

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10941

研究課題名(和文) Smadを標的とした不動性筋萎縮治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a therapy for immobilization induced muscle atrophy by targeting Smads

研究代表者

金治 有彦 (KANAJI, Arihiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20286511

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)：筋萎縮は高齢者において転倒から脆弱性骨折のリスクとなるため、その制御は重要である。我々はSmad2とSmad3がタンパク質レベルで萎縮した筋に蓄積することをマウスの不動性筋萎縮モデルを用いて見出していた。そこで、Smad3 floxマウスの樹立を試み、Smad2 floxマウスはすでに共同研究者から入手済みであったため、アダルトにおいてSmad2/Smad3を二重欠損するマウスの樹立に成功した。このマウスを用いてSmad2/Smad3はアダルトにおいて抑制可能であることを見出した。またドラッグリポジショニングのスクリーニングによりSmad3抑制剤の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、様々な分子が筋萎縮に対する治療標的と考えられているが筋萎縮に対する治療薬は存在しない。我々はSmad2/Smad3が不動性筋萎縮の治療標的であることを見出していたが、Smad2/Smad3のノックアウトマウスは胎生致死であるため、アダルトにおける筋萎縮の治療標的としては有用であるかが不明であった。今回のスタディでは、Smad2/Smad3はアダルトにおいて治療標的となり得ることを明らかにした点で学術的意義がある。また人為的にSmad2/Smad3を抑制するための薬剤も同定できており、今後の筋萎縮の治療法の開発にもつなげ得る成果を得た点において、社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Muscle atrophy is a risk for fall leading to fragility fractures in elderly. Thus, inhibiting muscle atrophy in elderly is mandatory. We have previously demonstrated that Smad2 and Smad3 proteins accumulated in atrophic muscles in an immobilization induced muscle atrophy model in mice. Muscle specific targeting Smad2 and Smad3 resulted in significant inhibition of the immobilization induced muscle atrophy in mice. To determine if Smad2 and Smad3 could be inhibited globally in adults, we tried to establish Smad3 flox mice. We successfully established the Smad3 flox mice. Smad2 flox mice were already gifted by a collaborator. Now we successfully generated inducible Smad2 and Smad3 doubly deficient mice in adults. We found that Smad2 and Smad3 could be targeted in adult mice. We also screened Smad3 inhibitors by a drug repositioning screen, and identified some agents as Smad3 inhibiting chemical compounds.

研究分野：整形外科

キーワード：整形外科

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮は筋力の低下から、特に高齢者においては転倒や転倒による脆弱性骨折のリスクともなるため、その対策は重要である。筋萎縮は不動や加齢、固定、癌による悪液質、ステロイドの長期投与等で発症するものであるが、加齢により進行性に筋力や筋肉量の低下をきたすサルコペニアは、国立長寿医療研究センターによる無作為抽出一般住民長期調査、老化に関する長期十段疫学研究 (NILS-LAS) によると、国内の筋量ベースでの罹患患者数は約 850 万人にのぼると推計されている。サルコペニアの発症によっては、先述のように転倒や骨折のリスクとなるばかりではなく、サルコペニアによる不動によりさらなるサルコペニアの進行という悪循環を招き、日常生活動作レベルの低下や、寝たきりなど、二次的な障害の発生リスクを高め、高齢者のロコモティブシンドロームの大きな要因ともなるほか、本人の苦痛のみならず、家族の介護負担や医療経済的にも高齢者の大きな問題の 1 つとなっていることから、その対策は超高齢社会の我が国においては、もはや喫緊の課題といえる。一方、サルコペニアの予防あるいは治療用の薬剤の開発については、すでにメガファーマを含む複数のメーカーがサルコペニア対策用の薬剤の開発に着手しており、一部はフェーズスタディが開始されているものもあるが、未だサルコペニアや筋萎縮に対する有望な薬剤の製品化には至っていないのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では新規に筋萎縮に対する治療薬の開発を目的とし、スタディを実施した。研究開始時点で筋萎縮の予防あるいはその改善において、もっとも有望と考えられていた治療標的は Myostatin というタンパク質であった。Myostatin の先天的な機能喪失型自然変異動物ではヒトを含め牛や犬などで筋量の増大と筋力の上昇を認めることが知られており、遺伝子工学的に Myostatin 遺伝子を欠損させたマウスでも同様の所見が報告されたことなどから、もっとも注目を集めている治療標的である。そこで、Myostatin の機能を抑制する阻害薬や中和抗体製剤、Myostatin を生理的に抑制する Folistatin 製剤、また Myostatin の受容体である Activin type II receptor (ActR II) に対する阻害薬や中和抗体製剤の開発がメガファーマなどを中心に進められ、すでにそのうちのいくつかはフェーズスタディに入っているものもあるが、今に至るまで FDA を含め世界的にも認可製剤はないのが現状である。我々はまず、先天的に機能欠損することで筋量・筋力増強につながる Myostatin が、アダルトにおける筋萎縮に対しても有望な治療標的となり得るかを検証するため、Cre/LoxP system を用いてアダルトにおいて Myostatin を欠損させるマウスモデルを新規に作出し、神経切断により標的筋が萎縮する不動態筋萎縮モデルを作成し、その抑制効果を検証したところ、Myostatin 抑制によっても筋萎縮を予防することは全くできないことを見出した (図 1 : JBC 2016)。このことにより、世界的に進められている Folistatin-Myostatin-ActR II 経路以外の治療標的分子探索の必要性が示唆された。そこで、我々が世界に先駆けて不動態筋萎縮治療標的候補として見出した Smad2/Smad3 が、アダルトにおいても治療標的となり得るか、ということ进行を明らかにすることを目的に本研究を開始した。また、Smad2/Smad3 を阻害する薬剤を同定することで、Smad2/Smad3 を標的とした新たな筋萎縮の治療法を開発することを目的とした。

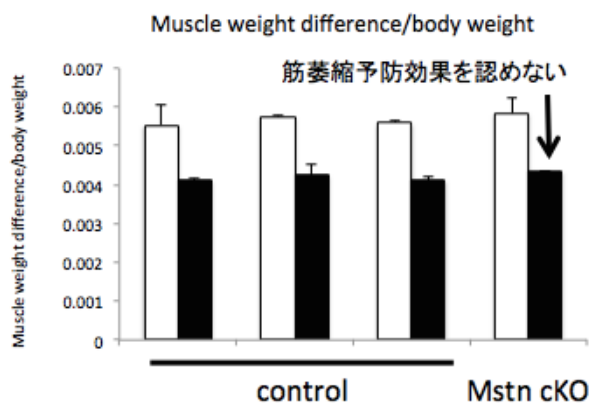


図 1: Myostatin 標的化によっても筋萎縮は予防できない Myostatin アダルト欠損マウス (Mstn cKO) は野生型や Cre のみなどの control マウスと同等の筋肉量の低下を神経切断による標的筋萎縮モデルにおいて示す (□ 非萎縮側、■ 萎縮側)。

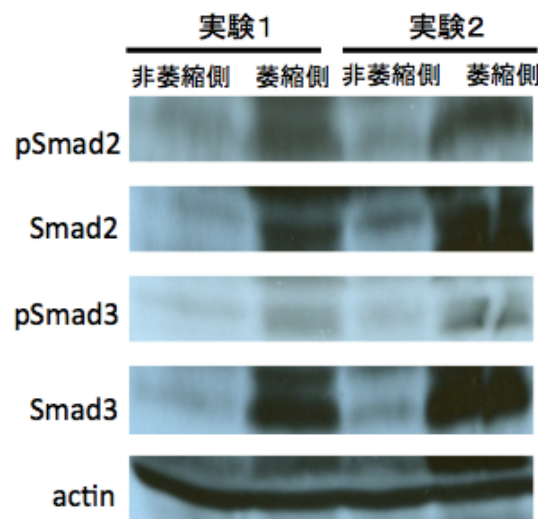


図 2: 筋萎縮側では Smad2, Smad3 蛋白が蓄積する野生型マウスにおける神経切断による標的筋萎縮モデルにおいて萎縮側に特異的にリン酸化フォーム (p) を含む Smad2, Smad3 蛋白の蓄積を認める。

そこで、我々が世界に先駆けて不動態筋萎縮治療標的候補として見出した Smad2/Smad3 が、アダルトにおいても治療標的となり得るか、ということ进行を明らかにすることを目的に本研究を開始した。また、Smad2/Smad3 を阻害する薬剤を同定することで、Smad2/Smad3 を標的とした新たな筋萎縮の治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、不動性萎縮モデルにおいて、萎縮筋における autophagy 経路の関与の有無や遺伝子発現に関する網羅的なマイクロアレイ解析、蛋白質の発現解析を進め、それらの中から最も有望な知見として萎縮側の筋に特異的に Smad2, Smad3 蛋白質が蓄積することを見出した (図2、JBC 2016)。そこで、野生型マウス (WT)、筋特異的 Smad2 欠損 (Smad2 KO)、Smad3 KO および筋特異的 Smad2/Smad3 ダブル欠損 (DKO) マウスを用いて、神経切断による標的筋の萎縮モデルを作成したところ、Smad3 および DKO において筋萎縮のほぼ完全な予防効果を認めた (図3、JBC 2016)。このことは Smad2/Smad3 が不動性筋萎縮予防において、治療標的として優れていることを示唆している。しかし、この実験では Smad2 は筋特異的に、また Smad3 は全身的に出生時には欠損しているモデルであり、アダルトにおいても Smad2/Smad3 が治療標的として有用であるかは明らかではない。Smad2 や

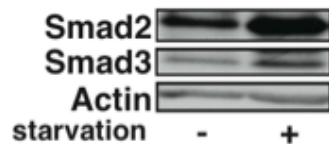


図4: C2C12細胞を用いたin vitroにおける筋萎縮再現系1 C2C12細胞に対し血清starvationをすることで、Smad2およびSmad3のタンパクの蓄積をwestern blotにて確認することができる。

Smad2/Smad3 二重欠損マウスは胎生致死になることが知られており、この点において、Smad2/Smad3 をアダルトにおいて標的としても致死等の有害事象が発生しないか、確認する必要があった。

そこで、まず Smad2/Smad3 をアダルトにおいて全身的に抑制した場合の有害事象の有無を検証するため、Smad3 のコンディショナルノックアウトマウス (Smad3 flox マウス) を新規に樹立することとした。Smad3 flox マウスについてはターゲティングベクターの ES 細胞を用いた相同組み換えによる遺伝子導入により作出することとした。また Smad2/Smad3 を阻害する薬剤については、ドラッグリポジショニングによるスクリーニングを行うこととした。ドラッグリポジショニング用のドラッグライブラリーを用い、一次スクリーニングとしては筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、血清飢餓 (starvation) によって、in vivo での筋萎縮時と同様、筋萎縮関連分子である Atrogin-1 や MuRF1 の発現誘導が再現されるモデルをすでに確立していたので、簡便に多くの薬剤のスクリーニングを可能としていた。この C2C12 細胞を用いた in vitro の系の特徴としては、C2C12 細胞の starvation によって、in vivo での挙動と同様、Smad2/Smad3 がタンパク質レベルで蓄積するが (図4)、この際 Smad2/Smad3 の mRNA は上昇せず (図5)、in vivo を模倣する系であるため、in vitro のスクリーニングで同定された化合物の効果が in vivo でも期待できるメリットが考えられた。

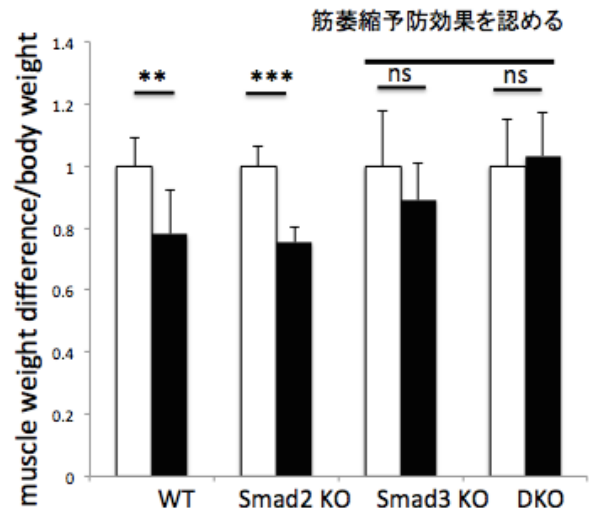


図3: Smad3は筋萎縮予防のための標的となる野生型 (WT)、Smad2 Knock out (Smad2 KO)、Smad3 KO、Smad2/3 double KO (DKO) マウスそれぞれに神経切断による標的筋萎縮モデルを実施した (□非萎縮側、■萎縮側)。

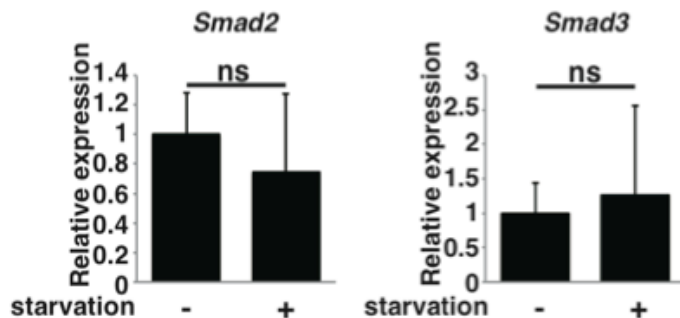


図5: C2C12細胞を用いたin vitroにおける筋萎縮再現系2 C2C12細胞に対し血清starvationをしても、Smad2およびSmad3のmRNAレベルでの上昇は認めない。

4. 研究成果

まず、Smad3 flox マウスの作出については、ターゲティングベクターを作成し、ES 細胞へ相同組み換えにより遺伝子導入を行った。その後、ターゲティングベクターが組み込まれた陽性 ES 細胞クローンを選別し、陽性 ES 細胞クローンからネオマイシンカセットの deletion を行い、仮親マウスへの ES 細胞の移植からキメラマウス (F0) の産仔を得ることに成功した。F0 のキメラマウスと野生型マウスとの交配で F1 マウスを得、genotyping の結果、Smad3 flox 遺伝子が世代を超えて継代されることが明らかになった。そこで、この

Smad3 flox マウスと、すでに入手済みの Smad2 flox マウス、全身性に誘導性に Cre を発現する Mx1 Cre マウスとの交配により、Mx1 Cre/Smad2-flox/flox, Smad3-flox/flox マウスの作出に成功した。Mx1 Cre マウスでは、polyIpolyC の投与により Mx1 プロモーターが活性化され、Cre の発現誘導が起こる。そこで、8週令の Mx1 Cre/Smad2-flox/flox, Smad3-flox/flox マウスに polyIpolyC を投与し、アダルトにおいて全身性に Smad2/Smad3 を欠損させたところ、通常の Smad2/Smad3 全身欠損マウスに見られるような致死的な有害事象は認めず、Smad2/Smad3 がアダルトにおいては治療標的となり得ることが明らかになった。

そこで、人為的に Smads を抑制すべく、ドラッグリポジショニングにより Smad2/Smad3 を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。すでに入手済みのドラッグリポジショニングライブラリーを用いて、C2C12 筋芽細胞の *in vitro* のスクリーニング系により、筋萎縮関連因子である Atrogin-1 と MuRF1 の発現抑制効果を指標にスクリーニングを行い、複数のヒット化合物を得ることに成功した。

以上の成果は全て現時点では未発表であり、今後論文等で公開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Oike T, Kaneko Y, Miyamoto K, Funayama A, Oya A, Nishiwaki T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T.	4. 巻 37
2. 論文標題 1. Insulin-like growth factor-I is required to maintain muscle volume in adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab.	6. 最初と最後の頁 627-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-018-0964-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi S, Mikami K, Nakashima D, Kitamura T, Hasegawa N, Nishikino M, Kanaji A, Nakamura M, Nagura T.	4. 巻 19
2. 論文標題 2. Laser Resonance Frequency Analysis: A Novel Measurement Approach to Evaluate Acetabular Cup Stability During Surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s19224876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Oike T, Kaneko Y, Miyamoto K, Funayama A, Oya A, Nishiwaki T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Insulin-like growth factor-I is required to maintain muscle volume in adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab.	6. 最初と最後の頁 627-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-018-0964-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu H, Shimoda M, Mochizuki S, Miyamae Y, Abe H, Chijiwa M, Yoshida H, Shiozawa J, Ishijima M, Kaneko K, Kanaji A, Nakamura M, Toyama Y, Okada Y.	4. 巻 188
2. 論文標題 Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2109-2119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2018.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki T, Uchikawa S, Kusakabe H, Seki A, Eguchi Y, Takayama S, Oya A, Nakamura M, Matsumoto M, Kanaji A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pronounced femur malunion after pathological bone fracture due to a simple bone cyst in the shaft of the femur, treated using Ilizarov fixation: a case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-018-1710-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki T, Oya A, Fukuda S, Nakamura S, Nakamura M, Matsumoto M, Kanaji A.	4. 巻 28
2. 論文標題 Curved periacetabular osteotomy via a novel intermuscular approach between the sartorius and iliac muscles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hip Int.	6. 最初と最後の頁 642-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1120700018772047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oya A, Katsuyama E, Morita M, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nishiwaki T, Funayama A, Fujita Y, Kobayashi T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T.	4. 巻 36
2. 論文標題 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab.	6. 最初と最後の頁 679-690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-017-0890-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki T, Hata R, Oya A, Nakamura M, Matsumoto M, Kanaji A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Pelvic Tilt Displacement Before and After Artificial Hip Joint Replacement Surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Arthroplasty	6. 最初と最後の頁 925-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arth.2017.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki T, Uchikawa S, Kusakabe H, Seki A, Eguchi Y, Takayama S, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M, Kanaji A.	4. 巻 23
2. 論文標題 Neuroblastoma metastasis to bone requiring differentiation from septic arthritis of the hip. Report of 2 cases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Sci.	6. 最初と最後の頁 853-856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2016.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oya A, Katsuyama E, Morita M, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nishiwaki T, Funayama A, Fujita Y, Kobayashi T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-017-0890-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki T, Hata R, Oya A, Nakamura M, Matsumoto M, Kanaji A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Pelvic Tilt Displacement Before and After Artificial Hip Joint Replacement Surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Arthroplasty	6. 最初と最後の頁 925-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arth.2017.10.014	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 金治有彦, 大矢昭仁, 大野由紀雄, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 簡易ナビゲ-ションシステムと関節包靭帯温存手技を併用した人工股関節全置換術の有用性
3. 学会等名 日本最小侵襲整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦, 大矢昭仁, 古郡宏行, 大野由紀雄, 中村賢, 菊池駿介, 木村篤史, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 仰臥位前外側進入による臼蓋側人工股関節再置換術の短期成績
3. 学会等名 日本股関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦, 大矢昭仁, 古郡宏行, 大野由紀雄, 中村賢, 菊池駿介, 木村篤史, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 関節包靭帯弛緩性が仰臥位前外側進入関節包靭帯温存THAの術後成績に与える影響
3. 学会等名 日本股関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦, 大矢昭仁, 大野由紀雄, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 関節包靭帯を温存した股関節鏡視下関節唇縫合術の適応と限界
3. 学会等名 日本股関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaji A, Nishiwaki T, Oya A, Ogawa R, Niki Y, Nakamura M, Matsumoto M
2. 発表標題 Accuracy of Implant Positioning and Leg Length Equality in Total Hip Arthroplasty in Supine Position for Dysplastic Hip
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦, 大矢昭仁, 小川亮, 中村賢, 木村篤史, 菊池駿介, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 仰臥位THAにおける関節靭帯温存の有用性－術前脚長差1cm以下の症例での検討－
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦
2. 発表標題 変形性股関節症・股関節唇損傷に対する疼痛対策
3. 学会等名 日本人工関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金治有彦, 大矢昭仁, 古郡宏行, 中村賢, 菊池駿介, 木村篤史, 二木康夫, 中村雅也, 松本守雄
2. 発表標題 牽引手術台使用仰臥位関節包靭帯温存人工股関節全置換術の術後成績 -術直前牽引時の関節裂隙開大の程度が術後成績に与える影響-
3. 学会等名 日本人工関節学会
4. 発表年 2019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	宮本 健史 (MIYAMOTO Takeshi) (70383768)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授 (32612)	