

課題番号 29

骨格筋特異的 Smad2 ユビキチン化抑制による 老化モデルの作成と検証

[1] 組織

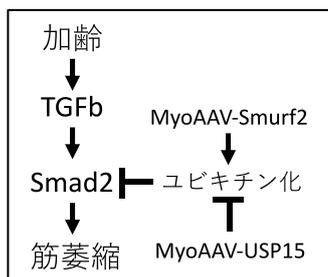
代表者：乾 雅史
 (明治大学農学部)
 対応者：久保 純
 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 57,980 円，旅費 40,020 円

[2] 研究経過

加齢に伴う骨格筋量の低下（サルコペニア）は高齢者の QOL の低下の原因であり、高齢化社会を迎える日本にとって社会的に解決が望まれる重要な疾患の一つである。骨格筋量はミオスタチン等の TGF β シグナルで負に制御されている。TGF β リガンドを受容した骨格筋細胞では、細胞内シグナル伝達因子 Smad2/3 のリン酸化による Smad 経路の活性化が起こり、Akt の抑制などを通じて骨格筋特異的ユビキチンリガーゼ（Atrogin-1 や MuRF1）を活性化し、筋萎縮を誘導する。また老化した筋肉において、Smad2/3 タンパク質が蓄積しているという報告もあり、TGF β から標的遺伝子の活性化に至るシグナル伝達経路に干渉することができれば骨格筋量の制御、将来的にサルコペニアに対する治療法の開発につながると期待されている。

そこで本共同研究では、加齢研担当教員・久保博士確立した、骨格筋特異的な感染指向性を示す MyoAAV システムを用い、骨格筋特異的に Smad2 ユビキチン化酵素 Smurf2 および脱ユビキチン化酵素 USP15 を過剰発現させることで、骨格筋特異的に Smad2 のユビキチン化を促進あるいは抑制し、筋重量の変化を観察することを目的とした（下図）。



さらに、これにより起こる変化が自然な加齢に伴う骨格筋減少（サルコペニア）とどの程度関連があるかを検証するために老齢マウスの骨格筋における遺伝子発現プロファイルと比較を行うことを通じ、老齢マウスの骨格筋において、Smad2/3 のユビキチン化による制御の役割を検証することを目的に研究を行なった。以下、研究活動状況の概要を記す。

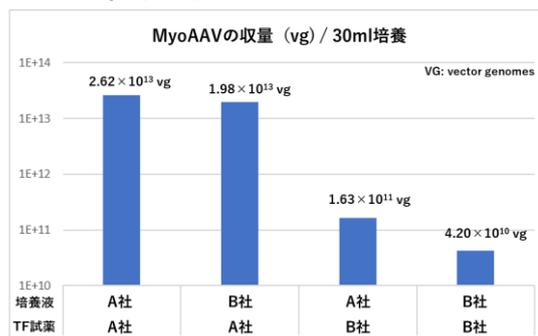
本年度は 12 月 6-7 日の 2 日間にわたり加齢研において打ち合わせ及び MyoAAV の精製に関わる実験を行った。また Smad2 のユビキチン化を促進または抑制した際の老齢マウスの骨格筋の変化を評価することを目的として、老齢マウスへの MyoAAV の投与実験、筋力の測定の予備実験を行った。

その前後の代表者の所属機関での実験と合わせて以下のような研究成果を得た。

[3] 成果

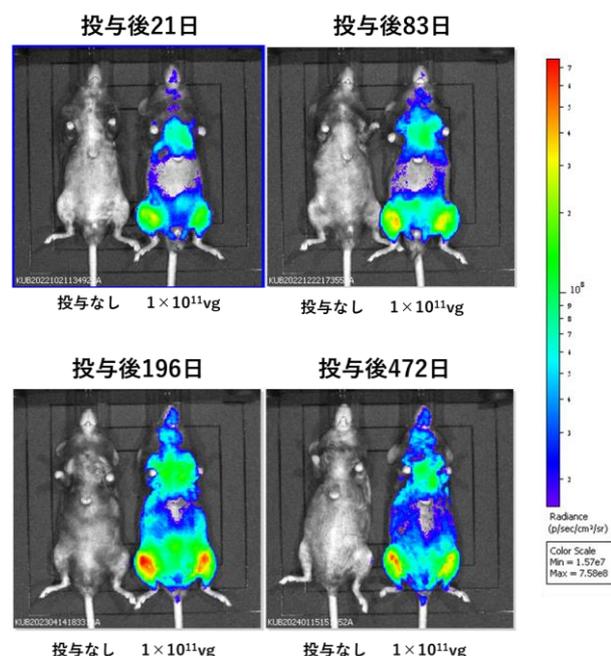
(3-1) 研究成果

第一に、MyoAAV を産生する細胞の培養やトランスフェクションの条件を最適化することを目的として、複数のメーカーの培養液、トランスフェクション試薬を検討した（以下、A 社、B 社とする）。培養液に関しては、A 社、B 社のいずれを使用しても細胞の増殖に問題は無く、30ml の培養スケールで 10^{13} vg 以上の収量を得ることができた。一方で、トランスフェクション試薬については、B 社のトランスフェクション試薬では MyoAAV の産生量が極めて少ない結果であった。AAV の収量はセロタイプや培養条件によっても、変化するため、B 社のトランスフェクション試薬の性能が一概に悪いとは決めつけることはできないものの、MyoAAV の作製においては A 社の方が優れている可能性がある。（下図）



第二に、骨格筋での発現特異性を増すことを目的に、MyoAAV でGOI を発現させるプロモーターについて比較検討を行った。これまでに AAV に搭載された実績のある Mhck7 プロモーターと dMck プロモーターを比較検討した。尾静脈からの全身投与では、どちらのプロモーターを用いても骨格筋で発現を誘導することができた。しかし、骨格筋以外にも心臓での発現が誘導された。心筋でのトランスジーンが発現が個体の生存に影響を及ぼすような場合には、これらのプロモーターも使用が適切ではない可能性があり、AAV に搭載可能で、より骨格筋に特異的なプロモーターの開発が望まれる。誘導されるトランスジーンが発現量について比較したところ、dMCK プロモーターよりも Mhck7 プロモーターの方が誘導される発現量が高いことが確認された。また、この実験の過程で代表者乾は対応者久保から MyoAAV 産生の手法を学び、Smad2 ユビキチン化酵素群の誘導に資する技術を身につけた。

最後に、老齢マウスに対して、MyoAAV を尾静脈から全身投与する実験を行った。今後、この老齢マウスの解析を進めていく予定である。驚いたことに、MyoAAV の投与後、長期間にわたってトランスジーンが発現が持続することが分かった。下図に示すように、14 週齢で MyoAAV を投与したマウスでは、投与後 472 日 (82 週齢) の老齢期にでも発現が持続していた。



MyoAAV を投与した老齢マウスの筋力を評価するために、老齢マウスを用いて筋力測定の予備実験を行った。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では上記のような実験の成果に加え代表者、対応者、協力者の間で頻繁な情報のやり取りを

行うことから、本研究計画の枠組みを超えた活発なディスカッションが行われた。代表者及び対応者それぞれに有用な研究のアイデアや手法のアドバイス、今後の共同研究の方向性などの波及効果が得られ、加齢研と学外の研究者との交流が促進された。

[4] 成果資料

(1) 山崎勇輝, 乾雅史 “Smad2dPY モチーフ欠損マウスの骨格筋の解析” 第 8 回 若手による骨格筋細胞研究会

(2) Sakamoto K, Yamasaki Y, Hitachi K, Kubo A, Inui M, et al. “Smad2 ubiquitination regulates skeletal muscle mass in age dependent manner” 投稿準備中