

図 2.1 pGC-1 α 1 と pGC-1 α 4 のタンパク構造

pGC-1 α 1 (797 アミノ酸) と pGC-1 α 4 (266 アミノ酸) は、それぞれ N 末端と C 末端のアミノ酸配列が異なる。pGC-1 α 4 の mRNA は pGC-1 α 1 のプロモーターよりも上流で転写され、pGC-1 α 4 の第 1 エクソンの 13 個のアミノ酸が付加される。pGC-1 α 4 の 263 個目のアミノ酸から C 末端までは、pGC-1 α 1 と異なるエクソン由来の配列を有する。

の作用により筋肥大を誘導し、さらにタイプ IIa と IIx 線維を増加させる。pGC1- β のトランスジェニックマウスではタイプ IIx 線維が増加することが報告されている。加齢による筋線維タイプの変化は上記因子の作用が関与することが予想されるが、詳細なメカニズムや意義については未解明である。

2.1.3 酸化ストレスとミトコンドリア

もともと骨格筋はミトコンドリアに富んでいる器官だが、運動トレーニングなどにより骨格筋のエネルギー産生の需要が高まるとミトコンドリアの数が増加する。ミトコンドリアはその機能・形態を維持するため分裂・融合を繰り返しており、品質不良のミトコンドリアはオートファジーにより除去される。加齢に伴い、ミトコンドリア DNA の変異、ミトコンドリア生成を誘導する pGC1- α タンパク発現の減少、一群のミトコンドリア酵素タンパク発現の減少と活性低下、エネルギー産生効率の減弱、酸化ストレスの増大、アポトーシスの誘導、代謝機能低下および熱産生の減少などのミトコンドリア機能低下が起きることが数多く報告されている⁷⁾。しかし、ミトコンドリアの機能低下がサルコペニアの原因にどの程度関わるのか、直接的に証明した報告は少ない。ミトコンドリアで産生される活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が老化を進行させるという酸化ストレス学説の考え方は広く受け入れられているが、サルコペニアの病態を ROS による細

胞毒性の単一原因で説明することはできない。

ミトコンドリアは、その内膜に存在する酸化リン酸化に関わる呼吸鎖複合体などの酸素群の働きで、解糖系よりも効率よく ATP を産生してエネルギーを細胞に供給する。その過程に副産物として ROS が産生され、細胞内のタンパク質、核酸、脂質などを酸化するために細胞毒性を発生させる。Mn-SOD (superoxide dismutase) はミトコンドリア内で酸素から生じる ROS のスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) を、過酸化水素 (H_2O_2) と酸素に変換する。産生された H_2O_2 はミトコンドリア内のグルタチオンペルオキシダーゼとグルタチオンの働きで、水と酸素に分解されて無毒化される。Mn-SOD 遺伝子を骨格筋特異的にノックアウトしたマウスを調べたところ、運動機能は著しく低下するが筋萎縮は示さず、筋再生能もコントロール群と同じであった。

2.1.4 骨格筋における同化と異化の平衡状態

骨格筋は他の組織と同様に、代謝作用の同化 (anabolism) と異化 (catabolism) の平衡状態が保たれている。外傷による運動神経の伝達経路の切断、ベッドレストやギプス固定などで不活動状態になると、同化と異化のバランスが急速に崩れて 2 週間で骨格筋は萎縮する。これは、大脳運動皮質→脊髄 (運動神経細胞) →神経筋シナプス→筋へと伝わる運動刺激がブロックされ、筋収縮の抑制が引き金となり筋線維でタンパク分解が促進されるためである。加齢によりこの経路の神経伝

達の効率が慢性的に低下すると、タンパク分解と合成のバランスが崩れて筋萎縮へ傾くと考えられている。

(1) ユビキチン-プロテアソーム系

これまで明らかにされている筋細胞内のタンパク質の分解系は、リソソーム系、Ca²⁺依存性タンパク分解（カルパイン）系、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系がある。これらのなかで、とくにユビキチン-プロテアソーム系の作用による筋萎縮のメカニズムはよく研究されている。筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子 MAFbx (muscle atrophy F-box)/Atrogin-1 と MuRF1 (muscle ring finger 1) などの筋萎縮原因遺伝子 (Atrogenes) は、運動神経切断、不活動や神経筋難病などさまざまな筋萎縮モデルにおいて、その発現が増加することが報告されている。本来、筋萎縮原因遺伝子は筋萎縮を誘導するために存在しているのでなく、筋のタンパク合成と平衡状態を維持することで骨格筋を一定の大きさに保持している。しかし老化に伴うさまざまな体内環境の変化、すなわち栄養状態、運動不足による不活動、筋細胞から分泌される TNF α などの炎症性リンホカインの上昇など複数のシグナル経路の働きにより、筋萎縮原因遺伝子の転写が促進される(図 2.2)。筋萎縮原因遺伝子は筋特異的に発現しているが、それぞれの遺伝子をノックアウトしたマウスは、坐骨神経切除による筋萎縮に抵抗性を示す。細胞内の AMP 濃度センサーである AMP キナーゼが活性化すると、転写因子 FOXO

(forkhead box O) のリン酸化が抑制されて細胞質から核内移行が可能となり、Atrogin-1 と MuRF1 の転写活性が誘導される。一方、運動不足や不活動により pGC1- α が減少すると、ミトコンドリアの生成が抑制され AMP/ATP の比が上がり、FOXO の核内移行が可能になり、さらに pGC1- α が抑制していた FOXO の転写が増加し、Atrogin-1 と MuRF1 の転写活性が誘導される。また、pGC1- α が減少すると骨格筋で産生される TNF α が増加して、MuRF-1 の転写が促進される。

著者らの解析によると、老化マウスの長趾伸筋(タイプ II a, II b, II x で構成)において筋萎縮原因遺伝子 (MuRF1) の発現がタイプ II b 速筋線維で増強し、その他の筋線維では発現変化を認めなかった。したがって、ユビキチン-プロテアソーム系は筋線維のすべてではなく、一部の筋線維タイプにおいて加齢による筋萎縮や筋力低下に関与していると考えられる。

(2) オートファジー

ユビキチン-プロテアソーム系は標的タンパクを種類ごとに認識して、ATP を消費してタンパクを分解するが、オートファジーはタンパクを含む細胞質内の成分や巨大なオルガネラなどの細胞質内の一部を無作為に分解する。オートファジーは飢餓状態などのストレス下において生存に必要なエネルギーの確保やタンパクの合成のために、細胞内成分を分解してアミノ酸を確保して再利用する役割を担う。ヒトの体重の 40% を占める骨

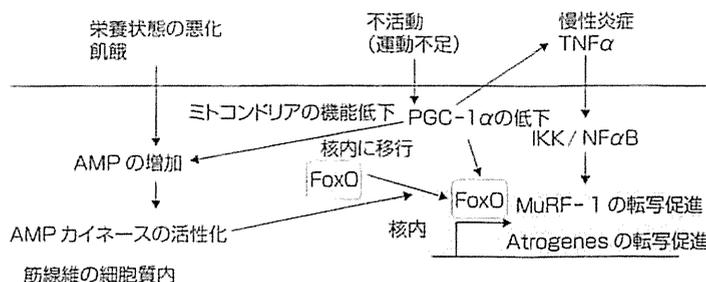


図 2.2 筋線維の筋萎縮原因遺伝子発現を誘導するシグナル経路

格筋の筋細胞内のオートファジーは、飢餓状態の生命維持に重要な役割を果たしてきた。加齢によりオートファジーの活性が低下するかどうか、また骨格筋の加齢に伴うオートファジーの活性変化や役割についてはまだよくわかっていない。

(3) マイオスタチン

生体には筋の肥大化を抑制する機構が存在する。マイオスタチンは1997年にその機能が明らかにされたTGFβスーパーファミリーに属している。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が、タンパク分解酵素で処理されて活性型となる。その受容体(アクチンタイプII受容体)はセリン/スレオニンキナーゼ活性を有しており、リガンド結合により活性化されたシグナルはSmad2とSmad3、およびp38MAPK(mitogen-activated protein kinase)の二つのカスケードを伝わり、筋萎縮原因遺伝子の転写活性を誘導する(図2.3)。Smad2/3は転写因子で、DNAに直接結合して標的遺伝子の転写を誘導するだけでなく、FOXOと直接結合して遺伝子発現を制御する。マイオスタチンは筋細胞特異的に作用するが、TGFβ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。

老化モデル動物の血中および骨格筋内ではTGFβが増加するが、マイオスタチンは変化しない。

また、TGFβとマイオスタチン受容体の下流シグナルのSmad3とp38MAPKの活性化が報告されているが、ユビキチン-プロテアソーム系の活性化については相反する結果が示されている。一方、高齢者の骨格筋でマイオスタチン発現とユビキチン-プロテアソーム系の遺伝子発現が増加することが報告されており、マイオスタチンが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。

マイオスタチンを阻害する分子はサルコペニアや筋ジストロフィーを含む神経筋難病の治療薬として注目されている。阻害分子は、マイオスタチン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やその改変分子、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ンタイプII受容体の細胞外領域(ACVR2B-Fc)などがある。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、肥大を誘導して筋力を増加することが証明されている。

(4) IGF-1

IGF-1(insulin-like growth factor-1)は骨格筋のタンパク合成を促進させて骨格筋の肥大を誘導する。IGF-1受容体は受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドとIGF-1が受容体と結合すると細胞膜内の内在性チロシンキナーゼが活性化される。その活性化シグナルが下流に伝わり、PI3

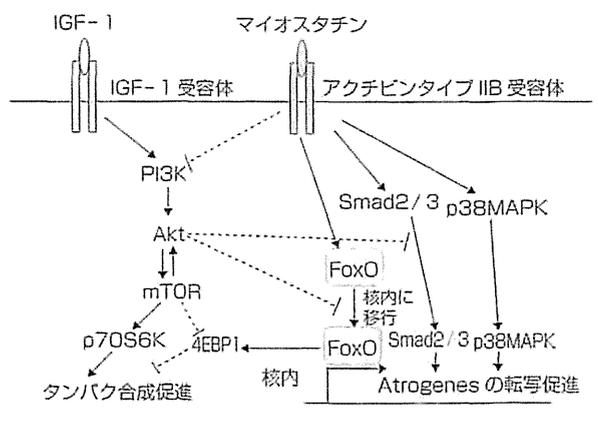


図2.3 マイオスタチンとIGF-1のシグナル伝達のクロストーク

キナーゼ (phosphatidylinositol-3-kinase), Akt-1, mTOR (mammalian target of rapamycin), p70S6 キナーゼのシグナルカスケードが活性化され、転写活性やリボソーム生成が増加してタンパク合成が促進する (図 2.3). mTOR は筋肥大制御の中心的役割を果たしており、4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4-binding protein 1) をリン酸化して、4EBP1 と結合していた eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) が離れることで転写活性が亢進する. IGF-1 受容体から Akt-1 を介さないで mTOR を活性化するカスケードも存在する.

IGF-1 はタンパク合成だけでなくユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解を抑制することで筋肥大を誘導する (図 2.3). IGF-1 で活性化された Akt-1 (セリン/スレオニンキナーゼ) により FOXO がリン酸化される. その結果、リン酸化 FOXO の核内移行が抑制されて筋萎縮原因遺伝子の発現が減少する. mTOR は上流の Akt-1 をリン酸化して、活性化された Akt-1 は転写因子の Smad3 をリン酸化することで Atrogen-1 の発現を抑制する.

老化モデル動物の筋では IGF-1 受容体の発現が増加しているが、リン酸化 IGF-1 受容体のベースラインは若い動物と変化がないことが報告

されている. また、下流の Akt-1/mTOR シグナルおよび p70S6 キナーゼの活性化状態の変化については、相反する結果が報告されている. 著者らの解析では、若齢マウスと比較して、老齢マウスの月齢、骨格筋の部位、筋線維タイプにより MuRF-1 発現や p70S6 キナーゼのリン酸化が異なることを観察している. 骨格筋におけるシグナル伝達を本質的に理解するためには、筋全体の均一な系としてではなく、技術的には困難であるが筋線維タイプごとに解析して理解する必要がある.

2.1.5 骨格筋組織幹細胞 (サテライト細胞)

骨格筋は、胎児期の中胚葉細胞塊で構成される体節 (筋節) の筋前駆細胞が遊走と増殖を行い、細胞融合と成熟過程を経て多核の筋線維へ分化して形成される. 成体の骨格筋では基底膜 (骨格筋組織幹細胞ニッチ) と筋線維の間に、転写因子 Pax7 を発現する単核のサテライト細胞が存在しており、通常では細胞分裂の静止状態を維持している (図 2.4). 骨格筋損傷や過負荷を受けると増殖因子やサイトカインの刺激で速やかに活性化され、必要とされる筋核数を確保するために増殖を繰り返し、その後ほとんどの細胞は Pax7 発現を失う一方で、筋分化制御因子の MyoD を発現して筋芽細胞へ分化する. 筋芽細胞は既存の筋線維

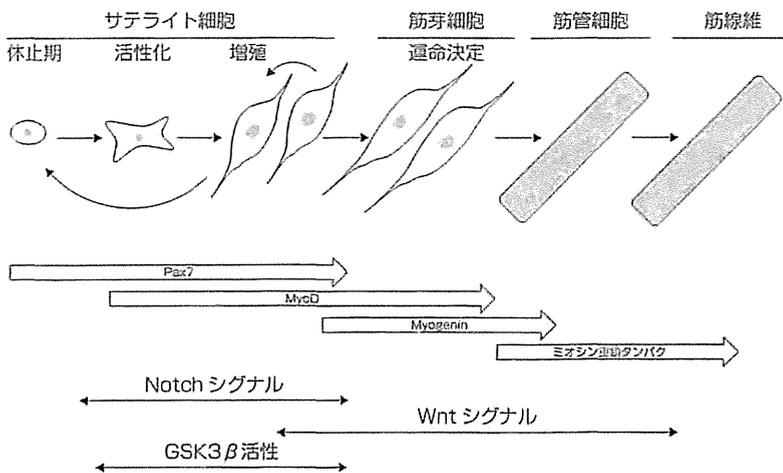


図 2.4 筋細胞の分化に伴う遺伝子発現とシグナル伝達の変化

に融合することで、ミオシン重鎖を発現する筋管細胞へと成熟する。サテライト細胞は骨格筋の維持や修復だけでなく、筋力トレーニングによる筋肥大にも重要な役割を果たす。この筋再生過程で増殖したサテライト細胞の一部は、リザーブが枯渇しないように Pax7 発現を維持したまま MyoD 発現を低下させて、ニッシュに入り、再び細胞分裂の休止期へ入る。近年、サテライト細胞は均一な細胞集団ではなく骨格筋の発生由来の体節遺伝子の影響を受けていることが示唆されている。

骨格筋ではサテライト細胞の数が一定に維持されているが、加齢による数や増殖能の変化については一致した見解が得られていない。筋線維タイプの変化と同様に、骨格筋の部位によりそれらの加齢変化が異なるという報告がある。また *in vivo* において、サテライト細胞の増殖能は細胞自体の加齢変化だけでなく、ニッシュなどサテライト細胞の増殖制御に関与する体内環境が加齢による影響を受ける。近年、スタンフォード大学の T. Rando のグループは、高齢マウスと若いマウスの2匹の血管を縫合することで血液循環を共通にして (parabiotic pairings) 筋損傷による再生能を調べたところ、若いマウスとつながった高齢マウスでは筋再生能が増強し、逆に若年マウスでは筋再生能が低下して筋の線維化が進むことを見いだした⁹⁾。この方法を使い、彼らは Wnt シグナルと Nox シグナルが再生能の低下と線維化に関与することを発見した。さらに、Wnt シグナル伝達を抑制すると筋再生能を回復することを示した。Wnt は発生やがんなどさまざまな生命現象に関与するが、肝臓や肺の線維化を促進する因子としても知られている。Rando らはサテライト細胞から筋芽細胞を経て筋管細胞に分化する過程で、Notch-GSK3 β シグナル依存性の増殖期から、Wnt シグナルにより GSK3 β が非活性化されて非増殖期へ移行することを示した (図 2.4)。Wnt 自体によるシグナル伝達は筋分化の制御過程で重

要な役割を果たしているようである。

Wnt 受容体は、7 回膜貫通型タンパクの frizzled と 1 回膜貫通タンパクの low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) から構成される。Wnt は分泌されるとすぐに細胞表面や細胞外基質に結合して取り込まれるために、作用時間が短いことが知られている。2012 年に小室一成らのグループは、血中の補体成分の C1q が老化マウスの血中で増加しており、frizzled に結合して Wnt シグナルを活性化することを報告した⁹⁾。また、C1q がサテライト細胞の増殖を抑制する一方で、線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を促進することを *in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で証明した。サルコペニアの原因との関連性について今後の解析が注目される。

IGF-1 はサテライト細胞の増殖を促進する作用がある。筋サテライト細胞の増殖を亢進させるメカニズムとして、PI3K/Akt の細胞内シグナル伝達経路の活性化、それに伴い細胞周期抑制因子であるサイクリン依存性キナーゼ (cdk) 抑制因子 p27^{Kip1} の転写活性が FOXO1 のリン酸化によって抑制されることが示された。サルコペニアとの関連については不明であるが、サテライト細胞の機能亢進を促し、高齢期の筋損傷や筋萎縮の薬物による予防治療法として利用できる可能性がある。

2.1.6 マイオカイン

骨格筋からは免疫細胞の機能制御を担う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タンパク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：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、

