

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659683

研究課題名(和文) ミオスタチンの制御による新しいOA治療法の開拓

研究課題名(英文) Reclamation of a novel OA therapy by the control of Myostatin

研究代表者

新井 祐志 (Arai, Yuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50347449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：Myostatinは、筋の組織幹細胞であるサテライト細胞の増殖抑制、筋芽細胞から筋管への分化抑制等の作用を通じて、骨格筋組織の発生と再生を制御するサイトカインである。最近、Myostatinがカヘキシア等の病態にも重要な意義を有し、一方で糖脂質代謝を制御することも知られるようになってきた。Myostatinシグナルの抑制は、カヘキシアやサルコペニア等の筋萎縮性病態の予防と治療、肥満や糖尿病の制御等につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Myostatin negatively regulates proliferation of satellite cells that are tissue resident stem cells in the skeletal muscle, as well as differentiation of myoblasts into myotubes. Myostatin is crucially involved in pathogenesis of some diseases including cachexia, while recent studies have clarified its important roles in the control of carbohydrate and lipid metabolism. Blocking of Myostatin signal may provide novel therapeutic modality to prevent and improve atrophic conditions in cachexia and sarcopenia, and to control obesity and diabetes as well.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ミオスタチン hiPS細胞

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

1. 研究開始当初の背景

●急速な高齢化社会の到来とともに、運動器疾患は著しく増加している。近年、運動能力低下を回避するためにロコモティブトレーニングの重要性が強調されている。特に大腿四頭筋力増強訓練は OA 膝の治療として重要であり、国際変形性関節症学会（OARSI）の治療ガイドラインでも高いエビデンスレベルを有するとして強く推奨されている。しかし、薬物療法や手術療法と比較すると効果発現までに長時間要するなどの問題がある。大腿四頭筋訓練の効果として 大腿骨 脛骨間の圧分散による圧集中の改善、 屈曲拘縮の改善、 筋・靭帯の柔軟性の増加に伴う代謝改善による関節機能の改善、などが推察されているが、OA 膝の病態や関節軟骨代謝に及ぼす影響は明らかにされていない。

●Mstn は筋細胞から分泌されるサイトカインで筋肉の成長を抑制する作用を持ち、Mstn ノックアウトマウスでは筋線維量増加と筋線維肥大が生じる。Mstn の機能制御を用いた筋力強化は骨量減少や筋ジストロフィー、外傷後の筋再生などへの応用が期待されている（*Kishida, J Gene Med, 2004*）。一方、OA 膝では発症および進行に大腿四頭筋筋力低下が関係しているため、Mstn 抑制による大腿四頭筋筋力強化は OA 膝に対する予防・治療としても期待できる。

●われわれは OA 膝に対する病態解析および治療開発の技術やデータを蓄積してきている。動物 OA モデルを用いた研究や軟骨代謝

の評価にも熟練しており（*Arai, J Orthop Res, 2010, Arai, J Orthop Res, 2011*）、動物 OA モデルにおける Mstn の機能を大腿四頭筋特異的に制御することは容易で、これにより大腿四頭筋の筋力強化が OA 膝の病態に及ぼす影響を組織学的・分子生物学的に

2. 研究の目的

変形性膝関節症（osteoarthritis of knee; OA 膝）の予防および治療にとって大腿四頭筋筋力訓練は重要であるが、その OA 膝への疾患修飾効果に関してほとんど明らかにされていない。また、効果発現に期間を要することや患者の自主性に影響されることなどの問題がある。一方、ミオスタチン（Myostatin ; Mstn）は筋肉の成長を制御するサイトカインであり、抑制することで筋肉は早期に肥大する。本研究では動物の大腿四頭筋に siMstn を導入することで大腿四頭筋筋力を短期間で特異的に増強し、筋力強化が膝関節軟骨に与える生物学的な影響を解析する。さらに Mstn を制御することで、OA 膝に対する新規治療法の開発に迫る。

3. 研究の方法

細胞実験で適切な siRNA 導入方法を検討する。ラット筋芽細胞に siRNA を導入し、その抑制効率を解析する。siMstn による筋芽細胞増殖を経時的に評価する。動物実験ではエレクトロポレーションを用いて siMstn を大腿四頭筋に特異的に導入し、筋肥大モデルを作

成する。筋肉の組織学的変化および力学的変化、軟骨代謝への影響を解析する。OA モデルの大腿四頭筋にエレクトロポレーションまたはソノポレーションで siMstn を導入し、OA 膝に対する治療効果を肉眼的、組織学的および生化学的に評価する。

4 . 研究成果

ヒト皮膚線維芽細胞に EB ウイルスで Oct3/4-2A-Klf4-2A-Sox2 遺伝子を導入し、human induced pluripotent stem (hiPS)細胞を作製した。hiPS 細胞を培養皿で 10 日間平板培養し筋芽細胞に分化させた。recombinant human myostatin protein (rhMyostatin)を添加することで MyoD、Myo5a の誘導を抑制し、筋芽細胞分化を有意に抑制した。rhMyostatin を添加した hiPS 由来胚性体細胞培養では対照群と比較して 6 日目から 10 日目において生存率が有意に低下した。10 日目の培養細胞において、myosin heavy chain と alpha actin に対する免疫染色を行ったところ、rhMyostatin 添加群で有意に発現が低下していた。抑制実験として Myostatin に対する siRNA(siMyostatin) を用いた。hiPS 由来胚性体細胞を培養し siMyostatin を導入した。siMyostatin 導入群における MyoD と myosin heavy chain の遺伝子発現は対照 siRNA 群と比較して有意に亢進した。これらの結果からヒト由来の iPS 細胞から筋芽細胞への分化において Myostatin が重要な役割を担っている可能性がある。

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 1 件)

Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells, Biochemical and Biophysical Research Communications 431

(2013) 309-314, 査読有

Fei Gao, Tsunao Kishida, Akika Ejima, Satoshi Gojo, Osam Mazda

[学会発表] (計 4 件)

・井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 寺内 竜, 土田真嗣, 松木智宏, 井上敦夫, 齊藤正純, 松田 修, 久保俊一, ソノポレーションで導入した TNF- α 特異的 siRNA による関節炎モデルの治療効果, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 平成 25 年 10 月 18 日, 千葉県

・市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 松木智宏, 久保俊一, 活性化マクロファージに対する ROS を介したランソプラゾールの抗炎症効果の解析, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 平成 25 年 10 月 17 日, 千葉県

・ Matsuki T, Arai Y, Tsuchida S, Terauchi R, Inoue H, Nakagawa S, Inoue A, Mazda O, Kubo T. , The roles of heat shock protein 70 on chondrocyte , 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) , 2013.4.18, Philadelphia, U.S.A

・ Inoue H, Arai Y, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Hiraoka N, Tsuchida S, Matsuki T, Mazda O, Kubo T. , Effect of mechanical stress on the

hypertrophic differentiation related gene
expression in cultured chondrocytes , 16th World
Congress of the Osteoarthritis Research Society
International (OARSI) , 2013.4.18, Philadelphia,
U.S.A

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新井 祐志 (Arai Yuji)

京都府立医科大学医学研究科講師

研究者番号 : 50347449

(2)研究分担者

岸田 綱郎 (Kishida Tsunao)

京都府立医科大学医学研究科講師

研究者番号 : 00370205

久保 俊一 (Kubo Toshikazu)

京都府立医科大学医学研究科教授

研究者番号 : 20178031

寺内 竜 (Terauchi Ryu)

京都府立医科大学医学研究科講師

研究者番号 : 20575154