

---

## 西野瑞穂歯科臨床医学奨励賞 受賞講演

---

### RNA 干渉法を用いた筋萎縮性疾患に対する核酸医薬の開発研究

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

### Development Study of the Nucleic Acid Innovative Drug for the Muscular Atrophy-related Disease using the RNA Interference Method

Nao KINOCHI

**Abstract :** Skeletal muscle is one of the most important morpho-functional organs, and its atrophy causes severe conditions such as muscular dystrophies. RNA interference (RNAi)-based gene therapy has been expected as a safe remedy without side effects. However, the rapid degradation of small interfering RNAs (siRNAs) and their limited duration of activity require efficient delivery methods.

Atelocollagen (ATCOL)- or cationic liposome-mediated administration of siRNAs is a promising approach to disease treatment, including muscular atrophy. In this study, we used RNAi to control the expression of myostatin, a negative regulator of skeletal muscle formation, for the purpose of developing a good as new method to regulate skeletal muscle volume, and report herein that ATCOL- or cationic liposome-mediated administration of a myostatin-targeting siRNA into skeletal muscles of normal and diseased mice induced a marked increase in muscle mass and a recovery of myofunction. We are now trying to examine the effectiveness of systemic administration of cationic liposome-delivered myostatin-targeting siRNA. Since cationic liposomes delivered siRNA to muscles effectively and are safe and cost-effective, they may represent a powerful therapeutic tool for disease treatment, including muscular atrophy.

In this review, I would like to summarize about possibility to regulate skeletal muscle volume and to develop a new treatment for various muscle disorders by RNAi technique.

#### はじめに

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。なかでも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。日常生活活動の向上・維持といった観点から, 特に最も重症な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<sup>1-11)</sup>、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<sup>12, 13)</sup>、未熟終止コドンを翻訳過程で読み飛ばし、アミノ酸に対応する終止コドンを別のアミノ酸に対応させることにより正常に近い機能を有するジストロフィン蛋白質の発現を回復させるリードスルー薬の投与、その他に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に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<sup>9-11)</sup>。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おり、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<sup>14, 15)</sup>、特に transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、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<sup>16, 17)</sup>。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に対して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。

私たちはこれまで、筋萎縮性疾患に対する新たな核酸医薬開発のための基礎研究として、RNA 干渉法を用いた骨格筋形成抑制遺伝子であるマイオスタチンの発現制御に焦点を当て、研究を進めてきた。そこで今回、個体レベルでの骨格筋量調節の有効性が示唆されたので報告し、今後の課題と展望についてまとめてみたい。

## RNA 干渉法

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<sup>18-21)</sup>、臨床応用への期待が高まりつつある<sup>22, 23)</sup>。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特異性が挙げられる。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<sup>19-21)</sup>。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応用する研究も各分野で急速に進められている<sup>22, 23)</sup>。RNAi による治療技術開発を進める上で、いかに血中や組織中での siRNA の安定化を図るかが大きな壁となる。すなわち生体内での siRNA のデリバリーや標的遺伝子の発現抑制、あるいは生物学的効果の評価系の選択である。中でも最大の問題点は、いかに高効率で、かつインターフェロンや炎症性サイトカインなどの非特異的な生体反応を惹起することなく siRNA をデリバリーできるかどうかである。siRNA のデリバリーに関しては、例えばマウスの尾静脈から合成 siRNA を短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法<sup>24)</sup>の他、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いた導入法など、動物個体レベルでも既に多くの試みがなされているが、臨床応用可能な siRNA のデリバリー方法は未だ確立されていない。そこで、核酸医薬デリバリーシステムの開発が進められる中、私たちは導入効率が高く、生体親和性物質であるアテロコラーゲンおよびカチオン性リポソームに着目した。

アテロコラーゲンはウシの真皮から抽出した I 型コラーゲンを原料としており、ペプシン処理によって抗原性を有する N-, C- 両末端のテロペプチドと呼ばれるアミノ酸領域を切断して精製するため、生体へ投与しても免疫応答の惹起や毒性を示す可能性はきわめて低い。実際に軟組織陥凹部の補正修復などさまざまな医療現場で使用されており、人体への安全性が確認されているバイオマテリアルである。アテロコラーゲンは低温 (2-10°C) では液体 (ゲル状) であるため、核酸溶液と混合することが可能である。また、アテロコラーゲンは正に荷電しているため、負に荷電している核酸分子と静電的に結合して複合体を形成する<sup>24)</sup>。すなわち、20 塩基前後の小さな核酸分子である siRNA とは、細胞に取り込まれやすいナノサイズの粒子を形成すると考えられている<sup>25)</sup>。アテロコラーゲンを担体とした siRNA の導入は、マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する局所あるいは全身性の siRNA 導入実験においてすでにその有効性が確認されている<sup>26-28)</sup>。一方、カチオン性リポソームは、生体膜と同じリン脂質二重膜構造を成しており、中性脂質とともにカチオン性脂質が一定のモル比で存在し、正電荷を有している。そのため、負電荷を持つ siRNA と高い親和性を示す。siRNA とカチオン性リポソームを混合することにより、siRNA を包含したりポソーム複合体 (siRNA-lipoplex) が形成される。siRNA-lipoplex は生体内において siRNA の分解を防ぎ、細胞表面に到達するとエンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる。その後、内包する siRNA を放出することにより細胞内への siRNA の送達が行われる。カチオン性リポソームもアテロコラーゲンと同様、これまでに siRNA やプラスミド DNA、抗腫瘍薬など様々な物質の担体としてそ

の有効性が報告されている。

しかしながら、アテロコラーゲンやカチオン性リポソームを用いたドラッグデリバリーシステムを筋肉に応用した例は未だなく、本研究によって得られる新知見は筋疾患に対する RNAi 創薬の端緒となることが期待された。

### マイオスタチンの機能

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- $\beta$  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<sup>29)</sup>。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<sup>30-32)</sup>、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、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<sup>33)</sup>。

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<sup>34, 35)</sup>。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<sup>36, 37)</sup>。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<sup>38-42)</sup>。また別の作用機序として、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<sup>43-46)</sup>。

過去に私たち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<sup>34)</sup>。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

増殖 (hyperplasia) によるものであることを確認している<sup>34)</sup>。さらに、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<sup>47, 48)</sup>。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<sup>49)</sup>。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<sup>50)</sup>。

### RNA 干渉法を用いた骨格筋量調節

#### 1. アテロコラーゲンを用いた siRNA 導入

骨格筋形成に関する研究が進められる中、Artaza らは、マイオスタチン特異的 siRNA 発現ベクターを作製し、エレクトロポレーションにてこの siRNA 発現ベクターをラット前脛骨筋に導入したところ、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た<sup>51)</sup>。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<sup>52)</sup> やウイルスベクター<sup>53)</sup> が用いられてきたが、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。

この問題点を解決するべく、私たちの研究グループでは為害性が少なく、かつ siRNA 導入の有効性がすでに確認されているアテロコラーゲン<sup>26-28)</sup> を担体として、マイオスタチン特異的二本鎖 siRNA (Mst-siRNA) のマウス咬筋への局所導入をまず始めに行った。20 週齢の C57BL/6 野生型マウス、筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウス、および細胞骨格に関与する caveolin-3 遺伝子を欠失させた caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウスを試料として用い、左側咬筋に Mst-siRNA とアテロコラーゲンの複合体を導入した。また、同一個体の右側咬筋にはネガティブコントロールとして scrambled-siRNA (scr-siRNA) とアテロコラーゲンの複合体を導入し、対照側として用いた。その結果、導入から 2 週間後において、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と骨格筋増大が認められた (図 1 A)。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、対照側と比較して Mst-siRNA を導入した咬筋では各筋線維直径の増加すなわち筋の肥大 (hypertrophy) が認められた (図 1 B, C)<sup>54, 55)</sup>。

さらに、20 週齢の野生型マウスと caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウスを用いて、眼窩静脈叢からの Mst-siRNA 全身投与の有効性について検討した。対照群には、scr-siRNA とアテロコラーゲンを混合して投

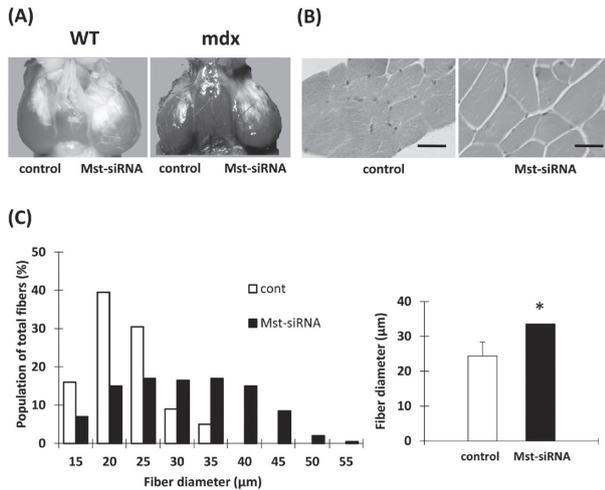


図1 アテロコラーゲンを用いた siRNA 局所導入後におけるマウス骨格筋の形態および組織学的解析 (A) 野生型マウス (WT) および mdx マウス (mdx) における骨格筋の肉眼的所見。Mst-siRNA を導入していない右側咬筋 (control) と比較して、Mst-siRNA を導入した左側同部位 (Mst-siRNA) では顕著な骨格筋増大が認められた。(B) 野生型マウス咬筋の HE 染色像。control に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋筋線維は、明らかに肥大傾向を示した (Bar: 50 μm)。(C) 野生型マウス咬筋における筋線維直径の分布様相と平均値。Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維 (33.6 ± 1.5 μm) は、対照群 (24.4 ± 1.1 μm) に比べて約 1.3 倍増加していた (\*: p < 0.0001)。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)。

与した。投与開始日を含め、2 週間の実験期間内に計 4 回 siRNA を全身投与し、最終投与を終えてから 1 週間の待機期間を経て各種解析を行った。対照群に比べ、Mst-siRNA を導入した個体の咬筋では、局所投与と同様に筋線維の肥大傾向が認められた (図 2 A, B)。さらに興味深いことに、筋機能解析として前脛骨筋における筋張力試験を行ったところ、野生型マウスでは対照群と Mst-siRNA 投与群の二群間に差は認められなかったが、caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウスでは、対照群に比べ Mst-siRNA を導入すると約 3 倍の筋張力を示した。これは、野生型マウスが示す筋張力の約 53% まで回復する結果となった (図 2 C, D)<sup>56)</sup>。

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<sup>57-60)</sup>、マイオスタチンは骨格筋の再生部位において発現し<sup>61, 62)</sup>、筋衛星細胞数の制御に関わると考えられている<sup>63)</sup>。また、骨格筋はそれ自身も収縮特性などが運動負荷に対して敏感に反応し、筋量を増すことも知

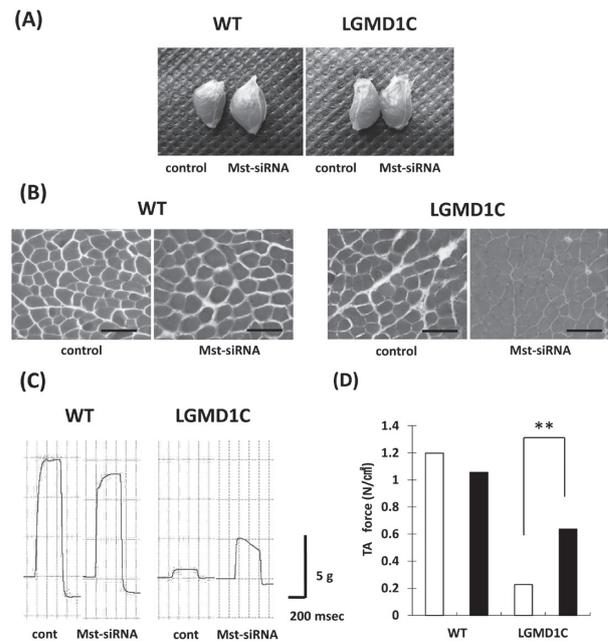


図2 アテロコラーゲンを用いた siRNA 全身投与後におけるマウス骨格筋の形態および組織学的解析 (A) 野生型マウス (WT) および caveolin-3 突然変異型トランスジェニックマウス (LGMD1C) における骨格筋の肉眼的所見。control と比較して、Mst-siRNA を全身投与したマウスでは顕著な骨格筋増大が認められた。(B) 咬筋の HE 染色像。control に比べ Mst-siRNA を投与したマウス咬筋の最大直径部における筋線維は、明らかに肥大傾向を示した (Bar: 50 μm)。(C) (D) 前脛骨筋における筋張力試験。WT では control 群と Mst-siRNA 投与群の二群間に差は認められなかったが、LGMD1C では control 群に比べ Mst-siRNA を投与すると約 3 倍の筋張力を示し、WT の示す筋張力の約 53% まで回復した (\*\*: p < 0.05)。

られている<sup>64)</sup>。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抑制能が低下した結果、hypertrophy が生じた可能性が考えられる。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、標的とする細胞種や投与する siRNA 濃度に大きく依存することから、生体内における持続期間やノックダウンレベルの詳細についても明らかにされていない。しかしながら、私たちの研究では 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維持されていた。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。

## 2. カチオン性リポソームを用いた siRNA 導入

アテロコラーゲンは非常に高価な薬物であり、臨床において多量の投与が必要となることを考慮するとコスト面での欠点を有している。そこで、私たちはアテロコラーゲンに替わる新規の薬物輸送単体としてカチオン性リポソームに着目した。カチオン性リポソームは、アテロコラーゲンと比較して調製が容易で安価であるという利点を有するため、カチオン性リポソームによる Mst-siRNA の導入効果が得られれば、Mst-siRNA の臨床応用の可能性がさらに高まるのではないかと考えた。

20～25 週齢の C57BL/6 野生型マウスおよび筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスを試料として、左側咬筋に Mst-siRNA とカチオン性リポソームの複合体 (Mst-siRNA-lipoplex) を局所導入した。また、同一個体の右側咬筋にはネガティブコントロールとして scr-siRNA とカチオン性リポソームを導入し、対照側として用いた。その結果、導入から 1 週間後において Mst-siRNA-lipoplex を導入した咬筋では、アテロコラーゲンを担体を用いた場合と同様に顕著なマイオスタチンの発現抑制と、筋分化制御因子である MyoD および myogenin の有意な発現レベルの上昇に伴う筋線維の肥大が認められた (図 3 A, B, C)。また、mdx マウスの骨格筋においては筋線維の変性・壊死に伴い、筋線維中に存在する未分化幹細胞の脂肪組織への分化が亢進すると考えられていることから、Mst-siRNA-lipoplex 導入による脂肪分化に対する影響を検討した。その結果、対照側に比べ Mst-siRNA-lipoplex 導入側において、脂肪分化マーカーである PPAR $\gamma$  および CEBP $\alpha$  ともに有意な発現レベルの低下を認めた。すなわち、mdx マウスでは骨格筋の再生促進に伴って脂肪分化が抑制されている可能性が示唆された。

一方で、筋線維に肥大が生じた場合には、筋組織の肥大という形態的増大に見合う機能的発達が期待される。私たちは、Mst-siRNA-lipoplex 導入による筋機能に対する影響を検討するため、マウス咬筋の機能的評価としてテレメトリーシステムを用いて咬筋筋電図の終日測定を行った。その結果、野生型マウスの咬筋活動レベルは導入前後で変化を認めなかったが、mdx マウスでは Mst-siRNA-lipoplex 導入後、筋電図波形の振幅最大値 (peak activity) と、安静時活動レベルにおける筋活動量の増加傾向を認めた (図 3 D)<sup>65)</sup>。筋力と筋の断面積が高い相関を示すとした報告もあり<sup>66)</sup>、今回の結果は筋線維の肥大に伴う筋活動量の増加を示すことで一致していることから、カチオン性リポソームを用いた Mst-siRNA の導入は、骨格筋量の調節のみならず筋機能も回復しうる可能性が示唆された。

今後、臨床応用していく上で、Mst-siRNA-lipoplex の全身投与における導入効率や表現型として現れるまでの

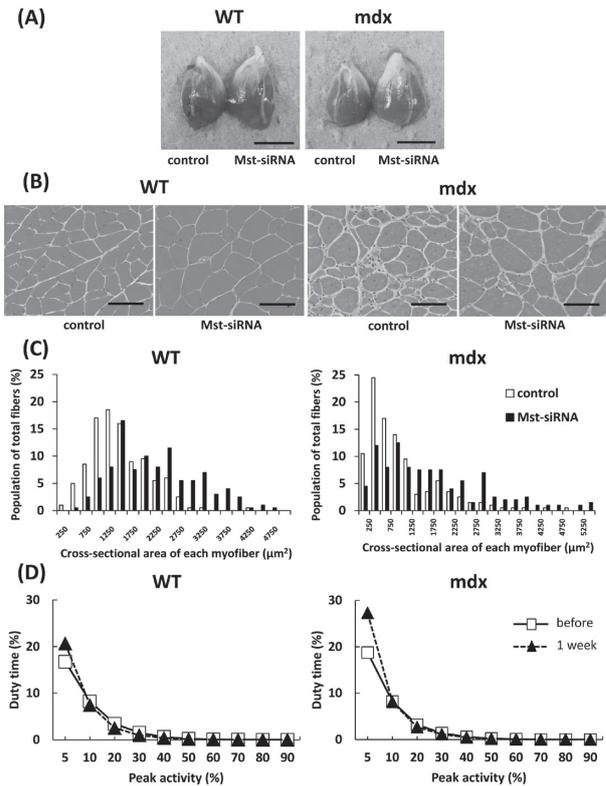


図 3 カチオン性リポソームを用いた siRNA 局所導入後におけるマウス骨格筋の形態および組織学的解析

(A) 野生型マウス (WT) および筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) 骨格筋の肉眼的所見。Mst-siRNA を導入していない右側咬筋 (control) と比較して、Mst-siRNA を導入した左側同部位 (Mst-siRNA) では顕著な骨格筋増大が認められた。

(B) 咬筋横断面の HE 染色像。control に比べ Mst-siRNA を導入した咬筋 (Mst-siRNA) の筋線維は、明らかに肥大傾向を示した (Bar: 50  $\mu$ m)。

(C) 各筋線維断面積の分布様相。Mst-siRNA を導入した咬筋の筋線維断面積は、control に比べ肥大傾向を示した。グラフは、総筋線維数に対して各断面積に分布する筋線維数を % 表示したものである (n=200)。

(D) マウス咬筋の機能的評価。WT および mdx の咬筋活動レベル。WT の咬筋活動レベルは導入前後で変化を認めなかったが、mdx では Mst-siRNA 導入後、筋電図波形の振幅最大値 (peak activity) と安静時活動レベルにおける筋活動量の増加傾向を認めた。

期間、筋機能の回復、さらには筋萎縮性疾患の最終的な致死要因となる骨格筋以外の心筋や呼吸筋への影響についても解析が必要であり、これについては現在検討中である。

## おわりに

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを中心とした筋ジストロフィーの原因遺伝子を元通りに修復する根本的治療法が未だ開発中の現在、私たちは、RNAiを用いたマイオスタチン遺伝子の発現制御が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ことを今回報告した。この治療法は、決して症状を完治するものではなく、また変異遺伝子を正常にするわけではないが、筋細胞を守る機能はいくらか残すことが可能となるため病状は軽くなり、延命効果も得られるのではないかと考えられる。

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発展し、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。

## 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閲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 田中栄二教授、本研究の実施に際し終始御指導を賜りました徳島大学副学長 野地澄晴教授に甚大なる謝意を表します。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口腔分子病態学分野 石丸直澄教授、口腔顎顔面矯正学分野 泰江章博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) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) Chicoine L, Montgomery C, Bremer W, Shontz K, Griffin D, Heller K, Lewis S, Malik V, Grose W, Shilling C, Campbell K, Preston T, Coley B, Martin P, Walker C, Clark K, Sahenk Z, Mendell J and Rodino-Klapac L: Plasmapheresis Eliminates the Negative Impact of AAV Antibodies on Microdystrophin Gene Expression Following Vascular Delivery. *Mol Ther* 22, 338-347 (2014)
- 13) Aoki Y, Yokota T and Wood M J: Development of Multiexon Skipping Antisense Oligonucleotide Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomed Res Int* 2013, 1-8 (2013)
- 14) Arnold H H and Winter B: Muscle differentiation more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev* 8, 539-544 (1998)
- 15) Molkentin J D and Olson E N: Defining the regulatory

- networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 445-453 (1996)
- 16) Massague J, Cheifetz S, Endo T and Nadal-Ginard B: Type  $\beta$  transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8206-8210 (1986)
  - 17) 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)
  - 18) 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)
  - 19) Elbashir S M, Lendeckel W and Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)
  - 23) 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)
  - 24) Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y and Terada M: New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med* 5, 707-710 (1999)
  - 25) Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H and Terada M: Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr Gene Ther* 1, 31-52 (2001)
  - 26) 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)
  - 27) 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)
  - 28) 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)
  - 29) McPherron A C, Lawler A M and Lee S J: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387, 83-90 (1997)
  - 30) 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)
  - 31) 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)
  - 32) 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)
  - 33) 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)
  - 34) 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)
  - 35) Weintraub H: The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244 (1993)
  - 36) 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)
  - 37) 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)
  - 38) 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)
  - 39) Massague J: TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791 (1998)

- 40) Liu D, Black B L and Derynck R: TGF- $\beta$  inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15, 2950-2966 (2001)
- 41) Liu D, Kang J S and Derynck R: TGF- $\beta$ -activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J* 23, 1557-1566 (2004)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) 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)
- 49) Whittmore 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)
- 50) 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)
- 51) 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)
- 52) 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)
- 53) 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)
- 54) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K and Noji S: Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther* 15, 1126-1130 (2008)
- 55) Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S and Tanaka E: Local applications of myostatin-siRNA with atelocollagen increase skeletal muscle mass and recovery of muscle function. *PLoS ONE* 8, e64719 (2013)
- 56) Kinouchi N, Kawakami E, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru Y, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E and Noji S: Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ* 53, 48-54 (2011)
- 57) Hawke T J and Garry D J: Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551 (2001)
- 58) Bischoff R: Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture. *Med Sci Sports Exerc* 21, 164-172 (1989)
- 59) 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)
- 60) 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<sup>nlacZ/+</sup> mouse. *Gene Ther* 8, 778-783 (2001)
- 61) 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)
- 62) 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)
- 63) 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)
- 64) 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)
- 65) Mori H, Kawai N, Kinouchi N, Hichijo N, Ishida T, Kawakami E, Noji S and Tanaka E: Effectiveness cationic liposome-mediated local delivery of myostatin-targeting small interfering RNA in vivo. *Develop Growth Differ*, in press
- 66) Maughan RJ, Watson JS and Weir J: Relationships between muscle strength and muscle cross-sectional area in male sprinters and endurance runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 50, 309-318 (1983)