

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792431

研究課題名（和文） 慢性遺伝性筋疾患に対する新規 RNAi 医薬の開発

研究課題名（英文） Development of new RNAi medicine for the chronic hereditary muscular disorder

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）：これまで siRNA 導入剤として有効性が確認されているアテロコラーゲンの代替として、より安価で臨床応用が可能な安全供給の確実性の高い特殊コラーゲンを開発し、この特殊コラーゲンを併用した骨格筋量抑制遺伝子であるマイオスタチン特異的 siRNA の導入が、個体レベルにおいても局所の骨格筋量の調節に有効である可能性が示唆され、将来的に慢性遺伝性筋疾患に対する新規治療法の開発につながるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed high special collagen of the certainty of the security supply that it was cheaper, and clinical application was possible as a substitute of atelocollagen where the effectiveness was confirmed as a siRNA introduction agent. The possibility that it was effective for the adjustment of the local skeletal muscle mass in the individual level was suggested when we introduced myostatin specific siRNA which was a skeletal muscle mass suppressor with this special collagen, and it was thought that we were connected for the development of the new cure for the chronicity hereditary muscular disorder in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：RNAi、骨格筋、コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

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た。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

量抑制遺伝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。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。

ここ近年において、生体における骨格筋量制御のメカニズムが分子レベルで解明され、今後はこれらの知見に基づいた新しい治療法の開発が望まれた一方で、RNAiは、small interfering RNA(siRNA)と呼ばれる二本鎖RNAにより、これと相同配列を有する標的遺伝子(mRNA)の発現が抑制される現象で、ゲノムDNAを損傷することなく特異的に効果を発揮するため、種々の疾患に対する治療への応用も期待されていた。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た。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た。

これまでに、極めて安全性の高い scaffold であるアテロコラーゲンを併用した標的遺伝子マイオスタチンに対する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。また、慢性筋萎縮性疾患である筋ジストロフィーモデルマウスにおいてマイオスタチン特異的RNAiを応用すると筋張力が正常マウスの約53%にまで回復することを確認している。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の技術を全身性に適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た。しかし、RNAiを筋ジストロフィーをはじめとする様々な筋疾患の治療に応用することを最終目的とした場合、siRNAに加えてアテロコラーゲンが高価なためコスト面での問題が予想される。そこで、アテロコラーゲンの代替としてより安価な特殊コラーゲンを担体としたマイオスタチン特異的RNAiを確立し、その効果を検討しようという着想に至った。また、本研究成果は、骨格筋量を制御する新しい治療法の開発につながるものと考えられ、骨格筋に異常を伴う種々の難治疾患、例えば筋ジストロフィーやミオパチーなどに対して非侵襲的で安全確実な治療を行うことが可能となり、多くの患者に福音をもたらすものと期待された。

2. 研究の目的

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。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のみならず、さらには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。アテロコラーゲンは、免疫原性が極めて低く、生体適合性が高いバイオマテリアルであり、RNAiのドラッグデリバリーシステムの基材としての応用研究も進められてきている。しかしながら、高価であるため核酸医薬としての実用化が困難と予想される。

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、これまでsiRNA導入剤として有効性が確認されているアテロコラーゲンの代替として、より安価で臨床応用が可能な安全供給の確実性の高い特殊コラーゲンを開発し、これを併用したRNAiを *in vitro* および *in vivo* において応用し、その抑制効果を検討するとともに、慢性遺伝性筋疾患に対して骨格筋量を制御する新規治療法を開発することを最終目標とした。

3. 研究の方法

本研究は、ゲノム創薬に代表される新しい創薬手法、あるいは遺伝子治療、再生医療など将来の医療技術を支える基盤技術として、まず、これまで用いていたアテロコラーゲンに代替する担体として、より安価で安全供給の確実性の高い特殊コラーゲンを開発し、siRNAの導入剤としてその効果を検討した。siRNAを用いた実験系では、その導入効率とsiRNAの発現が問題となることから、今回予定している *in vitro* における実験では、すでに高い導入効率が確認されているアテロコラーゲンと比較することにより、その有効性を検討した。また、この特殊コラーゲンを併用して骨格筋量抑制遺伝子であるマイオスタチン特異的siRNAを筋ジストロフィーモデルマウスに導入して、マイオスタチン遺伝子の発現抑制がマウス骨格筋量に及ぼす影響を解析するとともに、*in vivo* におけるsiRNA導入剤としての特殊コラーゲンの有効性について検討した。さらに、筋ジストロフィーモデルマウスの筋張力を測定し、これ

に加えてテレメトリーシステムを用いて、筋機能回復度を評価することを検討した。

なお、合成 siRNA 導入剤にはアテロコラーゲンやリポソームなどの非ウイルス性キャリアーが開発されているが、いずれもその導入効率と siRNA の発現が問題となる。今回の実験に際しては、特殊コラーゲンを用いる 1 方法のみでなく、効率的に導入可能なリポソーム法も代替手段として検討することを念頭において行った。

(1) 細胞培養および細胞への siRNA 導入
Luciferase 恒常発現の B16-F10-luc-G5メラノーマ細胞を細胞密度 3.5×10^4 /well で播種し、0.2mg/ml Zeocin と 10%ウシ胎仔血清含有 DMEM 中で 37°C、5% CO₂ インキュベータ内で培養後、サブコンフルエントの段階で Luciferase-siRNA、scramble-siRNA を Lipofectamine2000 (Lipo2000)、アテロコラーゲン (ATCOL)、特殊コラーゲン (SPC) を導入剤として細胞にトランスフェクションした。

(2) Luciferase 活性の測定

B16-F10-luc-G5 メラノーマ細胞へ siRNA をトランスフェクションして 2 日後、各細胞の Luciferase 活性をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

(3) 動物への siRNA 導入

24 ~ 28 週齢の野生型雄性マウス (C57BL/6) および筋ジストロフィーモデルマウスとして mdx mouse を用いて、合成二本鎖 siRNA (scramble-siRNA あるいはマイオスタチン遺伝子特異的 siRNA である Mst-siRNA) を、*in vitro* 実験よりその有効性が確認できた特殊コラーゲンと混合して左右のマウス咬筋にそれぞれ局所投与した。

(4) マウス骨格筋の組織学的解析

siRNA の局所導入から 2 週間後、マウス咬筋を採取し上皿自動天秤を用いて骨格筋重量を測定した。また、対照群 (scramble-siRNA 導入群) あるいは Mst-siRNA 導入群、それぞれの咬筋について最大直径部における切片を作製し HE 染色を行った。さらに、この HE 染色像から筋線維直径および断面積の計測とその分布様相を解析した。

(5) マウス骨格筋の生化学的解析

マイオスタチン遺伝子に対する RNAi による筋分化への影響を検討するため、採取した組織より total RNA を抽出し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) の発現レベルをリアルタイム PCR システムを用いて解析した。

(6) 筋機能回復度の評価

野生型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に刺入して 1 週間の記録 (control data) をとった後、siRNA の局所投与を実施し約 3 週間終日筋電図を測定して筋機能の回復度を検討した。

4. 研究成果

(1) Luciferase 活性測定による特殊コラーゲンの有効性の検討

Luciferase 恒常発現の B16-F10-luc-G5 メラノーマ細胞に、Luciferase-siRNA、scramble-siRNA を Lipofectamine2000 (Lipo2000) を用いてアテロコラーゲン (ATCOL) あるいは特殊コラーゲン (SPC) を導入剤として細胞にトランスフェクションした。アテロコラーゲン (ATCOL) は、0.5%、0.05%、特殊コラーゲン (SPC) は 0.03% の濃度で検討を行った。各 siRNA をトランスフェクションして 2 日後、それぞれの細胞における Luciferase 活性をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

その結果、特殊コラーゲン (SPC) を併用して Luciferase-siRNA をトランスフェクションした細胞では、SPC のみ、siRNA のみあるいは scramble-siRNA を SPC にてトランスフェクションした細胞に比べ、有意に Luciferase 活性が低下していた。またその活性レベルは、これまでにも有効性が確認されているアテロコラーゲン (ATCOL) を併用して Luciferase-siRNA をトランスフェクションした細胞とほぼ同レベルまで低下していた。

(2) マウス骨格筋における特殊コラーゲンの有効性の検討

まず、24 ~ 28 週齢の野生型雄性マウス (C57BL/6) を用いて、合成二本鎖 siRNA (scramble-siRNA あるいはマイオスタチン遺伝子特異的 siRNA である Mst-siRNA) を、*in vitro* 実験よりその有効性が確認できた特殊コラーゲン (SPC) と混合して左右のマウス咬筋にそれぞれ局所投与した。

siRNA の局所導入から 2 週間後、マウス咬筋を採取し上皿自動天秤を用いて骨格筋重量を測定した。また、対照群 (scramble-siRNA 導入群) あるいは Mst-siRNA 導入群、それぞれの咬筋について最大直径部における切片を作製し HE 染色を行った。さらに、この HE 染色像から筋線維直径および断面積の計測とその分布様相を解析した。加えて、各群におけるマイオスタチンの遺伝子発現レベルについてリアルタイム PCR システムを用いて解析した。

その結果、まず肉眼的所見として、Mst-siRNA を導入した咬筋は

scramble-siRNA を導入した対照群に比べて顕著な増大傾向を示した。また、マウス咬筋重量を測定したところ、Mst-siRNA を導入した咬筋重量は scramble-siRNA を導入した対照群に比べて有意に増加していた。さらに、各群における筋線維直径および断面積の計測とその分布様相を解析したところ、Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維直径および断面積は scramble-siRNA を導入した対照群に比べて、有意に大きな値を示した。

遺伝子発現レベルに関して、各群におけるマイオスタチン遺伝子、そして筋分化関連因子である MyoD ファミリーに属する遺伝子 (MyoD, myogenin) についてリアルタイム PCR システムを用いて解析した。

その結果、咬筋の増大傾向に伴い、Mst-siRNA を導入した咬筋では scramble-siRNA を導入した対照群に比べてマイオスタチン遺伝子の発現は低下していた。またそれに伴い、MyoD、および myogenin の遺伝子発現レベルは増加する傾向を示していた。

なお現在、筋機能回復度の評価として、野生型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に刺入して 1 週間の記録 (control data) をとった後、siRNA の局所投与を実施し約 3 週間終日筋電図を測定して筋機能の回復度を検討している。さらには筋ジスモデルマウスである mdx マウスでも検討する予定である。

以上の結果から、今回開発した特殊コラーゲンは、これまで siRNA 導入剤として有効性が確認されているアテロコラーゲンの代替として、より安価で臨床応用が可能な安全供給の確実性の高いことが確認できた。また、この特殊コラーゲンを併用した骨格筋量抑制遺伝子であるマイオスタチン遺伝子に特異的な siRNA の導入が、個体レベルにおいても局所の骨格筋量の調節に有効である可能性が示唆され、将来的に慢性遺伝性筋疾患に対する新規治療法の開発につながるものと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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：