

## The important role of the neuromuscular junction in maintaining muscle mass and strength

Shuuichi Mori\*, Katsuo Koshi and Kazuhiro Shigemoto

Department of Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

Received: December 11, 2013 / Accepted: December 19, 2013

**Abstract** Sarcopenia is an age-related decline of skeletal muscle mass and function, leading to reduced physical ability and difficulties in carrying out day-to-day tasks; it has become a major health concern in our aging society. The exact etiology of sarcopenia is not completely understood, but recent studies have focused on age-associated changes in the neuromuscular junction (NMJ). Using an animal model of myasthenia gravis with antibodies against muscle-specific kinase (MuSK), a disorder of the NMJ characterized by muscle weakness, we investigated the role of the NMJ in the pathogenesis of sarcopenia. Our studies indicate that the structure and function of the NMJ is important for maintaining muscle mass and strength, which suggests that the malfunction of the NMJ plays a role, at least in part, in the onset of sarcopenia. These findings suggest that the NMJ will become an important therapeutic target for sarcopenia in the future.

**Keywords** : neuromuscular junction, sarcopenia, myasthenia gravis, muscle-specific kinase (MuSK)

### Introduction

Aging gradually causes a decrease in physical ability and the ease of carrying out daily tasks; quality of life is also usually impaired. The fundamental cause of these problems is an age-associated decline in skeletal muscle mass and function, a condition known as sarcopenia<sup>1,2</sup>. With our increasingly aging society, prevention and treatment of sarcopenia is essential in order to reduce the risk of morbidity and mortality in the elderly, as well as alleviate the financial burden on family members. Research has focused on improving our understanding of the etiology of sarcopenia, which should lead to new methods being devised for preventing and treating this disability. The etiology of sarcopenia is thought to be a multi-factorial process that involves both intrinsic and extrinsic factors. Various physical mechanisms have been postulated to contribute to sarcopenia, including decreased capacity of motoneurons to innervate muscle fibers; a decline in satellite cell activation and proliferation; oxidative damage; and hormone deficiencies associated with aging. In this review, we present recent data on proposed mechanisms that contribute to the onset of sarcopenia, focusing on the role of the neuromuscular junction (NMJ).

### Structure of the NMJ

The NMJ is a joint between motoneurons and skeletal muscle, and is composed of three regions: the presyn-

aptic part (the motor nerve terminal), the synaptic cleft, and the postsynaptic part (the muscle membrane; Fig. 1). The myelin sheath surrounding presynaptic motor axons, extended from motoneurons in the anterior horn of the spinal cord, ends in proximity to the muscle fibers; the axons then terminate in a shallow depression of the muscle membrane. The motor nerve terminals contain a large number of synaptic vesicles, each of which stores approximately 5,000 to 10,000 molecules of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). When an action potential arrives at the terminal, an increase in the local concentration of free  $Ca^{2+}$  (through voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels) facilitates the

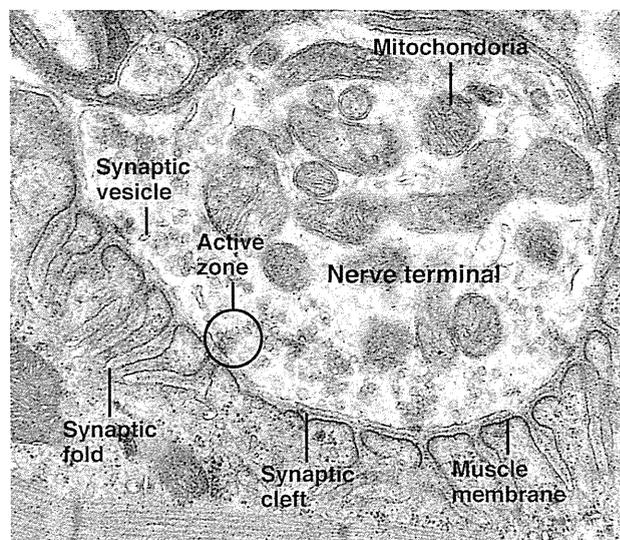


Fig. 1 Electron micrograph of a mouse neuromuscular junction.

\*Correspondence: shuuichi@tmig.or.jp

fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane, at a site called the 'active zone'. ACh is then released from overlying active zones in the nerve terminals and binds to ACh receptors (AChRs) in the muscle membrane. This causes ligand-gated ion channels to open and depolarizes the muscle membrane, which generates an action potential that stimulates muscle contraction. In particular, the postsynaptic membrane has a large number of deep invaginations, termed synaptic folds, which increase the surface area of the membrane exposed to the nerve terminal. Moreover, AChRs are highly concentrated at the crests of postjunctional folds ( $>10,000$  receptors per  $\mu\text{m}^2$ ), compared to the troughs of those folds and in extrasynaptic regions, where the density of receptors is  $<10$  sites per  $\mu\text{m}^2$ <sup>3,4</sup>). As described above, the NMJ is a specialized structure with a number of properties that ensure effective neuromuscular transmission.

### Age-associated changes of the NMJ

Morphological changes of the skeletal muscle found in patients with sarcopenia, include a reduced number of muscle fibers, greater heterogeneity of fiber thickness, the presence of angular fibers, an increased number of centralized myonuclei, fiber-type grouping, and a preponderance of type I fibers<sup>5</sup>). Several lines of evidence from both animal and human studies have suggested that these changes mainly result from degeneration of motoneurons and denervation of skeletal muscle fibers<sup>2,6,7</sup>). A preferential denervation of type II fibers and reinnervation by axonal sprouting from motoneurons innervating type I fibers, leads to remodeling of the motor units, which results in fiber-type grouping and preponderance of type I fibers. However, in the condition in which the denervation outpaces the reinnervation, muscle fibers, which are not reinnervated, degenerate and disappear. This atrophy of the muscle fibers ultimately leads to the loss of skeletal muscle mass, which contributes to the decline in muscle strength seen in sarcopenia. Interestingly, it has been suggested that age-associated changes in the structure of the NMJ precede the denervation of muscle fibers<sup>6,8</sup>). Anatomical studies in laboratory animals have shown that, in aged muscles, some presynaptic nerves exhibit terminal sprouts, and that postsynaptic AChR clusters are often fragmented into lots of small islands instead of a typical pretzel-like structure; however, these structures are rarely observed at NMJs in young adult muscles<sup>6-10</sup>). In addition, electron microscopic study has shown that labyrinthine synaptic gutters observed at young adult NMJs become simplified into a number of cup-like depressions at aged NMJs<sup>11</sup>). On the presynaptic side, it has been shown that the number of active zones and the expression level of Bassoon, a scaffold protein essential for assembly of the active zone, was significantly reduced at the nerve terminals of NMJs in aged mice<sup>12,13</sup>). The living body is intrinsically equipped with homeostatic mechanisms; however,

these changes suggest that aging impairs the capability of the NMJ to maintain its structural integrity. As described above, the complicated structure of the NMJ is essential for effective neuromuscular transmission, and it is thought that the age-associated distortion of the NMJ could reduce the efficiency of neuromuscular transmission, and hence contribute to the impairment of muscle contraction. It has been reported that the 'safety factor', a measure of the ability of neuromuscular transmission to remain effective under various physiological conditions, declines at NMJs of the diaphragm in aged rats<sup>14</sup>). Taken together, it is possible that failure of the mechanism needed to maintain the NMJ, plays a role in the onset of sarcopenia.

### Role of MuSK in maintaining the structure and function of the NMJ

MuSK (muscle-specific kinase) is a receptor-tyrosine kinase which is concentrated at the peaks of synaptic folds at the NMJ alongside AChRs. MuSK is activated by agrin, a nerve-derived heparan sulfate proteoglycan, through the LDL receptor-related protein 4 (LRP4). In addition to agrin, MuSK activation also requires interaction with Dok-7, a cytoplasmic adaptor protein. The dual activation of MuSK results in the interaction of several downstream molecules, leading to clustering of AChRs<sup>15</sup>). MuSK-deficient mice display devastating defects in both pre- and post- synaptic differentiation and die at birth because they cannot breathe. In these mice, motor nerves grow excessively and fail to form terminal arbors, and no AChR clusters are present on myofibers opposite ingrowing nerve terminals. These data show that MuSK is essential for the formation of NMJs at the embryonic stage<sup>16</sup>).

Autoantibodies against MuSK have been found in a proportion of patients with myasthenia gravis (MG), a disorder of the NMJ characterized by ptosis, fatigue and muscle weakness<sup>17</sup>). MG is an autoimmune disease caused by an immunological response against specific proteins on postsynaptic membranes; experimental autoimmune MG (EAMG) is an animal model used to investigate the pathogenic mechanisms of MG by replicating the symptoms of human disease. We previously developed a model of EAMG caused by anti-MuSK antibodies (MuSK-EAMG) by injecting rabbits and complement-deficient mice with recombinant soluble MuSK protein<sup>18-20</sup>). EAMG using complement-deficient mice eliminated the possible effect of immune complex-mediated damage to tissue at the onset of MG because of failure in activation of the complement cascade, providing direct evidence that disruption of MuSK by autoantibodies causes MG. Mice affected with MuSK-EAMG exhibited marked muscle weakness, muscle fatigue caused by impairment of neuromuscular transmission, and muscle atrophy. Morphological analysis indicated significant loss of AChR expression, retraction of nerve terminals opposite AChR clusters, axon sprouting (with or without the remnant of nerve terminals), and

a reduction of synaptic folds at NMJs. In addition to the morphological defects, functional defects at the NMJ were also observed. Electrophysiological assessment of the efficiency of neuromuscular transmission *ex vivo* indicated that lower levels of ACh were being released from presynaptic nerve terminals in these mice. These observations demonstrate that inhibition of MuSK with autoantibodies disturbs both pre- and post-synaptic structure and function at the NMJ, despite the fact that MuSK is only expressed at postsynaptic membranes, and suggest that MuSK acts via retrograde signals from postsynaptic sites to maintain presynaptic structure and function. Taken together, our studies illustrate that MuSK plays an important bidirectional role in maintaining the structure and function of the mature NMJ, and that blocking MuSK action leads to a breakdown in NMJ function and causes MG. Although MG and sarcopenia have a different initial cause, it is possible that they share a common fundamental mechanism, i.e., disruption of NMJ structure and function leading to muscle weakness and atrophy, which is observed in both diseases<sup>21</sup>). Therefore, we believe that studying MG, caused by inhibition of MuSK, is a useful method for trying to resolve the pathogenic mechanisms of sarcopenia.

### Relationship between MuSK and sarcopenia

To date, studies have implied an indirect relationship between MuSK and sarcopenia. Agrin, an activator of MuSK, is degraded by neurotrypsin, a neuronal serine protease. Young adult mice with motoneuron-specific neurotrypsin overexpression in which degradation of agrin is enhanced, exhibit structural changes of the NMJ, including fragmentation of AChR clusters, a reduction in the number of muscle fibers, the presence of centralized myonuclei, and an increased proportion of type I fibers, all of which are associated with sarcopenia<sup>22</sup>). These results are consistent with the notion that decreased functionality of the NMJ plays a role in the onset of sarcopenia, and suggest that deactivation of MuSK, by the removal of agrin from the NMJ, is part of the pathogenic mechanism. Interestingly, both neurotrypsin-deficient and neurotrypsin-resistant agrin-overexpressing mice, in which levels of agrin are elevated, develop sarcopenia at old age, suggesting that multiple mechanisms contribute to the onset of sarcopenia. Neurotrypsin-overexpressing mice could therefore represent another model for studying the pathology of sarcopenia in addition to MuSK-EAMG mice.

### Future perspective on research into sarcopenia

Given the hypothesis that decreased functionality of the NMJ results in the onset of sarcopenia, it is feasible to suggest that increasing the stability of the NMJ could prevent or delay the disease course. Animal studies have

shown that the NMJ exhibits considerable structural and functional plasticity in response to altered levels of neuromuscular activity such as through exercise training or disuse<sup>23</sup>). Interestingly, in aged mice, one month of voluntary exercise on running wheels was reported to attenuate and partially reverse age-related changes in NMJ structures that had already occurred<sup>10</sup>). Furthermore, it was shown that isometric strength training for two months in aged rats could lessen the decrease in Bassoon at the NMJ<sup>13</sup>). These observations highlight the beneficial effect of physical activity. Although the detailed mechanism is not yet known, increased muscle activity through exercise could potentiate expression and release of muscle-derived trophic factors that improve the functionality of the NMJ in an autocrine and/or paracrine fashion. It has recently been reported that skeletal muscle cells release a number of humoral factors termed 'myokines'<sup>24</sup>). Further identification of novel myokines activated by exercise is needed, and the effect of myokines on NMJ plasticity should be investigated.

Another approach in the search for unraveling a potential mechanism for maintaining NMJ structure and function is to develop biomarkers for sarcopenia. Recently, an agrin fragment cleaved by neurotrypsin in blood has been identified as a marker for the diagnosis of sarcopenia in Europe<sup>25,26</sup>). Early detection of sarcopenia using such biomarkers is important for initiating treatment early in patients and for monitoring the efficacy of treatment continuously. In conclusion, the NMJ will become an important therapeutic target for sarcopenia in the future.

### Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (25860734) from the Ministry of Education, Science, and Culture, Japan.

### References

- 1) Roubenoff R and Hughes VA. 2000. Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: M716-M724.
- 2) Doherty TJ. 2003. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 95: 1717-1727.
- 3) Hartzell HC and Fambrough DM. 1973. Acetylcholine receptor production and incorporation into membranes of developing muscle fibers. *Dev Biol* 30: 153-165.
- 4) Cohen SA and Fischbach GD. 1977. Clusters of acetylcholine receptors located at identified nerve-muscle synapses in vitro. *Dev Biol* 59: 24-38.
- 5) Lexell J, Taylor CC and Sjöström M. 1988. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84: 275-294.
- 6) Deschenes MR, Roby MA, Eason MK and Harris MB. 2010. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp Gerontol* 45: 389-393.

- 7) Jang YC and Van Remmen H. 2011. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 46: 193-198.
- 8) Li Y, Lee Y and Thompson WJ. 2011. Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci* 31: 14910-14919.
- 9) Balice-Gordon RJ. 1997. Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle Nerve Suppl* 5: S83-S87.
- 10) Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD, Jr., Gage FH, Lichtman JW and Sanes JR. 2010. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14863-14868.
- 11) Ezaki T, Oki S, Matsuda Y and Desaki J. 2000. 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: 388-395.
- 12) Chen J, Mizushige T and Nishimune H. 2012. Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol* 520: 434-452.
- 13) Nishimune H, Numata T, Chen J, Aoki Y, Wang Y, Starr MP, Mori Y and Stanford JA. 2012. Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. *PLoS One* 7: e38029.
- 14) Kelly SS. 1978. The effect of age on neuromuscular transmission. *J Physiol* 274: 51-62.
- 15) Wu H, Xiong WC and Mei L. 2010. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137: 1017-1033.
- 16) 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 and Yancopoulos GD. 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85: 501-512.
- 17) Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A and Vincent A. 2001. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 7: 365-368.
- 18) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, Hato N, Yamada H, Jie C, Kobayashi N, Mominoki K, Abe Y, Ueda N and Matsuda S. 2006. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 116: 1016-1024.
- 19) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N and Shigemoto K. 2012. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 180: 798-810.
- 20) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N and Shigemoto K. 2012. 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 245: 75-78.
- 21) Shigemoto K, Kubo S, Mori S, Yamada S, Akiyoshi T and Miyazaki T. 2010. Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1: S137-S147.
- 22) Butikofer L, Zurlinden A, Bolliger MF, Kunz B and Sonderegger P. 2011. Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J* 25: 4378-4393.
- 23) Wilson MH and Deschenes MR. 2005. The neuromuscular junction: anatomical features and adaptations to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. *Int J Neurosci* 115: 803-828.
- 24) Manabe Y, Miyatake S and Takagi M. 2012. Myokines: Do they really exist? *J Phys Fitness and Sports Med* 1: 51-58.
- 25) Drey M, Sieber CC, Bauer JM, Uter W, Dahinden P, Fariello RG and Vrijbloed JW. 2013. C-terminal Agrin Fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 48: 76-80.
- 26) Hettwer S, Dahinden P, Kucsera S, Farina C, Ahmed S, Fariello R, Drey M, Sieber CC and Vrijbloed JW. 2013. Elevated levels of a C-terminal agrin fragment identifies a new subset of sarcopenia patients. *Exp Gerontol* 48: 69-75.

## サルコペニアに関する筋肉基礎科学

重本和宏\* 森秀一\*  
高嶋留美\* 本橋紀夫\*

要旨：サルコペニアは認知症と共に要介護の2大原因であるが、その臨床的な定義・診断法が提唱されたのは最近のことである。サルコペニアのメカニズムの研究は始まったばかりであり、その成果を早期診断と予防・治療法の開発へ展開することが求められている。サルコペニアの成因は多因子であることから、そのためには学際的な研究が必要である。

### はじめに

超高齢社会に伴う介護予防の対策は急務である。特に介護の主要原因となるサルコペニア（加齢性筋肉減少症）の早期診断や予防・治療法の研究が求められている。サルコペニアの定義や診断は、筋量および筋力の減少と身体運動機能の低下を定量して評価することが提案されている。一方で、サルコペニアは老年病態症候群の1つで、虚弱の定義とも重複しており、臨床的に老化を疾患として扱う難しさを象徴している。さらに、高齢者は生活習慣病、認知症やその他の疾患も罹患しているケースが多い。特に近年では、生活習慣病に加えて認知症とサルコペニアの直接的な因果関係について注目されている。加齢による代謝機能の低下と認知症の関連についても議論がなされている。骨格筋は単なる運動器官ではなく、体重で40%を占める生体内の最大の代謝調節器官でもある。サルコペニアの定義や成因についても、運動

機能だけでなく代謝における骨格筋の役割を知り考慮に入れる必要がある。

本稿では代謝における骨格筋の役割を中心に、サルコペニアに関する基礎科学からの考え方を紹介する。

### I. 代謝における骨格筋の役割

5億6千万年前のエディアカラ紀に地球上に存在していた生物の化石がカナダで発見され、その成果が2014年の論文に発表された<sup>1)</sup>。これまでの古生物学では、カンブリア紀の前に存在していた生物はすべて、爆発的に新しい生物が出現したカンブリア時代に食べつくされていたとされていたが、化石から復元した生物の形は刺胞動物（くらげなど）の幼体にそっくりであった（図1）。大変興味深いことに、骨格筋線維のような構造を持つ最古の生物で捕食行動を行っていたと考えられている。現存する生物と同じ体節構造を有しており、5億6千万年前から厳しい環境変化に適応するために、骨格筋線維の代謝制御が重要な役割を果たすことで今日まで生物が進化してきたと考えられている。

実際、われわれの体の最大重量（体重の40%）を占める骨格筋は静止期には体内のエネルギー代

\* Kazuhiro SHIGEMOTO et al, 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運動器医学

Underlying mechanisms of sarcopenia

Key words : Sarcopenia, Muscle fiber type, Myokine

表 1 マウスの骨格筋線維の特徴

	マウスの4種類の筋線維タイプ			
	遅筋線維	速筋線維		
	I / $\beta$	II a	II d/x	II b
収縮スピード	遅い		速い	
疲労耐性	高い	やや高い	低い	低い
代謝	ミトコンドリア系	ミトコンドリア系/解糖系		解糖系
エネルギー効率	優	やや優	劣	劣
解剖学的(色)	赤	赤	白	白
筋線維の大きさ	小さい	中間	大きい	大きい

遺伝子配列からヒトのIIb筋線維はマウスのII d/xに相当する。

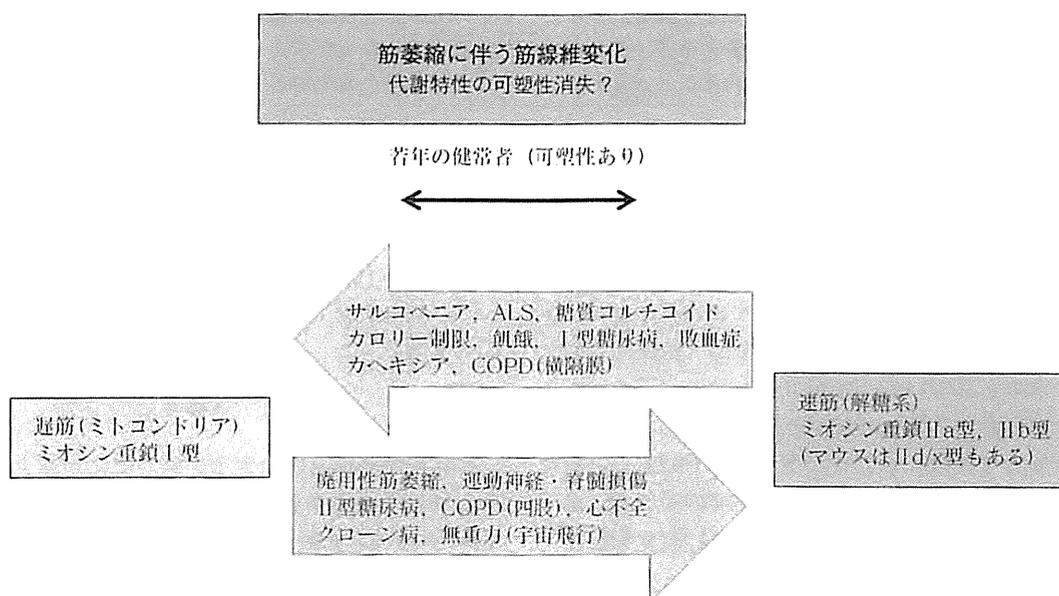


図 2 様々な原因の筋萎縮に伴う筋線維変化

ている<sup>7)</sup>。ヒトでもトレーニングのタイプにより持久力あるいは瞬発力に順応した筋力を鍛えることができる。筋線維タイプが変化するかどうかは倫理的およびサンプリングの問題もあり定説はまだないが、マウスと同様の変化を示すことが十分予想される。

Ⅲ. 筋萎縮に伴う筋線維の変化 (図 2)

様々な原因による筋萎縮の病理学的変化として、筋線維数と筋線維断面積の減少および筋線維

タイプの割合が変化することが報告されている。ヒトの骨格筋では加齢により、I型線維がII型線維よりも萎縮しやすいことや、ラットの前脛骨筋のIIa型線維が減少してI型線維の割合が増加すること、またヒラメ筋のI型筋線維の割合が増加し、速筋線維を多く含む筋ではIIx/IIbの筋線維の比率が増加することが報告されている。われわれも加齢マウスの筋線維タイプの病理学的変化を調べてみたところ、前頸骨筋ではIIb型線維が減少してIIx/IIbの比率が増加する一方で、ヒラメ

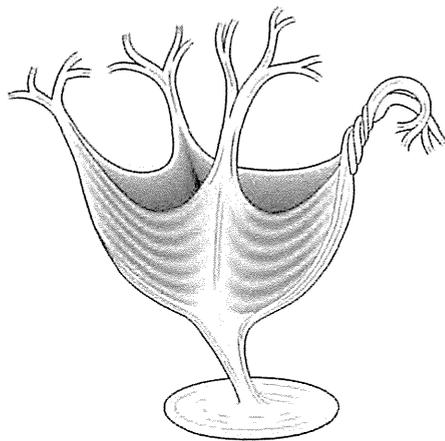


図1 5億6千万年前の先カンブリア紀(エディアカラ)の化石から予想される生物の形態<sup>1)</sup>

謝の30%であるが、インスリン刺激により体内の糖消費の85%を占めるまで増加する<sup>2)</sup>。さらに、運動のピーク時には20倍に増加するエネルギー代謝の90%を骨格筋が占めている。この代謝機能のダイナミックレンジの広さ、つまり可塑性は捕食や天敵からの回避運動のときだけでなく、生存に必要な体熱産生およびエネルギー消費の調節を通して、氷河期や飢餓時において生物の生存に重要な役割を果たしてきたと考えられる。現在のサルコペニアの定義は、骨格運動機能に関する指標に基づいているが、運動と代謝は表裏一体の関係にあることから、加齢に伴う骨格筋の代謝調節機能の可塑性の変化もサルコペニアの診断において考慮に入れる必要があるのではないだろうか。

## II. 骨格筋線維の分類と特性

サルコペニアの発症メカニズムの研究は認知症と比べて大きく遅れているのが現状であるが、その理由として認知症のように病理学的な診断が確立されていないことが大きい。認知症研究では発症メカニズムに加えて、画像やバイオマーカーによる早期診断法や新規治療法の効果についても、病理学的な根拠が求められる。ところで、骨格筋の萎縮ではサルコペニアやその他の原因により、代謝機能変化のベクトルが異なることが骨格筋線

維の変化から予想される。

本題に入る前に骨格筋線維について概説する。

骨格筋線維は、ヒトではミオシン重鎖がI型の筋線維と2種類のII型筋線維(IIaとIIb)から構成され、マウスではミオシン重鎖Iを発現するI型筋線維、ミオシン重鎖IIa、IIx、IIbをそれぞれ発現するII型筋線維がある(表1)<sup>3)4)</sup>。各ミオシン蛋白は異なる遺伝子から蛋白が翻訳されているが、ヒトのミオシン重鎖IIb遺伝子はマウスのIIx遺伝子配列とホモロジーが高く、実は相同遺伝子であるとされている。ミオシン重鎖蛋白はATPase活性があり、ATPを分解して生じた化学エネルギーを力学的エネルギーに変換してアクチン蛋白を動かすことで筋線維が収縮する。II型筋線維はATPase活性も高く、ATPの供給は解糖系で迅速に供給されるため、無酸素の環境下でも瞬間的に大きな収縮力を生み出すことができるが、一方で解糖系はATP産生効率が悪いために疲労耐性が弱い。対照的に、I型筋線維はミオシン重鎖のATPase活性は速筋線維に比べ低く、筋線維はミトコンドリアに富んでおり解糖系に比べてATP産生速度は遅いが、酸素を消費して効率よくATPが供給されるために持久力に優れ、疲労耐性が強い。

発生期には、 $I > IIa > IIx > IIb$ の順に筋線維が分化して出現する一方で、ヒトやマウスの成体においては、運動トレーニングあるいは非運動により筋線維が上記の順に可逆的にある程度変化すると、スポーツ科学の研究により報告されている。近年では、IIaやIIxを発現する筋線維もミトコンドリアに富んでおりI型とIIb型の単なる中間型ではないと考えられている<sup>5)</sup>。骨格筋は上記の複数の筋線維により構成され、ヒラメ筋(遅筋)や前頸骨筋(速筋)のような骨格筋単位での速筋や遅筋の特性が決まる。

マウスやラットの運動負荷に伴い筋線維のタイプが変化することが様々な実験で報告されている<sup>3)4)6)</sup>。正常時および若い個体の骨格筋においては、筋収縮の特性変化に適応したATPの産生を可能にする代謝プログラミングを伴い(ミトコンドリア⇌解糖系)筋線維の変化は可塑性に富ん

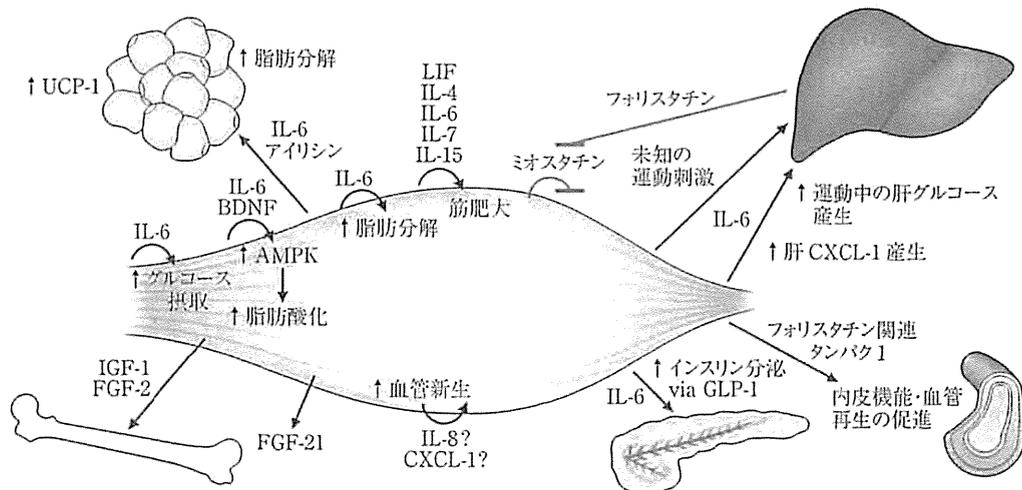


図 3 骨格筋から分泌される様々なマイオカインと臓器連関<sup>10)</sup>

筋は IIa と IIx 型線維が減少して I 型線維の比率が増加することがわかっており<sup>10)</sup>、種を超えて同じ変化が起きることがわかった。

興味深いことに、筋萎縮に伴う筋線維の割合の変化は原因により異なる<sup>11)</sup>。ALS (amyotrophic lateral sclerosis: 筋萎縮性脊索硬化症)、カロリー制限、飢餓、糖質コルチコイドの投与、I 型糖尿病、敗血症、癌に伴う悪液質ではサルコペニアと同様に遅筋線維の割合が増えることが報告されている。対照的に、長期間のベッド療養などによる廃用性筋萎縮、外傷による運動神経損傷や脊髄損傷、II 型糖尿病、癌などによるカヘキシア、COPD (chronic obstructive pulmonary disease)、クローン病、無重力状態 (宇宙飛行) などでは筋萎縮に伴い速筋線維の割合が増加することが報告されている。筋線維の割合の変化は骨格筋の代謝特性も随伴することが予想されるが、骨格筋は患者の身体活動の変化だけでなく、各疾患の原因に伴う体内の代謝環境の変化の影響を受けていると考えることもできる。

#### IV. マイオカイン

##### — IL-6 の代謝調節作用 —

では、骨格筋はどのようにして体内の代謝環境の調節に関わっているのでしょうか？ 近年、骨

格筋からは、もともと免疫細胞の機能制御を担うことがわかっている多くのサイトカインが分泌されており、さらにサイトカイン以外の分泌蛋白も含めてマイオカイン (myokine) と総称する。マイオカインは、オートクライン (自己分泌: 分泌された分子が、分泌した細胞自身に作用する)、パラクライン (傍分泌: 骨格筋内の近隣の細胞へ作用する)、エンドクライン (内分泌: 分泌された細胞から体液によって離れた器官、肝臓、脂肪組織、膵臓、免疫組織、骨、脳などに運ばれて作用する) により様々な役割をしていることが報告されている (図 3)<sup>10)</sup>。新しいマイオカインと機能がこれまで次々と報告されており、未知の分子が存在することが予想される。マイオカインの分泌制御は骨格筋の運動機能や体内の栄養環境の変化の影響を受けるものが多く、サルコペニアの成因との関連性が十分あることが予想される。

疫学研究から、被験者の安静時 (ベースライン) および運動習慣の程度は、IL-6 の血中濃度と負の相関がある<sup>11)</sup>。一方で、耐久トレーニングを行った被験者では安静時の IL-6 の血中濃度が低下する。また、加齢に伴う四肢筋量の減少や握力低下などのサルコペニアの指標と、安静時の IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 の炎症性サイトカインの血中濃度との間に負の相関がある。このことから、サルコペ

ニアに慢性炎症が関与しているという概念が提示され<sup>12)</sup>、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1の血中濃度測定がサルコペニアのバイオマーカーとして疫学研究では利用されている。

一方で、IL-6は免疫細胞でも産生される炎症性のサイトカインであり、加えて運動後30分には骨格筋内のIL-6のmRNA転写が100倍程度も増加することから、サルコペニアの臨床診断に血中IL-6の量を指標に使うのは困難である。ちなみに、安静時および運動負荷後に増加する血中IL-6の主要な分泌部位は骨格筋として最初にマイオカインとして定義されたサイトカインである。近年、骨格筋内のvesicleで貯留されているIL-6が筋収縮後に分泌されることがイメージング法で確認されており、骨格筋が正に分泌器官であることを示している。サルコペニアにおいては、骨格筋で貯蔵されているIL-6が減少していると予想される。

では、筋収縮刺激により骨格筋で分泌されるIL-6は何をしているのであろうか？ 免疫細胞とは異なり炎症シグナルのTNF $\alpha$ とは異なる機構で産生され、運動時に骨格筋が必要とするエネルギー量を検知して調節するセンサーとして働くことが報告されている。筋収縮で増加したIL-6は結合した受容体からの細胞内シグナルにより、筋細胞も含めて全身の脂肪酸の $\beta$ 酸化を促進しエネルギー産生を増加させ、また脂肪組織のアドレナリン刺激による脂肪分解の感受性を高める。また、リコンビナントIL-6をラットに投与すると筋細胞膜のIL-6受容体から細胞内シグナルを介して、グルコースの細胞内取り込みが増加する。このように、IL-6は運動時のエネルギー需要に対して生体が適応できるように代謝制御を行っていると考えられている。

## V. その他のマイオカイン

急速な筋収縮が引き金となり分泌されるマイオカインはIL-6のほかに、IL-8やケモカインなどが報告されているが<sup>14)</sup>、その意義については今後の検討が必要である。ところで、ハーバード大のWenzら<sup>13)</sup>は、pGC1- $\alpha$ 遺伝子を過剰発現したト

ランスジェニックマウスが加齢による骨格筋の機能低下、肥満、糖代謝の変化や慢性炎症に対して耐性であることを見いだした。2013年には、pGC1- $\alpha$ を過剰発現したトランスジェニックマウスの骨格筋で膜結合蛋白のfibronectin type III domain-containing 5 (FNDC5)の発現が増強され、その細胞外ドメインが蛋白分解酵素で切断されて血中に遊離することを発見してアイリシン (irisin) と名づけた<sup>14)</sup>。アイリシンはIL-6とは異なり急性的な筋収縮刺激ではなく、運動を継続することで骨格筋から遊離される。皮下脂肪組織の白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞様の機能を持つベージュ脂肪細胞 (beige cell) へと変換誘導する。褐色脂肪細胞は、ミトコンドリア内膜の酸化的リン酸化反応を脱共役させエネルギーを熱として散逸する。したがって、エネルギー消費の少ない白色脂肪細胞がベージュ脂肪細胞へ変化すると、エネルギーの消費が増大して肥満になりにくい体質へ変化することになる。アイリシンは脂肪細胞からもアディポカインとして分泌されるが、末梢だけでなく中枢神経細胞でも持続運動 (endurance exercise) 刺激により発現して、海馬のbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) の作用を介して認知機能を高める作用があることを、動物モデルを使い Spiegelman らが報告した (2014年北米神経科学会)。末梢で発現させたアイリシンも中枢神経に同様の作用をもたらすとしているが、詳細について今後の展開が期待される。

マイオカインであるマイオスタチンはTGF $\beta$ スーパーファミリーに属しているが、1997年に筋の肥大化を抑制する作用があることが報告されて以来、その阻害効果を有する抗体や薬物が筋萎縮の治療薬として注目されてきた。マイオスタチンは骨格筋で産生分泌され、細胞外基質に非活性型として保持されている。組織に存在する蛋白分解酵素の働きで活性型が変わる。その受容体 (アクチンタイプII受容体) のセリン/スレオニンキナーゼ活性を介して細胞内シグナルが伝達されて、筋萎縮原因遺伝子の転写活性を誘導する。マイオスタチンは筋細胞特異的に作用するが、TGF $\beta$ もその受容体を活性化して上記のシグナル

