

200730021B

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 砂田 芳秀

平成20（2008）年 3月

## 目次

### I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....	10
-------	----

### III. 研究成果の刊行物・別刷

.....	13
-------	----

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 教授

**研究要旨：** myostatin は骨格筋特異的な TGF- $\beta$ ファミリー分子で骨格筋量を負に制御している。本研究では、多面的なアプローチにより myostatin 活性を阻害する治療薬の開発を行い、筋ジストロフィーの新たな治療基盤の確立を目指した。Myostatin 阻害戦略として、①myostatin prodomain や follistatin など活性型 myostatin 分子に結合して活性化を抑制する生体分子、②可溶化欠損型 myostatin 受容体、③TGF- $\beta$  type I 受容体低分子阻害薬、④myostatin-siRNA、⑤myostatin シグナルに拮抗する Wnt ファミリー分子の5つに着目して研究を行った。myostatin 前駆体タンパクの 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から、prodomain 過剰発現マウスを作出した。これを肢帯型筋ジストロフィーLGMD1C モデルマウス（変異 caveolin-3 Tg マウス）と交配すると筋萎縮がほぼ正常に改善し、筋力や走力も回復することを見出した。さらに治療効果の分子機序の解析を通して、caveolin-3 は type I myostatin 受容体と結合しその活性化を抑制することによって、myostatin シグナルを negative に制御していることを解明した。次いで独自に開発した HEK293 細胞 luciferase assay 系を用いて、prodomain の myostatin 阻害活性の78%を約 30 アミノ酸領域に特定した。さらにこの領域の合成ペプチドが用量依存性に myostatin 活性を抑制することが確認できた。

次に内分泌ホルモンである follistatin 分子が強力な myostatin 阻害活性を有する点に着目し、myostatin 阻害特異性を有する follistatin 改変体 FSI-I を作製した。FSI-I 分子過剰発現遺伝子改変マウスを作製し、顕著な筋肥大が生じる事を示した。さらに筋ジストロフィーの病態軽減作用を mdx マウスとの交配で解析し、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。

Myostatin に対する type II 受容体 ActRIIA および B の細胞外 domain と Ig-Fc 部位との融合タンパクを LGMD1C モデルマウスの腹腔内に投与したところ、顕著な骨格筋量の増大が生じることを見出した。また、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。3種類の TGF- $\beta$  type I 受容体阻害剤の中から、最も myostatin 阻害特異性の高い化合物 (Ki26894) を特定し、LGMD1C モデルマウスに投与して筋萎縮に対する治療効果を解析した。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- $\beta$  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。

マイオスタチン mRNA を標的とする RNAi を利用した myostatin 阻害療法の開発を目的に、siRNA の野生型マウスへの投与実験を行なった。アテロコラーゲンを担体として混和し、骨格筋局所投与および経静脈性全身投与実験において筋肉量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治療の可能性が示唆された。

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

myostatin は骨格筋特異的な TGF- $\beta$  superfamily 分子であり、高発現マウスが筋萎縮を来すことから、骨格筋増殖抑制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)の両者の特徴とする。

Myostatinは他のTGF- $\beta$ ファミリー分子同様、prodomain(propeptide)と active peptide から成る前駆体タンパクとして合成され、これがプロセッシングを受けて prodomain が切り離され、最終的に活性型 myostatin 二量体となる。活性型二量体が type I, type II からなる細胞膜受容体複合体に結合しこれをリン酸化すると、細胞内エフェクター分子 Smad 2/3 がリン酸化され、核内へ移行し標的遺伝子の発現制御が行われ、最終的に骨格筋分化や増殖が抑制される。

2003年、ペンシルバニア大学の Kurhana らは筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスにおいて特異抗体投与により myostatin 活性を阻害すると、筋ジストロフィー変化が改善することを報告した。これを契機に myostatin 阻害は筋ジストロフィーに対する薬物療法の新規戦略として注目されるようになった。欧米では、Wyeth 社によりヒト化 myostatin 抗体による第2相臨床試験が Becker 型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの患者を対象に実施されている。

しかし、抗体療法はその阻害力価が必ずしも高くなく反復投与により効果が減弱するなどの問題点も考えられる。そこで、われわれは抗体以外にも、myostatin シグナルの分子機構に基づいた多面的アプローチにより、独自の myostatin 阻害薬の開発を目的に本研究を推進した。具体的な myostatin 阻害戦略としては、①myostatin prodomain や follistatin など活性型 myostatin 分子に結合して活性化を抑制する生体分子、②可溶化欠損型(ドミナントネガティブ) myostatin 受容体、③TGF- $\beta$  type I 受容体低分子阻害薬、④myostatin-siRNA、⑤myostatin シグナルに拮抗する Wnt ファミリー分子の5つに着目して研究を行った。

Myostatin 前駆体タンパクの prodomain 部分が活性型 myostatin 二量体に結合し、その活性化を抑制することに注目し、prodomain を創薬ターゲットとした。遺伝子改変マウスを用いて prodomain の myostatin 活性阻害による治療効果を確認し、さらに prodomain における阻害活性領域をできるだけ狭い範囲に絞り込んで、ペプチド医薬を開発することを目指した。

また内分泌ホルモンである follistatin が強力な myostatin 阻害活性を有する点にも着目した。

myostatin 阻害特異性を高めた follistatin 改変体を開発し、筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、治療効果を検討するとともに、その分子基盤の解明を試みることにした。

次に、myostatin シグナルを阻害する分子標的を type I および type II myostatin 受容体と考えた。すなわち、myostatin 結合部位を有する type II 受容体については、可溶化した欠損型受容体分子を用いて myostatin を競合阻害する。一方で、type I 受容体については、TGF- $\beta$  type I 受容体低分子阻害薬を筋ジストロフィー治療に応用できないか検討することとした。

Myostatin を mRNA レベルで抑制するため、siRNA を設計し、これを、筋ジストロフィー治療に応用できないかマウスを用いて検討した。

以上述べたように多面的なアプローチにより myostatin 阻害薬の開発を目指すとともに、骨格筋で myostatin を阻害した時に遺伝子発現どのような変化が生じるのか DNA array を用いて解析し、そのデータを基に新たな治療標的分子を見出すことも本研究の目的とした。

## B. 研究方法

### 1. Prodomain を用いた myostatin 阻害による筋ジストロフィー治療効果の検討

CMV promoter の調節下に myostatin prodomain cDNA が発現するよう plasmid を構築し prodomain を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出した。これを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)と交配して、二重変異マウスを作出し、筋ジストロフィー形質の改善効果を病理組織学的、運動生理学的に検討した。

