

200833068A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の
臨床応用基盤の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田 芳秀

平成21（2009）年3月

目次

I. 総括研究報告書	
筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立	
砂田芳秀	1
II. 分担研究報告書	
1. マイオスタチン阻害ペプチド及び低分子阻害剤による臨床応用	
砂田芳秀	8
2. マイオスタチン阻害療法による筋萎縮防止と細胞浸潤阻止効果の基盤的研究	
土田邦博	12
3. 臨床応用のためのマイオスタチン siRNA デリバリーシステムの開発	
野地澄晴	16
4. マイオスタチン作用の調節因子に関する研究	
濃野 勉	19
5. 筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析 —筋ジストロフィー犬に対する deflazacort の効果—	
武田伸一	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	28

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立

研究代表者 砂田 芳秀 川崎医科大学内科学（神経） 教授

研究要旨

マイオスタチンは骨格筋量を減少させる骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子で、本研究ではマイオスタチン活性阻害による筋ジストロフィー治療薬の臨床応用基盤の確立を目標としている。マイオスタチンプロドメインの活性阻害領域に相当する 29 個の合成アミノ酸を正常マウスに腹腔内投与し骨格筋量の 15% の増加を達成した。マイオスタチン受容体（TGF- β タイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体）に対する低分子阻害剤の経口投与による筋ジストロフィー治療効果を確立した。マイオスタチン阻害活性を持つ生体分子ホリスタチンの組換え蛋白分子 FS-N を新たに作製し、治療効果を検討した。新たな治療標的分子としてマイオスタチンの作用修飾分子である furin と Wnt4 に注目し、遺伝子改変マウスの作出を行っている。マイオスタチン siRNA 療法の臨床応用基盤として、アテロコラーゲンの siRNA 導入効率をマウス体毛の観察によりアッセイする系を開発した。マイオスタチン阻害マウスの研究を端緒として、筋ジストロフィー変化での線維化や脂肪変性を担う、間葉系前駆細胞が骨格筋組織内に存在することを明らかにした。来年度以降、筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性を検討する前段階試験として、prednisolone 誘導体である deflazacort の経口投与を行い、治験プロトコルを検討した。

研究分担者

砂田芳秀 川崎医科大学医学部・教授
土田邦博 藤田保健衛生大学医学部・教授
野地澄晴 徳島大学工学部・教授
濃野 勉 川崎医科大学医学部・教授
武田伸一 国立精神・神経センター神経研
所・部長

A. 研究目的

筋ジストロフィーは進行性の筋萎縮と筋力低下をきたす予後不良の遺伝性疾患である。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療や骨格筋幹細胞による再生治療などが試みられているが、いまだに有効な治療法は確立されていない。本研究は骨格筋量を負に制御するマイオスタチンを創薬標的分子ととらえ、マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療薬の開発と臨床応用に向けた基盤を確立することを目的とする。われわれは既にマイオ

スタチンプロドメインやホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害ペプチドあるいは組換え蛋白やマイオスタチン siRNA などの治療分子を開発し、培養細胞系への添加実験やマウスへの遺伝子導入で治療効果を確認している。そこで、本研究では筋ジストロフィーモデル動物（マウスあるいはイヌ）にこれらの治療分子を投与して、その治療効果と安全性を評価し、臨床応用の可能性を検討する。また、同時により安全で治療効果の高い新たなマイオスタチン阻害分子の開発に取り組む。その1つは細胞膜上のマイオスタチン受容体であるタイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体（ALK5）に対する低分子阻害剤（TPRI kinase 阻害剤）である。本来抗がん剤として開発され現在臨床試験が予定されているが、筋ジストロフィーへの治療応用の可能性を検討する。次いで、細胞間シグナル分子 Wnt4 がマイオスタチン作用に拮抗し、筋分化増殖活性を有することを見出したので、

新たな筋ジストロフィー治療標的分子をとらえて研究を進める。

一方、アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA の全身投与により、筋ジストロフィーモデルマウスでの治療効果が確認されたことから、アテロコラーゲンによる siRNA 導入メカニズムの解明と改良型生体内デリバリーシステムの開発にも取り組む。

B. 研究方法

1. マイオスタチン阻害ペプチド Rp29 の開発

N-末端に細胞膜透過配列を付加した 29 アミノ酸から構成されるプロドメイン由来阻害ペプチド (Rp-29) を合成して野生型マウスの腹腔内に投与した。安全性について評価するとともに、体重・筋力及び骨格筋の病理解析により治療効果の用量依存性についても検討した。

2. 低分子 T \cdot RI kinase 阻害剤の野生型マウスおよびカベオリン-3 欠損マウスへの投与と治療効果の解析

T β RI kinase 阻害剤を野生型マウスおよびカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウス 10 週間投与して、体重、握力を経時的に測定した。投与終了後、骨格筋を採取し、筋重量、筋線維断面積、筋骨格筋張力を測定した。また投与マウスの血中マイオスタチン活性を HEK293-(CAGA)12 マイオスタチン活性測定系で検討した。

3. 改良型ホリスタチン誘導分子 FS-N の開発

マイオスタチン阻害効果が強力なホリスタチン分子に着目し、マイオスタチン阻害効果を持つが、他の TGF- β 分子であるアクチビン阻害効果の少ないペプチドを開発している。従来のキメラ型ホリスタチン改変体ではなく、天然分子 FS-N を設計し、GFP やヒト免疫グロブリンと融合させた遺伝子を強力な CAG プロモーターの下流に連結させた遺伝子改変マウスを作製した。

4. FS-N-Fc 融合分子の精製とマウス投与実験

ヒト免疫グロブリンとの融合分子は、蛋白質の取得のため、CHO-K1 安定株を樹立し、エンドトキ

シン混入の少ない分子を取得した。前臨床試験の一環として、免疫不全マウスへ腹腔内投与し、筋量増加効果を検討した。

5. 多分化能を有する間葉系前駆細胞の同定

様々な表面抗原に対する抗体染色や FACS 解析、分化培養を行なうことで、マウスの心筋、骨格筋、脂肪組織中に存在する脂肪分化能や繊維芽細胞への分化能の高い間葉系前駆細胞の予知的な同定を行なった。

6. siRNA 導入効率アッセイ系の開発

メラノコルチン 1 受容体 (Mc1r) はメラノサイトの細胞膜上に存在する G タンパク質で、 α MSH の受容体として機能し、上皮においてメラニンの産生に関わっている。その機能欠損型マウスでは体毛が金色化する。Mc1r の siRNA を用いて、マウスの上皮にアテロコラーゲン-siRNA 法で導入しマウスの体毛色の変化により、導入効率が測定できる系を開発する。

7. バキュロウイルスベクターを用いた Wnt4 組換え蛋白の作製

組換えタンパク質を作成するために、C 末端側に V5 タグを挿入したヒト *Wnt4* cDNA をバキュロウイルスベクターに組み込んで組換えウイルスを作成した。これを培養昆虫細胞に感染させることで組換えタンパク質の調製を試みた。

8. Wnt4 過剰発現トランスジェニックマウスの作出

骨格筋特異的に Wnt4 を過剰発現するマウスを作出するために、MCK プロモーターの下流に *Wnt4* cDNA を挿入したコンストラクトを作成した。マウス受精卵前核に注入しキメラマウスを作出した。

9. Furin コンディショナルノックアウトマウスの作出

骨格筋特異的に *furin* 遺伝子を破壊するためにコンディショナル・ノックアウトマウスを作成した。翻訳開始コドンを含むエクソン 2 の両端に loxP 配列を挿入したコンストラクトを、ES 細胞株 (TT2) に形質導入し、相同組換えを行った。得られた ES 細胞をもとに、キメラマウスを作出し、続い

て兄妹交配を行って $fur^{flox/flox}$ ホモマウスを作成した。得られた $fur^{flox/flox}$ ホモマウスを筋衛星細胞で Cre 組換え酵素を発現するマウス (B6; 129S4-Myf5^{tm3} (cre) Sor/J) と交配し、 $fur^{Dlox/+}$; Cre ヘテロマウスを作出した。最終的に $fur^{Dlox/+}$; Cre マウスを $fur^{flox/flox}$ ホモマウスに戻し交配し、骨格筋特異的に *furin* 遺伝子を破壊した $fur^{Dlox/Dlox}$ マウスを得た。

10. 筋ジストロフィー犬に対する deflazacort の投与と治療効果・安全性評価

正常犬 4 頭、筋ジストロフィー犬 1 頭に deflazacort 0.9 mg/kg/day の経口投与を行った。筋ジストロフィー犬での臨床症状発現前の 1 ヶ月齢から開始、理学所見、血液検査、臀部・大腿の MRI を撮像した。投与 3 ヶ月後に安楽殺の後剖検し、全身臓器および骨格筋の病理学的検討を行った。

C. 研究結果・考察

1. マイオスタチン阻害ペプチド Rp29 の安全性と有効性

Rp29 腹腔内投与で明らかな副作用は認められなかった。マウスでは一回投与量 500 μ g までは安全と考えられた。Rp-29 一回投与量 100 μ g より 150 μ g の方が体重および筋力増加が良好で、コントロールと比較して 15%増加した。しかし 200 μ g 投与群と 150 μ g 投与群とに有意差は認められなかった。

2. 低分子 T・RI kinase 阻害剤の治療効果

野生型およびカベオリン-3 欠損マウスとも TBRI kinase 阻害剤の経口投与により、体重、最大握力、筋重量、筋線維径、筋張力の増加を認めた。マウス血清による HEK293-(CAGA)12 マイオスタチン *ex vivo* 活性測定では投与群はほぼ 80%のマイオスタチン活性抑制が認められた。また骨格筋におけるマイオスタチンの標的遺伝子のひとつである p21 の遺伝子発現は投与群では減少し、この低分子阻害剤投与によって血液及び骨格筋のマイオスタチン活性が抑制され、筋量が増加、筋力が増強することが明らかとなった。

3. ホリスタチン誘導分子 FS-N の精製と治療効果
ホリスタチン誘導体(FS-N)をヒト免疫グロブリン分子との融合分子として精製する方法を開発し、エンドトキシンの混入の少ない標品を得ることが可能となった。精製標品を免疫不全マウスへ腹腔内投与し、3週間後に、筋量を測定したところ、前頸骨筋、腓腹筋で有為に重量の増加が予備的に確認された。

4. 骨格筋内の間葉系前駆細胞の同定

骨格筋内に存在する細胞の分化能を網羅的に解析した。筋内血管の近傍の間質に存在する細胞が、高い脂肪分化能を持つ事がわかった。同定細胞は周皮細胞とは異なる細胞で、TIE2, PDGFR α , CD29, CD44 陽性で間葉系前駆細胞と考えられる。同定した間葉系前駆細胞は、正常ヒト骨格筋組織にも存在し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の脂肪変性骨格筋において増加する所見を得た。

5. siRNA 導入効率アッセイ系の開発

Mc1r の siRNA を導入した結果、体毛色の変化ではなく体毛が薄くなる変化がみられた。この変化はその発現率の高さや、ネガティブコントロールには現れない腹部の変化といった特異性から、アテロコラーゲンによる *Mc1r* に対する siRNA の導入による表現型であると考えられる。しかし、なぜノックアウトの表現型と異なるかについては、現在のところ理由は不明である。

6. Wnt4 組換えタンパク質の作製

Wnt4 組換えタンパク質は、昆虫細胞系を利用したが、組換えタンパク質の分泌が極めて悪く、十分な量のタンパク質を得ることができなかった。シグナル配列を Wnt3a のものに交換した Wnt4/Wnt3a キメラタンパク質を作るなど改善を試みる必要がある。

7. Wnt4 過剰発現トランスジェニックマウスの作出

MCK プロモーターの下流に Wnt4 cDNA を連結したコンストラクトをマウス受精卵前核に顕微注入した。292 個の移植胚を作成し、45 匹の産仔を得ることができた。このうちの 1 匹で *Wnt4* 遺伝子が挿入されていることが確認できたが、成育不良により生後 2 ヶ月で死

亡した。顕微注入を2回やり直し、合計 479 個の移植胚を作成した。現在までに 32 匹の産仔が得られ遺伝子型の解析を行っている。

8. Furin コンディショナルノックアウトマウスの作出

furin 遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソン2の両端に loxP 配列を挿入したコンストラクトをもちいて ES 細胞で相同組換えを行った。得られた 3 系統(#5, #10, #34)の ES 細胞を使ってキメラマウスを作成し、fur^{lox/flox}ホモマウスを得た。筋衛星細胞で Cre 組換え酵素を発現するマウスと交配したところ、順調に産仔を得ることができた。

9. 筋ジストロフィー犬に対する deflazacort の投与と治療効果・安全性評価

正常犬では、投与 4 週後に全身の筋萎縮と成長遅延が認め、3 頭で内臓ヘルニアを生じた。MRI で筋内への脂肪浸潤と筋萎縮を認め、剖検では脂肪沈着、脂肪肝、全身の骨格筋が萎縮していた。筋ジス犬では、成長遅延は見られたが、同齢の筋ジス犬に比べ運動機能は保たれ、血清 CK 値も著減したが、deflazacort による成長抑制が関連していた可能性がある。

D. 結論

- (1) マイオスタチン阻害ペプチド Rp29 を開発し、野生型マウスへ試験投与して投与量・投与期間について条件設定を行った。
- (2) TGF- β タイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体に対する低分子阻害剤の経口投与により筋ジストロフィーモデルマウスだけでなく野生型マウスでも著明な筋肥大筋力増強が示された。
- (3) マイオスタチン阻害分子としてホリスタチン誘導体 FS-N を開発し、遺伝子導入マウスの作製、融合蛋白の精製と免疫不全マウスへの投与を行ない、筋量増加効果を得た。
- (4) siRNA 導入効率のアッセイ系としてマウス上皮へのアテロコラーゲンによる *Me1r* の siRNA 導入の有効性が示された。

- (5) マイオスタチン活性に影響を及ぼす Wnt4 と furin に注目し、これらの分子の筋衛星細胞(幹細胞)における作用を検証するため遺伝子改変マウスの作成をおこなっている。
- (6) Deflazacort は、筋ジス犬の筋機能の維持に有効である可能性があるが、成長障害、全身の骨格筋萎縮、内臓ヘルニアなど副作用も起こる可能性がある。

E. 健康危険情報 該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. *Acta Myol.* 27:19-24, 2008
- 2) 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.* 15(15):1126-30, 2008.
- 3) Tsuchida K. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11(4): 487-494, 2008
- 4) Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M, Inokuchi K. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS ONE* e1869, 2008
- 5) Murakami T, Sawada H, Tamura G, Yudasaka M, Iijima S, Tsuchida K. Water-dispersed single-wall carbon nanohorns as drug carriers for local cancer chemotherapy. *Nanomedicine* 3(4): 453-463, 2008
- 6) Zhang M, Murakami T, Ajima K, Tsuchida K, Sandanayaka ASD, Ito O, Iijima S, Yudasaka M. Fabrication of ZnPc/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy.

- 7)Tsuchida K. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myologica* 27(1), 14-18, 2008
- 8)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*. 2008-09 (in press)
- 9)Tsuchida K. Drug delivery systems for cancer treatment. *Encyclopedia of Cancer*, 2nd ed (Manfred Schweb Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York pp909-911, 2008
- 10) 村上達也、土田邦博 機能性リボタンパク質「機能性 DDS キャリアの製剤設計 (岡田弘晃監修)」 pp150-157 (2008)
- 11)Yokota T, Lu QL, Partridge TA, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman EP. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*. 2009 (in press)
- 12)Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J*. 2009
- 13)Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, Takeda S, Ikeda S. Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45-55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet*. 54(2):127-30, 2009
- 14)Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanasaki H, Kudo A, Manya H, Endo T, Takeda S. Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts invitro. *Mech Dev*. 126: 107-116, 2009
- 15)Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet*. 18: 621-31, 2009
- 16)Sekiguchi M, Zushida K, Yoshida M, Maekawa M, Kamichi S, Yoshida M, Sahara Y, Yuasa S, Takeda S, Wada K. A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain*. 132(Pt 1):124-35, 2009
- 17)Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neurol*. 66(1): 32-8, 2009
- 18)Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S. Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther*. 17(1): 73-80, 2009
- 19)Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res*. 314(17): 3232-44, 2008
- 20)Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct*. 33(2): 163-9, 2008
- 21)Katsumata O, Honma T, Sanda M, Kamata A, Takeda S, Kondo H, Sakagami H. Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res*. 1234:44-9, 2008
- 22)Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol*. 173(3):781-91, 2008
- 23)Sato K, Yokota T, Ichioka S, Shibata M, Takeda S. Vasodilation of intramuscular

- arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol.* 27:30-6, 2008
- 24)Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther.* 19(7):719-30, 2008
- 25)Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, Ueda H, Urasawa N, Koyama J, Yazaki Y, Yazaki M, Sakai T, Haruta S, Takeda S, Ikeda S. Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Clin Neurosci.* 15(7): 757-63, 2008
- 26)Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H. Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through b-synemin, a-dystrobrevin and actin. *J Cell Sci.* 121(Pt 12): 2062-74, 2008
- 27)Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishibori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 582(15): 2212-8, 2008
- 28)Urasawa N, Wada MR, Machida N, Yuasa K, Shimatsu Y, Wakao Y, Yuasa S, Sano T, Nonaka I, Nakamura A, Takeda S. Selective vacuolar degeneration in dystrophin deficient canine Purkinje fibers despite preservation of dystrophin-associated proteins with overexpression of Dp71. *Circulation.* 117(19): 2437-48, 2008
- 29)Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med.* 10(6): 702-713, 2008
- 30)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): 477-87, 2008
- 31)Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskelet Disord.* 9(1):1, 2008
- 32)Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin alpha2 upon transplantation to dy(3k)/dy(3k) mice. *Exp Cell Res.* 314(1):193-203, 2008
2. 学会発表
- 1)Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Sunada Y. A small-molecule inhibitor targeting transforming growth factor- β type receptor kinase ameliorate muscular atrophy in a mouse model of caveolin-3-deficient muscular dystrophy. 13th International Congress of World Muscle Society, Newcastle, UK, September 29-October 2(2008)
- 2)久我敦、大澤裕、林紗織、村上龍文、砂田芳秀. cardiotoxin 筋再生モデルにおける caveolin-3 と dysferlin の動態. 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日
- 3)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 欠損筋の dysferlin/myoferlin 細胞内局在異常. 第 49 回日本神経学会総会、2008 年 5 月 15 日
- 4)Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T. Transgenic expression of myostatin inhibitor derived from follistatin ameliorates muscular dystrophy model mice. 7th International Conference on BMPs. 7th International Conference on BMPs. California, U.S.A. July 9-13 (2008)
- 5)土田邦博 マイオスタチンが仲介する骨格筋と脂肪組織の相互作用 第 13 回アディポサイエンス研究会 大阪、8 月 22 日 (2008)
- 6)Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Identification of mesenchymal progenitor cells responsible for fatty degeneration of skeletal muscle. EMBO Myogenesis Conference,

Barcelona, Spain. September 24-29 (2008)

7) Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A. Myostatin inhibiting peptide works as a magic bullet to increase skeletal muscle mass and to ameliorate muscle pathology in muscular diseases by transgenic expression. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II) Nuremberg, Germany. October 3-5 (2008)

8) 上住聡芳, 深田宗一郎, 土田邦博 Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. 内藤カンファレンス 幹細胞の維持と分化の分子基盤 [III] 湘南、11月11-14日(2008)

9) 土田邦博、中谷直史、常陸圭介、上住聡芳、山本直樹、山田治基、武田伸一、野地澄晴、砂田芳秀 マイオスタチン阻害による骨格筋肥大と脂肪量減少の分子機構 厚労省精神・神経疾患班会議 東京、12月14日(2008)

10) 上住聡芳、土田邦博 様々な組織における間葉系前駆細胞の予知的同定と分離 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会 神戸、12月9-12日(2008)

11) 中谷直史、小久保正博、土田邦博 マイオスタチン阻害による脂肪組織の減少 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会 神戸、12月9-12日(2008)

12) Takata H, Moriguchi T, Yamamura M, Nohno T: Interaction of Wnt4 with myostatin signaling during myogenic differentiation of skeletal muscle., Keystone Symposia: Signaling Pathways in Cancer and Development, Colorado, 3月(2008)

13) 田中伸吾, 高田温行, 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3報-, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸、12月(2008)

14) 武田伸一: nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである、シンポジウム、メカニカルストレスに対する筋・骨格系の応答の分子機構, 第31回日本分子生物学会年会, 神戸、12月12日(2008)

15) Takeda S: Muscle progenitor cells in skeletal muscle: their functions and potencies in therapy. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle

development and regeneration, First EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 9.24-29 (2008)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

コラーゲンをを用いた siRNA の導入法 (予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

マイオスタチン阻害ペプチド及び低分子阻害剤による臨床応用基盤の確立

研究分担者 砂田 芳秀 川崎医科大学内科学（神経） 教授

研究要旨

骨格筋萎縮作用のあるマイオスタチンの阻害によって骨格筋肥大が起こることから、我々は独自に開発したカベオリン-3 欠損肢帯筋ジストロフィーモデルマウスを用いてマイオスタチン阻害療法の開発を行ってきた。その結果、①マイオスタチンに対する特異的な阻害療法として、マイオスタチンプロドメインの活性阻害領域に相当する 29 個のアミノ酸を合成し、野生型コントロールマウスに腹腔内投与して投与量・投与期間について条件設定を行った。隔日 10 回の投与によって骨格筋量の 15% の増加を達成した。このペプチド治療法の臨床応用の基盤を確立するためにカベオリン-3 欠損マウスに対する投与を開始した。②マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害療法として TGF- β タイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体に対する低分子阻害剤を経口投与することによってカベオリン-3 欠損モデルマウスのみでなく野生型マウスの筋重量、筋粗大、及び筋張力が増加することを示した。更に臨床応用にむけて長期投与による安全性を確認していく。

A. 研究目的

骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンはノックアウトマウスが著明な骨格筋肥大を来すことから強力な骨格筋萎縮作用があると考えられている。我々が独自に開発したカベオリン-3 欠損肢帯筋ジストロフィー1Cモデルマウスは著明な筋萎縮を呈する。その病態解析をする過程で、骨格筋マイオスタチンシグナルの活性化が認められること、マイオスタチン阻害によって筋萎縮が劇的に改善することを証明し、筋細胞におけるカベオリン-3 によるマイオスタチンシグナル抑制の分子機構について提唱した (Ohsawa Y., et al. J Clin Invest 116:2924-2934, 2006)。このことからこのマウスをモデルとした筋ジストロフィーに対するマイオスタチン阻害療法を開発し、その臨床応用を確立するための基盤研究を進めてきた。

我々がマイオスタチン阻害療法のツールとしてまず注目したマイオスタチンプロドメインは、マイオスタチン分子の N-末端約 250 アミノ酸から構成され、C-末端のマイオスタチン活性

中心と非共有結合することによって生理的かつ特異的にマイオスタチン活性を阻害すると考えられている。このプロドメインによるマイオスタチン活性阻害についてこれまでに BMP-1/Tolloid 様蛋白分解酵素によるプロセッシングが起こると阻害されなくなることが報告されているが、その他の詳細な阻害機構については全く不明であった。我々はこれまで *in vitro* でのマイオスタチン活性測定系として、マイオスタチン刺激による HEK293 ヒト胎児腎細胞-pGL3-(CAGA)12 レポーター遺伝子転写活性測定系を開発した。この系にプロセッシング部位を含めたマイオスタチンプロドメインの 26 個のペプチド断片に相当する cDNA を共発現してマイオスタチン活性を測定した結果、阻害活性の最も強い 29 アミノ酸からなる領域を決定できた。更にこの 29 アミノ酸を含む領域について、N-末端に細胞膜透過型配列を付加してペプチドを合成した。この細胞膜透過型合成ペプチド (Rp-29) についても用量依存性にマイオスタチン活性を抑制することが示され、この領域が阻害活性中

心であると考えられた。そこで本研究はこの阻害ペプチド Rp-29 投与による *in vivo* マイオスタチン活性阻害機構を応用した筋ジストロフィー治療法を開発することを主目標とする。本年度はまず Rp-29 を野生型マウスへ試験投与を行うことによって投与量・投与期間・安全性について検討を行った。

一方、TGF- β 1の細胞膜上の受容体である タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体 (ALK5) に対する低分子阻害剤 (T β RI kinase 阻害剤)は、本来抗がん剤として開発され現在臨床治験が予定されている。我々は ALK5 が TGF- β 1のみでなくマイオスタチンの受容体としても働くことから、この阻害剤には特異的ではないもののマイオスタチン阻害作用もあるのではないかと考えた。そこで本研究ではこの低分子阻害剤を野生型及びカベオリン-3 欠損マウスに経口投与し骨格筋及びマイオスタチンシグナルの解析を行った。

B. 研究方法

Rp-29 の野生型マウスへの投与と解析

N-末端に細胞膜透過配列を付加した 29 アミノ酸から構成されるプロドメイン由来阻害ペプチド (Rp-29) を生合成して野生型マウス腹腔内に投与を行った。細胞膜透過型合成ペプチドの腹腔内投与方法については岡山大学生理学の松井らの方法(Noguchi H, et al., Nat Med 305-309, 2004)を参考に実験を進めた。まず実験 1 では 10 週齢 C57B/L6 マウスについて Rp-29 を一回 100、200、300、400、及び 500 μ g を隔日で合計 3 回投与し安全性について評価した。実験 2 では 29 アミノ酸の配列を逆向きに並べた Rev-Rp-29 をコントロールとして Rp-29 を隔日で合計 10 回投与し、体重・筋力及び骨格筋の病理解析により用量依存性についての検討をおこなった。

低分子 T β RI kinase 阻害剤の野生型マウス及びカベオリン-3 欠損マウスへの投与と解析

T β RI kinase 阻害剤を 0.08%粉餌に混入し、野生型マウス及びカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウスの 6 週齢から 10 週間、最終的には 16 週齢まで投与をおこなった。生理学的解析として、まず毎週体重、握力を経時的に測定した。更に 16 週齢では、前脛骨筋及び横隔膜の筋骨格筋張力について測定した。また投与マウスのマイオスタチン活性のモニタリングとして、マウス血清を採取してこれを HEK293-(CAGA)12 マイオスタチン活性測定系に添加する *ex vivo* の検討を行った。更に 16 週齢で骨格筋を採取し、筋重量、筋線維断面積について、投与群及び非投与群について比較解析をおこなった。また投与群及び非投与群骨格筋のマイオスタチン活性について、マイオスタチンエフェクターである Smad2 リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット解析、マイオスタチン下流の転写因子である p21, p27 プロンプを用いたノザンブロット解析によって検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、川崎医科大学の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、遺伝子組み換え実験については、川崎医科大学の規定に従い、許可を得て行った。

C. 研究結果

Rp-29 のマウス投与条件の検討

実験 1 では、松井らの方法に従い、まず一回投与量を振って、安全性について検討を行った。それぞれの投与量について明らかな副作用は認められず、マウスは元気であった。この結果からマウスは一回投与量 500 μ g までは安全と考えられた。次いで実験 2 では、Rp-29 一回投与量を 100、150、200 μ g、コントロールの Rev-Rp-29 一回投与量 200 μ g として、隔日 10 回投与した。投与前後でマウスの体重、筋力及び骨格筋量について比較した。Rp-29 一回投与量 100 μ g より 150 μ g の方がより体重および筋力が増加し、コントロールと比較して 15%していた。しかし

200 µg 投与群と 150 µg 投与群とに有意差は認められなかった。以上の条件設定実験をもとに今後は、Rp-29 一回投与量 150 µg をカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウスに投与しその治療効果を解析していく。

低分子 TβRI kinase 阻害剤投与による野生型及びカベオリン-3 欠損マウス骨格筋量の増加

TβRI kinase 阻害剤の経口投与による野生型マウス及びカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウスを解析した。野生型及びカベオリン-3 欠損マウスとも投与 2 週目の 12 週齢から体重及び筋力は投与群では非投与群と比較して有意に増加した。最大握力測定による筋力についても投与 4 週目の 14 週齢から野生型及びカベオリン-3 欠損マウスとも投与群では有意に非投与群より増加していた。16 週齢の筋重量（上腕二頭筋、大腿四頭筋、前脛骨筋、ヒラメ筋）についても非投与群では投与群と比較して増加していた。16 週齢の前脛骨筋及び横隔膜の筋張力解析では投与群は非投与群と比較して有意に張力の増加を認めた。骨格筋解析では、カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウスで認められた筋線維萎縮は、投与群では改善し、野生型マウスの筋線維径も有意に増大していた。マウス血清による HEK293-(CAGA)12 マイオスタチン *ex vivo* 活性測定では投与群はほぼ 80% のマイオスタチン活性抑制が認められた。また骨格筋におけるマイオスタチンの標的遺伝子のひとつである p21 の遺伝子発現は投与群では減少し、この低分子阻害剤投与によって血液及び骨格筋のマイオスタチン活性が抑制され、筋量が増加、筋力が増強することが明らかとなった。

D. 考察

マイオスタチンに対する特異的阻害療法として、生理的阻害分子であるプロドメインの阻害活性中心に相当する 29 アミノ酸を合成して野生型マウスに投与を行い条件の設定をした。これ

までの検討では一回投与量 150 µg を隔日 10 回投与することによって約 15% 体重が増加することが明らかとなった。この条件に基づき、今後はカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーマウスに対して解析数を増やしてこの投与量で特異的阻害ペプチドを投与し定量的解析を進めていく。

またマイオスタチン及び関連 TGF-βファミリー分子に対する広範な阻害療法として TGF-βタイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体に対する低分子阻害剤の経口投与を開始した。この阻害剤は現在、進行性がん患者で臨床治験が予定されている。癌細胞の浸潤や転移抑制の観点からの検討は行われているが、骨格筋量やがんによる悪疫質についての検討は全く行われていない。我々の野生型マウス及び筋ジストロフィーモデルマウスの検討からはこの阻害剤は *in vivo* でもマイオスタチンとその関連 TGF-βファミリー分子阻害すると考えられる。従ってこの阻害剤は、筋ジストロフィーのみでなく癌悪疫質などの筋消耗性疾患、正常人の筋増強にも適応がある可能性があり今後は長期投与の安全性をも考慮した前臨床研究が必要となってくる。

E. 結論

独自に開発したプロドメイン阻害ペプチドによる筋ジストロフィーモデルマウスに対するマイオスタチン特異的阻害療法の前段階として、ペプチドを野生型マウスへ試験投与して投与量・投与期間について条件設定を行った。また、マイオスタチン及び関連 TGF-βファミリー分子に対する阻害療法として TGF-βタイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体に対する低分子阻害剤の経口投与を行った。これにより筋ジストロフィーモデルマウスだけでなく野生型マウスでも著明な筋肥大筋力増強が示された。従ってこのタイプの阻害剤による筋ジストロフィーを含めた広範な筋消耗性疾患での筋肥大、筋力増強治療法が可能かもしれない。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

1)Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. Acta Myol. 2008 Jul;27:19-24.

2)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 Aug;15(15):1126-30.

2. 学会発表

1)Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Sunada Y. A small-molecule inhibitor targeting transforming growth factor- β type receptor kinase ameliorate muscular atrophy in a mouse model of caveolin-3-deficient muscular dystrophy. 13th International Congress of World Muscle Society, Newcastle, UK, September 29-October 2(2008)

2)久我敦、大澤裕、林紗織、村上龍文、砂田芳秀. cardiotoxin 筋再生モデルにおける caveolin-3 と dysferlin の動態. 第49回日本神経学会総会、横浜、2008年5月15日

3)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欠損筋の dysferlin/myoferlin 細胞内局在異常. 第49回日本神経学会総会、2008年5月15日

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

マイオスタチン阻害療法による筋萎縮防止と細胞浸潤阻止効果の基盤的研究

研究分担者 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、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。筋萎縮防止と筋再生促進、そして細胞浸潤の抑制のためにマイオスタチン阻害療法は有望な治療法の一つである。他の機序の治療法との併用すればさらに応用が広いと考えられている。一方、筋疾患の骨格筋や心筋で見られる繊維化や脂肪化の病態を把握し阻止する治療法を開発することは、罹患者の Quality of life 改善のため極めて重要である。本研究では、生体ホルモンを利用して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マウスへの遺伝子導入と薬物導入による効果を検討した。また、骨格筋や心筋で繊維化に寄与する間葉系前駆細胞の解明に取り組んだ。これまで知られていなかった多分化能を持つ間葉系前駆細胞が存在することを明らかとした。筋疾患で繊維化や脂肪変性を担う細胞である可能性が示唆され、新しい治療標的細胞となる可能性が高い。

A.研究目的

本研究では、筋ジストロフィーの治療法開発に向けて、マイオスタチン阻害分子を開発すること、筋ジストロフィーモデル動物を用いた前臨床治療研究を推進させること、適応となる筋疾患を把握する事を目的としている。さらに、筋ジストロフィーを中心とした筋疾患で見られる骨格筋、心筋への細胞浸潤、脂肪化、繊維化の由来となる細胞やその分子機構を明らかにし、新たな細胞標的や分子標的を見出し、治療基盤を構築することを目指している。

B.研究方法

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の細胞外ドメイン、マイオスタチン受容体の阻害剤、siRNA などがある。我々は、マイオスタチン阻害効果が強力なホリスタチン分子に着目し、マイオスタチン阻害効果を持つが、他の TGF- β 分子であるアクチビン阻害効果の少ないペプチドを複数設計し、解析を推進させている。本年度は、候補となるホリスタチン改変体

の中で、キメラ型ではなく、天然分子に分子 FS-N 分子について、GFP やヒト免疫グロブリンと融合させた遺伝子を強力な CAG プロモーターの下流連結させた遺伝子改変マウスを作製した FS-N-GFP の系統維持に成功した。このマウスは以前作製したミオシン軽鎖プロモーターの下流にキメラ型のホリスタチン変異体を導入したマウスよりも筋肥大が顕著であった。また、治療薬候補 (FS-N-Fc) と同じ構造を持つヒト免疫グロブリン分子との融合分子のトランスジェニックマウスについては、2系統遺伝子導入が確認された段階である。ヒト免疫グロブリンとの融合分子は、蛋白質の取得のため、CHO-K1 安定株を樹立し、エンドトキシン混入の少ない分子を取得した。前臨床試験の一環として、免疫不全マウスへ腹腔内投与し、筋量増加効果を検討した。

近年、国際的に骨格筋と脂肪細胞の起源に関する研究に大きな進歩が見られている。Myf5 陽性の前駆細胞から筋芽細胞のみならず、褐色脂肪細胞が産生される事や PRDM16 と呼ばれる転写因子がその分岐を調節する事等が明らかになっている。

る。我々は、様々な表面抗原に対する抗体染色やFACS解析、分化培養を行なうことで、マウスの心筋、骨格筋、脂肪組織中に存在する脂肪分化能や繊維芽細胞への分化能の高い間葉系前駆細胞の予知的な同定を行なった。心筋、骨格筋での局在を免疫染色法により精査した。

(倫理面への配慮)

実験動物実験は学内の審査と許可を経て、動物愛護上の配慮は十分行なっている。ヒト試料を用いた研究に関しては、学内倫理委員会の承認を得た後、人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解を求めて行なっており、問題ない。

C. 研究結果

マイオスタチン阻害ペプチドの一つ (FS-N) をヒト免疫グロブリン分子との融合分子として精製する方法を検討した。カラムの検討により、エンドトキシンの混入の少ない標品を得ることが可能となった。精製標品は、K562細胞を用いた赤芽球分化系およびA204横紋筋肉腫細胞株を用いた転写アッセイ系で活性を評価し、マイオスタチン阻害活性を保持し、アクチビン阻害活性は弱い分子である事を確認した。免疫不全マウスへ腹腔内投与し、3週間後に、筋量を測定したところ、前頸骨筋、腓腹筋で有為に重量の増加が予備的に確認された。興味深い事に、褐色脂肪の重量にも増加が見られた。

マイオスタチン/TGF- β シグナルの活性化で繊維化が生じることが知られている。そこで、骨格筋内に存在する細胞を網羅的に解析し、繊維芽細胞分化、脂肪分化、筋分化を評価する研究を行なった。筋衛星細胞は高い筋分化能を示すが脂肪分化能は低かった。一方、血管の近傍の間質に存在する細胞が、高い脂肪分化能を持つ事がわかった。また、TGF- β 刺激で繊維芽細胞に効率よく分化した。同定細胞は周皮細胞とは異なる細胞で、TIE2, PDGFR α , CD29, CD44 陽性で間葉系前駆細胞と

考えられる。同定した間葉系前駆細胞は、正常ヒト骨格筋組織にも存在し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の脂肪変性骨格筋において増加する所見を得た。また、骨格筋以外に、心筋、脂肪組織、肝臓にも類似の細胞が存在し、程度の差はあるが、すべての組織から試験管内で多分化能を示すことが分かった。

D. 考察

マイオスタチン阻害分子を取得し、マウスへの投与実験を行ない、筋量増加効果を持つ事が示された。成人マウスへの介入で、筋量増加作用がある分子を評価していることは大きな進展と言えよう。また、褐色脂肪の量が増加していたことは興味深い知見である。

筋内に存在する繊維芽細胞分化能や脂肪分化能の高い間葉系前駆細胞を見出した。TGF- β 刺激で繊維芽細胞への分化を示し、BMP 刺激では骨芽細胞に分化するなど多分化能を保持している。試験管内脂肪分化系では、白色脂肪マーカーであるレプチン、褐色脂肪マーカーであるUCP-1の両者を発現している。なお、筋衛星細胞とは異なり、筋分化能は持たないが筋疾患の病態進行時に増殖が活発になり、繊維化や脂肪変性に寄与する事が推定される。

E. 結論

マイオスタチン阻害分子の治療薬候補の遺伝子導入マウスの作製、精製と免疫不全マウスへの投与を行ない、筋量増加効果を得た。作成マウスは、生体内でのマイオスタチン阻害分子の会合分子を明らかにしたり、PK/PD (ファーマコキネティクス/ファーマコダイナミクス) 解析のために有用と考えられる。モデルマウスへの薬効効果の検討が今後必要になる。

さらに、骨格筋内に存在する細胞を網羅的に解析し、繊維芽細胞分化能、脂肪分化能、筋分化能を評価した。筋衛星細胞は筋基底膜直下に存在し、高い筋分化能を示すが脂肪分化能は低かった。

一方、血管近傍の間質に繊維芽細胞に分化能を持つ間葉系前駆細胞が存在する事を明らかにした。周皮細胞とは異なるこれまで知られていない細胞集団である。筋疾患の骨格筋内脂肪変性や心筋繊維化に関与する可能性があり、今後、新たな治療標的分子を探索する予定である。

F.健康危険情報
該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) K. Tsuchida. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11(4), 487-494 (2008)
- 2) H. Ageta, A. Murayama, R. Migishima, S. Kida, K. Tsuchida, M. Yokoyama, K. Inokuchi. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS ONE* e1869 (2008)
- 3) T. Murakami, H. Sawada, G. Tamura, M. Yudasaka, S. Iijima, K. Tsuchida. Water-dispersed single-wall carbon nanohorns as drug carriers for local cancer chemotherapy. *Nanomedicine* 3(4), 453-463 (2008)
- 4) M. Zhang, T. Murakami, K. Ajima, K. Tsuchida, A.S.D. Sandanayaka, O. Ito, S. Iijima, M. Yudasaka. Fabrication of ZnPc/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105(39), 14773-14778 (2008)
- 5) K. Tsuchida. Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myologica* 27(1), 14-18 (2008)
- 6) Y. Ohsawa, T. Okada, A. Kuga, S. Hayashi, T. Murakami, K. Tsuchida, S. Noji, Y. Sunada. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. *Acta Myologica* 27(1), 19-24 (2008)
- 7) K. Tsuchida, M. Nakatani, T. Murakami, A. Uezumi. Action of myostatin and its regulators in skeletal myogenesis. In Recent advances of skeletal muscle differentiation. *Research Signpost.* (2008-09) (in press)
- 8) K. Tsuchida. Drug delivery systems for cancer treatment. *Encyclopedia of Cancer*, 2nd ed (Manfred Schweb Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York pp909-911 (2008)
- 9) 村上達也、土田邦博 機能性リポタンパク質「機能性 DDS キャリア」の製剤設計 (岡田弘晃監修) pp150-157 (2008)

2. 学会発表

- 1) K. Tsuchida, M. Nakatani, A. Uezumi, T. Murakami. Transgenic expression of myostatin inhibitor derived from follistatin ameliorates muscular dystrophy model mice. 7th International Conference on BMPs. 7th International Conference on BMPs. California, U.S.A. July 9-13 (2008)
- 2) 土田邦博 マイオスタチンが仲介する骨格筋と脂肪組織の相互作用 第13回アデイポサイエンス研究会 大阪、8月22日(2008)
- 3) A. Uezumi, S. Fukada, K. Tsuchida. Identification of mesenchymal progenitor cells responsible for fatty degeneration of skeletal muscle. EMBO Myogenesis Conference, Barcelona, Spain. September 24-29 (2008)
- 4) K. Tsuchida, M. Nakatani, A. Uezumi. Myostatin inhibiting peptide works as a magic bullet to increase skeletal muscle mass and to ameliorate muscle pathology in muscular diseases by transgenic expression. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II) Nuremberg, Germany. October 3-5 (2008)
- 5) 上住聡芳, 深田宗一朗, 土田邦博 Mesenchymal

progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. 内藤カンファレンス 幹細胞の維持と分化の分子基盤 [III] 湘南、11月11-14日(2008)

6) 土田邦博、中谷直史、常陸圭介、上住聡芳、山本直樹、山田治基、武田伸一、野地澄晴、砂田芳秀 マイオスタチン阻害による骨格筋肥大と脂肪量減少の分子機構 厚労省精神・神経疾患班会議 東京、12月14日(2008)

7) 上住聡芳、土田邦博 様々な組織における間葉系前駆細胞の予知的同定と分離 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会 神戸、12月9-12日(2008)

8) 中谷直史、小久保正博、土田邦博 マイオスタチン阻害による脂肪組織の減少 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会 神戸、12月9-12日(2008)

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

臨床応用のためのマイオスタチン siRNA デリバリーシステムの開発

研究分担者 野地 澄晴 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 教授

研究要旨

筋肉形成抑制作用のあるマイオスタチンの発現を抑制することにより、筋肉形成が誘導されることから、マイオスタチンに対する RNA 干渉法を用いた治療について検討を行ってきた。その結果、アテロコラーゲンを導入担体とした siRNA 導入に成功し、筋肉の機能が回復することを示した。この方法の臨床応用の基盤を確立するためには、アテロコラーゲンによる siRNA 導入メカニズムを解明する必要があり、そのためのアッセイ系を開発した。アッセイ系として、マウスの皮膚を利用できることを示す事ができた。

A. 研究目的

われわれは、筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、マイオスタチンの発現を抑制することにより、筋肉の機能が回復することを示してきた。さらに、その抑制法として、マイオスタチンに対する RNAi 法が使用できることも示してきた。われわれは siRNA の導入法として、1999 年に国立がんセンターの落合らによって発見された、アテロコラーゲンを導入担体とする方法を採用した。アテロコラーゲンは牛真皮の I 型コラーゲンを由来とするバイオマテリアルである。コラーゲン分子は、N-、C-両末端にコラーゲンの主要抗原部位であるテロペプチドを有する。アテロコラーゲンは、そのテロペプチドを除去した分子である。これによりアテロコラーゲンは免疫原性が極めて低く、生態適合性が高い。生理的条件において、アテロコラーゲンは正電荷、siRNA などの核酸は負電荷を帯びるため、アテロコラーゲンと核酸の両者は静電的に結合し複合体を形成する。アテロコラーゲンと複合体を形成している核酸は、血清および生体組織内で安定に保持されることが明らかとなっており、アテロコラーゲン分子がヌクレアーゼの核酸への接触をブロックしていると考えられている。

すぐれた導入効率や安全性を示しているアテロコラーゲン-siRNA 導入法であり、アテロコラーゲンと核酸の複合体はエンドサトームにより、細胞内に取り込まれると考えられているが、その作用機序や有効な組織、細胞種はいまだ明らかとなっていない。

そこで本研究では、アテロコラーゲン効果のアッセイ系として、観察が簡単なマウスの毛の色を変える系を選択した。そこで、メラノコルチン 1 受容体 (Mclr) に着目した。Mclr はメラノサイトの細胞膜上に存在する G タンパク質で、 α MSH の受容体として機能する。上皮においては主にメラニンの産生に関わっているとされ、 α MSH と結合した Mclr は cAMP の合成を促進し、黒色のユーメラニンを産生させる。その機能欠損型マウスでは体毛が金色化することが、Fisher, D.E ら(ダナファーマーがん研究所)により報告されている。Mclr の siRNA を用いて、マウスの上皮にアテロコラーゲン-siRNA 法で導入を行い、それが有効であれば、マウスの体毛色が変化すると予想し、研究を行った。

B. 研究方法

Mclr の siRNA 導入

Mclr の siRNA 導入実験を 5 回行った。それぞれ、実験 1 では表現型の確認、実験 2 では再現性の確認、実験 3 では表現型発現率の確認、実験 4、5 では詳細の解析を目的とした。

実験 1 では Mclr の siRNA 3 種とスクランブル siRNA、アテロコラーゲンのみの計 5 種の試薬を一個体に投与したのに対し、実験 2、3、4、5 では Mclr の siRNA 3 種を混合し、Mclr の siRNA 3 種混合、スクランブル siRNA、アテロコラーゲンのみの計 3 種の試薬をそれぞれ個別に投与した。スクランブル siRNA とはゲノム上に存在しない配列の siRNA であり、

ネガティブコントロールとして用いた。実験 4 では背毛の一部をピンセットで抜毛した。

実験 1 では、まず 200 μ M *Mcl1r* siRNA 3 種、スクランブル siRNA をバッファーとそれぞれ混合し、目的濃度となるよう調製した。これらを等量のアテロコラーゲンと混合した。

実験 2、3、4、5 では、まず 200 μ M *Mcl1r* siRNA 3 種等量とバッファーを合わせて混合し、目的濃度となるよう調製、スクランブル siRNA をバッファーに溶解し、目的濃度となるよう調製した。これらを等量のアテロコラーゲンと混合した。

これ以降の操作は実験 1~5 で共通である。コントロールとしてアテロコラーゲンのみを投与するため、アテロコラーゲンを等量のバッファーと混合した。以上の siRNA 及びアテロコラーゲンとバッファーの混合液をローテーターで 4 $^{\circ}$ C、4rpm、20 分間混和し、4 $^{\circ}$ C、10000rpm、1 分間遠心分離した。これを 27 ゲージシリンジで気泡が入らないように注意して 100 μ l 吸引し、マウスの背中上皮に局所投与し、経過観察、解析を行った。

切片化

siRNA 導入、経過観察後にマウス上皮を採取し切片化した。実験 1 のマウスは有毛部をカミソリで剃毛してから上皮を採取、O.C.T.Compound を用いて凍結包埋した。これをスライドガラス上に厚さ 10 μ m の切片とし、-80 $^{\circ}$ C で保存した。実験 2、3 のマウスは有毛部をハサミで刈毛してから上皮を採取、CMC を用いて凍結包埋した。Histo フィルムを用いて厚さ 10 μ m の切片とし、-80 $^{\circ}$ C で保存した。実験 4 のマウスは有毛部をハサミで刈毛してから上皮を採取、CMC を用いて凍結包埋した。これをスライドガラス上に厚さ 6 μ m の切片として、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

HE 染色、免疫抗体染色、TUNEL 染色、三重蛍光抗体染色

作製した切片に HE 染色を行った。操作はすべて室温で行った。作製した切片に、*Mcl1r* に対する免疫抗体染色を行った。アポトーシスを起こしている細胞を観察するため、作製した切片に TUNEL 法による染色を行った。作製した切片に、三重蛍光抗体染色を行った。

qPCR

Mcl1r の siRNA 導入マウス上皮において

Mcl1r の mRNA の発現が抑制されているか調べるため、背中上皮を採取し RNA を抽出、逆転写反応を行い、qPCR を行った。全細胞において恒常的に発現している β actin の mRNA 発現をコントロールとして比較し、発現量を同定した。*Mcl1r* の発現が確実な部位として、UniGene の EST-Profile に基づいて全眼を選択しこれをポジティブコントロールとした。

実験 4 のマウス試薬投与後 20 日目の背中上皮と全眼、実験 5 のマウス試薬投与後 20 日目の背中上皮を採取し剃毛した。RNA 抽出、逆転写反応し、qPCR を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、徳島大学の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、遺伝子組み換え実験については、徳島大学の規定に従い、許可を得て行った。

C. 研究結果

表現型

Mcl1r の siRNA を導入した結果、体毛が薄くなる変化がみられた。この変化がみられる部位では、細く短い毛しか生えていない。通常の脱毛とは異なる点として、*Mcl1r* の siRNA を導入したマウスには腹部の体毛にも変化が見られたが、コントロールのマウスにはみられなかった。

切片の解析

HE 染色

体毛変化部位の上皮状態を調べるため、上皮切片に HE 染色を行った。*Mcl1r* の siRNA を投与したマウスでは未処理のマウスに比べ脂腺が肥大しているように見られた。

免疫抗体染色

Mcl1r の局在を調べるため、上皮切片に *Mcl1r* に対する免疫抗体染色を行った。*Mcl1r* の発現は脂腺に強くみられた。これにより *Mcl1r* は脂腺に局在していることが示唆された。

TUNEL 法

脱毛、または育毛阻害の変化が現れることから、毛周辺でのアポトーシスの状態を調べるため、上皮切片に TUNEL 法による染色を行った。角質層に染色部位が確認されるため、アポトーシスの検出は成功したものと考えられる。しかしながら特徴的な染色部位は確認できなかった。

三重蛍光抗体染色

HE染色切片で見られた脂腺の肥大化、免疫抗体染色で見られた *Mclr* の脂腺での局在、そしてそれらと体毛変化の関連性を調べるため、*Mclr* 抗体、TUNEL法、DAPI染色を三重蛍光抗体染色で行った。三重蛍光抗体染色の結果、スクランブル siRNA 導入マウス、未処理マウスに比べ、*Mclr* の siRNA 導入マウスでは *Mclr* 発現量が少ないことが確認された。また、*Mclr* の発現は脂腺に強く見られた。TUNEL法によるアポトーシス検出は、全てのマウスでほとんど確認できなかった。

qPCR

Mclr の siRNA 導入マウス上皮において、*Mclr* の mRNA の発現が抑制されているか調べるため、背中上皮を採取し RNA を抽出、逆転写反応を行い、qPCR を行った。全細胞において恒常的に発現している β -actin の発現量に対する *Mclr* の発現量を求めた。この結果、*Mclr* の siRNA を導入したマウスの *Mclr* 発現量は、スクランブル siRNA、及びアテロコラーゲンのみを導入したマウスのものに比べ、約 1/3 から 1/4 に減少していた。

D. 考察

Mclr はメラニン産生に関与していること、また *Mclr* の機能欠損型マウスでは体毛が金色になることから、体毛の色の変化を予想してアテロコラーゲンによる *Mclr* の siRNA 導入を行ったが、体毛の色に変化は見られず、体毛の脱毛または育毛阻害と見られる変化が現れた。この変化はその発現率の高さや、ネガティブコントロールには現れない腹部の変化といった特異性から、アテロコラーゲンによる *Mclr* に対する siRNA の導入による表現型であると考えられる。しかし、なぜノックアウトの表現型と異なるかについては、現在のところ理由は不明である。切片の HE 染色、免疫抗体染色、三重抗体染色による結果から、*Mclr* は上皮において脂腺に局在していると考えられる。TUNEL法によるアポトーシスの検出は今後更なる条件検討が必要である。qPCR の結果から、アテロコラーゲン・siRNA 導入法による *Mclr* の siRNA によって、*Mclr* の mRNA の発現は抑制されたことが確認された。しかし、測定の時期により mRNA 発現量に約 10 倍の差があることから、今後は毛周期、週齢を

考慮した定量的解析が必要である。

E. 結論

マウス上皮へのアテロコラーゲンによる *Mclr* の siRNA 導入の有効性が示されたことから、in vivo におけるアテロコラーゲン・siRNA 治療法の可能性が広がった。また、この系を用いてメカニズムの解明ができることがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y.

Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. Acta Myol. 2008 Jul;27:19-24.

2) 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 Aug;15(15):1126-30.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

コラーゲンを用いた siRNA の導入法 (予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他