

令和元年 8月30日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03266

研究課題名(和文)骨格筋の代謝変換の機構に基づくサルコペニアの病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of sarcopenia based on the mechanism of metabolic changes of skeletal muscle

研究代表者

重本 和宏 (Shigemoto, Kazuhiro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・副所長

研究者番号：40284400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニア・筋萎縮に至る過程で、一方向性の骨格筋線維タイプ変化(サルコペニア：速筋→遅筋)がおきる。筋線維タイプ変化(代謝変換)とサルコペニア・筋萎縮の機構の因果関係を明らかにして、サルコペニア・筋萎縮の予防・治療法の開発に結びつけることを目標として研究を進めている。各筋線維タイプは固有のエネルギー代謝特性を有しており、本研究ではマウスの異なる代謝特性を有する4種類の筋線維タイプ全てが、異なる蛍光タンパクで生きたまま識別できるMusColorマウスを開発した。このMusColor技術を使い、筋線維タイプ変化(代謝変換)を誘導する生体内因子を発見してそのメカニズムの解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MusColorマウス由来の筋幹細胞を用いて骨格筋線維の代謝変換を誘導する物質(生体内因子や薬物など)の同定に関する新技術(MusColor技術)の特許出願を果たし、日米の特許に加えて欧州特許が2018年5月に成立させた。このMusColor技術を使い、これまで、100種類以上の市販の生体内因子・マイオカイン・薬物などを用いてMyHC-I, IIa, IIx或はIIbを発現する筋線維を顕著に誘導あるいは抑制する物質のスクリーニングを実行して候補分子を複数同定している。この新技術はサルコペニア・フレイルのメカニズム解明、早期診断法および有効な介入法の開発に有用であると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the process leading to sarcopenia and muscle atrophy, unidirectional skeletal muscle fiber type change (sarcopenia: fast muscle → slow muscle) occurs. We are conducting research with the aim of clarifying the causal relationship between muscle fiber type changes (metabolic changes) and the mechanism of sarcopenia and muscle atrophy, and linking it to the development of methods for preventing and treating sarcopenia and muscle atrophy. Each muscle fiber type has its own energy metabolic properties, and in this study different metabolic properties of mice. We have developed MusColor mice that allow all four types of muscle fiber types that have alive to be distinguished alive with different fluorescent proteins. Using this MusColor technology, we have found in vivo factors that induce muscle fiber type changes (metabolism conversion) and studied the mechanism.

研究分野：基礎老化学、老年医学

キーワード：サルコペニア フレイル 代謝変換 筋線維タイプ変化 バイオマーカー 早期診断 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、多くの疫学研究でサルコペニア(加齢性筋肉減少症)と高齢者の死亡率・介護リスクや老年病症候群(認知症、生活習慣病、フレイル等)は密接な因果関係があることが示されている。しかし、サルコペニアの診断の確定時には筋萎縮が既に進行している。サルコペニアの病態メカニズムは未解明であり、早期診断と有効な予防法の確立が必要である。

2. 研究の目的

サルコペニア・筋萎縮に至る過程で、一方向性の骨格筋線維タイプ変化(サルコペニア: 速筋 遅筋)がおきる。各筋線維タイプは固有の代謝特性を有する。つまり、量的減少(筋力・筋量)だけでなく質的变化として代謝変換(筋線維タイプ変化)能の喪失を伴い、サルコペニアの病態解明の重要な手がかりとなる。そこで、本研究では新技術を完成・駆使して骨格筋の代謝変換誘導する生体内因子・マイオカインの探索・同定すると共に、サルコペニア・筋萎縮のモデルマウスに投与して予防効果を評価して機序を解明する。サルコペニアは高齢者死亡率及び老年病症候群と密接な因果関係があることから、効果判定の指標として筋力・筋量・身体活動改善の指標に加え、申請者らが開発した新規バイオマーカーの測定と評価、代謝機能の改善、また健康増進の指標として寿命延長効果を解析する。

3. 研究の方法

申請者は、マウスの4種全ての筋線維タイプを生きたまま、in vivo と in vitro の両方で識別観察できる新技術の開発を行った。各ミオシン重鎖蛋白(MyHC) I型, IIa型, IIx型, IIb型(右上表参照)の遺伝子座に各4色の蛍光蛋白(Sirius, Celurian, YFP, mCherry)をノックイン(遺伝子改変)した MusColor™ マウスを作製した(右図)。

(1) MusColor マウス™を用いて代謝変換を誘導する生体内因子・マイオカインの探索

蛍光イメージング法で各 MyHC 鎖(I, IIa, IIx, IIb)を蛍光蛋白(Sirius, Celurian, YFP, mCherry)で生きたままで識別できる MusColor™ マウスを使う。MusColor マウス™の骨格筋から筋幹細胞を採取し、筋幹細胞株(MusColor 筋幹細胞™)を樹立した。各マウスから採取した MusColor 筋幹細胞™を株化して液体窒素タンクに既に保存しており随時実験に使うことができる(下図)。各幹細胞株 96/48 ウェルプレートで培養して、生体内因子・マイオカインを添加して分化を誘導する。そして、MyHC-I-YFP(遅筋線維)、IIa-Sirius, IIx-Celurian, IIb-mCherry(速筋線維)の各蛍光蛋白の発現を、蛍光顕微鏡(ライカ DMD6000+cMOS カメラ)で取得した画像を解析ソフト(ImageJ と MetaMorph)で定量解析する。本課題では、市販で入手可能な生体内因子・マイオカイン(購入済)を使い MyHC-I-YFP 或は IIb-mCherry を顕著に誘導する物質のスクリーニングを実行する。筋線維タイプの変換は、定量 PCR を用いた MyHC 遺伝子発現(遅筋: MYH-7, 速筋: MYH-2, -1, -4)及びウェスタンブロット法を用いて併せて確認する。老齢マウスの血中で増加する因子かどうか ELISA で解析する。

(2) 代謝変換の in vitro での機能解析

In vitro の解析には、分化誘導後の MusColor™ 筋管細胞を最大 8 well で培養して細胞外フラックスアナライザー XF p (Seahorse 社)を使う。細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖系(細胞外酸化速度; ECAR)とミトコンドリアによる好気呼吸(酸素消費速度; OCR)を筋管細胞に対して無侵襲・高感度に経時的計測して代謝特性を評価する。同定した候補因

子を、MusColor™/c-KO マウス由来の温度感受性不死化筋幹細胞株の分化誘導時に添加して、細胞外フラックスアナライザーで代謝変換能を解析する(コントロール細胞と比較検討).

(3) 代謝変換(筋線維タイプ変換)誘導因子のメカニズムの解明

代謝変換に関わる遺伝子(核内蛋白、細胞外受容体を含む)の(コンディショナル)**c-KO** マウス [pGC-1, ERR, mTOR, Sirt1, kloth, FGF21, CD36(長鎖脂肪酸輸送体), DiO2(2型脱ヨウ素酵素), BAL1(クロック遺伝子)等]の cKO マウスと筋特異的 Cre 発現(HSA-Cre, MCK-Cre) マウスから不死化筋幹細胞株を樹立する. c-KO 欠失遺伝子で筋線維タイプ誘導の影響を受けない因子は、添加した培養筋細胞の遺伝子発現解析を行い、新規筋線維タイプ変換制御遺伝子を探索する.

(4) 代謝変換(筋線維タイプ変換)誘導因子の抗筋萎縮・抗サルコペニア作用の解析

マウスに、同定した代謝変換生体内因子を投与して筋力低下、筋萎縮、筋組織の病理学的解析を行い老化因子の可能性を解析する.

4. 研究成果

1. MusColor マウス™の筋から温度感受性不死化遺伝子を導入した MusColor™筋幹細胞株(サテライト細胞)確立して、筋線維の可塑性を制御する生体内因子・薬物などを探索する技術を確立した(日米欧の特許取得). この技術を使い筋線維変化(代謝変換)を誘導する約 100 種類の生体内因子・代謝産物・薬物の探索を行い、複数の新規筋線維タイプ変換誘導因子を同定した.

2. 同定した生体内誘導因子の中で in vitro 及び in vivo でも遅筋線維の割合を増加させ、一方で代謝機能を低下させる因子の同定を試みた(フラックスアナライザー解析、筋組織切片の SDH, NADH 活性). 更に候補因子をマウスに投与して筋力低下・筋萎縮と脂肪組織変化を解析した. また、候補因子の産生様式についても解析を行った.

3. 候補因子を培養筋細胞に処理して遺伝子発現解析を行い、シグナル伝達経路の解析を行った.

4. 老化マウスと若年マウスで候補因子の血中濃度の変化を解析した.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Nishimune H and Shigemoto K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. Neurologic Clinics, 36:2, 231-240. 2018 (査読有り)
2. Motohashi N, Uezumi A, Asakura A, Ikemoto-Uezumi M, Mori S, Mizunoe Y, Takashima R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S and Shigemoto K: Tbx1 Regulates Inherited Metabolic

and Myogenic Abilities of Progenitor Cells Derived from Slow- and Fast-type Muscle. Cell Death Differ. 26:6, 1024-1036.2019 (査読有り)

3. 重本 和宏、「老年医学Q & A」、日本老年医学会雑誌、54巻(1)、p97-98,2017. (査読無し)
4. 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. サルコペニ・アフレイルの基礎研究の現状. 日本臨床増刊号、上巻「老年医学」、189-193, 2018. (査読無し)
5. 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. フレイルのバイオマーカー探索. 最新医学別冊, 診断と治療のABC137, 67-73, 2018. (査読無し)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Shigemoto K. Dying-back neuropathy as a cause and predictor of sarcopenia. 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. 2016, 11.4. Nagoya, Japan.
2. Shigemoto K.: Declining muscle plasticity in sarcopenia and frailty. 4th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Daling, China, 2018.10.20-21.
3. Badawi Y, Mori S, Shigemoto K., Nishimune H. Super Resolution Microscopy Analysis of NMJ Active Zones in Adult and Aged Mice. Neuroscience 2016, 2016, 11.4. San Diego, USA.
4. Shigemoto K., Badawi Y, Mori S, and Nishimune H. Structural analysis of active zones in NMJ of aged-mouse using STED microscopy. Frontiers in aging research toward healthy longevity. Tokyo. 11.17.2016.
5. 28. Motohashi N, Mori S, Takashima R and Shigemoto K. Identification of novel factors influencing muscle fiber type transition, 2017 Keystone Symposia Conference; Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease, Yokohama Japan, 5.17. 2017.
6. Norio Motohashi, Shuuichi Mori, Rumi Takashima and Kazuhiro Shigemoto: Identification of novel molecular mediators of muscle fiber-type switch, Cell Symposia: Multifaceted Mitochondria 2018, San Diego, CA, USA, 2018.6.4.
7. 31. Norio Motohashi, Shuuichi Mori, Rumi Takashima and Kazuhiro Shigemoto: Development of screening system for identification of novel factors influencing muscle fiber types, Molecular mechanisms of muscle wasting during aging and disease, Monte Verità, Ascona, Switzerland, 2018.9.24.
8. 重本和宏: サルコペニアの病態と薬物治療の可能性. 第16回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 6月12日、2016年.
9. 重本和宏: サルコペニア発症のメカニズム、第17回日本抗加齢医学会総会, 東京, 6月4日、2017年.
10. 重本和宏, フレイルのメカニズム研究の現状について、第30回日本老年学会/第40回日本基礎老化学会大会、合同シンポジウム、名古屋、6月15日、2017年.
11. 重本和宏、神経筋接合部からみたサルコペニアのメカニズム研究について、第3回日本筋学会、東京(小平)、8月4日、2017年.
11. 重本 和宏: サルコペニア・フレイルを予防するためになぜ運動や栄養が大切か? 第87回愛宕臨床栄養研究会、東京慈恵医科大学、2018.7.21.
12. 重本 和宏: サルコペニア・フレイルのメカニズムの解明に向けて、第40回臨床栄養学会総会、第39回臨床栄養協会総会、東京、2018.10.6.

〔図書〕(計 2 件)

1. 重本和宏(原田敦 監修)、「バイオマーカー」今後の展望について(新しい研究、治験など)、「サルコペニア診療マニュアル」、p108-114、メジカルビュー社 2016.

2. 重本和宏(荒井 秀典監修) どのようなメカニズムで起こるのか?
「サルコペニア概論」, ライフサイエンス出版株式会社 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 5 件)

名称: 筋幹細胞又は筋芽細胞、及びそれを用いた代謝変換に関する物質のスクリーニング方法、並びにスクリーニング方法によって得られた物質を含む医薬組成物」
発明者: 重本和宏
権利者: 東京都健康長寿医療センター
種類: 特許
番号: 第 6159930 号
取得年: 2017 年
国内外の別: 国内

名称: MUSCLE STEM CELL OR MYOBLAST, METHOD FOR SCREENING SUBSTANCES THAT PARTICIPATE IN METABOLIC CONVERSION USING SAME, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SUBSTANCE OBTAINED FROM SAID SCREENING METHOD.

発明者: 重本和宏
権利者: 東京都健康長寿医療センター
種類: 特許
番号: US 9,618,502 B2
取得年: 2017 年
国内外の別: 国外(米国)

名称: MUSCLE STEM CELL OR MYOBLAST, METHOD FOR SCREENING SUBSTANCES THAT PARTICIPATE IN METABOLIC CONVERSION USING SAME, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SUBSTANCE OBTAINED FROM SAID SCREENING METHOD.

発明者: 重本和宏
権利者: 東京都健康長寿医療センター
種類: 特許
番号: EP 3 051 810 B1
取得年: 2018 年
国内外の別: 国外(スイス、ドイツ、スペイン、フランス、イギリス、イタリア)

名称: 加齢または筋萎縮の診断用バイオマーカー

発明者: 重本和宏
権利者: 東京都健康長寿医療センター
種類: 特許
番号: 6240919 号
取得年: 2017 年
国内外の別: 国内

名称: Biomarker for diagnosis of aging or amyotrophia. 発明者: 重本和宏

権利者: 東京都健康長寿医療センター
種類: 特許
番号: EP 3 128 326 B1
取得年: 2018 年
国内外の別: 国外(スイス、ドイツ、スペイン、フランス、イギリス、イタリア)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森 秀一

ローマ字氏名：**Mori Shuuichi**

所属研究機関名：東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)

部局名：東京都健康長寿医療センター研究所

職名：研究員

研究者番号 (8 桁): **30508677**

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本橋 紀夫

ローマ字氏名：**Motohashi Norio**

所属研究機関名：東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)

部局名：東京都健康長寿医療センター研究所

職名：研究員

研究者番号 (8 桁): **50532727**

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。