カスケードにより筋萎縮原因遺伝子の転写活性を誘導することがわかっている。サルコペニアにマイオスタチンが筋萎縮に関与するかについては、老化モデル動物の血中および骨格筋内では TGF $\beta$  が増加するが、マイオスタチンは変化せず、サルコペニアにどの程度関与しているのか今後の解析が必要である。

FGF21 もマイオカインとして知られており、筋収縮刺激で骨格筋での発現が増強するという報告がある。FGF21 はアイリシンと同様に白色脂肪細胞をベージュ脂肪細胞へ変化させることから、製薬会社は創薬標的として研究開発を進めているようである。そのほかには、myostatin, IL-7, IL-15, leukemia inhibitory factor (LIF) などが代表的なマイオカインだが、生理的な役割やサルコペニアとの関連性については今後も検討が必要である。

## VI. ホルモンと栄養

サルコペニアの成因には男性ホルモン（アンドロゲン）とビタミン D が関係するとされている。男性のアンドロゲンの 95% は精巣のライディッヒ細胞から産生され、5% が副腎からも産生される。女性の場合、微量ではあるが副腎から男性ホルモンが分泌される。テストステロンは主要な男性ホルモンであり、標的臓器でジヒドロテストステロンへ変換されアンドロゲン受容体に結合し、核内の遺伝子発現を制御して作用効果を表す。多くの研究から、男性においては加齢とともにアンドロゲン作用の低下による、筋力や身体運動機能の減弱、転倒の増加、生殖機能および骨密度の低下などの関連が示されている。実際、高齢者男性において筋力や身体運動機能、転倒などが血中のテストステロン値と相関がある。一方、女性におけるエストロゲンの減少と筋量や身体運動能力との関連については、一定の見解が得られていない。

ビタミン D は、様々な臓器で生理作用を示すホルモン様効果を示すことから、欧米では D ホルモンとも呼ばれている。骨の代謝に対するビタミン D の効果はよく知られているが、ビタミン

D 不足で発症する骨軟化症や、くる病では筋力低下を併発する<sup>15)</sup>。また、加齢による血中ビタミン D の低下と、身体運動能力の低下（転倒）との間に相関関係がある。高齢者に対するビタミン D 投与による転倒予防が、ビタミン D 不足のケースに対して効果があることが報告されている。ビタミン D の多岐にわたる作用と加齢現象との関連性については、今後も研究を進めていく必要がある。

栄養として摂取された蛋白由来の分岐鎖アミノ酸 (BCAA) (ロイシン, バリン, イソロイシン) は、蛋白合成を促進することで骨格筋の同化を亢進する。骨格筋細胞は栄養状態を感知する様々な分子レベルのセンサーの作用により、同化と異化の制御を行うことで骨格筋の機能と生体の生命維持 (栄養環境) のバランスを調節する。この生命維持機構は、いつ食物となる獲物に出遭うかわからない野生動物においては、重要な生命維持装置として働いているのであろう。また、人類も飢餓などの厳しい環境におかれただけでなく、通常の生活条件下でもこの機構が栄養のバランスを維持するために機能していると予想される。サルコペニアの病態は、体内環境として栄養バランスが飢餓状態に傾いていると考えられ、筋肉の加齢メカニズムを理解するために今後もこの分子メカニズムの研究が必要である。

## VII. 運動神経細胞と神経筋シナプス

運動神経線維終末部と骨格筋のつなぎ目の神経筋シナプスは、サルコペニアや神経筋難病による筋萎縮の早期の病態メカニズムと関連している。筋萎縮の早期で、運動神経細胞と筋線維との相互作用が減弱してシナプスの機能と形態に影響を与える。脊髓前角の運動神経細胞から骨格筋へ伸びる軸索 (神経線維) は数十の骨格筋線維を神経支配する。神経線維を伝わる膜電位変化が神経線維の終末部に達すると、神経伝達分子のアセチルコリンが放出され筋線維側の受容体を刺激して骨格筋が収縮する (図 4)。また、運動神経終末と筋線維の間隙には agrin (ヘパリン硫酸プロテオグリカン) やラミニンなどの生理活性が集積して

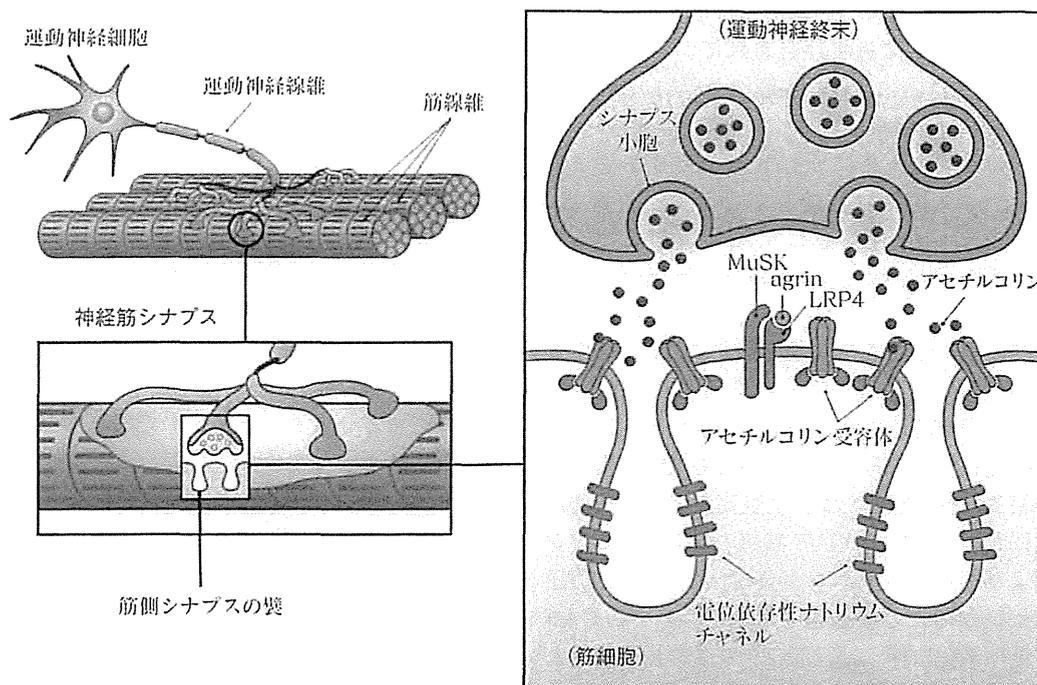


図 4 神経筋シナプスの構造と分子の局在

シナプス維持に重要な役割を果たしている。Agrin は神経終末側からアセチルコリンとは異なる経路で分泌され筋側のシナプス襞の先端部に集積して発現している LRP4 (low-density lipoprotein receptor [LDLR]-related protein 4) と結合して受容体型チロシキナーゼの MuSK (muscle-specific kinase) を活性化する<sup>16)</sup>。そして、細胞内へのシグナル伝達により ACh 受容体の凝集およびシナプス全体の形態と機能を維持する。筋側から分泌され運動神経終末側で作用する逆行性シグナルも存在するが、未だよくわかっていない。

加齢による神経筋シナプスの形態変化として、神経終末部および AChR 凝集の断片化、神経終末の分枝化、脱神経支配、シナプス襞の減少がヒトや老化モデル動物 (ラット、マウス) が観察される<sup>17)18)</sup>。加齢マウスの研究から、ヒトの中年期に相当する月齢でシナプス形態の変性が始まり、カロリー制限および運動で予防できることが示された<sup>19)</sup>。高齢者のカロリー制限は色々と議論があるが、サルコペニアに対して栄養管理および運動が

早期予防に有用であることを示している。

#### Ⅷ. 神経筋シナプスとサルコペニアのバイオマーカー

サルコペニアに関しては、筋萎縮の早期診断・予防治療法の研究は全く進んでおらず、近年、unmet medical needs として世界的に注目されている。サルコペニア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既に合併している場合が多く、病態改善の有効な治療や予防は困難である。そこで、早期にサルコペニアを診断するために客観的指標としてバイオマーカーが求められている。上述のように神経筋シナプスの形態変化はサルコペニアの病態進行の早期に起きるが、このプロセスに関与する新規バイオマーカーが報告された<sup>20)21)</sup>。

セリンプロテアーゼの neurotrypsin は、精神遅滞の原因遺伝子の一つで中枢神経のプレシナプスに局在していることが知られていた<sup>22)</sup>。さらに、神経筋シナプスの神経終末のシナプス小胞内にも

発現しており、サルコペニアの新しいバイオマーカーの候補として近年注目されている。Neurotrypsin の生体内における生理的な標的基質は agrin であることが報告され、シナプス伝導に伴い神経伝達物質と一緒に neurotrypsin が分泌されて、シナプス間隙に沈着している分子量が 200 kDa 以上の agrin を切断して 22 kDa の C 末端ペプチド断片 (CAF; C-terminal agrin fragment) が産生される<sup>23)</sup>。この CAF はマウスだけでなくヒトの血中に分泌されて定量測定することができ<sup>20)21)</sup>。

69 名の高齢者 (女性 47 名) の血清中の CAF 濃度を測定したところ、男性高齢者の筋量と有意に負の相関関係を認めたが、女性高齢者では相関関係は弱かった。また、CAF 高値の群ではビタミン D および運動トレーニング負荷後に有意に CAF の値が下がることが報告された<sup>20)</sup>。血中の CAF 蛋白量は老化に伴う神経筋シナプスの形態変化と相関関係があることから、特異性の高いサルコペニアのバイオマーカーの可能性を示している。また、neurotrypsin を脊髄の運動神経細胞に過剰発現したトランスジェニックマウスを作成したところ、若いマウスでも筋萎縮が観察され筋の病理組織像はサルコペニアと類似していた<sup>24)</sup>。しかしながら、サルコペニアの成因は neurotrypsin による agrin の分解だけでは説明ができない。Neurotrypsin 遺伝子のノックアウトマウスおよび neurotrypsin 分解に耐性の agrin 蛋白を過剰発現したトランスジェニックマウスは、いずれも加齢による自然発症の一次性サルコペニアを抑制することができなかった。二次性のサルコペニアに有効である可能性は残されているが、サルコペニアの治療・予防の分子標的として利用することは今後の検討が必要である。一方で、バイオマーカーとしては二次的なサルコペニアにおいても利用できる可能性がある。

#### IX. サルコペニアの治療薬の開発

米国では希少疾患の特発性封入体筋炎を対象とした、マイオスタチン受容体 (ActRII) に対するヒト化中和抗体の第Ⅲ相臨床試験中であり<sup>25)</sup>、

2013 年、FDA より breakthrough therapy に指定され、迅速審査により 2016 年に認可される見込みである。日本でもこの秋から臨床試験が開始されている。年間売上高が 5,000 億円に達すると見込まれ、筋萎縮症分野での欧米メガファーマの開発競争が既に激化している。サルコペニアや筋ジストロフィを含む神経筋難病の治療薬として、前述したマイオスタチンを阻害する様々な薬物がこれまで開発されてきた。マイオスタチン自体に結合して活性を阻害する前駆体ペプチドのホリスタチン、およびその改変分子、マイオスタチン阻害抗体、マイオスタチン受容体であるアクチペンタイプ IIB 受容体の細胞外領域 (ACVR2B-Fc) 等がある。生体の成熟した骨格筋に対するマイオスタチン阻害は筋線維数を増やさないが、蛋白分解を抑制することで筋肥大と筋力増加することが証明されている。サルコペニアを疾患として FDA が認めるかどうかはわからないが、高齢者を対象とした筋萎縮の治療にも適応を考えているに違いない。

#### 文 献

- 1) Liu AG et al : Haootia quadriformis n. gen., n. sp., interpreted as a muscular cnidarian impression from the Late Ediacaran period (approx. 560 Ma). *Proc Biol Sci* **281** (1793), 2014
- 2) Fan W et al : Road to exercise mimetics : targeting nuclear receptors in skeletal muscle. *J Mol Endocrinol* **51** : T87-T100, 2013
- 3) Schiaffino S et al : Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91** : 1447-1531, 2010
- 4) Blaauw B et al : Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol* **3** : 1645-1687, 2013
- 5) Arany Z et al : The transcriptional coactivator PGC-1beta drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab* **5** : 35-46, 2007
- 6) Ciciliot S et al : Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **45** : 2191-2199, 2013
- 7) Bassel-Duby R et al : Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Ann Rev Biochem* **75** : 19-37, 2006
- 8) 福永大地ほか : 老齢マウスの筋線維タイプ特異

- 的な筋萎縮の病態解明. 基礎老化研究 36 : 47-49, 2012
- 9) 重本和宏ほか : サルコペニアの成因と疾患メカニズム. *Anti-aging Med* 9 : 28-32, 2013
  - 10) Pedersen BK et al : Muscles, exercise and obesity ; skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8 : 457-465, 2012
  - 11) Fischer CP : Interleukin-6 in acute exercise and training ; what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12 : 6-33, 2006
  - 12) Handschin C et al : The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 454 : 463-469, 2008
  - 13) Wenz T et al : Increased muscle PGC-1 $\alpha$  expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 : 20405-20410, 2009
  - 14) Villarroya F : Irisin, turning up the heat. *Cell Metab* 15 : 277-278, 2012
  - 15) Girgis CM et al : The roles of vitamin D in skeletal muscle ; form, function, and metabolism. *Endocr Rev* 34 : 33-83, 2013
  - 16) Wu ZZ et al : Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* 284 : 36453-36461, 2009
  - 17) Wokke JHJ et al : Morphological changes in the human end plate with age. *J Neurol Sci* 95 : 291-310, 1990
  - 18) Valdez G et al : Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7 : e34640, 2012
  - 19) Valdez G et al : Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 : 14863-14868, 2010
  - 20) Drey M et al : C-terminal agrin fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 48 : 76-80, 2013
  - 21) Hettwer S et al : Elevated levels of a C-terminal agrin fragment identifies a new subset of sarcopenia patients. *Exp Gerontol* 48 : 69-75, 2013
  - 22) Molinari F et al : Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298 : 1779-1781, 2002
  - 23) Stephan A et al : Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J* 22 : 1861-1873, 2008
  - 24) Butikofer L et al : Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J* 25 : 4378-4393, 2011
  - 25) Lach-Trifilieff E et al : An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy. *Mol Cell Biol* 34 : 606-618, 2014

---

\*                    \*                    \*

\*                    \*

## サルコペニアと神経筋シナプス

重本和宏\*\* 森 秀一\* 本橋紀夫\*

### 要 旨

神経筋シナプスは運動神経細胞と骨格筋の相互作用により維持されており、サルコペニアによる筋萎縮の早期段階からシナプスの形態異常が起きる。この初期段階を検出することができれば、サルコペニアの早期診断と治療が可能になるかもしれない。

### はじめに

サルコペニアの成因は多様であるが、早期診断や予防・治療法の研究が求められている。運動神経線維終末部と骨格筋のつなぎ目の神経筋シナプスは、サルコペニアや神経筋難病による筋萎縮の早期の病態メカニズムと関連している。筋萎縮の早期で、運動神経細胞と筋線維との相互作用が減弱して、シナプスの機能と形態に影響を与える。本稿では、神経筋シナプス維持の分子機構とサルコペニアとの関連について概説する。

### 神経筋シナプスの維持機構

個々の運動神経細胞から骨格筋へ伸びる軸索（神経線維）は、数十の骨格筋線維を神経支配して運動単位（motor unit）を形成する。神経線維を伝わる膜電位変化が神経線維の終末部に達すると、シナプス小胞（アクティブ

ゾーン）が開口して神経伝達分子のアセチルコリン（ACh）が放出され、筋線維側の受容体を刺激して骨格筋が収縮する。また、運動神経終末と筋線維の間隙には、agrin（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）やラミニンなどの生理活性が集積して、シナプス維持に重要な役割を果たしている。Agrin は神経終末側からAChとは異なる経路で分泌され、筋側のシナプス襞の先端部に集積して発現している LDL receptor-related protein 4 (LRP4) と結合して、受容体型チロシンキナーゼの muscle-specific kinase (MuSK) を活性化する<sup>1)</sup>。そして、細胞内へのシグナル伝達により ACh 受容体の凝集およびシナプス全体の形態と機能を維持する。

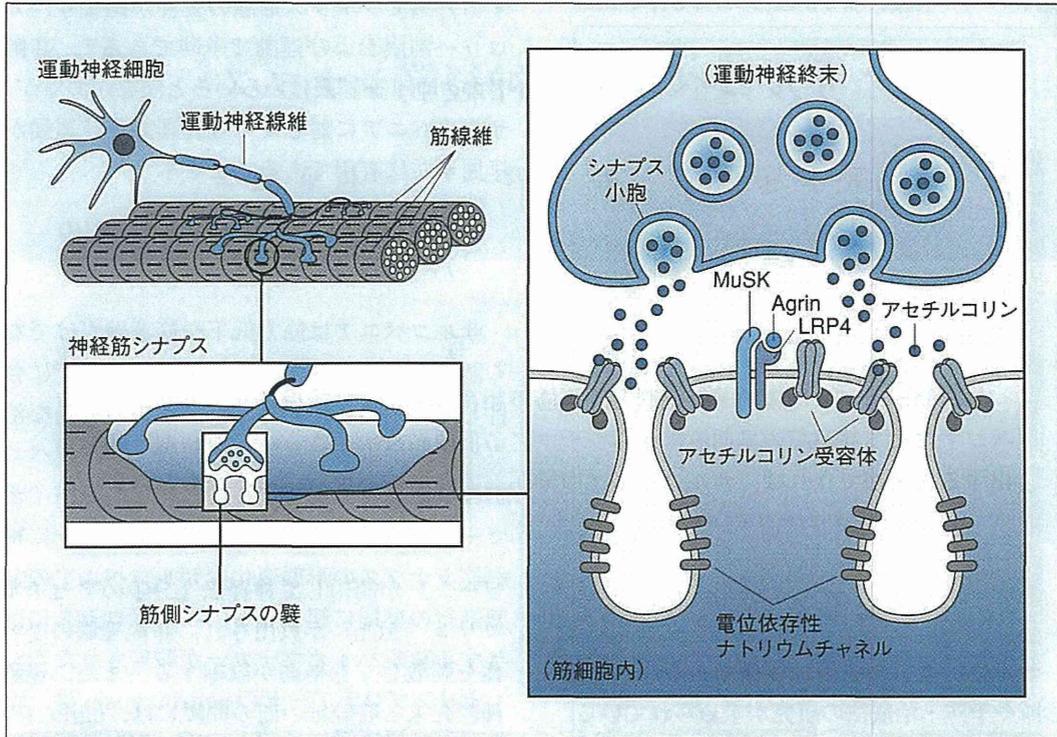
筋側から分泌され運動神経終末側で作用する逆行性シグナルも存在する。細胞外マトリックスタンパク質の laminin- $\beta$ 2 は運動神経終末のカルシウムチャンネルと結合して、ACh 分泌の開口部のアクティブゾーンの形成・維持の機能を担う<sup>2)</sup>。また、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) で切断された LRP4 の細胞外タンパク質は、運動神経終末の機能と形態を維持する<sup>3)4)</sup>。さらに、MuSK も逆行

\* 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 運動器医学

\*\* 同部長

キーワード：サルコペニア，神経筋シナプス，  
運動神経細胞

図1 神経筋シナプスの維持を担う分子の局在



Agrin はアセチルコリンとは異なる経路で神経終末から分泌される。シナプス後膜(筋側)の襞の先端部に集積している LRP4 タンパク質に agrin が結合して MuSK を活性化する。活性化シグナルはアセチルコリン受容体の集積と局在化だけでなく、シナプス全体の形態と機能の維持に必要である。

性シグナルを誘導してアクティブゾーンの機能を制御することが示唆されている<sup>5)6)</sup>。サルコペニアの成因に、骨格筋の機能低下とともにシナプスの逆行性シグナルが減弱し、神経伝達の効率が低下して筋萎縮に至る悪循環の機構が存在することが考えられる。

#### 神経筋シナプスの dying-back 現象(変性)

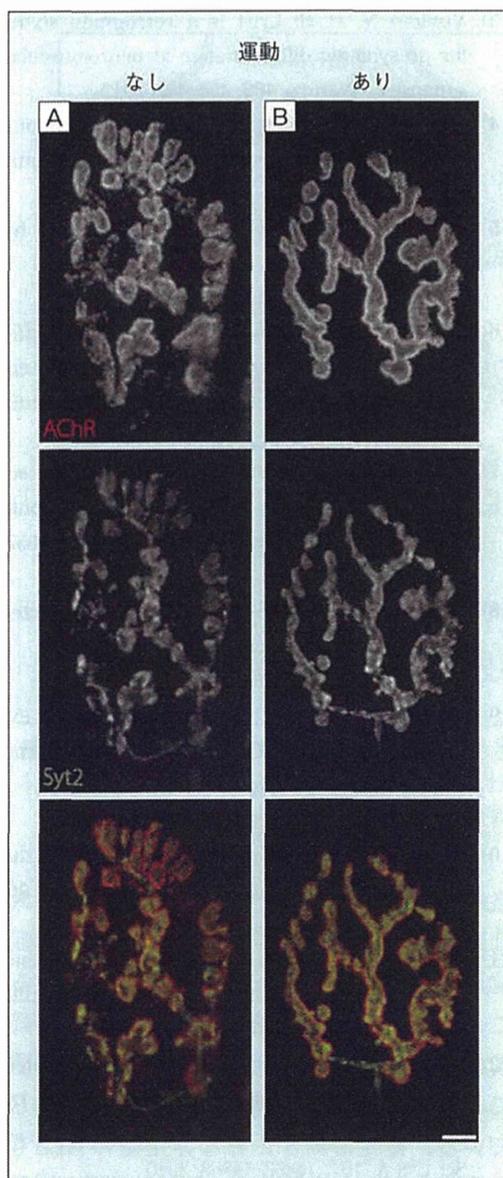
筋萎縮に至るさまざまな疾患の病態進行の早期に神経筋シナプスの形態変化が起きる。家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の SOD1 突然変異(G93A)を導入したトランスジェニックマウスは、筋力低下と筋萎縮の発症および運動神経細胞死が起きる前に神経筋シナプスの変性の結果、脱神経支配が進行する(dying-back 現象)<sup>7)</sup>。また、骨

格筋特異的に SOD1<sup>G93A</sup> を発現させたマウスは同様に ALS を発症することから<sup>8)9)</sup>、発症前期から骨格筋で ALS 発症機序が作用することを示す。ALS の発症は 50~70 歳の年齢層に多く、約 90% が非遺伝性で原因は不明であるが、高齢社会を背景に患者数が増加している。確定診断が困難な非定型の ALS もあることから、サルコペニアとの鑑別が課題である。

#### サルコペニアによる神経筋シナプスの変化

加齢による神経筋シナプスの形態変化として、神経終末部および ACh 受容体凝集の断片化、神経終末の分枝化、脱神経支配、シナプス襞の減少が、ヒトや老化モデル動物(ラット、マウス)において観察される<sup>10)11)</sup>。

図2 運動は加齢マウスのシナプス形態を若返らせる  
(文献<sup>12)</sup>より出版元の許可を得て転載)



22ヵ月齢のマウスに1ヵ月間 running wheel の自由運動を与えると、運動に関与する骨格筋では断片化した神経筋シナプスの形態(A)が改善して若返る(B)。AChR(赤色)はアセチルコリン受容体(筋側)で、Syt2(緑色)はシナプトフィジン(神経終末)を蛍光で可視化している。

加齢マウスの研究から、ヒトの中年期に相当する月齢でシナプス形態の変性が始まり、カロリー制限および運動で予防できる<sup>12)</sup>。高齢者のカロリー制限はいろいろと議論があるが、サルコペニアに対して栄養管理および運動が早期予防に有用であることを示す。

#### 神経筋シナプスとサルコペニアのバイオマーカー

サルコペニア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すでに合併している場合が多く、病態改善の有効な治療や予防は困難である。そこで、サルコペニアの早期診断となる客観的指標としてバイオマーカーが求められている。上述のように神経筋シナプスの形態変化はサルコペニアの病態進行の早期に起きるが、このプロセスに関与する新規バイオマーカーが報告された<sup>13)14)</sup>。

セリンプロテアーゼの neurotrypsin は、精神遅滞の原因遺伝子の1つで、中枢神経のプレシナプスに局在している<sup>15)</sup>。また、神経筋シナプスの神経終末のシナプス小胞内にも発現しており、サルコペニアの新しいバイオマーカーの候補として近年注目されている。現在までのところ、neurotrypsin の生体内における生理的な標的基質は agrin だけであり、シナプス伝導に伴って神経伝達物質と一緒に neurotrypsin が分泌され、シナプス間隙に沈着している分子量が 200kD 以上の agrin を切断して、22kD の C 末端ペプチド断片 (C-terminal agrin fragment : CAF) が産生される<sup>16)</sup>。この CAF はマウスやヒトの血中に分泌されて定量測定することが可能である<sup>13)14)</sup>。

69人の高齢者(女性47人)の血清中のCAF濃度を測定したところ、男性高齢者の筋量と有意に負の相関関係を認めたが、女性高齢者では相関関係は弱かった。また、CAF高値の群ではビタミンDおよび運動トレーニング負荷後に有意にCAFの値が下がること

が報告された<sup>13)</sup>。血中の CAF タンパク量は老化に伴う神経筋シナプスの形態変化と相関関係があることから、特異性の高いサルコペニアのバイオマーカーの可能性を示している。また、neurotrypsin を脊髄の運動神経細胞に過剰発現したトランスジェニックマウスを作製したところ、若いマウスでも筋萎縮が観察され、筋の病理組織像はサルコペニアと類似していた<sup>17)</sup>。しかしながら、サルコペニアの成因は neurotrypsin による agrin の分解だけでは説明できないようである。Neurotrypsin 遺伝子のノックアウトマウスおよび neurotrypsin 分解に耐性の agrin タンパク質を過剰発現したトランスジェニックマウスは、いずれも加齢による自然発症の一次性サルコペニアの発症を抑制できなかった。二次性サルコペニアに有効である可能性は残されているが、サルコペニアの治療・予防の分子標的として利用できるかどうかは今後の検討が必要である。一方で、バイオマーカーとしては二次的なサルコペニアにおいても利用できる可能性がある。

#### おわりに

サルコペニアの診断・早期治療・予防法の確立に有用な病理学的根拠として、神経筋シナプスの機能と形態変化に着目することが有用である。CAF の測定技術は、スイスのベンチャー企業 (Neurotune 社) が EUROSTARS から資金を得て、バイオマーカーとしての実用化を進めている。

#### 文 献

- 1) Wu Z Z, et al: Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* 284: 36453-36461, 2009.
- 2) Nishimune H, et al: A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432: 580-587, 2004.
- 3) Yumoto N, et al: Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature* 489: 438-442, 2012.
- 4) Wu H, et al: Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron* 75: 94-107, 2012.
- 5) Shigemoto K, et al: Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 116: 1016-1024, 2006.
- 6) Mori S, et al: 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.
- 7) Krakora D, et al: Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2012: 379657, 2012.
- 8) Dobrowolny G, et al: Skeletal muscle is a primary target of SOD1<sup>G93A</sup>-mediated toxicity. *Cell Metab* 8: 425-436, 2008.
- 9) Wong M, et al: Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 19: 2284-2302, 2010.
- 10) Wokke J H J, et al: Morphological changes in the human end plate with age. *J Neurol Sci* 95: 291-310, 1990.
- 11) Valdez G, et al: Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7: e34640, 2012.
- 12) Valdez G, et al: Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14863-14868, 2010.
- 13) Drey M, et al: C-terminal Agrin Fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 48: 76-80, 2013.
- 14) Hettwer S, et al: Elevated levels of a C-terminal agrin fragment identifies a new subset of sarcopenia patients. *Exp Gerontol* 48: 69-75, 2013.
- 15) Molinari F, et al: Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic men-

- tal retardation. *Science* 298: 1779-1781, 2002.
- 16) Stephan A. et al: Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J* 22: 1861-1873, 2008.
- 17) Butikofer L. et al: Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J* 25: 4378-4393, 2011.
- 

### Sarcopenia and Neuromuscular Junction

Kazuhiro Shigemoto, Shuuichi Mori, Norio Motohashi  
Research Team for Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

# 筋肉（サルコペニア）

## Summary

サルコペニア (sarcopenia) とは、加齢により骨格筋・筋肉 (sarco) が減少 (penia) していることを指す造語で、日本語では加齢性筋肉減少症と訳される。超高齢社会を迎え、骨格筋量の低下に伴う機能低下は認知症と並んで高齢者の ADL (activity of daily living) と QOL (quality of life) を損なう主要な原因となることから、その早期診断と有効な介護予防対策は急務の課題である。サルコペニアの臨床における定義および基準として、筋力、筋量と身体運動能力 (歩行速度など) の三つの指標を定量的に測定して評価することが、2010年に欧州の統一見解として発表された<sup>1)</sup>。また、2012年には厚生労働省研究班から、その監視とわが国の現状を鑑みた欧州基準に対する見解が Q&A として発表された<sup>2)</sup>。サルコペニアの有病率は 60~70 歳で 5~13%、80 歳以上の高齢者では 11~50% との報告がある。サルコペニアの有病率は世界的にも増加しており、高齢者の健康と福祉の観点からサルコペニアについて、そのメカニズムと科学的根拠に基づく予防法の研究が求められている。しかし現在のところ、サルコペニアの定義は臨床データに基づいており、その発症メカニズムを解明して理解するためには別の見方が必要である。骨格筋量や筋機能 (筋力、収縮速度、パワー、疲労耐性など) の維持には、骨格筋だけでなく運動神経細胞、神経筋シナプスが重要な役割を果たす。本章ではサルコペニアのメカニズムについて、これらの三つの項目を中心に概説する。

## 2.1 骨格筋の維持と老化

### 2.1.1 老化による筋線維の変化

骨格筋は、壮年期男性の体重の 40% (女性は 35%) を占め、運動に必要な筋収縮だけでなく代謝と熱産生の役割も担っている。実は、この二つ

の役割は筋収縮を担う筋線維タイプの構成と機能に密接に関係している (表 2.1)。マウスの骨格筋はミオシン重鎖 I を発現する遅筋線維、ミオシン重鎖 IIa, IIx, IIb を発現する速筋線維 (IIa 線維は中間筋として分類されることもある) で構成されるが、ヒトでは遅筋線維 (ミオシン重鎖 I)

表 2.1 マウスの 4 種類の筋線維タイプの特徴

ミオシン重鎖	遅筋線維	速筋線維		
	I/β	IIa	II d/x	II b
収縮スピード	遅い		速い	
疲労耐性	高い	やや高い	低い	低い
代謝	ミトコンドリア系	ミトコンドリア系/解糖系	解糖系	解糖系
エネルギー効率	優	やや優	劣	劣
解剖学的 (色)	赤	赤	白	白
筋線維の大きさ	小さい	中間	大きい	大きい

と2種類の速筋線維（ミオシン重鎖ⅡaとⅡb）からなり<sup>3)</sup>、ヒトのミオシン重鎖Ⅱbの遺伝子はマウスのⅡxと相同性が高い。ミオシン重鎖はATPアーゼ活性を有しており、その活性の差により筋線維の収縮特性が決まる。また、遅筋線維はミトコンドリアに富んでおり、酸素消費を伴う運動に使われ疲労耐性が高く、速筋線維はエネルギー産生に酸素消費を伴わない解糖系を使うため疲労耐性が低い。従来、速筋線維はタイプⅡ線維としてまとめて分類されてきたが、Ⅱa線維もミトコンドリアに富んでおり、マウスのタイプⅡx線維は、タイプⅡa線維とタイプⅡb線維の中間型の代謝特性を示すことから、各筋線維は固有の特性をもっていると考えられる。また正常の骨格筋に、数は少ないが同一の筋線維内に異なるミオシン重鎖を同時に発現するものがあり、ハイブリッド線維と呼ばれている。一方、骨格筋の部位により筋線維タイプの構成比が異なる。姿勢を制御する筋（例：ヒラメ筋）ではタイプⅠとⅡa線維の比率が高い。ヒト、齧歯類ともに筋肉トレーニングで筋線維タイプの可塑的な変化が起きるが、加齢とともにその可塑性が失われる。

ヒトを対象とした研究から、サルコペニアに伴う筋萎縮では、筋線維数と筋線維1本あたりの断面積の減少に加え、タイプⅠ線維の割合が増加することがよく知られていた。対照的に不活動性の筋萎縮（廃用性筋萎縮）ではタイプⅡb線維が増えるとされており、筋萎縮の成因と筋の代謝機能の変化に密接な関係があることを示す。一方、齧歯類（マウス、ラット）の老化モデルの研究により、ヒラメ筋などでは老化によりタイプⅡa線維が減少して、タイプⅠ線維の割合が増加するが、速筋線維を多く含む筋ではタイプⅡx/Ⅱbの比率が増加することが報告されている。著者（重本）らは、老化マウスにおける筋線維タイプの変化の様式は、骨格筋部位により異なることを見いだしている<sup>4)</sup>。ヒトにおいても単純にタイプⅠ線維の

割合が増加するのではなく、筋線維タイプの変化は骨格筋の部位ごとに多様であることが近年報告されている。

### 2.1.2 筋線維タイプの決定因子

では、筋線維の特徴はどのような分子メカニズムによって決定されるのだろうか。遅筋線維については、これまで転写因子共役因子のpGC1- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1) とpGC1- $\beta$ 、核内受容体のERR $\alpha$ 、ERR $\gamma$  (estrogen related-receptor) などの核内タンパクが決定因子として報告されている。ERR $\alpha$ とERR $\gamma$ は、結合するリガンドは発見されていないが、これらの分子は構成的に活性化状態にあるといわれている。一方、ミトコンドリアの生成に必要な遺伝子を誘導する転写因子として知られるYY-1 (Yin Yang 1) が、ミオシン重鎖Ⅰ遺伝子の発現に直接関係しているかどうかは不明である。また、ミトコンドリアの生成に必要なpGC1- $\alpha$ などの遺伝子発現とミオシン重鎖Ⅰ遺伝子発現の機構は密接にリンクしており、トランスジェニックマウスを使った実験から、pGC1- $\alpha$  (pGC1- $\alpha$ 1) とERR $\gamma$ はそれぞれミオシン重鎖Ⅰを発現する遅筋線維を誘導することがわかった。pGC1- $\alpha$ のトランスジェニックマウスはサルコペニア、筋ジストロフィーや運動神経切断などによる筋萎縮に対して抵抗性を示す<sup>5)</sup>。pGC1- $\alpha$ 転写産物には少なくとも4種類のアイソフォームが存在しており、従来から知られていたpGC1- $\alpha$ による筋線維に対する作用はpGC1- $\alpha$ 1によることがわかった<sup>6)</sup>。pGC1- $\alpha$ 4とpGC1- $\alpha$ 1タンパクは、それぞれ異なるプロモーターで転写される選択的スプライシングアイソフォーム (alternative splicing isoform) のmRNAから翻訳される(図2.1)。トランスジェニックマウスの解析から、pGC1- $\alpha$ 4はIGF-1 (insulin-like growth factor) の発現を増強し、またミオスタチンの発現を減少させて両者