害療法開発

昨年度までに 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改変体分子 FSI-I を見出した。次いで、FSI-I 遺伝子導入マウスを作出し、骨格筋の hyperplasia と hypertrophy が生じることを確認した。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、筋ジストロフィー病態の軽減あるいは改善効果が確認された。

①FSI-I 遺伝子導入で改善した *mdx* マウス骨格筋における遺伝子発現プロファイリング解析を行い、表現型改善の分子機序を詳細に検討した。

②マイオスタチンの胎児期での発現を調べるため、マウス胚や P19 細胞を用いた分化系で精査した。

3. RNAi による myostatin 発現抑制療法

昨年度までに myostatin-targeting siRNA を設計し、培養細胞に導入して、細胞レベルで myostatin の発現抑制効果を確認した。さらに、siRNA 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することにより筋を肥大させることに成功した。

①アテロコラーゲンと混和した siRNA を野生型マウスに経静脈性に投与して、myostatin 阻害効果を解析した。

4. 欠損型 myostatin 受容体の治療応用の検討

myostatin 欠損マウス骨格筋の遺伝子発現解析により、Wnt4 の発現が上昇していることに着目した。骨格筋の分化・維持における Wnt

シグナルの機能を myostatin シグナルとの関連に注目して解析し、骨格筋の増大に対して正の作動薬としての開発を目指す。

①Wnt4 の C 末端側に HA あるいは V5 のタグを付けた組換えタンパク発現ベクターを構築し、C2C12 筋芽細胞にトランスフェクションして、筋分化への影響を細胞レベルで解析した。

②上記の Wnt4 組換えタンパクをニワトリ胚では複製可能型レトロウイルスベクター(RCAS)に組み込んで、ニワトリ胚の肢芽に 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作成した 26 個の prodomain 断片を上記のシステムを用いて解析した結果、myostatin 阻害活性部位を最終的には約 30 アミノ酸領域に特定することができた。(この部位に阻害活性の約 78%が局在する)

③特定された阻害領域に相当する合成ペプチドを細胞培養系に添加すると、用量依存性に myostatin 活性を阻害することが確認された。

今後この 30 アミノ酸配列に基づいてペプチド薬が開発できる可能性ある。

2. Follistatin 改変体の治療効果

①follistatin 改変体 FSI-I 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、筋病理像の改善も確認された。

②Mac1 陽性のマクロファージ系譜の細胞浸潤は骨格筋の面積あたり *mdx* マウスでは 8.5%であったが、FSI-I 遺伝子の導入により 4.0%に低下した。FSI-I により myostatin 活性を阻害することによって、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。

③myostatin mRNA の胎児期での発現を精査するため、マウス胚を用いて、in situ hybridization 法を行なった。MSTN mRNA は胎児期におい

でも骨格筋に強く発現していたが、FLRG と異なり心臓での発現は低めであったが心房と心室の中隔では発現が確認された。

3. RNA 干渉による myostatin 抑制

①20 週齢の野生型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ところ、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 myostatin 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 myostatin の発現抑制が認められた。

②20 週齢の野生型マウスに myostatin-siRNA とアテロコラーゲンを混合して静脈注射を行った。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 を導入したマウスの骨格筋では明らかな骨格筋増大が観察され、ウェスタンブロット解析にて顕著な myostatin の発現抑制が認められた。

③骨格筋組織の定量解析では筋線維径が有意に増加していた。

4. 欠損型 myostatin 受容体の治療応用

①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。

②この過程で筋芽細胞のマーカー Pax7、筋分化のマーカー MyoD の発現が対照群に比べて顕著に上昇していた。このような効果は筋芽細胞株 C2C12 でも確認された。

③myostatin によって Smad-2 のリン酸化が誘導されるが、この時に Wnt4 を過剰発現するとリン酸化が抑制され、Wnt4 が myostatin 細胞内シグナルに拮抗することをみいだした。

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 阻害活性を 30 アミノ酸領域に特定できた。

(2)Follistatin よりも低分子で、myostatin に対する阻害特異性の高い follistatin 改変体分子 FSI-I を開発した。筋ジストロフィーモデルマウスと交配して FSI-I 遺伝子導入すると、筋萎縮の改善（筋線維径の増大）や炎症細胞浸潤の軽減、筋力増強など、ジストロフィー変化の治療効果が達成できた。

(3)myostatin に対する siRNA をアテロコラーゲンを担体として、経静脈性に全身投与することで、骨格筋量を増大させることに成功した。

(4) 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。Wnt4 は myostatin 細胞内シグナルに拮抗するため、Wnt4 の過剰発現は 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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer* 6, 62 (2007)
- 2) Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn* 236(10), 2800-2807 (2007)
- 3) Narita T, Nishimatsu S, Wada N, Nohno T. A Wnt3a variant participates in chick apical ectodermal ridge formation: distinct biological activities of Wnt3a splice variants in chick limb development. *Dev Growth Differ* 49(6), 493-501 (2007)
- 4) Takehara-Kasamatsu Y., Tsuchida K., Nakatani M., Murakami T., Kurisaki A., Hashimoto O., Ohuchi H., Kurose H., Mori K., Kagami S., Noji S., Sugino H. Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family members during mouse heart development. *J. Med. Invest.* 53(3,4): 276-288, 2007
- 5) Nakatani M., Takehara Y., Sugino H.,

