

分に説明を行い、調査の対象者全員から検体の保存を含むインフォームドコンセントを得ている。また同一の人に繰り返し検査を行っており、その都度インフォームドコンセントにて本人への確認を行っている。分析においては、参加者のデータをすべて集団的に解析し、個々のデータの提示は行わず、個人のプライバシーの保護に努めている。

C. 研究結果

サルコペニアは歩行速度が毎秒 1 m 未満あるいは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満で、DXA による判定で四肢筋量の低下が認められるものとした場合、サルコペニアを有する高齢者は男性では 32 人 (4.6 パーセント)、女性では 85 人 (11.8 パーセント) であった。6 年間の追跡での ADL 低下のリスクは図 2 に示すようにサルコペニア群が非サルコペニア群に比べて高くなっていた。サルコペニア群と非サルコペニア群のあいだの ADL 低下のオッズ比は 1.54 (95%CI: 1.16-2.06, $p=0.003$) とサルコペニア群で有意に高くなっていた (図 3)。

男性の握力の基準値を 30kg 未満とした場合にはサルコペニアは、男性で 94 人 (13.5 パーセント)、女性で 85 人 (11.8 パーセント) であり、6 年間の追跡での ADL 低下のオッズ比は 1.31 (95%CI: 1.03-1.67, $p=0.028$) であった (図 4、5)。

D. 考察

介護予防を目指して、European consensus によるサルコペニアの簡易基準を参考に地域住民を対象としたサルコ

ペニアの簡易基準の作成を行い、身体機能に支障が生じ、将来要支援要介護となるような可能性のある集団を捉えることを目指した。

地域住民を対象とした場合には European consensus によるサルコペニアの簡易基準では、特に歩行速度を 0.8m/秒を判定基準にした場合には、ほとんどすべての人がサルコペニアでないと判断されてしまう。今回は歩行速度を 1.0m/秒を判定基準として、握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満である場合には脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、実際に筋肉量が減少している場合をサルコペニアとした。男性の握力の基準値を海外で用いられていることが多い 30kg とした場合の検討も行っている。

6 年間の追跡で非サルコペニアに比べてサルコペニアである場合の ADL の低下のオッズ比が 1.54 倍で有意に高くなっていた。男性の握力の基準値を 30kg とより厳しくした場合には、オッズ比は 1.31 倍と有意ではあったが小さな値となり、日本人男性では 25kg を採用した方が ADL 低下を予測するために、より適していることがわかった。

E. 結論

サルコペニアによる ADL 低下リスクについて検討した。サルコペニアは歩行速度あるいは握力の低下があり、DXA による判定で四肢筋量の低下が認められるものとした。サルコペニアを有する高齢者では 6 年間の追跡での ADL 低下のオッズ比が 1.54 (95%CI: 1.16-2.06, $p=0.003$)

と有意に高くなっていた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Terabe Y, Harada A, Tokuda H, Okuizumi H, Nagaya M, Shimokata H.

Vitamin D Deficiency in Elderly Women in Nursing Homes: Investigation with Consideration of Decreased Activation Function from the Kidneys. *J Am Geriatr Soc.* 60: 251-255, 2012.

2) Kozakai R, Ando F, Kim HY, Rantanen T, Shimokata H. Regular exercise history as a predictor of exercise in community-dwelling older Japanese people. *J Phys Fitness Sports Med* 1(1): 1-8, 2012.

3) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史。地域在住中高齢者の膝関節変形と膝伸展筋力との関連。 *Osteoporosis Japan* 20(2): 254-256, 2012.

4) 安藤富士子、今井具子、加藤友紀、大塚礼、松井康素、竹村真里枝、下方浩史。血清カロテノイドと2年後の骨粗鬆症／骨量減少発症リスクに及ぼす影響。 *日本未病システム学会雑誌* 18(2): 89-92, 2012.

5) Hida T, Ishiguro N, Shimokata H, Sakai Y, Matsui Y, Takemura M,

Terabe Y, Harada A. High prevalence of sarcopenia and reduced leg muscle mass in Japanese patients immediately after a hip fracture. *Geriatr Geront Int* (in press).

6) Matsui Y, Takemura M, Harada A, Ando F, Shimokata H. Divergent significance of bone mineral density changes in aging depending on sites and sex revealed through separate analyses of bone mineral content and area. *J Osteoporos* 2012: 1-6, 2012.

7) 下方浩史、安藤富士子。日常生活機能と骨格筋量、筋力との関連。サルコペニア－研究の現状と未来への展望。 *日老会誌* 49(2): 195-198, 2012.

8) 下方浩史、安藤富士子。疫学研究からのサルコペニアとそのリスク－特に栄養との関連。 *日本老年医学会雑誌* 49(6): 721-725, 2012.

9) 下方浩史、安藤富士子。検査基準値の考え方－医学における正常と異常－。 *日本老年医学会雑誌* (印刷中)。

10) 幸篤武、安藤富士子、下方浩史。サルコペニア、虚弱の疫学－日本人データから。 *Bone Joint Nerve* 3(1): 67-74, 2013.

11) 下方浩史、安藤富士子。健康長寿社会を築く長期縦断疫学研究。 *日本未病システム学会雑誌* (印刷中)。

12) 大塚礼、下方浩史、安藤富士子. 高齢者の栄養に関する疫学研究. Geriatric Medicine (印刷中).

13) 幸篤武、安藤富士子、下方浩史. わが国におけるサルコペニアの診断と実態—日本人における診断. サルコペニア—その成因と栄養・運動(葛谷雅文、雨海照祥編)、医歯薬出版、東京(印刷中).

14) 加藤友紀、安藤富士子、下方浩史. サルコペニアの栄養ケア BCAA. サルコペニア—その成因と栄養・運動(葛谷雅文、雨海照祥編)、医歯薬出版、東京(印刷中).

15) 幸篤武、安藤富士子、下方浩史. 罹患の実態について教えてください. サルコペニア Q&A—高齢者における筋量減少・筋力低下にどう対応するべきか?(関根里恵、小川純人編)、フジメディカル出版、東京(印刷中).

16) 安藤富士子、下方浩史. サルコペニアを起こす高齢者の特徴は? サルコペニア Q&A—高齢者における筋量減少・筋力低下にどう対応するべきか?(関根里恵、小川純人編)、フジメディカル出版、東京(印刷中).

2. 学会発表

1) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史. ロコモティブシンドロームのチェック項目の妥当性の検討—ロコチェックの有無による各種運動能力の比較. 日本整形外科学会、2012年5月9日、京都.

2) 下方浩史. 疫学研究からのサルコペニアとそのリスク—特に栄養との関連. 疫学研究からのサルコペニアとそのリスク—特に栄養との関連. シンポジウム「高齢者の「サルコペニア」ならびに「虚弱」とその対策」. 第54回日本老年医学会学術総会、2012年6月26日、東京.

3) 下方浩史. 検査基準値の考え方—医学における正常と異常—シンポジウム「生活自立を指標とした生活習慣病の検査基準値」. 第54回日本老年医学会学術総会、2012年6月27日、東京.

4) 杉浦彩子、内田育恵、中島務、新野直明、李成喆、安藤富士子、下方浩史. 地域在住中高齢者の難聴と転倒、重心動揺との関連. 第54回日本老年医学会学術総会、2012年6月27日、東京.

5) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、小坂井留美、下方浩史. ロコモティブシンドローム(ロコモ)とサルコペニアの関連. 第54回日本老年医学会学術総会、2012年6月27日、東京.

6) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、李成喆、下方浩史. 地域在住中高齢者の膝関節痛と膝伸展筋力の関連. 第4回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会総会、2012年7月19日、宜野湾.

7) 下方浩史. 中高年者の栄養と運動—長期縦断疫学研究から. シンポジウム「成人向け保健指導とヘルスプロモーション」. 第60回日本教育医学会記念大会、

2012年8月26日、筑波.

なし

8) 幸篤武、李成喆、小坂井留美、金興烈、安藤富士子、下方浩史. 中高年男性における余暇身体活動強度と血清遊離テストステロン濃度の関連. 第67回日本体力医学会大会、2012年9月15日、岐阜.

3. その他

なし

9) 金興烈、李成喆、幸篤武、小坂井留美、安藤富士子、下方浩史. 中高年齢者の歩幅と歩調に影響を与える関連要因. 第67回日本体力医学会大会、2012年9月15日、岐阜.

10) 小坂井留美、安藤富士子、金興烈、李成喆、幸篤武、下方浩史. 運動経験のない中高年者における運動習慣開始の要因. 第67回日本体力医学会大会、2012年9月14日、岐阜.

11) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史. ロコモティブシンドロームチェック項目とSF36身体機能との関連. 第14回日本骨粗鬆症学会、2012年9月29日、新潟.

12) 下方浩史. 健康長寿社会を築く長期縦断疫学研究、特別講演、第19回日本未病システム学会総会、2012年10月27日、金沢.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

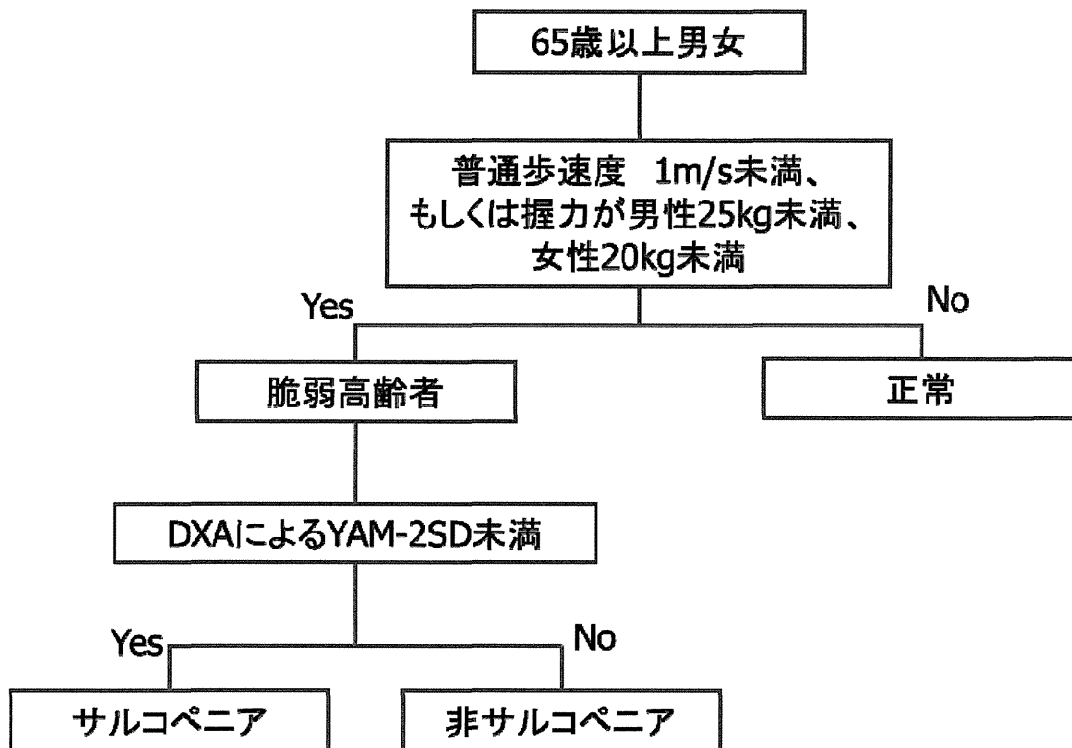


図1. サルコペニアの簡易基準

The European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP)によるヨーロッパ・コンセンサスに基づいた簡易基準。ただし、一般住民に適応できるよう基準値の一部を変更している。

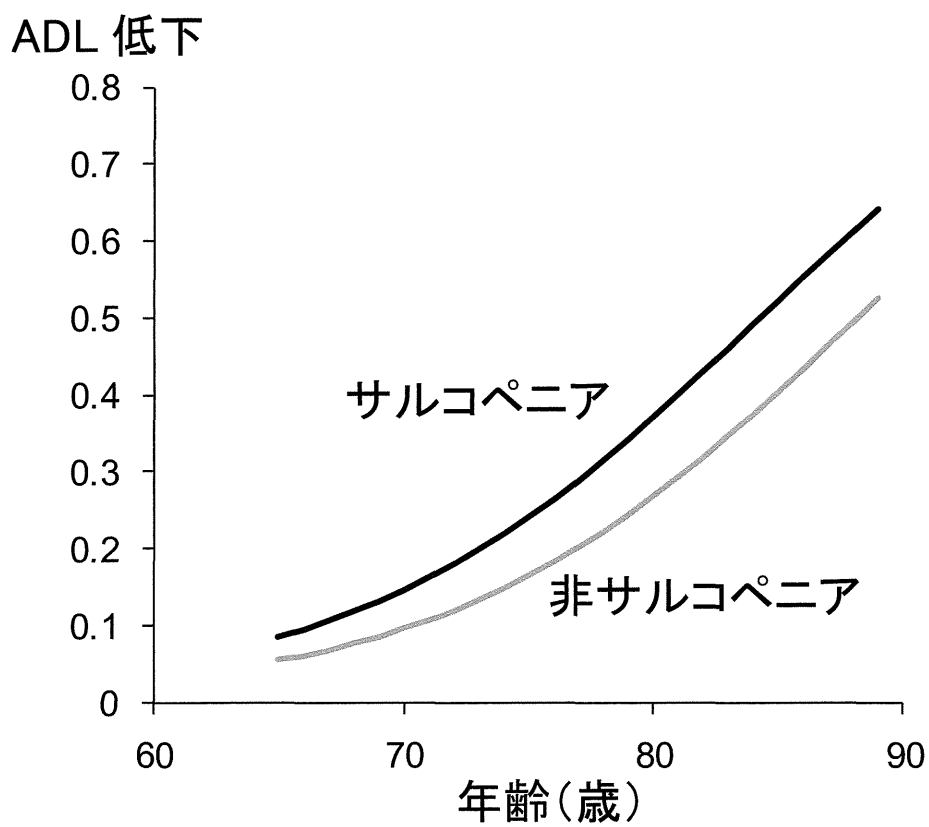


図 2. サルコペニアの有無による ADL 低下のリスク(男性の握力基準値 25kg の場合)
6 年間の縦断データによる一般化推定方程式での性別・年齢調整済みリスク推定

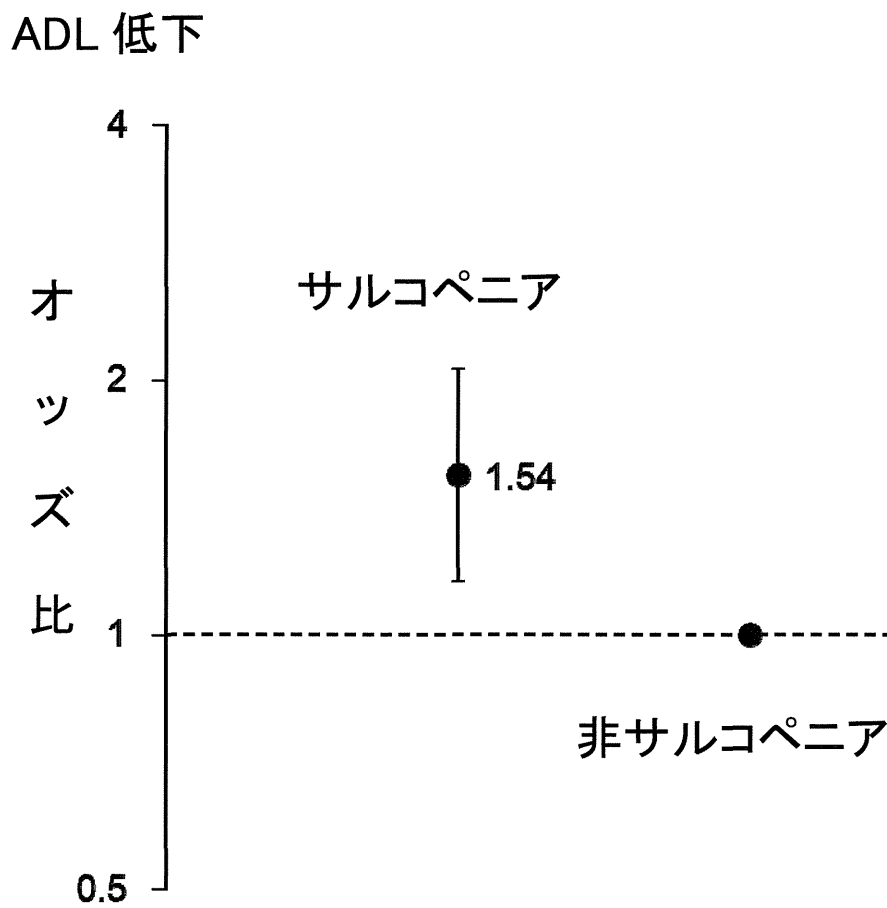


図 3. サルコペニアの有無による ADL 低下のオッズ比(男性の握力基準値 25kg の場合)
6 年間の縦断データによる一般化推定方程式での性別・年齢調整済みリスク推定

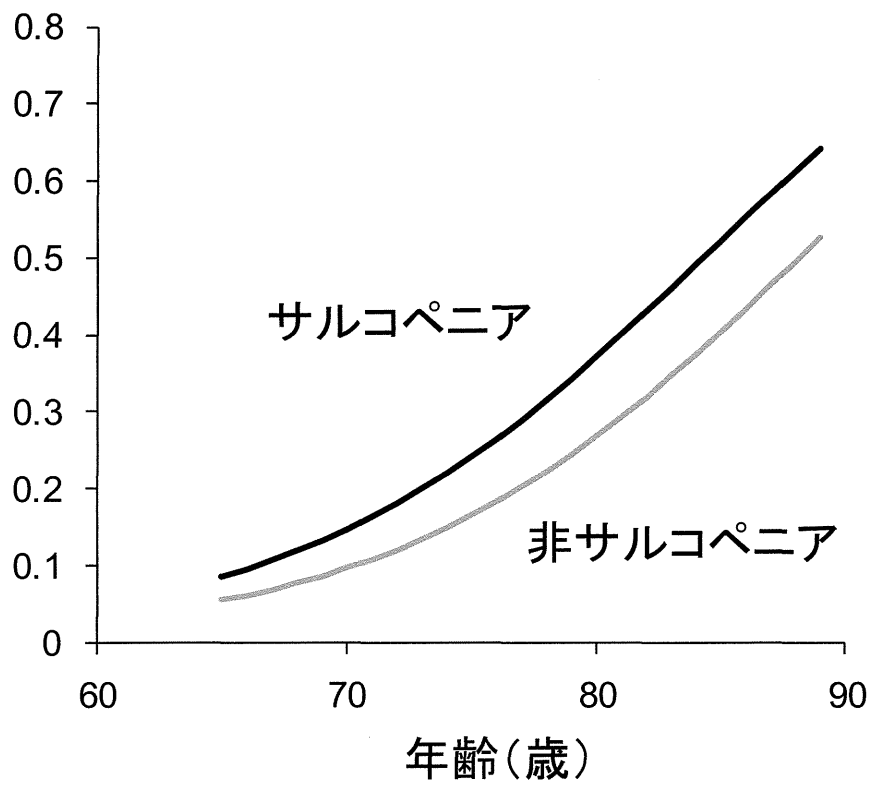


図 4. サルコペニアの有無による ADL 低下のリスク(男性の握力基準値 30kg の場合)
6 年間の縦断データによる一般化推定方程式での性別・年齢調整済みリスク推定

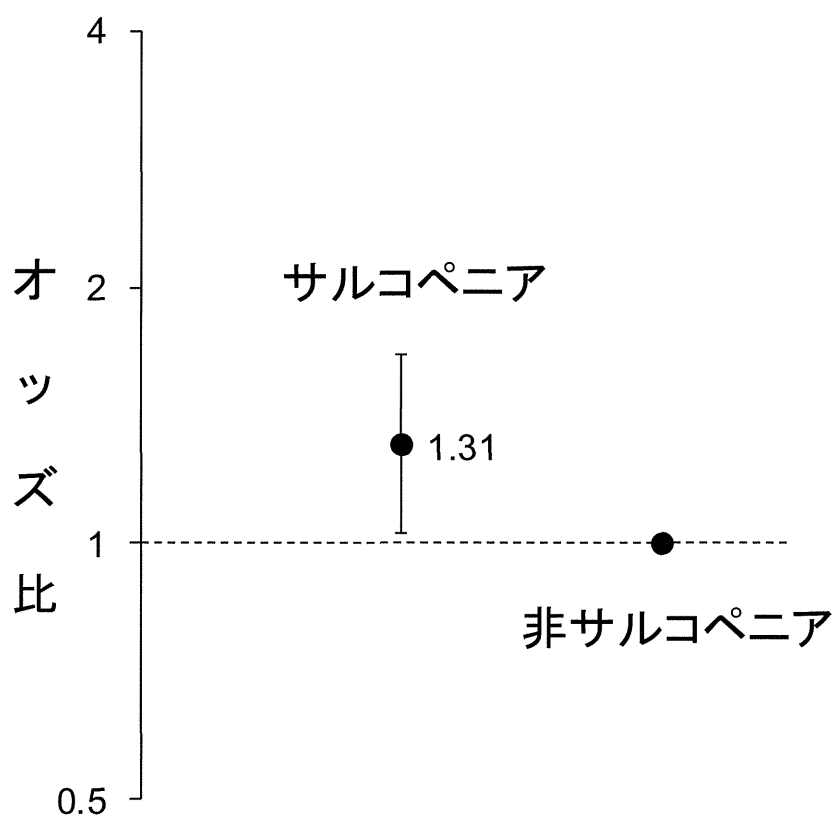


図 5. サルコペニアの有無による ADL 低下のオッズ比(男性の握力基準値 30kg の場合)
6 年間の縦断データによる一般化推定方程式での性別・年齢調整済みリスク推定

