

欠損型マイオスタチン受容体による筋分化の促進効果

高田 温行, 寺田久美子*, 山本 康弘, 笹岡 俊輔*, 宇田川 潔*
和田 直之*, 森口 隆彦, 濃野 勉*

骨格筋形成の過程で一過性に発現するマイオスタチン (myostatin ; MSTN) は筋芽細胞の増殖と分化を負に調節し, その機能欠失変異によって過剰な筋肉が形成される。MSTN は成熟後, 膜受容体である II 型アクチビン受容体 (ActRII) に結合して細胞内へシグナルを伝え, 筋芽細胞の分化を調節している。2つある ActRII のうち A 型は皮筋節や筋肉塊の周囲で発現し, MSTN の発現部位と時間的, 空間的に重なっているのに対し, B 型は主に神経管で発現している。欠損型の II 型受容体を過剰に発現すれば MSTN 作用の最初の段階でシグナルを遮断でき, 欠損型受容体は競合的に働く制御因子として作用する。この作用をマウス筋芽細胞 C2C12 およびニワトリ胚の間充織細胞の初代培養系で検定した結果, 予想通りの効果が得られ, 特に速筋型の筋線維に対して有効であった。A, B の2つある ActRII のうち, 筋肉で特異的に発現している A 型の優性欠損型は筋肉特異的な遮断に有効であると考えられる。

(平成18年6月13日受理)

Myogenic Activity of the Dominant-Negative Form of Type II Receptor for Myostatin during Skeletal Muscle Development

Haruyuki TAKATA, Kumiko TERADA*, Yasuhiro YAMAMOTO,
Shunsuke SASAOKA*, Kiyoshi UDAGAWA*, Naoyuki WADA*,
Takahiko MORIGUCHI, Tsutomu NOHNO*

Myostatin (MSTN) is transiently expressed in developing skeletal muscle, and negatively regulates muscle growth, in that a loss of function mutation of the MSTN gene results in excess muscle formation. MSTN is known to act through initial binding of mature peptide to the type II receptor, activin receptor IIA and IIB (ActRIIA and ActRIIB), after proteolytic cleavage at the junction between N-terminal propeptide and C-terminal mature peptide. Whereas ActRIIB is expressed predominantly in the developing neural tube, ActRIIA is expressed in the myogenic precursor cells derived from the dermomyotome. Overexpression of the extracellular domain of ActRIIA and ActRIIB effectively blocks MSTN signaling through inhibition of the receptor binding of MSTN. The extracellular domain of ActRII produced in a conditioned medium of DF-1 cells caused an increase in myogenic differentiation of the C2C12 myoblast cell line and of a primary culture of chick embryo mesenchymal cells. Dominant-negative forms of ActRIIA and ActRIIB both effectively stimulate myogenic differentiation. (Accepted on June 13, 2006) *Kawasaki*

川崎医科大学 形成外科学

〒701-0192 倉敷市松島577

* 同 分子生物学

e-mail address : Haruyuki@med.kawasaki-m.ac.jp

Department of Plastic Surgery, *Department of Molecular Biology, Kawasaki Medical School : 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan

Medical Journal 32(4): 175-186, 2006

Key Words ① Myostatin ② Activin receptor IIA ③ Activin receptor IIB
④ Myogenic differentiation ⑤ C2C12 myoblast

はじめに

胚発生において骨格筋形成は皮筋節に由来する前駆細胞が遊走しながら増殖し、筋芽細胞の増殖と分化によって進行する。この過程には種々の増殖因子、分化因子が関与し、これらの相互作用であらかじめ決められた場所に筋肉塊が形成される^{1),2)}。

骨格筋の形成に対する負の調節因子として知られる MSTN は間充織系列の幹細胞から筋前駆細胞の分化、筋芽細胞の増殖と分化などを調節する因子であり、筋肉形成に対して抑制的に作用する^{3)~6)}。この作用は細胞膜の II 型受容体である ActRII, および I 型受容体として ALK4, ALK5, ALK7 を介してシグナルを細胞内へ伝える^{7),8)}。リガンドである MSTN の受容体への結合を競合的に遮断するために、その結合を阻害するタンパク質や中和抗体などが利用されている^{9),10)}。この研究では、細胞外のリガンド結合ドメインのみからなる欠損型の II 型受容体の筋分化への影響を調べた。MSTN と ActRIIA の両者は骨格筋の形成過程で共に発現しているため、この時期に MSTN シグナルを受け取る過程を特異的に遮断することで MSTN の筋分化抑制作用を阻害できる。その結果として筋肉形成が促進されるので、優性欠損型受容体の活性を利用すれば特異性の高い萎縮性筋疾患の治療が可能になると考えられる。

材料と方法

1. cDNA クロンの構築と発現

ヒト線維芽細胞 cDNA から増幅した ActRIIA, ActRIIB の細胞外ドメインをコードする cDNA (それぞれ AR2A-DN, AR2B-DN) を V5 タグ付きの発現ベクター pcDNA3.2-DEST へ組み

込み、ニワトリ由来 DF-1 細胞にトランスフェクトして発現させた。タグ抗体でタンパク質の産生効率を確認し、培養上清中 (conditioned medium; CM) に分泌されたタンパク質を回収して使用した。同様に、MSTN のプロ領域 (MST-PRO) および成熟領域 (MST-MAT) を発現するプラスミドを作製した。PCR プライマーの設計でこれらの C 末端領域には HA タグを導入し、発現ベクターに組換えた。元の MSTN 由来のシグナル配列ではタンパク質の産生効率が低く、また成熟タンパク質へのプロセッシングも極めて悪いので、これらは ActRII (A 型または B 型) のシグナルペプチドにつき換えたクローンを構築した。

遺伝子発現系はニワトリの ASLV のサブグループ A に由来する RCAS ベクター、および動物の発現ベクター pCAGGS を一部改変して用いた。pCAGGS はクローニングサイトの下流に IRES-eGFP をつなぎ、pCAG-IEG を作製した。cDNA の入れ換えのためには Gateway System (Invitrogen) を使用した。すなわち、attR1 と attR2 を持つカセットを発現ベクターのクローニング部位へ導入し、それぞれ RCAS-DEST, pCAG-IEG-DEST を作製し、最終的な発現ベクターとして使用した。C 末端側への HA または V5 タグの導入は PCR プライマーに組み込んだ配列、あるいはあらかじめベクターに組み込んだ配列を使用した。欠変異の導入は PCR で増幅した DNA 断片同士の間直接接続で行った。PCR による変異の可能性を下げるために KOD plus を使用し、最終的には塩基配列を確認した。

発現させるための cDNA クロンの構築と改変には attL1 と attL2 を持つ pENTR を使用し、上述の発現ベクターまたは pcDNA3.2/V5/DEST へ LR 反応で入れ換えて発現系を構築した。

ニワトリ線維芽細胞 CEF および DF-1 細胞への DNA の導入はそれぞれ Lipofectin および Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。DF-1 の培養上清 (CM) はトランスフェクション翌日に血清を含まない最少培地 (D-MEM または Opti-MEM) に培地交換し、さらに24時間培養して調製した。

2. 筋分化の検定

筋芽細胞の分化アッセイはニワトリ胚の肢芽間充織から調製した初代培養細胞 (CLM) を用いて行った。ニワトリ胚の発生ステージは Hamburger and Hamilton (1951) に従った¹¹⁾。発生ステージ23-24のニワトリ胚肢芽から近位側半分を切り出し、さらに筋芽細胞の移動経路である背側および腹側組織を切り出した。この組織塊を0.5% trypsin 中で20分処理して、外胚葉をはがした。次いで筋芽細胞を含む間充織組織を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含 Tyrode 液中に移し、37℃で40分処理した。Tyrode 液を培養液に置換したのち、ピペッティングにより組織塊を単細胞に解離した。培養液は Ham's F-12 と D-MEM を等量混合したものを基本培地とし、ウシ胎児血清とニワトリ胚抽出液をそれぞれ5% 添加して用いた。24-well plate に1穴あたり 3.0×10^5 個の細胞を播種した。37℃、5% CO_2 下で4時間培養して細胞を培養皿底面へ付着させ、目的とする細胞培養上清を添加して3~5日間培養を継続した。

筋芽細胞 C2C12 での検定は10%ウシ胎児血清を含む D-MEM で継代維持し、2%ウマ血清または2.5%ウシ胎児血清を含む培地で筋分化を誘導した。アッセイ用の小型4-well plate に 2×10^4 細胞を播き、翌日分化用培地 (0.5 ml) に交換し、同時に組換えタンパク質 MST-MAT, MST-PRO, または AR2A-DN, AR2B-DN を発現した DF-1 の CM (5~50 μ l) を加えてさらに3~5日間培養を継続した。

3. 蛍光抗体法での免疫染色 (IHC)

ニワトリ胚は Ca, Mg 不含 phosphate-buffe-

red saline (PBS) 中で羊膜を取り除き、4% paraformaldehyde/PBS で一晩固定した。その後、PBS に置換し、10分間で2回振盪した。続いて25% ethanol/PBT (PBS + 0.1% Tween 20)、50% ethanol/PBT、75% ethanol/PBT、100% ethanol で順にそれぞれ5分間振盪し、最後に再度100% ethanol で10分間振盪した後、-20℃で保存した。

この試料を ethanol と xylene での行程を経てパラフィン包埋し、厚さ7 μ m の組織切片を作製した。切片を脱パラフィン処理後、10mM citrate buffered saline (pH 6) 中で3分間3回マイクロウエーブ処理し、PBS で10分間2回洗浄した。TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) に1%ヤギまたはウマ血清を加えたブロッキング液で処理し、TBS で希釈した下記の一次抗体と反応させた。TBS で洗浄後、同様に蛍光標識した二次抗体と反応させ、洗浄した。その後 DAPI で核を染色し、蛍光顕微鏡で検鏡した。

培養細胞の蛍光抗体染色は細胞を70% ethanol-formaldehyde-acetic acid (20:2:1) で固定後、PBS で洗浄し、その後のブロッキングと抗体処理は組織切片の場合と同様に行った。

用いた抗体 (メーカーまたはディーラー) と希釈倍率は次の通り。抗 MyHC 速筋型 (Sigma) : 1/400, 抗 MyHC 遅筋型 (Sigma) : 1/1000, 抗 histone H3 (Ser28) -P : 1/1000, 抗 HA (Roche) : 1/500, 抗 V5 (Bethyl) : 1/200。

4. *In situ* hybridization (ISH) 法

Digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche) を用いて T7 または SP6 RNA ポリメラーゼで37℃、2時間反応して転写反応を行い、DIG-11-UTP 標識された antisense RNA プロブを合成した。DIG 標識 cRNA は必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

Whole-mount の場合、100% ethanol 中に-20℃で保存してある試料を75% ethanol/PBT に置換し、5分間振盪し再水和を行った。その後、50% ethanol/PBT で5分間、25% ethanol/PBT

で5分間、PBTで5分間それぞれ振盪した後、再度PBTに置換し5分間振盪した。Proteinase K/PBT溶液(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)に置換し、37°Cで15分間振盪した。その後、glycine(2 mg/ml)/PBT溶液に置換後、室温で5分間、PBTで5分間2回振盪した。2% glutaraldehyde + 4% paraformaldehydeを含むPBTに置換し、20分間再固定した。その後、PBTに置換し5分間振盪した(2回繰り返す)。次いでPBT中68°Cで50分間熱処理した。十分に冷却したPBTに置換し、氷上で5分間振盪した。6% H_2O_2 /methanol溶液に置換し、氷上で1時間振盪した。その後、PBSで5分間、PBTで5分間振盪し、68°Cの pre-hybridization mix(50% formamide, 5 \times SSC pH 7.0, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA, 1% SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin)に置換し、1時間振盪した。

Digoxigenin (DIG)-labeled RNA probe(0.35 μg)を含む pre-hybridization mix 溶液(0.7 ml)に置換し、68°Cで一晩 hybridization を行った。その後、Hybridization Wash Solution 1(5 \times SSC, 50% formamide, 1% SDS)に置換し振盪した。再度新たな Hybridization Wash Solution 1に置換し、68°Cで30分間振盪して洗浄を行った。その後、Hybridization Wash Solution 2(2 \times SSC, 50% formamide, 0.1% Tween20)で5分間、次いで同じ液を用いて68°Cで30分間、さらに TBST(100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)で室温5分間を3回繰り返す、ブロッキング溶液(1.5% Blocking Reagentを含むTBST)で60~90分間、それぞれ振盪した。最後にブロッキング溶液を除き、抗体を加え4°Cで一晩抗体反応を行った。

TBSTに置換し5分間振盪を4回行った。新たなTBSTに置換して、30分間振盪を8回、NTMT(0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH9.5, 50 mM MgCl_2 , 0.1% Tween 20)に換えて3回、10分間振盪による洗浄を行った。その後、NTMTを発色液(NBT: 4-nitro blue tetrazolium chloride + BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphateを含むNTMT)に換え、発色反応を

開始した。発色開始10分後から発色状況を確認し、発色が完了したところでPBTに置換し、5分間振盪を3回行い、発色反応を停止した。次に50% ethanol/PBTに置換し、5分間振盪後100% ethanolに換え1.5~3時間振盪した。その後、50% ethanol/PBTで5分間、PBTで5分間振盪した後、撮影まで遮光して4°Cで保存した。

切片でのISHはWhole-Mount ISHの手法に準じて行った。固定した胚を脱水後にパラフィン包埋し、厚さ7 μm で切片を作製した。脱パラフィン処理して再水和後、Proteinase K(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/PBT溶液に置換し、37°Cで10分間、酵素処理を行った。その後、室温でglycine(2 mg/ml)/PBT溶液に置換して5分間、PBTで2回5分間振盪した。4% PFA/PBT溶液に置換し、再固定を20分間行った。その後、PBTに置換し5分間3回振盪した。0.1 M triethanolamine 中で無水酢酸を加えて15分間アセチル化を行った後、PBTに置換して5分間5回振盪した。Whole-Mount ISHで用いた pre-hybridization mix に終濃度10% dextran sulfate を加えたものを切片ISHで使用し、65°Cで1時間処理した。DIG-labeled RNAプローブ(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む pre-hybridization mix に置換し、65°Cで16~17時間 hybridization を行った。Hybridization Wash Solution 3(2 \times SSC, pH7.0, 50% formamide, 0.1% SDS)に置換し、65°Cで20分間4回洗浄を行った。その後、0.2 \times SSC + 0.1% Tween 20に置換し65°Cで20分間4回洗浄した。さらにTBSTで室温5分間2回、ブロッキング溶液中で15°C、1時間、それぞれ振盪した。ブロッキング溶液を除き、抗体を加えて15°Cで2時間抗体反応を行った。TBSTに置換し、10分1回、5分6回振盪した。次にNTMTに置換し、5分間2回の振盪による洗浄を行った。その後、NTMT中に発色基質(NBT + BCIP)を含む溶液に換え、発色反応を開始した。発色液はWhole-Mountの場合の1/10の濃度を用いた。発色時間は発色の状態を確認しながら1~2日間室温で行った。発色停

止後に0.1% Nuclear fast red/5% 硫酸アルミニウム水溶液で核を染色した。

5. Western blotting

資料の調製、及び western blotting は笹岡の手法に準じて行った¹²⁾。用いた抗体は次の通り。抗 MyHC 遅筋型 (Sigma) : 1/4,000, peroxidase で標識した anti-mouse IgG 抗体 (Sigma) : 1/20,000。検出したシグナルを Densitograph (ATTO) を用いて数値化した。

結 果

1. MSTN とその受容体の発現パターン

四肢が形成される段階で MSTN の発現パターンを調べると、皮筋節で発現が始まり、体幹部から四肢へ前駆細胞の移動が起きている場所で発現が維持されている (Figs. 1, 2)。その一方で、ActRIIA の発現は MSTN より少し早くから発現が始まり、発現の継続も MSTN より長い。すなわち、ニワトリ胚の肢芽では発生ステージ23から MSTN の発現が始まり、四肢の筋肉での発現はステージ24でピークにな

る。その後、ステージ25までは発現が見られるが、ステージ26では消失する。

一方、ActRIIA の発現は皮筋節や肢芽での Pax7 の発現と重なり、ステージ23ですでに有意な発現が見られる。その後、ステージ24-26で最も強く発現が見られ、ステージ29-30までは発現が持続する。

ActRIIB については、ステージ23-26で皮筋節、肢芽の筋肉部位での発現は全く見られず、ステージ23-25で神経管、肢芽の背側間充織などでの発現が見られるが、肢芽での発現はステージ27以降では弱くなる。

このように、MSTN の発現は ActRIIA とはオーバーラップしているが、ActRIIB とはオーバーラップせず、その一方で MSTN の発現は一過性であることが判明した (Table 1)。

筋芽細胞へ分化する前駆細胞である衛星細胞のマーカーであると言われている Pax7 の発現¹³⁾は、神経管背側での発現に加えて、ステージ23前後から皮筋節や肢芽の筋肉塊周辺で強い発現が見られる (Figs. 1, 2)。ここでの発現はステージ26-27まで継続し、ステージ29-30では筋肉塊での発現は低下するが、発現している細

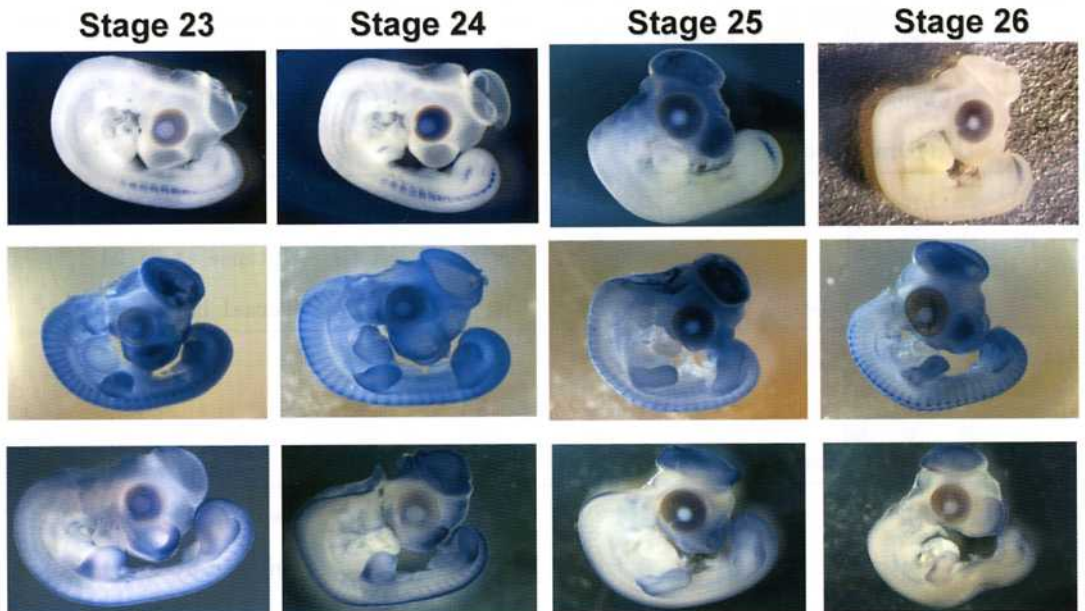


Fig. 1. Expression patterns of MSTN, ActRIIA, and ActRIIB during chick embryogenesis, as revealed by whole-mount in situ hybridization at stages 23 to 26. Top, MSTN; middle, ActRIIA; bottom, ActRIIB.

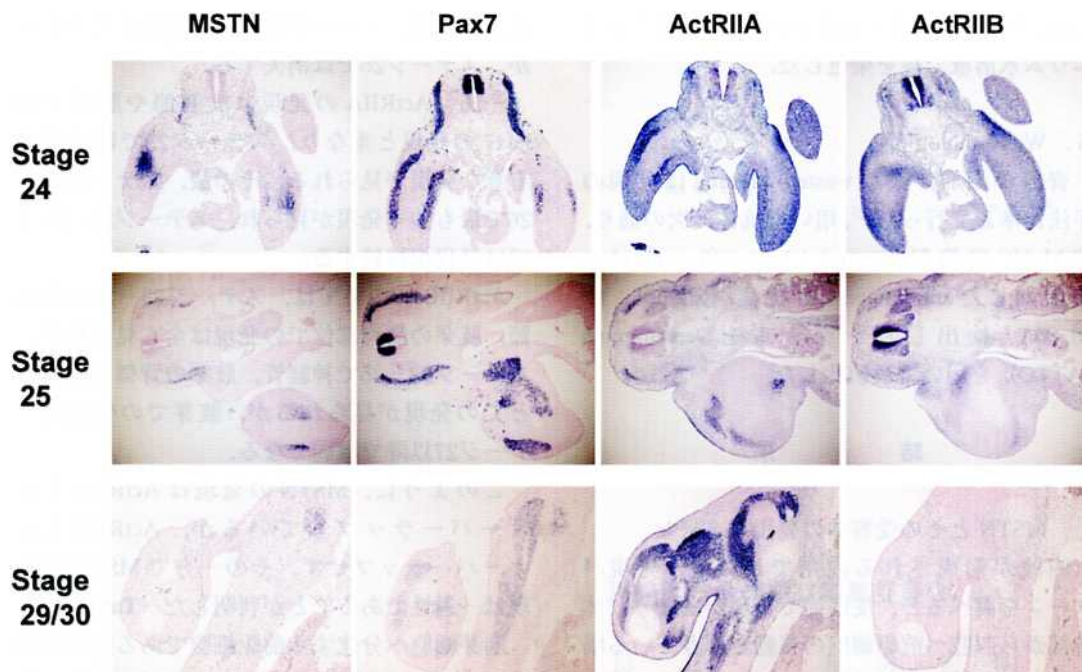


Fig. 2. Expression pattern of MSTN, Pax7, ActRIIA, and ActRIIB during chick embryogenesis, as revealed by section in situ hybridization at stages 24 to 30. ActRIIA, but not ActRIIB, is expressed in myogenic cells during migration into the limb bud with MSTN and Pax7.

Table 1 Summary of expression pattern in the chick embryos at stage (St) 23–26.