### 2. Myostatin と caveolin-3 相互作用の解析

Prodomain 遺伝子導入により LGMD1C モデルマウスの筋萎縮が劇的に改善したことから、培養細胞を用いた *in vitro* の系で、caveolin-3 と myostatin type I 受容体の相互作用について解析した。①サル腎 COS-7 細胞に、FLAG-caveolin-3 と HA-type I myostatin 受容体(HA-ALK4, HA-ALK5)を共発現させて、caveolin-3 と受容体の細胞内局在を検討した。②FLAG-ないし HA-caveolin-3 と HA-ないし FLAG-type I 受容体を COS-7 細胞に共発現させ FLAG で免疫沈降-ウエスタンブロット解析を

行った。③常時活性型 type I myostatin 受容体と、caveolin-3 を COS-7 細胞に共発現させ、受容体の自己リン酸化レベルを *in vitro* kinase assay で解析した。④ caveolin-3 の細胞内 myostatin signal 分子に与える影響について、effector 分子 Smad2 リン酸化をウエスタンブロット解析と Smad 感受性ルシフェラーゼ遺伝子の転写アッセイ解析を行った。次いで変異 caveolin-3 Tg マウス (ヘテロ) と myostatin 活性阻害 Tg マウス (ヘテロ) を掛け合わせて作出した 4 種類のマウス (野生型、変異 caveolin-3、二重変異、myostatin 活性阻害) の骨格筋を用いた *in vivo* の系で、⑤ Smad2 のリン酸化レベルをウエスタンブロット解析により検討した。⑥ myostatin 依存性 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) である p21 の転写レベルをノザンブロット解析により検討した。

### 3. Prodomain における myostatin 阻害活性領域の解析

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。

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。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。

③ 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。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した。

④ 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。

### 4. 可溶化欠損型 type II 受容体による myostatin 阻害の治療効果の検討

myostatin に対する type II 受容体である ActRIIB のリガンド結合部位を含む細胞外ドメ

インに安定化のため Fc 部分を付加した融合タンパクを肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスに腹腔投与して、その治療効果を体重変化、骨格筋重量、筋線維断面積などを指標として解析した。

### 5. TGF- $\beta$ type I 受容体低分子阻害薬の myostatin 阻害特異性検定と筋ジストロフィーモデルマウスへの投与

① 入手することができた 3 種類の TGF- $\beta$  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。② 次いで、TGF- $\beta$  type I 受容体阻害剤 Ki26894 を CAV-3<sup>P104L</sup>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③ CAV-3<sup>P104L</sup>Tg マウスの筋萎縮に対する TGF- $\beta$  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。

### 6. Follistatin 改変体分子による myostatin 阻害療法の開発

myostatin に生体内で結合し、その活性を抑制する蛋白質として follistatin が存在する。follistatin に由来するペプチドを設計し、follistatin よりも低分子で、かつ myostatin に選択的な阻害活性を有するタンパク分子 FSI-I の開発に取り組んだ。

① FSI-I 遺伝子導入マウスを作製し、骨格筋重量、筋線維面積、筋線維数、筋力、運動能力などの表現型を解析した。さらに FSI-I により myostatin を阻害した骨格筋における遺伝子発現プロファイリングを DNA array 解析し、分子病態解明を試みた。

② Duchenne 型筋ジストロフィーモデルである mdx マウスとの交配を行ない、FSI-I 遺伝子導入による治療効果を評価するため、病理組織の精査、病態の軽減作用の検討を行なった。肥大した筋肉での代謝調節分子の変動解析を DNA アレイ解析を用いて行った。

③ follistatin や類似分子 FLRG のペプチド断片を用いて myostatin を定量する手法に着手した。

## 7. siRNA 発現ベクターの作製とマウス骨格筋への導入

Myostatin 特異的 siRNA 発現ベクターは、マウス myostatin mRNA の開始コドンから 325 番目からの 19 塩基 5'-GAUGACGAUUAUCACG CUA-3' を選択し、センス鎖とアンチセンス鎖の間に 9 塩基のループ 5'-TTCAAGAGA -3' を付与して pSilencer 2.1-U6 neo (Ambion Inc., U.S.A.) の BamH I/Hind III サイトに組み込んで作製した。20 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウスの左側咬筋および大腿二頭筋に 10  $\mu$ M の myostatin 特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) とアテロコラーゲン (AteloGene<sup>TM</sup>) を混合し、筋肉注射を行った。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。次いで、Mst-siRNA をアテロコラーゲンと混和して、マウスの眼窩静脈から全身投与を行った。

## 8. 欠損型受容体による MSTN 活性の阻害と Wnt4、sFrp2 の過剰発現系の構築

特異的な myostatin 作用の遮断のために ActRIIA、ActRIIB の細胞外ドメイン (ActRIIA-DN、ActRIIB-DN) を使用し、これらを過剰発現することで内因性 MSTN 活性の阻害を行う。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、あるいは組換えタンパク質等を添加して効果を調べた。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 結合因子 sFrp2 も同様に発現させ、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 Wnt4、sFrp2、ActRIIA-DN、ActRIIB-DN の cDNA を発現させた。

(倫理面への配慮)

所属研究施設の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、文科省、厚労省、経産省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、各研究施設の定める倫理規定にもとづいた倫理委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果と考察

### 1. Prodomain による myostatin 阻害療法の開発

#### (1) Prodomain 遺伝子導入による LGMD1C モデルマウスにおける筋萎縮の著明改善

Prodomain 遺伝子が導入された二重変異マウスでは LGMD1C モデルマウスでみられた著明な筋萎縮がほぼ野生型マウスのレベルまで回復した。体重増加曲線、骨格筋重量も改善し、筋線維径の増加 (hypertrophy) と筋線維数の増加 (hyperplasia) の両者が確認された。筋力 (前肢握力) と走力 (トレッドミル試験) においても、有意な改善がみられた。この結果は prodomain による筋ジストロフィー改善効果を *in vivo* で証明しており、prodomain を創薬ターゲットとする妥当性が確認された。

#### (2) Caveolin-3 は myostatin type I 受容体に結合しリン酸化抑制により myostatin シグナルを抑制

① caveolin-3 と、type I myostatin 受容体 (ALK4、ALK5) は COS-7 細胞内で共局在した。② この細胞抽出液の免疫沈降法では、caveolin-3 と type I myostatin 受容体の相互作用を認めた。③ caveolin-3 の共発現により、type I myostatin 受容体リン酸化レベルは著明に減少した。すなわち caveolin-3 は type I 受容体活性化を抑制することが明らかとなった。④ 野生型 caveolin-3 導入細胞では、Smad2 リン酸化レベルが低下し、逆に変異 caveolin-3 導入細胞では、Smad2 リン酸化レベル上昇していた。⑤ 野生型 caveolin-3 導入細胞では、Smad 感受性レポーター遺伝子 pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-luc の転写レベルが低下し、逆に変異 caveolin-3 導入細胞では、上昇した。⑥ マウス骨格筋のリン酸化 Smad2 レベルは、野生型と比較し、変異 caveolin-3 Tg マウスでは著明に増加していた。一方、myostatin 活性阻害 Tg マウスでは、減少し、二重変異では、野生型と同等まで回復していた。⑦ マウス骨格筋で myostatin 依存性転写因子である p21 の遺伝子発現を検討したところ、野生型と比較し変異 caveolin-3 Tg マウスでは著明に増加していた。myostatin 活性阻害 Tg マウスでは減少、二重変異では、野生型と同等まで回復していた。

この結果は Caveolin-3 が type I 受容体に結合しそのリン酸化を抑制することにより、細胞内 myostatin シグナルを負に制御することを世界に先駆けて解明したものである。さらに、

LGMD1C (caveolin-3 欠損症) における筋萎縮の分子病態として、caveolin-3 欠損による過剰な myostatin シグナルの流入があることを明らかにした。従って、LGMD1C における myostatin 阻害療法適応の分子基盤も明らかとなった。

### (3) Prodomain における myostatin 阻害活性領域の解析

① myostatin 転写活性測定用プラスミド pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-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。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 78% の myostatin 阻害活性を認めた。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。

従って、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から、今後ペプチド医薬の開発が期待される。

## 2. Follistatin 改変体による myostatin 阻害療法の開発

① follistatin に由来する myostatin 阻害分子 FSI-I を作製し、*in vitro* で myostatin 阻害効果を有する事や、follistatin とは異なりアクチビンには阻害効果を持たない事を示した。生体内での作用を調べるために、骨格筋特異的なプロモーターの下流に遺伝子を組み込み、トランスジェニックマウスを樹立した。顕著な筋肥大が生じる事を示した。このトランスジェニックマウスを筋ジストロフィーモデルの *mdx* と交配し、筋肥大、グリップテストによる筋力回復効果、骨格筋へのマクロファージ等の細胞浸潤の軽減効果があることを示した。従って、FSI-I は強力の特異的な myostatin 阻害活性を有する治療分子として、今後開発が期待される。

② 骨格筋組織で変動する分子を DNA array 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、ミトコンドリアの脂肪酸酸化に關与する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。この結果から、Myostatin 阻害療法は筋ジストロフィーだけではなく、ミトコンドリアミオパチーなどの代謝性ミオパチーにも治療効果が期待できる可能性が示唆された。

## 3. TGF- $\beta$ type I 受容体阻害薬による筋ジストロフィー治療効果

Myostatin(GDF8) 刺激によるヒト胎児腎 HEK293 細胞における pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-luc レポーター遺伝子転写活性は、TGF- $\beta$  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- $\beta$ 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、Ki26894 非投与群に分け、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。投与群では非投与群に比し、体重は、12 週齢から 16 週齢まで有意に増加していた。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に増大していた。

現在、TGF- $\beta$  type I 受容体の低分子阻害薬は肝硬変や悪性腫瘍治療への臨床応用が研究されている。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。

## 4. myostatin siRNA による阻害療法の開発

(1) アテロコラーゲンを用いた myostatin 遺伝子

## に対する siRNA の *mdx* マウスへの局所投与実験

Myostatin 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。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。

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と比較して、Mst-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。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。

## (2) アテロコラーゲンをを用いた myostatin 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。また、マウス大腿四頭筋における myostatin の発現をウェスタンブロット法にて解析したところ、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 myostatin の発現抑制が認められた。

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。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は対照群に比べ増加していた。

本研究により、myostatin 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、今回の研究結果から、少なくとも

も、アテロコラーゲン-myostatin dsRNA の投与により、筋ジストロフィー疾患モデルマウスで筋肉増大可能であることがわかった。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。

## 5. myostatin に拮抗する Wnt4 の過剰発現による治療法

① Wnt4 は衛星細胞の増殖を促進するので、Wnt4 の作用は筋芽細胞の分化に対する myostatin 作用に拮抗すると考えられる。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。胎生ステージ 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 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、下腿の外側への湾曲と下腿部の肥厚が見られた。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。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。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。

② Wnt4 を C2C12 にトランスフェクトして、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 EGFP 発現の対照群と比べて有意に上昇していた。この時、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。myostatin で発現抑制される筋分化にかかわるシグナルとして Wnt4 非標準経路の関与が示唆される。

③ myostatin 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。myostatin 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。このことは、Wnt4 が単に myostatin 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互作用し、筋分化を促進していると考えられる。Wnt4 の作用は一部  $\beta$  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。

④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・ベクターで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 MyHC の発現は Wnt4-lenti で顕著に回復した

## 6. その他

①ヒトの myostatin の定量法についての研究を行った。follistatin 類似分子の follistatin ドメインに myostatin 結合活性があることに着目し、サンドウィッチ法による定量法を検討した。現在のところ、~50 ng/ml 程度であれば測定可能な段階まで到達した。今後改良を加えると共に倫理審査委員会の承認を得た後にヒト患者血清中の定量を行なう予定である。

②myostatin 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。

③ナノ粒子に薬物を結合させて少ない副作用で生体内にデリバリーする手法の開発に取り込んだ。筋ジストロフィー治療に関して見直されている抗炎症剤のステロイド剤について行なった。ナノ粒子に結合させ、徐々に放出させる技術基盤は完成した。

## D. 結論

①Myostatin prodomain の遺伝子導入により肢帯型筋ジストロフィーLGMD1C モデルマウスの劇的な改善がみられた。caveolin-3 は、骨格筋細胞で、type I myostatin 受容体と結合しその活性化を抑制することによって、下流のエフェクター分子の活性化と転写を制御し myostatin 筋萎縮シグナルを制御していることを示した。従って、LGMD1C に対して myostatin 阻害療法が有効であることが示唆された。

②Prodomain における myostatin 阻害活性部位を 30 アミノ酸領域に特定することができた。さらに、この領域の合成ペプチドの投与により培養細胞系で myostatin 活性が用量依存的に抑

制されることを確認した。今後、抗 myostatin ペプチド医薬の開発につながる可能性がある。

③Myostatin 阻害特異性を高めた follistatin 改変体 FSI-I 分子を開発し、mdx マウスへの遺伝子導入により筋ジストロフィー変化改善効果がみられた。

④TGF- $\beta$  type I 受容体阻害剤は myostatin シグナルを *in vitro*, *ex vivo* 双方で抑制した。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- $\beta$  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。

⑤Myostatin 特異的二本鎖 siRNA をアテロコラーゲンを用いて局所および全身的に導入した筋では、myostatin の発現が有意に抑制され、骨格筋重量および筋線維径は有意な増加を示した。アテロコラーゲン-myostatin を用いた 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。

⑥myostatin の下流で働く Wnt4 を過剰発現すると、生体内での筋分化、筋肉形成が促進されることを明らかにした。myostatin 作用の遮断と同等あるいはそれ以上の効果が Wnt4 発現により得られるので、今後の筋疾患治療の新たな治療戦略として期待される。

## E. 研究発表

- 1) 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)
- 2) Narita T, Sasaoka S, Udagawa K, Ohya T, Wada N, Nishimatsu S, Takada S, Nohno T: Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development. *Dev Dyn* 233(2): 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(2): 97-105 (2005)
- 4) 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)
- 5) 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)
  - 6) Tsuchida K: The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6(2): 147-154 (2006)
  - 7) 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)
  - 8) 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 Endocrinol* 189(2): 409-421 (2006)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) 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. *川崎医誌* 32(4): 175-186 (2006)
  - 12) 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)
  - 13) 大澤裕, 砂田芳秀. TGF- $\beta$ 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)
  - 14) 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)
  - 15) 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)
  - 16) 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)
  - 17) 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)
  - 18) 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)
  - 19) 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)
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)

23) 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)

24) Tsuchida K. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. Acta Myologica 2008 (in press)

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

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
土田邦博	フォロスタチンと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(5)	440-443	2005
Narita T, Sasaoka S, Udagawa K, Ohyama T, Wada N, Nishimatsu S, Takeda S, Nohno T	Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development	Developmental Dynamics	233(2)	282-287	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	川崎医学会誌	31(2)	97-105	2005
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)	4463-4468	2006
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
Tsuchida K, Sunada Y, Noji S, Murakami T, Uezumi A, Nakatani M.	Inhibitors for the TGF- $\beta$ superfamily and their clinical applications.	Med Chem	6(11)	1255-1261	2006
Tsuchida K.	The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders	Expert Opin Biol Ther	6(2)	147-154	2006
Liu Z.H, Tsuchida K, Matsuzaki T, Yamakawa N, Bao Y.L, Kurisaki A, Sugino H.	Characterization of isoforms of activin receptor-interacting protein 2 that augment activin signaling.	J Endocrinol	189(2)	409-421	2006
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	26	229-233	2006

研究成果の刊行に関する一覧表 (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 川崎医学会誌	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	Developmental Dynamics 細胞	32 (4)	175-186	2006
Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Morigu chi T, Nohno T.	Involvement of Wnt4 signaling during myogenic pro- liferation and differentiation of skeletal muscle.	化学と生物	236 (10)	2800-2807	2007
大澤裕, 砂田芳秀	TGF- $\beta$ ファミリーシグナルによる神経・筋疾患の制御	難病と在宅ケア	39 (8)	344-348	2007
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	J Med Invest	45 (3)	186-190	2007
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	四国歯誌	13 (9)	43-45	2007
Takehara-Kasamatsu Y, Tsuchida K, Nakatani M, Murakami T, Kurisaki ., Hashimoto O, Ohuc hi H, Kurose H, Mori K, Kagami S, Noji S, Sugino H.	Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family mem- bers during mouse heart development	Development, Growth and Dif- ferentiation	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	Molecular Cancer	20 (1)	27-41	2007
Narita T, Nishimatsu S, Wada N, Nohno T	A Wnt3a variant participates in chick apical ecto- dermal ridge formation: distinct biological activ- ities of Wnt3a splice variants in chick limb development	FASEB J	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		6	62	2007
Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Ue zumi 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.		22 (2)	477-487	2008

研究成果の刊行に関する一覧表 (3)

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
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)	
hsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y.	Caveolin-3 regulates myostatin signaling.	Acta Myologica		(in press)	
Tsuchida K.	Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice	Acta Myologica		(in press)	

## フォリスタチンとフォリスタチン様タンパク質による骨格筋量及び体脂肪量調節とタンパク質創薬

### 1. 緒言

骨格筋は生体で重量的に最大の組織である。遺伝性の骨格筋の変性を引き起こす疾患は難治疾患が多く治療法に乏しい。筋原性変性疾患である筋ジストロフィー、神経原性変性疾患である筋萎縮性硬化症 (ALS)、脊髄小脳変性症、神経変性疾患は、古くから知られている病気でありながら、筋肉の変性や壊死を引き起こし、良好な治療法はほとんどない。さらに、現代社会は高齢化に対処する必要に迫られており、老化や寝たきりによって起こる筋力の低下は、ヒトとしての quality of life の低下につながる。また、骨格筋はインスリンの標的臓器でもあり、肥満・糖尿病の病態生理を考える上でも重要臓器である。従って、骨格筋の量的および質的な制御機構を明らかにし、調節可能な因子を開発していくことは、国民が安心して生涯を過ごすことができる社会を実現させるためにも重要である。

一方、脂肪組織は、生命活動に必要な不可欠な臓器であるが、いわゆる生活習慣病によって量的および質的な異常をきたし、体脂肪が増加すると、死の四重奏と呼ばれる疾患群 (高脂血症、肥満、高血圧、糖尿病) を惹起し、現代人の生命を脅かす存在となる。

本ミニレビューでは、フォリスタチンとそのファミリー分子であるフォリスタチン様因子 (FLRG) による生体内での骨格筋の量的・質的な調節と体脂肪量の調節について最近の動向を交えながら紹介したい。

### 2. マイオスタチンによる骨格筋量と体脂肪量の調節

マイオスタチン (myostatin) は、発見当初 growth differentiation factor 8 (GDF8) と呼ばれていた TGF- $\beta$  ファミリーに属する因子である<sup>1)</sup>。マイオスタチンのノックアウトマウスが1997年に報告され、骨格筋量が、劇的に2~3倍に増大することから、横紋筋細胞の増殖を抑制する因子としてマイオスタチンと再命名された<sup>2)</sup>。

家畜ウシで、骨格筋量が増大し脂肪量が低下した変異体が時に見つかるが、マイオスタチンの遺伝子変異であることが多い<sup>3)</sup>。また、最近ヒトのマイオスタチンが体内で作られない男児が見つかり報告された<sup>4)</sup>。この男児は、新生児の頃より、手足の筋肉が発達しており、5歳にして3kgの



図1 生体内でマイオスタチンを作らない男児の筋肥大最近、体内でマイオスタチンが産生されない男児が報告された。筋量が増大し、子供ながら3kgのダンベルを軽々と持ち上げるといふ。将来、重量挙げや短距離走の名選手として活躍できるかも知れない。(N. Engl. J. Med. (2004) 350, 2682-2688 より著者の許可を得て引用。)

ダンベルを軽々と持ち上げるといふ。ちなみに、この男児は精神発達遅滞や心筋の異常は見られない。つまり、マイオスタチンはヒトでも筋肉量を調節している (図1)。

マイオスタチンは筋ジストロフィーなどの先天性の筋疾患や、老化によって筋力低下した病態に対する分子標的となりうる。マイオスタチン阻害により、体脂肪量が低下することも確実である。マイオスタチンのノックアウトマウスでは、皮下脂肪のみならず、内臓脂肪の量が劇的に低下する。レプチンの低下や脂肪分化に必須の転写因子であるC/EBP $\alpha$  やPPAR $\gamma$  のmRNAの低下が報告されている<sup>5)</sup>。肥満・2型糖尿病のモデルマウスであるKKAyマウスやob/obマウスはレプチン/レプチン受容体の遺伝子異常などによって摂食障害に起因した肥満と糖尿病を呈する。この肥満マウスで交配実験によってマイオスタチンを欠損させると、摂食量には変化が見られないが、脂肪が骨格筋に置き換わった体型になり、肥満や糖代謝の改善が見られる<sup>6)</sup>。これは、筋肉の生成を制限するマイオスタチンの働きがなくなったために筋肉量が増え、エネルギーをより効率的に消費するためと考えられる。

### 3. マイオスタチン阻害分子としてのフォリスタチンとFLRG

我々は、マイオスタチンが新しい分子標的治療薬開発の

ターゲットになると考え、その阻害因子の開発に取り組んでいる。マイオスタチンは、構造的にアクチビンの近縁分子である。アクチビンには、細胞外でアクチビンに結合しその機能を阻害する内分泌ホルモンとしてフォリスタチンおよびフォリスタチン様因子 (FLRG) が知られている<sup>1,7)</sup>。アクチビンはもともと、下垂体からの卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌活性を指標にして同定されたホルモンであり、生体内の多くの細胞を標的としている<sup>7)</sup>。アクチビンにはアクチビン A, アクチビン B, ヘテロダイマーであるアクチビン AB が知られている。マイオスタチンが骨格筋特異的な作用を示すのに対して、アクチビンは生体のあらゆる細胞を標的としている。特に、性腺の発生、生殖器官の成熟には欠かせないホルモンである。最近では、アクチビンは炎症や消化器がんの発生にも関与することが明らかにされている<sup>1)</sup>。また、アクチビンには brain derived neurotrophic factor (BDNF) に類似した強い神経栄養因子としての作用もある。一方、フォリスタチンはアクチビンの強力な阻害分子である。フォリスタチンは、骨形成因子 (BMP2, 4, 7) に弱く結合活性を示すものの、生理的な濃

度では阻害活性は見られず、アクチビン特異的な阻害分子と長らく考えられてきた。2000年には、フォリスタチンに構造および機能面で類似したフォリスタチン様因子 (follistatin-related gene, FLRG) が発見された<sup>9)</sup>。FLRG もフォリスタチン同様に、アクチビンに結合し活性を阻害する分子である。ところが、最近になって、フォリスタチンと FLRG が、アクチビンのみならず、マイオスタチンの強力な阻害分子として働くことが明らかとなった。フォリスタチンは、マイオスタチンと  $K_i=470$  pM という高い親和性で結合し、その機能を生理的な低濃度で阻害する。骨格筋特異的にフォリスタチンを導入したマウスでは、マイオスタチンノックアウトマウスと類似した骨格筋量の増大が見られる<sup>9)</sup>。また、FLRG が、実際に生体内でマイオスタチンと結合するホルモンであることがプロテオミクス的手法により明らかとなった<sup>10)</sup>。マイオスタチンは胎児期の筋発生にも関与するが、成人の骨格筋中や血清中にも検出される。その意味から、マイオスタチンは、骨格筋から産生される内分泌ホルモン (myokine) ともいえる。血液中でマイオスタチンに結合する分子を網羅的に解析するため

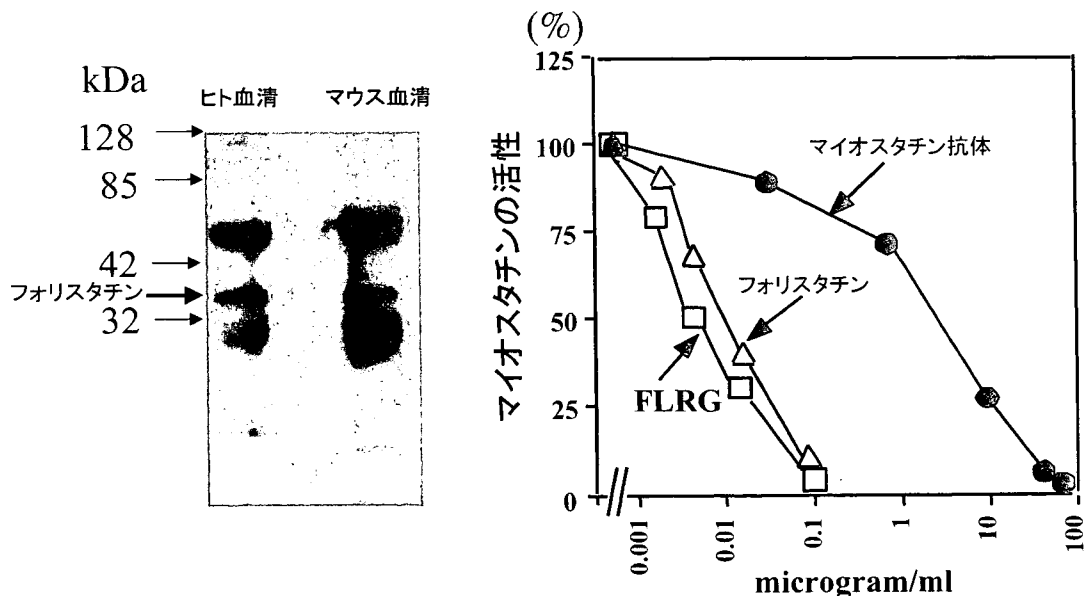


図2 フォリスタチンのマイオスタチンとの会合と機能阻害

(左) ヒト (レーン左), マウス (レーン右) の血清をマイオスタチンに対するモノクローナル抗体で免疫沈降し、フォリスタチンの抗体で検出した。ヒト, マウスいずれの血清においても, フォリスタチン分子が検出された。

(右) HEK293細胞にマイオスタチン応答性のルシフェラーゼリポーター遺伝子を導入し, フォリスタチン, FLRG, マイオスタチン阻害抗体によるマイオスタチン阻害効果を検討した。フォリスタチン, FLRGでは低濃度でマイオスタチン阻害効果が見られる。その作用効果はマイオスタチン阻害抗体よりも遥かに強力であった。



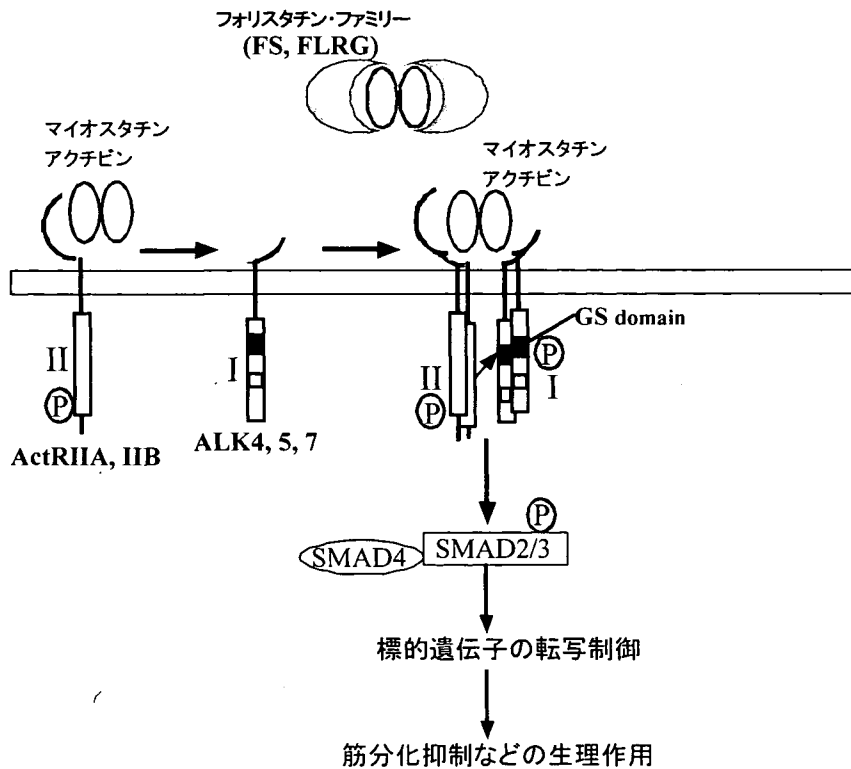


図3 マイオスタチン、アクチビンの情報伝達とその制御

マイオスタチンとアクチビンは ActRIIA, ActRIIB と呼ばれるアクチビン II 型受容体を細胞膜受容体として用いる。I 型受容体はリガンドによって異なるが構造と機能の類似した ALK (activin receptor-like kinase) 4, 5, 7 を介して細胞内に情報を伝える。細胞内では、アクチビン/TGF- $\beta$  の情報伝達因子である SMAD2, SMAD3 を介して標的遺伝子の転写を制御する。マイオスタチンの場合は、強力に骨格筋分化を抑制する生理作用を発揮する。

フォリスタチンと FLRG は細胞外でマイオスタチンとアクチビンに結合することで、受容体への結合を妨げ、その作用を強力に遮断する。

に、Wolfman らは血清中のタンパク質をマイオスタチンに対するモノクローナル抗体が結合したビーズで免疫沈降し、結合する分子を MALDI-TOF で解析した。そして、マイオスタチン前駆体ペプチドと FLRG をマイオスタチン結合分子として同定した<sup>10)</sup>。我々の作製した FLRG 抗体を使用し、実際に血液中でのマイオスタチンと FLRG の会合が確認されている。なお、彼等の報告では、マイオスタチンとフォリスタチンとの結合は血清中で検出されないとしているが、これは、彼等の使用した抗体が結合部位をマスクしたことによるものと思われる。我々は、彼等とは異なったマイオスタチン抗体を用いることで、マイオスタチンとフォリスタチンの血清中での明らかな会合を確認している (図2左)。また、フォリスタチンと FLRG が強いマイオスタチン阻害活性を持つことも確認された。その活性は、筋ジストロフィーのモデル動物である *mdx* への大量投与で筋病理の改善が見られたマイオスタチン抗体よりも遥かに強力である (図2右)。マイオスタチンはアクチビンと細胞膜受容体を共有しており、その意味でも、アクチビンと近縁なホルモンと考えてよい<sup>1,9)</sup> (図3)。

#### 4. マイオスタチン阻害分子開発の現状

フォリスタチンと FLRG は、マイオスタチンの強力な阻害分子として働き、現在知られているマイオスタチン阻害活性をもつ分子としては最強である。しかしながら、フォリスタチンと FLRG そのものは、アクチビンの強力な阻害分子でもある (図3)。フォリスタチンの過剰発現マウスは生殖能に著しい影響を与える<sup>11)</sup>。そこで、我々は、フォリスタチンを分子の鋳型として、アクチビンへの作用がなく、マイオスタチン阻害に特異性をもった分子としてフォリスタチン変異体ペプチドの創製に取り組み、複数のマイオスタチン特異的な阻害分子を同定した。我々の創出したフォリスタチン変異体ペプチドを導入したトランスジェニックマウスは、生体内でマイオスタチンを阻害し、その結果、骨格筋量が増大し、逆に皮下脂肪・内臓脂肪の量が激減する<sup>12)</sup>。それ以外の主だった異常は観察されていない。脂肪組織のサイズが小さくなることも確認している。

欧米の研究グループは、マイオスタチンを阻害する抗体やマイオスタチンの前駆体ペプチドやそれを変換しプロテアーゼで切断されにくい分子を創製している<sup>13)</sup>。

マイオスタチン阻害分子は、発達期の青少年や成人以降

の大人でも効果を発揮する可能性が高い。実際に、生後のマウスモデルで、マイオスタチン阻害により筋量の増加が報告されている<sup>14)</sup>。また、筋ジストロフィーのモデルである *mdx* マウスと我々の作製したフォリスタチン由来分子を導入したマウスとの交配により、生後に進行する筋ジストロフィーマウスの骨格筋の壊死・変性が改善されることを確認している。筋ジストロフィーには、デュシェンヌ型、福山型、肢体型、筋強直性など多くの病型があるが、難治疾患の代表的な疾患で良好な治療法に乏しい。マイオスタチン阻害分子が生後でも作用する性質を利用すれば、筋ジストロフィー<sup>14)</sup>や神経性の筋萎縮、さらには悪液質によるがん末期の疲弊、高齢による筋力低下を救える可能性がある<sup>15)</sup>。

マイオスタチンの阻害は体脂肪の量を減らす作用があるため、新しい肥満治療のための分子としても有望と考えられる。マイオスタチン活性は、完全に100%阻害しなくとも、作用が見られる点も分子標的として優れている。

## 5. おわりに

フォリスタチンは、1987年に弱いFSH分泌抑制作用を持つタンパク質として偶然発見されたが、1990年にアクチビンの阻害分子として同定され、内分泌学を中心に研究が進展してきた<sup>7)</sup>。本レビューで紹介したように、フォリスタチンとFLRGがマイオスタチンの強力な阻害分子であるとの最近の知見から、タンパク質創薬の鋳型となる分子として見直されるようになった。

なお、マイオスタチンを阻害すれば筋力の上昇は見られるが、持久力に問題があるとの学会報告もある。実際に筋疾患への治療を実現させるためには、他剤と併用し、白筋と赤筋のバランスよい増加をはかることも重要であろう。

本稿は、第45回日本生化学会中国・四国支部例会の第1回学術奨励賞を受賞した内容を他の研究者の仕事も交えて紹介したものであります。本研究は、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（筋ジストロフィーに対する根本的治療を実現するための技術集約的研究）、文部科学省特定領域研究（アディポミクス）などのサポートを受け、現在進行中であり、関係者の方々にこの場をかりて御礼を申し上げます。

- 1) Tsuchida, K. (2004) *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 4, 157-166
- 2) McPherron, A.C., Lawler, A.M., & Lee, S.J. (1997) *Nature* 387, 83-90
- 3) Sweeney, H.L. (2004) *Sci. Am.* 291, 37-43
- 4) Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F., & Lee, S. J. (2004) *N. Engl. J. Med.* 350, 2682-2688
- 5) Lin, J., Arnold, H.B., Della-Fera, M.A., Azain, M.J., Hartzell, D.L., & Baile, C.A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 701-706
- 6) McPherron, A.C. & Lee, S.J. (2002) *J. Clin. Invest.* 109, 595-601
- 7) Sugino, H. & Tsuchida, K. (2000) in *Skeletal Growth Factor* (Canalis, E. eds.), pp. 251-263, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 8) Tsuchida, K., Arai, K.Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y., & Sugino, H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 40788-40796
- 9) Lee, S.-J. & McPherron, A.C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9306-9311
- 10) Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., & Qiu, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 40735-40741
- 11) Cipriano, S.C., Chen, L., Kumar, T.R., & Matzuk, M.M. (2000) *Endocrinology* 141, 2319-2327
- 12) 土田邦博 (2004) 生化学, 76, 1379
- 13) Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., & Lee, S.J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15842-15846
- 14) Bogdanovich, S., Krag, T.O.B., Barton, E.R., Morris, L. D., Whitemore, L.-A., Ahima, R.S., & Khurana, T.S. (2002) *Nature* 420, 418-421
- 15) Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., & Lee, S.J. (2002) *Science* 296, 1486-1488

土田 邦博

(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

Regulation of skeletal muscle mass and adipose tissue mass by follistatin and follistatin-related gene (FLRG) and development of novel polypeptides as medical drugs

Kunihiro Tsuchida (Division for Therapies against Intractable Diseases, Institute for Comprehensive Medical Science (ICMS), Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake 470-1192, Japan)

# Wnt10a Is Involved in AER Formation During Chick Limb Development

Tomohiro Narita,<sup>1</sup> Shunsuke Sasaoka,<sup>1</sup> Kiyoshi Udagawa,<sup>1</sup> Takahiro Ohyama,<sup>2</sup> Naoyuki Wada,<sup>1</sup> Shin-ichiro Nishimatsu,<sup>1</sup> Shinji Takada,<sup>3</sup> and Tsutomu Nohno<sup>1\*</sup>

The apical ectodermal ridge (AER) is indispensable for vertebrate limb development and requires Wnt/ $\beta$ -catenin signaling for induction and maintenance. We report identification and involvement of *Wnt10a* in AER formation during chick limb development. Chicken *Wnt10a* has 82% identity with mouse *Wnt10a* in the amino acid sequence. The *Wnt10a* gene was expressed broadly in the surface ectoderm from as early as stage 10. By stage 15, the expression was restricted to the surface ectoderm overlying the lateral plate mesoderm. *Wnt10a* expression became intensified in the presumptive limb ectoderm during AER formation, and subsequently intense expression signals persisted in the AER. *Wnt10a* misexpression led to ectopic *Fgf8* expression in the developing limb ectoderm and induced translocation of  $\beta$ -catenin in chick embryo fibroblasts. These results suggest that *Wnt10a* is involved in AER formation in the chick limb bud through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Developmental Dynamics* 233:282–287, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** AER;  $\beta$ -catenin; chick; expression pattern; limb; *Wnt10a*

Received 24 June 2004; Revised 12 November 2004; Accepted 18 November 2004

## INTRODUCTION

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays key roles in formation and maintenance of the apical ectodermal ridge (AER) during limb development. Misexpression of the constitutively active form of  $\beta$ -catenin leads to induction of ectopic *Fgf8* expression in the developing chick limb bud (Kengaku et al., 1998; Soshnikova et al., 2003). Conditional mutation of  *$\beta$ -catenin*, on the other hand, results in lack of *Fgf8* expression (Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003). Compound mutation of *Lef1/Tcf1* also impairs AER formation (Galceran et al., 1999). Therefore, Wnt/ $\beta$ -catenin signal-

ing in the AER is required for *Fgf8* expression to induce and maintain this activity.

*Wnt3a* and *Wnt3* are known to trigger Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during AER formation in chick and mouse embryos, respectively. In chick embryos, *Wnt3a* is expressed in the presumptive limb ectoderm before initial expression of *Fgf8* in the limb ectoderm (Kengaku et al., 1997). Misexpression of mouse *Wnt3a* leads to induction of ectopic *Fgf8* expression in the chicken limb bud (Kengaku et al., 1998). In mouse embryos, *Wnt3* but not *Wnt3a* is expressed ubiquitously in the limb ectoderm (Parr

et al., 1993). Conditional *Wnt3* mutation results in the lack of *Fgf8* expression in the mouse limb bud (Barrow et al., 2003).

In attempting to clarify which Wnt members are implicated in AER formation and maintenance, we found that *Wnt10a* was expressed in the AER of chick embryos. Here, we report on the expression patterns of chicken and mouse *Wnt10a*. We show the phenotypic consequence of *Wnt10a* misexpression in the developing chick limb bud, and the distribution of nuclear  $\beta$ -catenin in *Wnt10a*-expressing fibroblasts.

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

<sup>2</sup>Section on Molecular Development, Department of Cell and Molecular Biology, House Ear Institute, Los Angeles, California

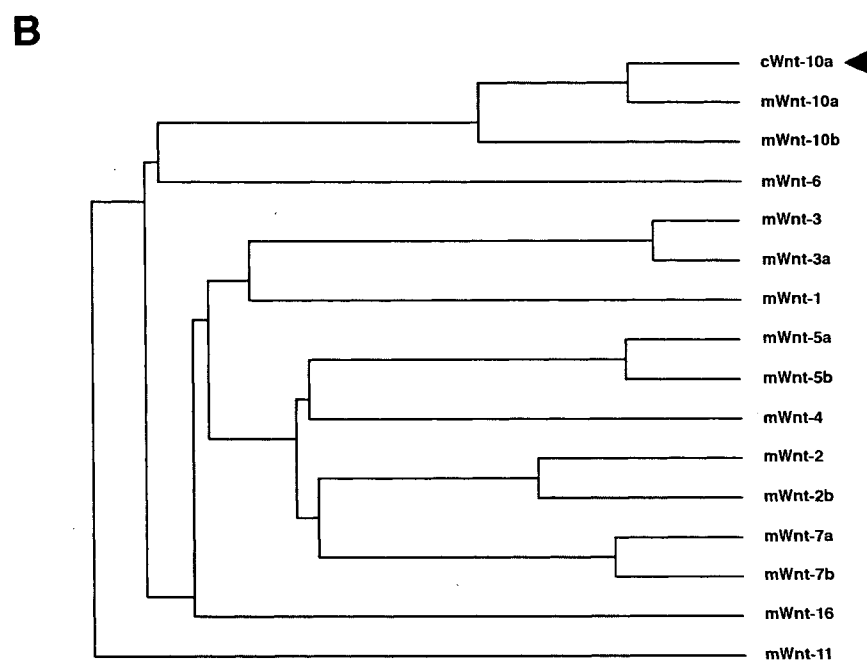
<sup>3</sup>Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan

Grant sponsor: Japanese Ministry of Education, Culture, Science, Sports, and Technology; Grant number: 13680863; Grant number: 14034260; Grant number: 16027251; Grant sponsor: Research Project Grants from Kawasaki Medical School; Grant number: 13-101; Grant number: 14-101; Grant number: 15-103A; Grant number: 16-101M; Grant sponsor: Ryobi-Teien Memorial Foundation.

\*Correspondence to: Tsutomu Nohno, Department of Molecular Biology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki 701-0192, Japan. E-mail: nohno@bcc.kawasaki-m.ac.jp

DOI 10.1002/dvdy.20321

Published online 23 March 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



**Fig. 1.** Sequence analysis of chick *Wnt10a*. **A:** Comparison of the amino acid sequence of chick *Wnt10a* and mouse *Wnt10a*. The amino acid sequence was 82% identical between them. Asterisks indicate the identical amino acid residues. c, chicken; m, mouse. **B:** A phylogenetic tree predicting the evolutionary relationship among chicken *Wnt10a* and other known mouse Wnts (mWnt), generated by using the UPGMA method (Genetyx, Tokyo). The chicken *Wnt10a* sequence is grouped with mouse *Wnt10a* (arrowhead).

**RESULTS**

**Expression Pattern of *Wnt10a* in Chicken and Mouse Embryos**

We screened chicken genomic libraries with mouse *Wnt10a* as a probe and obtained a full-length chicken *Wnt10a* cDNA by 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE). The chicken *Wnt10a* was, respectively, 82.0% and 61.2% identical to the mouse *Wnt10a*

and *Wnt10b* amino acid sequence (Fig. 1A,B).

To investigate the possible roles for *Wnt10a* in chick development, we examined the expression pattern of *Wnt10a* in chicken embryos from stage 10 to stage 34 using in situ hybridization. At stage 10, *Wnt10a* transcripts were detected weakly but significantly in the surface ectoderm posterior to the otic vesicle (Fig. 2A). Specifically, intense expression sig-

nals were observed in the surface ectoderm along the neural fold of the closing neural tube (Fig. 2A, arrowheads). At stage 12, strong expression of *Wnt10a* began to be detected in surface ectoderm around the tail bud (Fig. 2B, arrowhead). By stage 15, the expression that had been detected broadly in the surface ectoderm was restricted to the ectoderm overlying the lateral plate mesoderm but not the neural tube and somites (Fig. 2C).

During limb development, strong expression of *Wnt10a* was restricted in the ectoderm of the presumptive forelimb and hindlimb fields and then restricted in the developing AER. At stage 16, the expression signals detected uniformly in the surface became intensified in the prospective forelimb field (Fig. 2D). *Wnt10a* expression was observed uniformly in the limb fields at the dorsal-ventral levels. The expression domain of *Wnt10a* overlapped that of *Wnt3a* (Fig. 2D,E). At stage 18, strong expression of *Wnt10a* became detectable in the ectodermal domain located at the dorsal-ventral border on the developing AER (Fig. 2F, arrowheads). The *Wnt10a* expression domain was narrower at the dorsal-ventral levels and more extensive at the anterior-posterior levels than the *Fgf8* expression domain (Fig. 2G). At stage 21, strong expression of *Wnt10a* was observed in the AER expressing *Fgf8* (Fig. 2H,I). In contrast, in nonridge ectoderm, *Wnt10a* expression became very weak (Fig. 2H, arrowheads). During later stages, *Wnt10a* expression in the AER continued, but at stage 29, the expression disappeared in the tip of the forelimb AER (data not shown). By stage 32, *Wnt10a* expression was undetectable in the forelimb AER (data not shown). At stage 34, *Wnt10a* expression was observed in the hindlimb AER (data not shown). No expression signals were detected in the limb mesenchyme throughout all stages (Fig. 2H, window).

We also detected *Wnt10a* expression in mouse embryos. Expression of *Wnt10a* was first observed at 10.5 days post coitum (d.p.c.) in the AER of the limb buds (Fig. 2J,K) and maintained until 11.5 d.p.c. (Fig. 2L). *Wnt10a* was expressed in the AER of both chicken and mouse embryos.