

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09767

研究課題名(和文) TGF-beta阻害戦略によるサルコペニアの病態治療研究

研究課題名(英文) Therapeutic study of sarcopenia by TGF-beta inhibition strategy

研究代表者

大澤 裕 (Ohsawa, Yutaka)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80246511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：介護負担を押し上げ健康寿命を短縮する加齢性筋萎縮(サルコペニア)の基本病態は解明されていない。我々は老化マウスの骨格筋でマイオスタチン/TGF-betaシグナルが亢進していることを見出した。本研究では、マイオスタチン活性阻害老化マウスを作出した。マイオスタチン阻害老化マウスでは、老化マウスで認められた体重減少・握力減少・筋張力減少・筋減少が改善、寿命が延長し、筋線維萎縮と筋衛星細胞減少が軽減した。また、骨格筋の遺伝子解析によりマイオスタチン/TGF-beta阻害分子を同定した。そのリコンビナント蛋白質の老化マウス投与に取り組み、将来のサルコペニア治療への突破口を開くことを目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは介護負担を押し上げるため、その克服は先進国の先頭を切って超高齢化社会を迎えた本邦の社会的課題となっているが、保険適用を獲得している医薬品は世界的に皆無である。これまでサルコペニア研究は、骨格筋幹細胞数の減少による骨格筋再生能低下、およびtype II 線維の減少といった細胞生物学的観点が目目されてきた。本研究は、我々が独自に発見した老化マウス骨格筋のマイオスタチン/TGF-betaシグナルの亢進を端緒として、サルコペニア病態における筋線維萎縮機構を解明する分子生物学に立脚した独創性をその学術的意義とする。その阻害医薬開発は、臨床的かつ医療経済的に極めて有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To date, the molecular mechanisms have almost been unknown leading to age-related muscular atrophy (sarcopenia), which increases the caregiver burden and shortens the healthy life expectancy. We found that the myostatin/TGF-beta signal was upregulated in skeletal muscle in aged mice. In the current study, we generated and characterized the aging mice accompanied with inhibition of myostatin activity. The mice showed amelioration of weight loss, muscle loss, reduced grip strength, and decreased muscle tension observed in the aged mice. The mice exhibited alleviation of myofiber atrophy and loss of muscle precursor satellite cell, when compared to the aged mice. In addition, inhibition of myostatin activity extended life span in the mice. We identified a myostatin/TGF-beta inhibitory molecule in skeletal muscle tissue by gene expression analysis. We are currently administering its recombinant protein to aged mice, and aim to open a breakthrough for the future treatment of sarcopenia.

研究分野：神経内科学

キーワード：サルコペニア マイオスタチン TGF-beta 老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動・循環・内分泌・代謝を司る人体最大の臓器である。最近、加齢性筋萎縮（サルコペニア）が健康寿命を短縮させる極めて重要な要因であることが証明され（*Matthews, Ann N Y Acad Sci* 1237, 2011）その克服は先進国の先頭を切って超高齢化社会を迎えたわが国の課題となっている。最近ヨーロッパでは、骨格筋量と筋力を基準としたサルコペニアの診断基準が提唱され（*Cruz-Jentoft, Age Aging* 39, 2010）、これを鑑みると、本邦のサルコペニア患者は、60-70歳代の15%、80歳以降の50%、約1,000万人と推定され、介護負担増大の要因と考えられる。ところが、サルコペニアの基礎研究は緒に就いたばかりで、保険適用を獲得している医薬品は世界的に皆無である。

マイオスタチンは骨格筋特異的なTGF- $\beta$ 分子で筋量を負に制御する（*McPherron, Nature* 387, 1997）。我々は、マイオスタチンのシグナル亢進から筋萎縮が惹起される筋ジストロフィー病態を世界に先駆け報告した（*Ohsawa, J Clin Invest* 116, 2006）。これまで、このシグナル破綻に対して、TGF- $\beta$ 分子を広範に抑制するタイプ I 膜型受容体キナーゼ阻害剤、マイオスタチンのみを特異的に阻害するペプチド医薬（PCT/JP2014/52345）を開発し、それぞれ筋萎縮改善効果を示して論文を発表した（*Ohsawa, Lab Inv* 92, 2012, *Ohsawa, PLoS One* 10, 2015, *Takayama, J Med Chem* 58, 2015）。

我々は老化マウスの骨格筋を解析して、TGF- $\beta$ 活性が亢進して著明な筋萎縮を呈することを発見した。本研究では、サルコペニアを「年齢依存性の骨格筋マイオスタチン/TGF- $\beta$ 活性亢進を基本病態とする」と仮説する。老化マウスとマイオスタチン活性阻害マウスの交配によってマイオスタチン活性阻害老化マウスを作出し、老化マウスとの比較解析によりこの仮説を検証する。併せて、マイオスタチン/TGF- $\beta$ を阻害する蛋白質を大量精製して、超高齢マウスに経静脈投与して、サルコペニア改善の可否を問い、医薬品としての非臨床POC取得を目指す。

### 2. 研究の目的

サルコペニアの基本病態は解明されていない。われわれは老化マウスの骨格筋でマイオスタチン/TGF- $\beta$ シグナルが亢進する驚くべき現象を発見した。本研究は、マイオスタチン活性阻害老化マウスを作出してサルコペニア改善の可否を検証し、骨格筋の網羅的遺伝子発現解析からマイオスタチン/TGF- $\beta$ が制御するサルコペニアにいたる分子病態を解明することを目標とする。さらにマウスへのマイオスタチン/TGF- $\beta$ 阻害分子の投与により新規病態介入への突破口を開く。マイオスタチン/TGF- $\beta$ 恒常性破綻によるサルコペニア発症を作業仮説とする独自の基礎研究で、阻害医薬による健康寿命延伸療法の基盤確立（非臨床POC取得）を目指す。

