

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 5 月 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890125

研究課題名（和文）慢性筋萎縮疾患制圧を目的とした RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究

研究課題名（英文）Strategic study of atelocollagen-mediated application of myostatin-targeting siRNA for therapeutic use for muscular atrophy diseases

研究代表者

川上 恵実 (KAWAKAMI EMI)

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：20579958

研究成果の概要（和文）：骨格筋量の調節に関与するマイオスタチン(Mst)遺伝子の RNAi を応用して骨格筋の制御とその機能回復を図り、筋ジストロフィーに対する真吉量法を開発することを目的として、マウス骨格筋への Mst 特異的 siRNA とアテロコラーゲンの複合体の局所・あるいは全身投与を行った。その結果、形態的には骨格筋の肥大を認め、機能的には張力、筋活動量ともに回復傾向を認める結果となった。

研究成果の概要（英文）：Muscular dystrophy is a severe muscle wasting disorder caused by gene mutations. The disease is lethal, but the treatment of the basic genetic defect has not been established. Recently, many studies have been performed towards establishing an effective treatment for muscular dystrophy.

After local application of the Mst-siRNA/ATCOL complex, masseter muscles were enlarged, while no significant change was observed on the contralateral side. Histological analysis showed that the myofibril sizes of the masseter muscles treated with the Mst-siRNA/ATCOL complex were larger than those of the control side. The Mst-siRNA/ATCOL treated muscles were further examined by a real-time PCR analysis, showing a significant down-regulation of Mst gene expression in the treated masseters of both wild type and mCAV-3Tg mice. From EMG records, the amounts of masseter muscle activity in mCAV-3Tg mice were increased by local administration of Mst-siRNA/ATCOL complex. Furthermore, systemic application of the Mst-siRNA/ATCOL complex induced considerable recovery of contractile forces for TA muscles in mCAV-3Tg mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

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、RNAi、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは骨格筋の変性・壊死を主病変とした慢性筋萎縮性疾患の代表的疾患であり、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性疾患と定義されている。矯正学的観点から言えば、筋ジストロフィー患者の口腔内所見は、筋繊維の衰退と脂肪組織の増大により舌の仮性肥大を生じ、これに伴い、下顎歯列弓の拡大と上下の歯列弓の不調和による開咬といった不正咬合を示しやすいと言われている。また、咬筋の機能低下により、咀嚼・嚥下障害を惹起するとも考えられている。しかしながら、根本的な治療法が未確立であり、筋萎縮の進行を抑制するなどの対症療法のみが実施されているのが現状である。現在、ヒトへの応用を目的として、失われた遺伝子を導入する遺伝子治療や、筋幹細胞を移植する細胞移植療法、そして薬物療法といったものが細胞あるいは動物レベルにおいて研究されている。遺伝子治療の一つとして筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンの導入が試みられたが、巨大な細胞骨格を有する為、直接導入が困難であり、我々はそれにかわる遺伝子として、TGF- β スーパーファミリーに属する当ペプチド性増殖因子であるマイオスタチンに注目した。当講座では、ドミナントネガティブ型のマイオスタチンを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その骨格筋量が増大することを確認している。

2. 研究の目的

背景でも示したように、筋ジストロフィーにおいては進行性に症状が悪化し、特にDuchenne型では20~30歳といった青年期に死亡するにも関わらず根本的な治療法が未確立である。そこで本研究でc、mは、骨格筋量の調節に関与するマイオスタチン遺伝子のRNAi効果を応用して骨格筋量の制御とその機能回復を図り、筋ジストロフィーに対する新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス咬筋へのマイオスタチン siRNA とアテロコラーゲンの複合体(以下 Mst-siRNA/ATCOL と略す)の局所投与と、マウス眼窩下静脈叢からの全身投与

野生型マウス(C3Hマウス)と筋ジストロフィーモデルマウス(mutant-caveolin-3transgenicマウス:以

下 mCAV-3Tgマウスと略する)を使用してアテロコラーゲンをデリバリー担体としたマイオスタチン siRNA の局所及び全身投与が骨格筋(咬筋、前脛骨筋)に及ぼす効果を検索する。

局所投与:Mst-siRNA/ATCOLをマウスの右側咬筋に、対照側としてスクランブル siRNA とアテロコラーゲンの複合体(以下 scr-siRNA/ATCOLと略す)をマウスの左側咬筋に局所投与する。局所投与は1回のみで投与後2週間で咬筋を採取し、解析を行う。

全身投与:Mst-siRNA/ATCOLをマウス眼窩下静脈叢より全身投与する。対照群のマウス眼窩下静脈叢からはscr-siRNAを投与する。全身投与では初回の投与から2週間の間に4回投与し、最終投与から1週間の待機期間をい経た後、骨格筋を採取して解析を行う。

(2)マウス咬筋に対する形態学的変化を確認するために、咬筋重量測定を行った後、凍結切片を作製し、HE染色を施し、光学顕微鏡で筋繊維形態の確認を行い、筋繊維断面積を画像ソフトウェア(Image J)を用いて計測した。

(3)マウス咬筋内でのMst-siRNAによるマイオスタチン抑制効果を確認するために、mRNA抽出を行い、リアルタイムPCR法にてマイオスタチン mRNA を定量した。

(4)マイオスタチン抑制前後でのマウスの骨格筋の張力に変化があるかどうかを確認するために、全身投与を行ったマウスに対して、前脛骨筋を取り出し、筋張力測定を行った。

(5)マイオスタチン抑制前後でのマウス咬筋の筋電図おける変化を確認するために、マウス咬筋に対する終日筋電図測定を行った。ここでは、マウス咬筋の左右に筋電図測定のための電極を埋め込み、1週間の待機期間を経た後、4日間連続して終日咬筋活動を測定した。その後一度測定停止し、それと同時に、左側咬筋にMst-siRNA/ATCOLを局所投与した。投与1週間目と2週間目を含んだ前後4日間連続して咬筋活動を測定し、全測定終了後、咬筋を取り出す際に、電極が正常な位置に固定されていることを確認した。

4. 研究成果

(1) マウス咬筋への Mst-siRNA/ATCOL 局所投与による RNAi 効果

(a) 野生型マウス (C3H マウス) 咬筋に対する RNAi 効果

咬筋重量については、対照側と比較すると Mst-siRNA/ATCOL の投与側で、有意に大きい値を示した。また、咬筋内の Mst-mRNA 発現量は対照側と比較して投与側が有意に小さい値を示した。咬筋の横断面凍結切片を作製し、HE 染色像にて確認すると各筋線維の断面は対照側と比較して投与側で肥大しており、その断面積の平均値の比較を行ったところ、投与側で有意に大きい値を示した。

(b) 筋ジストロフィーマウス (mCAV-3Tg マウス) 咬筋に対する RNAi 効果

咬筋重量については、対照側と比較すると Mst-siRNA/ATCOL の投与側で、有意に大きい値を示した。また、咬筋内の Mst-mRNA 発現量は対照側と比較して投与側が有意に小さい値を示した。咬筋の横断面凍結切片を作製し、HE 染色像にて確認すると各筋線維の断面は対照側と比較して投与側で肥大しており、その断面積の平均値の比較を行ったところ、投与側で有意に大きい値を示した。また、凍結切片の蛍光免疫染色像では対照側と比較して投与側での Mst 発現の抑制を認めた。

(2) マウス咬筋への Mst-siRNA/ATCOL 局所投与が咬筋の終日筋活動に及ぼす影響

(a) 野生型マウス (C3H マウス) 咬筋の終日筋活動

Peak-activity をもとに設定した活動レベルごとの終日 duty time は、Mst-siRNA/ATCOL 投与前、投与後 1 週間、投与後 2 週間での測定結果に大きな変化は認められなかった。一般的に安静時を示す、5%レベル、食事や嚙下などの活動時を示す 20%レベル、50%レベルでの duty time を比較した場合、実験期間を通して Mst-siRNA/ATCOL 投与による影響は認められなかった。

(b) 筋ジストロフィーマウス (mCAV-3Tg マウス) 咬筋の終日筋活動

野生型マウスとは異なり、mCAV-3Tg マウス咬筋終日筋活動を測定した結果、duty time は Mst-siRNA/ATCOL 投与前と投与後 1 週間、2 週間の間に変化が認められた。5%レベルでの duty time は投与前と比較して投与 1 週間後、2 週間後では有意に増加した。20%レベル、50%レベルでは 5%レベルと同様に増加傾向が見られたが、有意差は認められなかった。

(3) マウス眼窩下静脈からの Mst-siRNA/ATCOL 全身投与による RNAi 効果

(a) Mst-siRNA/ATCOL 全身投与がマウス咬筋、大腿筋に及ぼす影響

野生型マウス (C3H マウス) および筋ジストロフィーマウス (mCAV-3Tg マウス) は、対照群、投与群ともに投与前後の体重と握力には有意な差は認められなかった。一方、咬筋、大腿筋の筋繊維断面 HE 染色像より、両マウスともに投与群での筋線維の肥大と、筋線維間脂肪組織の減少を確認した。

(b) Mst-siRNA/ATCOL 全身投与が前脛骨筋張力も及ぼす影響

野生型マウス (C3H マウス) では対照群と投与群に筋張力の強さの有意差は認められなかった。一方、筋ジストロフィーマウス (mCAV-3Tg マウス) では対照群と比較して投与群の筋張力が有意に強くなっていた。mCAV-3Tg マウスの投与群の前脛骨筋の筋張力は、C3H マウスの対照群の筋張力の約 60% まで回復していた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kawakami E, Kinouchi N, et al., Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice, 査読有, Dev Growth Differ, 2011, 53(1)48-54. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01221.x.

② Adachi T, Kawakami E, et al., Delivery of small interfering RNA with a synthetic collagen poly (Pro-Hyp-Gly) for gene silencing in vitro and in vivo, Development Growth and Differentiation, 査読有, Dev Growth Differ, 2010, 52(8)693-699. doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01206.x.

[学会発表] (計 1 件)

① 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担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, 平成 22 年 9 月 27-29 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

[図書] (計 1 件)

① 川上恵実, 他, 生体の科学「マイオスタチンの発現抑制による治療」, 医学書院, 2011, 146-150

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 恵実 (KAWAKAMI EMI)

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：20579958