Probe (Gene)	Site	Developmental Stage				Comment
		St 23	St 24	St 25	St 26	
Myostatin	Limb bud	+	++	+	–	
	Myotome	+	+	±*	±*	*Partial
	Neural tube	–	–	–	–	
Pax7	Limb bud	+	++	++	++	
	Myotome	++	+++	++	++	Intense at St 24
	Neural tube	++	++	+	+	Dorsal half
ActRIIA	Limb bud	+	++	++	++	
	Myotome	+	++	++	++	
	Neural tube	–	–	+	+	
ActRIIB	Limb bud	+	+	+	+	Weak in myoblast
	Myotome	±	+	±	±	Intense at St 24
	Neural tube	++	++	+	+	Intense at St 23, 24

–, no signal; ±, weak; +, moderate; ++, intense; +++, very intense signals.

胞が筋肉塊の中に部分的に散在するようになる。

皮筋節での MyHC の発現はステージ25から認められるようになり、速筋型では軸下の細胞に限局しているが、遅筋型では軸上領域まで発現が見られる (Fig. 3)。その後、肢芽へ移動した筋芽細胞での発現が始まるが、その発現領域は速筋型の方が広範囲である。従って、MSTN の発現は時間的、空間的に遅筋の発現と関連している可能性がある。

2. MST-MAT, MST-PRO, AR2A-DN, AR2B-DN の DF-1 細胞での発現

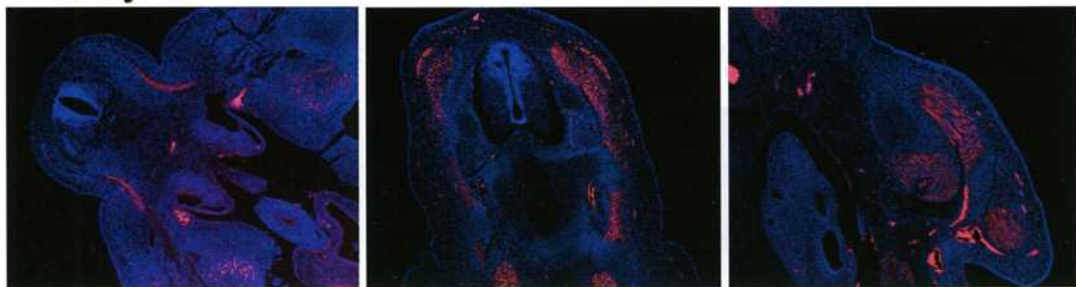
全長 cDNA に HA タグ用の配列を追加してヒト MSTN タンパク質の産生を試みたが、分泌効率もプロセシングの効率も極めて低い。それゆえアミノ酸 (aa) 19-266 (MST-PRO) と aa 267-375 (MST-MAT) の間で分断し、それぞれ C 末端側に HA タグを付けて別々に発現した。しかし、この場合でも細胞内にタンパク

質は認められるが、培養液中へはほとんど分泌されていなかった。

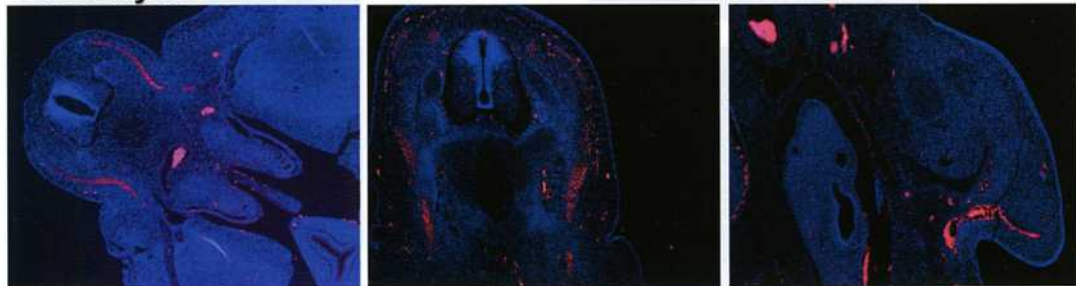
一方、細胞外ドメインのみの配列に V5 タグを付けたヒト ActRIIA の aa 20-137 (AR2A-DN) も、ヒト ActRIIB の aa 23-133 (AR2B-DN) も培養液中への分泌が極めて高く、特に AR2A-DN では合成されたタンパク質がほとんど分泌されており、細胞内への残存はあまり見られなかった。このように、AR2A-DN も AR2B-DN も産生タンパク質は効率よく分泌されているのが確認された。この結果はシグナル配列の違いによるものと推測される。CM 中への産生効率は AR2B-DN > AR2A-DN であった。

次に、ActRIIA と ActRIIB のシグナル配列 (SP) に HA タグ配列を持つ MST-PRO と MST-MAT をつなぎ、AR2A (SP)-PRO, AR2A (SP)-MAT, または AR2B (SP)-PRO, AR2B (SP)-MAT として発現させた。その結果、タンパク質産生のタグ抗体による検出では、どちらのシ

Fast MyHC



Slow MyHC



Stage 25/26

Stage 29/30

Stage 29/30

Fig. 3. Expression pattern of slow and fast myofiber MyHC during chick embryogenesis, as revealed by immunofluorescent staining. AlexaFluor 594-labeled secondary antibody detects primary antibody bound to fast muscle MyHC (top) and slow muscle MyHC (bottom). Cell nuclei were counterstained with DAPI.

グナル配列の場合でも効率よく MST-PRO, MST-MAT のいずれについても CM 中へ十分な量が産生されていた。産生量は AR2B(SP)-PRO > AR2A(SP)-PRO > AR2B(SP)-MAT > AR2A(SP)-MAT の順であった。

これら ActRII のシグナル配列を持つクローンはいずれも RCAS ベクターへ組換えてウイルスとしての発現を試みた。

3. 筋分化における MSTN 作用の阻害効果

マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて MSTN 作用を検証した。2%ウマ血清または2.5%ウシ胎児血清で分化誘導をかけて検定した時、組換えタンパク質(rMST-MAT)に対する応答が悪く、50~400 ng/ml では MyHC 抗体での染色で見るとほとんど筋分化の抑制効果は見られなかった。10%ウシ胎児血清存在下での細胞増殖に対する抑制効果も、M 期のマーカーである histone H3-P 抗体でのラベリング¹⁴⁾で調べて差は見られなかった。細胞分化の誘導をかけたとき、C2C12 では MyHC の遅筋型の方が速筋型よりも優先して多数出現してくる。MSTN 阻害の効果は速筋型に対して効果が現れやす

く、遅筋型ではあまり効果がないと言われているので、C2C12 は MSTN 作用の検定系として感度が悪く、あまり適していないと考えられる。

次に、ニワトリ胚の初代培養細胞 CLM を用いて検定した。その結果、rMST-MAT 50 ng/ml で筋分化の抑制が見られ、その効果は速筋型に対して顕著であった (Fig. 4)。DF-1 細胞で発現した AR2B-DN も AR2A-DN もこの細胞へ加えると分化の促進効果が見られた (Fig. 5)。このことは遅筋型 MyHC で調べた Western blotting でも確認された (Fig. 6)。

MST-PRO と AR2A-DN, AR2B-DN では筋分化促進活性に違いがあるかどうかをさらに確認する必要があるため、これらを RCAS に組み込んで発現した。CLM での検定では AR2A-DN が有効である証拠が得られている。最終的には生体内で発現させるために、ウイルスベクターを用いた持続的な発現法を開発する必要がある。

考 察

発現パターンから、MSTN の筋分化に対す

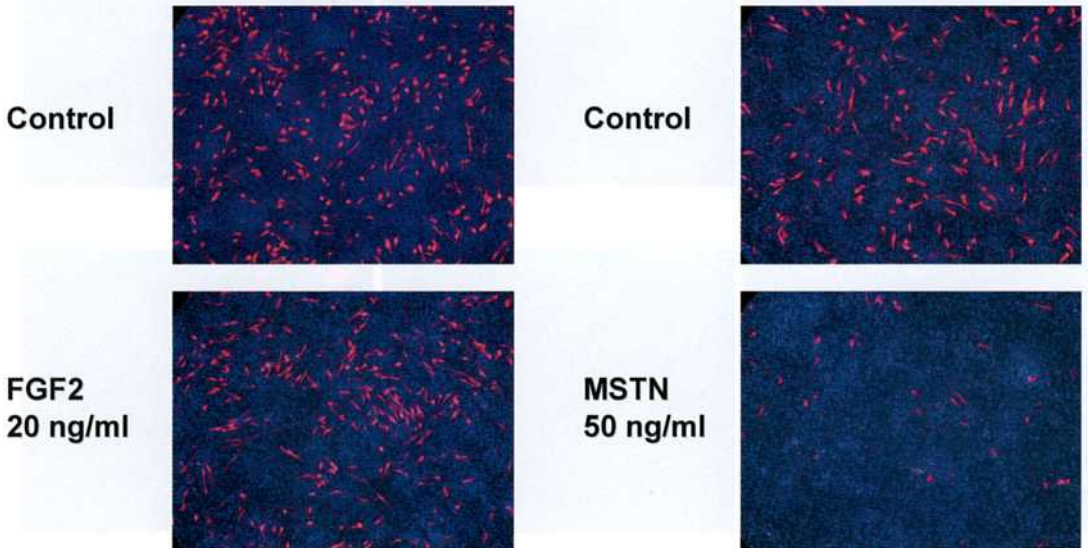


Fig. 4. Effect of recombinant FGF2 and MSTN proteins on myogenic differentiation of chicken myoblasts during high-density primary culturing. Limb bud cells from a stage 24 embryo were cultured for three days in the presence or absence of recombinant proteins, and fixed for immunofluorescent staining against fast muscle MyHC (AlexaFlour 594 label), followed by counterstaining with DAPI.

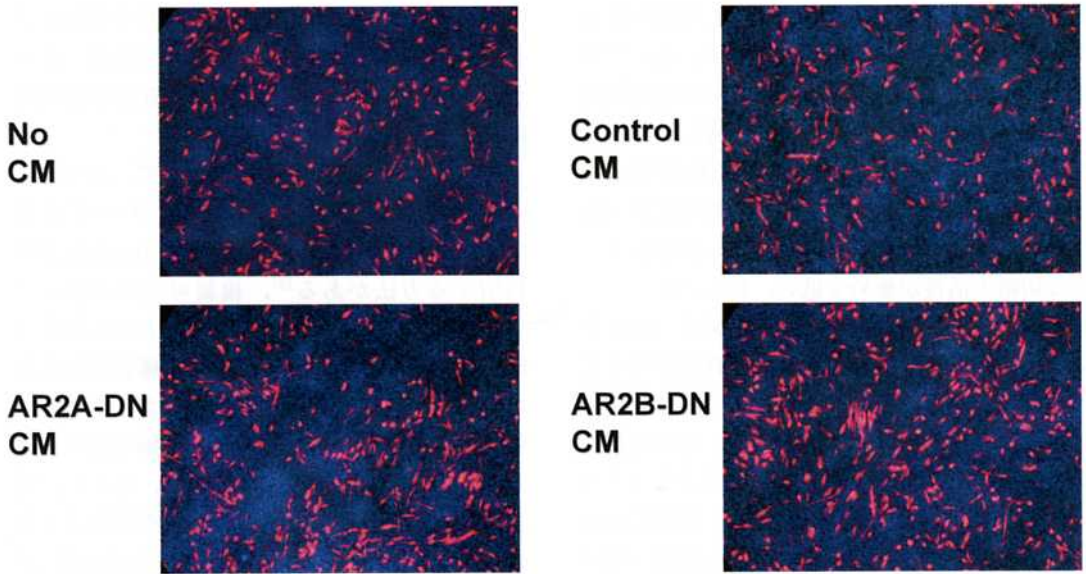


Fig. 5. Effect of AR2A-DN and AR2B-DN proteins on myogenic differentiation of chicken myoblasts during high-density primary culturing. Limb bud cells from a stage 24 embryo were cultured for three days with the serum-free conditioned medium (CM) from DF-1 cells expressing AR2A-DN and AR2B-DN. Control cells were cultured with or without control CM. Cells were fixed for immunofluorescent staining against fast muscle MyHC (AlexaFlour 594 label), followed by counterstaining with DAPI.

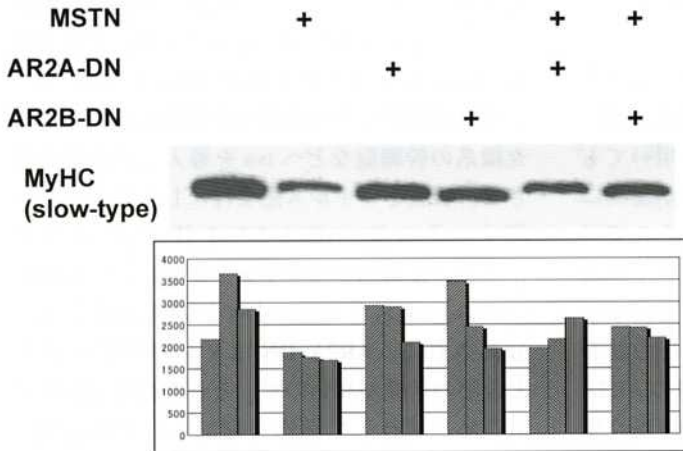


Fig. 6. Competitive effect of AR2A-DN and AR2B-DN from the conditioned medium (CM) against recombinant MSTN during myogenic differentiation of chick primary myoblasts. Limb bud cells from a stage 24 embryo were cultured for three days in the presence or absence of CM and recombinant MSTN. Myogenic differentiation was determined by Western blotting of total protein with anti-slow muscle MyHC antibody, and was detected with a peroxidase-labeled secondary antibody. The relative intensities of the bands were densitographed and typical results are shown at the top. The columns at the bottom indicate the relative intensities of the bands, determined in three independent experiments.

る抑制作用は主に ActRIIA を介していると考えられる。すなわち、筋肉細胞へと分化する前

駆細胞が最初に皮筋節から遊走するのに一致して MSTN の発現が見られる。一方、類似の構造を持つ ActRIIB は MST-MAT との結合親和性は高いが、筋肉に分化する細胞で全く発現していない。従って、筋分化に対する特異的な効果を得るためには、MSTN が ActRIIA へ結合するのを遮断することが重要であり、一方で ActRIIB へのシグナルを遮断する場合には神経細胞などに対して望ましくない効果が現れる可能性がある。欠損型受容体の MSTN に対する阻害活性が高いかどうかのみで判断するのではなく、他のシグナル分子に対する影響が出にくいという点も考慮して、MSTN 阻害活性を評価すべきである。

MSTN タンパク質の産生、分泌はシグナルペプチドに大きく依存している。すなわち、MSTN 自身のシグナル配列では培

養液中への分泌効率が低く、元来 MSTN は合成された細胞内に大部分が留まり、極めて少量しか分泌されていない。MSTN の生理活性は C 末端側のペプチド MST-MAT にあり、N 末端側 MST-PRO はその活性を阻害する。そのためプロセッシングを受けていなければ受容体との結合活性はない^{4), 15)}。さらに、細胞によっては切断の活性が極めて低い。以上のように、転写された MSTN mRNA から MST-MAT タンパク質が分泌されて標的細胞で作用するまでの道筋には多くの段階がある。この活性化に至る各段階で調節を受けているので、それぞれの段階を妨げることで生理活性を調節することができる。筋芽細胞で発現している MSTN 自身の自己増殖抑制、分化抑制作用を MST-MAT との結合タンパク質を使って阻害するのみならず、プロセッシングの阻害や分泌の阻害によっても達成することができるので、この方面での開発も必要である。

MST-PRO および Follistatin とその関連ペプチドは MST-MAT に直接結合してその受容体への結合を阻害することで筋分化を促進する作用があるが^{16)~18)}、このような作用は MST-MAT の膜受容体の細胞外ドメインを用いても達成することができる^{5), 8)}。リガンドが最初に結合する受容体は ActRII であるが、ここで示したように B 型が神経に分化する細胞で発現しているのに対し、A 型が筋分化の過程では優先して発現している。MST-MAT との結合親和性は B 型の方が高いが⁵⁾、欠損型の AR2A-DN でも AR2B-DN と同等の筋分化促進作用が確認された。発現パターンを考慮すると、AR2B-DN では神経系の発生に対する影響が現れると思われるが、AR2A-DN では MSTN 活性に対する効果が筋肉組織に対して特異的に現れるであろうと推測される。

これらの阻害ペプチドの過剰発現による遮断作用を MSTN に対して十分発揮するには、それを恒常的に発現し、供給し続けなければならない。MSTN 阻害抗体やプロペプチドを用いた実験動物での効果はタンパク質製剤の直接投

与が行われているために 1 回に大量を使用する必要があった。臨床研究でも同様である。この点が MSTN 阻害タンパク質による治療法開発の大きな障害となっている。

これを克服する 1 つの方法として、ニワトリのレトロウイルス由来のベクターである RCAS とその受容体をコードする tva 遺伝子を利用する方法がある¹⁹⁾。複製可能な RCAS ベクターはこれまでにニワトリ胚などの実験系で研究用に使用され、その安全性が確認されてきた^{20), 21)}。これらは鳥類の細胞では増殖複製可能型の感染性ウイルスであり、力価の高い組換えウイルスが効率よく産生できる。しかし、哺乳動物の細胞へこのウイルス粒子が感染するためには、細胞膜受容体をコードする tva 遺伝子の産物がウイルス受容体として必要であるが、これはマウスやヒトのゲノムには存在せず、鳥類に固有である。さらに、この tva 遺伝子をマウス細胞などへ導入した場合でも、RCAS の感染は起こるが、ウイルス遺伝子の構造の違いのためウイルスの複製が極めて悪く、実質上複製が起こらないことが確認されている^{22), 23)}。この発現系をヒトへ応用する方法としては、間充織系の幹細胞などへ tva を導入して強制発現させ、細胞をウイルス感受性にしてから患者へ戻す。その後、AR2A-DN を持つ RCAS ウイルスを直接適用すると tva を発現している細胞へのみ感染して AR2A-DN が効率よく産生、分泌される。AR2A-DN はタンパク質の産生と分泌の活性が高いので、それが循環血液中の MSTN と結合して活性を抑制し、その結果、筋分化が促進される可能性が高い。このような手順で恒常的に阻害ペプチドを供給し続ける方法であれば、筋ジストロフィーなどの筋疾患の有効な治療法になると考えられる。

このウイルスは哺乳動物の細胞内では複製することはないので、周辺の細胞へ感染が広がる可能性はなく、レトロウイルスの感染による細胞癌化などの危険性はほとんどない。このような遺伝子治療のためのデリバリー方法は開発途上にあり、今後更なる開発が期待される。

結 論

MSTN とその受容体の発現パターンおよび生物活性の検定から、欠損型の ActRIIA が内因性 MSTN 作用をブロックするのに最適であることの根拠が示された。これを筋分化に対する正の調節因子である Wnt ファミリーと併用することで、効果的な筋疾患の治療が可能となる。

遺伝子治療を適用するには導入遺伝子の発現効率の改善と安全性の確保が必要である。その方法として、鳥類のウイルスベクター RCAS

の利用と、ウイルス受容体の遺伝子 tva の導入があり、その基礎的な発現条件の検討を行った。この方法は組換えタンパク質や抗体を全身投与方法に比べて作用が持続的であるためより有効である。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、実験を補助していただいた三棹聡美さんに感謝します。また、この研究は本学プロジェクト研究費 (17-101N, 17-213T, 17-215T)、文部科学省科学研究費 (16027251) および厚生労働省科学研究費 (こころの健康科学) の助成によって行われた。

参 考 文 献

- 1) 平野茂樹：ニワトリ胚子における骨格筋の発生。生体の科学 52：261-266, 2001
- 2) Sadler TW：ラングマン人体発生学。安田峯生訳。第9版。東京、メディカル・サイエンス・インターナショナル。2005, pp 181-189
- 3) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ：Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Nature 387：83-90, 1997
- 4) McPherron AC, Lee SJ：Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci USA 94：12457-12461, 1997
- 5) Lee SJ, McPherron AC：Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc Natl Acad Sci USA 98：9306-9311, 2001
- 6) Amthor H, Huang R, McKinnell I, et al.：The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. Dev Biol 251：241-257, 2002
- 7) Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, et al.：Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. Mol Cell Biol 23：7230-7242, 2003
- 8) Lee SJ, Reed LA, Davies MV, et al.：Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. Proc Natl Acad Sci USA 102：18117-18122, 2005
- 9) Bogdanovich S, Krag TOB, Barton ER, et al.：Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature 420：418-421, 2002
- 10) Whittemore LA, Song K, Li X, et al.：Inhibition of myostatin in adult mice increase skeletal muscle mass and strength. Biochem Biophys Res Commun 300：965-971, 2003
- 11) Hamburger V, Hamilton H：A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph 88：49-92, 1951
- 12) 笹岡俊輔：ニワトリ胚の四肢形成における Wnt-Frizzled 相互作用。川崎医学会誌。印刷中, 2006
- 13) Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, et al.：Muscle satellite cells adopt divergent fates：a mechanism for self-renewal? J Cell Biol 166：347-357, 2004
- 14) Goto H, Tomono Y, Ajiro K, et al.：Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. J Biol Chem 274：25543-25549, 1999

- 15) Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, et al. : Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Letters* 474 : 71–75, 2000
- 16) Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, et al. : The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277 : 40735–40741, 2002
- 17) Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, et al. : Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1 : A novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. : *Mol Endocrinol* 17 : 1144–1154, 2003
- 18) Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, et al. : Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 15842–15846, 2003
- 19) Hughes SH : The RCAS vector system. *Folia Biologica (Praha)* 50 : 107–119, 2004
- 20) Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, et al. : Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Develop Growth Differ* 41 : 29–40, 1999
- 21) 山本康弘 : 顎顔面形態形成に関わる FGF-8 の解析. *川崎医学会誌* 31 : 151–159, 2005
- 22) Fisher GH, Orsulic S, Holland E, et al. : Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene* 18 : 5253–5260, 1999
- 23) Orsulic S : An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models. *Mammalian Genome* 13 : 543–547, 2002