

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463183

研究課題名(和文)慢性筋萎縮性疾患に対する核酸創薬の開発研究

研究課題名(英文)Development study of the nucleic acid innovative drug development for the chronic amyotrophy-related disease

研究代表者

木内 奈央(KINOUCHI, Nao)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：30457329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：すでに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ドラッグデリバリーシステム担体であるリポソームを開発し、このリポソーム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 the liposome of the certainty of the security supply that it was cheaper, and a possible drug delivery system carrier for clinical application 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 liposome, and it was thought that we were connected for the development of the new cure for the chronicity hereditary muscular disorder in the future.

研究分野：矯正歯科

キーワード：RNAi 骨格筋

### 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ドラッグデリバリーシステム担体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(mdx 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た。しかし、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 RNAi を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りポソーム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)という現象が種々の遺伝子機能の解析のみならず、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リポソームを開発し、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

本研究では、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リポソームを開発し、siRNA の導入剤としてその効果を検討した。また、このリポソーム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 導入剤としてのリポソームの有効性について検討した。さらに、テレメトリーシステムを用いて、野生型マウス (C57BL/6) および mdx マウスにおける筋機能回復度を評価することを検討した。

#### (1) リポソームの開発および導入剤としての有効性の検討

最適濃度のリポソームを検討するため、2種類の正電荷脂質量 (40%、20%) ならびに3通りの濃度 (25%、50%、75%) の計6条件のリポソームを合成する。導入対象として、20~25週齢の野生型マウス (C57BL/6) を用いる。また、これらリポソームの対照として生理食塩水を用いることとした。マウス左側の咬筋に生理食塩水を、右側同部位に各リポソームを局所投与する。

リポソームを局所投与したマウスの生化学的・組織学的解析 各濃度のリポソームを局所投与して3日後、マウス咬筋および大腿筋を採取する。

#### (2) マウス咬筋への siRNA 導入

20~25 週齢の野生型マウス (C57BL/6) および mdx マウスを用いて、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な siRNA である Mst-siRNA) を、*in vitro* の実験においてその有効性が確認できたリポソームと混合して、左側咬筋に Mst-siRNA とリポソームの複合体 (Mst-siRNA-lipoplex) を局所導入した。同一個体の右側咬筋には scr-siRNA とリポソームの複合体を導入し対照側として用いた。

#### マウス骨格筋の組織学的解析

siRNA の局所導入から 3 日後、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。

#### 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 システムにて解析した。また、mdx マウスの骨格筋においては筋線維の変性・壊死に伴い、

筋線維中に存在する未分化幹細胞の脂肪組織への分化が亢進すると考えられていることから、Mst-siRNA-lipoplex 導入による脂肪分化に対する影響を検討した。

#### 筋機能回復度の評価

野生型マウスおよび mdx 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) 最適濃度のリポソームの開発および導入剤としての有効性の検討

20~25 週齢の C57BL/6 野生型マウスを用い、左側咬筋にコントロールとして生理食塩水を、右側同部位に様々な条件のリポソームを局所投与した。その結果、カチオン性脂質である DC-6-14、中性脂質である Cholesterol、DOPE、POPC が *in vivo* における siRNA の導入に至適な 2:3:3:2 のモル比で調製されたリポソームが最も組織傷害が少なく最適であると判断し、本研究で用いることとした。

##### (2) マウス骨格筋におけるリポソームの有効性の検討

20~25 週齢の野生型マウス (C57BL/6) および mdx マウスを用いて、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リポソームと混合して、左側咬筋に Mst-siRNA-lipoplex を局所導入した。また同一個体の右側咬筋には scr-siRNA とリポソームの複合体を導入し、対照側として用いた。

siRNA の局所導入から 3 日後、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、野生型マウスおよび mdx マウスともに Mst-siRNA-lipoplex 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-lipoplex を導入した咬筋重量は scramble-siRNA を導入した対照群に比べて増加していた。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-lipoplex 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-lipoplex 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する一方、MyoD および myogenin の遺伝子発現レベルは上昇していたことから、骨格筋形成が促進されていることが示唆された。また、mdx マウスの咬筋において Mst-siRNA-lipoplex 導入による脂肪分化に対する影響を検討した結果、対照側に比べ Mst-siRNA-lipoplex 導入側において、脂肪分化マーカーである PPAR および CEBP とともに有意な発現レベルの低下を認めた。すなわち、mdx マウスでは骨格筋の再生促進に伴って脂肪分化が抑制されている可能性が示唆された。

最後に、筋線維の肥大が生じた場合には、筋組織の肥大という形態的増大に見合う機能の発達をも期待されることから、Mst-siRNA-lipoplex 導入による筋機能に対する影響を検討するため、筋機能回復度の評価として野生型マウスおよび mdx マウスの背部にテレメトリーシステムを埋め込み、テレメトリーシステムを用いて咬筋筋電図の終日測定を行った。

その結果、野生型マウスの咬筋活動レベルは導入前後で変化を認めなかったが、mdx マウスでは Mst-siRNA-lipoplex 導入後、筋電図波形の振幅最大値 (peak activity) と、安静時活動レベルにおける筋活動量の増加傾向を認めた。筋力と筋の断面積が高い相関を示すとした報告もあることから、今回の結果は筋線維の肥大に伴う筋活動量の増加を示すことで一致しているため、リポソームを用いた Mst-siRNA の導入は、骨格筋量の調節のみならず筋機能も回復しうる可能性が示唆された。

以上の結果から、今回開発したリポソームは、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、このリポソーム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)

## 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

田中 栄二 (TANAKA, Eiji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 40273693

川合暢彦 (KAWAI, Nobuhiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 40437588