

**Fig. 6 – MyoD and myogenin expression in single-fiber culture of IGF-I Tg mice and WT mice. A and B.** Myofibers were isolated from EDL muscles of adult mice and cultured in 20% FBS/DMEM without VC at 37 °C (37 °C culture) or 37 °C for the first 24 h to activate the satellite cells and subsequently at 30 °C (30 °C culture). The ratios of myogenin-positive nuclei to MyoD-positive nuclei per myofiber in the 37 °C culture (A) or in the 30 °C culture (B) were calculated and are presented as the mean  $\pm$  SEM. The satellite cells of IGF-I Tg mice expressed myogenin at a higher level than those of WT mice on day 2 in the 37 °C culture and on day 4 in the 30 °C culture.  $**p < 0.01$ . C. The satellite cells on the myofibers from IGF-I Tg and WT mice in the 30 °C culture were immunostained for MyoD (arrowhead) and myogenin (arrow) 4 days after the activation. Cell nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 50  $\mu$ m.

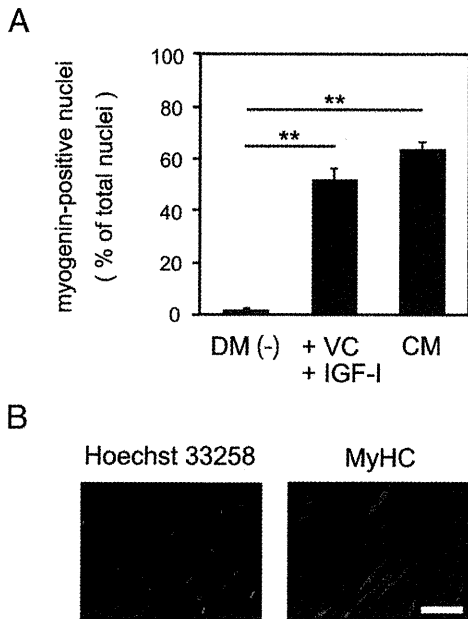
temperature, IGF-I stimulates myogenin expression through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway [29,30]. Although it has not been clear yet if IGF-I promotes myogenin expression via the identical signaling pathway at 30 °C, it is likely that the same mechanism is responsible for both temperatures. On the other hand, acting as an antioxidant, VC also plays multiple important roles *in vivo*, which includes promoting the formation of collagen matrix and proteoglycan [31]. These extracellular matrices (ECM) act as reservoirs of various cytokines and growth factors and produce microenvironments for cells *in vivo*, which commit cells to a specific differentiation fate. Our study showed that VC enhanced the effect of IGFs for myogenin expression and myotube formation at 30 °C. A conceivable mechanism of the observed synergistic effects of IGFs and VC involves the stimulation of ECM production by VC, which then serves to efficiently concentrate IGFs around cells thereby enhancing its effect. It is also possible that VC acts as a reducing agent on a signaling pathway acting downstream of IGFs and enhances myogenin expression.

We anticipate that the rescue experiments of myogenic differentiation with IGFs and VC at low temperatures will be a useful tool for the investigation of the molecular events during myogenic differentiation, which normally progresses so rapidly at

normal culture temperature that it is difficult to study the minute details of the signaling pathway. In the low-temperature cell culture system described here, the differentiation speed can be controlled by varying the culture temperature and concentrations of IGFs and VC in the culture medium and therefore each of the cell differentiation steps can be studied separately.

MicroRNAs examined in this study were reported to be involved in the regulation of myogenic differentiation or muscle regeneration [25]. It was shown that MyoD and myogenin bind the regulatory regions of miR-1, -133 and -206 and are likely to control their expressions [32]. Therefore, it is probable that IGF-I and VC promoted the expressions of these miRNAs at 30 °C as a result of rescuing myogenin expression. On the other hand, miR-181 was reported to express upstream of MyoD and to induce MyoD expression through downregulation of Hox-A11 [33]. In our study, IGF-I and VC also rescued miR-181 expression at 30 °C, suggesting that these factors might promote myogenic differentiation such as expression of miR-181 through the other signaling pathway, which was not directly activated by MyoD or myogenin.

In the single-fiber culture, satellite cells of both IGF-I Tg and WT mice expressed myogenin by day 4 at 30 °C. This trend was entirely different from C2C12 cells, which hardly expressed myogenin at 30 °C even after 10 days of culture in DM (data not



**Fig. 7 – Effects of conditioned medium of differentiated C2C12 cells at 30 °C.** A. C2C12 cells were cultured for 6 days at 30 °C in DM with or without 100 ng/ml IGF-I and 200  $\mu$ M VC or conditioned medium (CM) of C2C12 cells differentiated at 38 °C and immunostained for myogenin. Myogenin expression was rescued with CM at the same level as that with both IGF-I and VC. The percentages of myogenin-positive nuclei to the total nuclei are presented as the mean  $\pm$  SEM. **\*\* $p$  < 0.01.** B. C2C12 cells were cultured in CM for 10 days at 30 °C and immunostained for MyHC. The cells expressed MyHC but did not form multinucleated myotubes. Bar: 100  $\mu$ m.

shown). This discrepancy may have been due to the secretion of certain biological factors into the culture medium by cells associated with the isolated WT mouse myofibers other than satellite cells, such as myofibroblasts, or myofibers themselves which could rescue myogenin expression.

To confirm this hypothesis, we cultured C2C12 cells at 30 °C in conditioned medium (CM) of C2C12 cells differentiated at 38 °C and found that CM promoted myogenin expression at 30 °C at the almost same level as that with both IGF-I and VC. On the other hand, myotubes were not formed though the cells were cultured in CM for 10 days. The conceivable reason of this observation is that CM did not have sufficient nutritional quality for myotube formation or that CM contained some factors preventing myoblast fusion such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [34].

Our result demonstrates that differentiated myogenic cells secrete a factor (or factors) which can restore myogenin expression at 30 °C. Although we have yet to identify the specific factor(s), it is probable that one of the factors contained in CM is IGF-II, because skeletal muscle cells secrete IGF-II endogenously during differentiation [35,36]. It is likely that innate factors exist *in vivo* which serve as buffers to low temperature and help normal muscle cell differentiation even in parts of the body with temperatures lower than 30 °C [3].

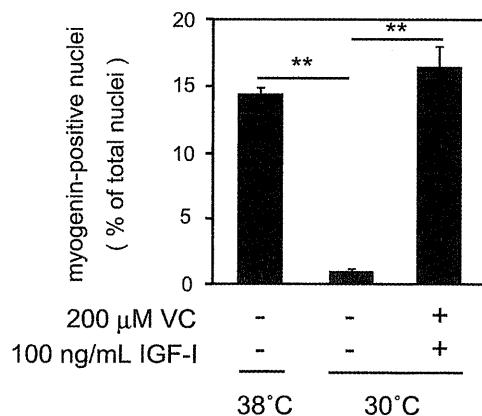
We examined whether or not human skeletal muscle cells were also inhibited to differentiate at 30 °C and further IGF-I and VC have a rescuing effect. Human cells showed the same tendency as C2C12 mouse myoblast cells, but did not form myotubes under the

culture condition described in Materials and methods. Therefore, we just evaluate their myogenin expression, which is a marker of myogenic differentiation in the early stage.

Another instance in which the body experiences low temperatures is during hypothermia treatment, which involves maintaining the body at 32–34 °C for several days and is known to be effective for improving survival and neurological outcome after brain injury, such as cerebral ischemia and hemorrhage [37], and sudden cardiac arrest [38]. The protective mechanism of hypothermia includes reduction of brain metabolism by depressing its electrical activity, inhibition of programmed cell death by reducing excitatory amino acid release and attenuating oxidative stress. However, this treatment strategy can also have negative effects for patients as the suppression of the immune system occasionally results in serious infections and death. Therefore, the administration of drugs which enhance local biological activities in patients whose body temperature are lower than 35 °C to levels observed at normal body temperature during hypothermia treatment could help to improve survival rates. As IGF-I and VC promoted differentiation of human skeletal muscle cells at 30 °C, we speculate that they may function as *in vivo* buffers to low temperatures and are good drug candidates for compensating against the defects of hypothermia treatment in not only skeletal muscles, but also in other organs.

## Conclusions

At 30 °C, mouse skeletal muscle cells neither express myogenin nor fuse into multinucleated myotubes, while the myoblasts continuously expressed Id3 and do not upregulate muscle-specific miRNAs. Human skeletal muscle cells also did not express myogenin at 30 °C. However, the low temperature-induced inhibition of myogenic differentiation is effectively alleviated by the addition of either IGFs (IGF-I and IGF-II) or VC into culture medium. Satellite cells from IGF-I overexpressing Tg mice swiftly



**Fig. 8 – Myogenin expression in human skeletal muscle cells cultured with IGF-I and VC at 30 °C.** Human skeletal muscle cells were cultured in DM at 38 or 30 °C and in DM containing 100 ng/ml IGF-I and 200  $\mu$ M VC at 30 °C for 6 days and then immunostained for myogenin. Myogenin expression in the human muscle cells was inhibited at 30 °C, but was rescued by treatment with IGF-I and VC. The percentage (%) of myogenin-positive nuclei to the total nuclei is presented as the means  $\pm$  SEM. **\*\* $p$  < 0.01.**

differentiated at both 37 and 30 °C in single-fiber culture. Our findings that IGFs and VC promote myogenic differentiation at lower temperatures than body temperature suggest that the sensitivity of myogenic cells to low temperature could be buffered by certain physiological factors *in vivo*.

## Acknowledgments

This work was supported by a Health and Labor Sciences Research Grant (19A-020) for Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health, and a Research Grant for Nervous and Mental Disorders (20B-13) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

