

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07762

研究課題名（和文）横紋筋肉腫に対するミオスタチンアンチセンス核酸治療

研究課題名（英文）Myostatin antisense nucleic acid therapy for rhabdomyosarcoma

研究代表者

前田 和宏（Maeta, Kazuhiro）

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・研究員

研究者番号：60443024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：横紋筋肉腫(Rhabdomyosarcoma: RMS)は、筋原性の高悪性腫瘍で、治療抵抗群もあることからより効果的な治療法の開発が喫緊の課題である。本研究で開発したミオスタチン遺伝子(MSTN)のmRNA産出を抑制するアンチセンス核酸(MSTN-ASO)は、RMS細胞において、MSTN mRNAを減少させ、ミオスタチンシグナルを低下させた。さらに、細胞周期を停止させることで増殖を阻害した。また、高量のMSTN-ASOはRMS細胞に対してアポトーシスを誘導した。さらに、マウスxenograftモデルにおいてRMS細胞とMSTN-ASOの同時接種による腫瘍拡大抑制効果がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりミオスタチンが高発現しているRMSの治療においてミオスタチンを標的にすることが効果的であることが示された。さらに申請者が開発したMSTN-ASOが、培養RMS細胞のみならず、マウスxenograftモデルにおいてもその効果を発揮したことは、MSTN-ASOがRMS治療の有力なツールになりうることを示唆した。特にMSTN-ASOはアポトーシスを誘導することから、抗がん剤としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Rhabdomyosarcoma (RMS) is a highly malignant myogenic tumor that is resistant to treatment, and the development of more effective therapies is an urgent issue. Antisense oligonucleotides (ASOs) that inhibit splicing of the myostatin gene (MSTN) and suppress mRNA production of MSTN were developed as potential therapeutic agents for muscle atrophy in this study. In the course of researching treatments for muscle atrophy, we found that MSTN-ASO inhibits the proliferation of RMS cells. MSTN-ASO decreased MSTN mRNA and myostatin signaling in RMS cells (Maeta et al., Int J Mol Sci., 2022). MSTN-ASO inhibited proliferation of RMS cells by arresting the cell cycle. In addition, high doses of MSTN-ASO induced apoptosis in RMS cells. Furthermore, simultaneous inoculation of RMS cells and MSTN-ASO inhibited tumor expansion in a mouse xenograft model.

研究分野：分子生物学

キーワード：横紋筋肉腫 ミオスタチン アンチセンス核酸 アポトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫(Rhabdomyosarcoma: RMS)は、筋原性の高悪性腫瘍で、集学的治療により予後は改善した。しかし、治療抵抗群もあり、より効果的な治療法の開発が喫緊の課題である。ミオスタチンは筋肉の増殖を抑制するミオカインであり、ミオスタチン阻害は筋形成を促進させる。そのため、ミオスタチン阻害は筋萎縮の治療法として盛んに研究されている。

申請者は、筋萎縮の治療法としてミオスタチン遺伝子(*MSTN*)のスプライシングを阻害し、*MSTN* mRNA 産出を抑制するアンチセンス核酸(MSTN-ASO)を開発した。この MSTN-ASO は想定通り筋芽細胞の増殖を促進したが、横紋筋肉腫(RMS)細胞に投与すると増殖を阻害するという想定外の結果を示した。そして、この結果から MSTN-ASO が RMS の治療薬になることが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究は、MSTN-ASO による RMS 細胞の増殖阻害を確定させ、その増殖阻害機序を明らかにすることで、ミオスタチンの想定外の作用とミオスタチン阻害による抗腫瘍効果を明確にする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ミオスタチンの mRNA の産出を抑制するアンチセンス核酸(MSTN-ASO)が横紋筋肉腫(RMS)細胞の増殖を阻害する効果を筋芽細胞と比較しつつ細胞レベルで明らかにする。さらに、MSTN-ASO の作用機序を細胞周期、アポトーシスに焦点をおいて明らかにする。そして、ヌードマウス xenograft に MSTN-ASO を投与し、その腫瘍抑制効果を明らかにする。

1) MSTN-ASO による RMS 細胞の増殖阻害; MSTN-ASO を培養 RMS 細胞と培養筋芽細胞に投与し、細胞の増殖を細胞数、代謝インジケータで評価する。

2) MSTN-ASO による RMS の細胞周期停止; RMS 細胞と筋芽細胞に対して ASO を処理し、細胞周期インジケータFucci を利用したタイムラプスイメージ解析により細胞周期停止を検証する。

3) MSTN-ASO による細胞周期停止機構の解析; Fucci による解析の結果を基に、MSTN-ASO による細胞周期停止機構を明らかにする。MSTN-ASO で停止した細胞周期のチェックポイントの通過に関与するサイクリン-CDK 複合体、CDK 阻害因子の発現量を検証する。

4) MSTN-ASO によるアポトーシスの解析; ASO 投与後の RMS 細胞で、TUNEL アッセイによりアポトーシスの有無を検討する。

5) ヌードマウス xenograft による MSTN-ASO の抗腫瘍効果の証明; ヌードマウス xenograft に MSTN-ASO を投与し、その腫瘍抑制効果を明らかにする。RMS 細胞移植と MSTN-ASO 投与を同時に行い、腫瘍の拡大を検証する解析と、RMS 細胞移植後、腫瘍をあらかじめ拡大させておいた後に MSTN-ASO を投与して大きさの変化を検証する解析を行う。

### 4. 研究成果

ミオスタチンは筋細胞の増殖を阻害するため、RMS 細胞ではその発現が低いと想定された。しかしながら、RT-PCR で *MSTN* mRNA レベルを検討した結果、想定に反し、RMS 細胞(CRL-2061 細胞, CCL-136 細胞)でその発現は高いことが示された(図 1)。このことから、ミオスタチンは RMS 細胞の増殖に必要なことが示唆された。まず、RMS 細胞における MSTN-ASO の *MSTN* mRNA 発現抑制効果について検討を行った。その結果、RMS 細胞(CRL-2061 細胞)では MSTN-ASO の投与量依存的な *MSTN* mRNA の産生抑制が確認された(図 2)。さらに、MSTN-ASO 量依存的なミオスタチンシグナルの低下も観察された(Maeta et al., Int J Mol Sci., 2022)。これらの結果は、MSTN-ASO は筋芽細胞のみならず、RMS 細胞においても *MSTN* mRNA 産生抑制効果を発揮することを示している。

次に、MSTN-ASO 投与による細胞増殖阻害効果を検討した。細胞数ならびに、代謝インジケータを利用した解析で、CRL-2061 細胞の MSTN-ASO 投与による増殖阻害が認められた(図 3)。

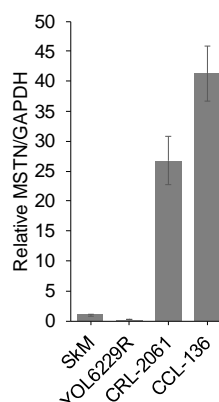


図 1. RMS 細胞の *MSTN* 発現。RT-PCR により *MSTN* mRNA と *GAPDH* mRNA 発現量を解析し、*MSTN*/*GAPDH* を算出。

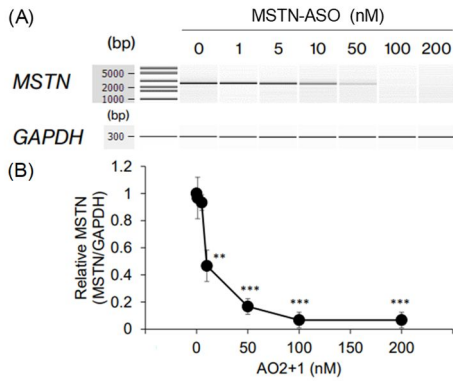


図2. CRL-2061細胞にMSTN-ASOを投与。MSTN-ASOの量依存的にMSTN mRNAが低下。(A)RT-PCRでMSTN-ASO投与後のMSTNの発現を検討。(B)(A)を定量することによりMSTN/GAPDHを算出。

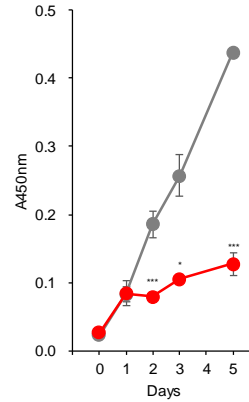


図3. CRL-2061細胞のMSTN-ASOによる増殖阻害。代謝インジケターCCK-8によるアッセイ。MSTN-ASO投与無(灰)、100 nM MSTN-ASO投与(赤)。

MSTN発現量とMSTN-ASOによる増殖阻害の検討を行うため、MSTNが高発現しているCRL-2061細胞、CCL-136細胞と、MSTNが低発現のYOL6229R細胞を使用して比較検討した。その結果、MSTNが高発現しているCRL-2061細胞、CCL-136細胞ではMSTN-ASOによる増殖阻害が認められたが、MSTNが低発現のYOL6229R細胞では増殖阻害が認められなかった。これらの結果から、MSTN-ASOによる増殖阻害はMSTNが高発現しているRMS細胞でみられることが示された。また、筋芽細胞でのMSTN-ASOの効果を検討したところ、筋芽細胞では、RMS細胞と同様にMSTN-ASOによるMSTN mRNAの産生抑制と、ミオスタチンシグナルの低下が観察されたが、細胞増殖の促進がみられた(Maeta et al., Int J Mol Sci., 2022)。MSTN-ASOの細胞増殖阻害はMSTNが高発現しているRMS細胞特異的な表現型であることが示された。

次にRMS細胞(CRL-2061細胞)の増殖阻害を細胞周期に注目して検討した。細胞周期インジケターFast-Fucciを利用し、細胞周期停止を検証したところ、細胞周期の進行が阻害されていることが示された(図4)。続いて、CRL-2061細胞においてMSTN-ASO投与後の細胞周期の進行に関する因子の発現を定量PCR(TaqMan™ Array, Human Cyclins & Cell Cycle Regulation)で検討した結果、MSTN-ASO投与でG1の進行を阻害するサイクリン依存性キナーゼ阻害分子CDKN2BとG1期-S期の移行にかかわる転写因子E2F3の発現量の増加が観察され、G1期における細胞周期停止が示唆された(図5)。

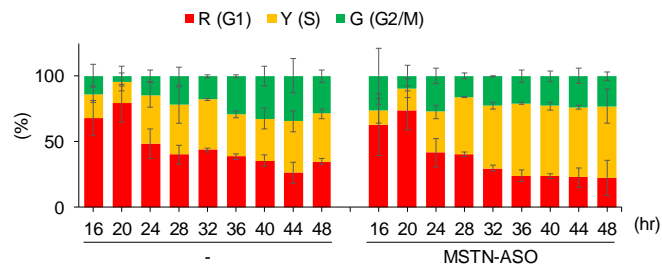


図4. CRL-2061細胞にMSTN-ASOを投与。細胞周期インジケターFast-Fucciで各周期を検討。MSTN-ASO投与で細胞周期が停止した。

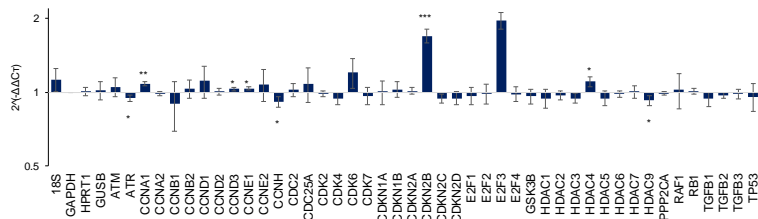


図5. CRL-2061細胞で細胞周期関連因子の発現を定量PCRで検討。MSTN-ASO無と100 nM MSTN-ASOを比較。サイクリン依存性キナーゼ阻害分子CDKN2Bと転写因子E2F3の発現が上昇した。

さらにアポトーシスを TUNEL アッセイで検討した。CRL-2061 細胞に MSTN-ASO を投与し、24 時間後に検討した結果、MSTN-ASO によりアポトーシスが誘導された。さらに RMS 細胞のアポトーシスの誘導が既知であるシスプラチンと MSTN-ASO の併用利用を検討したところ、併用で効果が相加的に増加した(図 6)。このことは、MSTN-ASO がシスプラチンのアポトーシス誘導効果を阻害しないことを示しており、併用が可能なことを示唆している。

MSTN-ASO の腫瘍抑制効果についてヌードマウスの xenograft モデルで検討したところ、MSTN-ASO 同時接種での腫瘍の大きさが、MSTN-ASO 無と比較して縮小していたことから、MSTN-ASO の腫瘍拡大の抑制効果が示された(図 7)。一方で、あらかじめ腫瘍を拡大させておいた後に腫瘍に MSTN-ASO を投与して腫瘍の大きさの変化を検討した場合は有意な差は得られなかった。

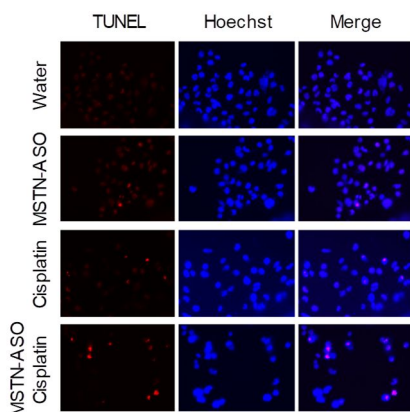
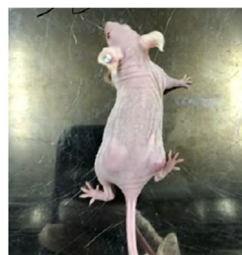


図 6. CRL-2061 細胞に MSTN-ASO を投与。アポトーシスを TUNEL アッセイで検討。MSTN-ASO 投与で TUNEL 陽性細胞がみられ、シスプラチンの共投与で陽性細胞のさらなる増加がみられた。



(-) (+)  
1535 mm<sup>3</sup> 535 mm<sup>3</sup>

図 7. マウス xenograft モデル。CRL-2061 細胞を接種とともに MSTN-ASO の有無でその拡大を検討。ASO 無(-)と 100 nM ASO(+). ASO 投与で腫瘍の拡大が抑制された。数値(mm<sup>3</sup>)は腫瘍の大きさを示す。

本研究でミオスタチンが高発現している RMS 細胞では MSTN-ASO による増殖抑制効果があることが示唆された。一方で腫瘍の縮小効果をもたらす適切な投与量ならびに投与方法は今後の検討課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takeda Atsuhito, Ueki Masahiro, Abe Jiro, Maeta Kazuhiro, Horiguchi Tomoko, Yamazawa Hirokuni, Izumi Gaku, Chida Nagai Ayako, Sasaki Daisuke, Tsujioka Takao, Sato Itsumi, Shiraiishi Masahiro, Matsuo Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of infantile Barth syndrome with severe heart failure: Importance of splicing variants in the <i>TAZ</i> gene	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e2190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.2190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maeta Kazuhiro, Farea Manal, Nishio Hisahide, Matsuo Masafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 A novel splice variant of the human <i>MSTN</i> gene encodes a myostatin specific myostatin inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 2289 ~ 2300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.13314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mamiko, Maeta Kazuhiro, Suzuki Hisato, Kurosawa Ryo, Takenouchi Toshiki, Awaya Tomonari, Ajiro Masahiko, Takeuchi Atsuko, Nishio Hisahide, Hagiwara Masatoshi, Miya Fuyuki, Matsuo Masafumi, Kosaki Kenjiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Successful skipping of abnormal pseudoexon by antisense oligonucleotides in vitro for a patient with beta-propeller protein-associated neurodegeneration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-56704-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maeta Kazuhiro, Farea Manal, Nishio Hisahide, Matsuo Masafumi	4. 巻 23
2. 論文標題 An Antisense Oligonucleotide against a Splicing Enhancer Sequence within Exon 1 of the MSTN Gene Inhibits Pre-mRNA Maturation to Act as a Novel Myostatin Inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5016 ~ 5016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23095016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Farea Manal, Maeta Kazuhiro, Nishio Hisahide, Matsuo Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Human Dystrophin Dp71ab Enhances the Proliferation of Myoblasts Across Species But Not Human Nonmyoblast Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 877612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.877612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Maeta, Manal Farea, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo	4. 巻 23(9)
2. 論文標題 An Antisense Oligonucleotide against a Splicing Enhancer Sequence within Exon 1 of the MSTN Gene Inhibits Pre-mRNA Maturation to Act as a Novel Myostatin Inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 前田和宏、竹内敦子、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 MSTN遺伝子のスプライシングをスイッチするアンチセンス核酸はデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの所見を改善する
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会、第10回筋ジストロフィー医療研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾雅文、前田和宏、西尾久英
2. 発表標題 N-of-1アンチセンス核酸薬の開発システムの構築
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田和宏、Manal Farea、岡本 到、藤原健志、閻 正博、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 スプライシング開始阻害型アンチセンス核酸の開発：MSTN遺伝子をモデルとして
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田和宏、Manal Farea、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 MSTN遺伝子のスプライシングパリアントの産生を促すアンチセンス核酸
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田和宏、Manal Farea、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 ヒトのミオスタチンアイソフォームはミオスタチンを阻害し筋芽細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Maeta, Manal Farea, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo
2. 発表標題 A splicing variant found in the human myostatin gene encodes an isoform that inhibits myostatin
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田和宏、Manal Farea、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 ヒトMSTN遺伝子で初めてクローニングしたスプライシングバリエントは3' UTR内の非典型スプライスサイトを活性化していた
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田和宏、Manal Farea、西尾久英、松尾雅文
2. 発表標題 ミオスタチン新規アイソフォームはミオスタチンを特異的に阻害し筋芽細胞増殖を促進する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ミオスタチンスプライスバリエント由来タンパク質によるミオスタチンシグナル阻害とその利用	発明者 松尾雅文、岡崎宏亮、前田和宏	権利者 神戸天然物化学株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7445640号	取得年 2024年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 範行 (Nishimura Noriyuki) (00322719)	神戸大学・保健学研究科・教授  (14501)	
研究分担者	松尾 雅文 (Matsuo Masafumi) (10157266)	神戸常盤大学・保健科学部・特命教授  (34535)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------