
学位論文

マイオスタチンに対する RNA 干渉法による骨格筋形成の調節

木内 奈央

キーワード：マイオスタチン, RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi)
short interference RNA (siRNA), 筋芽細胞, 骨格筋

Regulation of Skeletal Muscle by RNA Interference for Myostatin

Nao KINOUCHI

Abstract : Skeletal muscle is one of the most important morpho-functional organs, and its atrophy causes severe conditions such as muscular dystrophies. In the craniofacial region, skeletal deformities and malocclusion are often caused by hyper- and hypotrophy of masticatory muscles or the tongue. Recently, RNA interference (RNAi)-based gene therapy has been expected as a safe remedy without side effects; therefore, we used RNAi to control the expression of myostatin, a negative regulator of skeletal muscle formation, for the purpose of developing a new method to regulate skeletal muscle volume in this study. We constructed a plasmid vector containing the full-length of myostatin cDNA (pcDNA3.1-Mst-myc) and a vector for silencing mRNA for either myostatin (pSi-Mst) or green fluorescence protein (GFP) sequence as a negative control (pSi-N). When these vectors were transiently co-transfected in COS-1 cells, the myostatin expression level was notably reduced. For better understanding of the effect of gene silencing by pSi-Mst on mouse myoblastic cells, we generated stable transfectants overexpressing pcDNA3.1-Mst-myc in mouse myoblast cell line C2C12. The proliferation ability in C2C12 cells overexpressing myostatin was accelerated by transfection with pSi-Mst, but not with pSi-N. Furthermore, the myogenic differentiation of C2C12 cells overexpressing myostatin, transfected with pSi-Mst, showed a higher expression of MyoD and myogenin than control cells transfected with pSi-N. In addition, they exhibited slight acceleration of myotube formation and a slight increase in myosin heavy chain (MHC) expression. Finally, to investigate the effect of synthetic 19 nucleotide-long double-stranded RNA (Mst-siRNA) *in vivo*, we injected Mst-siRNA/atelocollagen complex into the masseter and biceps femoris muscles in four mice. After two weeks, myostatin protein levels in those muscles were significantly decreased, but not in the contralateral muscles. Moreover, dramatically increased muscle mass and myofibril size were observed following myostatin down-regulation. These results suggest that it may be possible to regulate skeletal muscle volume and to develop a new treatment for various muscle disorders by RNAi technique.

緒 言

近年、細胞内の標的遺伝子 mRNA (messenger RNA) の発現を特異的に抑制する RNA 干渉法 (RNA interference: 以下 RNAi と略す) が発見され¹⁾、種々の遺伝子機能の解析に用いられるようになってきている。RNAi は 19~21塩基の small interfering RNA (以下 siRNA と略す) 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の発現が抑制される現象である^{2,4)}。この二本鎖 RNA を用いた RNAi 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ている。また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、迅速かつ高効率なプロセスで治療法開発を実現することが可能になると予測されることから、この現象を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^{5,6)}。

骨格筋は人体を構成する諸器官の中でも極めて重要な要素であり、成長発育のみならず種々の病態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 (後天性免疫不全症候群) などに伴う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、幼少年期においては二次的に成長の歪みを惹起し、これが原因となって身体構造の形態的不均衡を招来する可能性がある。顎口腔領域においても、咀嚼筋や舌筋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から、口腔周囲筋の機能が成長過程に大きな影響を与え、形態形成の一翼を担うと考えられる⁷⁾。例えば、下顎骨の成長には咀嚼筋が深く関与するため、咬筋の機能が低下することで下顎角の開大が生じ、逆に機能が亢進すると下顎角の狭小が生ずると報告されている⁸⁾。また、巨大舌を伴う先天異常である Beckwith-Wiedemann 症候群では、しばしば重度の開咬を併発することが報告されている⁹⁾。しかしながら、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。

骨格筋の発生は、筋肉の前駆細胞である筋芽細胞 (myoblast) が分裂・増殖を繰り返し、次いでそれらが互いに融合して多核の筋管 (myotube) に分化した後、やがて肥大化して筋線維 (muscle fiber) を形成することが知られている。この過程はさまざまな成長因子や転写因子のクロストークによって制御されており^{10,11)}、特に transforming growth factor- β (TGF- β)、インスリン様成長因子 (IGF: insulin-like growth factor) などがその中心的役割を担うと考えられている^{12,13)}。

マイオスタチン (別名 growth differentiation factor 8: GDF8) 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、本遺伝子を欠失したノックアウトマウスでは骨格筋量が野生型同腹仔の 2~3 倍にまで増大することが報告されて

以来、骨格筋形成の抑制遺伝子として一躍注目されるようになった¹⁴⁾。骨格筋過形成を示す家畜牛 Piedmontese (マイオスタチン遺伝子の 1056 番目のグアニンがアデニンに点突然変異した結果、マイオスタチンタンパク成熟領域内 313 番目のシステインがチロシンへと置換) や Belgian Blue (マイオスタチン遺伝子の 937 番目から 947 番目の 11 塩基欠失によるフレームシフトで、マイオスタチンタンパク成熟領域が欠失) の報告からも¹⁵⁻¹⁷⁾、マイオスタチンが骨格筋形成の抑制遺伝子であることが強く示唆された。また近年、ヒトではマイオスタチンの突然変異をきたした男児の大腿および上腕の骨格筋に肥大が生じたことが報告されている¹⁸⁾。

一方、筋細胞の増殖・分化過程においては、主に筋分化制御因子である MyoD ファミリーに属する遺伝子 (MyoD, myogenin, Myf5 および MRF4) が各段階に応じて発現し機能することが知られている^{19,20)}。MyoD ファミリーは bHLH (basic helix-loop-helix) 構造をもつ転写調節因子であり、さまざまな筋特異的遺伝子の転写調節領域に直接結合することにより転写を活性化させる^{21,22)}。マイオスタチンは、細胞膜上のセリン/スレオニンキナーゼ型レセプターである I 型 (ALK5) および II 型 (ActR II B) レセプターを活性化し、シグナル伝達分子である Smad3 を介して MyoD の作用を阻害するため、筋分化を抑制することが明らかとなっている²³⁻²⁷⁾。また別のシグナル伝達経路として、マイオスタチンは細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現を特異的に誘導するため、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk2) の発現抑制と活性阻害を惹起し、さらに細胞増殖の調節因子である pRb の低リン酸化を生じさせ、細胞周期の G1 期での停止により筋芽細胞増殖を抑制することが報告されている²⁸⁻³¹⁾。

このように、生体における骨格筋量制御のメカニズムも分子レベルで解明されており、筋ジストロフィーを始めとした全身性筋疾患のみならず、顎口腔系の筋機能異常に対してもこれら知見に基づいた新しい治療法の開発が望まれている。そこで本研究では、筋形成の新たな制御方法の検索を目的として、骨格筋形成の抑制遺伝子であるマイオスタチンを標的遺伝子とした RNAi が、マウス筋芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を解析するとともに、個体レベルでの骨格筋量調節への有効性について検討した。

実験材料および実験方法

1. 細胞培養法

サル腎臓由来細胞株 COS-1 細胞の培養には、10% ウシ胎仔血清 (以下 FBS と略す) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium: 以下 DMEM と略す, Sigma Chemical Co.) を使用し、マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞の培養には、20% FBS 含有 DMEM

(growth medium: 以下 GM と略す) を使用した。また筋芽細胞の分化誘導には、2% ウマ血清 (以下 HS と略す) (GIBCO, Invitrogen, California, U.S.A.) 含有 DMEM を培養液 (Differentiation medium: 以下 DM と略す) として用いた。いずれの培養細胞も、空气中に 5% の炭酸ガスを含むよう調整した培養器中で 37°C にて培養した。細胞の継代は、Ca²⁺ と Mg²⁺ を含まない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6, phosphate buffered saline: 以下 PBS(-) と略す) で調整したトリプシン/EDTA で細胞を 37°C で 5 分間処理することにより行った。

