

長寿医療研究開発費 平成24年度 総括研究報告

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

本研究目的は、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を明らかにすることである。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する。これらの加齢変化を明らかにすることで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、前年度に実施した、老化マウスと若齢マウスの再生過程骨格筋組織と血清を用いたサイトカイン抗体アレイ解析により同定された骨格筋環境調節候補因子について、その発現確認と機能解析を行った。それにより、老化骨格筋の再生能力低下の原因となるタンパク質が明らかになってきた。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における間葉系前駆細胞と筋衛星細胞の減少、および、老化マウスの再生後期における新生筋線維形成の低下を見出した。また、老化マウスの再生後期では間葉系前駆細胞と免疫細胞の収束に遅延が認められた。再生中期の変化が後期に見られた違いを生んでいると考え、再生中期の細胞の性質変化をマイクロアレイにより調べ、間葉系前駆細胞特異的かつ老化により発現変動している遺伝子群を同定した。その中で、間葉系前駆細胞の老化表現型に関与する可能性がある候補因子を見出した。

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。

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、前年度に実施した再生過程骨格筋組織と血清を用いたサイトカイン抗体アレイ解析により同定された、老化で発現変動するタンパク質について、その発現確認と *in vitro* での機能解析を行った。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、再生中期の細胞の性質変化に焦点を当てマイクロアレイ解析を行った。

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

① サイトカイン抗体アレイ解析により同定されたタンパク質の発現確認

老化マウス（24ヶ月齢超、n=3）と若齢マウス（2-3ヶ月齢、n=3）から血清を分離し、いくつかのサイトカインについて ELISA で発現の再現性を調べた。

また、老化マウスと若齢マウスの下肢骨格筋に Cardiotoxin (CTX) を投与し、筋損傷を誘導した。CTX 投与 1, 3, 5, 7, 14 日後に筋肉を採取し、タンパク質を抽出した。Immunoblot 及び ELISA にて、着目したサイトカインの筋再生過程における経時的発現変化とその老化による発現変化を調べた。

② 筋衛星細胞の *in vitro* 培養系での機能解析

若齢マウスの下肢骨格筋から FACS を用いて筋衛星細胞を分取し、様々な濃度の候補因子を含む増殖培地中で培養した。4 日後に MyoD 陽性細胞数を比較し、筋衛星細胞の増殖への影響を調べた。

また、若齢マウスから FACS によって分取した筋衛星細胞を増殖培地中で 4 日間培養後、様々な濃度の候補因子を含む分化培地に交換した。3 日後に myosin heavy chain 陽性 myotube に含まれる核の割合 (fusion index) を比較し、筋衛星細胞の分化に対する影響を調べた。

(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中期の間葉系前駆細胞と筋衛星細胞、免疫細胞の遺伝子発現をマイクロアレイによって調べ、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 3 日目の間葉系前駆細胞、筋衛星細胞、免疫細胞を FACS により分取し、RNA を単離、精製した。
- ③マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った。間葉系前駆細胞、筋衛星細胞、免疫細胞の細胞間での比較、さらに、老化マウスと若齢マウス間での比較解析を行い、間葉系前駆細胞特異的で老化により発現変動する遺伝子群を同定した。

(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

- ①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により同定されたタンパク質の発現確認

アレイ解析において、若齢マウスに比べ老化マウスの血清で 1.5 倍以上発現増加していたサイトカインのうち、いくつかのもの (DKK-1, sTNF RI, CXCL13 等) について ELISA で発現の再現性を確認した。

- ②老化マウスと若齢マウスの再生過程骨格筋組織を用いたサイトカイン抗体アレイ解析により同定されたタンパク質の発現確認と *in vitro* での機能解析

老化マウスで発現減少していた一つのサイトカインに着目した。まず、若齢マウスを用いて筋損傷後の発現変化を経時的に調べたところ、筋損傷 5 日後に最も発現が増大す

ることがわかった。筋損傷5日後は増殖した筋衛星細胞が分化し、幼若筋線維が形成され始める時期であることから、候補因子は筋衛星細胞の分化に機能していると予想された。この損傷5日後の筋肉において老化マウスと若齢マウスで発現レベルを比較し、immunoblotとELISA両方において老化マウスで発現減少していることを確認した。また、筋衛星細胞のin vitro培養系への添加実験により、候補因子は筋衛星細胞の分化を促進することを明らかにしている。これらの結果から、老化骨格筋では候補因子の発現減少によって筋分化能が低下し、これが筋再生能力低下の一因となっている可能性が示された。

(2) 骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析

老化マウスと若齢マウスの再生中期（筋損傷後3日）から間葉系前駆細胞、筋衛星細胞、免疫細胞を単離しマイクロアレイによる比較解析を行った。その結果、間葉系前駆細胞特異的かつ老化により発現変動している遺伝子群を同定した。リアルタイムPCR解析を行ったところ、老化間葉系前駆細胞でいくつかの遺伝子が顕著に発現変動することが確認できた。その中には、核内受容体を活性化し直接標的遺伝子の発現を誘導するシグナル経路に含まれる因子もあり、間葉系前駆細胞の老化表現型に関与する可能性がある。今後、これらの因子を中心に機能解析を進め、間葉系前駆細胞の制御による再生環境の改善を目指す。

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

近年、加齢に伴う筋再生能力低下の原因として、骨格筋内環境変化の影響を示唆する報告がなされている。whole muscle移植実験では、若齢ラットの筋肉を老化ホストに移植すると、若齢ホストに移植した場合に比べ、はるかに再生が悪くなる¹⁾。さらに、老化マウスと若齢マウス間のパラビオーシス(血流を共有させること)により、低下した老化マウスの筋再生能力が回復する²⁾。我々のこれまでの研究結果に加え、これらの報告から、筋再生における環境の重要性が指摘されるが、加齢に伴う筋再生能力低下をもたらす環境因子は未だ同定されていない。よって、本研究では骨格筋組織に局在するlocal factorとsystemic factorである血清に着目し、老化骨格筋の再生環境悪化を導く候補因子の同定を進めている。本年度は一つのサイトカインに着目し、老化骨格筋でのその発現減少が筋再生能力低下の一因となっている可能性を示した。今後、老化マウスへのその候補因子補充による筋再生能力改善効果を検証し、サルコペニアの予防法開発へと発展させる。

(参考文献)

1. Carlson BM. and Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. Am J Physiol. 1989, 256(6 Pt 1): C1262-6.
2. Conboy IM. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic

environment. Nature. 2005, 433(7027): 760-4.

(2) 骨格筋内在性の間葉系前駆細胞に着目した解析

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、老化間葉系前駆細胞で発現変動するいくつかの遺伝子を同定した。その中で、核内受容体を活性化するシグナル経路に位置する因子に注目している。核内受容体は DNA の転写調節領域に結合し、直接標的遺伝子の発現を誘導する。このことからこれらの因子およびそれが位置するシグナル経路が間葉系前駆細胞の老化表現型に関与する可能性がある。今後、この因子やシグナル経路に注目し、その筋再生における重要性を調べるとともに、その制御にも取り組み、老化再生環境改善を目指す。

E. 結論

老化骨格筋での筋再生能力低下の一因として、一つのサイトカインの発現減少を見出し、その補充による筋再生能力改善の可能性を示した。また、老化間葉系前駆細胞で変化する因子およびシグナル経路を見出し、その制御による間葉系前駆細胞の正常化（若返り）の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, Yamamoto N, Yamaguchi A, Yamada H, Tsuchida K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. PLoS One. 2013, 8(2): e56641.
- 2) Ito T, Ogawa R, Uezumi A, Ohtani T, Watanabe Y, Tsujikawa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Imatinib attenuates dystrophic condition in severe mouse dystrophy and inhibits both proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. Neuromuscul. Disord. 2013, 23(4): 349-356.
- 3) 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, 43(5): 581-587.

2. 学会発表

- 1) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Hashimoto N. Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia. Keystone Symposium, Aging and Diseases of Aging, 2012
- 2) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Hashimoto N. Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', 2012
- 3) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Hashimoto N. Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia. FASEB Science Research Conference: Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, 2012
- 4) 上住聡芳 筋疾患および筋再生における間葉系前駆細胞の役割 農研機構 畜産草地研究所セミナー 2013 (招待講演)
- 5) 上住聡芳 間葉系前駆細胞による筋再生制御機構の解析 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」平成24年度 研究班会議 2012 (招待講演)
- 6) 上住聡芳 筋再生および筋疾患における間葉系前駆細胞の役割 協和発酵キリン株式会社 (骨格筋再生および筋疾患に関する最前線研究の講義) 2012 (招待講演)
- 7) Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', 2012
- 8) Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. FASEB Science Research Conference: Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, 2012

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