

サルコペニアの予防・治療法の開発を目的とした老化骨格筋の再生環境悪化の原因究明  
(23-6)

主任研究者 上住 円 国立長寿医療研究センター 室長

#### 研究要旨

本研究は、サルコペニアの一因と考えられる加齢に伴う筋再生能力低下をもたらす骨格筋内の環境変化の実体解明を目的とする。骨格筋の再生環境を調節する要素として、再生過程の骨格筋で作用するタンパク質(骨格筋組織に存在する因子および全身性の因子(血清))と骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目し、これらの加齢に伴う変化を明らかにすることにより、老化骨格筋における再生環境悪化の原因を追求する。再生過程の骨格筋で作用するタンパク質に着目した解析では、老化マウスと若齢マウスの再生過程骨格筋組織及び血清を用いたサイトカイン抗体アレイ解析を実施し、骨格筋環境調節候補因子を同定した。また、骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析においては、間葉系前駆細胞とそれが作用する筋衛星細胞及び免疫細胞の加齢に伴う組織内動態変化を解析し、老化マウスの再生中期以降に見られる間葉系前駆細胞の収束の遅延が、再生環境を変化させ筋再生不良を導いている可能性を示した。

主任研究者

上住 円 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

上住 聡芳 藤田保健衛生大学 助教

#### A. 研究目的

サルコペニアは高齢者の転倒事故の主要な原因の一つであり、寝たきり人口の増加につながるため、解決すべき重要課題である。サルコペニアの原因は未だ解明されていないが、加齢に伴う筋再生能力の低下が一因であると考えられている。我々は実際に、老化マウスでは若齢マウスに比べ筋再生能力が顕著に低下していることを認めている。成体筋組織の再生は、骨格筋特異的な幹細胞である筋衛星細胞が担っているが、加齢に伴う筋衛星細胞自体の質の劣化より、骨格筋組織内環境の悪化が筋再生能力低下に寄与していることを明らかにしている。そこで、本研究では、加齢に伴う筋再生能力低下をもたらす骨格筋内の環境変化を明らかにし、サルコペニアの予防・治療法の開発へと発展させる。

具体的には、骨格筋の再生環境を調節する要素として、再生過程の骨格筋で作用するタンパク質（骨格筋組織に存在する因子および全身性の因子（血清））と、骨格筋に存在し、筋衛星細胞とは異なる細胞である間葉系前駆細胞に着目し、これらの加齢に伴う変化を明らかにすることにより、老化骨格筋における再生環境悪化の原因を追求する。

分担研究者は骨格筋内に筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞を同定し、この細胞が骨格筋の脂肪化や線維化といった組織内環境の悪化に寄与することを見出している（Uezumi et al., Nat. Cell Biol. 2010; Uezumi et al., J. Cell Sci. 2011）。一方、この間葉系前駆細胞は生理的条件下では、筋衛星細胞や免疫細胞に作用し、間接的に筋再生を促進することも明らかになってきた。このように間葉系前駆細胞は筋再生環境に大きな影響を及ぼす細胞要素で、その加齢変化を解明することは老化に伴う筋再生能力低下の原因究明につながる

と期待出来る。

本年度は、再生過程の骨格筋で作用するタンパク質に着目した解析においては、老化マウスと若齢マウスの再生過程骨格筋組織及び血清を用いてサイトカイン抗体アレイ解析を実施し、骨格筋環境調節候補因子の探索を行った。また、骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析においては、間葉系前駆細胞とそれが作用する筋衛星細胞及び免疫細胞の加齢に伴う組織内動態変化の解析を行った。

## B. 研究方法

### （1）再生過程の骨格筋で作用するタンパク質に着目した解析

老化マウス（24ヶ月齢超）と若齢マウス（2-3ヶ月齢）の下肢骨格筋に Cardiotoxin (CTX) を投与し、筋再生を誘導した。最も筋衛星細胞の増殖が活発な CTX 投与 3 日後の骨格筋組織からタンパク質を抽出し、サイトカイン抗体アレイ (RayBiotech) 解析を行った。また、老化マウスと若齢マウスから血清を分離し、サイトカイン抗体アレイ (RayBiotech) 解析を行った。

### （2）骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析

以下の手順で筋再生過程における間葉系前駆細胞と筋衛星細胞、免疫細胞の動態変化を精査し、老化マウスと若齢マウス間で比較した。

- ①老化マウスと若齢マウスの下肢骨格筋に再生を誘導した。
- ②筋再生過程における間葉系前駆細胞と筋衛星細胞、免疫細胞の動態変化を三重染色により、免疫組織学的に調べた。老化マウスと若齢マウスについて同様の解析を行い、各細胞の動態変化に違いがあるか精査した。各細胞のマーカーとして PDGFR $\alpha$ （間葉系前駆細胞）、M-cadherin（筋衛星細胞）、CD45 及び CD11b（免疫細胞）を用いた。
- ③筋再生過程での間葉系前駆細胞、筋衛星細胞、免疫細胞の数的変化を FACS により定量

的に解析した。老化マウスと若齢マウスについて同様の解析を行い、各細胞の数的変化の違いを比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、人権の保護や個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究には該当しない。動物実験に関しては、国立長寿医療研究センターの動物飼育設備利用者委員会および動物実験倫理委員会の承認の下、規則に従って実施した。

### C. 研究結果

(1) 再生過程の骨格筋で作用するタンパク質に着目した解析

再生過程骨格筋組織のサイトカイン抗体アレイ解析では、調べた 144 種類のサイトカイン関連因子のうち、若齢マウスに比べ、老化マウスで発現増加(1.5 倍以上)するものとして、12 種類を同定し、逆に発現減少(1.5 倍以下)するものとして 3 種類を同定した。また、血清のサイトカイン抗体アレイ解析においては、老化マウスの血清で発現増加(1.5 倍以上)するものとして、47 種類を同定し、逆に発現減少(1.5 倍以下)するものとして 1 種類を同定した。

(2) 骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析

再生初期における間葉系前駆細胞の増殖や免疫細胞の動員に、老化マウスと若齢マウス間で大きな差は見られなかった。再生初期(筋損傷後 2 日目及び 3 日目)における筋衛星細胞の増殖は老化マウスで明らかに低下していた。一方、再生中期から後期にかけて(筋損傷後 3~7 日)、若齢マウスでは間葉系前駆細胞と免疫細胞は減少していくが、老化マウスではこれらの細胞の減少が見られず、炎症反応の収束に遅延が認められた。これに対応して、再生中期から後期の筋衛星細胞による新生筋線維形成が老化マウスにおいて低下しており、損傷後 7 日目において依然増殖過程の筋衛星細胞が観察された。

### D. 考察

(1) 再生過程の骨格筋で作用するタンパク質に着目した解析

再生過程骨格筋組織のサイトカイン抗体アレイ解析は、CTX投与3日後の組織を用いて実施した。分担研究者による組織学的解析やFACS解析から、CTX投与3日後において筋衛星細胞の増殖が老化マウスで顕著に低下していることが明らかになっており、サイトカイン抗体アレイ解析によって老化マウスで発現変動の認められた因子は、筋衛星細胞の増殖に関与している可能性が高い。

老化マウスと若齢マウスの血清を用いたサイトカイン抗体アレイ解析から、老化マウ

スの血清で発現変動する因子を同定した。興味深いことに、発現変動の認められた47種類のうち、老化マウス血清で発現減少(1.5倍以下)していたものは1種類のみであり、その他は全て老化マウス血清で発現増加(1.5倍以上)していた。筋衛星細胞の増殖促進効果が知られているいくつかの因子において発現減少は認められず、むしろ、筋衛星細胞の機能阻害に関わる因子が増加していると考えられた。

#### (2) 骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析

再生初期の間葉系前駆細胞と免疫細胞の応答に、老化マウス-若齢マウス間で差が見られなかったことから、再生初期の筋衛星細胞の増殖低下には間葉系前駆細胞と免疫細胞は関与していないと考えられる。一方、老化マウスの再生中期以降に見られる間葉系前駆細胞の収束の遅延は、再生環境を変化させ筋再生不良を導いている可能性がある。

#### E. 結論

加齢に伴う筋再生能力低下をもたらす骨格筋内の環境変化の実体解明を目的として、老化マウスと若齢マウスの再生過程骨格筋組織及び血清を用いたサイトカイン抗体アレイ解析を実施し、骨格筋環境調節候補因子を同定した。また、間葉系前駆細胞とそれが作用する筋衛星細胞及び免疫細胞の加齢に伴う組織内動態変化を解析し、老化マウスの再生中期以降に見られる間葉系前駆細胞の収束の遅延が、再生環境を変化させ筋再生不良を導いている可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Ikemoto-Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, Shimizu S, Hashimoto N. CDK4 and Cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. Gene Ther. 2011, 18(9): 857-866.
- 2) Yamaguchi M, Ogawa R, Watanabe Y, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Yamamoto H, Takeda S, Fukada S. Calcitonin receptor and Odz4 are differently expressed in Pax7-positive cells during skeletal muscle regeneration. J. Mol. Histol. 2012, In press.
- 3) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Milkov M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S.

Fibrosis and adipogenesis originate from common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 2011, 124(21): 3654-3664.

- 4) Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogawa R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H. Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development.* 2011, 138(21): 4609-4619.

(総説)

- 1) 上住聡芳、深田宗一郎、土田邦博、骨格筋内脂肪形成のメカニズム. *Modern Physician.* 2011, 31(11): p1313-1315.
- 2) 上住聡芳、深田宗一郎、土田邦博、骨格筋内在性の間葉系前駆細胞. *生体の科学.* 2011, 62(2): p157-160.
- 3) 上住聡芳、土田邦博、骨格筋内脂肪の形成に寄与する間葉系前駆細胞の同定. *日本老年医学会雑誌.* 2011, 48(2): p99-103.

2. 学会発表

- 1) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Hashimoto N. Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells. *Keystone Symposia, The Life of a Stem Cell: From Birth to Death, 2012*
- 2) 上住 円, サルコペニアの原因解明を目的とした骨格筋幹細胞の加齢変化の解析. 徳島大学医学部生体栄養学分野特別講演会, 2011 (招待講演)
- 3) Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. *Keystone Symposia, The Life of a Stem Cell: From Birth to Death, 2012*
- 4) Uezumi A, Tsuchida K. Interaction between non-myogenic mesenchymal progenitors and muscle cells. 第34回日本分子生物学会年会, 2011 (招待講演)
- 5) 上住聡芳, 骨格筋の脂肪化や線維化に寄与する間葉系前駆細胞の同定. 第11回徳島 Bone Forum 講演会, 2011 (招待講演)
- 6) 上住聡芳, 骨格筋の脂肪化や線維化に寄与する間葉系前駆細胞の同定. 第29回日本骨代謝学会学術集会, 2011 (招待講演)
- 7) 上住聡芳, 骨格筋の脂肪変性のメカニズム. 第11回抗加齢医学会総会, 2011 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし