

マイオスタチン作用の調節因子に関する研究

研究分担者 濃野 勉 川崎医科大学 教授

研究要旨

骨格筋の成長を抑制するマイオスタチン (myostatin) の作用機序をもとに、調節分子をターゲットとして筋ジストロフィー治療薬の開発を目指している。本研究では、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変異マウスの作成をおこなっている。Wnt4 を過剰発現するトランスジェニックマウス、また骨格筋特異的に furin 遺伝子を破壊したノックアウトマウスが得られ、現在解析を進めているところである。

A. 研究目的

マイオスタチンは、骨格筋の増殖を抑制する因子として働き、その機能が阻害されると筋形成が促進されて肥大化する。これをもとに筋ジストロフィーの治療薬としてマイオスタチン中和抗体 (MYO-029) が作製され、米国で臨床試験 (I 相 II 相) が実施されたが、一部では効果がみられたものの全体として有効性を証明することができなかった。今後は MYO-029 に代わる方法でマイオスタチンを標的とした治療薬の開発が進められると予想される。

その一方で、マイオスタチンのシグナル伝達にかかわる因子の活性を制御することによって萎縮した筋肉を肥大化させる戦略が考えられる。我々は、マイオスタチンのシグナル伝達の上流と下流で作用しマイオスタチン活性に拮抗的な影響をおよぼす Wnt4 と furin に注目し、これらの分子の骨格筋形成および再生における病態生理学的な機能を明らかにするとともに、筋ジストロフィーの新たな治療薬となる分子の開拓と臨床応用を目指している。

B. 研究方法

(1) Wnt4 の機能解析

筋ジストロフィーモデルマウスでの効果を検証するために、組換えタンパク質の作成と骨格筋特異的に Wnt4 を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。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。一方、骨格筋特異的に Wnt4 を過剰発現するマウスを作成するために、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成した。

(2) Furin の機能解析

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、キメラマウスを作成し、続いて兄妹交配を行って fur^{lox/lox} ホモマウスを作成した。得られた fur^{lox/lox} 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-Myf5tm3 (cre) Sor/J) と交配し、fur^{lox/+}; Cre ヘテロマウスを作成した。最終的に fur^{lox/+}; Cre マウスを fur^{lox/lox} 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^{lox/lox} マウスを得た。

(倫理面への配慮)

動物個体を使用した実験は川崎医科大学動物実験指針に従って行い、遺伝子組換え実験については川崎医科大学の規定に従って行った

C. 研究結果および考察

Wnt4 はマイオスタチンの欠損変異により発現が上昇することが知られている。これまでにニワトリ胚芽細胞株 (C2C12 細胞) を使ったアッセイで Wnt4 にマイオスタチンと拮抗する作用があり筋分化を促進する活性があることを確かめた。本研究では、野生型マウスや筋ジストロフィーモデルマウスでの効果について検証するために、組換えタンパク質の作成と骨格筋特異的に Wnt4 を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。Wnt4 組換えタンパク質は、昆虫細胞系を利用した。この実験系は、Wnt4 と同じファミリーの Wnt3a の組換えタンパク質を作成するのに用いられた方法で、Wnt3a と同様に組換えタンパク質を効率よく産

生することが期待された。しかしながら、Wnt4 では、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。同時に、Wnt4 cDNA をレンチウイルスベクターに組換えて過剰発現すると、C2C12 では有意な筋分化の促進効果が見られたに対し、濃縮した組換えウイルスを正常マウスの下肢外側に注入して 7 日～14 日後に TA 筋を採取して対照と比較したが、有意な差は見られなかった。

組換えタンパク質調製やウイルスベクターでの発現と並行して、トランスジェニックマウスの作成を行った。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 ヶ月で死亡してしまった。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。

Furin は、マイオスタチンや MT-MMP などの前駆体タンパク質の切断に関わる酵素である。Furin の機能を阻害すると、マイオスタチンの生合成が抑制され骨格筋の形成が促進されると予想されるが、Laminin-2 や dystroglycan の切断も抑制される可能性があるため、マイオスタチンの阻害効果の程度はわからない。*furin* 遺伝子を破壊したマウスは発生初期に致死となるため、骨格筋の発生における生理機能も不明のままである。そこで骨格筋特異的に *furin* 遺伝子を破壊したコンディショナルノックアウトマウスを作成することで、筋形成と再生における furin の機能並びに病態生理との関連について検討した。*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^{fllox/fllox}* 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。

D. 結論

Wnt4 と furin のどちらの変異マウスも解析途中であり最終的な結論はまだ得られていない。今後、体重変化、握力、運動能力について正常マウスと比較する。また cardiotoxin (CTX) 処理により筋組織を破壊し筋衛星細胞の挙動を免疫染色により解析を行う。予想どおり骨格筋の肥大効果が確認された場合、筋ジスモデルマウスと交配し萎縮し

た筋組織を回復できるか検証する。また、Wnt4 組換えタンパク質の投与により回復できるか、furin 阻害ペプチドを作成し効果がみられるか検証する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

2) 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)

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

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—

分担研究者 武田 伸一 国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨

経口ステロイド剤は、Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対して唯一有効な治療法である。中でも prednisolone の誘導体である deflazacort が副作用の点から注目されている。そこで、筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）に対する deflazacort の効果について検討した。2ヶ月齢の正常犬4頭、筋ジス犬1頭に deflazacort 0.9mg/kg/day の投与を行い、理学所見、血液検査、臀部・大腿 MRI を検討し、剖検を行った。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。

A. 研究目的

筋ジストロフィーに対する治療薬の評価をする上で、筋ジストロフィー犬を用いることは極めて重要である。一方、経口ステロイド剤は、Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）に対して唯一有効性が認められた治療法である。本邦での保険適応はないが、北米や欧州では prednisolone や deflazacort が使用されている。特に、副作用が少ないことから、deflazacort が注目されている。そこで、正常犬と筋ジス犬に対して deflazacort を投与し、効果について検討した。

