

表2 筋ジストロフィーの治療法

遺伝子治療	遺伝子治療用のベクター (AAV など) を利用する。 アンチセンスによるエキソンスキッピング。
細胞移植治療	全身投与や筋肉へのデリバリーが可能になりつつある。 骨格筋に分化可能な幹細胞を移植する。 筋芽細胞, 成体幹細胞, 骨髄間質細胞などが候補。 倫理的な問題を解決する必要がある。
薬物治療	マイオスタチン阻害による治療法。 IGF-1 による治療法。 プロテアーゼ阻害剤。 ストップコドンを読みスルーさせる薬剤。 クレアチニン。

れている (Montarras et al, 2005)。さらに、近年の解析から、筋 SP (side population) 細胞と呼ばれる、DNA 結合色素を排泄する能力が高い細胞、血管芽細胞 (mesangioblast)、筋由来幹細胞 (muscle derived stem cells)、骨髄や脂肪組織に存在する成体幹細胞が骨格筋幹細胞として作用することが明らかとなっている (Dezawa et al, 2005; Sampaolesi et al, 2003)。ヒトへの治療応用を考えた場合、倫理面から、成体に存在する幹細胞が細胞のソースとして望ましい。したがって、骨髄間質幹細胞や脂肪由来幹細胞を用いた応用研究が期待されている。

### 3) 薬物療法

上述の遺伝子治療や細胞移植治療にも進展が著しいが、マイオスタチン阻害により萎縮した筋肉量を取り戻す治療法が最も実現性が高い治療法と考えられている。マイオスタチンを阻害する方法としては、(1) マイオスタチン阻害抗体、(2) マイオスタチン前駆体ペプチド、(3) マイオスタチン阻害分子であるフォリスタチンやフォリスタチン様分子 (FLRG)、(4) マイオスタチン受容体であるアクチビンの II 型受容体の細胞外領域からなる可溶性 ActRIIB 受容体などがある (Tsuchida, 2006)。マウス型マイオスタチン阻害抗体を用いた筋ジストロフィーモデル動物の治療が報告された (Bogdanovich et al, 2002)。欧米では、ヒト型マイオスタチン抗体 MYO-029 の筋ジストロフィー患者に対する治験が進行中である (Tsuchida, 2006)。マイオスタチン前駆体ペプチドを遺伝子導入したマウスでも、骨格筋中の筋線維数の増加が見られ (Nishi et al, 2004)、マイオスタチン前駆体ペプチドを用いても、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx マウスの筋崩壊を抑制可能である (Bogdanovich et al, 2005)。フォリスタチンや可溶性 ActRIIB 受容体は、マイオスタチンの遮断効果が強力であり、筋量の増加作用や筋分化促進作用が著しい (Lee and McPherron, 2001)。しかしながら、フォリスタチンや可溶性 ActRIIB 受容体は、マイオスタチン以外にアクチビンの作用をも阻害する (Tsuchida, 2004)。アクチビンは、マイオスタチン同様に筋分化抑制作用を持つが、性腺組織や肝臓など他の組織への効果も強力であるため、

アクチビン阻害効果を持たない分子が臨床応用を考えた際有用である (Tsuchida, 2004)。われわれは、フォリスタチン由来のマイオスタチン阻害分子を構築しており、筋量の増大作用や、mdx との交配による筋組織崩壊の抑制を確認している。

マイオスタチン阻害した筋芽細胞は、移植効率も上昇することが報告されている (Benabdallah et al, 2005)。マイオスタチン阻害療法を、前項で述べた細胞移植療法と併用することで、より効果の高い筋ジストロフィーの治療法の開発が期待できる。

その他の治療法としては、ジストロフィン遺伝子のエキソンスキッピング法が知られている。変異のあるエキソンを読み飛ばすために、アンチセンスのオリゴヌクレオチドを投与すると、正常よりも短い、機能のあるジストロフィンが筋膜上に発現し、筋壊死や変性が抑制される。AAV ベクターと組み合わせることで効率よく内因性ジストロフィンの発現誘導が可能になっている (Goyenvalle et al, 2004)。また、ゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生剤には、ストップコドンを読みスルーして、タンパク合成を促す作用があり、途中でストップコドンが挿入された変異ジストロフィン遺伝子に対する効果が検討されている。

## 2. 筋萎縮性側索硬化症

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は孤発性の発症例が多く、家族性発症が 5~10% と少ないため、責任遺伝子の同定された例は少ない。ALS の原因分子としては、Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) の変異が知られており、多種類の点変異が報告されている (Deng et al, 1993)。SOD 遺伝子変異により、gain-of-toxic function によって運動ニューロンに対して毒性を獲得すると考えられている。

最近、構造上 GTPase 活性調節因子であることが予想される分子 (ALS2, alsin) の変異が明らかとなった (Hadano et al, 2001)。また、DNA/RNA ヘリカーゼ様の構造を持つ senataxin (SETX) の変異 (ALS4) も報告されている。血管の形成を担う増殖因子 VEGF の発現の低下が進行性に運動ニューロンの変性を引き起こすことも知られている

表3 筋萎縮性側索硬化症の原因分子

病型	遺伝子座	原因分子
成人発症型		
ALS1	21q22	SOD1
ALS3	18q21	未同定
ALS6	16q12	未同定
ALS7	20pter-p13	未同定
ALS8	20q13	VAPB
若年発症型		
ALS2	2q33	ALS2, alsin
ALS4	9q34	SETX
ALS5	15q15-q21	未同定
孤発症型		
		AMPA 受容体の編集異常 GLT-1 の発現低下 VEGF の発現低下

ALS: amyotrophic lateral sclerosis, SOD1: Cu/Zn superoxide dismutase, VAPB: vesicle-associated membrane protein B, SETX: senataxin, a putative DNA/RNA helicase, GLT-1: glutamate transporter-1, VEGF: vascular endothelial cell growth factor.

(Ilzecka, 2006). さらに、孤発症例においては、グルタミン酸受容体の1つであるAMPA受容体の編集異常によってもALSが生じることが解析されている。

ALSの治療法に関しては、臨床応用が承認されている薬剤に、リルゾール (riluzol) がある。作用機序としては、グルタミン酸作用の抑制である。メチルコバラミン大量投与も試みられている。その他の治療法としては、IGF-1の遺伝子をAAVベクターに挿入し、骨格筋に投与し、逆行性に脊髄まで到達させて、神経細胞を保護させる遺伝子治療法が報告されている (Kaspar et al, 2003)。HGFなどの細胞増殖因子による神経細胞保護効果を期待する方法や、抗生剤によって、星状膠細胞にグルタミン酸トランスポーターであるGLT-1 (glutamate transporter 1, EAAT2) の発現を上昇させて、細胞内へのグルタミン酸の取り込みを促し、シナプス間隙の過剰なグルタミン酸を減少させて、神経細胞死を回避する方法も有効である (Rothstein et al, 2005)。ペニシリン系のベータラクタム抗生剤のうち、特にロセフィン (セフトリアキソン) の有効性が報告されている。マイオスタチン阻害療法が、神経原性筋萎縮を引き起こすALSにも有効性を有するのかが今後の重要な検討課題である。

#### IV. おわりに

有効な治療法に乏しかった筋萎縮をきたす神経・筋難病にも近年、有望な治療法の開発に長足の進歩が見られる。筋ジストロフィーに関しては、種々の病型の責任分子の同定がなされ、実現可能な治療法の開発に重点がおかれている。特に、マイオスタチン阻害療法は、最も実現性の高い治療法であり、欧米では、阻害抗体が臨床試験に入ってい

る。一方、細胞移植療法も進展が著しい。遺伝子治療については、AAVベクターなどの有用なベクターの開発に進展が見られる。

神経原性の筋萎縮をきたすALSについては、孤発性が多いが、家族性発症例の家系調査から、近年責任分子の同定に進展が見られている。筋ジストロフィーの責任分子が筋基底膜周囲の、ジストロフィンを含む筋鞘周囲のタンパク質群に集中している。一方、ALS発症に関与する分子群については、SOD1、GTPaseドメインを持つ分子、VEGFの発現低下、グルタミン酸の編集異常といった個別の発症メカニズムが解析されている。統一した発症機構のメカニズム解析には今後の進展を期待したい。ALSの孤発症例の分子機構の解析が進めば、治療法開発にも弾みがつくものと期待できる。

筋萎縮を防御する治療法の開発は、老化による筋萎縮 (sarcopenia) の予防にもつながる。急速な高齢化社会を迎えており、われわれの取り組んでいる筋萎縮をきたす神経・筋難病の治療法の開発研究は、健康・長寿社会の実現にも貢献できるものと期待される。

#### 文 献

- Barresi, R., Michele, D. E., Kanagawa, M., Harper, H. A., Dovico, S. A., Satz, J. S., Moore, S. A., Zhang, W., Schachter, H., Dumanski, J. P., Cohn, R. D., Nishino, I. and Campbell, K. P. (2004) LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nature Med*, 10: 696-703.
- Benabdallah, B. F., Bouchentouf, M. and Tremblay, J. P. (2005) Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal. *Transplantation*, 79: 1696-702.
- Blankinship, M. J., Gregorevic, P. and Chamberlain, J. S. (2006) Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Therapy*, 13: 241-249.
- Bogdanovich, S., Krag, T. O., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L. A., Ahima, R. S. and Khurana, T. S. (2002) Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 420: 418-421.
- Bogdanovich, S., Perkins, K. J., Krag, T. O., Whittemore, L. A. and Khurana, T. S. (2005) Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J*, 19: 543-549.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P. and et al. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, 261: 1047-1051.
- Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C. and Nabeshima, Y. (2005) Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309: 314-317.
- Durbejj, M. and Campbell, K. P. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: An overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev*, 12: 349-361.
- Goyenville, A., Vulin, A., Fougereuse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L. and Danos, O. (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 306: 1796-1799.
- Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y.,

- Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H. Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R. and Ikeda, J. E. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genet*, 29: 166-173.
- Ilzecka, J. (2006) Does VEGF represent a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis? *Curr Opin Investig Drugs*, 7: 54-59.
- Kaspar, B. K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J. D. and Gage, F. H. (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*, 301: 839-842.
- Lee, S.-J. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20: 61-86.
- Lee, S.-J. and McPherron, A. C. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9306-9311.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T. and Buckingham, M. (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*, 309: 2064-2067.
- Nishi, M., Yasue, A., Nishimatsu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M., Moriyama, K., Ohuchi, H. and Noji, S. (2002) A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 293: 247-251. Erratum in: (2004) *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 801.
- Parker, M. H., Seale, P. and Rudnicki M. A. (2003) Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet*, 4: 497-507.
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. and Emerson, Jr. C. P. (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18: 747-783.
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D. S., Toan, S. V., Bruijn, L. I., Su, Z. Z., Gupta, P. and Fisher, P. B. (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433: 73-77.
- Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M. A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M. G., Campbell, K. P., Bottinelli, R. and Cossu, G. (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*, 301: 487-492.
- Tsuchida, K. (2004) Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 4: 157-166.
- Tsuchida, K. (2006) The role of myostatin and bone morphogenetic proteins in muscular disorders. *Expert Opin Biol Therapy*, 6: 147-154.
- Yoshimura, M., Sakamoto, M., Ikemoto, M., Mochizuki, Y., Yuasa, K., Miyagoe-Suzuki, Y. and Takeda, S. (2004) AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Therapy*, 10: 821-828.

**Abstract:** Kunihiro TSUCHIDA (Division for Therapies against Intractable Diseases, Institute for Comprehensive Medical Science (ICMS), Fujita Health University, Toyoake, 470-1192 Japan) *Development of therapies against neuromuscular diseases causing muscle atrophy*. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.*, 26: 229-233 (2006).

Skeletal muscles become atrophied by muscular disorders such as muscular dystrophy, wasting and even aging. In addition to muscle atrophy, progressive muscle damage, inflammation and replacement of muscle fibers with fibrous and fatty tissues are observed in muscular dystrophy. Neuronal innervation is required for skeletal muscle, and muscles become atrophic when motor neurons are affected by neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis. Restoring muscle mass and function lost by diseases such as muscular dystrophy and neurodegenerative disorders is important. There are three rational therapies for muscular dystrophy and related diseases: gene therapy, cell therapy and drug therapy. Gene therapies to replace the defective genes have been tried with various degrees of effectiveness. Multiple myogenic stem cells including satellite cells, bone marrow cells, muscle side population cells, muscle-derived stem cells and mesoangioblast have been characterized. Cell therapies using these stem cells are one of the promising therapies for neuromuscular diseases causing muscle atrophy. As pharmacological drug therapies, increasing skeletal muscle mass by myostatin inhibition is quite promising and will be applied clinically in the near future.

**Key words:** Muscle atrophy, Muscular dystrophy, Amyotrophic lateral sclerosis, Myostatin, Molecular therapy

(Reprint requests should be sent to K. Tsuchida)

# 形態形成にかかわるWntファミリーの機能的多様性

川崎医科大学(分子生物学) 濃野 勉

## はじめに

形態形成で細胞間シグナリングに重要な役割を演じているWntファミリーには19種類のリガンドと10種類の膜貫通型受容体Frizzled(Fzd)があり, Wntが受容体へ結合した後, 最終的に標的遺伝子が活性化されるまでの過程には複数のシグナル伝達経路が作動している<sup>1-4)</sup>. 標準的な $\beta$ カテニンを介する経路には正, 負の調節をする多くの因子が関与し, さらに非標準的経路ではGタンパク質や $Ca^{2+}$ を介する経路, およびJNKを介する経路が並列で作動している. Wntファミリーはすべての左右相称動物のゲノムに共通して保存されている基本的なシグナル分子, 経路であるが, 各々の系統で多様化し, 保存されたシグナリング経路と保存されていない作用機序が混在している. Wntファミリーは胚発生で重要な役割を演じているが, リガンドの糖鎖付加, 糖鎖修飾や脂質結合が活性化に必須であるために, 活性型タンパク質としての精製が困難であり, そのため解析が遅れていた.

動物の多様性を決める形態形成過程でWntメンバーは領域特異的に発現し, 細胞分化の調節因子として重要な働きをしているが, 個々のWntによって作用が大きく異なっている. 一般に, 標準経路は細胞増殖を誘導し形態形成の場の構築に関与し, 非標準経路は部位特異的な分化に関与していると考えられている<sup>1-4)</sup>. この研究では標準経路を介するメンバーとしてWnt3a, Wnt10a, Wnt7aを中心に, また非標準経路を活性化するメンバーとしてWnt5a, Wnt11を中心に, 主にニワトリ胚の四肢形成, 顎顔面形成, 体節分化の過程でそれらの役割を調べた. すなわち, 活性型リガンドを部位特異的に, 異所性で過剰発現したときの効果を比較し, 器官形成における遺伝子発現誘導シグナルとしての役割を解明する. 培養細胞系やニワトリ胚を用いて, 細胞分化のマーカー遺伝子の発現に対する効果を調べ, 位置特異的な軟骨分化, 筋肉分化, 神経分化などとの関連性を見出すことを目指した.

## 材 料 と 方 法

### 1. ニワトリ受精卵とプローブ

発生ステージはHamburger and Hamilton(1951)に従った<sup>5)</sup>. 発現パターンはwhole-

mount in situ hybridizationおよび切片でのin situ hybridizationで調べた。ProbeにはニワトリWnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8c, Wnt10a, Wnt11, FGF8などの鋳型cDNAからcRNAを合成して用いた<sup>6,7)</sup>。

野生型ではレトロウイルスの感染効率が低いので、レトロウイルスベクターを用いた過剰発現実験には日生研(株)より購入したウイルス未感染のニワトリ受精卵を用いた。38℃の孵卵器(SANYO INCUBATOR MIR-153)で2日(ステージ8~12), 3日(ステージ17~19), 4日(ステージ23前後), 5日(ステージ26前後), 6日(ステージ28前後)まで孵卵した。

## 2. 遺伝子発現の検出

ニワトリ胚を4% paraformaldehydeを含む phosphate-buffered saline (PBS) で4℃一晩固定し, 0.1% Tween 20を含むPBS (PBT) に置換した後, 25% ethanol/PBT, 50% ethanol/PBT, 75% ethanol/PBT, 100% ethanolで処理し, 最後に100% ethanol中で-20℃で保存した。

Whole-mount in situ hybridizationは定法に従って行った<sup>6,7)</sup>。前処理後, 68℃のpre-hybridization mix (組成: 50% formamide, 5×SSC pH 7.0, 50 μg/ml tRNA, 1% SDS, 50 μg/ml heparin) に置換し, 1時間処理した後, Digoxigenin (DIG)-labeled RNA probe (0.5 μg) + 希釈用pre-hybridization mix溶液に置換し, 68℃で一晩hybridizationを行った。ProbeはT7またはT3 RNA polymeraseで, 37℃で2時間反応して合成し, DIG標識RNAは必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。ハイブリダイゼーション後プローブを洗浄し, アルカリホスファターゼで標識した抗DIG抗体で反応を行ない, NTMT (組成: 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween<sup>20</sup>) 中で発色した。発色液 (NBT: 4-Nitro blue tetrazolium chloride + BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate/NTMT) で発色反応を開始し, 発色完了後50% ethanol/PBTに置換し, 遮光して4℃で保存した。

切片での発現は次のようにして調べた。取り出した胚を4% paraformaldehyde/PBS溶液で固定し, 脱水, 再水和後にパラフィン包埋し, 厚さ7 μmで切片を作製した。In situ hybridizationはwhole-mount in situ hybridizationの手法に準じて行った。変更点としては, pre-hybridization mixにはwhole-mountで使用したpre-hybridization mixに終濃度10% dextran sulfateを加えたものを使用し, 発色液はwhole-mountの場合の1/10の濃度を用いた<sup>6)</sup>。発色停止後に0.1% Nuclear fast red/5% 硫酸アルミニウム水溶液で核を染色した。

### 3. 組換えレトロウイルスの作製

ニワトリ線維芽細胞(CEF), およびニワトリ由来の細胞株DF-1は5%ウシ胎児血清(FBS)を含むDulbecco改変最少培地(D-MEM)で継代培養した. ニワトリ胚からクローニングした全コーディング域を含むWnt10a cDNA(cWnt10a)をRCAS vectorにlinkerを介してサブクローニングした<sup>8)</sup>. マウスWnt3a(mWnt3a)はPCRで増幅したcDNAをRCAS vectorにサブクローニングして用いた. ニワトリWnt3aには典型的なシグナルペプチドの配列がなかったため, マウスのWnt3a由来のシグナルペプチド配列を繋ぎ換えて(mcWnt3a)発現させた<sup>9)</sup>.

CEFを $1 \times 10^6$  cells/wellで直径90 mmのシャーレに播き(培地は2% FBS と1%ニワトリ血清(CS)を含む D-MEM 10ml), CO<sub>2</sub>孵卵器中で37°C, 12~24時間培養する. 約70% confluentになっているのを確認し, シャーレ当たり3  $\mu$ gのRCAS-Wnt DNAと15  $\mu$ lのLipofectinを用いてGIBCO-BRLの手順に従ってtransfectionを行った. 培地を血清なしのD-MEMに変えて引き続き24時間培養し, 培地を2% FBS 1% CS D-MEM 10mlに換える. その後, 24~48時間毎に培地を交換し, 培養上清にウイルス粒子を回収する.

回収した培地を遠心チューブ中に合わせ, BECKMANN SW-27ロータで20,000 rpm, 10分間, 4°Cで遠心し, 細胞残渣を除去したのち, 上清を別の遠心チューブに移し, 同様に120分間遠心してウイルス粒子を沈殿させる. 上清を除去後, 少量の培地に懸垂し, 濃縮ウイルスを得る. 濃縮したウイルスは-80°Cで保存する.

ウイルスカ価の検定は12穴プレートに $1 \times 10^5$  cells/wellで播き込んだDF-1細胞を使って行った. 保存ウイルスを加え, 37°Cで培養する. 48時間後に培地を捨て, PBSで洗浄し, 4% PFA/PBS溶液で固定する. PBSで再度洗浄し, 0.3%過酸化水素/methanol溶液に5分間浸透することで内在性peroxidaseを不活化し, VECTASTAIN Elite ABC KITを用いて免疫染色した.

### 4. ニワトリ胚への遺伝子導入

#### 1) エレクトロポレーションによる遺伝子導入<sup>9)</sup>

卵殻に一部穴を開け, Tyrode液で希釈した墨汁を胚胎の下に注ぎ, 胚を可視化する. ステージ13前後の神経管に, CAG promoter/enhancerに繋げたcDNA(1-2 mg/ml)をfast green(400 ng/ml), carboxymethyl cellulose(3  $\mu$ g/ml)を含む液に溶かして注入する. プラチナ線(100  $\mu$ m)で自作した4 mm幅の電極を介してエレクトロポレーションを行った. 30Vで50msecの矩形波を4回かけ, その後24~48時間孵卵を続けた.

#### 2) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入<sup>6,8)</sup>

レトロウイルス未感染のニワトリ受精卵(line M)を38°Cの孵卵器(SANYO MIR-153)でス

テージ12前後まで孵卵する. ニワトリ胚の漿膜, 羊膜を取り除き, 片側予定肢芽領域に濃縮した RCAS-Wntウイルスをマイクロインジェクター (NARISHIGE IM-300) で微量注入 (約10nlを数回) する. その後, 卵開口部を透明粘着テープでシールし, 孵卵を継続する. 対照実験としては上記手順と同様に濃縮したアルカリホスファターゼ発現ウイルス (RCAS-BPAP) を同部位に微量注入する.

## 5. 蛍光免疫染色

ニワトリ胚をPBS中に取り出し, 4% paraformaldehyde/PBS溶液に置換し4°Cで一晩固定した. 切片を作製し, 使用説明書に記載の濃度で一次抗体と4°Cで一晩反応した. PBSで洗浄後, 蛍光標識した二次抗体を用いて検出した.

## 6. タンパク質の回収

ニワトリ線維芽細胞由来のDF-1細胞株を6穴プレートに $2 \times 10^5$  cells/wellで播き込む (培地は2% FBS, 1% CS D-MEM). HAのタグを付けたcWnt3a, cWnt4, cWnt5a, cWnt6, cWnt7a, cWnt10a, cWnt11, mWnt3a, mWnt8とFLAGのタグを付けたFrizzled 4 またはFrizzled10を発現ベクターpcDNA3.2に組換え, それぞれ1  $\mu$ g DNAをlipofectamine 2000を用いて細胞へ同時導入し, 37°Cで培養する. 24時間後に培地を捨て, PBSで洗浄し, PBSを加えcell scraperにて掻き採り細胞を回収する. 10,000 rpmで15分間遠心後, RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS) 70  $\mu$ lを加え, 超音波細胞粉碎装置を用いて氷冷下で超音波処理を行う. 10,000rpm 15分4°Cで遠心後上清を回収し, Bradford法でタンパク濃度を測定し, 濃度を揃える.

## 7. ウェスタンブロッティング

調製した試料にsample buffer (NEB) を加え90°Cで2分間処理したのち, DTTを加えてSDSを含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, PVDFメンブレンへ電氣的に転写した. TBST (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Tween<sup>20</sup>) 中に2.5% スキムミルク, 0.5% BSAを含むブロッキング溶液で処理した後, ブロッキング溶液で1/3,000倍希釈したHA, FLAGに対する1次抗体液で4°C一晩反応する. ブロッキング溶液で3回洗浄した後, HAではanti-rat IgG-peroxidaseを, FLAGではanti-mouse IgG-peroxidaseをブロッキング溶液で1/20,000希釈した反応液中で1時間, 室温で反応させる. TBSTで洗浄し, 化学発光基質 (Amersham ECL+) を用いて検出した.

## 8. 免疫沈降法

回収したサンプルにanti-FLAG M2 affinity gel(Sigma)を加えlysis buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0, 1% Triton X-100)で全量を500  $\mu$ lにした後, 2時間震盪する. 10,000 rpm 4°Cで5秒間遠心しTBS(Tween20を含まないTBST)で3回洗浄した. Sample bufferを加え加熱処理したのち10,000 rpmで 5秒遠心し, 上清をゲル電気泳動し, ウエスタンブロッティングを行った.

## 結 果

### 1. 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

ニワトリ胚の約4日胚(ステージ23), 約5日胚(ステージ25), 約6日胚(ステージ28)を用いて, WntファミリーのうちWnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8c, Wnt10a, Wnt11を調べた. その結果, Wnt4, Wnt7a, Wnt8cについては顔面隆起での発現はほとんどみられなかった<sup>6,7)</sup>. 以下, 顕著な発現シグナルがみられたWntについて記載する.

#### 1) Wnt5a

ステージ23では上顎隆起全体に強く発現している. また下顎隆起全体にも発現しているが, 遠位で強く近位では弱く発現している. 口窩には発現していない. 外側鼻隆起および内側鼻隆起にも強く発現しているが, 鼻窩には発現していない(図 1 A, B). ステージ25ではステージ23と同様にすべての顔面隆起で発現している. ステージ23に比べ, それらの発現は, 隆起の遠位側で強くなっている(図 1 C, D). ステージ26胚の上顎隆起お

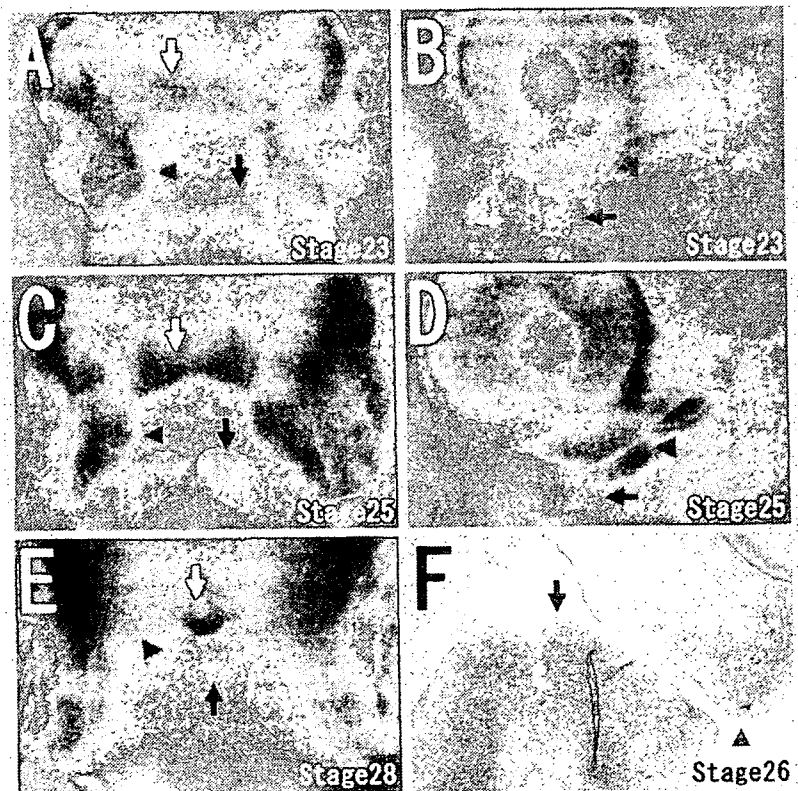


図1 ニワトリ顎顔面の形態形成におけるWnt5aの発現パターン。(A,B)ステージ23, (C,D)ステージ25, (E)ステージ28での顎顔面における発現パターン。(F) Nuclear fast red染色後のステージ26胚の顔面切片.



よび下顎隆起を含む切片より, Wnt-5aの顔面隆起における発現は, 間充織のみで上皮(外胚葉)にはみられないことが分かる(図1F).

さらに発生が進みステージ28では, 突出してきた前頭鼻隆起の先端で強く発現している. 一方, 上顎隆起と下顎隆起での発現は, より先端辺縁部に弱く局在している(図1E).

## 2) Wnt11

ステージ23では, 上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で強く発現している.

また, 眼胞周囲にも強く発現している(図2A, B). ステージ25ではステージ23と同様に, 上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で,

より局在化して発現している. また, 上顎隆起と内側鼻隆起の近接部にも発現している(図2C, D). ステージ26

胚の上顎隆起および下顎隆起を含む切片より, Wnt11は, 上顎隆起と下顎隆起の近接部の間充織に強く発現している. 一方, 上皮(外胚葉)での発現は, みられない(図2F). さらに発生が進行しステージ28になると, 顔面隆起での発現は, 消失している(図2E).

## 3) Wnt3aおよびWnt10a

両者とも, 顎顔面形態形

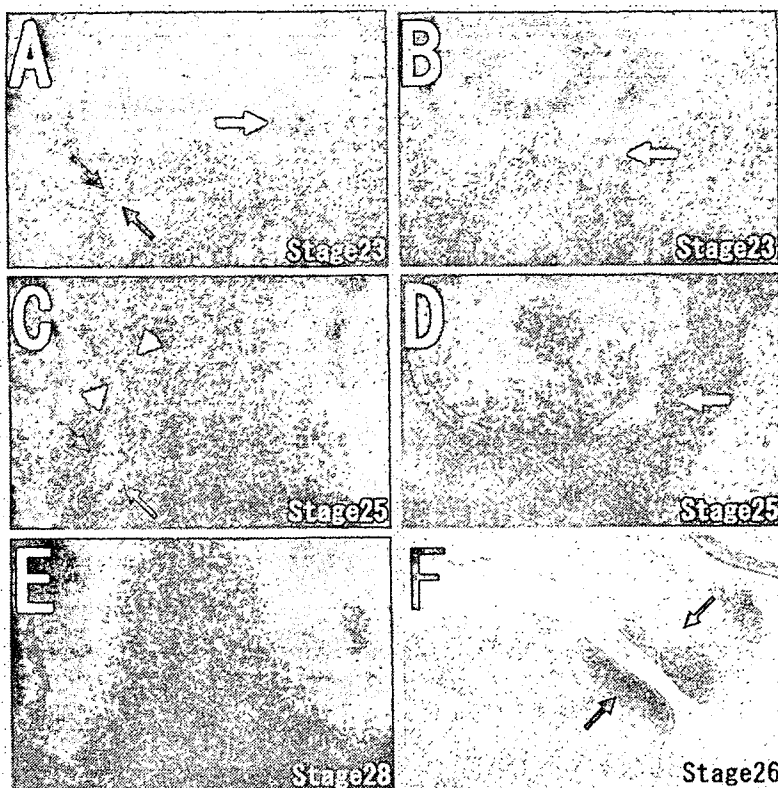


図2 ニワトリ顎顔面の形態形成におけるWnt11の発現パターン. (A,B)ステージ23, (C,D)ステージ25, (E)ステージ28での顎顔面における発現パターン. (F)Nuclear fast red染色後のステージ26胚の顔面切片.

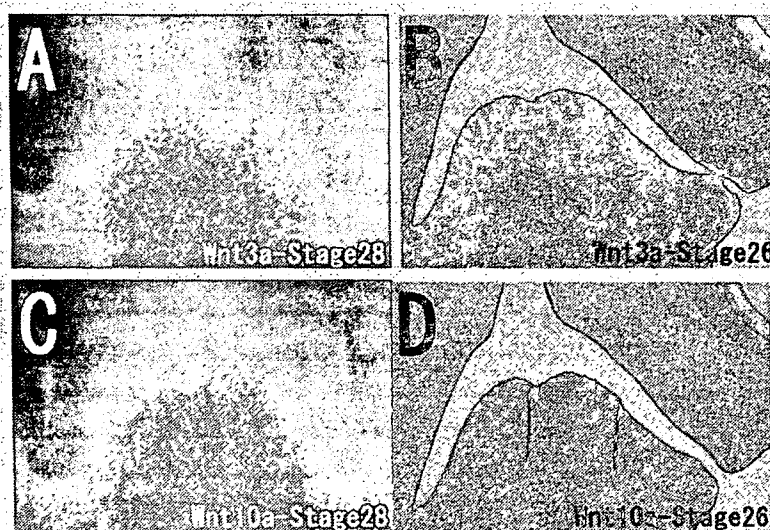


図3 ニワトリ顎顔面の形態形成におけるWnt3aとWnt10aの発現パターン. (A,B) Wnt3a, (C,D) Wnt10aの顎顔面における発現パターン. (A,C)ステージ28, (B,D) Nuclear fast red染色後のステージ26胚の顔面切片.

成過程を通して上皮(外胚葉)で発現がみられるが、各々の顔面隆起において強い局所的な発現はない。両者を比較すると、Wnt3aに比べWnt10aの方がやや強い発現シグナルがみられた(図3A-D)。

## 2. 皮筋節の分化におけるWnt3aの機能

ニワトリ胚やマウス胚の神経管背側で発現するWnt3aは神経管に対する増殖促進作用を持つことが知られている。神経管背側で発現するWnt3aが体節の形成、増殖に対してはどのような影響を及ぼすかを調べるため、ニワトリ胚でWnt3aを強制発現したときの効果を調べた。ニワトリWnt3aは典型的なシグナルペプチドを持たず、効率よく分泌されない可能性があるため、これをマウスのWnt3a由来のシグナルペプチド配列と繋ぎ換えて発現させた(図4)。

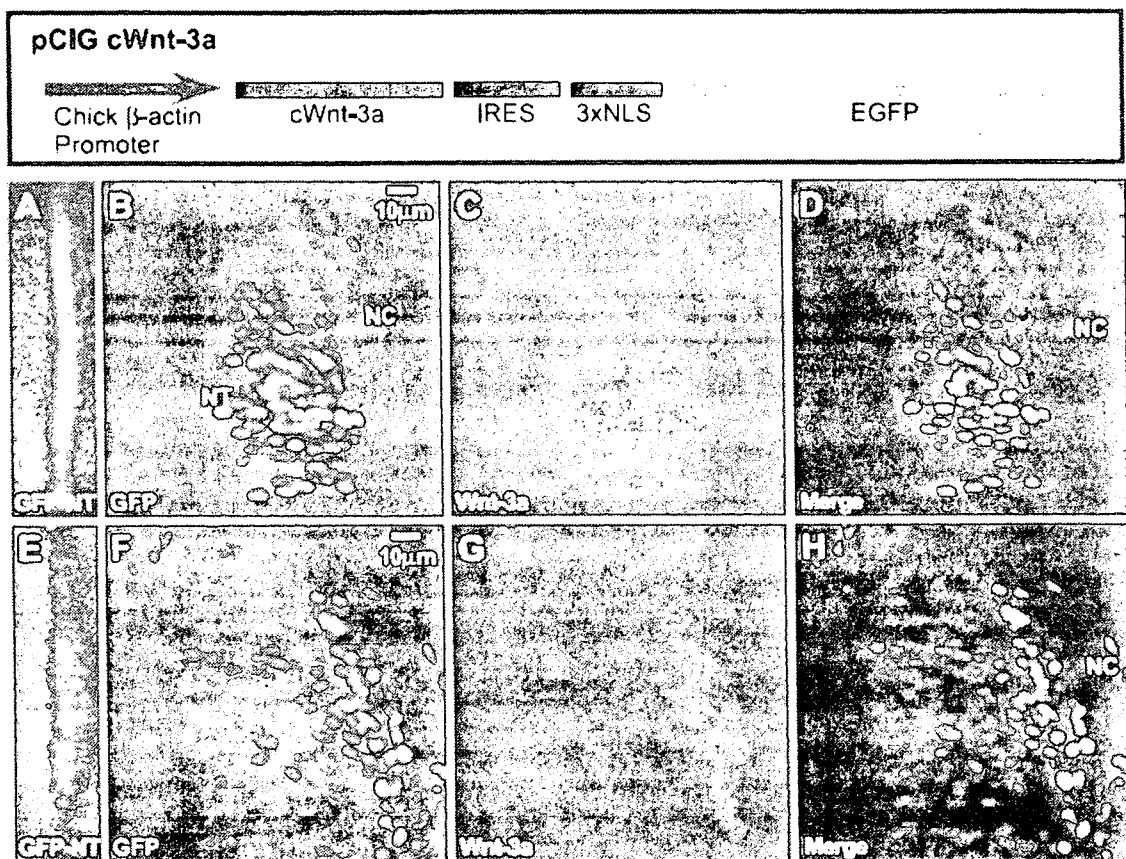


図4 エレクトロポレーションによるニワトリ胚片側でのmcWnt3aの異所的発現。発現ベクターの概要を最上段に示す。CAGプロモーター/エンハンサーの下流にmcWnt3aを繋ぎ、さらに内部翻訳開始シグナル(RES)を挟んで核移行シグナル(NLS)をもつGFPを繋ぎ付けてある。(A-D)導入24時間後、(E-H)導入48時間後のGFPの蛍光(緑)とWnt3a抗体による蛍光染色(赤)。(A,B,E,F) GFPの発現、(C,G) Wnt3aの発現、(D,H)両者を重ねた図。略号:NC, neural crest; NT, neural tube。

このマウス由来のシグナル配列を持つニワトリWnt3a(mcWnt3a)にIRES-NLS-eGFPを繋ぎつけて発現ベクターに組み込み、エレクトロポレーションでステージ11-14のニワトリ胚神経管に導入して発現させると、24-48時間後に神経管の片側でWnt3aとGFPのほぼ重複した発現が認

められた(図4). このとき, 24時間後では隣接した体節でのPax1の発現が消失したが, Pax7の代償的な発現は見られなかった(図5 A, B). 48時間後には皮筋節でのPax3とPax7の発現領域はわずかに拡大し, MyoDとmyosin heavy chain(MHC)抗体で確認できる筋節領域は実質的に拡大していた(図5 C-F).

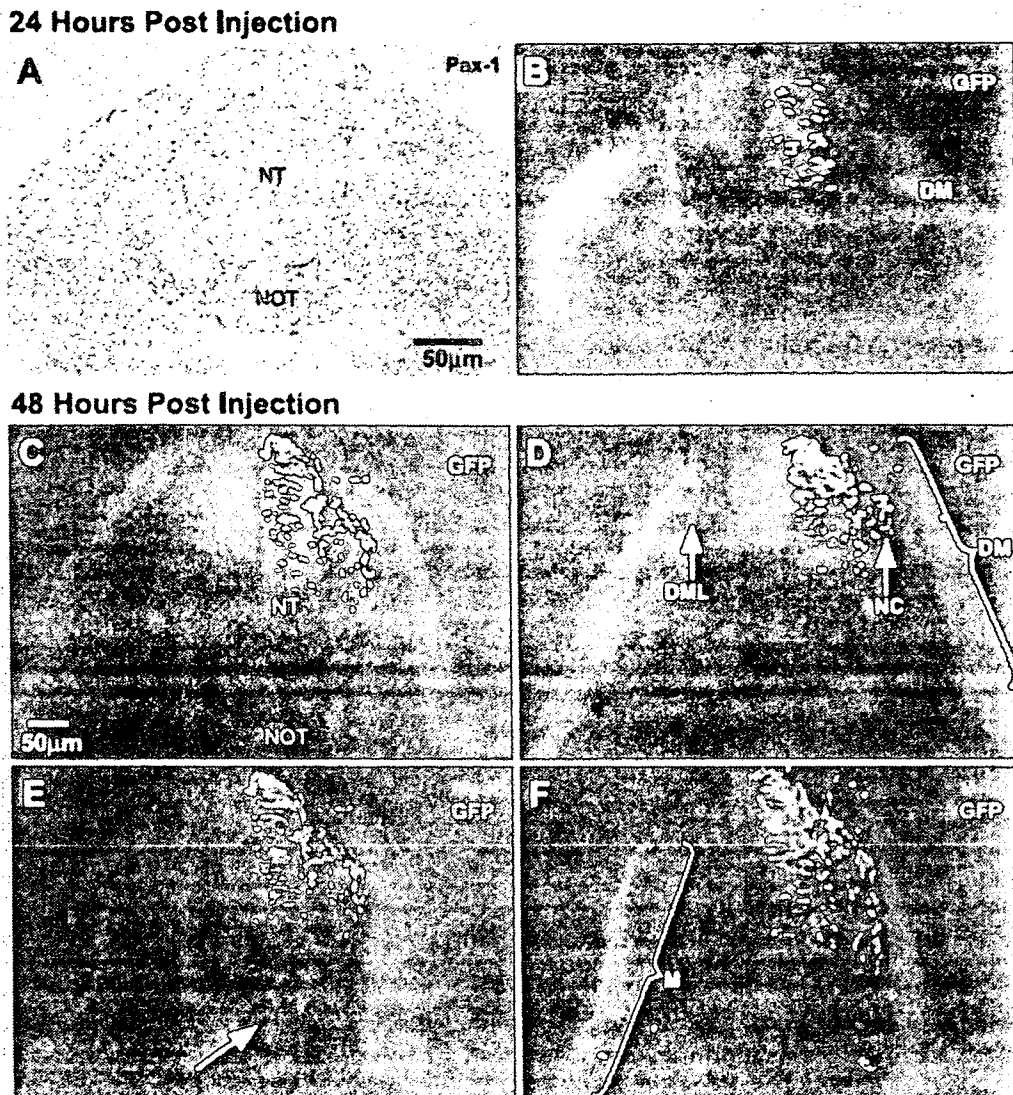


図5 片側で異所的に発現したmcWnt3aによる効果を遺伝子, タンパク質の発現で検出. (A)導入24時間後のPax1の発現. (B)導入24時間後, (C-F) 導入48時間後でのGFP蛍光(緑)と抗体による蛍光染色(赤)を重ねた図. (B,D) Pax7, (C) Pax3, (E) MyoD, (F) myosin heavy chain (MHC). 略号:DM, dermomyotome; DML, dorsomedial lip; NC, neural crest; NOT, notochord; NT, neural tube.

ステージ10の体節板, 体節I-III, 体節IV-VIの外植片を用いた実験でもWnt3aタンパク質またはWnt3a発現細胞の培養上清を加えるとPax3, Pax7の発現は顕著に上昇するが, MyoD, MHCではわずかな発現誘導しか見られなかった. 体節I-IIIの外植片で見られるWnt3aの効果は細胞増殖の促進によるものであり, 細胞死の変化によるものではないことがリン酸化histone H3抗体, およびTUNEL標識で確認された. ニワトリ胚の神経管で過剰発現したWnt3aによっても同様

な効果が認められ、体節を構成する細胞の増殖が促進され、その一方で細胞死はほとんど変化が見られなかった。

### 3. 四肢形成におけるWnt10aの機能

その一方で、このmcWnt3aをニワトリ肢芽で過剰発現してもFGF8の発現に対しては影響が見られない。そのため、FGF8の発現に先立って肢芽先端部外胚葉で発現するWnt10aについて、FGF8の誘導因子としての活性を調べる実験を行った。Wnt10aはステージ12では外胚葉全体で顕著な発現が認められ、ステージ16では前肢芽の外胚葉で強く発現するようになる(図6 A-D)。神経管や体節での発現は見られない。ステージ18ではAERが形成される背腹境界で強い発現が見られるようになるが、FGF8に比べると背腹軸ではより狭く、前後軸ではより広い(図6 F, G)。ステージ21ではFGF8の発現と重なってAERで強い発現が見られる(図6 H, I)。以後、前肢のAERではステージ29まで発現が継続し、ステージ32では検出できなくなるが、後肢のAERではステージ34まで継続する。

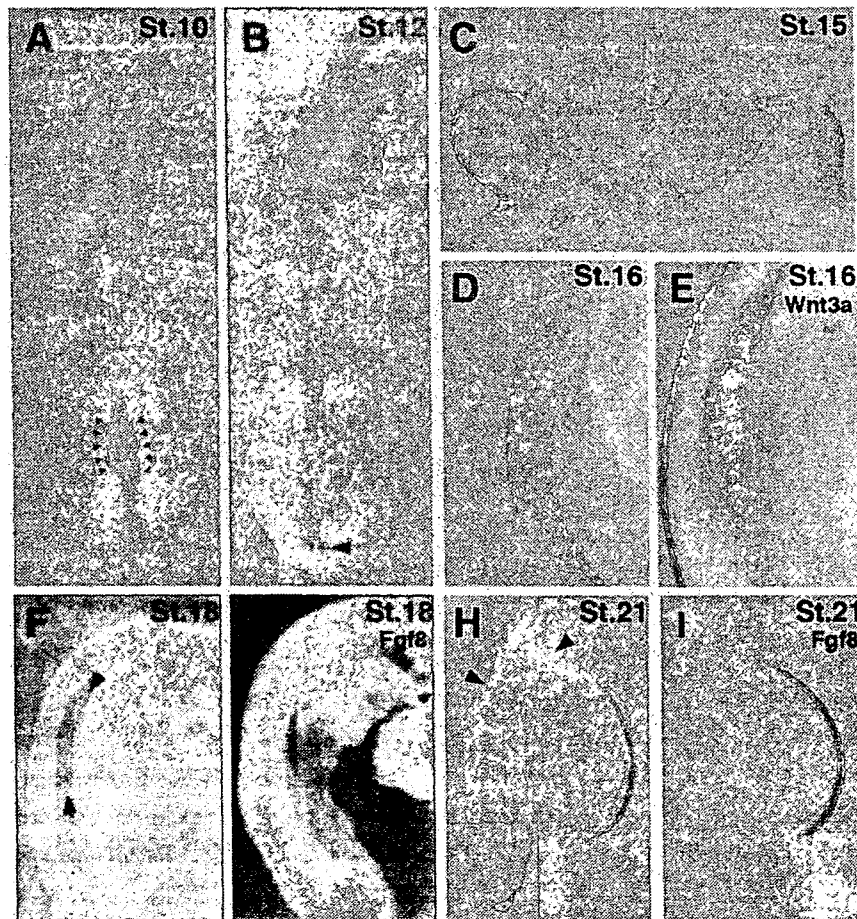


図6 四肢形成におけるWnt10aの発現。(A-D,F,H) Wnt10a, (E) Wnt3a, (G,I) Fgf8の発現パターン。発生ステージは各パネルに記載。ステージ18~21でのWnt10aの発現はFgf8よりも広範囲であり、Fgf8の発現に先立つ。

ニワトリWnt10aもマウスWnt10aと同様に肢芽での過剰発現でFGF8を異所的に誘導することができ、その活性はマウスのWnt3aで見られるのと同レベルである(図7 A-F)。さらに、Wnt10aの過剰発現で $\beta$ カテニンが細胞質へ蓄積することに加えて、核内にも集積することを確認した(図7 G-J)。

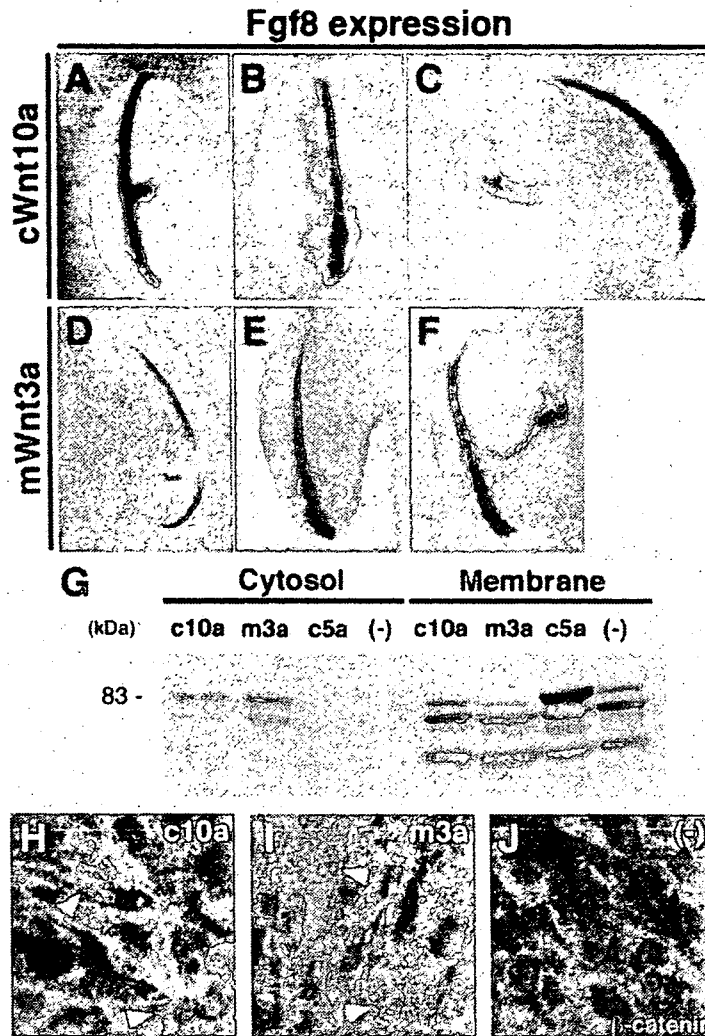


図7 レトロウイルスベクターを用いて肢芽で異所的発現したWnt10aは $\beta$ -catenin経路を活性化してFgf8の発現を誘導する。(A-C)ニワトリWnt10a, (D-F)マウスWnt3aを過剰発現したときのFgf8の異所的発現。Fgf8の発現が肢芽先端部の外胚葉頂堤(AER)以外の場所へ広がっている。(G) Western blottingで検出した $\beta$ -cateninタンパク質の細胞質への蓄積。ニワトリWnt10a (c10a), マウスWnt3a (m3a)では細胞質へ $\beta$ -cateninの蓄積が検出されるが、ニワトリWnt5aでは対照と同様に検出されない。(H-J) ニワトリWnt10a (c10a), マウスWnt3a (m3a)による $\beta$ -cateninの核への移行。

#### 4. Wnt-Frizzled相互作用

ニワトリ肢芽で発現しているWntとFrizzledの対応関係を調べるため、Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt10a, Wnt11のC末端側にHAタグをいれ、一方Frizzled4, Frizzled4にはFLAGタグを入れてDF-1細胞で発現させた。発現効率は均一ではなくWntによってタンパク質の産生量に

大差が見られるが、共発現してプルダウンアッセイを行うとすべてのWntがFrizzledと結合していた。一方、Wnt-HAの培養上清をFrizzled-FLAG発現細胞に加えて行ったアッセイではWnt7aとFrizzled10の間で高い結合が見られた(図8)。

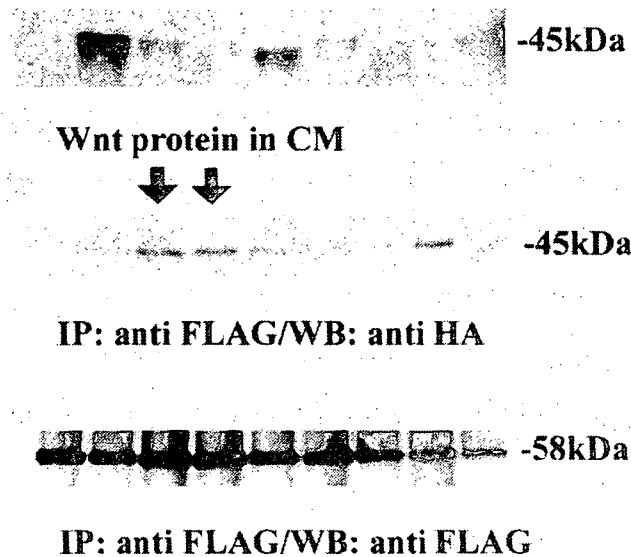


図8 ニワトリ胚芽で発現しているWntファミリーとFrizzled10の相互作用。左側レーンから順に、C末端側にHAタグをいれたWnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt10a, Wnt11, マウスWnt3a, マウスWnt8, およびベクターのみの対照を示す。FLAGタグ付きのFrizzled10を発現させたDF-1細胞にこれらを加えてプルダウンアッセイを行った。Wntタンパク質の培養上清中への産生量には差が見られるが(上段), Frizzled10との結合ではWnt5a, Wnt7aで顕著なバンド(矢印)が検出された(中段)。下段はプルダウン後に検出したFrizzled10。

## 考 察

Wntファミリーは分子量約4万の糖タンパク質であり、現在、脊椎動物では19種のメンバーが知られ、さまざまな局面で時間的、位置的に特異的な発現を示し、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能している<sup>1,2)</sup>。この研究では細胞増殖の促進による器官形成の場の提供、および部位特異的な細胞分化の調節による組織形成と器官構築の過程に関与するWntファミリーをシグナル伝達経路の多様性と関連付けて調べた。

Wnt5aは四肢が成長していく過程で、肢芽先端の間充織の増殖と伸長に関与すると考えられている<sup>6,10)</sup>。顎顔面での発現を調べた結果からもWnt5aはステージが進むとともに、顔面隆起の遠位側で強い発現があり、同部位の間充織における増殖と伸長に関与すると考えられる。しかし、Wnt5aは非βカテニン経路のうち、Ca<sup>2+</sup>経路を主として作動することが知られており<sup>11)</sup>、細胞分化には関与するが直接の細胞増殖シグナルとは考えられていない。四肢の形成において、Wnt5aは軟骨分化、筋肉分化に関与していることが調べられており<sup>6,12,13)</sup>、またWnt5aのノックアウト

マウスでは四肢の先端部への伸展が阻害されることが知られている<sup>10)</sup>。従って、Wnt5aの顎顔面の形成過程での発現パターンから、ここでも四肢の場合と同様に、顎の軟骨分化や筋肉分化に関与している可能性が考えられる。

Wnt11は初期胚において非 $\beta$ カテニン経路の1つであるJNK経路を介して平面内細胞極性の決定や細胞分化に関与していることが知られている<sup>11)</sup>。また、上顎隆起と内側鼻隆起の癒合には、TGF $\beta$ やSHH, FGF, BMPのシグナルが関与し、これらの因子はJNK経路とのシグナルクロストークが知られている。顎顔面の形成過程ではWnt11が上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で強く発現していた。従って、癒合に関与する上記シグナルに加え、Wnt11も上顎隆起下顎隆起間と上顎隆起外側鼻隆起間など、それぞれの顔面隆起の癒合に関与し、単なる隆起の伸展から顔面の形態形成に至る過程に関与する因子の一つであると考えられる。

顎顔面の形態形成において外胚葉で発現するWnt3aは神経管の背側でも発現しているが、その体節分化に対する作用は不明であった。ここではニワトリ胚で片側的にWnt3aを過剰発現し、効果を調べた<sup>9)</sup>。ニワトリWnt3aには典型的なシグナル配列がなく効率的に分泌されない可能性が高いので、マウスWnt3a由来のシグナル配列と繋ぎ換えてmcWnt3aとして発現させた。Wnt3aの成熟部分の配列は種間で保存されているがマウスとニワトリでは一部異なり、ニワトリWnt3aには1箇所余分にNグリコシル化される場所がある。そのためシグナルペプチド配列をマウス型に代えてもニワトリWnt3aのタンパク質合成はマウスWnt3aの場合よりも低く、成熟部分の翻訳効率に差がある。成熟部分の体節分化における活性は隣接する皮筋節の増殖、分化に対して顕著な活性が検出された。すなわち、筋分化の初期マーカーであるPax7やmyosin heavy chain に対してmcWnt3aを過剰発現した側で領域の拡大が見られた。従って、成熟部分の活性はニワトリWnt3aでも保持されていると考えられる<sup>9)</sup>。

このように、ニワトリWnt3aの成熟部分は体節の増殖、分化に対する効果で見ると十分な活性を保持している。しかし、mcWnt3aを肢芽で過剰発現してもマウスWnt3aで見られるようなAERとその近傍の外胚葉でのFGF8発現の誘導に対してはほとんど影響が見られない<sup>14)</sup>。そこでFGF8に先立って肢芽先端部で発現するWnt10aについて、FGF8発現誘導因子としての確認を行った<sup>8)</sup>。ニワトリWnt10aもマウスWnt10aと同様に肢芽での過剰発現でFGF8を異所的に誘導することができ、その活性はマウスWnt3aの効果とほぼ同程度であった。Wnt10aにより $\beta$ カテニンが細胞質へ蓄積することに加えて、核内にも集積することを確認した。従って、ニワトリ胚でのFGF8の発現を介するAER形成にはWnt3a ではなくWnt10aの方が内因性因子として関与していると考えられる。

一般にWntファミリーは細胞外基質や膜表面に強固に結合し、効率よく培養上清中に分泌さ

れる可能性が低く、これまでにWnt3a, Wnt5aなど限られたメンバーしか活性を持つ分子として精製されていない。そのため多様な活性を持つWntファミリーがWnt受容体系として同定された7回膜貫通型受容体のFrizzledおよび1回膜貫通型の共働受容体LRP5/6とどのような関係にあるのかについて、明確な証拠が得られていない。ここでは肢芽で領域特異的に発現するFrizzled4, Frizzled10とWntファミリーとの結合を調べるために、それぞれFLAGとHAのタグを導入して培養細胞DF-1で発現した。Wnt-HAをFrizzled-FLAGと共発現または培養上清として加え、FLAG抗体でプルダウンしたとき、Frizzled10ではWnt5a, Wnt7aとの顕著な結合が認められ、一方Frizzled4ではどのWntとも有意な結合は検出されなかった。このような結果はWnt7aとFrizzled10が肢芽の共通した領域で発現が見られること、およびツメガエルのアニマルキャップを用いた検定系で、マーカー遺伝子の発現に対する効果から相互作用が考えられていたWnt7aがFrizzled10のリガンドであるという結論と一致する見解である<sup>15)</sup>。

Wntファミリーは多細胞生物の形態形成に必須の細胞間シグナル分子であり、この作用メカニズムを比較、解明することで動物の多様性を決める分子的基盤が明らかになる。さらに、このような研究から未分化の幹細胞が増殖、分化して多様な組織、器官を構築するための基本的な原則が解明され、それを応用した臓器再生にも道が開ける。すなわち、胚性幹細胞を利用した臓器形成、再生などによる失われた組織、器官の構築を行うためには、細胞の位置特異的な増殖や分化を時間的、空間的に正しく再現する必要がある、それには細胞間の相互作用にかかわるWntなどの作用を調べ、器官形成における位置情報決定のメカニズムを理解して応用する必要がある。

## 文 献

- 1) 濃野 勉:現代医療, 32:1912-1921(2000)
- 2) 濃野 勉:実験医学, 20:2469-2476(2002)
- 3) Logan CY, Nusse R:Annu Rev Cell Dev Biol, 20:781-810(2004)
- 4) Nelson WJ, Nusse R:Science, 305:1483-1487(2004)
- 5) Hamburger V, Hamilton H:J Morph, 88:49-92(1951)
- 6) Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Ishikawa T, Noji S, Nohno T:Dev Growth Differ, 41:29-40(1999)
- 7) 山本康弘, 山本 康弘, 高田 温行, 森口 隆彦, 和田 直之, 本間 隆義, 濃野 勉:川崎医学会誌, 31:97-105(2005)
- 8) Narita T, Sasaoka S, Udagawa K, Ohyama T, Wada N, Nishimatsu S, Takada S,



- Nohno T:Dev Dyn, 233:282-287(2005)
- 9)Galli LM, Willert K, Nusse R, Yablonka-Reuveni Z, Nohno T, Denetclaw W, Burrus LW:Dev Biol, 269:489-504(2004)
- 10)Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S:Development, 126:1211-1223 (1999)
- 11)中村 勉,秋山 徹:生化学, 77:5-19(2005)
- 12)Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P:J Cell Sci, 115:4809-4818 (2002)
- 13)Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AM, Evans DJ, Francis-West P:Development, 130:3503-3514 (2003)
- 14)Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Izpisua-Belmonte J-C, Tabin CJ:Science, 280:1274-1277(1998)
- 15)Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Nohno T:Dev Growth Differ, 42:561-569 (2000)

## 欠損型マイオスタチン受容体による筋分化の促進効果

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\*

骨格筋形成の過程で一過性に発現するマイオスタチン (myostatin ; MSTN) は筋芽細胞の増殖と分化を負に調節し, その機能欠失変異によって過剰な筋肉が形成される。MSTNは成熟後, 膜受容体であるII型アクチビン受容体 (ActRII) に結合して細胞内へシグナルを伝え, 筋芽細胞の分化を調節している。2つあるActRIIのうちA型は皮筋筋や筋肉塊の周囲で発現し, MSTNの発現部位と時間的, 空間的に重なっているのに対し, B型は主に神経管で発現している。欠損型のII型受容体を過剰に発現すればMSTN作用の最初の段階でシグナルを遮断でき, 欠損型受容体は競合的に働く制御因子として作用する。この作用をマウス筋芽細胞C2C12およびニワトリ胚の間充細胞の初代培養系で検定した結果, 予想通りの効果が得られ, 特に速筋型の筋線維に対して有効であった。A, Bの2つあるActRIIのうち, 筋肉で特異的に発現しているA型の優性欠損型は筋肉特異的な遮断に有効であると考えられる。 (平成18年6月13日受理)

### Myogenic Activity of the Dominant-Negative Form of Type II Receptor for Myostatin during Skeletal Muscle Development

Haruyuki TAKATA, Kumiko TERADA\*, Yasuhiro YAMAMOTO,  
Shunsuke SASAOKA\*, Kiyoshi UDAGAWA\*, Naoyuki WADA\*,  
Takahiko MORIGUCHI, Tsutomu NOHNO\*

Myostatin (MSTN) is transiently expressed in developing skeletal muscle, and negatively regulates muscle growth, in that a loss of function mutation of the MSTN gene results in excess muscle formation. MSTN is known to act through initial binding of mature peptide to the type II receptor, activin receptor IIA and IIB (ActRIIA and ActRIIB), after proteolytic cleavage at the junction between N-terminal propeptide and C-terminal mature peptide. Whereas ActRIIB is expressed predominantly in the developing neural tube, ActRIIA is expressed in the myogenic precursor cells derived from the dermomyotome. Overexpression of the extracellular domain of ActRIIA and ActRIIB effectively blocks MSTN signaling through inhibition of the receptor binding of MSTN. The extracellular domain of ActRII produced in a conditioned medium of DF-1 cells caused an increase in myogenic differentiation of the C2C12 myoblast cell line and of a primary culture of chick embryo mesenchymal cells. Dominant-negative forms of ActRIIA and ActRIIB both effectively stimulate myogenic differentiation. (Accepted on June 13, 2006) *Kawasaki*

川崎医科大学 形成外科学  
〒701-0192 倉敷市松島577  
\* 同 分子生物学  
e-mail address : Haruyuki@med.kawasaki-m.ac.jp

Department of Plastic Surgery, \*Department of Molecular  
Biology, Kawasaki Medical School : 577 Matsushima,  
Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan

Medical Journal 32(4): 175-186, 2006

**Key Words** ① Myostatin ② Activin receptor IIA ③ Activin receptor IIB  
④ Myogenic differentiation ⑤ C2C12 myoblast

## はじめに

胚発生において骨格筋形成は皮筋節に由来する前駆細胞が遊走しながら増殖し、筋芽細胞の増殖と分化によって進行する。この過程には種々の増殖因子、分化因子が関与し、これらの相互作用であらかじめ決められた場所に筋肉塊が形成される<sup>1),2)</sup>。

骨格筋の形成に対する負の調節因子として知られる MSTN は間充織系列の幹細胞から筋前駆細胞の分化、筋芽細胞の増殖と分化などを調節する因子であり、筋肉形成に対して抑制的に作用する<sup>3)-6)</sup>。この作用は細胞膜の II 型受容体である 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<sup>7),8)</sup>。リガンドである MSTN の受容体への結合を競合的に遮断するために、その結合を阻害するタンパク質や中和抗体などが利用されている<sup>9),10)</sup>。この研究では、細胞外のリガンド結合ドメインのみからなる欠損型の II 型受容体の筋分化への影響を調べた。MSTN と ActRIIA の両者は骨格筋の形成過程で共に発現しているため、この時期に MSTN シグナルを受け取る過程を特異的に遮断することで MSTN の筋分化抑制作用を阻害できる。その結果として筋肉形成が促進されるので、優性欠損型受容体の活性を利用すれば特異性の高い萎縮性筋疾患の治療が可能になると考えられる。

## 材料と方法

### 1. cDNA クロンの構築と発現

ヒト線維芽細胞 cDNA から増幅した ActRIIA, ActRIIB の細胞外ドメインをコードする cDNA (それぞれ AR2A-DN, AR2B-DN) を V5 タグ付きの発現ベクター pcDNA3.2-DEST へ組み

込み、ニワトリ由来 DF-1 細胞にトランスフェクトして発現させた。タグ抗体でタンパク質の産生効率を確認し、培養上清中 (conditioned medium; CM) に分泌されたタンパク質を回収して使用した。同様に、MSTN のプロ領域 (MST-PRO) および成熟領域 (MST-MAT) を発現するプラスミドを作製した。PCR プライマーの設計でこれらの C 末端領域には HA タグを導入し、発現ベクターに組換えた。元の MSTN 由来のシグナル配列ではタンパク質の産生効率が低く、また成熟タンパク質へのプロセッシングも極めて悪いので、これらは ActRII (A 型または B 型) のシグナルペプチドにつき換えたクローンを構築した。

遺伝子発現系はニワトリの ASLV のサブグループ A に由来する RCAS ベクター、および動物の発現ベクター pCAGGS を一部改変して用いた。pCAGGS はクロニングサイトの下流に IRES-eGFP をつなぎ、pCAG-IEG を作製した。cDNA の入れ換えのためには Gateway System (Invitrogen) を使用した。すなわち、attR1 と attR2 を持つカセットを発現ベクターのクロニング部位へ導入し、それぞれ RCAS-DEST, pCAG-IEG-DEST を作製し、最終的な発現ベクターとして使用した。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 で増幅した DNA 断片同士の直接接続で行った。PCR による変異の可能性を下げるために KOD plus を使用し、最終的には塩基配列を確認した。

発現させるための cDNA クロンの構築と改変には attL1 と attL2 を持つ pENTR を使用し、上述の発現ベクターまたは pcDNA3.2/V5/DEST へ LR 反応で入れ換えて発現系を構築した。

ニワトリ線維芽細胞 CEF および DF-1 細胞への DNA の導入はそれぞれ Lipofectin および Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。DF-1 の培養上清 (CM) はトランスフェクション翌日に血清を含まない最少培地 (D-MEM または Opti-MEM) に培地交換し、さらに24時間培養して調製した。

## 2. 筋分化の検定

筋芽細胞の分化アッセイはニワトリ胚の肢芽間充織から調製した初代培養細胞 (CLM) を用いて行った。ニワトリ胚の発生ステージは Hamburger and Hamilton (1951) に従った<sup>11)</sup>。発生ステージ23-24のニワトリ胚肢芽から近位側半分を切り出し、さらに筋芽細胞の移動経路である背側および腹側組織を切り出した。この組織塊を0.5% trypsin 中で20分処理して、外胚葉をはがした。次いで筋芽細胞を含む間充織組織を  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  不含 Tyrode 液中に移し、37°C で40分処理した。Tyrode 液を培養液に置換したのち、ピペッティングにより組織塊を単細胞に解離した。培養液は Ham's F-12 と D-MEM を等量混合したものを基本培地とし、ウシ胎児血清とニワトリ胚抽出液をそれぞれ5% 添加して用いた。24-well plate に1穴あたり  $3.0 \times 10^5$  個の細胞を播種した。37°C、5%  $\text{CO}_2$  下で4時間培養して細胞を培養皿底面へ付着させ、目的とする細胞培養上清を添加して3~5日間培養を継続した。

筋芽細胞 C2C12 での検定は10%ウシ胎児血清を含む D-MEM で継代維持し、2%ウマ血清または2.5%ウシ胎児血清を含む培地で筋分化を誘導した。アッセイ用の小型4-well plate に  $2 \times 10^4$  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, または AR2A-DN, AR2B-DN を発現した DF-1 の CM (5~50  $\mu\text{l}$ ) 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)

ニワトリ胚は Ca, Mg 不含 phosphate-buffe-

red saline (PBS) 中で羊膜を取り除き、4% paraformaldehyde/PBS で一晩固定した。その後、PBS に置換し、10分間で2回振盪した。続いて25% ethanol/PBT (PBS + 0.1% Tween 20), 50% ethanol/PBT, 75% ethanol/PBT, 100% ethanol で順にそれぞれ5分間振盪し、最後に再度100% ethanol で10分間振盪した後、-20°C で保存した。

この試料を ethanol と xylene での行程を経てパラフィン包埋し、厚さ7  $\mu\text{m}$  の組織切片を作製した。切片を脱パラフィン処理後、10mM citrate buffered saline (pH 6) 中で3分間3回マイクロウエーブ処理し、PBS で10分間2回洗浄した。TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) に1%ヤギまたはウマ血清を加えたブロッキング液で処理し、TBS で希釈した下記の一次抗体と反応させた。TBS で洗浄後、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、PBS で洗浄し、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 (メーカーまたはディーラー) と希釈倍率は次の通り。抗 MyHC 速筋型 (Sigma) : 1/400, 抗 MyHC 遅筋型 (Sigma) : 1/1000, 抗 histone H3 (Ser28) -P : 1/1000, 抗 HA (Roche) : 1/500, 抗 V5 (Bethyl) : 1/200。

## 4. *In situ* hybridization (ISH) 法

Digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche) を用いて T7 または SP6 RNA ポリメラーゼで37°C、2時間反応して転写反応を行い、DIG-11-UTP 標識された antisense RNA プローブを合成した。DIG 標識 cRNA は必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

Whole-Mount の場合、100% ethanol 中に-20°C で保存してある試料を75% ethanol/PBT に置換し、5分間振盪し再水和を行った。その後、50% ethanol/PBT で5分間、25% ethanol/PBT