

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13045

研究課題名(和文) 加齢に伴う筋萎縮状態克服を目標とする安心・安全な治療の基礎的検討

研究課題名(英文) Fundamental study of safe treatment for overcoming muscle atrophy condition with aging

研究代表者

泰江 章博 (YASUE, Akihiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：80380046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、高齢化に伴う運動器障害による生活の質(QOL)低下につれ、医学的治療を必要とする人口が増加傾向にあり、その対策は社会的にも重要課題である。しかし、加齢に伴う種々の要因により進行する筋萎縮・筋肉量減少(サルコペニア)は、そのメカニズム解明が困難であることから、治療法開発が進展しない。本課題では、治療法開発の困難な加齢による筋力低下をターゲットに、現在も進化発展中であるゲノム編集技術(CRISPR/Casシステム)の安心・安全な利用を探索しつつ筋肉量増大を図り、要支援・要介護からの開放やQOL上昇を目指すことを目的として研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In recent years, with the decline in quality of life (QOL) due to disorders of locomotorium accompanying the aging population, there is an increasing trend of the population needing medical treatment, and the measures are socially important issues. However, as muscle atrophy and muscle mass reduction (sarcopenia) progressing due to various factors associated with aging are difficult to elucidate its mechanism, the therapeutic methods are not progress. In this study, we aimed to increase muscle mass while searching for secure and safe use of genome editing technology (CRISPR/Cas system), which is still evolving, targeting muscle weakness due to aging, which is difficult to develop therapeutic methods. This would lead to release from support and nursing, and to raise QOL.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Casシステム 筋萎縮 筋肉量増大

### 1. 研究開始当初の背景

TGF-βスーパーファミリーの一員である growth differentiation factor (Gdf) 8 は、骨格筋量増大を呈するそのノックアウトマウスの所見からマイオスタチンと名付けられ、その後、筋肥大家畜牛・競争犬など極度な筋肥大表現型を呈する品種で、同遺伝子変異が次々と検出・報告され、それはヒトも例外ではなかった。

我々は過去に、家畜牛で検出されたドミナントネガティブ型マイオスタチンを CAG プロモーター下で強発現させたトランスジェニックマウスを作製し、明らかな骨格筋量増大マウスを得た(Nishi et al. BBRC, 2002)。これら家畜牛もトランスジェニックマウスも骨格筋増大を認めた一方で、目立った副作用や負の表現型は認められなかった。このことから、マイオスタチン遺伝子配列改変は、負の事象をもたらす副作用が生じない可能性が十分考えられ、また、ヒトでの変異体の存在は安全性としての担保でもあり、筋肉量低下克服へのアプローチとして、これほど容易で安心・安全、確実なものはないと予想された。さらに、我々は、同遺伝子機能抑制による筋疾患克服を課題に、マイオスタチン配列を標的とした siRNA を、アテロコラーゲンをデリバリーに筋肉注射したところ、やはり筋肥大化を認めた(Kinouchi et al. Gene Ther, 2008)。一方で、我々は TALEN、CRISPR/Cas システムといったゲノム編集技術に、マウス受精卵において早くから適用させ、標的配列破壊マウスを作製してきており(Yasue et al. Sci Rep, 2014, Mitsui et al. Sci Rep, 2016)、成体マウスへの応用も見据えていた。

### 2. 研究の目的

近年、高齢化に伴う運動器障害による生活の質 (QOL) 低下につれ、医学的治療を必要とする人口が増加傾向にあり、その対策は社会的にも重要課題である。しかし、加齢に伴う種々の要因により進行する筋萎縮・筋肉量減少(サルコペニア)は、そのメカニズム解明が困難であることから、治療法開発が進展しない。近年開発されたゲノム編集技術は、これまで困難だと考えられてきた遺伝子改変を容易にする生物学の常識を覆す革命的技術で、培養細胞系や受精卵のみならず、成体実験動物においても応用されている。本課題は、治療法開発の困難な加齢による筋力低下をターゲットに、現在も進化発展中であるゲノム編集技術 (CRISPR/Cas システム) の安心・安全な利用を探索しつつ筋肉量増大を図り、要支

援・要介護からの開放や QOL 上昇を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 成体へのゲノム編集技術の適用として、gRNA ならびに Cas9 を同時に発現させる pX330 プラスミドベクターを使用し、マイオスタチン標的配列を組み込んだ。

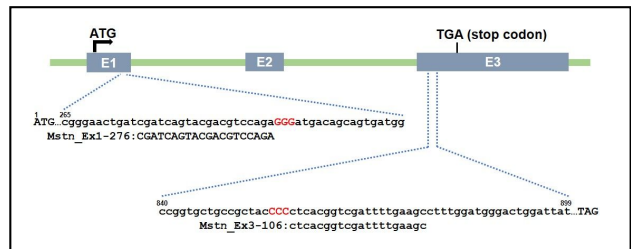
(2) これらの筋肉への微小気泡とパルス超音波を用いた音響穿孔法 (ソノポレーション) を利用した局所投与を行うことで、マイオスタチンの配列破壊を試みた。ポジティブコントロールとして、CAG/GFP ベクターを用いた。

(3) 筋肉量の観察を行う。

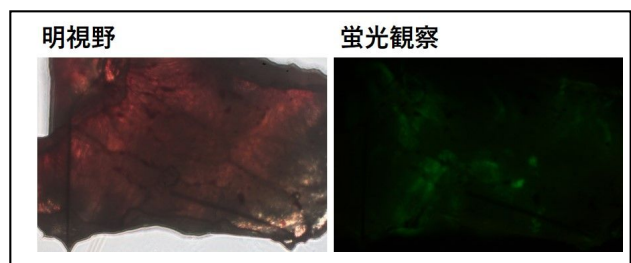
(4) 標的配列破壊が生じているかを、ダイレクトシーケンスにより確認する。

### 4. 研究成果

(1) CRISPR 標的配列の設計 (マウスマイオスタチン遺伝子)

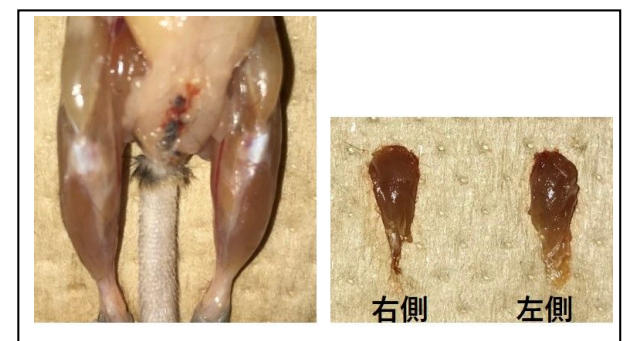


(2) ソノポレーションによる CAG/GFP プラスミドの導入

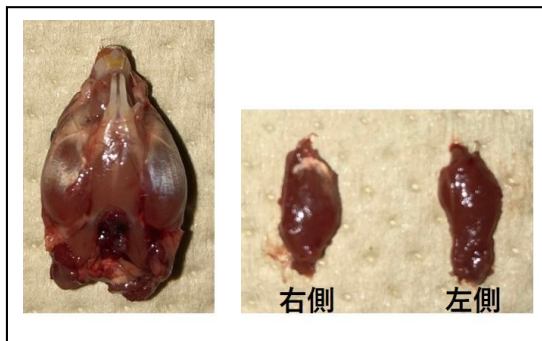


GFP の発現が認められ、ソノポレーションによるプラスミド導入が行われていることが示された。

(3) 筋肉量の変化の観察 (右側: マイオスタチン標的配列 in pX330 ベクター、左側: コントロールとして CAG/GFP 発現ベクター) **前脛骨筋**