B. 研究方法

正常犬4頭、筋ジス犬1頭に deflazacort 0.9mg/kg/day の経口投与を行った。筋ジス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. 研究成果

正常犬において、投与2週間より体重が未投与犬と比べて減少しはじめ、4週後に筋萎縮と成長遅延が明らかとなった。投与1~3ヶ月にかけて4頭中3頭で鼠径あるいは腹壁ヘルニアを生じた。MRIでは、皮下脂肪の増加、筋内への脂肪浸潤と筋萎縮が認められた。血清CK値を含め一般生化学検査（総蛋白、アルブミン、AST、ALT、LDH、総コレステロール、中性脂肪、フルクトサミン）の値に異常を認めなかった。剖検では、肉眼的に、全身の脂肪蓄積、脂肪肝および体幹・大腿筋の筋萎縮を認めた。組織病理学的には、近位筋の萎縮は1型および2型線維ともに萎縮していたが、特に2型線維の萎縮が高度であった。一方、遠位筋の筋萎縮は肉眼的には明らかでなかったが、組織学的には2型線維の萎縮が認められた。筋ジス犬では、同齢の筋ジス犬に比べ比較的運動機能が保たれ、血清CK値が著明に改善した。成長遅延は見られたが内臓ヘルニアは発症しなかった。MRIでは壊死が検出可能な選択的脂肪抑制CHESS-T2WI法を用いて、筋内高信号が減少しており、骨格筋の変性

が抑制されていると考えられた。

D. 考察

Deflazacortの副作用として内臓ヘルニアは過去にヒトでは報告がなく、むしろ肥満など筋ジストロフィーで問題になりやすい副作用が少ない傾向が言われている。イヌを用いた実験で重篤な副作用としてのヘルニアが出現した背景には、deflazacortの体内動態が動物種によって異なり、イヌとヒトでは排泄経路や血中濃度に差があることが関係している可能性がある。また、2足歩行と4足歩行という体位や腹圧の係り方の差も関連している可能性がある。一方、筋ジストロフィーでは成長障害がみられたものの、同齢の筋ジストロフィーと比べて運動機能は比較的保たれ、血清CK値は明らかに低下したことから、治療効果はあるものと考えられ、成長遅延が筋ジストロフィーの進行抑制関与している可能性がある。

E. 結論

Deflazacortは、筋ジストロフィー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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

I. 論文発表

【欧文原著】

1. Toshifumi Yokota, Qi-long Lu, Terence Partridge, Masanori Kobayashi, Akinori Nakamura, Shin'ichi Takeda, Eric Hoffman.
Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs.
Ann Neurol. 2009; in press
2. 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 Jan 23.
3. 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. 2009; 54(2):127-30.
4. Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S.
Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro.
Mech Dev. 126, 107-116, 2009
5. 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
6. 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. 2009 Jan; 132(Pt 1):124-35.
7. 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. Jan; 66(1): 32-8, 2009
8. 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. Jan; 17(1): 73-80, 2009
 9. 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. Oct 15; 314(17): 3232-44, 2008
 10. 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. Oct 1; 33(2): 163-9, 2008
 11. 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. Oct 9; 1234:44-9, 2008
 12. 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. Sep; 173(3):781-91, 2008
 13. 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. Jul; 27:30-6, 2008
 14. 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. Jul; 19(7): 719-30, 2008
 15. 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. Jul; 15(7): 757-63, 2008
 16. 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 {beta}-synemin, {alpha}-dystrobrevin and actin.
J Cell Sci. Jun 15; 121(Pt 12): 2062-74, 2008
 17. 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. Jun 25;582(15): 2212-8, 2008

18. 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. May 13; 117(19): 2437-48, 2008

19. 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. Mar 14; 10(6): 702-713, 2008

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. Feb; 22(2): 477-87, 2008

21. 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. Jan 9;

9(1):1, 2008

22. 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. Jan 1;314(1):193-203, 2008

【欧文総説】

1. Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A, Takeda S.

Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation

Recent Advances of Skeletal Muscle

Differentiation.

Ed. Kunihiro Tsuchida and Shin'ichi

Takeda, pp61-78, Research Signpost

2. 学会発表

<国内>

1. 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、12.12.2008

その他多数

<国外>

1. Shin'ichi Takeda:

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

その他多数

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

研究成果の刊行に関する一覧表 (1)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土田邦博 村上達也	機能性リポタンパク質	岡田弘晃	機能性DDSキャリアの製剤設計	シーエムシ出版	大阪市	2008	150-157
Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A & Takeda S.	Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation	Tsuchida K & Takeda S	Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation	Research Signpost	Fort P.O., Trivandrum -695 023, Kerala, India	in press	

研究成果の刊行に関する一覧表(2)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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)	1-12	2008
Tsuchida K.	Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice.	Acta Myologica	27(1)	14-18	2008
Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y.	Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review.	Acta Myologica	27(1)	19-24	2008
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)	781-791	2008
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
Tsuchida K.	Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders.	Curr. Opin. Drug Discov. Devel.	11(4)	487-494	2008
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
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)	719-730	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.	15	1126-1130	2008
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.	xxvii	30-36	2008
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
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
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)	32-38	2009
Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Manya H, Endo T, Takeda S.	Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro	Mech Dev.	126(3-4)	107-116	2009
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.			in press
Tsuchida K, Nakatani M, Murakami T, Uezumi A.	Action of myostatin and its regulators in skeletal myogenesis. In Recent advances of skeletal muscle differentiation.	Research Signpost.			in press