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

骨格筋幹細胞のサルコペニアにおける役割の解明

研究分担者 橋本 有弘

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所 再生再建医学研究部長

研究要旨

運動機能の低下したヒト(膝関節症などの患者)から摘出した下肢筋組織を、組織学的に検討した。その結果、著しい筋組織の脂肪化を認めた。加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を解明するために、高齢者の下肢骨格筋由来不死化筋幹細胞と、若齢者由来不死化筋細胞との遺伝子発現パターンの違いを検討した。遺伝子発現解析によって、高齢者筋細胞で発現の増大している分泌性因子を同定した。筋組織の加齢変化と筋幹細胞の加齢変化との関連性の解明が重要課題と考えられる。

A. 研究目的

加齢にともなう筋再生能力の低下は、サルコペニアの発症と密接に関わっていると考えられる。筋再生には、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の働きが必須であるが、後期高齢者の筋幹細胞の性質については、解明が進んでいない。本分担研究では、後期高齢者骨格筋から分離した筋幹細胞の性質を、分子・細胞生物学的および病理学的に解析し、サルコペニアにおける筋幹細胞の役割を明らかにする。さらに、研究成果をもとに「骨格筋幹細胞を標的としたサルコペニアに対する新たな予防法ならびに重度化防止法」を提案したい。

B. 研究方法

① ヒト筋組織の組織病理学的解析

国立長寿医療センター病院において整形外科疾患のために手術を受けられる方で、本人からの同意が可能な方を対象とした。なお、梅毒や肝炎などの感染症に罹患している方および主治医が不相当と認めた方は対象から除外した。同意が得られた方について、部分麻酔下での手術時に、切開部近傍の骨格筋を0.1-0.4 g程度摘出した。

筋組織は、急速凍結し、-80℃の超低温槽に保存した。クリオスタットを用いて薄切し、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、ヘマトキシリン-エオシン染色を行った。

② 不死化ヒト筋細胞の培養

ヒトテロメラゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺

伝子およびヒト cyclin D1 遺伝子を導入・発現させることによって、後期高齢者由来ヒト筋細胞を、分化能を保持したまま不死化した。不死化ヒト筋細胞は、I 型コラーゲンを塗布したプラスチック培養皿に播き、37℃、10% CO₂の気相下で静置培養した。培養液は、Primary myocyte growth medium (pmGM) [20% FCS, 2% Ultrosor G (Biosepra, PALL) in high-glucose (4.5 g/ml) DMEM] を用いた。筋分化を誘導する場合は、1x10⁵細胞を 35-mm 培養皿に播き、2 日後に培地を Primary myocyte differentiation medium (pmDM) [2% FCS, 5 µg/ml holo-transferrin (bovine), 10 µg/ml insulin, 10 nM selenite in hDMEM] に交換し、4-6 日間培養した。定法にしたがって細胞抽出液を調製し、イムノブロット解析をおこない、筋分化マーカー myosine heavy chain (MyHC) を検出した。

③ 不死化ヒト筋細胞の遺伝子発現解析

不死化ヒト筋細胞から RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。この RNA を鋳型として cDNA を合成した。RT-profiler PCR array-Common cytokines (QIAGEN) を用いて、分泌性因子の遺伝子発現を、リアルタイム PCR 法によって解析した。発現量は、23 歳女性から分離樹立した不死化筋細胞 Hu37KDpp を基準として変形性膝比較検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト骨格筋組織の採取に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を受

けた。臨床研究に関する倫理指針に則り、患者に対しては、文書を用いて説明し、患者本人より文書にて同意を得た。

C. 結果

① 運動機能の低下した患者由来筋組織の病理学的解析

変形性股関節症、変形性膝関節症および膝大腿骨内顆骨壊死で人工関節手術を受ける方から、手術時に切開部より微小な筋組織を摘出した。変形性股関節症（2例）の場合は、大臀筋、変形性膝関節症（4例）と膝大腿骨内顆骨壊死（1例）の場合は、大腿四頭筋（内側広筋）を摘出した。7例の内訳は、男性3名、女性4名、年齢は77歳から80歳であった。

凍結組織を薄切すると切片が碎片化してしまい、作業がきわめて困難であったため、当初計画していた抗体染色（筋線維タイプ特異的抗体など）は中止し、一般染色（ヘマトキシリン-エオシン染色）によって組織像を把握することにした。その結果、いずれの筋組織にも顕著な脂肪化を認めた。凍結組織の薄切が困難であった原因は、筋組織内に脂肪が蓄積するためであると考えられた。脂肪化の程度は、筋組織標本ごとに差が認められた。女性患者の大腿四頭筋4例を比較すると、筋組織内脂肪化の程度が著しい例ほど、骨格筋組織中の筋線維数は減少しており、膝伸展筋・膝屈曲筋の筋力は低下している傾向が見られた。これらの脂肪化は、「骨格筋組織内」に見られる脂肪の蓄積であり、筋組織外の脂肪組織の増加ではなかった。また、脂肪は、筋線維の中ではなく、筋線維間の間質に蓄積していた。ただし、中心核線維は認められず、筋再生は誘導されていない。炎症細胞の浸潤も認められなかった。

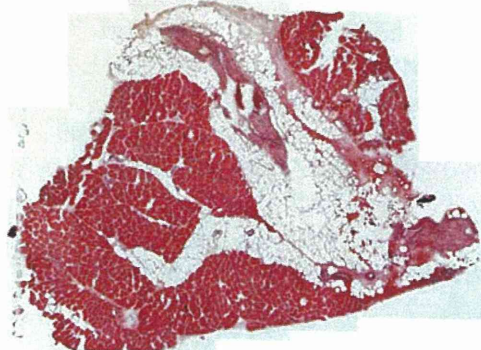


図1 78歳男性、変形性股関節症患者の大殿筋。ヘマトキシリン-エオシン染色。

② 後期高齢者由来不死化筋細胞の遺伝子発現解析

未分化筋細胞は、様々な分泌性因子（サイトカイン、成長因子など）を発現していることが報告されている。これらの自己分泌性因子の未分化筋細胞における生理的意義については、不明の点が多いものの、筋細胞の増殖・分化の制御に関わっている可能性がある。23歳女性、75歳男性および86歳女性の正常腹直筋から分離・樹立した不死化筋細胞 Hu37KDpp（以下 Hu37）、Hu20IHKD（以下 Hu20）Hu27KD（以下 Hu27）における成長因子、サイトカインおよびそれらの関連因子の発現を RT-PCR 法によって比較検討した。その結果、Hu37 に比べて Hu20 と Hu27 で共通に上昇傾向が見られた遺伝子として、Inhibin β B、BMP4、JAG2 が、Hu20 と Hu27 のどちらかで上昇が認められた遺伝子としては Inhibin β A が同定された。Inhibin α は、明瞭な増減を示さなかった。また、osteopontin 発現は、Hu20 と Hu27 で共通に低下傾向が見られた。この結果から、高齢者由来筋細胞では、TGF β スーパーファミリー分子の発現が増大している可能性が示唆された。

③ 後期高齢者由来不死化筋細胞の分化能の解析

Hu20、Hu27 および82歳女性の腹直筋由来の不死化筋細胞 Hu46ppKD（以下 Hu46）の筋分化能を、Hu37 と比較検討した。いずれの筋細胞も、分化培養で4日目以降、MyHC を発現し、細胞融合して筋管細胞を、形成した。後期高齢者由来不死化筋細胞は、Hu37 と同程度の分化能力を持つことが明らかになった。

（倫理面への配慮）

ヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

D. 考察

運動機能の低下した患者の下肢筋組織を組織学的に検討したところ、筋組織の著しい脂肪化を見いだした。脂肪化の程度には個人差があるものの、検討した7例全ての筋組織に脂肪化が認められた。このような筋組織の著しい脂肪化は、老化マウスでは認められず、ヒト固有の加齢依存的な現象である可能性が考えられる。

骨格筋組織の脂肪化は、筋ジストロフィーなどの筋疾患においてしばしば認められる。筋組織に潜在している脂肪前駆細胞の増殖が、筋線維の壊死脱落によって刺激され、筋組織内で脂肪に分化するものと考えられる。初期の脂肪化は、筋線維の壊死の結果誘導されると考えられる。しかし、過剰な脂肪化が増悪要因となって、さらに筋線維の壊死が促進される可能性がある。本研究で見いだされた著しい筋組織の脂肪化は、老化マウスなどでは決してみることができない、運動機能の低下したヒト筋組織に特徴的な組織病理像である。高齢者に見られる「筋量や筋力の低下（サルコペニア）」の進行に関しても、筋組織の脂肪化が増悪作用をもたらす、病態の進行（悪化）を促しているのかもしれない。仮にそうであれば、筋組織における過剰な脂肪化を抑制することによって、サルコペニアの進行を抑制し、リハビリテーションなどによる治療効果を高めることが期待できる。今後、(1)高齢者筋組織における脂肪化が筋幹細胞および筋線維に与える影響と、(2)骨格筋組織内脂肪化の抑制による治療の可能性について検討する必要がある。

不死化ヒト筋細胞の分離・樹立が可能になったことにより、これまで不明の点が多かった未分化ヒト筋細胞(筋幹細胞、筋前駆細胞)の性質を詳細に検討することができるようになった。自己分泌性因子の発現解析の結果、高齢者由来筋細胞において、Inhibin α の発現レベルは、若年成人由来筋細胞と同程度であるのに対してInhibin β Bは上昇していた。この結果は、高齢者由来筋細胞では、Inhibin α 鎖とInhibin β 鎖の二量体であるInhibinではなく、Inhibin β 鎖の二量体であるactivinの産生量が増大している可能性を示唆している。Activinタンパク質の産生と筋機能の関連性という新たな検討課題が提示された。さらに、私たちは、後期高齢者由来筋細胞の特性を、DNAアレイによる網羅的遺伝子発現解析によって明らかにしようと、研究を進めている。

E. 結論

運動機能の低下した高齢者の筋組織を解析し、著しい脂肪化を見いだした。骨格筋組織の脂肪化がサルコペニアの発症・進行とどのように関わっているのか、新たな視点が得られた。後期高齢者筋組織から分離・樹立した不死化筋細胞を解析し、activinの発現上昇を示唆する結果を得た。後期高齢者筋細胞の特

性解明およびサルコペニアに対する治療薬開発のためのスクリーニングに有用な実験系を確立することができた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

橋本有弘, 骨格筋幹細胞—最新基礎知見を踏まえて. Bone Joint Nerve 3(1): 21-26, 2013.

2. 学会発表

橋本有弘、塩見浩介、永田有希、岡村菊夫. 自己筋細胞を用いた尿失禁に対する再生治療の開発: 移植細胞供給システムの確立. 第1200回日本泌尿器科学会総会 シンポジウム. 2012年4月22日、横浜

橋本有弘, 骨格筋幹細胞(筋サテライト細胞)の性質解明: 加齢や筋疾患による性質変化から、筋サテライト細胞を標的とした再生医療の可能性を探る. 第29回筋肉の会. 2012年9月13日、岐阜

橋本有弘, 骨格筋幹細胞を標的とした再生医療. 第27回整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム. 2012年10月27日、名古屋

橋本有弘, ヒト骨格筋幹細胞/前駆細胞の特性と筋疾患. 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2012年12月、福岡

永田有希、他. 炎症性サイトカインIL-1によるヒト筋細胞の分化阻害. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月、福岡

塩見浩介、他. グルココルチコイドは、ヒト筋芽細胞のRb依存的な細胞周期の停止を解除する. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月、福岡

Naohiro Hashimoto and Kosuke Shiomi

Glucocorticoids repress

Rb-dependent/stress-induced cell cycle arrest of human myogenic cells: a possible mechanism of glucocorticoid therapy for Duchenne muscular dystrophy

Frontiers in Myogenesis Meeting:

Development, Function and Repair of the

Muscle Cell 2012年6月4-8日, ニューヨーク

Naohiro Hashimoto

Recruitment of M-cadherin/p120 Catenin Complex to Lipid Raft is Critical for Establishing Fusion Competence of M the FASEB Science Research Conference on *Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells* 2012年8月12-17日, ルカ(イタリア)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

液性因子とサルコペニア

研究分担者 江頭正人 東京大学 特任准教授

研究要旨

マウスならびに培養マウスC2C12細胞を用いて、骨格筋におけるVEGFの分泌が、軽度の運動負荷により増加、廃用性萎縮にともない低下することを明らかにした。骨格筋細胞におけるVEGFの発現は、グアニリルシクラーゼ-PGC-1alphaが関与していることも明らかになった。骨格筋由来VEGFが内皮細胞保護作用をもつマイオカインとして作用している可能性がある。

A. 研究目的

運動は、心血管疾患や認知症の予防効果を示す一方、身体活動の低下サルコペニアが、死亡率や心血管疾患発症のリスクになることが知られているが、その機序は必ずしも明らかではない。われわれは、骨格筋由来の液性因子が、内皮細胞保護効果をもつかどうかを検討した。

B. 研究方法

培養骨格筋細胞（C2C12細胞）と大動脈内皮細胞（HAEC）の共培養をおこない、血清除去にともなうHAECのアポトーシスに対する共培養の抑制効果を検討した。また、8週齢のC57BL/6Lマウスに対し4週間中等度のトレッドミル負荷をおこない、ヒラメ筋におけるVEGFを含む増殖因子の遺伝子発現をRT-PCRにて検討した。また、マウス血中ならびに培養上清中のVEGF濃度はELISAにて検討した。

（倫理面への配慮）

東京大学の動物実験に関する倫理指針にそって

本実験はおこなわれた。

C. 研究結果

血清除去にともなうHAECのアポトーシスの程度は、C2C12細胞との共培養により、有意に軽減した。マウスのヒラメ筋において運動負荷により上昇する内皮細胞の各種生存因子を検討したところ、VEGF mRNAレベルの有意な上昇が確認された。また、運動負荷により血中のVEGFレベルは上昇していた。一方で、マウス廃用性萎縮モデルにおけるヒラメ筋では、VEGF mRNAレベルは有意に低下していた。共培養における培養上清においてもVEGFの分泌がみとめられた。VEGF受容体（VEGFR2）のアンタゴニストの存在下にて共培養による内皮細胞アポトーシス抑制効果は減弱した。PGC-1alphaのsiRNAによるノックダウンにより、C2C12細胞におけるVEGF mRNA発現、VEGF分泌は低下した。グアニリルシクラーゼ活性化薬であるBAY41-2272により、PGC-1alphaのC2C12細胞における発現は

上昇し、VEGF mRNA発現、VEGF分泌は増加した。

また、共培養系にBAY41-2272を添加すると内皮細胞アポトーシス抑制効果はさらに増強した。

D. 考察

本研究において、中等度の運動により骨格筋よりVEGFの分泌が増強されること、一方廃用性に萎縮した骨格筋からは、VEGFの発現が低下したことを明らかにした。また、骨格筋細胞と内皮細胞の共培養において、内皮細胞のアポトーシスが低下したこと、共培養において培養上清中のVEGF濃度が上昇したこと、このアポトーシス抑制効果がVEGFシグナルの遮断にてキャンセルしたこと、から骨格筋由来のVEGFが内皮保護効果をもつマイオカインとして作用している可能性が示唆された。従来、臨床研究において、身体活動が高いことが心血管疾患リスクを低下させること、反対に、サルコペニアや身体能力の低下、身体活動量の低下が、心血管リスクの上昇と関連していることが知られていたが、このメカニズムに骨格筋由来のVEGFの分泌の増減が関与している可能性がある。今後、動物モデル、さらに高齢患者において、このことを検証する必要がある。

また、骨格筋におけるVEGFの発現は、グアニリルサイクラーゼ-PGC-1 α が正に制御していることが明らかになった。したがって、この系の活性化がサルコペニア関連疾患の治療標的となる可能性がある。

E. 結論

骨格筋由来VEGFが内皮細胞保護作用をもつマイオカインとして作用している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kojima T, Akishita M, Nakamura T, Nomura K, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Polypharmacy as a risk for fall occurrence in geriatric outpatients. *Geriatr Gerontol Int.* 12: 425-430, 2012.

2) Kojima T, Akishita M, Kameyama Y, Yamaguchi K, Yamamoto H, Eto M, Ouchi Y. Factors associated with prolonged hospital stay in a geriatric ward of a university hospital in Japan. *J Am Geriatr Soc.* 60: 1190-1191, 2012.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

東京大学大学院医学系研究科 秋下雅弘

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

サルコペニアのバイオマーカーの開発と実用化

研究分担者 重本和宏

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム 研究部長

研究要旨

サルコペニアによる運動機能の低下-寝たきり-認知症の悪循環は、高齢者の要介護増加に繋がっていくことから、超高齢社会に突入しつつある現在の日本にとって社会的要請の強い重要な課題である。従って、そのメカニズムの解明は、科学的根拠に基づいた早期予防、リハビリの有効性および効果判定、新たな治療法の開発基盤のために必須である。本研究では、筋と運動神経の相互作用に着目し、筋量や筋力とは次元の異なる定量可能なサルコペニアのパラメーターの発見と、それを利用したサルコペニアの新たな診断・予防・治療法の開発を目的としている。前年度まで、抗 MuSK (muscle-specific kinase) 抗体で発症する動物モデルを用いて、筋と運動神経の相互維持メカニズムの破綻で発症する筋萎縮のメカニズムを明らかにしてきた。高齢者および老化動物の神経筋シナプスにおいても、モデルマウスで観察されたシナプスの形態と共通点が多いことから、MuSK の支配下にある重要な維持機構 (おそらく複数) の破綻がサルコペニアの成因にも関与していると予想している。従って、MuSK の機能を制御する分子の同定はサルコペニアの新たなバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えている。本年度は、*in vitro* のアッセイシステムと重症筋無力症のモデル動物由来の抗 MuSK 抗体を用いて、MuSK の活性化・機能抑制に関与する分子メカニズムを解析したので報告する。

A. 研究目的

1. 筋と運動神経の相互維持メカニズム解明

我々は、サルコペニアの主要な原因である「筋と運動神経の相互維持メカニズムの破綻」において、神経筋シナプスの筋側 (ポストシナプス膜) に発現するレセプター型チロシンキナーゼの MuSK が重要な役割を果たしていることを、抗 MuSK 抗体で発症する重症筋無力症の疾患モデルマウスを確立することで証明した^{1,2)}。重症筋無力症を発症したマウスは筋萎縮や筋力低下を示し、神経筋シナプスでは AChR 凝集

の散乱やシナプス襞の減少が認められた。また、ポストシナプス側の変化だけでなく、運動神経軸索の分岐・伸展や神経終末の縮退といったプレシナプス側の変化も認められた。老化動物の神経筋シナプスにおいても、AChR 凝集の断片化とともにシナプス全体構造の単純化と見なされる形態変化が現れており、モデルマウスの形態と共通点が多い^{3,4)}。従って、MuSK の支配下にある重要な維持機構 (おそらく複数) の破綻がサルコペニアの成因にも関与している可能性が高いと考えられた。

MuSK の活性化による AChR の凝集は、運動神経終末から分泌される agrin によって誘導される。Agrin はポストシナプス膜に発現している LRP4 に結合し、これらが細胞外領域で複合体を形成して MuSK を活性化している。さらに、アダプタータンパクの Dok-7 による細胞内からの刺激も MuSK の活性化に重要である。前述したように、サルコペニアの成因に MuSK が強く関与していることを考慮すると、その機能を制御する分子の同定はサルコペニアの新たなバイオマーカーとして利用できる可能性がある。本研究では、*in vitro* のアッセイシステムと抗 MuSK 抗体を用いて、MuSK の活性化・機能抑制に関与する分子メカニズムを解析した。

B. 研究方法

1. リコンビナントタンパクの作製

マウス脊髄由来の mRNA から神経型 agrin の cDNA 配列を PCR でクローニングし、発現ベクターに挿入して COS-7 細胞にトランスフェクションした。数日後に細胞の培養メディウムを回収し、Sephadex G-200 カラムを用いてリコンビナント agrin を精製した。

2. 抗 MuSK 抗体の調製

MuSK タンパクを免疫して重症筋無力症を発症したウサギ (3 羽) から血清を回収し、ProteinG カラムを用いて二価の IgG 抗体を精製した。また、抗 MuSK IgG 抗体は MuSK の活性化作用を有するため (後述の結果参照)、IgG 抗体をパパインで処理し、ProteinA カラムを用いて MuSK 活性化能を有さない一価の Fab 抗体を作製した。また、正常ウサギの血清からも同様

に IgG 画分とその Fab 断片を精製し、抗 MuSK 抗体に対するコントロールとして用いた。

3. *In vitro* での AChR 凝集実験

C2C12 筋芽細胞を播種し、コンフルエント後に培養メディウムを 2.5% horse serum/DMEM に交換して筋管細胞の形成を誘導した。分化誘導 3 日後、リコンビナント agrin (1 nM) による刺激を行う 30 分前に抗 MuSK IgG 抗体または Fab 抗体 (40 μ g/ml) を培養系に添加し、AChR の凝集形成に及ぼす影響を検討した。Agrin 刺激 15 時間後に Alexa594 標識 α -bungarotoxin を添加して AChR 凝集を染色し、固定後に蛍光顕微鏡下で観察した。また、agrin 刺激 11 時間後に抗 MuSK Fab 抗体 (40 μ g/ml) を添加し、すでに形成された AChR 凝集に及ぼす影響を検討した。

4. 免疫沈降実験

分化誘導 3 日後、agrin 刺激 (1 nM) 刺激を行う 30 分前に抗 MuSK IgG 抗体または Fab 抗体 (40 μ g/ml) を培養系に添加した。Agrin 刺激 30 分後に細胞のライセートを回収し、抗 MuSK 抗体を用いた免疫沈降を行った。MuSK のリン酸化は、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。また、agrin 刺激 2 時間後と 8 時間後にもライセートを回収して抗 Dok-7 抗体による免疫沈降も同様に行い、Dok-7 のリン酸化とタンパク発現レベルを解析した。

C. 研究結果

1. 抗 MuSK 抗体は agrin による AChR の凝集形成を抑制する

C2C12 筋管細胞の培養系にリコンビナント agrin を添加すると、蛍光標識 α -bungarotoxin で染色可能な AChR の凝集が筋管細胞の表面上に形成される。Agrin 刺激前に抗 MuSK IgG または Fab 抗体を培養系に添加すると、全ての発症ウサギ由来の抗体で AChR の凝集形成が抑制された (図 1A)。また、agrin 刺激によって AChR 凝集を誘導した後に抗 MuSK Fab 抗体を添加すると、凝集の数と大きさの減少が認められた (図 1B)。従って、抗 MuSK 抗体は一価、二価ともに AChR 凝集の形成と維持を抑制することが *in vitro* で示された。

2. 抗 MuSK 抗体は MuSK を介したシグナル伝達を妨害する

MuSK のチロシンキナーゼ活性は agrin によって活性化されるが、抗 MuSK IgG 抗体は agrin

の非存在下で MuSK の活性化を誘導する。また、agrin による AChR の凝集形成を抑制するにもかかわらず、MuSK の活性化は抑制されていなかった。一方、抗 MuSK Fab 抗体は MuSK の活性化を誘導せず、agrin による MuSK 活性化を抑制した (図 2)。以上の結果は、一価と二価の抗 MuSK 抗体が異なる作用機序を介して agrin による AChR の凝集を抑制することを示しており、MuSK の機能制御には複数のメカニズムが関与していることが明らかとなった。

3. 抗 MuSK 抗体は MuSK と Dok-7 の相互作用を抑制する

MuSK の活性化には細胞内アダプター分子である Dok-7 との相互作用も必要である。抗 MuSK IgG 抗体は MuSK と同様に agrin の非存在下で Dok-7 の活性化 (リン酸化) を誘導し、

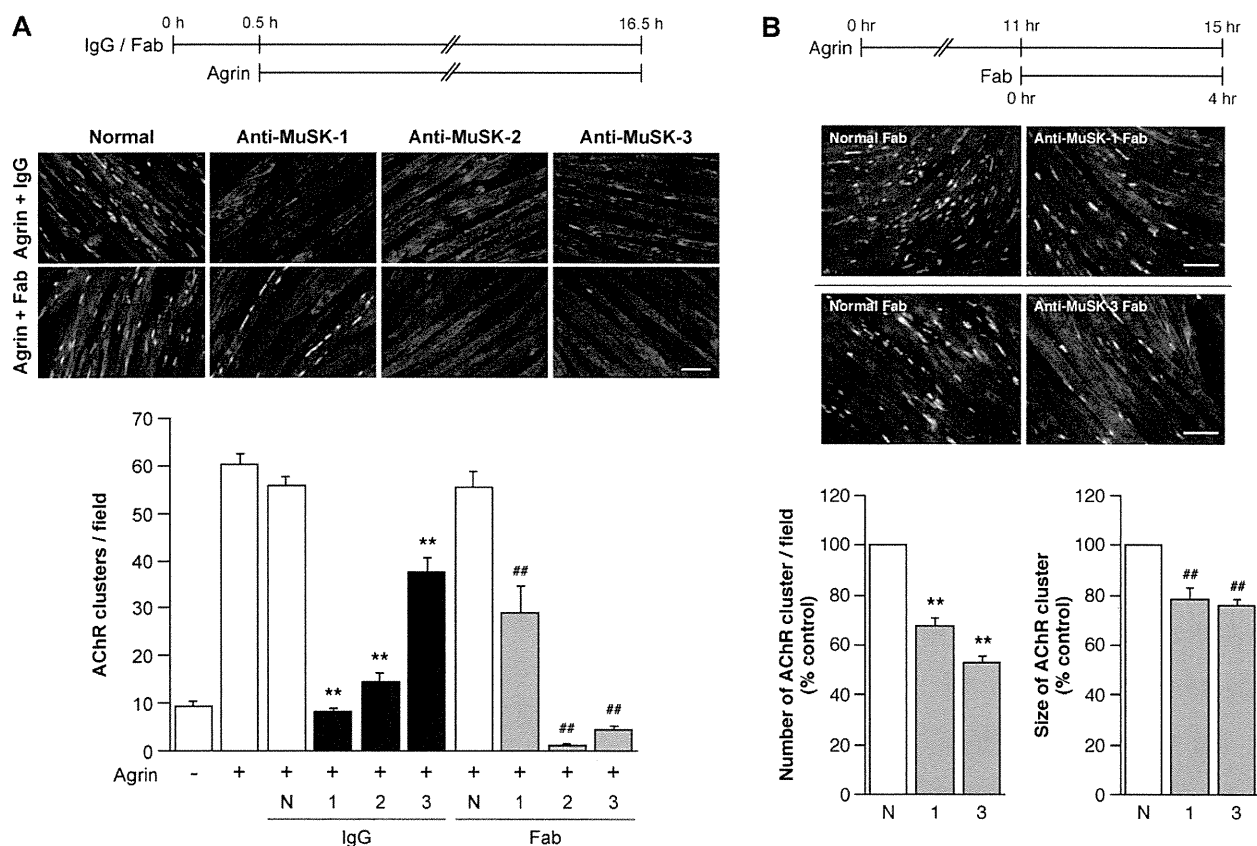


図 1

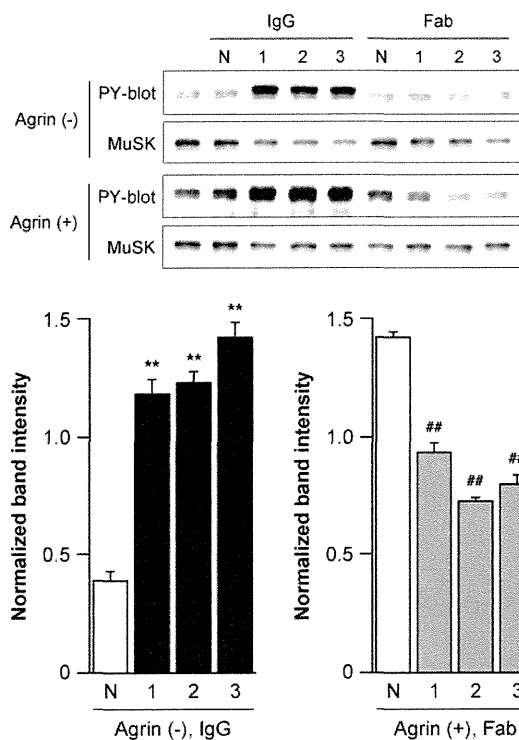


図 2

agrin による Dok-7 活性化を抑制しなかった。一方、抗 MuSK Fab 抗体は agrin による Dok-7 活性化を抑制した (図 3A)。また、Dok-7 の経時的なタンパク発現レベルの減少が agrin 刺激によって誘導されており、活性化された Dok-7 が何らかの修飾反応を受けてダウンレギュレーションを起こしていると考えられた。しかし、抗 MuSK IgG 抗体は agrin の非存在下で Dok-7 の発現レベル減少を誘導しており、ダウンレギュレーションを加速させることで Dok-7 の機能を抑制していると考えられた。一方、抗 MuSK Fab 抗体は agrin による Dok-7 の発現レベル減少を抑制しており、agrin による刺激経路の上流に存在する MuSK の活性化が抑制されたことで Dok-7 の活性化が誘導されなかったと考えられた (図 3B)。以上の結果から、一価と二価の抗 MuSK 抗体が異なる作用機序を介して MuSK と Dok-7 の相互作用を抑制し、最終的に AChR の

凝集が抑制されると考えられた。加えて、MuSK が支配する維持機構において、Dok-7 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

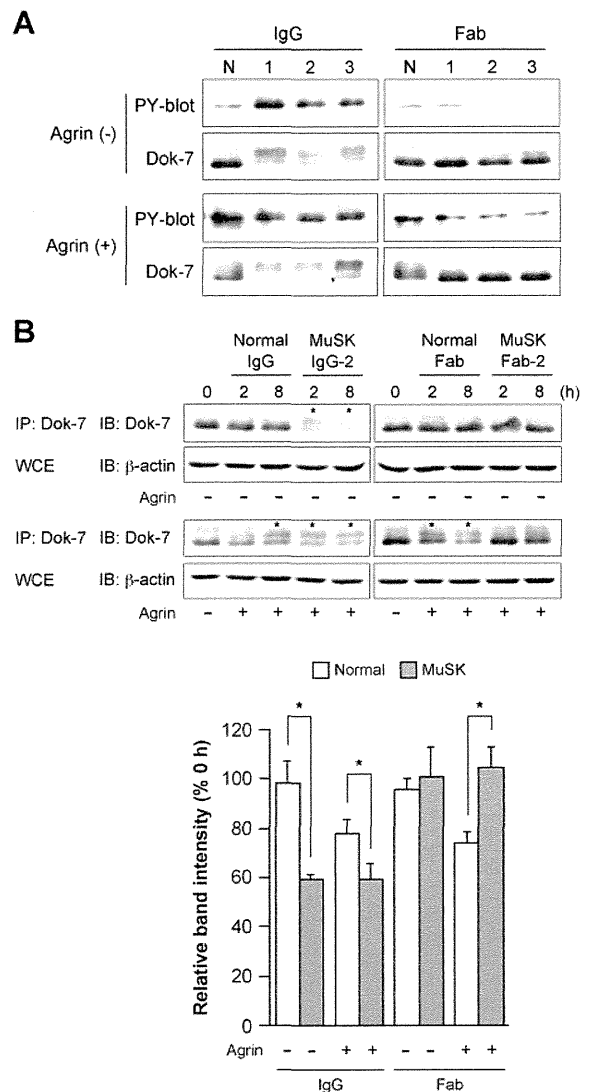


図 3

D. 考察

現在までのところ、MuSK とサルコペニアの直接的な関連を示した研究は報告されていない。しかし最近になって、間接的ながらも MuSK との関連を示唆する研究が報告されてきた。神経型セリンプロテアーゼの neurotrypsin は、MuSK の活性化分子である agrin を分解する唯

一のプロテアーゼとして知られている。この neurotrypsin を神経細胞特異的に過剰発現させ、 agrin の分解を促進させたマウスでは、若齢時から AChR 凝集の断片化といった神経筋シナプスの形態変化とともに、サルコペニア様の筋症状 (筋線維数の減少、中心核の出現、遅筋線維の比率増加など) が現れると報告されている⁵⁾。これは神経筋シナプスの維持機構の破綻がサルコペニアの発症に関与していることを支持するものであり、 agrin の分解促進による MuSK 活性化の低下が発症に寄与していることを示唆している。さらにヨーロッパでは、 neurotrypsin による agrin の分解産物 (CAF) の血中濃度を測定し、サルコペニアのバイオマーカーとして利用する研究がすでに進行している。69名の高齢者の血清中の CAF 濃度を測定したところ、男性高齢者の筋量と負の相関関係が認められており、ビタミン D 投与と運動トレーニング負荷後に CAF 濃度が低下するとも報告されている⁶⁾。サルコペニアのバイオマーカーとしては炎症性サイトカインの IL-6 や TNF- α が知られているが、臨床的に利用できるほどに特異性は高くない。一方、血中の CAF は老化に伴う神経筋シナプスの形態変化と因果関係があり、新たなサルコペニアのバイオマーカーとして興味深い。しかしながら、 neurotrypsin ノックアウトマウスや neurotrypsin 抵抗性の agrin を過剰発現させたマウスにおいても、実際の老化によって生じるサルコペニアの症状を抑制することはできなかったと報告されている⁵⁾。サルコペニアの発症が agrin の分解のみに依存しておらず、複数の要因に起因することを示唆する結果ではあるが、 agrin 刺激を伝達する

LRP4、MuSK、Dok-7 など下流の分子の発現レベルや活性も考慮する必要があるのではないかと考えられる。実際に我々の結果では、MuSK と Dok-7 の機能が神経筋シナプスの維持機構に重要な役割を果たしていることが示された。特に、二価の抗 MuSK 抗体によって誘導される Dok-7 の発現レベル減少は興味深い。これらが関与する分子メカニズムの解明は、サルコペニアの成因を知る上で重要な手がかりとなるはずであり、新たなバイオマーカーの同定にも繋がっていくと考えられる。

E. 結論

抗 MuSK 抗体を用いた *in vitro* のアッセイシステムにより、神経筋シナプスの維持機構の破綻には MuSK の Dok-7 の相互作用の障害が分子メカニズムとして関与している可能性が示された。今後は老化によって生じる神経筋シナプスの変化において、MuSK や Dok-7 がどのような役割を果たしているか検討する必要がある。

文献

- 1) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 180: 798-810, 2012.
- 2) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse