

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：37401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012 年度  
 課題番号：22590509  
 研究課題名（和文）Duchenne 型筋ジストロフィーに対するヒストン脱アセチル化酵素阻害療法の開発  
 研究課題名（英文）A novel therapy using histone deacetylase inhibitors for Duchenne muscular dystrophy.  
 研究代表者  
 内田 友二（UCHIDA YUJI）  
 崇城大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：70433026

### 研究成果の概要（和文）：

我々の実験系においては筋芽細胞に対してヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による明らかな筋分化誘導能を見いだせなかった。また、ビタミン A の誘導体であるレチノイド（Am80）を用いて同様の検討を行ったが、Am80 によっても治療効果は確認できなかった。今後は、培養系が不安定となるものの初代培養細胞に対する効果や、筋分化誘導能を有する可能性のある他の薬物/物質を含めて検討する必要があると考えられる。

### 研究成果の概要（英文）：

We have examined the possibility of a novel therapy using histone deacetylase inhibitors (HDAC-I) for muscle differentiation. At first, we have investigated the change of C2C12 cells (mouse myoblast cell line) after the administration of TSA. We have not observed the efficacy of TSA. Next, we have used retinoid (Am80). However, we have obtained no distinct effects on C2C12 cells.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	500,000	150,000	650,000
平成 23 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：筋ジストロフィー

#### 1. 研究開始当初の背景

トリコスタチン A などのヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（以下、HDAC-I）を投与することにより筋分化誘導能が有意差をもって亢進したとの報告がみられる。

#### 2. 研究の目的

HDAC-I による筋ジストロフィーへの治療応用の可能性があるかどうかを、骨格筋培養細胞を用いて検討する。

### 3. 研究の方法

まず、ヒストン脱アセチル化酵素薬として、予備実験の結果により筋芽細胞に対する効果が大きかったトリコスタチン A(以下 TSA)を用いて研究を進めた。TSA の厳密な溶解度の違いや手技による誤差を最小化するために固体の TSA を溶解するのではなく、TSA の 5mM ジメチルスルホキシド(以下 DMSO)溶液を以下の実験に用いた。溶媒である DMSO のみを細胞に添加する予備実験により、DMSO 自体による細胞生存率や分化に関する細胞への影響が認められたため、細胞培地に対する DMSO の割合 (量) を 1/1000 以下とした。

細胞はマウスの筋芽細胞の cell line である C2C12 細胞を用いた。TSA について  $5 \times 10^{-3} \text{ M} \sim 10^{-6} \text{ M}$  の stock 溶液を調製した。培地のグルコース濃度は 4.5g/l と 1g/l の 2 種類の DMEM 培地を用いた。TSA を加える時点の細胞密度を 1. (20~30%)、2. (50~70%)、3. (ほぼ 100%confluent) の 3 種類、TSA に暴露する時間を 24、48、72 時間の 3 種類、薬物への暴露を終了してから評価までの時間を 72 時間、96 時間、120 時間の 3 種類それぞれについて検討した。また、TSA を添加するタイミングを、分化誘導をかける前後(growth medium に加えるか、differentiation medium に加えるか)に分けて検討した。

次に、筋分化誘導活性を有するとの報告があるビタミン A の誘導体であるレチノイド (Am80) を用いて、筋分化誘導実験を行うこととした。Am80 の  $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-8} \text{ M}$  の DMSO 溶液を調製した。分化培地の normal horse serum 濃度、上記薬液を添加する時点の細胞密度、添加する時間の 3 点について、様々な条件検討を行った。Am80 を添加してから 72 時間、

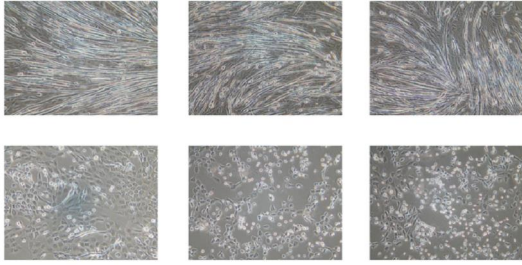
96 時間、120 時間後に筋管細胞を形成した割合(面積)と筋管細胞の長さを指標として筋管細胞形成能(筋分化誘導能)を評価した。

### 4. 研究成果

TSA については、上記いずれの条件においても、筋管細胞を形成した割合(面積)と筋管細胞の長さには有意差は認められなかった。昨年度の結果と矛盾する結果となり、その原因について検討したが現在までのところ原因を確定できていない。念のために上記と同様の系にて HDAC 阻害活性を有するバルプロ酸ナトリウムおよび Sodium butyrate についても C2C12 筋芽細胞に対する添加実験を施行した。これら 2 薬物の添加による C2C12 細胞に対する分化誘導能は認められなかった。

Am80 については、 $10^{-6} \text{ M}$  および  $10^{-7} \text{ M}$  水溶液を、2%normal horse serum の High-Glucose DMEM 培地に 48 時間添加した際に、120 時間後に評価したところ筋管細胞を形成した割合(面積)と筋管細胞の長さのいずれの指標においても筋管細胞形成能の亢進が認められた(下記 Figure 上段、左から  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$ , control (DMSO のみ))。しかしながら、同様の条件においては、control (DMSO のみ)においても筋管細胞形成能の亢進が認められ、上記の指標いずれにおいても有意差は認められなかった。

図：骨格筋培養細胞分化誘導における Am80 の影響(上段：high-glucose medium, 下段：low-glucose medium, 左列：Am80 濃度： $10^{-6} \text{ mol/l}$ , 中央列：Am80 濃度： $10^{-5} \text{ mol/l}$ , 右列：control (Am80 を添加せず、溶媒のみを添加したもの))



Am80 により筋分化誘導能促進されて筋管細胞の形成が亢進している傾向はあった（上段の左と中央）ものの、Am80 を加えていない対照（上段の右）と比較した場合、筋分化に対する Am80 による明らかな影響は確認することが出来なかった。

#### 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）

〔学会発表〕（計 4 件）

1) Muscle fiber type-predominant promoter activity in lentiviral-mediated transgenic mouse. Tomohiro, Suga, En Kimura, Yuka, Morioka Masahito Ikawa, Sheng Li, Katsuhisa Uchino, Yuji Uchida (Sojo University), Satoshi Yamashita, Yasushi Maeda, J S Chamberlain (University of Washington School of Medicine) , Makoto Uchino. (所属の記載のない共同演者の所属はすべて、Kumamoto University) ASGCT 14<sup>th</sup> Annual Meeting, (2011, 5, 18, Seattle, USA)

2) Lentiviral vector mediated delivery of full-length dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy. En Kimura, Katsuhisa Uchino, Tomohiro Suga, Tatsuya Koide, Yuji Uchida (Sojo University), Yasushi Maeda, Satoshi

Yamashita, Jeffrey Chamberlain (University of Washington School of Medicine) , Makoto Uchino. (所属の記載のない共同演者の所属はすべて、Kumamoto University) (15<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society, 2010, 10, 12, Kumamoto, Japan)

3) 筋ジストロフィーの遺伝子・幹細胞治療研究.

内野克尚, 木村 円, 菅 智宏, 小出達也, 内田友二 (崇城大学), 山下 賢, 前田 寧 Jeffrey S. Cham

berlain (University of Washington School of Medicine), 内野 誠. (所属の記載のない共同演者の所属はすべて、熊本大学)

(第 51 回日本神経学会総会, 2010, 5, 20, 東京)

4) Lentiviral vector mediated delivery of full-length dystrophin for gene therapy of muscular dystrophy.

En Kimura, Katsuhisa Uchino, Tomohiro Suga, Tatsuya Koide, Yuji Uchida (Sojo University), Yasushi Maeda, Satoshi Yamashita, Jeffrey Chamberlain

(University of Washington School of Medicine) , Makoto Uchino. (所属の記載のない共同演者の所属はすべて、Kumamoto University)

(ASGCT 13<sup>th</sup> Annual Meeting, 2010, 5, 17, Washington, D. C. , USA. )

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 友二 (UCHIDA YUJI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70433026

### (2) 研究分担者

木村 円 (KIMURA EN)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター  
トランスレーショナルメディカル  
センター 臨床研究支援部 早期・探索的  
臨床試験室・室長

研究者番号：60433025