

200935041A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田 芳秀

平成22（2010）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の臨床応用基盤の確立	
砂田芳秀	11
2. マイオスタチン阻害による筋萎縮防止療法と骨格筋への脂肪沈着に関する研究	
土田邦博	14
3. マイオスタチンに対する RNA 干渉法による発現抑制法に関する研究	
野地澄晴	18
4. マイオスタチン作用に拮抗する因子による筋疾患の治療法の開発	
濃野 勉	24
5. 筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析 —イヌ血清 CRP 値を用いた早期妊娠診断および胎仔数との関連性—	
武田伸一	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

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

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カベオリン3欠損肢帯型筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋に局所投与し骨格筋量の20%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治療効果の分子機序として、筋芽細胞から筋管細胞への融合・分化促進作用を明らかにした。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。マイオスタチンの作用修飾分子である furin を骨格筋特異的にノックアウトしたマウスの作出に成功した。マイオスタチン siRNA 療法の臨床応用基盤として、アテロコラーゲンを担体として骨格筋への導入効率を高める手法を確立し、治療効果を機能的に解析した。骨格筋組織内に新たな多分化能を有する間葉系前駆細胞を同定し、これが骨格筋形成と脂肪細胞産生のバランスを制御していることを見いだした。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、前臨床治験に用いる筋ジストロフィー犬の繁殖効率を改善する目的で、より早期の妊娠判定と胎仔数予測に血清 CRP 値が有用であることを見いだした。

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究所・部長

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（T β RI kinase 阻害剤）である。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が、昨年度までの研究で、T β RI kinase 阻害剤経口投与により野生型マウス

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

では骨格筋が肥大し、筋ジストロフィーモデルマウスでは筋病理変化の改善効果がみられた。そこで臨床応用の基盤となる改善効果の分子機構について検討する。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。また、マイオスタチン前駆体の活性化プロセッシングに関与する furin にも着目し治療標的となる可能性について検討する。

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 のマウス骨格筋局所投与による治療効果の検討

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) を合成してカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋に局所投与した。投与 2 週後に骨格筋を摘出して病理解析により治療効果を検討した。

2. 低分子 T・RI kinase 阻害剤のマウス筋芽細胞分化系の解析

TβRI kinase 阻害剤をマウス筋芽細胞ライン C2C12 の分化培養系に添加し、筋融合および筋分化作用に対する影響を形態学・細胞生物学的に解析した。

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。フォリスタチン由来のマイオスタチン阻害分子の一つである FS-I-I の N 末端欠損変異体や C 末端変異体を作製し、マ

イオスタチン阻害活性を比較検討した。活性評価は、ヒト横紋筋肉腫由来の A204 細胞を用いたルシフェラーゼ活性法を用いた。

4. マイオスタチン阻害による骨格筋 miRNA 発現変動の解析

マイオスタチン阻害による miRNA の発現変動を調べるために、野生型マウスと骨格筋肥大マウスの骨格筋から miRNA を抽出して、骨格筋特異的 miRNA を中心として、定量 PCR を行なった。

5. 脂肪細胞分化能を有する間葉系前駆細胞の同定

マウス骨格筋を酵素処理して単核細胞とし、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、骨格筋内に存在する脂肪分化能を有する間葉系前駆細胞の同定を行なった。

6. アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA 導入の治療効果の検討

24-28 週齢の筋ジストロフィーモデルマウス (変異 caveolin-3 Tg マウス) および野生型雄性マウス (C3H) の眼窩下静脈叢にマイオスタチン-siRNA とアテロコラーゲン複合体の全身投与を 2 週間の間に計 4 回行い、最終投与から 1 週間の待機期間を経た後、前脛骨筋と咬筋を摘出し、前脛骨筋では張力試験を、咬筋では形態学的ならびに組織学的解析、機能的解析を行った。

7. 筋芽細胞における Wnt4 の機能解析

C2C12 細胞における Wnt シグナルの経路について、増殖培地で培養した場合と分化培地で培養した場合の遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。また Wnt4 を恒常的に発現する細胞株を樹立し、スクラッチテストにより細胞動態の変化を分析した。

8. マウス骨格筋特異的な Wnt4 の過剰発現

培養細胞やニワトリ胚だけでなく、マウスを使って Wnt4 の機能を解析している。Wnt4 をマウスの骨格筋特異的に過剰発現させるために、組換えアデノウイルスを作成した。また 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 (MCK-Wnt4) をマウス受精卵前核に顕微注入し TG マウスの作出を試みた。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. 骨格筋における furin の機能阻害の効果

Furin 遺伝子のエクソン2の両端に loxP 配列を挿入したマウスと Myf5 プロモーター下で Cre 酵素を発現するマウスを交配することにより、筋衛星細胞において furin 遺伝子が破壊されたマウスを作出した。成長速度、握力について解析した。

10. イヌ血清 CRP 値による妊娠予測

1~7歳齢までの筋ジス保因犬29交配（妊娠25頭、不妊娠4頭）、および1~2歳齢の正常犬3交配（妊娠2頭、不妊娠1頭）について、発情出血確認後、Witness LH (Synbiotics社) を用いてLHサージを検出した。LHサージ検出から3日後と6日後に交配を実施し、1回目の交配日をDay 0とし、Day 15, 20, 25, 30, 35, 40および50に静脈採血し血清分離した。Dog C-Reactive Protein (CRP) ELISA Test Kit (Life Diagnostics社) を用いて血清CRP値を測定し、統計学的に解析した。

C. 研究結果・考察

1. Rp-29 局所投与による LGMD1C モデルマウス筋萎縮性ミオパチーの改善

10 週齢 LGMD1C モデルマウス前脛骨筋へ Rp-29 を単回局所投与した。2 週間後の下腿 CT で前脛骨筋最大横断面積 (CSA) は用量依存性に増大が認められた。前脛骨筋の筋重量解析でも同様に用量依存性に増大が認められ最大 20% の筋重量の増大を達成した。Rp-29 局所投与によって LGMD1C モデルマウスの筋萎縮性ミオパチーが改善することが明らかとなった。マイオスタチン阻害による筋肥大は、筋線維のサイズ増大によると報告されていることから、筋線維断面積 SMA を測定したが筋線維サイズの有意な増大を認めた。

2. 低分子 T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞融合・分化の促進

T β RI kinase 阻害剤 (Ki 化合物) を最終濃度 20 μ M となるように培養上清に添加したところ、多

核の筋管細胞が増加した。fusion index はコントロールと比較して有意に増加し、阻害剤による筋芽細胞融合促進作用が証明された。また分化 7 日-14 日で筋分化マーカーであるマイオジェニン (myogenin) 及びクレアチンキナーゼ (CK) の発現は添加群で有意に増加し、筋分化促進作用が認められた。

3. ホリスタチン誘導分子 FS-N のマイオスタチン阻害活性の解析

ホリスタチン由来のマイオスタチン阻害分子 FSI-I の C 末端欠損体に相当する FS-N は、マイオスタチン阻害活性を保持していた。結合解析ではアクチビンにも親和性を示すが、アクチビン阻害活性は検出されなかった。FS-N の N 末端変異体は、マイオスタチン阻害活性が消失することから、N 末端部分は、マイオスタチン阻害に重要であり、N 末端部分が FS ドメイン 1 と共にマイオスタチンとの相互作用と阻害活性に重要であることが示唆された。なお、FS-N 分子とキメラ型の FSI-I 分子のマイオスタチン阻害効果は同程度であった。

4. マイオスタチン阻害による骨格筋 miRNA 発現変動の解析

マイオスタチン阻害によって変動が見られる miRNA の解析では、骨格筋特異的 miRNA の内、miR-133 には変化は検出されなかったが、miR-206 は 2 倍程度の発現上昇が確認された。miR-206 は、MyoD によって発現誘導され、骨格筋分化を促進させることが知られている。

5. 骨格筋内の間葉系前駆細胞の同定

骨格筋の中の血管近傍の間質に、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体 α 陽性 (P α^+) Sca-1 陽性 CD31 陰性 CD45 陰性 integrin α 7 陰性の特徴を有する間葉系前駆細胞を同定した。同定した細胞は脂肪細胞へ効率よく分化し、BMP 刺激ではアルカリホスファターゼ陽性細胞に分化し、TGF- β 刺激では平滑筋様細胞に分化するなど多分化能を有するが、骨格筋分化は示さない。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞や内皮細胞とは異なっ

た細胞であった。移植実験を行なったところ、生体内の細胞環境に応じて独特な機能を発揮する細胞である事が解析された。

6. マイオスタチン siRNA 導入による筋張力の改善効果

変異 caveolin-3Tg マウスに対する全身投与では投与前後での体重、握力には有意差がなかったが (Fig. 2)、caveolin-3Tg マウスにおいて張力検査による筋機能解析の結果、Mst-siRNA とアテロコラーゲン複合体投与群において対照群の約 3 倍の張力増加が見られた。また、その回復した張力は野生型 (C3H) マウスの約 55% に達することが認められた。

7. 筋芽細胞株における Wnt シグナル経路の解析

Wnt ファミリーの β カテニン経路への影響を調べたところ、Wnt4 の β カテニン経路に対する作用は見られず、逆に Wnt3a による β カテニン経路の促進に対して拮抗することがわかった。また、恒常的に Wnt4 を発現する C2C12 細胞株を樹立したところ、増殖培地での増殖速度が 1/2 以下に低下し、同時に自発的な筋分化が見られた。

8. Furin コンディショナルノックアウトマウスの作出

Furin コンディショナル変異マウス (Furin^{fllox/fllox}) と Myf5 プロモーターの制御下で組換え酵素 Cre を発現するマウス (Myf5^{Cre}) を交配し産仔を得た。Furin 遺伝子が破壊された雄マウス (Furin^{-/-}) と対照群 (Furin^{+/-}) を比べたところ、体重が 3 割ほど少なく成長速度に遅滞がみとめられた。握力も減少していることがわかった。雌マウスでは対照群との相違がないことから、性差があることがわかった。

9. 胎仔数と血清 CRP 値の相関関係

保因犬では、Day15 では血清 CRP 値と胎仔数の間に相関関係は認められなかったが、Day20~50 では、有意な正相関が認められた。特に、Day30 では、 $r = 0.8995$ 、 $p < 0.0001$ と極めて強い相関が認められた。また、正常犬についても、保因犬とほぼ同等の結果が得られた。

D. 結論

- (1) マイオスタチン阻害ペプチド Rp29 を開発し、筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋へ局所投与し、筋萎縮の有意な改善効果を確認した。
- (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には筋芽細胞の融合・分化促進作用があり、筋萎縮改善の分子基盤となっていることを明らかにした。
- (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 を開発した。さらに阻害活性は N 末端部分にあることを明らかにした。
- (4) 骨格筋内で脂肪細胞への分化能を有する間葉系前駆細胞の存在を同定し、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体 α 陽性 (P α^+) Sca-1 陽性 CD31 陰性 CD45 陰性 integrin $\alpha 7$ 陰性であることを解明した。
- (5) アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA 導入により、筋ジストロフィーモデルマウスの筋張力の大幅な改善に成功した。
- (6) 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。
- (7) 筋ジストロフィー犬のより早期の妊娠判定と胎仔数予測に血清 CRP 値が有用であることを見いだした。

E. 健康危険情報 該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal.* 7(1): 15, 2009
- 2) Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell

- proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.* 297(1): 157-164, 2009
- 3) Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, Pimentel DR, Papanicolaou KN, Panse KD, Tsuchida K, Lara-Pezzi E, Lee SJ, Walsh K. Activin A and follistatin-like3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation.* 120(16): 1606-1615, 2009
- 4) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12(2): 143-52, 2009
- 5) Ageta H, Ikegami S, Miura M, Masuda M, Migishima R, Hino T, Takashima N, Murayama A, Sugino H, Setou M, Kida S, Yokoyama M, Hasegawa Y, Tsuchida K, Aosak Ti, Inokuchi K. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learning and Memory* (in press), 2010
- 6) Murakami T, Tsuchida K, Hashida M, Imahori H. Size control of lipid-based drug carrier by drug loading. *Mol. BioSystems.* (in press) , 2010
- 7) Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K. Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuro Report.* (in press), 2010
- 8) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12: 143-52, 2010
- 9) Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens. *J. Poult. Sci.* 46: 95-99, 2009
- 10) Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S. Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. *Muscle Nerve,* 40: 815-826, 2009
- 11) Cui R, Duan XL, Anderson GJ, Qiao YT, Yu P, Qian ZM, Yoshida K, Takeda S, Guo P, Yang ZL, Chang YZ. Age-dependent expression of hephaestin in the brain of ceruloplasmin-deficient mice. *J Trace Elem Med Biol.* 23: 290-299, 2009
- 12) Guo P, Cui R, Chang YZ, Wu WS, Qian ZM, Yoshida K, Qiao YT, Takeda S, Duan XL. Hepcidin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides.* 30: 262-266, 2009
- 13) Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K. Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther.* 20: 1013-1021, 2009
- 14) Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A. CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal.* 3: 135-145, 2009
- 15) Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
- 16) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 17: 4798-4811, 2009
- 17) Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol.* 65: 667-676, 2009
- 18) Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem

cells. *FASEB J.* 23: 1907-1919, 2009

19) 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: 73-80, 2009

【欧文著書】

20) Okada T, Takeda S. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in *A Guide to Human Gene Therapy* (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ.(in press)

【和文著書】

21) 青木 吉嗣, 武田 伸一: 研修医のための神経内科診療, 新興医学出版社, 東京, 2010, pp248-252

22) 鈴木 友子, 武田 伸一: 骨格筋, 炎症・再生医学事典, 朝倉書店, 東京, 2009, pp453-456

23) 武田 伸一: モルフォリノをもちいた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, *臨床神経学*, 49: 856-858, 2009

24) 武田 伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療—エクソン・スキッピングを中心に—, *神経治療学*, Vol.26, No.6, 715-718, 2009

25) 永田 哲也, 武田 伸一: 筋ジストロフィーとエクソン・スキッピング, *生物の科学, 遺伝*, Vol.63, No.5, 84-89, 2009

26) 鈴木 友子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーに対する先端治療法の開発, *ゲノム医学*, Vol.9, No.3, 195-198, 2009

27) 矢田 英理香, 武田 伸一: iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療の展望, *難病と在宅ケア*, vol.15, No.1, 2009

2. 学会発表

1) Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y.: Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

2) 大澤 裕, 久我 敦, 林 紗織, 力丸満恵, 村上龍文, 砂田芳秀: TGF- β タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発 (第 2 報), 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009

3) 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士, 藤野雅広, 力丸満恵, 林 紗織, 村上龍文, 藤井 績: 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明, 診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 21 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.11, 2009

4) 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士, 藤野雅広, 力丸満恵, 林 紗織, 村上龍文, 藤井 績: 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2010

5) 土田邦博, 中谷直史, 上住聡芳, 常陸圭介: マイオスタチン阻害による脂肪量低下と脂肪肝抵抗性の分子機構, 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 群馬, 4.23-25, 2009

6) 池本円, 上住聡芳, 土田邦博, 深田宗一郎, 橋本有弘: Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells. 第 7 回幹細胞シンポジウム, 東京, 5.15-16, 2009

7) 上住聡芳, 深田宗一郎, 山田治基, 西野一三, 武田伸一, 土田邦博: Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. 第 7 回幹細胞シンポジウム, 東京, 5.15-16, 2009

8) Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP: Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. 91 th Annual Meeting of Endocrine Society, 6.10-13, 2009

9) Uezumi A, Fukada S, Yamada H, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. *Making Muscle in the Embryo and the Adult*. Nw York, U.S.A. 5. 28-6. 2, 2009

- 10) 中谷直史, 土田邦博: マイオスタチン機能阻害マウスにおける脂肪組織の減少, 第 14 回 アデイポサイエンス研究会, 大阪, 8.22, 2009
- 11) 上田洋司, 畠中謙, 佐藤道夫, 土田邦博, 瀬藤光利: 脳における UBL3 の機能的役割, 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.18, 2009
- 12) 土田邦博: マイオスタチン・シグナリングと骨格筋/脂肪組織の相互作用 ワークショップ「細胞による機械的ストレス感知の分子機構」, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.10, 2009
- 13) 土田邦博, 中谷直史, 常陸圭介, 上住聡芳, 山本直樹, 山田治基, 濱田健太郎, 武田伸一, 砂田芳秀: マイオスタチン阻害による骨格筋量増加機構と脂肪細胞の動態解析, 厚労省精神・神経疾患班会議, 東京, 12.11, 2009
- 14) 川上 恵実, 木内 奈央, 田中 栄二, 野地澄晴: 慢性筋委縮疾患制圧を目指した RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究, 先端歯学スクール 2009, 淡路島, 8.28-29, 2009
- 15) 川上 恵実: 慢性筋委縮疾患制圧を目指した RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. Tokushima Bioscience Retreat 2009, 小豆島, 9.17-19, 2009
- 16) E Kawakami, N Kinouchi, T Adachi, Y. Osawa, N Ishimaru, H Ouchji, Y Sunada, Y Hayashi, E Tanaka, S Noji: Strategic study atelocollagen-mediated application of myostatin-targeting siRNA for therapeutic use for muscular atrophy diseases. QOL International Symposium 2010, 新潟, 2.9-10, 2010
- 17) 足立太郎, 古谷拓磨, 石丸直澄, 林良夫, 大内淑代, 野地澄晴: 色素細胞刺激ホルモン受容体 Mc1r の毛周期制御機構への影響. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.9-12, 2009
- 18) 田中伸吾, 高田温行, 本康弘, 寺田久美子, 三椏聡美, 西松伸一郎, 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 4 報-, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月, 2009
- 19) Nishimatsu S, Tanaka S, Kiyonari H, Hayashibara Y, Aizawa S, Ohsawa Y, Sunada Y, 20) Nohno T: Muscle mass regulation by myostatin signaling related molecules. 第 8 回 日仏筋ジストロフィーシンポジウム (Paris, France) 2009 年 7 月
- 【特別講演・シンポジウム】
- 21) Takeda S: Potential of muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.12, 2009
- 22) Takeda S: The dystrophic dogs as an excellent animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.10, 2009
- 23) Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.4, 2009
- 24) Miyagoe-Suzuki Y, Motohashi N, Yada E, Segawa M, Wang B, Harano C, Masuda S, Yoshida M, Takeda S: Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.3, 2009
- 25) Takeda S: Exon skipping, Panel introductions and Project summaries: Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6.26, 2009
- 26) Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
- 27) Takeda S: Significance of the dystrophin-glycoprotein complex that connects the cytoskeleton to the basal lamina. Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, 6.6, 2009
- 28) Takeda S: Plenary Lecture: Advances of Molecular Therapy Research on Dystrophin-deficient Muscular Dystrophy. 8th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC), Mumbai, India, 5.23, 2009

- 29) 鈴木 友子、武田 伸一: Molecular and cellular mechanisms of mechanosensing nNOS regulates skeletal muscle mass, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 30) 鈴木 友子, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 鈴木 直輝: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は骨格筋の可塑性の制御因子である, 第 17 回日本運動生理学会大会 シンポジウム V: 骨格筋の可塑性, 東京, 7.26, 2009
- 31) 武田 伸一: 筋疾患のトランスレーショナルリサーチ (基礎から臨床へ), シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」, 第 52 回日本神経化学学会大会, 伊香保, 6.24, 2009
- 32) 武田 伸一: 遺伝子治療と再生医療, 筋ジストロフィーの遺伝子治療~エキソスキッピングを中心に, 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009
- 33) 武田 伸一: 難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ, モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.21, 2009
- 34) 武田 伸一: 遺伝子治療の夢と現実, 第 6 回日本神経学会生涯教育講演セミナー, 仙台, 5.19, 2009
- 【国際学会】
- 35) Segawa M, Wang B, Harano C, Suzuki Y, Matsuda R, Takeda S: Generation and muscle differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice. (poster) Keystone Symposia: Stem cell differentiation and dedifferentiation. , Keystone Resort, Keystone, Colorado, February 15 - 20, 2010
- 36) Imamura M, Takeda S: Searching for Loss of Imprinting of the ϵ -Sarcoglycan Gene in Cells of ϵ -Sarcoglycan Partial Knockout Mice. Poster, The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, San Diego, USA, 12.10, 2009
- 37) Takeda S: Rodent vs. “Large Animal” models, Animal models assessment session, Bringing down barriers—translational medicine in inherited neuromuscular diseases, TREAT-NMD NIH International Conference, Brussels, Belgium, 11.18, 2009
- 38) Yokota T, Takeda S: PMO and PPMO in the dystrophic dog. CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) annual meeting, Washington D.C., USA, 11.7, 2009
- 39) Nakamura A, Kobayashi M, Yuasa K, Yugeta N, Takeda S: The opening of pulmonary respiration resulted in muscle degeneration of diaphragm in canine X-linked muscular dystrophy. Poster, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
- 40) Ito N, Ampong BN, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Neuronal nitric oxide synthase is an essential mediator for muscle hypertrophy, International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 7.29, 2009
- 41) Yada E, Harano C, Motohashi N, Segawa M, Wada MR, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adultmdx mice, 7th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Barcelona, Spain, 7.9, 2009
- 42) Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S: Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy for muscular dystrophy using normal primates. American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009
- 【一般学会】
- 43) 伊藤 尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤 明, 鈴木 友子, 武田 伸一: Neural nitric oxide synthase is an essential mediator for early stage of muscle hypertrophy, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 44) 瀬川 亮, 王 博, 原野 千加, 鈴木 友子, 松田 良一, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と筋分化条件の検討, 第 32 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
- 45) 笠原 優子, 喜納 裕美, 西山 章代, Jin-Hong Shin, 大島 幸子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞

の骨格筋分化誘導と細胞移植治療, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 10.26, 2009

46) 岡田 尚巳, 喜納 裕美, 笠原 優子, 岡田 浩典, 武田 伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009

47) 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 永田 哲也, 中村 昭則, 武田 伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009

48) Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S: Effective AAV8 vector-mediated microdystrophin transduction of skeletal muscles in normal primate, Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009

49) Kasahara Y.N, Kinoh H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama SO, Maeda MW, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesencymal stromal cells in dog, Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009

50) 中村 昭則, 小林 正典, 武田 伸一: 筋ジス犬新生仔劇症型の病態機序に関する検討, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009

青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: Mdx52 を用いたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの前臨床研究, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009

【その他】

51) 高橋 明男, 小林 正典, 八幡 由美子, 北 秀樹, 市川 慎一, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: イヌ血清 CRP 値を用いた早期妊娠診断および胎仔数との関連性, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

52) 万年 英之, 松本 大和, 笹崎 晋史, 藤原 哲, 市原 伸恒, 菊池 建機, 中村 昭則, 今村 道博, 武田 伸一: ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子の同定と発症機序の解明, 厚生労働省精神・神経疾患

研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

53) 武田 伸一, 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

54) 山元 弘, 深田 宗一朗, 森川 大亮, 伊藤 尊仁, 山口 賢彦, 辻川 和丈, 鈴木 友子, 武田 伸一: mdx の病態・機能に与える遺伝背景の影響, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

55) 上住 聡芳, 深田 宗一朗, 山元 弘, 山田 治基, 武田 伸一, 土田 邦博: 骨格筋に内在する間葉系前駆細胞の解析, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

56) 裏出 良博, 有竹 浩介, 鎌内 慎也, 林 正裕, 永田 奈々恵, 小林 正典, 中村 昭則, 武田 伸一: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発, ~プロスタグランジン D2 をターゲットとした筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減と尿中代謝物を対象とした病態進行マーカーの開発~, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

57) 武田 伸一, 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009

58) 武田 伸一, 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 永田 哲也, 大澤 真木子: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009

59) 横田 俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge, 小林 正典, 浦澤 延幸, 中村 昭則, Ryszard Kole, Peter Szani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田 伸一: 新世代モルフォリノによる筋ジストロフィー治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009

60) 若尾 義人, 高野 裕史, 藤井 洋子, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: Speckle Tracking Echocardiography を用いた CXMDJ 犬および保因犬の左室心筋局所機能評価, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009

61) 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009

62) 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 大澤 真木子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009

63) 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子, 武田 伸一: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009

64) 武田 伸一: RNA splicing を標的とした神経筋疾患の治療戦略, 厚生労働省化学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班, 平成 21 年度ワークショップ, 東京, 7.31, 2009

65) 武田 伸一: 筋ジストロフィーの治療研究の進歩, 筋ジストロフィーという病気をもっと知ろう, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー集学的治療と均てん化に関する研究 (神野班), 特別講演, 平成 21 年度 第一回筋ジストロフィーに関する市民公開講座, 名古屋, 7.18, 2009

66) 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 第 13 回 3 施設合同研究発表会, 東京,

6.16, 2009

67) 武田 伸一: 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究, 第 46 回筋ジストロフィー協会全国大会, 東京, 5.17, 2009

マイオスタチン阻害ペプチドの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

骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンの機能阻害によって骨格筋量は増大しジストロフィン筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋病変は改善する。我々はマイオスタチン転写活性についての *in vitro* アッセイシステムを開発して、マイオスタチンプロドメインのうち 29 アミノ酸から構成される部分にマイオスタチン活性阻害中心が存在することを示してきた。本研究では、これに相当するペプチド (Rp29) を合成してカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1C モデルマウス骨格筋に局所投与を行った。2 週間後には筋量が用量依存性に増大し、驚くべきことに最大 20% の増加を達成した。単一筋線維断面積の解析からは筋線維萎縮についても有意に改善することを証明した。また、マイオスタチンの細胞膜受容体である TGF- β タイプ I セリン・スレオニン膜キナーゼ受容体を標的とする低分子医薬 (Ki 化合物) の経口投与によって LGMD1C モデルマウスの萎縮性ミオパチーが著明に改善するが、その分子機構として、筋芽細胞から筋管細胞への融合・分化の促進作用が認められることを明らかとした。今後は、マイオスタチン阻害ペプチドの全身投与方法の確立を目指すとともに、低分子キナーゼ阻害薬の臨床応用に向けて検討を行っていく。

A. 研究目的

マイオスタチンは骨格筋に特異的に発現する TGF- β ファミリー分子で、ノックアウトマウスが著明な骨格筋肥大を呈することから、強力な骨格筋萎縮作用があると考えられている。我々が作出したカベオリン-3 欠損肢帯筋ジストロフィー (LGMD) 1C モデルマウスは、著明な筋萎縮をその表現型とするが、骨格筋マイオスタチンシグナルの活性化が認められ、マイオスタチン阻害によって筋萎縮が劇的に改善した。更に正常筋細胞ではカベオリン-3 はマイオスタチンシグナルを上流で抑制する分子であることが明らかとなった (Ohsawa Y, et al. *J Clin Invest* 116:2924-2934, 2006)。我々はこの LGMD1C マウスをモデルとして、合成ペプチド及び低分子医薬を用いたマイオスタチン阻害治療法を開発して最終的には臨床応用を行うことを目的として本研究を進めてきた。

合成ペプチド療法の候補として、我々はマイオスタチンプロドメインに着目した。プロドメインはマイオスタチンの 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を強力に抑制する

生理作用がある。我々はこれまでに、*in vitro* のマイオスタチンアッセイ系として、マイオスタチン刺激による HEK293 ヒト胎児腎細胞系を開発した。この系にプロドメインの様々な領域に相当する合計 26 種類の cDNA を共発現してマイオスタチン活性を測定した。その結果、29 アミノ酸残基からなる特定の領域に強力なマイオスタチン活性阻害作用があることを発見した。この領域に相当するペプチド (Rp29) を合成して、アッセイ系に添加しても同様に *in vitro* のマイオスタチン活性阻害作用が認められた。そこで、本年度はこの阻害ペプチドを LGMD1C モデルマウス骨格筋に局所投与を行うことによって、*in vivo* のマイオスタチン活性阻害作用、筋萎縮性ミオパチーの改善作用について解析を行った。

一方、低分子医薬の候補として、我々はマイオスタチンの細胞膜受容体である タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体 (ALK5) に対する低分子キナーゼ阻害剤 (T β RI kinase 阻害剤) を考えた。T β RI kinase 阻害剤はマイオスタチンのみでなく

TGF- β 1 など関連 TGF- β ファミリー分子への広範阻害作用があり、TGF- β 1 による癌促進作用に拮抗する分子標的治療薬として世界中で様々な化合物が開発競争されている。我々はこれまでに、HEK293-pGL3-(CAGA)12 アッセイ系を用いて様々な T β RI kinase 阻害剤を検討しマイオスタチン活性阻害作用が最も強い Ki 化合物を選択した。更にこの Ki 化合物の経口投与によって、野生型マウスでは骨格筋が肥大し、LGMD1C モデルマウスでの骨格筋病変の改善作用が認められることを明らかとしてきた。本年度はこの低分子化合物をマウス筋芽細胞 C2C12 分化系に添加することによって、なぜ筋量が増大し筋萎縮が改善するのかについての分子機構について検討を行った。

B. 研究方法

Rp-29 の筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋への局所投与と解析

N-末端に細胞膜透過配列を付加した 29 アミノ酸残基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、10 週齢 LGMD1C モデルマウスの右前脛骨筋に局所投与を行った。Rp-29 を右前脛骨筋に 50、100、及び 200 μ g 投与し、2 週間後に、全身麻酔下で下腿中央部の CT 撮影を行い、前脛骨筋断面積 (CSA) を測定し解析した (各 n=7)。左前脛骨筋には 29 アミノ酸残基の配列を逆向きに並べた Rev-Rp-29 をコントロールとして局所投与した。CT 撮影後に、左右前脛骨筋を採取して、筋重量を測定した後、凍結標本とした。免疫組織染色画像をもとに、単一筋線維断面積 (Single-myofiber area, SMA) を測定し (1 個体あたり 2,000 筋線維, n=7) し、統計学的に解析した。また、マイオスタチンの標的遺伝子である p21 の遺伝子発現について、総 RNA を単離して解析した。

低分子 T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞分化系の解析

単核であるマウス筋芽細胞 C2C12 は、10%胎児牛血清培地から 2%ウマ血清に交換することによって、次第に細胞膜が融合して多核となって、筋管細胞様

に形態変化を起こし分化していくことが知られている。この *in vitro* 細胞融合・分化系に T β RI kinase 阻害剤である Ki 化合物を添加することによる筋融合及び筋分化作用への影響について、解析をおこなった。まず Ki 化合物の濃度について条件設定をおこない、0.5-30 μ M までは用量依存性に細胞融合・分化が促進することを確認した。20 μ M に条件を統一し、細胞形態、ライトギムザ染色による細胞融合指数 (fusion index) 解析を行った。次いで筋分化マーカーであるマイोजェニン (myogenin) 及びクレアチンキナーゼ (CK) の発現について、免疫組織化学的に解析を行った。

(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 局所投与による LGMD1C モデルマウス筋萎縮性ミオパチーの改善

10 週齢 LGMD1C モデルマウス前脛骨筋へ Rp-29 を一回局所投与した。2 週間後の下腿 CT ではコントロールと比較して前脛骨筋最大横断面積 (CSA) は、50 μ g < 100 μ g < 200 μ g の順で、用量依存性に増大が認められた (200 μ g 投与群: コントロール 6.57 \pm 0.37 mm², Rp-29 7.42 \pm 0.53 mm²)。前脛骨筋の筋重量解析では、コントロールと比較して、同様に用量依存性に増大が認められ、200 μ g 投与群で最大 20% の筋重量の増大を達成した (コントロール 40.2 \pm 1.3 mg, Rp-29 投与 48.7 \pm 3.8 mg)。Rp-29 局所投与によって LGMD1C モデルマウスの筋萎縮性ミオパチーが改善することが明らかとなった。マイオスタチン阻害による筋肥大は、筋線維のサイズ増大によると報告されていることから、SMA を測定した。Rp-29 200 μ g 投与群では、SMA はコントロール 575.7 \pm 60.8 μ m²、に対して、752.5 \pm 93.6 μ m² と有意に筋線維サイズの増大が認められた。

低分子 T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞

融合・分化系促進

T β RI kinase 阻害剤 (Ki 化合物) を最終濃度 20 μ M となるように培養上清に添加したところ、無添加コントロールと比較して、多核の筋管細胞が増加した。fusion index はコントロールと比較して有意に増加し、阻害剤による筋芽細胞融合促進作用が証明された。また分化 7 日・14 日で筋分化マーカーであるマイオジェニン (myogenin) 及びクレアチンキナーゼ (CK) の発現は添加群で有意に増加し、筋分化促進作用が認められた。

D. 考察及び今後の課題

本研究では、マイオスタチンに対する特異的阻害として、プロドメインの阻害活性中心に相当する 29 アミノ酸残基からなる合成ペプチド治療法がカベオリン-3 欠損筋ジストロフィー病変を改善することが明らかとなった。今後は、このペプチドの全身投与によってカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーが改善するか否かについて詳細に条件設定を行い、この阻害ペプチド療法の可能性について解析を進めていく。

一方、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として、T β RI kinase に対する分子標的治療法が考えられる。これまでの我々の検討からカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーの筋萎縮筋力低下を改善することが示されていたがその分子機構は明らかではなかった。今回この阻害剤が、マウス筋芽細胞 C2C12 のウマ血清による細胞融合と筋分化に対して促進作用を有することが明らかとなった。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、正常人の老化による筋萎縮などにも広く適応がある可能性が示され、今後は長期投与の安全性も考慮した前臨床研究を検討する必要がある。

E. 結論

独自に開発したプロドメイン由来阻害ペプチドの局所投与によって、カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーモデルマウスの筋病変が用量依存性に改善した。

また、マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子を阻害する T β RI kinase 阻害剤によって筋芽細胞の細胞融合及び筋細胞分化が促進することが示された。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. Cell commun signal 7:15, 2009

2. 学会発表

Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y. Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, Geneve, Switzerland, 9.11.2009

大澤 裕、久我 敦、林 紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀 : TGF- β タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発 (第 2 報), 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11.2009

砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績 : 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 21 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.11.2009

砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績 : 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9.2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし。

研究要旨

筋ジストロフィー等の難治性筋疾患の病態の進行を阻止するには、筋萎縮を防ぐと共に筋再生を促進し、骨格筋の脂肪変性を抑制する治療法を開発することが罹患患者のコンプライアンスの改善のため極めて重要である。マイオスタチン阻害療法はこういった観点からみて極めて有望な治療法の一つである。また、筋疾患で見られる骨格筋や心筋の脂肪変性が生じる分子機構を把握し阻止する治療法を開発することは、重要課題である。本研究では、マイオスタチン阻害活性を有する蛋白質を設計し、マイオスタチン阻害効果を詳細に検討した。マイオスタチン阻害によって、骨格筋、脂肪組織の間で脂肪細胞の動態が制御されている事を示して来た。こうした知見を基に、骨格筋や心筋で脂肪変性に寄与する間葉系前駆細胞の解明に取り組んだ。骨格筋にこれまで未同定であった多分化能を持つ間葉系前駆細胞が存在し、骨格筋形成と脂肪細胞産生のバランスを制御していることを見出した。同定細胞は、筋ジストロフィー患者の骨格筋で脂肪変性を担う細胞であり、新しい治療標的細胞となる可能性が高い。

A.研究目的

本研究の一つの目的は、筋ジストロフィーの治療法の実現に向けて、マイオスタチン阻害分子を開発し、その有用性を検討することにある。これまでの国内外の研究で、マイオスタチンを阻害する手法として、モノクローナル抗体、点変異型マイオスタチン前駆体ペプチド、可溶性マイオスタチン II 型受容体 (soluble ActRIIB)、I 型 TGF- β 受容体キナーゼ阻害剤、マイオスタチンの siRNA 等が研究されている。我々は、フォリスタチン分子に強いマイオスタチン阻害活性があることに着目し、数種のフォリスタチン改変体を構築してきた。その中で、キメラ型の FSI-I 分子や天然分子に近い構造の FS-N が、アクチビン阻害がなく、マイオスタチンを効率よく阻害することを示して来た。上記分子の過剰発現マウスを作製し、筋肥大が生じる事、筋ジストロフィーモデルマウスと交配すると筋内への細胞浸潤が軽減されることを示して来た。マイオスタチン阻害分子の精製に取り組み、マウスの投与で実際に筋量の増加効果があるかの検証を推進させてきた。本研究では、マイオスタチン阻害分子をより詳しく解析し、阻害活性に重要な領域の同定を行なった。

マイオスタチン阻害によって筋肥大が生じる詳細な分子機構は未解明である。近年、骨格筋の分化に小さな RNA (miRNA) が関与することが示されて

いる。そこで、マイオスタチン阻害により発現変動が見られる miRNA の解析に取り組む研究を計画した。

マイオスタチン阻害によって、骨格筋肥大が生じると共に、脂肪細胞の肥大化が阻止されることが分かったため、その分子基盤を明らかにする研究を計画した。高脂肪食負荷で生じる脂肪肝の形成、脂肪酸の組成変化を詳しく解析してきた。本研究では、さらに、筋疾患の病態生理の解明の一環として、骨格筋内に生じる異所性脂肪変性を担う細胞を同定することで、筋ジストロフィーの新たな細胞標的を探索する研究に着手した。骨格筋の萎縮と共に、脂肪変性や繊維化が生じ、筋形成と脂肪形成のバランスに破綻を来す。脂肪変性の基になる細胞の同定は筋疾患の病態解明に大きな進歩を与えると考えられる。

B.研究方法

フォリスタチン由来のマイオスタチン阻害分子の一つである FS-I-I の N 末端欠損変異体や C 末端変異体を作製し、マイオスタチン阻害活性を比較検討した。活性評価は、ヒト横紋筋肉腫由来の A204 細胞を用いたルシフェラーゼ活性法を用いた。

マイオスタチン阻害による miRNA の発現変動を調べるために、野生型マウスと骨格筋肥大マウスの骨格筋から miRNA を抽出して、骨格筋特異的

miRNA を中心として、定量 PCR を行なった。

骨格筋内に脂肪変性を引き起こす細胞の同定に関しては、ここ数年精力的に取り組んで来た。具体的には、マウスの骨格筋を採取し単核細胞を得るために酵素処理を施した後に、様々な表面抗原(CD31, CD45, CD90, integrin α 7, PDGF 受容体 α , Sca-1 等) に対する抗体を用いた FACS 解析とセルソーターによる分画と分化培養を行なった。筋内への移植実験を行ない生体内での脂肪分化能を精査した。倫理審査を得て入手したヒト骨格筋細胞の抗体染色を行ない、ヒト骨格筋での局在を検証した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた解析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いるため問題ないと判断出来る。

C. 研究結果

フォリスタチン由来のマイオスタチン阻害分子 FSI-I の C 末端欠損体に相当する FS-N は、マイオスタチン阻害活性を保持していた。結合解析ではアクチビンにも親和性を示すが、アクチビン阻害活性は検出されなかった。FS-N の N 末端変異体は、マイオスタチン阻害活性が消失することから、N 末端部分は、マイオスタチン阻害に重要であり、N 末端部分が FS ドメイン 1 と共にマイオスタチンとの相互作用と阻害活性に重要であることが示唆された。この結果は、最近、報告されたマイオスタチンとフォリスタチンの結晶構造解析とも一致している。なお、FS-N 分子とキメラ型の FSI-I 分子のマイオスタチン阻害効果は同程度であった。

マイオスタチン阻害によって変動が見られる miRNA の解析では、骨格筋特異的 miRNA の内、miR-133 には変化は検出されなかったが、miR-206 は 2 倍程度の発現上昇が確認された。miR-206 は、MyoD によって発現誘導され、骨格筋分化を促進させることが知られている。

骨格筋内に生じる異所性脂肪変性を担う細胞の同定に関しては、骨格筋の中の血管近傍の間質に、これまで存在が知られていなかった間葉系前駆細胞を同定した。同定した細胞は、血小板由来増殖因子(PDGF)受容体 α 陽性(P α^+) Sca-1 陽性 CD31 陰性 CD45 陰性 integrin α 7 陰性で、脂肪細胞へ効率よく分化する。BMP 刺激ではアルカリホスファターゼ陽性細胞に分化し、TGF- β 刺激では平滑筋様細胞に分化するなど多分化能を有するが、骨格筋分化は示さない。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞や内皮細胞とは異なった細胞であった。移植実験を行なったところ、生体内の細胞環境に応じて独特な機能を発揮する細胞である事が解析された。つまり、筋再生環境下では、P α^+ 細胞は増殖し、筋形成を促す。一方、脂肪変性条件下では同定細胞自体が脂肪細胞に分化する。筋繊維と共培養すると脂肪分化は抑制された。ヒトの骨格筋においても、間質での存在が確認された。筋ジストロフィーにおいて骨格筋組織に沈着する脂肪細胞を供給する細胞である可能性が示唆される。新たな筋疾患治療の標的を見出したと言える。

その他、フォリスタチンが、アクチビン及びマイオスタチンの阻害を介して、筋衛星細胞の増殖を促し、筋肥大させる事やアクチビンと FLRG が心臓の虚血に対する感受性の決定に重要であることを示した。

D. 考察

マイオスタチンは、ヒトにおいても筋量を調節させる効果があることから、筋萎縮を防止する筋疾患の治療法として、有望な治療法と考えられている。エクソンスキッピング療法や細胞移植治療などと組み合わせるとより効果があると考えられている。実際に、最近、国外のグループから、マイオスタチン II 型受容体である AcvRIIB に対する RNA 干渉と遺伝子治療ベクターを用いたエクソンスキッピングの併用で mdx マウスの筋力が上昇する事や、AAV1 ベクターを用いた霊長類(マカクザル)へのフォリスタチンアイソフォームの発現が筋肥大と筋力増強効果があるといった報告が相次いで報告されている。

我々も、本研究成果で示したように、フォリスタチン由来の分子で筋疾患の治療効果を確認しており、臨床応用に向けた研究をさらに推進させていく予定である。

マイオスタチン阻害で発現する miRNA として miRNA-206 を含めて発現変動が見られる複数の miRNA を検出した。miRNA-206 の標的としては、フォリスタチン様分子(FSTL1)、HDAC4、コネクシン 43、ミオシン重鎖などが知られている。miR206 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態進行を遅らせ、神経筋接合部の再生をも促す事が報告されている。マイオスタチン阻害で筋再生を促す miRNA の有力候補と考えられる。筋ジストロフィーに対しては、マイオスタチン阻害の下流で上方に発現誘導され、筋肥大を担う分子である可能性が示唆される。miRNA-206 以外に発現変動する miRNA についても、分子標的の同定等を含めた解析を推進する予定である。

マイオスタチン阻害で脂肪量が減少することを基に展開させた、骨格筋内に脂肪変性を惹起する細胞の同定に関しては、時間をかけ詳細な解析を行ってきた。本年度、評価の高い英文雑誌に成果として公表する事ができた。Nature cell biology 誌の News and Views に取り上げられ、筋形成と脂肪細胞形成のバランスを制御する新しい細胞で、筋ジストロフィーの新たな治療標的細胞である事が認知された。

E. 結論

マイオスタチン阻害療法は、ジストロフィーのエクソンスキッピング、リードスルー療法、細胞移植療法等と共に、筋疾患の有望な治療法の一つである。米国を中心に行なわれたマイオスタチンのモノクローナル抗体 Myo-029 の臨床治験は、安全性は確認されたものの、効果は限定的であった。抗体以外の治療薬の開発も急務と考えられる。フォリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子の詳細な解析を行ない、臨床応用に向けた研究に発展させていきたいところである。本年度は、マイオスタチン阻害による筋肥大の作用機序解明の一端を明らかにするた

めに、miRNA の解析を取り入れた研究を行なった。さらに、骨格筋内に存在する新たな間葉系細胞を同定し、脂肪沈着に寄与したり、骨格筋形成と脂肪細胞形成のバランスを調節する細胞である事が解明された。分子標的治療法と細胞標的治療の統合が今後の課題の一つである。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

K. Tsuchida, M. Nakatani, K. Hitachi, A. Uezumi, Y. Sunada, H. Ageta, K. Inokuchi. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal.* 7(1),15 (2009)

H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K. Tsuchida, J. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.* 297(1), 157-164 (2009)

Y. Oshima, N. Ouchi, M. Shimano, D.R. Pimentel, K.N. Papanicolaou, K.D. Panse, K. Tsuchida, E. Lara-Pezzi, S.-J. Lee, K. Walsh. Activin A and follistatin-like3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation* 120(16), 1606-1615 (2009)

A. Uezumi, S. Fukada, N. Yamamoto, S.I. Takeda, K. Tsuchida. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2), 143-152 (2009)

H. Ageta, S. Ikegami, M. Miura, M. Masuda, R. Migishima, T. Hino, N. Takashima, A. Murayama, H. Sugino, M. Setou, S. Kida, M. Yokoyama, Y. Hasegawa, K. Tsuchida, T. Aosaki, K. Inokuchi. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learning and Memory* (in press)(2010)

T. Murakami, K. Tsuchida, M. Hashida, H. Imahori. Size control of lipid-based drug carrier by drug loading. *Mol. BioSystems.* (in press) (2010)

2. 学会発表

土田邦博、中谷直史、上住聡芳、常陸圭介 マイオスタチン阻害による脂肪量低下と脂肪肝抵抗性の分子機構 第82回日本内分泌学会学術総会 群馬、4月23-25日 (2009)

池本円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘 Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日 (2009)

上住聡芳、深田宗一郎、山田治基、西野一三、武田伸一、土田邦博 Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日 (2009)

H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K.

Tsuchida, J.P. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. 91 th Annual Meeting of Endocrine Society. June 10-13 (2009)

A. Uezumi, S. Fukada, H. Yamada, S. Takeda, K. Tsuchida. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. Making Muscle in the Embryo and the Adult. Nw York, U.S.A. May 28-June 2 (2009)

中谷直史, 土田邦博 マイオスタチン機能阻害マウスにおける脂肪組織の減少 第14回 アデipoサイエンス研究会 大阪、8月22日(2009)

上田洋司, 畠中謙, 佐藤道夫, 土田邦博, 瀬藤光利 脳における UBL3 の機能的役割 第32回日本神経科学大会 名古屋、9月18日(2009)

土田邦博 マイオスタチン・シグナリングと骨格筋/脂肪組織の相互作用 ワークショップ「細胞による機械的ストレス感知の分子機構」 第32回日本分子生物学会年会 横浜、12月10日(2009)

土田邦博, 中谷直史, 常陸圭介, 上住聡芳, 山本直樹, 山田治基, 濱田健太郎, 武田伸一, 砂田芳秀 マイオスタチン阻害による骨格筋量増加機構と脂肪細胞の動態解析 厚労省精神・神経疾患班会議 東京、12月11日(2009)

マイオスタチンに対する RNA 干渉法による発現抑制法に関する研究

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

RNAi を慢性筋委縮疾患である筋ジストロフィーの治療に応用することを最終目的として、筋ジストロフィーモデル雄性マウス咬筋に対して骨格筋形成抑制遺伝子マイオスタチンの siRNA とアテロコラーゲンの複合体を局所投与し、咬筋における RNAi 効果を検討した。また全身投与することによって咬筋だけでなく、前頸骨筋での RNAi 効果を検討し、機能的解析を行った。臨床応用考慮に入れ、siRNA とアテロコラーゲン複合体のコスト面での問題点を改善するにあたって、アテロコラーゲンの代替となり得る安価で安全性のある特殊加工コラーゲンを使用した RNAi 効果の検討と siRNA による免疫系の誘導の解析を行った。

A. 研究目的

難治性疾患は症例数が少なく、原因不明で治療方法も未確立であり、かつ、生活面で長期にわたる支障がある疾患である。当研究グループは筋ジストロフィーの現実的な治療方法と臨床応用のための研究を行う。治療方法は 21 から 25 塩基対の短い short interference RNA (siRNA) を生体内に導入し、遺伝子の発現を抑制する RNAi を使用する。RNAi を非侵襲的かつ安全に臨床応用に用いるために、アテロコラーゲンをを用いた siRNA の導入機構解析と特殊処理コラーゲンでの導入試薬の検討を目的とした。

詳細には骨格筋形成抑制遺伝子であるマイオスタチン遺伝子に対する siRNA (*Mst*-siRNA) をマウスの生体内に投与することでマイオスタチンの遺伝子発現を抑制し、筋肉の発育抑制を抑えることで慢性筋委縮疾患である筋ジストロフィーの治療に応用することを最終目的として下記 4 点の解析、検討を施行した。

- 1) 筋ジストロフィーモデル雄性マウス(変異 caveolin-3Tg マウス)咬筋に *Mst*-siRNA とアテロコラーゲンの複合体を局所投与し、咬筋での RNAi 効果を検討。
- 2) 筋ジストロフィーモデル雄性マウス(変異 caveolin-3Tg マウス)に *Mst*-siRNA 全身投与することによって前頸骨筋での RNAi 効果を検討、機能的解析。
- 3) アテロコラーゲンをを用いた siRNA 導入機構を蛍光標識した scramble siRNA (scr-siRNA) とメラノコルチン 1 レセプター (*Mclr*) という毛の色を調節する遺伝子の siRNA (*Mclr*-siRNA) をマウス上皮に局所投与を行って解析。
- 4) 臨床応用でのコスト面の問題点を改善する事を

目的に、アテロコラーゲンの代替となり得る安価で安全性のある特殊加工コラーゲンを *Mst*-siRNA の導入試薬として使用して RNAi 効果を検討。

B. 研究方法

1) 24-28 週齢の筋ジストロフィーモデル雄性マウス(変異 caveolin-3 Tg マウス)および野生型(C57BL/6, C3H)雄性マウスの右側咬筋に *Mst*-siRNA とアテロコラーゲン複合体の局所投与を行い、2 週間後に咬筋を摘出し、その筋重量を測定するとともに、形態学的ならびに組織学的解析を実施した。なお、同一個体の左側咬筋を対照側として scr-siRNA とアテロコラーゲン複合体を投与し、*Mst*-siRNA 導入を行った実験側との比較を行った。

2) 24-28 週齢の筋ジストロフィーモデルマウス(変異 caveolin-3 Tg マウス)および野生型雄性マウス(C3H)の眼窩下静脈叢に *Mst*-siRNA とアテロコラーゲン複合体の全身投与を 2 週間の間に計 4 回行い、最終投与から 1 週間の待機期間を経た後、前脛骨筋と咬筋を摘出し、前脛骨筋は張力試験を、咬筋は局所投与の際と同様に形態学的ならびに組織学的解析、機能的解析を行った。全身投与における対照群は、同種マウスで体重がほぼ同じものを使用し、眼窩下静脈叢に scr-siRNA とアテロコラーゲン複合体を全身投与して比較検討した。

3) (1)Alexa555 scr-siRNA とアテロコラーゲン複合体を C57 BL/6 マウスの咬筋と皮下に局所投与し、どのように局在するかを解析した。

(2) *Mclr*-siRNA とアテロコラーゲン複合体処理群と Negative Control 群の背部上皮で以下の比較検討を行った。(2-1) 表現型 (1-2) *Mclr*mRNA 発現量 (2-3)