### 3. 研究の方法

平成29年度は、老化マウスに、マイオスタチン活性阻害マウスを交配し、F2世代で、野生型、マイオスタチン活性阻害、老化、マイオスタチン活性阻害老化の4種類の遺伝子型を示すマウスを作出した。このマイオスタチン阻害老化マウスの骨格筋解析により、マイオスタチン活性阻害によるサルコペニアの改善の可否を検証する。平成30年度以降は、これらマウスの骨格筋遺伝子発現をGene Chipにより網羅的に解析し、クラスター解析によって、マイオスタチン/TGF- $\beta$ シグナルを抑制する分子を探索した。これらの分子を、レトロウイルスベクターpMXs-IRES-GFPに組み込み、PLAT-Eパッケージング細胞で増殖させた（*Kitamura, Exp Hematol* 31, 2003; *Ohsawa, Lab Inv* 92, 2012）。このウイルス粒子をマウス筋芽細胞C2C12に導入し2%ウマ血清誘導アッセイを行い、筋芽細胞融合指数（Fusion index）、Myogenin・ミオシン重鎖・CK発現により多核筋管分化度について*in vitro*解析して、マイオスタチン/TGF- $\beta$ シグナルを抑制・筋融合・筋分化を促進する分子を絞り込んだ。この分子のリコンビナント蛋白質を超高齢野生型マウスへ全身投与し、マイオスタチン阻害戦略によるサルコペニアの改善、寿命短縮の改善について検証を行った。

### 4. 研究成果

交配により、マイオスタチン活性を阻害した老化マウスを作出した。マイオスタチン活性阻害老化マウスでは、老化マウスと比較して、生理学的には、(i)体重減少、(ii)握力減少、(iii)筋張力減少、(iii)筋量減少がそれぞれ有意に改善し、(iv)寿命が有意に延長した。骨格筋解析では、(i)単一筋線維断面積減少、(ii)線維化マーカーヒドロキシプロリン含有量、(iii)筋前駆（衛星）細胞数減少、が、いずれも有意に軽減した。また、マイオスタチン活性阻害老化マウスと老化マウス骨格筋の網羅的遺伝子発現比較解析により、発現が2倍以上増減する分子を選択した。それらのクラスター解析によって、マイオスタチン/TGF- $\beta$ 抑制分子群同定した。この分子群のうち、筋分化・筋融合を促進する分子を絞り込んだ。現在、この分子のリコンビナント蛋白質を作製して、老化マウスへの投与に取り組んでいる。サルコペニアの改善の有無を検証して、将来のサルコペニア治療への突破口を開くことを目指している。

これまでのサルコペニアの基礎研究は、加齢にともなう骨格筋幹細胞数の減少による骨格筋再生能低下（*Chakkalakal, Nature* 490, 2012）およびtype II線維の減少（*Verdijik, Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, 2007）といった細胞生物学的観点が注目されてきた。本研

究は、われわれが独自に発見した老化マウス骨格筋のTGF- $\beta$  シグナル亢進を端緒として、サルコペニア病態における骨格筋 TGF- $\beta$  シグナルの恒常性破綻から筋線維萎縮にいたる機構を明らかにする分子生物学に立脚した独創性をその学術的な特色としている。阻害医薬開発、とりわけマイオスタチン/TGF- $\beta$  抑制/筋分化促進医薬の投与は、サルコペニアばかりでなく骨粗鬆症など老化現象一般への波及効果が期待できる臨床的な有用性を持つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y.	4. 巻 492
2. 論文標題 Cleavage of -dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 199-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.08.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大澤 裕, 深井雄太, 萩原宏毅, 砂田芳秀
2. 発表標題 The inhibitory core of the myostatin prodomain has potential to treat muscle atrophy
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 裕, 丹田和恵, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 マイオスタチンペプチド医薬によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療法の基盤研究
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博
2. 発表標題 筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF-シグナルの解明と分子標的医薬の開発
3. 学会等名 平成30年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班 班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 裕
2. 発表標題 マイオスタチン阻害ペプチドによる筋ジストロフィーとサルコペニア治療法の開発
3. 学会等名 第3回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohsawa Y, Fukai Y, Ohtsubo H, Fujino M, Nishimatsu S.I, Sunada Y.
2. 発表標題 The inhibitory core of myostatin prodomain: its suppression of ligand-receptor binding and potential for muscle wasting disorders.
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology 第58回日本神経学会学術大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤 裕, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 マイオスタチン阻害ペプチドによる筋ジストロフィー治療の基盤研究
3. 学会等名 第35回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深井雄太, 大澤 裕, 大坪秀明, 西松伸一郎, 萩原宏毅, 笹岡俊邦, 村上龍文, 砂田芳秀
2. 発表標題 -dystroglycanプロセッシングの分子機構の解析
3. 学会等名 平成29年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班 班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 大坪秀明, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博
2. 発表標題 筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF- $\beta$ シグナルの解明と分子標的医薬の開発
3. 学会等名 平成29年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班 班会議
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西松 伸一郎  (Nishimatsu Shin-Ichiro)  (20222185)	川崎医科大学・医学部・准教授   (35303)	
研究分担者	村上 龍文  (Murakami Tatsufumi)  (30330591)	川崎医科大学・医学部・准教授   (35303)	