## REFERENCES

- [1] P.R. Morrison, F.A. Ryser, Weight and body temperature in mammals, *Science* 116 (1952) 231–232.
- [2] Clarke A., Pörtner H.O., Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* (2010), published online in advance of print.
- [3] J. Aschoff, R. Wever, Kern und Schale im Wärmehaushalt des Menschen, *Naturwissenschaften* 45 (1958) 477–485.
- [4] A. Shima, R. Matsuda, The expression of myogenin, but not of MyoD, is temperature-sensitive in mouse skeletal muscle cells, *Zool. Sci.* 25 (2008) 1066–1074.
- [5] S.M. Rosenthal, Z.Q. Cheng, Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 10307–10311.
- [6] E.R. Barton-Davis, D.I. Shoturma, A. Musaro, N. Rosenthal, H.L. Sweeney, Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15603–15607.
- [7] E.R. Barton-Davis, D.I. Shoturma, H.L. Sweeney, Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle, *Acta. Physiol. Scand.* 167 (1999) 301–305.
- [8] A. Musarò, K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, G. Dobrowolny, M. Molinaro, E.R. Barton, H.L. Sweeney, N. Rosenthal, Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle, *Nat. Genet.* 27 (2001) 195–200.
- [9] J.R. Florini, D.Z. Ewton, S.L. Roof, Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression, *Mol. Endocrinol.* 5 (1991) 718–724.
- [10] D.D. Sarbassov, R. Stefanova, V.G. Grigoriev, C.A. Peterson, Role of insulin-like growth factors and myogenin in the altered program of proliferation and differentiation in the NFB4 mutant muscle cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 10874–10878.
- [11] J.R. Florini, D.Z. Ewton, S.A. Coolican, Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis, *Endocr. Rev.* 17 (1996) 481–517.
- [12] C.E. Stewart, P.L. James, M.E. Fant, P. Rotwein, Overexpression of insulin-like growth factor-II induces accelerated myoblast differentiation, *J. Cell Physiol.* 169 (1996) 23–32.
- [13] B. Peterkofsky, The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 152 (1972) 318–328.
- [14] R. Hata, H. Senoo, L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissue-like substance by skin fibroblasts, *J. Cell Physiol.* 138 (1989) 8–16.
- [15] R. Matsuda, O. Saitoh, M. Periasamy, L-ascorbic acid 2-phosphate promotes myogenesis of BC3H1 cells by activating myogenin expression, *FASEB J.* 4 (1990) A1964.
- [16] Y. Mitsumoto, Z. Liu, A. Klip, A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 394–402.
- [17] H.M. Blau, C.P. Chiu, C. Webster, Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons, *Cell* 32 (1983) 1171–1180.
- [18] D. Yaffe, O. Saxel, Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle, *Nature* 270 (1977) 725–727.
- [19] S. Decary, V. Mouly, C.B. Hamida, A. Sautet, J.P. Barbet, G.S. Butler-Browne, Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy, *Hum. Gene. Ther.* 8 (1997) 1429–1438.
- [20] C.H. Zhu, V. Mouly, R.N. Cooper, K. Mamchaoui, A. Bigot, J.W. Shay, J.P. Di Santo, G.S. Butler-Browne, W.E. Wright, Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies, *Aging Cell* 6 (2007) 515–523.
- [21] Y. Nagata, H. Kobayashi, M. Umeda, N. Ohta, S. Kawashima, P.S. Zammit, R. Matsuda, Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells, *J. Histochem. Cytochem.* 54 (2006) 375–384.
- [22] N. Kadota, A. Suzuki, Y. Nakagami, T. Izumi, T. Endo, Endogenous meltrin alpha is ubiquitously expressed and associated with the plasma membrane but exogenous meltrin alpha is retained in the endoplasmic reticulum, *J. Biochem.* 128 (2000) 941–949.
- [23] V. Riechmann, I. van Cruchten, F. Sablitzky, The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 749–755.
- [24] I.N. Melnikova, B.A. Christy, Muscle cell differentiation is inhibited by the helix-loop-helix protein Id3, *Cell Growth Differ.* 7 (1996) 1067–1079.
- [25] T.E. Callis, J.F. Chen, D.Z. Wang, MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development, *DNA Cell Biol.* 26 (2007) 219–225.
- [26] A. Mauro, Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 (1961) 493–495.
- [27] S.B. Chargé, M.A. Rudnicki, Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 209–238.
- [28] P. Zammit, J. Beauchamp, The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68 (2001) 193–204.
- [29] Q. Xu, Z. Wu, The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 36750–36757.
- [30] J. Tureckova, E.M. Wilson, J.L. Cappalunga, P. Rotwein, Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39264–39270.
- [31] M. Levine, New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid, *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 892–902.
- [32] P.K. Rao, R.M. Kumar, M. Farkhondeh, S. Baskerville, H.F. Lodish, Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 8721–8726.
- [33] I. Naguibneva, M. Ameyar-Zazoua, A. Poleskaya, S. Ait-Si-Ali, R. Groisman, M. Souidi, S. Cuvellier, A. Harel-Bellan, The microRNA *miR-181* targets the homeobox protein *Hox-A11* during mammalian myoblast differentiation, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 278–284.
- [34] R. Lafyatis, R. Lechleider, A.B. Roberts, M.B. Sporn, Secretion and transcriptional regulation of transforming growth factor- $\beta$ 3 during myogenesis, *Mol. Cell Biol.* 11 (1991) 3795–3803.
- [35] J.R. Florini, K.A. Magri, D.Z. Ewton, P.L. James, K. Grindstaff, P.S. Rotwein, "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts

- is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15917–15923.
- [36] K.M. Rosen, B.M. Wentworth, N. Rosenthal, L. Villa-Komaroff, Specific, temporally regulated expression of the insulin-like growth factor II gene during muscle cell differentiation, *Endocrinology* 133 (1993) 474–481.
- [37] S. Nagel, M. Papadakis, L. Hoyte, A.M. Buchan, Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage, *Expert Rev. Neurother.* 8 (2008) 1255–1268.
- [38] A. Janata, M. Holzer, Hypothermia after cardiac arrest, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52 (2009) 168–179.

# Muscle injury-induced thymosin $\beta$ 4 acts as a chemoattractant for myoblasts

Received September 6, 2010; accepted September 20, 2010; published online September 29, 2010

Yuka Tokura<sup>1,2,\*</sup>, Yuki Nakayama<sup>1,3,\*</sup>,  
So-ichiro Fukada<sup>4</sup>, Noriko Nara<sup>1</sup>,  
Hiroshi Yamamoto<sup>4</sup>, Ryoichi Matsuda<sup>2</sup> and  
Takahiko Hara<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Project Group, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506; <sup>2</sup>Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902; <sup>3</sup>Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8555; and <sup>4</sup>Department of Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

\*These authors contributed equally to this work.

†Takahiko Hara, Stem Cell Project Group, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan. Tel: +81 3 5316 3310, Fax: +81 3 5316 3226, email: hara-tk@igakuken.or.jp

**Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) is a major intracellular G-actin-sequestering peptide. There is increasing evidence to support important extracellular functions of T $\beta$ 4 related to angiogenesis, wound healing and cardiovascular regeneration. We investigated the expression of ‘T $\beta$ 4’ and ‘thymosin  $\beta$ 10’, a closely related peptide, during skeletal muscle regeneration in mice and chemotactic responses of myoblasts to these peptides. The mRNA levels of ‘T $\beta$ 4’ and ‘thymosin  $\beta$ 10’ were up-regulated in the early stage of regenerating muscle fibres and inflammatory haematopoietic cells in the injured skeletal muscles of mice. We found that both T $\beta$ 4 and its sulphoxized form significantly accelerated wound closure and increased the chemotaxis of C2C12 myoblastic cells. Furthermore, we showed that primary myoblasts and myocytes derived from muscle satellite cells of adult mice were chemoattracted to sulphoxized form of T $\beta$ 4. These data indicate that muscle injury enhances the local production of T $\beta$ 4, thereby promoting the migration of myoblasts to facilitate skeletal muscle regeneration.**

**Keywords:** chemotaxis/myoblast/regeneration/skeletal muscle/thymosin beta4.

**Abbreviations:** bFGF, basic fibroblast growth factor; CT, cardiotoxin; DIG, Digoxigenin; DMEM, Dulbecco’s modified Eagle’s medium; Gapdh, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ILK, integrin-linked kinase; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; TA, tibialis anterior; T $\beta$ 4, thymosin  $\beta$ 4; T $\beta$ 4so, thymosin  $\beta$ 4 sulphoxized; T $\beta$ 10, thymosin  $\beta$ 10.

Skeletal muscles are damaged and repaired daily, and support the locomotor functions of life. During muscle regeneration, various cytokines and secretory peptides are transiently produced by inflammatory immune cells and regenerating muscle fibres. These factors play an important role in the cell cycle entry of satellite cells (muscle stem cells), the differentiation of myoblasts and in myotube formation (1). Since some factors, such as insulin-like growth factor-1 (2) and vascular endothelial growth factor (3), have been reported to ameliorate the damaged skeletal muscles in mouse models of muscular dystrophy, it is important to extend our knowledge of these muscle injury-induced secretory molecules.

We and others reported previously that the expression of ‘thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4)’ mRNA is up-regulated in the skeletal muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice (4, 5) and in a *mdx*-derived myoblastic cell line (6) compared with their respective wild-type controls. T $\beta$ 4 is an N-terminally acetylated polypeptide of 4.9 kDa and contains 43 amino acid residues (7). T $\beta$ 4 sequesters intracellular monomeric G-actin and inhibits the assembly of actin fibres within cells (8). However, a substantial amount of T $\beta$ 4 is released from cells, where it serves as a paracrine factor to support angiogenesis, wound healing, hair growth and cardiac regeneration (9–14). It has been reported that T $\beta$ 4 is chemotactic for endothelial cells (9), keratinocytes (12) and cardiomyocytes (14). In contrast, T $\beta$ 4 is inhibitory for the chemotaxis of neutrophils (15). Notably, T $\beta$ 4 sulphoxide (T $\beta$ 4so), in which the sixth methionine residue is oxidized, has an even greater ability to inhibit the migration of neutrophils (15). Moreover, a closely related peptide, thymosin  $\beta$ 10 (T $\beta$ 10) (16, 17) may have similar functions to T $\beta$ 4.

Recently, two groups reported a critical role for T $\beta$ 4 and its cleavage product in cardiac regeneration (13, 14). T $\beta$ 4 was shown to be physically associated with the LIM (Lin-1, Isl-1, and Mec-3) domain protein, PINCH (particularly interesting new Cys-His protein), and with integrin-linked kinase (ILK) to activate Akt kinase in cells (13). T $\beta$ 4 promoted the survival and repair of cardiomyocytes after cardiac injury through this signalling pathway, in addition to stimulating the migration of cardiomyocytes and endothelial cells.

The expression level of T $\beta$ 4 is reported to be high in wound fluid and in regenerating tissues (18–20). Based on the fact that ‘T $\beta$ 4’ expression is up-regulated in the skeletal muscles of *mdx* mice (4, 5) and injured porcine muscles (20), we hypothesized that it may play an important role in skeletal muscle regeneration. In this study, we show that ‘T $\beta$ 4’ and ‘T $\beta$ 10’ mRNAs are induced in regenerating muscles and inflammatory haematopoietic cells. More importantly, we

demonstrate that T $\beta$ 4 serves as a chemoattractant for myoblasts.

## Materials and Methods

### Muscle injury models

First experimental model was set up as described earlier (21). Briefly, 100  $\mu$ l of cardiotoxin (CT, 10  $\mu$ M in 0.9% NaCl; Wako, Osaka, Japan) was injected into the tibialis anterior (TA) muscles of 6-week-old male C57BL/6 mice (Nihon SLC, Hamamatsu, Japan) using 27G needles. The CT-treated TA muscles were then harvested at various time points (from 6 h to 14 days), fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, frozen, sectioned and stained with haematoxylin and eosin.

Alternatively, TA muscles were quickly frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. A second muscle crush-injury model was established by puncturing the gastrocnemius muscles of 8-week-old male C57BL/10 mice (Nihon SLC) with 23G needles. At different time points (from 5 h to 14 days) after injury, the gastrocnemius muscles were isolated, frozen in liquid nitrogen and subjected to RNA extraction.

Mice were maintained under a 12-h light/dark cycle in a pathogen-free animal facility. All experimental procedures involving the mice were pre-approved by the ethical committee of the institute.

### Reverse transcription–polymerase chain reaction (PCR)

Total RNAs were prepared from skeletal muscle tissues using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Five micrograms of RNA from each sample was reverse-transcribed using the SuperScript II pre-amplification system for first strand cDNA synthesis with oligo(dT) primers (Invitrogen). Part of the cDNA mixture (1/125) was used in a PCR reaction with an annealing temperature of 56°C, ExTaq DNA polymerase (Takara, Otsu, Japan), and the following primer sets: 5'-TCTGACAAACCCGATATGGCT-3' and 5'-CGATTCGCCAGCTTGCTTCTCT-3' for detection of 'T $\beta$ 4' (PCR product: 129 bp), 5'-GCAGACAAGCCGGACATGGGG-3' and 5'-GGAGATTTCACTCCTCTTTTCC-3' for 'T $\beta$ 10' (PCR product: 129 bp) and 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCA CCACCTGTTGCTGTA-3' for 'glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase' ('Gapdh'; PCR product: 452 bp), respectively. 'Gapdh' was used as a template control. Real-time PCR was performed with SYBR<sup>®</sup> premix ExTaq II (Takara). The  $\Delta\Delta C_t$  method was used to determine relative mRNA expression levels.

### In situ hybridization

The PCR-amplified 3'-untranslated regions of the 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' cDNAs were cloned into the PCR-Script Amp SK(+) vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes were prepared by using the DIG RNA labelling kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The CT-treated TA muscles from C57BL/6 mice were dissected on the fifth day after injection and frozen in isopentane pre-cooled in liquid nitrogen. Cryostat cross sections (10  $\mu$ m) were prepared, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and treated with 1  $\mu$ g/ml proteinase K (Wako) in PBS at room temperature for 7 min. After acetylation with acetic anhydride in triethanolamine (Wako), the sections were hybridized with a DIG-labelled anti-sense or sense RNA probe at 65°C for 18 h and the signals were detected colorimetrically (22).

