

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

分担研究者 濃野 勉 川崎医科大学 教授

研究要旨：幹細胞から骨格筋への分化の過程で一過性に発現するマイオスタチン（MSTN）は前駆細胞が筋芽細胞を経て筋管へ分化する過程を負に調節するが、MSTN によって発現抑制される Wnt4 は逆に筋芽細胞の分化を促進する。マウス筋芽細胞株では MSTN 活性を遮断するために用いた欠損型の受容体によって速筋の分化は促進されるが、遅筋の分化は変化しない。同様な効果は下流で働く Wnt4 によっても見られ、MSTN による Smad2 のリン酸化は Wnt4 によって抑制される。ニワトリ胚の肢芽で Wnt4 を過剰発現すると Pax7、MyoD1 の発現が上昇し、最終的に速筋への分化が促進されて対照と比べて 10% 程度の有意な筋分化促進が見られた。MSTN の下流シグナルである Wnt4 の過剰発現は MSTN 遮断の場合以上に、作動薬として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

骨格筋の形成を負に調節するマイオスタチン（MSTN）をターゲットとして、その活性を阻害することによって筋肉増大を図り、筋ジストロフィーの治療に直接使用できる作動薬の開発を目指す。MSTN 活性の阻害により骨格筋での発現が上昇する Wnt4、逆に発現が低下する sFrp2 は、MSTN の下流で働く骨格筋分化に関与する因子であると考えられ、これらの過剰発現による効果を実験動物で検証する。骨格筋の維持において、MSTN 活性の阻害による効果と、Wnt シグナルの過剰による効果との関係を調べ、これらによる相乗効果を試み、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。

B. 研究方法

MSTN 作用の遮断のためには、その受容体である ActRIIA、ActRIIB の細胞外ドメイン（それぞれ ActRIIA-DN、ActRIIB-DN と呼ぶ）を使用し、これらを過剰発現することで内因性の MSTN 作用の阻害を行う。ニワトリ胚では複製可能型レトロウイルスベクター（RCAS）による発現を、マウス筋芽細胞（C2C12）では一般の動物発現ベクターによるトランスフェクション、あるいは市販の組換えタンパク質 ActRIIA-DN、ActRIIB-DN 等を適用して効果を調べた。Wnt4 も C 末端側に HA あるいは V5 のタグを付けて RCAS で発現させた。Wnt に結合して作用を遮断する sFrp2 も同様にして発現

させ、Wnt 活性の抑制群とした。

マウス個体での発現には複製不能型のレンチウイルスベクターを使用し、ヒト由来の Wnt4、sFrp2、ActRIIA-DN、ActRIIB-DN の cDNA を組換えて発現させた。

（倫理面への配慮）

動物個体を使用した実験は川崎医科大学動物実験指針に従って行い、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。

C. 研究結果

ニワトリ胚で ActRIIA-DN、ActRIIB-DN を過剰発現した時には、四肢の骨格筋に対する効果は顕著でなく、対照群と有意な差は見られなかった。それに対して、Wnt4 を過剰発現した群では筋肉塊の有意な増大が見られ、速筋型ミオシン重鎖の発現レベルも上昇していた。遅筋型のミオシン重鎖では差が見られなかった。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。

MSTN 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た。MSTN 適用による Smad-2 のリン酸化は ActRIIA-DN、ActRIIB-DN の発現によって阻害されたのみならず、Wnt4 の過剰発現でもリン酸化が阻害されていた（図 1）。このことは、Wnt4 が単に MSTN の下流で働いているのではなく、独立のシグナル経路で相

相互作用し、筋分化を促進していると考えられる。

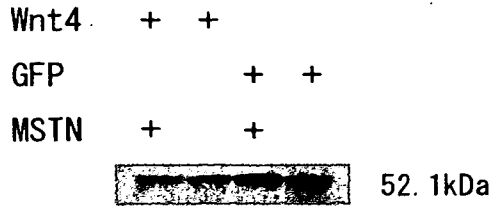


図1 :C2C12におけるMSTN(500 ng/ml)によるSmad-2のリン酸化に対するWnt4発現の効果

対照のGFP発現ではMSTNによりSmad-2のリン酸化が見られるが、Wnt4発現ではそれが阻害されている。

Wnt4の作用は一部βカテニン経路を介して作用するが、非標準Wntシグナル経路であるJNK経路などを介して、Smad-2/3に対して抑制的に作用している可能性がある。すなわち、Wnt4はMSTN作用の遮断薬と同等あるいはそれ以上に筋分化促進効果があると考えられる。

マウス個体でWnt4の作用を検証するため、ヒトWnt4 cDNAをレンチウイルスベクターを用いて過剰発現させる目的で組換えウイルスを作成した。293FT細胞にトランスフェクトして調製したWnt4-lentiを筋芽細胞に適用して効果を調べると、MSTNを加えたときに抑制される速筋型ミオシン重鎖の発現はWnt4-lentiで顕著に回復した(図2)。

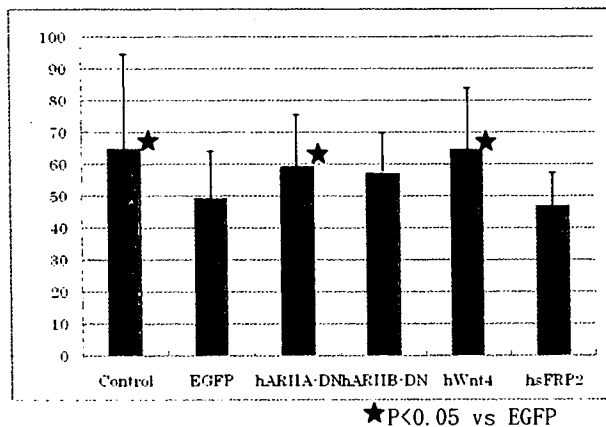


図2 :C2C12の筋分化を抑制するMSTN作用に対する過剰発現の効果

MSTN(500 ng/ml)存在下でC2C12を分化誘導し、ActRIIA-DN、ActRIIB-DN、Wnt4、sFrp2をレンチウイルスで過剰発現すると、ActRIIA-DN群、Wnt4群ではMSTN無添加のControlに匹敵する速筋型ミオシン重鎖の発現が見られた。図ではEGFPを発現した群との有意差を示している。

D. 考察

MSTNはActRIIAまたはActRIIBに結合してALK4/5/7を介してSmad-2/3のリン酸化を誘導し、筋分化を抑制するが、この時にWnt4を過剰発現するとSmad-2のリン酸化が顕著に抑制されていた。このことはWnt4が単にMSTNの下流で働く筋分化促進因子であるだけでなく、Wnt4のシグナル経路がSmad-2/3経路に干渉していることを示唆する(図3)。従って、遮断薬としてActRIIA-DNなどを使用するよりも作動薬としてWnt4を使用する方が筋分化の促進に対して有利であると考えられ、さらにこれをMSTN機能抑制併用することで、より効果的な筋分化促進が得られると考えられる。

MSTN作用を抑制するために、その内因性の活性を遮断するよりも、MSTN作用に対して拮抗作用を持つWnt4を利用することでより積極的な筋分化の促進効果が得られると評価できる。レンチベクターでの組換え体が活性を持つことが培養細胞で確認されたので、今後はマウス個体での効果の検証が中心となる。

筋分化に対する負のシグナルであるMSTN/受容体/Smad-2/3経路と、正のシグナルであるWnt4/Frizzled/βカテニン・JNK経路との間にクロストークがあることが今回新たに分かり、これらの相互関係を標的とした新規治療薬開発の戦略が立てられる。

マウス個体でのWnt4-lentiの投与は、片側の四肢骨格筋へ注射して1週間後に摘出し、筋肉塊の増量や機能亢進など、その効果を現在検証中である。

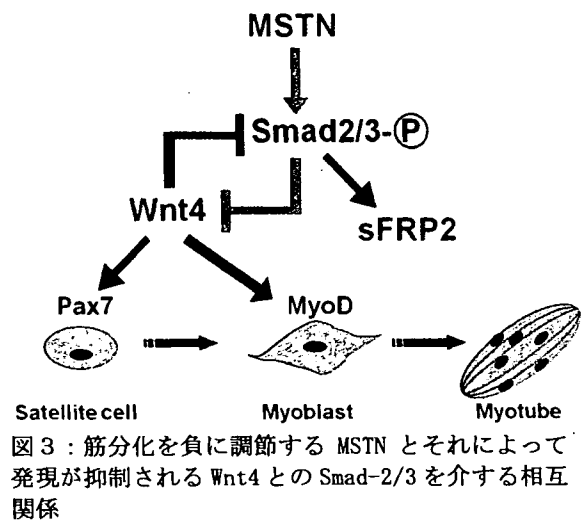


図3 :筋分化を負に調節するMSTNとそれによって発現が抑制されるWnt4とのSmad-2/3を介する相互関係

E. 結論

MSTN 作用の遮断と同等あるいはそれ以上の効果が Wnt4 の発現で得られることが分かり、今後の筋ジストロフィー治療の戦略が新たな方向へと展開できる。

F. 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)

2. 学会発表

1) 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)*

2) 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)*

3) 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

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

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	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	金澤一郎他6名	難病と在宅ケア	日本プランニング	千葉県	2007	43-45

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
Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T.	Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle.	Developmental Dynamics	236(10)	2800-2807	2007
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
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.	54(3,4)	276-288	2007
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	20(1)	27-41	2007
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	Development, Growth and Differentiation	49(6)	493-501	2007
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	Molecular Cancer	6	62	2007
Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsu moto 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 <i>mdx</i> mice.	FASEB J.	22(2)	477-487	2008
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.		In press	2008
Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, and Sunada Y.	Caveolin-3 regulates myostatin signaling.	Acta Myologica		In press	2008
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	Endocrine J.	55(1)	11-21	2008
Tsuchida, K.	Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice	Acta Myologica		In press	2008