14 機能性リポ蛋白質

村上達也*¹, 土田邦博*²

14.1 はじめに

血管内に投与されるドラッグキャリアとして、リポソームやポリマーミセルが知られている。いずれも人工ナノ粒子であるため、本来であれば生体による異物認識を受けるが、ポリエチレングリコール修飾などにより「異物として見えないようにする」ことが可能である。ここでは、生体内に存在するナノ粒子を用いることにより、「生体分子として見える」ドラッグキャリアの開発の可能性について述べたい。

14.2 リポ蛋白質

リポ蛋白質は生体内に存在する天然のナノ粒子である。その構造は図1(a)に示すように、蛋白質と各種脂質からなる複合型ナノ粒子である。蛋白質はapolipoproteinと呼ばれ、その両親媒性作用により脂質を水溶液中に溶解する。リポ蛋白質は主にchylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL)の4つに分類され、粒子径はそれぞれ75~1200, 30~80, 10~25, 5~12 nmである¹⁾。それぞれのリポ蛋白質における構成apolipoproteinは異なり、LDLにはApoB-100, HDLにはApoA-Iが含まれる。リポ蛋白質の生理機能は血管内での脂質の輸送である。中でも、悪玉コレステロールとして知られるLDLは、肝臓で合成された脂質を末梢組織へ輸送し、逆に善玉コレステロールのHDLは末梢組織から肝臓へ脂質を輸送する。高LDLコレステロールは動脈硬化性心血管疾患のリスクフ



図1 (a) アポ蛋白質のモデル図
(b) 機能性HDLのモデル図: ApoA-I変異体作製(左),
ApoA-Iへの化学修飾(右)による高機能化

* 1 Tatsuya Murakami 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 助教; JSTさきがけ研究員

* 2 Kunihito Tsuchida 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授

ァクターとして知られてきたが、最近の報告によると、低HDLコレステロールもそのリスクファクターとなることが示唆されている²⁾。すなわちHDLはhealthy nanoparticleと言える。

14.3 リポ蛋白質のドラッグキャリア応用

リポ蛋白質は脂質コアを有することから、疎水性薬物のドラッグキャリアとして機能することが容易に想像できる。さらに完全な生分解性であること、免疫応答を誘導しないこと、細網内皮系に認識されないことも、ドラッグキャリアとして魅力的である。中でもLDLは癌ターゲティングドラッグキャリアとして注目を集めてきた。分裂の早い癌細胞は正常細胞に比べて多くのコレステロールを必要とし、LDLがそのコレステロール輸送を担うためである^{3,4)}。LDLは癌細胞表面で高発現するLDL受容体にApoB-100を介して認識され、エンドサイトーシスを受ける。重要なことに、LDL以外のリポ蛋白質に含まれるApoE¹⁾は、脂質粒子と結合すると、LDL受容体に対してLDLの15~25倍の親和性を示すことが報告されている⁵⁾。以上のことから、癌細胞表面のLDL受容体を利用して、LDLだけでなくすべてのリポ蛋白質に癌ターゲティング能力を賦与できる可能性がある。一方、HDL特異的な機能として、ApoA-Iを利用した血液脳関門上のscavenger receptor BIを介した脳腫瘍ターゲティングの可能性が報告されている⁶⁾。

化学修飾によりターゲティング能力を賦与したりポ蛋白質も作製されている。Bijsterboschらは、肝臓の実質細胞およびKupffer細胞がD-galactoseを含む物質を細胞表面のasialoglycoprotein受容体を介して取り込むことに着目し、LDL⁷⁾およびHDL⁸⁾のそれぞれのapolipoproteinにlactose (D-galactosyl-D-glucose)を還元アルキル化反応により導入した。それらをラット血管内投与したところ、lactosylated LDLは主にKupffer細胞そして次に実質細胞、lactosylated HDLはほぼ完全に実質細胞へ集積した。この分布の差に対して、彼らはLDLとHDLの粒径の差を挙げている。またいずれの場合においても、asialofetuinやN-acetylgalactosamineの前投与で集積量が低下することから、これらの集積がasialoglycoprotein受容体依存的であることも確認されている。

さらに近年、葉酸修飾LDLの報告がなされている。葉酸 (folic acid, FA) は水溶性ビタミンの一種で、その受容体が多く癌細胞で高発現していることが知られている。そのため、癌ターゲティングリガンドとしてリポソームやポリマーミセルなど様々なドラッグキャリアに応用されてきた。リポ蛋白質の場合、apolipoproteinのLys側鎖アミノ基に葉酸が導入される。Zhengらのグループは、FA修飾LDLを用いた癌ターゲティングを*in vitro*⁹⁾、*in vivo*¹⁰⁾両方で確認している。以上のことから、リポ蛋白質はapolipoprotein部分に様々な機能を容易に導入できることがその特徴の1つと言える。

これまでに紹介した報告では、すべて生体から分離精製した(天然型)リポ蛋白質が用いられている。これに対してリポ蛋白質を再構成してドラッグキャリアとして利用する試みもなされて

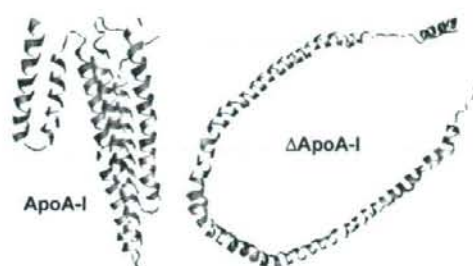
いる。1つはHDLの構成蛋白質ApoA-Iを大腸菌発現により組み換え蛋白質として取得し、市販のリン脂質と反応させてHDLを作製する方法である¹¹⁾。この方法で得られたHDLは抗真菌剤 amphotericin Bを内包し、*C. albicans*感染マウスの生存期間を容量依存的に延長した。もう1つの方法では、ApoB-100部分ペプチドが用いられている。ApoB-100は分子量550 kDaの巨大な蛋白質であるため、ApoA-Iの様に組み換え蛋白質として得ることは困難である。そこでApoB-100から脂質結合モチーフとLDL受容体結合ドメインを抜き出し、それらを連結した29アミノ酸からなるペプチドが合成された¹²⁾。このペプチドを各種脂質と混合すると、平均粒径10 nm程度のLDL様ナノ粒子が生成した。しかしゲル濾過分析結果を見る限り、非常に不均一な集団からなっているようである。一方でこのLDL様ナノ粒子を、LDL受容体を高発現している多形神経腫細胞株に作用させると、LDL受容体依存的な細胞内取り込みが観察され、LDL受容体結合ドメインも機能していることが示された。これらの報告は、リポ蛋白質の臨床応用に向けた実用的な研究として注目される。

14.4 蛋白質工学的手法を駆使したHDLの高機能化

最後に、我々が最近行っている研究を紹介したい。先程も述べたとおり、ApoA-Iは大腸菌発現により大量に得ることができ、各種脂質と混合するだけで、天然型HDLと同等の機能を有するHDLを試験管内で再構成することができる。我々は蛋白質工学的手法を利用すれば、HDLにドラッグキャリアとして魅力的な性質を賦与できるのではないかと考え、本研究をスタートした。具体的には、ApoA-Iの変異体作製およびApoA-Iの化学修飾を利用した高機能化HDLドラッグキャリアの作製である(図1(b))。

ApoA-I遺伝子は2つのexonからなり、それぞれ1-43と44-243残基をコードしている。この知見を元に、N末端1-43残基の欠損変異体が作製され、全長ApoA-Iと構造・機能の比較が行われた。X線結晶構造によると、全長ApoA-Iは複数の α -helixがコンパクトに折れ畳んだ構造をしている¹³⁾のに対し、この欠損変異体(以後 Δ ApoA-Iと表す)は α -helixが馬蹄状に連なった珍しい構造をしていた(図2)¹⁴⁾。 Δ ApoA-Iのリン脂質反応性(= discoidal HDL形成能)はApoA-Iとほとんど変わらないが、得られるdiscoidal HDL(以後dHDLと表す)の平均粒径は全長ApoA-Iの場合(dHDL)に比べて増大する¹⁵⁾。dHDLに少量のコレステロールを内包させ、HDLの生理活性の指標の1つであるlecithin: cholesterol acyltransferase活性化反応を検討したところ、反応性はdHDLの約半分に低下した。この反応性はHDLの粒径にも影響を受けるため、 Δ ApoA-Iの寄与がどの程度なのかは不明である。

HDL中のApoA-I構造は明らかとなっていないが、脂質非存在下の Δ ApoA-Iとよく似た構造をとると予測されている¹⁴⁾。この理由としては、① discoidal HDL中のApoA-Iと Δ ApoA-Iは同

図2 ApoA-Iと Δ ApoA-IのX線結晶構造

じ α -helix含量を示すが、 Δ ApoA-Iの場合、脂質非存在下でもその値が変わらない（ApoA-Iは82→68%まで減少する）、②脂質非存在下の Δ ApoA-Iの蛋白質分解パターンがHDL中ApoA-Iのものとは基本的に一致する、③X線結晶構造解析で得られた Δ ApoA-Iの馬蹄状構造とその大きさが、直径8～12nmのHDLを包むのに適している、ということが挙げられる。すなわち図1(a)に示すように、ApoA-Iは脂質粒子にベルト状に巻き付いていると考えられる。

我々は、このように構造解析の進んでいる Δ ApoA-Iを出発物質として用いることにした。大腸菌による蛋白質発現効率の観点からも、分子量の低下したこのN末端欠損変異体は有利である。 Δ ApoA-IはN末端His₆タグ融合蛋白質として発現させ、ニッケルキレートレジンで精製した。尚、ApoA-IへのN末端His₆タグ融合は、その物理的性質にほとんど影響を与えないことが報告されている¹⁶⁾。精製 Δ ApoA-Iは炭酸アンモニウムに対して透析した後、凍結乾燥して-80℃で保存した。同様に全長ApoA-Iも得た。それぞれの分子量は、25kDa (Δ ApoA-I)、30kDa (ApoA-I)である。Discoidal HDLは、コール酸-透析法に従って作製した¹⁵⁾。具体的には、尿素溶液に溶解した Δ ApoA-Iとコール酸ナトリウム溶液に溶解した100モル等量のリン脂質POPC (palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine)を混合し、終夜静置後、分画分子量50,000の透析膜を用いPBSに対して透析した。

図3には、作製したdHDL、 Δ HDL、そして天然型HDL (BIOMEDICAL TECHNOLOGIES INC.)の動的光散乱測定による粒径分布および平均粒径を示す。いずれも10nm程度の値を示し、ゲル濾過分析を元に報告されているストークス径と大差がないことを確認した。ApoA-Iは、反応させるPOPCとコレステロールの量を増やすと、得られるHDLの粒径が増大することが報告されているが¹⁷⁾、今回、 Δ HDLにおいてもPOPC量を増やすと粒径が増大することが分かった(表1)。

次に、抗癌剤ドキシソルピシン (DXR)を用いて、 Δ HDLのドラッグキャリアとしての機能評価を行った。DXR内包反応条件は、天然型HDLに対して報告されているものを利用した¹⁸⁾。内

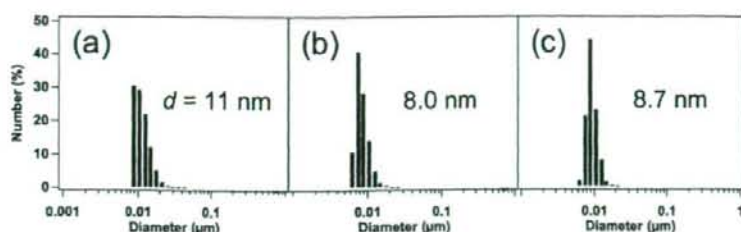


図3 リポ蛋白質の動的散乱測定

(a) dΔHDL, (b) dHDL, (c) 天然型HDL (図中の数字は平均粒径を表す)

表1 POPC量依存的な平均粒径変化

POPC (mol eq.)	平均粒径 d (nm)	
	dΔHDL	dHDL
100	11	8.0
150	13	11
200	15	15
250	19	19

包反応終了後、NAP-5 (GE Healthcare) を用いたゲル濾過精製により、未反応DXRと凝集体成分を除去した。溶出液中のDXR量および蛋白質濃度を、それぞれOD485測定およびLowry法により求めた。図4にはDXR内包量 (μg) と蛋白質換算収率 (%) を示す。興味深いことに、dΔHDLのDXR内包量および蛋白質換算収率ともに、dΔHDL作製に使用したPOPC量とともに増大した。特に注目すべきは、250モル等量のPOPCの使用で、反応収率がほぼ100%にまで達したことである。dHDLについても同様の傾向が見られたが、DXR内包量および反応収率ともにややdΔHDLより低い値を示した。今後このdΔHDLとdHDLの差を詳細に検討する予定である。いずれにせよ天然型HDLの結果と比べれば、DXR内包におけるdΔHDLの有用性は明らかである。

ここではdΔHDLへのDXR内包条件最適化のために、250モル等量のPOPCで作製したΔHDLを用いて、DXR内包反応を37、50、60℃で行うとともに、反応時間についても0.5、1、1.5hの3点で検討した。図5(a)に示すとおり、DXR内包量は反応温度の上昇、反応時間の延長とともに顕著に増大した。図4の同じdΔHDLに対して得られたDXR内包量と60℃、1.5hでのDXR内包量を比較すると、その差は4倍以上であった。次に、各種条件下で得られたDXR内包dΔHDLの動的散乱測定を行った(図5(b))。興味深いことに、ΔHDLは25から222nmの様々な粒径を示すことが分かった。平均粒径からDXR内包dΔHDLの体積を概算すると、その体積とDXR内包量との間には直線性が見られ($r^2 = 0.922$)、dΔHDLは内包するDXR量に応じてフレキシブル

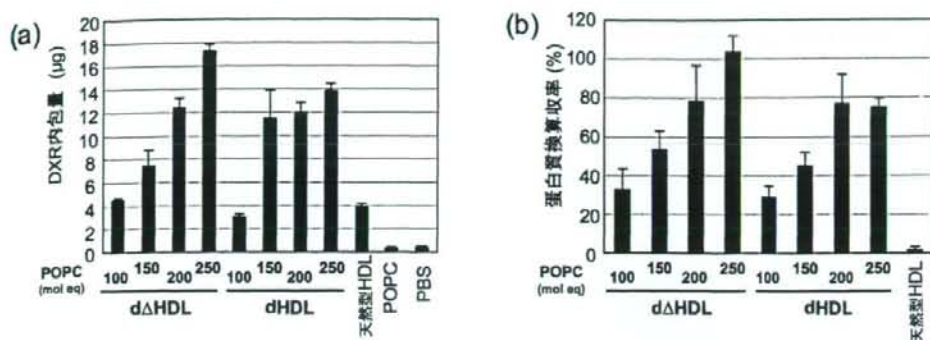


図4 dΔHDLへのDXR内包におけるPOPC量の効果
(a) DXR内包量, (b) 蛋白質量を指標とした反応収率

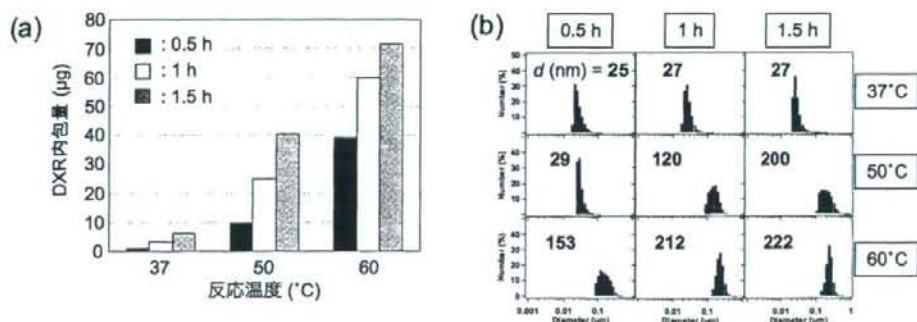


図5 dΔHDLのDXR内包反応条件最適化
(a) DXR内包量, (b) DXR内包dΔHDLの動的光散乱測定 (図中の数字は平均粒径を表す)

に粒径を変化させられることが示唆された。

また、60°C、1.5 hの反応条件でも蛋白質換算収率の明確な減少は観察されなかった。LDLのApoB-100同様、ApoA-Iの熱変性は50°C程度から生じるが、HDL中のApoA-Iの熱安定性は高く、熱変性温度は80°C以上とされている¹⁹⁾。すなわちDXR内包反応温度にはまだ上昇の余地があると言えるが、60°C、1.5 hの反応ですでに粒径は200 nmを超えており、一般的なナノ粒子の粒径と細網内皮系取り込みの関係を考慮すれば、少なくともDXR内包に関して60°C以上で検討する必要はないかもしれない。

最後に、dΔHDLの葉酸 (FA) 化学修飾による癌ターゲティングについて述べる。dΔHDLの場合、ΔApoA-Iに含まれる18個のLys側鎖アミノ基が化学修飾部位となる。dΔHDLはまずFITC標識した後、FA活性化エステルと反応させた。細胞はヒト咽頭癌細胞株KBを用い、予めFA不含培

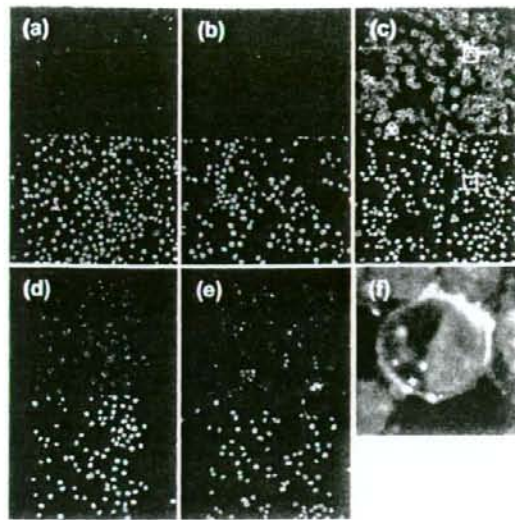


図6 ヒト咽頭癌細胞株KBによるFITCラベルした葉酸修飾dHDLの取り込み
 (上: FITC蛍光, 下: DAPI蛍光, (f)のみ両者の重ね合わせ)
 (a) 未処理, (b) dHDL, (c) FA-dHDL, (d) FA-dHDL + FA,
 (e) FA-dHDL (FA受容体低発現株), (f) (c)の四角部分の拡大図

地で培養することによりFA受容体の発現を誘導した。図6には、FITCラベルした各種dHDL存在下で37℃、4h培養したKB細胞の蛍光画像を示す。FA修飾dHDL (FA-dHDL) で処理するとKB細胞が蛍光ラベルされ、FA-dHDLの取り込みが示唆された (図6(c))。蛍光は主に細胞膜近傍から得られている (図6(f)) が、同様の局在がFA-PEG-DXRからなる nano-aggregateでも観察されている²⁰⁾。このKB細胞をdHDLのみ (図6(b))、もしくはFA-dHDLとfree FA (図6(d)) で処理すると、dHDLの取り込みは強く抑制された。これらの結果は、FA-dHDLのKB細胞への取り込みがFAとFA受容体の相互作用依存的に生じたことを示唆している。さらに、FA受容体の発現を誘導していないKB細胞にFA-dHDLを作用させても、明確な細胞内取り込みは生じないことを確認している (図6(e))。以上の結果から、これまでのドラッグキャリア同様、dHDLもFA化学修飾により *in vitro* 癌ターゲティングを行えることが示された。

14.5 おわりに

以上、リボ蛋白質のドラッグキャリアとしての可能性、高機能化について述べてきた。リボ蛋白質のドラッグキャリア応用自体は目新しい研究ではないが、我々は組み換えApoA-I変異体を

利用することにより、HDL様ナノ粒子の医療応用に向けた大量調製だけでなく、ドラッグキャリアとしての高機能化も期待している。生体には様々な生理活性ペプチドが存在し、生理活性蛋白質に対してもその機能ドメインが同定されてきている。さらに近年ではファージペプチド提示系を利用して、人工ペプチドライブラリーから特定臓器指向性を有するペプチドも数多く取得されている。今後、これらのペプチドを利用したApoA-I変異体を作製し、複数の機能を有するHDL様ドラッグキャリアを作製していきたいと考えている。

文 献

- 1) P. C. N. Rensen *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **47**, 251 (2001)
- 2) P. Linsel-Nitschke and A. R. Tall, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 193 (2005)
- 3) R. A. Firestone, *Bioconjugate Chem.*, **5**, 105 (1994)
- 4) J. M. Shaw *et al.*, *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, **507**, 252 (1987)
- 5) R. E. Pitas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 2311 (1979)
- 6) B. Petri *et al.*, *J. Control. Release*, **117**, 51 (2007)
- 7) M. K. Bijsterbosch *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **36**, 484 (1989)
- 8) M. K. Bijsterbosch and T. J. C. Van Berkel, *Mol. Pharmacol.*, **41**, 404 (1992)
- 9) G. Zheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 17757 (2005)
- 10) J. Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5798 (2007)
- 11) M. N. Oda *et al.*, *J Lipid Res.*, **47**, 260 (2006)
- 12) M. Nikanjam *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **328**, 86 (2007)
- 13) A. A. Ajees *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 2126 (2006)
- 14) D. W. Borhani *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 12291 (1997)
- 15) D. P. Rogers *et al.*, *Biochemistry*, **36**, 288 (1997)
- 16) D. P. Rogers *et al.*, *Biochemistry*, **37**, 11714 (1998)
- 17) G. Cavigliolo *et al.*, *Biochemistry*, **47**, 4770 (2008)
- 18) A. Kader and A. Pater, *J. Control. Release*, **80**, 29 (2002)
- 19) A. R. Tall *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 4940 (1975)
- 20) H. S. Yoo and T. G. Park, *J. Control. Release*, **100**, 247 (2004)

Research article

Open Access

Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle

Katsutoshi Yuasa*^{1,2}, Akinori Nakamura², Takao Hijikata¹ and Shinichi Takeda²

Address: ¹Department of Anatomy and Cell Biology, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Musashino University, Nishi-tokyo, Tokyo 202-8585, Japan and ²Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Email: Katsutoshi Yuasa* - k_yuasa@musashino-u.ac.jp; Akinori Nakamura - anakamu@ncnp.go.jp; Takao Hijikata - hijikata@musashino-u.ac.jp; Shinichi Takeda - takeda@ncnp.go.jp

* Corresponding author

Published: 9 January 2008

Received: 28 September 2007

BMC Musculoskeletal Disorders 2008, 9:1 doi:10.1186/1471-2474-9-1

Accepted: 9 January 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/9/1>

© 2008 Yuasa et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Skeletal muscles are composed of heterogeneous collections of muscle fiber types, the arrangement of which contributes to a variety of functional capabilities in many muscle types. Furthermore, skeletal muscles can adapt individual myofibers under various circumstances, such as disease and exercise, by changing fiber types. This study was performed to examine the influence of dystrophin deficiency on fiber type composition of skeletal muscles in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J), a large animal model for Duchenne muscular dystrophy.

Methods: We used tibialis cranialis (TC) muscles and diaphragms of normal dogs and those with CXMD_J at various ages from 1 month to 3 years old. For classification of fiber types, muscle sections were immunostained with antibodies against fast, slow, or developmental myosin heavy chain (MHC), and the number and size of these fibers were analyzed. In addition, MHC isoforms were detected by gel electrophoresis.

Results: In comparison with TC muscles of CXMD_J, the number of fibers expressing slow MHC increased markedly and the number of fibers expressing fast MHC decreased with growth in the affected diaphragm. In populations of muscle fibers expressing fast and/or slow MHC(s) but not developmental MHC of CXMD_J muscles, slow MHC fibers were predominant in number and showed selective enlargement. Especially, in CXMD_J diaphragms, the proportions of slow MHC fibers were significantly larger in populations of myofibers with non-expression of developmental MHC. Analyses of MHC isoforms also indicated a marked increase of type I and decrease of type IIA isoforms in the affected diaphragm at ages over 6 months. In addition, expression of developmental (embryonic and/or neonatal) MHC decreased in the CXMD_J diaphragm in adults, in contrast to continuous high-level expression in affected TC muscle.

Conclusion: The CXMD_J diaphragm showed marked changes in fiber type composition unlike TC muscles, suggesting that the affected diaphragm may be effectively adapted toward dystrophic stress by switching to predominantly slow fibers. Furthermore, the MHC expression profile in the CXMD_J diaphragm was markedly different from that in *mdx* mice, indicating that the dystrophic dog is a more appropriate model than a murine one, to investigate the mechanisms of respiratory failure in DMD.

Background

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked, lethal disorder of skeletal muscle caused by mutations in the dystrophin gene, which encodes a large sub-sarcolemmal cytoskeletal protein, dystrophin. DMD is characterized by a high incidence (1 in 3,500 boys) and a high frequency of *de novo* mutation [1]. The absence of dystrophin is accompanied by the loss of dystrophin-associated glycoprotein complex from the sarcolemma, leading to reduce membrane stability of myofibers. This dysfunction results in progressive muscle weakness, cardiomyopathy, and subsequent early death by respiratory or heart failure in DMD patients.

For basic and therapeutic studies of DMD, it is very important to perform analysis and evaluation using dystrophin-deficient animal models, such as the *mdx* mouse and dystrophic dog. The *mdx* mouse has been well utilized in many DMD studies, but the murine model shows moderate dystrophic changes unlike severe human DMD [2]. In contrast, golden retriever muscular dystrophy (GRMD) shows similar dystrophic phenotypes to those of human patients: elevated serum CK level, gross muscle atrophy with joint contracture, cardiomyopathy, prominent muscle necrosis, degeneration with mineralization and concurrent regeneration, and endomysial and perimysial fibrosis [3]. Therefore, the dystrophic dog is more suitable than the *mdx* mouse for studies to gain insight into the pathogenic and molecular biological mechanisms of human DMD, as well as for pre-clinical trials [4]. Therefore, we have recently established a colony of beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J) [5], and have demonstrated that CXMD_J also exhibited severe symptoms similar to GRMD. To date, we have utilized the littermates of the CXMD_J colony for pathological [6,7], molecular biological [8], and therapeutic examinations [9] of DMD.

Skeletal muscles are composed of heterogeneous populations of muscle fiber types, which contribute to a variety of functional capabilities. In addition, muscle fibers can adapt to diverse situations, such as aging, exercise, and muscular diseases, by changing fiber size or fiber type composition. Therefore, it is important to analyze fiber types to evaluate the condition of skeletal muscle with disease. Fiber types can be distinguished by biochemical, metabolic, morphological, and physiological properties. One of the most informative methods for identification of fiber types is detection of myosin heavy chain (MHC) [10,11]. Myofibers express various MHC isoforms containing slow (type I), fast (types IIA, IIX, IIB), embryonic, and neonatal forms. MHC expression, however, seems to differ between animal species and muscle types. Three MHC isoforms (types I, IIA, and IIX) have been identified in limb skeletal muscles of human and dog, while the

fourth isoform, MHC IIB, is abundantly present in small mammals including mouse [10,11]. In addition, expression profiles of MHCs in dystrophin-deficient muscles have been widely examined in limb skeletal muscles of DMD patients [12] and animal models, such as the *mdx* mouse [13] and GRMD [14], but it has not been fully analyzed in skeletal muscles of a canine model. Furthermore, expanded studies of the diaphragm were restricted to that of the *mdx* mouse [13,15]. Therefore, it is important to perform detailed evaluation of fiber types and fiber sizes in limb skeletal muscles and the diaphragm of CXMD_J to understand adaptations toward disease by changes in fiber type composition in the skeletal muscles of human DMD.

In this study, to investigate fiber types of myofibers in dystrophin-deficient skeletal muscles of dystrophic dogs, we evaluated the expression profiles of MHCs in tibialis cranialis (TC) muscles and diaphragms of CXMD_J at various ages, by immunohistochemical and electrophoretic techniques. Briefly, we detected myofibers expressing fast type, slow type, and/or developmental MHCs. In addition, the numbers of fast or slow MHC fibers and the size distribution of these myofibers were analyzed among populations of muscle fibers with or without developmental MHC. The composition of MHC isoforms was also examined in pairs of normal and affected dogs at various ages. This is the first report of evaluation of the detailed distribution of fiber types in TC muscles and diaphragms of dystrophic dogs.

Methods

Animals

Experimental dogs were wild-type and dystrophic littermates at ages from 1 month to 3 years, from the beagle-based CXMD_J breeding colony at National Center of Neurology and Psychiatry (Tokyo, Japan) [5,6]. Within a few days after birth, the genotypes (wild-type, carrier, or dystrophy) of the littermates were determined by a snapback method of single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis [16], and the phenotypes were also confirmed by measuring serum CK level [5]. All animals were cared for and treated in accordance with the guidelines approved by Ethics Committee for Treatment of Laboratory Animals at NCNP, where three fundamental principles (replacement, reduction, and refinement) were also considered. Adult control and CXMD_J dogs (10 months to 3 years) were analyzed in early experiments (three to six animals). Series consisting of a pair of a normal dog and an affected littermate at ages of 1, 2, 4, 6 months, or 1 year old were examined in subsequent experiments. TC muscles and diaphragms were removed from the dogs after necropsy, in which euthanasia was performed by exsanguination under anesthesia with isoflurane taken to prevent unnecessary pain. TC muscle was used as a

representative limb skeletal muscle, and it corresponds to the tibialis anterior muscle in mice and humans. The muscle blocks were divided into pieces and frozen immediately in isopentane pre-cooled with liquid nitrogen.

Histological and immunohistochemical analysis

Serial transverse cryosections (10 μ m thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and immunostained using anti-MHC antibodies. Immunohistochemistry was performed as described previously [17]. Cryosections were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibodies against fast type MHC (NCL-MHCf; Novocastra), slow type MHC (NCL-MHCs), and developmental MHC (NCL-MHCd). The primary antibodies were detected using a Vectastain[®] ABC kit (Vector Laboratories) and then visualized with diaminobenzidine. Images were recorded using a microscope (Eclipse E600; Nikon) equipped with a CCD camera (HV-D28S; Hitachi), and fiber types of individual myofibers from 400 to 1200 per muscle were identified, based on serial sections immunostained with three types of MHC antibodies. Subsequently, the fiber number of each group was counted, and fiber sizes were also measured using Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Furthermore, the differences in MHC expression between two groups (normal, dMHC (-) vs affected, dMHC (-); affected, dMHC (-) vs affected, dMHC (+)), between muscles (TC muscle vs diaphragm), or among ages (1, 2, 4, 6 months, and 1 year) were evaluated by Yates's chi-square test.

Myosin extraction and gel separation

Myosin was extracted on ice for 60 min from cryosections, as described previously [18,19]. MHC isoforms were separated on 8% SDS-polyacrylamide gels containing 30% glycerol, according to the methods described previously [19,20] with some modifications. Briefly, aliquots of 0.4 μ g of total protein were loaded in each well of mini-gels (Bio-Rad). Electrophoresis was carried out at 60 V at 5°C for 48 h using upper buffer containing additional 10 mM 2-mercaptoethanol. The gels were stained with silver, and the image was scanned and analyzed using NIH image.

Results

MHC expression in TC muscle and diaphragm of adult CXMD₁

To investigate the relationship between the pathology and fiber types in dystrophic skeletal muscles of CXMD₁, we first examined histological features and MHC expression in TC muscles and diaphragms of normal and affected dogs at adult stages (10 months to 3 years old) (Fig. 1). In H&E-stained sections, affected muscles exhibited some dystrophic characteristics, such as necrosis, regeneration, cellular infiltration, fibrosis, fiber splitting, and fiber size variation. Especially, clusters of infiltrating cells were

prominently observed in TC muscles, while endomysial fibrosis was predominant in diaphragms.

We next detected expression of fast and slow type MHCs for fiber type identification, and further examined developmental MHC, which means neonatal and/or embryonic MHC, as a marker of regenerating fibers (Fig. 1). In TC muscles and diaphragms of adult normal dogs, individual myofibers showed expression of either fast or slow type MHC. In affected TC muscles, the proportions of fast or slow MHC fibers were similar between normal and affected muscles. In addition, large numbers of developmental MHC-expressing fibers were observed in clusters, and many of these fibers co-expressed fast type MHC. In the affected diaphragms, the numbers of fast MHC fibers were much lower than in the normal counterparts, and slow type MHC was expressed in almost all fibers. Furthermore, the numbers of developmental MHC fibers were less than in affected TC muscle, and almost all of these fibers co-expressed slow type MHC, unlike TC muscle. These results indicated that the influences of dystrophin deficiency on MHC expression are significantly different between TC muscle and the diaphragm of CXMD₁, suggesting that the diaphragm would be more greatly influenced with regard to the composition of fiber types and muscle regeneration than TC muscle.

MHC expression and fiber size distribution

To further evaluate the size distribution of individual myofibers related to MHC expression, we measured transverse areas of all muscle fibers within one area in TC muscle or diaphragm of adult CXMD₁ (Fig. 2 and Table 1). We then analyzed three types of MHC-positive fibers (fast, slow, and hybrid) among populations of myofibers expressing fast and/or slow type MHC(s) together with or without developmental MHC, which were defined as regenerating or non-regenerating fibers, respectively. In non-regenerating fibers of affected TC muscle and diaphragm, the proportion of slow MHC fibers increased and these fibers showed a larger size distribution than those in the normal counterparts, indicating increased number and enlarged fiber size of slow fibers (Fig. 2B and Table 1). Interestingly, fast MHC fibers disappeared in the adult CXMD₁ diaphragm.

In regenerating fibers of both affected muscles, the distributions of all three populations shifted to smaller sizes than those in the normal counterparts, and a large number of hybrid fibers co-expressing fast and slow type MHCs were observed at a high rate (Fig. 2C and Table 1). In addition, fast MHC fibers were predominant in a regenerating population in TC muscle, while slow MHC fibers were predominant in the diaphragm except for hybrid fibers. These observations suggested that fast fibers could be more susceptible to dystrophic stress than slow fibers, and