

**Figure 1.** Manifestation of MG-like phenotypes after MuSK injection of A/WySnJ mice. **A:** A/WySnJ mice injected with MuSK protein exhibited a prominent cervical hump and were unable to raise their heads. Control mice injected with vehicle showed no such malformation. MuSK-injected mice lost weight (**B**) and muscle strength (**C**) after the second injection, compared with control mice. Significant weight reduction was observed in MuSK-injected mice at day 26 after the first injection.  $n = 5$ , control;  $n = 18$ , MuSK-injected. Data are reported as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  versus control A/WySnJ mice ( $t$ -test). **D:** Change in MuSK immunoreactivities of sera after MuSK immunization. Sera from MG-affected mice contained a high titer of MuSK Abs. Sera were prediluted 1:1000 for assay. Values of absorbance at 450 nm were determined as MuSK immunoreactivity. \*\* $P < 0.01$  versus preimmune sera ( $t$ -test). **E:** Isotyping analysis of MuSK Abs. MuSK Abs were predominantly of the IgG1 subclass, with small amounts of IgG2a and IgG2b, but no detectable IgG3, IgM, IgA, or IgE. Sera were prediluted 1:3000 for assay. Values of absorbance at 405 nm were determined as amounts of MuSK Ab subclasses. \*\* $P < 0.01$  versus IgG1 subclass (analysis of variance). Open symbols, control; filled symbols, MuSK.

ing weak cervical extensor muscles (Figure 1A). In addition, MuSK-injected mice exhibited significant weight loss and muscle weakness (Figure 1, B and C). By contrast, neither vehicle-injected mice ( $n = 5$ ; Figure 1, B and C) nor OVA-injected mice ( $n = 5$ ; data not shown) exhibited weight loss or muscle weakness. We also injected three A/WySnJ mice with *Torpedo californica* AChR protein three times (at days 0, 14, and 42) and found no effect on body weight or muscle strength in these mice (data not shown).

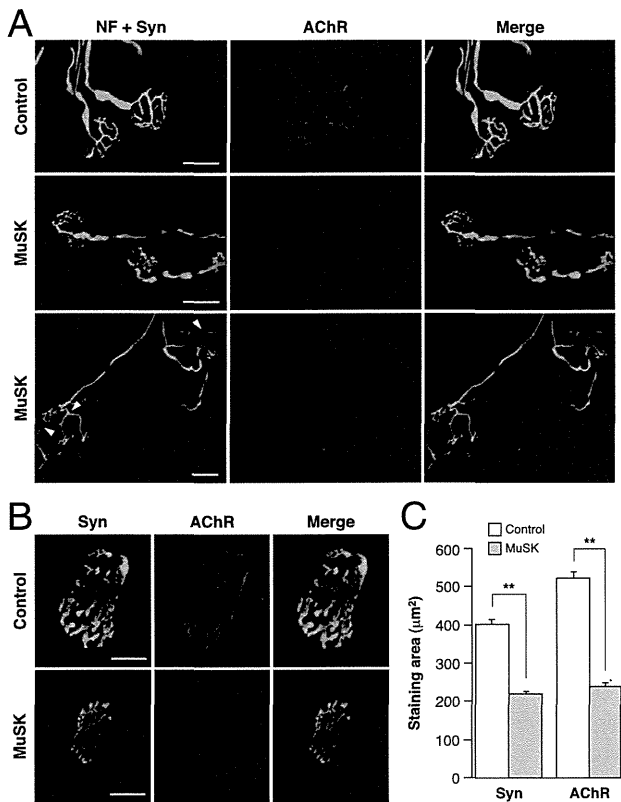
### IgG1 Is a Predominant Subclass in MuSK Abs

To test whether muscle weakness of the mice correlates with serum titers of MuSK protein, we used ELISA. Anti-MuSK IgG antibodies were detectable in all MuSK-injected mice, whereas control mice ( $n = 5$ ) had no detectable antibodies to MuSK, which was similar to the preimmune sera (Figure 1D). Isotyping analysis revealed that MuSK Abs were predominantly of the

IgG1 subclass, along with smaller amounts of IgG2a and IgG2b (Figure 1E). No other subclasses tested were detected in the MuSK Abs. Mouse IgG1 has functional similarities with human IgG4 in terms of electrophoretic mobility and T-helper type 2 dependency for production.<sup>22</sup> Thus, MuSK-MG in patients and in A/WySnJ mice seems to share a common immune regulatory pathway.

### MuSK Abs Change Both Presynaptic and Postsynaptic Structures

To assess directly whether the presence of MuSK Abs results in NMJ structural changes, whole mounts of soleus muscles from MuSK-injected and control mice were double-labeled with BTx (a probe for AChRs), as well as a cocktail of antibodies against neurofilaments and the synaptic vesicle marker synaptophysin (markers for motor neuron axons and terminals, respectively). Extended-focus images collected by confocal microscopy

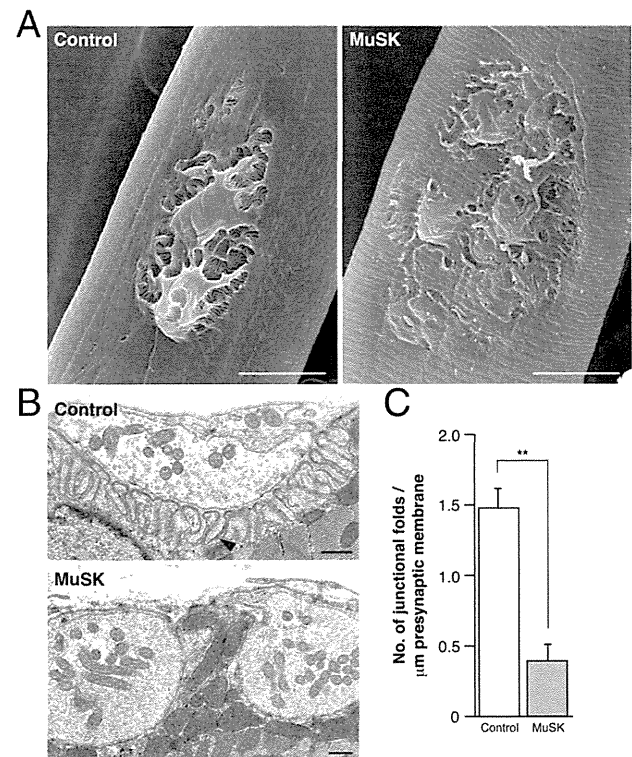


**Figure 2.** Disorganization of both presynaptic and postsynaptic structures in MuSK-injected mice. **A:** Whole-mount staining of NMJs from soleus muscles. Axons and nerve terminals (green) were stained with anti-neurofilament and anti-synaptophysin antibodies (NF + Syn), and AChRs (red) were labeled with rhodamine-BTx. Some NMJs with axon sprouts were observed in MuSK-injected mice (arrowheads). Scale bars: 30 µm. **B:** Soleus muscle nerve terminals were stained with anti-synaptophysin (green) and AChRs were stained with rhodamine-BTx (red). **C:** Synaptophysin and rhodamine-BTx-stained areas decreased to 54.8% and 45.6% of control levels, respectively, in MuSK-injected mice. Scale bars: 20 µm. Data are expressed as means ± SEM from ≥30 NMJs of each mouse (*n* = 3 mice/group). \*\**P* < 0.01 versus control (*t*-test).

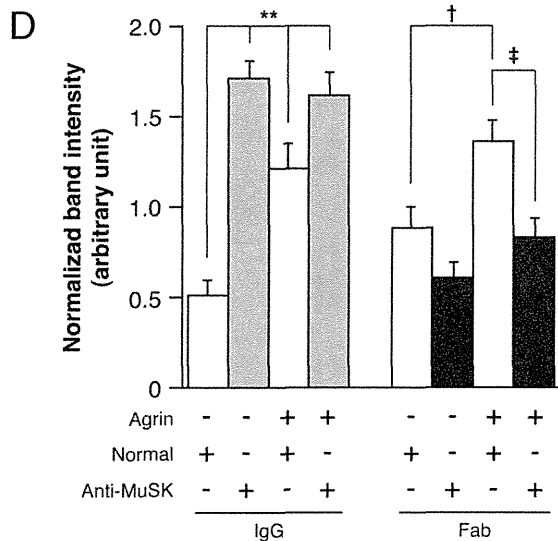
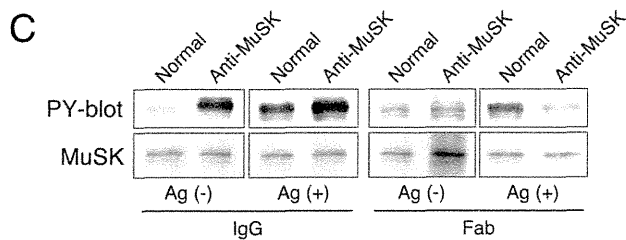
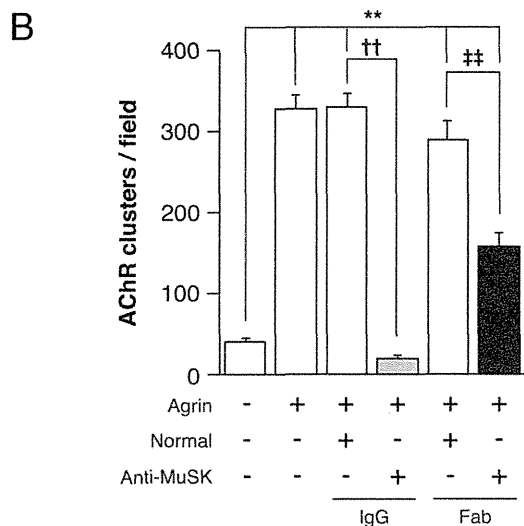
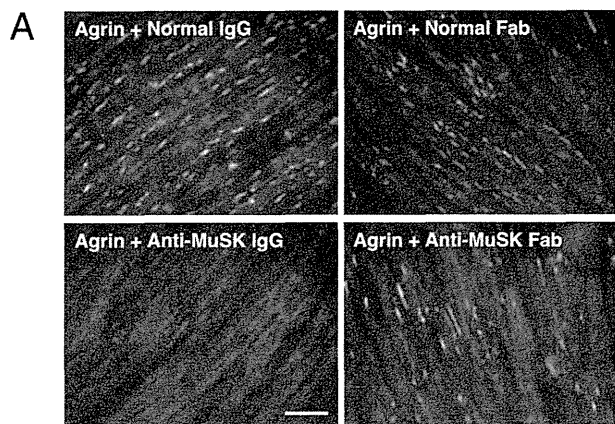
were recorded and used for quantitative structural analysis. Accordingly, areas of AChR-clustering and of apposing nerve terminals of NMJs were significantly smaller in soleus muscles of MuSK-injected mice (*n* = 109 NMJs from three mice), compared with controls (*n* = 126 NMJs from three mice) (Figure 2, A–C). Furthermore, the density of AChR clustering at NMJ postsynaptic membranes was reduced in soleus and other muscles of MuSK-injected mice, compared with control mice, as evidenced by the intensity of BTx at NMJs (Figure 2, A and B). In addition, axon sprouting, with or without the remnants of nerve terminals, was prominent at the NMJs of MuSK-injected mice (Figure 2A). These results are consistent with the axon outgrowth and reduced AChR clustering observed in other animal models of MuSK-MG.<sup>8,23,24</sup> These results also indicate that MuSK is required by mature NMJs for maintenance of AChR clustering at the postsynaptic membrane and apposing motor terminals. Because MuSK is expressed in skeletal muscle but not in motor neurons,<sup>25</sup> MuSK likely acts via retrograde signals to affect presynaptic NMJ structures.

### Changes in Three-Dimensional Structures of the NMJ Subneural Apparatus

Using SEM, we studied the three-dimensional organization of the subneural apparatus at NMJs in tibialis anterior muscles after removing presynaptic terminals and connective tissues.<sup>18</sup> In control mice, the subneural apparatus consisted of complex labyrinthine postsynaptic gutters, approximately 0.9 to 2.8 µm in width, containing numerous slit-like junctional folds. In MuSK-injected mice, however, the subneural apparatus had shallow gutters and lost both labyrinthine structures and formerly prominent slit-like junctional folds (Figure 3A). TEM observations made in diaphragm muscles revealed that synaptic folds underneath motor terminals underwent a pronounced loss in MuSK-injected NMJs, compared with control mice (Figure 3, B and C). Of note, the synaptic membrane was well preserved in MuSK-injected animals (Figure 3B), and we observed no complement-mediated destruction of synaptic structures.<sup>26</sup> These data indicate that MuSK is required for the maintenance of the subneural apparatus and that the reduction of synaptic folds in MuSK-injected mice likely impaired synaptic transmission and caused muscle weakness in these animals.



**Figure 3.** Disruption of NMJ ultrastructure in MuSK-injected mice. **A:** Complex synaptic gutters containing numerous slit-like junctional folds were observed by SEM in NMJs of control tibialis anterior muscle. Synaptic gutter flattening and a decreased number of slit-like junctional folds were observed in NMJs of MuSK-injected mice. Scale bars: 15 µm. **B:** Evenly distributed junctional folds (arrowhead) of comparable depth were observed in controls via TEM. Loss of junctional folds was observed in MuSK-injected mice. Scale bars: 500 nm. **C:** Junctional fold densities were significantly decreased in MuSK-injected mice. Data are expressed as means ± SEM from ≥10 NMJs of each mouse (*n* = 3 mice/group). \*\**P* < 0.01 versus controls (*t*-test).



### Both Divalent and Monovalent MuSK IgG Perturb MuSK Signaling in C2C12 Myotubes

Because our histological studies demonstrated that MuSK Abs caused EAMG without complement activation, we next tested MuSK Abs in sera from MuSK-injected mice for the ability to interfere with MuSK function *in vitro*. Agrin has been shown to induce the clustering of AChRs in C2C12 myotubes after autophosphorylation by MuSK.<sup>27</sup> When agrin and purified IgG antibodies from the sera of MuSK-injected mice were added to C2C12 myotubes, there was a significant reduction in the marked AChR clustering observed in the presence of purified IgG antibodies from normal sera (Figure 4, A and B). Because inhibition of MuSK signaling by MuSK Abs might have inhibited AChR clustering on C2C12 cells, we analyzed the effect of these antibodies on MuSK phosphorylation. However, MuSK-IgG antibodies induced tyrosine phosphorylation of MuSK in the absence of agrin, and these antibodies did not inhibit activation by agrin (Figure 4, C and D), as described previously,<sup>7,28</sup> suggesting that the divalent MuSK Abs altered a downstream pathway instead of inhibiting MuSK signaling directly.

Next, we generated monovalent Fab fragments of MuSK-IgG antibodies by papain digestion to determine whether they were sufficient to block MuSK signaling in C2C12 cells. Although monovalent Fab fragments of MuSK-IgG antibodies did not activate autophosphorylation of MuSK in the absence of agrin (Figure 4, C and D), these Fab fragments significantly inhibited agrin-induced AChR clustering and MuSK phosphorylation (Figure 4, A–C). These results indicate that monovalent MuSK Abs can block MuSK function *in vitro*.

### Neuromuscular Transmission Is Impaired in MuSK-Injected Mice

We performed electrophysiology experiments to determine the effect of MuSK Abs on neuromuscular transmission in mature NMJs. First, we performed EMG experiments in the gastrocnemius muscles of MuSK-injected

**Figure 4.** Inhibition of agrin-induced MuSK function in cultured myotubes by anti-MuSK IgG and Fab fragments. **A:** C2C12 myotubes were treated with either normal IgG/Fab (10  $\mu$ g/mL) or anti-MuSK IgG/Fab (10  $\mu$ g/mL) for 30 minutes and then were incubated with 1 nmol/L agrin for 16 hours. AChR clusters were labeled with Alexa Fluor 594-BTx. Scale bar = 100  $\mu$ m. **B:** The number of AChR clusters decreased significantly in anti-MuSK IgG or Fab-treated myotubes. Quantification was performed on six randomly selected fields from each of four experiments, and data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $P$  < 0.01 versus no treatment; †† $P$  < 0.01 versus treatment with agrin + normal IgG; †† $P$  < 0.01 versus treatment with agrin + normal Fab (analysis of variance). **C:** C2C12 myotubes were treated with either normal IgG/Fab or anti-MuSK IgG/Fab for 30 minutes. Half of the myotube cultures were then treated with 1 nmol/L agrin (Ag) for 30 minutes. Cell extracts were immunoprecipitated with MuSK antibody and immunoblotted with anti-phosphotyrosine (PY-blot) and anti-MuSK. **D:** Divalent anti-MuSK IgG treatment induced MuSK phosphorylation in the absence of agrin, but treatment with monovalent anti-MuSK Fab significantly inhibited agrin-induced MuSK phosphorylation. Band intensities of the PY-blot were normalized to total MuSK. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from three experiments. \*\* $P$  < 0.01 versus treatment with normal IgG; † $P$  < 0.05 versus treatment with normal Fab; † $P$  < 0.05 versus treatment with agrin + normal Fab (analysis of variance). Control: open symbols; MuSK: filled symbols.

mice with severe muscle weakness. Repetitive stimulation at 3 Hz elicited a declining CMAP response reminiscent of that observed in MG patients, whereas the CMAPs of control mice exhibited no such decline in response (Figure 5A). CMAP amplitude declined by an average of  $25.8 \pm 3.2\%$  ( $n = 10$ ) in MuSK-injected mice (Figure 5B). These results indicate that a failure of neu-

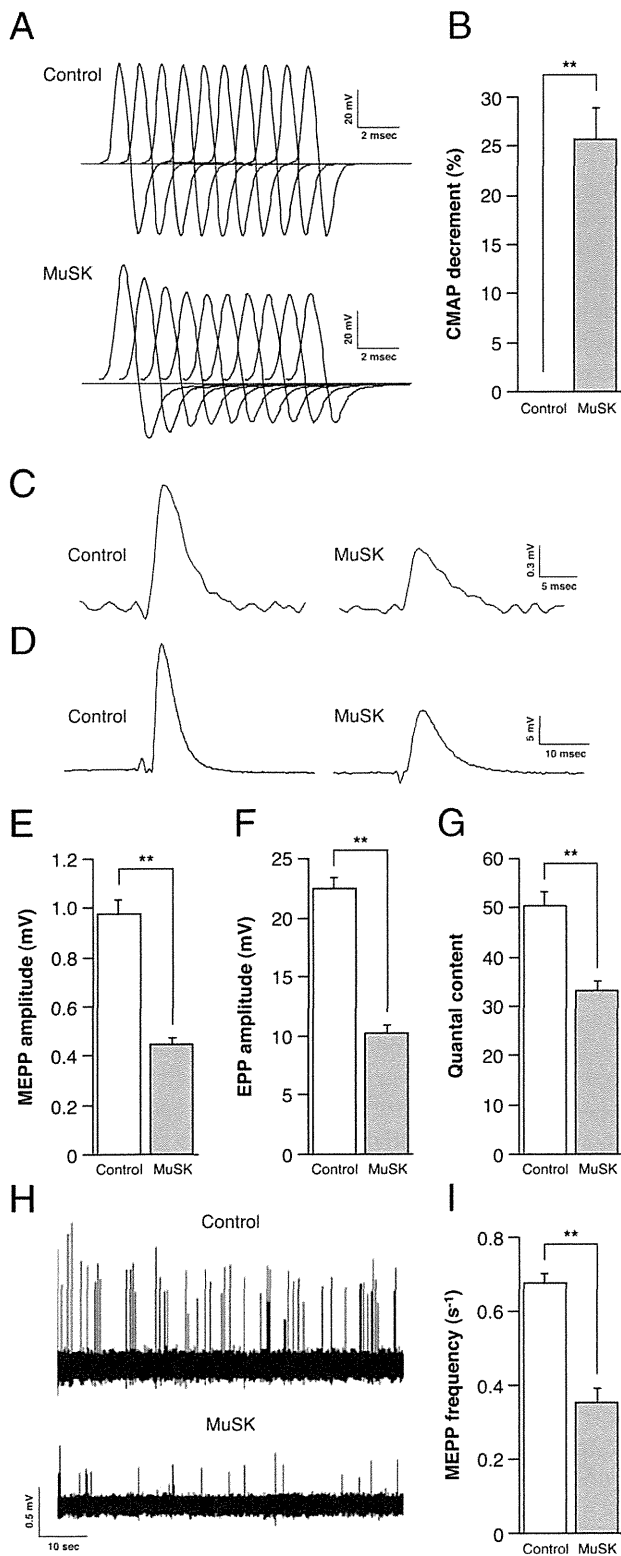
romuscular transmission was the likely cause of muscle weakness in MuSK-injected mice.

Next, we analyzed the MEPPs and EPPs of MuSK-injected mice via intracellular recordings from muscle fibers of excised hemi-diaphragms.<sup>17,29</sup> No significant difference was observed in resting membrane potential between control mice ( $-64.1 \pm 0.96$  mV) and MuSK-injected mice ( $-65.4 \pm 1.33$  mV). In MuSK-injected mice, both MEPP and EPP amplitudes (MEPP,  $0.45 \pm 0.03$  mV; EPP,  $10.2 \pm 0.67$  mV;  $n = 47$  NMJs in 4 mice) were significantly decreased, compared with controls (MEPP,  $0.98 \pm 0.06$  mV; EPP,  $22.4 \pm 0.92$  mV;  $n = 63$  NMJs in 3 mice) (Figure 5, C–F). A decrease in EPP amplitude could result either from fewer transmitter quanta being released by a single nerve impulse or from a smaller effect of individual quanta.<sup>30</sup> In addition to the decreased MEPP amplitude, which indicates a smaller postsynaptic effect, the mean quantal content (ie, the steady-state number of quanta released by a single nerve impulse under stimulation at 0.7 Hz) of MuSK-injected diaphragms was also decreased, falling to  $33.3 \pm 1.78$  (or 66.2% of the normal value,  $50.3 \pm 2.92$ ) (Figure 5G). Taken together, these two effects could result in decreased EPP amplitude, leading to CMAP amplitude decrements.

In addition to the decrease in stimulation-dependent quantal release, MuSK-injected mice ( $0.35 \pm 0.04/s$ ;  $n = 48$  NMJs in 4 mice) exhibited a 52% reduction in spontaneous release, as observed in MEPP frequency, compared with controls ( $0.67 \pm 0.02/s$ ;  $n = 61$  NMJs in 4 mice) (Figure 5, H and I). Because MuSK protein injection resulted in decrease in MEPP amplitude due to the loss of AChR clusters, we could not exclude the possibility that some of the emerging MEPPs were undetectable by our method. However, these results might indicate a low probability of spontaneous quantal ACh release resulting from a presynaptic defect in MuSK-injected mice, as described previously.<sup>31,32</sup>

### MuSK-EAMG Is Inducible in Other Complement-Deficient Strains of Mice

A/WySnJ mice exhibit a significant loss of mature B cells due to the B-cell maturation defect-1 (*Bcmd-1*) mutant allele of B-cell-activating factor receptor (*BAFF-R*), and are genetically prone to develop B cell-mediated autoimmunity.<sup>33,34</sup> [*BAFF-R* has since been reclassified as tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c



**Figure 5.** Impairment of neuromuscular transmission after MuSK injection. **A:** Representative EMG traces during repetitive nerve stimulation. MuSK-injected mice exhibited a decremental CMAP amplitude response, consistent with MG. **B:** MuSK-injected mice exhibited significant CMAP decline (mean,  $25.8 \pm 3.2\%$ ).  $n = 3$ , control;  $n = 10$ , MuSK-injected. Representative MEPP (**C**) and EPP (**D**) traces from diaphragm muscles. Mean amplitudes of both MEPPs (**E**) and EPPs (**F**), as well as mean quantal release by nerve stimulation (**G**), were decreased in MuSK-injected mice to 45.9%, 45.5%, and 66.2% of control values, respectively. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from  $\geq 10$  NMJs of each mouse ( $n = 3$ , control;  $n = 4$ , MuSK-injected). **H:** Representative MEPP recordings from diaphragm muscles. **I:** MEPP frequencies were decreased to 52.0% of control levels in MuSK-injected mice. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from  $\geq 10$  NMJs of each mouse ( $n = 4$  mice/group). \*\* $P < 0.01$  versus controls (*t*-test).

**Table 1.** Incidence of MuSK-MG in Seven Mouse Strains

Strain	Total number of mice	MG symptoms (no. of mice)			Incidence (%)
		No symptoms	>10% CMAP decrement		
			<20% weight loss	>20% weight loss	
A/WySnJ	18	0	0	18	100
A/J	5	0	0	5	100
DBA/2	5	0	1	4	100
FVB/N	5	0	0	5	100
B10.A-H2 <sup>a</sup>	4	0	4	0	100
BALB/c	4	1	1	2	75.0
C57BL/6	11	6	4	1	45.5

CMAP, compound muscle action potential.

(*Tnfrsf13c*]. To determine whether the presence of this mutant allele affects the onset of MuSK-EAMG regardless of C5 deficiency, several strains of mice carrying no *Bcmd-1* mutant allele (A/J, DBA/2, FVB/N), but exhibiting the same C5 deficiency as A/WySnJ,<sup>19</sup> were injected with MuSK protein in the same manner and on the same schedule. Almost all of the mice tested exhibited a marked decrease in body weight in addition to impairment of neuromuscular transmission, indicating that a severe form of MuSK-EAMG is inducible in other C5-deficient strains at high incidence (Table 1). Of note, these mice were more sensitive to the onset of MuSK-EAMG than were complement-sufficient mice, such as B10.A-H2<sup>a</sup>, BALB/c, and C57BL/6. Notably, approximately one half of the C57BL/6 mice examined exhibited neither significant weight loss nor neuromuscular transmission defect, despite receiving three injections (Table 1). These results imply that C5-deficient strains may share the genetic background that confers susceptibility to severe MuSK-EAMG.

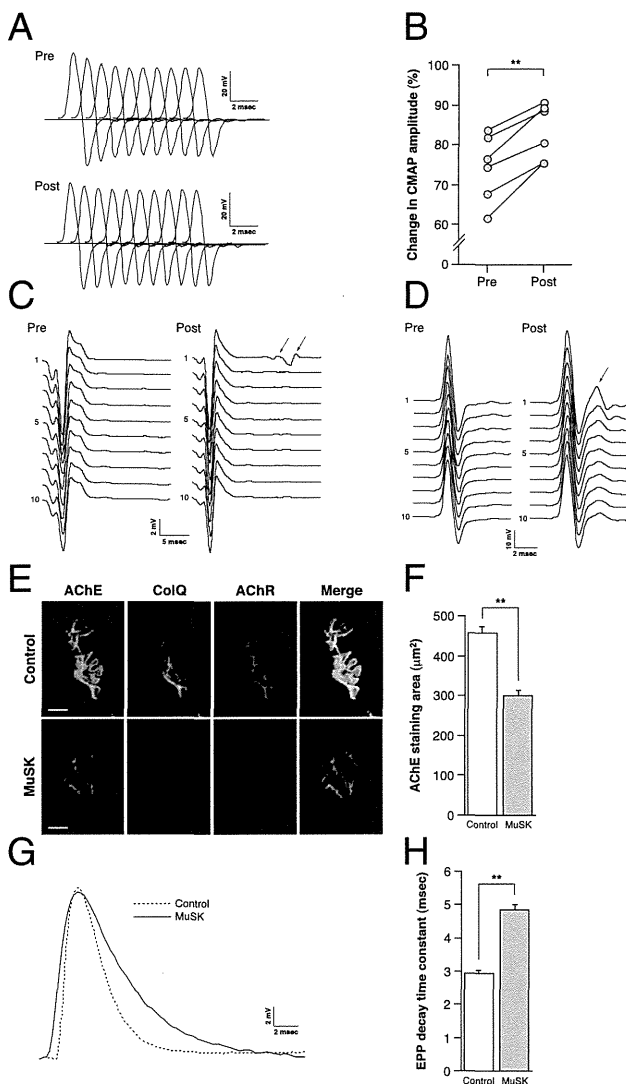
To validate the results obtained using A/WySnJ mice, genetically engineered C3-deficient mice were used to induce MuSK-EAMG.<sup>35</sup> Although two out of five MuSK-injected mice exhibited moderate (<20%) weight reduction 2 weeks after the third injection (see Supplemental Figure S1 at <http://ajp.amjpathol.org>), these mice exhibited a significant decrease in muscle strength, compared with controls. In addition, all MuSK-injected mice exhibited a decremental CMAP amplitude response after repetitive nerve stimulation, indicating that neuromuscular transmission was impaired (see Supplemental Figure S1, D and E, at <http://ajp.amjpathol.org>). In whole-mount staining of soleus muscles from MuSK-injected mice, the pretzel-like structures of AChR clusters were totally disassembled, and axon sprouting was observed in many NMJs (see Supplemental Figure S1F at <http://ajp.amjpathol.org>). Taken together, these results are consistent with those obtained from A/WySnJ mice, confirming that complement activation is dispensable for the onset of MuSK-EAMG.

### MuSK Abs Impair AChE Function at NMJs

AChE inhibitors are an effective for treatment of AChR-MG symptoms, but may cause muscle cramps, fasciculation, dysphagia, and respiratory insufficiency in MuSK-MG pa-

tients.<sup>14,36</sup> Therefore, to investigate the effect of AChE-inhibition on recovery of neuromuscular transmission, we administered the AChE inhibitor neostigmine to MuSK-injected mice, and recorded CMAPs by repetitive nerve stimulation before and 20 minutes after neostigmine administration (37.5  $\mu$ g/kg). Although all neostigmine-treated, MuSK-injected mice ( $n = 6$ ) exhibited a significant reversal in CMAP decline, only one mouse recovered CMAP to within 10% of the decline (9.2%), which is considered a normal response (Figure 6, A and B). Of note, in two neostigmine-treated, MuSK-injected mice, we recorded an abnormal EMG pattern 5 to 20 ms after the CMAP peak in the first trace in a stimulation series, as is observed in MuSK-MG patients after AChE inhibitor treatment (Figure 6C).<sup>37,38</sup> Furthermore, another abnormal EMG pattern related to a congenital myasthenic syndrome caused by an AChE deficiency was recorded in a separate MuSK-injected mouse (Figure 6D).<sup>39</sup> Repetitive nerve stimulation at 3 Hz elicited a second CMAP with smaller amplitude than the first, a moderate decline of the primary CMAP, and a faster decline of the secondary CMAP. We did not observe abnormal EMG patterns after neostigmine injection in control mice (data not shown). These observations indicate abnormal sensitivities to ACh at endplates after MuSK injection, and suggest that the pathological conditions of patients with neuromuscular disorders could be reproduced in MuSK-injected mice.

Given that abnormal electrophysiological signs have been observed in MuSK-MG patients administered an overdose of AChE inhibitors or in patients with congenital myasthenia with AChE deficiency,<sup>38,39</sup> we postulated that AChE deficiency relative to ACh activity at NMJs might be the cause of these abnormalities. We therefore examined the expression of AChE and the AChE-anchoring protein ColQ, which may bind to MuSK and promote the accumulation of AChE at the postsynaptic membrane.<sup>40,41</sup> Using BTx and antibodies against AChE and ColQ, we triple-labeled soleus muscle whole mounts from MuSK-injected and control mice. The intensities of both AChE and ColQ expression at NMJs in MuSK-injected mice were reduced (Figure 6E), and the area of AChE expression was decreased significantly in MuSK-injected mice ( $n = 104$  NMJs in 3 mice), compared with control mice ( $n = 91$  NMJs in 3 mice) (Figure 6, E and F).



**Figure 6.** Impairment of AChE function in MuSK-injected mice. **A:** Representative EMG traces before and after neostigmine treatment. **B:** Neostigmine induced a significant reversal of CMAP decrement, ranging from 23.4% to 54.1% (mean,  $36.4 \pm 4.8\%$ ).  $**P < 0.01$  (paired *t*-test). **C and D:** Abnormal EMG traces evoked by neostigmine treatment. After neostigmine treatment, disturbance of baseline (**arrows**) after CMAP emerged in the first trace only (**C**), and a second CMAP (**arrow**) emerged, with smaller amplitude than the first, and then gradually disappeared (**D**). **E:** Levels of antibody staining for AChE (green), ColQ (cyan), and Alexa Fluor 647-BTx labeling of AChRs (red) were reduced in soleus muscles of MuSK-injected mice, compared with controls. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **F:** The average AChE staining area decreased to 65.8% of control values in MuSK-injected mice;  $\geq 30$  NMJs from each mouse ( $n = 3$  mice/group) were quantified. **G:** Representative EPP traces from control and MuSK-injected mouse diaphragms. In EPP traces with equivalent amplitudes, MuSK-injected mice exhibited longer EPP decay time constants ( $\tau = 5.0$  ms), compared with controls ( $\tau = 2.6$  ms). **H:** The mean EPP  $\tau$  of MuSK-injected mice was 164% that of control mice. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from  $\geq 10$  NMJs of each mouse ( $n = 3$  mice/group).  $**P < 0.01$  versus control mice (*t*-test).

Furthermore, we investigated the impairment of AChE function by examining the rate of EPP decay, the EPP decay time constant ( $\tau$ ), using intracellular recordings as described above.<sup>42</sup> In traces with similar amplitudes, the falling phase of the EPP of MuSK-injected mice was not as steep as that of controls (Figure 6G), and the mean EPP  $\tau$  of MuSK-injected mice ( $4.85 \pm 0.16$  ms,  $n = 30$  NMJs in 3 mice) was longer than that of controls ( $2.95 \pm$

0.07 ms,  $n = 53$  NMJs in 3 mice) (Figure 6H), indicating that the AChE at NMJs in MuSK-injected mice could not hydrolyze ACh rapidly, leading to prolonged ACh action. Taken together, our results demonstrate that MuSK is required for the binding of AChE clusters to ColQ at the NMJ postsynaptic membrane *in vivo* and that MuSK Abs interfered with AChE function, leading to hypersensitivity to ACh after neostigmine treatment.

### Discussion

In the present study, we investigated the pathophysiology of MuSK-MG using a new animal model in which 100% of mice synchronously develop MG after MuSK protein injection. In addition, we demonstrated the pathogenicity of MuSK Abs and found novel roles for MuSK activity at mature NMJs.

We previously demonstrated the pathogenicity of MuSK Abs via active immunization of rabbits with recombinant soluble MuSK protein.<sup>7</sup> In addition, EAMG induced by inoculation of MuSK protein has also been successfully established in mice.<sup>23,43</sup> Furthermore, when passive transfer of human MuSK Abs from MG patients into mice caused severe muscle weakness,<sup>8</sup> and EMG results were compatible with a diagnosis of MG, the pathogenicity of MuSK Abs was confirmed. Although it has been postulated that the human IgG4 subclass of autoantibodies causes MuSK-MG without complement activation, previous pathophysiological studies did not include complement-deficient animals.<sup>9,10,44</sup>

The A/WySnJ mouse strain cannot generate the membrane attack complex, which is the cytolytic end product of the complement cascade, because of mutations in the complement component 5 gene (*C5*).<sup>19</sup> Thus, the use of this strain allowed us to completely eliminate the role of complement activation on the onset of MG and to analyze non-complement-mediated effects. Previously, a high incidence of EAMG after MuSK immunization was also observed in A/J mice, which exhibit the same *C5* deficiency as A/WySnJ mice.<sup>23</sup> We demonstrated that not only A/J but also other *C5*-deficient strains exhibited a severe form of MuSK-EAMG at a high incidence, as observed in the A/WySnJ strain. Complement-mediated damage to postsynaptic membranes is considered to be the major pathogenic mechanism in AChR-MG, because complement-deficient mice are resistant to EAMG induced by AChR immunization.<sup>20,21</sup> However, our results demonstrate that complement activation is not necessary for the onset of MuSK-MG, and provide insight into the mechanism by which the IgG4 subclass of MuSK Abs causes human MG.<sup>9,10</sup>

The IgG4 subclass of MuSK Abs observed in MG patients may have a functionally monovalent antigen-binding site, because IgG4 exchanges Fab arms with non-pathogenic IgG4 *in vivo*.<sup>45</sup> Therefore, this particular IgG4 may not efficiently reduce the number of MuSK molecules on the surface of postsynaptic membranes by invoking a cross-linking mechanism requiring divalent antibodies. Although no dynamic exchange of the IgG-Fab arm is found in mouse IgG subclasses, we demonstrated *in*

*vitro* that the monovalent Fab fragments of MuSK-IgG inhibited MuSK signaling and AChR clustering. Therefore, MuSK antibody binding could directly inhibit MuSK function required for the maintenance of mature NMJs, as well as internalization of MuSK molecules from the plasma membrane.<sup>7,46</sup>

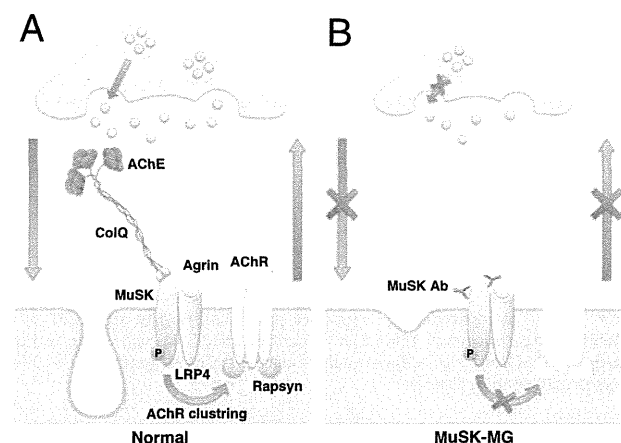
In the present study, we demonstrated that MuSK is required for maintenance of mature NMJ structure and function. Our complement-deficient mouse model exhibited a loss of AChR expression, as well as a reduction in the size of motor terminals apposing AChR clusters at NMJs. These changes were consistent with those observed in complement-sufficient animals that developed MuSK-EAMG<sup>7,8,23,43</sup> and in mice bearing the MuSK mutations observed in congenital myasthenic syndrome.<sup>47,48</sup> Furthermore, our ultrastructural studies indicate a significant loss of complexity in convoluted postsynaptic structures (eg, the flattening of synaptic gutters), as well as a decrease in the number of slit-like junctional folds at postsynaptic membranes.

In addition to morphological defects, our model exhibited functional defects at presynapses, including lower levels of transmitter release from nerve terminals. In clinical studies, low levels of presynaptic ACh release were found at NMJs of a MuSK-MG patient using *in vitro* electrophysiology, which is consistent with our results.<sup>49,50</sup> It has been shown that AChR-MG, which is caused exclusively by postsynaptic defects, results in an increase in quantal content in both patients and EAMG model animals, suggesting the involvement of a compensatory retrograde signaling mechanism between postsynaptic and presynaptic sites.<sup>51,52</sup> Therefore, the decrease in quantal content in MuSK-MG might imply dysfunction of this compensatory mechanism, suggesting that MuSK mediates retrograde signaling involving transmitter release from nerve terminals. In this regard, mice that carry an inactivated form of the gene encoding muscle-specific  $\beta$ -catenin, a signaling protein downstream of dishevelled (Dvl), or laminin  $\beta$ 2, also have morphological defects both presynaptically and postsynaptically.<sup>31,32</sup> These data point to the important roles these molecules play in NMJ formation. Furthermore, both spontaneous and evoked ACh release from nerve terminals are reduced by abnormalities in the vesicle release machinery or reductions in the number of release sites. Therefore, we cannot exclude the possibility that the defects observed in our EAMG model might result from impairment of the presynaptic component itself, via dysfunction of MuSK (although it is generally assumed that the reductions observed in presynaptic and postsynaptic areas are related to diminished ACh release<sup>17</sup>). Our data suggest that MuSK plays a role in the maintenance of presynaptic function at NMJs through retrograde signaling.

We demonstrated that MuSK is required for proper AChE function at NMJs and determined the mechanism by which AChE inhibitor treatment exacerbates MuSK-MG symptoms. It is clear that MuSK participates in the accumulation of AChE in the synaptic basal lamina of NMJs, possibly by forming complexes with ColQ, as postulated previously based on *in vitro* experiments.<sup>41</sup> MuSK might act as a scaffold molecule, anchoring those complexes to the

synaptic basal lamina. Additionally, MuSK signaling may be required for the highly localized expression of AChE mRNA at mature NMJs.<sup>53,54</sup> Accumulated AChE in the synaptic cleft may tightly limit both the temporal and spatial extent of cholinergic neurotransmission by rapid cleavage of ACh at the basal lamina. However, inhibition of MuSK by MuSK Abs decreased levels of AChE at the basal lamina and impaired its function, as shown by the prolonged EPP time constant we observed. If AChE inhibitors were to be administered in these conditions, the rebinding to AChRs by an excess of ACh existing at the synaptic cleft could provoke cholinergic hypersensitivity (recorded as an abnormal EMG pattern) and so could eventually lead to cholinergic crises.

Clinically, MuSK-MG patients tend to have severely weak, atrophied muscles and are more refractory to treatment than AChR-MG patients. These differences in clinical symptoms between MuSK-MG and AChR-MG could result from the distinct pathogenic mechanisms involved in these two types of MG. Overall, our results indicate that MuSK plays indispensable roles in the structural and functional maintenance of mature NMJs, and that disruption of MuSK function by specific autoantibodies causes MG (Figure 7). One of the main signals that cause advancement from presynapse to postsynapse stages is the agrin/MuSK pathway, but the retrograde signals regulated by MuSK are still elusive. Although fibroblast growth factors, laminin  $\beta$ 2, and collagen  $\alpha$ (IV) chains act as muscle-derived organizers of presynaptic differentiation, whether they act in conjunction with MuSK signaling is uncertain.<sup>55,56</sup> Our model of MuSK-MG did not exhibit immune complex-mediated damage to tissue that would otherwise participate in this interaction. Our model thus provides a valuable platform from which to evaluate the role of MuSK signaling in NMJ maintenance and the immune mechanisms and pathophysiology of MuSK-MG.



**Figure 7.** Pathogenic mechanism of MG induced by MuSK Abs. **A:** In normal NMJs, agrin binds to LRP4 to activate MuSK. MuSK regulates the maintenance of both presynaptic and postsynaptic structures and functions bidirectionally. **B:** MuSK Abs bind to the ectodomain of MuSK, causing MuSK degradation by antigenic modulation and/or direct inhibition of MuSK function. This inhibits MuSK, resulting in structural disruptions (eg, dispersal of AChR clusters, loss of synaptic folds, and degeneration of nerve terminals) and functional abnormalities (eg, decrease in ACh release) that eventually lead to MG. Furthermore, the decreased levels of AChE, which is anchored to MuSK by ColQ, can induce a cholinergic crisis mediated by AChE inhibitors, exacerbating the symptoms of MG.

As a result, this model could be instrumental in the development of effective medications for this group of devastating diseases.

## Acknowledgments

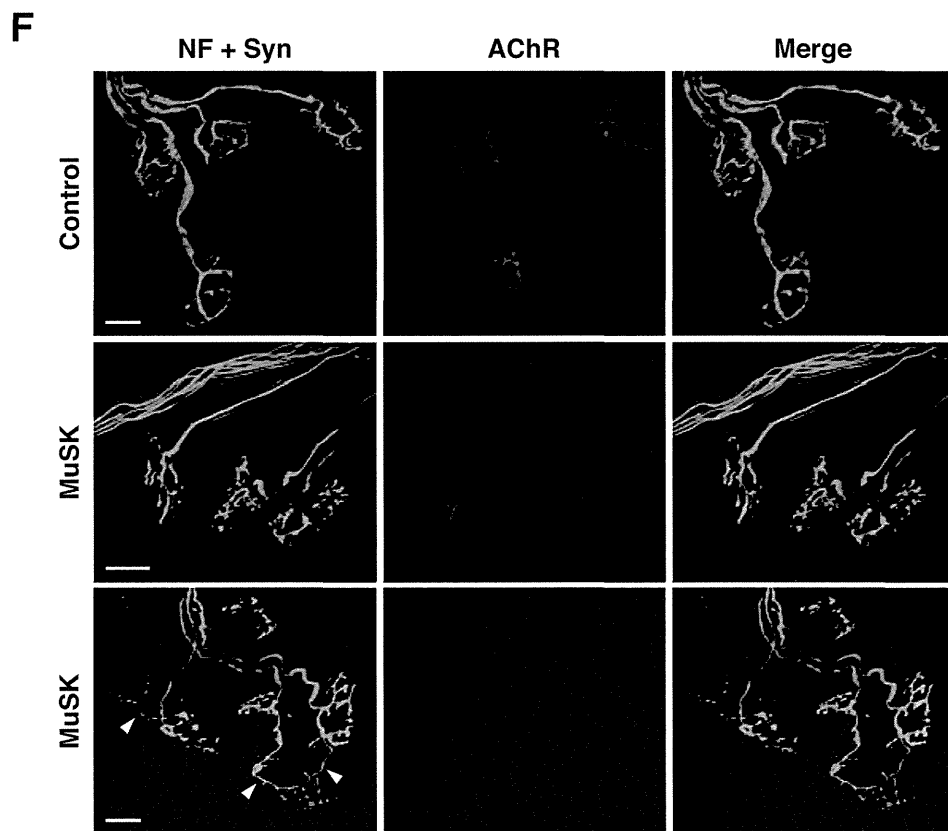
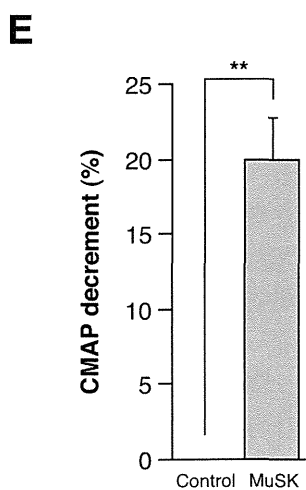
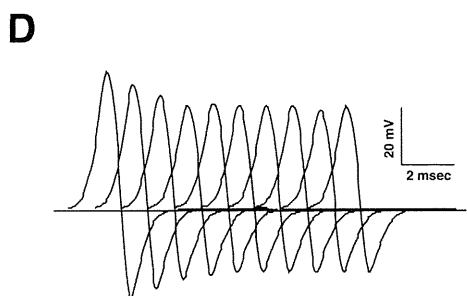
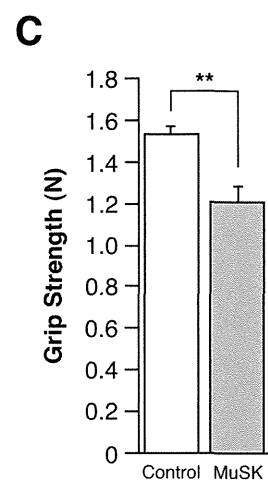
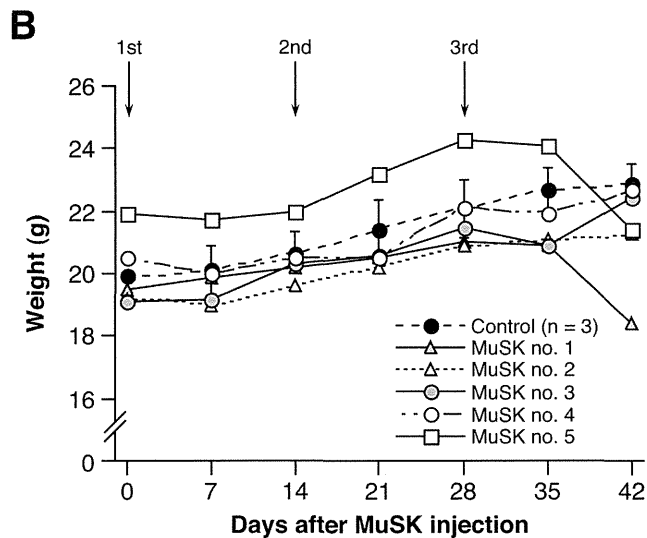
We thank Terrone L. Rosenberry for AChE antibody and Fumio Hasegawa for excellent technical assistance with ultrastructural studies.

## References

- Vincent A, Lang B, Kleopa KA: Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006, 52:123–138
- Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ: Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 2006, 116:2843–2854
- Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001, 7:365–368
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD: The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 1996, 85:501–512
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ: Lrp4 is a receptor for agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 2008, 135:334–342
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L: LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008, 60:285–297
- Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, Hato N, Yamada H, Jie C, Kobayashi N, Mominoki K, Abe Y, Ueda N, Matsuda S: Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006, 116:1016–1024
- Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, Phillips WD: Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* 2008, 63:782–789
- McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, Vincent A: Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004, 55:580–584
- Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, Maruyama N, Konishi T, Ohta M: Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 2007, 14:1029–1034
- Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, Beeson D, Willcox N, Vincent A: IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain* 2008, 131:1940–1952
- Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, McConville J, Vincent A: Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 2003, 60:1978–1980
- Oh SJ: Muscle-specific receptor tyrosine kinase antibody positive myasthenia gravis current status. *J Clin Neurol* 2009, 5:53–64
- Hatanaka Y, Hemmi S, Morgan MB, Scheufele ML, Claussen GC, Wolfe GI, Oh SJ: Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG. *Neurology* 2005, 65:1508–1509
- Tierney ML, Osborn KE, Milburn PJ, Stowell MH, Howitt SM: Phylogenetic conservation of disulfide-linked, dimeric acetylcholine receptor pentamers in southern ocean electric rays. *J Exp Biol* 2004, 207:3581–3590
- Martin AR: A further study of the statistical composition on the end-plate potential. *J Physiol* 1955, 130:114–122
- Wood SJ, Slater CR: Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 2001, 64:393–429
- Ezaki T, Oki S, Matsuda Y, Desaki J: Age changes of neuromuscular junctions in the extensor digitorum longus muscle of spontaneous thymoma BUF/Mna rats. A scanning and transmission electron microscopic study. *Virchows Arch* 2000, 437:388–395
- Wetsel RA, Fleischer DT, Haviland DL: Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. *J Biol Chem* 1990, 265:2435–2440
- Christadoss P, Lindstrom JM, Talal N, Duvic CR, Kalantri A, Shenoy M: Immune response gene control of lymphocyte proliferation induced by acetylcholine receptor-specific helper factor derived from lymphocytes of myasthenic mice. *J Immunol* 1986, 137:1845–1849
- Christadoss P, Tüzün E, Li J, Saini SS, Yang H: Classical complement pathway in experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1132:210–219
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES: Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988, 334:255–258
- Jha S, Xu K, Maruta T, Oshima M, Mosier DR, Atassi MZ, Hoch W: Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *J Neuroimmunol* 2006, 175:107–117
- Xu K, Jha S, Hoch W, Dryer SE: Delayed synapsing muscles are more severely affected in an experimental model of MuSK-induced myasthenia gravis. *Neuroscience* 2006, 143:655–659
- Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, Nuñez L, Park JS, Stark JL, Gies DR, Thomas S, Le Beau MM, Fernald AA, Copeland NG, Jenkins NA, Burden SJ, Glass DJ, Yancopoulos GD: Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 1995, 15:573–584
- Engel AG, Tsujihata M, Lambert EH, Lindstrom JM, Lennon VA: Experimental autoimmune myasthenia gravis: a sequential and quantitative study of the neuromuscular junction ultrastructure and electrophysiologic correlations. *J Neuropathol Exp Neurol* 1976, 35:569–587
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD: Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 1996, 85:513–523
- Hopf C, Hoch W: Dimerization of the muscle-specific kinase induces tyrosine phosphorylation of acetylcholine receptors and their aggregation on the surface of myotubes. *J Biol Chem* 1998, 273:6467–6473
- Magleby KL: Neuromuscular transmission. *Myology*, ed 3. Edited by AG Engel, C Franzini-Armstrong. New York, McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2004, pp 373–396
- Slater CR, Fawcett PR, Walls TJ, Lyons PR, Bailey SJ, Beeson D, Young C, Gardner-Medwin D: Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with 'limb-girdle myasthenia'. *Brain* 2006, 129:2061–2076
- Knight D, Tolley LK, Kim DK, Lavidis NA, Noakes PG: Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J Physiol* 2003, 546:789–800
- Li XM, Dong XP, Luo SW, Zhang B, Lee DH, Ting AK, Neiswender H, Kim CH, Carpenter-Hyland E, Gao TM, Xiong WC, Mei L: Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin. *Nat Neurosci* 2008, 11:262–268
- Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C: BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001, 293:2108–2111
- Mayne CG, Amanna IJ, Nashold FE, Hayes CE: Systemic autoimmunity in BAFF-R-mutant A/WySnJ strain mice. *Eur J Immunol* 2008, 38:587–598
- Tüzün E, Scott BG, Goluszko E, Higgs S, Christadoss P: Genetic evidence for involvement of classical complement pathway in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2003, 171:3847–3854
- Punga AR, Stålberg E: Acetylcholinesterase inhibitors in MG: to be or not to be? *Muscle Nerve* 2009, 39:724–728
- Punga AR, Flink R, Askmark H, Stålberg EV: Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody. *Muscle Nerve* 2006, 34:111–115
- Punga AR, Sawada M, Stålberg EV: Electrophysiological signs and the prevalence of adverse effects of acetylcholinesterase inhibitors in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008, 37:300–307
- Bestue-Cardiel M, Sáenz de Cabezón-Alvarez A, Capablo-Liesa JL, López-Pisón J, Peña-Segura JL, Martín-Martínez J, Engel AG: Con-



- genital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to ephedrine. *Neurology* 2005, 65:144–146
40. Feng G, Krejci E, Molgó J, Cunningham JM, Massoulié J, Sanes JR: Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 1999, 144:1349–1360
  41. Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C: MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004, 165:505–515
  42. Kohara N, Lin TS, Fukudome T, Kimura J, Sakamoto T, Kaji R, Shibasaki H: Pathophysiology of weakness in a patient with congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Muscle Nerve* 2002, 25:585–592
  43. Shigemoto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N, Kobayashi N, Kameda K, Mominoki K, Miyazawa A, Ishigami A, Matsuda S, Maruyama N: Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1132:93–98
  44. Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, Dekker FW, Wintzen AR, Wirtz PW, Vincent A, van Tol MJ, Jol-van der Zijde CM, Verschuuren JJ: Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol* 2008, 195:151–156
  45. van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, den Bleker TH, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, De Baets MH, van de Winkel JG, Aalberse RC, Parren PW: Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007, 317:1554–1557
  46. Cole RN, Ghazanfari N, Ngo ST, Gervásio OL, Reddel SW, Phillips WD: Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *J Physiol* 2010, 588:3217–3229
  47. Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauche S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Ios C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J, Hantai D: MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2004, 13:3229–3240
  48. Chevessier F, Girard E, Molgó J, Bartling S, Koenig J, Hantai D, Witzemann V: A mouse model for congenital myasthenic syndrome due to MuSK mutations reveals defects in structure and function of neuromuscular junctions. *Hum Mol Genet* 2008, 17:3577–3595
  49. Burges J, Vincent A, Molenaar PC, Newsom-Davis J, Peers C, Wray D: Passive transfer of seronegative myasthenia gravis to mice. *Muscle Nerve* 1994, 17:1393–1400
  50. Niks EH, Kuks JB, Wokke JH, Veldman H, Bakker E, Verschuuren JJ, Plomp JJ: Pre- and postsynaptic neuromuscular junction abnormalities in musk myasthenia. *Muscle Nerve* 2010, 42:283–288
  51. Plomp JJ, Van Kempen GT, De Baets MB, Graus YM, Kuks JB, Molenaar PC: Acetylcholine release in myasthenia gravis: regulation at single end-plate level. *Ann Neurol* 1995, 37:627–636
  52. Cull-Candy SG, Miledi R, Trautmann A, Uchitel OD: On the release of transmitter at normal, myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human end-plates. *J Physiol* 1980, 299:621–638
  53. Jasmin BJ, Lee RK, Rotundo RL: Compartmentalization of acetylcholinesterase mRNA and enzyme at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuron* 1993, 11:467–477
  54. Legay C, Huchet M, Massoulié J, Changeux JP: Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. *Eur J Neurosci* 1995, 7:1803–1809
  55. Fox MA, Sanes JR, Borza DB, Eswarakumar VP, Fässler R, Hudson BG, John SW, Ninomiya Y, Pedchenko V, Pfaff SL, Rheault MN, Sado Y, Segal Y, Werle MJ, Umemori H: Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* 2007, 129:179–193
  56. Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS: A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 2004, 432:580–587



Supplemental Figure S1.

特集 サルコペニア

## サルコペニアの発症機序\*

● 重本和宏\*\* / 森 秀一\*\* / 宮崎 剛\*\* / 久保幸穂\*\*

Key Words : sarcopenia, satellite cell, neuromuscular junction, retrograde signal, motor neuron

### はじめに

運動器障害によって治療や介護を要する状態(運動器不安定症, ロコモティブシンドロームと称される)の中で, サルコペニア(加齢性筋肉減少症)は高齢者のactivity of daily living (ADL) と quality of life (QOL) を損う主要な原因である。すでに超高齢社会を迎えているわが国だけでなく, 欧米においてもサルコペニアが注目されている。サルコペニアの特徴は加齢による筋肉量低下と筋力低下であるが<sup>1)</sup>, 実際に臨床や介護現場で有効に役立てることができる定義と診断基準のいずれについても確立されていないのが現状である。さらに, サルコペニアは遺伝因子と環境要因に加えて, エピジェネティックの変化など多様な老化促進因子が長時間重なって起きるため, その病態とメカニズムを解明することを困難にしている。サルコペニアは, さまざまな原因により誘発されると終末像と考えられるが, その原因についてはほとんどわかっていない。本稿ではこのような現状を踏まえて, これまでの成因メカニズムの研究について紹介する。

### サルコペニアの定義

サルコペニアの定義はまだ定まっていないのが現状であると述べた。しかし, サルコペニアの成因について議論する前に, その定義について筆者の考え方を明確にしておく必要がある。

2010年に世界に先駆けてサルコペニアの定義がEuropa Consensusとして発表された<sup>2)</sup>。筋量と筋力, および歩行速度(運動能力)の三つを指標にして, それぞれを組み合わせることでサルコペニアを診断するとしている。これらの指標はJanssenの疫学研究の結果を基にしているが<sup>3)</sup>, さまざまな原因によって生じるサルコペニアを早期に診断して予防するために真に有効かどうか, すでに疑問視する考え方もあり, 今後も継続して検証する必要がある。それから, 神経筋疾患の除外診断は当然必要である。たとえば高齢社会を背景に重症筋無力症の患者数が, 18年前の全国調査に比べ総数で2.5倍増加していることが2006年に実施された厚生労働省の免疫性神経疾患に関する調査で明らかになった。高齢者は, 眼瞼下垂, 複視, 構音障害, 嚥下困難を含む筋力低下などの重症筋無力症に特徴的な症状が, 若年者に比べ見過ごされがちになる。その他の神経筋疾患についても, 高齢化に伴い増加しているにもかかわらず見過ごされている可能性が十分にある。サルコペニアから神経筋疾患

\* Current understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying sarcopenia.

\*\* Kazuhiro SHIGEMOTO, M.D., Ph.D., Shuichi MORI, Ph.D., Tsuyoshi MIYAZAKI, M.D., Ph.D. & Sachiho KUBO : 東京都健康長寿医療センター研究所老年病研究チーム運動器医学[〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2]; Reseach Team for Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015, Japan.

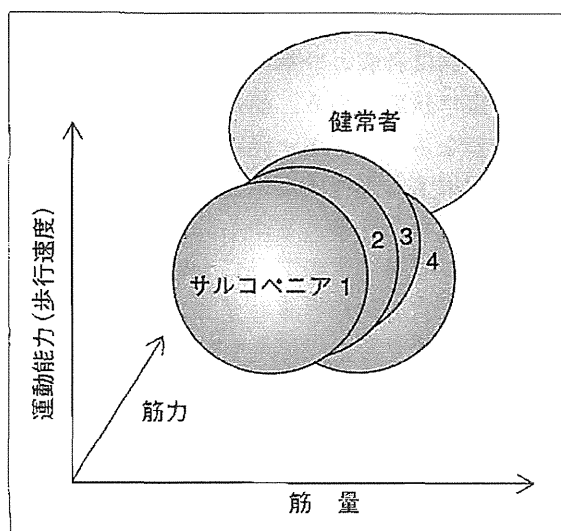


図1 サルコペニアの定義と診断

サルコペニアはさまざまな原因によって起きるが、それらを筋量、筋力および歩行速度の組み合わせで診断する意義については、今後の検討が必要である。

は除外しなくてはならない。

現在、認知症は多くの病型に分類することができるが、サルコペニアも多様な原因により筋萎縮へ収束する病態の集合群であり、まだ単一概念として捉えているだけであると考えられる(図1)。加えて、高齢者がなんらかの原因で急性期の運動機能障害を抱えてしまうと、リハビリによる機能回復の程度は個人差が大きく困難なケースも多くなる。明らかな原因疾患(悪性腫瘍、重篤な感染症、脳血管障害、認知症)による筋肉喪失(cachexia)とサルコペニアの違いの明確な定義はないが、cachexiaのケースで基礎疾患が改善された後のリハビリによる回復力の違いは、サルコペニアの成因と関連すると考えられる。サルコペニアの病態を知る上で、病理学的データの蓄積と解析が必要であるが、認知症のような体系的な研究はこれまでほとんど行われていなかったと思われる。

以上のことから、現状では単純にサルコペニアの定義を述べることは難しいが、ここではサルコペニアを老化による筋の予備能力と回復力の喪失という観点で考えてみたい。

### サルコペニアの三つの成因メカニズム

サルコペニアに関するこれまでの研究から、

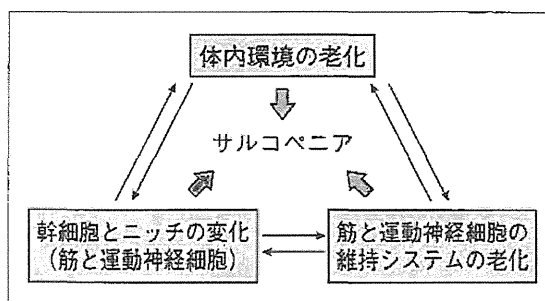


図2 サルコペニアのメカニズム

環境要因、遺伝因子、エピジェネティックの変化で誘発される3種類の経路。

加齢による筋の老化促進の要因は以下の3種類に分類することができる(図2)。体内環境全体の変化(免疫・炎症、ホルモン、代謝・栄養状態)、そして、幹細胞(サテライト細胞)とそれを維持する微小環境(ニッチ)の老化、さらに筋と運動神経細胞(中枢神経)の相互作用による維持システムの老化である。これらの原因が互いに影響し合うことでサルコペニアが進行すると考えられる。

#### 1. 免疫・炎症性変化と代謝変換

加齢に伴い体内の環境は変化するが、その一つとして生体内において慢性炎症状態が生ずることにより老化現象が顕在化する可能性が提案されている<sup>3)</sup>。また、最近では筋からも炎症性サイトカインを分泌することが明らかにされている(muscleから分泌されるcytokineをmyokineともいう)。運動習慣は筋において、遺伝子転写補助因子であるperoxisome-proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ (PGC1 $\alpha$ )の発現を増強するが、PGC1 $\alpha$ はIL-6, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現を抑制する<sup>4)</sup>。また、サルコペニアの原因についてはミトコンドリア機能との関連が古くから指摘されているが、PGC1 $\alpha$ はミトコンドリアの機能を正に調節する(図3)。興味深いことにPGC1 $\alpha$ を筋に強制的に発現させたトランスジェニックマウスは、高齢になっても筋の運動機能が保たれサルコペニアを抑制し、さらに寿命も顕著に長くなるという<sup>4)</sup>。炎症性サイトカインは脂肪細胞からも分泌されるが、サルコペニアでは筋萎縮に伴い筋肉内の脂肪組織も増大することが指摘されている(sarcopenic obesity)。

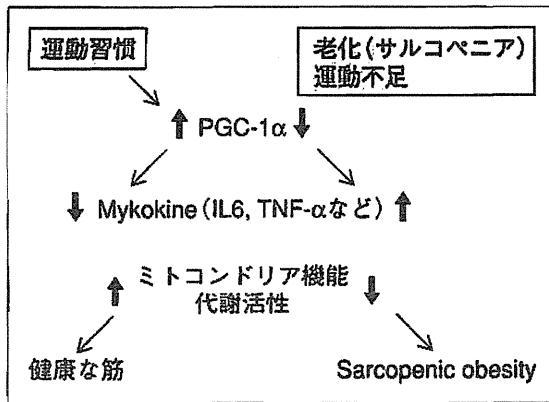


図3 サルコペニアとPGC-1αの関係を示す模式図

加齢とともに筋肉のPGC-1αの発現が減少して、筋から炎症性サイトカイン(myokine)の産生が増加する。また、筋のミトコンドリア機能が弱まり、萎縮した筋の代わりに脂肪組織が増える(sarcopenic obesity)。インシュリン感受性も減弱する。運動習慣はPGC-1αの発現を増強することで逆に作用する。

それでは、実際に高齢者においてIL6とTNF-αの発現はどうなっているであろうか。Visserらは、運動障害のない健康な米国人の高齢者(70~79歳)男女3,075人(白人とアフリカ系米国人)について横断的研究で高IL-6およびTNF-αが高齢者の筋量と筋力の低下と相関しているとしている<sup>5)</sup>。さらに、Schaapらは炎症性マーカー(IL-6, TNF-α, CRP, 可溶性IL-6受容体とTNF-α受容体)と筋力(握力と膝伸展筋力)および筋量(CT)の変化との相関を5年間の縦断的研究で解析した<sup>6)</sup>。筋量の減少を、体重減少を考慮に入れ補正した結果、TNF-αと可溶性TNF-α受容体の高値が筋量および筋力低下と相関があるとしている。調査開始時点では運動障害のない高齢者を選んでいますが、期間中に死亡した対象者は除外されている。

サルコペニアと慢性炎症の因果関係についてはまだよくわかっていないが、老化による筋萎縮の過程で遅筋線維から速筋線維への質的変換が起きることが20年以上も前に組織学的研究から示されている。遅筋はミトコンドリアによる代謝が主であり、一方で速筋は解糖系が優位であることから、老化による筋の質的変換は代謝変換を伴っていると考えられる。前述のPGC1αは、この代謝変化と炎症性サイトカインの分泌調整の両方に関係することから、生活習慣病とサルコペニアとの関連性も提唱されており、そのメカニズムに関する研究が注目される。

## 2. 栄養状態とホルモン変化

通常、筋は合成と分解のバランスが保たれることで定常状態にある。筋は栄養飢餓状態において重要なエネルギー源になることから、食生活に起因する慢性的な栄養不足はサルコペニアの成因になりうる。しかし、内在性の筋合成障害とサルコペニアの関係については、対象者の選定や測定方法がさまざまに定まった見解がないのが現状である。ビタミンDとサルコペニアに関する疫学的調査に関しても、相反する結果がこれまで報告されている。Foleyらは腎機能の低下がサルコペニアの出現と相関すると報告しているが、多変量解析を行ったところGFR低下に加え加齢、低所得、肥満、運動不足、栄養の偏り、高カルシウム血症、ビタミンDの低摂取、高拡張期血圧およびインスリン抵抗性がサルコペニアと関連していた<sup>7)</sup>。ビタミンDは老化によるさまざまな身体機能障害とも関係があるので、サルコペニアよりはfrailty(老化による虚弱状態の概念)との関連を考えた方が良さそうである。高齢者の男性のテストステロンの減少とサルコペニアの関連が報告されている<sup>8)</sup>。また、女性では閉経後のエストロゲンの減少が筋肉に発現するエストロゲン受容体を介して筋力と筋量の減少を誘発すると考えられているが、メカニズムは明らかにされていない<sup>9)</sup>。Insulin-like growth factor1 (IGF-1)は、蛋白合成と筋サテライト細胞を活性化して筋肉の分化成熟、維持、再生、肥大をもたらす。成長ホルモンで誘導されるIGF-1が加齢とともに減少して筋量が減少すると考えられているが、サルコペニアとの因果関係は不明である<sup>10)</sup>。上記のホルモンは確かに筋の維持に重要な役割を果たしているが、ビタミンDと同様に多臓器に対して作用する。

## 3. サテライト細胞とニッチの老化

筋の幹細胞はサテライト細胞と呼ばれているが、高齢マウスを使った実験からサテライト細胞の機能低下と筋の線維化を促進する新しい体内環境因子としてWntが関与することが報告された<sup>11)12)</sup>。Wntは細胞間シグナルを行う分泌蛋白で胚発生やガンにかかわることが知られているが、Klothoという蛋白がWntと結合することで細胞老化を抑制すると報告した。また、Conboyらは高

齢マウスと若いマウスの2匹の血管を縫合して血液循環を同じにして(parabiotic pairings), 筋に損傷を与えてその再生能を調べたところ, 若いマウスとつながった高齢マウスでは筋再生能が増強し, 逆に若年マウスでは筋再生能が低下して筋の線維化が進んだ<sup>13)</sup>. その促進因子としてWntを同定した. Wntは肺や肝臓の線維化の促進因子としても報告されている. Wntとその抑制因子は, 本来局所的なシグナル伝達分子として知られており, 体内環境の老化因子としての作用は新しい見方である.

高齢による筋の再生能の低下の原因が上記の体内環境以外に, サテライト細胞自身やニッチの老化が関係することが報告されている. サテライト細胞のニッチとしては, 周囲の筋細胞, 結合組織, 細胞外マトリックスなどがあげられる. 高齢マウス由来のサテライト細胞は若いマウスの筋に移植すると十分な再生能を示す. したがって, 前項で述べたWntに加えて, ニッチの加齢による変化がサテライト細胞に影響している可能性が考えられる. Conboyらは若いマウス由来のサテライト細胞を, 高齢マウス由来の筋と共培養すると再生能が顕著に抑制することを示した. そして, 高齢マウスの筋の基底膜にTGF- $\beta$ が増加していること, また, TGF- $\beta$ はサテライト細胞の増殖を抑制し, さらにサテライト細胞の増殖刺激に必要なNotchシグナルが減少していることを示した<sup>13)</sup>. 前に紹介したWntによる体内環境の変化とニッチとの関係は不明であるが, 結合組織の増殖を介している可能と考えられる.

最近, 筋細胞とはまったく異なる系譜のPDGF $\alpha$ 陽性の脂肪前駆細胞が筋に存在することが明らかにされた<sup>14)15)</sup>. この前駆細胞は通常は筋サテライト細胞の分化を抑制しているが, 筋再生が必要なときは増殖して, おそらくIL6を介して筋サテライト細胞の分化を誘導すると考えられる<sup>16)</sup>.

一方で, 筋損傷が引き金となって前駆細胞が脂肪細胞へ分化すると筋サテライト細胞の分化を抑制するようになる. 加齢変化と筋損傷, およびsarcopenic obesityのメカニズムとの関連で注目される.

#### 4. 筋と運動神経の相互作用による維持メカニズム

もともと健常筋には萎縮へと向かうカスケードが常在している. 若い健常人であっても骨折などで筋活動が停止すると, 2週間以内で急速に筋萎縮に至る. 適切な運動習慣により, 運動神経線維と筋のつなぎ目である神経筋シナプスを介した筋と運動神経の相互作用が, 結果的に筋の合成と分解のバランスを保つことで筋萎縮カスケードに拮抗することができる. また, 前述したサルコペニアの特徴である筋の遅筋化は, 運動神経細胞により誘導されると考えられている. 速筋線維を支配するシナプスは遅筋よりも選択的な脆弱性があるため, 近傍の遅筋線維を支配するシナプスから代償的に伸張した運動神経終末で再神経支配された時に, 速筋線維から遅筋線維へと転換すると考えられている. そして, 再支配を受けることができなかった筋線維は萎縮する. しかしながら, 筋と運動神経のシナプスを介した相互作用の分子機構は, いまだよくわかっていない. 特に筋から運動神経への逆行性シグナルはさまざまな機能分子が予想され, たとえばシナプスの形態と機能を維持するために必要なものや, 運動神経細胞に対する標的由来神経栄養因子として働いている分子もあり, 筋萎縮性疾患の病因解明と治療への応用が期待される. これまで同定されたNGFファミリーやGDNFなど, 神経栄養因子の運動神経細胞に対して期待された臨床治療効果は限定的であるのが現状である. 老化に伴うなんらかの原因により, 運動神経と筋の相互作用維持メカニズムが阻害されると筋萎縮が誘導されると考えられる<sup>17)</sup>. 運動神経細胞の脱落とサルコペニアとの関連性については, 病理学的なデータが不足しており, 今後の検討が必要である.

#### おわりに

現在の医学では不可逆的に進行した筋萎縮を治療することは不可能であるが, 筋萎縮に至る前の早期段階で運動能力の可塑性(回復力)を科学的な根拠に基づく方法で診断することができれば, 介護現場においてもさまざまな場面で有効に活用できるであろう. また, サルコペニアの原因を早期に発見することができれば, 進行を抑制するための適切な処方の開発とその有効

性を検討することが可能となるであろう。

### 文 献

- 1) Janssen I. Influence of sarcopenia on the development of physical disability : the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc* 2006 ; 54 : 56-62.
- 2) Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis : Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010 ; 39 : 412-23.
- 3) Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 2008 ; 454 : 463-9.
- 4) Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, et al. Increased muscle PGC-1 alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 20405-10.
- 5) Visser M, Pahor M, Taaffe DR, et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women : the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002 ; 57 : M326-32.
- 6) Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, et al. Higher inflammatory marker levels in older persons : associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009 ; 64 : 1183-9.
- 7) Foley RN, Wang C, Ishani A, et al. Kidney function and sarcopenia in the United States general population : NHANES III. *Am J Nephrol* 2007 ; 127 : 279-86.
- 8) Szulc P, Claustrat B, Munoz F, et al. Assessment of the role of 17 beta-oestradiol in bone metabolism in men : does the assay technique matter? The MINOS study. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2004 ; 61 : 447-57.
- 9) Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009 ; 9 : 186-97.
- 10) Scicchitano BM, Rizzuto E, Musaro A. Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases : the critical role of IGF-1. *Aging (Albany NY)* 2009 ; 1 : 451-7.
- 11) Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007 ; 317 : 803-6.
- 12) Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007 ; 317 : 807-10.
- 13) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005 ; 433 : 760-4.
- 14) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010 ; 12 : 143-52.
- 15) Joe AW, Yi L, Natarajan A, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010 ; 12 : 153-63.
- 16) Rodeheffer MS. Tipping the scale : muscle versus fat. *Nat Cell Biol* 2010 ; 12 : 102-4.
- 17) Shigemoto K, Kubo S, Mori S, et al. Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 2010 ; 10 Suppl 1 : S137-47.

\* \* \*

### 3. 運動神経細胞とサルコペニア

重本 和宏\*  
しげもと かずひろ

森 秀一\*  
もり しゅういち

宮崎 剛\*  
みやざき つよし

久保 幸穂\*  
くぼ さちほ

- サルコペニア（加齢性筋肉減少症）は認知症と並んで、高齢者の activity of daily living (ADL) と quality of life (QOL) を損なう主要な原因である。
- サルコペニアの定義および診断に筋量、筋力と歩行速度が指標に用いられている。
- 早期発見、運動機能障害者に対するリハビリの効果の判定を可能にするためには、客観的かつ有効な新しいバイオマーカーの開発が必要である。
- 加齢による筋の老化促進の要因は、体内環境全体の変化、幹細胞とそれを維持する微小環境の老化、筋と運動神経細胞の相互作用維持システムの老化の3種類に分類することができる。
- 筋萎縮に至る前段階で、運動能力の可塑性（回復力）を科学的な根拠に基づく方法で定量化することができれば、介護現場においてもさまざまな場面で有効に活用できるであろう。

#### Key Words

サルコペニア、バイオマーカー、神経筋シナプス、逆行性シグナル、運動神経細胞

サルコペニア（加齢性筋肉減少症）は高齢者の activity of daily living (ADL) と quality of life (QOL) を損なう主要な原因である。すでに超高齢社会を迎えている我が国だけでなく欧米においてもサルコペニアの問題が注目されている。サルコペニアの特徴は加齢による筋肉量低下と筋力低下だが<sup>1)</sup>、実際に臨床や介護現場で有効に役立てることができる定義と診断基準のいずれについても確立されていないのが現状である。さらに、サルコペニアは遺伝因子と環境要因に加えて、エピジェネティックな変化など多様な老化促進因子が長時間重なって起きるため、その病態とメカニズムの解明が困難となっている。現在、認知症は多くの病型に分類することができるが、サルコペニアも多様な原因により筋萎縮へ収束する病態の集合群であり、まだ単一概念として捉えているだけであると考えられる。加えて、高齢者が何らかの原因で急性期の運動機能障害を抱えてしまうと、リハビリによる機能回復の程度は個人差が大きく困難なケースも多くなる。明らかな原因疾患（悪性腫瘍、重篤な感染症、脳血管障害、認知症）による筋肉喪失 (cachexia) とサルコペニアの違いの明確な定義はないが、cachexia のケースで基

礎疾患が改善された後のリハビリによる回復力の違いは、サルコペニアの成因と関連する可能性がある。本稿では、特に筋と運動神経の相互維持作用とサルコペニアの成因メカニズムについて紹介する。

#### □ サルコペニアの定義

サルコペニアの定義はまだ定まっていないのが現状であると述べた。一方で2010年に世界に先駆けてサルコペニアの定義が Europa Consensus として発表された<sup>2)</sup>。筋量と筋力、および歩行速度の3つを指標にして、それぞれを組み合わせることでサルコペニアを診断するとしている(図1)。これらの指標は Janssen らの疫学研究の結果を基にしているが、さまざまな原因によって生じるサルコペニアを早期に診断して予防するために真に有効かどうか、既に疑問視する考え方もあり、今後も継続して検証する必要がある。上記の3つの指標や日常生活を指標とした運動機能能力のスコアによる判定は、すでに筋萎縮を伴うような顕著な筋力低下を検出することは容易であるが、早期発見と予防に対して必ずしも有効であるとはいえない。サルコペニアも認知症と同じく症

\*東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム



状が顕著になったケースでは病態が進行している。もし、上記の指標とは独立したサルコペニアのバイオマーカーが開発され利用できるようになると、早期発見、運動機能障害者に対するリハビリの効果の判定を可能にする、客観的かつ有効な指標として介護予防対策に有用となると期待される。サルコペニアはすでに超高齢社会を迎えた日本だけでなく、欧米においても医学的かつ社会的にも急務の問題とされているようであるが、早期発見とリハビリの有効性を判定できる診断法（指標）は未解決の課題である。サルコペニアは、さまざまな原因により誘発される終末像と考えられるが、その原因についてはほとんどわかっていないのが

実情である。

#### □ サルコペニアの3つの成因メカニズム

サルコペニアに関するこれまでの研究から、加齢による筋の老化促進の要因は以下の3種類に分類することができる（図2）。体内環境全体の変化（免疫・炎症、ホルモン、代謝・栄養状態）、そして幹細胞（サテライト細胞）とそれを維持する微小環境（ニッチ）の老化、さらに筋と運動神経細胞（中枢神経）の相互作用による維持システムの老化である。これらの原因がお互いに影響しあうことでサルコペニアが進行すると考えられる。

筆者らは、運動神経線維と筋のつなぎ目である神経筋シナプスを介した筋と、運動神経の相互作用システムとサルコペニアとの関連に注目して研究を行っている。もともと健全筋には萎縮へと向かうカスケードが常在している。若い健常者であっても骨折などで筋活動が停止すると、2週間以内で急速に筋萎縮に至る。適切な運動習慣により、運動神経線維と筋のつなぎ目である神経筋シナプスを介した筋と、運動神経の相互作用システムが、萎縮カスケードに拮抗することで筋と運動神経の両方が保持されている<sup>3,4)</sup>。筋と運動神経のシナプスを介した相互作用の分子機構は、未だよくわかっていない。特に筋から運動神経への逆行性シグナルの機能分子は、運動神経細胞に対する標的由来神経栄養因子として働いていると予想され、筋萎縮性疾患の病因解明と治療への応用が

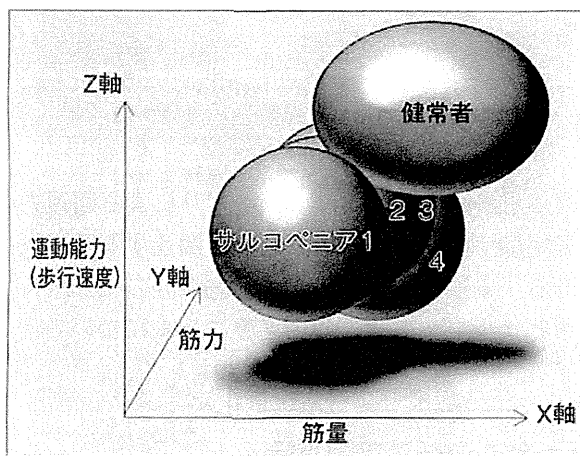


図1 サルコペニアの定義と診断

サルコペニアはさまざまな原因によって起きるが、それらを筋量、筋力および歩行速度の組み合わせで診断する意義については、今後の検討が必要である。

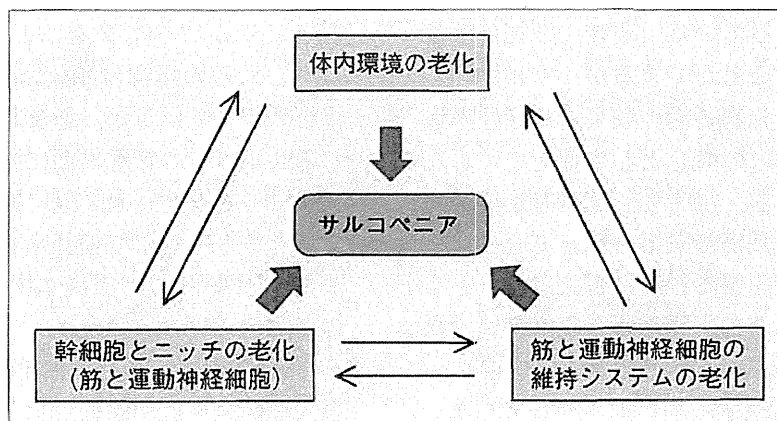


図2 サルコペニアのメカニズム

環境要因、遺伝因子、エピジェネティックの変化で誘発される3種類の経路

期待される。これまで同定された NGF ファミリーや GDNF など、神経栄養因子の運動神経細胞に対して期待された臨床治療効果は限定的であるのが現状である。筆者らは、老化に伴う何らかの原因により、運動神経と筋の相互作用維持メカニズムが阻害されると筋萎縮が誘導されると考えている。このメカニズムを解明することで、サルコペニアの原因解明、診断と予防法の開発が可能となるかもしれない。

### □ 加齢による筋の質的变化

サルコペニアでは筋萎縮に至るまでの過程で遅筋線維から速筋線維への質的変換が起き、そして神経筋シナプスを介して筋の質的変換を決定するとの考え方が 20 年以上も前に組織学的研究から示されている。遅筋はミトコンドリアによる代謝が主であり、一方で速筋は解糖系が優位であることから、老化による筋の質的变化は代謝変換も伴っていると考えられる。その分子メカニズムは未だ解明されていないが、筋の質的变化は運動神経細胞により誘導されると考えられている。速筋線維を支配するシナプスには選択的な脆弱性があり、近傍の遅筋線維を支配するシナプスから代償性に伸張した運動神経終末で再神経支配された時に速筋線維から遅筋線維へと転換するとしている。そして、再支配を受けることができなかった筋線維は萎縮する。一方で、筋の質的变化は運動神経細胞とは独立して、遺伝子転写補助因子である peroxisome-proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) 遺伝子をマウスに発現させると速筋が遅筋へ変換することが報告されている。運動神経との関係については不明であるが、筋が運動神経とは独立して質的变化を起こす可能性も予想される。PGC1 $\alpha$  は IL-6, TNF $\alpha$  などの炎症サイトカインの筋での発現を抑制する<sup>5)</sup>。また、サルコペニアの原因についてはミトコンドリア機能との関連が古くから指摘されているが、PGC1 $\alpha$  はミトコンドリアの機能を正に調節する(図 3)。興味深いことに PGC1 $\alpha$  を筋に強制的に発現させたトランスジェニックマウスは、高齢になっても筋の運動機能が保たれサルコペニアを抑制し、さらに寿命も顕著に長くなるという<sup>5)</sup>。筋

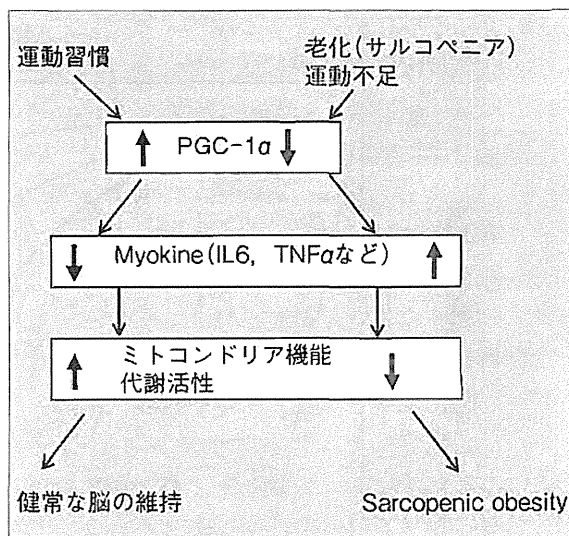


図 3 サルコペニアと PGC-1 $\alpha$  の関係を示す模式図

加齢とともに筋肉の PGC-1 $\alpha$  の発現が減少して、筋から炎症性サイトカイン (myokine) の産生が増加する。また、筋のミトコンドリア機能が弱まり、萎縮した筋の代わりに脂肪組織が増える (sarcopenic obesity)。インシュリン感受性も減弱する。運動習慣は PGC-1 $\alpha$  の発現を増強することで逆に作用する。

萎縮側索硬化症 (ALS) に代表される運動ニューロン疾患でも臨床症状が出現する前から、筋萎縮に先立って速筋線維から遅筋線維への筋の質的転換が観察されることが指摘されている(図 4)<sup>6)</sup>。シナプスによる筋の質的変換と運動神経の選択的な脆弱性の分子メカニズムの解明は、筋と神経の相互作用と筋萎縮の分子病態を理解するうえで重要な鍵となると筆者らは考えている。

### まとめ

現在の医学では不可逆的に進行した筋萎縮を治療することは不可能であるが、筋萎縮に至る前の早期段階で運動能力の可塑性(回復力)を科学的な根拠に基づく方法で定量化することができれば、介護現場においてもさまざまな場面で有効に活用できるであろう。また、サルコペニアの原因を早期に発見することができれば、進行を抑制するための適切な処方の開発とその有効性を検討することが可能となるであろう。

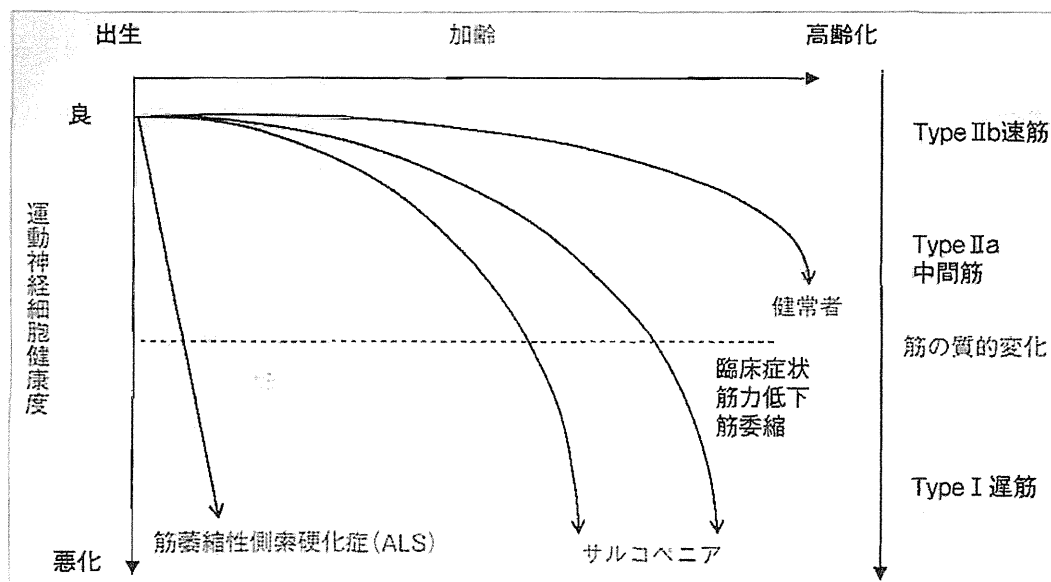


図4 サルコペニアと運動神経細胞の健康度の関係(仮説)

サルコペニアも筋萎縮側索硬化症も筋の質的变化(速筋の遅筋化)が起きることが報告されている。サルコペニアにおける運動神経細胞の消失との関係は未だ明らかではない。

(Frey D. et al. : J Neurosci 20 : 2534-2542. 2000 より引用して改変)<sup>6)</sup>

## 文献

- 1) Janssen I : Influence of sarcopenia on the development of physical disability : the Cardiovascular Health Study. J Am Geriatr Soc 54 : 56-62. 2006
- 2) Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. : Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis : Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing 39 : 412-423. 2010
- 3) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. : Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. J Clin Invest 116 : 1016-1024. 2006
- 4) Shigemoto K, Kubo S, Mori S, et al. : Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. Geriatr Gerontol Int 10(Suppl 1) : S137-S147. 2010
- 5) Handschin C, Spiegelman BM : The role of exercise and PGC1 alpha in inflammation and chronic disease. Nature 454 : 463-469. 2008
- 6) Frey D, Schneider C, Xu L, et al. : Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. J Neurosci 20 : 2534-2542. 2000

## 第4節 高齢者におけるサルコペニアの発見と対処法の構築

### Summary

- サルコペニアは、disability or mortality, 転倒・骨折の予知因子である。
- 筋肉量を評価する精度の高い手法は、CT法, MRI法, DXA法であるが、疫学調査の手法としては不向きである。大規模集団を扱う疫学研究では、形態測定値, BIA法の採用も推奨される。
- サルコペニアと関連する要因は様々で複雑であるが、不活動や栄養など、可変要因の改善に焦点を当てた対処法の構築が有効である。
- サルコペニア高齢者の一つの特徴は、骨粗鬆症に伴う骨折危険性の高いことが挙げられる。
- サルコペニア高齢者における骨格筋の増加, 体力の向上には、運動指導, 栄養指導ともに有効であるとの知見を得た。

### はじめに

中年期を過ぎると人間諸組織の機能が変化し、環境変化への適応能力の低下ないし機能喪失が徐々に増してくる。その背景要因に、身体の構成要素である体脂肪や除脂肪組織量 (lean body mass : LBM) の変化が挙げられる (図1)<sup>1)</sup>。中でも、加齢に伴って徐々に進行する骨格筋量の減少や筋力の衰えを意味する“sarcopenia”は<sup>2)</sup>、disability or mortality, 転倒・骨折の predictor であることが多くの疫学調査で指摘され<sup>3,4)</sup>、その対処法をいかに立てるかは、介護予防, 健康寿命の延長のために重要な課題である。

しかし、地域在住高齢者の中から、サルコペ

ニア高齢者を発見し、適する対処法を立てることは容易な作業ではない。それは、サルコペニアの定義, 骨格筋量の推定, 採用する選定基準が研究者によって異なり、ゴールドスタンダードが確立されていないからである。

### 1. 地域高齢者におけるサルコペニアの発見

サルコペニアは「骨格筋量の減少」を意味する概念であるが、サルコペニア高齢者を発見するためには、骨格筋量の正確な推定が必要である。筋肉量を評価する精度の高い手法は、computed tomography (CT) 法, magnetic resonance imaging (MRI) 法, dual energy X-ray absorpti-