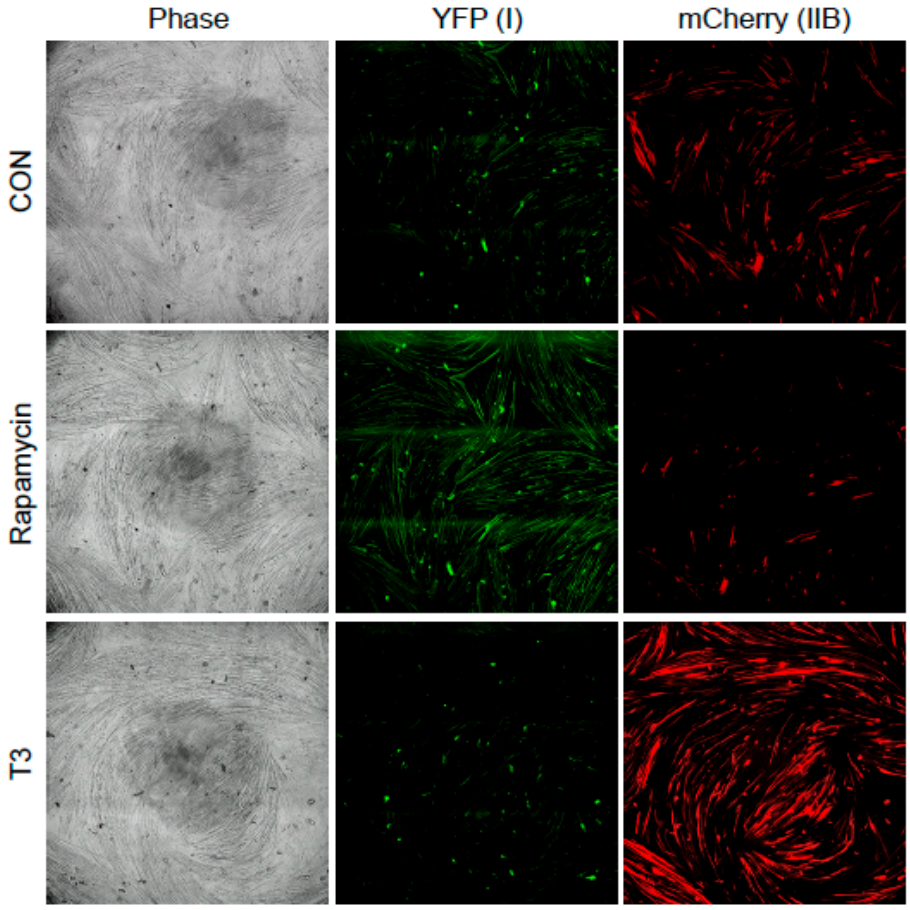
125　筋線維タイプ変換に基づいた新規筋萎縮治療法の開発	本橋　紀夫

【目的】骨格筋は肥大・萎縮をする可塑性を有すると共に、筋線維タイプ（遅筋・速筋）および代謝変換（酸化系・解糖系）能を有し、それらは関連する可能性が考えられる。ところが筋線維タイプ変換の詳細なメカニズムは未解明な部分が多く、さらに筋線維タイプと骨格筋の可塑性との関連についても全く不明であった。本研究では、全ての筋線維タイプを蛍光蛋白で識別することができるMusColorマウス由来筋細胞を用いて、筋線維タイプ変換を引き起こす生体内物質・薬剤等を網羅的に探索・同定する事を目的とした。また同定した因子がどのように筋代謝変換を誘導するかを明らかにし、さらに同定した因子を用いて加齢や不活動による筋萎縮を抑制できるか否かを検討した。

【方法】MusColor マウス由来筋管細胞に対し生体内因子或いは薬剤を添加し、その後 MyHC-I-YFP（遅筋線維）、ⅡB-mCherry（速筋線維）の発現を蛍光顕微鏡下で測定した。YFP 或は mCherry を誘導する物質の網羅的スクリーニングを行い、筋線維タイプ変化を誘導する因子・薬剤を探索した。また筋線維タイプ変換が代謝機能を伴う変換か否かを *in vitro* で検討する為、候補因子で処理した筋管を、細胞外フラックスアナライザーXFp を用いてミトコンドリア活性能、或は解糖能を検討した。さらに筋線維タイプ変換誘導因子を加齢マウスに投与した。

【結果】*In vitro* で遅筋線維、或は速筋線維を誘導する因子を複数同定した。筋線維タイプ変換誘導因子は筋代謝も変化させる事が明らかと成った。さらに遅筋化が進行する老齢マウスに対して速筋誘導因子を投与した結果、筋萎縮の予防・運動機能および筋代謝機能改善を認め、速筋誘導因子は加齢性筋萎縮を予防・改善効果がある可能性が示唆された。

速筋誘導因子 T3 および遅筋誘導因子 Rapamycin による筋線維タイプ変化



125. 筋線維タイプ変換に基づいた新規筋萎縮治療法の開発

本橋　紀夫

*東京都健康長寿医療センター 老年病態研究チーム 運動器医学

Key words：骨格筋，筋幹細胞，筋線維タイプ，筋萎縮，代謝

緒　言

体重の約 40%を占める骨格筋は可塑性を有し、各種運動トレーニング等によって肥大する一方、老化や各種疾患・不活動によって萎縮する。加えて骨格筋を構成する筋線維は、遅筋線維と速筋線維から成り立ち、様々な要因により可逆的な変化（遅筋・速筋）が誘導され、同時に代謝変換（酸化系・解糖系）を伴う事が知られる。例えばレジスタンストレーニングやドーピング薬であるβ2-agonist 投与によって惹起される筋肥大では速筋線維が増加する一方、持久性運動では遅筋線維の割合が増加する。また加齢性筋萎縮（サルコペニア）やカロリー制限・癌悪液質によって惹き起こされる筋萎縮では遅筋線維の割合が優位になる一方、寝たきり等による廃用性筋萎縮やギプス固定・無重力環境下曝露による筋萎縮では速筋線維が誘導される［1］。すなわち、筋肥大・萎縮に伴う筋線維タイプ変換は、原因によって大きく異なる事を示している。ところが筋線維タイプ変換の詳細なメカニズムは未解明な部分が多く、さらに筋線維タイプと骨格筋の可塑性との関連についても全く不明である。そこで本研究では、筋線維タイプ変換誘導因子を同定し、そのメカニズム、さらに筋肥大・萎縮との関連を解明する事を目指した。これまでに骨格筋線維タイプを定義する全ての MyHC 鎖（type-I、-ⅡA、-ⅡD/X、-ⅡB）を蛍光蛋白（YFP、Sirius、Cerulean、mCherry）を用いて識別できる MusColor マウスを作製に成功した。このマウス由来筋細胞を用いて筋線維タイプ変換を引き起こす生体内物質・薬剤等を網羅的に探索し、新規筋線維タイプ変換誘導因子の同定を目的とし、さらに骨筋線維タイプ変換が代謝変換を伴うか否かを検討した。また筋線維タイプ変換誘導因子の同定は，サルコペニアや不活動によって惹き起こされる筋萎縮の要因・機序解明に繋がると予想される一方で、それら病態に対する治療薬開発にも繋がると期待される。そこで同定した因子を用いて加齢や不活動による筋萎縮に対する予防・治療できるか否かも検討した。

方法・結果・考察

1.　MusColor マウスを用いた筋線維タイプ変換誘導因子の探索

動物実験は東京都健康長寿医療センター研究所動物実験委員会の承認を得て行った。MusColor マウス（8～12 週齢）骨格筋から骨格筋幹細胞である筋衛星細胞を、FACS および MACS［2］を用いて単離・培養し、得られた筋管細胞に対して生体内因子・薬剤等を添加した。添加開始 3 日後、MyHC type-I-YFP（遅筋）および type-ⅡB-mCherry（速筋）の発現を蛍光顕微鏡で撮影した。YFP および mCherry の発現量を ImageJ を用いて解析を行い、遅筋線維、或は速筋線維を顕著に誘導する因子の探索を行った。筋線維タイプ変換は、定量 PCR を用いた *MyHC* 遺伝子発現（遅筋：Myh-7、速筋：Myh-2、-1、-4）で併せて確認した。これまでに筋線維タイプ変換を誘導する既知の因子・薬剤として T3（甲状腺ホルモン；速筋へ誘導）［3］、Rapamycin（免疫抑制剤; 遅筋へ誘導）［4］が報告されている。そこで MusColor マウス由来筋管細胞を T3 或は Rapamycin 処理した結果、T3 は mCherry（速筋）の発現を増加させた一方、Rapamycin は YFP（遅筋）の割合を増加させた（図 1A）。これらの結果は、遺伝子発現でも確認され（図 1B）、確立した実験系においても過去の報告と同様の結果が得られた。

そこで次に 100 種類以上の生体内生理活性物質（サイトカイン・ケモカイン等：R&D 社・Prospec 社）及び薬剤（Sigma 社等）を用いてスクリーニングを行った。その結果、遅筋線維（Type-I）或は速筋線維（Type-ⅡB）を誘導する因子を複数同定することができ、これらの結果は MyHC 発現量においても確認する事ができた。

*現在の所属：国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

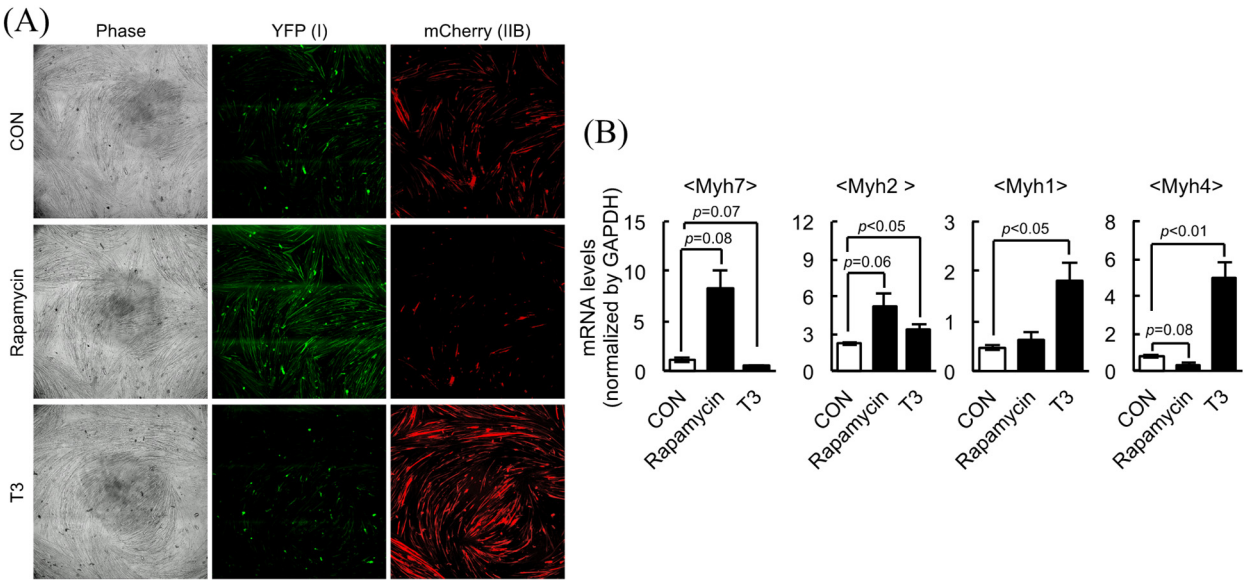


図 1. 筋管細胞における Rapamycin および T3 の影響

MusColor マウス由来筋管細胞を Rapamycin および T3 で処理した結果、Rapamycin は遅筋を、T3 は速筋を誘導する事が蛍光顕微鏡下 (A) および遺伝子発現解析 (B) で明らかとなった。(n = 4、Student's t-test)

2. 筋線維タイプ変換誘導因子の筋線維の代謝機能への影響の検証

次に、生体内因子・薬剤によって誘導された筋線維タイプ変換が、代謝機能を伴う変換であるか否かの検討を行った。そこで T3 および Rapamycin で 3 日間処理した筋管細胞を、細胞外フラックスアナライザーXFp (Seahorse 社) を用い酸素消費量を指標とするミトコンドリア活性能、或は pH 値変化を指標とする解糖能の変化を検討した。その結果、T3 で処理した筋管細胞の解糖系機能が低下する一方で、酸素消費量 (ミトコンドリア活性) には影響を与えなかった。また Rapamycin で処理した筋管細胞においても、解糖系機能を変化させる (図 2) 一方で、ミトコンドリア活性には影響を与えない事が明らかとなった。従来、速筋線維は解糖系が、遅筋線維はミトコンドリア酸化系が発達していると考えられていたが [5]、T3・Rapamycin は速筋あるいは遅筋線維に誘導するにも関わらず、ミトコンドリア活性には影響を与えず、解糖系機能の低下をもたらしていた事から、筋線維タイプと筋代謝との関係は必ずしも一致しない可能性が考えられた。従って、同定された筋線維タイプ変換誘導因子は、骨格筋代謝への影響も併せて検討されなければならない。

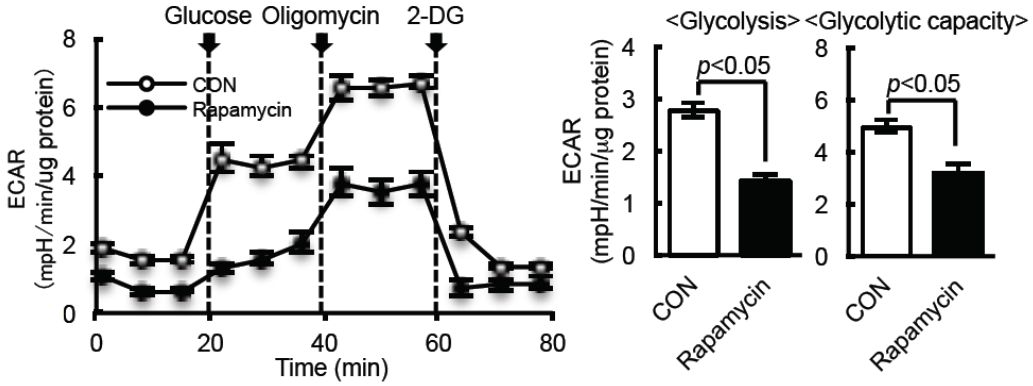


図 2. 筋管細胞における Rapamycin による解糖機能への影響

MusColor マウス由来細胞を Rapamycin で処理した結果、解糖系機能が低下している事が明らかとなった。(n = 3、Student's t-test)

3. 筋萎縮モデルマウスに対する筋線維タイプ変換誘導因子の効果の検証

加齢性筋萎縮では遅筋線維の割合が増加し［1］、同時に代謝機能低下が認められる（未発表データ）。そこで速筋へ誘導する新規筋線維タイプ変換誘導因子である Nicotinamide（NAM）を投与し、筋線維タイプ・代謝の変化及び筋萎縮を抑制できるか否かの検討を行った。老齢マウス（19～24 ヶ月齢）に対して 1%NAM を飲水投与し、投与開始 1 ヶ月後に筋力機能およびマウス筋重量を測定した。また染色によりミトコンドリア活性の指標となる SDH 或は NADH 活性を評価した。その結果、NAM 投与によって運動機能は優位に改善し、筋重量の増加および SDH・NADH 活性の回復を認め、速筋誘導因子である NAM には加齢性筋萎縮に対する改善効果がある可能性が示された。

NAM は NAD（nicotinamide adenine dinucleotide）の前駆産物であり、解糖系・クエン酸回路による糖・脂質の酸化還元反応に必須である［6］。同時に NAM は Sirtuin 活性阻害剤として知られ、*Sirtuin* 遺伝子の発現は筋線維タイプ［7］、または代謝［8］に影響する事が知られる事から、今後は Sirtuin と加齢性筋萎縮との関連、および NAM による加齢性筋萎縮抑制メカニズムを解明する必要がある。また、筋萎縮を伴う疾患（糖尿病・肥満・癌）に対しても、筋線維タイプ変換誘導因子が効果的であるか否かを併せて検討する必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京都健康長寿医療センターの森秀一研究員、重本和宏研究部長、理化学研究所の古関明彦チームリーダー、大阪大学の深田宗一朗准教授らのご協力を得て行われました。本研究の遂行に対して多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. The international journal of biochemistry & cell biology. 2013;45(10):2191-9. Epub 2013/05/25. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.016. PubMed PMID: 23702032.

2) Motohashi N, Asakura Y, Asakura A. Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. J Vis Exp. 2014(86). Epub 2014/04/22. doi: 10.3791/50846. PubMed PMID: 24747722.

3) Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. Science. 1986;231(4738):597-600. Epub 1986/02/07. PubMed PMID: 3945800.

4) Lee CS, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Xu J, Ismailov, II, Knoblauch M, et al. Ligands for FKBP12 increase Ca2+ influx and protein synthesis to improve skeletal muscle function. J Biol Chem. 2014;289(37):25556-70. Epub 2014/07/24. doi: 10.1074/jbc.M114.586289. PubMed PMID: 25053409; PubMed Central PMCID: PMCPMC4162161.

5) Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 2011;91(4):1447-531. Epub 2011/10/21. doi: 10.1152/physrev.00031.2010. PubMed PMID: 22013216.

6) Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. J Biol Chem. 2004;279(49):50754-63. Epub 2004/09/24. doi: 10.1074/jbc.M408388200. PubMed PMID: 15381699.

7) Chalkiadaki A, Igarashi M, Nasamu AS, Knezevic J, Guarente L. Muscle-specific SIRT1 gain-of-function increases slow-twitch fibers and ameliorates pathophysiology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. PLoS genetics. 2014;10(7):e1004490. Epub 2014/07/18. doi: 10.1371/journal.pgen.1004490. PubMed PMID: 25032964; PubMed Central PMCID: PMCPMC4102452.

8) Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, Feng X, et al. The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. Cell Stem Cell. 2015;16(2):171-83. Epub 2015/01/21. doi: 10.1016/j.stem.2014.12.004. PubMed PMID: 25600643; PubMed Central PMCID: PMCPMC4320668.