

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792055

研究課題名（和文）難治性筋疾患制圧を目指した RNA 干渉を用いた筋機能回復機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of the myofunctional recovery using RNA interference aiming at the treatment of the skeletal muscle disorder

研究代表者

川合 暢彦（KAWAI NOBUHIKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40437588

研究成果の概要（和文）：

筋ジストロフィーモデルマウスにマイオスタチン特異的 siRNA を投与し、RNA 干渉による筋機能回復に対する有効性を確立することを目的とした。筋ジストロフィーモデルマウス（mdx マウス）の咬筋にマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA の局所投与を行ったところ、筋線維は肥大し、筋活動量も増大していた。以上より、RNA 干渉を用いたマイオスタチン遺伝子抑制は、筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋萎縮の改善に有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of a myostatin-targeting siRNA (Mst-siRNA) for the recovery of muscle functions using muscular dystrophy model mice. The injection of the Mst-siRNA into the masseter muscle induced an increase in muscle mass and a muscle activity. These results suggested that the administration of Mst-siRNA might be a candidate for the treatment of muscular atrophy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：筋ジストロフィー、マイオスタチン、RNA 干渉、筋電図、咀嚼筋

1. 研究開始当初の背景

進行性筋ジストロフィーは骨格筋の進行性変性をきたす遺伝性疾患群の総称で、その中で最も頻度が高く重篤な症状を呈する病

型が Duchenne 型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy：DMD）である。DMD は伴性劣性の遺伝形式をとり、新生児 3500 人に 1 人の頻度で男性のみに発

症する。原因遺伝子の変異により筋線維膜構成成分の一つであるジストロフィンが欠損し、膜の脆弱化が起こり、それにより筋線維が萎縮、変性、壊死することにより筋力が低下する。臨床経過は常に進行性で予後はきわめて悪く、ほとんどの症例は 20 代には心不全や呼吸器不全により死亡する。骨格筋の収縮張力は骨での適応反応を引き起こすため骨格筋の進行性萎縮は身体活動の低下ばかりでなく、形態的不均衡を招来することが指摘されている。そのため DMD は顎顔面骨格の成長においても影響を及ぼし、舌筋線維の壊死に伴う脂肪組織の増大による歯列幅径の不調和や、閉口筋機能の低下による骨格性開咬が生じることが知られている。

本疾患には副腎皮質ステロイド投与やリハビリテーションが行われるが、病因に基づく根本的な治療法は確立されていない。近年、細胞内の標的遺伝子の発現を特異的に抑制する RNA 干渉という現象が発見され、数々の遺伝子機能の解析に用いられるようになってきた。また、マイオスタチン (Myostatin 以下 Mst) は細胞の増殖や分化機構に関与する TGF- β スーパーファミリーに属する遺伝子として発見され、骨格筋形成の抑制遺伝子として注目されている。我々の研究グループではこれまで、マイオスタチンに対する RNA 干渉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骨格筋量の調節に有用であることを報告した (Kinouchi et al., 2008)。本結果をもとに、RNA 干渉によるマイオスタチン遺伝子のノックダウンは筋ジストロフィーをはじめとした難治性筋疾患の新規治療法の開発に発展し得ると考えた。

2. 研究の目的

筋ジストロフィーモデルマウスにマイオスタチン特異的 siRNA を投与し、運動生理学、免疫組織化学的および生化学的解析を行い、RNA 干渉による骨格筋量制御法の有効性を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋ジストロフィーモデルマウスの咀嚼筋性状解析

25 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウスと筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) それぞれ 10 匹の咬筋活動の測定を行った。筋活動の測定には送信器 (TL11M2-F20-EET, 12 mm \times 9 mm \times 17 mm, 3.9g; Data Sciences International (DSI), St. Paul, USA)、受信ボード (RPC-1,

DSI)、データ取得システム (Dataquest A.R.T., DSI) から構成されるテレメトリー長時間自動計測システムを使用した。全身麻酔下で筋電図記録用送信器をマウス背部に埋め込み、双極電極を右側咬筋に埋入し、筋膜表面で固定した。筋活動は術後 1 週間の回復期間ののち、3 日間連続測定し、筋活動の評価は振幅の最大値をもとに設定される活動レベルごとに 1 日の総活動時間の割合 (duty time) を算出した。

測定終了後、マウスを屠殺し右側咬筋を摘出した。筋重量測定後、厚さ 10 μ m の凍結切片を作製した。H-E 染色を行い光学顕微鏡にて観察を行い、筋線維断面積を画像ソフトウェアを用いて計測した。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの siRNA 導入による筋機能回復効果の検討

25 週齢の mdx マウス 10 匹を使用した。右側咬筋に Mst-siRNA とアテロコラーゲン複合体の局所投与を行い、2 週間後に両側の咬筋を摘出し、その筋重量を測定するとともに、解剖学および生化学的解析を行った。

解剖学的検索として、厚さ 10 μ m の凍結切片を作製した。H-E 染色を行い光学顕微鏡にて観察を行い、筋線維断面積を画像ソフトウェアを用いて計測した。

生化学的検索として、摘出した咬筋から mRNA を抽出しリアルタイム定量 PCR によるマイオスタチンおよび筋分化マーカーである MyoD および myogenin 遺伝子発現の検討および抗マイオスタチン抗体を用いたウェスタンブロットによるマイオスタチンの発現の検討を行った。

また、咬筋の活動量の変化を検討するため、Mst-siRNA の投与前および投与 2 週間後に右側咬筋の終日筋活動をテレメトリー長時間自動計測システム 3 日間連続測定した。

4. 研究成果

(1) 筋ジストロフィーモデルマウスの咀嚼筋性状解析

5%と 50%の両活動レベルにおいて mdx マウスが野生型マウスに比べ有意に高い活動を示した (5%:p<0.01; 50%:p<0.05)。

また、筋重量および筋線維断面積ともに mdx マウスが野生型マウスに比べ有意に (p<0.01) 小さい値を示した。

以上より、筋ジストロフィーモデルである mdx マウスでは骨格筋の正常な発育が阻害された結果、機能的に補うため筋活動量が増加していることが明らかとなった。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの siRNA 導入による筋機能回復効果の検討

siRNA の局所投与を行った側の咬筋は肥大し、対照側と比較して筋重量が有意に増加した ($p<0.05$) (図 1)。筋線維についても対照群と比較して有意に肥大していた ($p<0.01$) (図 2)。

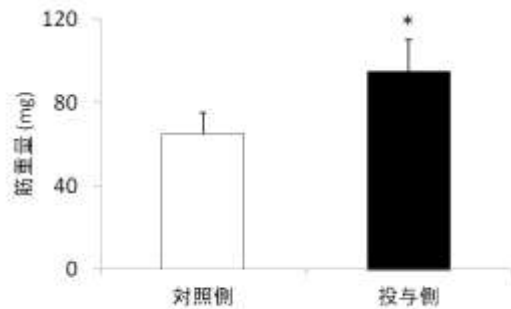


図1 筋重量の比較 (*: $p<0.05$)

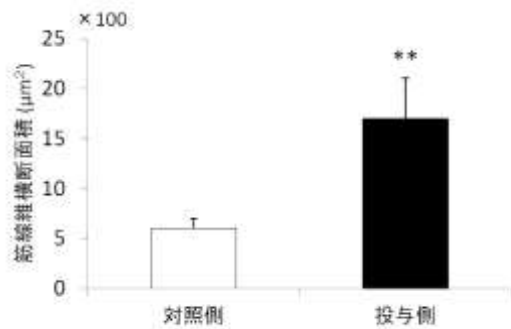


図2 筋線維横断面積の比較 (**: $p<0.01$)

次いで、定量リアルタイム PCR 法による解析結果として、Mst-siRNA 投与側では対照側と比較してマイオスタチン遺伝子発現が有意に小さく ($p<0.01$)、発現が抑制されていることが確認された。また、筋組織への分化マーカーである myogenin と MyoD 遺伝子の発現が有意に増加していた ($p<0.05$)。ウェスタンブロットによりタンパクレベルでもマイオスタチンの発現が減少していることが示された。

投与前と投与 2 週間後の咬筋終日筋活動を比較すると、5%レベルで投与後筋活動量が有意に増大していた ($p<0.05$) (図 3)。この活動亢進は siRNA 投与による筋産生の向上によるものと考えられた。

以上より、RNA 干渉を用いたマイオスタチン遺伝子抑制は、筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋萎縮の改善に有効であることが明らかとなった。

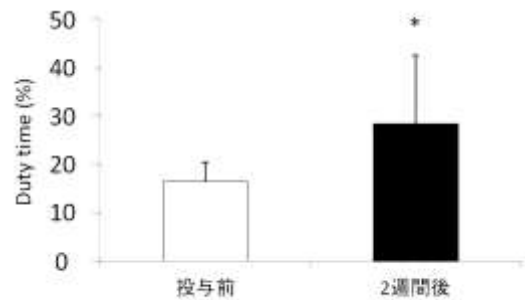


図3 5%レベルにおける咬筋終日筋活動 (*: $p<0.05$)

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 1 件)

Kawai N, Sano R, Korfage JAM, Nakamura S, Kinouchi N, Kawakami E, Tanne K, Langenbach GEJ, Tanaka E. Adaptation of rat jaw muscle fibers in postnatal development with a different food consistency: an immunohistochemical and electromyographic study. *Journal of Anatomy* 216: 717-723, 2010, 査読有, DOI: 10.1111/j.1469-7580.2010.01235.x.

[学会発表] (計 3 件)

① 川合暢彦, 川上恵美, 中村彩花, 木内奈央, 田中栄二. 筋ジストロフィーモデルマウスにおける RNA 干渉を用いた咀嚼筋機能の回復. 第 47 回日本顎口腔機能学会学術大会, 兵庫医療大学 神戸キャンパス, 2011.10.22 (神戸)

② Kawai N. Influences of the mastication on the development of jaw muscles in rats. International Joint Symposium on Oral Science: The University of Tokushima, Universitas Gadjah Mada, Niigata University, The Patra Bali, 2010.12.17 (Bali, Indonesia)

③ 川上恵実, 木内奈央, 足立太郎, 中村彩花, 川合暢彦, 田中栄二, 野地澄晴. 特殊加工コラーゲンを単体としたマイオスタチン siRNA 投与による骨格筋量調節法の研究. 第 69 回日本矯正歯科学会大会, パシフィコ横浜, 2010. 9.27 (横浜市)

6. 研究組織

研究代表者

川合 暢彦 (KAWAI NOBUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教
研究者番号：40437588