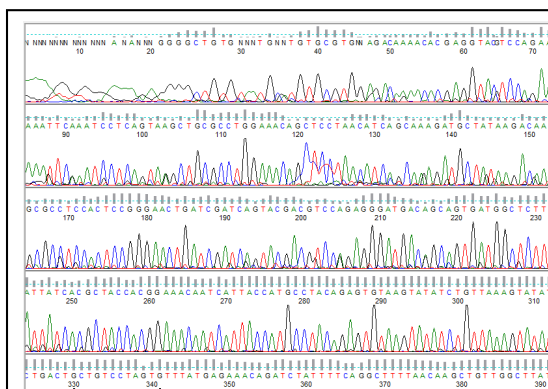


## 咬筋



前脛骨筋、咬筋とも、マイオスタチン標的配列破壊を試みた右側での筋肉量増大は認められなかった。

### (4) ダイレクトシーケンスによる標的配列破壊の確認の一例



全てのサンプルにおいて、標的配列の破壊は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Fischer C, Seki T, Lim S, Nakamura M, Andersson P, Yang Y, Honek J, Wang Y, Gao Y, Chen F, Samani NJ, Zhang J, Miyake M, Oyadomari S, Yasue A, Li X, Zhang Y, Liu Y, Cao Y. A miR-327-FGF10-FGFR2-mediated autocrine signaling mechanism controls white fat browning. *Nat Commun.* 2017 Dec 12;8(1):2079. doi: 10.1038/s41467-017-02158-z.

Yasue A, Kono H, Habuta M, Bando T, Sato K, Inoue J, Oyadomari S, Noji S, Tanaka E, Ohuchi H. Relationship between somatic mosaicism of Pax6 mutation and variable developmental eye abnormalities-an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos. *Sci Rep.* 2017 Mar 3;7(1):53. doi: 10.1038/s41598-017-00088-w.

Hagiwara-Chatani N, Shirai K, Kido T, Horigome T, Yasue A, Adachi N,

Hirai Y. Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Sci Rep.* 2017 Jan 6;7:39868. doi: 10.1038/srep39868.

Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E. Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal the importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development. *Sci Rep.* 2016 Dec 5;6:38398. doi: 10.1038/srep38398.

Mino-Oka A, Izawa T, Shinohara T, Mori H, Yasue A, Tomita S, Tanaka E. Roles of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:274-281. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.028. Epub 2016 Oct 28.

Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LT, Onishi A, Yamashita Y, Kosugi C, Suzuki H, Sembon S, Suzuki S, Nakai M, Hashimoto M, Yasue A, Matsuhisa M, Noji S, Fujimura T, Fuchimoto D, Otoi T. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv.* 2016 Sep 14;2(9):e1600803. doi: 10.1126/sciadv.1600803. eCollection 2016 Sep.

(雑誌論文)(計 0 件)

(学会発表)(計 5 件)

Yasue A, Arai D, MITSUI SN, Oyadomari S and Tanaka E: In vivo deletion assay of mouse MSX1 gene using CRISPR/Cas system., 第65回国際歯科学研究学会日本部会総会・学術大会 JADR, Nov. 2017. 東京(展示)

Yasue A, Arai D, Mitsui SN, Oyadomari Sand Tanaka E: Functional verification of each Msx1 homology domain of Msx1 gene for tooth morphogenesis using CRISPR/Cas system., 第60回日本発生生物学会, May 2017. 東京(展示)

Yasue A, Mitsui SN, Arai D, Oyadomari S and Tanaka E: In vivo DNA deletion assay of Msx1 gene in mice using CRISPR/Cas system, Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Mar. 2017. Kiel, Germany, (poster)

泰江 章博, 多数歯欠損症 —原因遺伝子探索と in vivo 機能解析—, 第 75 回日本矯正歯科学会, 2016 年 11 月. アステイ徳島 (徳島県徳島市) (口演)

Yasue A, Naruto T, Mitsui SN, Komoto T, Imoto I and Tanaka E: Detection of small deletion in PAX9 gene in a Japanese family with oligodontia by combined targeted resequencing and quantitative PCR analysis, 12th Tooth Morphogenesis and Differentiation conference, Jun. 2016. Porvoo, Finland (poster)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泰江 章博 (YASUE, Akihiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号 : 8 0 3 8 0 0 4 6

### (2) 連携研究者

三戸 太郎 (MITO, Taro)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部  
(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号 : 8 0 3 2 2 2 5 4