

図5 ChE阻害薬投与によるMuSK-MGマウスの過敏反応  
MuSK-MGマウスにChE阻害薬のネオスチグミンを投与して反復神経刺激による誘発筋電図を測定すると、反復性の複合筋活動電位(CMAP)による漸減反応が現れる(囲み部分)。終板AChE欠損症の患者でも同様の筋電図所見が認められている。(文献<sup>19)</sup>より改変引用)

MG患者由来のIgG抗体がMuSKとColQ/AChE複合体の結合を抑制すると報告された<sup>35)</sup>。以上の結果は、MuSK-MG患者に対してChE阻害薬の治療効果が乏しく過敏症が現れやすい原因を示している。動物モデルとは対照的に、MuSK-MG患者の生検筋ではAChEの機能低下を推測できる根拠は現在までのところ得られていない。これら所見の違いが、生検する部位の違いによるものなのか、または異なる作用機序の関与を示唆しているのかは不明であるが、その疑問を解明するためにも動物モデルの活用が重要になるであろう。

### おわりに

本稿では、重症筋無力症(MG)の病態機序の解明において動物モデルが果たしてきた役割を紹介した。また、筆者らはこれまで病態機序の解明だけでなく、MuSK-MGの対症治療における新たな薬物の有効性も動物モデルで示している<sup>37)</sup>。また、MGの新たな自己抗体として抗Lrp4抗体が発見されたが、最近、Lrp4-MGの動物モデル作成が報告された<sup>38)</sup>。モデル動物を使った詳細な病態機序の理解は、より効果的な治療薬・治療法の開発につながることから、新たな治療指針を確立するための基盤として疾患モデルは今後もますます重要な役割を果たすであろう。

### 文 献

- 1) Drachman DB. Autonomic "myasthenia": the case for an autoimmune pathogenesis. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 797-9.
- 2) Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973 ; 180 : 871-2.
- 3) Link H, Xiao BG. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev* 2001 ; 184 : 117-28.
- 4) Baggi F, Antozzi C, Toscani C, Cordiglieri C. Acetylcholine receptor-induced experimental myasthenia gravis : what have we learned from animal models after three decades? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012 ; 60 : 19-30.
- 5) Toyka KV, Brachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis : passive transfer from man to mouse. *Science* 1975 ; 190 : 397-9.
- 6) Luo J, Taylor P, Losen M, et al. Main immunogenic region structure promotes binding of conformation-dependent myasthenia gravis autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor conformation maturation, and agonist sensitivity. *J Neurosci* 2009 ; 29 : 13898-908.
- 7) Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2005 ; 57 : 289-93.
- 8) Christadoss P. C5 gene influences the development of murine myasthenia gravis. *J Immunol* 1988 ; 140 : 2589-92.
- 9) Tüzün E, Scott BG, Goluszko E, et al. Genetic evidence for involvement of classical complement path-

- way in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2003 ; 171 : 3847-54.
- 10) Karachunski PI, Ostlie NS, Monfardini C, Conti-Fine BM. Absence of IFN-gamma or IL-12 has different effects on experimental myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2000 ; 164 : 5236-44.
  - 11) Zhou Y, Gong B, Lin F, et al. Anti-C5 antibody treatment ameliorates weakness in experimentally acquired myasthenia gravis. *J Immunol* 2007 ; 179 : 8562-7.
  - 12) Soltys J, Kusner LL, Young A, et al. Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2009 ; 65 : 67-75.
  - 13) Loutrari H, Kokla A, Tzartos SJ. Passive transfer of experimental myasthenia gravis via antigenic modulation of acetylcholine receptor. *Eur J Immunol* 1992 ; 22 : 2449-52.
  - 14) Selcen D, Fukuda T, Shen XM, Engel AG. Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004 ; 62 : 1945-50.
  - 15) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1016-24.
  - 16) Jha S, Xu K, Maruta T, et al. Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *J Neuroimmunol* 2006 ; 175 : 107-17.
  - 17) Richman DP, Nishi K, Morell SW, et al. Acute severe animal model of anti-muscle-specific kinase myasthenia : combined postsynaptic and presynaptic changes. *Arch Neurol* 2012 ; 69 : 453-60.
  - 18) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, et al. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 798-810.
  - 19) Punga AR, Lin S, Oliveri F, et al. Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice. *Exp Neurol* 2011 ; 230 : 207-17.
  - 20) Viegas S, Jacobson L, Waters P, et al. Passive and active immunization models of MuSK-Ab positive myasthenia : electrophysiological evidence for pre and postsynaptic defects. *Exp Neurol* 2012 ; 234 : 506-12.
  - 21) Burges J, Vincent A, Molenaar PC, et al. Passive transfer of seronegative myasthenia gravis to mice. *Muscle Nerve* 1994 ; 17 : 1393-400.
  - 22) Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, Phillips WD. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* 2008 ; 63 : 782-9.
  - 23) Huijbers MG, Zhang W, Klooster R, et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 20783-8.
  - 24) Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol* 2008 ; 195 : 151-6.
  - 25) Plomp JJ, Van Kempen GT, De Baets MB, et al. Acetylcholine release in myasthenia gravis : regulation at single end-plate level. *Ann Neurol* 1995 ; 37 : 627-36.
  - 26) Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012 ; 135 : 1081-101.
  - 27) Niks EH, Kuks JB, Wokke JH, et al. Pre- and postsynaptic neuromuscular junction abnormalities in musk myasthenia. *Muscle Nerve* 2010 ; 42 : 283-8.
  - 28) Morsch M, Reddel SW, Ghazanfari N, et al. Muscle specific kinase autoantibodies cause synaptic failure through progressive wastage of postsynaptic acetylcholine receptors. *Exp Neurol* 2012 ; 237 : 286-95.
  - 29) van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007 ; 317 : 1554-7.
  - 30) Mori S, Yamada S, Kubo S, et al. Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanisms in a rabbit model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2012 ; 244 : 1-7.

- 31) Zong Y, Zhang B, Gu S, et al. Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 247-58.
- 32) Koneczny I, Cossins J, Waters P, et al. MuSK myasthenia gravis IgG4 disrupts the interaction of LRP4 with MuSK but both IgG4 and IgG1-3 can disperse preformed agrin-independent AChR clusters. *PLoS One* 2013 ; 8 : e80695.
- 33) Xu K, Jha S, Hoch W, Dryer SE. Delayed synapsing muscles are more severely affected in an experimental model of MuSK-induced myasthenia gravis. *Neuroscience* 2006 ; 143 : 655-9.
- 34) Chroni E, Punga AR. Neurophysiological characteristics of MuSK antibody positive myasthenia gravis mice : focal denervation and hypersensitivity to acetylcholinesterase inhibitors. *J Neurol Sci* 2012 ; 316 : 150-7.
- 35) Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011 ; 77 : 1819-26.
- 36) Cartaud A, Storchlic L, Guerra M, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004 ; 165 : 505-15.
- 37) Mori S, Kishi M, Kubo S, et al. 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2012 ; 245 : 75-8.
- 38) Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2012 ; 69 : 445-51.

\* \* \*

# サルコペニア発症における神経系の関与

Involvement of the nervous system in sarcopenia onset



重本和宏(写真) 森 秀一

Kazuhiro SHIGEMOTO and Shuichi MORI

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

◎サルコペニア(sarcopenia)はもともとは骨格筋量が減少する病態を示していたが、最近では筋量だけでなく筋力と身体運動能力も低下する病態を示す老年病態候群の概念としてとらえられている。サルコペニアの原因は多因子であり、統一的にその機序を理解することは非常に困難である。認知症は病理学的な診断に基づき疾患が分類されその分子機構の研究が進められているが、サルコペニアについても同様なアプローチによる研究が必要である。このような背景のなかで、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の役割をもつ神経筋シナプスの研究がサルコペニアや神経筋難病による筋萎縮の病態メカニズムと関連していることから、注目されている。筋萎縮の原因にかかわらず、その早い過程で運動神経細胞と筋線維との相互作用の変化が神経筋シナプスの機能と形態に影響を与える。本稿では、まず神経筋シナプスの役割と維持の分子機構を紹介して、運動神経細胞の役割も含めサルコペニアとの関連について概説する。



サルコペニア, 神経筋シナプス, 逆行性シグナル, 運動神経細胞

## ● 神経筋シナプスの役割

神経筋シナプスは大脳から発した随意運動刺激の神経信号を、脊髄の前角にある運動神経細胞から骨格筋線維に伝達して筋収縮を誘導する(図1)。脊髄前角に存在する個々の神経細胞から骨格筋へ伸びる軸索(神経線維)はヒトの場合で長さが1 mに達することもあるが、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)を構成する。骨格筋の筋線維はヒトの場合は2種類の速筋と1種類の遅筋に分類され、ひと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。運動神経細胞の細胞体は神経細胞のなかでも大きく、ヒトでは直径3~18 μmあり、その長さの特徴と併せて加齢も含めて生体内のさまざまなストレスに弱い原因とされている。運動神経細胞から神経線維を伝わる膜電位変化(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で生じる電位変化)が神経線維の終末部に達すると、その細胞膜付近に局在するシナプス小胞(アクティブゾーン)が開口する

ことで神経伝達分子のアセチルコリンが放出される<sup>1)</sup>(図2)。運動神経終末は筋線維と約50 nm離れて接しており、その間隙にはラミニンなどのさまざまな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。

## ● 神経筋シナプスを介した筋線維と運動神経細胞の相互作用

運動神経終末部と筋線維の間の相互作用はシナプスだけでなく、運動神経細胞および筋の機能維持に重要な役割を果たすことが報告されている。運動神経終末側から agrin(ヘパリン硫酸プロテオグリカン)が分泌され、シナプスの対面側にある筋側のシナプス襲の先端部に集積して発現している LRP4 [low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein 4] と結合すると受容体型チロシンキナーゼの MuSK (muscle-specific kinase) との複合体形成を誘導して活性化する<sup>2,3)</sup>(図1)。そして細胞内ヘシグナルが伝わりシナプス襲の先端部のアセチルコリン受容体の凝集とシ

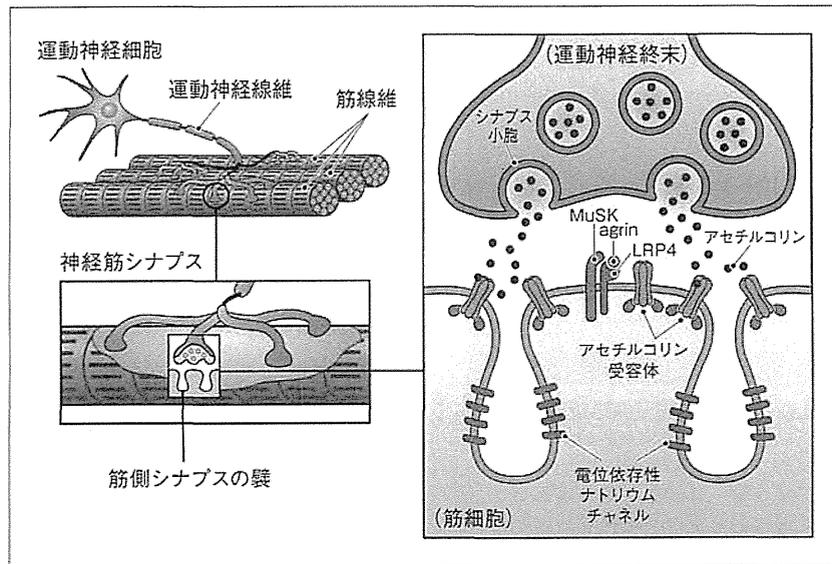


図 1 神経筋シナプスの構造と分子の局在

神経筋シナプスは運動神経線維の終末部と骨格筋を構成する筋線維の間で、運動神経伝達分子(アセチルコリン)のほかさまざまな分子を介してシナプスを維持している。運動神経終末から分泌された agrin は、シナプス後膜の襞先端部に集積している Lrp4 蛋白に結合して MuSK を活性化する。MuSK の活性化によりアセチルコリン受容体の集積と局在化、シナプス襞の維持など形態と機能が維持される。

ナプス襞を維持する。Agrin は神経伝達分子と同じ順行性の分泌シグナル分子であるが、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明らかにされている。細胞外基質蛋白の laminin- $\beta$ 2 が運動神経終末の Ca 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<sup>4)</sup>。そのほか、MMP(matrix metalloproteinase)により切断された LRP4 の細胞外ドメインが、運動神経終末に達して未知の分子と結合して運動神経終末の機能と形態を維持することが報告されている<sup>5,6)</sup>。さらに、MuSK も逆行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が、その分子機構はまだよくわかっていない<sup>7)</sup>。何らかの原因で骨格筋の機能が障害されると、逆行性シグナルの機能が弱まりシナプスの形態と機能が障害され、神経伝達の効率がさらに減弱して筋萎縮が誘導されるという悪循環の機構が考えられている。

### 加齢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 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)で共通に観察される<sup>8,9)</sup>(図 3)。また、老化モデル動物の神経終末部のアクティブゾーンが加齢で減少することが報告されていることから、シナプスの形態だけでなく機能も低下していると考えられる<sup>10)</sup>。シナプス形態変化は加齢により進行するが、マウスでは骨格筋の部位により程度が異なり、体幹、後肢、頸部のシナプスは形態変化が顕著で、外眼筋や外肛門括約筋では形態が保たれている<sup>11)</sup>。興味深いことに、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: 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、外肛門括約筋を支配する仙髄の神経細胞は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の原因との関連性を示唆しているのかもしれない。また、運動神経細胞死に至る前の機能障害の時期に、神経伝達分子によるシナプス伝導の効率を低下させて骨格筋の運動機能低下や筋萎縮を引き起こす可能性もある。

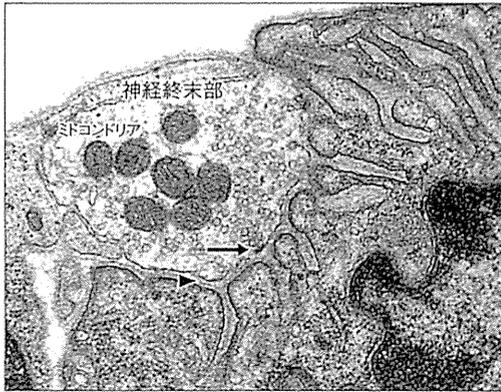


図 2 神経筋シナプスの電子顕微鏡画像

矢印が示す黒い部位が神経終末部のアクティブゾーンで、シナプス小胞が集積しているのがみえる。アクティブゾーンからアセチルコリンが分泌され、対面にあるシナプス後膜の鬚先端部に発現している受容体に結合して運動刺激が筋線維に伝わる。シナプス間隙の中間にみえる細胞外マトリックスに agrin も沈着している(矢頭)。

## ● 神経筋シナプスとサルコペニアのバイオマーカー

セリンプロテアーゼの neurotrypsin は精神遅滞の原因遺伝子のひとつで、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が<sup>12)</sup>、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<sup>13,14)</sup>。これまで知られている neurotrypsin の生体内の標的基質は agrin だけであり、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(C-terminal agrin fragment : CAF)が生じる<sup>15)</sup>。この 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 sarcopenia と類似していた<sup>16)</sup>。興味深いことに、切断された CAF はヒトの血清に存在しており、モノクローナル抗体で測定することが可能である。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が認められたが、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 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となる可能性がある。しかし、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 遺伝子の欠損マウスおよび 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サルコペニアを抑制することができなかった<sup>16)</sup>。ヒトの場合、二次的なサルコペニアの成因によっても結果的に血中の CAF 産生が減少してバイオマーカーとして利用できるかもしれないが、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難しいかもしれない。

## ● 加齢による運動神経細胞の変化

前述したように加齢によって増加する運動神経細胞死がサルコペニアの原因となる可能性があるが、それを裏づける研究結果は乏しい。しかし、高齢者の剖検観察によると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報告されている。また、1977 年にイギリスのグループが報告したデータによると、死亡時に運動機能が保たれていた 13～95 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はじめ 80 歳以上になると約 25% の運動神経細胞数が減少していた(図 4)<sup>17)</sup>。実験動物においてもラット脊髄の運動神経細胞数が生後 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<sup>18)</sup>。このように加齢に伴う運動神経細胞死の増加は動物種を越えて観察されているが、高齢社会を迎えてから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障害を比較して研究した報告はまだ見当たらず、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)の関係についてよくわかっていない。

ところで、ALS 患者の運動神経細胞は急速に変性・脱落して筋萎縮に至るがその約 90% が非遺伝性で原因は不明である。ALS の約 5% の患者に認

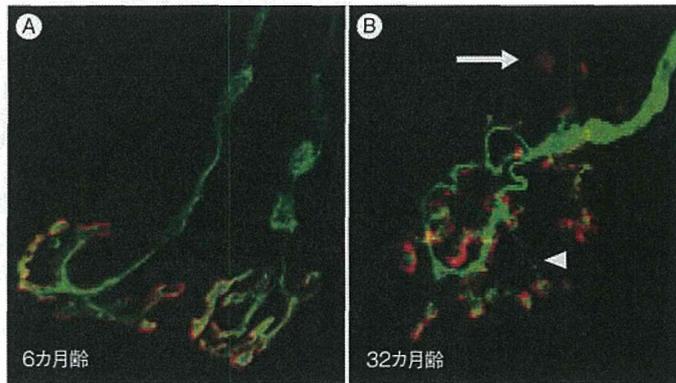


図3 加齢による神経筋シナプスの形態変化(マウス)  
 老齢マウスの神経筋シナプスのアセチルコリン受容体(赤色)の凝集散乱(矢印), 運動神経終末(緑色)の sprouting(矢頭)を蛍光顕微鏡で観察することができる。

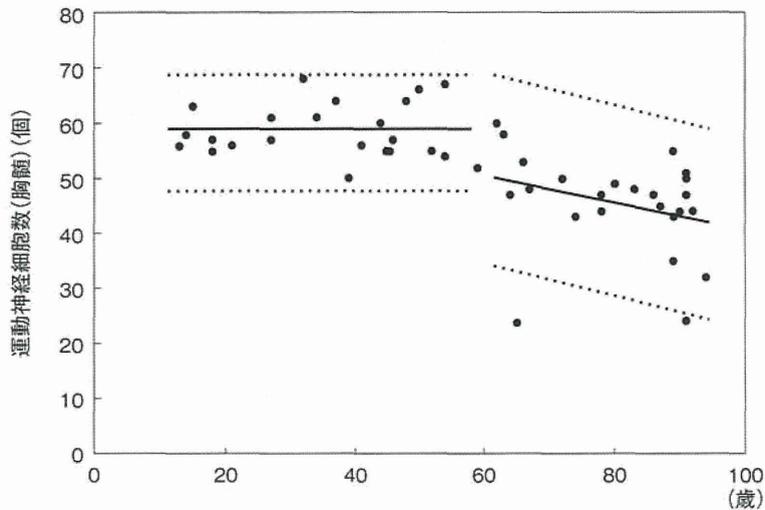


図4 脊髄(ヒト)の運動神経細胞数の加齢変化<sup>17)</sup>

知症を伴う臨床例が存在しており, 非 Alzheimer 型の認知症である前頭側頭葉認知症 (frontotemporal dementia: FTL) と臨床的にも病理学的にもオーバーラップすることから, 近年その発症メカニズムが注目されている<sup>19,20)</sup>. ALS と FTL 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] の蓄積を観察することができる. 遺伝性 ALS 患者に TDP-43 の遺伝子変異が発見されていることや<sup>21-23)</sup>, 変異型 TDP-43 や野生型 TDP-43 を過剰発現させたトランスジェニックマウス

は ALS や FTL の病態を発症することから<sup>24-29)</sup>, TDP-43 の異常蛋白の凝集化と不溶化による蓄積による細胞毒性が非遺伝性の ALS と FTL の病態にも関係していると考えられる. さらに, TDP-43 は mRNA のスプライシングを制御しており, 変異型 TDP-43 によるスプライシング異常で ALS が発症することがトランスジェニックマウスを使って報告されている<sup>30)</sup>. ALS の発症は 50~70 歳の年齢層に多く, 高齢社会を迎えて ALS の患者が増加している. 診断が難しい非定型の ALS が存在することも予想されることから, サルコペニアとの鑑別が問題となりそうである.

## おわりに

サルコペニアに神経系がどのように関与するかについての研究は骨格筋に比べてきわめて少ないが、今後は重要な課題となるであろう。スイスのベンチャー企業(neurotune社)はEUROSTARSから資金を得てバイオマーカ―(neurotrypsin)の実用化を進めている。サルコペニアのバイオマーカ―を確立することができれば、早期診断・予防法の開発が進むことが期待される。

### 文献

- 1) Wu, H. et al. : *Development*, **137** : 1017-1033, 2010.
- 2) Kim, N. et al. : *Cell*, **135** : 334-342, 2008.
- 3) Zhang, B. et al. : *Neuron*, **60** : 285-297, 2008.
- 4) Nishimune, H. et al. : *Nature*, **432** : 580-587, 2004.
- 5) Yumoto, N. et al. : *Nature*, **489** : 438-442, 2012.
- 6) Wu, H. et al. : *Neuron*, **75** : 94-107, 2012.
- 7) Mori, S. et al. : *Am. J. Pathol.*, **180** : 798-810, 2012.
- 8) Wokke, J.H.J. et al. : *J. Neurol. Sci.*, **95** : 291-310, 1990.
- 9) Ezaki, T. et al. : *Virchows Arch.*, **437** : 388-395, 2000.
- 10) Chen, J. et al. : *J. Comp. Neurol.*, **520** : 434-452, 2012.
- 11) Valdez, G. et al. : *PLoS One*, **7** : e34640, 2012.
- 12) Molinari, F. et al. : *Science*, **298** : 1779-1781, 2002.
- 13) Drey, M. et al. : *Exp. Gerontol.*, **48** : 76-80, 2013.
- 14) Hettwer, S. et al. : *Exp. Gerontol.*, **48** : 69-75, 2013.
- 15) Stephan, A. et al. : *FASEB J.*, **22** : 1861-1873, 2008.
- 16) Butikofer, L. et al. : *FASEB J.*, **25** : 4378-4393, 2011.
- 17) Tomlinson, B. E. et al. : *J. Neurol. Sci.*, **34** : 213-219, 1977.
- 18) Kanda, K. et al. : *Neurobiol. Aging*, **17** : 613-617, 1996.
- 19) Neumann, M. et al. : *Science*, **314** : 130-133, 2006.
- 20) Arai, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351** : 602-611, 2006.
- 21) Sreedharan, J. et al. : *Science*, **319** : 1668-1672, 2008.
- 22) Gitcho, M. A. et al. : *Ann. Neurol.*, **63** : 535-538, 2008.
- 23) Kabashi, E. et al. : *Nat. Genet.*, **40** : 572-574, 2008.
- 24) Tsai, K. J. et al. : *J. Exp. Med.*, **207** : 1661-1673, 2010.
- 25) Shan, X. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 16325-16330, 2010.
- 26) Wils, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 3858-3863, 2010.
- 27) Igaz, L. M. et al. : *J. Clin. Invest.*, **121** : 726-738, 2011.
- 28) Xu, Y. F. et al. : *J. Neurosci.*, **30** : 10851-10859, 2010.
- 29) Wegorzewska, I. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** : 18809-18814, 2009.
- 30) Arnolda, E. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **E736-745**, 2013.

\* \* \*

# 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

重本和宏

加齢に伴う筋力低下・筋萎縮（サルコペニア）は認知症と並び要介護の主要因となることから、その発症機序と早期予防・治療法の研究が求められている。骨格筋は代謝特性の異なる速筋および遅筋線維から構成されるが、サルコペニアの筋萎縮に伴い遅筋線維の割合が増加する。骨格筋は体内の代謝調節作用を担い、運動トレーニングだけでなくさまざまな体内内外の環境要因により筋線維の変化が誘導されるが、その機構はまだよくわかっていない。本稿では、サルコペニアを中心に、代謝変換（リプログラミング）を伴う筋線維変化についての最近の話題を紹介する。

キーワード● サルコペニア, 筋萎縮, 筋線維変化, 代謝変換

## はじめに

サルコペニア (sarcopenia) とは、1989年に Rosenberg により提唱された概念に基づく新しい造語で、加齢により骨格筋・筋肉 (sarco) が減少 (penia) することを意味しており、日本語では加齢性筋肉減少症と訳される<sup>1)</sup>。超高齢社会を迎え、2010年には「要支援・要介護」の認定数はすでに500万人に達している。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 activity of daily living (ADL) と quality of life (QOL) を損なう主要な原因となることから、その早期診断と有効な予防対策は急務の課題である。最近、サルコペニアが研究対象として注目されているが、まだ疫学的研究が先行している段階で、定義も定まっておらずメカニズムも未解明である。

2010年に、サルコペニアを「筋力」「筋量」および「身体機能」に関する3つの臨床的な測定値で総合的に定義・診断することが欧州で提唱されたが<sup>2)</sup>、その背景としては、加齢による「筋力の減少」あるいは「筋量

の減少」が必ずしも「身体機能の低下」に結びつかないためである。一方、骨格筋は代謝特性の異なる筋線維から構成され、サルコペニアによる筋萎縮は筋線維の質的な変化を伴うことが古くから知られている。さらに、骨格筋は成人男性の体重にして40% (女性は35%) を占め、運動だけでなく炭水化物や脂肪酸の代謝と体熱産生による体温調節を行う。本稿では、サルコペニアを骨格筋の代謝機能の加齢変化として捉えて最近の研究動向を概説する。

## 1 骨格筋を構成する筋線維の種類と代謝特性

骨格筋は、運動を行う筋収縮だけでなく代謝と熱産生の調節機能も担うが、サルコペニアを含む骨格筋の萎縮に伴う筋線維の変化はこれら機能と強い関連があると考えられている。筋線維は、ヒトではI型線維 (*MYH7* 遺伝子がコードするミオシン重鎖Iを発現する) と2種類のII型筋線維 (*MYH2* 遺伝子のミオシン

Linkage between the mechanisms of sarcopenia and metabolic changes in our bodies

Kazuhiro Shigemoto: Research Team of Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (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)

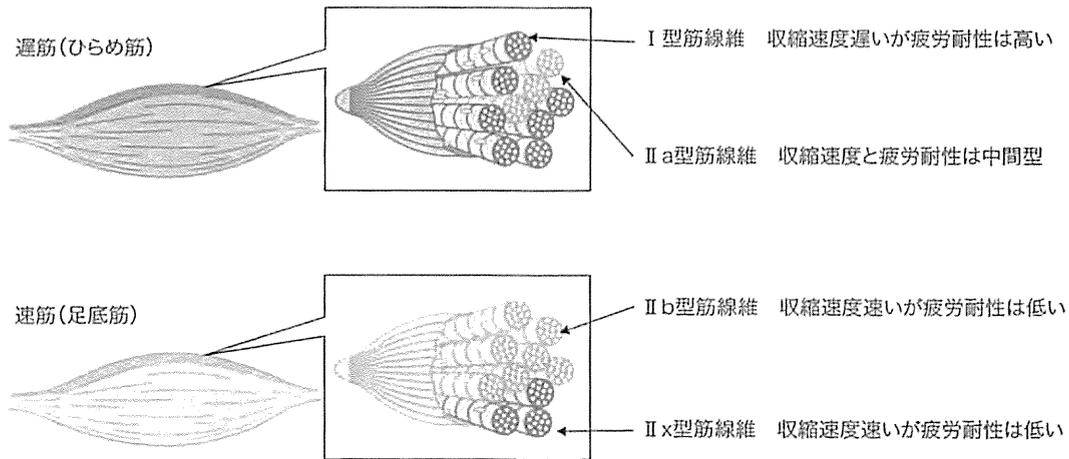


図1 マウスの代表的な遅筋と速筋の筋線維タイプとその特性

ひらめ筋は遅筋線維で抗重力筋として足関節の底屈を担う。足底筋は同じく足関節の底屈筋だが速筋線維に富む

重鎖Ⅱa, *MYH4* 遺伝子のミオシン重鎖Ⅱbをそれぞれ発現する) からのなるが、マウスはミオシン重鎖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(図1)<sup>34)</sup>。各ミオシンタンパク質は異なる遺伝子でコードされており、ヒトのミオシン重鎖Ⅱb遺伝子はマウスのⅡx遺伝子と相同性が高い。ミオシン重鎖タンパク質はATPase活性があり、ATPの分解で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タンパク質を動かして筋線維が収縮する。Ⅱ型線維はATPase活性が高く、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時的に大きな収縮力を生み出すことができるが疲労耐性が弱い。対照的に、Ⅰ型筋線維はミオシン重鎖のATPase活性は速筋に比べ低いが、筋線維はミトコンドリアに富んでおり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。これまで、Ⅰ>Ⅱa>Ⅱx>Ⅱbを発現する筋線維の順に上記特性が変わるとされてきたが、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>。また、骨格筋は上記の複数の筋線維により構成され、ひらめ筋(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。

## 2 筋萎縮に伴う骨格筋線維の変化

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さまざまな実験で報告されている<sup>34)46)</sup>。筋収縮の特性変化はATP産生など代謝リプログラミングも伴い、筋線維の変化は可塑性があることを示す<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が、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。一方、ヒト、マウスやラットの研究からさまざまな要因による筋萎縮においては筋線維の数と断面積の減少に加えて、骨格筋の筋線維タイプの割合が変化することが報告されている<sup>34)46)</sup>。

加齢によりヒトの骨格筋では、Ⅰ型線維がⅡ型線維よりも萎縮しやすいことや、ラットの研究では前脛骨筋(速筋)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、また速筋線維を多く含む筋ではⅡx/Ⅱb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変化を調べたところ、前頸骨筋(速筋)でⅡb型線維が減少してⅡx/Ⅱbの比率が増加する一方で、ひらめ筋(遅筋)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

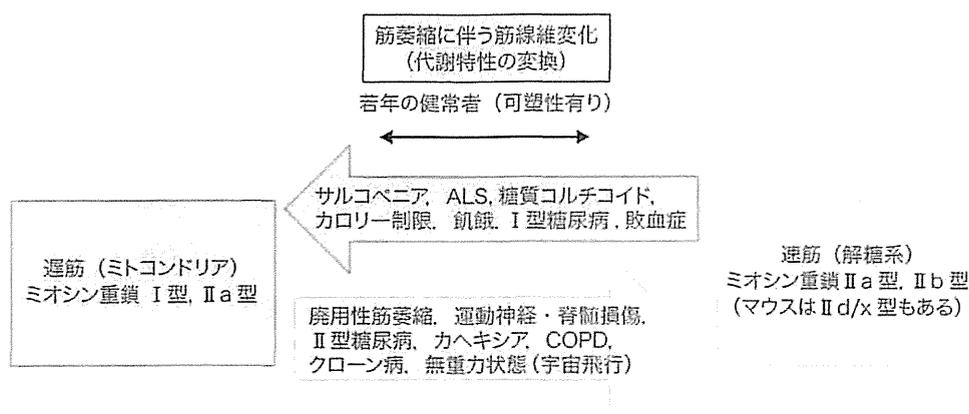


図2 筋萎縮に伴う筋線維変化は疾患により異なる  
筋線維変化は代謝変換も伴うと考えられる

り<sup>819)</sup>、種を超えて同じ現象が観察される。

遅筋線維の割合が増加することは、ALS (amyotrophic lateral sclerosis, 筋萎縮性脊索硬化症)、カロリー制限や飢餓、糖質コルチコイドの投与、I型糖尿病、敗血症、がんに伴うカヘキシア<sup>820)</sup>で起きることが報告されている<sup>6)</sup>。対照的に、速筋線維の割合が増加する筋萎縮の原因として、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、がん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) などが報告されている (図2)。骨格筋は体内の代謝調節作用を担うことから、運動トレーニングだけでなくさまざまな体内外の環境要因により筋線維の変化が誘導されていると考えられるが、近年は、生活習慣病の研究領域においても代謝変換を伴う骨格筋の筋線維タイプ変化のメカニズムが注目されている (図3)。

#### ※ カヘキシア

がんや慢性疾患などの消耗性疾患が原因となり、食欲不振と代謝調節機構の障害による重度の骨格筋の萎縮と臓器の機能不全の病態を示す、複合的なメタボリック症候群のことをいう。悪液質と同義語であり、カヘキシアを有する多くの患者はサルコペニアを伴うが、サルコペニアに必ずカヘキシアが伴うとは考えられていない。

### 3 筋線維タイプ誘導の分子メカニズム

筋線維のなかで遅筋線維を誘導する核内決定因子として、これまで核内受容体スーパーファミリーで脂肪酸と結合して活性化され、転写制御因子でもあるPPAR  $\beta/\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$ ) とその共役因子のpGC1- $\alpha$ 、pGC1- $\beta$ 、核内受容体のERR  $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ )、ERR  $\gamma$ などが報告されている<sup>10)11)</sup>。PPAR  $\beta/\delta$ は小腸や肝臓だけでなく骨格筋で多く発現している。

PPAR  $\beta/\delta$ 、pGC1- $\alpha$  (pGC1- $\alpha$ 1) とERR  $\gamma$ をそれぞれ発現させたトランスジェニックマウスはミオシン重鎖Iを発現する遅筋線維を誘導しII型筋線維の割合が減少する<sup>11)12)</sup>。一方、pGC1- $\beta$ 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。前述の遺伝子はミオシン遺伝子だけでなく、例えば種々のミトコンドリア生成、脂肪酸酸化や熱産生を担う分子の転写誘導の作用がある<sup>9)</sup>。pGC1- $\alpha$ の上流シグナル分子として栄養センサーを担うmTOR (mammalian target of rapamycin) があり、摂取されたタンパク質由来の分岐鎖アミノ酸 (BCAA) (ロイシン、バリン、イソロイシン) や運動刺激により活性化されサルコペニアの予防にも有効であるとの報告がある<sup>13)~15)</sup>。PPAR  $\beta/\delta$ のアゴニストはpGC1- $\alpha$ 発現量を4倍に増やし、ミトコンドリア機能を高めて脂肪酸酸化を促進して、運動

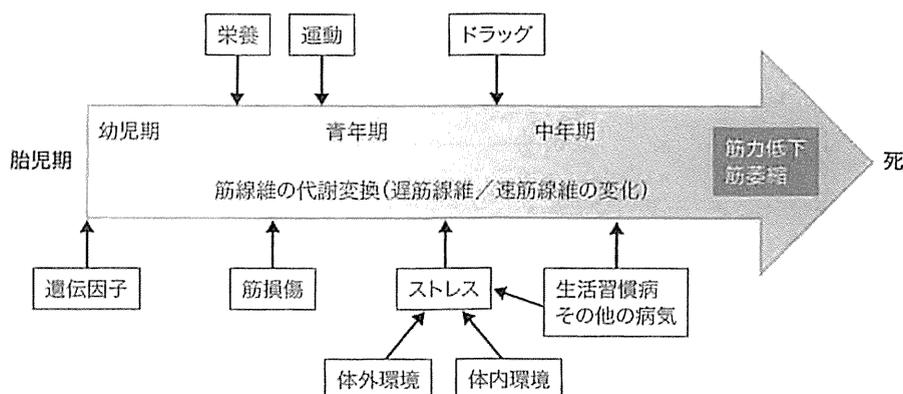


図3 代謝変換を伴う筋線維変化はさまざまな要因で生涯を通して起きている  
文献9より改変

と同じ効果を筋にもたらす<sup>16)~18)</sup>。骨格筋の老化に伴いpGC1- $\alpha$ の発現量が減少するが、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>19)</sup>。pGC1- $\alpha$ は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- $\alpha 1$ によるものであると報告された<sup>20)</sup>。pGC1- $\alpha 4$ とpGC1- $\alpha 1$ タンパク質はalternative splicing isoformのmRNAから翻訳されるが、異なるプロモーターで転写される。pGC1- $\alpha 4$ のトランスジェニックマウスにおいてはIGF-1 (insulin-like growth factor)の発現が増強し、またTGF $\beta$ スーパーファミリーで筋肥大を抑制するミオスタチンの発現を減少させて、両者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。

ERRファミリー( $\gamma$ 以外には、 $\alpha$ と $\beta$ がある)はエストロゲンとは結合せず、すでに構成的な活性化状態にあり、その機能はpGC1- $\alpha$ とpGC1- $\beta$ などの共役因子やRIP140 (receptor-interacting protein 140)などのコリプレッサーとの競争的結合により制御される<sup>10)</sup>。ERR $\gamma$ はひらめ筋などの遅筋に多く発現しているが、タイプII線維特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成すると大腿四頭筋などのタイプIIb線維が減少して、IaとIIa線維の割合が顕著に増加する<sup>11)</sup>。意外なことに、この機序にはpGC1- $\alpha$ は関与しない代わりに細胞内エネルギーセンサーのAMPKの作用によ

り、骨格筋のVEGF $\beta$ 産生によるパラクラインを誘導して血管新生が関与することが報告されている。

PPAR $\beta/\delta$ の骨格筋特異的ノックアウトマウスでは、速筋筋線維の割合の増加が加齢に伴う肥満やII型糖尿病の発症の前から出現することから、筋線維タイプ変化は生活習慣病の結果ではなく、むしろ原因と直接関係するとしている<sup>18)</sup>。また、PPAR $\beta/\delta$ は糖質コルチコイド投与や敗血症で誘導される筋萎縮の活性化に働き、阻害剤で筋萎縮を抑制することができる<sup>21)</sup>。サルコペニアを含む筋萎縮に伴う筋線維タイプの決定機構には前述のようなさまざまな分子が関与しているが、いまだ十分に解明されてはいない。

#### 4 サルコペニアと代謝を制御する マイオカインとの関係

骨格筋からは多くのサイトカインが分泌されており、その他の分泌タンパク質を含めてマイオカイン (myokine) と総称する<sup>22)</sup> (真鍋の稿参照)。近年、新しいマイオカインとその機能が報告されているが、そ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因果関係があり、したがってサルコペニアの機序についても関連があることが予想される。

ヒトを対象とした疫学研究から、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>23)</sup>。一方で、耐久トレーニングは安静時

のIL-6の血中濃度を下げる。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は負の相関がある。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考え方が提示され<sup>20)</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利用されている。運動後30分には骨格筋内のIL-6のmRNA転写が100倍程度増加する。安静時および運動負荷後に増加する血中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- $\alpha$ により負の制御を受けている<sup>21)</sup>。運動負荷直後の骨格筋だけでなく、運動トレーニング(習慣)を受けている安静時の骨格筋でpGC1- $\alpha$ 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では逆にpGC1- $\alpha$ の発現が低下する。IL-6は骨格筋から分泌されることが報告された最初のサイトカインだが<sup>25)</sup>、免疫細胞とは異なりTNF $\alpha$ 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調節するエネルギーセンサーとして働く<sup>23) 26) 27)</sup>。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 $\beta$ 酸化を促進し、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。サルコペニアにおけるIL-6を含むマイオカインの役割を解明するためには、さらなる研究が必要である。

## ■ おわりに

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。近年、アルツハイマー型認知症と高インスリン血症の因果関係が注目されている<sup>28)</sup>。また、加齢による筋萎縮には脂肪量の増加が伴うケースが多いが、高度な肥満は身体機能の低下を伴うためサルコペニア肥満(sarcopenic obesity)として臨床的に注目されている<sup>29)</sup>。その定義や機序はまだ定まっていないが、全身の代謝機能の加齢変化の強い表現型であるという考え方がある。サルコペニアの研究は、単に骨格筋の研究に止まらず認知症や生活習慣病との因果関係についても、今後は研究を展開する必要がある。

## 文献

- 1) Rosenberg IH : Am J Clin Nutr, 50 : 1231-1233, 1989
- 2) Cruz-Jentoft AJ, et al : Age Ageing, 39 : 412-423, 2010
- 3) Schiaffino S, et al : Physiol Rev, 91 : 1447-1531, 2010
- 4) Blaauw B, et al : Compr Physiol, 3 : 1645-1687, 2013
- 5) Arany Z, et al : Cell Metab, 5 : 35-46, 2007
- 6) Ciciliot S, et al : Int J Biochem Cell Biol, 45 : 2191-2199, 2013
- 7) Bassel-Duby R & Olson EN : Annu Rev Biochem, 75 : 19-37, 2006
- 8) 福永大地, 他 : 基礎老化研究, 36 : 47-49, 2012
- 9) 重本和宏, 他 : ANI-AGING MEDICINE, 9 : 28-32, 2013
- 10) Giguère V : Endocr Rev, 29 : 677-696, 2008
- 11) Narkar VA, et al : Cell Metab, 13 : 283-293, 2011
- 12) Li J, et al : Nature, 418 : 793-797, 2002
- 13) Shimizu N, et al : Cell Metab, 13 : 170-182, 2011

## column

### 骨格筋はまだ多くの謎が残されている 宝の山

わが国も欧米も、承認基準を緩和するなどインセンティブを設けて稀少疾患を対象とした創薬を推奨している。実は稀少疾患に有効な薬物は患者数が多い疾患にも有効である可能性が高い。骨格筋の領域では筋ジストロフィーやALSなどだけでなく、原因が未解明の神経筋難病がまだまだ多く残されている。また、高齢社会を背景に認知症だけでなくサルコペニアの有効な対策も必要なことから、近年、大手の製薬会社でもサルコペニアの研究をはじめていると聞く。われわれは、神経筋難病の1つで、抗MuSK(muscle-specific kinase)抗体で発症する重症筋無力症の動物モデルを世界で最初に報告した。筋萎縮の分子機構を調べていると、サルコペニアとの関連性があることに気づき現在では筋線維変化に伴う代謝変換の分子機構に関する研究も行っている。(重本和宏)

- 14) Kim HK, et al : J Am Geriatr Soc, 60 : 16-23, 2012
- 15) Mackenzie LS & Lione L : Life Sci, 93 : 963-967, 2013
- 16) Wang YX, et al : Cell, 113 : 159-170, 2003
- 17) Wang YX, et al : PLoS Biol, 2 : e294, 2004
- 18) Schuler M, et al : Cell Metab, 4 : 407-414, 2006
- 19) Wenz T, et al : Proc Natl Acad Sci U S A, 106 : 20405-20410, 2009
- 20) Ruas JL, et al : Cell, 151 : 1319-1331, 2012
- 21) Castellero E, et al : PLoS One, 8 : e59726, 2013
- 22) Pedersen BK & Febbraio MA : Nat Rev Endocrinol, 8 : 457-465, 2012
- 23) Fischer CP : Exerc Immunol Rev, 12 : 6-33, 2006
- 24) Handschin C & Spiegelman BM : Nature, 454 : 463-469, 2008
- 25) Pedersen BK & Febbraio MA : Physiol Rev, 88 : 1379-1406, 2008
- 26) Keller C, et al : Cytokine, 36 : 141-147, 2006
- 27) Pedersen BK : Med Sci Sports Exerc, 44 : 392-396, 2012
- 28) Craft S : Neurobiol Aging, 26 Suppl 1 : 65-69, 2005
- 29) Baumgartner RN, et al : Obes Res, 12 : 1995-2004, 2004

### 参考図書

- 「サルコペニアの基礎と臨床」(鈴木隆雄/監修, 島田裕之/編集), 真興交(株)医書出版部, 2011  
「サルコペニア 24のポイント」(関根里恵, 小川純人/編集), フジメディカル出版, 2013

### Profile

著者プロフィール

重本和宏：1982年，山口大学医学部卒業。'82～'86年，千葉大学大学院医学研究科。'86～'89年，東京都老人医学総合研究所研究所および国立予防衛生研究所の研究員を経て，'92～'96年，ロンドン大学ルドウィック癌研究所研究員。'98～2008年，愛媛大学医学部助教授。'09年から地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所（旧老人研）老年病態研究チーム研究部長。ロンドン時代にMuSK（muscle specific kinase）に出会い，それから現在までずっと神経筋シナプスについての研究を続けている。

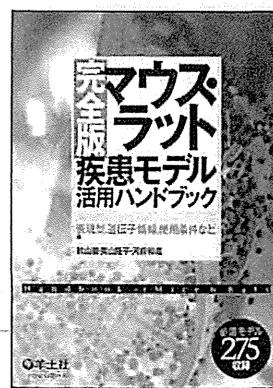
## Book Information

完全版

# マウス・ラット 疾患モデル 活用ハンドブック

表現型, 遺伝子情報, 使用条件など

編/秋山 徹,  
奥山隆平,  
河府和義



① 医薬生物学研究で使うマウス・ラットを，がん・脳神経・免疫などの研究分野ごとに厳選収録！

② 遺伝子情報や使用条件といった実践的データをコンパクトに解説したガイドブック。

- ◆ 定価（本体 8,500 円+税）
- ◆ 2色刷り B6判 605頁
- ◆ ISBN978-4-7581-2017-3

図表と写真で表現型・重要データがよくわかる！

発行  羊土社

RESEARCH ARTICLE

# Effects of Exercise and Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Supplementation on Body Composition, Physical Function, and Hematological Parameters in Community-Dwelling Frail Japanese Women: A Randomized Double Blind, Placebo-Controlled, Follow-Up Trial

Hunkyung Kim<sup>1\*</sup>, Takao Suzuki<sup>2</sup>, Miji Kim<sup>1</sup>, Narumi Kojima<sup>1</sup>, Noriyasu Ota<sup>3</sup>, Akira Shimotoyodome<sup>3</sup>, Tadashi Hase<sup>3</sup>, Erika Hosoi<sup>1</sup>, Hideyo Yoshida<sup>1</sup>

**1** Research Team for Promoting Independence of the Elderly, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan, **2** National Institute for Longevity Sciences, Aichi, Japan, **3** Biological Science Laboratories, Health Science, Kao Corporation, Tochigi, Japan

\* kimhk@tmig.or.jp



 OPEN ACCESS

**Citation:** Kim H, Suzuki T, Kim M, Kojima N, Ota N, Shimotoyodome A, et al. (2015) Effects of Exercise and Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Supplementation on Body Composition, Physical Function, and Hematological Parameters in Community-Dwelling Frail Japanese Women: A Randomized Double Blind, Placebo-Controlled, Follow-Up Trial. PLoS ONE 10(2): e0116256. doi:10.1371/journal.pone.0116256

**Academic Editor:** Maciej Buchowski, Vanderbilt University, UNITED STATES

**Received:** August 10, 2014

**Accepted:** December 1, 2014

**Published:** February 6, 2015

**Copyright:** © 2015 Kim et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This study was supported by a research grant of the Ministry of Health and Welfare of Japan and a Grant-in-Aid for Scientific Research B of the Japan Society for the Promotion of Science (22300243). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Co-authors Noriyasu

## Abstract

### Objective

To investigate the combined and separate effects of exercise and milk fat globule membrane (MFGM) supplementation on frailty, physical function, physical activity level, and hematological parameters in community-dwelling elderly Japanese women.

### Methods

A total of 131 frail, elderly women over 75 years were randomly assigned to one of four groups: exercise and MFGM supplementation (Ex+MFGM), exercise and placebo (Ex+Plac), MFGM supplementation, or the placebo group. The exercise group attended a 60-minute training program twice a week for three months, and the MFGM group ingested 1g of the MFGM supplement in pill form, daily for 3 months. The primary outcome measure was change in frailty status based on Fried's frailty phenotype. Secondary outcome measures included body composition, physical function and hematological parameters, and interview survey components assessing lifestyle factors. Participants were followed for 4 months post-intervention.

### Results

Significant group×time interactions were observed for usual walking speed ( $P = 0.005$ ), timed up & go ( $P < 0.001$ ), and insulin-like growth factor-binding protein 3 / insulin-like

Ota, Akira Shimotoyodome and Tadashi Hase are employed by Kao Corporation. Kao Corporation provided support in the form of salaries for authors NO, AS and TH, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

**Competing Interests:** The authors have the following interests: Co-authors Noriyasu Ota, Akira Shimotoyodome and Tadashi Hase are employed by Kao Corporation. Kao Corporation provided the MFGM supplementation, and the authors included in this publication affiliated with the Biological Science Laboratories of Kao Corporation analyzed the blood samples. The terms of this arrangement have been reviewed and approved by the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology in accordance with its policy on objectivity in research. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

growth factor 1 ratio ( $P = 0.013$ ). The frailty components revealed that weight loss, exhaustion, low physical activity, and slow walking speed were reversed, but low muscle strength did not significantly change. Frailty reversal rate was significantly higher in the Ex+MFGM (57.6%) than in the MFGM (28.1%) or placebo (30.3%) groups at post-intervention ( $\chi^2 = 8.827$ ,  $P = 0.032$ ), and at the follow-up was also significantly greater in the Ex+MFGM (45.5%) and Ex+Plac (39.4%) groups compared with the placebo (15.2%) group ( $\chi^2 = 8.607$ ,  $P = 0.035$ ). The exercise+MFGM group had the highest odds ratio (OR) for frailty reversal at post-intervention and follow-up (OR = 3.12, 95% confidence interval (CI) = 1.13–8.60; and OR = 4.67, 95% CI = 1.45–15.08, respectively).

## Conclusion

This study suggests that interventions including exercise and nutrition can improve frailty status. Statistically significant additive effects of MFGM with exercise could not be confirmed in this population, and further investigation in larger samples is necessary.

## Trial Registration

The Japan Medical Association Clinical Trial Registry (JMACCT) JMA-IIA00069

## Introduction

Frailty has been a focus in the aging literature in the past decade. There are several risk factors related to frailty such as aging, chronic disease, skeletal muscle disuse and cognitive function decline, although the mechanisms are still unclear [1,2]. Regardless, presence of these risk factors may lead to declines in physiological function, fractures, activities of daily living (ADL) disabilities, hospitalization, and death [3,4]. There is; however, still a lack of consensus on the assessment and definition of frailty. One of the most commonly used definitions based on phenotypic classification, defines frailty as the presence of three or more of five components which includes weight loss, muscle weakness, exhaustion, slow walking speed, and low physical activity level [3].

Exercise has been a focus in the prevention of frailty, as research has shown that it is beneficial for the enhancement of skeletal muscle mass and strength, and can improve muscle function, physical activity participants and functional ability in frail older adults [5]. Whether or not exercise can reverse frailty status, as an outcome measure, still remains to be confirmed. There has also been an increase in interest regarding the value of nutritional supplementation for skeletal muscle enhancement. Several studies have investigated the effects of milk ingestion on body composition and protein synthesis as well as muscle mass [6–8]. The results of these studies showed that the consumption of milk with resistance training may have increased muscle protein synthesis thus promoting muscle mass maintenance and gains, and even increased strength gains. However, these studies were performed on young adults, and the results of milk consumption with exercise on the elderly population are unknown. Recently, the nutritional properties of milk fat globule membrane (MFGM) have been under study. MFGM is a highly complex structure made from different protein and lipid components of milk, and its biological importance has been under study, as it is considered a potentially valuable ingredient for new food products [9]. Although the research on MFGM is still in its preliminary stages, one mice study found that MFGM in congruence with habitual exercise effectively suppressed the aging-

associated deterioration of muscle mass and strength in aging mice[10]. However, the effects of MFGM supplementation alone and combined with exercise in frail elderly people, remains to be confirmed.

Therefore the purpose of this study was to investigate the effects of the combined and separate effects of exercise and MFGM supplementation on frailty reversal, physical function, and hematological parameters in community-dwelling elderly Japanese women.

## Methods

The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see [S1 CONSORT Checklist](#) and [S1 Protocol](#).

## Ethics Statement

We conducted a randomized double-blind placebo-controlled trial. The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (TMIG). The intervention procedures were fully explained to all participants and written informed consents were obtained. The study was registered at The Japan Medical Association Clinical Trial Registry (JMACCT) JMA-IIA00069. The authors confirm that all ongoing and related trials for this intervention are registered. Although the date of the registration is stated as August 11, 2011 (after recruitment began for the trial), the process was started on June 24, 2011 prior to recruitment. The registration took longer than anticipated because we were unfamiliar with the system and the process, and this led to the delayed registration date.

## Study Population and Timeline

An invitation letter to participate in an annual comprehensive general health survey was mailed to elderly women who were randomly selected from the Basic Resident Register of elderly people residing in the Itabashi ward of Tokyo Japan. The invitation was sent to a cohort of 1,447 women aged 77 and older in November 2009, where 974 people participated in the health survey. In October 2010, the invitation was sent to a different cohort of 1,458 people aged 74 and older, and 861 people volunteered for the survey. A total of 1,835 people participated in the baseline assessment at the TMIG, however the 1,070 who were invited but did not participate could not be followed.

The Clinical Research Ethics Committee of the TMIG approved this study on May 26, 2011. The recruitment period was from July 1 ~ July 13, 2011 and the information session for potential participants was held on July 28, 2011. Volunteer participation forms were collected from people who were interested in the study, and they were asked to read through the informed consent form at home. The baseline survey was held across two days from August 30 ~ August 31, 2011, and the signed informed consent forms were obtained on these days. Randomization was performed by the principal investigator between September 4 ~ September 5, 2011, and the group assignments were sent to the participants on September 8, 2011. The first phase of the intervention began on September 14, 2011, until the post-intervention survey on December 5 ~ December 6, 2011. Participants were followed for four months, and the follow-up survey was held on March 14 ~ March 15, 2012. The groups were then crossed over for the second phase of the study, where the intervention began on March 26, 2012. The post-intervention survey for the second phase was held on June 13 ~ June 14, 2012, marking the end of this trial. For the scope of this study, the data from the cross-over was not analyzed. The data analyzed in this study only included the first phase of the trial, which was until the follow-up (March 14 ~ March 15, 2012).

## Inclusion and Exclusion Criteria for Intervention

Participation in the intervention required the participants to be operationally defined as frail, which meant categorization into three or more of the following inclusion criteria [3]: 1) Weight loss: At baseline, having unintentionally lost more than 2.0 ~ 3.0kg in the last 6 months; since the intervention was 3 months, i.e., half of the 6 months, the weight loss criteria post-intervention was 1.0 ~ 1.5kg. The follow-up period was 4 months, or two-thirds of the 6 months, the weight loss criteria was two-thirds of the original, 1.3 ~ 2.0kg at follow-up. 2) Weakness: grip strength less than 19.0kg; 3) Slow walking speed: usual walking speed less than 1.0 m/s; 4) Exhaustion: Answering “yes” to at least one of two questions, “I felt that everything I did was an effort” or “I could not get going”; 5) Low activity: Answering “true” to at least 3 of the following 4 statements, “I regularly take walks less than once a week,” “I do not exercise regularly,” “I do not actively participate in hobbies or lessons of any sort,” and “I do not participate in any social groups for elderly people or volunteering.”

The exclusion criteria were: 1) severe knee or back pain; 2) severely impaired mobility; 3) impaired cognition (Mini-Mental State Examination (MMSE) score <24); 4) missing baseline data; and 5) unstable cardiac conditions such as ventricular dysrhythmias, pulmonary edema, or other musculoskeletal conditions. Based on the inclusion and exclusion criteria, 331 (18.0%) people were defined as frail. An invitation letter detailing the objectives, methods, and use of personal data in the study were mailed to them, where 131 (39.6%) people participated (Fig. 1).

## Randomization

Randomization was performed after the baseline assessment, and any variable that identified personal information was not included in the randomization process. Computer-generated random numbers were assigned to 131 participants, who were then sorted and equally divided into four groups. IBM SPSS statistics 20.0 was used to generate the random numbers from a normal distribution with mean and standard deviation of any specified variable. The groups were randomly assigned to one of the four interventions: exercise and MFGM supplementation (Ex+MFGM;  $n = 33$ ), exercise+placebo (Ex+Plac;  $n = 33$ ), MFGM supplementation ( $n = 32$ ), or placebo ( $n = 33$ ) groups. All participants agreed to the group allocations. There was no attempt to equalize the size of the groups based on their characteristics or to recruit subjects with specific characteristics. The co-investigators were blind to the randomization procedure and group allocations, and data collection was conducted by separate physical therapy staff members who were also blind to the allocation of treatments. The principal investigator generated the random allocation sequenced, enrolled the participants, and who assigned participants to the interventions.

## Outcome Measures

Data were collected at baseline, after the 3-month intervention, and at a 4-month follow-up after the completion of the intervention, where measures included interview surveys, body composition assessments using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA; Hologic QDR 4500A, USA) [11], and physical function tests.

### Frailty Status

The primary outcome of this study was frailty status, which was defined as the presence of 3 or more of the 5 frailty criteria. Frailty reversal rate was defined as the percentage of those who were defined as frail by having at least 3 of the 5 criteria at baseline, but decreased to 2 or below at post-intervention or follow-up.

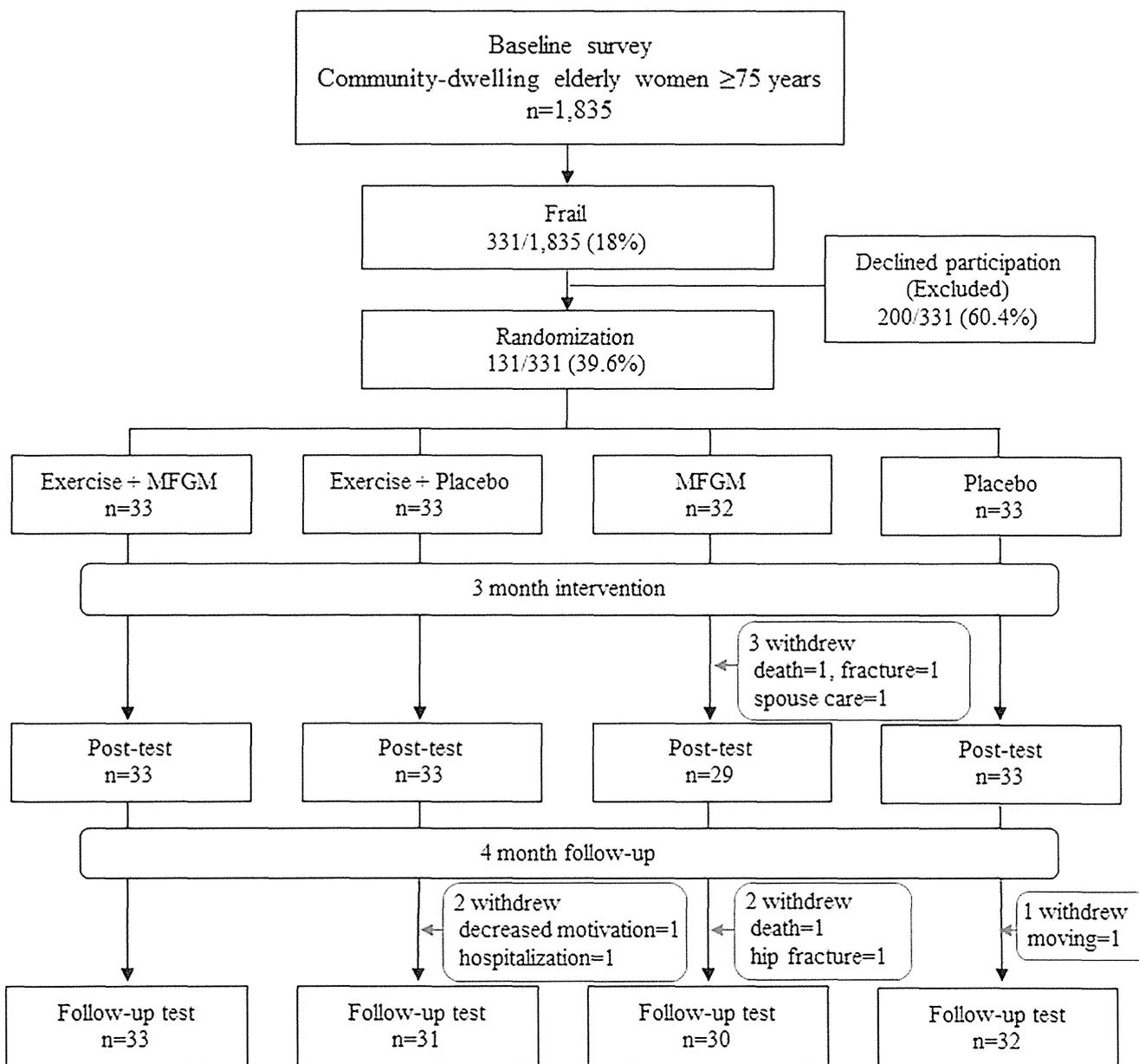


Fig 1. Flow chart of participant recruitment during the randomized controlled trial of exercise and/or nutrition supplementation.

doi:10.1371/journal.pone.0116256.g001

Each individual frailty criterion, i.e. weight loss, weakness, slow walking speed, exhaustion and low physical activity (described in detail in the inclusion criteria section), was also assessed at baseline, post-intervention, and follow-up.

Interview Survey

Each participant was interviewed face-to-face to assess the individual’s history of chronic illness, medications, falls, fear of falling, fractures, pain, long-term care status, hospitalization, TMIG index [12], exercise habits, urinary incontinence, frequency of going out, and self-rated health.

#### Body Composition Assessment

Measurements of height and weight were used to calculate BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Muscle mass, bone mineral density, and body fat mass were determined using DXA.

#### Functional Fitness Test

Grip strength was assessed using a handheld Smedley-type dynamometer in the dominant hand. Isometric knee extension strength was measured twice using a handheld dynamometer ( $\mu\text{TasMF-01}$ , ANIMA, Japan), with the participants seated, knees at a 90 degree angle. The sensor of the measuring device was placed against the anterior side of the ankle in the dominant leg (or the leg with no pain), and the participant was asked to try to extend the knee as hard as possible. The better of two scores were recorded and used for analysis. Walking speed across 5 m was measured as the participants walked on a flat 11 m path with markers at the 3 m and 8 m points. A stop watch was used to measure the time taken to walk between the markers, and the faster of two trials was recorded. A stop watch was also used to measure timed up & go (TUG). Time was measured from the moment the participant stood up from the chair, walked around a cone placed 3 m away, and returned to starting position (seated on the chair), and the faster of two trials was recorded. Assistive walking devices were only used upon the participant's request, or if the investigators observed any risk of falling.

#### Hematological Parameters

Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentration was measured with a human BDNF Quantikine ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Serum insulin-like growth factor (IGF)-1 level was measured with a human IGF-I Quantikine ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Serum IGF-1 binding protein (IGFBP)-3 level was measured with a human IGFBP-3 Quantikine ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Serum myostatin was measured with a human Myostatin ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). All measurements were performed in accordance with the manufacturers' instructions.

## Intervention

### Exercise

The participants in the exercise group were provided with a physical comprehensive training program of moderate intensity. The intensity of the exercises was maintained at approximately 12–14 on the Borg Rate of Perceived Exertion scale. Each exercise class was 60 minutes, held at the TMIG twice per week for 3-months. In order to keep the exercise classes small enough to provide proper instruction, the two exercise intervention groups were further divided into two subgroups, where the participants exercised together within their assigned subgroup in one of four exercise sessions offered per day. There was one instructor for all four classes. Two assistant trainers were present at every class to ensure proper form and observe each participant's level.

The exercise session included a five minute warm-up, 30 minutes of strengthening exercises, 20 minutes of balance and gait training, followed by a five minute cool-down. The strengthening exercises were performed in a progressive sequence from the seated to standing positions, and progressive resistance was applied through the use of the Thera-bands, and increasing repetition of each time of exercise. Resistance or progression was only increased on a group basis when the participants were able to properly execute each exercise without significant fatigue or loss of proper execution. Each individual's ability to increase intensity was assessed by the principal investigator, along with the exercise instructor and assistant trainers.

The exercise classes began with seated exercises as the participants were frail older adults, and it provided a secure and stable position. Repetitions of toe raises, heel raises, knee lifts,