

図3. 筋力低下者の頻度

Cochran-Mantel-Haenszel test

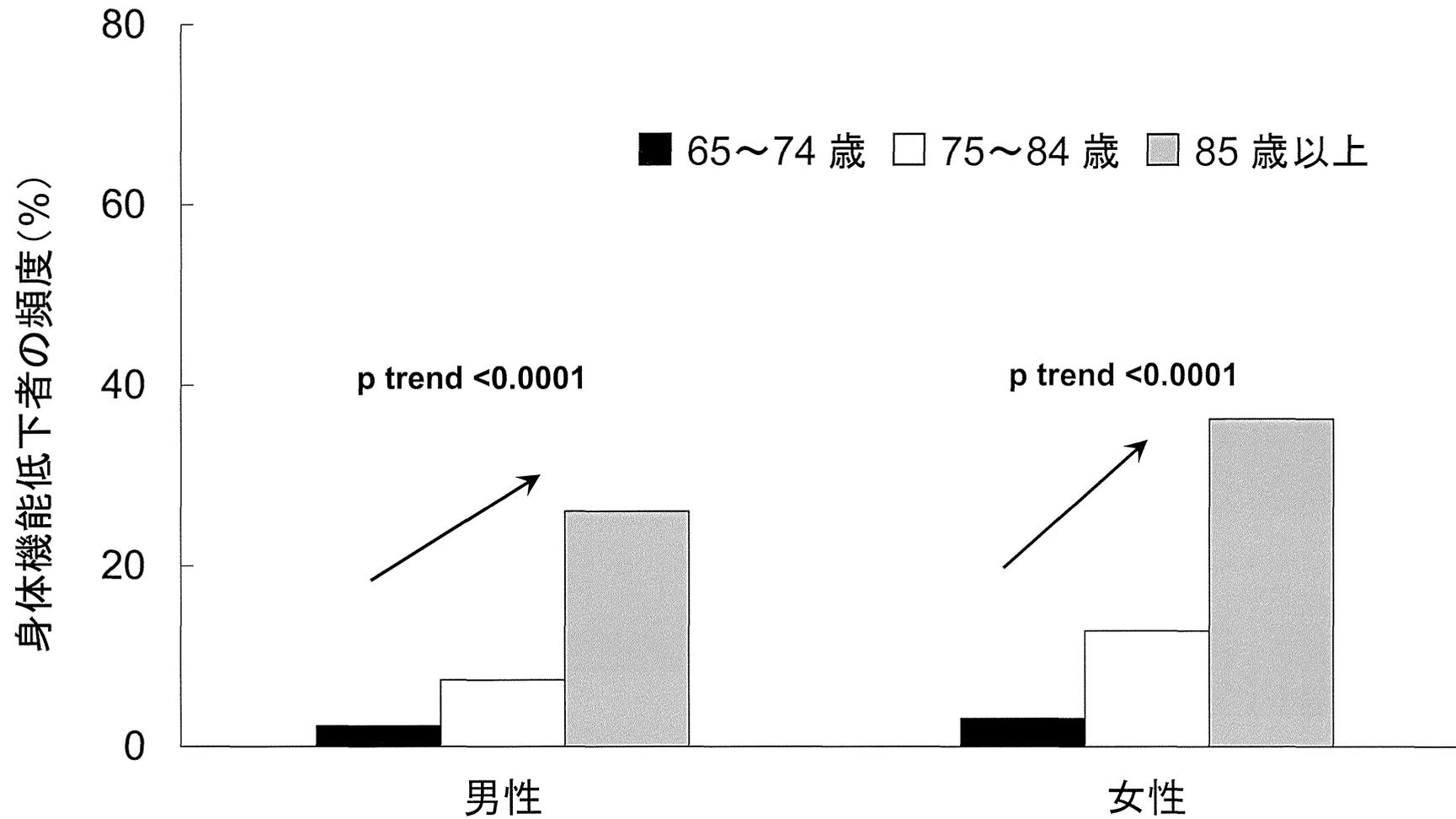


図4. 身体機能低下者の頻度

Cochran-Mantel-Haenszel test

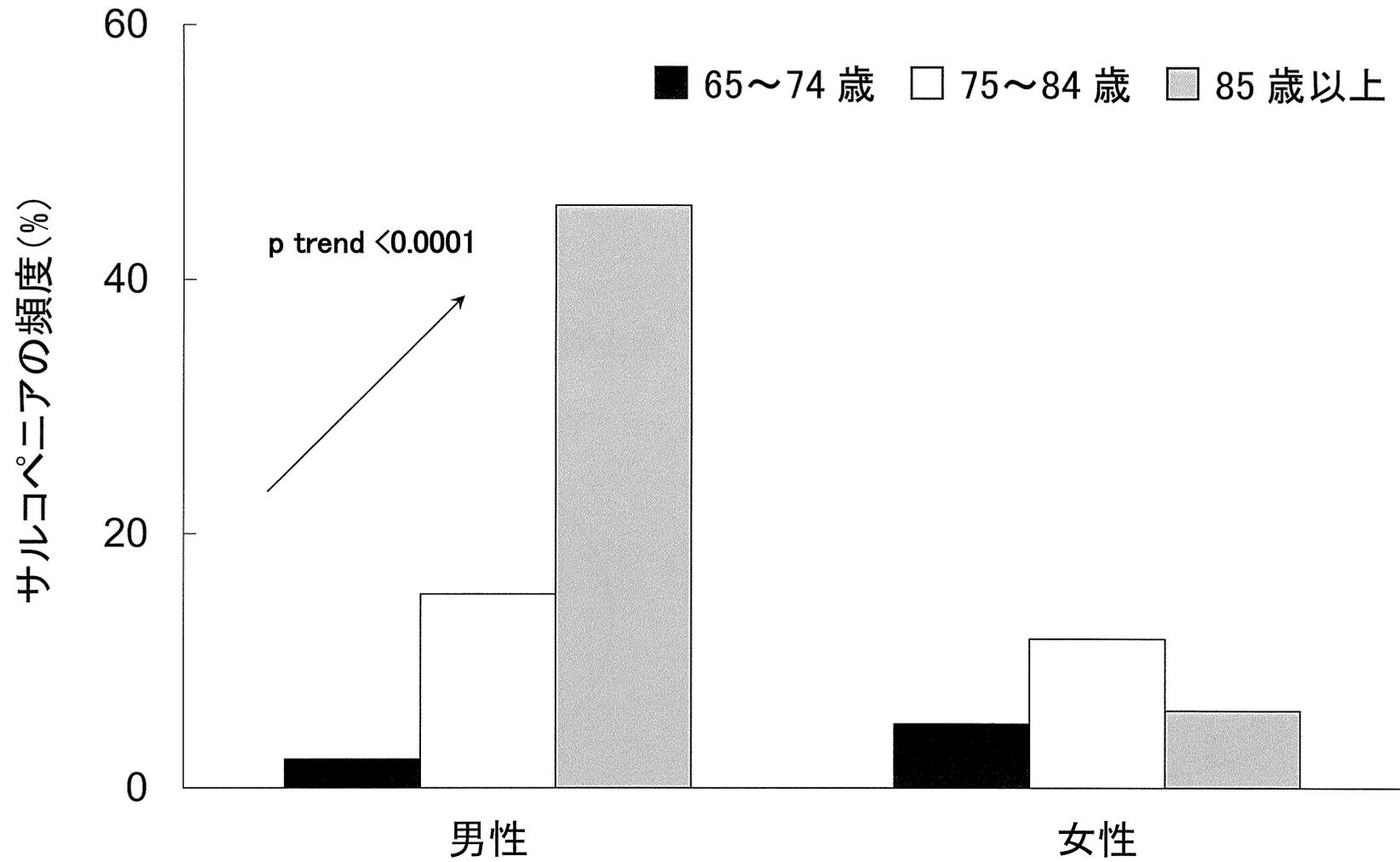


図5. サルコペニアの頻度

Cochran-Mantel-Haenszel test

男性

女性

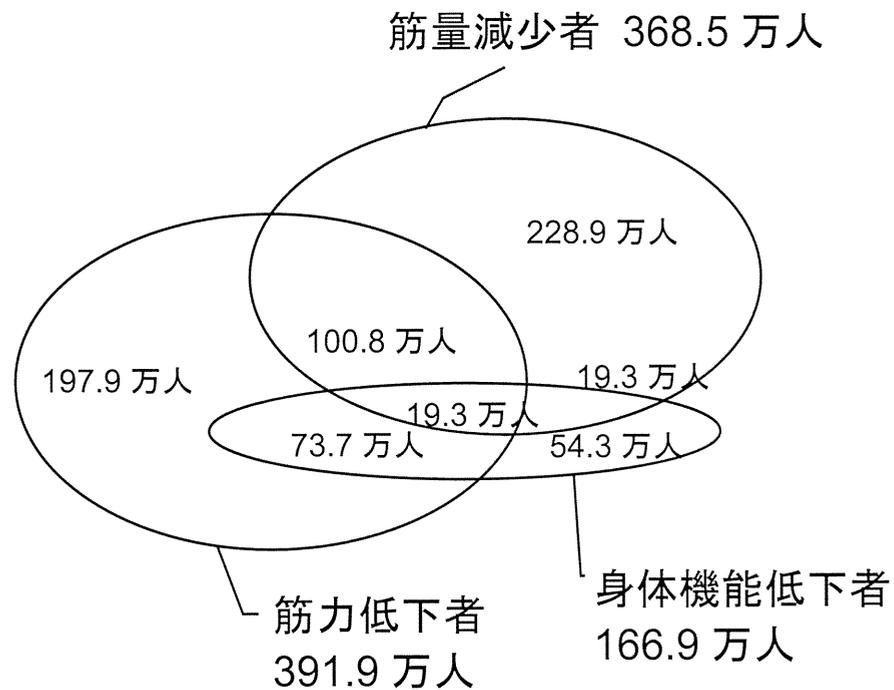
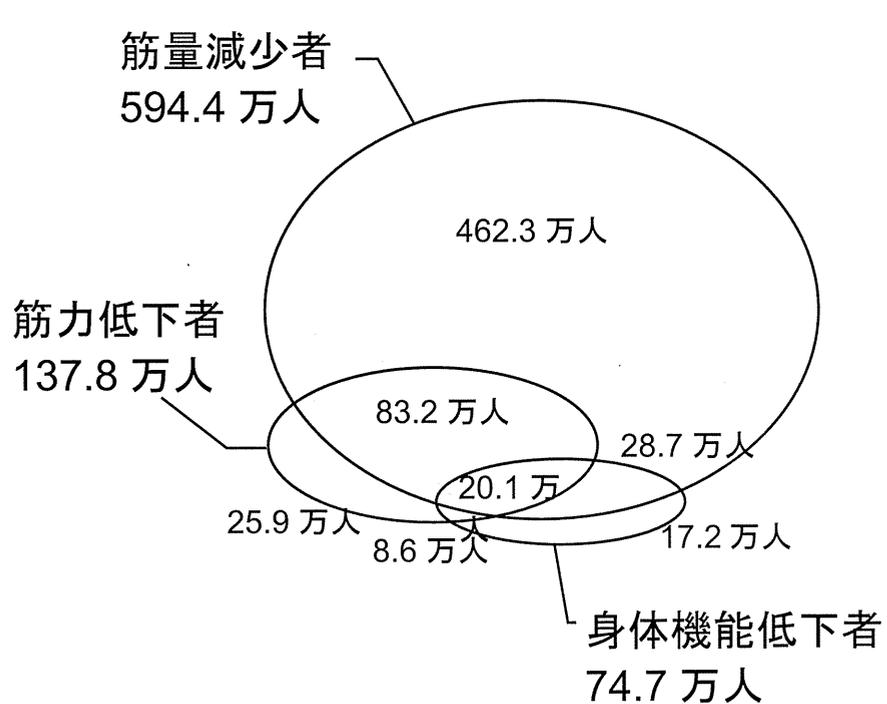


図6. サルコペニアの有病者数の全国推計

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 マウスの骨折、筋損傷モデルを用いて、骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの、筋再生に対する影響を解析した。その結果、アレンドロネートは、骨折を伴う外傷による筋損傷時には、未分化筋細胞の損傷部位への遊走および損傷部位における増殖を選択的に抑制することが示唆された。

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。本年度は、昨年度不死化ヒト筋細胞を用いて得られた、アレンドロネートの筋細胞への影響を、マウスモデルを用いて *in vivo* で検証した。

B. 研究方法

① マウス骨折モデルの作成

麻酔下にマウスの後肢の皮膚と筋肉を切開し、大腿骨を切断した。その後、膝側骨頭にドリルで穴を開け、固定用釘を挿入し、大腿骨を固定した。

② 筋生成の誘導

液体窒素で冷却したステンレス製スパーテル（幅 3mm、厚さ 2 mm）を、骨折部位に面した大腿四頭筋の表面に約 10 秒間接触させ、凍結損傷を与えた。

③ 組織学的解析

筋組織を摘出し、未固定凍結切片を作成した。ヘマトキシリン-エオシリンによる染色あるいは

細胞種特異的な抗体を用いた蛍光抗体法によって細胞を同定した。

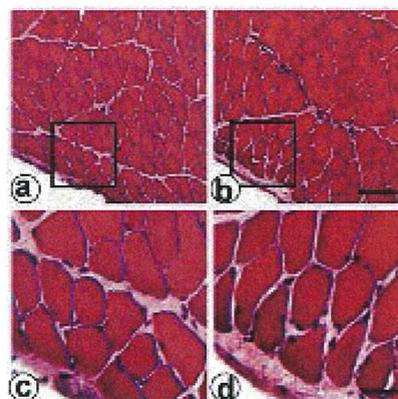
（倫理面への配慮）

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 アレンドロネートおよび骨折は、筋再生を誘導しない

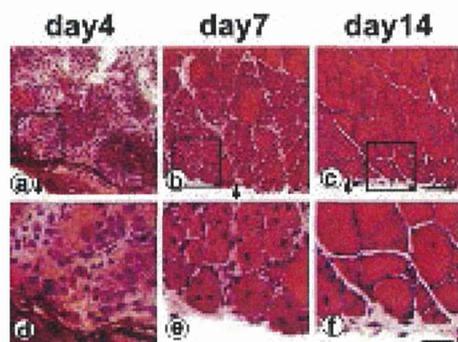
マウス大腿骨を実験的に骨折させても、古拙部位に接触する大腿四頭筋の組織像は、全く正常であった。アレンドロネート（0.7 nmo1/g BW）を7日ごとに計3回腹腔内投与したところ、大腿四頭筋への影響は、認められず、正常であった。さらに、アレンドロネートを7日ごとに計3回腹腔内投与した後に、実験的に骨折をおこした場合でも、やはり大腿四頭筋に、筋線維の壊死損傷や再生は認められず、組織像は、全く正常であった。



骨折およびアレンドロネートによって筋組織は影響を受けない。骨折 (a, c) および骨折とアレンドロネート投与 (b, d) によって、筋組織に異常は認められない。

② 凍結損傷によって大腿四頭筋には局所的な筋再生が誘導される

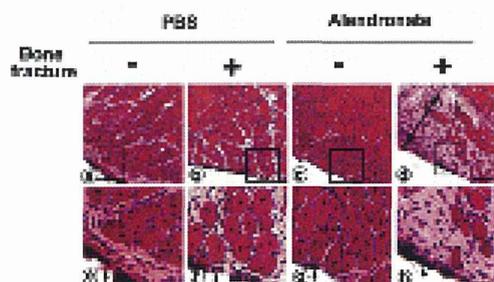
大腿四頭筋に凍結損傷を与えると、4 日後には筋線維の壊死および炎症細胞の浸潤が認められた。損傷 7 日後には、「中心核」を有する再生筋線維が多数認められ、筋再生が誘導された。14 日後には中心核筋線維は僅かに残存するだけになり、細胞膜直下に核を配置した、成熟筋線維が形成された。



凍結損傷による筋再生過程 7 日後には中心核筋線維が多数認められる。

③ アレンドロネートは、骨折を伴う筋再生を阻害する

アレンドロネートを投与後、大腿骨に骨折を誘導すると同時に、骨折部位に接する大腿四頭筋に凍結損傷を与えた。アレンドロネートを投与しない対照群では、正常な筋再生が確認された。一方、アレンドロネート投与群では、骨折を誘導すると同時に筋損傷を与えた場合、壊死した筋線維は損傷部位から消失し、中心核筋線維は形成されなかった。

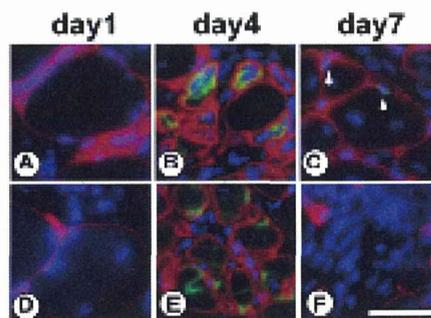


アレンドロネートによる骨折を伴う筋再生の阻害 筋損傷のみ (a, e)、骨折と筋損傷 (b, f)、

およびアレンドロネート投与と骨折 (c, g) を与えた対照群では、何れも筋再生が誘導された。一方、アレンドロネート投与後に骨折と筋損傷を与えると、再生筋線維の形成は認められない (d, h)。

④ アレンドロネート投与によって、筋組織の再生部位から未分化筋細胞が消失する

アレンドロネートが、骨折を伴う再生筋組織において、どの細胞種に影響を与えるのかを明らかにするため、未分化筋細胞を M カドヘリン抗体、マクロファージを F4/80 抗体、血管内皮細胞を CD31 抗体を用いて検出した。その結果、マクロファージの浸潤と貪食、および血管形成には、顕著な影響が認められなかった。しかし、M カドヘリン陽性の未分化筋細胞は、損傷後 4 日の時点では存在するものの、7 日後には消失した。以上の結果から、骨折を伴う筋再生過程では、アレンドロネート投与によって、未分化筋細胞が選択的に障害を受けることが示唆された。



アレンドロネートによる未分化筋細胞の障害 骨折を伴う筋再生過程においてアレンドロネートを投与していない対照群 (A, B, C) で認められる未分化筋細胞 (緑色) が、ALN 処理群 (D, E, F) では、消失し、再生筋線維は形成されない。

(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

ビスフォスフォネートは、広く有効性が認められている骨粗鬆症治療薬である。アレンドロネートは、代表的なビスフォスフォネートのひとつであり、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。原田らによって、アレンドロネートを投与した骨粗鬆症患者の筋量が増加傾向を示すことが報告され、アレンドロネートが骨格筋に対して何らかの影響を与える可能性が考えられた。

アレンドロネートは、速やかに骨基質に取り込まれ、蓄積されるため、24時間以内に血中濃度は半減すると言われている。破骨細胞による骨吸収の際には、アレンドロネートが骨基質から溶出されるため、破骨細胞に取り込まれて、その機能を阻害するが、それ以外には、大きな影響を及ぼさないと考えられている。

骨格筋は、骨組織に近接しており、アレンドロネートを投与中の骨粗鬆症患者においては、アレンドロネートに暴露され、何らかの影響を受ける可能性がある。

昨年度までの研究の結果、アレンドロネート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、最終分化したヒト筋管細胞が、アレンドロネートに対して抵抗性を示すことが明らかになった。これらの結果から、(1) 正常な骨格筋組織がアレンドロネートに暴露されたとしても直接的に障害を受ける可能性は低い、と考えられるが、(2) 筋再生に対しては、阻害作用を及ぼすことが示唆された。

従来、アレンドロネートの *in vivo* における、骨格筋に対する影響については、ラットの筋機能に影響はないとする解析結果が報告されているのみだった。今回、私たちは、マウス骨折モデルと、凍結損傷による実験的筋再生を組み合わせることによって、アレンドロネートが、骨折を伴う筋再生に対して著しい阻害効果を示すことを明らかにした。我々の培養ヒト筋細胞を用いた *in vitro* の解析 (H25 年度) と、マウスモデルを用いた *in vivo* の解析 (H26 年度) は、これまでに報告されてきた、アレンドロネートが筋細胞に対して細胞毒性を示すか否かに関する、相反する報告に、最終的かつ合理的な解釈を与えるものである。

本研究の結果から、アレンドロネートが骨折を伴う筋再生を著しく阻害することが示された。骨折と筋再生とは、一見すると関係がないようにも思えるが、転倒などによる骨折事故の場合、骨折に伴って近接する骨格筋組織が損傷を受けることは、けっして珍しいことではないと考えられる。したがって、本研究によって明らかになった、アレンドロネー

トによる筋再生阻害は、臨床分野において考慮すべき重要な二つの知見 (仮説) を提示する。

- (1) 長期間アレンドロネートを投与された骨粗鬆症患者では、転倒骨折などの際に、筋再生が阻害される結果、骨折が治癒したあとも筋機能の低下によって運動機能が十分に回復しない可能性がある
- (2) アレンドロネートは、筋線維に対して影響をあたえる可能性は低いと考えられる。

本研究の結果は、アレンドロネートの治療効果が得られた骨粗鬆症患者においても、破骨細胞による骨リモデリングと筋損傷が同時に起こった場合には、筋機能低下による運動機能低下の危険性が生じることを強く示唆している。

E. 結論

我々は、サルコペニアに対する治療薬開発のための検定系として、不死化ヒト筋細胞を用いた *in vitro* 実験系が有用であることを示してきた。マウスモデルを用いた *in vivo* 解析と不死化ヒト筋細胞の *in vitro* 実験系を連動させることによって、アレンドロネートの未分化筋細胞に対する作用を明らかにし、臨床分野において重要な知見を得ることができた。

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
Zeng, W., et al.,
Genetic and epigenetic characteristics of FSHD-associated 4q and 10q D4Z4 that are distinct from non-4q/10q D4Z4 homologs
Hum Mutat, 35(8): 998-1010, 2014.

2. 学会発表

橋本有弘
ヒト骨疾患における骨格筋幹細胞 (筋サテライト細胞) の役割
第 32 回日本骨代謝学会
2014 年 7 月 26 日、大阪

川田茂雄、橋本有弘
骨粗鬆症治療薬 Alendronate がマウス骨格筋再生に及ぼす影響

第 69 回日本体力医学会、2014 年 9 月 19-21
日、長崎

川田茂雄、橋本有弘
骨粗鬆症治療薬 Alendronate は、筋再生を阻
害する
第 37 回日本分子生物学会
2014 年 11 月 26 日、横浜

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

分担研究者 江頭正人 東京大学 准教授

研究要旨

高齢女性を対象として、DXA検査から身体組成を評価し、関連因子を検討した。筋力低下は身体機能低下、総テストステロン値低下やFGF-23上昇と関連が認められた。高齢者医療において、身体組成を考慮にいれた診療が重要であることを示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

加齢に伴う身体組成変化で最も顕著な変化を起こすのは、骨格筋である。一般的に、加齢に伴い骨格筋量は徐々に減少し、20歳から80歳までに約20%が減少するといわれている。1989年Rosenbergらは、この加齢に伴って骨格筋量が減少し、かつ筋力が低下する現象をサルコペニアと名づけ、その後、多くの報告により高齢者の転倒や骨折、ひいては寝たきりなどのADLの障害を引き起こす大きな原因として知られるようになってきた。現在、サルコペニアは加齢に伴う様々な変化が、相互に複雑に関係しあっていると考えられているがその詳細はいまだに不明である。そこで、我々は骨格筋量および筋力を指標とし、それぞれについて低下群と非低下群の2群に分けて、身体計測値、身体組成分布、身体機能、血液バイオマーカー、高齢者総合機能評価（ADL評価、認知機能、うつ状態）との関連性を横断的に検討した。

B. 研究方法

2010年5月から2014年2月にかけて、東京大学医学部附属病院老年病科にもの忘れ精査目的に通院

・入院された65歳以上の高齢女性26例を対象とした。対象者に対し、疾患及び既往歴、内服薬、喫煙歴（喫煙者、既喫煙者、非喫煙者）、飲酒歴に関する問診を自己回答方式により行った。身体計測として、身長、体重、ウエスト周囲長の測定を行い、BMIを算出した。血圧は安静座位の状態で測定した。血液検査は早朝空腹状態で行った。上腕周囲長および上腕三頭筋皮下脂肪厚から上腕筋面積を計算した。全ての対象者に高齢者総合機能評価としてMMSE、HDS-R（改訂版長谷川式簡易知能評価スケール）、Barthel Index（ADL評価）、Lawton IADL（高次ADL評価）、GDS（Geriatric Depression Scale簡易版）を行った。血液検査は、一般検査以外にもインスリン、DHEA-S、エストラジオール（E2）、総テストステロン、1,25-(OH)₂ビタミンD、FGF（fibroblast growth factor）-23（ELISA法）、25-OHビタミンD（RIA2抗体法）を測定した。

DXA法により骨格筋量評価を行った。骨格筋量評価としては、体液による影響を比較的受けにくい四肢における除骨量、除脂肪量であるASM（kg）を求めた。さらにASMを身長（m）の2乗で除したskeletal muscle mass index（SMI）を算出した。骨密

度に関しては大腿骨頸部の骨密度 (g/cm^2) も測定した。低骨格筋量群はDXA法によるSMI $< 5.4 \text{ kg}/\text{m}^2$ 、低筋力群は握力が $< 18 \text{ kg}$ として対象を2群に分類し、比較検討をおこなった。データは平均値 \pm SDで表した。2群間における検討ではunpaired t検定を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医学部の倫理委員会の承認を得て、対象者から書面による本研究への参加同意を得て行われた。

C. 研究結果

DXA検査を行った23例中、SMI $5.4 \text{ kg}/\text{m}^2$ をカットオフとすると、7例 (30%) が低骨格筋量群、握力 18 kg 未満をカットオフとすると26例中16例 (62%) が低筋力群、に該当した。低骨格筋量群では、非低下群と比べて、年齢、体幹脂肪量、大腿骨頸部骨密度に差はなく、BMIのみ有意差が認められた (低骨格筋量群 : $19.9 \pm 1.6 \text{ kg}/\text{m}^2$, 非低下群 : $24.2 \pm 4.9 \text{ kg}/\text{m}^2$, $p = 0.034$)。身体計測値では低骨格筋量群のものは上腕周囲長、大腿周囲長、下腿周囲長が低値であったが、下腿周囲長のみ有意差が認められた (低骨格筋量群 : $29.5 \pm 1.7 \text{ cm}$, 非低下群 : $32.2 \pm 2.3 \text{ cm}$, $p = 0.011$)。両群間での血液バイオマーカー、MetSリスク数、身体機能検査、高齢者総合機能評価に関する指標には差がなかった。

筋力低下群では、非低下群と比べて、年齢が高く、BMI、四肢骨格筋量、大腿骨頸部骨密度、四肢の身体計測値が低かったが、これらに有意差はなかった。血液バイオマーカーでは、筋力低下群は

血清Alb (筋力低下群 : $3.65 \pm 0.31 \text{ g}/\text{dL}$, 非低下群 : $4.01 \pm 0.37 \text{ g}/\text{dL}$, $p = 0.012$) および総テストステロン (筋力低下群 : $0.18 \pm 0.10 \text{ ng}/\text{mL}$, 非低下群 : $0.35 \pm 0.20 \text{ ng}/\text{mL}$, $p = 0.016$) が有意に低値であり、FGF-23 (筋力低下群 : $51.1 \pm 23.0 \text{ pg}/\text{mL}$, 非低下群 : $27.2 \pm 9.8 \text{ pg}/\text{mL}$, $p = 0.035$) が有意に高値であった。身体機能検査では、筋力低下群では下肢筋力が低く、4 m歩行速度、椅子立ち上がり時間、timed get up-and-go testが遅かったが、timed get up-and-go test (筋力低下群 : 14.4 ± 2.7 秒, 非低下群 : 10.2 ± 1.8 秒, $p = 0.028$) のみ有意差が認められた。

D. 考察

高齢女性における骨格筋低下および筋力低下の意義を調査し、骨格筋量低下は筋力低下や身体機能、加齢関連血液バイオマーカー、転倒イベントとの間に関連がなかったが、筋力低下では身体機能の低下や加齢関連の血液バイオマーカーとの間に関連があることが示唆された。本研究では、骨格筋量低下と筋力低下による集団分布において偏りは認められず、骨格筋量低下の有無による2群間で握力に差がなかった。このことは、筋力が筋量だけに依存しているわけではなく、速筋や遅筋などの筋線維組成、筋組織自体の神経原性変化が関与しているためと推測される。加齢に伴って、筋量も低下するが、前述のそれ以外の要素も大きく低下することが知られており、高齢者では骨格筋量の低下速度よりも、筋力や身体機能の低下速度の方がより速くなり、そのため筋力と骨格筋量との関連が弱くなるとも考えられる。そして、骨格

筋量低下と筋力低下を比較すると、筋力低下の方がより、ADLの低下や死亡リスクなどとの関連が深いことが知られている。今回の研究でも、筋力低下群は身体機能の有意な低下が認められたが、骨格筋量の低下は身体機能とは関連がなかった。血液バイオマーカーとの関連では、FGF-23の高値が、低筋力と関連が認められた。FGF23は、主に骨細胞から産生され、Klotho-FGF受容体複合体に結合することにより、リンと1,25-(OH)₂ビタミンD濃度を低下させるなどの作用を有するホルモンである。いくつかの疫学研究により、FGF-23の高値が死亡率や心血管疾患、CKD (Chronic Kidney Disease) の進行や骨折など、特にCKD患者において多くの有害事象と関係することが報告されている。FGF-23がなぜこのようなアウトカムに関連しているか、に関しては、未だ不明な点も多いが、ビタミンD濃度の低下や腎機能障害は筋力低下に関連している可能性があるため、加齢による腎機能障害がFGF-23の高値を導き、その作用の一つでもある活性型ビタミンD濃度の低下や腎機能障害に関連する栄養障害などが関与している可能性も考えられる。本研究では、1,25-(OH)₂ビタミンDが、有意ではなかったが、低筋力群において低下していた。このような現象はサルコペニアの一部を説明できる可能性もあり、今後、さらなる大規模な前向き調査での確認とメカニズムの解明が必要であると考えられる。

E. 結論

高齢女性を対象とし、身体組成を評価し、関連因子を検討した。筋力低下は身体機能低下、総テストステロン値低下やFGF-23上昇と関連が認めら

れた。高齢者医療において、身体組成を考慮にいられた診療が重要であることを示唆するものと考えられる。

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

・江頭正人. 薬物ガイドラインにおける高齢者の扱いについて *Geriatric Medicine* 52(8): 893-895, 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

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 老年病態研究チーム 研究部長

研究要旨

サルコペニアによる運動機能の低下-寝たきり-認知症の悪循環は、高齢者の要介護増加に繋がっていくことから、超高齢社会に突入しつつある現在の日本にとって社会的要請の強い重要な課題である。従って、そのメカニズムの解明は、科学的根拠に基づいた早期予防、リハビリの有効性および効果判定、新たな治療法の開発基盤のために必須である。我々は、筋と運動神経の相互作用に着目し、筋量や筋力とは次元の異なる定量可能なサルコペニアのパラメーターの発見と、それを利用したサルコペニアの新たな診断・予防・治療法の開発を目的としてきた。筋と運動神経は神経筋シナプスを介した双方向的なシグナリングを行い、お互いの形態・機能を維持するシステムを有している。しかし、この筋と運動神経の相互作用に異常を来す傷害が運動機能システムのいずれかの場所で発生すると筋萎縮・筋力低下が誘導される。サルコペニアの成因においても同様の機序が関与していると考えられるため、現在、シナプスの維持機構に基づいたサルコペニア診断のバイオマーカーを開発中である。臨床におけるバイオマーカーの有用性を見極めるためには、その科学的根拠となるシナプスの維持機構を詳細に解明する必要がある。本研究では、神経筋シナプスの形成に必須の分子である Lrp4 (LDL receptor-related protein 4) に着目し、抗 Lrp4 抗体で発症する重症筋無力症の動物モデルを作成して神経筋シナプスの維持機構における役割を検討したので報告する。

A. 研究目的

1. 筋と運動神経の相互維持メカニズム解明

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

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

MuSK の活性化による AChR の凝集は、運動神経終末から分泌される agrin によって誘導される。Agrin は MuSK とは直接結合せず、MuSK とともにシナプス後膜に発現する Lrp4 との結合を介して MuSK を活性化する⁵⁾。成体の神経筋シナプスの維持機構における MuSK の重要性を考慮すると、MuSK の活性化に関与する Lrp4 も同様に重要な役割を果たしていると推測される。しかし、MuSK と同様に Lrp4 の遺伝子欠損マウスも新生児で死亡するため、成体の神経筋シナプスにおける役割は不明な部分が多い。本研究では、抗 Lrp4 抗体で発症する重症筋無力症の動物モデルを作成し、神経筋シナプスの維持機構における Lrp4 の役割を検討した

B. 研究方法

1. リコンビナントタンパクの作製と免疫

購入した cDNA クローンから C 末端に His-tag を付加した Lrp4 cDNA 配列を PCR でクローニングし、発現ベクターに挿入して Expi293F 細胞にトランスフェクションした。数日後に細胞の培養メディウムを回収し、Ni-sepharose を用いてリコンビナント Lrp4 タンパクを精製した。精製したリコンビナントタンパクを抗原とし、補体欠損マウス一匹あたり 10 mg をアジュバントでエマルジョン化して 2~3 週間毎に免疫注射した。対照群には PBS をアジュバントでエマルジョン化して同様に注射した。動物実験計画は実験施設 (東京都健康長寿医療センター研究所) で承認された方法に従って行った。

2. 筋力測定

小原医科産業株式会社の器機を用いて wire

hanging test を行った。マウスを器機中央の金網にしがみつかせ、金網を反転させる。マウスが金網から落下するまでの時間を計測した。

3. 筋電図

麻酔状態のマウスの坐骨神経に 3~40 Hz の頻度で最大上刺激を連続 10 回行い、腓腹筋の複合筋活動電位 (CMAP) を測定した。第 1 刺激で発生した CMAP を基準とし、2~10 回目の刺激による CMAP 振幅の減衰率を求めた。

4. 神経筋シナプスの形態解析

マウスのヒラメ筋を固定して細分化し、Alexa647 標識 α -bungarotoxin で AChR 凝集を染色した。染色後に筋を洗浄し、メタノールで透過処理を行った後に 1% BSA/0.3% TritonX-100/PBS でブロッキング処理を行った。その後、1 次抗体反応を 4 °C、overnight で行い、切片を洗浄した後に 2 次抗体反応を 4 °C、overnight で行った。また、固定したヒラメ筋を 20%スクロース/PBS で処理した後に OCT compound に凍結包埋し、クリオスタットで 20 μ m の縦断切片を作製した。乾燥した切片を 2% BSA/2%正常ヤギ血清/0.1% TritonX-100/PBS でブロッキング処理後、1 次抗体反応を 4 °C、overnight で行い、2 次抗体を室温で 90 分間行った。運動神経軸索は抗 neurofilament 抗体、神経終末は抗 synaptophysin 抗体、active zone (神経伝達物質の放出部位) は抗 bassoon 抗体を用いて染色した。2 次抗体反応後に洗浄した筋または切片を退色防止剤で封入し、共焦点顕微鏡で観察した。撮影した神経筋シナプス画像は ImageJ を用いて解析した。

5. 抗 Lrp4 抗体を検出

抗原として用いたリコンビナント Lrp4 タンパクを ELISA プレートにコーティングし、ブロッキング処理後に Lrp4 免疫マウスの血清 (1000 倍希釈) と反応させた。HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて抗原に結合した抗 Lrp4 IgG 量を測定した。また、Plat-E 細胞に Lrp4 と mCherry の融合タンパクを発現させ、透過処理を行わずに Lrp4 免疫マウスの血清 (50 倍希釈) と反応させた。Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いて細胞表面の Lrp4 と結合した抗 Lrp4 IgG を観察した。

6. In vitro での AChR 凝集実験

C2C12 筋芽細胞を播種し、コンフルエント後に培養メディウムを 2.5% horse serum/DMEM に交換して筋管細胞の形成を誘導した。分化誘導 3 日後、リコンビナント agrin (1 nM) による刺激を行う 30 分前に Lrp4 免疫マウスの血清 (50 倍希釈) を培養系に添加し、AChR の凝集形成に及ぼす影響を検討した。Agrin 刺激 15 時間後に Alexa488 標識 α -bungarotoxin を添加して AChR 凝集を染色し、固定後に蛍光顕微鏡下で

観察した。また、agrin 刺激 13 時間後にマウス血清 (50 倍希釈) を添加し、すでに形成された AChR 凝集に及ぼす影響を検討した。

7. 免疫沈降実験

分化誘導 3 日後、agrin 刺激 (1 nM) 刺激を行う 30 分前に Lrp4 免疫マウスの血清 (50 倍希釈) を培養系に添加した。Agrin 刺激 2 時間後に細胞のライセートを回収し、抗 MuSK 抗体を用いた免疫沈降を行った。MuSK のリン酸化は、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。

C. 研究結果

1. Lrp4 の機能抑制は筋力と体重を低下させる

本研究の動物モデルでは、マウスの体内で産生された抗 Lrp4 抗体が神経筋シナプスに発現する Lrp4 に結合し、その機能を抑制することを想定している。Lrp4 タンパクを 2 回または 3 回免疫されたマウスは最終的に姿勢保持や歩行動作が困難となった (図 1A)。同時に、対照群のマウスと比較して体重の急激な減少 (図 1B, C) と筋力の顕著な低下 (図 1D) が認められた。以上の結果から、抗 Lrp4 抗体による Lrp4

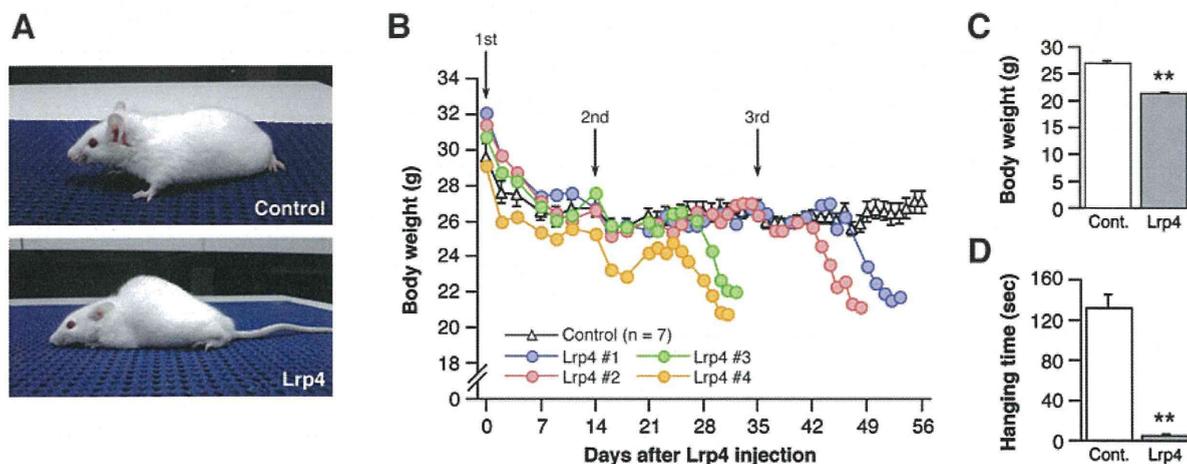


図 1

の機能抑制によって筋力低下が引き起こされていると考えられた。

2. Lrp4 の機能抑制は神経筋シナプスの刺激伝達能を障害する

Lrp4 免疫マウスでは、3 Hz の反復神経刺激での第2刺激後の CMAP から振幅の急激な低下が認められた。第1刺激後の振幅と最小の振幅を比較すると、異常と見なされる 10%以上の減衰を示し、筋が易疲労状態にあることが示された (図 2A, B)。一方、対照群のマウスでは活動電位の振幅低下は認められなかった。また、Lrp4 免疫マウスでは刺激周波数に依存した CMAP 振幅の減衰率の増加が認められた (図 2C)。従って、Lrp4 免疫マウスの筋力低下は、神経筋シナプスの刺激伝達が抑制されたことに起因していると考えられた。

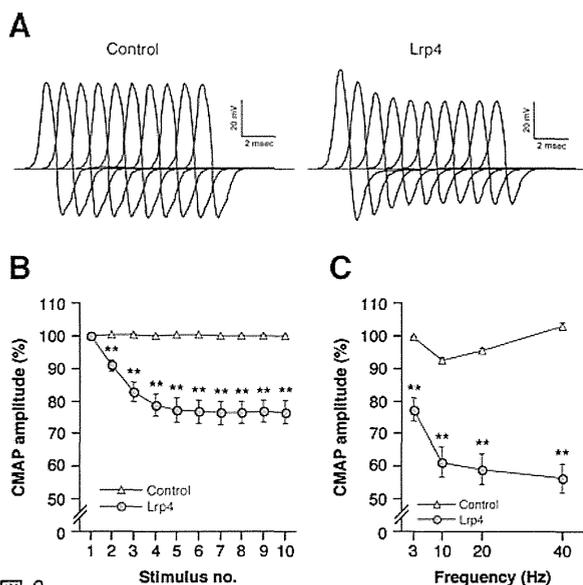


図 2

3. Lrp4 は神経筋シナプスの形態維持に必要である

Lrp4 免疫マウスでは、シナプス後膜に存在す

る AChR 凝集の染色強度が顕著に低下しており、AChR の発現が減少していると考えられた (図 3A, B)。また、AChR 凝集と運動神経終末の染色面積の減少が認められ、神経筋シナプス全体の構造が縮小していることが明らかとなった (図 3A, C, D)。加えて、抗 bassoon 抗体による染色面積の減少が認められたことから、運動神経終末の縮小に対応した active zone の減少が明らかとなった (図 3E, F)。従って、Lrp4 免疫マウスの神経筋伝達能の低下には、AChR の減少によるシナプス後膜の感受性低下と神経終末からの神経伝達物質 (ACh) の放出量減少が関与していると考えられた。

4. 抗 Lrp4 抗体は agrin による AChR の凝集形成を抑制する

Lrp4 免疫マウスは血清中の抗 Lrp4 抗体が顕著に上昇し、Lrp4-mCherry を細胞膜表面に発現させた Plat-E 細胞に特異的に結合した。C2C12 筋管細胞の培養系に agrin を添加すると、agrin と結合した Lrp4 が MuSK のチロシンキナーゼ活性 (自己のチロシン残基をリン酸化する) を活性化し、筋管細胞の表面上に AChR の凝集を誘導する。Agrin 刺激前に抗 Lrp4 血清を培養系に添加すると、MuSK のリン酸化が抑制され、対照群のマウス血清と比較して AChR 凝集の減少が認められたことから、抗 Lrp4 抗体は MuSK の活性化を抑制することで AChR の凝集形成を抑制することが示された (図 4A, B)。また、agrin 刺激によって AChR 凝集を誘導した後に抗 Lrp4 血清を添加しても凝集の減少が認められたことから、抗 Lrp4 抗体は AChR 凝集の維持も抑制することが *in vitro* で示された (図 4C)。

D. 考察

本研究では、Lrp4 は成体の神経筋シナプスの構造維持において必須の分子であり、Lrp4 の機能抑制が神経筋シナプスの変性を介して筋力低下を引き起こすことが示された。重症筋無力症とサルコペニアでは発症の引き金が異なっているが、最終的に現れる筋萎縮・筋力低下といった症状は、神経筋シナプスの維持機構が破綻することによって生じるという基本的なメカニズムが共通している可能性が高い。現在までのところ、Lrp4 とサルコペニアの直接的な関連を示した研究は報告されていない。しかし最近になって、間接的ながらもその関連を示唆する研究が報告されてきた。神経型セリンプロテ

アーゼの neurotrypsin は、Lrp4 と結合する agrin の分解を促進する遺伝子改変マウスでは、若齢時から AChR 凝集の断片化といった神経筋シナプスの形態変化とともに、サルコペニア様の筋症状 (筋線維数の減少、中心核の出現、遅筋線維の比率増加など) が現れると報告されている⁶⁾。これは神経筋シナプスの維持機構の破綻がサルコペニアの発症に関与していることを支持するものであり、agrin の分解促進による Lrp4-MuSK シグナル経路の活性低下が発症に寄与していることを示唆している。しかしながら、agrin の分解を抑制した遺伝子改変マウスにおいても、実際の老化によって生じるサルコペニアの症状を抑制することはできなかつたと報告されており⁶⁾、サルコペニアの発症が agrin

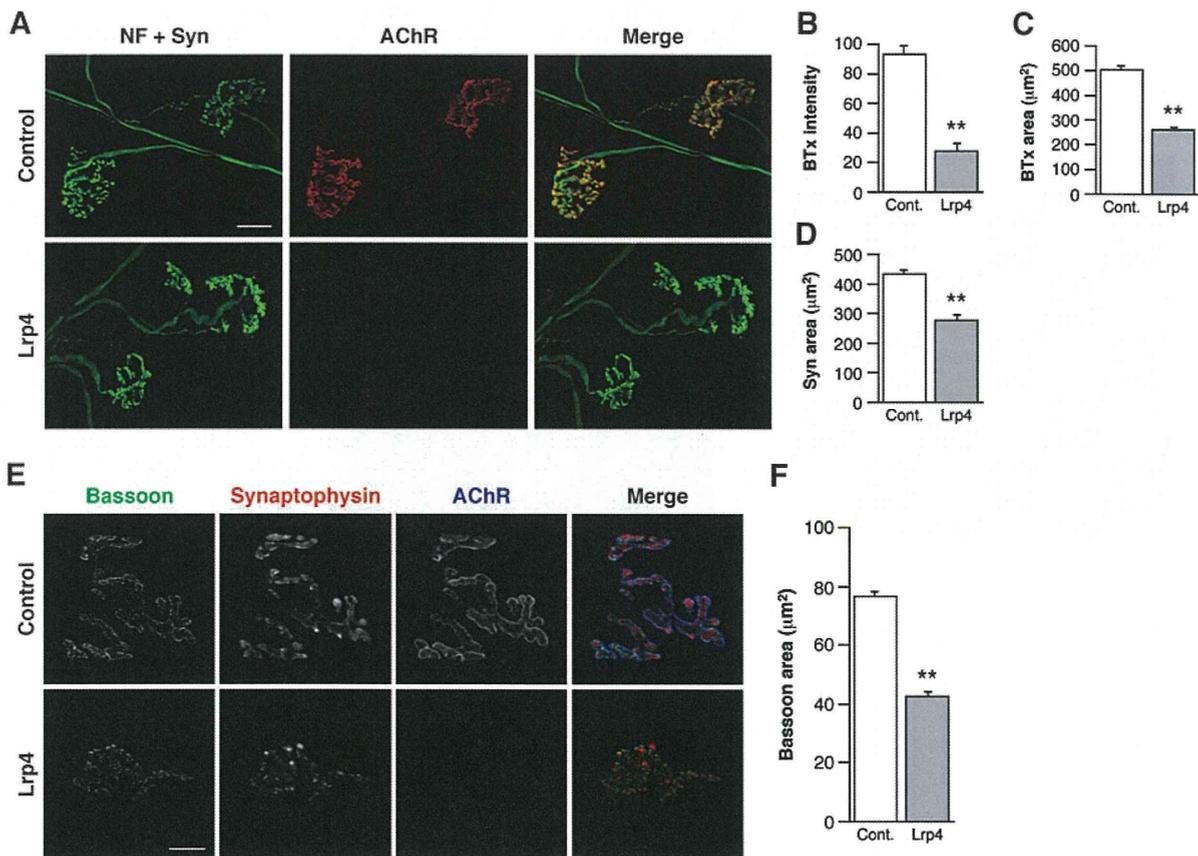


図 3

の分解のみに依存しておらず、複数の要因に起因することを示唆している。近年、胎生期において Lrp4 は運動神経に直接的に作用し、シナプス小胞の集積や active zone の形成など機能的な前シナプスの分化を誘導する逆行性シグナル分子としての役割も明らかとなった⁷⁾。成体期において Lrp4 が前シナプスに及ぼす影響は依然として不明な部分が多い。本研究モデルは補体欠損マウスを用いているため、抗原抗体複合体の形成によって活性化される補体系がシナプス構造を非特異的に破壊する可能性を排除している。従って、本研究モデルは神経筋シナプスの維持機構における Lrp4 の役割を解明する上で有用になると考えられる。

E. 結論

抗 Lrp4 抗体による重症筋無力症の動物モデルの作成により、Lrp4 は成体の神経筋シナプスの構造維持において必須の分子であり、Lrp4 の機能抑制が神経筋シナプスの変性を介して筋力低下を引き起こすことが示された。神経筋シナプスの維持機構を抑制する本研究の動物モデルは、サルコペニアによる筋萎縮・筋力低下のメカニズムを解明する上で有用になると考えられる。

文献

- 1) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N,

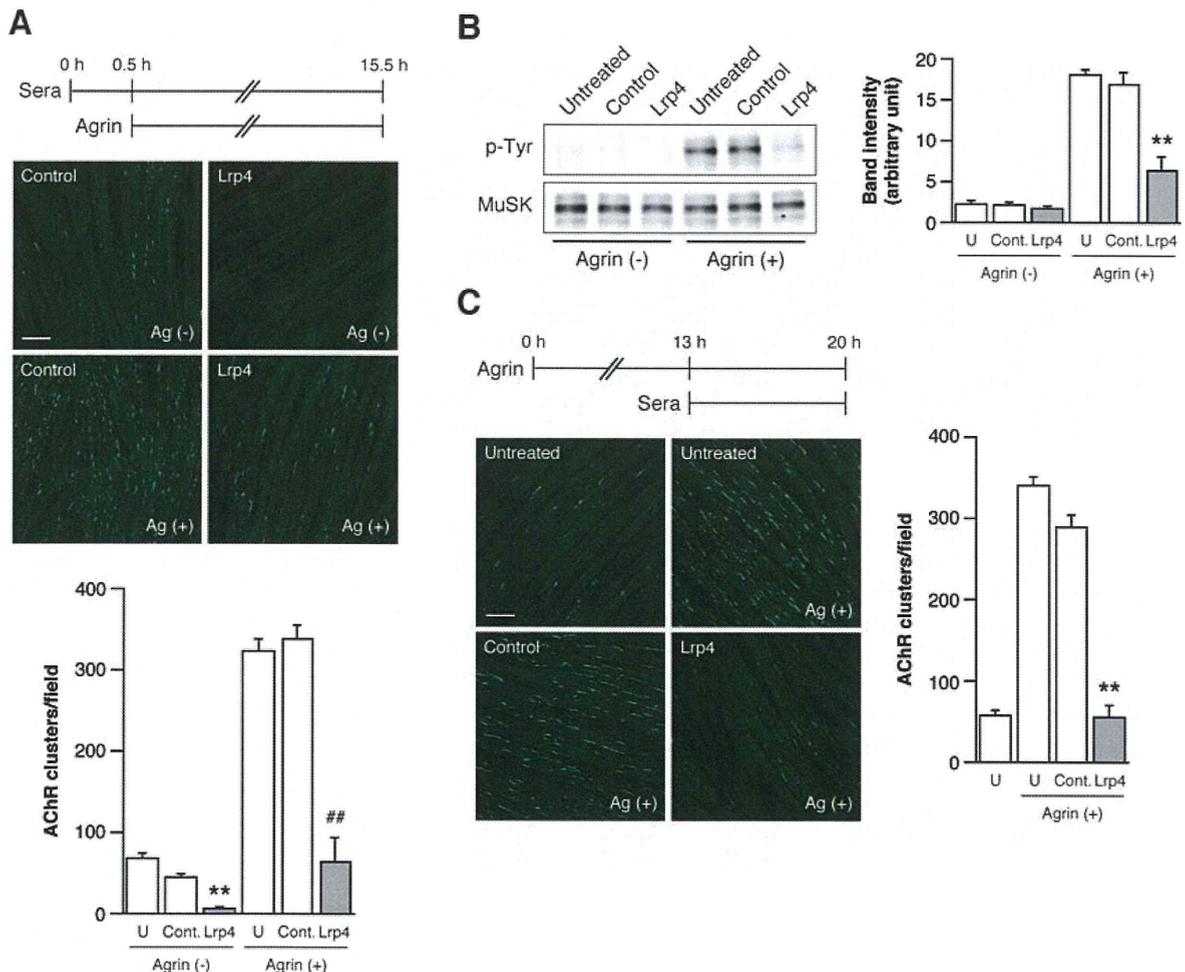


図 4

- Shigemoto K. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 180: 798-810, 2012.
- 2) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 245: 75-8, 2012.
- 3) Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD Jr, Gage FH, Lichtman JW, Sanes JR. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14863-8, 2010.
- 4) 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* 437: 388-95, 2000.
- 5) 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* 135: 334-342, 2008.
- 6) Bütikofer L, Zurlinden A, Bolliger MF, Kunz B, Sonderegger P. Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J* 25: 4378-439, 2011.
- 7) Yumoto N, Kim N, Burden SJ. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapse. *Nature* 489: 438-442, 2012.
- 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, Koshi K, Shigemoto K. The important role of the neuromuscular junction in maintaining muscle mass and strength. *J.Phys.Fitness.Sports.Med.* 3(1): 111-114, 2014.
- 2) 森 秀一、高嶋留美、小西哲郎、重本和宏. 動物モデルによる重症筋無力症の病態機序の解明. *神経内科* 80(4): 475-483, 2014.
- 3) 重本和宏、森 秀一. サルコペニア発症における神経系の関与. *医学のあゆみ* 248(9): 691-695, 2014.
- 4) 重本和宏. 筋萎縮 (サルコペニア) における代謝変換のメカニズムの役割. *実験医学* 32(9): 1366-1371, 2014.
- 5) 重本和宏. 筋肉 (サルコペニア)、「老化の生物学」、石井直明・丸山直記編. 化学同人、34-49, 2014.
- 6) 重本和宏、森 秀一、高嶋留美、本橋紀夫. サルコペニアに関する筋肉基礎科学. *整形・災害外科* 58: 145-153, 2015.
- 7) 重本和宏、森 秀一、本橋紀夫. サルコペニアと神経筋シナプス. *最新医学* 70(1): 69-73, 2015.
2. 学会発表
- 1) 重本和宏. サルコペニアの基礎と臨床. 第69回日本体力医学会大会. 長崎.

2014. 9. 19-21.

- 2) 重本和宏. サルコペニアと代謝制御の臨床. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 4 月 25 日. 福岡. 2014. 4. 24-26.
- 3) 村瀬尚哉、森 秀一、越 勝男、重本和宏、樋上賀一. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症に対するラパマイシンの治療効果の検討. 日本薬学会第 134 年会. 熊本. 2014.3.27-30.
- 4) 森 秀一、越 勝男、村瀬尚哉、重本和宏. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症に関与する分子機序の解明. 抗 LRP4 抗体による重症筋無力症の動物モデル作成と病態機序の解明. 第 55 回日本神経学会学術大会. 福岡. 2014.5.20-24.
- 5) 福永大地、久保幸穂、森 秀一、樋上賀一、重本和宏. Fiber specific studies in muscle atrophy with aging mice. 第 37 回日本基礎老化学会. 愛知. 2014. 6. 26-27.
- 6) 森 秀一、重本和宏. LRP4 は神経筋シナプスの維持に重要である. 第 69 回日本体力医学会大会. 長崎. 2014. 9. 19-21.
- 7) 重本和宏、森 秀一、福永大地. Fiber specific studies in muscle atrophy with aging mice、第 1 回サルコペニア・フレイル研究会. 東京. 2014. 10. 19.
- 8) Mori S, Takashima R, Shigemoto K. Generation of experimental model of myasthenia gravis with antibodies against LRP4. Society for Neuroscience 2014, 2014/11/15 Washington, D.C.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 1. (特許申請) 加齢または筋萎縮の診断用バイオマーカー、発明者(東京都健康長寿医療センター研究所: 重本和宏)、出願番号: 特願 2014-077086、出願日 2014 年 4 月 3 日
 2. (特許申請) 筋幹細胞又は筋芽細胞、及びそれを用いた代謝変換に関与する物質のスクリーニング方法、並びに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、発明者(東京都健康長寿医療センター研究所: 重本和宏)、出願番号: PCT/JP2014/078366、出願日 2014 年 10 月 24 日
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

地域在住後期高齢者におけるsarcopenic obesityの早期予防のための包括的介入プログラムの効果検証
—介入参加者と不参加者の特性比較—

研究分担者 金 憲経 東京都健康長寿医療センター 研究所研究副部長
鈴木隆雄 国立長寿医療研究センター 研究所長

研究要旨

70歳以上の都市部在住高齢女性1,213人に、体脂肪率32%以上+SMI5.67 kg/m²未満、体脂肪率32%以上+握力17.0 kg 未満、体脂肪率32%以上+歩行速度1.0 m/s 未満のいずれかに該当した場合をS0と定義し、該当者307人(25.3%)を選定した。S0高齢者307人中、S0改善を目的とした3ヶ月間のRCT介入参加者は144人、介入不参加者は163人であった。介入参加者と不参加者を比較したところ、介入不参加者は参加者に比べて、下肢筋力のみならず（膝伸展力）上肢筋力（握力）の衰え、歩行速度（通常・最大）の低下、さらには定期的な運動習慣を持っていない者の割合が高いとの特徴が観察された。この結果より、S0高齢者の中で、介入不参加者はより深刻な健康問題を抱えている可能性が強く示唆され、介入不参加S0高齢者に対する防策確立が今後の課題と言える。

A. 研究目的

地域在住高齢者におけるsarcopenic obesity（以下S0）高齢者を対象に実施したRCT介入研究への参加者と不参加者の特性を調べる。

B. 研究方法

都市部在住高齢者1,213人を対象に（H24年575人、H25年638人）包括的検診を実施し、身長、体重、血圧、聞き取り調査（健康度自己評価、過去1年間の転倒、転倒恐怖感、骨折歴、外出頻度、生活機能、運動習慣、社会活動、尿漏れ、痛み、既往歴等々）、体力（筋力、歩行機能）、身体組成（DXA法による体脂肪率、筋肉量、骨密度）、血液成分（アルブミン、コレステロール、クレアチニン、HbA1c、ヘモグロビン等々）のデータを収集した。

DXA法による体脂肪率32%以上+SMI5.46 kg/m²未満、体脂肪率32%以上+握力17.0 kg 未満、体脂肪率32%以上+歩行速度1.0 m/s 未満のS0選定基準を適応し、該当者307(25.3%)人を選定した。

S0改善プログラムの効果を検証するために、平成26年7月31日説明会を開催し、自筆同意が得られた144人が介入参加者、残り163人は介入不参加者である。介入参加者144人をRCTにより4群に分け、運動+栄養群36人、運動単独群36人、栄養単独群36人、健康教育群36人配置し、12週間の介入（8月27日～11月27日）を行った。運動介入は、研究所の監視下で週2回、一回60分の筋力強化運動と有酸素運動を、栄養介入は、研究所の指導下でアミノ酸、茶カテキン補充を12週間実施した。

（倫理面への配慮）

健診参加者には個別的に調査目的、調査内容、

個人情報管理の管理、調査結果の活用、結果のフィードバックなどについて詳細に説明し、調査参加有無を自ら選択するように説明すると共に自筆の承諾書を得た上で実施した。本研究のプロトコルは東京都健康長寿医療センター倫理委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

S0認定者は307人（25.3%）中、介入参加者は144人、不参加者は163人であった。介入参加者と不参加者を比較したところ、不参加者は年齢が高く（参加者79.22±4.24歳、不参加者80.74±4.61歳、 $p=0.003$ ）、上肢筋力（握力：参加者20.01±4.91kg、不参加者18.65±4.58kg、 $p=0.013$ ）及び下肢筋力（膝伸展力：参加者195.78±55.13N、不参加者180.35±54.11N、 $p=0.014$ ）は弱く、通常歩行速度（参加者1.15±0.25m/s、不参加者1.05±0.26m/s、 $p=0.001$ ）及び最大歩行速度（参加者1.64±0.34m/s、不参加者1.49±0.36m/s、 $p<0.001$ ）は遅かった。しかし、BMI、体脂肪率、血圧、筋肉量などでは両群間で有意な差は観察されなかった。

血液成分の比較では、介入不参加者のクレアチンは低い値を示した（参加者0.692±0.28mg/dL、不参加者0.655±0.32mg/dL、 $p=0.006$ ）が、総コレステロール、HDLコレステロール、HbA1c、アルブミン、クレアチニング、中性脂肪などでは有意差は見られなかった。

一方、介入不参加者は定期的な運動習慣を持っている者の割合は低かった（参加者28.2%、不参加者39.6%、 $\chi^2=4.428$ 、 $p=0.035$ ）。しかし、60歳以降の骨折歴、過去1年間の転倒有無、尿漏れ有無、介護予防申請有無、腰痛、膝痛などでは両群