

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670437

研究課題名(和文)筋の代謝変換のメカニズムの解明とその制御による治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of metabolic shift of skeletal muscle during aging and invention of new therapies for sarcopenia

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・研究部長

研究者番号：40284400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会を迎えサルコペニア(加齢性筋肉減少症)は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。本研究では、筋萎縮に伴う骨格筋の代謝機能の変化のメカニズムを解明して、さらに代謝を調節することで画期的な予防・治療法を開発するための新技術を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia impairs activity of daily living of aged people. For the early prevention or treatment of such conditions, it is required to understand the pathogenesis and invent effective therapies. In this study, we will elucidate the metabolic changes in skeletal muscle during aging and establish the new technologies for developing innovative preventive and therapeutic methods by remodeling the metabolism.

研究分野：基礎老化学

キーワード：サルコペニア 筋萎縮 動物モデル 代謝 筋線維

1. 研究開始当初の背景

(1)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。

(2)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様々な体内外の環境要因により、代謝変換を伴う筋線維タイプ(速筋および遅筋)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。また、筋線維タイプ変化を変化させる物質を探索することができれば、筋萎縮の予防効果について解析することが可能となる。

2. 研究の目的

(1)骨格筋は分化系譜の異なる様々な細胞から構成される複雑な組織である。筋収縮の中心的役割を果たす筋線維は、収縮特性・代謝特性・疲労耐性等の違いから遅筋線維と速筋線維に大別することができ、それぞれ性質が全く異なる筋線維タイプに分類されている(下表)。

加齢による筋萎縮に伴い筋線維タイプが変化することはこれまで多く報告されているが、筋萎縮の機構と筋線維タイプ(エネルギー産生機構)の変化との因果関係についてはまだほとんどわかっていない。本研究では、筋線維タイプ変化を伴う代謝変換の機構に着目して筋萎縮のメカニズムの解明と予防治療法の研究を行うことを目的としているが、老化マウスの骨格筋内の筋線維タイプごとに、詳細に解析した病理学的な研究は殆どなされておらず、介入後の効果を判定する指標を得る必要がある。そこで我々は、若齢(8ヶ月齢)及び老齢(32ヶ月齢)のC57BL/6Ncrマウス()における下肢筋の凍結筋横断切片を作製し、筋萎縮に伴う筋線維タイプレベルの筋機能の変化を、組織化学的・病理学的方法で体系的に解析を行った。

(2)筋線維タイプを生きたまま解析する新技術をこれまで確立しているため、本解析方法を創薬技術として使えるようにハイスループットの手法を確立する。

(3)筋線維タイプ変化を誘導する物質を同定して作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)C57BL/6Ncrマウス(、若齢群;8ヶ月齢と老齢群;32ヶ月齢)を動物実験委員会から許可を得た方法で安楽死させた後、下肢骨格筋(ひらめ筋、長趾伸筋)をすばやく採取して液体窒素で凍結する。凍結切片を作製して免疫抗体染色法と組織化学染色法により

筋線維タイプ単位で、加齢による病理学的変化を画像で定量的に解析する。

(2)C57BL/6Ncrマウス由来の骨格筋から新技術を使い、筋芽細胞株を樹立している。そこで樹立した筋芽細胞に候補分子を添加して分化誘導後に筋線維タイプを同定して、ハイスループットに探索できるよう条件検討を行う。

(3)生体内で筋線維タイプ変化を誘導することが既に報告されている物質(生体内因子、薬物)、未報告の候補分子を使いスクリーニング系の評価を行う。さらに、同定した物質が筋線維タイプを変化させる分子機構を解析する。

4. 研究成果

(1)老齢マウスのひらめ筋及び長指伸筋は共に筋重量の減少と、顕著な萎縮を示した。次に、各筋線維タイプ別の筋萎縮を解析するためにATPase(pH4.7)染色と各筋線維タイプに対する免疫染色を行った。その結果、老齢マウスのひらめ筋(Type a筋線維から構成される)はType a筋線維特異的な筋線維数の減少を示したが、筋線維の面積はType a筋線維共に維持された。一方、老齢マウスの長指伸筋(Type a, x, b筋線維で構成される)ではType b筋線維特異的な筋線維数の減少と筋線維面積の低下を示した。このように、老齢マウスのひらめ筋と長指伸筋は筋線維タイプ特異的に異なる筋萎縮の様式を示すことがわかった。

先行研究では、加齢に伴い神経筋接合部の機能・形態が変化し筋線維の脱神経支配が生じて筋の萎縮が進行することが示されている。筋線維の脱神経支配と近隣に存在する筋線維の再神経支配は、筋線維タイプの群化として認められる。従って、高齢者の筋で見られる筋線維タイプの群化は、除神経に伴う再神経支配を反映することが予想される。そこで、除神経・再神経支配が筋線維タイプに及ぼす影響を調べるために、独自の評価方法によって筋線維タイプの群化を定量的に解析した。その結果、老齢マウスの長指伸筋において、顕著な萎縮を示したType2b fiberの脱群化や、それに伴うType2a及び2xの群化が確認された。老齢マウスのひらめ筋においてもType1 fiberの群化が確認された。

エネルギー代謝が活発な骨格筋では、ミトコンドリア機能の低下は筋機能の低下や筋萎縮を引き起こすことが予想される。また、実際に高齢者や老齢動物の骨格筋において、ミトコンドリアの活性が低下することは既に知られている。しかし、それらの研究は骨格筋全体を研究対象として扱っており、筋線維タイプとミトコンドリア活性に着目した

報告はほとんどなかった。そこでまず速筋（長指伸筋）と遅筋（ひらめ筋）におけるミトコンドリア機能の加齢変化を調べるために、NADH(呼吸鎖複合体), SDH(呼吸鎖複合体), COX(呼吸鎖複合体)染色によるミトコンドリア呼吸酵素活性の解析を行った。その結果、老齢マウスのひらめ筋におけるSDH活性は維持されていたが、NADH及びCOX活性は顕著に低下した。一方で、老齢マウスの長指伸筋におけるミトコンドリア活性は維持されていた。次に、ひらめ筋の連続切片を作製し、ATPase(pH4.7)染色とCOX染色及びNADH-TR染色を行うことで筋線維タイプ別のミトコンドリア呼吸酵素活性を解析した。その結果は、老齢マウスのひらめ筋では、Type1 fiber 特異的にCOX活性及びNADH活性の低下が観察された。先行研究では、生化学的手法により老齢動物のひらめ筋はミトコンドリア活性の低下を示すことが報告されているが、我々は筋線維タイプ特異的なミトコンドリア活性の低下であることを明らかにした。

さらに、ミトコンドリアの形態異常の有無を検討するために、ひらめ筋と長指伸筋の各切片に対して、ゴモリトリクローム変法(mGT; modified Gomori trichrome)による染色、COX活性の(cytochrome c oxidase)染色、抗体によるCOXの免疫組織染色を行った。その結果、老齢マウスのひらめ筋において筋線維膜直下にミトコンドリアの集積像が観察される筋線維が有意に増加していることが認められたが、長指伸筋ではその変化は全く観察されなかった。

老齢マウスのひらめ筋と長趾伸筋における解糖系代謝機能を解析した。解糖系代謝機能の評価として、解糖系代謝酵素活性の指標とされる-GPD(-glycerophosphate dehydrogenase)染色を、作製した凍結筋切片に施した。その結果、老齢マウスのひらめ筋と長趾伸筋では共に-GPD活性に顕著な変化は認められず、各筋線維タイプ単位で活性が維持されることが判明した。

(2)代謝変換を伴う筋線維タイプ変化を誘導する薬物を探索するため開発した培養筋芽細胞株を使い、物質探索をハイスループットで探索する条件を探索した。そして、マルチプレート(48,96ウェル)での培養条件として、細胞数、培養日数、顕微鏡観察のプログラムの最適化及び解析プログラムの最適条件を見出した。さらに、pGC1-, mTOR、YY-1のKOマウス(Jackson Lab), ERRのKOマウス(凍結胚: from MMRRRC by NIH)を入手して培養筋細胞株の樹立を進めている。

(3)開発した探索技術を使い、既に発見した3種類の代謝変換物質に加えて、新たに既に10種類の物質が筋線維タイプ変化を誘導す

ることができた。そのうち2種類は探索前に、同じ作用が報告されていたが、3つは探索時に報告され、さらに7つについては未報告である。同定した物質の作用機序の解明を進めている。

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12件)

1. Mori S, Koshi K, Shigemoto K. The important role of the neuromuscular junction in maintaining muscle mass and strength. *J Phys Fitness Sports Med* 3: 111-114, 2014. (査読無し)
2. 重本和宏: 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 実験医学、Vol.32 No.9, 1366-71,2014.
3. 重本和宏: 筋萎縮(サルコペニア) 医学のあゆみ 248、691-695, 2014. (査読無し)
4. 森 秀一, 高嶋 留美, 小西 哲郎, 重本和宏. 動物モデルによる重症筋無力症の病態機序の解明. *神経内科* 80: 475-483, 2014. (査読無し)
5. Mori, S. and Shigemoto, K.: Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun.Rev.* 12, 912-917, 2013. (査読有り)
6. Hotta, H., Masamoto, K., Uchida, S., Sekiguchi, Y., Takuwa, H., Kawaguchi, H., Shigemoto, K., Sudo, R., Tanishita, K., Ito, H. and Kanno, I. : Layer-specific dilation of penetrating arteries induced by stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the mouse frontal cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 1440-1447, 2013. (査読有り)
7. Kimura, Y., Kubo, S., Koda, H., Shigemoto, K., Sawabe, M. and Kitamura, K. : RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using laser microdissection--a technical report. *Hear Res* 302, 26-31, 2013. (査読有り)
8. 重本和宏, 福永大地, 森秀一 : 筋肉の老化. *Clin.Calcium* 23, 23-28, 2013. (査読無し)
9. 森 秀一, 重本 和宏 : 神経筋接合部の維持機構と筋萎縮. 医学のあゆみ 244, 696-703, 2013. (査読無し)
10. 宮崎 剛, 森 秀一, 重本 和宏 : サルコペニア発症のメカニズム. 腎と骨代謝 26, 99-107, 2013. (査読無し)

11. 重本和宏、越勝男、森秀一：サルコペニアの病因と疾患メカニズム。アンチエイジング医学 9, 536-540, 2013。(査読無し)
12. Mori, S., Kishi, M., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. J.Neuroimmunol. 245, 75-78, 2012。(査読有り)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 招待講演(シンポジウム)重本和宏:サルコペニアと代謝制御の臨床。第 87 回日本内分泌学会学術総会 福岡、4 月 24-26 日、2014 年
2. 森秀一、重本和宏: 神経筋シナプスの維持メカニズムの解明とサルコペニア研究の展開。第 67 回日本体力医学会大会、岐阜、2012.9.14-16, 2014 年
3. 招待講演(シンポジウム)重本和宏:サルコペニアの基礎と臨床。第 69 回日本体力医学会、長崎、9 月 20 日、長崎、2014 年。
4. 森秀一、越勝男、村瀬尚哉、重本和宏: 抗 LRP4 抗体による重症筋無力症の動物モデル作成と病態機序の解明。第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、2014.5.20-24
5. (Invitation from NIH workshop) Shigemoto K.: Preclinical models of myasthenia gravis: MuSK model, The preclinical workshop on MG models. NIH Bethesda, USA.2014.9.24-25
6. 重本和宏、森秀一、福永大地: Fiber specific studies in muscle atrophy with aging mice、第 1 回サルコペニアフレイル研究会、10 月 19 日、東京、2014 年
7. Mori S, Takashima R, Shigemoto K. Generation of experimental model of myasthenia gravis with antibodies against LRP4. Society for Neuroscience 204, 11.15-19. Washington, D.C. 2014
8. Mori, S., Kubo, S., Kishi, M., Konishi, T. and Shigemoto, K.: Elucidation of pathogenic mechanism of myasthenia gravis with MuSK antibodies using a novel murine model. 15th International congress of immunology, Milan, 2013.8.22-27
9. 森秀一、久保幸穂、重本和宏: 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症に關与する分子機序の解明。第 54 回日本神経学会学術大会、東京、2013.5.29-6.1
10. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T.,

Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: A murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies; effect of genetic background. Myasthenia 2013, Paris, 2013.7.1-2

11. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: A novel murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012.5.21-23
12. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: Examination of the treatment of myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies using an experimental autoimmune animal model. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012.5.21-23

〔図書〕(計 2 件)

1. 重本和宏: 筋肉(サルコペニア) p34-49, 「老化の生物学」, 石井直明・丸山直記編, 化学同人、2014 年。
2. 重本和宏: Q.9 診断のためのバイオマーカーについて教えてください。サルコペニア 24 のポイント 高齢者への適切なアプローチをめざして、47-51, フジメディカル出版 2013 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

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: PCT/JP2015/060671

出願年月日: 平成 27 年 4 月 3 日

国内外の別: 国外

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關与する物質のスクリーニング、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: PCT/JP2014/078366

出願年月日: 平成 26 年 10 月 24 日

国内外の別: 国外

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：特願 2014-77086
出願年月日：平成 26 年 4 月 3 日
国内外の別： 国内

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關与する物質のスクリーニング,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：特願 2013-221037
出願年月日：平成 25 年 10 月 25 日
国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/undokiiigaku.html

6. 研究組織

(1)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・研究部長
研究者番号：40284400