

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ッセイ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 °C 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 °C、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 ± 2 ppm、pH 2.5~3.0)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 °C にて保存した。

-28 °C のクリオスタット内で厚さ 8 μm 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 °C 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マイ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の活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて 37 °C、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%CuSO₄ 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 ₂)	1.5mL
0.1%過酸化水素水(H ₂ O ₂)	150 μL

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の活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて37、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
-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の活性を反映する。凍結筋切片を下記反応液内にて37、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) α-GPD (α-glycerophosphate dehydrogenase)染色

-GPDは、解糖系で生じたNADHをミトコンドリア内でFADH₂に変換する反応に関与する。-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、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CaCl₂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CaCl₂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%CaCl₂で30秒間洗浄し、2%CoCl₂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。

-GPD 反応溶液	必要量
NTB(nitro blue tetrazolium chloride)	19.2mg
50mM Tris-HCl(pH7.4)	20mL
-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 CaCl₂ 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 CaCl₂ 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%CaCl₂ で 30 秒間洗浄し、2%CoCl₂ 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
リンタンゲステン酸	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 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 (1st antibody in PBS with 1%BSA) を 4 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 (2nd 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 µg/mL
Type2 A	anti-mouse IgG2b	clone SC-71		3 µg/mL
Type2 B	anti-mouse IgM	clone BFF3		1:20
Type2 X	anti-mouse IgM	clone 6H1		1:20
COX	anti-rabbit	polyclonal	Cell Signaling 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 anti-mouse IgM	Invitrogen	A21044	1:2000

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 -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 -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 COX 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 COX の発現を解析するために、筋線維タイプと COX の多重免疫組織染色を行った。COX の発現を調べるために、各筋線維タイプ単位の COX 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 , COX , Tfam) の発現量を解析するために、標的特異的プライマー及び SYBER® Premix EX Taq™ (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		
-actin	Forward	5' CTGGCTCCTAGCACCATGAAGAT 3'
	Reverse	5' GGTGGACAGTGAGGCCAGGAT 3'
PGC1	Forward	5' CGCACAACTCAGCAAGTCCTC 3'
	Reverse	5' CTTGCTGGCTCCAAAGTCTC 3'
Tfam	Forward	5' AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT 3'
	Reverse	5' TTTTCCAAGCCTCATTACAAGC 3'
COX	Forward	5' CATTCTACTTCGGGTGCCTTC 3'
	Reverse	5' CACATCAGGCAAGGGGTAGTC 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。老齡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

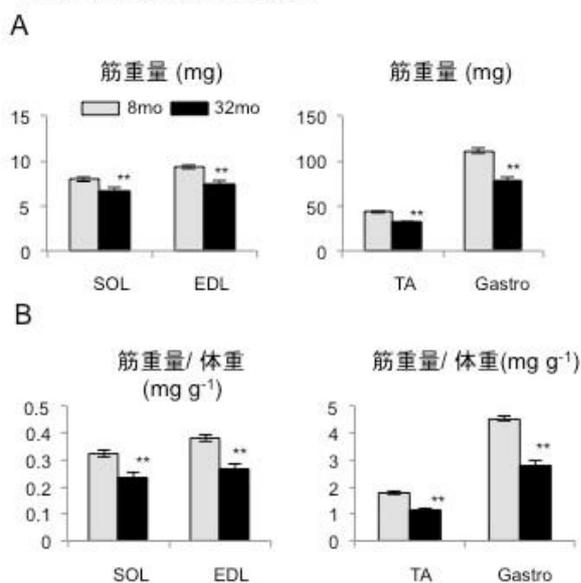
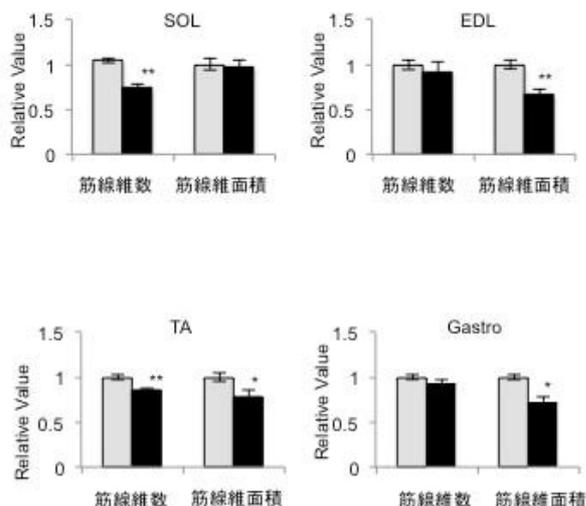


図2.加齢による筋萎縮 (筋線維数と筋断面積の減少)



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、老齡マウスのひらめ筋、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。老齡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)。

図3. 加齢による筋線維タイプ数の変化

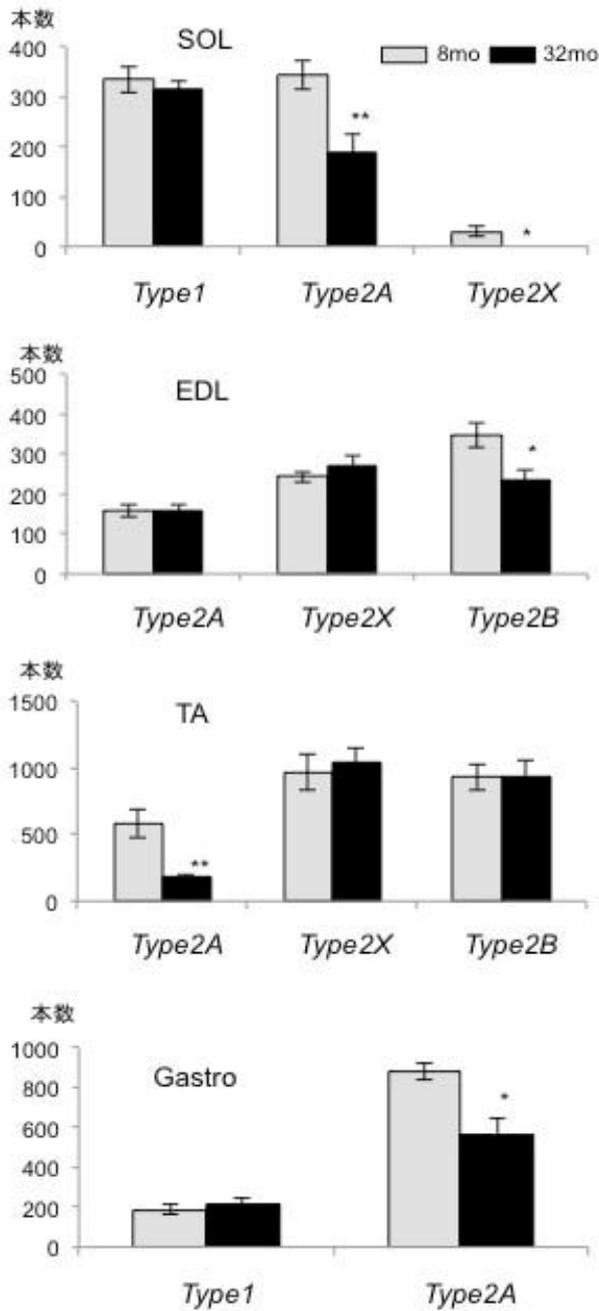
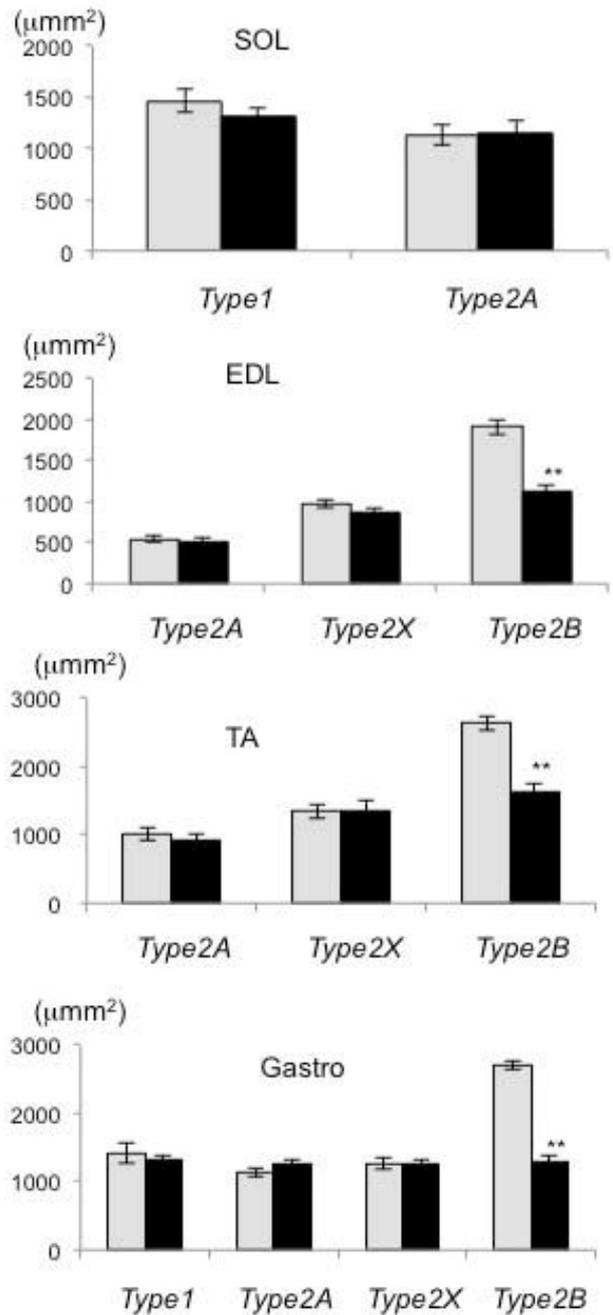


図4. 加齢による筋線維タイプ毎の断面積の変化



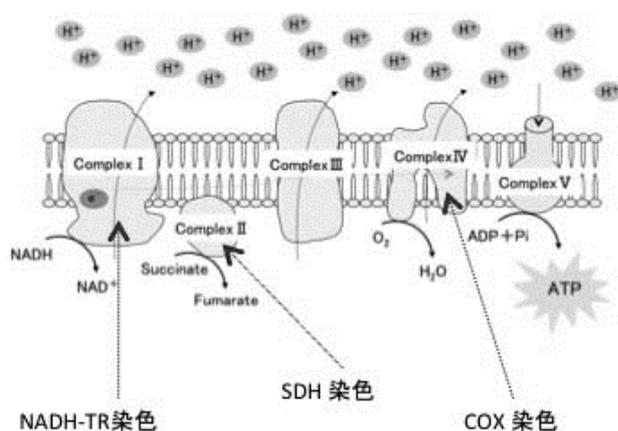
3. ミトコンドリア機能の変化

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・組織化学的な手法により、単一筋線維レベルで筋線維の萎縮とミ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

吸鎖複合体の活性を反映する
COX(cytochrome c oxidase)、呼吸鎖複合体の活性を反映する
NADH-TR(nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase)、呼吸鎖複合体の活性を反映する
SDH(succinate dehydrogenase)染色を行った(図5)。

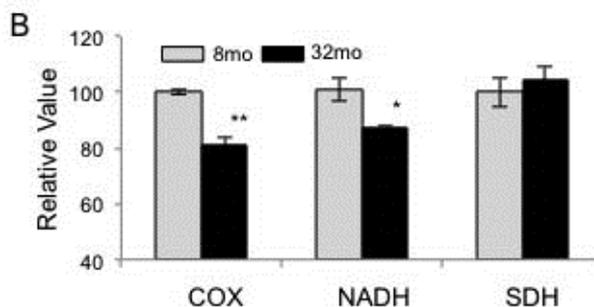
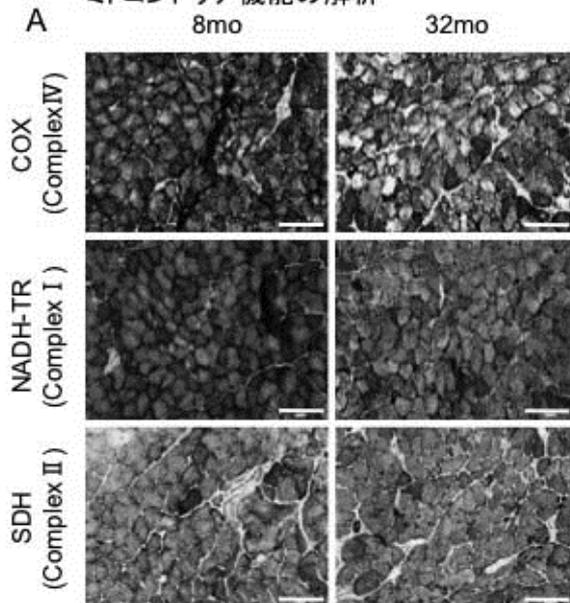
図5. ミトコンドリアの機能と組織染色の説明



組織染色画像を定量的に解析した結果、老齢マウスのひらめ筋においてSDH活性は維持されていたもののCOX(呼吸鎖複合体)及びNADH-TR(呼吸鎖複合体)活性が有意に低下したことから、ミトコンドリア呼吸酵素活性が顕著に低下することが示された(図6)。

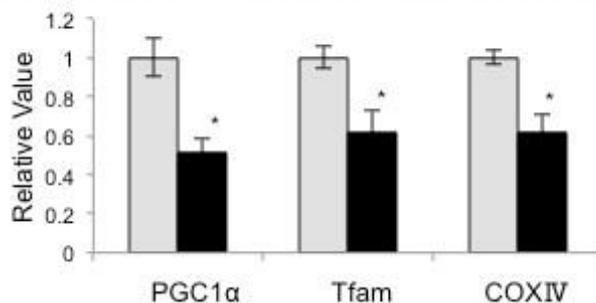
ミトコンドリアバイオジェネシスやミトコンドリア呼吸機能を正に制御するPGC1 (PPAR coactivator-1)、PGC1の下流でミトコンドリアDNAの転写を促進するTfam(mitochondrial transcription factor)、ミトコンドリア呼吸鎖複合体(COX)の一部をコードするCOX(COX subunit)のmRNA量を定量的リアルタイムPCR法によって解析した。その結果、老齢マウスのひらめ筋にお

図6. 組織化学染色によるひらめ筋のミトコンドリア機能の解析



るミトコンドリア関連遺伝子発現の顕著な低下を確認した(図7)。

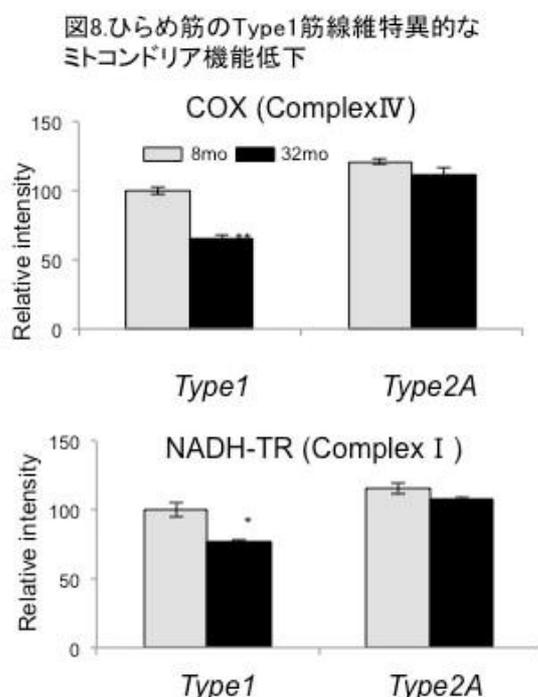
図7. ひらめ筋のミトコンドリア関連遺伝子の発現解析



一方で、老齢マウスの長趾伸筋では、ミトコンドリア呼吸酵素活性(COX活性とNADH-TR活性)及びPGC1のmRNA発現量に顕著な変化は認められなかった。

次に、老齢マウスのひらめ筋と長趾伸

筋における筋線維タイプ特異的な筋萎縮とミトコンドリア呼吸酵素活性の変化との関連性を調べた。その結果、老齡マウスのひらめ筋におけるミトコンドリア呼吸酵素活性の低下は、筋萎縮を呈した Type2A fiber ではなく Type1 fiber 特異的に引き起こされることが示された(図 8)。

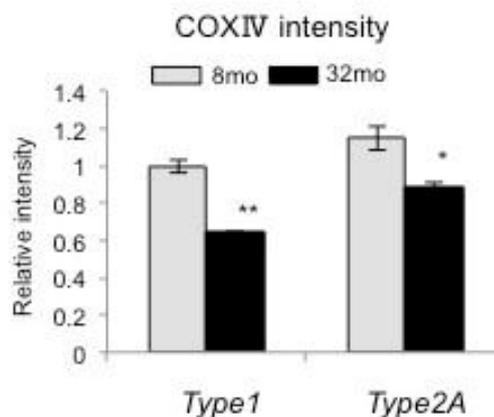


老齡マウスの長趾伸筋においては、各筋線維タイプ単位でミトコンドリア呼吸酵素(COX)活性が維持されることが明らかとなった。

次に、ミトコンドリア呼吸酵素活性の低下とミトコンドリアの蛋白質発現変化との関連を明確にするために、COX の構成蛋白質サブユニット である COX に対する特異抗体を用いた免疫組織染色を行うことにより、ミトコンドリア蛋白質発現の変化を筋線維タイプ単位で解析した。その結果、老齡マウスのひらめ筋では、若齡と比較して Type1、Type2A fiber 共

に COX の蛍光強度が有意に低下したが、Type1 fiber において、その低下がより顕著であった(図 9)。

図9. 加齢によるミトコンドリア蛋白質発現の減少

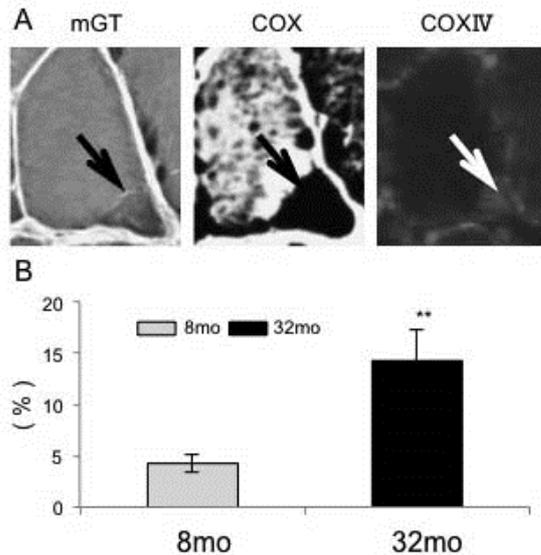


4. ミトコンドリアの形態変化

ミトコンドリアの形態異常にも着目して、組織化学的手法であるゴモリトリクローム変法(mGT; modified Gomori trichrome)を使った。mGT 染色は、ミトコンドリアミオパチー患者などの筋病理診断に用いられる染色であり、ミトコンドリア機能の低下に伴うミトコンドリア形態の異常を光学顕微鏡的に赤紫色に染出する。興味深いことに、老齡マウスのひらめ筋において筋線維膜直下に異常と考えられる集積物が観察される筋線維が有意に増加していることが認められた(図 10A、B)。

この集積物がミトコンドリアであると予想し、作製した凍結筋連続切片にて mGT 染色、COX 染色、COX の免疫組織染色を行った。その結果、集積物はミトコンドリア呼吸酵素である COX 活性が非常に高く、ミトコンドリア蛋白質の COX の免疫組織染色像と共同在を示した(図 10 A)。

図10. ひらめ筋で観察されるミトコンドリアの形態異常 (sarcoplasmic mass-like fiber)



この筋病理所見は、筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy) などの患者の筋で観察される「sarcoplasmic mass」に類似する。さらに定量解析の結果、sarcoplasmic mass-like fiber の出現に筋線維タイプ特異性はなく、Type1、2A fiber とともに同程度の割合で病理所見が観察された。

5. 解糖系酵素活性の解析

老齡マウスのひらめ筋と長趾伸筋における解糖系代謝機能を解析した。解糖系代謝機能の評価として、解糖系代謝酵素活性の指標とされる β -GPD (β -glycerophosphate dehydrogenase) 染色を、作製した凍結筋切片に施した。その結果、老齡マウスのひらめ筋と長趾伸筋では共に β -GPD 活性に顕著な変化は認められず、各筋線維タイプ単位で活性が維持されることが判明した。

D. 考察

これまで、サルコペニアのモデルとして、ヒトにおける 56~69 歳に相当する 21~24 ヶ月齡のマウスを用いた先行研究が多く、これらのマウスは筋量の減少を示さないといった報告もあるが、我々が用いた老齡マウスはサルコペニア様症状が顕在化した後期高齡者 (75 歳以上) における筋病態を反映する老化動物モデルであると捉えることが出来る。

解析した老齡マウスの 4 つの下肢骨格筋ではそれぞれ、筋線維タイプ特異的に萎縮の様式が異なることが判明した。また、ひらめ筋における加齡性筋萎縮 (Type2A fiber の筋線維数減少) は、ミトコンドリア機能の異常に起因することが示唆された一方で、長趾伸筋においては、ミトコンドリア機能や解糖系代謝機能といったエネルギー代謝能の低下に起因するのではなく、むしろ、その他の要因によって筋萎縮 (Type2B fiber の筋線維数減少かつ筋線維面積低下) が引き起こされることが示唆された。以上の結果から、加齡性筋萎縮は、筋を構成する筋線維タイプによって萎縮の要因が異なり、筋線維タイプ特異的で多様な原因により進行する可能性が示唆された。

サルコペニアのバイオマーカーの開発においては、老化マウスを使いその生物学的意義と評価的評価について検討する必要がある。我々は、作成した新規バイオマーカーのアッセイシステムを使い、マウスを使った動物実験とヒトの検体を使い評価を現在進めている。今回の結果から、老齡マウスを使いバイオマーカーの測定結果から、その生物学的意義と臨床評価の根拠を得るために必要不可欠なデータを得ることがで

きた。

E. 結論

サルコペニアは複合的な原因が蓄積することで起きると考えられる。そのため、サルコペニアの新規バイオマーカーの評価において、どのような指標を使えば良いのか議論されてはいるが結論に至っていない。我々は、運動機能評価だけでなく動物モデルを使い骨格筋の病理学的変化の定量的な指標を使うことでサルコペニアのバイオマーカーの開発を進めている。今年度の研究結果は新規バイオマーカーの開発に有用な新しい指標となるであろう。

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) Mori S, Shigemoto K. Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* 12: 912-917, 2013.
- 2) 重本和宏、福永大地、森秀一. 筋肉の老化. *CLINICAL CALCIUM* 23: 23-27, 2013.
- 3) 重本和宏、森秀一、福永大地、宮崎剛. 筋肉と神経のシナプスの老化 (サルコペニア) の基礎研究. *日本老年医学会雑誌* 50: 349-351, 2013.
- 4) 森秀一、重本和宏. 神経筋接合部の維持機構と筋萎縮. *医学のあゆみ* 244: 696-703, 2013.
- 5) 宮崎剛、森秀一、重本和宏. サルコペ

ニア発症のメカニズム. *腎と骨代謝* 26: 99-107, 2013.

- 6) 重本和宏、越勝男、森秀一. サルコペニアの病因と疾患メカニズム. *アンチエイジング医学* 9: 536-540, 2013.

2. 学会発表

口頭発表 (ワークショップ)

- 1) Mori S, Kubo S, Kishi M, Konishi T, Shigemoto K. Elucidation of pathogenic mechanism of myasthenia gravis with MuSK antibodies using a novel murine model. 15th International congress of immunology, Milan, 2013.8.22-27.

ポスター発表

- 2) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. A murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies; effect of genetic background. *Myasthenia 2013*, Paris, 2013.7.1-2.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特願 2013-221037 「筋幹細胞又は筋芽細胞、及びそれを用いた代謝変換に関する物質のスクリーニング方法、及びスクリーニング方法によって得られた物質を含む医薬組成物」(重本和宏)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし