

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの病態解析

氏 名 橋 本 貴 生

【研究背景, および目的】

骨格筋萎縮は運動機能の低下だけでなく、肥満や糖尿病リスクの上昇をさせるなど、人々の生活において様々な問題をもたらす。しかし、Duccenne 型筋ジストロフィにおける dystrophin の変異のように遺伝的要因が解明されている病態を除いて、骨格筋萎縮の発症の要因は多様であり、特に、加齢に伴って骨格筋重量と筋力が低下する sarcopenia は、加齢による生理機能の変化の他に、神経伝達やエネルギー代謝の低下、寝たきりなど、多くの因子が複雑に絡み合うため発症過程は極めて複雑である。sarcopenia の予防や改善を指向した医薬品や食品の機能評価を目的とした動物実験では、長期の飼育を必要とし、短期の発症での骨格筋萎縮モデルではヒトの病態を再現することが極めて困難である。

先行研究により、glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDE) ファミリーの一つである GDE5 は、骨格筋を含むエネルギー消費量の多い組織に強く発現し、また、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に GDE5、あるいはその酵素活性を欠損させた変異体の GDE5dc471 を過剰発現させた際に、筋分化が著しく抑制されたことから、GDE5 は非酵素活性的に筋分化を調節する可能性が示唆されていた。そこで分子栄養学研究室において、GDE5dc471 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス (GDE5Tg マウス) を作出したところ、わずか 12 週齢で解糖系の酵素活性が高い Type2 筋繊維を多く含む大腿筋や腓腹筋の萎縮が観察された。さらに、GDE5Tg マウスの大腿筋において、筋繊維に神経刺激を伝達するのに重要な neuromuscular junction (NMJ) 関連遺伝子群と細胞防御に関連する遺伝子群の発現上昇を確認した。これらの変化は sarcopenia における病態と類似していることから、GDE5Tg マウスは sarcopenia を短期で自然発症するモデル動物として期待されている。しかし、GDE5Tg マウスの骨格筋病態の発症要因が明らかでない上、12 週齢以降の病態の進展など詳細なメカニズムは不明な点が多く、GDE5Tg マウスの病態生理をさらに詳しく理解することが必要である。

本研究では、4 週齢 (幼若期)、8 週齢 (若齢期) および 1 年齢 (中年期) の 3 期にわたって GDE5Tg マウスの病態を解析し、骨格筋病態の進展のメカニズムの解明を行うことで、これまで利用されている骨格筋萎縮モデル動物との相違点を明らかにすることを研究目的とした。また、幼若期の GDE5Tg マウスを解析することで、GDE5dc471 過剰発現による骨格筋病態の原因を探索した。

【実験方法, および結果】

4 週齢、8 週齢および 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型マウスにおける骨格筋病態の進展を病理学、あるいは生理学的手法により解析した。その結果、4 週齢の GDE5Tg マウスは筋萎縮を示さなかったが、8 週齢の GDE5Tg マウスは野生型マウスに比べて Type2 筋繊維が豊富な骨格筋のみが選択的に萎縮し、運動機能の低下を示した。さらに、血中脂質濃度と白色脂肪組織重量が増加し、これらの形質は 1 年齢まで不可逆的に継続することが明らかとなった。また、興味深いことに、GDE5Tg マウスの筋萎縮の進展に伴って、通常は筋細胞膜上に分布する核が、筋細胞の中心に局在する現象 (中心核) が認められた他、アポトーシスによる細胞死を示唆する断片化した核の出現率が増加した。これらはいずれも sarcopenia で報告されている現象であり、GDE5Tg マウスは sarcopenia と多くの共通

の形質を示すモデルマウスである可能性が示唆された。

これまで sarcopenia の進展には、NMJ の形態変化による神経伝達の低下が密接に関連すると考えられているが、GDE5Tg マウスの大腿筋において、NMJ の形態と筋単位面積当たりの個数は中年期においても野生型マウスとの差異は認められなかった。しかし、NMJ を構成する筋特異的な nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) サブユニット mRNA の発現を realtime PCR 法により解析したところ、筋委縮を示さない 4 週齢においても発現上昇し、1 年齢まで持続していた。したがって、GDE5Tg マウスにおける筋特異的な nAChR サブユニット mRNA は、筋委縮や NMJ の変性による代償的な発現上昇と異なる、別の発現機構により誘導されたと考えられた。一方、8 週齢から 1 年齢の GDE5Tg マウス腓腹筋の組織像では、筋細胞質内のタンパク質様の異常な沈着物が高頻度に観察された。そこで筋委縮を呈さない幼弱期において、異常タンパク質の蓄積に関連したストレス応答の有無を検証するため、4 週齢の GDE5Tg マウスの腓腹筋を用いてストレス応答に関連する HSP70 タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、GDE5Tg マウスは野生型に比べて HSP70 タンパク質の発現量が著しく増加していた。さらに、この発現増加は生後間もない 2 週齢の GDE5Tg マウスも示したことから、幼若期により何らかの細胞ストレスが誘導されている可能性が示唆された。

次に、GDE5Tg マウスの筋委縮発症要因を網羅的に探索することを目的とし、2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いて DNA microarray 解析を行ったところ、野生型マウスと比較してストレス応答や脂質代謝に関連した遺伝子群の発現変動が認められた。特に、ストレス応答に関連して、HSP70 の他にも *Hspa4l* (HSP40)、および *Hsp110* (HSP110) などの HSP ファミリーの発現上昇が認められた。加えて、炎症性サイトカイン IL-1 と結合する *Il1rap*、さらに mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害作用を持つ *sesn2* の顕著な発現上昇が認められた。一方、脂質代謝関連の中でも脂肪酸代謝に関わる *Ucp1*、アシル CoA 合成酵素 *Acsn3*、および遊離脂肪酸トランスポーターの *Slc27a2* の発現減少が明らかとなった。

【考察および結論】

本研究では、GDE5Tg マウスの経時的な骨格筋病態の解析によって、8 週齢で認めた Type2 筋繊維の選択的萎縮と運動機能の低下が長期に持続することを見出した。これらは、sarcopenia を対象とした研究に用いられてきた拘束や除神経処置による一過性の筋萎縮モデルの形質とは明らかに異なっており、GDE5Tg マウスの骨格筋病態は、sarcopenia に特徴的な Type2 筋繊維の優先的萎縮のみならず、不可逆的かつ緩やかな進行である点においても sarcopenia との類似性が示唆された。

また、本研究では GDE5Tg マウスの骨格筋病態の進展に異常タンパク質の蓄積を伴うことを初めて見出し、筋委縮を呈さない幼少期においても様々な細胞ストレスに対する応答が示唆された。今後、GDE5Tg マウスを用いた研究を通して、蓄積した異常タンパク質と筋萎縮との関連性、特に骨格筋細胞に対するストレスなどの作用機序を明らかにすることで sarcopenia の発症と進展機構に新たな知見を提供できるものと期待される。一方、GDE5Tg マウスは 1 年齢においても sarcopenia の発症因子の一つにある NMJ の変性を示さなかったが、筋委縮を示さない幼若時から NMJ を構成する筋特異的 nAChR サブユニットの mRNA が発現上昇しており、NMJ の形態を維持するための代償的な生理作用が考えられた。事実、GDE5Tg マウスは出生間もない時期から複数のストレス関連遺伝子が発現上昇しており、ストレス誘導による NMJ 構成因子の発現誘導の可能性を示唆するものである。NMJ 構成因子の増加による NMJ の形態維持は骨格筋老化に対する防御的方策として有望であることから、GDE5Tg マウスは新規の骨格筋萎縮モデルとしての有用性のみならず、筋特異的 nAChR サブユニットの発現誘導機構の新たな概念を提供できる可能性も示唆された。

以上、sarcopenia の病態を極めて早期に、かつ長期的に示す自然発症するモデルは前例がなく、GDE5Tg マウスの評価系としての有用性が考えられるとともに、新たな NMJ 維持機構の解明においても極めて有用である。本研究成果を基にした医薬品ならびに機能性食品の発掘、および評価を通して、人々の健康寿命・QOL の向上に貢献することが期待される。