

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461285

研究課題名(和文) マイオスタチン阻害ペプチドによる筋ジストロフィーとサルコペニア治療法の開発

研究課題名(英文) Development of an inhibitory peptide for myostatin: its implications for muscular dystrophy and sarcopenia

研究代表者

大澤 裕 (Yutaka, Ohsawa)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80246511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マイオスタチンは骨格筋に特異的に発現し筋量を負に制御するユニークなTGF-beta分子である。本研究では、血中でマイオスタチンリガンドを生理的に阻害するプロドメインの阻害活性中心(IC)を絞り込んだ。ICに、これまで知られていなかった、リガンドとマイオスタチン筋細胞膜受容体との結合を特異的に阻害する作用を見出した。相当する合成オリゴペプチドの投与によって筋ジストロフィーモデルマウスの筋量を増加させることに成功した(Ohsawa, et al. PLoS One 10:e0133713, 2015)。

研究成果の概要(英文)：Myostatin, a muscle-specific transforming growth factor-beta, negatively regulates skeletal muscle mass. The N-terminal prodomain of myostatin noncovalently binds to and suppresses the C-terminal mature domain (ligand) as an inactive circulating complex. Here, we identified the inhibitory core (IC) region that inhibited myostatin-induced transcriptional activity by 79% compared with the full-length prodomain. We found that the IC suppresses not only the ligand, but also prevents two distinct membrane receptors from binding to the ligand. Indeed, the IC inhibits myostatin, but not TGF-beta 1, and activin. Local injection of the IC peptide ameliorates muscle atrophy in a rodent model of muscular dystrophy (Ohsawa, et al. PLoS One 10:e0133713 2015, 2015).

研究分野：筋ジストロフィー

キーワード：筋ジストロフィー サルコペニア マイオスタチン 再生医療

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは、骨格筋線維の変性壊死と不完全再生による“筋ジストロフィー性変化”から筋萎縮を来す遺伝性疾患群で、有効な治療法がない稀少難病である。このうち代表的な病型であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの萎縮筋線維では TGF- β の阻害分子である LTBP4 の活性化 (Goldstein, *et al. Hum Mol Genet*, 20: 894-904, 2011) と転写因子 Smad2/3 の活性化 (Cohn, *et al. Nat Med*, 13:204-210, 2007) が認められる。一方、加齢性筋萎縮 (サルコペニア) は、高齢化社会を迎えた先進国の国民の健康寿命と生命予後を決めることが明らかとなってきたが、その基礎研究は緒に就いたばかりである。加齢マウスの解析からは、サルコペニアは骨格筋幹 (衛星) 細胞の TGF- β とその標的遺伝子 p21 (Calson, *Nature*, 54:528-532, 2008) および p16 (Garcia-Prat, *et al. FASEB J*, 280:4051-4062, 2013) の活性亢進によって惹起される骨格筋再生障害と提唱されている。すなわち、稀少難病筋ジストロフィーとコモンディージーズであるサルコペニアの発症には、骨格筋 TGF- β シグナル亢進という共通の分子機構が想定できる。

マイオスタチンは骨格筋特異的に発現し筋量を負に制御するユニークな TGF- β 分子で、その中和抗体やデコイ受容体の投与で筋ジストロフィーモデルマウスの筋萎縮が改善 (Bogdanovich, *et al. Nature*, 420:418-421, 2002) したことから、筋萎縮治療の分子標的として注目されている。ところが、抗体などの高分子医薬の長期投与による抗原性や安全性については依然として明確にされておらず、臨床応用への障壁となっている。

わたしたちは常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1C の原因遺伝子産物であるカベオリン-3 に着目し、その疾患モデルマウスを作出し、カベオリン-3 欠損によってマイオスタチン細胞膜受容体が活性化して骨格筋萎縮を惹起する分子病態を世界に先駆け解明した (Ohsawa Y, *et al. Hum Mol Genet*, 13:151-157, 2004, *J Clin Inv*, 116:2924-2934, 2006)。さらに平成 20-22 年度科学研究費補助金: 基盤研究 (C) 「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」では、この活性化細胞膜受容体を標的とする低分子キナーゼ阻害剤をマウスへ投与し筋萎縮が改善することを証明した (Ohsawa Y, *et al. Lab Inv*, 92:1100-1114, 2012)。

ところが、この低分子阻害剤はマイオスタチンばかりでなく、アクチピン、TGF- β 1 など広範な TGF- β ファミリーをも抑制するため、その臨床応用には性腺萎縮や発がんなどの想定される副作用対策が必須となる。

そこで、この副作用を回避すべく、われわれはマイオスタチンを特異的かつ生理的に阻害する安全性の高い医薬の開発に着手し

た。マイオスタチンは、筋細胞で前駆体蛋白質が 262 アミノ酸残基からなる N-末端のプロドメインと、C-末端活性部位 (リガンド) にプロセッシングされ (図 1)、前者が後者を非共有結合によって包含する不活性型複合体が形成され、血中に分泌される。BMP-1 など蛋白分解酵素によってプロドメインが切断分解されると、リガンドが活性化して筋細胞膜受容体に働く。すなわち、プロドメインはマイオスタチンシグナルを生理的に阻害すると考えられる。

われわれは独自に *in vitro* マイオスタチンアッセイ系を構築し、プロドメインの各領域の阻害活性を測定した。その結果、29 アミノ酸残基からなる領域にプロドメイン全長の 79% に相当する阻害活性を認め、これを阻害活性中心 (inhibitory core, IC) と命名した。相当するペプチドを合成し野生型マウスの骨格筋に局所投与したところ筋線維が肥大し骨格筋幹 (衛星) 細胞が増加することを発見した。この成果を踏まえて、阻害ペプチドをデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス及びサルコペニアのモデルマウスへ静脈投与して筋萎縮の改善効果を証明することを骨子とする本研究を構想した。

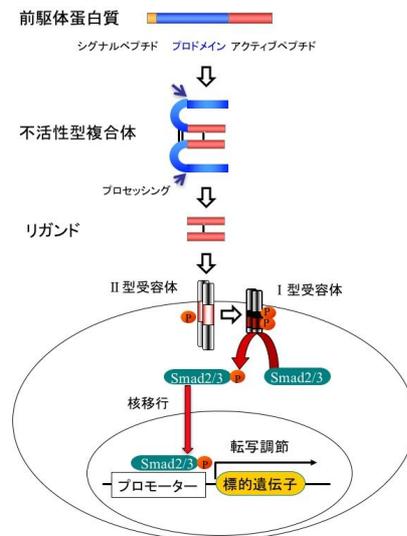


図1. プロドメインはマイオスタチンの生理的阻害蛋白質。

2. 研究の目的

われわれが独自に同定したマイオスタチン阻害ペプチドが、筋ジストロフィーおよびサルコペニアに有効な低分子医薬となり得るかを検証することを目的とする。併せて筋ジストロフィーおよびサルコペニア発症における TGF- β シグナル亢進の役割の分子機能を解明し、稀少難病筋ジストロフィーと高齢者にとって不可避なサルコペニアの双方に有効な治療法の確立に挑む。

3. 研究の方法

平成 26 年度、平成 27 年度は、29 アミノ酸残基からなる IC 領域のマイオスタチン活性阻害の分子薬理機構を解明する。平成 28 年

度はさらに、相当するペプチドを、筋ジストロフィーモデルマウス、サルコペニアモデルマウスに投与して、骨格筋萎縮・ジストロフィー性変化・TGF- β シグナル亢進が改善するかどうかについて検討する。

4. 研究成果

本研究では、この IC が、これまで知られていた血中リガンドの阻害ばかりでなく、細胞表面のリガンド-受容体結合を特異的に阻害するこれまで知られていなかった薬理機構を発見した(Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713 2015)。

マイオスタチンプロドメインの IC 領域は N 末端側に存在し、様々な TGF- β 分子で相同性の高い α -ヘリックス領域に該当した(図 2)。興味深いことに、最近の TGF- β 1 の三次元結晶解析によって、この領域は、TGF- β 1 リガンドばかりでなく、TGF- β 1 の 2 種類の膜受容体との相互作用が想定されるそれぞれ 3 区域に分割されることが報告されていた(Shi, *et al.* *Nature* 474, 2011)。そこでわれわれは、マイオスタチン IC 領域の 3 区域(RC, AH, LL)とマイオスタチンリガンド、マイオスタチン膜受容体の相互作用について、研究を進めた(図 2)。COS 7 細胞への強制発現では、IC はリガンドばかりでなく、2 種類の受容体と共発現・共共沈した(図 3)。マイオスタチンプロドメイン全長から、3 区域のうち単独区域を欠損した場合には、阻害活性は、保持されるが、複数区域(2 区域ないし 3 区域)の欠損では、阻害活性が保持されないことが明らかとなった(図 4)。このことから、マイオスタチン IC 領域は、実際にマイオスタチンリガンドの他、2 種類のマイオスタチン膜受容体との相互作用によって、マイオスタチン活性を特異的に阻害していることが明らかとなった。実際にマイオスタチン IC 領域は、膜受容体の異なる、アクチビン、TGF- β 1 は阻害せず、細胞表面で、リガンド-受容体結合を特異的に阻害していると考えられた(図 4)。

相当するペプチドの筋ジストロフィーモデルマウスへの局所投与により、筋線維が肥大し骨格筋幹(衛星)細胞が増加した(図 5)。

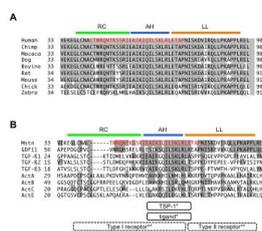


図 2. マイオスタチン (Mstn)プロドメインの阻害活性中心(IC)は種を超えて保存され (A)、多くのTGF- β 分子で保存された α -helix (AH), を含む3区域(RC, AH, LL)から構成される(B) (Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713 2015).

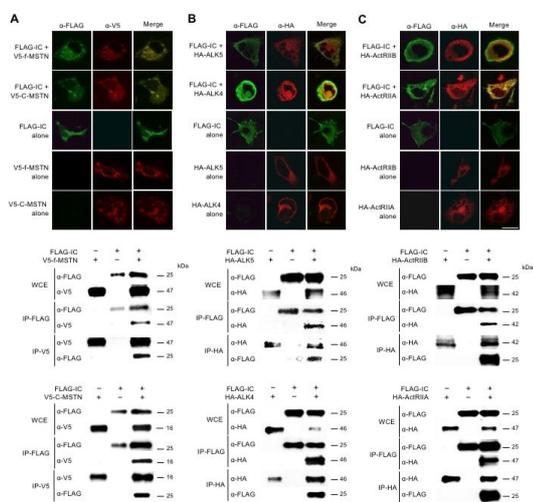


図 3.プロドメインICは、リガンド (A)、タイプ I 膜受容体 (B)、タイプ II 膜受容体 (C) と、共局在 (上段)、共共沈 (下段) する (Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713 2015).

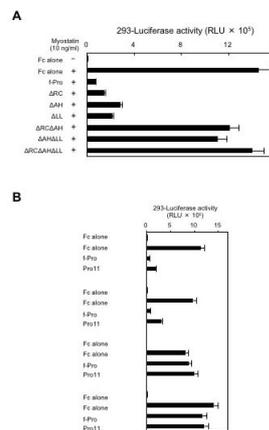


図 4.プロドメインICの3区域(RC, AH, LL)の単独欠損では阻害活性が保持されるが、複数欠損では、阻害活性は保持されない (A)。プロドメインICはマイオスタチンと、受容体を共有しないTGF- β 1とアクチビンの活性は、阻害しない (B) (Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713 2015)。

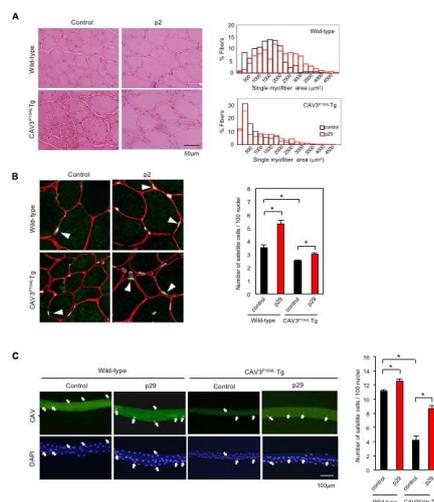


図 5.プロドメインICペプチド前脛骨筋投与による、野性型(wild-type)、筋ジストロフィーマウス(CAV3^{P104L}Tg)の筋線維肥大(A)、骨格筋幹(衛星)細胞数の増加 (B: 筋組織、D: 単一筋線維) (Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713 2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J Med Chem*, 58(3):1544-1549, 2015, doi: 10.1021/jm501170d, 査読有

Ohsawa Y, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, Itoh F, Tsuchida K, Hayashi Y, Sunada Y. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors, and Potential to Treat Muscle Atrophy. *PLoS One*, 10(7):e0133713, 2015, doi:10.1371/journal.pone.0133713, 査読有

Imamura K, Sahara N, Kanaan NM, Tsukita K, Kondo T, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Kawakami K, Hotta A, Yawata S, Watanabe D, Hasegawa M, Trojanowski JQ, Lee VM, Suhara T, Higuchi M, Inoue H. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. *Sci Rep*, 6:34904, 2016, doi: 10.1038/srep34904, 査読有

Tatsumi R, Suzuki T, Do MQ, Ohya Y, Anderson JE, Shibata A, Kawaguchi M, Ohya S, Ohtsubo H, Mizunoya W, Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ojima K, Nishimatsu S, Nohno T, Ohsawa Y, Sunada Y, Nakamura M, Furuse M, Ikeuchi Y, Nishimura T, Yagi T, Allen RE. Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells. *Stem Cells*, in press, 2017

doi: 10.1002/stem.2639, 査読有

〔学会発表〕(計12件)

大澤 裕, 砂田芳秀. 筋消耗性疾患に対するマイオスタチン阻害薬: サルコペニア治療の展望, 第55回日本神経学会学術大会, 2014年5月24日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

大澤 裕, 深井雄太, 村上龍文, 砂田芳秀. MRL 創傷治癒形質によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー改善機構の解析, 第55回日本神経学会学術大会, 2014年5月24日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Fujino M, Fukai Y, Sunada Y. Type I TGF- β receptor kinase inverses myogenesis; implication in caveolin-3-deficient limb-girdle muscular dystrophy 1C. *FASEB Science Research Conferences SKELETAL MUSCLE*

SATELLITE AND STEM CELLS, 2014/7/20~25, Steamboat Springs, Colorado, USA

大澤 裕, 砂田芳秀. 筋ジストロフィーに対するマイオスタチン阻害ペプチドの開発, 第32回日本神経治療学会総会, 2014年11月22日, 東京ドームホテル(東京都文京区)

大澤 裕, 深井雄太, 村上龍文, 砂田芳秀. マイオスタチンプロドメインのInhibitory core はリガンド受容体結合を阻害する, 第56回日本神経学会学術大会, 2015年5月20日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

大澤 裕, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博, 砂田芳秀. マイオスタチンプロドメインの阻害活性中心の新たな機能, 第1回日本筋学会学術集会, 2015年8月8日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

大澤 裕, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博, 砂田芳秀. 筋ジストロフィー関連疾患における TGF- β シグナルの解明と標的医薬の開発, 平成27年度「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8) 西野班 班会議, 2015年12月7日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

大澤 裕. 筋ジストロフィー関連疾患における TGF- β シグナルの解明と標的医薬の開発, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 平成27年度精神・神経疾患研究開発費 筋ジストロフィー合同班会議, 2016年1月8日, JA 共済ビル カンファレンスホール(東京都千代田区)

大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 村上龍文. マイオスタチン阻害活性中心ペプチドによる筋萎縮治療法, 第57回日本神経学会学術大会, 2016年5月18日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

大澤 裕. マイオスタチンプロドメインによる骨格筋量制御機構, 第2回日本筋学会学術集会, 2016年8月6日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

大澤 裕. マイオスタチンプロドメインによる骨格筋量の新たな制御機構, 第34回日本神経治療学会総会, 2016年11月5日, 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 大坪秀明, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博. 筋ジストロフィー関連疾患における TGF- β シグナルの解明と標的医薬の開発, 2016年12月5日, 平成28年度「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8) 西野班 班会議, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

〔図書〕(計3件)

大澤 裕, 砂田芳秀. Geriatric Medicine
【サルコペニアとフレイル-臨床と研究の
最前線-】 骨格筋萎縮に対するマイオスタ
チン阻害薬の最前線, 株式会社ライフ・
サイエンス, 2014, 144(387-392)

大澤 裕, 砂田芳秀. 骨格筋症候群(上)
[第2版] 3) LGMD1C(caveolin-3 欠損症),
日本臨床社, 2015, 471(101-104)

大澤 裕, 砂田芳秀, 西松伸一郎. サルコ
ペニアとフレイル サルコペニアに対する
新規治療薬の可能性を探る: マイオスタチ
ン阻害薬, 医薬ジャーナル社, 2015,
212(202-209)

〔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
なし。

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: 80246531

(2) 研究分担者

西松 伸一郎 (NISHIMATSU Shin-ichiro)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20222185

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()