

サルコペニア発症の細胞・分子メカニズム解明および治療法開発に向けた基盤研究

(28-21)

主任研究者 上住 円 国立長寿医療研究センター 細胞再生研究室長

研究要旨

骨格筋は身体活動を司る組織であり、その機能低下は QOL (quality of life) や ADL (activities of daily living) の低下に直結する。高齢者における筋量や筋機能の低下(サルコペニア)は転倒や骨折を誘発し、要介護状態や寝たきり、死へとつながる。よって、健康的に老いるにはサルコペニアを予防・治療することが極めて重要となり、そのためにはまず、サルコペニアの発症メカニズムや筋量回復のメカニズムを理解する必要がある。

本研究では、サルコペニア発症の要因と考えられる細胞・分子レベルの加齢変化や筋量回復に重要と考えられる骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)に着目し、マウスを用いた基礎研究に取り組んだ。独自に見出した骨格筋内の血管・神経筋接合部の異常、および、筋の維持に必須な間葉系前駆細胞の加齢変化に着目し、サルコペニア発症の分子メカニズムを探った。また、筋萎縮からの回復療法開発への発展を目指し、筋量回復過程における筋衛星細胞の必要性を精査した。このように本研究は骨格筋老化の背景を成す本質的問題に対して包括的に取り組み、その解決を目指すもので、本研究によりサルコペニアの発症および進行メカニズムの解明が期待できると同時に、科学的論拠に基づいた予防・治療法の開発が可能になると考えられる。

主任研究者

上住 円 国立長寿医療研究センター 細胞再生研究室長

分担研究者

上住聡芳 藤田保健衛生大学 講師

深田宗一郎 大阪大学 招聘准教授

A. 研究目的

現在、我が国では平均寿命と健康寿命の間に約10年の乖離があり、健康的に老いることの重要性が高まっている。骨格筋は身体活動を司る組織であるため、その機能低下は QOLやADLの低下に直結する。特に、高齢者における筋量や筋機能の低下(サルコペニア)は転倒や骨折を誘発し、それらによって被る長期間の不活動は、さらなる要介護状態や寝たきりを引き起こす要因となる。よって、サルコペニアを予防・治療することは健康長寿実現の鍵になるが、サルコペニアの発症メカニズムは不明で、有効な治療法も

無いのが現状である。

そこで、本研究ではサルコペニア発症の要因と考えられる細胞・分子レベルの加齢変化を精査し、サルコペニア発症のメカニズム解明に取り組む。また、筋量回復過程における骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の重要性を明らかにする。

## B. 研究方法

### I. 老化による骨格筋内の血管・神経筋接合部の異常に着目した研究（主任：上住円担当）

血管や神経筋接合部の加齢変化はサルコペニアに強く関与すると考えられているが、その分子メカニズムについては不明である。我々は、老化マウス（25ヶ月齢）と若齢マウス（3ヶ月齢）の下肢骨格筋組織を用いた抗体アレイ解析により、老化筋の血管や神経筋接合部で異常に高発現・蓄積する分子 MFG-E8 (Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8) を独自に見出しており、この分子に注目することでサルコペニア発症メカニズムを探求する。

本年度は、老化筋での MFG-E8 の発現増加がサルコペニアの発症原因となりうるか否かを調べた。老化過程のどの時期から MFG-E8 の異常蓄積および筋重量の減少が見られるのかを、6,9,12,15,18,21,24,28ヶ月齢のマウス（各 n=5-10）を用いて経時的に調べた。

### II. 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の筋維持機構に着目した研究（分担：上住聡芳担当）

筋間質に存在する間葉系前駆細胞を欠損させると急速にサルコペニア様の表現型を呈する。このことから間葉系前駆細胞は筋の維持に必須の細胞であり、その加齢変化はサルコペニアを導く要因と考えられる。我々は、間葉系前駆細胞欠損筋、および、老化マウス由来間葉系前駆細胞の遺伝子発現解析データをすでに得ており、これらのデータを用いて、老化に伴い間葉系前駆細胞で発現変化しサルコペニアを誘導すると考えられる候補遺伝子の絞り込みを行った。絞り込まれた遺伝子群に含まれた TGF- $\beta$ スーパーファミリーの一つ X に注目し機能解析を行った。ヒト骨格筋から単離した高品質な myogenic 細胞を用いて、ヒト骨格筋に及ぼす X の作用を精査した。X をヒト筋管細胞に作用させた後、MyHC の染色による細胞面積の定量評価、ウェスタンブロットによる下流シグナルの解析を行った。

### III. 筋萎縮からの筋量回復における筋衛星細胞の機能に着目した研究（分担：深田宗一郎担当）

骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は定常状態の筋の維持には必須でないことが報告されたが、筋量の回復過程では必要な可能性がある。本分担研究では筋衛星細胞を欠損させたマウスを利用し、筋萎縮からの筋量回復過程における筋衛星細胞の重要性や機能を精査した。

○ギプス固定モデル

麻酔下で、固定する足を延ばした状態でサージカルテープを用いて固定をした。次に、水

に浸したスコッチキャストプラス-Jをサージカルテープで固定した足にまいた。指先および大腿部に過剰にはみ出たキャストを切り、個別飼育を行った。1週間程度でゆるみやかじられることによるキャストの損傷があるので再度麻酔して巻きなおした。

○筋衛星細胞欠損モデル

Pax7-CreERT2 と Rosa-DTA マウスを交配し、Pax7-CreERT2::Rosa (DTA/+)マウスを作成した。コントロールとしては Pax7-CreERT2::Rosa (+/+) マウスを用いた。これらマウスに、タモキシフェンを投与し、それから2週間後にギプス固定を2週間行った。2週間後に、ギプスを取り除き、萎縮した筋の回復を12日間誘導した。解析を行った筋として、前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋の乾燥重量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立長寿医療研究センターの実験動物管理委員会、動物実験倫理委員会、および、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認を得ており、関連法令に加えて、科学的、動物愛護、環境保全、安全確保の観点からも十分に考慮し実験を遂行した。

ヒトサンプルを用いる実験に関する個人情報保護や倫理面での対策は、藤田保健衛生大学の医学研究倫理委員会の審査・承認を得ることで対応済みである。

## C. 研究結果

### I. 老化による骨格筋内の血管・神経筋接合部の異常に着目した研究(主任:上住円担当)

下肢筋重量の有意な減少は24ヶ月齢以降で見られるのに対し、MFG-E8の蓄積は少なくとも18ヶ月齢で既に認められることが分かった。このことから、MFG-E8の蓄積は筋重量の減少に先行して起こることが明らかとなり、サルコペニアの発症原因となる可能性が示唆された。

### II. 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の筋維持機構に着目した研究(分担:上住聡芳担当)

我々は、すでにヒト骨格筋から高品質な myogenic 細胞の単離・培養系を確立し報告している。本手法から得られたヒト筋管細胞に X を添加し、その作用を解析した。まず、X の添加により筋管の面積が増加する傾向が得られた。X の作用機序を追究する目的で細胞内シグナルを精査したところ、X の刺激によりヒト筋管細胞において筋肥大シグナル経路が活性化されることを見出した。

### III. 筋萎縮からの筋量回復における筋衛星細胞の機能に着目した研究(分担:深田宗一朗担当)

○ギプス固定モデルの検証

C57BL/6マウスを用いた検討において、ギプス固定を除いた後に、筋量の回復率は、前脛骨

筋、腓腹筋、長趾伸筋、ヒラメ筋で、それぞれ12日目で元の82%, 80%, 93%, 87%、20日目で88%, 90%, 98%, 88%まで回復することが明らかとなった。

#### ○筋衛星細胞欠損モデル

予備検討により、筋衛星細胞が90%減少していることを単一筋線維培養法によりまず、確認を行った。その状況下において、コントロールと筋衛星細胞欠損マウスでギプス固定からの回復に違いが認められなかった。コントロールの数十分ではないが、ギプス固定からの回復に筋衛星細胞は必要ないと考えられる。

### D. 考察と結論

#### I. 老化による骨格筋内の血管・神経筋接合部の異常に着目した研究(主任:上住円担当)

老化による血管(動脈)でのMFG-E8の発現増加は、既にラットやヒトの大動脈で見られることが報告されており、MFG-E8とアテローム性動脈硬化との関連についてもいくつか報告がある。また、動脈硬化で見られる動脈スティフネスの亢進(動脈壁の物理的柔軟性の喪失)と中高年における大腿筋重量の減少が相関関係にあることが報告されている。これらのことから、加齢に伴うMFG-E8の発現増加が筋重量減少の原因となる可能性が十分考えられる。さらに、MFG-E8は神経筋接合部で発現が認められ、老化筋でその発現は著しく増加するが、本知見は我々が独自に見出した発見である。老化筋では、一部の筋線維で運動神経の脱落が認められ、これが老化による筋力低下の最も大きな要因であると考えられている。この運動神経の脱落に神経筋接合部でのMFG-E8の発現増加・蓄積が関与しているのかを今後明らかにし、サルコペニアの発症メカニズムの解明を目指していきたい。

#### II. 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の筋維持機構に着目した研究(分担:上住聡芳担当)

独自に開発した間葉系前駆細胞欠損マウスや老化マウスを駆使することで、老化間葉系前駆細胞で発現低下することでサルコペニアが誘導されると考えられる候補因子を絞り込んだ。その中の一つであるXの機能解析を行い、Xはタンパク同化シグナルを活性化することで筋線維を維持する、間葉系前駆細胞由来栄養因子であると結論づけられた。

#### III. 筋萎縮からの筋量回復における筋衛星細胞の機能に着目した研究(分担:深田宗一朗担当)

筋衛星細胞を除去したマウスとコントロールマウス間で、ギプス固定からの回復率に違いが認められなかった。この結果は、ギプス固定からの筋量回復に筋衛星細胞が関与していない事を示唆している。

レジスタンストレーニングモデル(筋トレ)で誘導される筋肥大では、筋衛星細胞による核の供給が起きており、筋肥大に筋衛星細胞が必要である事が報告されている。今回の我々の結果と、これまでの報告をあわせて考えると、筋量が増加するというプロセスは同

じであっても、もとの状態に戻る場合（今回の実験）と元のサイズよりも大きくなる場合（筋肥大モデル）では、筋衛星細胞の貢献は大きく異なる事を示している。今後、なぜ、筋量が増加するという結果が同じであるにも関わらず、筋衛星細胞の貢献度が異なってくるのかを明らかにする事で、サルコペニア等の筋萎縮の治療法開発の一助になると期待できる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

（主任：上住 円）

- 1) Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. Cell surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports*. 7(2): 263-78, 2016.

（分担：上住聡芳）

- 1) Uezumi A\*, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. Cell surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports*. 7:263-278, 2016. (\*corresponding author)

- 2) Uezumi A\*, Kasai T, Tsuchida K. Identification, isolation and characterization of mesenchymal progenitors in mouse and human skeletal muscle. *Methods Mol Biol*. 1460:241-253, 2016. (\*corresponding author)

（分担：深田宗一郎）

- 1) 竹本裕政, 深田宗一郎: 「筋衛星細胞の維持機構及び加齢性筋萎縮への関与」  
*Clinical Calcium*. 2017, 27(3): 339-344.
- 2) Rodrigues M, Echigoya Y, Maruyama R, Lim KR, Fukada S, Yokota T. Impaired regenerative capacity and lower revertant fibre expansion in dystrophin-deficient mdx muscles on DBA/2 background. *Sci. Rep*. 2016, 6: 38371.

##### 2. 学会発表

（主任：上住 円）

- 1) Ikemoto-Uezumi M. Two aspects of skeletal muscle aging -primary sarcopenia

- and aged muscle regeneration-. Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School “Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration”, USA. Aug 2016.
- 2) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Hashimoto N. MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age. FASEB SRC, USA. Jul 2016.
  - 3) 上住 円, 上住聡芳, 橋本有弘. サルコペニアの発症または進行に関与する因子の探索. 第2回日本筋学会学術集会 東京 2016年8月.
  - 4) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Hashimoto N. MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age. 第4回若手による骨格筋細胞研究会 名古屋 2016年11月.  
(分担：上住聡芳)
  - 1) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Fukada S, Tsuchida K. Maintenance of skeletal muscle by interstitial mesenchymal progenitors. FASEB SRC, USA. Jul 2016.
  - 2) Uezumi A. Roles of interstitial mesenchymal progenitors in skeletal muscle homeostasis. Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School “Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration”, USA. Aug 2016.
  - 3) 上住聡芳、「筋間質の間葉系前駆細胞による骨格筋組織の維持」、第2回日本筋学会学術集会・シンポジウム4「骨格筋ステムセルバイオロジー」、2016年8月6日
  - 4) 上住聡芳、「高品質なヒト骨格筋由来幹・前駆細胞の獲得とその応用」、第36回日本眼薬理学会・シンポジウム1「眼科研究における薬効評価モデル」、2016年9月10日  
(分担：深田宗一郎)
  - 1) 深田宗一郎. 「筋幹細胞は筋線維の質・量維持に貢献できるのか？」 第62回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物科学会第30回大会 合同ワークショップ3, 愛知医科大学, 愛知 2016年10月15日
  - 2) 深田宗一郎. 「骨格筋の量・質と幹細胞」 第34回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会シンポジウム5 筋・腱・靭帯シンポジウム, 大阪国際会議場, 大阪 2016年7月23日
  - 3) University of Minnesota Medical School, Symposium, “Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration” 「Molecular regulation of muscle stem cell quiescence, undifferentiation, and survival」 So-ichiro Fukada, Minnesota, USA (Invited by Prof. Atsushi Asakura), 2016年8月1日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2016-040513 「筋萎縮抑制剤及びその用途」、土田邦博、上住聡芳、山田治基；

PCT 出願 PCT/JP2017/6019

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし