

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20646

研究課題名(和文) 筋萎縮性疾患に対する機能性リポソームを用いた新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel oligonucleotide therapeutics using functional liposomes for atrophic muscular disorder

研究代表者

森 博世 (MORI, Hiroyo)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：80733914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋萎縮性疾患に対するmyostatin siRNA(Mstn-siRNA)およびmyostatinの受容体であるactivin type IIB受容体の細胞外領域Fc融合タンパク(ActRIIB-Fc)の共投与による効果を検討した。共投与を行ったマウスは、それぞれの単独投与と比較して骨格筋重量と筋線維断面積の有意な増加とともに、myogeninの遺伝子発現の亢進および筋萎縮関連遺伝子であるMuRF-1 およびAtrogin-1 の発現低下を認めた。これらの結果より、Mstn-siRNAとActRIIB-Fcの共投与は骨格筋萎縮疾患の有効な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to assess the effectiveness of the co-delivery of myostatin-targeting siRNA (Mstn-siRNA) and ActRIIB-Fc into skeletal muscle. Inhibition of myostatin function by the combination of Mstn-siRNA and ActRIIB-Fc increased muscle weight and myofibril size in murine masseter muscle. Furthermore, myogenin mRNA expression was upregulated in the combination treatment group, while MuRF-1 and Atrogin-1 mRNA expression was downregulated compared to administration of each compound alone. These findings suggest that co-administration of Mstn-siRNA and ActRIIB-Fc could be a useful treatment of atrophic muscular disease.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：筋萎縮性疾患 myostatin

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィー症をはじめとする筋萎縮性疾患は、摂食嚥下や発語などの口腔機能に障害をもたらし、若年期においては顎顔面骨格の正常な成長を妨げることから、その治療法を確立することは歯学領域においても喫緊の課題と位置づけられる。

TGF- $\beta$  ファミリーに属する myostatin は、骨格筋特異的に発現する制御因子として 1997 年に McPherron らによって発見された。myostatin の骨格筋量制御機構は、Smad 経路および MAPK 経路の活性化ならびに、IGF-1 経路の間接的阻害によるものであり、筋細胞の増殖分化抑制と、成熟筋線維の分解亢進により、骨格筋量を強力に負に制御する。

昨今、骨格筋形成に関与する遺伝子または筋萎縮性疾患原因遺伝子を標的とした様々な筋萎縮治療薬の開発が試みられる中で、myostatin は重要な標的遺伝子のひとつとして注目されている。

当研究グループにおいても、これまでに myostatin を標的とした核酸医薬による筋萎縮治療法について検討を行ってきた。その結果、in vivo において myostatin の発現を特異的に制御する myostatin siRNA (Mstn-siRNA) のマウス骨格筋への局所投与ならびに全身投与により、骨格筋量および筋活動量の増加が認められた。このことから、Mstn-siRNA が筋萎縮疾患治療に有用である可能性が示された (N. Kinouchi et al., Gene Ther., 2008, E. Kawakami et al., PLoS One, 2013)。

一方で、siRNA 単独では易分解性、低い血中滞留性および親水性のため細胞内導入が困難である。したがって、myostatin 阻害効果を向上させるためには、myostatin siRNA による mRNA レベルの阻害に加えて、myostatin 作用経路上の異なる標的を阻害する手法について検討するとともに、薬物の導入効率を高める輸送システムの開発が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、myostatin の標的である activin type IIB 受容体細胞外領域 Fc 融合タンパク (ActRIIB-Fc) を応用し、siRNA 単独投与と比べてより効果的な myostatin 阻害法の探索を試みるとともに、これまでに用いてきたアテロコラーゲンに代わる新規の薬物輸送担体として機能性リポソームの有効性を検討することとした。

### 3. 研究の方法

11 週齢の C57BL/6 野生型マウスを実験動物として用いた。

コントロール群、Mstn-siRNA 投与群、ActRIIB-Fc 投与群ならびに Mstn-siRNA/ActRIIB-Fc 共投与群に分類し、コントロール群にはリン酸緩衝生理食塩水

(PBS)、Mstn-siRNA 投与群には 10 $\mu$ M Mstn-siRNA/アテロコラーゲン複合体、ActRIIB-Fc 投与群には 1 $\mu$ M ActRIIB-Fc 複合タンパク/PBS 溶液、共投与群には Mstn-siRNA/アテロコラーゲン複合体と ActRIIB-Fc 複合タンパク/PBS 溶液の両方を、週 2 回咬筋へ局所投与した。

1 週間後に各群の咬筋を摘出し、組織学的解析ならびに遺伝子発現解析を行った。

本研究にかかる動物実験計画は、徳島大学動物実験管理規則の下に作成し、徳島大学動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

### 4. 研究成果

(1) Mstn-siRNA/ActRIIB-Fc 共投与群は、単独投与群に比べて咬筋重量および筋線維断面積が有意に増加した (図 1、2)。



Control Mstn-siRNA ActRIIB-Fc Co-delivery

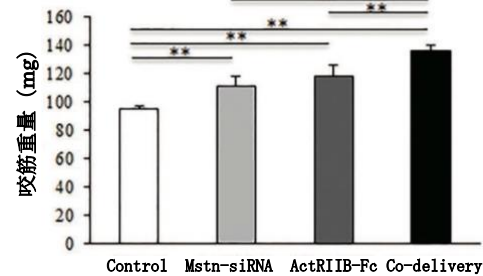


図 1. 咬筋の肉眼像および各群の咬筋重量 (scale bar=5 mm, \*\*p<0.01)

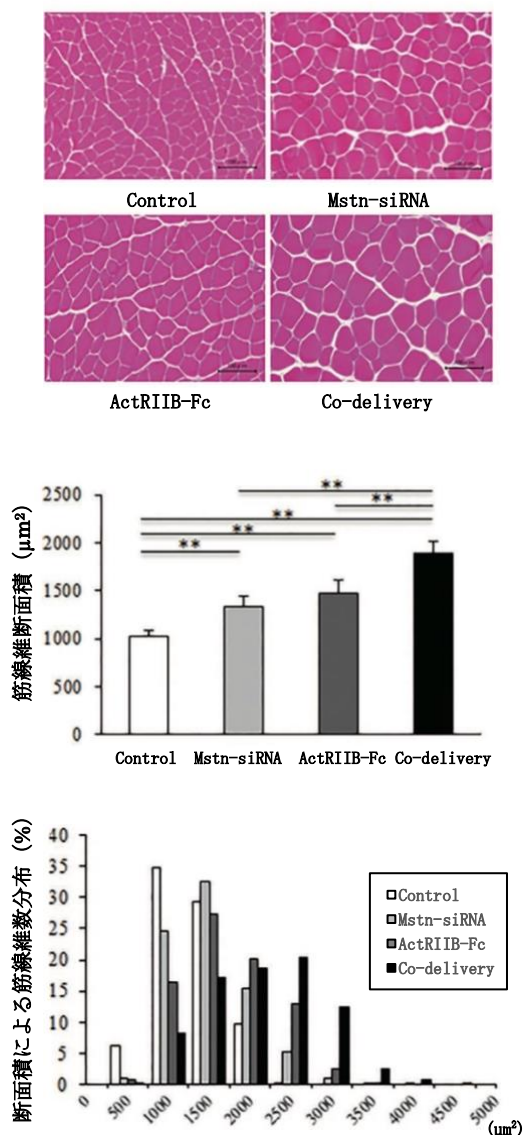


図 2. 各群の筋線維断面積および断面積による筋線維数分布 (scale bar=100 μm, \*\*p<0.01)

(2) Mstn-siRNA 単独投与群および Mstn-siRNA/ActRIIB-Fc 共投与群において、myostatin mRNA 発現レベルは有意に低下した。さらに、Mstn-siRNA/ActRIIB-Fc 共投与群においては、単独投与群に比べて myogenin mRNA の発現レベルが有意に上昇し、MuRF1 および Atrogin-1 の発現レベルは有意に低下した (図 3)。

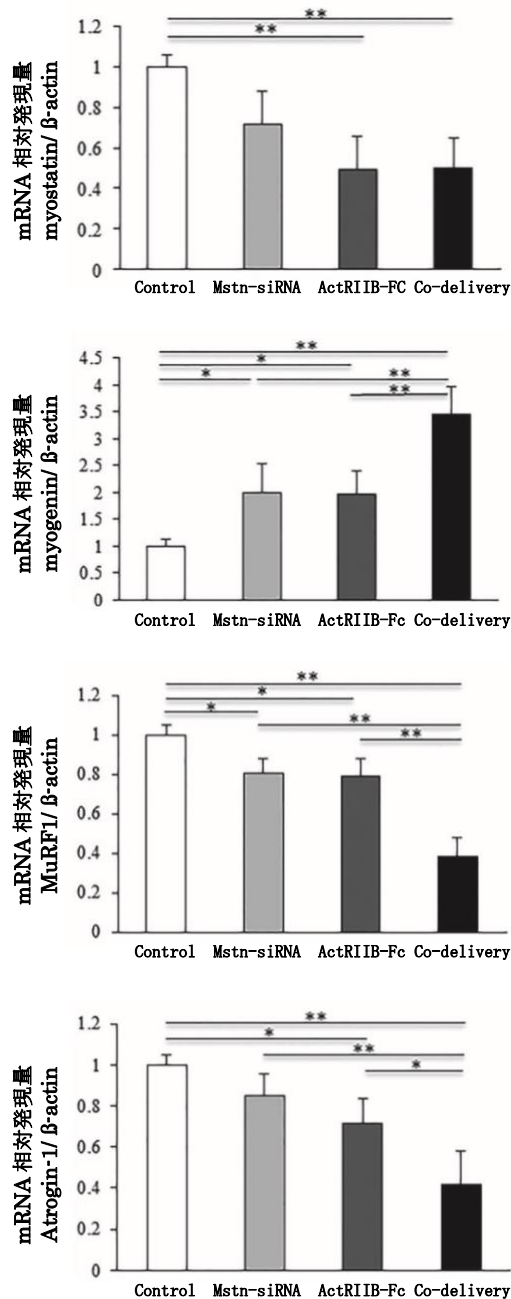


図 3. 各群における myostatin、myogenin、MuRF1 および Atrogin-1 mRNA 発現レベル (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

以上の結果より、Mstn-siRNA と ActRIIB-Fc の共投与は骨格筋萎縮疾患の有効な治療法となる可能性が示唆された。

今後、筋萎縮疾患モデルマウスに対する共投与の有効性を評価するとともに、作用効率および作用条件などについて、機能性リポソームの応用も含めた比較検討を行う予定としている。

## 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 2 件)

- ① Od BAYARSAIKHAN, Nobuhiko KAWAI, Hiroyo MORI, Nao KINOCHI, Takeshi NIKAWA and Eiji TANAKA, Co-Administration of Myostatin-Targeting siRNA and ActRIIB-Fc Fusion Protein Increases Masseter Muscle Mass and Fiber Size, Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 63, 244-248, 2017 (査読有)  
DOI : 10.3177/jns.v.63.244
- ② Od BAYARSAIKHAN, Nobuhiko KAWAI, Hiroyo MORI, Nao KINOCHI, Takeshi NIKAWA and Eiji TANAKA, Effects of Co-Transfection with Myostatin-Targeting siRNA and ActRIIB-Fc Fusion Protein on Skeletal Muscle Growth Journal of Oral Health and Biosciences 30 (1) : 1-7, 2017 (査読有)  
DOI : 10.20738/johb.30.1\_1

[学会発表] (計 1 件)

- ① Od BAYARSAIKHAN, Nobuhiko KAWAI, Hiroyo MORI, Nao KINOCHI and Eiji TANAKA, Effectiveness of myostatin targeting siRNA and ActRIIB-Fc fusion protein in skeletal muscle mass, 第 75 回日本矯正歯科学会学術大会, 2016.11.7-9, 徳島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 博世 (MORI, Hiroyo)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号 : 80733914