2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

培養細胞を PBS(-) で 3 回洗浄後、ISOGEN (日本ジーン, 東京) により添付プロトコールにしたがって全 RNA を抽出した。Complementary DNA (以下 cDNA と略す) の合成は、RNA PCR kit (宝酒造, 草津) により行った。すなわち、1 µg の全 RNA を用い、5 mM MgCl₂, 10× RNA PCR buffer, 1 mM dNTP mixture, 1 U/µl RNase inhibitor, 2.5 µM random 9 mers, 0.25 U/µl reverse transcriptase を加え、50°C, 30 分間逆転写反応させた後、99°C, 5 分間加熱して反応を停止し、cDNA を得た。なお、試薬の調整はすべてジエチルピロカーボネイト (和光純薬, 大阪) 処理滅菌水で行った。得られた cDNA を含む溶液 1 µl, 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mixture, 25 U/ml Taq polymerase および表 1 に示す各特異的プライマー対を用い、至適条件下にてサーマルサイクラー (宝酒造) で反応、増幅させた。内部標準遺伝子としては β-actin を用いた。反応生成物はエチジウムブロマイド (和光純薬) を添加した 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後、3UVTM トランスイルミネーター (Funakoshi Inc., 東京) を用いて検出し、ポラロイドカメラにて撮影した。

3. マイオスタチン発現ベクターの作製およびマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株の樹立

マウスマイオスタチン全長 cDNA の 5' および 3' 末端にそれぞれ BamH I および Apa I サイトを付与するため、forward ならびに reverse プライマーを用いて PCR を行い、増幅した DNA 断片を pcDNA3.1-myc/His A vector (Invitrogen) の BamH I/Apa I サイトに組み込んでマイオスタチン発現ベクター (pcDNA3.1-Mst-myc) を作製した。発現ベクターに組み込んだプラスミドについては、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems Inc., U.S.A.) を用いて塩基配列の確認を行った。

100 mm デイッシュ (Corning Inc., U.S.A.) に 1 × 10⁶ 個の C2C12 細胞を播種し、24 時間後、活性型デンドリマーを利用した Superfect Transfection Reagent (QIAGEN Inc. Valencia, CA, U.S.A.) を用いて 10 µg の pcDNA3.1-Mst-myc を導入し、G418 (500 µg/ml) (Sigma Chemical

表 1 PCR 解析に用いたプライマー対の塩基配列および PCR の反応条件

Gene sequence mRNA	Oligonucleotide sequence	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
mouse myostatin	5'-CAGCCTGAATCCAACCTTAGG-3' 5'-TCGCAGTCAAGCCCAAAGTC-3'	167	58
MyoD	5'-GATGGCATGATGGATTACAGC-3' 5'-GACTATGTCCTTCTTTGGGG-3'	528	64
myogenin	5'-GCTCAGCTCCCTCAACCAAG-3' 5'-ATGTGAATGGGGAGTGGGA-3'	424	64
p21	5'-AATCCTGGTGTGTCGGACCTG-3' 5'-TCCGTGACGAAGTCAAAGTCC-3'	158	64
β-actin	5'-TTCCTTGCAGCTCCTCGTTGCCG-3' 5'-TGGATGGCTACGTACATGGCTGGG-3'	458	60

Co.) 存在下で 20% FBS 含有 DMEM にて約 2 週間培養後、出現したクローンを単離した。単離した細胞は、500 µg/ml G418 を添加した培地で維持した。また、得られたマイオスタチン導入細胞における遺伝子の発現は、ウェスタンブロット法にて確認を行った。

マイオスタチン cDNA 増幅用プライマーの塩基配列:
forward; 5'-CGGGATCCATGATGCAAAAAGTCAAAATG-3'
reverse; 5'-GAAGGGCCCTGAGCACCCACAGCGGTCTACTACCAT-3'
下線は制限酵素部位を示す。

4. siRNA 発現ベクターの作製および導入法

60 mm 培養皿 (イワキ株式会社, 東京) に 5 × 10⁵ 個の COS-1 細胞を播種し、24 時間後コントロールベクター (pcDNA3.1-myc/His A vector), マイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-Mst) あるいはネガティブコントロールとして Ambion 社の green fluorescence protein (GFP) 特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-N) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、それぞれ pcDNA3.1-Mst-myc と同時に導入した。pSi-Mst は、マウスマイオスタチン mRNA の開始コドンから 325 番目からの 19 塩基 5'-GAUGACGAUUAUCACGCUA-3' を選択し、センス鎖とアンチセンス鎖の間に 9 塩基のループ 5'-TTCAAGAGA-3' を付与して pSilencer 2.1-U6 neo (Ambion Inc., U.S.A.) の BamH I/Hind III サイトに組み込んで作製した。

同様に、60 mm 培養皿に 5 × 10⁵ 個の樹立したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株を播種し、24 時間後 pSi-Mst あるいは pSi-N を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。

5. ウェスタンブロット法

培養細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、200 µl RIPA buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mg/ml aprotinin, 50 mg/ml leupeptin, 1 mM

phenylmethanesulfonyl fluoride) を用いて氷上にてタンパク質抽出を行い、微量高速冷却遠心機 (トミー精工, 東京) で遠心分離し、得られた上清を試料とした。Nanodrop N10-1000 (NanoDrop Technologies, DE, U.S.A.) を用いて抽出タンパク質の濃度を測定した後、各タンパク質 40 μ g 等量をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略す) にて展開し、ポリビニリデンジフルオライド膜 (QIAGEN Inc.) (以下 PVDF 膜と略す) に転写後、5% (W/V) スキムミルク、1% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA, Sigma Chemical Co.) および 0.05% TritonX-100 含有 PBS (以下 PBS/T と略す) でブロッキングした後、一次抗体として 1,000 倍希釈した抗 myc 抗体 (9B11: Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, U.S.A.), 500 倍希釈した抗 MyoD ポリクローナル抗体 (C-20: sc-304, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.), 500 倍希釈した抗 pRb ポリクローナル抗体 (Ser795: sc-7986, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 500 倍希釈した抗 p53 モノクローナル抗体 (DO-1: sc-126, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用い反応させた。PVDF 膜を洗浄後、10,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG, またはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を室温で 1 時間反応させた。PVDF 膜を PBS/T で洗浄した後、ECL-plus kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて化学発色法にてバンドの検出を行った。

6. 細胞増殖能の測定

60 mm 培養皿 (イワキ株式会社) に 5×10^5 個の C2C12 細胞およびマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株を播種し、24 時間後マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株に pSi-Mst あるいは pSi-N を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。導入を行った日を 0 日目として 1, 2, 3 日目に各細胞を回収し、コールターカウンター (Beckman Coulter Inc., U.S.A.) にて細胞数を測定した。

7. 蛍光免疫染色法

C2C12 細胞および樹立したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株をガラスボトムチャンパー (MatTec Corporation, Ashland, MA, U.S.A.) に播種し、約 80% コンフルエントの時点でマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株に pSi-Mst および pSi-N をそれぞれ導入した。導入から 24 時間後、細胞を PBS (-) で洗浄し、新鮮な 4% パラホルムアルデヒド/PBS にて室温で 10 分間固定した後、0.2% Triton X-100/PBS にて室温で 20 分間膜透過処理を行った。抗体の非特異的な結合の阻止のため、5% BSA にて 1 時間室温で処理した後、1,000 倍希釈した抗 myc 抗体 (9B11: Cell Signaling Technology) および抗 myosin heavy chain (MHC) 抗体 (Sigma Chemical Co.)

を一次抗体として用い、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体としてローダミンレッド標識抗マウス IgG 抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Medical & Biological Laboratories Co., LTD) を用い、室温で 30 分間反応させ、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) にて観察した。

8. 実験動物およびマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA の導入

20 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウス (日本クレア社, 東京) を試料として用い、ネンブタール® (25mg/kg i.p. 大日本製薬, 大阪) 麻酔後、左側咬筋および大腿二頭筋に 10 μ M のマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) とアテロコラーゲン (AteloGene™: 高研, 東京) を混合し、筋肉注射を行った。また、同一個体の右側部位にはアテロコラーゲンのみを導入し、対照群として用いた。導入から 2 週間後に各筋組織を採取し、種々の解析を行った。

9. 骨格筋の解析

1) 骨格筋の重量測定

20 週齢マウスの咬筋および大腿二頭筋を採取し、対照群 (アテロコラーゲンのみを導入) と Mst-siRNA 導入群 (Mst-siRNA とアテロコラーゲンを混合して導入) においてそれぞれの骨格筋重量を、上皿自動天秤 (LIBROR, 島津製作所, 京都) を用いて測定した。

2) 骨格筋の組織学的解析

マウスの各咬筋は、4% パラホルムアルデヒド/PBS にて 4°C で一晩固定した。その後エタノールで脱水、キシレンで脱脂後、パラフィン (融点 56°C, Oxford Labware, St. Louis, MO, U.S.A.) にて包埋し、組織学的検索のために筋組織の最大直径部において厚さ 5 μ m の横断切片を作製した。横断切片は、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色と略す) により観察した。横断面の筋線維直径幅は画像ソフトウェア NIH image (NIH, U.S.A.) を用いて解析した。

10. 統計処理

細胞増殖反応および骨格筋の解析におけるデータは、平均 \pm S.D. で表示し、Student's t-test により有意差検定を行った。

結 果

1. マイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-Mst) によるマイオスタチン発現の抑制効果の検討

マイオスタチン発現ベクター (pcDNA3.1-Mst-myc) および pSi-Mst を構築した (図 1)。これら発現ベクターを COS-1 細胞に一過性に強制発現させ、導入後 2 日目に融合タンパク質の発現を抗 myc 抗体によるウェスタンブロット法により解析を行った。その結果、

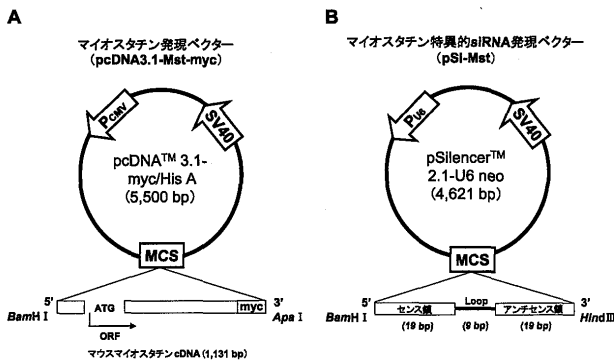


図1 マイオスタチン発現ベクター (pcDNA3.1-Mst-myc) およびマイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-Mst) の構造
 (A) pcDNA3.1-Mst-myc の構造。Cytomegalovirus (CMV) promoter によって誘導される発現ベクター (pcDNA3.1-myc/His A) の BamHI/Apa I サイトにマウスマイオスタチン全長 cDNA を組み込んで作製した。(B) pSi-Mst の構造。それぞれ19塩基からなるセンス鎖とアンチセンス鎖の間に9塩基のループを付与し、U6 promoter によって誘導される発現ベクター (pSilencer 2.1-U6 neo vector) の BamHI/Hind III サイトに組み込んで作製した。

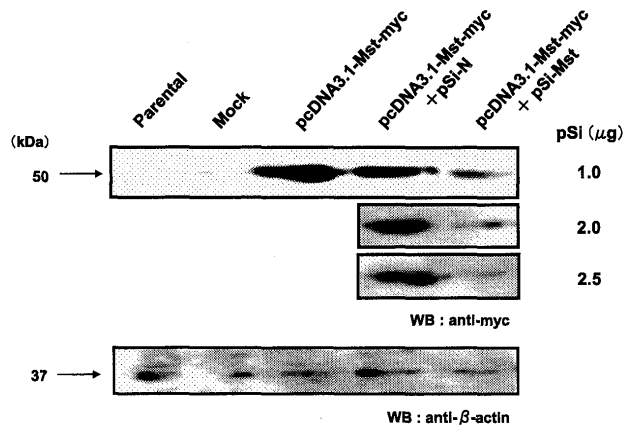


図2 COS-1 細胞における pSi-Mst によるマイオスタチン発現の抑制効果
 空ベクター (MOCK), pcDNA3.1-Mst-myc, ネガティブコントロールの siRNA 発現ベクター (pSi-N) および pSi-Mst を, COS-1 細胞に一過性に強制発現させた後, 融合タンパク質の発現を抗 myc 抗体を用いたウェスタンブロット法にて確認した。pcDNA3.1-Mst-myc のみを導入した細胞と比較して, pSi-N を導入した細胞ではマイオスタチンタンパク質の発現に変化は認められなかったが, pSi-Mst を導入した細胞では発現が有意に抑制されていた。

pcDNA3.1-Mst-myc のみを導入した細胞と比較して, ネガティブコントロールの GFP 特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-N) を導入した細胞ではマイオスタチンタンパク質の発現に変化は認められなかったが, pSi-Mst を導入した細胞ではその発現が有意に抑制されていた。また, 導入 siRNA 発現ベクター量を 1.0, 2.0, 2.5 μg で検討したところ, その抑制効果は 1.0 μg の pSi-Mst 導入でも認められた (図2)。

2. マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株の分離と同等 pSi-Mst は, 過去の報告からマウス線維芽細胞由来 C3H10T1/2 細胞においてマイオスタチンの発現を特異的に抑制することが確認されているが³²⁾, 筋芽細胞におけるマイオスタチンの発現抑制効果は未だ確認されていない。したがって, 構築した pSi-Mst が筋芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響をより詳細に検討するために, pcDNA3.1-Mst-myc を C2C12 細胞に強制発現させ, G418 による耐性株の薬剤選択にてマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株の樹立を行った。RT-PCR 法によりベクター mRNA の発現をスクリーニングした後, 抗 myc 抗体を用いたウェスタンブロット法による融合タンパク質の発現を確認したところ, マイオスタチン恒常発現株が 2 クローン得られた (図3)。データは示さないが, クローン間に大きな細胞形態の差は認められなかった。

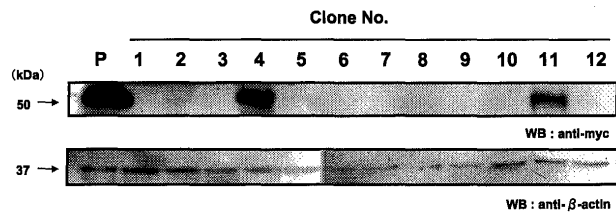


図3 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株の樹立
 C2C12 細胞に pcDNA3.1-Mst-myc を過剰発現させ, G418 薬剤耐性株選択の後, 各クローンにおける融合タンパク質の発現について抗 myc 抗体を用いたウェスタンブロット法にて検索したところ, pcDNA3.1-Mst-myc 恒常発現株 (マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株) が 2 クローン (Clone No. 4 および 11) 得られた。P: ポジティブコントロール, Clone No.1~12: 単離した C2C12 細胞株。

3. マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における pSi-Mst が筋芽細胞の増殖に及ぼす影響

マイオスタチンに対する RNAi が筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため, 樹立したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株に pSi-N および pSi-Mst を導入し, 細胞数測定による細胞増殖能の比較検討を行った。その結果, 遺伝子導入を行っていない親株 C2C12 細胞と比較して, マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および

pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株はともに有意な細胞増殖能の低下を示したが、この現象は pSi-Mst を導入することにより有意に回復する傾向が認められた (図 4)。

次に親株 C2C12 細胞およびマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における細胞増殖能の評価として、細胞周期関連因子である p21 mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて解析した。その結果、親株 C2C12 細胞と比較してマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株ではともに p21 の発現上昇が認められたが、pSi-Mst を導入するとその発現が低下していた (図 5 - A)。また、p21 と同様に細胞周期関連因子である p53 タンパク質の発現および pRb のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析したところ、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株ではともに p53 の発現上昇と pRb の低リン酸化

が認められた。一方、pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では p53 の発現低下と pRb のリン酸化亢進が認められた (図 5 - B)。

4. マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における pSi-Mst が筋芽細胞の分化に及ぼす影響

親株 C2C12 細胞、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株、pSi-N のみ導入あるいは pSi-Mst のみ導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株におけるマイオスタチンに対する RNAi 効果を検討するため、これらの各細胞群を分化誘導培地にて培養し、マイオスタチンの発現を RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。その結果、マイオスタチン恒常発現株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株と比較して、pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では分化誘導 3 日目までマイオスタチンの発現が低下していたが、5 日目ではコントロール群と

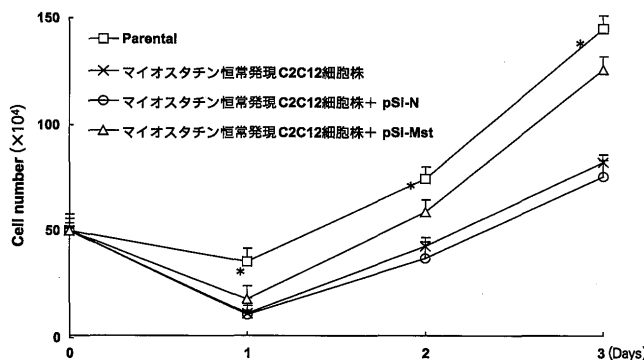
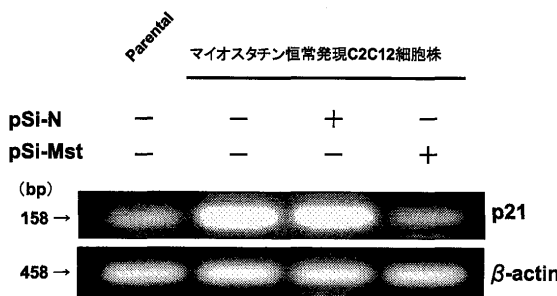


図 4 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株の細胞増殖能に対する pSi-Mst の効果

マイオスタチンに対する RNAi が筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を、細胞数計測による細胞増殖能の比較にて検討した。マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株は、遺伝子導入を行っていない親株 C2C12 細胞 (Parental) と比較して有意な増殖能の低下を示したが、pSi-Mst の導入によりこの増殖能の低下は回復する傾向を示した (*: p < 0.0001, n=3)。

A



B

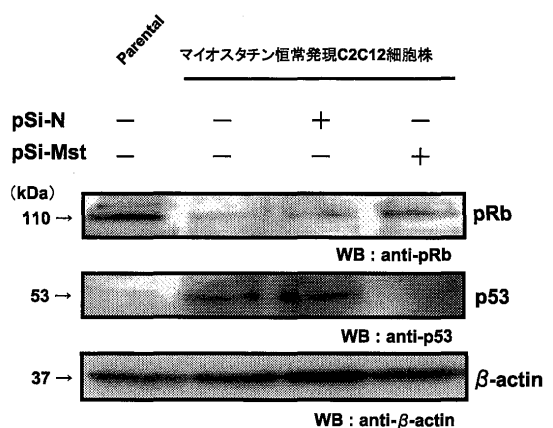


図 5 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における細胞周期関連因子の発現に対する pSi-Mst の効果 (A) RT-PCR 法による p21 遺伝子の発現様相。マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞と比較して、pSi-Mst を導入した細胞では p21 mRNA の発現が低下していた。(B) ウェスタンブロット法による p53 タンパク質の発現および pRb のリン酸化の検索。マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株ではともに p53 の発現上昇と pRb の低リン酸化が認められたが、pSi-Mst を導入すると p53 の発現は低下し、pRb のリン酸化は亢進していた。

ほぼ同程度まで回復する傾向を示した (図 6 - A, B)。分化誘導 1 日目における融合タンパク質の細胞内での局在について抗 myc 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検索したところ、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では核周囲に強く、また細胞質においてもわずかにその発現が認められた。一方、pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では発現が抑制されていた (図 6 - C)。

そこで、マイオスタチンに対する RNAi がこれら筋分化制御因子の発現に及ぼす影響について検討するため、各細胞群を分化誘導培地にて 3 日間培養し、MyoD, myogenin を RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。その結果、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株と比較して、pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では MyoD, myogenin

の有意な発現上昇が認められた (図 7 - A, B)。また、分化誘導培地にて 5 日間培養後 MHC の発現を蛍光免疫染色法にて解析したところ、親株 C2C12 細胞では顕著な発現が認められたのに対して、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では MHC の発現は全く認められなかった。一方、pSi-Mst を導入すると MHC のわずかな発現上昇が認められた (図 7 - C)。

さらに、分化誘導開始 5 日後における細胞形態を位相差顕微鏡にて観察したところ、親株 C2C12 細胞は分化が進むにしたがって多核の筋管を形成したのに対して、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では線維芽細胞様の形態を維持し、筋管形成は認められなかった。一方、pSi-Mst を導入することでわずかな筋管形成の促進が認められた (図 8)。

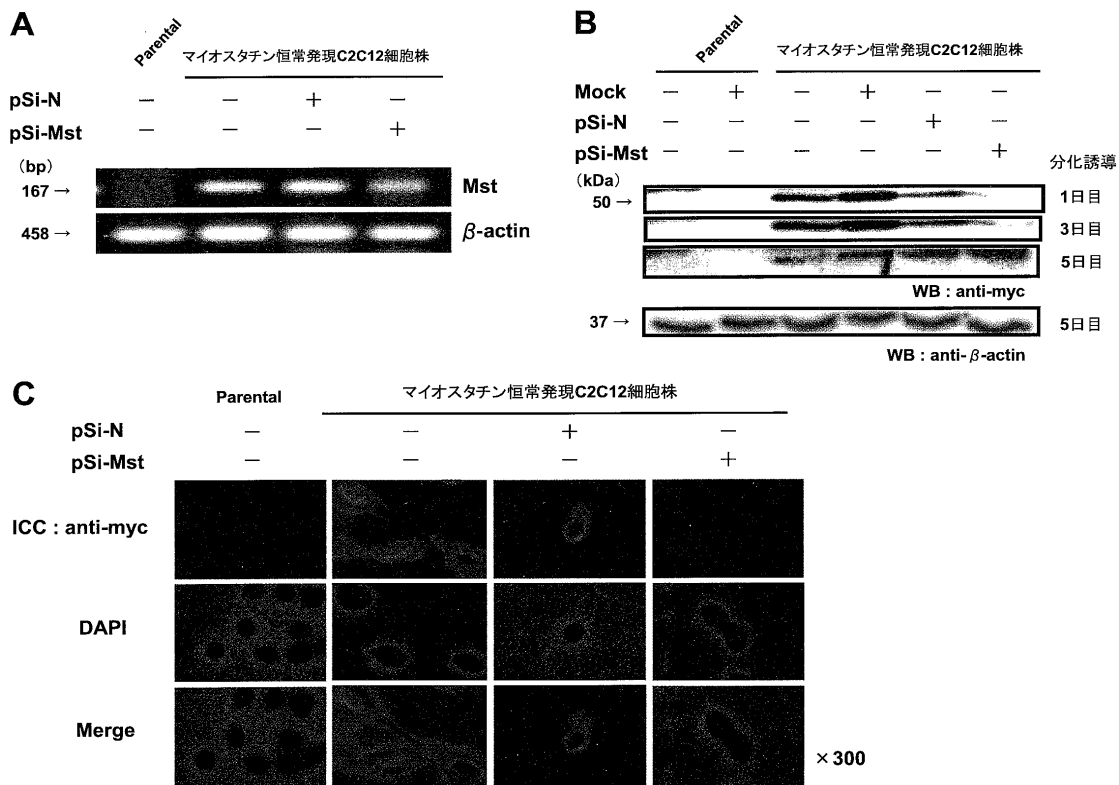


図 6 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における RNAi 効果の検討

(A) RT-PCR 法によるマイオスタチン遺伝子の発現様相。分化誘導開始 3 日目において、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞と比較して、pSi-Mst を導入した細胞ではマイオスタチン mRNA の発現は有意に抑制されていた。(B) pSi-N, pSi-Mst をマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株に導入し、分化誘導培地にて培養後、マイオスタチンの発現を抗 myc 抗体を用いたウェスタンブロット法にて経時的に検索した。pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株では、分化誘導 3 日目までマイオスタチンの発現が低下していたが、5 日目ではコントロール群とほぼ同じレベルまで回復した。(C) 融合タンパク質の細胞内での局在を抗 myc 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検索した。マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞では核周囲に強く、また細胞質においてもわずかにその発現を認めたが、pSi-Mst を導入した細胞では発現は抑制されていた。

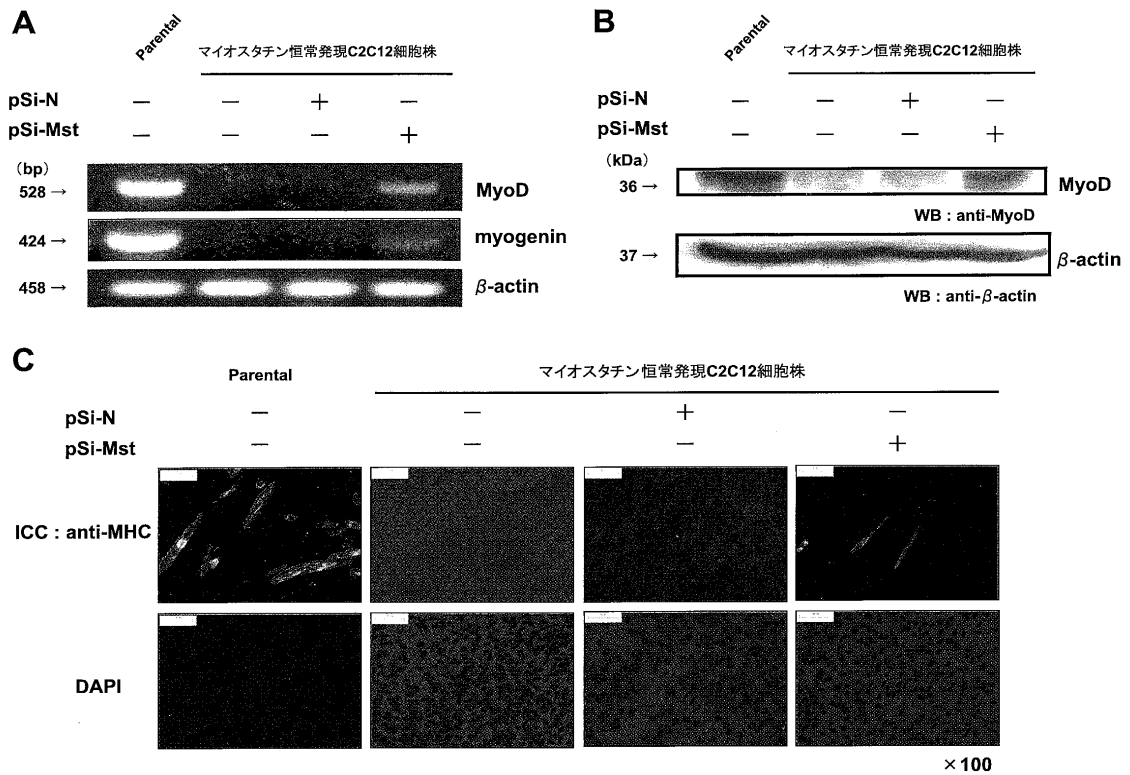


図7 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における筋分化制御因子の発現に対する pSi-Mst の効果 (A) RT-PCR 法による筋分化制御因子の発現様相の検索。分化誘導開始 3 日後において、親株 C2C12 細胞 (Parental) で顕著な MyoD および myogenin mRNA の発現上昇が確認されたが、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞では発現は認められなかった。一方、pSi-Mst を導入すると MyoD および myogenin mRNA の発現はともに上昇していた。(B) 筋分化初期マーカである MyoD の発現について抗 MyoD 抗体を用いたウェスタンブロット法にて検索したところ、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞では MyoD の発現は認められなかったが、pSi-Mst を導入すると MyoD の発現上昇が認められた。(C) 筋分化後期マーカである MHC の発現について抗 MHC 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検索した。分化誘導開始 5 日後において、親株 C2C12 細胞 (Parental) で顕著な MHC の発現が確認されたが、マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株および pSi-N を導入した細胞ではその発現は認められなかった。一方、pSi-Mst を導入すると MHC のわずかな発現上昇が認められた。

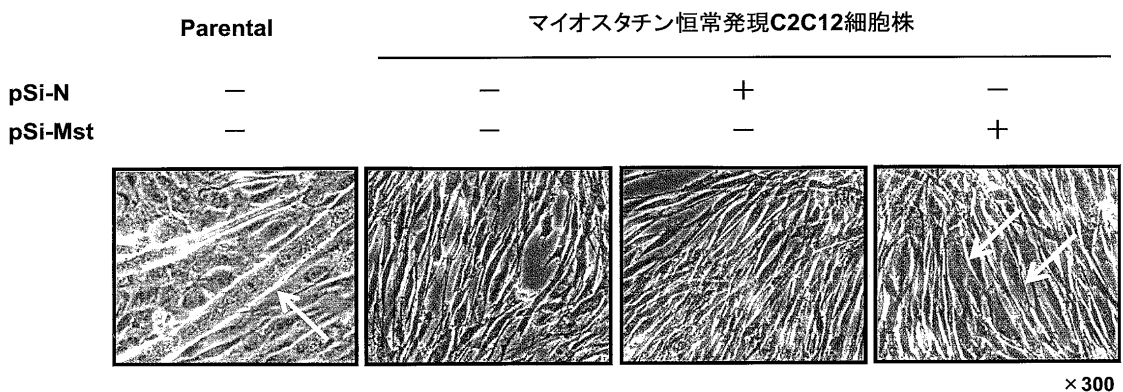


図8 マイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株における筋管形成の抑制に対する pSi-Mst の効果 各発現ベクターをマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株に導入し、分化誘導培地にて 5 日間培養後の細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。親株 C2C12 細胞 (Parental) では多核の筋管が形成された (a) が、この現象はマイオスタチン恒常発現 C2C12 細胞株 (b) および pSi-N を導入した細胞 (c) では認められなかった。一方、pSi-Mst を導入すると筋管を形成する傾向が認められた (d)。矢印は筋管を示す。

5. マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) がマウス骨格筋に及ぼす影響

Mst-siRNA がマウス骨格筋形成に及ぼす影響を検討するため、20週齢のマウス左側咬筋および大腿二頭筋に Mst-siRNA とアテロコラーゲンを混合して筋肉注射を行った。マウス咬筋におけるマイオスタチンの発現をウェスタンブロット法にて解析したところ、アテロコラーゲンのみを導入した同一個体の右側部位 (以下対照群と略す) と比較して、Mst-siRNA を導入した咬筋では顕著なマイオスタチンの発現抑制が認められた (図9)。また、マウスの骨格筋を形態組織学的に比較したところ、対照群に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋および大腿二頭筋では明らかな骨格筋増大が観察された (図10-A)。骨格筋重量を比較するため、咬筋および大腿二頭筋を採取しそれぞれの重量を測定したところ、Mst-siRNA を導入した骨格筋では対照群に比べいずれも重量の増加が認められた (図10-B)。

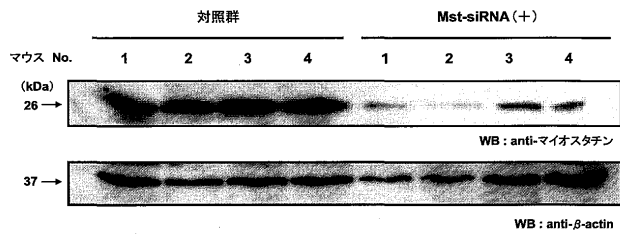


図9 マウス咬筋におけるマイオスタチン発現に対するマイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) の効果

Mst-siRNA をマウス咬筋に導入し、2週間後マイオスタチンの発現について抗マイオスタチン抗体を用いたウェスタンブロット法にて検索した。Mst-siRNA を導入していない咬筋 (対照群) と比較して、Mst-siRNA を導入した咬筋では顕著なマイオスタチンの発現抑制が認められた。

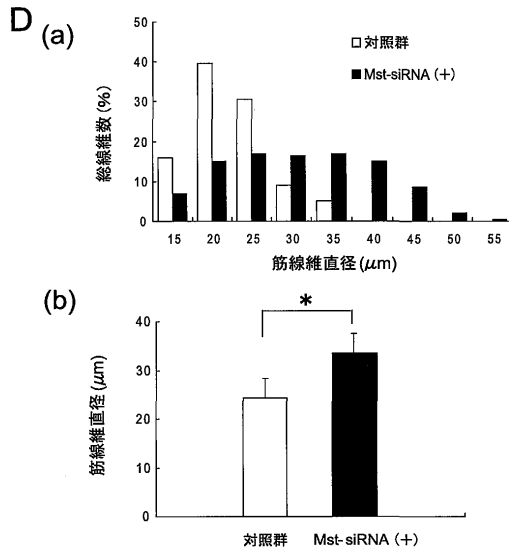
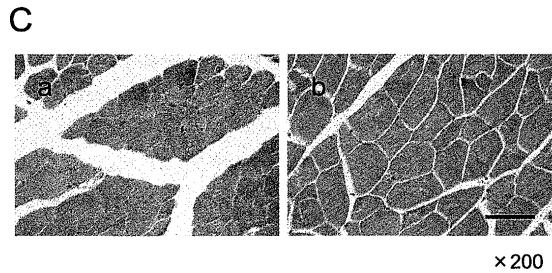
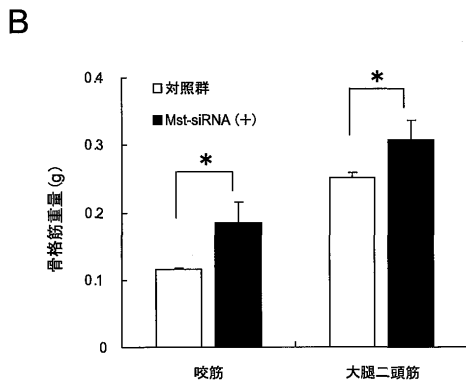
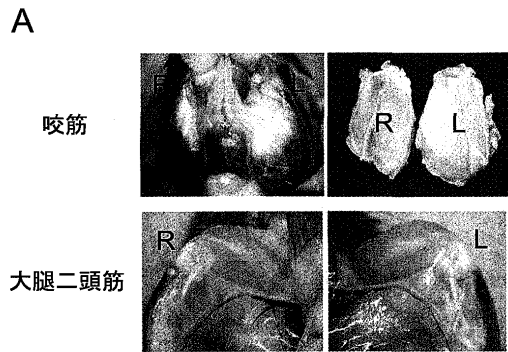


図10 マウス骨格筋の形態および組織学的解析

(A) マウス骨格筋の肉眼的所見。Mst-siRNA を導入していない右側咬筋および大腿二頭筋 (対照群) と比較して、Mst-siRNA を導入した左側同部位では顕著な骨格筋増大が認められた。(B) マウス骨格筋の重量測定。Mst-siRNA を導入した咬筋および大腿二頭筋の骨格筋重量は、対照群に比べいずれも有意に増加していた (*: $p < 0.05$, $n=4$)。 (C) 咬筋横断面の HE 染色像。対照群 (a) に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋 (b) の最大直径部における筋線維は、明らかに肥大傾向を示した (Bar: $50 \mu\text{m}$)。 (D) 咬筋の筋線維直径の計測。(a) 各筋線維直径の分布様相。Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維直径は、対照群に比べ $15 \sim 55 \mu\text{m}$ の広範囲に分布していた。グラフは、総筋線維数に対して各直径に分布する筋線維数を % 表示したものである ($n=200$)。 (b) 各筋線維直径の平均値。Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維 ($33.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$) は、対照群 ($24.4 \pm 1.1 \mu\text{m}$) に比べて約1.3倍増加していた (*: $p < 0.0001$, $n=4$)。

次に、この Mst-siRNA 導入による骨格筋量増大のメカニズムについて詳細に検討するため、咬筋の最大直径部における横断切片を作製した。骨格筋は、筋管の成熟体である筋線維が束となって筋線維束という一つの単位を形成し、さらにこの筋線維束が多数集まることによって構成されている。対照群に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋の各筋線維は肥大傾向を示した (図10-C)。さらに、NIH image を用いて各筋線維の直径を測定・定量化し、その分布と平均値について比較検討を行ったところ、Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維 ($33.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$) は対照群 ($24.4 \pm 1.1 \mu\text{m}$) に比べ約1.3倍増加していた (図10-D)。

考 察

RNA 干渉法 (RNA interference : RNAi) は、A. Fire と C. Mello らにより1998年に線虫を用いた実験で初めて見いだされた2本鎖 RNA によって引き起こされる遺伝子配列特異的な発現抑制の現象であり^{1,4)}、近年臨床応用への期待が高まりつつある^{5,6)}。また、この RNAi を遺伝子医薬として応用する利点として、標的遺伝子とは無関係の遺伝子発現に影響を及ぼすことのない高い選択性が挙げられる。

骨格筋形成に関する研究が進められる中、Artaza らは、骨格筋形成の抑制遺伝子であるマイオスタチン特異的な siRNA 発現ベクターの作製を行い、マウス胎仔線維芽細胞由来 C3H10T1/2 細胞において、マイオスタチンの発現を効果的に抑制することを報告している³²⁾。本研究では、マイオスタチン発現ベクター (pcDNA3.1-Mst-myc) およびマイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクター (pSi-Mst) を作製し、これらのベクターをサル腎臓由来細胞株 COS-1 細胞に一過性に発現させて、マイオスタチン遺伝子に対する RNAi の有効性を検討した。pcDNA3.1-Mst-myc のみ、あるいはネガティブコントロールの siRNA 発現ベクター (pSi-N) を pcDNA3.1-Mst-myc と同時に導入した細胞と比較して、pSi-Mst を導入した細胞では顕著なマイオスタチン発現レベルの低下が認められた。すなわち、今回実験に用いた19bp の pSi-Mst は、マイオスタチン遺伝子特異的にその発現を抑制したと考えられる。

骨格筋は、骨、軟骨、神経、靭帯等とともに生体の運動機能や姿勢の制御を司る重要な器官である。また、筋組織が損傷を受けると、静止期にある筋衛星細胞が直ちに活性化され、筋芽細胞 (myoblast) への分化が開始して損傷した筋線維に向かって遊走するといった再生能力の高い組織であることも知られている³³⁻³⁵⁾。マイオスタチンもこのプロセスを制御する負の調節因子であり³⁶⁻³⁸⁾、増殖しているマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞をマイオスタチン存在下で培養すると濃度依存的に細胞増殖が抑制されるが、マイオスタチンを除去すると再び増殖し始めることが確認されている²⁹⁾。Thomas らはこ

の現象に着目して、マイオスタチンによる細胞増殖抑制は G1 期から S 期への細胞周期のブロックによることを報告している²⁸⁾。細胞周期に関与する因子の一つに癌抑制遺伝子 p53 が挙げられる。マイオスタチンは、p53 を介してサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現を誘導し、サイクリン依存性キナーゼ (cdk2) の発現抑制と活性阻害を惹起する³⁰⁾。さらに、マイオスタチン処理を行った筋芽細胞では、細胞増殖の調節因子である pRb の低リン酸化が生じており、細胞周期の G1 期の停止によって筋芽細胞増殖を抑制することから、マイオスタチンは細胞周期の調節に関与していることが示されている²⁸⁻³⁰⁾。しかしながら、RNAi によるマイオスタチンの発現抑制効果は筋芽細胞において未だ確認されていない。そこで、マイオスタチンの筋分化に与える影響を検討するためには遺伝子を恒常的かつ安定に発現する筋芽細胞株を得る必要があると考え、本研究では pcDNA3.1-Mst-myc を C2C12 細胞に強制発現させ、マイオスタチン恒常発現株を2クローン樹立した。樹立したマイオスタチン恒常発現株および pSi-N を導入した細胞では、p53、p21 の発現上昇と pRb の低リン酸化が観察され、過去の報告と一致した所見を示した²⁸⁻³⁰⁾。一方、pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現株では、p53、p21 の発現は低下しており pRb のリン酸化は亢進していた。また、マイオスタチン恒常発現株は遺伝子導入を行っていない親株 C2C12 細胞と比較して有意な細胞増殖能の低下を示したが、この現象は pSi-Mst の導入により有意に回復したことから、RNAi によるマイオスタチン遺伝子の発現抑制がそのシグナル強度を減弱させる結果、細胞周期関連因子の発現様相に変化をもたらした細胞増殖が促進されたと考えられる。

TGF- β スーパーファミリーの1つであるマイオスタチンのシグナル伝達には、セリン/スレオニンキナーゼ型レセプターである I 型 (ALK5) および II 型 (ActR II B) レセプターが必須で、シグナル伝達分子である Smad3 を介して筋分化誘導因子である MyoD の作用を阻害することが知られている²³⁻²⁷⁾。筋芽細胞は、未分化間葉系の細胞から成熟した筋管に分化する過程で、おのおのの分化段階に特異的マーカーの遺伝子を順次発現することが明らかとなっている^{19, 20)}。このマーカーの一つである MyoD は未分化間葉系の細胞を筋原性細胞へ決定づける必須の転写因子で、主に筋分化初期に発現することが報告されている^{21, 22)}。MyoD と同様に bHLH 転写因子である myogenin は、筋原性細胞から筋芽細胞への増殖・分化に作用すると考えられており、一方ミオシン重鎖 myosin heavy chain (MHC) は、筋芽細胞が互いに融合して多核の筋管を形成する筋分化後期に発現することが知られている。これらの遺伝子同士が相互に活性化あるいは自己活性化し、一度獲得した筋肉としての形質を維持していると考えられるが^{10, 11, 20-23)}、MyoD、myogenin などの発現レベルは筋分化の数時間から数十時間のタイ

ム・スケールで変化するという過去の報告から^{30, 39, 40)}, 本研究では, RNAi によるマイオスタチン発現抑制効果の持続時間および筋分化制御因子の発現に与える影響を検討した。pSi-Mst を導入したマイオスタチン恒常発現株を分化誘導培地にて 5 日間培養したところ, マイオスタチンの発現は分化誘導 3 日目まで低下していたが 5 日目では回復する傾向を示した。そこで, 分化誘導 3 日目における MyoD, myogenin の発現を検討したところ, マイオスタチン恒常発現株および pSi-N を導入した細胞と比較して, pSi-Mst を導入するとその両者の発現上昇が認められた。さらに, マイオスタチン恒常発現株における筋分化後期のマーカーである MHC の発現および筋管形成の抑制に対する RNAi 効果を検討したところ, 親株 C2C12 細胞では顕著な MHC 発現と多核の筋管形成が認められたのに対し, マイオスタチン恒常発現株および pSi-N を導入した細胞では MHC 発現および筋管形成は全く認められなかった。一方, pSi-Mst を導入するとわずかに MHC の発現上昇と筋管形成を示す傾向が観察された。今回の実験において, pSi-Mst を導入した細胞における MHC 発現量および筋管形成がわずかであった理由としては, RNAi によるマイオスタチン遺伝子の発現抑制効果が経時的に減弱していること, そして細胞内における pSi-Mst のコピー数が低かった可能性が考えられる。これらの結果より, 今回用いた pSi-Mst はその特異的遺伝子の発現抑制作用によって筋芽細胞の増殖のみならず, 分化の制御も可能であることが明らかとなった。したがって, マイオスタチンに対する RNAi は, 骨格筋量の制御に有効な手段となりうる可能性が示唆された。

進行性の筋萎縮と筋力低下を主徴とする筋ジストロフィーは, その原因遺伝子が既に明らかになっているにもかかわらず未だ有効な治療法が確立されていない重篤な遺伝性疾患で, 全身の自律的な活動を制限するだけでなく呼吸障害をきたし死の転帰をとることもある。また, 口腔内においては前歯部の重度の開咬を呈し顎口腔系の機能にも大きな障害をもたらす。日常生活活動の向上・維持といった観点から, これまでに筋疾患, 特にデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する様々な治療法の開発に関する研究が進められ⁴¹⁻⁵¹⁾, 生体における骨格筋量の制御機構が分子レベルで解明されつつある。例えば, 原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子, あるいは本遺伝子の機能領域のみから成るミニジストロフィン遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターに組み込んだ遺伝子治療や⁴⁵⁻⁴⁷⁾, ジストロフィンと類似した構造を有し, 幼若な筋や再生した筋肉にのみ一過性発現する細胞骨格タンパク質であるユートロフィンの発現を増強させる試みなどが挙げられる⁴⁹⁻⁵¹⁾。しかしながら, 効果の持続性や遺伝子の大きさ, 導入効率, 安全性などいくつかの問題点が残されているのが現状である。

過去に我々の研究グループでは, Belgian Blue と同様

のフレームシフト変異によるマイオスタチン点突然変異型トランスジェニックマウスを作製し, このマウスの骨格筋がドミナントネガティブ作用によって明らかに増大することを証明した¹⁹⁾。また, その骨格筋増大の原因は筋線維肥大 (hypertrophy) ではなく, 筋細胞数増加 (hyperplasia) によるものであることを確認している¹⁹⁾。近年, 骨格筋の著しい萎縮を呈する Caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウスに, このマイオスタチン突然変異型トランスジェニックマウスを交配させると筋力の回復を示すマウスが出生することが報告された^{52, 53)}。また他の研究グループにおいて, 筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスにマイオスタチン抗体を投与してその作用を阻害すると, 骨格筋の再生能力が高まり筋萎縮レベルの改善が認められるとの報告がある⁵⁴⁾。これらのことから, マイオスタチンの機能を阻害することによって骨格筋形成の調節が可能となり, 今後さまざまな筋疾患に対する治療として応用される可能性が示唆された⁵⁵⁾。このような背景を踏まえ, 本研究では, マイオスタチンを標的遺伝子とした RNAi がマウス骨格筋に与える影響を検討した。従来, 骨格筋への siRNA の導入法にはエレクトロポレーション⁵⁶⁾ やウイルスベクター⁵⁷⁾ が多く用いられてきたが, 実際の臨床応用を想定した場合, 導入効率が高い反面, 特殊な装置の必要性や病原性, 条件検討やベクターの作製が困難であることなどが問題となる。よってこの問題点を解決するべく, 今回の実験では有害性が少なく, 近年マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する siRNA 導入実験でその有効性が確認されているアテロコラーゲンを担体として用い siRNA の導入を行った⁵⁸⁻⁶⁰⁾。マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) を導入した咬筋では, 顕著なマイオスタチンの発現抑制と骨格筋増大が認められた。さらに, 骨格筋増大のメカニズムについて組織学的解析にて検討したところ, アテロコラーゲンのみを導入した対照群と比較して, Mst-siRNA を導入した咬筋では各筋線維直径の増加が認められた。マウスの筋線維数は胎生期に決定され, 出生後は変化しないことが知られていることから⁶¹⁾, 今回得られた骨格筋増大の所見は hypertrophy が原因であることが示唆される。過去の報告によると, 骨格筋の hypertrophy には筋衛星細胞や成長因子などの相互作用が関連しており³³⁻³⁶⁾, マイオスタチンは骨格筋の再生部位において発現し^{37, 38)}, 筋衛星細胞数の制御に関わると考えられている³⁹⁾。また, 骨格筋はそれ自身がもつ収縮特性などの運動負荷に対して敏感に反応し, 筋量を増すことも知られている⁶²⁾。したがって, Mst-siRNA を導入した骨格筋では, マイオスタチンの発現抑制により筋衛星細胞の自己複製能および細胞増殖の抑制というマイオスタチンの機能が低下した結果, hypertrophy が生じた可能性が考えられる。近年, 核酸医薬, 特に siRNA のデリバリーシステムの開発が進められているが^{63, 64)}, 血中あるいは組織中において siRNA

を安定させることが困難であるため、臨床応用可能なデリバリー方法は未だ完全には確立されていない。また、一般に RNAi 効果は導入後最大約 1 週間程度といわれているが、生体内におけるその詳細についても明らかにされていない。しかしながら、今回の実験では siRNA 導入は 1 回のみであり、2 週間を経過しても骨格筋増大が認められた。これは、siRNA をアテロコラーゲンとの複合体として導入することによって、細胞への取り込み効率が高まるとともに細胞内における siRNA の半減期が延長され、マイオスタチン遺伝子の発現を持続的かつ効果的に抑制したためと考えられる。

本研究により、マイオスタチンに対する RNAi は、筋芽細胞の増殖および分化を促進し、さらにはマウス骨格筋量を増大させたことから、成長因子の発現制御による新たな筋組織の再生促進法として有効な手段となりうる可能性が示唆された。また、より詳細な情報を得るためには、筋ジストロフィー疾患モデルマウスを用いて RNAi 効果の検討を行う必要があると考えられる。今後、このような技術が直接生体に対して応用できる新たな治療法として進歩し、非侵襲的かつ安全に行うことが可能となれば、骨格筋異常を伴う種々の疾患に対する RNAi 創薬の可能性がますます広がるものと期待される。

結 論

筋形成の新たな制御方法の開発のため、骨格筋形成の抑制遺伝子であるマイオスタチンを標的遺伝子とした RNA 干渉法を用いてマウス筋芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を解析するとともに、骨格筋量調節への有効性について検討したところ、以下の結果および結論を得た。

- 1) COS-1 細胞においてマイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクターはマイオスタチン遺伝子の発現を特異的かつ効果的に阻害した。
- 2) 樹立したマイオスタチン恒常発現株は有意な細胞増殖能と筋分化能の低下を示したがマイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクターを導入することによりその両者はともに回復する傾向を示した。
- 3) マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA を導入した咬筋では、対照群と比較してマイオスタチンの発現が有意に抑制されていた。
- 4) マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA を導入した咬筋、大腿二頭筋の骨格筋重量および筋繊維の直径は、対照群と比較してともに有意な増加を示した。

以上の結果よりマイオスタチンに対する RNA 干渉法は、筋芽細胞の増殖や分化、さらに個体レベルでの骨格筋量の調節に有用であったことから、今後種々の筋疾患への治療として応用される可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導と御校

関を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授、本研究の実施に際し終始御指導を賜りました徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門 野地澄晴教授に甚大なる謝意を表します。さらに、御校閲を戴いた口腔分子病態学分野 林良夫教授、分子薬理学分野 吉本勝彦教授に深謝致します。また、本研究の遂行に関して終始御指導と御協力を戴きました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面矯正学分野 泰江章博博士、徳島大学病院矯正歯科 谷本起穂博士ならびに研究の円滑な発展のために数々の御教示と御援助戴いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面矯正学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E and Mello C C: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811 (1998)
- 2) Elbashir S M, Lendeckel W and Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)
- 3) Hammond S M, Bernstein E, Beach D and Hannon G J: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296 (2000)
- 4) Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001)
- 5) Lewis D L, Hagstrom J E, Loomis A G, Wolff J A and Herweijer H: Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-108 (2002)
- 6) Varambally S, Dhanasekaran S M, Zhou M, Barrette T R, Kumar-Sinha C, Sanda M G, Ghosh D, Pienta K J, Sewalt R G, Otte A P, Rubin M A and Chinnaiyan A M: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629 (2002)
- 7) Moss M L and Salentijn L: The primary role of functional matrices in facial growth. *Am J Orthod* 55, 566-577 (1969)
- 8) Ingervall B and Thilander B: Relation between facial morphology and activity of the masticatory muscles. *J Oral Rehabil* 1, 131-147 (1974)
- 9) Miyawaki S, Oya S, Noguchi H and Takano-Yamamoto T: Long-term changes in dentoskeletal pattern in a case with Beckwith-Wiedemann syndrome following tongue

- reduction and orthodontic treatment. *Angle Orthod* 70, 326-331 (2000)
- 10) Arnold H H and Winter B: Muscle differentiation more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev* 8, 539-544 (1998)
 - 11) Molkenkin J D and Olson E N: Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 445-453 (1996)
 - 12) Massague J, Cheifetz S, Endo T and Nadal-Ginard B: Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8206-8210 (1986)
 - 13) Deasy B M, Qu-Peterson Z, Greenberger J S and Huard J: Mechanisms of muscle stem cell expansion with cytokines. *Stem Cells* 20, 50-60 (2002)
 - 14) McPherron A C, Lawler A M and Lee S J: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387, 83-90 (1997)
 - 15) Kambadur R, Sharma M, Smith T P and Bass J J: Mutations in *myostatin* (*GDF8*) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7, 910-916 (1997)
 - 16) McPherron A C and Lee S J: Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12457-12461 (1997)
 - 17) Grobet L, Martin L J, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R and Georges M: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17, 71-74 (1997)
 - 18) Schuelke M, Wagner K R, Stolz L E, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin J F and Lee S J: Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350, 2682-2688 (2004)
 - 19) Nishi M, Yasue A, Nishimatu S, Nohno T, Yamaoka T, Itakura M, Moriyama K, Ohuchi H and Noji S: A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 247-251 (2002)
 - 20) Weintraub H: The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244 (1993)
 - 21) Olson E N and Klein W H: bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 8, 1-8 (1994)
 - 22) Davis R L, Cheng P F, Lassar A B and Weintraub H: The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60, 733-746 (1990)
 - 23) Lassar A B, Davis R L, Wright W E, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D and Weintraub H: Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315 (1991)
 - 24) Massague J: TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791 (1998)
 - 25) Liu D, Black B L and Derynck R: TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15, 2950-2966 (2001)
 - 26) Liu D, Kang J S and Derynck R: TGF- β -activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J* 23, 1557-1566 (2004)
 - 27) Rios R, Carneiro I, Arce V M and Devesa J: Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, 993-999 (2002)
 - 28) Spiller M P, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn J K, Bass J J and Sharma M: The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 22, 7066-7082 (2002)
 - 29) Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R: Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275, 40235-40243 (2000)
 - 30) Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S and Kambadur R: Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277, 49831-49840 (2002)
 - 31) Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B and Cabello G: Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 286, 263-275 (2003)
 - 32) Artaza J N, Bhasin S, Magee T R, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome N P, Meerasahib M F and Gonzalez-Cadavid N F: Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology* 146, 3547-3557 (2005)
 - 33) Hawke T J and Garry D J: Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551 (2001)
 - 34) Bischoff R: Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture. *Med Sci Sports Exerc* 21, 164-172 (1989)
 - 35) Schmalbruch H and Lewis D M: Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23, 617-626 (2000)
 - 36) Heslop L, Beauchamp J R, Tajbakhsh S, Buckingham M E, Partridge T A and Zammit P S: Transplanted primary

- neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5^{nlacZ/+} mouse. *Gene Ther* 8, 778-783 (2001)
- 37) Yamanouchi K, Soeta C, Naito K and Tojo H: Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 510-516 (2000)
- 38) Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P and Bass J: Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184, 356-363 (2000)
- 39) McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M and Kambadur R.: Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162, 1135-1147 (2003)
- 40) Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb N J and Fernandez A: The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* 142, 1447-1459 (1998)
- 41) Zhou G Q, Xie H Q, Zhang S Z and Yang Z M: Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead. *Chin Med J* 119, 1381-1391 (2006)
- 42) Bertoni C, Jarrahan S, Wheeler T M, Li Y, Olivares E C, Calos M P and Rando T A.: Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 419-424 (2006)
- 43) Fletcher S, Honeyman K, Fall A M, Harding P L, Johnsen R D and Wilton S D: Dystrophin expression in the *mdx* mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J Gene Med* 8, 207-216 (2006)
- 44) Williams J H, Sirsi S R, Latta D R and Lutz G J: Induction of dystrophin expression by exon skipping in *mdx* mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers. *Mol Ther* 14, 88-96 (2006)
- 45) Yuasa K, Miyagoe Y, Yamamoto K, Nabeshima Y, Dickson G and Takeda S: Effective restoration of dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-mediated transfer of truncated dystrophin cDNAs. *FEBS Lett* 425, 329-336 (1998)
- 46) Fabb S A, Wells D J, Serpente P and Dickson G: Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/*mdx* mice. *Hum Mol Genet* 11, 733-741 (2002)
- 47) Gregorevic P, Allen J M, Minami E, Blankinship M J, Haraguchi M, Meuse L, Finn E, Adams M E, Froehner S C, Murry C E and Chamberlain J S: rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* 12, 787-789 (2006)
- 48) Molnar M J, Gilbert R, Lu Y, Liu A B, Guo A, Larochelle N, Orlopp K, Lochmuller H, Petrof B J, Nalbantoglu J and Karpati G: Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther* 10, 447-455 (2004)
- 49) Perkins K J and Davies K E: The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12, 78-89 (2002)
- 50) Squire S, Raymackers J M, Vandebrouck C, Potter A, Tinsley J, Fisher R, Gillis J M and Davies K E: Prevention of pathology in *mdx* mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* 11, 3333-3344 (2002)
- 51) Weir A P, Morgan J E and Davies K E: A-utrophin up-regulation in *mdx* skeletal muscle is independent of regeneration. *Neuromuscul Disord* 14, 19-23 (2004)
- 52) Vaghy P L, Fang J, Wu W and Vaghy L P: Increased caveolin-3 levels in *mdx* mouse muscles. *FEBS Lett* 431, 125-127 (1998)
- 53) Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S and Sunada Y: Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Invest* 116, 2924-2934 (2006)
- 54) Whittemore L A, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill J J, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan X Y, Tomkinson K N, Veldman G M, Widom A, Wright J F, Wudyka S, Zhao L and Wolfman N M: Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 965-971 (2003)
- 55) Patel K and Amthor H: The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 15, 117-126 (2005)
- 56) Kishida T, Asada H, Gojo S, Ohashi S, Shin-Ya M, Yasutomi K, Terauchi R, Takahashi K A, Kubo T, Imanishi J and Mazda O: Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. *J Gene Med* 6, 105-110 (2004)
- 57) Miller T M, Kaspar B K, Kops G J, Yamanaka K,

- Christian L J, Gage F H and Cleveland D W: Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57, 773-776 (2005)
- 58) Honma K, Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Yamamoto H, Hirai K, Aso Y and Terada M: Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 1075-1081 (2001)
- 59) Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M and Ochiya T: Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 32, 109 (2004)
- 60) Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A and Ochiya T: Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12177-12182 (2005)
- 61) Luff A R and Goldspink G: Total number of fibers in muscles of several strains of mice. *J Anim Sci* 30, 891-893 (1970)
- 62) Goldspink G: Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 194, 323-334 (1999)
- 63) Dykxhoorn D M and Lieberman J: Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 126, 231-235 (2006)
- 64) Xie F. Y, Woodle M C and Lu P Y: Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discov Today* 11, 67-73 (2006)