Matsumoto M., Hashimoto O., Hasegawa Y., Murakami T., Uezumi A., Takeda S. Noji S., Sunada Y., Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in *mdx* mice. *FASEB J.* 22(2): 477-487, 2008

- 6) Murakami M., Tsuchida K. Recent advances in inorganic nanoparticle-based drug delivery systems. *Mini. Rev. Med. Chem.* 8(2): 175-183, 2008
- 7) Tsuchida K., Nakatani M., Uezumi A., Murakami T., Cui X. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr. J.* 55(1): 11-21, 2008
- 8) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 2008 Mar 6; in press.
- 9) Tsuchida K., Nakatani M., Murakami T., Uezumi A. Action of myostatin and its regulators in skeletal myogenesis. In *Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation. Research Signpost* (in press)
- 10) Tsuchida K. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myologica* (in press)
- 11) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, and Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. *Acta Myologica* 2008 (in press)
- 12) 大澤裕、砂田芳秀. TGF- β ファミリーシグナルによる神経・筋疾患の制御. *細胞* 2007
- 13) 土田邦博 マイオスタチン阻害分子の開発の現状と筋ジストロフィー治療実現への展望 *難病と在宅ケア* 13(9): 43-45, 2007
- 14) 木内奈央 マイオスタチンに対する RNA 干渉法による骨格筋形成の調節 *四国歯誌* 2007;20(1):27-41.

2. 学会発表

- 1) Ohsawa Y, Okada T, Hayashi S, Ikezoe K, Murakami T, Sunada Y. Therapeutic effects of small-molecule inhibitors of type I TGF- β receptors for the treatment of muscular dystrophy. *FASEB Summer research Conferences, TGF- β Superfamily: Signaling & Development, Tucson, Arizona, July 14-19 (2007)*
- 2) Ohsawa Y, Murakami T, Sunada Y : Myostatin inhibition reverses satellite cell number in caveolin-3-deficient mouse muscle. *FASEB Summer research Conferences, Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, Indian Wells, California, July 14-19 (2007)*
- 3) Ohsawa Y, Sunada Y. Inhibition of myostatin signaling through type I and type II myostatin receptors. 7th Japanese-French Workshop on Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy. Hayama, Kanagawa, June 8-9 (2007)
- 4) Ohsawa Y, Murakami T, Okada T, Nishimatsu S, Nohno T, Noji S, Sunada Y. Myostatin inhibition increases atrogen-1 expression and accelerates skeletal muscle atrophy under denervated conditions. 12th International Congress, World Muscle Society, Sicily, Italy, October 17-20 (2007)
- 5) Tsuchida K., Nakatani M., Uezumi A., Murakami T. Prevention of muscle atrophy and muscle degeneration in muscular dystrophy by myostatin blockage. *Gordon Research Conference, Myogenesis. II Ciocco, Italy, May13-18, 2007*
- 6) Tsuchida K. Myostatin inhibition by follistatin-derived peptide ameliorates pathophysiology of muscular dystrophy model mice. 7th Japanese-French Workshop on Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy. Hayama, Kanagawa, June 8-9 (2007)
- 7) Uezumi A., Nakatani M., Tsuchida K. Dynamic changes of skeletal muscle satellite cells and macrophages in myostatin-inhibited transgenic mice. *FASEB Summer Research Conferences, Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Indian Wells, CA, U.S.A. July*

14-19 (2007)

- 8) Tsuchida K. Discovery and development of myostatin inhibitors to prevent muscle atrophy caused by neuromuscular disorders. 5 th Anniversary Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST), Xi'an, China, November 7-11 (2007)
 - 9) Nao Kinouchi, Yukiho Tanimoto, Sumihare Noji, Keiji Moriyama. 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, Hyogo, March 2-3 (2007)
 - 10) Takata H, Moriguchi T, Nohno T. Role of Wnt4 in myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. Wnt Conference in La Jolla, California, Abs. p. 20. June 21-23 (2007)
 - 11) Takata H, Moriguchi T, Yamamura M, Nohno T. Interaction of Wnt4 with myostatin signaling during myogenic differentiation of skeletal muscle. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Signaling Pathways in Cancer and Development, Snowboat Springs, Colorado. March 24-28 (2008)
 - 12) 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
 - 13) 林紗織、岡田只士、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、鈴木友子、武田伸一、砂田芳秀. マイオスタチン活性は筋衛生細胞動態に影響する. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日
 - 14) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、村上龍文. TGF- β タイプ I 受容体阻害剤による筋ジストロフィー分子標的療法. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日
 - 15) 大澤裕、岡田只士、萩原宏毅、村上龍文、砂田芳秀. ALS に対するマイオスタチン阻害効果の検討. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日
 - 16) 砂田芳秀、林紗織、大澤裕、村上龍文. 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. 第 25 回日本神経治療学会総会、仙台、2007 年 6 月 21 日
 - 17) 大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、若山吉弘、澁谷誠二、砂田芳秀. Caveolin-3 変異マウスにおける dysferlin と myoferlin の解析. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費平成 19 年度清水班班会議、東京、2007 年 12 月 7 日
 - 18) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、土田邦博. Myostatin prodomain における myostatin 阻害領域の解析. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費平成 19 年度清水班班会議、東京、2007 年 12 月 8 日
 - 19) 土田邦博、中谷直史、上住聡芳、村上達也、武田伸一、野地澄晴、砂田芳秀 フォリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子の解析と筋ジストロフィー治療法の開発. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費平成 19 年度清水班班会議、東京、2007 年 12 月 8 日
 - 20) 上住聡芳、深田宗一朗、土田邦博 骨格筋脂肪変性を担う血管近傍に存在する間葉系細胞の同定 日本分子生物学会日本生化学会合同大会 (BMB2007) 横浜、2007 年 12 月 11-15 日
 - 21) 中谷直史、上住聡芳、小久保正博、崔雪玲、土田邦博 マイオスタチン阻害による抗肥満作用 日本分子生物学会日本生化学会合同大会 (BMB2007) 横浜、2007 年 12 月 11-15 日
 - 22) 木内奈央、谷本起穂、大澤裕、砂田芳秀、野地澄晴、森山啓司 マイオスタチンに対する RNA 干渉法による骨格筋形成の調節 第 66 回日本矯正歯科学会 大阪、2007 年 9 月 19-21 日
 - 23) 高田温行、山本康弘、岡博昭、森口隆彦、寺田久美子、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 (第 2 報) 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11-15 日
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Myostatin prodomain における myostatin 阻害領域の解析

分担研究者 砂田芳秀 川崎医科大学 教授

研究要旨：筋ジストロフィーに対する myostatin 阻害戦略として、myostatin 前駆体タンパクの N 末 2/3 を占める prodomain が活性型 myostatin 二量体に結合し、その活性化を抑制することに注目した。すなわち、Prodomain の中で myostatin 活性化抑制部位を特定することができれば、そのアミノ酸配列を標的としてペプチド阻害薬を開発することが可能となる。そこで、prodomain 領域をカバーする 26 個のペプチド断片の発現ベクターを作成し、HEK293 細胞に myostatin 転写活性測定用プラスミド pGL3-(CAGA)12-Luciferase とともに導入し、myostatin 阻害活計を解析した。その結果、prodomain の myostatin 阻害活性の 70%を約 30 アミノ酸領域に絞り込むことができた。さらにこの領域の合成ペプチドをつくり、培養細胞系に添加したところ、用量依存性に myostatin 活性が抑制されることが確認できた。

A. 研究目的

Myostatin は骨格筋特異的に発現する TGF- β ファミリー分子であり、骨格筋量を負に調整する生理機能を有することが知られている。Myostatin も TGF- β 同様に、前駆体タンパクとして生合成され、その N-末端 2/3 に相当する prodomain は、C-末端 1/3 に相当する活性型 myostatin を、強力に抑制することが知られている。しかし、その抑制機構の詳細については不明である。

われわれは prodomain の持つ myostatin 活性化阻害能を筋ジストロフィー治療に応用することを構想し、肢帯型筋ジストロフィーモデルマウス(変異 Caveolin-3 トランスジェニックマウス) に prodomain 遺伝子を導入したところ、筋萎縮と筋力の著明な改善効果を達成することに成功した。そこで、今年度は prodomain における機能 domain 解析を行い、myostatin 阻害領域の決定を試みた。

B. 研究方法

(1) 262 アミノ酸から構成されるヒト prodomain について、既に報告されているシグナルペプチド切断部位 (アミノ酸 23)、N 型糖鎖切断部位(アミノ酸 91)、BMP1/ Tolloid

様プロテアーゼ切断部位 (アミノ酸 99) を挟む形で、合計 26 個のペプチド断片を設計した (図 1)。

(2) この 26 個のペプチド断片をコードするそれぞれの cDNA をヒト骨格筋 mRNA から RT-PCR 法で増幅した。

(3) これらの cDNA を、CMV プロモーターの下流、ヒト免疫グロブリン Fc の上流に挿入した発現ベクター (Prodomain peptide-Fc- pcDNA 3) を構築した。

(4) これらの発現ベクターを、myostatin 転写活性測定用プラスミド pGL3-(CAGA)12-Luciferase とともにヒト胎児腎 HEK293 細胞にトランスフェクションした。

(5) この細胞を myostatin で刺激し luciferase 発光 (myostatin 活性) を測定する。これによって prodomain の阻害効果の高い領域を決定する。

(6) 次いで最も阻害活性の高い領域に相当する合成ペプチドをつくり、ヒト胎児腎 HEK293 細胞-(CAGA)12-luciferase 系でこのペプチドによる myostatin 阻害について確認する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については川崎医科大学の規定に従って行った。

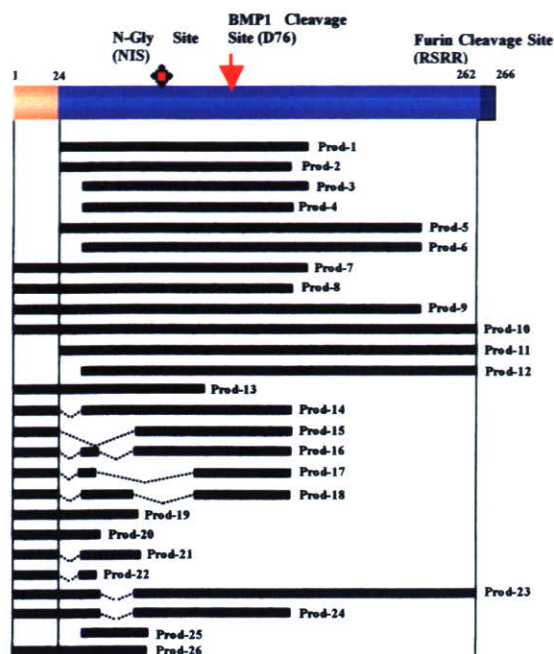


図 1. 構築した 26 個の prodomain 断片

C. 研究結果

(1) myostatin 転写活性測定用プラスミド pGL3-(CAGA)12-Luciferase を構築し、ヒト胎児腎 HEK293 細胞にトランスフェクションした培養細胞系で prodomain 全長を発現させて、luciferase 発光を測定することにより、myostatin 活性が阻害されることを確認した。

(2) こうして確立した myostatin 阻害活性の bioassay system を用いて、種々の prodomain 断片の阻害活性を解析したところ、prodomain N 末端の 110 アミノ酸は、prodomain 全長より強力な myostatin 阻害を示すことがわかった。(これを 100% 阻害とする)。(3) この 110 個のアミノ酸から引き続き阻害活性を示す領域を絞り込み、最終的には約 30 アミノ酸からなる領域に、約 70% のマイオスタチン阻害活性を認めた。(図 2)

(4) この領域に相当する合成ペプチドを myostatin 阻害活性の bioassay 系に添加したところ、用量依存性に myostatin 活性を阻害することを確認した。一方、コントロールとして scramble ペプチドを添加しても、myostatin 活性は阻害されなかった (図 3)。

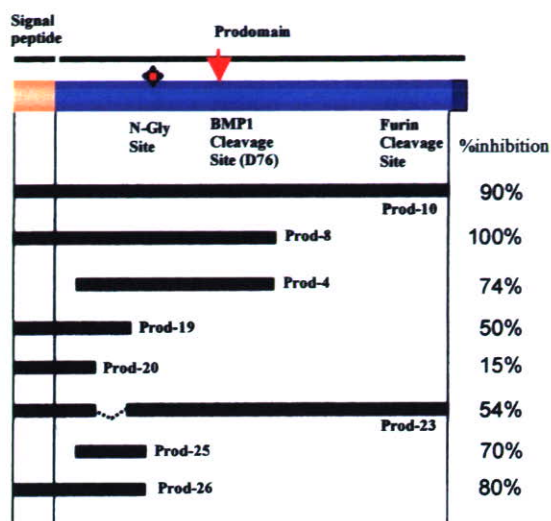


図 2. Prodomain 断片の myostatin 阻害活性解析

prodomain の myostatin 阻害活性の約 70% が Prod-25 の約 30 アミノ酸領域に局在する。

D. 考察

Myostatin prodomain は活性型 myostatin dimer に結合して、活性化を強力に抑制することが知られている。われわれは prodomain のこの myostatin 阻害活性に着目し、prodomain を創薬のターゲットとして治療法開発に取り組んできた。研究初年度には、独自に開発した肢帯型筋ジストロフィー LGMD1C モデルマウス (変異 caveolin-3 トランスジェニックマウス) と prodomain 過剰発現マウスの交配により、二重変異マウスを作出しその表現型を解析すると、肢帯型筋ジストロフィーマウスの筋萎縮が野生型マウスと同等レベルまで回復することを見出した。同時に筋力 (握力) や運動能力 (トレッドミル走力) などの筋生理機能にも顕著な改善がみられ、prodomain の治療有効性が示された。そこで、今年度はペプチド創薬への応用に向けて、prodomain 内における myostatin 活性化阻害領域をできるだけ狭い範囲に絞り込むことを目的に研究を行った。その結果、prodomain 全長の myostatin 阻害活性の約 78% の阻害活性が約 30 アミノ酸残基の範囲に局在することを見出した。

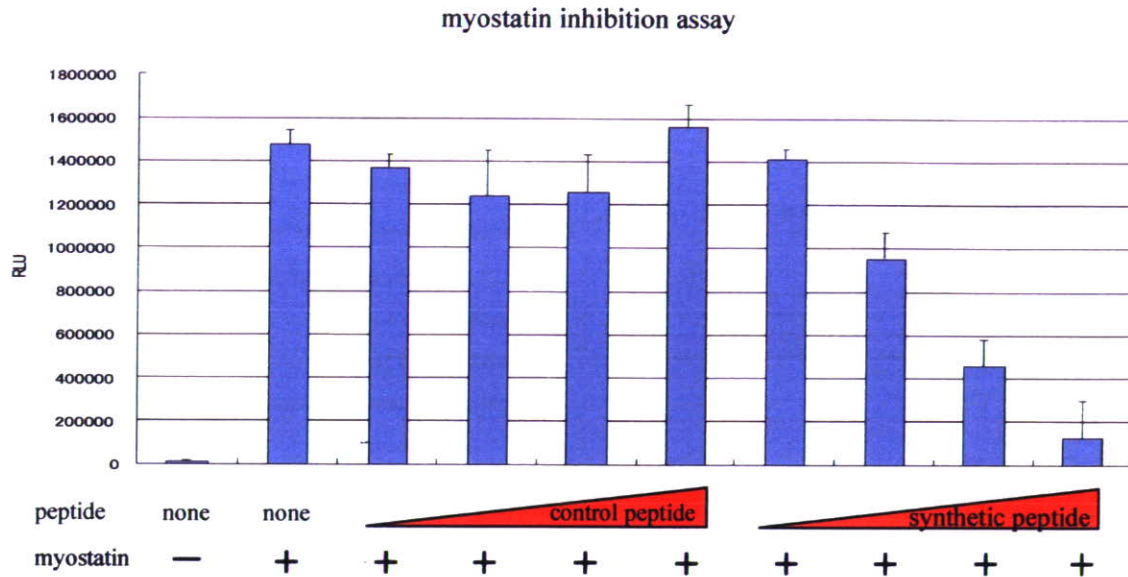


図 3. 合成ペプチドによる myostatin 活性阻害

合成ペプチド (synthetic peptide) は用量依存性に myostatin 活性を阻害するが、コントロールペプチド (control peptide) では myostatin 活性は抑制されない。

さらに、このアミノ酸配列に基づいて約 30 アミノ酸の合成ペプチドを作り、培養細胞系に添加して myostatin 阻害活性を luciferase assay で解析すると、用量依存性の抑制効果が確認された。すなわち、この合成ペプチドを生体内に投与すると、標的細胞（骨格筋細胞）における myostatin 活性化を阻害して、治療効果の発現が期待できることが示唆された。

E. 結論

(1) ヒト胎児腎 HEK293 細胞に myostatin 転写活性で発現するプラスミド pGL3-(CAGA)12-Luciferase をトランスフェクションし、myostatin 活性を測定できるバイオアッセイ系を確立した。

(2) prodomain の N-末端側 2/5 の位置の約 30 アミノ酸領域に myostatin 活性阻害領域があることを見出した。

(3) この prodomain の活性阻害領域内の約 30 アミノ酸の合成ペプチドによって myostatin 活性が用量依存性に阻害された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn* 236(10), 2800-2807 (2007)

2) Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in *mdx* mice. *FASEB J.* 22(2): 477-487, 2008

3) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting

siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 2008 (in press)

4) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, and Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. *Acta Myologica* 2008 (in press)

5) 大澤裕、砂田芳秀. TGF- β ファミリーシグナルによる神経・筋疾患の制御. *細胞* 39 (8): 344-348, 2007

2. 学会発表

1) Ohsawa Y, Okada T, Hayashi S, Ikezoe K, Murakami T, Sunada Y. Therapeutic effects of small-molecule inhibitors of type I TGF- β receptors for the treatment of muscular dystrophy. FASEB Summer research Conferences, TGF- β Superfamily: Signaling & Development, Tucson, Arizona, July 14-19 (2007)

2) Ohsawa Y, Murakami T, Sunada Y : Myostatin inhibition reverses satellite cell number in caveolin-3-deficient mouse muscle. FASEB Summer research Conferences, Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, Indian Wells, California, July 14-19 (2007)

3) Ohsawa Y, Sunada Y. Inhibition of myostatin signaling through type I and type II myostatin receptors. 7th Japanese-French Workshop on Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy. Hayama, Kanagawa, June 8-9 (2007)

4) Ohsawa Y, Murakami T, Okada T, Nishimatsu S, Nohno T, Noji S, Sunada Y. Myostatin inhibition increases atrogen-1 expression and accelerates skeletal muscle atrophy under denervated conditions. 12th International Congress, World Muscle Society, Sicily, Italy, October 17-20 (2007)

5) 林紗織、岡田只士、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、鈴木友子、武田伸一、砂田芳秀. マイオスタチン活性は筋衛生細胞動態に影響する. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日

6) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、村上龍文. TGF- β タイプ I 受容体阻害剤による筋ジストロフィー分子標的療法. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日

7) 大澤裕、岡田只士、萩原宏毅、村上龍文、砂田芳秀. ALS に対するマイオスタチン阻害効果の検討. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 17 日

8) 砂田芳秀、林紗織、大澤裕、村上龍文. マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療の開発. 第 25 回日本神経治療学会総会、仙台、2007 年 6 月 21 日

9) 大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、若山吉弘、濫谷誠二、砂田芳秀. Caveolin-3 変異マウスにおける dysferlin と myoferlin の解析. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費平成 19 年度清水班班会議、東京、2007 年 12 月 7 日

10) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、土田邦博. Myostatin prodomain における myostatin 阻害領域の解析. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費平成 19 年度清水班班会議、東京、2007 年 12 月 8 日

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

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： 近年では、難病と言われて久しい筋ジストロフィーに対する有望な治療法開発研究に進歩が著しい。ジストロフィンのエクソンスキッピング療法、遺伝子治療、細胞移植治療とならんで、マイオスタチン阻害療法は有望な治療法であり、筋ジストロフィーの病型に関わらず適応がある可能性が高い。他の治療法との併用を含めて応用が広いと考えられている。本研究では様々なマイオスタチン阻害分子を探索した。特に内分泌ホルモンであるホリスタチン分子が強力なマイオスタチン阻害活性を有する点に着目し、マイオスタチン阻害活性を有する蛋白質を設計し、治療薬候補を作製した。マイオスタチン阻害分子過剰発現遺伝子改変動物を作製し、詳細な解析を行なった。筋ジストロフィーの病態軽減作用をモデル動物との交配で解析し、筋量の増加、筋力の回復、炎症細胞浸潤の低下を確認し、治療効果があることを示した。マイオスタチンの胎児期での発現を調べるため、マウス胚や P19 細胞を用いた分化系で精査した。

A. 研究目的

本研究の目的は、筋ジストロフィーの新しい治療法開発に向けて、マイオスタチン阻害分子を開発し、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に生じる変化を分子生物学的手法や組織学的な微細構造解析法を駆使して解析する。さらに適応となる筋疾患を精査し、臨床応用へのトランスレーショナルリサーチを施行することも目的としている。

B. 研究方法

マイオスタチンは骨格筋の増殖分化を強力に抑制する細胞増殖因子であり、牛、犬、羊そしてヒトの骨格筋量を規定して

いる。マイオスタチンは成人の骨格筋や血清中にも検出され、生後に阻害しても hypertrophy の機構で筋量の増加が期待出来る。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である II 型アクチビン受容体の細胞外ドメイン、TGF- β 受容体の低分子阻害剤等が考えられる。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タンパク質としてホリスタチンが存在する。我々は、ホリスタチンに由来するペプチドを設計し、ホリスタチンよりも低分子で、マイオスタチン阻害に選択的な分子の開発に取り組んだ。具体的にはヒトホリスタチンの遺伝子配列を基に、組換え分子を作製し、

アクチビンへの阻害の有無、マイオスタチンに対する阻害効果の有無を検討し、候補となる分子を数種類選択した。1分子に関しては、特に詳細な解析を行なった。マイオスタチンとの結合を定量するために、GST との融合タンパク質や、ヒト免疫グロブリンとの融合タンパク質を精製した。表面プラズモンセンサーチップを用いて結合定数を算出した。ヒト横紋筋肉腫細胞である A204 細胞を用いて、創出分子のマイオスタチン阻害活性を定量した。さらに MyoD の強制発現により骨格筋に分化能を有するマウス 10T1/2 細胞を用いて、作製したマイオスタチン阻害分子のマイオスタチンの筋分化抑制作用の解除効果を検討した。骨格筋に特異的に発現させた遺伝子改変動物の作製のために、ミオシン軽鎖プロモーター遺伝子との融合遺伝子を作製し、常法に従い、遺伝子導入マウスを作出した。遺伝子導入マウスの骨格筋の詳細な解析のために HE 染色、ラミニン $\alpha 2$ 抗体染色、Mac-1 抗体によるマクロファージ染色、リン酸化 Smad2 やリン酸化 Erk1/2 抗体によるウェスタンブロット解析、筋繊維面積や筋繊維数の測定を行なった。筋力の解析のためには、握力テスト、ロタロッド解析を行なった。肥大した筋肉での代謝調節分子の変動解析を DNA アレイやウェスタンブロットにより行った。

筋ジストロフィーモデルマウスの病態の軽減効果の検討のために、*mdx* と交配

し組織学的解析および筋力測定を行なった。

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、良好な検出法は開発されていない。そこで、ホリスタチン様因子 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 のホリスタチン領域に結合活性があることがわかった。この領域を利用したマイオスタチンの定量に着手した。さらに、マイオスタチン mRNA のマウス胎児期の発現を *in situ hybridization* 法を用いて精査した。

C. 研究結果

ホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害ペプチドを設計した。この分子はホリスタチンと異なりアクチビン A との親和性は低下していた (K_d ; 6.43×10^{-5})。しかし、マイオスタチンに対しては、ホリスタチンに匹敵する高い親和性を保持していた (K_d ; 4.68×10^{-8})。ヒト横紋筋細胞 A204 を用いたレポーターアッセイの結果、アクチビンに対しては抑制作用を示さないが、マイオスタチン抑制効果は保持していた。10T1/2 を用いた MyoD 強発現による筋分化系でもマイオスタチン抑制効果を示した。

マイオスタチン阻害ペプチドを骨格筋に特異的に発現するマウスを作製し、詳細な解析を行なった。体重の有為な増加

と筋肥大が確認された(筋重量:前頸骨筋で 1.33 倍)。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、このことで筋肥大が生じている事を示した。

筋組織は顕微鏡及び電子顕微鏡レベルでも炎症像は観察されず、正常構造を維持していた。骨格筋組織で変動する分子を DNA マイクロアレイで解析し、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。ガレクチンに関しては、蛋白の発現上昇も確認した。ミトコンドリアで脂肪酸代謝に関与するカルニチンパルミトイル転移酵素-1(CPT-1)は特に顕著に上昇が見られた。

mdx マウスと交配し、マイオスタチン阻害分子の導入による、筋病理像の改善効果を精査した。Mac1 陽性のマクロファージ系譜の細胞浸潤は骨格筋の面積あたり *mdx* マウスでは 8.5%であったが、マイオスタチン阻害分子の導入により 4.0%に低下した。グリップ試験では正常マウスと同等の筋力の回復効果も確認された

マイオスタチン mRNA の胎児期での発現を精査するため、マウス胚を用いて、*in situ hybridization* 法を行なった。MSTN mRNA は胎児期においても骨格筋に強く発現していたが、FLRG と異なり心臓での発現は低めであったが心房と心室の中隔では発現が確認された。

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考察される。本研究において、ホリスタチンを改変することで、良好なマイオスタチン遮断分子のリード分子の開発可能である事が示された。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により肥大した骨格筋で CPT-1 が上昇するという知見を得た。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、ミオパチー、筋肉痛を起こす。従って、開発因子によってマイオスタチン阻害することで、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考えられる。マイオスタチン阻害で、デュシェンヌ型や筋肢帯型筋ジストロフィーに加えて、代謝性ミオパチー

への適応をも示唆するものである。

E. 結論

マイオスタチン阻害分子のリード分子を開発し、筋肥大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、脂肪酸や糖代謝経路の酵素群の変化、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、デュシェンヌ型のみならず、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。筋ジストロフィーの治療法開発は、ここ数年で急速に進歩が見られる。特にマイオスタチン阻害療法については、ワイス社が開発したマイオスタチン阻害抗体のMYO-029の治験が行われている。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。ヒトでのマイオスタチンの感度の良い定量系を開発することに向けた研究を推進させた。他の有望な治療法である遺伝子治療、エキソンスキッピング療法、ステロイド療法、細胞移植療法等と併用する治療法開発が次の目標である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takehara-Kasamatsu Y., Tsuchida K.,

Nakatani M., Murakami T., Kurisaki A., Hashimoto O., Ohuchi H., Kurose H., Mori K., Kagami S., Noji S., Sugino H. Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family members during mouse heart development. *J. Med. Invest.* 53(3,4): 276-288, 2007

2) Nakatani M., Takehara Y., Sugino H., Matsumoto M., Hashimoto O., Hasegawa Y., Murakami T., Uezumi A., Takeda S., Noji S., Sunada Y., Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in *mdx* mice. *FASEB J.* 22(2): 477-487, 2008

3) Murakami M., Tsuchida K. Recent advances in inorganic nanoparticle-based drug delivery systems. *Mini. Rev. Med. Chem.* 8(2): 175-183, 2008

4) Tsuchida K., Nakatani M., Uezumi A., Murakami T., Cui X. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr. J.* 55(1): 11-21, 2008

5) Tsuchida K., Nakatani M., Murakami T., Uezumi A. Action of myostatin and its regulators in skeletal myogenesis. In *Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation. Research Signpost* (in press)

6) Tsuchida K. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myologica* (in press)

7) 土田邦博 マイオスタチン阻害分子の開発の現状と筋ジストロフィー治療実現への展望 *難病と在宅ケア* 13(9): 43-45, 2007

2. 学会発表

1) Tsuchida K., Nakatani M., Uezumi A., Murakami T. Prevention of muscle atrophy and muscle degeneration in muscular dystrophy by myostatin blockage. *Gordon Research Conference, Myogenesis. Il Ciocco, Italy, May13-18, 2007*

2) Tsuchida K. Myostatin inhibition by follistatin-derived peptide ameliorates

pathophysiology of muscular dystrophy model mice 第7回日仏ワークショップ「筋ジストロフィーに対する治療を目指して」 Shonan, Japan, June 8-9, 2007

3) Uezumi A., Nakatani M., Tsuchida K. Dynamic changes of skeletal muscle satellite cells and macrophages in myostatin-inhibited transgenic mice. FASEB Summer Research Conferences, Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, Indian Wells, CA, U.S.A. July 14-19, 2007

4) Tsuchida K. Discovery and development of myostatin inhibitors to prevent muscle atrophy caused by neuromuscular disorders. 5 th Anniversary Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST), Xi'an, China, November 7-11, 2007

5) 土田邦博、中谷直史、上住聡芳、村上達也、武田伸一、野地澄晴、砂田芳秀 フォリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子の解析と筋ジストロフィー治療法の開発 厚労省精神・神経疾患研究班会議 東京、12月8日、2007

6) 上住聡芳、深田宗一朗、土田邦博 骨格筋脂肪変性を担う血管近傍に存在する間葉系細胞の同定 日本分子生物学会日本生化学会合同大会 (BMB2007) 横浜、12月11-15日、2007

7) 中谷直史、上住聡芳、小久保正博、崔雪玲、土田邦博 マイオスタチン阻害による抗肥満作用 日本分子生物学会日本生化学会合同大会 (BMB2007) 横浜、12月11-15日、2007

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

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

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、局所投与実験および全身投与実験において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、マイオスタチン遺伝子に対する siRNA を野生型マウスに局所投与した RNAi の効果を検討したところ、siRNA 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とともに骨格筋が増大することを報告した。本年度は、さらに研究を継続し、アテロコラーゲンを併用して siRNA を筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスへ局所投与あるいは野生型マウスへ全身投与し、その効果を検討した。その結果、骨格筋が増大する効果があることを発見したので、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

20 週齢の mdx 雄性マウス (日本クレア社, 東京) を試料として用い、ネブタール® (25mg/kg i.p. 大日本製薬, 大阪) 麻酔後、左側咬筋および前脛骨筋に 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コントロール siRNA をアテロコラーゲンと混合して導入し、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。

一方、20 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウス (日本クレア社, 東京) に 40 μ M の Mst-siRNA

とアテロコラーゲンを混合し、3 週間の実験期間内に 4 回静注した後、各筋組織を採取して種々の解析を行った。

2. 切片作製

マウスの各骨格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

各マウスの咬筋および前脛骨筋を採取し、対照群 (コントロール siRNA とアテロコラーゲンを混合して導入) 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

咬筋および大腿四頭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) および抗 laminin α 2 抗体を用いた蛍光免疫染色により観察した。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. 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 mdx マウスへの局所投与実験

マイオスタチン遺伝子に対する siRNA (Mst-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 mdx マウス左側咬筋および前脛骨筋に 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前脛骨筋では明らかな骨格筋増大が観察された (図 1)。



図 1 マウス左側咬筋および前脛骨筋が siRNA/アテロコラーゲンの処理により肥大。右側はコントロール。右は摘出したものを比較している (左側: 咬筋、右側: 前脛骨筋)。

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、コントロール siRNA とアテロコラーゲン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 (図 2)。

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 5 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 3)。

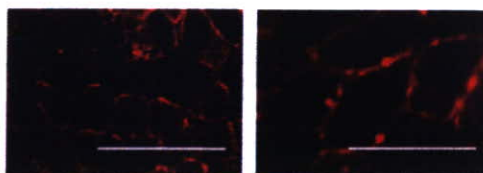


図 3 抗 laminin α 2 抗体を用いた咬筋の蛍光免疫染色。各筋線維は肥大傾向を示した (右図)。左図はコントロール

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 の野生型マウスへの全身投与実験

20 週齢の野生型マウスに Mst-siRNA とアテロコラーゲンを混合して静脈注射を行った。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 を導入したマウスの骨格筋では明らかな骨格筋増大が観察された (図 4)。



図 4 下段マウス骨格筋 (写真は下肢) が siRNA/アテロコラーゲンの処理により肥大。上段は対照群。

また、マウス大腿四頭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、対照群と比較して、Mst-siRNA を導入した大腿四頭筋では顕著なマイオスタチンの発現抑制が認められた (図 5)。

Fig.5 Western blot analysis



図 5 マイオスタチンのウェスタンブロット解析。右の 5 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、

大腿四頭筋の最大直径部における横断切片を作製した。対照群に比べ Mst-siRNA を導入した大腿四頭筋の各筋線維は肥大傾向を示した (図 6a)。

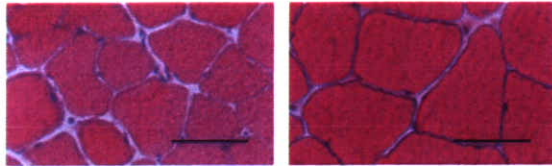


図 6a 大腿四頭筋の HE 染色。各筋線維は肥大傾向を示した (右図)。左図はコントロール

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 ($33.92 \pm 2.91 \mu\text{m}$) は対照群 ($22.95 \pm 1.54 \mu\text{m}$) に比べ増加していた (図 6b)。

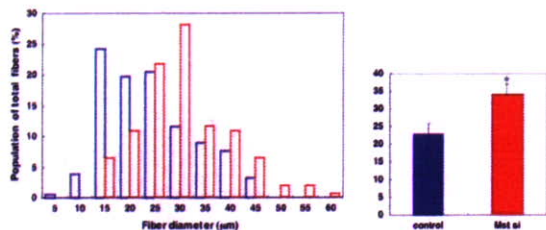


図 6b 筋線維の解析 赤が siRNA を投与した群。

D. 考察

過去に我々の研究グループでは、Belgian Blue と同様のフレームシフト変異によるマイオスタチン点突然変異型トランスジェニックマウスを作製し、このマウスの骨格筋がドミナントネガティブ作用によって明らかに増大することを証明した。また、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ィ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。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ことから、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。今後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、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

マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA の局所および全身投与により、マイオスタチンの発現が有意に抑制されるとともに、咬筋、前脛骨筋、大腿四頭筋の骨格筋重量および筋線維の直径は、対照群と比較して有意な増加を示した。

以上の結果よりアテロコラーゲンを併用したマイオスタチンに対する RNA 干渉法は、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、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面矯正学分野の森山啓司、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。

F. 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.

木内奈央 マイオスタチンに対するRNA干渉法による骨格筋形成の調節 四国歯誌 2007;20(1):27-41.

Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 2008 Mar 6; in press.

2. 学会発表

Nao Kinouchi, Yukiho Tanimoto, Sumihare Noji, Keiji Moriyama. 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, 兵庫、3月2,3日 (2007) .

木内奈央、谷本起穂、大澤裕、砂田芳秀、野地澄晴、森山啓司 マイオスタチンに対する RNA 干渉法による骨格筋形成の調節 第66回日

本矯正歯科学会 大阪、9月19-21日(2007)

木内奈央、谷本起穂、森山啓司、野地澄晴 RNA interference (RNAi) を用いた骨格筋制御に関する研究 第48回歯科基礎医学会学術大会 (2006)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし