

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11546

研究課題名（和文）サルコペニアに対する積極的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatments for sarcopenia

研究代表者

木村 雅友（Kimura, Masatomo）

近畿大学・大学病院・准教授

研究者番号：80247973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：年齢とともに起こる、筋肉の衰え（筋肉量の減少や筋力の低下）を引き起こすサルコペニアに対しては、現在のところ運動療法や栄養療法といった方法しかない。本研究では、サルコペニアに対する新たな治療法を確立することを目的とした。そのための方法として、骨格筋の萎縮や発育低下に関与すると考えられているタンパク質を標的として直接的な作用により下流へのシグナル伝達を抑制する新規の抗体作製と標的タンパク質やそのシグナル下流に存在するタンパク質に対して直接的に作用して抑制する新規化合物を探索するためのスクリーニング方法の確立と化合物の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアが引き起こされる分子メカニズムは解明されておらず、根本的な治療法は存在しないため、食事療法や運動療法が主体となっている。本研究では、骨格筋の萎縮や発育低下に関与すると考えられているタンパク質を標的とした治療法を開発を目指すことで、サルコペニアの原因の一端についても明らかにすることができると考えられる。また、サルコペニアの進行により生じる転倒によるけが（骨折等）は、安静状態を強いられることで廃用性筋萎縮も引き起こされ、更なる「生活の質」の低下につながる。治療法の開発は、早期の介入による転倒などの防止や運動療法が行えないといった状態に対しても有効な治療手段となりえる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Exercise and nutritional therapies are the main treatments for sarcopenia, which is age-related loss of skeletal muscle mass and simultaneous occurrence of muscle weakness or decreased physical function. The purpose for this study is to develop new treatments for sarcopenia. The approaches for this purpose are 1) to make new antibodies for the target protein, which is thought to be involved in skeletal muscle atrophy and hypotrophy, to suppress the signal cascade, and 2) to develop a screening method for and find compounds to directly suppress the target protein or the downstream proteins.

研究分野：病理学

キーワード：サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

骨格筋量の維持は、運動機能の保持だけでなく、身体の恒常性に重要な役割を果たす。超高齢社会に突入したことで、老化により骨格筋の衰えが生じる「サルコペニア」が深刻な問題となっているが、治療法は現在のところ栄養療法と運動療法しかない。サルコペニアが進行すると転倒による骨折などにより安静を強いられることで廃用性筋萎縮が進行するという悪循環に陥り、更なる「生活の質」の低下を引き起こす可能性がある。中には、運動療法を行うことができずに骨格筋の萎縮が進行することもあるため、治療法の確立は急務であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋の発育低下や萎縮に関与するタンパク質を標的とした治療薬によるサルコペニアに対するより積極的な治療法の確立を目指し、以下の2つのアプローチで研究を進めた(図1)。

- (1) 標的タンパク質に対する新規抗体による下流へのシグナル抑制
- (2) 標的タンパク質及びその下流にあるタンパク質を直接的に阻害する新規化合物の探索

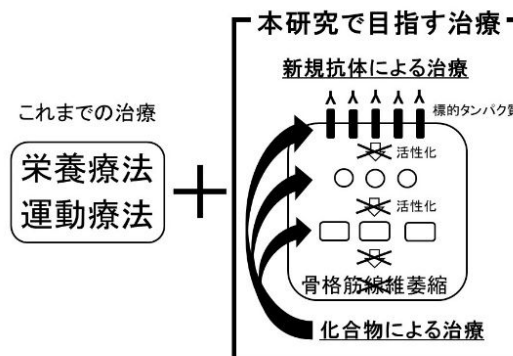


図1. 本研究における骨格筋の萎縮に対する治療

3. 研究の方法

3.1 標的タンパク質に対する新規抗体の作製

標的タンパク質に対する抗体作製のために、細胞外領域においてヒト、ラット、マウスで高度に保存されている領域の中からペプチド配列を設計した。ペプチドをマウスに投与し、ハイブリドーマを作製した。分離されたハイブリドーマ培養上清を投与ペプチドを用いたELISAに供し、ペプチドへの抗体結合能を評価した。高い結合能が確認された抗体に対し、筋芽細胞のlysateを用いてウェスタンブロットにて確認を行った。

3.2 新規抗体による骨格筋細胞への影響

抗体自体の細胞への結合及び影響を確認するために、筋芽細胞にハイブリドーマ上清及び精製抗体を添加し、24時間後に細胞を回収してlysateを得た。更にリガンド添加に対する抗体の影響を調べるため、筋芽細胞への精製抗体添加24時間後、リガンドを添加して更に培養してからlysateを調製してウェスタンブロットに供した。

3.3 新規抗体の遺伝子配列の決定

ハイブリドーマよりRNAを調製し、5'RACE法により遺伝子配列を決定した。

3.4 新規化合物探索のためのスクリーニング法の開発

多くの化合物に対して対応可能なスクリーニング法を開発するため、標的タンパク質及びその下流にあるタンパク質に対して阻害効果のある化合物を探索するために、筋芽細胞を用いた免疫染色法とELISA法を組み合わせた方法の開発を試みた。筋芽細胞を96ウェルプレートに播種して37°Cで1日培養した。翌日既知の阻害物質(コントロールは溶媒のみ)を添加した培地に交換して1時間37°Cで培養後、リガンドを添加して2時間培養した。その後、培地を除去して細胞をプレート上で固定し、通常の免疫染色と同様に過酸化水素処理、ブロッキングを行い、順次1次抗体、2次抗体を添加して発色を行い、マルチプレートリーダーにて吸光度を測定した。スクリーニング法の開発にあたり、検出対象タンパク質の選定、細胞固定法、最適細胞播種濃度を検討した。

3.5 新規化合物の探索

3.4 で開発したスクリーニング法を用いて大阪大学より提供していただいた化合物ライブラリーを用いて阻害効果を試験した。

4 . 研究成果

4.1 標的タンパク質に対する新規抗体の作製

ペプチド投与マウスより作製されたハイブリドーマは 700 個以上の細胞が得られた。この中から培養上清を使用した ELISA で高い結合反応がみられたハイブリドーマ上清を筋芽細胞の lysate を用いてウェスタンブロットを行い、市販抗体により確認された標的タンパク質のバンドと同じ位置に確認された抗体を選出した。

4.2 新規抗体の筋芽細胞への影響

筋芽細胞へのハイブリドーマ上清を添加した時（コントロールは、培地のみ）標的タンパク質の発現低下がみられた。更に精製抗体添加によって新規抗体が細胞へ結合することが確認されたが、コントロール抗体においてもこの現象がみられた。更に培養上清添加時にみられた標的タンパク質の発現量の低下は、精製抗体の添加においてはみられなかった。しかしながら、コントロール抗体ではみられない現象が、精製抗体の添加により観察された。

リガンド添加実験においてリガンド添加後の培養時間を検討した結果、添加 2 時間後が最適であることが判明した。この時間は化合物スクリーニング法の反応時間にも適用した。標的タンパク質の下流タンパク質の活性化について 2 経路に関してウェスタンブロットで確認を行った。その結果、一方の経路は活性の抑制が確認されなかったが、他方の経路は活性化の抑制が確認された。

4.3 新規抗体の遺伝子配列の決定

決定した遺伝子配列に関しては、現在未登録状態である。得られた遺伝子は、細胞発現用のベクターへクローニングして培養細胞による抗体産生の準備を行っている。

4.4 新規化合物探索のためのスクリーニング法の開発

対象タンパク質の選定は抗体の性能に依存するため、スクリーニングの前にウェスタンブロットによるチェックを行って選出した。その後、抗体が免疫染色への適応があるかを調べた。細胞の固定方法に関しては、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、メタノールを検討した結果、対象タンパク質に対してはメタノール固定が最適であった。これらの結果を踏まえて細胞筋芽細胞の最適播種細胞数の検討を行ったところ、96 ウェルプレートに対して 2.5×10^3 cell/well が最適であった。

4.5 新規化合物の探索

スクリーニングの結果、対象タンパク質を活性化するものと阻害するものがいくつか検出されたが、経路を阻害することが知られているコントロール阻害剤（提供された化合物プレートの端のウェルにあらかじめ添加）がうまく機能しないという問題が発生した。提供された化合物量はスクリーニング 1 回分しかなかったため、詳細な検討はできなかった。結果については問題解決後に再検討が必要であるため、既報の報告書には、現在のところ有効な化合物は得られていないと報告している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Satoru Hagiwara, Tomohiro Watanabe, Masatoshi Kudo, Kosuke Minaga, Yoriaki Komeda, Ken Kamata, Masatomo Kimura, Hidetoshi Hayashi, Kazuhiko Nakagawa, Kazuomi Ueshima, Yasunori Minami, Tomoko Aoki, Masahiro Takita, Masahiro Morita, Hirokazu Cishina, Hiroshi Ida, Ah-Mee Park, Naoshi Nishida	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of hepatic immune-related adverse events in comparison with autoimmune hepatitis and graft-versus host disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88824-1	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 Hajime Honjo, Tomohiro Watanabe, Mizuki Tomooka, Takuya Matsubara, Masashi Kono, Ikue Sekai, Akane Hara, Masayuki Kurimoto, Keisuke Yoshikawa, Yasuhiro Masuta, Yasuo Otsuka, Ryutaro Takada, Tomoe Yoshikawa, Ken Kamata, Kosuke Minaga, Shigenaga Matsui, Masatomo Kimura, Masatoshi Kudo	4. 巻 8
2. 論文標題 Case Report:Regulatory T Cell-Independent Induction of Remission in a Patient With Collagenous Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 678268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.678268	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 Masaki Sho, Watanabe Tomohiro, Minaga Kosuke, Kamata Ken, Komeda Yoriaki, Kimura Masatomo, Kudo Masatoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Possible involvement of autophagy in esophageal ulcers in anorexia nervosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 473 ~ 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-019-01089-0	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 Iwahashi Chiharu, Eguchi Hiroshi, Hotta Fumika, Uezumi Mayu, Sawa Miki, Kimura Masatomo, Yaguchi Takashi, Kusaka Shunji	4. 巻 20
2. 論文標題 Orbital abscess caused by Exophiala dermatitidis following posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide: a case report and a review of literature related to Exophiala eye infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-020-05294-y	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 Kaida Hayato, Kumode Takahiro, Kimura Masatomo, Ishii Kazunari	4. 巻 45
2. 論文標題 18F-FDG PET/CT Finding of Primary Cardiac Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 319 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RLU.0000000000002957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Takao, Hagiya Man, Maenishi Osamu, Kimura Masatomo, Mizuguchi Nobuyuki, Mine Yoshihiro, Kimura Ryuichiro, Chikugo Takaaki, Itoh Tatsuki, Satou Takao, Ito Akihiko	4. 巻 39
2. 論文標題 ECTOPIC TWEAKR EXPRESSION IN TYPE I FIBER OF STROKE-PRONE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IS RELATED TO SLOW MUSCLE-SPECIFIC HYPOTROPHY THROUGH MURF1 OVEREXPRESSION	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 e254 ~ e254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/01.hjh.0000747352.39323.e9	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 Bishop Justin A., Weinreb Ilan, van Vliet Chris, Leslie Connall, Utsumi Yoshitaka, Aishima Shinichi, Shiraiishi Junichi, Koyama Masamichi, Nara Yoshiharu, Kimura Masatomo, Palsgrove Doreen, Kuo Ying-Ju, Gilbert Ralph, Gagan Jeffrey, Nakaguro Masato, Nagao Toshitaka	4. 巻 47
2. 論文標題 Palisading Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1176 ~ 1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000002091	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funauchi Yohei, Takase Toru, Miyoshi Tatsuya, Miyashita Naoya, Kimura Masatomo, Nakazawa Gaku	4. 巻 61
2. 論文標題 The Diagnosis and Treatment of Primary Pulmonary Artery Sarcoma: Two Case Reports	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 667 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7666-21	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信行、前西 修、木村雅友、峯 嘉宏、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットSHRSPは廃用性萎縮からの回復時にユビキチン化の亢進が遅延する
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takao Inoue, Man Hagiya, Osamu Maenishi, Masatomo Kimura, Nobuyuki Mizuguchi, Yoshihiro Mine, Ryuichiro Kimura, Takaaki Chikugo, Tatsuki Itoh, Takao Satou, Akihiko Ito
2. 発表標題 ECTOPIC TWEAKR EXPRESSION IN TYPE I FIBER OF STROKE-PRONE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IS RELATED TO SLOW MUSCLE-SPECIFIC HYPOTROPHY THROUGH MURF1 OVEREXPRESSION
3. 学会等名 International Society for Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信行、峯 嘉宏、前西 修、木村雅友、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 SHRSPでは廃用性筋萎縮からの回復が遅延する
3. 学会等名 第57回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信行、峯 嘉宏、前西 修、木村雅友、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 脳卒中発症ラットSHRSPは廃用性萎縮からの回復時に筋線維の損傷がみられない
3. 学会等名 第7回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takao Inoue, Man Hagiya, Osamu Maenishi, Masatomo Kimura, Nobuyuki Mizuguchi, Yoshihiro Mine, Ryuichiro Kimura, Takaaki Chikugo, Tatsuki Itoh, Takao Satou, Akihiko Ito
2. 発表標題 ECTOPIC TWEAKR EXPRESSION IN TYPE I FIBER OF STROKE-PRONE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IS RELATED TO SLOW MUSCLE-SPECIFIC HYPOTROPHY THROUGH MURF1 OVEREXPRESSION
3. 学会等名 International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信之、前西 修、木村雅友、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 Ribosomal protein S6のリン酸化抑制がSHRSPにおける廃用性筋萎縮からの回復遅延に関係する
3. 学会等名 第59回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	井上 敬夫 (Inoue Takao) (00441006)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	

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
---------	---------