

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：転写共役因子 TAZ 活性化による筋萎縮治療

Development of TAZ inhibitors to prevent and treat sarcopenia

研究開発実施期間：2017年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：畑 裕

Yutaka Hata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 医歯学系専攻 病態代謝解析学分野・教授
Department of Medical Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の背景と目的

加齢性筋萎縮は高齢者が要介護になる原因の25%を占め、近い将来、脳血管障害を抜いて、第一位になると予測されている。したがって、加齢性筋萎縮は少子高齢化が進む社会が対処すべき重要な医療課題である。しかし、まだ有効な治療薬がない。転写共役因子 TAZ は骨格筋形成の主要な制御転写因子 MyoD と共役し、間葉系組織幹細胞の筋分化を促進する。マウスを使った実験により、骨格筋が損傷し修復するときには骨格筋での発現が上昇し、骨格筋に人為的に TAZ を過剰発現すると、骨格筋量が増すことが示されている。これらの知見から、TAZ の活性を高める薬剤は、骨格筋の萎縮を予防、回復させる作用があると期待される。不死化ヒト乳腺上皮 MCF10A 細胞は、TAZ の活性を高めると、無血清浮遊培養条件下でも生存が可能となり、スフェアと呼ばれる特徴的構造を作る。私たちは TAZ を発現する MCF10A 細胞にスフェア形成能を付与する低分子化合物を探索し、複数の TAZ 活性剤候補を獲得した。次に、これらの化合物をマウス筋芽 C2C12 細胞に投与し、筋分化を促進する化合物を選抜した。うち1つの化合物は、マウス骨格筋における蛇毒による損傷修復実験において修復を高め、ステロイドによる筋萎縮を予防した。その化合物の誘導体の中には C2C12 細胞に 10^{-6} M 以下の低濃度で効果を示すものがあった。また別の化合物もステロイド性、ギプス固定による廃用性筋萎縮に予防的に作用した。

本研究では、この2化合物について、筋量増加効果のみならず、筋力増強効果を示すかを調べることで、直接の標的分子を同定して作用機序を解明し、より有効な化合物の開発につなげることを目的とした。

研究開発の結果

対象とした2つの TAZ 活性剤とそれに由来する誘導体をマウス筋芽 C2C12 細胞に作用させ、筋分化マーカーが

誘導される以前に発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。これにより 1 つの TAZ 活性剤の誘導体では血管内皮増殖因子によって変動する遺伝子の発現が、もう 1 つの TAZ 活性剤ではインターフェロングによって変動する遺伝子の発現が誘導されることが判明した。誘導される遺伝子が異なる事実は、2 つの TAZ 活性剤が異なる標的分子を介して TAZ を活性化することを支持する。

対象とした TAZ 活性剤、ないし、それに由来する誘導体をリガンドとしてマトリックスに結合させたビーズ(化合物ビーズ)を作製し、C2C12 細胞と MCF10A 細胞から調製したサンプルを、化合物ビーズとインキュベートしたのち、非特異的に結合する蛋白を洗い落とし、化合物ビーズに残存する蛋白を SDS-PAGE 電気泳動により展開した。化合物ビーズにのみ結合した蛋白バンドを切り出し、質量分析により同定した。化合物をマトリックスに結合させる方法、マトリックスの材質、細胞からのサンプル調製方法を複数採用し、種々の組み合わせにより実験を反復した。その都度、化合物ビーズに特異的に結合する蛋白が確認されたが、再現性をもち、かつ、明瞭に多量に結合する蛋白は認められなかった。また、遺伝子解析が示唆する血管内皮増殖因子やインターフェロングシグナルに関係する分子も確認されなかった。しかし、念のため筋分化に関係する可能性がある分子については、C2C12 細胞においてノックダウンし、化合物の効果が失われるか検証したが、有意な結果は得られなかった。化合物に 2 つの反応基を導入し、片方の反応基を紫外線照射によって標的分子に共有結合させ、その後、残りの反応基にビオチンあるいは蛍光分子を結合させ、前者についてはストレプトアビジンビーズにより単離を、後者については蛍光顕微鏡下で観察を行う実験(光親和性標識法)も試みた。後者により細胞内に蛍光シグナルが観察されたが、前者による標的分子同定においては、前述の化合物ビーズを用いる実験と同じく再現性のある候補分子の同定に至らなかった。

筋力に対する効果に関しては、当初、小動物用四肢握力測定装置による握力評価、強制回転かごによる運動量評価による解析を試みた。前者においては、上肢の握力の寄与のため、ギプス固定により下肢を萎縮させても、下肢の握力低下を評価できなかった。後者においては、マウス個体間の差が大きく、安定した結果が得られなかった。最終的に、マウス下肢をギプス固定して廃用性筋萎縮を起こし TAZ 活性剤、ないし、その誘導体を局所注入し、廃用による筋力低下に対する効果を、総脛骨神経刺激時に腓腹筋に生じる等尺性筋張力により評価した。筋量が低下しても筋力が有意に低下しない、あるいは、ギプスを外すと短時間で筋萎縮から回復するなど実験上の制約もあり、有意な効果が観察されなかった。

同定された標的分子の構造をもとに、より親和性の高い化合物誘導体を合成することが当初、計画されていた。上述のように標的分子同定に至らなかったため、この部分は実行されなかった。種々の方法で誘導体をマトリックスに固定する目的で、反応基を導入した新しい誘導体の合成を行った。

セット・アップ企業の塩野義製薬は、2 つの TAZ 活性剤のうち、誘導体合成が先行し、低濃度で C2C12 細胞に効果を示すことが東京医科歯科大学によって示されていた TAZ 活性剤の解析を行った。元の化合物は塩野義製薬が使用する C2C12 細胞に対しては筋分化促進効果を示さなかった。ステロイドによる筋萎縮に対して腹腔内投与による効果を判定したが、やはり東京医科歯科大学が得た結果が再現されず、筋萎縮に対する予防効果を認めなかった。腹腔内投与後、3 時間には血漿中に化合物とその代謝産物が検出されたが、24 時間後には検出されなかった。化合物を局所投与することも検討したが、生理食塩水注入によって筋線維の形態変化が観察されたため、行わなかった。誘導体の効果は塩野義製薬が使用している C2C12 細胞によっても再現されたが、肝ミクロソーム安定性試験で 30 分後にほとんど分解されてしまったためマウスへの投与実験は行わなかった。

考察、および、今後の展望

本研究で目的とした TAZ 活性剤の標的分子同定と筋力効果の確認のいずれにおいても所期の結果を達成することができなかった。

対象とした 2 つの TAZ 活性剤が、MCF10A 細胞において示すスフェア形成誘導効果、C2C12 細胞において示す筋分化促進作用は、TAZ の発現抑制で失われるので、両化合物が TAZ の活性化に関係する分子を標的とする

ことは間違いない。片方の化合物については、光標識親和法を用いて標的分子を可視化すると、細胞内にシグナルが観察され、標的分子が量的にも十分量存在することが示唆されるにもかかわらず、その分子が同定できなかった。その理由としては、標的分子が難溶性である、可溶化のために加えた界面活性剤の存在下では化合物に結合しない、不安定である、などの可能性が考えられる。

加齢に伴う筋萎縮は生理的現象とみられがちであるが、白髪、禿頭、皮膚の皺などと異なり、高齢者の生活の質を著しく低下させ、要介護の原因になり社会的影響が大きい。本研究が進行中の 2018 年に加齢性筋萎縮の定義の見直しが行われた (European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) 2)。その中で加齢性筋萎縮は筋肉の病気として明瞭な位置づけが与えられた。加えて、加齢性筋萎縮を診断する基準となる指標が乏しい現状の指摘、便宜上、筋力や歩行速度の低下を根拠として加齢性筋萎縮の診断が下されるが、これらは症状であり、疾病としての加齢性筋萎縮の核心ではない点への注意喚起、加齢性筋萎縮を基礎づける変化は、症状が顕在化する以前から進行している可能性が高く早期の予防的介入が望まれるという勧奨もなされた。すなわち、今後は、加齢性筋萎縮の病理を分子レベルで明らかにし、分子変化に基づく早期発見、病像の核心を構成する標的を対象とする予防・治療が求められることになる。本研究では、対象とした TAZ 活性剤の標的分子を同定できず、「標的分子の構造に基づいて、より活性の高い化合物を合成し、動物実験に持ち込み、TAZ を対象とする介入が、加齢性筋萎縮治療として有効であることを立証する」という計画を遂行できなかった。しかし、加齢性筋萎縮治療の標的として TAZ が有望な分子であることに変わりはなく、加齢性筋萎縮の見直しが行われた今日、むしろ、その重要性は増したともいえる。MCF10A 細胞を用いるスクリーニング系に立ち帰り、候補となる TAZ 活性剤の母集団を増やし、標的分子同定が可能な TAZ 活性剤を選抜するというような発想の転換が必要と考える。

Sarcopenia results in physical disability and causes incident falls and bone fractures. Sarcopenia adversely affects metabolic and mental function. Eventually old people with severe sarcopenia become unable to lead an independent life. Thus, sarcopenia generates enormous social burden in ageing society. Combination of appropriate nutrition and exercise is effective for prevention and therapy. However, patients with severe sarcopenia cannot tolerate exercise itself. Hence, drugs to increase skeletal muscle mass and strength are awaiting.

TAZ, a transcriptional co-activator, interacts with various transcription factors and up-regulates various genes. In mesenchymal stem cells, TAZ activates MyoD-mediated transcription and promotes myogenesis. Animal models reveal that TAZ expression is enhanced during skeletal muscle repair after injury and that forced expression of TAZ increases skeletal muscle mass. Based on these findings, we hypothesized that TAZ activators increase skeletal muscle mass and be useful to treat sarcopenia. TAZ activation in mammary epithelial MCF10A cells enables cells to survive under serum-free floating condition and to form spheres. By using this sphere formation as a read-out, we screened for and identified TAZ activators. We subsequently selected TAZ activators that facilitate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells. In this project, we focused on two TAZ activators and attempted to identify their direct targets. We also evaluated their effect on skeletal muscle strength.

We fixed TAZ activators and their derivatives to several matrixes to generate affinity beads, which we incubated with cell extracts from MCF10A and C2C12 cells. After washing, we analyzed proteins on the beads on SDS-PAGE and identified by mass spectrometry proteins that specifically bound to affinity beads. We repeated experiments with various modifications but all attempts were unsuccessful. We also used a photoaffinity labeling method for one of TAZ activators. In this method, two reactive residues are introduced into TAZ activator. One residue is photoactivated and TAZ activator is covalently linked to its target.

Subsequently, the other residue is labeled with biotin and immunofluorescent tag for isolation and detection, respectively. In this attempt, we could indeed observe signals in cells but could not isolate a target.

To assess the effect on skeletal muscle strength, we induced muscle atrophy in mouse lower limbs by cast immobilization and locally applied TAZ activators. We measured isometric strength of gastrocnemius muscles by stimulating common tibial nerves. We could not reveal the significant effect of TAZ activators.

In sum, we failed to achieve the aims of this project. Even so, we still believe that TAZ is one of key molecules to regulate skeletal muscle homeostasis and that the development of TAZ activators as drugs against sarcopenia is worthwhile to continue in future.

III 事後評価総合所見

超高齢社会において要介護の原因の一つであるサルコペニアは、アンメットニーズの高い疾患であり、本研究における転写共役因子TAZに着目するサルコペニア研究は、本課題の研究代表者のオリジナルであり、新規性の高いものです。

一方で、ケミカルバイオロジー手法によるヒット化合物のターゲット分子探索研究やin vivo筋力増強効果の評価試験に果敢に取り組んだが、ヒット化合物に特異的に結合するタンパク分子の同定、筋萎縮改善による治療効果の確認ができませんでした。

改めて、表現型スクリーニングで得られたヒット化合物の資質を裏付ける研究の必要性が明らかとなったと考えますので、今後の展開に期待します。