

総会、東京、2013年11月10日。

33) 下方浩史. 夢を語り、夢を目指して  
生きる－健康長寿の秘訣. 第22回ト  
ータルライフ医療学術集会、東京、2013  
年12月14日。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を 含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. 男性におけるテストステロンレベルと筋量サルコペニアとの関連

分画			オッズ比(95%信頼区間)	p値
TT	2.9ng/ml 以上	vs. 2.9ng/ml 未満	1.57(0.90-2.74)	
cFT	46.3pg/ml 以上	vs. 46.3pg/ml 未満	2.14(1.06-4.33)	*
FT	7.7pg/ml 以上	vs. 2.9pg/ml 未満	1.83(1.04-3.22)	*

SMI<6.87kg/m<sup>2</sup> 未満となる 10 年間のリスクについて、一般推定方程式により求めた。調整項目は年齢、余暇身体活動量、栄養摂取量(総エネルギー、総タンパク質、ビタミン D)、既往歴(脳卒中、心疾患、がん、糖尿病、骨粗鬆症、関節炎)、喫煙の有無、とした。

\* p<0.05

表 2. 女性におけるテストステロンレベルと筋量サルコペニアとの関連

分画	オッズ比(95%信頼区間)			傾向性 p値
	Low	Middle	High	
TT	1.32 (0.53-3.27)	2.14 (0.89-5.16)	1.00(基準)	
FT	3.59 (1.25-10.34)	1.67 (0.52-5.36)	1.00(基準)	**

8年間の縦断データを用いて、サルコペニア発症のオッズ比をロジスティック回帰分析により求めた。調整項目は年齢、BMI、余暇身体活動量、栄養摂取量(総エネルギー、総タンパク質、ビタミンD)、血中CRP濃度、既往歴(心疾患、骨粗鬆症、関節炎)、月経の有無、喫煙の有無、とした。TT: Low, 15.0ng/dl未満; Middle, 15.0~24.8ng/dl; 24.8ng/dl以上

FT: Low, 0.7pg/ml未満; Middle, 0.7~1.2pg/ml; 1.2pg/ml以上

\*\* p<0.01

表 3. 男性におけるアンドロゲン受容体遺伝子多型とテストステロンレベルの交互作用の検討

遺伝子型	独立変数	モデル1		モデル2		モデル3	
		F値	p値	F値	p値	F値	p値
Short(S), Long(L)	TT	13.99	**	7.61	**	8.23	**
	AR遺伝子型	1.63		2.69		2.98	
	TT×AR遺伝子型	2.06		2.78		3.14	
	cFT	11.67	**	1.98		1.67	
	AR遺伝子型	7.60	**	9.34	**	8.35	**
	cFT×AR遺伝子型	7.84	**	9.19	**	8.27	**

従属変数に SMI、独立変数にテストステロン (TT, bioT, cFT)、CAG リピート群 (S 群, L 群)、およびテストステロン × CAG リピート群の交互作用項を投入した一般線形モデルを用いた。

モデル 1: 調整因子なし

モデル 2: 年齢、喫煙の有無

モデル 3: 年齢、喫煙の有無、余暇身体活動量、総エネルギー消費量

\*\* p<0.01

表 4. 女性におけるアンドロゲン受容体遺伝子多型とテストステロンレベルの交互作用の検討

遺伝子型の 組み合わせ	独立変数	モデル1		モデル2		モデル3	
		F値	p値	F値	p値	F値	p値
<b>SS vs. SL vs. LL</b>	TT	9.96	**	9.58	**	11.63	**
	AR 遺伝子型	0.65		0.79		0.81	
	TT×AR 遺伝子型	0.85		0.93		0.92	
	cFT	31.22	***	31.44	***	33.61	***
	AR 遺伝子型	1.18		1.30		1.18	
	cFT×AR 遺伝子型	2.43		2.37		2.18	
<b>SS vs. SL+LL</b>	TT	5.69	*	5.32	*	6.69	*
	AR 遺伝子型	0.65		0.81		0.64	
	TT×AR 遺伝子型	1.44		1.53		1.45	
	cFT	16.32	***	16.36	***	17.70	***
	AR 遺伝子型	2.07		2.29		1.92	
	cFT×AR 遺伝子型	4.23	*	4.22	*	3.95	*
<b>SS+SL vs. LL</b>	TT	10.64	**	10.58	**	12.51	**
	AR 遺伝子型	1.33		1.59		1.82	
	TT×AR 遺伝子型	0.81		0.99		1.11	
	cFT	38.45	***	39.12	***	41.39	***
	AR 遺伝子型	0.70		0.86		1.13	
	cFT×AR 遺伝子型	0.14		0.19		0.30	

従属変数に SMI、独立変数にテストステロン(TT, bioT, cFT)、CAG リピート群(S 群, L 群)、およびテストステロン × CAG リピート群の交互作用項を投入した一般線形モデルを用いた。

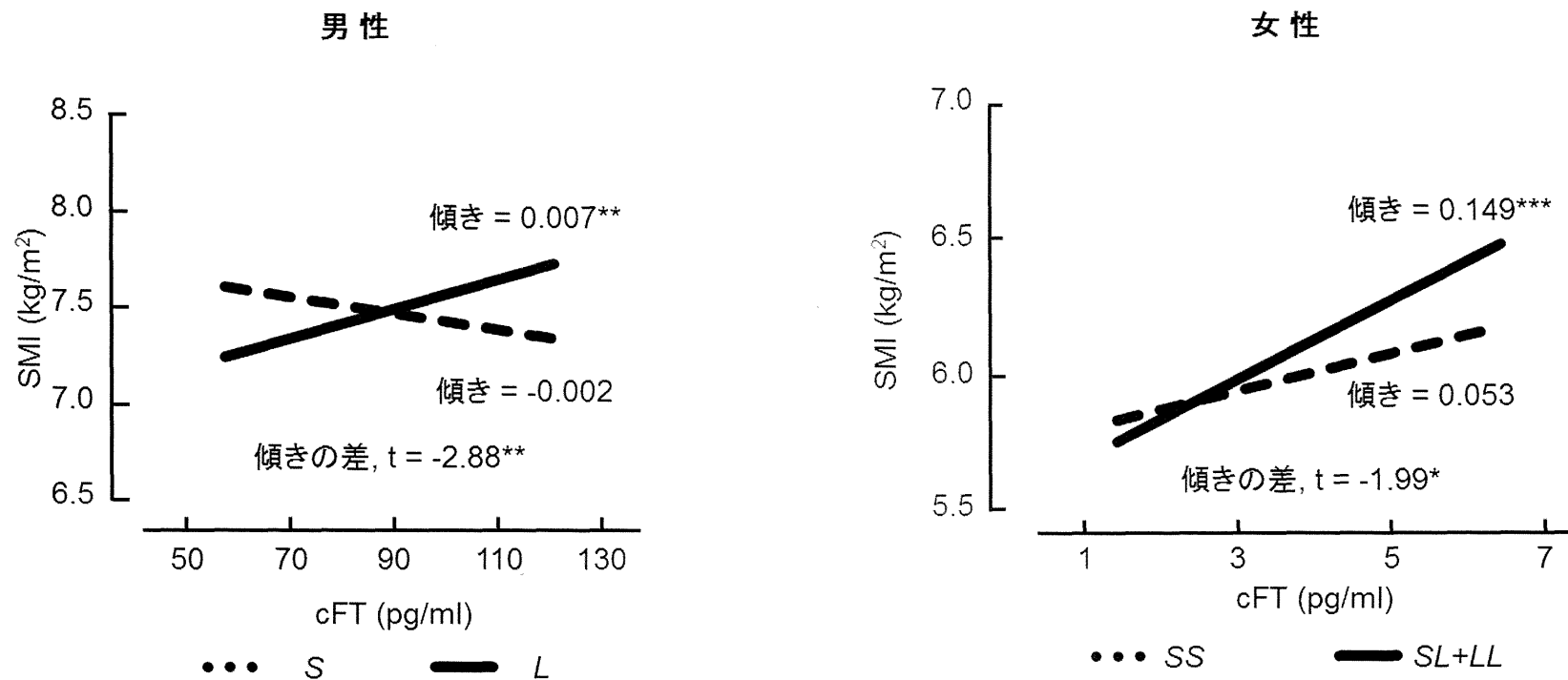
モデル 1: 調整因子なし

モデル 2: 年齢、喫煙の有無

モデル 3: 年齢、喫煙の有無、余暇身体活動量、総エネルギー消費量

\* p<0.05    \*\* p<0.01    \*\*\* p<0.0001

図1. アンドロゲン受容体遺伝子多型とテストステロンレベルの交互作用と筋量の関連



年齢、総摂取エネルギー量、余暇身体活動量の平均値、並びに「非喫煙」、「糖尿病既往無し」を回帰式に代入して傾きを算出した。

\*\* p<0.01    \*\*\* p<0.0001

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

サルコペニアに対する治療薬開発のための不死化ヒト筋細胞を用いた検定系の開発

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 独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの、ヒト筋細胞に対する直接作用を解析した。アレンドロネートは、ヒト未分化筋細胞の増殖、遊走および筋分化を阻害した。しかし、最終分化した筋管細胞の生存および分化形質の発現には、影響を与えなかった。

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。サルコペニアにおける筋幹細胞の役割については、未だ不明の点が多いものの、「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」の開発に期待が寄せられている。本分担研究では、独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、サルコペニアにおける治療薬を開発するための検定系を確立する。さらに、当研究班で見いだされた候補薬物の作用機序の解析を通じて、標準となる「ヒト筋細胞の機能検定法」の確立をめざす。

B. 研究方法

① 不死化ヒト筋細胞の培養

ヒトテロメラーゼ遺伝子、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、未分化ヒト筋細胞を、分化能を保持したまま不死化した。本研究では、42 歳女性の骨格筋に由来する不死化ヒト筋細胞クローン Hu5/KD3 を解析に用いた。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°C、10%CO<sub>2</sub> 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、2x10<sup>5</sup> 細胞を 90-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。

② 筋分化の誘導および分化マーカーおよび増殖マーカーの検出

細胞を、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で固定した後、分化マーカー-myosine heavy chain(MyHC)に対するモノクローナル抗体(MF20)あるいはトロポニンTに対する抗体と反応させた後、さらにHRPあるいはFITC標識二次抗体と反応させた。核はDAPIあるいはヘマトキシリンによって対比染色した。

③ BrdUの取り込みによるDNA合成細胞の検出

Hu5/KD3を10µM BrdUを含む培地中で4時間標識し、PFAで固定後、塩酸処理、中和処理の後、抗BrdU抗体と反応させた。Cy3標識二次抗体によってBrdU陽性核を検出し、DAPI染色による全核数に対する割合を算出した。

④ イムノブロット解析

細胞をPBSで洗浄した後、1%SDS in HEPES-buffered salineで溶解した。細胞溶解液をSDS-PAGE(和光純薬、SuperSepAce)で分離後、PVDFメンブレンに転写した。メンブレンは、特異抗体とincubationした後、アルカリ性フォスファターゼ標識二次抗体と反応させ、BCIP/NBTを基質とした発色法により、特異的タンパク質を検出した。

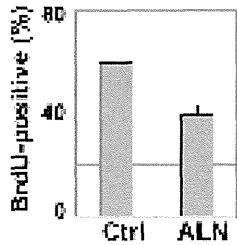
(倫理面への配慮)

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 アレンドロネートによるヒト筋細胞の増殖阻害および遊走阻害

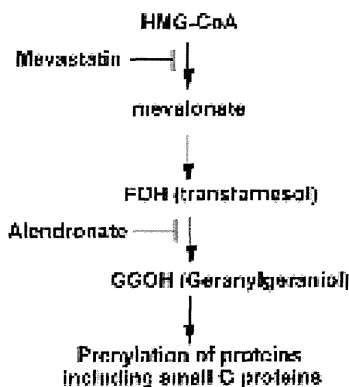
増殖条件下で培養した Hu5/KD3 を、アレンドロネート (ALN, 100  $\mu$ M) に暴露すると、分裂細胞は著しく減少した。また、BrdU 陽性細胞の割合は、対照群に比べて ALN 処理群で有意に減少した。



#### アレンドロネートによる BrdU 取り込み阻害

ALN 処理によって、Hu5/KD3 の形態は、平たく、縦に伸びた双極性紡錘形となり、lamellipodia 形成の阻害が認められた。タイムラプス観察の結果、対照群では活発な細胞遊走が見られるのに対し、ALN 処理群では、ヒト筋細胞の遊走は、完全に阻害されることが明らかになった。ALN 処理された細胞は、最終的に培養皿に生着し続けることが出来ず、やがて基質面から剥がれて死滅した。

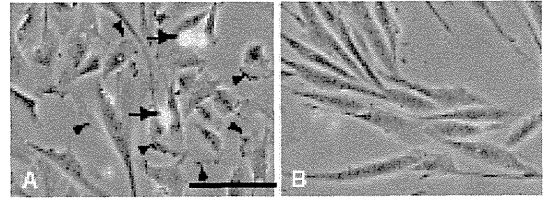
ALN の主な標的分子は、メバロン酸経路の酵素であると考えられている。未分化ヒト筋細胞に対する ALN の影響が、メバロン酸経路の阻害であるか否かを検討するため、mevastatin によってメバロン酸合成を阻害したところ、ALN と同様にヒト未分化筋細胞の形態は、ALN と同様に双極性紡錘形に変化し、細胞の増殖と遊走は、著しく阻害された。



#### メバロン酸経路におけるメバスタチンおよびアレンドロネートの作用点

この結果から、ALN は、未分化ヒト筋細胞の増殖および遊走を阻害することが示された。この阻害は、メバロン酸経路の阻害によるもの

と考えられる。



アレンドロネートによる、ヒト筋細胞の形態変化 対照群 (A) では分裂細胞 (矢印)、lamellipodia (矢頭) が認められるが、ALN 処理群 (B) では認められない。

#### ② アレンドロネートのレチノブラストーマ・タンパク質に対する影響

イムノブロット解析の結果、ALN は細胞周期調節因子レチノブラストーマ・タンパク質を活性化しないことが示された。一方、ALN は、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのタンパク量を増大させることが明らかになった。タンパク量の増大は、特に RhoA で著しく、Rac1 および Cdc42 では、限定的だった。

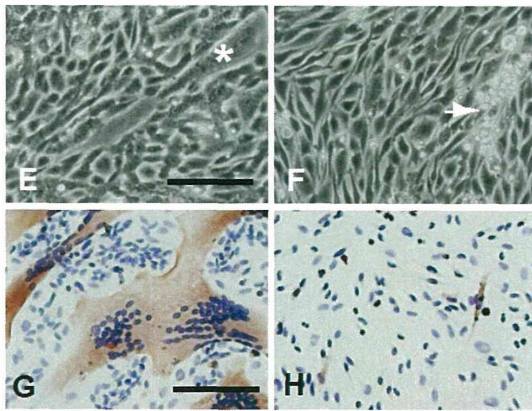
アレンドロネートによる、未分化ヒト筋細胞の増殖阻害は、細胞周期調節因子に対する直接的な作用ではなく、ファルネシル化阻害による、Rho ファミリー・タンパク質の機能阻害の結果生じた二次的影響であることが示唆された。

#### ③ アレンドロネートによるヒト筋細胞の分化阻害

未分化筋細胞 Hu5/KD3 を、高細胞密度で培養することによって、ALN による細胞の剥離を抑制できることがわかった。高密度で培養した Hu5/KD3 を、分化条件におくと、対照群では、細胞融合が誘導され、最終分化細胞である筋管細胞が形成された。筋管細胞では、分化マーカーである MyHC およびトロポニン T の発現が確認された。一方、ALN 処理群では、細胞は生存しているものの、筋管細胞形成および分化マーカーの発現は、完全に抑制された。

以上の結果から、ALN は、ヒト未分化筋細胞の最終分化を阻害することが明らかになった。



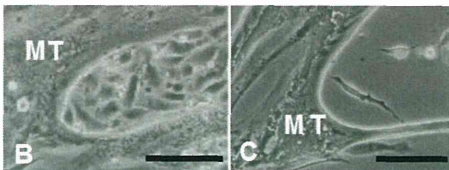


**アレンドロネートによる、ヒト筋細胞の分化阻害** 対照群 (E, G) では、筋管細胞(\*)およびMyHCの発現(茶)が認められるが、ALN処理群 (F, H) では認められない。

#### ④ アレンドロネートによる未分化ヒト筋細胞の選択的機能阻害

ALNが未分化ヒト筋細胞の増殖と分化を阻害することが明らかになった。そこで、最終分化した筋管細胞に対するALNの影響を比較検討した。Hu5/KD3を分化条件下で培養し、筋管細胞を形成させた後、ALNに4日間暴露した。対照群では、筋管細胞の間に、残存する未分化筋細胞が多数認められた。ALN処理群では、筋管細胞は認められたが、未分化筋細胞は、著しく減少していた。筋管細胞におけるトロポニンTの発現は、ALNによって影響を受けなかった。

以上の結果から、最終分化した筋管細胞は、筋分化過程において、ALNに対する抵抗性を獲得することが示唆された。



**アレンドロネートに対するヒト筋管細胞の抵抗性** 対照群 (B) でも、ALN処理群 (C) でも、筋管細胞(MT)は、正常なものに対し、未分化筋細胞は、対照群 (B) にのみ認められた。

(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

骨粗鬆症治療薬アレンドロネートは、破骨

細胞の機能を抑制することによって、骨密度の上昇をもたらすと考えられている。最近、原田らは、ALNを投与した骨粗鬆症患者の筋量が増加傾向を示すことを報告した。

ALNは、速やかに骨基質に取り込まれ、そのままでは、どの細胞にも作用を及ぼさないと考えられている。しかし、破骨細胞による骨吸収の際に骨基質から溶出し、破骨細胞に取り込まれて、その機能を阻害する。

骨格筋は、骨組織に近接しており、ALNを投与中の骨粗鬆症患者では、慢性的に低濃度のALNに曝されている可能性がある。

本研究の結果、ALNが未分化ヒト筋細胞の増殖と遊走を阻害することが明らかになった。一方、アポトーシスの特徴は見いだされなかった。ALNは、ラット筋芽細胞株L6にアポトーシスを誘導すると報告されているが、ALNはヒト未分化筋細胞に直接作用してアポトーシスを誘導することはないと考えられる。L6細胞におけるアポトーシスは、細胞が培養基質面から剥離した結果、二次的に誘導されたanoikisではないかと考えられる。

私たちは、最終分化したヒト筋管細胞が、ALNに対して抵抗性を示すことを明らかにした。従来、ALNは、ラット筋芽細胞に細胞死を誘導するという*in vitro*での解析結果と、ラットの筋機能に影響はないとする*in vivo*の解析結果が報告されており、矛盾する結果の意味は明らかではなかった。私たちの解析結果は、これらの相反する従来の報告に合理的な解釈を与えるものである。

本研究は、ALNの骨格筋に対する作用について、重要な二つの仮説を提示する。

- (1) 長期間ALNを投与された骨粗鬆症患者では、筋再生能力が低下している可能性がある。したがって、ALN投与中の筋組織へ外傷は、禁忌としなければならない。
- (2) 筋線維は、ALNに対して耐性であると考えられるので、筋機能の低下は、ALN治療における制限要因とはならない。

本研究の結果は、ALNを投与中の骨粗鬆症患者ALNに認められた筋量の増加が、筋細胞に対する直接効果ではないことを示唆している。しかし、ALNの二次的作用によって、筋機能が改善される可能性は十分にあり、今後の検討課題のひとつである。

#### E. 結論

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し、候

補薬物のヒト筋細胞に対する直接作用を明らかにすることができた。

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

Shiomi K, Nagata Y, Kiyono T, Harada A, Hashimoto N. Differential Impact of the Bisphosphonate Alendronate on Undifferentiated and Terminally Differentiated Human Myogenic Cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 66(3): 418-427, 2014.

2. 学会発表

永田有希、橋本有弘. ディシェンヌ型筋ジストロフィー由来ヒト筋細胞に特異的な「NotchとNF-kappaBのクロストーク」は、増殖・分化能の低下に関与する第27回日本整形第36回日本分子生物学会 2013.12、神戸.

塩見浩介、橋本有弘. グルココルチコイドは、ヒト筋細胞を酸化ストレスから防御する第36回日本分子生物学会 2013.12、神戸.

Naohiro Hashimoto. Glucocorticoid is essential to proliferation of human myogenic cells. Myogenesis Gordon Conference July 7-12, 2013, Lucca, Italy.

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

骨格筋由来液性因子とサルコペニアに関する探索的研究

研究分担者 江頭正人 東京大学 特任准教授

研究要旨

骨格筋における液性因子または液性因子受容体を網羅的に検討し、交感神経β受容体刺激により、骨格筋においてVDRの発現が上昇することを明らかにした。また、ビタミンD刺激によりGDNFが上昇することが明らかになった。これらのシグナルの活性化により、神経筋機能が改善し、サルコペニアの治療に有用である可能性がある。

A. 研究目的

骨格筋の維持や身体活動の増加は、日常生活の維持のみならず、心血管疾患や認知症のリスク低下とかかわっている。また、身体活動の低下やサルコペニアが、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。このことは、骨格筋と全身の臓器、組織との間に液性因子を介したクロストークが存在することを示唆するが、その詳細は明らかではない。われわれは、運動時にみとめられる交感神経β受容体刺激によって発現が変動する骨格筋由来液性因子または液性因子受容体について探索的な検討をおこなった。

B. 研究方法

無刺激ならびにイソプロテレノール刺激をおこなった培養骨格筋細胞（C2C12細胞）からmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイをおこないイソプロテレノールにて発現が変動する遺伝子を網羅的に検討した。変動が認められた遺伝子のなかで液性因子または液性因子受容体をコードする遺伝子を抽出した。それらの遺伝子のイソプロテレノールに

よる発現調節に関するメカニズムについても検討を加えた。

（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

マイクロアレイ解析によりイソプロテレノールによるビタミンD受容体（VDR）mRNAの発現上昇が認められた。VDR mRNAのイソプロテレノールによる上昇は、定量的RT-PCRにて確認された。また、ウエスタンブロット解析によりイソプロテレノールによるVDRタンパクレベルの発現上昇も確認された。選択的β2受容体活性化薬であるホルモテロールならびにフェモテロールにより同様にVDR発現上昇が認められ、イソプロテレノールの効果が選択的β2受容体拮抗薬ICI118551により遮断されることから、イソプロテレノールの効果は、β2受容体を介していることが示された。C2C12細胞におけるVDRの発現上昇は、ビタミンD3の添加でも認められ、イソプロテレノールとビタミンD3の同時刺激によ

りさらなる上昇がみられた。ビタミンD3の刺激によりC2C12細胞において神経栄養因子GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factorの発現上昇が認められた。

#### D. 考察

本研究において、交感神経β受容体刺激により骨格筋におけるVDRの発現が増強されること、その機序として、β2受容体が関与していることをみいだした。一方、ビタミンD3刺激により骨格筋におけるGDNFが増強することをみいだした。GDNFは、神経細胞や神経筋接合部の維持に重要な役割をはたしていることが想定されることから、神経骨格筋軸の維持に交感神経シグナルとビタミンDシグナルが重要である可能性が示唆された。これらのシグナルの活性化がサルコペニアの治療に有用である可能性がある。実際に、臨床研究において、ビタミンD投与により転倒リスクが低下すること、その際に筋量、筋力が変化しないことから、ビタミンDには神経筋機能を改善する可能性が想定されている。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と考えられる。

#### E. 結論

交感神経β受容体刺激により、骨格筋においてVDRの発現が上昇すること、ビタミンD刺激によりGDNFが上昇することが明らかになった。これらのシグナルの活性化により、神経筋機能が改善し、サルコペニアの治療に有用である可能性がある。

#### 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) Shibasaki K, Ogawa S, Yamada S, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Toba K, Akishita M, Ouchi Y. Association of decreased sympathetic nervous activity with mortality of older adults in long-term care. *Geriatr Gerontol Int.* 14: 159-166, 2014.

##### 2. 学会発表

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

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  
サルコペニア診断の新バイオマーカー候補の臨床的評価

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

超高齢社会を既に迎え、骨格筋量の進行的な低下に伴う機能低下、すなわちサルコペニア(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となることから、その早期診断や有効な介護予防対策は急務の課題である。サルコペニアは老年病症候群の主要な原因であるが、その定義と診断は筋量、筋力と身体能力(歩行能力など)の生理学的指標を定量的に測定して評価することが欧州の学会で統一見解として2010年に発表され、我が国においても日本人の体格にあわせた基準作りが、厚生労働省班会議と日本老年病学会が中心となり進められている。一方、この診断法に基づき臨床的にサルコペニアと診断されるケースは、筋力低下や筋萎縮だけでなく、認知症を含む他の老年病症候群を合併しているケースが多く、病態改善の有効な治療や予防がなかなか困難である。そこで、早期にサルコペニアを診断して、運動や栄養補給による介入や薬物治療などの効果を客観的な指標で判定することで介護予防を可能にするバイオマーカーが求められている。

本研究は、筋力と筋量とは全く別の次元の計測可能なバイオマーカーを発見しており、それを利用してサルコペニアの新しい診断・予防・治療法の開発を目的としている。バイオマーカー分子のアクセシシステムを開発して老化モデル動物に加え、筋力、筋量、運動能力、最大酸素摂取量、体脂肪のデータの揃った20歳から70歳の男女1000名の検体、および高齢者の検体を使いバイオマーカーの評価を行う。詳細については、知財の関係でまだ公表することができない。そこで本年度は、バイオマーカーの生物学的意義と評価的評価の根拠を定めるために、マウスの加齢性筋萎縮の解析とエネルギー代謝能の加齢変化を単一筋線維レベルで解析したので報告する。

### A. 研究目的

サルコペニアのバイオマーカーの開発においては、ヒトの臨床検体だけでなく加齢マウスを使い解析することで新規バイオマーカーの生物学的意義と臨床的意義を統合的に評価することが可能となる。すなわち、バイオマーカーの生

物学的意義を明確にすることができれば、臨床的評価の明確な根拠を提示すること可能となる。しかしながら、加齢マウスを使いサルコペニアに伴う骨格筋の様々な病理学的変化についてのこれまで報告では、同じ月齢であるにも関わらず解析結果が様々で異なる。また、超高

齢者に相当する 32 ヶ月齢でサルコペニア様症状の顕在化するマウスを使った研究や、さらに骨格筋を構成する筋線維単位での筋萎縮の病理学的変化および加齢に伴うエネルギー代謝機能の変化に関するデータは、現在開発しているバイオマーカーの臨床的評価に必要な情報である。そこで、本年度は 32 ヶ月齢の老齢マウスを用いて、筋線維単位の加齢性筋萎縮及びエネルギー代謝能の加齢による病理学的変化を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

全ての動物実験は東京都健康長寿医療センターの動物実験委員会の承認を得て行った。日本クレアから購入した C57BL/6NCr マウス(♀、若齢群；8 ヶ月齢と老齢群；32 ヶ月齢)を東京都健康長寿医療センター研究所動物施設にて、12 時間明暗期(8:00~20:00)、室温約 23℃の SPF 条件下で飼育した。飼料は CRF-1(オリエンタル酵母工業)を高圧蒸気滅菌(121℃、20 分)した後与え、自由に摂取させた。また、給水は塩素塩酸添加水(残留塩素濃度  $12 \pm 2$  ppm、pH2.5~3.0)を給水瓶により与え、自由に摂取させた。マウス屠殺後に開腹し、腫瘍などの疾患を罹患していないことを確認した。本研究には各群 3~6 匹ずつ用いた。

### 2. 凍結筋横断切片の作成

マウス屠殺後、下肢骨格筋(ひらめ筋、長趾伸筋、前頸骨筋、腓腹筋)をすばやく採取し、コルク板に筋が垂直になるようにトラガカントゴムを用いて立てた。次に、イソペンタンを

液体窒素で冷却し、十分に冷却したイソペンタン内でサンプルを 30 秒~1 分間急速凍結した。その後、30 分間ドライアイス上に放置し、切片を作製するまで-80℃にて保存した。

-28℃のクリオスタット内で厚さ 8 $\mu$ m の連続切片を作製し、切片を 30 分以上風乾した。その後、各染色実験に使用するまで-80℃にて保存した。本研究で使用したスライドガラス及び刃は、PLL(Poly-L-lysine)コートされたもの及びフェザーミクロトーム替刃を使用した。

### 3. 組織化学的染色

#### 1) HE (hematoxylin eosin) 染色

凍結筋切片をマイヤーヘマトキシリン溶液内にて 1 分間インキュベートした。流水で 5 分間の洗浄を行い、1%エオジン液内にて 30 秒間インキュベートした。その後、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い封入した。封入剤は MOUNT QUICK を使用した。

#### 2) COX (cytochrome c oxidase) 染色

使用した染色方法は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて 37℃、60 分間インキュベートした。その後、蒸留水で 90 秒間の洗浄を行い 1%CuSO<sub>4</sub> 液内にて 5 分間反応させた。蒸留水で 90 秒間の洗浄後、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK にて封入した。

COX 反応溶液 (pH5.5 に調整)	必要量
DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)	30mg
0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.6)	13.5mL
1%塩化マンガン (MnCl <sub>2</sub> )	1.5mL
0.1%過酸化水素水 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	150 $\mu$ L

### 3) NADH-TR (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase tetrazolium)染色

本染色は、主にミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて 37°C、30 分間インキュベートした。その後、蒸留水で 90 秒間の洗浄を行い、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回を行い、MOUNT QUICK にて封入した。

NADH-TR 反応溶液	必要量
NTB(nitro blue tetrazolium chloride)	18mg
$\beta$ -NADH	16mg
1M Tris-HCl (pH7.4)	3mL
蒸留水	12mL

### 4) SDH (succinate dehydrogenase)染色

本染色は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて 37°C、30 分間インキュベートした。その後、蒸留水で 90 秒間の洗浄を行い、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回を行い、MOUNT QUICK にて封入した。

SDH 反応溶液 (pH7.2-7.6 に調整)	必要量
NTB(nitro blue tetrazolium chloride)	15mg
0.2M コハク酸ナトリウム	7.5mL
0.2M リン酸バッファー	7.5mL

### 5) $\alpha$ -GPD ( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase)染色

$\alpha$ -GPD は、解糖系で生じた NADH をミトコンドリア内で FADH<sub>2</sub> に変換する反応に関与する。 $\alpha$ -GPD は解糖系代謝の律速酵素ではないが、多くの先行研究にて解糖系代謝酵素活性の指標として用いられている。凍結筋切片を下記反応液内にて 37°C、30 分間インキュベートした。その後、蒸留水で 90 秒間の洗浄を行い、グリセリンゼラチンで封入した。

### 6) ATPase (adenosine triphosphate phosphatase pH4.7) 染色

本染色は、アルカリ性溶液中と酸性溶液中でのミオシン重鎖の ATPase 活性の変化が、筋線維タイプによって異なる性質を利用し、各筋線維タイプを分類する方法である。本研究では、酸性溶液中の ATPase 染色を行った。100mM 塩化カリウムと 100mM 酢酸ナトリウムの混合溶液 (pH4.7) 内にて室温で 10 分間インキュベートした。20mM の CaCl<sub>2</sub> を含有した 20mM グリシン Buffer (pH9.4) 中で 30 秒間の洗浄を行った後、2.5mM の ATP ジナトリウム塩と 20mM の CaCl<sub>2</sub> を含有した 40mM グリシン Buffer (pH9.4) 中にて室温で 25 分間インキュベートした。1%CaCl<sub>2</sub> で 30 秒間洗浄し、2%CoCl<sub>2</sub> 液内に 3 分間浸けた。蒸留水で 90 秒間洗浄し、1%黄色硫化アンモニウ

ム液内で 30 秒間反応させた。その後、蒸留水で 90 秒間洗浄し、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK にて封入した。

$\alpha$ -GPD 反応溶液	必要量
NTB(nitro blue tetrazolium chloride)	19.2mg
50mM Tris-HCl (pH7.4)	20mL
$\alpha$ -グリセロリン酸(Wako, 102914)	56.9mg
メナジオン(Sigma, 101209607)	7.9mg

#### 7) ATPase (adenosine triphosphate phosphatase pH4.7) 染色

本染色は、アルカリ性溶液中と酸性溶液中でのミオシン重鎖の ATPase 活性の変化が、筋線維タイプによって異なる性質を利用し、各筋線維タイプを分類する方法である。本研究では、酸性溶液中の ATPase 染色を行った。100mM 塩化カリウムと 100mM 酢酸ナトリウムの混合溶液 (pH4.7) 内にて室温で 10 分間インキュベートした。20mM の  $\text{CaCl}_2$  を含有した 20mM グリシン Buffer (pH9.4) 中で 30 秒間の洗浄を行った後、2.5mM の ATP ジナトリウム塩と 20mM の  $\text{CaCl}_2$  を含有した 40mM グリシン Buffer (pH9.4) 中にて室温で 25 分間インキュベートした。1% $\text{CaCl}_2$  で 30 秒間洗浄し、2% $\text{CoCl}_2$  液内に 3 分間浸けた。蒸留水で 90 秒間洗浄し、1%黄色硫化アンモニウム液内で 30 秒間反応させた。その後、蒸留水で 90 秒間洗浄し、70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK にて封入した。

#### 8) mGT (modified Gomori trichrome) 染色

本染色は、ミトコンドリア機能異常に伴うミトコンドリア数の増加や形態変化を染出する。凍結筋切片をマイヤーヘマトキシリン溶液内にて 10 分間インキュベートし、5 分間の水洗を行った。その後、下記反応液内にて 20 分間インキュベートし、0.2%酢酸液内にて 5~10 分間洗浄した。70-90-100-100%のエタノール内で順次脱水を各 30 秒間行った。キシレンで 1 分間の透徹処理を行い、MOUNT QUICK にて封入した。

mGT 反応液 (pH3.4 に調整)	必要量
chromotrope 2R	0.6g
fast green FCF	0.3g
リンタングステン酸	0.6g
無水酢酸	1.0mL
蒸留水	100mL

#### 4. 免疫組織染色

凍結筋切片を PBS で 1 分間の洗浄後、4%PFA (paraformaldehyde) にて 15 分間氷上で固定し、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。その後、 $-20^\circ\text{C}$  にて 10 分間メタノールによる透過処理を行った。PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、5% normal goat serum (in PBS with 1%BSA) で室温にて 60 分間のブロッキング反応を行った。その後、一次抗体反応 (1<sup>st</sup> antibody in PBS with 1%BSA) を  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、二次抗体反応 (2<sup>nd</sup> antibody in PBS with 1%BSA) を室温で 90 分間、遮光条件下で行った。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、退色防止剤で封入した。封入後、すぐに蛍光顕微鏡 (Leica, AF6500) または共焦



点蛍光顕微鏡 (Leica, TCS-SP5) で組織形態を観察し、画像取得した。一次抗体及び二次抗体の詳細は、下記表に表記した。

一次抗体一覧表

1st antibody			Supplier	Dilution
Type1	anti-mouse IgG1	clone BAF8	DSMZ	12 $\mu$ g/mL
Type2 A	anti-mouse IgG2b	clone SC-71		3 $\mu$ g/mL
Type2 B	anti-mouse IgM	clone BFF3		1:20
Type2 X	anti-mouse IgM	clone 6H1	※	1:20
COXIV	anti-rabbit	polyclonal	Cell Signalin g #4844	1:250

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

二次抗体一覧表

2nd antibody	Supplier	Catalog no.	Dilution
Alexa Fluor® 594 Goat anti-mouse IgG2b	Invitrogen	A21145	1:2000
Alexa Fluor® 647 Goat anti-mouse IgG1	Invitrogen	A21240	1:2000
Alexa Fluor® 594 Goat	Invitrogen	A21044	1:2000

anti-mouse IgM			
Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgM	Invitrogen	A21044	1:2000
Alexa Fluor® 555 Goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	A21429	1:1000

## 5. 画像解析

### 1) 筋線維数及び筋線維面積の測定

HE 染色の画像を基に、全筋線維数及び筋線維面積を測定した。筋線維面積は少なくとも 100 本以上の筋線維面積を平均化した。

### 2) 各筋線維タイプの筋線維面積の測定

免疫組織染色の画像を基に、各筋線維タイプの数及び面積を測定した。各筋線維タイプごとに、30~100 本の筋線維を目安に平均化した。

### 3) 各筋線維タイプ単位のミトコンドリア活性及び $\alpha$ -GPD 活性の測定

ATPase (pH4.7) 染色または免疫組織染色によって筋線維タイプを区別した。連続切片には、ミトコンドリア呼吸酵素活性を調べるために COX, SDH, NADH-TR 染色を行い、解糖系代謝酵素活性を調べるために  $\alpha$ -GPD 染色を行った。両染色で得られた画像を光学顕微鏡 (Leica DMD108) により取得した。各筋線維タイプ単位のエネルギー代謝酵素活性を intensity に変換し、活性評価した。定量的な解析をするために各筋線維タイプごとに、少なくとも 30 本以上の筋線維におけるエネルギー代謝酵素活性を

平均化した。また、筋全体のエネルギー代謝酵素活性の評価として、上記した染色で得られた筋全体の画像を intensity に変換し評価した。

#### 4) ミトコンドリア COXIV の蛍光強度の測定

本解析は共焦点蛍光顕微鏡によって得られたミトコンドリア画像の解析を行った。各筋線維タイプ単位のミトコンドリア COXIV の発現を解析するために、筋線維タイプと COXIV の多重免疫組織染色を行った。COXIV の発現を調べるために、各筋線維タイプ単位の COXIV の蛍光強度を評価した。定量的な解析をするために各筋線維タイプごとに、30 本の筋線維を目安に得られた値を平均化した。

#### 5) sarcoplasmic mass-like fiber の定量的な解析

mGT 染色で得られた画像を基に、約 200~400 本の筋線維を含んだ領域の sarcoplasmic mass-like fiber の数を割合 (%) として算出した。

#### 6). リアルタイム PCR による mRNA の発現解析

細かく破碎した筋サンプルに ISOGEN を加え、ポリトロンによって完全に破碎し RNA を抽出し精製した。RNA 収量を NanoDrop により定量後、150ng の RNA を PrimeScript® RT reagent Kit により逆転写反応させ、cDNA を得た。目的遺伝子 (PGC1  $\alpha$ , COXIV, Tfam) の発現量を解析するために、標的的特異的プライマー及び SYBER® Premix EX Taq™ II (TaKaRa, RR820A) を用いて、cDNA を PCR 反応させ、ABI StepOne™ and StepOnePlus™ によって遺伝子発現を解析した。使用したプライマーの塩基配列は、下記表に記

す。

使用プライマーの塩基配列		
$\beta$	Forward	5' CTGGCTCCTAGCACCATGAAGAT 3'
	Reverse	5' GGTGGACAGTGAGGCCAGGAT 3'
-actin	Forward	5' CGCACAACTCAGCAAGTCCTC 3'
	Reverse	5' CTTGCTGGCCTCCAAAGTCTC 3'
PGC1 $\alpha$	Forward	5' AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT 3'
	Reverse	5' TTTTCCAAGCCTCATTTACAAGC 3'
Tfam	Forward	5' CATTCTACTTCGGTGTGCCTTC 3'
	Reverse	5' CACATCAGCAAGGGGTAGTC 3'
COXIV	Forward	5' CATTCTACTTCGGTGTGCCTTC 3'
	Reverse	5' CACATCAGCAAGGGGTAGTC 3'

#### 6. 統計解析

各測定により得られた結果は、平均値±標準誤差として表記した。老齢群と若齢群との有意差は、student の t 検定を用いて検討し、すべての検定において有意水準は 5%未満とした。

(倫理面への配慮)

本課題の遂行に必要な動物実験においては、東京都健康長寿医療センターで承認されており、また国の「動物の保護及び管理に関する法律」に従い、動物愛護の観点に十分配慮して行った。また、本課題の遂行に必要な組み換え DNA 実験は東京都健康長寿医療センターで承認されている。

本報告書の研究では、患者検体や医療情報などを使っておらず倫理委員会の承認を必要としない。

#### C. 研究結果

##### 1. 老齢マウスの下肢骨格筋は、骨格筋間で筋萎縮の様式が異なる。

若齢 (8 カ月齢)・老齢マウス (32 カ月齢) から、下肢骨格筋のひらめ筋 (SOL ; soleus)、長趾伸筋 (EDL ; extensor digitorum longus)、前脛骨

筋(TA ; tibialis anterior)、腓腹筋(Gastro ; gastrocnemius)を採取し筋重量を測定した。老齢マウスの下肢骨格筋において、筋重量の絶対量及び体重で補正した筋重量の顕著な減少を認めた(図1)。

図1.加齢による筋量の減少

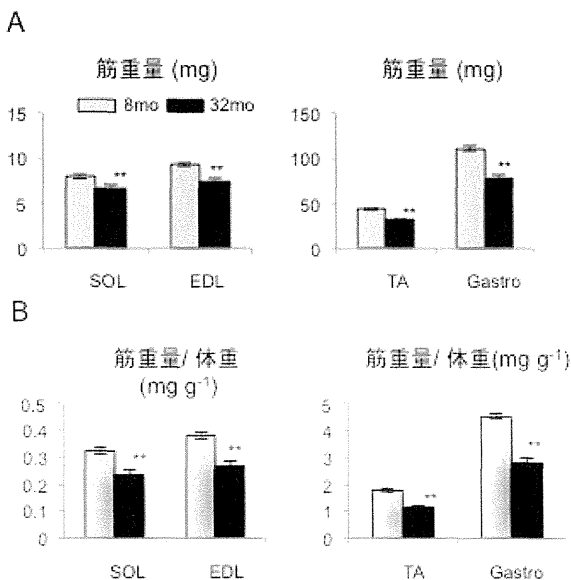
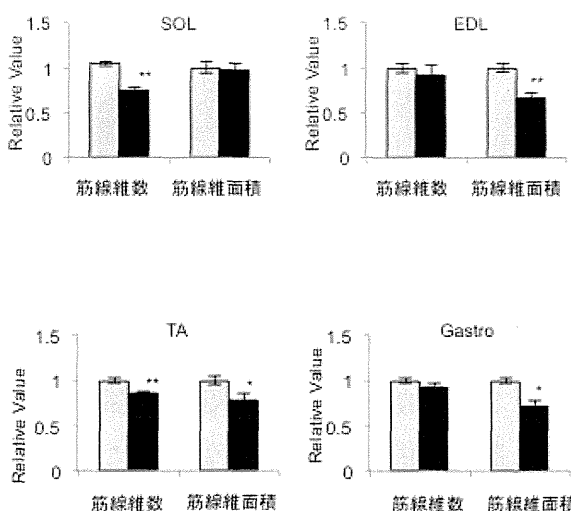


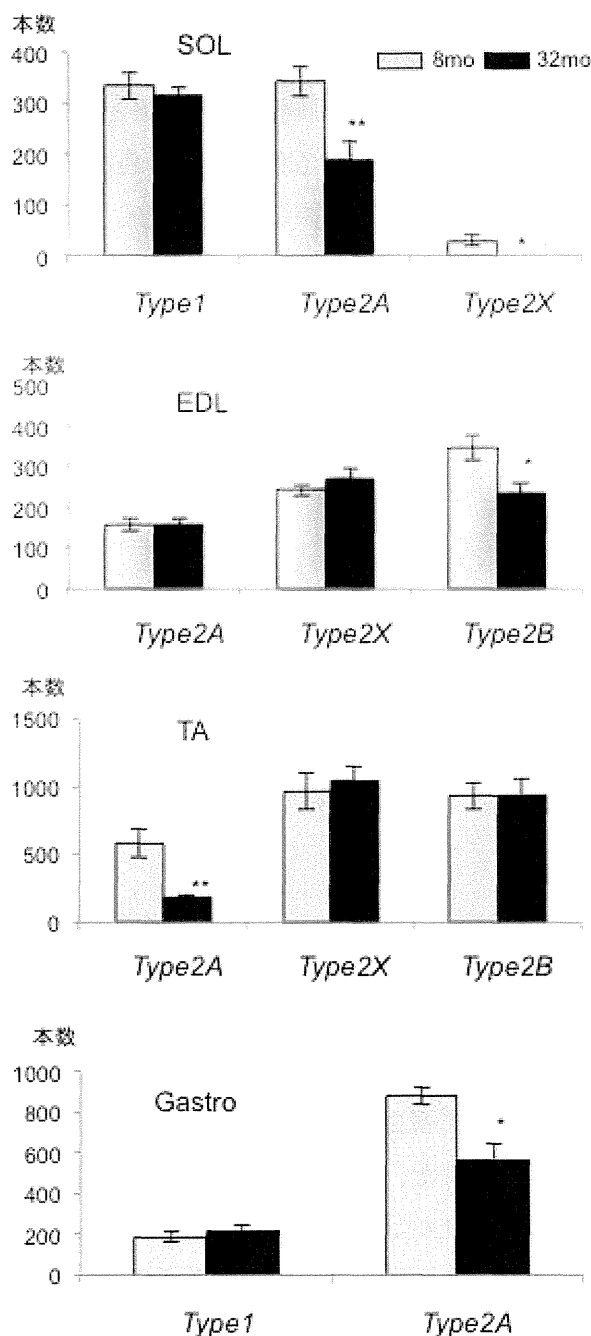
図2.加齢による筋萎縮 (筋線維数と筋断面積の減少)



加齢性の筋萎縮は、筋線維数の減少と筋線維面積の低下に起因するとされているが、複数の筋を対象として萎縮の様式を解析した報告は極めて少ない。そこで我々は、老齢マウスのひ

らめ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋における筋萎縮の様式を HE 染色によって解析した。老齢マウスのひらめ筋では筋線維数の減少に起因し、長趾伸筋と腓腹筋では筋線維面積の低下に起因し、前脛骨筋では筋線維数の減少と筋線維面積の低下に起因した筋萎縮であることが

図3. 加齢による筋線維タイプ数の変化



判明した (図 2)。以上の結果から、老齡マウスの下肢骨格筋では骨格筋間で筋萎縮の様式が異なることを明らかにした。

## 2. 老齡マウスの下肢骨格筋は、筋線維タイプ特異的に筋萎縮の様式が異なる。

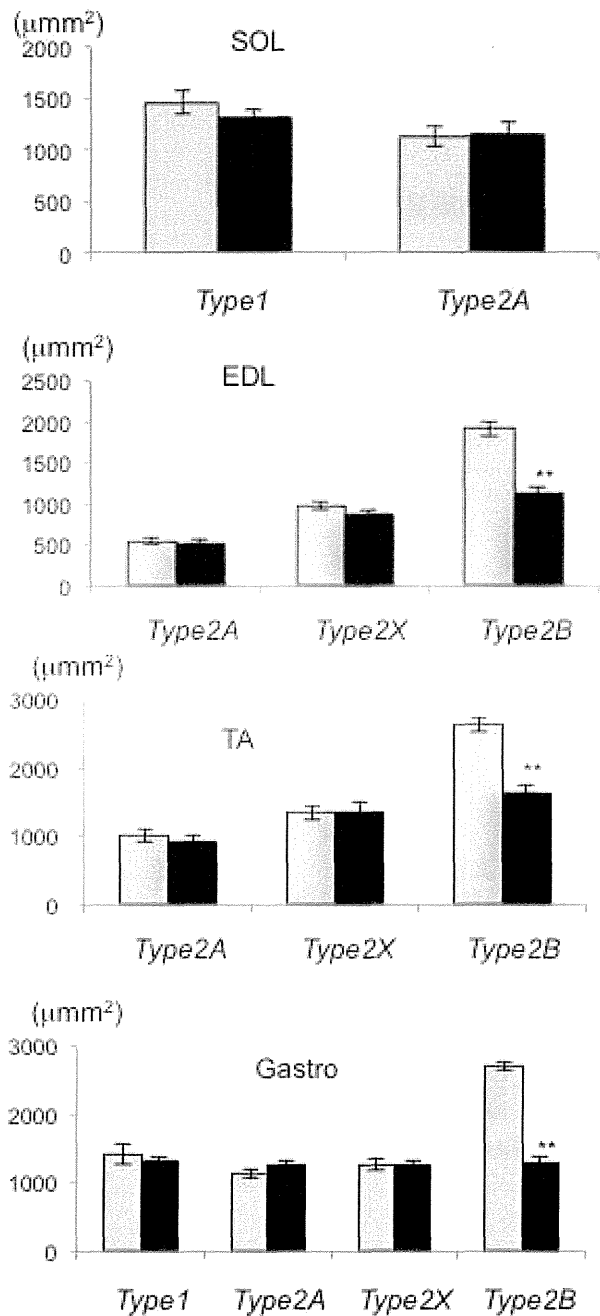
加齢性筋萎縮はヒトでもマウスでも速筋線維 (Type2B fiber) 選択的におきると報告されているが、マウスの4つの下肢骨格筋 (ひらめ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋) を対象として、各筋線維タイプに対する免疫組織染色法により、筋線維タイプ単位の筋萎縮の様式を解析した。その結果、各々の筋において筋線維タイプ特異的に筋萎縮の様式が異なることが判明した。筋線維数の変化については、長趾伸筋では Type2B fiber が減少し、ひらめ筋・前脛骨筋・腓腹筋では Type2A fiber の数が減少していた (図 3)。

一方で主に速筋線維で構成される速筋優位筋 (長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋) では共通して Type2B fiber 特異的な筋線維面積の低下を示した (図 4)。

## 3. ミトコンドリア機能の変化

加齢により下肢骨格筋においては、ミトコンドリア機能 (ミトコンドリア呼吸酵素活性やミトコンドリア蛋白質発現) が低下することが予想される。また、加齢に伴うミトコンドリア機能の異常がサルコペニア発症要因の1つとされている。そこで、病理学的・組織化学的手法により、単一筋線維レベルで筋線維の萎縮とミ

図4.加齢による筋線維タイプ毎の断面積の変化



トコンドリア機能の変化との因果関係をひらめ筋と長趾伸筋の2つの下肢骨格筋に焦点を絞り解析した。ミトコンドリア機能の指標としてミトコンドリア呼吸酵素活性に着目し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの活性を反映するCOX (cytochrome c oxidase)、呼吸鎖複合体 I の