

機関番号：35303
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591013
 研究課題名（和文）TGF- β タイプ I 受容体に対する筋ジストロフィー分子標的治療法の開発
 研究課題名（英文）Targeting the TGF- β type I receptor kinase as a molecular therapy for muscular dystrophy
 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

研究成果の概要（和文）：TGF- β タイプ I 受容体に対する低分子阻害薬が細胞内 TGF- β シグナル抑制による抗癌剤として開発された。この阻害剤は TGF- β 1、マイオスタチン、アクチビンによる筋芽細胞分化抑制を阻害した。経口投与により野生型マウス筋量増加、カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーモデルの筋萎縮は改善、TGF- β 標的遺伝子 p21 発現は抑制、筋衛星細胞数は増加した。阻害剤は筋萎縮に対する有効な分子標的治療薬となり得る。

研究成果の概要（英文）：Inhibitor targeting the TGF- β type I receptor kinase, recently developed for cancer, reverses impaired myoblast differentiation caused by myostatin, activin, and TGF- β 1. Inhibitor ameliorated muscular atrophy in a caveolin-3-deficient muscular dystrophy model with decrease of p21, a target gene of the TGF- β , and with increase of satellite cells. Inhibitor thus could be a rational drug for muscular atrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300 千円	690 千円	2,990 千円
2009 年度	700 千円	210 千円	910 千円
2010 年度	700 千円	210 千円	910 千円
年度			
年度			
総計	3,700 千円	1,110 千円	4,810 千円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは、進行性に筋力低下、筋萎縮を呈し骨格筋細胞の変性・壊死及び再生を特徴とするいわゆるジストロフィー性変化をきたす遺伝性疾患の総称で効果的な治療法が皆無の難病である。これまでに欠損遺伝子をウイルスで導入する遺伝子治療や正常骨格筋系細胞を単離し移植する細胞治

療が根治療法として疾患モデル動物を用いて試みられてきた。ところが、これら遺伝子細胞治療の臨床応用に向けては、未だに克服すべき技術的及び倫理的問題が山積しているのが現状である。

一方、根治療法ではないものの筋ジストロフィー病態を促進する分子を標的とし、その是正を図る“分子標的治療法”が臨床応用可

能な現実的な治療法として注目を集めている。これらの分子のうち、マイオスタチンは骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子として同定され、ノックアウトマウスやドミナントネガティブ変異体が著明な筋肥大を呈することから骨格筋量を負に制御する液性因子と考えられている。

2003年に米国ペンシルバニア大学のKhuranaらはマイオスタチン特異阻害抗体の腹腔内投与によってジストロフィン欠損デュシェンヌ型筋ジストロフィーマウスの筋力を増強しジストロフィー性変化を改善すると発表した。一方、我々も、独自に作出した常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー1C (LGMD1C)モデル変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg)マウスの著明な筋萎縮が、マイオスタチンを阻害するプロドメイン蛋白質やActRIIBデコイ受容体によって改善することを報告した(Ohsawa Y, *J Clin Inv* 116, 2006)。これらの発表を契機に骨格筋量を負に制御するマイオスタチンを筋ジストロフィー及び筋萎縮に対する創薬標的分子と見なす標的治療の世界的な開発競争が始まった。

低分子キナーゼ阻害剤は、チロシン及びセリン/スレオニンキナーゼのATP結合部位に親和性のある化合物として発癌に対する分子標的治療剤として盛んに開発されている。このうち慢性骨髄性白血病の原因蛋白質BCR-ABL阻害剤であるイマチニブや変異EGF受容体に対するゲフィチニブなど、一部では既に臨床応用が実現している。

2. 研究の目的

我々は、TGF- β 1-3による上皮間葉転換や癌細胞転移能亢進作用を抑制する抗癌剤として開発中の低分子化合物TGF- β タイプI受容体キナーゼ阻害薬(以下T β RI kinase阻害剤)が、理論的にはマイオスタチンの細胞内シグナルをも阻害する可能性があることに着目した。この低分子医薬はマイオスタチンばかりではなく、TGF- β 1などのマイオスタチンに関連する筋萎縮作用を有する複数のTGF- β シグナル阻害によって、筋ジストロフィー及び筋萎縮を強力に改善すると仮定した。本研究では、まず培養筋細胞への各種TGF- β 分子による効果がT β RI kinase阻害剤添加によって如何に変化するのか、次いでLGMD1Cモデルマウスへのこの阻害剤の経口投与によって筋萎縮が改善するか否かについて解析してこの仮説を検証していく。これによって、現行のマイオスタチン抗体や阻害蛋白質など高分子医薬のもつ抗原性や医療

経済的負担の克服を目指す。即ち本来抗癌剤である低分子医薬によるマイオスタチン阻害オフラベル分子標的治療法の開発を最終目標とする。

3. 研究の方法

(1)TGF- β ファミリー分子の骨格筋発現解析：T β RI kinase阻害剤によって阻害が可能と考えられるマイオスタチン及び関連TGF- β ファミリー分子であるアクチビン、GDF11, TGF- β 1の3者について、それぞれのtissue distributionをノザンブロット解析及びRT-PCR解析によって確認した。

(2)T β RI kinase阻害剤添加による各種TGF- β ファミリーによる*in vitro*転写活性解析：T β RI kinase下流の細胞内エフェクターの認識配列である(CAGA)_nをプロモーター領域に組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子をHEK293胎児腎細胞にトランスフェクションした。この細胞をマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1で刺激してルシフェラーゼ発光を転写活性と見なした。培養上清に刺激と同時にT β RI kinase阻害剤(Ki化合物、LY化合物、SB化合物)を添加して、この転写活性が抑制されるか否かについて検討した。

(3)T β RI kinase阻害剤添加によるTGF- β ファミリー標的遺伝子p21の遺伝子発現解析：HaCaTヒト角質細胞を、それぞれマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1によって刺激した。これらのTGF- β ファミリー共通の標的遺伝子であるp21の発現の上昇が、Ki化合物添加によって阻害されるかについてノザンブロットによって検証した。

(4)TGF- β ファミリー発現マウス筋芽細胞の樹立と筋管分化解析：C2C12マウス筋芽細胞は培地を高濃度牛血清から低濃度ウマ血清に交換することによって、細胞膜が融合して次第に多核となり、筋管様に形態変化を起こし分化していくことが知られている。まず東京大学医科学研究所北村俊雄先生が開発したレトロウイルス発現系によって、マイオスタチン、アクチビン、及びTGF- β 1をそれぞれC2C12筋芽細胞に高発現させた。このTGF- β ファミリー発現C2C12筋芽細胞の*in vitro*細胞融合・分化について検討した。

(5)*in vitro*筋管分化系に対するT β RI kinase阻害剤の効果判定：この*in vitro*系にKi化合物を添加して分化に対する影響に

ついて解析をおこなった。まず Ki 化合物の濃度について条件設定をおこない、0.5-30 μ M までは用量依存性に細胞融合・分化が促進することを確認した。20 μ M に条件を統一して、細胞形態、ライトギムザ染色による細胞融合指数 (fusion index) 解析を行った。次いで筋分化マーカーであるマイオジェニン、クレアチンキナーゼ、ミオシン重鎖の発現について、免疫組織化学的に解析を行った。

(6) T β RI kinase 阻害剤経口投与による *in vivo* 骨格筋解析: Ki 化合物を 6 週齢から 16 週齢の野生型及び変異 caveorin-3 Tg マウスに粉餌に混ぜて経口投与 (0.05%) を行い体重、骨格筋量及び筋力について生理学的解析を行った。

(7) 阻害剤投与による筋線維解析: 16 週齢で野生型及び変異 caveorin-3 Tg マウス骨格筋の単一筋線維断面積 (SMA) について統計的に解析した。

(8) 阻害剤投与による筋衛星細胞数解析: Ki 化合物投与骨格筋の筋衛星細胞の動向についてマーカー蛋白質である M-cadherin 免疫染色によって検討した。

(9) T β RI kinase 阻害剤経口投与の *ex vivo* バイオモニタリング: 阻害剤投与マウスから尾静脈採血によって血清を採取した。この血清を (2) の HEK293 胎児腎細-(CAGA)_n-ルシフェラーゼ転写活性系の培養上清に添加した。マイオスタチン刺激によるルシフェラーゼ発光を測定して阻害剤によるシグナル抑制効果を検討した。

(10) 阻害剤経口投与の副作用解析: 16 週齢で阻害剤投与野生型及び変異 caveorin-3 Tg マウスの各臓器について組織学的解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) マイオスタチンの骨格筋高発現: ノザンプロット及び RT-PCR 解析による骨格筋遺伝子発現量はマイオスタチン>アクチビン>TGF- β 1>GDF11 の順であった。

(2) 低分子 T β RI kinase 阻害剤による TGF- β ファミリー転写活性抑制効果: HEK293-(CAGA)-luc アッセイ系を用いてマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 の転写活性を測定した。3 種類の低分子 T β RI kinase 阻害剤 (Ki 化合物、LY 化合物、SB 化合物)

添加によって、それぞれ著明に抑制された。このうち Ki 化合物が最も強いマイオスタチン活性阻害作用を示した。以後の実験はこの化合物で行った。

(3) T β RI kinase 阻害剤による TGF- β ファミリー共通標的遺伝子 p21 発現抑制効果: HaCaT 細胞にマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 蛋白質を添加して経時的に p21 発現及び p15 発現を解析した。3 者共通に p21 発現が上昇、アクチビン、TGF- β 1 で p15 発現が上昇した。Ki 化合物の同時添加によってこの p21 発現上昇はそれぞれ有意で抑制された。一方、p15 発現上昇については変化を示さなかった。

(4) TGF- β ファミリー強制発現によるマウス筋芽細胞分化抑制効果: マイオスタチン、アクチビン、及び TGF- β 1 をそれぞれ C2C12 筋芽細胞に高発現させた。低濃度ウマ血清による筋芽細胞融合及び筋管分化は、これらの TGF- β ファミリー発現によってそれぞれ著明に抑制された。

(5) T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞融合・分化促進作用: (4) の系に Ki 化合物を最終濃度 20 μ M となるように添加したところ、コントロール C2C12 細胞とほぼ同等まで細胞融合・分化が回復した。

(6) 経口 T β RI kinase 阻害剤による野生型マウス骨格筋肥大・筋力増強効果: 野生型マウス 4 週齢から 14 週齢まで Ki 化合物を粉餌に混ぜて経口投与した。体重、握力の増大と筋張力の増加が認められ、単一筋線維断面積の増大を認めた。

(7) 経口 T β RI kinase 阻害剤による変異 caveolin-3 Tg マウス筋萎縮・筋力低下改善効果: 著明な筋萎縮を特徴とする LGMD1C モデル変異 caveolin-3 Tg マウスに 4 週齢から 14 週齢まで Ki 化合物を粉餌に混ぜて経口投与した。投与群では、非投与群と比較して体重減少、握力減少が改善し、筋張力低下も改善した。また単一筋線維断面積減少も軽減した。

(8) 経口 T β RI kinase 阻害剤の筋衛星細胞数増加効果: 14 週齢の阻害剤投与及び非投与骨格筋について 2 種類の M-cadherin 抗体によって染色し筋衛星細胞数を解析した。非投与群での比較では野生型マウスに対して LGMD1C モデルマウスでは筋線維あたりの筋

衛星細胞数は有意に減少していた(3.64 vs. 5.19 /100 fibers)。一方、Ki 化合物投与群では、野生型マウス、LGMD1C モデルマウスとも有意に増加が認められた(8.66 及び 7.39/100 fibers)。

(9)T β RI kinase 阻害剤の ex vivo バイオモニタリングシステムの樹立：阻害剤投与マウス血清を採取した。この血清をルシフェラーゼ転写活性系に最終濃度 25%で添加した。マイオスタチン刺激によるルシフェラーゼ発光は阻害剤投与量に正相関して抑制された。

(10)阻害剤経口の副作用解析：16 週齢阻害剤投与マウスの各臓器について組織学的解析では明らかな異常は認められなかった。

本研究では、マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害戦略として、膜受容体キナーゼである T β RI kinase に対する低分子化合物による分子標的治療が有効であることを証明した。この阻害剤が、成人骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞数を増加させること、マウス筋芽細胞 C2C12 分化抑制を強力に阻害することを明らかとした。即ち、広範な TGF- β ファミリー分子阻害により骨格筋組織幹細胞及び筋芽細胞レベルで骨格筋形成を促進するという作用機序が考えられた。本来、抗癌剤として開発中のこの阻害剤は筋ジストロフィーのみでなくおそらく癌悪疫質などの筋消耗性疾患、正常人の老化(サルコペニア)による筋萎縮などでも、幹細胞レベル及び筋芽細胞レベルの双方で筋萎縮阻害作用を示すと予想される。筋消耗性疾患全般に対するオフラベル分子標的治療薬と成る可能性があり、今後は長期投与による安全性確認を含めた前臨床研究が期待される。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Kuga A, Ohsawa Y, Okada T, Kanda F, Kanagawa M, Toda T, Sunada Y. Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. *Hum Mol Genet.* (査読有) in press

② Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-

mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* (査読有)53:48-54, 2011

③ Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (査読有) 300 : E543-E553, 2011

④ Hayashi S, Ohsawa Y, Takahashi T, Suzuki N, Okada T, Rikimaru M, Murakami T, Aoki M, Sunada Y. Rapid screening for Japanese dysferlinopathy by fluorescent primer extension. *Intern Med.* (査読有) 49:2693-2696, 2010

⑤ Murakami T, Ohsawa Y, Zhenghua L, Yamamura K, Sunada Y. The transthyretin gene is expressed in Schwann cells of peripheral nerves. *Brain Res.* (査読有) 1348:222-225, 2010

⑥ Murakami T, Fukai Y, Rikimaru M, Henmi S, Ohsawa Y, Sunada Y. Hereditary sensory ataxic neuropathy associated with proximal muscle weakness in the lower extremities. *J Neurol Sci.* (査読有) 291:121-123, 2010

⑦ Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. Mini-review. *Acta Myol.* (査読有) 27:19-24, 2008

⑧ Murakami T, Ohsawa Y, Sunada Y. The transthyretin gene is expressed in human and rodent dorsal root ganglia. *Neurosci Lett.* (査読有)436(3) : 335-339, 2008

⑨ Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* (査読有)15:1126-1130, 2008

[学会発表] (計 13 件)

① 砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、西松伸一

郎、石崎雅俊、菅 智宏、内野 誠、濃野 勉、野地澄晴、土田邦博. 筋ジストロフィーに対する抗myostatin治療薬の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成22年度「砂田班」班会議, 12. 3. 2010、東京

② Ohsawa Y, Okada T, Fujii I, Nishimatsu S-I, Fujino M, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nohno T, Sunada Y. Reprogrammed fibroblasts as a feasible source of cell-based therapy for muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society, 12-16-October 2, 2010, Kumamoto, Japan

③ Ohsawa Y, Fujii I, Okada T, Nishimatsu S, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nohno T, Sunada Y. Reprogrammed fibroblasts are a feasible source of cell therapy for caveolin-3-deficient and laminin α -2-deficient muscular dystrophy. 2010 FASEB Summer Research Conferences: Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, 18-23 July, 2010, Carefree, Arizona, USA

④ Sunada Y, Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nishimatsu S, Nohno T, Nagao M : Wound-healing MRL-MpJ phenotype improves outcome of dystrophin deficient mdx mice. XIII International Congress on Neuromuscular Diseases, 18-21-July, 2010, Naples, Italy

⑤ 砂田芳秀, 大澤 裕ら: 筋ジストロフィーの分子病態. 第28回日本神経治療学会総会, 7. 16. 2010、横浜

⑥ 砂田芳秀, 大澤 裕ら: nNOSはcaveolin-3欠損症の病態を抑制する. 第51回日本神経学会総会, 5. 21. 2010、東京

⑦ 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績. 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成21年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議, 1. 9, 2010、東京

⑧ 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士、藤野雅

広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井 績. 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成21年度「砂田班」班会議, 12. 11, 2009、東京

⑨ Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y. Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, 9. 11, 2009, Geneve, Switzerland

⑩ 大澤 裕, 久我 敦、林 紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀. TGF- β タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発 (第2報), 第27回日本神経治療学会総会, 6. 11, 2009、熊本

⑪ Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Sunada Y. A small-molecule inhibitor targeting transforming growth factor- β type receptor kinase ameliorate muscular atrophy in a mouse model of caveolin-3-deficient muscular dystrophy. 13th International Congress of World Muscle Society, September 29-October 2, 2008, Newcastle, UK

⑫ 久我 敦、大澤 裕、林 紗織、村上龍文、砂田芳秀. cardiotoxin 筋再生モデルにおけるcaveolin-3とdysferlinの動態. 第49回日本神経学会総会、2008年5月15日、横浜

⑬ 大澤 裕、岡田只士、林 紗織、久我 敦、村上龍文、若山吉弘、澁谷誠二、砂田芳秀. caveolin-3欠損筋のdysferlin/myoferlin細胞内局在異常. 第49回日本神経学会総会、2008年5月15日、横浜

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕 (計0件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

砂田 芳秀 (SUNADA YOSHIHIDE)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00240713

村上 龍文 (MURAKAMI TATSUFUMI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30330591