

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21792079

研究課題名 (和文) マイオスタチン特異的 RNAi を用いた骨格筋量制御法に関する研究

研究課題名 (英文) Regulation of skeletal muscles by RNA interference for Myostatin

研究代表者 木内奈央 (KINOUCHI NAO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：30457329

研究成果の概要 (和文)：本研究では、筋ジスモデルマウスCAV-3 transgenic mouseを用いてマイオスタチン特異的合成二本鎖siRNA (Mst-siRNA) をアテロコラーゲンと混合し全身投与したところ、対照群に比べMst-siRNA導入群では骨格筋量の増大が認められた。また、各筋のHE染色から野生型マウスの時と同様にMst-siRNA導入群では各筋線維の肥大傾向が認められ、平均で約1.2倍に増加していた。さらに前脛骨筋の筋張力試験を行った結果、caveolin-3 transgenic mouseでは対照群に比べ、Mst-siRNAを導入すると約3倍の筋張力を示し、これは野生型マウスが示す筋張力の約53%まで回復する結果となった。以上の結果より、アテロコラーゲンを併用したマイオスタチンに対するRNAiは個体レベルでの骨格筋量の調節に有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we examined whether systemic administration of the myostatin-siRNA /ATCOL (Mst-siRNA / ATCOL) complex effectively silenced myostatin expression in caveolin-3-deficient mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 1C(LGMD1C) mice. We observed the enlargement of a number of skeletal muscles, and more in mice treated with Mst-siRNA /ATCOL muscles than control. Moreover, the average myofibril size for Mst-siRNA / ATCOL-treated muscle was increased by approximately 1.2-fold relative to control. We evaluated the contractile properties of Mst-siRNA / ATCOL-treated LGMD1C muscle. Hypertrophied Mst-siRNA-positive LGMD1C fibers seemed to improve contractile force generation. Notably, the level of contractile force was improved by approximately 60% in Mst-siRNA / ATCOL-treated wild type muscles relative to control. These results provide evidence that ATCOL-mediated systemic administration of siRNAs may be a powerful therapeutic tool for muscular atrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、骨・軟骨、神経、靭帯等とともに生体の運動や姿勢の制御を司る重要な器官であり、超高齢化が進展する我が国では、日常生活活動(QOL)の向上・維持といった観点からも、骨格筋制御に関する研究領域に大きな注目が集まりつつある。骨格筋の種々の退行性あるいは進行性病変は、身体活動の低下または障害を引き起こすばかりでなく、幼少年期において二次的に成長の歪みを惹起し、ひいては身体構造の形態的不均衡を招来する可能性があることが指摘されている。顎口腔領域においても、咀嚼筋や舌等の異常によって、咀嚼、嚥下、発音といった口腔機能の障害や、顎骨の変形をきたす症例を目にすることがあるが、病因に基づく根本的な治療法は確立されていないのが現状である。

一方、McPherron らがマイオスタチンのノックアウトマウスの骨格筋量が野生型の 2~3 倍に増大することを報告して以来、マイオスタチンは骨格筋量抑制因子として注目された。その後、骨格筋量の増大した肉牛(Piedmontese, Belgian blue)においてマイオスタチンの突然変異が確認され、さらに Piedmontese と同様の点突然変異を含むドミナントネガティブ型のマイオスタチンを過剰発現するトランスジェニックマウスでは、骨格筋量が増大することが確認されている(Nishi *et al.* Biochem. Biophysic. Res. Commun. 293, 247-251, 2002)。In vitro の実験系においても、マイオスタチンが ALK5、ActRIIB、Smad3 を介してシグナル伝達されることが明らかとなっている。また、抗体の腹腔内投与によっても同様の効果が報告されており、その一方で、筋萎縮のみられる AIDS 患者では血中マイオスタチン濃度の上昇が見られるとの報告もある。しかし、RNA interference(RNAi)を用いたマイオスタチン発現抑制による骨格筋量調節についての検討は国内外を問わず全くなされていなかった。申請者はこれまでに、マイオスタチンを標的遺伝子とした RNAi がマウス筋芽細胞の増殖・分化に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* の実験系において検討し、マイオスタチンに対する RNAi が筋芽細胞の増殖

および分化を促進し、さらには個体レベルにおいて局所の骨格筋量の調節に有用であると報告してきた。この概念を将来の臨床応用に向け発展させるためには、これらの基礎研究に基づき、これまで困難とされてきた RNAi の技術を全身性に応用してマイオスタチン遺伝子のノックダウンを行い、骨格筋量を人為的に調節する方法の開発を行うことが必要であると考えに至った。

2. 研究の目的

骨格筋は人体を構成する諸器官の中でも極めて重要な位置を占め、成長発育のみならず種々の病態の成立にも深く関与することが知られている。加齢、筋ジストロフィー、AIDS などによって生じる筋萎縮は、日常生活における全身の自律的な活動を制限するだけでなく、顎口腔系の機能にも大きな障害をもたらすことから、歯学領域においても重要な研究課題とされてきている。

近年、細胞内の標的遺伝子(mRNA)の発現を特異的に抑制する RNA interference (RNAi) という現象が発見され、種々の遺伝子機能の解析に用いられるようになってきた。さらに、この現象を次世代の医療技術へと応用する研究も各分野で急速に進められようとしている。この二本鎖 RNA を用いた RNAi 創薬は、ゲノム DNA を損傷することなく標的遺伝子の発現を特異的にノックダウンするため、安全性が高いと考えられる。さらに全ヒトゲノム配列情報を基に予測困難な問題を回避することができるため、迅速、高効率かつ廉価なプロセスで治療法開発を実現することが可能と考えられる。

そこで本研究では、骨格筋量抑制因子であるマイオスタチンを標的遺伝子とし、アテロコラーゲンを併用した RNAi を *in vivo* において全身に応用させてその抑制効果を検討するとともに、骨格筋量を制御する技術を開発することを最終目標とする。

3. 研究の方法

成体マウス(野生型マウスおよび筋ジストロフィーモデルマウスとして CAV-3 transgenic mouse)を用いて、マイオスタチンに対する RNAi の

全身への適用実験系を確立する。

1) 動物への siRNA 導入

野生型雄性マウスおよび筋ジストロフィーモデルマウス (CAV-3 transgenic mouse) (20 週齢) を用いて、過去に局所投与で効果が確認された合成二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) をアテロコラーゲンと混合して眼窩静脈から注入する。

2) マウス体重変化の測定

siRNA 導入から 2 週間の実験期間中、3 ~5 日毎にマウスの体重変化を測定する。

3) ウェスタンブロット法によるマイオスタチン遺伝子発現の検討

siRNA 導入から 2 週間後、対照群あるいは Mst-siRNA 導入群、それぞれのマウス大腿四頭筋におけるマイオスタチン遺伝子の発現を、抗マイオスタチン抗体を用いてウェスタンブロット法により検討する。

4) マウス骨格筋の組織学的解析

siRNA 導入から 2 週間後、大腿四頭筋を採取し上皿自動天秤を用いて骨格筋重量を測定する。また、対照群あるいは Mst-siRNA 導入群、それぞれ大腿骨を含む大腿四頭筋について最大直径部における切片を作製し HE 染色を行う。さらに、筋線維直径の計測およびその分布様相を解析する。

5) マウス骨格筋の生化学的解析

マイオスタチンに対する RNAi による筋分化への影響を検討するため、筋分化マーカーである MyoD ファミリーに属する遺伝子 (MyoD, myogenin) の発現レベルをウェスタンブロット法を用いて解析する。

6) 筋機能回復度の検討

対照群あるいは Mst-siRNA を導入したマウスの前脛骨筋における筋張力試験を測定して筋機能の回復度を検討する。また、マウスの背部にテレメトリーシステムを埋め込むとともに送信機につながった記録用針電極を咬筋、大腿四頭筋に刺入して 1 週間の記録 (control data) をとった後、siRNA 導入を実施し約 3 週間終日筋電図の測定も検討する。

4. 研究成果

これまでマイオスタチンを標的遺伝子とし

た RNAi が個体レベルにおいて局所の骨格筋量の調節に有用であると報告してきたが、臨床応用に向け発展させるためには、この RNAi 技術を全身性に応用してマイオスタチン遺伝子のノックダウンを行い、骨格筋量を人為的に調節する方法の開発を行うことが必要であると考えられた。そこで本研究では、骨格筋量を制御する技術を開発することを最終目標として、アテロコラーゲンを併用した RNAi を *in vivo* において全身に適用させてその抑制効果を検討した。

筋ジストロフィーモデルマウスとして雄性の CAV-3 transgenic mouse (約 20 週齢) を用いて、過去に局所投与において効果がすでに確認されたマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) をアテロコラーゲンと混合して眼窩静脈から注入したところ、対照群と Mst-siRNA 導入群との間で体重変化に有意な差は認められなかった。しかしながら、咬筋および大腿四頭筋を採取し比較検討を行ったところ、肉眼的所見として対照群に比べ Mst-siRNA 導入群では骨格筋量の増大が認められた。また、各筋の最大直径部における切片を作製し HE 染色を行ったところ、野生型マウスの時と同様に Mst-siRNA 導入群では対照群に比べ、各筋線維の有意な肥大傾向が認められ、平均で約 1.2 倍に増加していた。さらに筋機能解析として、前脛骨筋における筋張力試験を行ったところ、野生型マウスでは、対照群と Mst-siRNA 投与群の両者間に差は認められなかったが、caveolin-3 transgenic mouse では対照群に比べ、Mst-siRNA を導入すると約 3 倍の筋張力を示し、これは野生型マウスが示す筋張力の約 53% まで回復する結果となった。以上の結果より、アテロコラーゲンを併用したマイオスタチンに対する RNAi は個体レベルでの骨格筋量の調節に有用であることが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

N Kinouchi, E Kawakami, T Adachi, Y Ohsawa, N Ishimaru, H Ohuchi, Y Sunada, Y Hayashi, E Tanaka, S Noji : Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Development, Growth & Differentiation*, 53 (1) : 48-54, 2011

〔学会発表〕 (計 1 件)

N Kinouchi, E Kawakami, Y Ohsawa, N Ishimaru, H Ohuchi, Y Sunada, Y Hayashi, E Tanaka, S Noji. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin siRNA improves muscular dystrophy. 88th IADR, July 14-17th, 2010, Barcelona, Spain

[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

木内奈央 (KINOUCHI NAO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号: 30457329

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: