

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09614

研究課題名(和文) 加齢に伴う筋再生能力低下の機序解明と抑制法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of age-related decline in muscle regenerative capacity and development of suppression methods

研究代表者

上住 円(池本円)(UEZUMI, Madoka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任講師

研究者番号：70435866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者において転倒や骨折に伴う筋損傷からの回復の遅れは、要介護や寝たきりへの移行原因となり、解決すべき重要課題である。老化による筋再生能力低下の原因を解明するため、老齢及び若齢マウス再生筋の網羅的タンパク発現解析を行い、老化で発現低下する因子を同定した。この因子の欠損マウスでは筋再生遅延が認められた。この因子は壊死線維の除去に働くことが示唆され、欠損マウスは、骨格筋幹細胞の増殖低下や再生筋線維数の減少を示したことから、炎症や壊死線維の残存により再生遅延が生じていると考えられた。本研究は老化による筋再生能力低下機序の一端を解明するものであり、この成果は予防・治療法の開発へと発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国では平均寿命と健康寿命の間に約10年の乖離があり、健康寿命を延伸させることが喫緊の課題となっている。高齢者において転倒や骨折に伴う筋損傷からの回復の遅れは、要介護や寝たきりへの移行原因となり、健康寿命延伸のために解決すべき重要課題である。しかしながら、筋再生能力低下の原因は未だ不明な点が多く、改善方法も確立されていない。本研究は、老齢及び若齢再生筋組織を用いた網羅的タンパク発現比較解析から、これまで筋再生への関与が知られていなかった分子を同定し、老化による筋再生能力低下機序の一端を解明するものであり、この成果は予防・治療法の開発へと発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Delayed recovery from muscle injury caused by falls and fractures in the elderly is an important problem to be solved because it causes the transition to nursing care or bedridden status. To elucidate the cause of age-related decline in muscle regenerative capacity, we performed a comprehensive protein expression analysis using regenerating muscle of aged and young mice and identified a factor that is down-regulated in aged mice. Mice deficient in this factor showed delayed muscle regeneration. The factor was suggested to function in the removal of necrotic fibers, and the deficient mice showed decreased proliferation of skeletal muscle stem cells and decreased number of regenerating myofibers, suggesting that prolonged inflammation and residual necrotic fibers cause the delayed regeneration. This study elucidated one of the mechanisms of age-related decline in muscle regenerative capacity, and the results are expected to lead to the development of preventive and therapeutic methods.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 老化 再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う筋の衰え(サルコペニア)は、高齢者に転倒や骨折を誘発し、それに伴う筋損傷からの回復の遅れは、さらなる要介護状態や寝たきりへと心身の状態を悪化させる要因となる。骨格筋は本来、非常に再生能力の高い組織であるが、加齢に伴いその能力は低下する(Ikemoto-Uezumi et al., Stem Cells. 2015; Ikemoto-Uezumi et al., Am J Pathol. 2017)。骨格筋の再生は組織特異的幹細胞である筋衛星細胞が担っているが、研究代表者は、老化による筋再生能力の低下が、筋衛星細胞自身の質の劣化ではなく、骨格筋内環境の悪化によって起こることを明らかにした(Ikemoto-Uezumi et al., Stem Cells. 2015)。そこで、老化による筋内環境悪化の原因を探索するため、若齢マウス(3ヶ月齢)と老化マウス(25ヶ月齢)の骨格筋組織を用いてサイトカイン抗体アレイ解析を行った。まず、若齢マウスにおいて、intact 筋と再生筋とを比較し、再生により10倍以上発現が増大する因子(再生に重要と予想される因子)を抽出し、かつ、老化マウスと若齢マウスの再生筋の比較から老化により発現が1/2以下に減少する因子として、Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8)を同定した。加齢に伴うMFG-E8の発現低下が筋再生能力低下に関わる可能性が示唆されたことから、本研究では、MFG-E8 ノックアウトマウスを用いて、その筋再生能力を精査し、筋再生におけるMFG-E8の機能を明らかにする。

2. 研究の目的

MFG-E8は、定常状態の骨格筋にも発現しているが、筋損傷によりその発現は劇的に増加する。よって、MFG-E8は筋再生において何らかの機能を果たしていると予想されるが、これまで骨格筋に着目してMFG-E8の発現や機能を調べた報告は無い。研究代表者が独自に見出したMFG-E8が筋再生において重要な働きをし、その発現減少が老化による筋再生能力低下に関わる可能性が示唆されるが、MFG-E8が筋再生においてどのような機能を担っているのかは明らかでない。本研究では、筋再生におけるMFG-E8の機能を追求するが、その結果は、MFG-E8を利用した老化筋再生能力改善方法の開発へと発展が期待できる。現在、加齢に伴って低下する筋再生能力を回復させる方法は無く、本研究からその方法を見出すことができれば、筋損傷後の長期間の不活動による要介護や寝たきりへの移行を回避でき、健康寿命の延伸に繋がると期待できる。また、高齢者のみならず、全ての年代において、事故やスポーツ等による筋損傷からの早期回復を促す治療法への発展の可能性も含んでいる。

3. 研究の方法

(1) MFG-E8 ノックアウトマウスの筋再生能力の評価

MFG-E8 ノックアウトマウス(2-3ヶ月齢)と同腹仔の野生型マウスの前脛骨筋にcardiotoxinを投与し、筋損傷を誘導した。

筋損傷3, 5, 7, 10, 14日後に前脛骨筋を採取し、凍結ブロックを作成した。

7 umの筋切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行った。

(2) 筋再生過程におけるMFG-E8の発現解析

若齢マウス(2-3ヶ月齢)の前脛骨筋にcardiotoxinを投与し、筋損傷を誘導後、0, 3, 5, 7, 10, 14日後に前脛骨筋を採取した。

150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% TritonX-100, protease inhibitor cocktail (Roche)を含む10 mM Tris-HCl (pH7.5)でタンパクを抽出した。

前脛骨筋中のMFG-E8レベルは、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)を用いて定量した。

(3) 筋再生過程におけるMFG-E8発現細胞の解析

若齢マウス(2-3ヶ月齢)の前脛骨筋にcardiotoxinを投与し、筋損傷を誘導後、3日後に前脛骨筋を採取し、凍結ブロックを作成した。

7 umの筋切片を作成し、抗Pax7(筋衛星細胞を認識)抗PDGFR(間葉系前駆細胞を認識)抗F4/80, CD11b(マクロファージを認識)抗CD31(血管内皮細胞を認識)抗CD45(血球系細胞を認識)各抗体と、抗MFG-E8抗体で二重染色を行った。また、(1)のサンプルにおいても同様の染色を行った。

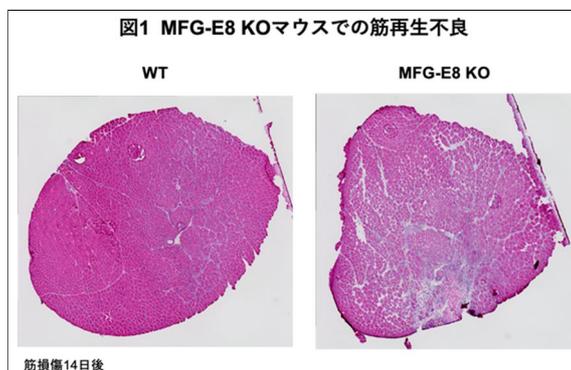
(4) 筋再生におけるMFG-E8の機能解析

(1)のサンプルを用いて、7 umの筋切片を作成し、抗Pax7抗体とKi67との二重染色および、抗myosin heavy chain抗体染色を行った。

(3)と(4)の染色画像をキーエンス社のハイブリッドセルカウント解析アプリケーションで定量解析した。

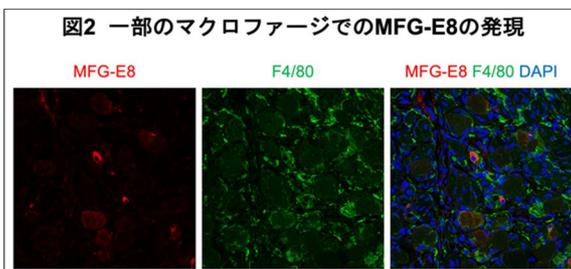
4. 研究成果

(1) 筋再生における MFG-E8 の重要性の確認
筋再生における MFG-E8 の重要性を確認するため、MFG-E8 ノックアウトマウスを用いて筋再生能力を調べた。筋損傷 3, 5, 7, 10, 14 日後の切片をヘマトキシリン-エオシン染色し、MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスと野生型 (WT) マウスの組織像を比較したところ、全てのタイムポイントにおいて、KO マウスで再生遅延が認められた。再生 14 日後には、WT マウスではほぼ完全に再生が完了するのに対し、KO マウスでは、壊死線維や浸潤細胞の残存、脂肪浸潤や間質の開大が見られ、筋再生不良が確認された (図 1)。この結果から、MFG-E8 が筋再生において重要な働きを担っており、その発現低下が老化による筋再生能力低下の一因となることが明らかとなった。

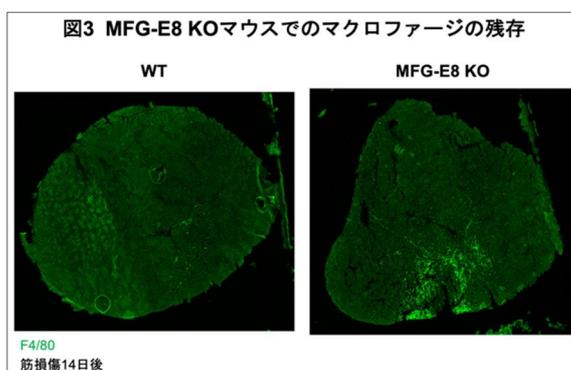


(2) 筋再生過程における MFG-E8 の発現変動
筋再生における MFG-E8 の機能を検討するため、筋再生過程における MFG-E8 の発現変動を調べた。若齢マウス (2-3 ヶ月齢) に筋損傷を誘導後、経時的にサンプリングを行い、ELISA により MFG-E8 の発現変動を調べた。非損傷時に比べ、再生初期 (3 日後) では発現が 10 倍以上増加し、その後、再生が収束するにつれて徐々に減少することが分かった。この結果から、MFG-E8 は再生初期に機能する分子であると予想された。

(3) 筋再生過程における MFG-E8 発現細胞の同定
筋再生過程において、MFG-E8 が最も発現増加するタイムポイントである再生 3 日後の筋を用いて、MFG-E8 発現細胞の同定を行った。筋切片を抗 Pax7 (筋衛星細胞を認識) 抗 PDGFR (間葉系前駆細胞を認識) 抗 F4/80, CD11b (マクロファージを認識) 抗 CD31 (血管内皮細胞を認識) 抗 CD45 (血球系細胞を認識) 各抗体と、抗 MFG-E8 抗体で二重染色を行い、共染色される細胞を調べた。その結果、F4/80 陽性のマクロファージの一部で MFG-E8 が共染色され (図 2)、一部のマクロファージが MFG-E8 を発現している可能性が示唆された。



(4) 筋再生における MFG-E8 の機能解析
筋再生における MFG-E8 の機能を検討するため、筋再生過程における各細胞の動態を MFG-E8 KO と WT マウスで比較した。再生初期 (3 日後) における免疫細胞の浸潤は両マウス間で差は認められなかったが、再生後期 (7, 10, 14 日後) では、KO マウスにおいて、F4/80 陽性のマクロファージが多く見られ (図 3)、壊死線維の残存も認められた。MFG-E8 はマクロファージによる死細胞の貪食に機能することが知られているため、MFG-E8 の欠損により壊死線維の除去が妨げられている可能性が示唆された。また、抗 Pax7 抗体と Ki67 との二重染色により、骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の増殖能力を調べた。KO マウスでは WT マウスに比べ、Ki67 陽性の筋衛星細胞数が減少しており、増殖能力の低下が認められた。抗 myosin heavy chain 抗体により再生筋線維を染色し定量した結果、壊死線維の残存と相まって、再生筋線維数が KO マウスで減少していた。CD31 陽性の血管内皮細胞の減少も KO マウスで認められた。さらに、再生後期において、WT マウスに比べ KO マウスでは、多くの PDGFR 陽性の間葉系前駆細胞が認められたことから持続的な炎症が起こっていることが示唆された。以上の結果から、MFG-E8 の発現低下により、壊死線維が残存し、炎症が持続することにより筋再生遅延が生じていると考えられた。本研究は、老化による筋再生能力低下機序の一端を解明するものであり、この成果は予防・治療法の開発へと発展が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kaneshige A, Kaji T, Saito H, Higashimoto T, Nakamura A, Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Fukada S | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Detection of muscle stem cell-derived myonuclei in murine overloaded muscles | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protocols | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yoshimoto Y, Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tanaka K, Yu X, Kurosawa T, Yambe S, Maehara K, Ohkawa Y, Sotomaru Y, Shukunami C | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Tenogenic Induction From Induced Pluripotent Stem Cells Unveils the Trajectory Towards Tenocyte Differentiation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.780038 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Morita M, Tsuchida K, Uezumi A | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Increased MFG-E8 at neuromuscular junctions is an exacerbating factor for sarcopenia-associated denervation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Aging Cell | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/accel.13536 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kaneshige A, Kaji T, Zhang L, Saito H, Nakamura A, Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Tsujikawa K, Seno S, Hori M, Saito Y, Matozaki T, Maehara K, Ohkawa Y, Potente M, Watanabe S, Braun T, Uezumi A, Fukada S | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Stem Cell | 6. 最初と最後の頁 265-280 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.11.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Minato K, Yoshimoto Y, Kurosawa T, Watanabe K, Kawashima H, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Measurement of Lateral Transmission of Force in the Extensor Digitorum Longus Muscle of Young and Old Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212356 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kurosawa T, Minato K, Ikemoto-Uezumi M, Hino J, Tsuchida K, Uezumi A | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Transgenic expression of Bmp3b in mesenchymal progenitors mitigates age-related muscle mass loss and neuromuscular junction degeneration | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910246 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kurosawa Tamaki, Goto Momo, Kaji Noriyuki, Aikiyo Satoshi, Mihara Taiki, Ikemoto-Uezumi Madoka, Toyoda Masashi, Kanazawa Nobuo, Nakazawa Tatsu, Hori Masatoshi, Uezumi Akiyoshi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Liver fibrosis-induced muscle atrophy is mediated by elevated levels of circulating TNF | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Death & Disease | 6. 最初と最後の頁 11-11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03353-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Uezumi Akiyoshi, Ikemoto-Uezumi Madoka, Zhou Heying, Kurosawa Tamaki, Yoshimoto Yuki, Nakatani Masashi, Hitachi Keisuke, Yamaguchi Hisateru, Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki, Morita Mitsuhiro, Yamada Harumoto, Toyoda Masashi, Kanazawa Nobuo, Nakazawa Tatsu, Hino Jun, Fukada So-ichiro, Tsuchida Kunihiro | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI139617 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoshimoto Yuki, Ikemoto-Uezumi Madoka, Hitachi Keisuke, Fukada So-ichiro, Uezumi Akiyoshi | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Methods for Accurate Assessment of Myofiber Maturity During Skeletal Muscle Regeneration | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 267-267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00267 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 上住円 |
| 2. 発表標題 神経筋接合部から見る骨格筋老化のメカニズム |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上住円、周赫英、吉本由紀、黒澤珠希、湊圭太郎、上住聡芳 |
| 2. 発表標題 神経筋接合部におけるMFG-E8の蓄積は加齢性脱神経の一因となる |
| 3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上住円、周赫英、黒澤珠希、吉本由紀、上住聡芳 |
| 2. 発表標題 神経筋接合部におけるMFG-E8の異常蓄積が骨格筋老化に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上住円、上住聡芳、張礪丹、周赫英、橋下有弘、岡村菊夫、松井康素、塚崎晃士、細山徹、中谷直史、森田充浩、山田治基、土田邦博、深田宗一郎 |
| 2. 発表標題 カルシトニン受容体の発現低下は加齢性の骨格筋幹細胞減少に寄与する |
| 3. 学会等名 第5回日本筋学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |