

主論文の要旨

**Meclozine ameliorates skeletal muscle pathology and
increases muscle forces in *mdx* mice**

〔メクロジンはmdxマウスにおいて骨格筋の病理を改善し、
筋力を増強させる〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

川村 佑介

【緒言】

デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は 3500 人に 1 人発生する dystrophin 遺伝子に変異を有する伴性劣性の筋疾患であり、ステロイド以外には有効な治療法は確立されていない。また、mdx マウスは dystrophin をコードする X 染色体連鎖遺伝子(Dmd)に変異を有し、生後 3 週から筋繊維の変性が始まるが、8.5 週以降は代償タンパク utrophin の影響もあり、筋変性は徐々におさまっていく。今回我々はドラッグリポジショニングの手法を用いて臨床応用可能な筋変性に有効な薬剤を探索し、酔い止めとして使用される抗ヒスタミン薬のメクロジンを同定し、ヒトの筋芽細胞及び mdx マウスに対して有用な効果を示したので、報告する。

【対象および方法】

ヒト筋芽細胞として、ウマ血清や ITS (insulin-transferrin-selenite)を含んだ分化 medium に変更すると多核の myotube(筋管細胞)を形成する Hu5/KD3 細胞を使用した。Hu5/KD3 細胞に 1186 種の FDA 既認可薬を加えて細胞数を測定する MTS assay によって評価し、筋肉細胞に有効な薬剤としてメクロジンを同定した。

メクロジンを Hu5/KD3 細胞に投与し、細胞増殖を測定する BrdU assay により増殖への影響を、細胞形態観察により分化への影響を、Western blotting により分化段階のマーカータンパクである MyoD と MYH の発現量への影響を、それぞれ調べた。次に分化への影響が可逆的なものであるかどうかを調べるために、Hu5/KD3 細胞に 7 日間メクロジンを投与した後にさらに 7 日間メクロジンを投与し続ける群と 7 日以降メクロジン投与を止める群に分け、細胞形態観察と Western blotting を行った。

メクロジンの mdx マウスへの影響を調べるために、3 週齢の mdx マウスに対して、ゾンデを経口的に胃内へ挿入してメチルセルロースに溶解させたメクロジンを 1 日 1 回 2 週間投与した。1 週間に 1 回体重を測定し、メチルセルロースのみを投与したコントロール群と体重増加について比較した。また、2 週間のメクロジン投与後にマウスを解剖し、前脛骨筋、下腿三頭筋、大腿四頭筋の筋重量を測定した。2 週間のメクロジン投与後にはマウスの運動機能について調べるために、前肢での握力測定と、ロタロッドテスト(回転する棒からの転落までの時間)も行った。さらに、遅筋であるヒラメ筋と速筋である長趾伸筋について凍結切片を作成し、HE 染色による組織学的評価を行った。以前当教室では、軟骨細胞において軟骨無形成症の原因となっている FGFR3 が古典的 MAP キナーゼである ERK のリン酸化を上昇させ、メクロジンがその上昇を抑制することを発表している。最後に、筋肉でのメクロジンの作用機序を明らかにするため、前脛骨筋からタンパクを抽出し、Western blotting により ERK のリン酸化について比較を行った。

【結果】

Hu5/KD3 細胞へのメクロジン処理によって、MTS assay もしくは BrdU assay 双方において細胞数の増加が示された(Figs. 1BC)。分化 7 日目での分化の状態を観察すると

メクロジン処理群ではコントロールと比べて myotube 形成が抑制されていた (Fig. 1D)。また、Western blotting により、メクロジン処理は分化の初期で発現される MyoD タンパクの発現量を増加し、分化の後期に発現される Myh タンパクの発現量を抑制した (Fig. 1E)。この myotube 形成の抑制が不可逆的であるかどうかを調べるために、メクロジンを分化 7 日目まで処理後この処理を継続する群と中止する群で比較を行い、処理を中止すれば再度 myotube 形成が促進することが分かった (Fig. 2)。

mdx マウスへのメクロジン経口投与によって、体重 (Figs. 3AB) と筋重量ともに増加した (Fig. 3C)。また、運動機能テストではメクロジン投与によって前肢の握力が増加し (Fig. 3D)、回転する棒からの転落までの時間が延長することが示された (Fig. 3E)。

Mdx マウスの筋繊維における中心核の測定により、病的な筋損傷、修復、再生を検討したところ、メクロジン投与によって中心核の数が減少した (Fig. 4A)。

Mdx マウスの筋組織における ERK のリン酸化状態の測定では、メクロジン投与によって ERK のリン酸化が抑制された (Fig. 4B)。

【考察】

本研究では筋肉細胞の生存や増殖に正に働き、筋分化を不可逆的に変化させない薬剤として抗ヒスタミン薬であるメクロジンを同定した。当教室及び他研究室により、メクロジンは軟骨無形成症や骨髄由来のマクロファージにおいて ERK のリン酸化を抑制すると発表されており、本研究では mdx マウスの骨格筋においても同様の効果を示した。また、ERK の上流の MEK の inhibitor であるセルメチニブもまた ERK を抑制し、Emery-Dreifuss 型の筋ジストロフィーや癌のカヘキシアにおいて筋機能を向上させたと報告されている。C26 未分化癌の担癌マウスでは体重、筋機能の低下に伴って ERK リン酸化の増加が見られ、このマウスへの ERK inhibitor の投与により体重や筋機能低下が抑制されたという報告もある。さらに別の発表ではアンギオテンシン受容体拮抗剤が ERK のリン酸化を抑制し、mdx マウスの骨格筋の線維化を抑制したと報告されている。これらと本研究の結果を踏まえると、メクロジン経口投与による体重・骨格筋の重量増加と運動機能の向上は、メクロジンが筋肉細胞において ERK のリン酸化を抑制することを介していると考えられる。

当教室及び他研究室により、メクロジンは経口投与により一定の濃度では眠気、頭痛、吐き気等の比較的小さな副作用のみを示すことが証明され、酔い止めとして大人にも子供も長年使われてきている。大腸がん、軟骨無形成症、パーキンソン病などに加え、本研究の結果により筋ジストロフィーの治療薬になり得ると期待される。またメクロジンが筋細胞において効果を示すことから、他のカテゴリーに属する抗ヒスタミン薬も筋ジストロフィーの治療薬として検討されうると考えられる。

【結語】

本研究ではメクロジンは筋芽細胞 Hu5KD3 の増殖を促し、3 - 5 週齢の mdx マウスにおいて骨格筋の成長を促進し運動機能を向上させた。メクロジンやメクロジンから

派生した薬剤は将来 DMD や他の筋疾患に対して新しい治療選択肢となることが期待されている。