### Cells and reagents

Mouse myoblast-derived C2C12 cells (American Type Culture Collection, CRL-1772) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, St Louis, MO, USA) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen) and 0.5% penicillin-streptomycin (Sigma). Myotube differentiation of C2C12 cells was carried out as previously described (23). Muscle satellite cells were separated from 8-week-old female C57BL/6 mice by using SM/C-2.6 antibody as described earlier (24) and sub-cultured for 7 days in 20% fetal calf serum, human basic fibroblast growth factor (bFGF, 5 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and 0.5% penicillin-streptomycin on matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)-coated plates. SM/C-2.6<sup>+</sup> cells were sorted on a FACS Aria (BD Biosciences). Approximately 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells of SM/C-2.6<sup>+</sup> fraction were obtained from skeletal muscle of two adult mice.

T $\beta$ 4 was chemically synthesized by the Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan) and oxidized in the presence of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Unoxidized T $\beta$ 4 was separated from T $\beta$ 4so by high-performance liquid chromatography.

### Scratch wound closure assay

Confluent monolayers of C2C12 cells in 6-well plates were scratched with a blue tip to generate a gap (~5  $\times$  1 mm). Cells were incubated with DMEM containing 10 mM thymidine (Sigma) at 37°C for 8 h in the presence or absence of various concentrations of T $\beta$ 4 or T $\beta$ 4so. The medium was replaced after 4 h of incubation. The scratched areas were photographed under a microscope both before and after culture, and the width of each gap measured.

### Chemotaxis assay

C2C12 cells or muscle satellite cells-derived myoblasts/myocytes were washed and resuspended at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml (C2C12) or 3.6  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml (primary myoblasts/myocytes) in DMEM containing 0.1% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma) and 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid pH 7.3 (Invitrogen). The wells of a 24-well culture plate were filled with 550  $\mu$ l of T $\beta$ 4, T $\beta$ 4so or bFGF at various concentrations. Chemotaxis chambers (8  $\mu$ m pore size; Kurabo, Osaka, Japan) were pre-coated with bovine fibronectin (100  $\mu$ g/ml; Wako) for 2 h at room temperature and placed in each well. Cells (200  $\mu$ l) were then added to the upper chamber. The plate was then incubated for 6 h at 37°C, after which the cells remaining in the upper chamber were scraped off. The cells that had migrated to the bottom surface of the membrane were stained with Diff-Quik (Kokusai Shiyaku, Kobe, Japan) and counted using a microscope.

### Statistical analyses

All statistical analyses were performed using ANOVA (analysis of variance) repeated measures analysis (Statview J5.0, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). *P* < 0.05 was considered significant for the unpaired Student's *t*-test.

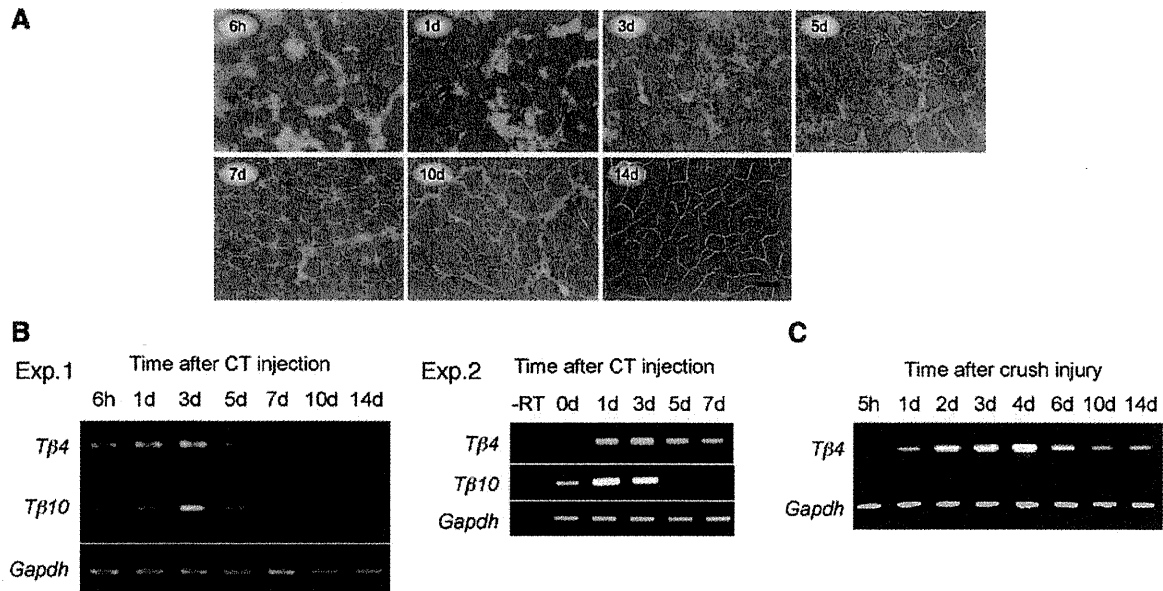
## Results

### Expression of T $\beta$ 4 and T $\beta$ 10 mRNAs is enhanced in skeletal muscles after injury

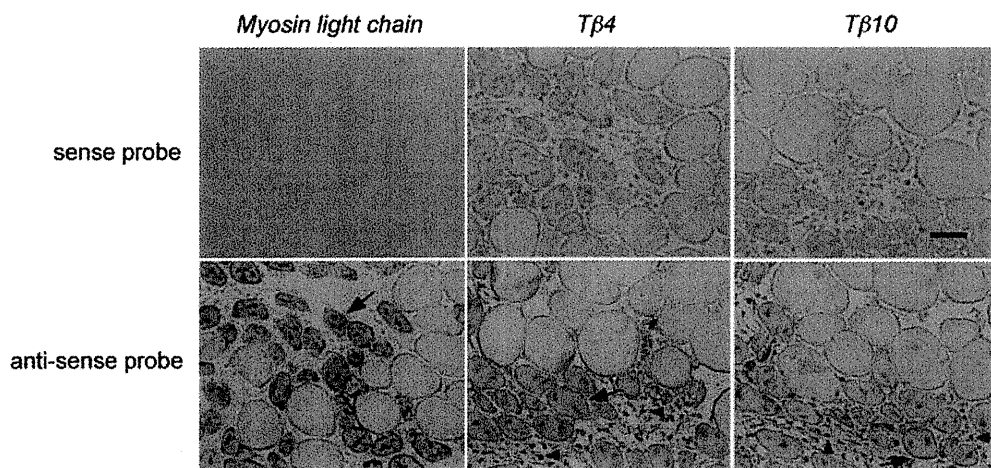
First, we investigated the expression patterns of 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' mRNAs during the recovery of injured skeletal muscles. As previously demonstrated (21), injection of CT into TA muscles caused the extensive degeneration of muscle fibres within 6 h (Fig. 1A). On Days 3–5, many inflammatory haematopoietic cells were recruited into the interstitial spaces. From Day 7 after CT injection, regenerating muscle fibers with central nuclei were gradually formed and the entire TA muscles were eventually repaired by Day 14 (Fig. 1A). Expression of 'T $\beta$ 4' mRNA was increased within 1 day, reaching its highest level on Day 3, and decreasing to base line levels by Day 14 after CT injection (Fig. 1B). Although the relative amount of 'T $\beta$ 10' mRNA was smaller than that of 'T $\beta$ 4', its expression was also maximal around Day 3 (Fig. 1B). In the crush injury model, 'T $\beta$ 4' mRNA was similarly up-regulated until Day 4 (when inflammatory reactions are initiated) and then gradually decreased by Day 14 (Fig. 1C).

### Localization of T $\beta$ 4 and T $\beta$ 10 mRNAs in the regenerating skeletal muscles

We next determined the type of cells that produce 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' during the regeneration of TA muscles by *in situ* hybridization. 'Myosin light chain' was utilized as a marker for the regenerating muscle fibres. As shown in Fig. 2, 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' mRNAs were



**Fig. 1** Up-regulation of 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' mRNAs during skeletal muscle regeneration. (A) Histological appearance of skeletal muscle during the course of regeneration after CT injection. TA muscles were recovered from CT-injected mice at indicated time points (6 h to 14 days). Their frozen sections were stained with haematoxylin and eosin. Scale bar, 50  $\mu$ m. (B and C) The mRNA levels of the indicated genes were analysed by reverse transcription-PCR at various time points (5 h to 14 days) after CT injection (B) or crush injury (C). Base line expression levels (Day 0) of 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' mRNAs were shown in the second CT injection experiment. DNA was visualized by ethidium bromide staining. 'Gapdh' was used as a template control.



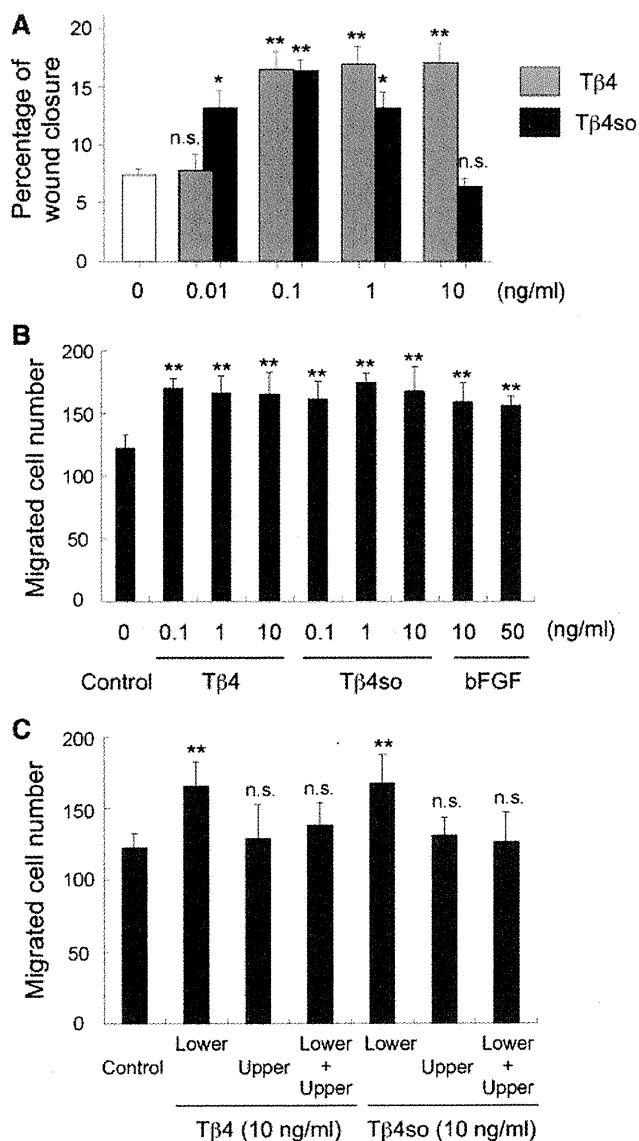
**Fig. 2** Location of 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10' mRNAs in the regenerating skeletal muscle. Transverse cryosections of TA muscles were harvested 5 days after CT injection and were hybridized with DIG-labelled sense (upper panels) or anti-sense (lower panels) cRNA probes for 'Myosin light chain', 'T $\beta$ 4' and 'T $\beta$ 10', respectively. Gene-specific signals in cytoplasm were visualized as light brown paints in the centrally nucleated muscle fibres (arrows) and interstitial haematopoietic cells (arrowheads). Scale bar, 50  $\mu$ m.

detectable in centrally nucleated regenerating muscle fibres, as well as in the haematopoietic cells present in the interstitial spaces (Fig. 2). These staining patterns were not observed with the sense probes, confirming the specificity of signals.

#### **Migratory responses of C2C12 cells to T $\beta$ 4 and T $\beta$ 4so**

As T $\beta$ 4 is known to promote the migration of endothelial cells and cardiac myocytes (9, 14), we examined the migratory responses of myoblasts to both T $\beta$ 4 and its oxidized form. As shown in Fig. 3A, both forms significantly enhanced the wound closing capacity of C2C12 cells in a dose-dependent manner.

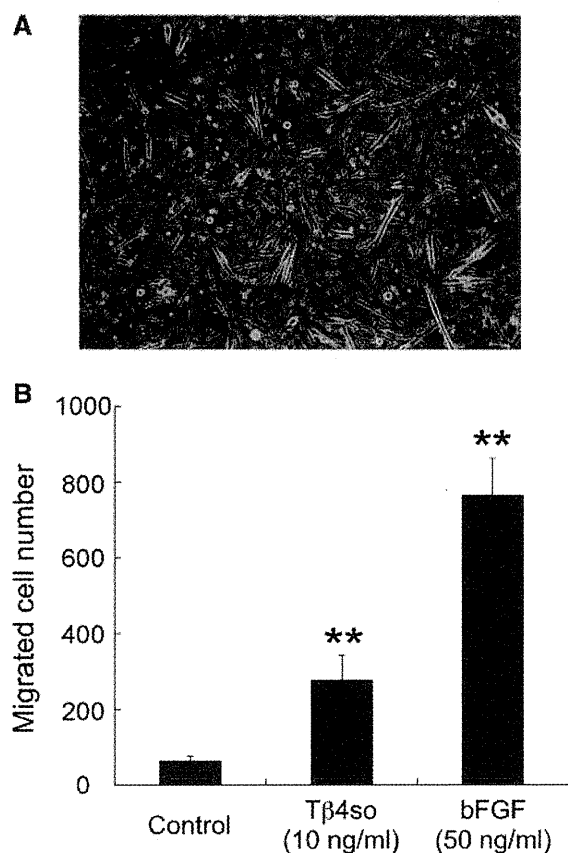
Maximum activity was observed at 100 pg/ml for T $\beta$ 4so, whereas T $\beta$ 4 exhibited a constantly high activity at concentrations >100 pg/ml. In contrast, the chemotactic responses of C2C12 cells to both T $\beta$ 4 and T $\beta$ 4so were very similar in terms of dose dependency (Fig. 3B). The total number of cells migrated in response to T $\beta$ 4 and T $\beta$ 4so was comparable to that seen with bFGF, a known chemotactic factor for C2C12 cells (25). When T $\beta$ 4 or T $\beta$ 4so was included in the upper chamber, or both the upper and lower chambers, of Chemotaxicell, enhancement of cell migration was cancelled (Fig. 3C). Therefore, T $\beta$ 4 and T $\beta$ 4so induce chemotaxis, but not chemokinesis to C2C12 cells.



**Fig. 3 Wound closure and chemotactic responses of C2C12 cells by exogenous Tβ4 and Tβ4so.** (A) Recovery ratio of scratched wounded areas of C2C12 monolayer was measured in the presence or absence of indicated concentrations of Tβ4 or Tβ4so. (B) Chemotactic responses of C2C12 cells to various concentrations of Tβ4 and Tβ4so. bFGF was used as a positive control. (C) Evaluation of chemokinetic responses of C2C12 cells to Tβ4 and Tβ4so. In (B) and (C), assays were performed using Chemotaxicell (8 μm pore size) with indicated reagents added in the upper and/or lower chambers. After 6 h of incubation, cells that had migrated to the bottom surface of the membrane were stained and subjected to microscopic observation and cell counting. Each value represents the mean ± S.D. (*n* = 8–9). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01. n.s., not significant compared to the value of medium control.

**Chemotactic responses of satellite cells-derived primary myoblasts/myocytes**

To confirm that Tβ4-responsiveness is a general property of myoblasts and not a C2C12-specific phenomenon, we prepared primary myoblasts and used them for the chemotaxis assay. For this purpose, we isolated SM/C2.6<sup>+</sup> muscle satellite cells from adult mice and cultured them for *in vitro* differentiation. As previously demonstrated (24), they vigorously proliferated and gave rise to myoblasts, myocytes and myotube-like structures (Fig. 4A). When we applied these cells to



**Fig. 4 Chemotaxis of satellite cells-derived myoblasts/myocytes to exogenous Tβ4so.** (A) Morphological appearance of primary myoblasts and myocytes derived from muscle satellite cells of adult mice. (B) Chemotactic responses of primary myoblasts/myocytes to Tβ4so and bFGF. Cells and indicated reagents were added in upper and lower chambers of Chemotaxicell (8 μm pore size), respectively. After 6 h of incubation, cells that had migrated to the bottom surface of the membrane were stained and counted. Each value represents the mean ± S.D. (*n* = 3). \*\**P* < 0.01 compared to the value of medium control.

Chemotaxicell, significant number of cells migrated across the membrane in response to Tβ4so (Fig. 4B). These data demonstrated the responsiveness of primary myoblasts/myocytes to Tβ4so. It is noteworthy that satellite cells-derived primary cells were more strongly chemoattracted to bFGF than to Tβ4so (Fig. 4B) when compared to C2C12 cells (Fig. 3B). This is probably related to a higher frequency of myocytes in the primary cell population.

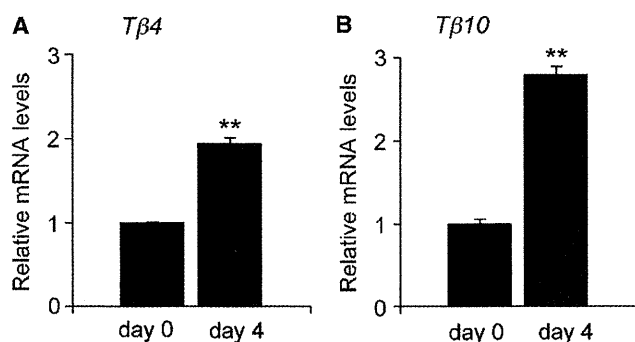
**Up-regulation of Tβ4 and Tβ10 mRNAs during myotube differentiation**

To understand whether expression of ‘Tβ4’ and ‘Tβ10’ mRNAs is changed between myoblasts and myofibers, we compared their expressions in C2C12 cells before and after myotube differentiation *in vitro*. As shown in Fig. 5, both ‘Tβ4’ and ‘Tβ10’ mRNAs were significantly increased by the myotube differentiation.

**Discussion**

Previous reports from several laboratories noted that the expression levels of ‘Tβ4’ in the skeletal muscle of *mdx* mice are significantly higher than





**Fig. 5** Increase of 'Tβ4' and 'Tβ10' mRNAs during myotube differentiation of C2C12 cells. (A) C2C12 cells were cultured in the differentiation media to induce myotube-like structures. Expression levels of 'Tβ4' (A) and 'Tβ10' (B) mRNAs before (Day 0) and after (Day 4) the myotube differentiation were determined by real-time RT-PCR. 'Gapdh' was used to normalize the relative abundance of 'Tβ4' or 'Tβ10' mRNA. In each panel, value of Day 4 was expressed as a relative amount to that of Day 0. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=3$ ). \*\*,  $P<0.01$  compared to the value of Day 0.

those of wild-type mice (4, 5). We also found that larger amounts of 'Tβ4' mRNA are produced by the *mdx*-derived myoblastic cell line (6) and the skeletal muscles of *mdx* mice (Nakayama, Y. and Hara, T., unpublished data). *In situ* hybridization data show that both 'Tβ4' and 'Tβ10' mRNAs are present in regenerating muscle fibres, but are absent from mature skeletal muscles. The specific localization of Tβ4 protein in regenerating muscles was shown in a very recent report using *mdx* mice (26). In addition to immature muscles, we found that haematopoietic cells in the interstitial spaces also produced 'Tβ4' and 'Tβ10' mRNAs. In the early stages (3–5 days) of muscle regeneration after CT injection, large amounts of inflammatory blood cells, including macrophages and T cells, infiltrate into the degenerated areas of skeletal muscle. These cells play an important role in tissue repair by secreting a number of cytokines. Accordingly, the levels of 'Tβ4' and 'Tβ10' mRNAs in the TA muscles were at their highest on Day 3 after CT injection.

Tβ4 is known to promote wound healing in skin (11), hair growth (12) and cardiac repair (13, 14). However, the physiological relevance of this up-regulation of 'Tβ4' and 'Tβ10' in *mdx* muscles and injured skeletal muscles remains to be clarified. In this study, we demonstrated that Tβ4 and its oxidized form, Tβ4so, are capable of stimulating the migration of both C2C12 cells and skeletal muscle-derived primary myoblasts/myocytes. Tβ4so was more potent in promoting the migration of C2C12 cells in the scratch wound assay than Tβ4, as was shown for human umbilical vein endothelial cells (15). As the chemotaxis-inducing activity of Tβ4 and Tβ4so was very similar, these two assays might detect a distinct biological activity of Tβ4so. In this regard, it is interesting that Tβ4so, but not Tβ4, is a potent inducer of neutrophil locomotion, and suppresses footpad swelling (15). However, we cannot rule out the possibility that an action range of the chemotaxis assay is broader than that of wound closure assay.

As mentioned above, 'Tβ4' mRNA is expressed in myoblastic cell lines and its expression level is higher in *mdx*-derived myoblastic cells than that in C57BL/10 mice-derived myoblasts (6). If Tβ4 acts as a chemoattractant for myoblasts, how Tβ4 gradient is generated in the regenerating skeletal muscles? We demonstrated that both Tβ4 and 'Tβ10' mRNAs were markedly up-regulated during myotube differentiation of C2C12 cells. Therefore, newly formed myofibers as well as inflammatory haematopoietic cells would produce larger amounts of Tβ4 and Tβ10 locally, thereby facilitating mobilization of myoblasts into the regenerating skeletal muscle regions.

Given the fact that Tβ4 and Tβ4so mobilize myoblasts to injured muscles, it may also facilitate the regeneration of injured skeletal muscles. In fact, a very recent report by Spurney *et al.* (26) shows that Tβ4-treated *mdx* mice have significantly increased numbers of regenerating muscle fibres compared with control *mdx* mice. Considering the role of Tβ4 in cardiac regeneration, it is likely that Tβ4 mediates the recruitment and survival of myoblasts via the PINCH-ILK-Akt pathway. This is supported by the fact that ILK and Akt are activated in C2C12 cells in response to Tβ4 (14). Alternatively, a reduction of NF-κB activity induced by Tβ4 might play a role in the anti-apoptotic effects seen in skeletal muscles (27).

Unfortunately, the impaired skeletal muscle strength and fibrosis seen in *mdx* mice were not ameliorated after chronic administration of Tβ4 in the study of Spurney *et al.* (26). In transgenic mouse lines over-expressing Tβ4 in their skeletal muscles, we failed to observe significant differences in the kinetics of muscle regeneration after CT injection (Nakayama, Y. and Hara, T., unpublished data). In this case, it is possible that the concentrations of endogenous Tβ4 and Tβ10 were sufficiently high to mobilize myoblasts in the injured muscles of these transgenic mice. Regarding the clinical application of Tβ4 for the treatment of muscular dystrophies, the combination of Tβ4 with other regeneration-promoting cytokines would be beneficial.

Only endothelial cells (9), keratinocytes (12), cardiomyocytes (14) and skeletal myoblasts (this study) are chemoattracted to Tβ4. Fibroblasts, smooth muscle cells, monocytes and neutrophils do not respond to Tβ4 (9, 15). Interestingly, both Tβ4 and Tβ4so are rather inhibitory for neutrophil chemotaxis elicited by N-formyl-methion-leucyl-phenylalanine (15). Therefore, Tβ4 modulates cell migration in a cell-type specific fashion to either promote tissue regeneration, or attenuate inflammatory responses. Future investigation of putative Tβ4 receptors would provide critical information for understanding how extracellular Tβ4 exerts its biological activities in cells.

## Acknowledgements

We thank Dr Tomomi Tani (Hokkaido University) for help in the purification of Tβ4 and Tβ4so.

**Funding**

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, Research on Nervous and Mental Disorders.

**Conflict of interest**

None declared.

**References**

1. Charge, S.B. and Rudnicki, M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–238
2. Barton, E.R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H.L. (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol.* **157**, 137–148
3. Messina, S., Mazzeo, A., Bitto, A., Aguenouz, M., Migliorato, A., De Pasquale, M.G., Minutoli, L., Altavilla, D., Zentilin, L., Giacca, M., Squadrito, F., and Vita, G. (2007) VEGF overexpression via adeno-associated virus gene transfer promotes skeletal muscle regeneration and enhances muscle function in mdx mice. *FASEB J.* **21**, 3737–3746
4. Tseng, B.S., Zhao, P., Pattison, J.S., Gordon, S.E., Granchelli, J.A., Madsen, R.W., Folk, L.C., Hoffman, E.P., and Booth, F.W. (2002) Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. *J. Appl. Physiol.* **93**, 537–545
5. Turk, R., Sterrenburg, E., de Meijer, E.J., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., and 't Hoen, P.A.C. (2005) Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics* **6**, 98
6. Nakayama, Y., Nara, N., Kawakita, Y., Takeshima, Y., Arakawa, M., Katoh, M., Morita, S., Iwatsuki, K., Tanaka, K., Okamoto, S., Kitamura, T., Seki, N., Matsuda, R., Matsuo, M., Saito, K., and Hara, T. (2004) Cloning of cDNA encoding a regeneration-associated muscle protease whose expression is attenuated in cell lines derived from Duchenne muscular dystrophy patients. *Am. J. Pathol.* **164**, 1773–1782
7. Mannherz, H.G. and Hannappel, E. (2009) The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **66**, 839–851
8. Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V.T. (1991) Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **266**, 4029–4032
9. Malinda, K.M., Goldstein, A.L., and Kleinman, H.K. (1997) Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* **11**, 474–481
10. Malinda, K.M., Sidhu, G.S., Banaudha, K.K., Gaddipati, J.P., Maheshwari, R.K., Goldstein, A.L., and Kleinman, H.K. (1998) Thymosin alpha 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. *J. Immunol.* **160**, 1001–1006
11. Malinda, K.M., Sidhu, G.S., Mani, H., Banaudha, K., Maheshwari, R.K., Goldstein, A.L., and Kleinman, H.K. (1999) Thymosin beta4 accelerates wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 364–368
12. Philp, D., Nguyen, M., Scheremeta, B., St-Surin, S., Villa, A.M., Orgel, A., Kleinman, H.K., and Elkin, M. (2004) Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J.* **18**, 385–387
13. Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M.D., Dimaiio, J.M., and Srivastava, D. (2004) Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* **432**, 466–472
14. Smart, N., Risebro, C.A., Melville, A.A., Moses, K., Schwartz, R.J., Chien, K.R., and Riley, P.R. (2007) Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* **445**, 177–182
15. Young, J.D., Lawrence, A.J., MacLean, A.-G., Leung, B.P., McInnes, I.B., Canas, B., Pappin, D.J., and Stevenson, R.D. (1999) Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat. Med.* **5**, 1424–1427
16. Erickson-Viitanen, S., Ruggieri, S., Natalini, P., and Horecker, B.L. (1983) Thymosin beta 10, a new analog of thymosin beta 4 in mammalian tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 407–413
17. Yu, F.X., Lin, S.C., Morrison-Bogorad, M., Atkinson, M.A., and Yin, H.L. (1993) Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 502–509
18. Frohm, M., Gunne, H., Bergman, A.C., Agerberth, B., Bergman, T., Boman, A., Liden, S., Jornvall, H., and Boman, H.G. (1996) Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur. J. Biochem.* **237**, 86–92
19. Roth, L.W., Bormann, P., Wiederkehr, C., and Reinhard, E. (1999) Beta-thymosin, a modulator of the actin cytoskeleton is increased in regenerating retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3488–3498
20. Ferre, P.J., Liaubet, L., Concordet, D., SanCristobal, M., Uro-Coste, E., Tosser-Klopp, G., Bonnet, A., Toutain, P.L., Hatey, F., and Lefebvre, H.P. (2007) Longitudinal analysis of gene expression in porcine skeletal muscle after post-injection local injury. *Pharm. Res.* **24**, 1480–1489
21. Yan, Z., Choi, S., Liu, X., Zhang, M., Schageman, J.J., Lee, S.Y., Hart, R., Lin, L., Thurmond, F.A., and Williams, R.S. (2003) Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **278**, 8826–8836
22. Tanaka, K., Tamura, H., Tanaka, H., Katoh, M., Futamata, Y., Seki, N., Nishimune, Y., and Hara, T. (2002) Spermatogonia-dependent expression of testicular genes in mice. *Dev. Biol.* **246**, 466–479
23. Nara, N., Nakayama, Y., Okamoto, S., Tamura, H., Kiyono, M., Muraoka, M., Tanaka, K., Taya, C., Shitara, H., Ishii, R., Yonekawa, H., Minokoshi, Y., and Hara, T. (2007) Disruption of CXCL12 chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **282**, 30794–30803
24. Fukada, S., Higuchi, S., Segawa, M., Koda, K., Yamamoto, Y., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Uezumi, A., Imamura, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., and Yamamoto, H. (2004) Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.* **296**, 245–255
25. Suzuki, J., Yamazaki, Y., Li, G., Kaziro, Y., and Koide, H. (2000) Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4658–4665
26. Spurney, C.F., Cha, H.-J., Sali, A., Pandey, G.S., Pistilli, E., Guerron, A.D., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2010) Evaluation of skeletal and cardiac muscle function after administration of thymosin beta-4 in the dystrophin deficient mouse. *PLoS ONE* **5**, e8976
27. Baudy, A.R., Saxena, N., Gordish, H., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2009) A robust in vitro screening assay to identify NF-kappaB inhibitors for inflammatory muscle diseases. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1209–1214

## 筋ジストロフィーに対するリードスルー治療

塩塚政孝 松田良一

### 1. リードスルー治療とは

ナンセンス変異によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) では、ジストロフィン遺伝子エクソン内で点変異により一つの塩基が置換し、本来の翻訳終結部位より上流に未熟終止コドン (premature termination codon) が生じることで、機能的な全長ジストロフィンタンパク質が合成されずに遺伝子欠損症状を呈す。この未熟終止コドンを薬物により抑制し翻訳を進行させ、正常機能を有するタンパク質分子の発現を回復させることで症状の改善を目指す治療法がリードスルー療法である。ナンセンス変異症例は DMD では本邦において 19% を占め、2,400 種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の存在が明らかにされるとともに、それらの包括的薬学療法としてもリードスルー治療は注目されている。

### 2. ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用

リードスルー誘起物質によるナンセンス変異の抑制は、酵母を用いた系でアミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンによって 1979 年に最初に立証された<sup>1)</sup>。その後、哺乳類細胞でもリードスルーにより機能的タンパク質の回復がみられることが報告され<sup>2)</sup>、1996 年にはアミノグリコシド系抗生物質の G418 やゲンタマイシンが、嚢胞性線維症の原因遺伝子にナンセンス変異をもつ細胞に

対して正常遺伝子産物を発現させることに成功した<sup>3)</sup>。これまで効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移植以外に方法はないと考えられていたナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療手段として、リードスルーによる治療の可能性が拓けてきた。

1999 年、ペンシルバニア大学の Lee Sweeney らのグループが *mdx* マウス (ジストロフィン遺伝子のエクソン 23 にナンセンス変異をもつ DMD のモデル動物) にゲンタマイシンを投与し、リードスルーさせることにより筋組織内に正常マウスの 20% 程度のジストロフィンの回復および筋力の上昇を報告した<sup>4)</sup>。ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用可能性が示唆されて以降、ゲンタマイシンを用いたいくつかの治験が行われたが、その重篤な副作用のために制限があり、いずれも治療効果は低かった。しかしながらリードスルーによる治療概念の妥当性を支持する結果は得られており、投与前から少量のジストロフィンをもつ患児に対しての半年間の投与では、15% 程度のジストロフィンの発現回復が見られている<sup>5)</sup>。そのため、より安全性が高く、点滴静脈注射よりも負担のない投与が可能な薬剤の確立が課題となった。

2007 年、Lee Sweeney らはバイオベンチャー企業 PTC Therapeutics 社とともにハイスループット検出系を使い、80 万種類の低分子化合物群から高いリードスルー活性をもつ PTC124 (アタルレン) を同定した (図 A)。*mdx* マウスと DMD

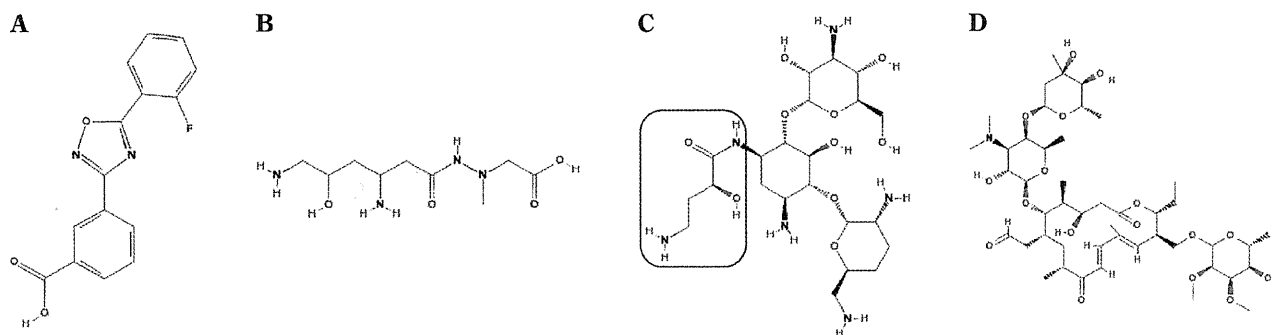


図 リードスルー誘起物質の構造

A. アタルレン(PTC124), B. ネガマイシン, C. アルベカシン(囲み部が AHB 基), D. タイロシン。

患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を復活させた報告は、第 I 相試験結果と同時に公表された<sup>6,7)</sup>。1日に3回服用での第 I 相で毒性は認められなかったものの、DMD とベッカー型筋ジストロフィー (Becker Muscular Dystrophy; BMD) 患者を対象とした後期第 II 相試験において、治療の有効性に関する科学的証拠を得ることはできなかった。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィー治療における安全性と有効性の基準を確立し、治験立案の知見を得られたことは重要な貢献であると考えられる。特に小児に対する運動機能評価については、最終効果判定とされた6分間歩行距離の統計解析について現在も議論され続け<sup>8)</sup>、ジストロフィンの発現だけではない臨床効果を評価する尺度の重要性が浮き彫りになっている。

DMD や BMD についての開発は頓挫しているが、肢帯型筋ジストロフィー 2B 型や三好型遠位型筋ジストロフィーに関連するジスフェリン欠損についても、アタルレンは効果をもつことが培養系で示されている<sup>9)</sup>。アタルレンは広範な適用可能性を潜在的にもつリードスルー誘起物質であり、経口投与可能な特性を有するため、嚢胞性線維症では第 III 相へ、血友病 A/B とメチルマロン酸血症では第 II 相へと治験は続行中である。

### 3. リードスルー誘起物質の探索

筆者らは 2001 年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシンが DMD や先天性筋ジストロフィーのモデル系において高いリードスルー活性を有することを報告してきた(図 B)<sup>10-12)</sup>。ネガマイシン

は 1970 年に日本の微生物化学研究会で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、ゲンタマイシンより高い安全性をもつため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬として有望と考えられた。しかしネガマイシンは未承認であり、その大量入手が不可能であったことから、ネガマイシンをリード物質とした新たな薬物候補を求めた。探索に先立ち、生体内での薬効評価を定量化かつ効率化するために遺伝子導入マウス (Readthrough Evaluation and Assessment by Dual-reporter; READ マウス) を作出した<sup>13)</sup>。この薬効評価系を用いることで、ネガマイシンの化学構造に立脚した *in silico* 探索からリードスルー治療薬候補を 5 種特定した<sup>14)</sup>。薬物候補 #2 や #4 は、ゲンタマイシンやネガマイシンよりも高い濃度依存的なリードスルー活性を内服によっても示し、*mdx* マウスや DMD 患者由来培養細胞を用いた生化学的・免疫組織化学的・運動機能解析学的解析や安全性試験結果も良好である。特定した薬物候補やネガマイシンのさらなる誘導体展開から、より臨床現場に近い薬物候補を提案することが可能となった<sup>15,16)</sup>。

2009 年 Du らは、毛細血管拡張運動失調症をモデルとした無細胞翻訳系 ELISA による完全自動化されたハイスループット探索で、アミノグリコシドではない化合物 RTC#13 を報告した<sup>17)</sup>。*mdx* マウス骨格筋培養細胞への処理でゲンタマイシンと同等のジストロフィンの発現回復が見られている。

#### 4. アミノグリコシドの再評価

筆者らは、カナマイシン類抗生物質群の探索から、ジベカシンの1-NH<sub>2</sub>基を(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸(AHB)基でアシル化することで減毒化した抗生物質、アルベカシンに強力なリードスルー活性があることを見出している(図C)。mdxマウスでの生化学的臨床指標による解析と同時に、筋機能回復について検証したところ有意な治療効果を認めた<sup>18)</sup>。アルベカシンは1973年に微生物化学研究会によって合成され、1990年に抗メチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)薬として上市されている承認薬である。それゆえ、オフラベルユース(適用外使用)の要件を満たすことで早期に臨床の場に送り込める薬物となりうる。

ナンセンス変異型嚢胞性線維症患者の割合が多いイスラエルでは近年、急速にリードスルーに関する研究が発展している。イスラエルからのリードスルー治療薬に関する最新の報告を二つ紹介したい。Baasovらのグループは、アミノグリコシドの構造的な要素を切り離し、毒性の低減とリードスルー活性の増強に成功した誘導体を報告した。パロモマイシンのもつ6-OH基とプチロシンやアミカシンのもつAHB基で修飾したパロマミン誘導体NB54<sup>19)</sup>や、6-Methyl基とAHB基を導入したG418誘導体NB84<sup>20)</sup>である。DMDを含む多種のナンセンス変異のコンストラクトを導入した培養細胞系においては良好な結果を示しており、個体レベルでの解析が期待される物質である。

もう一つは、大腸腺腫をモデルとしたレポーターアッセイや移植癌細胞において、アミノグリコシド系やマクロライド系抗生物質にリードスルー活性があることを報告したものである<sup>21)</sup>。特筆されるべきは、動物用医薬品および飼料添加物として承認されているマクロライド系抗菌剤タイロシンである(図D)。筆者らの薬効評価系でもそのリードスルー活性を確認しており、経口吸収性に優れ、数多く存在するタイロシン誘導体からさらなる治療薬候補を特定しつつある。

しかし、リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与が不可能なため、筋ジストロフィー治療に用いる場合には筋崩壊が進行して

いる組織にさらに障害を与える筋中や静脈内投与しか方法がなく、対象患者が低年齢のため疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため筆者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する経皮投与法を開発した。チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を化学的皮膚透過促進処理として用い、アミノグリコシドの皮膚外用剤を連日投与することで、骨格筋内に皮下注射と同等の薬効を認めた<sup>13,22)</sup>。皮膚のもつ防御機能による薬物吸収を特殊な機器を必要とせず市販されている安全性の高い除毛剤により制御し、皮膚非透過性の薬物の全身暴露の有効性が示されたことは、簡便かつ非侵襲的投与方法として臨床的使用に期待できる。また、筋ジストロフィーにおける長期投与中の在宅医療や嚥下困難な患者にとっても利便性の向上を提供できると考えられる。患者への負担を軽減するだけでなく、初回通過効果や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化を提供できる点で魅力的であり、他の薬物療法にも適用可能なため、その臨床的使用は大きな社会的成果が期待される。

#### 5. リードスルー治療の今後の展望

リードスルーの感受性は、一般に未熟終止コドンの種類がUGA(Opal) > UAA(Ochre) > UAG(Amber)の順に高いことが知られている<sup>23)</sup>。また、未熟終止コドン直後のヌクレオチドはC > U > A/Gの順にリードスルーしやすいこと<sup>24)</sup>や、リードスルー効率にとって上流の2ヌクレオチドと下流の6ヌクレオチドが極めて重要であること<sup>25)</sup>などが報告されている。これらのように、リードスルー誘起物質は未熟終止コドンの種類およびその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くのリードスルー治療薬候補物質を特定し、個々の患者に最適な治療戦略を選択かつ併用できるものを見出すことが求められている。DMDはまだ有効な治療法が確立されていない重篤な遺伝性筋疾患であるが、BMD症例に関する知見から正常量の20%に相当するジストロフィンの回復で病態進行の遅延とQOLの向上や延命が期待できる。そのため、リードスルー治療はナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィンを回復させる、迅速かつ有

効な選択肢と考えられる。その実現性を確保するためには、テーラーメイド治療の前提となる詳細な遺伝子解析と、着実な臨床応用への足場となる成果が肝要であろう。

本稿において紹介した筆者らの研究成果は、「厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学推進事業」, 「厚生労働省精神・神経疾患研究委託費」, 「厚生労働省精神・神経疾患研究開発費」, 「厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業」(以上 RM), 「財団法人金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成」(MS)によって行われたものである。

#### ●文 献

- 1) Palmer E, Willhelm JM, Sherman F : *Nature* **277** : 148-150, 1979
- 2) Burke JF, Mogg AE : *Nucleic Acids Res* **13** : 6265-6272, 1985
- 3) Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM : *Nat Med* **2** : 467-469, 1996
- 4) Barton ER, Cordiner L, Shoturma DI et al : *J Clin Invest* **104** : 375-381, 1999
- 5) Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L et al : *Ann Neurol* **67** : 771-780, 2010
- 6) Welch EM, Barton ER, Zhuo J et al : *Nature* **447** : 87-91, 2007
- 7) Hirawat S, Welch EM, Elfring GL et al : *J Clin Pharmacol* **47** : 430-444, 2007
- 8) McDonald CM, Henricson EK, Han JJ et al : *Muscle Nerve* **42** : 966-974, 2010
- 9) Wang B, Yang Z, Brisson BK et al : *J Appl Physiol* **109** : 901-905, 2010
- 10) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T et al : *Acta Myol* **20** : 154-158, 2001
- 11) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : *J Biochem* **134** : 751-758, 2003
- 12) Allamand V, Bidou L, Arakawa M et al : *J Gene Med* **10** : 217-224, 2008
- 13) Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T et al : *J Biochem* **147** : 463-470, 2010
- 14) 松田良一, 塩塚政孝, Alex MacKerell : PCT/JP2007/63436
- 15) Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S et al : *Chem Comm* **20** : 2379-2381, 2008
- 16) 林良雄, 木曾良明, 西口茂信・他 : 特願 2008-317710
- 17) Du L, Damoiseaux R, Nahas S et al : *J Exp Med* **206** : 2285-2297, 2009
- 18) 松田良一, 塩塚政孝, 我妻玲・他 : 特願 2010-021817
- 19) Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavivsky M et al : *J Med Chem* **52** : 2836-2845, 2009
- 20) Nudelman I, Glikin D, Smolkin B et al : *Bioorg Med Chem* **18** : 3735-3746, 2010
- 21) Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R : *Gut* **59** : 496-507, 2009
- 22) 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一 : 生体の科学 **61** : 636-640, 2010
- 23) Martin R, Mogg AE, Heywood LA et al : *Mol Gen Genet* **217** : 411-418, 1989
- 24) Howard MT, Shirts BH, Petros LM et al : *Ann Neurol* **48** : 164-169, 2000
- 25) Namy O, Hatin I, Rousset JP : *EMBO Rep* **2** : 787-789, 2001



## ナンセンス変異の抑制

### —リードスルーによる Duchenne 型筋ジストロフィーの治療

#### Therapeutic Readthrough Strategy for Suppression of Nonsense Mutations in Duchenne Muscular Dystrophy

塩塚 政孝\* 松田 良一\*

Masataka Shiozuka\*, Ryoichi Matsuda\*

#### Abstract

Effective treatment for Duchenne muscular dystrophy (DMD) is currently unavailable. Readthrough of disease-causing premature termination codons might alleviate the symptoms of genetic diseases caused by nonsense mutations. Several ribosome-binding compounds, including selective antibiotics and synthetic novel small molecules, induce translational readthrough, restoring full-length functional proteins. Here in this innovative therapeutic strategy has been summarized with a focus on DMD.

We have previously reported that negamycin restored dystrophin expression with less toxicity than gentamicin in *mdx* mice. To explore more potent readthrough inducers, we established the transgenic mouse called READ (readthrough evaluation and assessment by dural receptor) for readthrough-specific detection. Using READ mice, we discovered drug candidates, including sterically negamycin-like small molecules and aminoglycoside derivatives. The newly developed small molecules induced dose-dependent readthrough with greater potency than ataluren *in vitro* and promoted the expression of dystrophin and reduction in serum creatine kinase activity in *mdx* mice. Moreover, the aminoglycoside derivative restored both dystrophin protein and contractile function of *mdx* skeletal muscles with appreciably higher readthrough activity and lower toxicity than that of gentamicin. Furthermore, we confirmed the efficacy of a thioglycolate-based depilatory agent to enhance the topical delivery of skin-impermeable drugs, including aminoglycosides. These promising new chemotherapeutic agents with beneficial effects on readthrough action, lower toxicity, and transdermal delivery may have significant value in treating or preventing genetic diseases caused by nonsense mutations.

Key words : readthrough, nonsense mutations, muscular dystrophy, negamycin, aminoglycoside

#### はじめに

ナンセンス変異は塩基対が1つ置換し、アミノ酸コードが終止コドンに変化する点突然変異である。ナンセンス変異の結果、未熟終止コドン (premature termination codon) と呼ばれる異常な終止コドンが生じ、本来の翻訳終結部位より上流で蛋白質の生産が中断するため、適切な機能をもつ完全な蛋白質が合成されない。そのため、

重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異型遺伝性疾患の種類は、2,400種を超えることが明らかにされている。

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) のナンセンス変異症例は、本邦において患者数の19%を占めており、機能的な全長ジストロフィン蛋白質が合成されないために遺伝子欠損症状を呈し、進行性の筋力低下と筋萎縮を示している。この未熟

\* 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 [〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1] Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo at Komaba, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902 Japan

終止コドン薬物により抑制して翻訳を進行させ、正常機能を有する蛋白質分子の発現を回復させることで症状の改善を目指す治療法がリードスルー療法である。リードスルー療法では、薬物によって翻訳機構に干渉し、生得のジストロフィン遺伝子を活かして正常機能蛋白質の発現を回復させるため、遺伝情報を変更したり体内に遺伝物質を導入することがない。ジストロフィン蛋白質の発現自体が正常に制御されることで、その治療効果は大きくかつ副作用は少ないことが考えられるため、ナンセンス変異型筋疾患治療の有効かつ迅速な選択肢としてリードスルー療法は注目されている。本稿では、国外の研究動向ならびに筆者らの最新の研究成果をもとに、DMDに対するリードスルー療法について記述する。

## I. リードスルーによるDMD治療の試み

原核細胞においてアミノグリコシド系抗生物質はrRNAの構造変化を引き起こし、mRNA上の未熟終止コドンとrRNAのアミノアシル部位との結合を阻害する。その結果、未熟終止コドンをリードスルーして翻訳を続行させることで、ナンセンス変異が抑制される。アミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンが酵母でナンセンス変異を抑制することを初めて報告したのは1979年であった<sup>1)</sup>。数年後に、哺乳類細胞においてもリードスルーにより機能的全長蛋白質を復活させることが報告された<sup>2)</sup>。そして、1996年にBedwellらのグループは、アミノグリコシド系抗生物質のG418やゲンタマイシン(gentamicin: GM)を用いて、ナンセンス変異型嚢胞性線維症のモデル細胞における正常遺伝子産物の発現に成功した<sup>3)</sup>。これにより、ナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療戦略としてリードスルー療法の概念が提唱された。

1999年、Lee Sweeneyらのグループは、*mdx*マウス(ジストロフィン遺伝子のエクソン23にナンセンス変異をもつDMDのモデル動物)にGMを投与し、リードスルーを誘起させることにより筋組織内に正常マウスの最大20%程度のジストロフィンの回復を報告した<sup>4)</sup>。ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用可能性が示唆されて以降、GMを用いたいくつかの治験が行われているが、その重篤な聴覚毒性や腎毒性のために制限があり、いずれも治療効果は低いのが現状である。しかしながらリードスルーによる治療概念の妥当性を支持する結果は得られており、投与前から少量のジストロフィンを持つ患児に対しての半年間の投与では、15%程度のジストロフィンの発現回復がみられている<sup>5)</sup>。そのため、より安全

性が高く、点滴静脈注射よりも負担のない投与が可能な薬剤の確立が喫緊の課題となっている。

2007年、Lee SweeneyらはPTC Therapeutics社とともにハイスルーブット検出系を使い、80万種の低分子化合物群からPTC124<sup>®</sup>(アタルレン)を同定した。*mdx*マウスとDMD患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を回復させた報告は、第I相臨床試験結果と同時に公表された<sup>6,7)</sup>。1日に3回服用での毒性は認められなかったものの、DMDとBecker型筋ジストロフィー(Becker muscular dystrophy: BMD)患者を対象とした後期第II相臨床試験において、米食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)から治療の有効性に関する科学的証拠が得られていないと判断された。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィーの治療における安全性と有効性の基準を確立し、治験立案の知見を得られたことは非常に重要な貢献であると考えられる。特に小児に対する運動機能評価については、最終効果判定とされた6分間歩行距離の統計解析について現在も議論され続けており<sup>8)</sup>、筋ジストロフィーの臨床効果を見極める課題として、ジストロフィン発現や血清クレアチンキナーゼ活性だけによらない評価尺度の重要性が浮き彫りになっている。運動機能を評価する際、それ自身(例えば6分間歩行が可能であること)が治験参加の前提となるため、熱心な保護者が患児に訓練を施すことで結果に悪影響を及ぼすこともあり、その条件設定には苦慮すべき問題を抱えている。

アタルレンは、DMDやBMDについての開発は頓挫しているが、肢帯型筋ジストロフィー2B型や三好型遠位型筋ジストロフィーに関連するジスフェリン欠損についても、効果をもたらすことが培養系で示されている<sup>9)</sup>。アタルレンは広範な適用可能性を潜在的にもつリードスルー誘起物質であり、経口投与可能な臨床応用に適した特性を有するため、嚢胞性線維症では第III相へ、血友病A/Bとメチルマロン酸血症では第II相へと治験は続行中である。

## II. 新規リードスルー誘起物質の開発～創薬

筆者らは2001年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシン(negamycin: NM)が、DMDやメロシン欠損型先天性筋ジストロフィーのモデル系において、有益なリードスルー誘起活性を有することを報告してきた<sup>10-12)</sup>。NMは、1970年に日本の微生物化学研究所で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、GMより高い安全性を持つため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬と



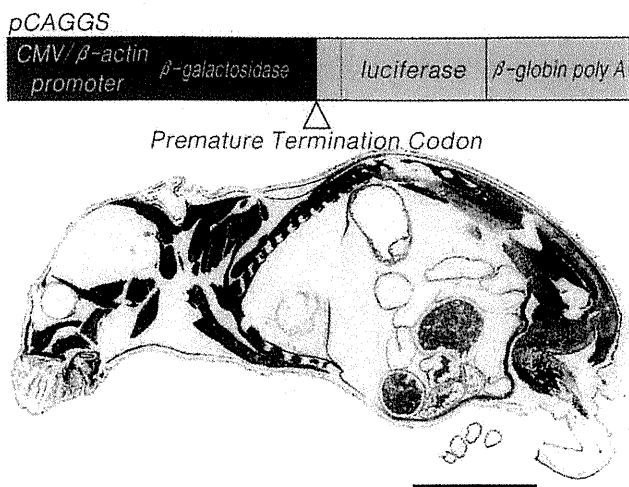


Fig. 1 READ マウスの全身 X-gal 染色像

READ マウスは  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) とルシフェラーゼ (*luc*) のレポーター遺伝子間に未熟終止コドンを入れたコンストラクトで作出されている。Kawamoto's film method による READ マウス全身凍結切片を X-gal 染色したところ、心筋や横隔膜を含む筋組織全般で  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を確認した。Bar = 1 cm

して有望と考えられた。しかし NM は未承認薬であり、その大量入手が困難であったことから、われわれは NM をリード物質とした新たな薬物候補を求めた。探索に先立ち、生体内での薬効評価を定量化かつ効率化するために遺伝子導入マウス (readthrough evaluation and assessment by dual-reporter: READ マウス) を作出した<sup>13)</sup> (Fig. 1)。mdx マウスを薬効評価系に使うと、含量が少なく 427 kDa と分子量が大きいジストロフィン (ジストロフィン遺伝子は 79 個のエクソンを有する全遺伝子中最大のもの) の検出定量性が問題となるためである。メリーランド大学薬学部の MacKerell 教授とともに、105 万種を超える低分子化合物データベースから NM の立体配位形成に適合する *in silico* 探索を行い、得られた NM 類似物質についてこの薬効評価系を用いることで、リードスルー治療薬候補を 5 種特定した<sup>14)</sup>。その中の薬物候補 #3 と #4 を READ マウスに皮下投与したところ、両者ともに既知のリードスルー誘起物質である GM や NM と同等以上のリードスルー活性を示した (Fig. 2)<sup>15)</sup>。次に、薬物候補 #3 と #4 を mdx マウスへ 3 週間連日投与 (50 mg/kg/day) することで、それぞれ 16.2%、18.8% のジストロフィン回復筋線維を確認した (Fig. 3 C, D)。mdx マウスのもつ未熟終止コドンとその直後のヌクレオチド "UAA A" は、最もリードスルーしにくい配列であることが示唆されている<sup>24)</sup>。それにもかかわらず、これらの染色像からは BMD 症例によく似たジストロフィンの発現様式がみとれる。Hoffman らは、

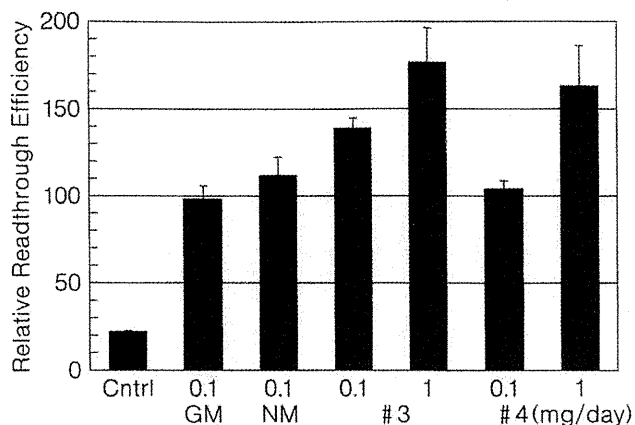


Fig. 2 薬物候補 #3 と #4 投与による READ マウスのリードスルー活性

1 週間連日皮下投与した READ マウス骨格筋でのリードスルー活性では、薬物候補 #3 と #4 が GM や NM と同等以上の薬効を示すことが確認された。対照 (Cntrl) は生理食塩水のみを投与した。

DMD より症状の穏やかな BMD 症例から、正常量の 20% 程度のジストロフィン回復によってその表現型が改善されると報告している<sup>16)</sup>。さらに、血清クレアチンキナーゼ活性は、薬物候補 #3 や #4 を投与することでおよそ半分の値にまで有意に減少した (Fig. 3 E)。

また、ヒト由来細胞に READ マウスで用いたコンストラクトを導入した培養系においては、#3 がアタルレンより高い効果を示した。そのため、薬物候補 #3 については東京薬科大学の林 良雄教授と共同研究を行い、低毒性化と薬効の増強を目指し、末端官能基と不飽和結合部に着目した、活性発現に寄与する部位の特定を試みている。特定した薬物候補や NM のさらなる誘導体展開から、より臨床現場に近い薬物候補を提案することが可能となっている<sup>17,18)</sup>。

薬物候補 #4 については、内服によっても用量依存的な活性を示し、mdx マウスにおける握力測定からも改善傾向を示す結果を得たことから、SPF (specific pathogen free) 施設において急性・亜急性毒性を検討したところ (Fig. 4)、単回・反復投与ともに体重、臓器重量、解剖所見、22 項目の血清生化学分析において異常はみられず、安全性が極めて高いことを確認した。現在、製剤化を目指した溶解性・安定性・吸収性の改善のための理化学的性状の改善を行っている。加えて、薬物候補 #2 については、東京女子医科大学附属遺伝子医療センターの斎藤加代子教授との共同研究により、DMD 患者由来培養細胞によるジストロフィン蛋白質の回復を確認している (投稿準備中)。

2009 年、Du らは、毛細血管拡張運動失調症をモデルと

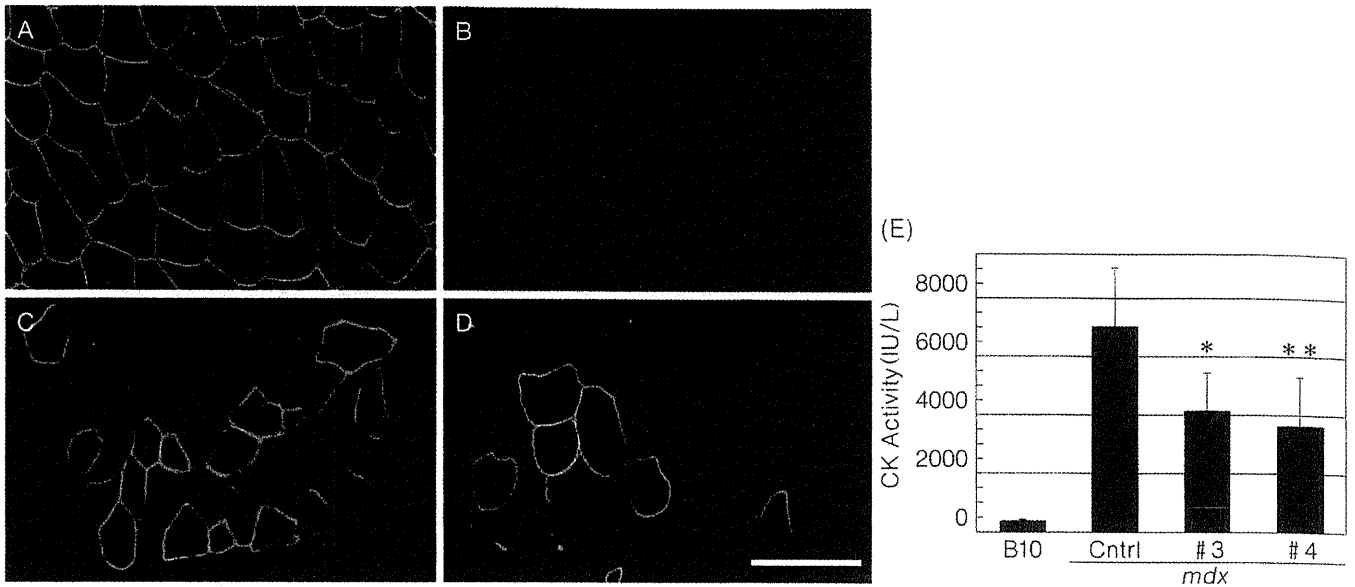


Fig. 3 薬物候補#3と#4投与によるmdxマウス骨格筋のジストロフィン免疫染色像と血清クレアチンキナーゼ活性  
 マウス骨格筋組織のジストロフィンC末端に対する抗体を用いた免疫染色像である。正常B10マウスではみられるジストロフィン(A)がmdxマウスではみられない(B)。薬物候補#3(C)や#4(D)をmdxマウスに3週間連日皮下投与したところ、ジストロフィンの回復がみられ、それぞれ約16%、19%のジストロフィン陽性筋線維数が確認された。Bar=100um。血清クレアチンキナーゼ活性を測定したところ、未投与mdxマウスに比べ、薬物候補#3や#4投与のmdxマウスでは約半分の値にまで低下した(E)。\* p=0.056 (vs. Cntrl), \*\* p=0.039 (vs. Cntrl)。

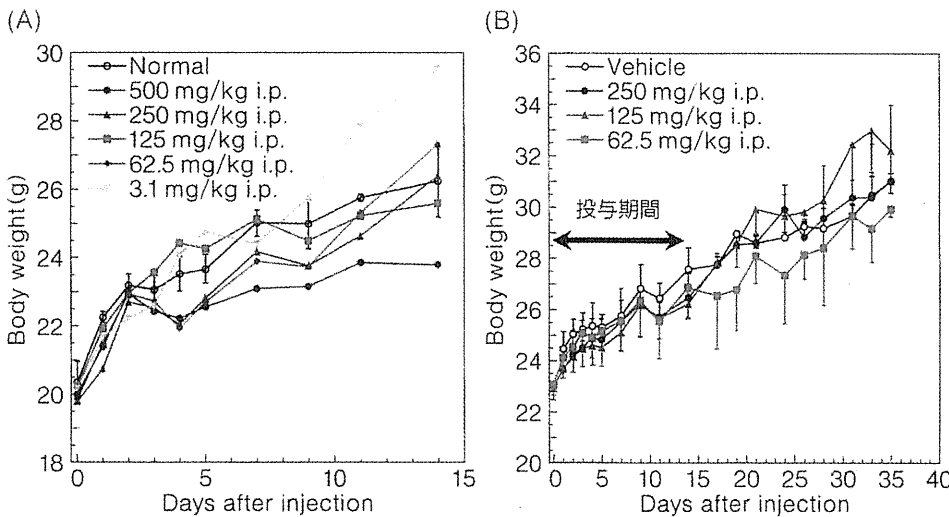


Fig. 4 薬物候補#4の単回・反復投与/回復安全性試験における体重変化  
 3.1~500 mg/kgでの単回腹腔内投与後、2週間の体重変化(A)、62.5~250 mg/kgでの2週間連日の反復腹腔内投与とその後3週間の体重変化(B)。単回・反復投与ともに、体重のみならず、臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析において異常はみられず、薬物候補#4の安全性は極めて高い。

した無細胞翻訳系 ELISA による完全自動化されたハイスループット探索から、アミノグリコシドではない化合物 RTC #13 や RTC #14 を特定した<sup>19)</sup>。mdx マウスに RTC #13 を筋注することで、GM やアタルレンよりも効率的にリードスルー活性を示し、横隔膜や心臓を含む筋組織でジストロフィンを回復させ、毒性もみられなかったことを報告している (米筋ジストロフィー協会全国科学会議, 2011)。

また, Baasov らのグループは, アミノグリコシドの構造的な要素を切り離し, 毒性の低減とリードスルー活性

の増強に成功した誘導体を報告した。パロモマイシンのもつ 6-OH 基とブチロシンやアミカシンのもつ 6-Methyl 基と (S)-4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル (AHB) 基で修飾したパロマミン誘導体 NB54<sup>20)</sup> や, AHB 基を導入した G418 誘導体 NB84<sup>21)</sup> である。DMD を含む多種のナンセンス変異のコンストラクトを導入した哺乳類細胞培養系においては良好な結果を示しており, 個体レベルでの解析が期待される物質である。

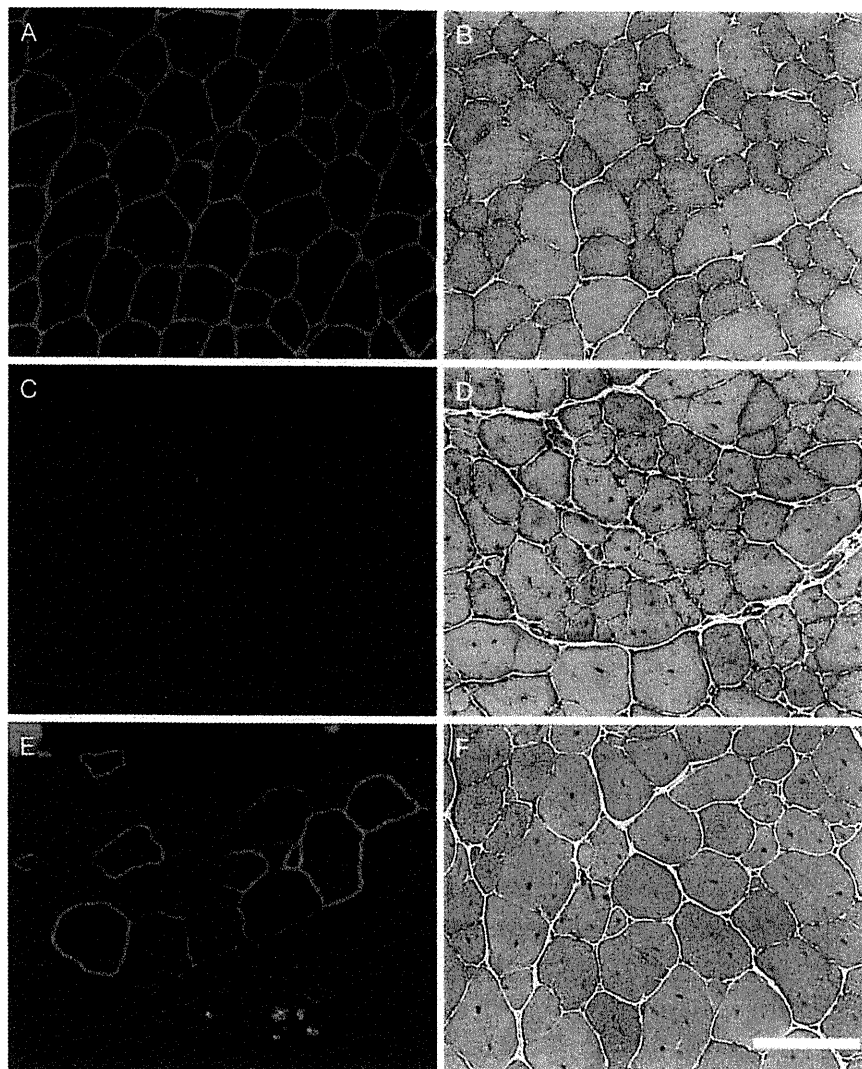


Fig. 5 アルベカシン投与による *mdx* マウス骨格筋の HE 染色像とジストロフィン免疫染色像

2w1mSC, ジストロフィン染色像 (A, C, E), HE (hematoxylin and eosin) 染色像 (B, D, F), B10 マウス (A, B), 未投与 *mdx* マウス (C, D), アルベカシン投与 *mdx* マウス (E, F)。アルベカシンを連日投与した *mdx* マウスの筋線維にジストロフィン発現の回復がみられ, その径に大小不同が少なく, 結合組織量も少ない傾向が認められる。Bar=100 μm

### III. 既承認薬からのリードスルー誘起物質の発見～育薬

医薬品の開発は, 薬の種となる物質の発見を目指した探索的基礎研究に始まり, 動物における非臨床試験やヒトによる治験で安全性や有効性を評価し, その後行政当局の承認審査に至るプロセスを経るため, 最低でも 10 年以上の開発期間と莫大な研究開発費が必要となる。新薬開発には, われわれ研究者の情熱と使命感だけでは越えられない障壁がまだ存在する。しかし, 患者やその家族が直面している課題は現実であり, 深刻であり, 重大である。一刻も早い臨床応用の実現が切望されている。

DMD 診断は, 血液生化学検査により乳幼児期の筋力低下症状のない時期でも可能であり, 発症前に治療を始められればその効果は極めて大きいものと期待される。

筆者らは, カナマイシン類抗生物質群の探索から, ジ

ベカシンの 1 位アミノ基に AHB 基を導入することで減毒化した抗生物質, アルベカシンに強力なリードスルー活性があることを見出した。アルベカシンは 1973 年に微生物化学研究会によって合成され, 1990 年に抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 薬として上市されている承認薬である。それゆえ, オフラベルユース (適応外使用) の要件を満たすことで早期に臨床の場に送り込める薬物となり得る。アルベカシンを連日投与した *mdx* マウスの筋線維径に大小不同が少なく, 結合組織量も少ない傾向が認められることから, 未熟終止コドンの抑制によりジストロフィン蛋白質の発現を誘導することで, 日常活動での筋収縮による筋損傷を軽減し, 過剰な炎症反応が抑制されていることが示唆される (Fig. 5)。*mdx* マウスでの生化学的臨床指標による解析と同時に筋機能回復について, 握力, 等尺性収縮張力, 単収縮張力測定, 強収縮張力, 筋力減衰率を指標に検証したところ, 有意

な治療効果を認めている。また、神戸学院大学総合リハビリテーション学部の松尾雅文教授との共同研究により、ナンセンス変異をもつ DMD 患者由来の培養筋細胞を 2 週間アルベカシン処理をすることで、ジストロフィン蛋白質の発現促進がみられたことを確認している（投稿準備中）。

ナンセンス変異型嚢胞性線維症患者の割合が非常に多いイスラエルでは、近年急速にリードスルー療法に関する研究が発展している。Zilberberg らは、大腸腺腫をモデルとしたレポーターアッセイや移植癌細胞において、マクロライド系抗生物質タイロシンにもリードスルー活性があることを報告した<sup>22)</sup>。動物用医薬品および飼料添加物として承認されている本抗菌剤については、筆者らの薬効評価系でもそのリードスルー活性を確認しており、経口吸収性に優れ、数多く存在する誘導体の網羅的探索から 16 員環の半合成物に治療薬候補を特定しつつある。

#### IV. リードスルー薬の経皮投与

リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与による吸収が不可能であるため、筋ジストロフィー治療に用いる場合には筋崩壊が進行している組織にさらに障害を与える筋肉内や静脈内投与しか方法がなく、対象患者が低年齢のため治療に伴う疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため筆者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する簡便な経皮投与方法を開発した。すなわち、チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を用いて化学的皮膚透過促進処理を行い、アミノグリコシドの皮膚外用剤を連日投与することで、骨格筋内に皮下注射と同等のリードスルー効果を認めた<sup>13)</sup>。皮膚のもつ防御機能を特殊な機器を必要とせず安全性の高い除毛剤により制御し、皮膚非透過性の薬物の全身暴露の有効性が示されたことにより、筋ジストロフィーにおける長期投与中の在宅医療や嚥下困難な患者にとっても利便性の向上を提供できる非侵襲的投与方法として期待できる。経皮吸収型薬物送達法は患者への負担を軽減するだけでなく、初回通過効果や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化を提供できる点で魅力的である。また、ほかの薬物療法にも適用可能なため、その臨床的使用は大きな社会的成果が期待されている。

#### V. リードスルー効率の制御

薬物によってリードスルーした未熟終止コドンは、読

み飛ばされているのか、それとも意味をもつアミノ酸が挿入されているのか、実際のところその分子機構は混沌としており、いまだ一致した見解が得られていない。しかし、ジストロフィン蛋白質においては、健常個体の正常ヒトジストロフィンにおいても 1 塩基欠損や 1 塩基置換は頻発しており、ほとんどの単一アミノ酸置換には耐性があるため問題はないことが知られている。

リードスルー誘起物質を投与すると、正常な翻訳終点までもリードスルーしてしまう可能性が考えられる。しかし、実際には本来の翻訳終点の後にも終止コドンが連続して存在する 경우가多く、未熟終止コドンは通常の終止コドンよりも周囲の配列の特徴によって決まる終止効率が低いため、選択的にリードスルーされやすい。現実には、リードスルー誘起物質によって正常蛋白質よりも大きな異常蛋白質が検出された例はなく、リードスルーによる副作用は少ないと思われる。

また、ナンセンス変異を有する異常な mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解 (nonsense-mediated mRNA decay: NMD) と呼ばれる品質管理機構により急速に分解、除去される。しかし、G418 や NM, アタルレンといった既知のリードスルー薬物候補は、NMD を阻害し mRNA を安定化する、つまり未熟終止コドンを特異的に認識し、正常な終止コドンでの翻訳終結には影響を及ぼさないことが示唆されている<sup>6,12,23)</sup>。NMD が抑制されることで、例えリードスルー自体の効率は低くとも多くの全長翻訳産物が得られるため、リードスルー薬物療法はより現実的な治療といえよう。

リードスルーの感受性は、一般に未熟終止コドンの種類が UGA (Opal) > UAA (Ochre) > UAG (Amber) の順に高いことが知られている<sup>24)</sup>。また、未熟終止コドン直後のヌクレオチドは C > U > A/G の順にリードスルーしやすいこと<sup>25)</sup> や、リードスルー効率にとって上流の 2 ヌクレオチドと下流の 6 ヌクレオチドが極めて重要であること<sup>26)</sup> などが報告されている。これらのようにリードスルー誘起物質は、未熟終止コドンの種類およびその周辺配列に対する特異性が異なる。したがって、より多くのリードスルー治療薬候補物質を特定し、個々の患者に最適な治療戦略を選択かつ併用できるようにすることが求められている。

#### おわりに

DMD は医療需要の高い重篤な遺伝性筋疾患である。しかも正常量の 20% に相当するジストロフィンの回復によって病態進行の遅延と QOL の向上や延命が期待で