

平成 22 年 6 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20800079
 研究課題名（和文） バイオイメージング法による
 筋線維の萎縮と質的変化の分子機構解明
 研究課題名（英文） Study of molecular mechanism in muscle atrophy and fiber type change
 by using bioimaging.
 研究代表者
 森 秀一（MORI SHUICHI）
 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・研究員 研究者番号：30508677

研究成果の概要（和文）：老化に伴う筋の変化は筋線維の萎縮だけでなく、同時に筋線維タイプの遅筋化が認められているが、そのメカニズムには不明な点が多い状況である。本研究では、遅筋線維と速筋線維を蛍光タンパクの発色によって明確に識別可能な遺伝子改変マウスを作製した。今後、この遺伝子改変マウスを用いて、老化に伴う筋線維タイプの変化のメカニズムを詳細に解析することで、筋萎縮に繋がる現象や指標に関して新たな知見を得ることが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Not only atrophy of muscle fibers but also fiber type transition from fast-type to slow-type has been observed as age-related changes of skeletal muscle, however, these mechanism remain to be elucidated. In this study, generation of genetically modified mice, which could definitely distinguish between fast-type fiber and slow-type fiber by expressions of fluorescence proteins, was performed. In future, it will enable novel findings about muscular atrophy-related phenomena and biomarkers by investigating the mechanism of age-related change in fiber type using these mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,245	402,000	1,742,245
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,245	762,000	3,302,245

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：老化・筋萎縮・神経筋シナプス

1. 研究開始当初の背景

高齢者における日常生活の質を低下させる根本的要因は、無意識のうちに進行する筋萎縮による筋機能の低下である。筋萎縮のメカニズムの解明は、その科学的根拠に基づい

た早期予防、リハビリの有効性および効果判定、新しい運動処方の開発の基盤となり、筋機能の維持・増進のために必須とされている。

筋は非常に可塑性に富んだ組織であり、肥大や萎縮といった量的変化だけでなく、筋線

維タイプの変化という質的変化も認められる。この現象には筋自体の可塑性だけでなく、運動神経と筋を繋ぐ神経筋シナプスの可塑性の低下が影響していると考えられている。また、筋と運動神経の間には、神経筋シナプスを介して順行性または逆行性のシグナルが作用しており、これらシグナル伝達機能の破綻が筋萎縮に関与していると考えられているにも関わらず、筋萎縮を対象とした従来の研究は、筋や運動神経それぞれを独立して扱う研究が多い状態である。

2. 研究の目的

老化による筋萎縮では、先行して筋線維タイプの遅筋化という現象が認められる。筋萎縮に繋がる筋の量的および質的変化のメカニズムには不明な点が多いが、本研究では、これらの変化が神経筋シナプスを介した筋と運動神経の相互作用である可塑性の変化によって引き起こされていると仮定した。従って、本研究の目的は、動物モデルとバイオイメージングを用いて、筋萎縮による筋の可塑性の変化（特に筋線維タイプの変化）と神経筋シナプスの **biology** についての解析を行うことであり、以下の項目を遂行した。

(1) 筋の質的変化（筋線維タイプの変化）を明確にするため、遅筋と速筋の筋線維をバイオイメージングで識別する遺伝子改変マウスを作製する。

(2) 作製した遺伝子改変マウスを用いて、神経筋シナプス変性に対する影響を検討するため、老化と同様に神経筋シナプスを変性させる動物モデルを作製する。

3. 研究の方法

(1) 速筋線維、遅筋線維が選択的に発色する遺伝子改変マウスの作製

① 遅筋線維が選択的に発色するマウス

遅筋線維を選択的に発色させるために、筋タンパク質であるミオシン重鎖タンパク (MyHC) で遅筋線維に豊富に発現している I 型アイソフォームの遺伝子に黄色蛍光タンパクである YFP の遺伝子を付加したノックインマウスを用いた。このマウスは National Institute of Health から入手した。

② 速筋線維が選択的に発色するマウス

速筋線維を選択的に発色させるために、速筋線維に豊富に発現している MyHC の IIb 型アイソフォームの遺伝子に赤色蛍光タンパクである mCherry の遺伝子を付加したノックインマウスを作製した。ターゲティングコンストラクト (図 1) は、MyHC-IIb 遺伝子の翻訳開始部位の直前に mCherry cDNA

を挿入し、ES クローンのポジティブ選択用に FRT 配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子をイントロン領域に挿入して作製した。さらに、ネガティブ選択用にチミジンキナーゼ遺伝子をコンストラクトの 3' 末端に付加した。このコンストラクトをマウス ES 細胞に導入し、ターゲティング領域と相同組換えを起こしたクローンを選択してノックインマウスの作製を行った。尚、ノックインマウスは、理化学研究所免疫アレルギー研究センターの古関昭彦氏の協力を得て作製した。

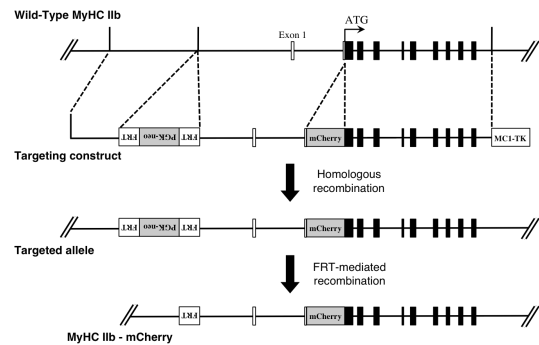


図1 MyHC IIb-mCherryノックインマウスのコンストラクト

(2) 老化による神経筋シナプス変性の動物モデルの作製

① 抗原の作製とマウスへの免疫

ラット筋細胞の mRNA から muscle-specific kinase (MuSK) 遺伝子の細胞外ドメイン領域を PCR でクローニングし、293F 細胞に導入して His-tag 付きのリコンビナントタンパク質を発現させた。リコンビナントタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、アジュバントと混合して補体成分 (C5) 欠損マウスに一匹あたり 20 μg を免疫した。2 週間後に再度リコンビナントタンパク質を免疫し、体重変化を経時的に記録して経過をモニターした。

② 神経筋シナプスの形態変化の解析

神経筋シナプスの免疫染色はマウスのヒラメ筋を使用した。運動神経の染色には、一次抗体として抗ニューロフィラメント抗体と抗シナプトフィジン抗体を用い、二次抗体として蛍光標識した抗ウサギ抗体を用いた。アセチルコリン受容体の染色には、蛍光標識した α-bungarotoxin を用いた。神経筋シナプスの観察には、共焦点顕微鏡を使用した。

また、走査型電子顕微鏡を用いて、前頸骨筋の神経筋シナプスを観察した。

4. 研究成果

(1) 遅筋線維、速筋線維が選択的に発色する遺伝子改変マウスの作製

入手した MyHC I-YFP ノックインマウスと、

作製した MyHC IIb-mCherry ノックインマウスからそれぞれの足底筋とヒラメ筋を採取し、蛍光タンパクの発色を蛍光実体顕微鏡で観察した。足底筋は代表的な速筋で、マウスでは IIb 型線維の占める割合は約 4 割であり、対照的に遅筋線維である I 型線維の割合は 1%未満であると報告されている。一方、代表的な遅筋であるヒラメ筋は約 6 割が I 型線維であり、足底筋とは対照的に IIb 型線維の割合は 1%未満であると報告されている。図 2 に示されているように、MyHC I-YFP マウスではヒラメ筋で YFP の選択的な発色、MyHC IIb-mCherry マウスでは足底筋で mCherry の選択的な発色が認められた。

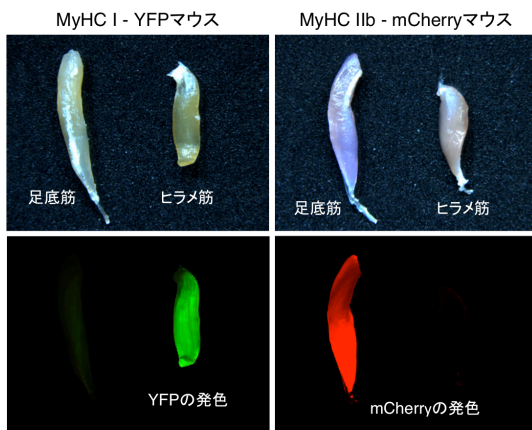


図2 ノックインマウスの筋線維の選択的な発色

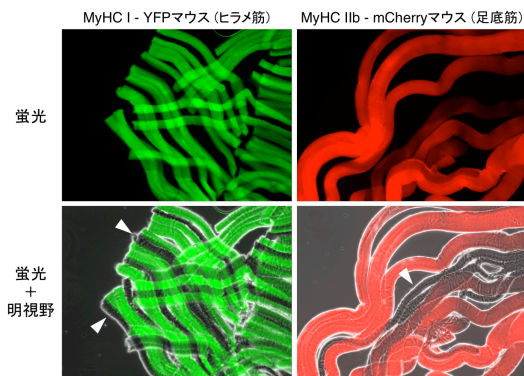


図3 ノックインマウスの筋線維の選択的な発色 (微視的な観察)

さらに、各マウスの発色した筋線維の一部を採取し、蛍光顕微鏡で観察した (図 3)。明視野との観察から両マウスの筋において、発色していない筋線維の存在 (矢印) が認められた。足底筋とヒラメ筋はそれぞれ代表的な速筋と遅筋ではあるが、ともに単一の筋線維タイプによって構成されているわけではなく、中間的な特性を持つ IIa 型線維や II d/x 線維と共存している。従って、各マウスの筋に認められる未発色の筋線維は、IIa 型線維または II d/x 型線維を示していると考えられ、本研究でのノックインマウスの I 型線維ま

たは IIb 型線維が選択的に発色していることを示唆するものである。

従来の筋線維タイプの分類には連続切片の作製を必要とし、空間的に多くの情報を失っていた可能性が高い。本研究で作製した遺伝子改変マウスは、筋の可塑性の変化である質的变化を *in situ* の状態で、さらにリアルタイムで解析するツールとして有用となるはずである。

(2) 老化による神経筋シナプス変性の動物モデルの作製

MuSK は神経筋シナプスの筋側に発現し、その機能形態に重要であると明らかにされている。本動物モデルは、MuSK のリコンビナントタンパクを免疫し、自己抗体を産生させてマウスの筋に内在している MuSK の機能を抑制するものである。MuSK を免疫したマウスは筋萎縮や筋力低下を示しただけでなく、神経筋シナプスにも大きな変化が認められた。そのポストシナプスを観察した結果、正常では馬の蹄のような形で存在しているアセチルコリン受容体の凝集が、MuSK の自己抗体産生による機能抑制によって広範囲に散乱していた (図 4)。

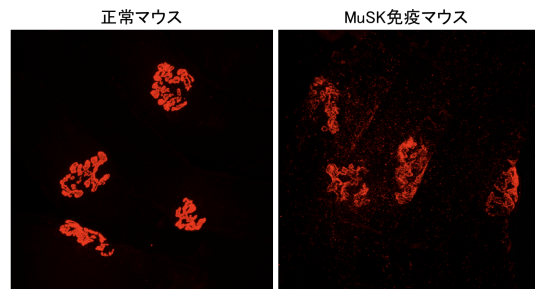


図4 MuSK免疫によるアセチルコリン受容体の凝集の変化

さらにポストシナプスだけでなく、プレシナプス側の運動神経終末の sprouting (矢印) も顕著であった (図 5)。

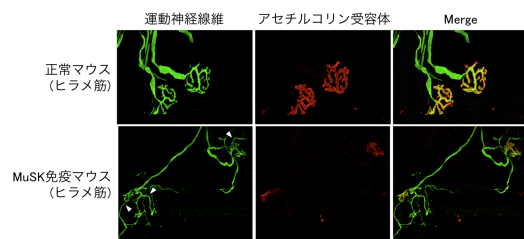


図5 MuSK免疫による神経筋シナプスの形態変化

また、神経筋シナプスのポストシナプス (筋) 側を走査型電子顕微鏡で観察した結果、MuSK の機能抑制によってシナプス溝の平坦化とその中に存在するシナプス襞の減少が生じており、正常マウスには認められる複雑なシナプス構造が失われていた (図 6)。シナプス襞にはアセチルコリン受容体だけ

でなく、電位依存性 Na チャネルなど神経筋伝達に必要な分子が多く局在しており、これらシナプス膜の機能的構造の崩壊は神経筋伝達の効率低下へと繋がる。さらに、図5で示したように、ポストシナプスの機能構造維持を障害する原因は、プレシナプスである運動神経終末の維持も阻害している。従って、筋萎縮・筋力低下などの筋機能の低下は、形態を含めた神経筋シナプスの維持機能が崩壊し、筋と運動神経の相互作用が抑制されることで生じると考えられる。

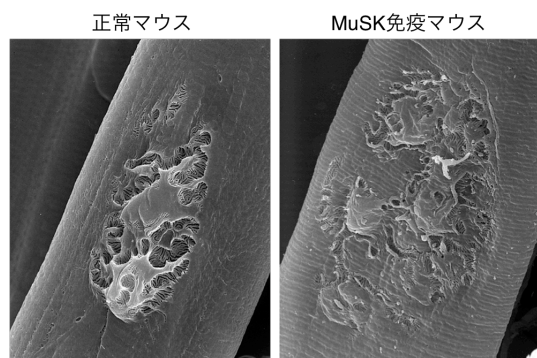


図6 MuSK免疫によるポストシナプスの形態変化

図7は若齢マウスと老齢マウス(22カ月齢)の神経筋シナプスを共焦点顕微鏡で観察したものである。MuSK免疫マウスと同様に、老齢マウスのポストシナプスではアセチルコリン受容体の凝集の断片化が生じており、プレシナプスにおいても sprouting 様の形態変化(矢印)が生じている。また、老齢マウスの神経筋シナプスを走査型電子顕微鏡で観察した先行研究においても、図6と同様にポストシナプス構造の単純化が認められている。従って、本研究で作製した動物モデルと同様に、老化においても神経筋シナプスの維持機能に異常が起こっていることを示唆するものである。

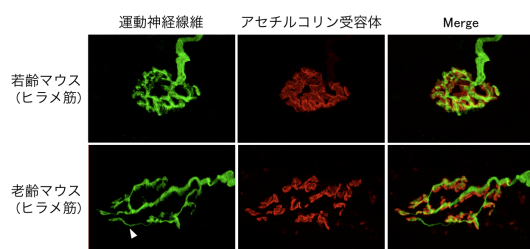


図7 老化による神経筋シナプスの形態変化

自己抗体の産生による神経筋シナプスの変性モデルは以前より報告されているが、抗原と自己抗体の複合体形成による補体系の活性化を介したシナプス組織破壊の可能性を否定することができない状況であった。しかし、本研究の動物モデルは補体欠損マウスを用いているため、そのような影響は完全に排除されている。従って、本研究で作製した

MuSKの機能抑制による動物モデルは、神経筋シナプスを介した運動神経と筋の相互作用を研究する上で、老化よりも早期に誘導可能な神経筋シナプスの変性モデルになりうると考えられる。

以上、(1)と(2)の成果を生かすことで、今後は筋萎縮に伴う変化を筋線維タイプの差異に着目し、各筋線維タイプを支配する運動神経とそれらを繋ぐ神経筋シナプスに生じる変化の差異を解析することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Tokuyama K, Nagasaka S, Mori S, Takahashi N, Kusaka I, Kiyonaga A, Tanaka H, Shindo M, Ishibashi S. Hepatic insulin sensitivity assessed by integrated model of hepatic and peripheral glucose regulation. *Diabetes Technol Ther* 2009 11: 487-92, 査読有
- ② Aoki K, Matsui J, Kubota N, Nakajima H, Iwamoto K, Takamoto I, Tsuji Y, Ohno A, Mori S, Tokuyama K, Murakami K, Asano T, Aizawa S, Tobe K, Kadowaki T, Terauchi Y. Role of the liver in glucose homeostasis in P1 3-kinase p85alpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 296: E842-53, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Mori S. Activation of complement is dispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. Society of Neuroscience, 2009年10月17日, シカゴ(アメリカ)
- ② 森 秀一. MuSKは神経筋シナプスの維持に重要である ~研究モデル動物の確立~. 日本体力医学会, 2009年9月20日, 新潟.
- ③ Mori S. Activation of complement is dispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. 日本神経科学会, 2009年9月18日, 名古屋.
- ④ 森 秀一. MuSKは神経筋シナプスの維持に重要である ~研究モデル動物の確立~. 日本基礎老化学会, 2009年6月20日, 横浜.

[図書] (計1件)

- ① Shigemoto K, Kubo S, Mori S, Yamada S, Miyazaki T, Akiyoshi T, Maruyama S. The immunopathologies of experimental

autoimmune myasthenia gravis induced by autoantibodies against muscle-specific kinase. Linus publication, Inc. *Book title:* Myasthenia gravis disease mechanism and immune intervention. 2009, p343-23.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀一 (MORI SHUICHI)

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・研究員

研究者番号 : 30508677

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :