

加齢に伴う筋骨格系細胞の細胞外マトリックス関連因子における変調とその作用解析

[1] 組織

代表者：本田 健

(山口大学大学院医学系研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

朝霧 成拳 (山口大学大学院医学系研究科)

倉増 敦朗 (山口大学大学院医学系研究科)

酒井 大樹 (山口大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 20 万

[2] 研究経過

運動器を構成する筋肉、骨、関節では、加齢による退行変性が細胞あるいは組織レベルで生じ、これらはサルコペニア、骨粗鬆症、変形性関節症など加齢性の筋骨格系疾患を惹起する要因となる。我々は、筋骨格系組織に形成される細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) に着目し、加齢による変調、あるいは変調した ECM 関連分子による筋骨格系細胞群への影響を明らかにすることを目指しており、ここでは特に骨格筋細胞における成果を報告する。骨格筋は細胞外の支持体として ECM で構成された基底膜を構築するが、骨格筋の構造維持といった静的役割のみならず、機械刺激応答や張力発生、筋量を調節する細胞内シグナル伝達の制御など、動的で多様な役割を持つ。重要なことに、筋ジストロフィー等の筋疾

だけでなく、骨格筋の量や機能の低下を引き起こす要因にもなることが、近年明らかにされつつある (図 1)。ECM は Matrix metalloproteinase (MMP) や Cathepsin 等に代表される分解酵素によって、量的、質的に制御されている。また ECM の分解は生理活性分子の放出にも関与しており、例えば ECM 構造体内に閉じ込められたサイトカインを放出する、あるいは ECM の代謝 (分解) 産物自体が生理活性成分として放出されるなど、近位・遠位に影響を与えることが明らかになってきている。このように ECM 分解酵素群は ECM を基盤とした様々な機能調節に密接に関与する重要な因子であり、また酵素という特性上、ECM 構成蛋白質に比べて薬物の設計やスクリーニングが容易で創薬標的としての魅力も大きい。そこで我々は、ECM 関連分子の中でも ECM 分解酵素に着目し、老化との関連性を明らかにすることを目的とした。本年度は骨格筋細胞における ECM 分解酵素の発現やその薬理的制御による効果、それに対する細胞老化の影響を調べた。これらを実施するにあたり、対応者である加齢医学研究所・小笠原康悦教授には、研究打ち合わせ (新型コロナウイルス蔓延のためウェブ会議にて) において、本研究遂行に関するご助言や解析結果の解釈を頂いた。また、老齢マウスをご恵与頂いた際には同研究所の田中耕三教授にご助力を賜った。以下、研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた骨格筋分化モデルを用いた。また、細胞レベルにおける老化の影響を解析するため、経代を重ねることで β ガラクトシダーゼ発現の亢進や、ゲノム DNA 損傷の蓄積 (ヒストン 2AX のリン酸化) といった老化マーカーを呈した筋芽細胞を準備した。まず、老化処理の有無における筋芽細胞において、ECM 分解酵素群の発現パターン解析を試みた。その結果、MMP-9 などいくつかの酵素については老化によって変調をきたす傾向が見られ、またこれらは筋分化を抑制する可能性が報告されていた [J Muscle Res Cell Motil. 2008、Mediators Inflamm 2016]。そこで、これらの酵素を



図1. 加齢によるECMを介した骨格筋への影響

患によって ECM は大きく変調するが、近年では身体活動量の低下や加齢によっても変調することが指摘されている。その ECM 変調は単に結果の産物という

阻害することで筋分化の促進が見られるのか、またそれに対する老化の影響はどうか、という点に着目して解析を進めた。まず継代数の少ない筋芽細胞を用いて阻害剤スクリーニングを行ったが、MMP-9を含め各種 MMP に対する特異的阻害剤では明確な作用は見られなかった。しかしながら、ある複数 MMP に対する阻害剤 (multiple MMP inhibitor; MMI) を作用させると、筋分化マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) の発現が用量依存的に増強されることを見出した。その際、筋分化のマスターレギュレータ転写因子である Myogenin も発現誘導が亢進されていた。また、それら分化マーカーの発現増強は、MMI 処理を分化初期に施した時のみ現れるという結果を得た (図 2、3)。この機序は不明だが、分化初期における複数の MMP による協奏的作用 (ECM の改変や ECM 分解で生じる代謝産物放出など) が、その後の筋分化に影響をもたらすことが推察された。分化初期の MMP 発現パターンの把握が重要であると考え、現在解析中である。

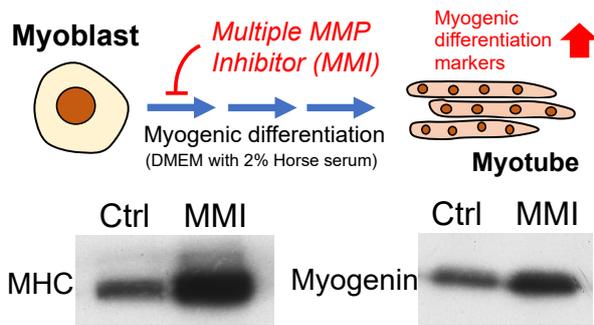


図2 .MMI処理による筋分化マーカーの発現亢進

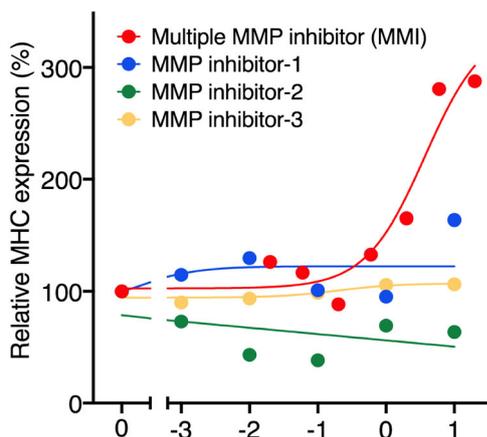


図3 .複数MMP阻害によるMHC発現誘導の亢進

次に、老化細胞においても MMI の効果が同様に得られるか調べた。老化した筋芽細胞 (継代数 50; P50) では MHC の発現誘導が弱まるが、MMI 処理によって有意な増強効果が見られた。しかしながら、継代数の少ない筋芽細胞 (P5, P15) と比較して MMI の効果は減弱することが分かった (図 4)。MMI で阻害されることにより分化促進効果に寄与している MMP に

対して、老化が何らかの影響を与えていることが推察される。これら MMP の分化初期における発現や活性が、老化によってどのような変調をきたすのか、現在その解析も含めて、老化細胞および老齢マウスの筋組織を用い、筋分化促進効果の分子機序解明を進めている。

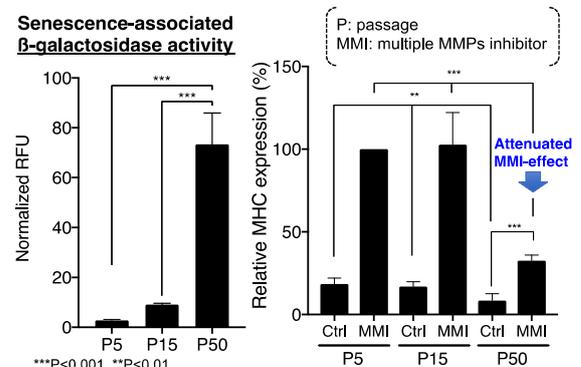


図4 : 老化した筋芽細胞におけるMMI効果の低減

(3-2) 波及効果と発展性など

ECM 変調や ECM 分解産物の新規作用についての研究は、心疾患や癌研究分野などで先行しており、新たな創薬標的として注目されているが、運動器組織における研究は大きく出遅れている。筋骨格系疾患は、高齢者の要介護状態への進行を加速させる大きな危険因子であり、ECM 変調を制御する薬物、あるいは変調を反映するバイオマーカーが発見されれば、退行変性を早期に検知し、介入することが可能となる。そのためには、細胞レベルおよび生体内における組織レベルにおいて、筋骨格系組織に形成される ECM やその代謝産物、調節因子 (ECM 分解酵素、またその代謝産物など) が、老化によってどのような変調をきたすのか、またその変調が筋骨格系をはじめとする関連細胞群に対して、近位・遠位も含めてどのように影響するのかを明らかにすることが重要となる。加齢と深く関わる筋疾患の代表格であるサルコペニアでは、骨格筋幹細胞の異常性に言及する報告は多く見られるが、その後の筋芽細胞以降の分化・成熟化についての知見は少ない。そのような研究領域に対して、本共同研究で明らかになった MMP 制御による筋芽細胞の筋分化促進効果と、それに対する細胞老化の影響は、現時点では現象論の予備的データではあるが興味深い知見であり、その作用機序を明らかにすることで、老化した骨格筋の成熟化における ECM の関与に考察を与え、サルコペニアのより深い理解に繋がることが期待される。

[4] 成果資料

学会発表

・日本薬理学会年会 (2021年3月8日), 1-P2-LB47