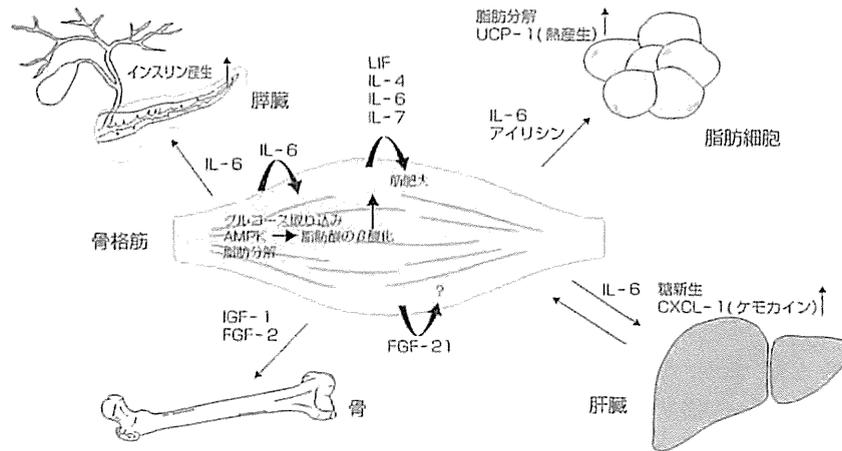


図 2.5 マイオカインの種類とその標的器官
(文献 10 の p. 459, Fig. 2 を改変)

筋などに運ばれて作用する)によりさまざまな役割をしている(図 2.5)¹⁰⁾。近年、新しいマイオカインと機能が次々と報告されているが、未知の分子が存在することが予想されている。マイオカインの産生制御は骨格筋の運動機能や体内の栄養環境と密接な関係がある。マイオカインは生体内でさまざまな代謝機能の調節を行っている。サイトカインで知られていた IL-6 は、最初に骨格筋から分泌されることが報告されたマイオカインである。その後、図 2.5 に示すように既知のサイトカインを含む種々のマイオカインとその機能が明らかにされた。マイオカインと骨格筋の加齢変化との関係については今後の研究課題として残されているが、サルコペニア診断のバイオマーカーや予防・治療法の開発に利用できる可能性があり、注目されている。

(1) IL-6

骨格筋から分泌される IL-6 は、免疫細胞とは異なり TNF α 非依存性に産生され、運動時に骨格筋のエネルギー消費を支援する生体内エネルギーセンサーとして機能する。運動後 30 分に骨格筋内の IL-6 の mRNA 転写が 100 倍程度増加する。骨格筋内のグリコーゲン量が少なくなると

は、IL-6 の mRNA 発現とタンパク分泌がともに増加する。一方で、運動中に糖を摂取すると血中の IL-6 量の増加が抑制される。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 AMP のセンサー分子の AMPK を介して、グルコースの細胞内取り込みが増加する。IL-6 ノックアウトマウスは晩発性に肥満や耐糖能の低下が見られる。また、IL-6 は肝臓に作用して、運動中の糖新生を促進することで骨格筋へのグルコース供給を促進する。膵臓に対しては、消化管ホルモンのグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) の増加を誘導することで、間接的にインスリン分泌を増やして骨格筋の糖利用を促進する。さらに、IL-6 の受容体シグナルは AMPK を介して、筋細胞も含めて全身の脂肪酸の β 酸化を促進する。一方で、運動習慣は骨格筋内のグリコーゲン量と脂肪酸の β 酸化に関わる酵素を増加させ、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。これらの結果、運動トレーニングを受けた骨格筋では、エネルギー産生に血中のグルコースよりも脂肪をより消費するようになる。

運動による IL-6 の増加は血中の TNF α を下げ、

炎症反応作用を沈静化する IL-10 や IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) の産生を増やし抗炎症効果をもたらす。一方で疫学研究から、運動習慣の程度と安静時 (ベースライン) の IL-6 の血中濃度との間に負の相関があることが明らかにされている。耐久トレーニングにより安静時の IL-6 の血中濃度が下がり、また運動負荷後の IL-6 の増加も減少する。また同様に、加齢に伴う四肢筋量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 α 、IL-1 の血中濃度との間に負の相関がある。安静時および運動負荷後の血中 IL-6 の主要な産生部位は骨格筋であり、ともに転写因子共役因子の pGC1- α により負の制御を受けている。運動負荷直後の骨格筋および運動トレーニング (習慣) を受けている安静時の骨格筋では pGC1- α の発現が上昇するが、運動不足の骨格筋や高齢マウスの骨格筋においては対照的に pGC1- α の発現が低下する。pGC1- α がミトコンドリアの生成と維持に重要な役割を果たし、筋線維タイプを変換する機能があることは 2.1.3 項で述べた。

(2) アイリシン

B. Spiegelman らは、pGC1- α 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報告した。さらに彼らはこの機能を誘導する血中分子を同定し、アイリシン (irisin) と命名した¹¹⁾。pGC1- α を過剰発現したトランスジェニックマウスの骨格筋では I 型膜結合タンパクの FNDC5 の発現が増強する。さらに、その細胞外ドメインがタンパク分解酵素で切断され、血中にホルモンとして遊離する。アイリシンは、運動刺激により骨格筋から遊離され、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もつベージュ脂肪細胞 (beige cell) へと変換誘導する。褐色脂肪細胞で発現するミトコンドリア脱共役タンパク 1 (uncoupling protein 1: UCP1) は、ミトコンドリア内膜の酸化リン酸化反応を

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。

(3) その他のマイオカイン

血中の FGF-21 は、おもに肝臓から分泌されて肝臓や脂肪細胞などに対して代謝機能の制御を行うが、筋細胞からも産生される。インスリン刺激により、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)/Akt-1 のシグナルを介して筋細胞からの FGF-21 の産生・分泌を誘導することで、バラクラインやオートクラインにより骨格筋の代謝機能を制御すると考えられる。また T 細胞や B 細胞の機能を制御する IL-7 が、培養筋細胞の上清中から発見された。ウエイトトレーニングにより安静時の骨格筋の IL-7 量が増えることが知られており、サテライト細胞に作用すると考えられるが、機能はまだよくわかっていない。LIF は IL-6 サイトカインのスーパーファミリーに属しており、IL-6 と LIF はサテライト細胞の増殖を誘導して、損傷時の筋肥大や筋再生に作用する。BDNF、カルプロテクチン (calprotectin)、エリスロポエチンや IL-4 は筋芽細胞と筋管細胞の融合を促進して筋再生を促進する。骨格筋と骨との相互作用に働くサイトカインとして IGF-1 と FGF-2 が知られており、それらの受容体は骨格筋と接する骨膜に発現して骨形成に関与することが報告されている。IL-15 も IL-6 と同様に運動刺激で産生が誘導される。IL-15 のトランスジェニックマウスは持久力が増強する。マウス CXCL1 (CXCL-1) はヒト IL-8 とアミノ酸の相同性が高く、ケモカインファミリーに属するが、おもにマクロファージや血管内皮細胞で産生され、炎症反応の白血球遊走や血管新生を誘導する。運動負荷で増加する血中の IL-6 により、肝臓と骨格筋で CXCL-1 の産生が誘導されるが、機能はまだわかっていない。

2.1.7 ホルモンと栄養

(1) 性ホルモン

サルコペニアの成因に関係するホルモンとして男性ホルモン（アンドロゲン）とビタミンDが知られている。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分泌されるが、5%が副腎からも産生される。女性においても微量ではあるが副腎から分泌される。テストステロンはアンドロゲンのなかでも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、核内で転写を制御することで作用効果を現す。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が低下して、筋力や身体運動機能の低下、転倒の増加、生殖機能の低下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ことが報告されている。アンドロゲン低下が筋に及ぼす作用として、筋特異的E3ユビキチンリガーゼ遺伝子であるMuRF-1とAtrogin-1の発現亢進、IGF-1の発現低下、Akt-1シグナル活性の低下、筋アポトーシスの亢進が報告されている。また、アンドロゲンの低下により骨格筋のマイオスタチンの発現抑制効果が減少するため、筋萎縮へと作用する。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。

(2) ビタミンD

ビタミンDは、さまざまな臓器で生理作用を示すホルモン様効果をもつことから、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。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ことが知られており、高齢者への

ビタミンD投与による転倒予防は、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の前駆体はコレステロール代謝産物からつくられ、皮膚で日光の光化学的作用によりビタミンDが生成される。さらにビタミンDは肝臓と腎臓で水酸化されて活性型となる。また、食物に含まれるビタミンDを消化管から吸収する。加齢により生体内のビタミンD合成量は減少する。ビタミンDは脂溶性であるため容易に細胞膜を通過することができ、細胞質内のビタミンD受容体（VDR）と結合した後、速やかに（1~10分以内）核へ移動してさまざまな遺伝子の転写制御を行う¹³⁾。ビタミンDと結合したVDRは、細胞質内ではカルシウム代謝を活性化することで、核内の転写活性化と合わせて、タンパク合成の促進や筋収縮力増強効果をもたらすことがわかっている。ビタミンDの多岐にわたる作用と加齢現象との間の関連性については、今後の研究により明らかにされるであろう。

(3) 栄養

栄養として摂取されたタンパク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、mTORのシグナルを活性化してタンパク合成を促進することで骨格筋の同化を亢進する（図2.6）。また良好な栄養状態においては、mTORの活性化シグナルにより筋細胞のオートファジーは抑制される。一方、低栄養状態を感知

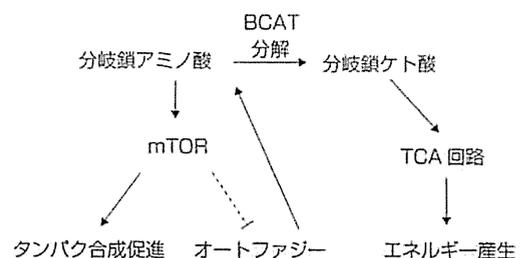


図2.6 分岐鎖アミノ酸（BCAA）による同化作用と異化作用の調節

する細胞内 AMP センサーの AMPK および p53 のシグナル経路は、mTOR に対して抑制的に作用して筋細胞のオートファジーを促進する。その結果、骨格筋の異化作用すなわち筋細胞内のタンパク分解が促進されて体内の栄養環境を維持する。BCAA 代謝の律速段階を担う酵素の分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) は、筋細胞内の BCAA を代謝して、その産物が TCA 回路に供給されエネルギーが産生される。細胞内の BCAA 濃度が下がると、mTOR 活性とタンパク合成が低下して異化が促進する。このように筋細胞は、栄養状態を感知するさまざま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会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置かれたときや、通常的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。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。

2.1.8 サルコペニア肥満と脂肪細胞

サルコペニアと肥満を合併する病態をサルコペニア肥満 (sarcopenic obesity) と呼び、臨床領域で注目されている。その診断基準はいまだ明確に定められてはいないが、単なる運動不足だけでなく、骨格筋、肝臓、膵臓および脂肪細胞など全身の代謝機能システムの加齢による変調が原因で起きる病態と考えられる。実際、脂肪細胞からも、IL-6, TNF α , FGF-21 など前述した筋細胞と同じサイトカインが分泌される。寒冷刺激は脂肪細胞から FGF-21 を分泌させ、オートクラインあるいはパラクラインにより褐色脂肪細胞を活性化し、

白色脂肪細胞をベージュ脂肪細胞へ変換して体熱産生を誘導する。高齢者の外側広筋 (下肢の骨格筋) では筋細胞内の脂肪滴の増加と組織内の脂肪細胞が出現するが、他の部位の骨格筋では必ずしも脂肪細胞の増加は観察されない。また、筋ジストロフィーなどの神経筋難病疾患による筋萎縮、肥満、二次性糖尿病では骨格筋内に異所性脂肪細胞が出現する。しかし、老化モデル動物 (マウス、ラット) の骨格筋内においては顕著な脂肪細胞の出現は観察されていない。

骨格筋内の脂肪細胞の由来は *in vitro* の分化誘導実験からサテライト細胞と考えられていたが、骨格筋の間質に局在している血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α) 陽性の間葉系前駆細胞が異所性脂肪細胞の起源であることが示された¹⁹⁾。さらに、PDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞はコラーゲンを高発現する線維芽細胞へも分化することから、骨格筋の線維化に寄与していることが明らかにされた (図 2.7)。間葉系前駆細胞は健康な骨格筋においては、筋線維の働きにより通常は脂肪細胞への分化が抑制されているが、筋再生の障害や筋線維の機能が減弱すると抑制シグナルが弱まり、間葉系前駆細胞が脂肪細胞へと分化する。逆に、間葉系前駆細胞は通常の状態では IGF-1, IL-4, IL-6 および Wnt を分泌してサテライト細胞から筋細胞への分化を促進することが示唆されている。老化による筋萎縮の病態はこのバランスが崩れて、

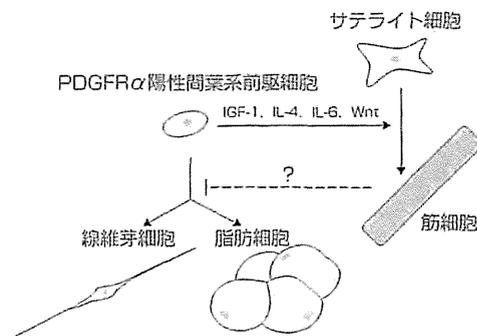


図 2.7 間葉系前駆細胞と筋細胞の相互作用

骨格筋内で脂肪細胞あるいは線維化が誘導されるのかもしれない。

2.2 神経筋シナプス

神経筋シナプスは運動神経細胞からの神経線維終末と骨格筋とのつなぎ目であり、大脳から脊髄を経た随意運動刺激の神経信号を骨格筋に伝え、効率よく筋収縮を誘導する機能を果たしている。個々の筋線維は脊髄前角にある1個の運動神経細胞から伸びる軸索（神経線維）により支配されており、ヒトの場合、その軸索の長さは1mに達するものもある。個々の運動神経細胞は数十の筋線維を神経支配しており、運動単位（motor unit）を構成しているが、骨格筋の部位により数が異なる。一つの運動単位を構成する筋線維は、ほとんどすべて同じ筋線維タイプであることが知られている。近年、神経筋シナプスの加齢変化と筋萎縮の関連性が注目されている。

2.2.1 神経筋シナプスの維持機構

脊髄前角の運動神経細胞から神経線維へと伝わる膜電位変化（ナトリウムイオンの細胞内流入とカリウムイオンの細胞外流出により生ずる電位変化）が神経終末（シナプス前膜）に達すると、細胞膜付近に局在するシナプス小胞（アクティブゾーン）が開いてアセチルコリンが放出される（図2.8、図2.9）。アセチルコリンがシナプス筋側の膜に発現するアセチルコリン受容体に結合すると、そのナトリウムチャネルが開き、ナトリウムイオンが細胞内に流れ込み、脱分極を起こして興奮性シナプス後電位が発生する。脱分極が閾値を超えると、シナプスの内側に多く存在する電位依存性ナトリウムイオンチャネルを一気に開口して、ナトリウムイオンが細胞内に流入して活動電位が発生する（図2.8）。活動電位は筋膜を伝わり、筋小胞体からカルシウムイオンが細胞内に放出されて筋が収縮する。この一連のシグナルは、筋収縮だけでなく骨格筋および神経筋シナプスの維持にも必要である。

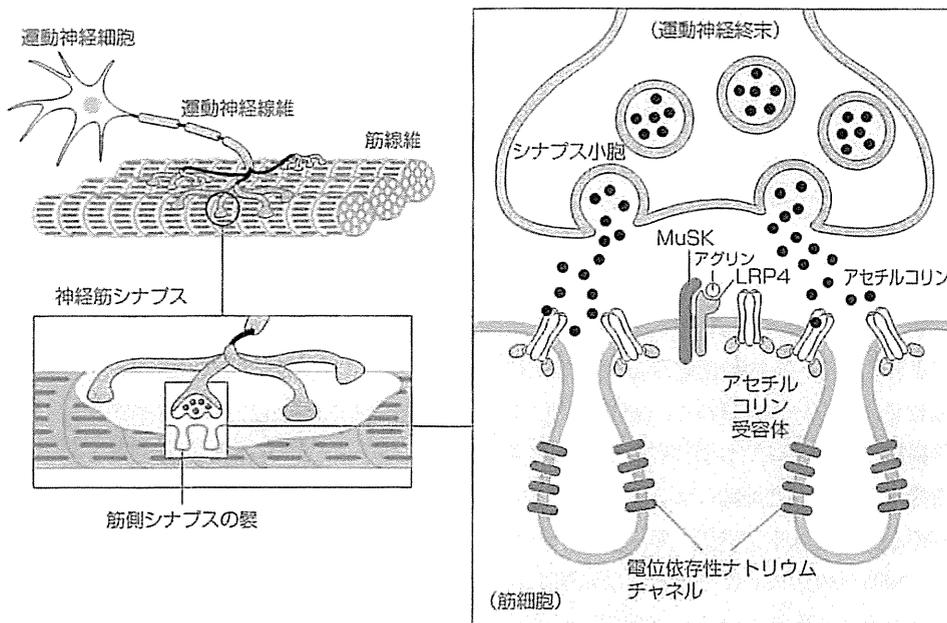


図 2.8 神経筋シナプスの構造と機能分子の局在



図 2.9 運動神経終末のアクティブゾーンとシナプス小胞

透過型電子顕微鏡で撮影した神経筋シナプスの構造。矢印はアクティブゾーンを示しており、その周辺にシナプス小胞が集まっている。

運動神経終末と筋側の双方からさまざまな分子が分泌され、相互に信号を交換して神経筋シナプスの機能と形態を維持する (図 2.8)。運動神経終末側からヘパリン硫酸プロテオグリカンのアグリン (agrin) が分泌され、筋側のシナプスに発現する鬚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、受容体型チロシンキナーゼの MuSK (muscle-specific kinase) と複合体を形成する。そして、この複合体形成が引き金となり MuSK のキナーゼが活性化され、細胞内へシグナルが伝わり、シナプス鬚の先端部のアセチルコリン受容体凝集とシナプス鬚の形成と維持が行われる。2004年に西宗裕史らは、筋側から分泌された細胞外基質タンパクの laminin- β 2 がプレシナプスのカルシウムチャネルと結合してアクティブゾーンの形成・維持の機能を担うことを報告した。2012年に S. Burden のグループは、筋の LRP4 の細胞外ドメインが MMP (matrix metalloproteinase) により切断され、運動神経終末に達して未知の分子と結合することで運動神経終末の機能と形態を維持することを発見した。さらにポストシナプスに存在する MuSK が、神経終末側のポストシナプスへの逆行性シグナルによるアクティブゾーンの機能を制御することが明らか

かにされているが、その分子機構はまだよくわかっていない¹⁴⁾。

2.2.2 加齢による神経筋シナプス形態の変化

加齢により神経筋シナプスの形態変化 (神経終末と AChR 凝集の断片化、神経終末の分岐化、脱神経支配、シナプス鬚の縮退) が、ヒトや老化モデル動物 (ラット、マウス) で共通に観察される。また、プレシナプスのアクティブゾーンの減少が加齢マウスで観察される¹⁵⁾。このような加齢によるシナプス形態変化は、神経伝達分子によるシナプス伝導の効率が低下して運動機能の低下をもたらすと予想されるが、これまでの電気生理学的解析では一致した見解が得られていない。萎縮の著しい筋線維からの活動電位の測定は困難であることから、シナプス形態変化の評価に対して筋線維単位の機能解析は過小評価となることが考えられる。

神経筋シナプスに存在するプロテアーゼの一つニューロトリプシン (neurotrypsin) は、神経終末から分泌され 200 kDa 以上もあるアグリンを切断して 22 kDa の C 末端 (CFA) ペプチドが生じる。ニューロトリプシン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は、筋萎縮が観察され筋の病理組織像がサルコペニアと

類似していた。興味深いことに、CFA はヒトの血清で検出することができるが、69 名の高齢者（女性 47 名）の血清中の CFA 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があり、一方で女性高齢者の相関は弱かった。また、ビタミン D と運動トレーニング負荷後に、CFA 高値の群では有意に CFA の値が下がることが報告された¹⁶⁾。炎症性サイトカインの IL-6 や TNF α はサルコペニアだけでなく急性炎症でも上昇するのに対し、血中の CFA は老化に伴う神経筋シナプスの形態変化と因果関係があり、特異性の高いサルコペニアのバイオマーカーとなる可能性がある。しかしながら、サルコペニアの成因は CFA の増加だけでは説明がつかない。タンパク分解酵素の標的であるアグリンタンパクを過剰発現したトランスジェニックマウスは、自然発症のサルコペニアを予防することができなかつたことから、サルコペニアの原因が多様であることを示している。

2.2.3 神経筋シナプスの可塑性

神経筋シナプスは骨格筋と同様に、本来は可塑性があり再生能も有している。しかし、2.2.2 項に述べたように加齢によりシナプスの形態は変化する。そこで、シナプス形態の加齢変化をカロリー制限や運動負荷により予防することができるかどうか、老化マウスを使った実験で調べた研究がある¹⁷⁾。興味深いことに、カロリー制限をすると全身のシナプス形態が若返るのに対して、運動負荷の場合はトレーニングを受けた筋のシナプスだけが改善した。また、カロリー制限のほうが運動負荷よりもシナプス形態の改善度がよかった。通常、マウスの飼育条件では食事制限はまったくされておらず、カロリー制限が果たしてヒトの老齢期に有効かどうかについて議論がある。マウスのカロリー制限は生後 4 カ月から始めて 24 カ月齢まで連続して行ったが、マウスの最大寿命は

40 カ月以上とされており、ヒトの老年期に相当する時期に開始しても有効かどうかは不明である。運動負荷の場合は、22 カ月齢のマウスに対しては 1 カ月間だけでも形態変化が改善することが確認されている。ヒトもマウスと同様に、老年期の運動習慣によりシナプス形態と運動機能がともに改善するかどうか興味もたれる。

2.2.4 神経筋シナプスと筋線維タイプ変化

筋線維タイプの決定は運動神経細胞から神経筋シナプスを介した固有の運動刺激のパターン（運動刺激信号の頻度の違い）により誘導されるという説が、実験結果を元に広く受け入れられてきた。これは、一つの運動単位が支配する筋線維のほぼすべてが同じ筋線維タイプであることをうまく説明する。加齢により筋線維のタイプが変化することは 2.1.1 項で述べたが、その機構は神経シナプスの再生機能による代償性作用であるという説がある。速筋線維の代表のタイプ IIb 線維を支配する運動神経細胞は大きく、加齢による酸化ストレスなどに対して脆弱である。脱落した IIb 線維を支配する運動神経細胞の運動神経終末を補うため、近傍のタイプ I 線維を支配する運動神経線維や神経終末から代償性に神経線維が脱神経支配された筋線維に伸びて（sprouting）、筋線維タイプがタイプ IIb から I に変換することが報告されている。また実際に、*in vivo* の実験で速筋線維の神経支配を遅筋線維の神経と取り替えると遅筋線維に変化することや、神経支配による運動刺激のかわりに、速筋を支配する運動神経よりも低頻度で筋を電気刺激すると遅筋へ変化することが示されている。

一方で、マウスの骨格筋に pGCl- α を強制発現するとタイプ I 線維が増えることは 2.1.2 項すでに紹介したが、これは運動神経細胞とは関係なく筋線維自体の遺伝子発現変化によるものである。さらに近年の研究により、pGCl- α で強制誘導さ

れたタイプ I 線維から、運動神経終末を介した逆行性シグナルが運動細胞を変化させることが示唆されている¹⁸⁾。神経筋シナプスを介してさまざまな相互シグナルが行き交っており、その加齢変化の研究はサルコペニアのメカニズムをよく理解するために今後も重要な課題である。

2.3 運動神経細胞

加齢に伴う運動神経細胞死がサルコペニアの原因となる可能性が考えられる。高齢者の剖検で、脊髄前根から出る運動神経線維束の径が小さくなり、太い神経線維が選択的に消失することが観察される。1977年に英国のグループが、死亡時に運動機能が保たれていた13歳から95歳までの47人の腰仙髄の運動神経細胞数を計測すると、60歳から運動神経細胞数が減少し始めて、80歳以上になると約25%減少することを報告した(図2.10)¹⁹⁾。また、ラット脊髄の運動神経細胞数も生後20カ月(ヒトの60歳に相当)から減少することが報告されている。このように加齢により運動神経細胞数の減少が起きることは動物種を越えて観察されているが、サルコペニアと診断されたヒトの脊髄の病理組織像と機能を合わせて研究した報告はきわめて少なく、運動神経細胞死の程度と

臨床的症状(筋力低下や筋萎縮に至る閾値)の関係についてはまだよくわかっていない。

ところで、運動神経細胞が急速に変性・脱落して筋萎縮に至る難病疾患として筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)がよく知られている。約90%が非遺伝性であるが、その原因は不明である。四肢あるいは球麻痺(発声、嚥下障害)の症状から始まり、典型的な症例では発症後3~5年で呼吸筋麻痺に至り、生命維持のために人工呼吸器が必要となる。このALSの約5%の患者に認知症を伴う臨床例が存在しており、非アルツハイマー型の認知症である前頭側頭葉認知症(frontotemporal dementia: FTL D)と臨床的にも病理学的にもオーバーラップすることが明らかにされている。ALSとFTLDのほとんどの症例に共通の神経病理学的所見として、神経細胞やグリア細胞内にユビキチン化と異常リン酸化されたTDP-43 [transactivation responsive region (TAR)-DNA-binding protein of 43 kDa]の蓄積が観察される。TDP-43の遺伝子変異で発症する遺伝性ALS患者が発見されていることや、変異型TDP-43のトランスジェニックマウスがALSやFTLDの病態を示すことから、この異常タンパクの凝集化と不溶化による蓄積が非遺伝性のALSとFTLDの病態にも関係していると考え

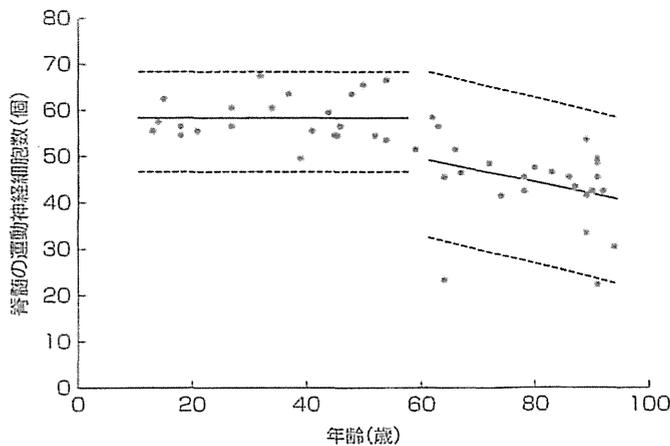


図 2.10 ヒト脊髄の運動神経細胞数の加齢による減少
(文献 19 の p.214, Fig. 1 を改変)

られる。ALSの発症は50~70歳の年齢層に多く、人口の高齢化に伴いALSの患者が増加している。一部の非定型のALSはもともと診断が難しく、将来、サルコペニアとの鑑別が問題となりそうである。老化マウスの体幹、後肢、頸部の神経筋シナプスは加齢による形態変化が顕著で、外眼筋や外肛門括約筋では形態が保たれている²⁰⁾。ALSの病態進行に伴い患者の運動神経細胞が脱落するが、外眼筋を支配する脳幹の動眼神経や外転神経の神経細胞、また外肛門括約筋を支配する仙髄の神経細胞はALSの末期まで保たれることが多く、神経筋シナプスの形態変化と運動神経細胞死との関連性を示唆している。

最後に、筋力低下がアルツハイマー型認知症の発症危険率と関係があることが知られていたが、近年、アルツハイマー型認知症と脳内の代謝調節異常の因果関係も注目されている。加齢による全身の代謝機能の変化は、サルコペニアと認知症の両方の成因に密接な関係があるのかもしれない。

文 献

- 1) Cruz-Jentoft, A. J. et al., *Age Ageing*, **39**, 412 (2010).
- 2) 原田敦ほか, 日本老年医学会雑誌, **49**, 788 (2012).
- 3) Schiaffino, S. et al., *Physiological Reviews*, **91**, 1447 (2010).
- 4) 福永大地ほか, 基礎老化研究, **36**, 47 (2012).
- 5) Wenz, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20405 (2009).
- 6) Ruas, J. L. et al., *Cell*, **151**, 1319 (2012).
- 7) Peterson, C. M. et al., *J. Aging Res.*, **2012**, 194821 (2012).
- 8) Conboy, I. M. et al., *Nature*, **433**, 760 (2005).
- 9) Naito, A. T. et al., *Cell*, **149**, 1298 (2012).
- 10) Pedersen, B. K. et al., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 457 (2012).
- 11) Villarroya, F., *Cell Metab.*, **15**, 277 (2012).
- 12) Girgis, C. M. et al., *Endocr. Rev.*, **34**, 33 (2013).
- 13) Rodeheffer, M. S., *Nature Cell Biology*, **12**, 102 (2010).
- 14) Mori, S. et al., *Am. J. Pathol.*, **180**, 798 (2012).
- 15) Chen, J. et al., *J. Comp. Neurol.*, **520**, 434 (2012).
- 16) Drey, M. et al., *Exp. Gerontol.*, **48**, 76 (2013).
- 17) Valdez, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14863 (2010).
- 18) Chakkalakal, J. V. et al., *Development*, **137**, 3489 (2010).
- 19) Tomlinson, B. E. et al., *J. Neurol. Sci.*, **34**, 213 (1977).
- 20) Valdez, G. et al., *PLoS ONE*, **7**, e34640 (2012).

特集Ⅱ 神経疾患の動物モデルをめぐって

動物モデルによる 重症筋無力症の 病態機序の解明*

森 秀一**
高嶋 留美**
小西 哲郎***
重本 和宏**

Key Words : neuromuscular junction, acetylcholine receptor, muscle-specific kinase, active immunization, passive transfer

はじめに

重症筋無力症(myasthenia gravis: MG)は神経筋接合部に対する自己免疫疾患の代表であり, シナプス後膜上の抗原分子に対する自己抗体によって神経筋伝達が障害され, 筋の易疲労性や脱力が生じる. 自己抗体媒介性の自己免疫疾患とは, ①自己抗体が患者の体内(血中)に特異的に存在する, ②生体内に抗体の標的となる抗原が存在する, ③患者由来の自己抗体を動物に投与すると同様の疾患症状が再現される, ④抗体の標的となる抗原を動物に免疫すると疾患が発症する, ⑤体内の自己抗体量が減少すると疾患症状が改善する, といった基準が満たされる必要があると提唱されており¹⁾, このうち③は疾患移送(passive transfer)モデル, ④は自己免疫(active immunization)モデルと呼ばれる動物モデルを指している. MG患者の血中からはさまざまな抗原に対する自己抗体が検出されているが, それらの病原性や臨床的な意義がすべて理解されているわけではない. そのため, MGを発症さ

せる病原性自己抗体としてのエビデンスを確立するためには, 上記の疾患動物モデルの作成が必須である.

現在までのところ, 病原性を有する自己抗体としてのエビデンスが得られているのは, MG患者全体の約80%に検出される抗アセチルコリン受容体(acetylcholine receptor: AChR)抗体と, 残り一部の患者に検出される抗筋特異的キナーゼ(muscle-specific kinase: MuSK)抗体の2種類である. 本稿では, これら自己抗体によるMGの病態機序に焦点を当て, その解明に疾患動物モデルがどのような役割を果たしてきたのかこれまでの知見を紹介する.

抗AChR抗体で発症するMG (AChR-MG)の動物モデル

MGの疾患モデル動物は, 1973年にPatrickとLindstromが電気ウナギの発電器官から精製したAChR蛋白をウサギに免疫注射し, 全身の筋力低下と筋萎縮症状とともにMG患者で観察される典型的な筋電図(漸減反応)が示されることを報告したのが最初である²⁾. この報告以降, さまざまな実験動物を用いてAChR-MGモデルが作成されているが, 高い発症率を示すラットを用いた報告が多い³⁾. ラットの場合, シブレエイ由来の

* Elucidation of pathogenic mechanism of myasthenia gravis using experimental animal model.

** Shuuichi MORI, Ph.D., Rumi TAKASHIMA & Kazuhiro SHIGEMOTO, M.D., Ph.D.: 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(〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2); Department of Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015, Japan.

*** Tetsuro KONISHI, M.D., Ph.D.: 京都地域医療学際研究所附属病院; Kyoto Interdisciplinary Institute of Community Medicine, Kyoto, Japan.

AChR蛋白を1回免疫することで上記の症状を示すMGが発症する。免疫後1週間程度の時期では一過的な筋力低下を示す頻度が多いが、この急性的な反応は抗体産生によって活性化されたマクロファージなどがシナプス後膜に傷害を加えるために生じる。免疫3~4週間後には炎症性細胞の浸潤はほとんど認められなくなり、大量の抗AChR抗体の産生とともに慢性的な筋無力症状を示すようになる。一方、マウスは発症まで2~3回の追加免疫が必要であり、免疫後早期の一過的反応は生じない。最後の追加免疫から1~2週間程度で慢性的な筋無力症状がようやく現れるが、その症状はラットと比較して穏やかである⁹⁾。しかしながら、マウスモデルはさまざまな遺伝子改変マウスが開発されていることから有用性は非常に高い。

疾患移送モデルは、1975年にToykaらがAChR-MG患者由来の抗体を健常マウスの腹腔内に投与し、神経筋伝達障害が引き起こされることを報告したのが最初である⁹⁾。疾患移送モデルの作成に用いられる抗体は患者由来の血清や精製したIgG分画であるが、自己免疫モデルの動物から回収した抗体を使用することもある。また、MG患者の病原性抗AChR抗体は、AChRの α 1サブユニットの細胞外領域に位置する67~76番目のアミノ酸部分をエピトープ(main immunogenic region : MIR)として認識し、MGを発症させることが明らかとなっている⁹⁾。そのため、MIRを認識するモノクローナル抗体を動物に投与し、MGを発症させることが可能である。

AChR-MGの発症機序

AChR-MGでは、補体系の活性化を介したシナプス後膜の組織破壊によるAChRの減少が主要な発症機序と考えられている。AChRと複合体を形成した自己抗体のFc部分に補体のC1成分が結合して古典的経路が活性化され、最終的に膜侵襲複合体(membrane attack complex : MAC)が神経筋接合部のシナプス後膜を限局的に破壊する。実際に、AChR-MG患者のシナプス後膜では、自己抗体や補体からなる免疫複合体の沈着が検出される⁷⁾。また、電子顕微鏡によって微細構造を観察すると、シナプス間隙の拡大とともに複雑

な膜構造が消失してシナプス後膜が平坦化する。これらの形態変化はAChRの減少によりACh刺激に対するシナプス後膜の感受性を低下させることから、神経筋伝達障害による筋無力症状が現れる。補体系がMGの発症に重要な役割を果たすことはAChR-MGモデル動物で実験的に証明されており、補体成分の遺伝子欠損マウス⁸⁾⁹⁾、補体結合能を有するIgGサブクラスの抗体産生が抑制されるIL-12遺伝子欠損マウスなどは野生型に比べMGの発症頻度が顕著に低い¹⁰⁾。さらに近年、補体成分に対する抗体や補体活性化の阻害薬がAChR-MGの有効な治療薬となる可能性が提示されている¹¹⁾¹²⁾。

また、AChR-MGの発症にかかわる別の機序も報告されている。抗体がAChRと架橋して複合体を形成すると、AChRの細胞内へのエンドサイトーシスと分解が促進される(antigenic modulation)。補体系の活性化を抑えるためにFc部分を除去した抗MIR抗体のF(ab')₂部分をラットに投与すると、穏やかではあるが依然としてシナプス後膜のAChR減少が生じてMGが発症する¹³⁾。そのため、antigenic modulationもAChR-MGの発症に少なからず関与していると考えられている。加えて、自己抗体が受容体のACh結合部位に結合し、イオンチャネル機能を直接阻害する機序が存在することも報告されている。

抗MuSK抗体で発症するMG (MuSK-MG)の動物モデル

2001年に抗AChR抗体陰性MG患者の血中に存在する自己抗体として抗MuSK抗体が同定された。しかし、MuSK-MG患者のシナプス後膜では免疫複合体の沈着や明確なAChRの減少が認められず、電子顕微鏡による観察においてもシナプス間隙の拡大や組織破壊などの形態変化は認めなかった⁷⁾¹⁴⁾。また、MuSK-MGの動物モデルの作成が成功しておらず、抗MuSK抗体の病原性が否定される時期が長く続いた。

しかし、2006年にShigemotoらがMuSK-MGの疾患モデルをウサギではじめて報告して以降¹⁵⁾、抗MuSK抗体の病原性自己抗体としてのエビデンスが徐々に蓄積されている。ウサギモデルに続きマウスのMG疾患モデルが報告され¹⁶⁾、近年は

ラットのモデルも報告されているが¹⁷⁾、疾患として確立されてからの歴史が浅いこともありその報告数はAChR-MGと比較してまだ少ない。現在まで報告されているウサギとマウスのモデルはすべて、培養細胞で作製したMuSKの細胞外領域の組み換え蛋白を2~4回免疫した後にMGが発症する^{15)16)18)~20)}。報告によって追加免疫の間隔は異なるが、おおむね最初の免疫から1~2カ月程度でMGが発症する。発症したマウスは背部や頸部の筋力低下と筋萎縮のために背中湾曲を示し頭部を挙上することができない。また、顕著な体重減少を示す特徴があり、咀嚼や嚥下などの摂食動作が困難であることを反映していると思われる。一方、近年に報告されたラットのモデルは1回のMuSK蛋白免疫でMGの発症が可能であり¹⁷⁾、AChR-MGラットモデルと同様に発症に対する感受性が非常に高い。

抗MuSK抗体がまだ同定されていなかった1994年には、オックスフォード大学グループによる抗AChR抗体陰性MG患者(筆者らはVincent教授にMuSK-MGであることを確認した)由来の抗体を用いたマウスの疾患移送モデル作成の試みが報告されている²¹⁾。この報告では、神経筋標本の電気生理学的解析でシナプス後膜の感受性低下は観察されたが、MGを発症させることができなかった。2008年、自己免疫モデルと同様の筋無力症状を示す疾患移送モデルがColeらによりはじめて報告された²²⁾。一方、モノクローナル抗体でMuSK-MGを惹起する疾患移送モデルは現在までのところ報告されていない。抗原となるMuSKの細胞外領域は三つのIg-likeドメインと一つのfrizzled-likeドメインから構成されており(図1)、最初のIg-likeドメインにMIRが存在すると推測されている²³⁾。

MuSK-MGの病態機序

MuSK-MGにおいて、①自己抗体の主要なIgGサブクラスがIgG4である、②頸部や肩の筋力低下、球麻痺、顔筋や舌筋の萎縮、呼吸筋麻痺などの症状を示す患者の頻度が多い、③コリンエステラーゼ(ChE)阻害薬の治療効果が乏しく難治性である、などAChR-MGとは異なる臨床的な特徴が報告されている。本節ではこれらの点に

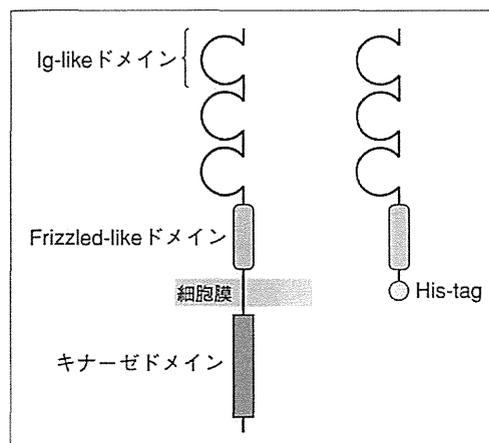


図1 MuSKの分子構造

右の図は筆者らが自己免疫モデルの作成に用いたMuSKの組み換え蛋白の構造である。

着目し、動物モデルによって明らかにされたMuSK-MGの病態機序について紹介する。

1. IgG4抗体の病原性と発症機序

a. 補体系の関与と神経筋接合部の維持機能

MuSK-MGでは、自己抗体の主要なサブクラスはIgG4サブクラスであり、その抗体価は患者の臨床症状の重症度と相関する²⁴⁾。しかし、IgG4は補体結合能がなく、MuSK-MG患者の生検筋の病理所見からもシナプス後膜の組織破壊による発症機序を説明できない。2006年にはじめてMuSK-MGの自己免疫モデルが報告されたが、これらの動物で産生される抗MuSK抗体には補体結合能を持つIgGが含まれているため、患者とは異なる機序でMGが発症している可能性も指摘されていた。

これらの疑問に対し、筆者らは補体成分の遺伝子欠損マウスを用いてMuSK-MGの自己免疫モデルを作成し、補体系の活性化が発症に必須ではないことを示した¹⁸⁾。MuSK-MGモデル動物の神経筋接合部を電子顕微鏡で観察すると、シナプス膜の減少やシナプス後膜の平坦化が確認されるが、シナプス間隙の拡大といった補体活性化を介した組織破壊を示す形態変化は認められない。光学顕微鏡による観察では、蛍光標識リガンドによるAChRの著しい染色性の低下と、通常は馬蹄形を成している凝集体の断片化と散乱が観察された。また、AChR-MGとは異なり、運

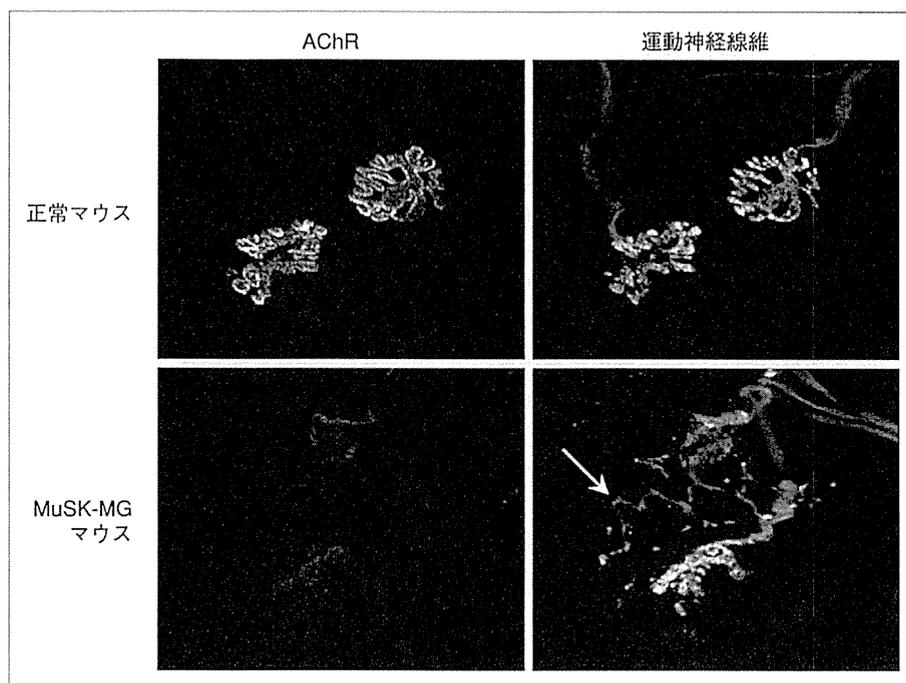


図2 MuSK-MGによる神経筋接合部の形態変化

MuSK-MGマウスの神経筋接合部では、蛍光標識した α -ブングロトキシンで染色されるAChRの凝集が散乱・消失している。また、運動神経線維のsprouting(矢印)が生じている。

動神経終末の縮小や神経線維のsprouting(軸索の分枝と伸展)といったシナプス前側の形態異常が顕著である(図2)。

シナプス前側の機能的な異常も電気生理学的解析で検出されており、MuSK-MGの神経筋伝達障害はシナプス後膜の感受性低下とシナプス前側の機能障害によって生じる。AChR-MGの患者または動物モデルの神経筋標本を用いた解析では、シナプス後膜の感受性低下に対して神経終末から放出されるACh量の増加が認められた²⁰⁾²⁵⁾。このACh放出量の増加はシナプス後膜の障害を補う代償的なシナプス前機能の亢進と考えられており、筋側から神経側へと作用する逆行性シグナル伝達の存在を示している。一方、MuSK-MGの患者または動物モデルの神経筋標本では、シナプス後膜の感受性低下は認められるがACh放出量は減少または変化しないことから^{18)20)26)~28)}、シナプス前機能を亢進させる逆行性シグナルが抑制されたと考えられる。MuSKはagrinによるAChRの凝集化を誘導・維持するなど(図3)、神経側から筋側へと作用する順行性シグナル伝達

の中心的役割を担うだけでなく、逆行性シグナル伝達を介した神経筋接合部の維持に必要な分子であることをMuSK-MGのモデル動物は示している。そのため、自己抗体によるMuSKの双方向性のシナプス維持機構の抑制がMGの発症機序であり、補体系は必ずしも発症に必要ではないと考えている。

b. 抗原結合部位が一価の抗体による発症機序

IgG4は生体内で別の抗原を認識するIgG4抗体分子と半分の構造を交換し、機能的に抗原結合部位(Fab)が一価の抗体となる性質(Fab arm exchange)を有する²⁹⁾(図4)。そのため、MuSK-MG患者の体内には二価と一価の抗MuSK IgG4抗体が存在しているが、抗原分子を架橋できない一価抗体はantigenic modulationをひき起こすことが難しいため、IgG4サブクラスによる発症機構は不明であった。

この疑問に対し、筆者らは自己免疫モデル動物由来のIgG抗体(二価)とFab抗体(一価)の両方がagrinによるAChRの凝集化を抑制することをin vitroの実験で発見しており、MuSK-MG患者の一

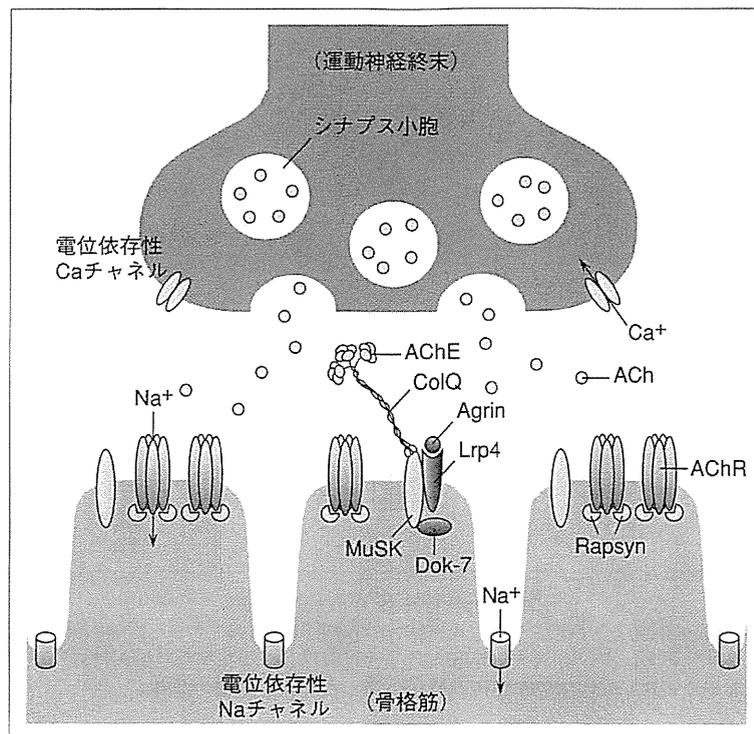


図3 神経筋接合部の分子機構

MuSKはシナプス後膜のAChRの凝集化において必須の分子であり、AChRとともに神経筋接合部の筋側のシナプス膜の頂上部に凝集している。MuSKの活性化を介した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と直接結合せず、MuSKと同様にシナプス後膜に存在するLrp4に結合し、これらが細胞外領域で複合体を形成してMuSKを活性化している。さらに、MuSKはアダプター蛋白のDok-7によって細胞内からも活性化され、その下流においてさまざまなキナーゼ分子を動員し、最終的にAChRのβサブユニットがリン酸化される。βサブユニットのリン酸化はアクチン細胞骨格系の再構築を促し、AChRの凝集化を誘導する。加えて、足場蛋白のrapsynが形成されたAChR凝集を安定化している。

価と二価のIgG4自己抗体がMuSKの機能を抑制する可能性を示した³⁰⁾。また、Fab抗体はagrinによるMuSKの活性化を抑制するのに対し、IgG抗体はMuSKの活性化をむしろ亢進することから、一価と二価の自己抗体は異なる分子機序を介してMuSK-MGを発症することがわかった。

Kloosterらは、MuSK-MG患者の血漿から分離精製したIgG1～3とIgG4の各分画をマウスに投与した結果、IgG4を投与したマウスのみでMGが発症したことから、抗MuSK IgG4抗体が主要な病原性抗体であると報告した²⁶⁾。また、IgG4抗体がagrin刺激に伴うMuSKとLrp4の結合を抑制するとin vitroで示した²³⁾。AgrinによってMuSK

が活性化される際、Lrp4との間で形成される複合体の立体配置が変化するとされていることから³¹⁾、IgG4抗体による立体構造変化を伴う活性化プロセスの障害が予想される。しかし、別の研究グループではIgG1～3分画もagrinによるAChRの凝集化を抑制すると報告しており³²⁾、ほかのIgGサブクラスの二価の自己抗体も病原性に関与していると考えられる。

2. 症状の限局性

MuSK-MG患者は四肢の筋力低下や易疲労性の症状は少なく、球麻痺や呼吸筋麻痺、眼瞼下垂など筋力低下の症状が限局的に現れるという特徴があるが、動物モデルでは、筋の部位によ

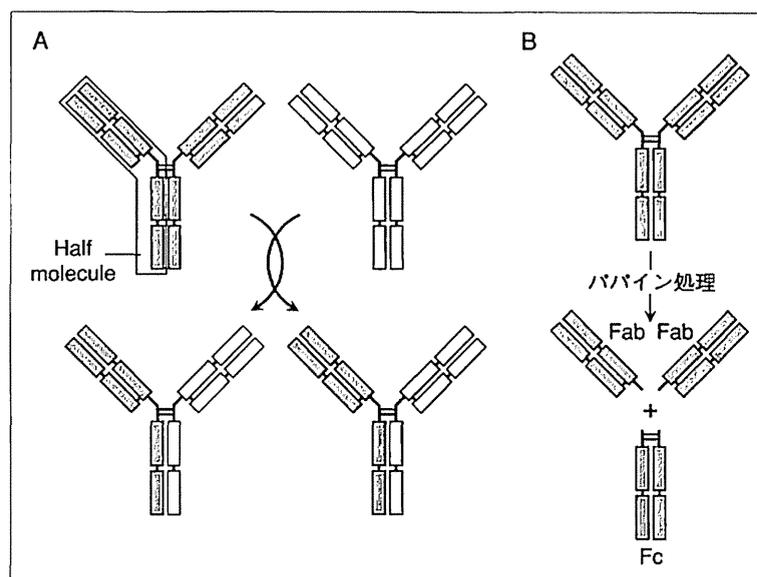


図4 IgG4のFab arm exchange

A: IgG4はヒンジ部のジスルフィド結合が構造的に不安定であるためhalf moleculeになりやすく、別のIgG4のhalf moleculeと再結合して抗原結合部位が機能的に一価となる。B: 筆者らがin vitroの解析で用いた一価と二価の抗体。

て神経筋接合部の形態変化に差が認められている。Xuらは筋の部位によって胎生期の神経筋接合部の形成速度が異なる点に着目し、形成速度が速い肋間筋や前頸骨筋と比較して、形成速度の遅い横隔膜や胸鎖乳突筋の方がMGによるAChRの減少が大きいことを報告している³³⁾。また、PungaらはMuSK mRNAの発現レベルが筋の部位によって異なることを示し、MGによる神経筋接合部の形態変化の程度と筋のMuSK発現レベルの間に関連を見出している¹⁹⁾。この報告では、MuSKの発現レベルが低い咬筋や頸部の筋でAChR凝集の断片化や散乱が激しいと示されており、嚥下や咀嚼など摂食動作の障害が動物モデルで生じる体重減少の主要な原因であることを示唆する根拠となっている。対照的に、MuSKの発現レベルが高い筋の神経筋接合部では、自己抗体のMuSK抑制作用に対する代償的反応が生じやすいため、神経線維のsproutingが多く観察されると報告している。一方、MuSK-MG患者の生検筋を用いた研究では、神経筋接合部での明確なAChRの減少は認められていない⁷⁾¹⁴⁾。神経筋接合部の形態変化に好発部位があることを考慮すると、症状の強い筋で生検することが理想的であるが、球麻

痺が主症状であるMuSK-MGでは困難な状況にあることを反映しているのかもしれない。

3. ChE阻害薬の効果

ChE阻害薬はアセチルコリンエステラーゼ(AChE)を抑制してシナプス間隙のACh濃度を高め、シナプス後膜の感受性を亢進させて筋無力症状を改善する対症治療薬である。しかし、MuSK-MGの治療においては効果が乏しいばかりでなく、コリン作動性クリーゼなど過敏症が現れることもあり、AChR-MGに対する効果とは対照的である。ChE阻害薬によって生じる過敏反応は筋電図測定時の異常波形として観察されるが、MuSK-MGマウスにおいても同様の筋電図所見が認められており¹⁸⁾³⁴⁾、患者の症状を忠実に反映していると考えられる(図5)。MuSK-MGマウスのシナプス後膜ではコラーゲンQ(CoIQ)とAChEの減少が認められ、神経筋標本を用いた電気生理学的解析でもAChE機能低下による変化が計測された¹⁸⁾³⁵⁾。MuSKはCoIQとの結合を介し、AChEをシナプス後膜に係留する役割を担っていることから³⁶⁾、自己抗体がMuSKに結合してAChEの発現減少または機能低下をひき起こすと推測される¹⁸⁾³⁵⁾。さらに、in vitroの実験では、MuSK-