

博士論文

骨格筋特異的 GDE5 過剰発現

マウスの病態解析

平成 29 年 9 月

橋本 貴生

博士論文

骨格筋特異的 GDE5 過剰発現

マウスの病態解析

平成 29 年 9 月

橋本 貴生

目次

目次.....	2
略語.....	4
序論.....	6
1. 骨格筋萎縮の概要.....	6
2. 骨格筋の加齢性変化とモデル動物を用いた骨格筋萎縮研究の現状.....	8
3. GDE および骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの概要.....	10
4. 本論文の構成.....	12
第一章 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの経時的な病態解析.....	17
第一節 緒言.....	17
第二節 材料と方法.....	19
1. 骨格筋特異的 GDE5dC471 過剰発現マウス (GDE5Tg マウス) の作製.....	19
2. 運動機能解析.....	20
3. 解剖および体重, 組織重量測定.....	21
4. 血液生化学検査.....	21
5. 後肢骨格筋の病理標本作製.....	22
6. 後肢骨格筋の病理標本の評価.....	25
7. 大腿筋における mRNA の発現解析.....	26
8. 統計解析.....	28
第三節 結果.....	30
1. 後肢骨格筋重量および一般状態の経時変化.....	30
2. 腓腹筋横断面の H&E 染色標本による病理組織検査および断面積の経時評価.....	30
3. 腓腹筋横断面の PAS, および EVG 染色による病理組織検査.....	31
4. 腓腹筋横断面の TUNEL 染色を用いた病理組織検査.....	32
5. 運動機能解析.....	32
6. 白色脂肪組織, 血中脂質および糖質の経時解析.....	33
7. GDE5Tg マウスの示す骨格筋病態とエネルギー代謝の関係性.....	33
8. 後シナプス膜の形態評価.....	34
9. NMJ 関連 mRNA の経時的発現解析.....	34

10. 中年期マウスの腓腹筋におけるミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の発現解析	35
11. 若齢あるいは中年期マウスの腓腹筋における筋分化マーカー mRNA の発現解析	35
第四節 考察	52
第二章 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの筋萎縮発症要因の探索	57
第一節 緒言	57
第二節 材料と方法	58
1. 大腿筋におけるウエスタンブロッティング法による HSP70 および GDE5 タンパク質の 検出	58
2. GDE5dC471 遺伝子導入マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞株における HSP70 および GDE5 の検出	61
3. GDE5Tg マウスの DNA マイクロアレイ解析	62
4. 2 週齢マウス大腿筋における RT-PCR 法による mRNA 発現解析	64
5. マウス腓腹筋における細胞増殖活性の検出	66
6. 統計解析	67
第三節 結果	69
1. 幼若期マウスの大腿筋における HSP70 タンパク質の発現	69
2. GDE5dC471 過剰発現 C2C12 細胞における HSP70 タンパク質の発現	69
3. 幼若期マウスの大腿筋において発現変動する遺伝子群の探索	69
4. 幼若期マウスの腓腹筋における細胞増殖	71
第四節 考察	80
総合討論	83
引用文献	87
謝辞	98

略語

ADL	: Activities of Daily Living
AKT	: serine/threonine-specific protein kinase
ATP	: adenosine triphosphate
α -BTX	: α -Bungarotoxin
BrdU	: bromodeoxyuridine
Cs	: citrate synthase
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMD	: Duchenne muscle dystrophy
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
cDNA	: complementary DNA
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
DNA	: deoxyribonucleic acid
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EVG	: Elastica van Gieson
FCS	: fetal calf serum
FOXO	: forkhead box O
GDE	: glycerophosphodiester phosphodiesterase
GP	: glycerophosphodiester
α -GPD	: α -glycerophosphate dehydrogenase
GroPCho	: glycerophosphocholine
GroPIns	: glycerophosphoinositol
GroPSer	: glycerophosphoserine
H&E	: hematoxylin-eosin
HSP	: heat shock protein
IGF	: insulin-like growth factor
MHC	: myosin heavy chain
mTOR	: mammalian target of rapamycin
nAChR	: nicotinic acetylcholine receptor

NMJ	: neuromuscular junction
PAS	: periodic acid schiff
PBS	: phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PGC-1 α	: peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α
PI3K	: phosphatidylinositol 3-kinase
PKB	: protein kinase B
PLA2	: phospholipase A2
QOL	: quality of life
RNA	: ribonucleic acid
mRNA	: messenger RNA
RT-PCR	: reverse transcriptase-PCR
SAM	: senescence accelerated mouse
SC	: satellite cell
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
TBE	: tris-borate-EDTA
TNE	: tris-NaCl-EDTA
TUNEL	: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling

序論

1. 骨格筋萎縮の概要

骨格筋は人体の組織の中で、およそ 30~40%を占める最大の組織であり、多核が細胞膜直下に存在する数百から数千の筋繊維と呼ばれる細胞群から構成されており、運動機能やエネルギー代謝に寄与している [1]。筋繊維は、遅筋系と速筋系のタイプに組織化学的に分類することができる。それらはさらに、筋タンパク質のうち最も多くを占めるミオシン重鎖の違いによって、遅筋系の I 型筋繊維 (Type1, [ミオシン重鎖:MHC1])、速筋系の II 型筋繊維 (Type 2, [ミオシン重鎖:MHC2a, MHC2b, MHC2x]) の 4 種類に分けられ、多くの骨格筋では代謝プロファイルの異なるそれらの筋繊維がモザイク状に存在している [2, 3]。各筋繊維は運動神経による支配をうけ、その細胞膜上には運動神経側のシナプス終末から放出される、神経伝達物質アセチルコリンの受容体であるニコチン作動性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor; nAChR) が局在し、シナプス終末と受容体を合わせて神経筋接合部 (neuromuscular junction; NMJ) が構成されており、NMJ を介して神経伝達が行われ、骨格筋は収縮することによって力学的な機能を発揮する (図 1) [4, 5]。

骨格筋を構成する筋細胞の構成タンパク質は、生涯を通して、分解と合成が絶え間なく繰り返されており、骨格筋の量的あるいは質的な平衡状態は構成タンパク質の代謝に依存している。そのため、骨格筋構成タンパク質の分解系が合成系を上回ると筋萎縮を発症し、その逆は筋肥大に至ることとなる。このタンパク質の代謝バランスには、運動刺激や成長ホルモンに応答して筋細胞や肝臓で合成される insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が関与し、IGF/PI3K/Akt 経路の活性化がタンパク質合成系における主要な経路と考えられている [6]。すなわち、IGF-1 がその受容体 (IGF-R) に結合することにより、下流の phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、およびそれに引き続く Akt-1/protein kinase B (PKB) を活性化する。さらに、Akt-1/PKB の活性化は mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の活性化を引き起こし、リボソームにおけるタンパク質合成を誘導する。

構成タンパク質を分解する経路としては、①ポリユビキチン化された基質タンパク質を 26S プロテアソームによって ATP 依存的に分解するユビキチン-プロテアソーム経路 [7]、②エンドサイトーシスあるいはオートファジーによってリソソームへ輸送されたタンパク質をカテプシン群により分解するリソソーム-カテプシン経路 [8]、③細胞内カルシウム濃度が異常

に増加することにより活性化するカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインを介したカルパイン経路が知られている [9]。Furuno らは、ラット坐骨神経切断によって筋不活動モデルのヒラメ筋において、いずれのタンパク質分解系も平行して活性化される一方で、合成系もわずかに亢進するが、リソソーム-カテプシン系とカルパイン系を阻害した際に筋萎縮が抑制できないことを示している [10]。Taillandier らは、ラットの尾部懸垂による後肢筋の不活動モデルのヒラメ筋において、タンパク質のポリペプチド鎖中央部のペプチドを切断するカテプシン B と、カルパイン酵素活性の亢進を明らかにし、これらの阻害時には、ユビキチン結合酵素 (E2)、および 26S プロテアソーム mRNA が発現上昇することを報告している [11]。このように、骨格筋の不活動によるタンパク質の分解にはユビキチン-プロテアソーム系が強く関与すると考えられているが、筋萎縮時には、上述した Akt-1/PKB 経路の下流の forkhead box O (FOXO) により転写調節を受けることで筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF-1 (muscle RING Finger-1) および atrogin-1 (MAFbx: muscle atrophy factor box) が活性化することが報告されている [12]。

骨格筋は外部環境の変化に適応する能力、いわゆる可塑性を有している。例えば、ギプス固定、長期間の横臥位 (寝たきり)、飢餓、がん性悪液質などによって萎縮するが、それらの症状や栄養状態の改善、あるいは適度な運動トレーニングによって回復する [1]。骨格筋が萎縮すると、収縮力が低下し、転倒や骨折のリスクを高める運動機能の低下を引き起こし、運動器の障害により日常生活の自立度を低下させる状態 (ロコモティブシンドローム) を招くだけでなく、骨格筋の生理機能の破綻によって、エネルギー消費量の減少や糖質の取り込み能力の低下などの生活習慣病の要因となるなど、ロコモティブシンドロームはヒトの健康生活において様々な副次的問題も併せ持つ病態である。

一方、遺伝子異常を病因とする骨格筋萎縮は不可逆的に進行し、不随意筋である呼吸筋の機能異常ももたらす致死的な疾患として知られている。代表的な例では、骨格筋自体を病因とした筋萎縮 (筋原性筋萎縮; myopathy) のうち、最も多くの症例数が報告されているデュシェンヌ型筋ジストロフィ (Duchenne muscle dystrophy; DMD) は筋細胞膜のジストロフィン遺伝子の突然変異、あるいは先天性の異常が明らかにされている [13, 14]。DMD では高頻度に筋傷害が繰り返され、筋細胞の前駆体である筋衛星細胞 (satellite cell; SC) が度重なる再生により疲弊した結果、筋細胞の壊死や変性によって病態が進行する [13, 14]。また我が国で DMD に次いで 2 番目に多く症例報告されている福山型筋ジストロフィは、生後約 9 ヶ月には発症し、10 代で死に至る重篤な疾患であり、先天的なフクチン遺伝子のスプライシング異常が発症原

因として同定されている [15]。

このように、原因遺伝子や発症機序が明らかになりつつあるものの、先天性筋ジストロフィとしてまとめられている原因不明な myopathy も依然として存在している。また、非遺伝性の骨格筋萎縮において高齢化社会において課題となる加齢性の骨格筋萎縮は、上述した外部要因や様々なストレスが発症に関与するものの、その病態進行においても個体差が極めて多く、発症機序においても未解明な部分が多い。

2. 骨格筋の加齢性変化とモデル動物を用いた骨格筋萎縮研究の現状

骨格筋は健康であっても加齢に伴って筋量と筋力の低下が引き起こされ、20歳～75歳にかけて段階的に約50%にまで筋力が低下すると考えられており [16]、このような加齢性の骨格筋量、および筋力が低下した状態はサルコペニア (sarcopenia) と呼ばれる [17]。sarcopenia では上腕に比べて下肢筋がより萎縮しやすいことから、寝たきりや転倒に直接結びつく歩行機能に対して特に影響すると考えられている [16]。内閣府による平成27年版高齢社会白書によると、1億2806万人を記録した2010年をピークに総人口は減少の一途をたどっている。2015年の総人口に占める65歳以上人口の割合（高齢化率）は26.0%であり、平均寿命は男性80.2歳、および女性86.6歳（2013年統計）であるが、2060年には高齢化率は40%に達すると見込まれている [18]。このように超高齢化社会が予想されている我が国において、日常生活動作（Activities of Daily Living; ADL）、および生活の質（Quality of Life; QOL）の向上は緊急の課題であり、人間の健康寿命を考える上で、sarcopenia を対象とした研究や解決策の提案は極めて重要である。

加齢に 관련된 骨格筋の病態生理学的特徴に関しては、高齢者や老齡げっ歯類による先行研究から、以下のことが報告されている。①緩やかに、そして不可逆的に骨格筋横断面積と筋細胞数が減少するのに加え、運動機能が低下する [17, 19, 20]。②青年期には Type1、および Type2 筋繊維がモザイク状に存在するが、加齢に伴う運動神経から骨格筋への神経伝達の低下・断絶（脱神経支配）およびその後の神経伝達の再構築（再神経支配）により、筋繊維タイプごとに集合する（図2） [21]。③Type1とType2筋繊維が概ね等しい量で構成されているヒトの外側広筋を用いた実験によって、Type1とType2それぞれの筋繊維横断面積（cross sectional area; CSA）と筋繊維数がともに減少するが、Type2が優先的に萎縮することが知られている [22]。また、④加齢では、運動神経から放出される神経伝達物質（アセチルコリン）

の受容体であるニコチン作動性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) が局在する NMJ の後シナプス膜の形態が破綻し、NMJ の密度低下や断片化などの変化が生じる (図 3) [23]。また NMJ の変性に関連し、nAChR を構成する骨格筋特異的 nAChR $\alpha 1$, β , γ , δ および ϵ サブユニット mRNA の発現上昇が知られている [24-26]。これらの知見をもとに、sarcopenia を対象とした発症機序の解明、あるいは医薬品や機能性食品素材による改善効果の検証を目的とした研究において、神経伝達を廃した除神経モデルや後肢懸垂による筋の不使用による廃用性筋萎縮モデルが頻りに利用されてきたが、多くの問題が山積している。その一例を表 1 に示すが、後肢懸垂による筋の不使用モデルでは、処置の直後から急激に筋萎縮が引き起こされ、後肢を懸垂状態から解放し再接地させると萎縮が改善する。また筋萎縮の際は Type1 と Type2 の両方の筋繊維が萎縮し、特に Type1 が優先的に萎縮することが知られている [27]。このように、機械的拘束による廃用性筋萎縮モデルでは、萎縮筋繊維の選択性、可逆性あるいは進展速度において sarcopenia とは明らかに異なる。一方、脱 (除) 神経処置モデル動物も後肢懸垂と同様な骨格筋病態を示すものの、NMJ の形態変化と nAChR サブユニット mRNA の発現上昇が報告されており [26, 28-30]、sarcopenia における脱神経支配と骨格筋萎縮の関係性を説明するモデルとしては有用である。しかし、除神経の後に神経伝達のネットワークが再構築されることで可塑性が生じることから、不可逆的な筋萎縮とは言えず、必ずしも sarcopenia を模倣したモデルであるとは言えない。

Sarcopenia の加齢にともなった骨格筋の萎縮や筋力の低下を動物実験で自然発症させる場合、寿命の差異や長期飼育中の不測の疾患、あるいは高齢ラットでは高頻度で下垂体腫瘍が発生するといった動物種特有の疾患による死亡例の出現によって [31]、生存例が少ない個体数で評価しなければならない問題がある。古くに確立された F344 と BrownNorway のハイブリッドラット (BDNF ラット) は長寿であり、実験に供することのできる老齢ラットの生存率が高いが、その表現型を得るのに 28 ヶ月間を要する [32]。また以後に確立された老化促進 SAM マウスのうち、骨格筋萎縮に関する報告のある SAMP6 マウスであっても筋重量の低下が認められるまで 9 ヶ月を要する [33]。このように、sarcopenia の表現型を自然発症で得るには長期飼育が必要である。

Sarcopenia の発症要因については実に多様であり、2010 年の European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) によると、大まかに一次性的ものと二次性的のものに分けられている [17]。すなわち、一次性 sarcopenia は加齢による生理現象以外に原因の認められない病態であり、性ホルモンの変化や骨格筋の apoptosis による脱落およびミトコンドリア

の機能異常によって引き起こされる。一方、二次性 sarcopenia は吸収不良による栄養不足、インスリン抵抗性やがん性悪液質に加え、前述の神経変性あるいは活動性の低下などが加齢で複合的に関連する。そのため、sarcopenia の発症メカニズムは極めて複雑であり、加齢における Type2 の優先的な萎縮と運動機能低下を示す動物モデルを作出するのが困難な原因ともなっている。

3. GDE および骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの概要

リン脂質代謝酵素のひとつである glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDE : EC3.1.4.46) の哺乳類における生理的役割が、近年明らかになりつつある。GDE は、phospholipase A1, および A2 の活性によりグリセロリン脂質の両アシル基が切断された glycerophosphodiester (GP) を alcohol と glycerol-3-phosphate (glycerol-3-P) に加水分解する酵素群であり、細菌や酵母あるいは植物にいたるまで、進化の過程で高い相同性をもって保存されており、それぞれの生物種で生理学的に異なった機能を持っていることが知られている [34]。例えば、微生物の GDE は、glycerophosphocholine (GroPCho), glycerophosphoserine (GroPSer), あるいは glycerophosphoinositol (GroPIIns) などの GP を幅広く認識して加水分解することにより、リンや炭素源等の栄養素の獲得に機能している [35, 36]。

微生物における GPs の生理的役割と異なり、哺乳類では GP 自身が生理活性物質としての重要な役割を果たすことが示唆されている。ごく一部の例を挙げると、Buccione らは、ヒト乳腺癌細胞株 MDB-MB-231 細胞, およびヒト悪性黒色腫細胞株 A375 細胞への GroPIIns あるいはその代謝産物である GroPIIns-4-phosphate 添加によって細胞外マトリックスへの浸潤の阻害を報告している [37]。一方 Burg らは、GroPCho は尿管上皮細胞などにおいて尿素や NaCl による高浸透圧ストレスに対する細胞内の浸透圧保護物質として重要な生理機能を有することを示唆している [38]。また、Alzheimer 病患者は脳脊髄液 (CSF) 内の GroPCho 濃度が上昇しており、GroPCho 代謝異常が病態発症に関与するという報告もある [39]。このように、細胞内の GP の生理的な意義が明らかにされる中で、その分解酵素である GDE は細胞内 GPs 濃度を調節する代謝酵素としての重要性が示されつつある。

哺乳類の GDE は、1956 年に Dawson らによってラット肝抽出液より発見されたのを発端に [40], 腎 [41-43], 脳 [44-46], 肝 [40, 47], あるいは子宮分泌液 [48] における酵素活性が次々に報告された。その後、全ゲノム配列の解読から、アミノ酸配列の一次構造より推

定される GDE 遺伝子は少なくとも 7 種類 (GDE1-GDE7) 存在することが明らかとなっている [49-51]。哺乳類の GDE は微生物と異なり、高い基質特異性をもち、各アイソザイムによって細胞内における局在も異なるなど、生理的意義が異なると考えられている。複数回膜貫通型ドメインを持つ GDE1, GDE2, GDE3, および GDE6 のうち、例えば、GroPIns に対して選択的な分解活性を示す GDE1 は、G タンパク質シグナリングの調節因子である RGS16 に結合し、G タンパク質共役受容体の刺激により活性調節されることから、G タンパク質シグナル伝達において双方向性の相互作用に関わるという報告がある [52]。同じく GroPIns の分解活性を持つ GDE3 は、マウス前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化過程で一過的に発現誘導される因子として単離され、骨芽細胞の分化促進因子であることが示唆されている [53]。一方、GDE2 は GroPCho 選択的な分解活性を持ち、レチノイン酸による脊髄運動神経の発生、および分化、さらに運動神経における神経突起伸長に必須であることから、神経細胞機能において重要な役割を果たすことが示されている [54, 55]。

当研究室では、GDE ファミリーのひとつである GDE5 に着目しており、これまで、その生理機能について精力的に研究を推進してきた。GDE5 は他の GDE と異なり、唯一膜貫通領域を持たない可溶性のタンパク質であり、N 末端に多糖類結合領域が推定されている [49]。また、5 ヶ月齢のげっ歯類における GDE5 mRNA の発現解析によって、エネルギー代謝の盛んな骨格筋、心臓、および脳での高い発現量が確認されている [56]。一方、老齢 (27 ヶ月齢) あるいは除神経処置 3 日後といった神経伝達の低下時においては、骨格筋の GDE5 mRNA 発現量が減少することが報告されている [56, 57]。また、マウス横紋筋由来筋芽細胞株 C2C12 細胞に GDE5 を過剰発現させた場合には分化が抑制され、さらに、GDE 活性を欠失させた変異体 GDE5dc471 を過剰発現させた C2C12 細胞においても筋分化が抑制されたことから、GDE5 の過剰発現は酵素活性非依存的に筋芽細胞の分化を調節する可能性が示唆されている [56, 58]。

以上の知見から筋疾患への GDE5 の機能的関与が推察されたため、*in vivo* における生理機能を探索することを目的として、Human α -actin をプロモーターとして GDE 活性を欠失させた GDE5 変異体 GDE5dc471 を骨格筋に過剰発現させた遺伝子改変マウス (GDE5Tg マウス) を樹立し、表現型解析が行われてきた。GDE5Tg マウスは 12 週齢で Type2 筋繊維を豊富に含む大腿筋や腓腹筋の組織重量、および腓腹筋横断面積の縮小とともに速筋型 troponin 遺伝子の mRNA 発現の低下を呈することが明らかにされている [56, 59]。以上のことから、GDE5Tg マウスは 12 週齢という短期間で sarcopenia に特異的な Type2 筋繊維の優先的な萎縮を自然発症することから、自然発症の骨格筋老化モデル動物としての利用が期待されるものの、

GDE5Tg マウスの筋萎縮の発症，あるいは進展に関する形質の詳細や分子機序は不明であり，他の筋萎縮モデルとの相違点などについても不明のままである。

このような研究背景から，骨格筋特異的 GDE5Tg マウスにおける病態生理の詳細な解析を行い，その進展メカニズムと発症要因に関する研究に着手した。

4. 本論文の構成

本論文の第一章では GDE5Tg マウスの示す病態生理学的特徴を 4 週齢（幼若期），8 週齢（若齢期），および 1 年齢（中年期）の 3 期にわたって経時的に解析することで骨格筋病態の進展のメカニズムの解明を行い，これまで知ら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試みた。第二章では幼若期の GDE5Tg マウスを中心に，GDE5dc471 過剰発現による骨格筋病態の原因を探索した。

表 1 病理学的視点からみた Sarcopenia と廃用性筋萎縮の共通点と相違点

骨格筋萎縮の別	Sarcopenia	廃用性筋萎縮	
		拘束・重力軽減	脱（除）神経
萎縮しやすい筋繊維	Type1<Type2	Type1>Type2	Type1>Type2
発症までの時間経過	緩慢	急性	急性
萎縮の進行	緩やか	激しい	激しい
回復性	不可逆的	可逆的	可逆的(再神経支配)
NMJの形態変化	認められる	認められない	認められる

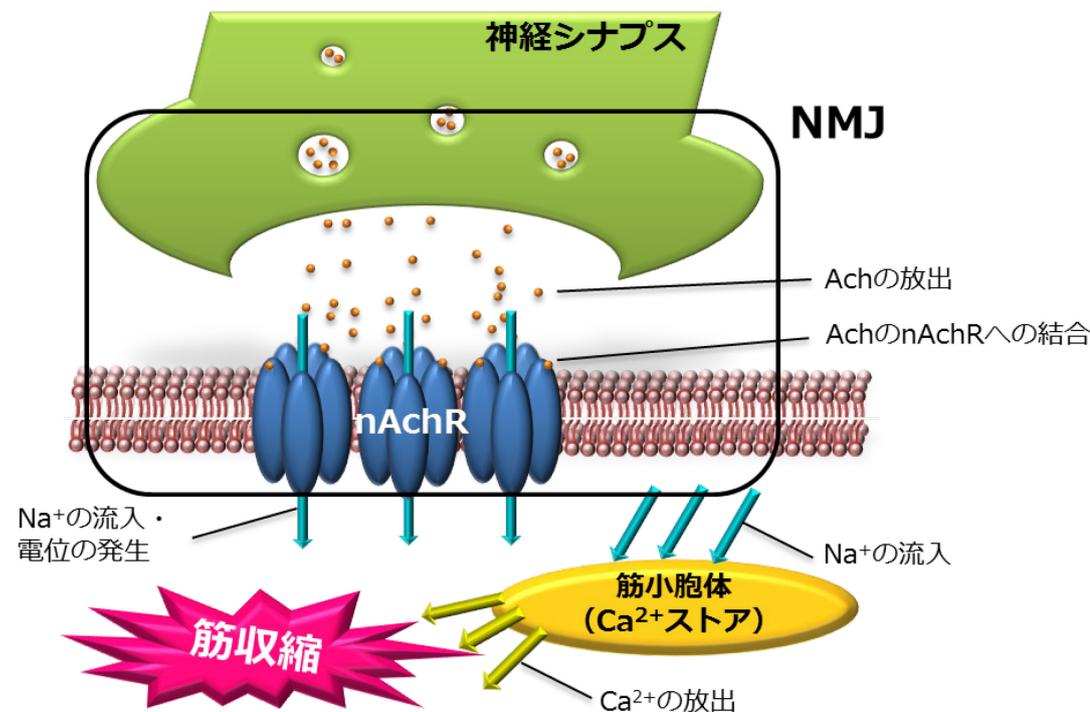


図1 骨格筋における神経筋接合部と筋収縮の模式図

運動神経側のシナプス終末と筋細胞膜上の後シナプスを合わせて **neuromuscular junction (NMJ)** が構成されている。神経シナプスより放出される神経伝達物質の **acetylcholine (ACh)** は、後シナプス膜に局在する **nicotinic acetylcholine receptor** に結合し、細胞内に Na^+ を流入させる。それによって電位が発生し、筋細胞内で Ca^{2+} を貯蔵している小胞体 (筋小胞体) に Na^+ が流入する。次いで筋小胞体より Ca^{2+} が放出され、筋繊維の収縮を引き起こす結果、筋力が発揮される。

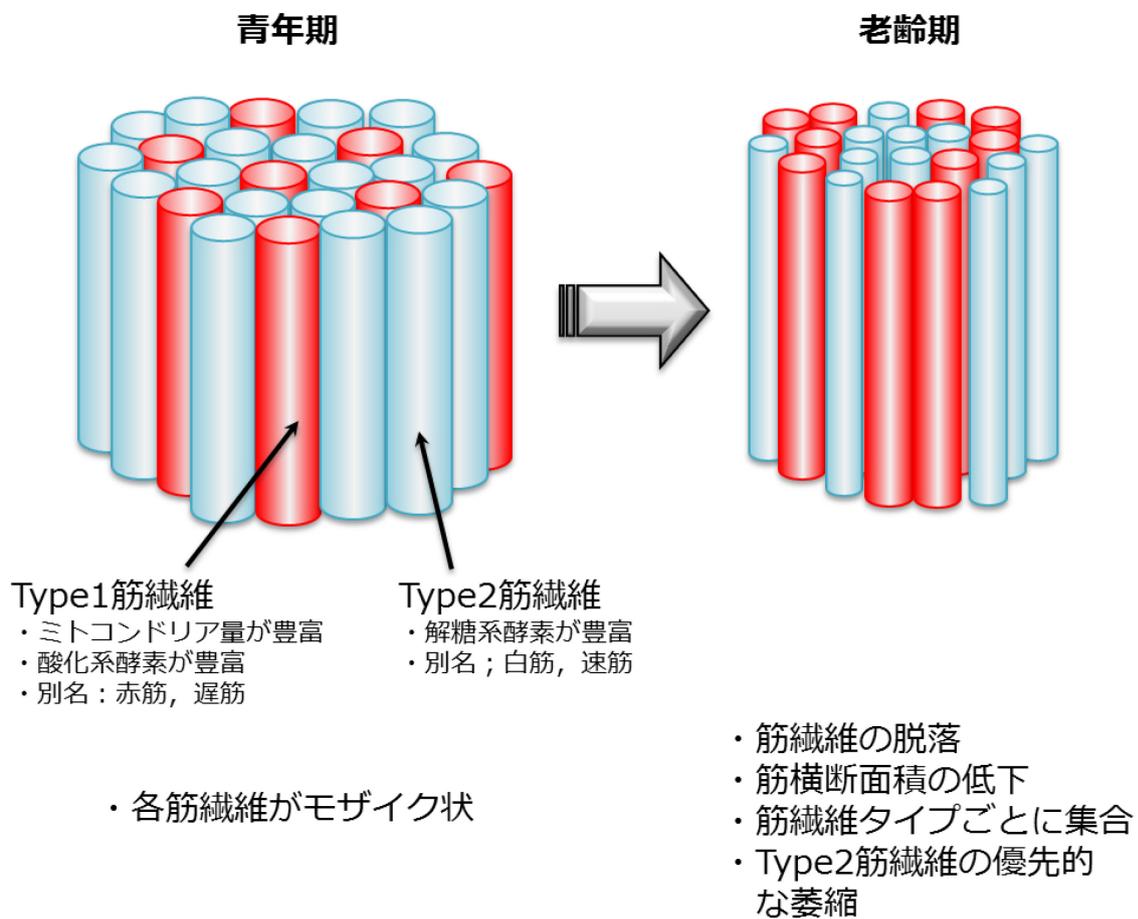


図2 筋繊維タイプの分類および加齢による変化

骨格筋繊維は老齢になるにつれて脱落し，それぞれの横断面積が低下する。青年期には Type1 筋繊維と Type2 筋繊維がモザイク状に配されているのに対し，老齢期ではそれぞれの筋繊維ごとがまとまるようになり，Type2 筋繊維が優先的に萎縮する。

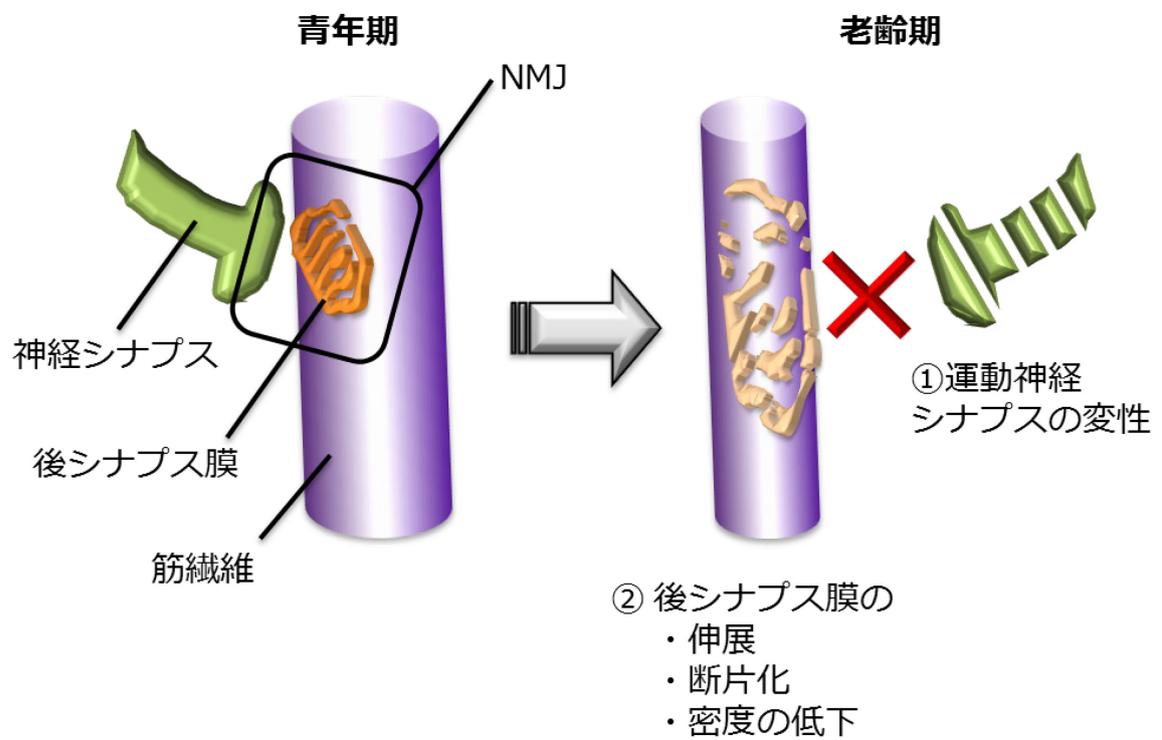


図3 筋繊維タイプの分類および加齢による変化

加齢によって、①運動神経シナプスの変性および②nAChR が局在する後シナプス膜の伸展・断片化・密度の低下など、形態変化が認められる。それに伴って運動神経からの神経伝達が低下する。

第一章 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの経時的な病態解析

第一節 緒言

加齢に伴う骨格筋病態 (sarcopenia) では, Type2 (速筋型) 筋繊維の優先的な萎縮と運動機能の低下が認められる [17, 19, 21, 22]。病態の進行には, 運動神経から骨格筋への神経伝達の低下が深く関わっていると言われ, nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) が局在する neuromuscular junction (NMJ) の形態変化に加え, nAChR を構成するサブユニット mRNA の発現上昇も数多く報告されている [23-26]。しかし, これらの変化を自然発症で示す実験動物の報告は極めて乏しい。

近年, 当研究室において, わずか 12 週齢で腓腹筋や大腿筋といった Type2 筋繊維が多く含まれる後肢筋が選択的に萎縮する GDE5dc471 過剰発現 (GDE5Tg) マウスを確立した [56, 59]。GDE5Tg マウスは筋萎縮を示しただけでなく, 大腿筋における遺伝子発現の網羅的探索によって, 複数のタイプの nAChR サブユニットに関する遺伝子発現上昇を示した [56, 59]。GDE5dc471 は GDE5 のもつ glycerophosphodiesterase 活性を廃した遺伝子であり, GDE5 あるいは GDE5dc471 をマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に過剰発現させたとき, いずれも筋芽細胞の最終分化に必須な myogenin の mRNA および筋管形成を著しく抑制し, 逆に, それらの発現を抑制させると筋分化が亢進した [56, 58]。GDE5 は生理的に骨格筋や心筋, あるいは脳において強く発現しており, 加齢に伴って発現が低下する [56]。これらのことから, GDE5 は筋分化を調節し, 加齢による骨格筋病態の進行において重要な役割を持つと考えられ, GDE5Tg マウスは若齢で sarcopenia の表現型を示す, 新規骨格筋萎縮モデルとして提案されてきた。しかし, 筋萎縮の進展メカニズムが不明であり, また運動機能や血清マーカーといった生理学的な変化については殆ど検討されておらず, GDE5Tg マウスを加齢性の骨格筋萎縮の病態解析における新規モデル動物として提案する情報として十分な状況にない。

本章では GDE5Tg マウスの示す骨格筋病態および生理機能への影響について, 病態の経時変化を解析することで進展メカニズムの解明に迫った。まず, 以前に報告のあった 12 週齢に近い, 8 週齢を若齢期として, 若齢期以前の 4 週齢を幼若期, さらに 1 年齢を中年期とし, 各時点における後肢骨格筋の病態を病理組織学的手法により詳しく調査し, 筋萎縮の認められた時点での生

理機能を解析した。さらに、NMJ に対する影響を評価するため、中年期における nAChR の形態および量的変化を検討し、nAChR 関連の遺伝子発現については若齢期より経時的に解析することで GDESTg と神経支配の関係性を検討した。

第二節 材料と方法

本研究における動物実験においては広島大学動物実験等規則に従い研究計画を提出し、広島大学長からの承認を受け（承認番号：C15-9-2），この規則に従い研究を実施した。材料の一般試薬においては、特に断りがない限り、ナカライテスク社およびSIGMA社の特級試薬を使用した。

1. 骨格筋特異的 GDE5dC471 過剰発現マウス（GDE5Tg マウス）の作製

1.1. 骨格筋過剰発現 GDE5Tg マウスの維持繁殖および飼育管理

当研究室において GDE5dC471 transgene が確認された後、少なくとも 5 回以上、C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー）と戻し交配を行ったのちに系統維持されている GDE5Tg マウスを用いた。本研究では雄性の GDE5Tg マウスと、雌性の C57BL/6J マウスを交配させ、野生型（Wild）マウス計 18 匹、GDE5Tg マウス計 20 匹の実験用マウスを作製した。マウスは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 10\%$ の環境で飼育した。飼料は標準的な実験動物用粉末飼料である MF（オリエンタル酵母工業）を自由摂取させ、水道水を自由飲水させた。

1.2. マウスのゲノム DNA 抽出およびトランスジェニックマウスの判定

1.1. で得られた実験用マウスの尾の先端約 3 mm を切断し、1.5 ml のチューブに移し、50 mM NaOH を 300 μL 添加し、ボルテックスミキサーにて 3 秒間混合した後、 95°C で 10 分間インキュベートした。1 M Tris-HCl (pH8.0) を 33 μL 加え、室温で 3 回転倒混合した後に 12,000 rpm (13,000 G)， 4°C の条件下で 10 分間遠心し、その上層液 100 μL を新しいチューブに移し、ゲノム DNA 溶液として用いた。

1.3. PCR 法による transgene の検出

1.2. で抽出したマウスのゲノム DNA を鋳型とし、下記の GDE5 プライマーを用いて PCR 反応を行なった。 94°C ，2 分の熱変性後、 98°C ，10 秒→ 68°C ，30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルの伸長反応後、増幅した DNA 断片の解析を行った。

[GDE5 primer]

sense primer : 5'-TTTGATGTCCACTTTC AAAGGAC-3'

antisense primer: 5'-CTCCATCCCTGTGTTGGCAAATCC-3'

[PCR 反応液組成]

2×PCR buffer for KOD FX	10 μL
2 mM dNTPs	4 μL
sense primer	0.8 μL
antisense primer	0.8 μL
KOD FX (1.0 U/μL)	0.3 μL
DNA 抽出液	1 μL
蒸留水	3.1 μL
Total	20 μL

PCR 反応後、増幅産物に 10×loading buffer を 10 μL 添加して、アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動は 1×tris-borate-EDTA (TBE) の泳動 buffer を用い、200V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、ゲルを ethidium bromide 溶液に 15 分間浸し、UV 照射により約 300 bp の DNA 断片の増幅が認められたサンプルについて、GDE5Tg マウスであると判定し、増幅が認められないものを Wild マウスとした。

2. 運動機能解析

GDE5Tg マウスの運動機能を検討するため、以前に大腿筋および腓腹筋の萎縮が報告されている 12 週齢と同等の若齢期の 8 週齢、あるいは中年期の 1 年齢の GDE5Tg マウスと、同腹の Wild マウスを用いて解析を行った。運動機能の測定には、全身のバランスなど複合的な運動筋機能（協調運動機能）については KN-75 式ロタロッド（夏目製作所、東京）を、能動的な運動機能（自発運動機能）について回転かご式自発運動量測定装置 RW-15（メルクエスト、富山）を用いた。

2.1. ロタロッドテストによる協調運動機能の測定

ロタロッドテストは 8 週齢、および 1 年齢の GDE5Tg マウスと、同腹の Wild マウスを用いて行った。ロタロッドテストは、ゆっくりと回転運動する円筒（ロッド）の上に動物が留まるかどうかを観察し、そこからの落下時間を測定することで運動機能を評価できる装置である。マウスの身幅よりもやや広い、3 cm 径のプラスチック製のロッドに乗せた後、ロッドを持続的に回転させると、マウスは落ちないようにロッド上を維持する。試行回数を重ねるのに従って、マウスのロッド上の滞在時間が長くなる。今回、実験に供した全てのマウス

を1日3回・3日間、ロタロッドで馴化させた後、15 rpm で回転させたロタロッドから各マウスが落下する時間を測定した。

2.2. 自走式回転かごによる自発運動機能の測定

自発運動能の測定は1年齢の GDE5Tg マウスと、同腹の Wild マウスを用いて行った。回転かごは単独飼育用ケージにマウスを飼育した状態で使用し、自発的に運動した回転数がカウンターに記録される。今回、実験に供した全てのマウスについて、回転かごを設置した状態で飼育する順化をした後、3日間の平均回転数を測定した。

3. 解剖および体重、組織重量測定

生後4週間（幼若期）、8週間（若齢期）および1年齢（中年期）の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの解剖に際しては、体重測定を行ったのち、全てのマウスはペントバルビタール麻酔下で放血させて安楽死させた。なお、8週齢あるいは1年齢のマウスは予め解剖の6時間前より絶食させておき、血液生化学検査を目的として腹大静脈より採血した。各時期で後肢骨格筋（大腿筋、腓腹筋、ヒラメ筋）を摘出し、8週齢あるいは1年齢のマウスは、骨格筋病態の進行にともなう脂肪組織重量の評価を目的として、腎周囲、および精巣周囲白色脂肪組織も摘出し、それらの湿重量を測定した。

以下に記載する実験に用いた腓腹筋および大腿筋は、筋繊維の垂直方向に筋の中心付近で二分し、上下左右の区別なく凍結やホルマリン固定などの処理を行い、評価に使用した。

4. 血液生化学検査

解剖時に得られた8週齢あるいは1年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの血液は1時間室温に静置したのちに3,000 rpm (2,500 G)、4°Cの条件下で10分間遠心し、上清を回収した。回収した血清を用いて、血中グルコース、血中トリグリセライド、および血中総コレステロールの分析について、自動分析装置日立7180（日立ハイテクノロジー、東京）を用いて行った。測定試薬にはそれぞれLタイプワコー Glu2（和光純薬工業、大阪）、デタミナー TG（協和メデックス、東京）およびデタミナー TCII（協和メデックス）を用いた。

5. 後肢骨格筋の病理標本作製

5.1. パラフィン切片の作製

4週齢, 8週齢および1年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより摘出した腓腹筋は, 10%中性緩衝ホルマリンに3日以上浸漬固定した。ホルマリンで固定された組織は薄切し病理評価に用いるため, ホルマリンをパラフィンで置換し, さらにパラフィン中に埋めることによりブロック化した。すなわち, ホルマリン固定後の組織を10分以上水洗し, 80%, 90% および 95%エタノールに各々10分以上段階的に浸漬し, 組織を脱水しエタノールに親和させる工程は手動にて行った。その後, 密閉式自動固定包埋装置 ETP Premier (サクラ精機, 東京) にセットした。セットプログラムは7層のエタノール各層に1時間×2層, 2時間×5層, 3層のキシレン各層に2時間ずつ, その後4層のキシレン層に各1時間浸漬することによる組織のパラフィン置換プログラムとした。パラフィン置換後の腓腹筋は, 中央付近の最大横断面で評価できるように, 切断面を下にしてパラフィン包埋皿に埋め, パラフィンブロック化した。十分に冷却したパラフィンブロックはマイクロトームによって2 μm の最低5枚以上の連続組織切片として薄切し, スライドガラス上に貼り付けた。その後1日間, 恒温乾燥機 (設定温度 37°C) で乾燥させた。

5.2. 凍結切片の作製

後述する後シナプス膜に局在する nAChR の形態観察には, 蛍光標識したヘビ毒を nAChR に特異的に結合させる反応を用いるため [60], アルデヒド系の固定をせずに病理組織検査用の凍結試料を作製する必要がある。1年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより得た大腿筋は, 薄切面が縦断面になるように Tissue-Tek® OTC-compound 中に組織を埋没させた後, 予め液体窒素で冷却しておいた2-メチルブタンに10分以上浸して完全に凍結させ, ブロック化した。凍結ブロックはクリオスタット (設定温度: -25°C) によって薄切し, 約 20 μm の組織切片として薄切し, スライドガラス上に貼り付けた。その後ドライヤーの冷風を30分間当て, 切片を乾燥させた。

5.3. hematoxylin-eosin (H&E) 染色

H&E 染色は, 4週齢, 8週齢および1年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの腓腹筋パラフィン切片を用いて, 自動染色装置 Tissue-Tek® Prisma (サクラ精機, 東京) を使用して行った。染色プログラムは4層のキシレン各層に10分×4層, 5分×1層の後, 2層の100%

エタノール各層に2分ずつ、95%、90%および80%エタノール各1層に1分ずつ段階的に浸漬することによる脱パラフィンを行った後、水層を経てhematoxylin染色を5分間実施し、その後、80%および90%エタノール各1層に1分ずつ浸漬洗浄後、10分間のeosin染色を行い、4層の100%エタノールでそれぞれ2分間ずつ洗浄した後、3層のキシレン層に3分、5分および10分間ずつ浸漬するプログラムとした。H&E染色後の組織切片は自動封入装置Primun-Aid（サクラ精機，東京）を用いて、マリノール（武藤化学，東京）によって自動封入した。封入後は1日間、恒温乾燥機（設定温度37°C）で乾燥させた。作製したH&E染色標本は、Aperio® AT（Leica microsystems，ドイツ）でスキャンした。

5.4. terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色

骨格筋細胞における断片化DNAを検出することを目的として、4週齢のGDE5Tgマウスと同腹のWildマウスにおける、4%PFA固定後の凍結切片、8週齢および1年齢の同上のマウスの腓腹筋パラフィン切片を用いて、TUNEL染色を行った。同一動物における評価対象組織以外でのTUNEL染色の染色態度を確認するため、小腸が同時包埋されている4週齢のみ凍結標本を用いた。なお、凍結切片でもパラフィン切片でも同等の検出力があるとされている[63]。TUNEL染色の陽性対照として、ラットの悪性リンパ腫を自然発症した脾臓のパラフィン切片を用いた。

パラフィン切片は、自動染色装置Tissue-Tek® Prismaを用いて、5.3.に記載した脱パラフィンの工程までを自動で行った。凍結切片は使用前に流水で10分以上なじませた。それぞれの切片をphosphate buffered saline (PBS) (-)に10分浸漬した後、PBS (-)で20倍希釈したproteinase K (DAKO Japan, 東京)で室温、3分間インキュベートした後に過酸化水素を3% (v/v)含むPBS (-)で室温、5分間インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後PBS (-)で5分間×2回洗浄した。以降の操作は3,3'-diaminobenzidine (DAB)による発色前まで、ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Temecula, CA, アメリカ)の取り扱い説明書に従った。内因性ペルオキシダーゼ除去した切片は平衡緩衝液で15秒間、室温で反応させ、キットに付属のTdT : reaction bufferを33 : 77で希釈したTdT酵素液をスライドに滴下した後、プラスチックカバーを直接被せ、ドラフト内で37°C、1時間反応させた。TdT反応は、蒸留水で35倍希釈した反応停止液を滴下し室温で10分間インキュベートし停止させた。スライドをPBS (-)で2分間ずつ4回洗浄した後、キットに付属のanti-DIG-peroxidaseを滴下しプラスチックカバーを直接被せ、室温で30

分間反応させた。スライドを PBS (-) で 2 分間ずつ 4 回洗浄した後、Liquid DAB+Substrate Chromogen System (DAKO Japan, 東京) キットの DAB 基質溶液と buffer を 50 : 1 で希釈した DAB 溶液をスライドに滴下し、凍結切片は 50 秒、パラフィン切片は 3 分間発色反応させ、反応は水洗して終了させた。TUNEL 染色後は 25 秒間、hematoxylin によって核の対比染色を行い、さらに、hematoxylin を青色に発色させるため、0.1% (w/v) 炭酸リチウム水溶液に 30 秒浸漬した。全ての染色を終了した後、70%、80%、90%、95%および 100%エタノールにそれぞれ 5 分ずつ浸した後、4 層のキシレンにそれぞれ 5 分ずつ浸し、脱水・透徹した。その後、5.3 に記載した H&E 染色と同様に封入した。作製した TUNEL 染色標本は、Aperio® AT でスキャンした。

5. 5. periodic acid schiff (PAS) 染色

病理組織標本における糖質の局在を検証することを目的として、PAS 染色を行った。PAS 染色はグリコーゲンなどの多糖類や基底膜などを濃紫色に染めることのできる特殊染色法である。評価には 4 週齢、8 週齢および 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの腓腹筋パラフィン切片を用いた。全ての切片は、自動染色装置 Tissue-Tek® Prisma を用いて、5. 3. に記載した脱パラフィンの工程までを自動で行った。脱パラフィン後に流水水洗をしておいたスライドを、5% (w/v) 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液で 15 分間染色し、流水水洗のち、コールドシッフ液 (和光純薬工業, 大阪) で 20 分間染色した。次いで、0.05 M 亜硫酸水素ナトリウム水溶液に 5 分間ずつ 3 回浸した後、流水水洗した。PAS 染色後は hematoxylin によって 25 秒間、核の対比染色を行い、さらに、hematoxylin を青色に発色させるため 0.1% 炭酸リチウム水溶液に 30 秒浸漬した。対比染色後、5. 4. TUNEL 染色と同様に脱水・透徹した後封入した。作製した PAS 染色標本は、Aperio® AT でスキャンした。

5. 6. Elastica van Gieson (EVG) 染色

細胞と細胞を繋ぐ支持組織である結合組織は、コラーゲンを多く含む膠原繊維とエラスチンを多く含む弾性繊維が主成分である [61]。EVG 染色は細胞質を黄～橙色に、赤血球を橙色に、膠原繊維を赤色に、また弾性繊維を黒色に特異的に染めわけることのできる特殊染色法である。本研究では H&E 染色では鑑別の難しい、結合組織の有無の評価のため、4 週齢、8 週齢および 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの腓腹筋パラフィン切片を用いた。全ての切片は、自動染色装置 Tissue-Tek® Prisma を用いて、5. 3. に記載した脱パラ

フィンの工程までを自動で行った。脱パラフィン後に流水水洗をしておいたスライドを、1% (v/v) 塩酸を含む 70%エタノールに 5 分間浸し、前田変法レゾルシン・フクシン液（武藤化学）で室温、90 分間染色した。染色後は 95%エタノールですばやく洗浄し、流水水洗した後、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液で室温、10 分間の核染色を行った。なお、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液は 99.5%エタノールに 1% (w/v) ヘマトキシリンを含む溶液に対して 1.2% (w/v) 塩化鉄（III）六水和物と 1%塩酸を蒸留水に溶解した液を当量ずつ混合し調製した。この核染後は 10 分以上流水で十分に水洗し、その後、ワンギーソン A 液（ピクリン酸、武藤化学）100 mL に対してワンギーソン B 液（酸フクシン、武藤化学）15 mL を混合し調製したワンギーソン液に室温で 3 分間浸し、不要な染色液を脱色するための分別を行った。その後、95%エタノールですばやく洗浄後、5.4 TUNEL 染色と同様に脱水・透徹した後封入した。作製した EVG 染色標本は、Aperio® AT でスキャンした。

5.7. 後シナプス膜の α -Bungarotoxin (α -BTX) 標識

骨格筋繊維に局在する神経筋接合部 (Neuromuscular junction, NMJ) を構成する後シナプス膜の形態観察を目的として、5.2.2. で作製した GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの未固定組織の凍結切片を用いて、 α -BTX 標識を行った。全ての凍結切片は使用前に流水で 10 分以上なじませ、それぞれの切片を PBS (-) に 10 分浸漬した後、 α -BTX Alexa® Fluor 594 (Invitrogen, アメリカ) を 2 μ g/mL となるよう Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO Japan) で希釈し、切片上に滴下し、湿潤箱に遮光した状態で 4°C×16 時間静置した。次いで、Tween20 を 0.05 %含む PBS (-) 溶液 (PBS-T) で 3 回洗浄し、glycerol と PBS (-) を等量混合した水溶性封入剤によって封入後、落射蛍光顕微鏡 BHS-RFC (オリンパス, 東京) により観察した。

6. 後肢骨格筋の病理標本の評価

6.1. 骨格筋横断面積の計測

骨格筋横断面積の計測は、5.3. で作製した H&E 染色標本を用いて行った。

マウスの腓腹筋において、Type1 繊維を含むヒラメ筋側の部位（近位）および解糖系の Type2 繊維が殆どを占める体表側の部位（遠位）よりそれぞれ 2 箇所以上、無作為に抽出したエリアの写真撮影を実施し、各個体 400 個以上の筋繊維の短径と長径について、電子ノギス（ミットヨ, 神奈川）を用いて計測した後、計測した数値を μm^2 に換算した。

6.2. 骨格筋繊維数あたりの中心核出現率の算出

骨格筋繊維数あたりの中心核出現率の算出は、5.3. で作製した H&E 染色標本を用いて行った。6.1. と同様に、近位および遠位より無作為に抽出した 2 箇所以上のエリアの写真撮影を実施した後、各個体 300 以上の筋繊維をカウントし、筋繊維 1 本あたりの筋細胞質の中心に出現した核（中心核）の出現率（%）を算出した。

6.3. 骨格筋細胞核あたりの TUNEL 染色核の陽性率の算出

骨格筋細胞核あたりの TUNEL 染色核の陽性率の算出は、5.4. で作製した TUNEL 染色標本を用いて行った。6.1. と同様に、近位および遠位より無作為に抽出した 2 箇所以上のエリアの写真撮影を実施し、TUNEL 陽性核を含む各個体 200 個以上の骨格筋細胞核をカウントし、TUNEL 染色核の陽性率（%）を算出した。

7. 大腿筋における mRNA の発現解析

7.1. 大腿筋からの RNA 抽出

4 週齢、8 週齢、および 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより摘出した大腿筋を用いて、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) のキットの取扱説明書に従って total RNA の調製を行った。15 mL 容量のファルコンチューブに 1.5 mL QIAzol reagent (QIAGEN) を分注し、ホモジナイザーで組織を完全に破碎した後、新しいファルコン管に移し total RNA の調製まで -80°C で保存した。保存していた大腿筋のホモジナイズ溶液は室温で 30 分間静置し融解させた後、クロロホルムを 375 μ L ずつ各サンプルに添加し、密閉した状態で 15 秒間ボルテックスミキサーによって激しく攪持させ、室温で 3 分間に静置した。その後、3,000 rpm (25,00 G) , 4°C の条件下で 15 分間遠心し、上層の RNA を含む無色の水層を 500 μ L 分取し 1.5 mL 容量のチューブに回収した。次いで、予め 2 mL のコレクションチューブにセットしておいた RNeasy Spin Column に回収した上清 350 μ L と等量の 70%エタノールをボルテックスにより完全に混合したものを添加し、12,000 rpm (13,000 G) , 4°C の条件下で 15 秒間遠心して溶出液を廃棄した。その後、700 μ L の Buffer RW1 を RNeasy Spin Column に添加し、密閉した状態で 12,000 rpm (13,000 G) , 4°C の条件下で 15 秒間遠心し、溶出液を廃棄した。その後、500 μ L の Buffer RPE を RNeasy Spin Column に添加し、チューブの蓋を静かに閉め 12,000 rpm (13,000 G) , 4°C の条件下で 15 秒間遠心し、RNeasy Spin Column を 2 mL 容量

の新しいコレクションチューブに移した。次いで、50 μL の RNase Free H₂O を RNeasy Spin Column シリカゲルメンブレンに直接添加し 12,000 rpm (13,000 G) , 4°C の条件下で 15 秒間遠心し、コレクションチューブに溶出した total RNA 液を得た。total RNA 液はすみやかに -80°C で保存した。

7.2. total RNA の定量

7.1. において -80°C で凍結保存しておいた total RNA 液を融解させた後、nano drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 神奈川) を用いて 260 nm の吸収波長 (A_{260}) の吸光度を測定し濃度測定をした後、mRNA 発現解析に利用する cDNA の合成用に 1 μg RNA 溶液相当量を算出した。

7.3. cDNA の合成

RNA 溶液 (1 μg 相当量) と RNase free Water を合わせて 17.25 μL として、random primer を 1.5 μL および 10 mM dNTP Mixture を 3 μL 加え、全量を穏やかに混合し、65°C, 5 分間熱変性した後、5 分間氷上でインキュベートした。次いで、氷上の溶液に RNase OUT™ を 0.75 μL および ReverTra@Ace を 1.5 μL 添加した。これに 5 \times RT Buffer を 6 μL 添加後、穏やかにピペッティングし、1 サンプルあたり総量 30 μL の反応溶液とした。逆転写反応は 30°C, 10 分間→42°C, 50 分間→95°C, 5 分間→4°C の条件で行い、cDNA 溶液を得た。得られた cDNA 溶液に RNase free Water を 100 μL ずつ添加し、下記の実験の cDNA 溶液として使用した。なお使用前まで cDNA 合成液は -80°C で保存した。

7.4. realtime PCR 法による mRNA の発現解析

4 週齢, 8 週齢, および 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの大腿筋における, NMJ 関連 mRNA の発現解析のため, アセチルコリンエステラーゼ (Ache) , ニコチン作動性アセチルコリンレセプター (nAchR) α 1 サブユニット (nAchR α 1) , nAchR γ および nAchR ϵ の realtime PCR を行った。また, 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの腓腹筋におけるエネルギー代謝の解析を目的として, ミトコンドリア量および機能解析には citrate synthase (Cs) および peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC-1 α) , また, 解糖系機能解析には, α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) の realtime PCR を行った。さらに, 筋繊維タイプの解析を目的として, 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マ

ウスの腓腹筋を用いて、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MHC) アイソフォームである MHC-I, MHC-IIa, MHC-IIx および MHC-IIb の realtime PCR を行った。はじめに、45 μ L の蒸留水に発現解析する mRNA の sense および anti-sense primer を 2.5 μ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーにて十分に混合した後にスピンドウンし、primer set を作製した。次いで、以下の反応液を混合し realtime PCR premix を作製した。

[realtime PCR premix]

蒸留水	6.1 μ L
Primer set	2.0 μ L
Rox	0.4 μ L
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	10 μ L
<hr/>	
Total	18.5 μ L

作製した realtime PCR premix を realtime PCR 用 8 連チューブに分注し、次いで 7.3 で作製し、予め氷冷し融解させておいた cDNA を気泡の混入がないように 1.5 μ L ずつ分注しマイクロピペットにて穏やかに混合した。その後、スピンドウンし、気泡の混入のないことおよびチューブの蓋に液体が付着していないことを十分に確認した後に realtime PCR システム、StepOnePlus™ (Applied biosystem) にセットした。反応条件は 95°C, 1 分間の熱変性後、95°C, 15 秒間→60°C, 1 分間を 1 サイクルとした 40 サイクルの伸長反応とした。反応終了後は各サンプルの Ct 値 (特定の増幅量に達するまでの PCR サイクル数) を得た後、リファレンスコントロールである L19 の Ct 値との差 (Δ Ct) および Wild マウスの 1 例目を基準とした割合を算出することによる $\Delta\Delta$ Ct 法により目的の mRNA 発現量を得た。なお、realtime PCR に使用した primer は表 1 に記した。

8. 統計解析

GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより得られた全ての数値データについて、対応のない t 検定によって統計学的有意性を解析した。また、経時的に得られたデータについては、二元配置分散分析を実施したのち、ポストテストとして上記の t 検定を実施し解析した。いずれも両側検定とし、有意水準は 5%未満 ($p<0.05$) と 1%未満 ($p<0.01$) とに分けて表示した。なお、統計解析は Prism 7 version 7.01 software (GraphPad Software) を使用し実施した。

表 2 定量 PCR に用いたプライマーの一覧

Accession No.	Gene	sense		anti-sense	
		5'	3'	5'	3'
NM_001290010	Ache	GCTCCTACTTTCTGGTTTAC		AAAGATGTAGGCATAGACCC	
NM_007389	Chrna1	GCCGGACGTCGTTCTCTATA		GTAGAACACCCAGTGCTTCC	
NM_009604	Chrng	CAAAGGCAGCGCAATGGATT		GTAGTGGGCCATGAGGAAGA	
NM_009603	Chrne	GCGTGCTCATTTCTGGCTTG		CGCGGCAGCAGCTCTAATAA	
NM_080728	Myh7	CCAAGGGCCTGAATGAGGAG		GCAAAGGCTCCAGGTCTGAG	
NM_001039545	Myh2	AAGCGAAGAGTAAGGCTGTC		GTGATTGCTTGCAAAGGAAC	
NM_030679	Myh1	CGGTGGTGGAAAGAAAGGGG		CAGGAGTCTTGGTTTCATTG	
NM_010855	Myh4	ACAAGCTCGGGTGAAGAGC		CAGGACAGTGACAAAGAACG	
NM_026444	Cs	AGCTCATGCGTTTGTACCTC		CTCATCTGACACGTCTTTGC	
NM_008904	Ppargc1a	ATGTGTCGCCTTCTTGCTC		TGTCTGTAGTGGCTTGATTC	
NM_010271	Gpd1	CAACTTTCGCATCACTGTGG		AGCTGCTCAATGGACTTTCC	
NM_031189	Myog	CATGTAAGGTGTGTAAGAGG		GTAGCGGAGATCGCGCTCCT	
NM_011039	Pax7	AGGCCTTCGAGAGGACCCAC		CTGAACCAGACCTGGACGCG	
NM_009078	Rpl19	GGCATAGGGAAGAGGAAGG		GGATGTGCTCCATGAGGATGC	

Ache : AchE, Chrna1 : nAchR α 1, Chrng : nAchR γ , Chrne : nAchR ϵ , Myh7 : MHC-I, Myh2 : MHC-IIa, Mhh1 : MHC-IIx, Myh4 : MHC-IIb, Cs : Cs, Ppargc1a : PGC-1 α , Gpd1 : α -GPD, Myog : Myogenin, Pax7 : PAX7, Rpl19 : L19

第三節 結果

1. 後肢骨格筋重量および一般状態の経時変化

4週齢（以下、4wk）を幼若期、8週齢（以下、8wk）を若齢期、また1年齢（以下、1Y）を中年期と定義し、各時期における骨格筋 GDE5dC471 過剰発現（以下、GDE5Tg）マウスの後肢骨格筋重量の経時的な解析を行った。解剖当日の体重、速筋繊維（Type2 繊維）を豊富に含む大腿筋および腓腹筋、また、そのほとんどが遅筋繊維（Type1 繊維）であるヒラメ筋重量を測定した結果を表 3 に示した。実験期間を通して、GDE5Tg マウスの体重と Wild マウスの体重の間に顕著な差は認められず、死亡例の発現も認められなかった。各解剖時期における骨格筋重量測定の結果、4wk においては、いずれの後肢骨格筋重量も GDE5Tg マウスと同腹の野生型コントロール（以下、Wild）マウスとの間に有意な差は認められなかった。8wk において、GDE5Tg マウスの大腿筋および腓腹筋重量は Wild マウスに比べて著明に減少し（Wild マウスを基準とした変化量；大腿筋：-37%，腓腹筋：-31%），この傾向は 1Y でも引き続き認められた（大腿筋：-36%，腓腹筋：-32%）。しかし、ヒラメ筋重量は 8wk および 1Y とともに、統計学的に有意な差は認められなかった。

2. 腓腹筋横断面の H&E 染色標本による病理組織検査および断面積の経時評価

GDE5Tg マウスの骨格筋病理および筋横断面積の経時推移の解析を目的とし、4wk、8wk および 1Y におけるマウス腓腹筋の H&E 染色標本を作製した（図 4A）。次いで、hematoxyline and eosin（H&E）染色標本の画像解析によって平均筋横断面積の経時推移を解析し（図 4B）さらに、個々の筋繊維の分布をヒストグラム化した（図 5）。4wk においては GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの間で腓腹筋の平均横断面積に差は認められなかったが、8wk および 1Y において、GDE5Tg マウスは Wild マウスに比べ、著明に縮小することが明らかになり（8wk：-42.3%，1Y：-44.2%），大腿筋および腓腹筋重量の低下は筋横断面積の縮小に関連すると考えられた（図 4A, B）。次に、個々の筋繊維の横断面積をもとに作成したヒストグラムにより、各週齢における野生型と GDE5Tg マウスの筋繊維横断面積の分布を比較した結果、4wk では両者の分布に違いが認められなかったが、8wk の GDE5Tg マウスでは腓腹筋繊維の個々の横断面は野生型に比して左側にシフトしており、筋重量の低下および筋横断面積の低下には、各々の筋繊維の縮小が寄与していると考えられた（図 5A, B）。このヒストグ

ラムは1YのGDE5Tgマウスにおいても8wkで認められたものと同様の分布であったことから、各筋繊維の横断面積の縮小は、少なくとも1Yまで不可逆的に引き続くことが判明した(図5C)。

腓腹筋のH&E染色標本の詳細観察によって、GDE5Tgマウスにおいて筋横断面積の縮小が認められただけでなく、筋核が細胞質の中心に位置する現象が散見した(中心核)(図4A)。通常、筋細胞の辺縁に局在する筋核が細胞質中に出現する中心核は、筋細胞に由来する傷害と再増殖時において頻繁に認められ、myopathyの診断指標に位置づけられる。GDE5Tgマウスにおける筋繊維数あたりの中心核の出現割合を算出したところ、同腹のWildマウスに比べて著しくその割合が増加し、時間依存的に増加することが明らかとなり(8wk:5.6倍, 1Y:6.0倍)、GDE5Tgマウス腓腹筋の萎縮はmyopathyである可能性が示唆された(図4C)。

3. 腓腹筋横断面のPAS, およびEVG染色による病理組織検査

壊死した細胞はその修復過程において、細胞と細胞を繋ぐ支持組織である結合組織に置き換わることが知られている[31]。結合組織はコラーゲンを多く含む膠原繊維と、エラスチンを多く含む弾性繊維が主成分である[62]。筋重量の低下および筋横断面積の縮小が認められる、8wkと1YのGDE5Tgマウスの腓腹筋において、炎症を示唆する単核球細胞の骨格筋への浸潤、重篤な細胞傷害などを示唆する壊死像は認められず、また、壊死からの修復像を示唆する、細胞質間の支持組織である結合繊維への置き換わった病理像を認める個体はなかった。しかし、8wkにおいて、筋細胞質に比べてエオシンにより強く染まる物質の沈着像が認められ、1Yではより明瞭に認められた(図6A-C (b) および図6D, H&E)。そこで、結合組織への置換の有無を確定すること、さらに細胞質内に貯留していた物質の性質を明らかにすることを目的とし、4wk, 8wk および1Yの腓腹筋横断面の切片を用いて、筋細胞質を黄～薄桃色、赤血球を橙色、膠原繊維を赤色、また弾性繊維を黒色に特異的に染めわけるとElastica van Gieson (EVG) 染色を行った(図6A-C (e), (f) および図6D, EVG)。また、ムコ多糖やグリコーゲンといった糖質および基底膜を特異的に濃紫色に染めるperiodic acid schiff (PAS) 染色を行った(図6A-C (c), (d) および図6D, PAS)。なお、それぞれの染色標本とH&E標本の病理像も比較した。EVG染色の結果、膠原繊維あるいは弾性繊維の増加はいずれの週齢の病理像でも認められなかったことから、GDE5Tgマウスの筋細胞が結合組織に置換された可能性は極めて低いと考えられた(図6A-C (e), (f) および図6D, EVG)。細胞質内に貯留していた物質は、EVG染色によって赤血球に近い色調で染色され

たことから、膠原繊維や弾性繊維であった可能性は低く、血球の形態が保たれていなかったため、この可能性も低いと考えられた。また、PAS 染色によって濃紫色に染まらなかったことから糖質の可能性が否定された（**図 6A-C (c)** , **(d)** および**図 6D, PAS**）。なお、各染色に使用した切片はパラフィン包埋切片であり、ホルマリン固定された組織にパラフィンを浸透させていく熱処理工程を通して、脂質は溶出する。そのため、不明な物質が脂質であった場合は H&E 染色標本の時点で円型に白く抜けるため、脂質の可能性が否定された。さらに、カルシウムなどの結晶成分は H&E 染色に染色されないため、これも否定された。従って、筋萎縮時に細胞質内に貯留する物質の構成成分は、筋細胞質とは異なったタンパク質である可能性が極めて高いことが示唆された。

4. 腓腹筋横断面の TUNEL 染色を用いた病理組織検査

細胞死の一つである apoptosis の検出を目的として、4wk, 8wk および 1Y におけるマウス腓腹筋の病理標本を用いて、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色により解析した。4wk では DNA が断片化し、TUNEL 染色陽性であることを示す茶色の核がほとんど視認できなかった一方、8wk および 1Y では TUNEL 陽性核が散見した (**図 7A**)。TUNEL 陽性核の出現率を算出した結果、4wk においては GDE5Tg マウスと Wild マウスの間で出現率に顕著な差が認められなかったのに対し、8wk, 1Y とともに、同腹の Wild マウスに対して GDE5Tg マウスの TUNEL 陽性核出現率が有意に増加し、また、経時的に増加していた (8wk : 4.1 倍, 1Y : 6.4 倍) (**図 7B**)。以上より、GDE5Tg マウスの腓腹筋の萎縮には apoptosis が関与していることが示唆された。

5. 運動機能解析

運動機能は、ロタロッドテストと自走式回転かごテストで評価した。ロタロッドテストは、一定速度で回転運動する円筒 (ロッド) にどれだけの時間留まることができるかを評価する試験で、マウスはバランスを取りながら歩行することが要求され、握力測定など単純な筋機能に対し、協調運動機能と呼ばれる全身の複合的な運動機能が評価できる。一方、自走式回転かごは能動的に運動することによって持久力・疲労耐性などが評価できる。本研究では筋萎縮が明らかに発症している時の GDE5Tg マウスの運動機能を評価するために、解剖前日までに 8wk および 1Y の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスを用いて各運動機能解析を行った。ロタロッドテストを 3 日間連続で実施したところ、いずれの週齢・試行時においても

GDE5Tg マウスは Wild マウスに比べてロタロッドから落下する速度が早く、8wk では Wild マウスより平均で 22 秒早く落下し (図 8A) , 1Y では 40 秒早く落下した (図 8B) 。一方、自走式の回転かごを飼育ケージに据え付け、回転数により自発運動機能が評価できる回転かごテストを 3 日間実施したとき、1Y の GDE5Tg マウスおよび同腹の Wild の間で 1 日あたりの平均回転数に明らかな差は認められなかった (図 9) 。このことから、GDE5Tg マウスは II 型筋繊維を豊富に含む後肢骨格筋の萎縮に加え、全身の複合的な運動機能が低下することが示唆された。

6. 白色脂肪組織、血中脂質および糖質の経時解析

骨格筋萎縮を示す GDE5Tg マウスにおける、肥満関連パラメータの変動を検討するため、8wk および 1Y の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの解剖時において、白色脂肪組織を採材し重量を測定した。なお、白色脂肪組織は腎周囲および精巣・精巣上部周囲の白色脂肪組織を合わせたものとした。また、腹大静脈血から分離した血清を用いて、血中グルコース、血中トリグリセライドおよび血中総コレステロール値を経時的に比較検討した。その結果、8wk および 1Y において、GDE5Tg マウスの腎周囲と精巣周囲を合わせた白色脂肪組織は、同腹の Wild マウスに比べ増加傾向にあることが判明した (8wk, 1Y ともに 1.28 倍) (表 4) 。血中グルコースおよび血中総コレステロール濃度は 8wk, 1Y の GDE5Tg マウスの間で有意な差はなかったが、いずれの週齢の GDE5Tg マウスも、血中トリグリセライド濃度は同腹の Wild マウスに比べて有意に高値を示した (8wk : 1.9 倍, 1Y : 1.4 倍) (表 4) 。なお、血清生化学に関しては糖質・脂質の他、aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) , 総タンパク質、アルブミンを測定したがいずれも野生型と GDE5Tg マウスとの間に有意差はなく (データ表示なし) , 肝機能や腎機能に対して影響は認められなかった。

7. GDE5Tg マウスの示す骨格筋病態とエネルギー代謝の関係性

酸化型の TypeI 筋繊維はミトコンドリアを多く含み、その呼吸鎖によりエネルギーが産生される [1] 。ミトコンドリア含量は citrate synthase (Cs) mRNA の発現によって評価することができ [63] , ミトコンドリア機能は peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC-1 α) mRNA 発現量が反映している [64] 。なお Cs はクエン酸回路の第一段階の律速酵素であり、PGC-1 α はミトコンドリアの再生に不可欠なタンパク質で、多様な核内受容体

や転写因子のコアクチベーターとして働きエネルギー代謝に重要な役割を持つ。一方、Type2筋繊維は解糖系によるエネルギー産生が盛んである [1]。解糖系機能は主要な代謝酵素である α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) mRNA 発現量によって評価することができる [65]。上述したように、GDE5Tg マウスの筋萎縮に伴って血中トリグリセリドと白色脂肪組織重量は増加するため、骨格筋病態とエネルギー代謝の関係性を明らかにすることを目的とし、1Y の GDE5Tg マウスの腓腹筋から抽出した total RNA より合成した cDNA を用いて、Cs, PGC-1 α あるいは α -GPD mRNA の定量解析を行った。その結果、Cs および PGC-1 α mRNA 発現量は GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの間で顕著な差はなかったが (図 10A), α -GPD mRNA は同腹の Wild マウスと比較して 45% の有意な発現減少を示した (図 10B)。これらの結果から、中年期における GDE5Tg マウスにおいて、ミトコンドリア含量や機能異常は認められないが、解糖系による糖代謝の低下が示唆された。

8. 後シナプス膜の形態評価

NMJ の形態変化の評価を目的として、骨格筋側の NMJ を構成し nAChR が局在している後シナプス膜の形態観察を行った。後シナプス膜の形状は α -bungarotoxin により nAChR を蛍光標識した病理標本によって観察した。1Y の GDE5Tg マウス腓腹筋の未固定凍結ブロックより作製した縦断面切片において、GDE5Tg マウスと Wild マウスの後シナプス膜の形態にほとんど差異はなく、加齢や除神経で報告されている断片化、密度の低下といった変性は認められなかった (図 11A)。さらに、縦断面の一面全体あたりに存在する後シナプス膜の数も計数したところ、GDE5Tg マウスと Wild マウスの間で差は認められなかった (図 11B)。

9. NMJ 関連 mRNA の経時的発現解析

4wk, 8wk および 1Y の GDE5Tg マウスおよび同腹の Wild マウスの腓腹筋を用いて、nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) を構成する筋特異的サブユニットの nAChR α 1, nAChR γ および nAChR ϵ , また、神経伝達物質の acetylcholine (Ach) を分解する acetylcholinesterase (Ache) mRNA 発現量に対する GDE5dC471 過剰発現の影響を realtime PCR 法により検討した。4wk において、GDE5Tg マウスの nAChR ϵ および Ache mRNA 発現量は、Wild マウスに比べて有意に高く (nAChR ϵ : 2.4 倍および Ache: 3.0 倍), nAChR α 1 mRNA に関しては有意ではなかったが野生型に比して 1.8 倍の発現増加を示した。一方、nAChR γ mRNA 発現量は GDE5Tg マウスと野生型の間でほとんど変わらなかった (図 12A-D)。筋萎縮を示す 8wk の GDE5Tg

マウスにおいては、今回検討した全ての mRNA 発現量が野生型を上回り、nAchR α 1 については有意差が認められた (nAchR α 1 : 2.0 倍, nAchR ϵ : 3.7 倍, nAchR γ : 2.8 倍および Ache : 2.4 倍) (図 12A-D)。この傾向は 1Y においても引き続き、1Y では全ての mRNA の発現量が有意に増加していた (nAchR α 1 : 3.0 倍, nAchR ϵ : 2.1 倍, nAchR γ : 4.2 倍および Ache : 4.2 倍) (図 12A-D)。

10. 中年期マウスの腓腹筋におけるミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の発現解析

骨格筋の加齢性変化や脱神経処置によって神経伝達が低下する際、Type1 の形質が Type2 になるなど、筋繊維タイプが遷移することが報告されている [21]。岡崎は 12 週齢の GDE5Tg マウス大腿筋において Type2 筋繊維型のトロポニンが減少し、Type2 筋繊維型が上昇することをノーザンブロット法により明らかにしており、筋繊維タイプの遷移の可能性を指摘している [59]。本研究では筋タンパク質に最も多く含まれる MHC に着目し、筋萎縮がさらに進行した 1Y の GDE5Tg マウスにおける筋繊維タイプの遷移を検討した。1Y の GDE5Tg マウスおよび Wild マウスの腓腹筋における MHC アイソフォーム mRNA を発現解析したところ、MHC-I, MHC-IIa, MHC-IIb および MHC-IIx の全 MHC アイソフォーム mRNA 発現量が低下傾向にあることが明らかとなった (MHC-I : -49.8%, MHC-IIa : -19.8%, MHC-IIb : -52.0% および MHC-IIx : -39.5%) (図 13)。しかし、特定の MHC mRNA の発現上昇は認められず、筋繊維タイプが遷移していた可能性は低いことが示唆された。

11. 若齢あるいは中年期マウスの腓腹筋における筋分化マーカー mRNA の発現解析

通常、筋繊維を取り巻く幹細胞である筋衛星細胞 (satellite cell, SC) の多くは休止状態にあり、apoptosis の誘導、タンパクのフォールディング異常などによる小胞体ストレス (endoreticulum stress, ER ストレス), および筋の機械的傷害によって SC は活性化する [66]。筋繊維自体は再生能を持たないが、SC が筋芽細胞に分化し融合することにより筋繊維は補われる。そこで、GDE5Tg マウスの骨格筋病態における SC の分化誘導に対する影響の検討を目的として、apoptosis 誘導が示唆されている 8wk ならびに 1Y の GDE5Tg, および Wild マウスの腓腹筋を用いて、最終分化に必要とされる myogenin の発現を realtime PCR により解析した。さらに、1Y については、静止期の SC が活性化した直後の筋分化マーカーである PAX7 についても同様に解析を実施した。その結果、8wk, 1Y ともに GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスの腓腹筋における myogenin mRNA の発現量にほとんど差がなく、また、1Y

の PAX7 mRNA 発現量についても GDE5Tg マウスでは軽度の上昇傾向を示したものの、同腹の Wild マウスの発現量との間に有意な差は認められなかった (図 14)。

表3 GDE5Tg マウスと同腹の野生型における体重と骨格筋重量の経時推移

Mice	Body weight (g)	Quadriceps (mg)	Gastrocnemius (mg)	Soleus (mg)
4week-old WT (n=4, 3 ^{\$})	15.3 ± 0.4	77.7 ± 4.2	77.8 ± 5.5	3.5 ± 0.4
4week-old Tg (n=4, 3 ^{\$})	15.0 ± 0.3	72.5 ± 4.7	70.7 ± 0.9	3.8 ± 0.4
8week-old WT (n=4)	21.8 ± 0.2	161.8 ± 8.3	144.0 ± 9.5	5.3 ± 0.4
8week-old Tg (n=3)	21.7 ± 0.5	101.3 ± 3.0*	99.0 ± 9.0*	4.7 ± 0.6
1year-old WT (n=7)	33.3 ± 0.9	205.0 ± 9.6	181.0 ± 3.6	8.7 ± 1.1
1year-old Tg (n=10)	31.8 ± 1.2	132.2 ± 5.0**	122.5 ± 4.4**	10.2 ± 0.7

データは全て平均値±標準誤差で示した。WT は野生型マウス，Tg は GDE5Tg マウスを意味し，カッコ内は解析に使用した例数を示した。なお，\$は soleus の重量測定に供した例数を示した。*: p<0.05, **: p <0.01 (対応のない t 検定)

表4 8週齢および1年齢のGDE5Tgマウスと同腹の野生型における白色脂肪組織重量および血液生化学検査値

Mice	WAT (mg)	Glu (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-Cho (mg/dL)
8week-old WT (n=4)	258 ± 80	269 ± 10	30 ± 2	72 ± 4
8week-old Tg (n=3)	329 ± 14.6*	276 ± 7	57 ± 7*	75 ± 3
1year-old WT (n=7)	784 ± 73	207 ± 11	20 ± 2	82 ± 2
1year-old Tg (n=10)	1005 ± 189	219 ± 12	28 ± 3*	82 ± 5

データは全て平均値±標準誤差で示した。WTは野生型マウス、TgはGDE5Tgマウスを意味し、カッコ内は解析に使用した例数を示した。WATは腎周囲脂肪重量および精巣周囲脂肪重量を合わせた白色脂肪組織重量を意味し、血液生化学検査値であるGlu、TGおよびT-Choはそれぞれ血清グルコース、血清トリグリセリドおよび血清総コレステロールを意味する。*: p<0.05 (対応のないt検定)

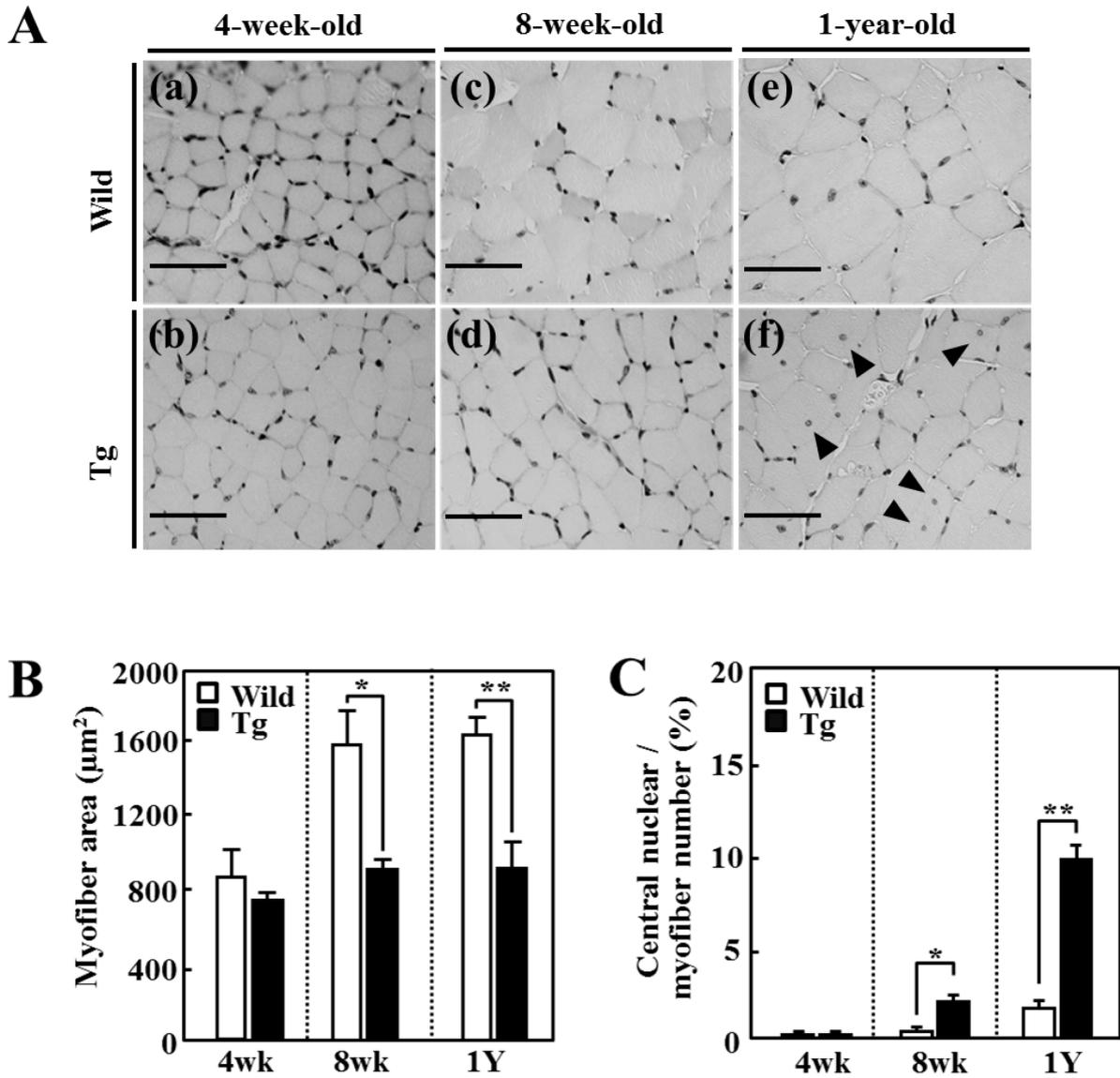


図4 GDE5Tg マウスと同腹の野生型における腓腹筋横断面積および中心核出現率の経時変化

A : 4 週齢, 8 週齢および 1 年齢の腓腹筋横断面の H&E 染色標本について, 代表的な病理組織像を示した。スケールバー : 100 μm , 矢印 : 中心核, Wild : 野生型マウス ((a) : 4 週齢, (c) : 8 週齢および (e) : 1 年齢), Tg : GDE5Tg マウス ((b) : 4 週齢, (d) : 8 週齢および (f) : 1 年齢)。B : 腓腹筋横断面積の平均値の経時推移を示した。4wk : 4 週齢, 8wk : 8 週齢, 1Y : 1 年齢。C : 腓腹筋横断面における筋繊維数あたりの中心核の出現率を示した。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対応のない t 検定)

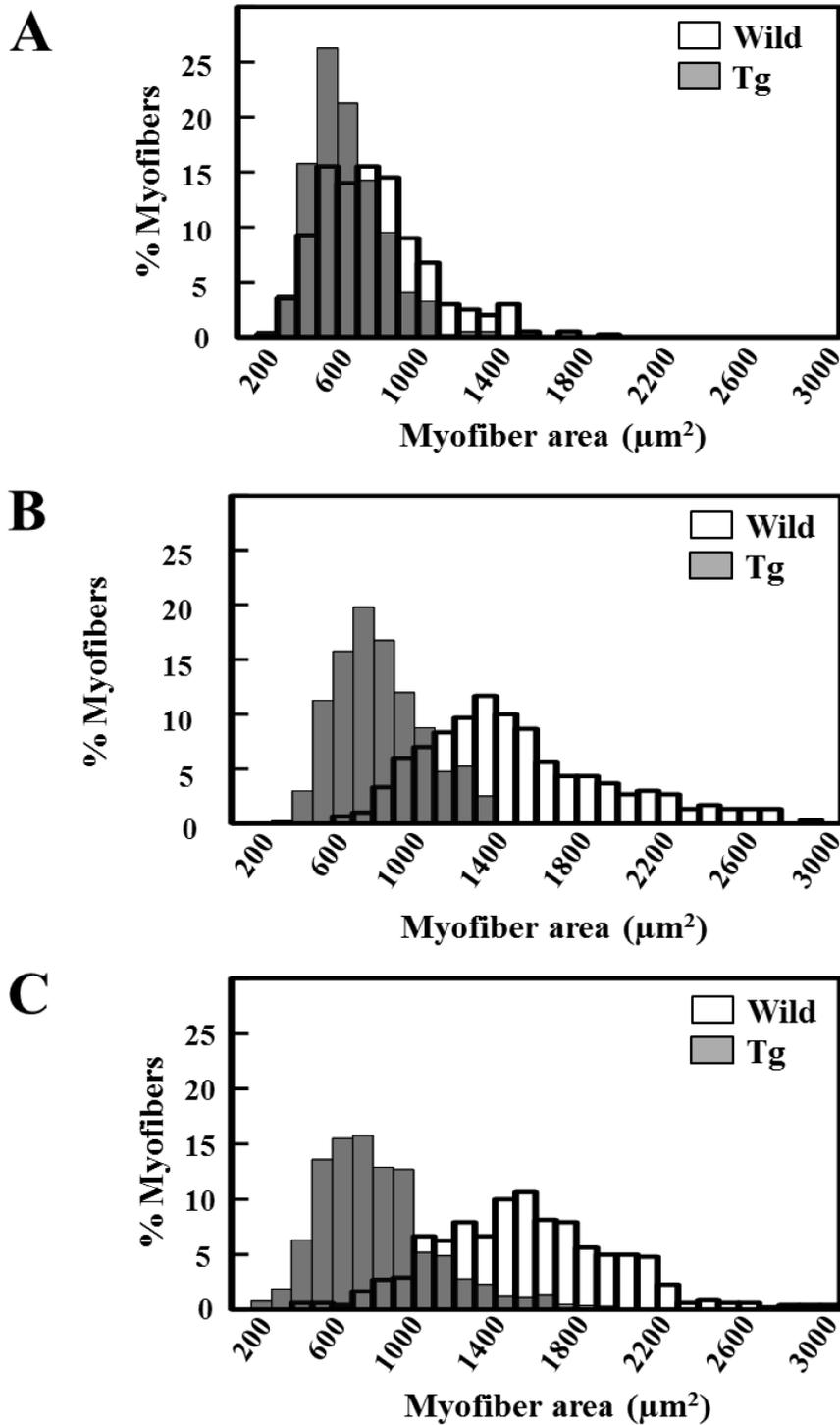
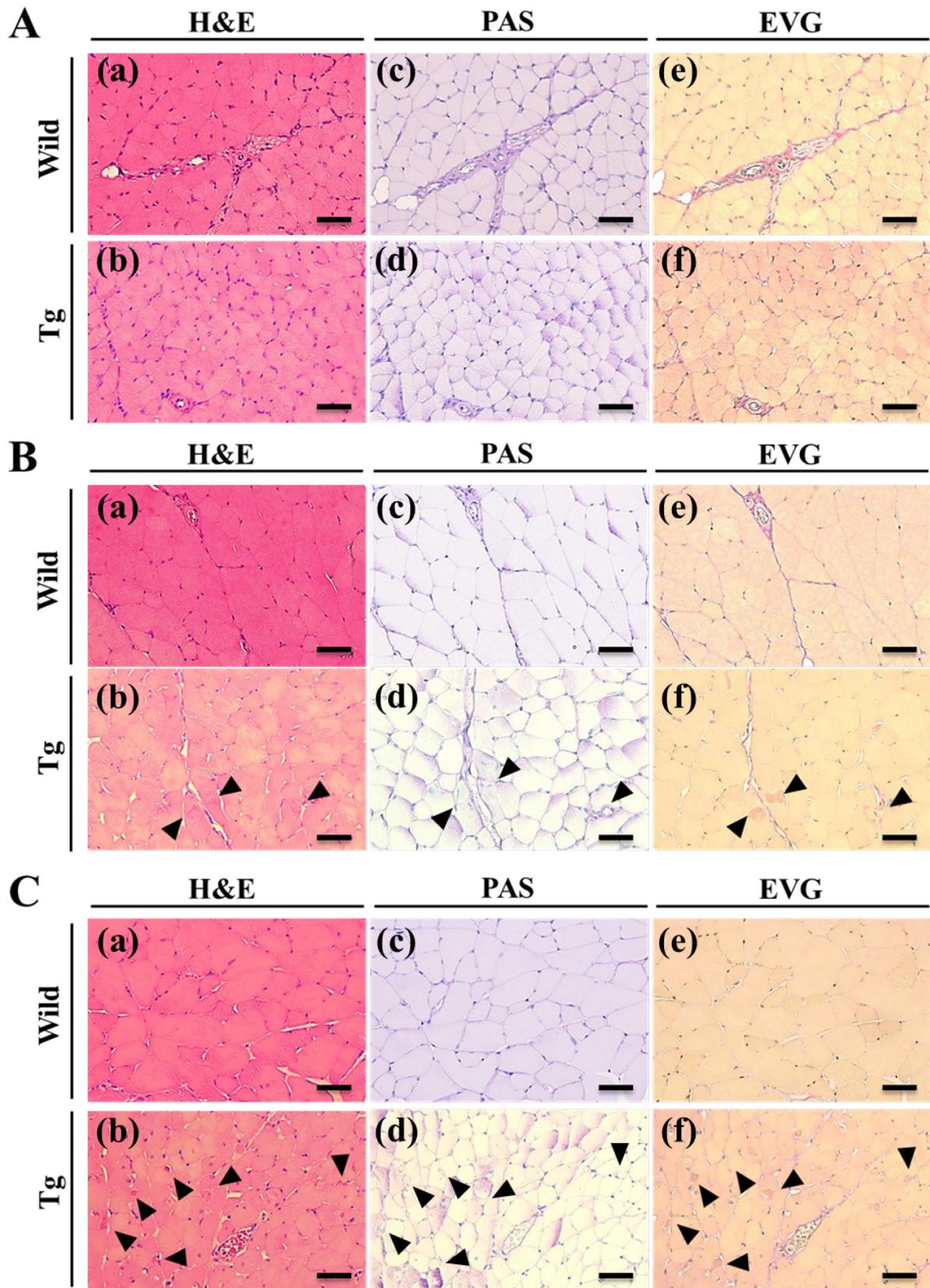


図5 GDE5Tg マウスと同腹の野生型の腓腹筋横断面における、個々の筋繊維面積のヒストグラムおよびその経時変化

腓腹筋横断面の H&E 染色標本における個々の筋繊維面積を層別化した。Wild は野生型マウス, Tg は GDE5Tg マウスを表す。A : 4 週齢, B : 8 週齢, C : 1 年齢



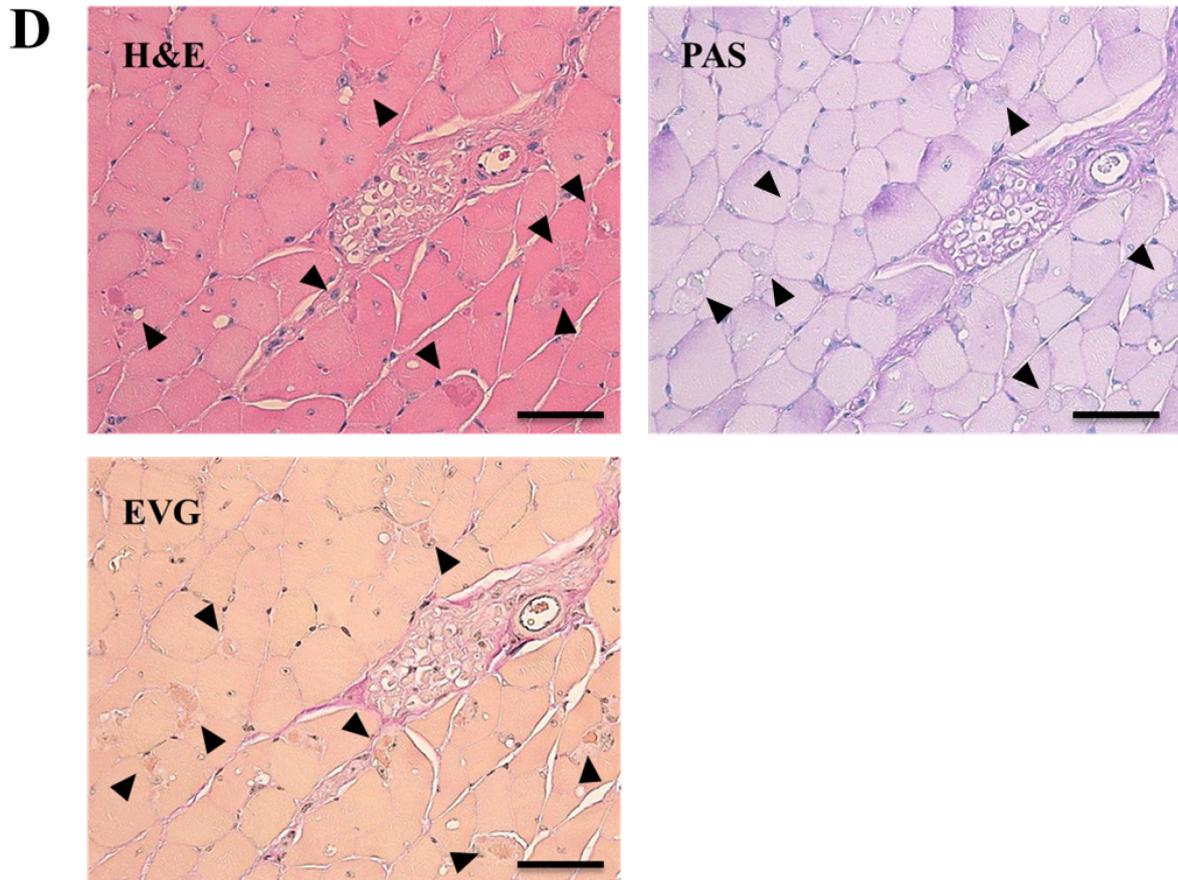


図6 GDE5Tg マウスと同腹の野生型における腓腹筋横断面の H&E 染色, PAS 染色および EVG 染色像の経時変化

4 週齢, 8 週齢および 1 年齢の GDE5Tg マウス (Tg) および同腹の野生型マウス (Wild) の腓腹筋横断面について, H&E 染色 (H&E), 糖質 (濃紫色) を特異的に染める PAS 染色 (PAS), および膠原繊維 (赤紫色)・弾性繊維 (黒色) と細胞質 (橙~薄赤色) を特異的に染め分けるエラスチカワンギーソン染色 (EVG) を施した標本の代表的な病理組織像を示した。H&E 染色でエオシンによく染まった箇所, および PAS 染色と EVG 染色においてその部位に相当する箇所について, 黒矢印で示した。スケールバー: 100 μ m, A: 4 週齢, B: 8 週齢, C: 1 年齢, D: 1 年齢 GDE5Tg マウスの強拡大, (a): Wild の H&E 染色像, (b): Tg の H&E 染色像, (c): Wild の PAS 染色像, (d): Tg の PAS 染色像, (e): Wild の EVG 染色像, (f): Tg の EVG 染色像

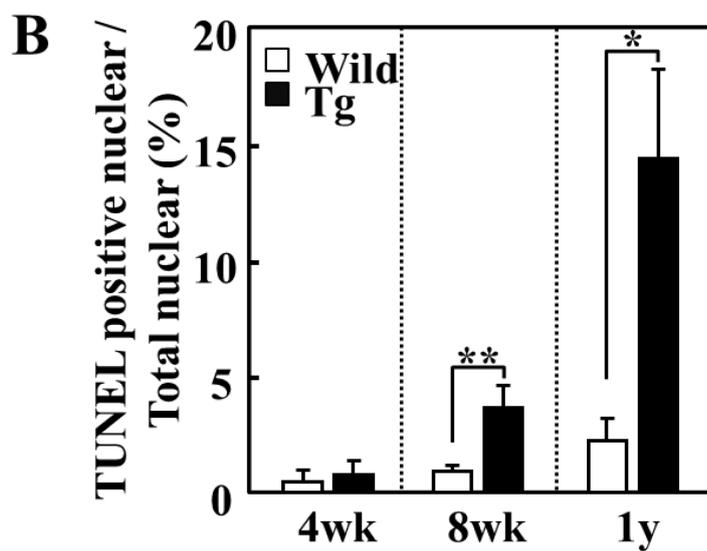
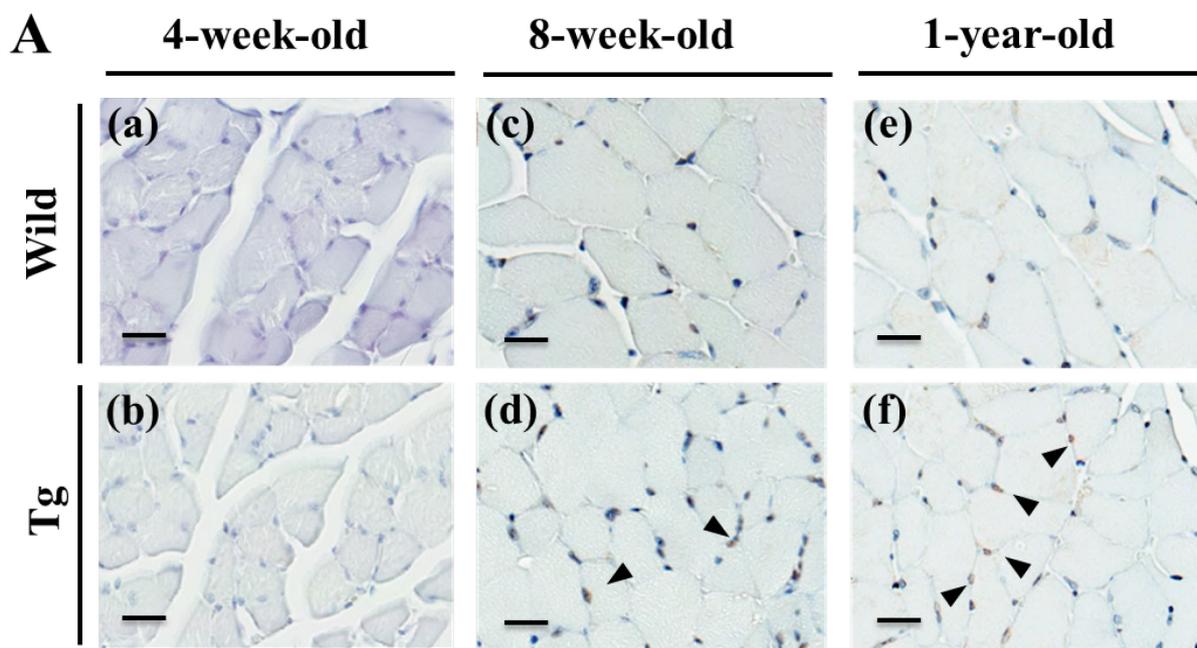


図7 GDE5Tg マウスと同腹の野生型の腓腹筋横断面における TUNEL 染色像および TUNEL 陽性核出現率の経時変化

A : 4 週齢, 8 週齢および 1 年齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の腓腹筋横断面における TUNEL 染色の代表的な組織像を示した。(a) : 4wk Wild の TUNEL 染色像, (b) : 4wk Tg の TUNEL 染色像, (c) : 8wk Wild の TUNEL 染色像, (d) : 8wk Tg の TUNEL 染色像, (e) : 1Y Wild の TUNEL 染色像, (f) : 1Y Tg の TUNEL 染色像, 矢印: TUNEL 陽性核 (茶色), 青~青紫色: TUNEL 陰性核, B: 筋細胞核 200 個あたりの TUNEL 陽性核の経時変化を示した。データは平均値±標準誤差で示した。スケールバー: 20 μ m, 4wk : 4 週齢, 8wk : 8 週齢, 1Y : 1 年齢, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対応のない t 検定)

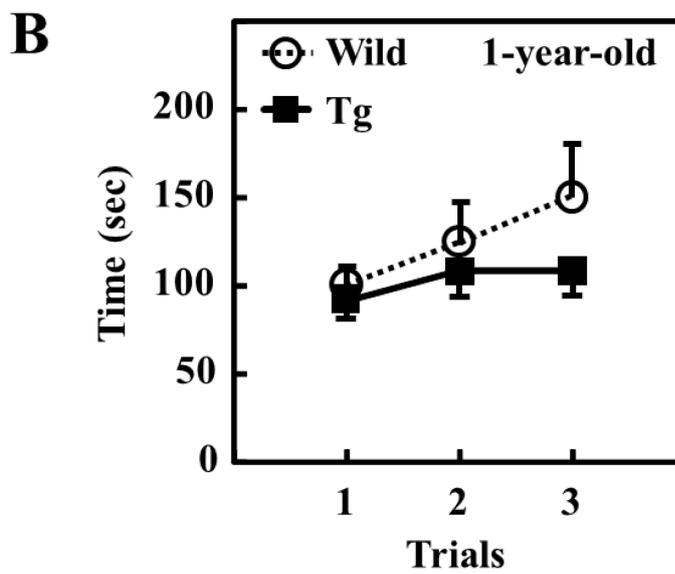
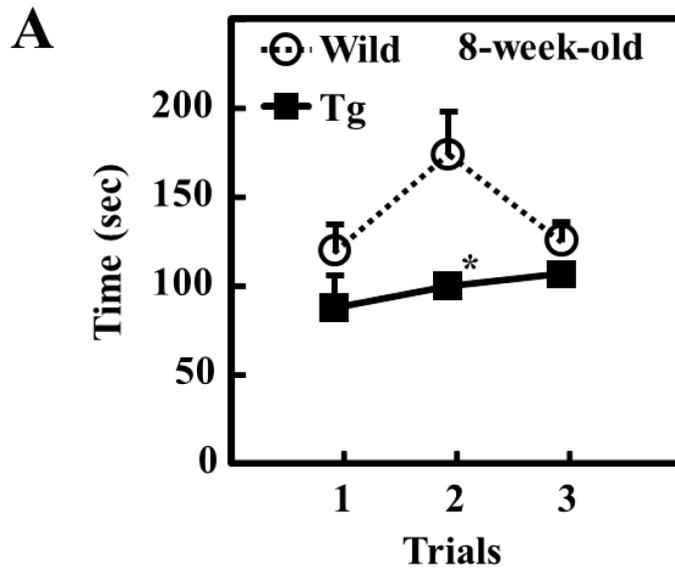


図8 8週齢および1年齢のGDE5Tgマウスと同腹の野生型における回転ロッドからの落下時間

8週齢および1年齢のGDE5Tgマウス(Tg)および同腹の野生型マウス(Wild)を用いて、ロタロッドテストを行った。試行回数は1回/1日の頻度で3回実施した。データは平均値±標準誤差で示した。A:8週齢, B:1年齢, *:p<0.05(対応のないt検定)

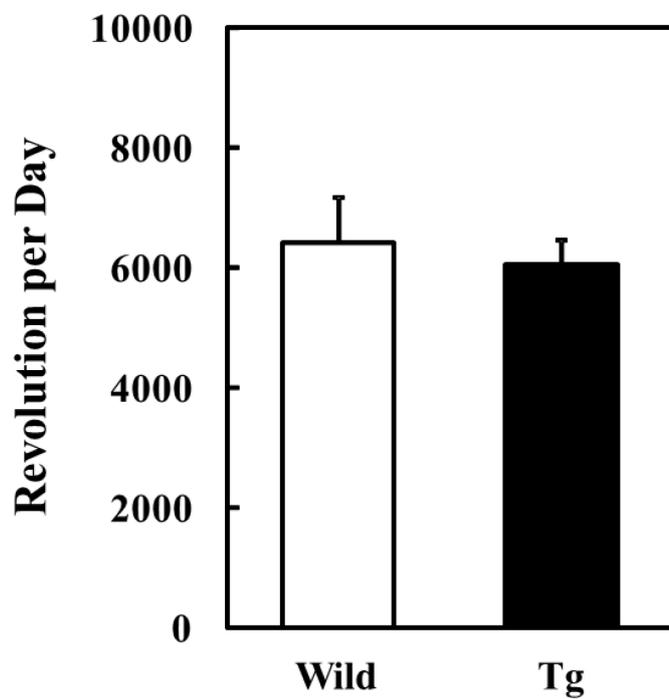


図9 1年齢のGDE5Tgマウスと同腹の野生型における自走式回転かごの1日当たりの回転数

1年齢のGDE5Tgマウス(Tg)および同腹の野生型マウス(Wild)を用いて、飼育ケージに取り付けた自走式回転かごの回転数を3日間計測し、1日あたりの回転数を示した。データは平均値±標準誤差で示した。

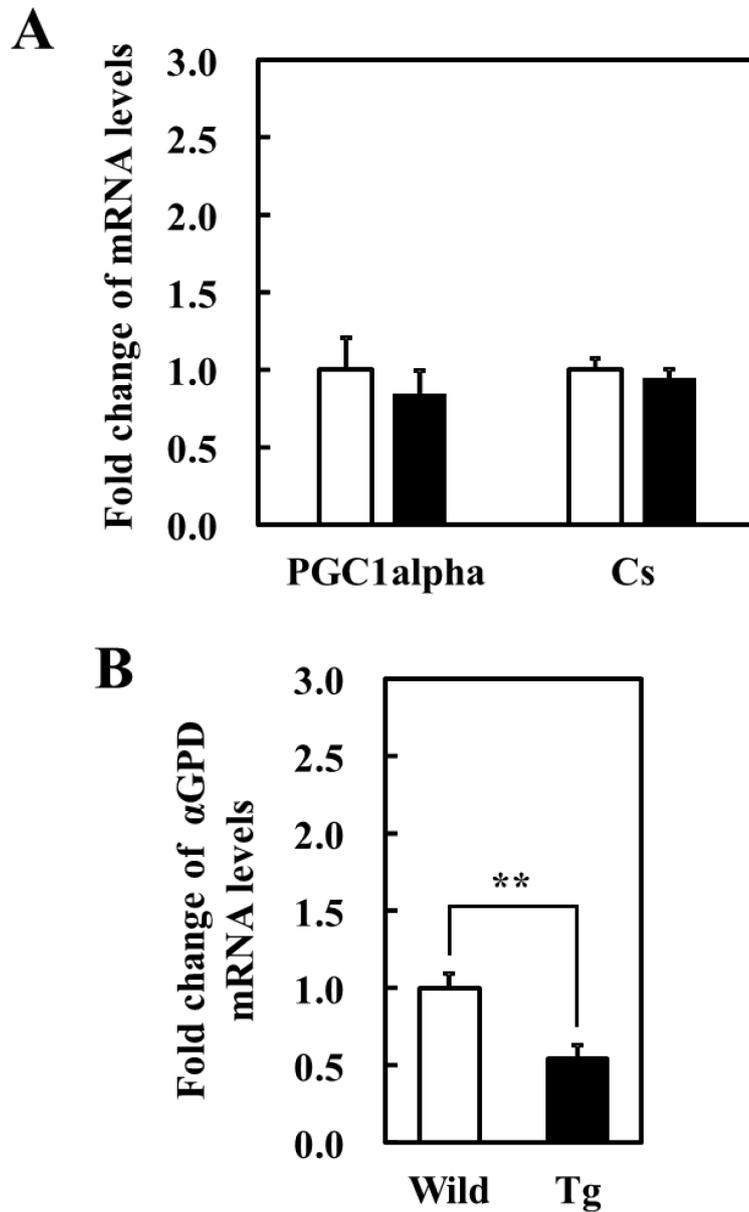


図10 1年齢のGDE5Tgマウスと同腹の野生型のミトコンドリア量およびミトコンドリア機能,あるいは解糖系機能に関連する mRNA の発現変動

1年齢のGDE5Tgマウス(Tg)および同腹の野生型マウス(Wild)の大腿筋におけるミトコンドリア量と機能(A),および解糖系機能(B)に関連するmRNAの定量PCR結果を示した。データは平均値±標準誤差で示した。PGC1alpha: peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator- α , Cs: citrate synthase, α GPD: α -glycerophosphate dehydrogenase, **: $p < 0.01$ (対応のないt検定)

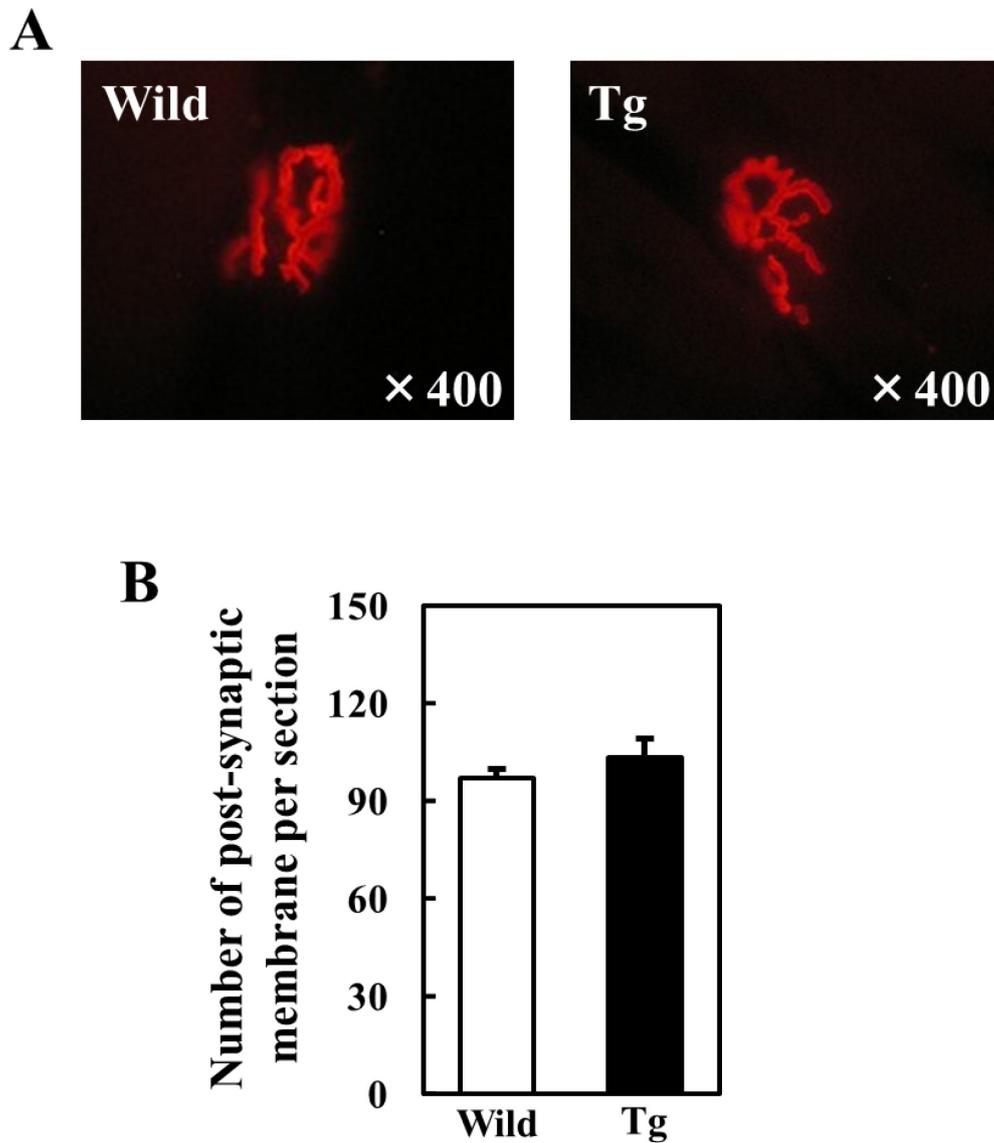


図 11 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型における後シナプス膜形態と数

A : 1 年齢の GDE5Tg マウス (Tg) および同腹の野生型マウス (Wild) の腓腹筋縦断面における α -bungarotoxin による後シナプス膜の蛍光染色の代表的な組織像を示した。B : 一断面あたりの NMJ 数を示した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した。

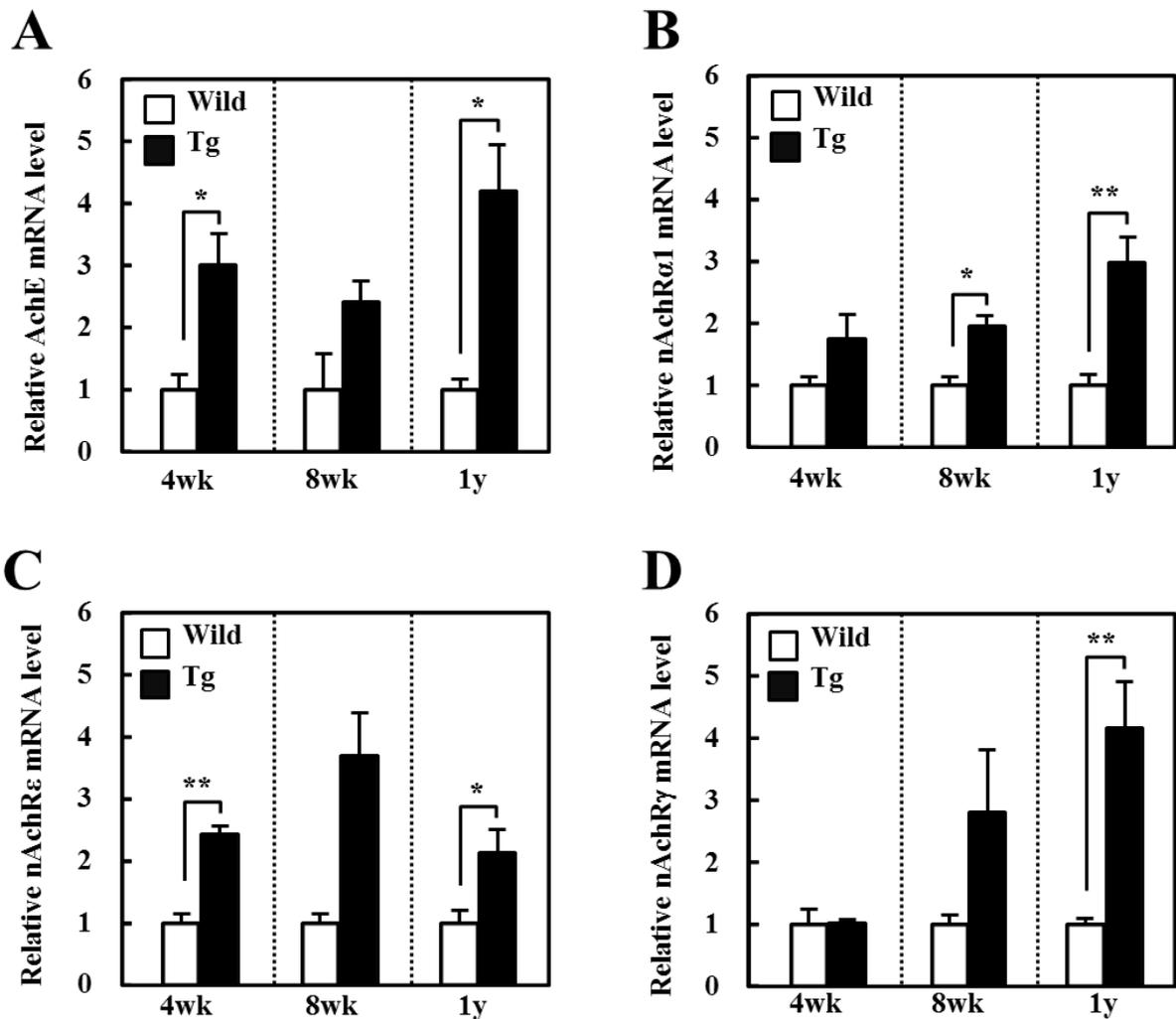


図12 GDE5Tg マウスと同腹の野生型における nAchR 関連 mRNA 発現の経時変化

4週齢 (4wk) , 8週齢 (8wk) および1年 (1Y) の GDE5Tg マウス (Tg) および同腹の野生型マウス (Wild) の大腿筋における nAchR 関連 mRNA の定量 PCR 結果を示した。データは平均値±標準誤差で示した。A : アセチルコリンエステラーゼ, B : nAchR α 1 サブユニット, C : nAchR ϵ サブユニット, D : nAchR γ サブユニット, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対応のない t 検定)

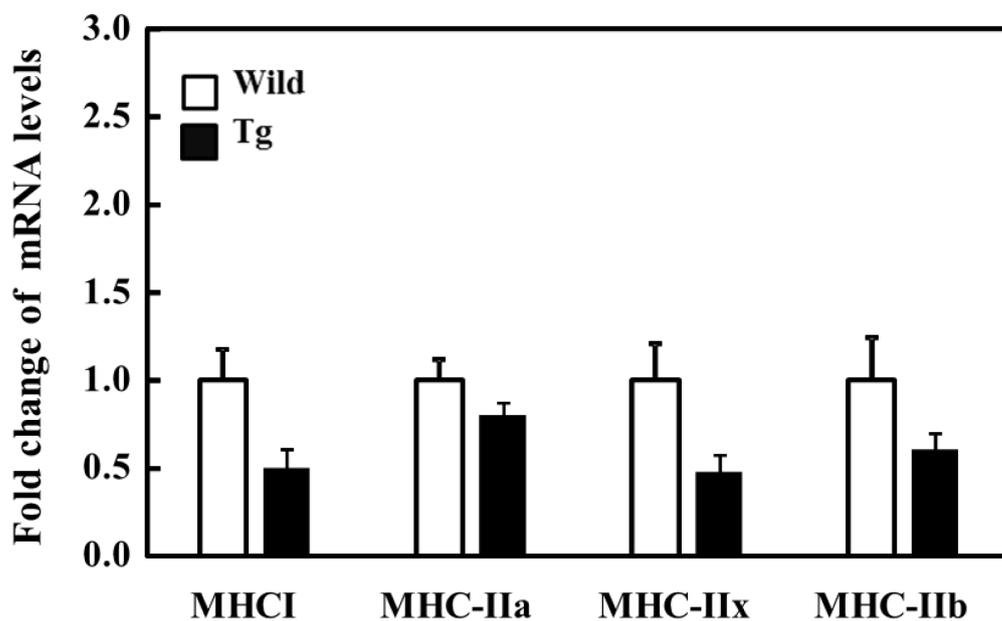


図 13 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型におけるミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の発現変動

1 年齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の大腿筋におけるミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MHC) アイソフォームの mRNA の定量 PCR 結果を示した。データは平均値±標準誤差で示した。MHC-I: Myosin heavy chain 1, MHC-IIa: Myosin heavy chain 2A, MHC-IIx: Myosin heavy chain 2X, MHC-IIb: Myosin heavy chain 2B

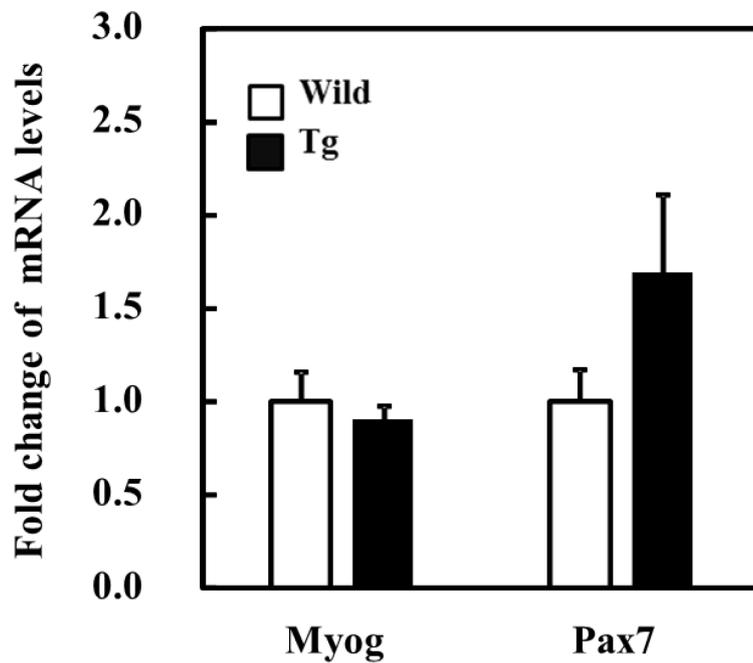


図 14 1 年齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型の筋分化に関連する mRNA の発現変動

1 年齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の大腿筋における筋分化に関連する mRNA の定量 PCR 結果を示した。データは平均値±標準誤差で示した。Myog: myogenin, Pax7 : PAX7

第四節 考察

本研究において、GDE5dC471 を骨格筋に過剰発現させた (GDE5Tg) マウスの後肢骨格筋のうち、解糖型酵素が豊富な Type2 筋繊維がその多くを占める、大腿筋と腓腹筋重量の低下が少なくとも 8 週齢までに引き起こされることを見出した。この骨格筋病態は 1 年齢まで継続したことから、GDE5Tg による骨格筋萎縮は不可逆的に引き続くが、致命的な病態ではないことが明らかになった。一方、後肢骨格筋のうち、酸化型の Type1 筋繊維を豊富に含むヒラメ筋重量は 4 週齢から 1 年齢まで野生型と差異は認められなかった。

骨格筋萎縮に至る原因が異なることで優先的に萎縮する筋繊維タイプは異なる。例えば、不動や微小重力暴露などによる筋の不使用、あるいは運動神経から骨格筋への神経伝達 (神経支配) の低下・断絶 (脱神経支配) によるヒトの廃用性筋萎縮を模倣したモデルの場合、Type1 筋繊維が優位に萎縮する [27-30]。また遺伝子の変異による筋萎縮であるデュシェンヌ型筋ジストロフィ (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) のモデル動物として広く利用されている mdx マウスの場合、萎縮する筋繊維タイプの選択性はなく Type1 と Type2 の筋繊維が萎縮する [13-14]。GDE5Tg マウスが示した、不可逆的な Type2 筋繊維の優先的萎縮はヒト・げっ歯類共に、加齢に伴う自然発生的な骨格筋萎縮 (sarcopenia) に特異な変化であることが知られている [22]。Type2 筋繊維の優先的萎縮は、sarcopenia の他にも emetine [67] , statin [68] などの化学物質投与で引き起こされるが、一過性の病態であり、また、がん性悪液質によっても誘導されるが [9] , 著しい体重減少による衰弱死がもたらされる点は、GDE5Tg マウスの病態とは異なる。以上より、GDE5Tg マウスの示す萎縮筋繊維の選択性、および不可逆的な進展は sarcopenia に近い形質であると考えられた。

臨床での sarcopenia の診断には、筋萎縮に加えて筋機能の低下が指標とされる [17, 19, 21]。また、運動量の減少による肥満 (sarcopenic obesity) およびインスリン抵抗性のリスクも指摘されている [69]。本研究において、GDE5Tg マウスの若齢期および中年期の筋重量の低下に加え、回転ロッド上での保持時間が同腹の野生型に比べて明らかに短いことを見出した。一方、自発運動機能の指標となる回転かごの回転数については GDE5Tg マウスと野生型との間に明確な差はなかった。回転ロッド上での身体保持は単純な筋力とは異なり、バランスを取りながら姿勢を維持する必要があることから複雑な全身の運動機能 (協調運動機能) が反映される。そのため、筋萎縮を示した GDE5Tg マウスは総合的な運動機能の低下が起きていた可能性が高いと考えられ

たが、自発運動機能は Type1 筋繊維の影響を強く受けると考えられており [70] , ヒラメ筋重量に変化がなかったことに関連しているのかもしれない。以上のような全身の運動機能の低下に加え、筋萎縮時の GDE5Tg マウスは肥満を示唆する白色脂肪組織重量の増加および血中トリグリセライドの増加を示し、また解糖系の機能低下を示唆する α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) mRNA の著明な発現減少を示した。 α -GPD の発現低下は高齢者の外側広筋において報告があるほか [71] , 老齢ラットの腓腹筋でも報告があり [72] , ヒトとげっ歯類に共通した骨格筋の加齢性変化に関連する生理現象であると捉えることができる。したがって、GDE5Tg マウスの肥満傾向をもたらした要因として、全身的な運動機能の低下に伴うエネルギー消費量の低下だけでなく、解糖系酵素を豊富に含む Type2 筋繊維が選択的に萎縮することに伴って、糖質を利用したエネルギー代謝が低下した可能性が考えられた。

次に、病理組織学的観点から GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態の特徴を論じる。除神経モデルや神経変性を原因とした骨格筋萎縮（神経原性筋萎縮，*neuropathy*）の場合、神経支配の減弱・消失した部位の細胞死により、神経に沿った部位が優先的に萎縮した結果、筋横断面上の個々の筋繊維の大きさに大小が生じるようになるため（大小不同の筋萎縮） [31] , 筋繊維の横断面積のヒストグラムは二分すると推察される。本研究では、筋萎縮が著明な時期における GDE5Tg マウスの腓腹筋横断面積のヒストグラムが野生型と比べて全体的に左側へ分布がシフトしていた。このことから、GDE5Tg マウスにおける筋萎縮では個々の筋繊維が比較的一様に縮小し、それが長期間に渡って引き続くものと考えられた。さらに、若齢期の GDE5Tg マウスにおいて、通常は筋細胞の周囲に存在する核が筋横断面の中心に出現し（中心核の出現）, それが中年期には劇的に増加することを見出した。中心核の出現は、*neuropathy* と、筋ジストロフィなどの筋自体の異常が原因となる萎縮（*myopathy*）を区別するため、50 年以上前から臨床において指標とされている [73] 。中心核は筋の不使用方法からの回復過程、加齢、あるいは激しい運動といった機械的な筋傷害の後など、様々な状況で観察された報告があり、未熟な筋細胞の分化や再生過程に関連していると考えられている [74, 75] 。従って、GDE5Tg マウスの筋病態は *neuropathy* ではなく、骨格筋の障害が主因となる *myopathy* の可能性が極めて高いと考えられた。

本研究において、筋萎縮が不可逆的に続いた 1 年齢の GDE5Tg マウスでさえも壊死とその修復した病理像はなかったが、大変興味深いことに、エオシンによく染まる何らかの物質が筋細胞質内に貯留することが明らかとなった。この貯留物質の同定には至らなかったが、脂質、糖質、細胞同士を繋ぐ結合組織（膠原繊維および弾性繊維）, あるいはミネラル分とは異なるため、タンパク質である可能性は高いと考えられた。また、程度は軽いが若齢でも認められたことから、

経時的に集積していくものと考えられた。以上のことより、GDE5dc471 の過剰発現による myopathy の進展に、細胞質内の何らかのタンパク質様物質の蓄積が関連することが示唆された。

ヒトにおける加齢性の骨格筋萎縮において、筋タンパク質の分解にはユビキチン・プロテアソーム系の亢進が強く関与し、また、筋繊維数の減少には apoptosis による筋繊維の脱落が関与することが知られている [7, 76-79]。apoptosis の亢進は、加齢性変化に限らず筋の不使用モデル動物でも指摘されている。すなわち、Allen らはラット後肢懸垂モデルにおいて、Smith らはウサギのギプス固定モデルのヒラメ筋において、断片化した DNA と筋細胞の核の脱落を報告している [80]。さらに、Always らの報告によると BDNF ラット除神経モデルのヒラメ筋と腓腹筋において、デスレセプターを介した apoptosis 経路に関与する caspase-8, その下流の caspase-3, -6 および 7 が活性化することを明らかにしている [81]。本研究において、GDE5Tg マウスの筋萎縮に伴って、断片化した核が多く認められるようになり、経時的に増加することを見出した。この現象は前述の中心核の出現時期とも合致していたことから、GDE5Tg マウスは時間依存的に apoptosis と代償的な筋細胞の再生が活発になる可能性が示唆された。なお、apoptosis の経路はミトコンドリアを介する経路と上述のデスレセプターを介する経路とに大きく分類することができる。ミトコンドリア機能異常は apoptosis を誘導する reactive oxygen species (ROS) の産生の上昇と関連し、peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC-1 α) は ROS 除去に関与する manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase1 (GPx1) などの酵素群の発現を調節することが知られている。本研究では GDE5Tg マウスの骨格筋萎縮にどちらの経路が関与しているかを明確にすることはできなかったが、ミトコンドリア含量および機能を反映する citrate synthase (Cs) および PGC-1 α mRNA 発現量に GDE5Tg マウスと野生型との間で明確な差異はなく、ミトコンドリアの異常は示唆されなかった。したがって、GDE5Tg マウスの骨格筋病態にはデスレセプターを介した apoptosis が関与している可能性が考えられた。

骨格筋細胞が再生する際、通常は静止期にある筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が活性化した後筋芽細胞へと分化し、さらに融合することで多核の筋管細胞になる [74, 82]。本研究では、分化初期に関わる PAX7 および最終分化に必須である myogenin の mRNA の発現変動を定量したが、いずれも GDE5Tg マウスと野生型との間に明らかな差異は認められなかった。序論で述べたように、これまで *in vitro* で GDE5 の非酵素的な働きによる myogenin mRNA の発現量の低下と筋管形成の抑制が報告されているが [56, 58], *in vivo* と *in vitro* の結果は合致しないことが明らかになった。したがって、GDE5Tg マウスの筋萎縮において、筋分化の低下が関与する可能性は低いことが示唆された。

最後に、GDE5Tg マウスにおける筋萎縮と神経伝達との関係性について論じる。加齢に伴って、運動神経からの収縮刺激に重要な役割をもつ neuro muscular junction (NMJ) の形態変化が多くの実験から明らかになっている [13, 15-18]。NMJ は運動神経側の前シナプスと骨格筋側の後シナプスから構成されており、後シナプス膜上には $(\alpha 1) 2\beta\delta\gamma$ (胎児期) あるいは $(\alpha 1) 2\beta\delta\epsilon$ (成熟期) サブユニットの 5 量体からなる Ach の受容体である nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) が局在する [24-26]。神経伝達物質の acetylcholine (Ach) を放出する前シナプスが変性すると、後シナプス膜は密度が低下し、伸展・断片化といった形態変化を起こす [23]。Suzuki らは、2 ヶ月～30 ヶ月齢のラット横隔膜の病理像の観察によって、加齢による NMJ の形態変化を報告しているが、必ずしも骨格筋萎縮を伴わないことを報告している [84]。その他、これまでの数多くの研究結果によって、加齢性の骨格筋萎縮に先行して NMJ が変性し、神経伝達の低下が進行するという考え方が広く認知されている [21, 23]。しかしながら、その一方で Li らによる老齢マウスの胸鎖乳突筋を用いた実験によって、骨格筋の加齢性変化には NMJ の変性が必ずしも必要ではないという報告があり [85]、神経伝達の低下と NMJ の形態変化の因果関係が明確ではない現状から [5]、未だ議論がなされているのも事実である。本研究において、GDE5Tg マウスの大腿筋縦断面における後シナプス膜の形態、および単位面積あたりの数について、1 年齢であっても野生型との間に明確な差異を認めず、本モデルの骨格筋萎縮において NMJ の形態は変化しないことが明らかとなった。一方、NMJ 関連 mRNA の発現上昇は、GDE5Tg マウスの筋萎縮発症前および発症後に認められた。さらに、これらは一過性的な変化ではなく、中年期まで継続的に発現上昇が認められた。GDE5Tg マウスの幼若期の骨格筋において NMJ の形態変化は認められないと考えられるものの、NMJ 関連 mRNA の発現上昇が神経伝達の低下によって引き起こされていた可能性は否定できない。序論に述べたように、青年期の骨格筋において強く発現している GDE5 は、加齢や除神経処置によって発現低下するため [59]、神経伝達低下に寄与している可能性が高く、過剰発現させた GDE5dc471 がドミナントネガティブに作用したのかもしれない。いずれにしても、今後、GDE5Tg マウス骨格筋を用いた電気生理的な評価によって、神経伝達に対する影響を明らかにする必要がある。

序論に述べたように、骨格筋の脱神経支配後に神経伝達が再構築 (再神経支配) される際、元々 Type2 筋繊維であったものが Type1 筋繊維になるといった筋繊維タイプの遷移現象が引き起こされ、結果的に近接する筋繊維同士が同じ筋繊維タイプごとに集合することが知られている [21]。これまで、12 週齢の GDE5Tg マウスの腓腹筋を用いたノーザンブロット法による解析によって、Type1 筋繊維型のトロポニン mRNA が増加した一方で Type2 筋繊維型は減少したため

[59], ヒトの加齢で報告されているような筋繊維タイプの遷移が考えられてきた。本研究において中年期 GDE5Tg マウスの腓腹筋を用いて骨格筋タンパク質において最も多くを占める MHC の mRNA を定量 PCR によって解析した結果, 予想に反して, MHC-I, MHC-IIa, MHC-IIb および MHC-IIx の全てが減少傾向を示した。Edström らは 30 ヶ月齢の雌 SD ラットのヒラメ筋において, 胎児型 MHCe mRNA が発現することを報告しており [86], Rowan らは 36 か月齢の F344 と Brown Norway のハイブリッドラットの腓腹筋を用いて MHC の免疫染色を行ったところ, MHC I および II が共に発現減少する一方で, 両方の抗体に染まる筋繊維が著しく増加することを報告している [87]。これらの報告は, 老齢のげっ歯類において, 成熟期の MHC アイソフォームが特殊な MHC (胎児型 MHCe) に置き換わることを示唆しており, 本研究で見出した MHC I および II の発現減少においても, げっ歯類の骨格筋の加齢性変化に特有の表現型である可能性が示唆された。今後, 筋繊維タイプの変化を明らかにするために, 筋の病理組織標本上で詳細な評価をする必要があるだろう。

以上のように, GDE5Tg マウスは sarcopenia に共通した病理変化と生理的な変化を若齢より自然発症で示すだけでなく, その後の骨格筋萎縮が不可逆的で緩やかである点においても sarcopenia との数多くの類似性を示すことが明らかになった。しかし, 加齢ではミトコンドリア機能の低下が報告されている一方, GDE5Tg マウスは正常であるなど, 老齢動物との相違点も認められた。また, GDE5Tg マウスの筋萎縮には, これまで sarcopenia において報告のない, 異常タンパク質の蓄積を伴うことから, sarcopenia の病態進展を考える上で新しい切り口を提供できる有用性が見出された。さらに, GDE5Tg マウスは sarcopenia の進展において強く支持されている, 神経伝達の低下を誘導する NMJ の形態変化を示さないにも関わらず, nAChR が活性化した可能性を示しており, 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呈示できる可能性も示唆された。

第二章 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの筋萎縮発症要因の探索

第一節 緒言

第一章において、GDE5Tg マウスの示す Type2 筋繊維の優先的な萎縮の進展に伴って、周囲の筋細胞質に比べてエオシンに濃く染まるタンパク質様物質が筋細胞質内に沈着する現象が認められた。また、筋萎縮が長期的に引き続いた 1 年齢においても NMJ の形態変化が認められなかったことから、GDE5Tg マウスの筋萎縮は骨格筋細胞質自体の異常による可能性が強く示唆された。先行研究によって、筋萎縮を示す 12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋において、炎症性サイトカインの IL- β 、およびストレス応答に関連する GST ファミリーの主要分子種である Gsta1 の遺伝子発現が著明に上昇し、また 20 週齢の大腿筋においてグルタチオン量が増加したことを報告している [56, 59]。これらのことから GDE5Tg マウスの筋萎縮の発症においても異常タンパク質の蓄積を含む細胞ストレスが関与するという仮説をたてた。

本章では、出生直後の 2 週齢および幼若期の 4 週齢 GDE5Tg マウスの後肢筋を用いて病態発症要因の探索を行った。はじめに、熱ショック、炎症や低酸素といったストレスに幅広く応答し [88-90]、また、分子シャペロンとして異常タンパク質のリフォールディングに関わることが知られる heat shock protein (HSP) 70 [91] のタンパク質発現をウエスタンブロッティング法により解析した。次いで、GDE5dc471 の過剰発現と細胞ストレスとの関係性を明らかにするため、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に GDE5dc471 を過剰発現させ、HSP70 のタンパク質発現を免疫蛍光染色法により解析した。さらに、2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現変動を網羅的に解析し、12 週齢の同マウスの遺伝子発現変動と比較解析を行った。

第二節 材料と方法

1. 大腿筋におけるウエスタンブロッティング法による HSP70 および GDE5 タンパク質の検出

1.1. 大腿筋のタンパク質の調製

第一章, 第二節 3. で得られた 4 週齢の GDE5^{Tg} マウスと同腹の Wild マウスの大腿筋および第一章, 第二節 1. に従って発生させた 2 週齢のマウスから同様に得た大腿筋を以下の実験に供した。摘出した大腿筋をタンパク質分解酵素阻害剤の 0.25 M phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) を 80 μ L, ロイペプチンおよびアプロニチンをそれぞれ 20 μ L 含む Tris-NaCl-EDTA (TNE) -0.5% NP40 バッファー 2 mL とともに, ポリトロンホモジナイザーにより破碎した。ホモジナイズ溶液を 1 ml のエッペンドルフチューブに移した後, 12,000 rpm (13,000 G), 4°C の条件下で 10 分間遠心し, その上清をサンプルとして用いた。

1.2. タンパク質濃度の定量

1.1. で得たサンプルに含まれるタンパク質の定量には, BioRad Detergent compatible (DC) Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いた。予め凍結させておいた 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 および 4.0 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を氷上にて融解させ, キットの Reagent A を 500 μ L と Reagent S 10 μ L で Reagent A' を 510 μ L 調製したのち, 25 μ L ずつ新しいチューブに分注した。さらにサンプルおよび BSA 溶液を 5 μ L ずつ分注して混合した後, Reagent B を 200 μ L ずつ加え, ピペッティングにより十分混合した。これを室温で 15 分間インキュベートした後, 750 nm の吸収波長 (A_{750}) の吸光度を測定した。吸光度計には V-530 UV/VIS Spectrophotometer (JASCO) を用いた。BSA の A_{750} の値を基に検量線を作成し, 各サンプルのタンパク質濃度を算出した。

1.3. sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

下記の組成の分離ゲルおよび濃縮ゲルを調整し, sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用のゲルとした。1.2. で算出したサンプルのタンパク質濃度より, それぞれのサンプルタンパク質を同量ずつ新しいチューブに分注し, 蒸留水で 50 μ L にメスアップした。これにサンプルバッファーを 25 μ L 加えてピペッティングした後, 95°C で

2 分間加熱した。熱変性させたサンプルをスピンドウン後、ピペッティングした後に、ゲル上に 15 μL ずつアプライした。なお、本実験のベースラインの検出は coomassie brilliant blue (CBB) 染色により行ったため、同一のゲルで CBB 染色用のサンプルもアプライした。電気泳動は 24 mA の定電流で 90 分間行い、電気泳動には蒸留水に Tris を 2.66% (w/v), Glycine を 13% (w/v), および SDS を 0.45% (w/v) 含む SDS-PAGE 泳動バッファーを用いた。

<分離ゲル>

30% poly acrylamide	6.6 mL
1M Tris-HCl (pH 8.8)	6.67 mL
10% SDS	200 μL
10 \times ammonium peroxodisulphate (APS)	200 μL
tetramethylethylenediamine (TEMED)	40 μL
超純水	6.3 mL

<濃縮ゲル>

30% poly acrylamide	625 μL
0.5M Tris.HCl (pH 6.8)	1.25 mL
10%SDS	50 μL
10 \times APS	50 μL
TEMED	5 μL
超純水	3 mL

1.4. ブロッキング

電気泳動終了後、直ちにゲル板を泳動槽から取り出し、分離ゲルの大きさに合わせてメンブレンとろ紙を用意し、メンブレンに転写するゲルと CBB 染色に使用するゲルとに分割した。Immobilon-P トランスファーメンブレン (MILLIPORE) は 100%メタノールに浸した後、すみやかにメタノールを 5% (w/v), Tris を 1.21% (w/v), Glycine を 1.44% (w/v) 含むブロッキングバッファーに浸して使用した。ろ紙も同様にブロッキングバッファーに浸した。メンブレンとゲルを密着させ、その両側をろ紙ではさみ、ブロッキング装置にセットした。メンブレンの面積 (5.5 cm \times 8.5 cm) \times 2 mA の定電流で 120 分間転写を行った。

1.5. ブロッキング

ブロッキング終了後、4% (w/v) スキムミルクを含む PBS (-) にメンブレンを浸し、室温で2時間、振とうさせながらブロッキングを行った。

1.6. HSP70 および GDE5 シグナルの検出

ブロッキング終了後、Can Get Signal® Solution I (TOYOBO) にて 1,000 倍希釈した抗 HSP70 マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) あるいは同様に 1,000 倍希釈した抗 GDE5 ウサギポリクローナル抗体 (当研究室にて精製) とメンブレンをハイブリパックに入れ、気泡を抜いた後ポリシーラーで密封した。これらを 4°C で一晩、一次抗体反応を行った。翌日、各メンブレンをハイブリパックより取り出し、Tween20 を 0.05 % 含む PBS (-) 溶液 (PBS-T) で 5 分間、振とうさせながら 3 回洗浄した。その後、HSP70 抗体を反応させたメンブレンには Can Get Signal® Solution II (TOYOBO) にて 1,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Sigma) を、また、GDE5 のメンブレンには同様に希釈した抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Bioscience) をメンブレンとともにハイブリパックに入れ、気泡を抜いた後ポリシーラーで密封した。これを室温で 30 分間振とうさせ、二次抗体反応を行った。抗体反応終了後、各メンブレンをハイブリパックより取り出し、PBS-T で 5 分間、振とうさせながら 3 回洗浄した。目的タンパク質の検出には ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare Japan, 東京) を用いた。Detection reagent 1 および 2 を 1:1 の割合で混合し、メンブレンと共にハイブリパックに入れ、気泡を抜いた後、ポリシーラーで密封した。その後、暗室で化学発光シグナルを X 線フィルムによって検出した。

1.7. CBB 染色

1.4. で分離したゲルについて、超純水にメタノールを 45% (v/v)、酢酸を 10% (v/v)、CBB を 0.25% (w/v) 含む CBB 染色液に 50 分間浸した後、超純水にメタノールを 5% (v/v)、酢酸を 7.5% (v/v) 含む CBB 脱色液①に一晩浸漬して脱色した。その後、ゲル上のバンド以外のバックが脱色されるまで超純水にメタノールを 40% (v/v)、酢酸を 10% (v/v) 含む CBB 脱色液②に浸した。CBB 染色・脱色の後にゲルの写真撮影を行った。

2. GDE5dc471 遺伝子導入マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞株における HSP70 および GDE5 の検出

GDE5dc471 遺伝子を一過性に強制発現させたマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞株における HSP70 および GDE5 タンパク質は免疫蛍光顕微鏡検査によって検出した。

2.1. C2C12 細胞の培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用いて 5% CO₂, 37°C の条件で培養した。

2.2. C2C12 細胞へのトランスフェクション

C2C12 細胞への GDE5dc471 のトランスフェクションは GeneJuice® Transfection Reagent (Millipore) を用いて行った。トランスフェクション翌日に 70~80% confluent に達するように、細胞を 5.0×10^4 cells/4well plate で播種した。以下の操作に使用する GDE5dc471 の発現ベクターは、先行研究にて構築し凍結保存してあるものを用いた。トランスフェクション当日に培地を除去し、opti-MEM (サーモフィッシャー) を 20 µL, GeneJuice を 0.75 µL および凍結融解した pEGFP-C1 および GDE5dc471 発現ベクターを 250 ng 添加し、5% CO₂, 37°C の条件で一晩培養した。

2.3. C2C12 細胞の抗体染色

トランスフェクションの翌日に培地を除去し、各 well に 4%パラホルムアルデヒドを 500 µL ずつ添加し、室温で 15 分静置し、細胞を固定した。次いで PBS (-) で 5 分間、3 回洗浄し、1% Triton X-100 を含む PBS (-) を添加し、室温で 5 分間静置した。洗浄液を除去したのち、ブロックエースを 500 µL 添加し室温で 30 分間反応させ、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、PBS (-) にて 1,000 倍希釈した抗 HSP70 マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および抗 GDE5 ウサギポリクローナル抗体 (当研究室にて精製) を各 well に滴下し 4°C で一晩、一次抗体反応させた。翌日、well を PBS (-) で 5 分間洗浄し、さらに 10 分間ずつ 2 回洗浄した。その後、GDE5 の検出を目的とし、緑色蛍光標識抗体である Goat anti-rabbit FITC (MBL), HSP70 の検出を目的とし、赤色蛍光標識抗体である Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Cy3 Conjugate (GE Healthcare) を一次抗体と同様に希釈

し、また、核の検出を目的とし、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) をそれぞれ各 well に滴下し、4°C で 2 時間、二次抗体反応させた。その後、一次抗体反応後と同様の洗浄操作を行い、PBS (-) と glycerol を 1 対 3 の割合で混合した水溶性封入剤によって封入後、蛍光顕微鏡にて写真撮影した。

3. GDE5Tg マウスの DNA マイクロアレイ解析

解析には *in situ* 合成オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies) を使用した。オリゴ DNA マイクロアレイ法では、生物学的に異なる 2 つの試料を相対的に比較し、遺伝子発現を探索することが可能となる。本研究では、1 枚のスライドガラスの片面に、マウス由来の約 4 万 4 千個の遺伝子がスポットされたアレイが 4 枚載っている 44K×4 のフォーマットを 2 枚使用した。また、蛍光色素の取り込み効率、およびハイブリダイゼーション効率の差異による偽陽性や誤差を軽減するために、使用する蛍光色素を入れ替え、蛍光色素とサンプルの組み合わせを 2 通りにする DyeSwap 法を利用した [93]。

3.1. 2 週齢マウスの RNA 調製

2 週齢の GDE5Tg マウスおよび Wild マウスの大腿筋を摘出し、RNeasy® Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN) の QIAzol 5 ml の入った 15 ml チューブに入れ、ホモジナイズした。total RNA の調製は第一章、第二節 7. に準じて行った。

3.2. DNA マイクロアレイ解析

3.2.1. RNA のラベル化

3.1. で -80°C に保存しておいた RNA 溶液に対してエタノール沈殿を行い、減圧乾燥後、Nucleotide Free Water (以下、NFW) を各 20 μ L 加え、75°C で 5 分間熱変性を行った。ピペッティングをした後、2 週齢 Wild, 2 週齢 GDE5Tg の RNA サンプルを 25 倍希釈し、 A_{260} 値により RNA 濃度を算出した。次いで、700 ng 相当の RNA を溶液に T7 promoter primer を 1 μ L, 10 mM dNTP mix を 0.7 μ L 加え、nuclease free water (NFW) により反応液を 7.7 μ L とした後、65°C で 10 分間熱変性した。これを氷上で 5 分間静置後にスピンドウンし、5×first strand buffer を 2.7 μ L, 0.1 M DTT を 1.3 μ L, RNase OUT™ を 0.3 μ L 加え 37°C で 2 分間インキュベートした。次いで、M-MLV RT を 0.7 μ L 添加して静かにピペッティングした後に 40°C で 2 時間インキュベートし、さらに 65°C で 15 分間反応させることにより、cDNA を合成した。この

間に以下の溶液を調製した。調製量は1サンプルあたりの量を記す。

• NFW	10.2 μ L
• 4 \times Transcription buffer	13.33 μ L
• 0.1 M DTT	4 μ L
• 予め 40°C で融解させておいた 50% PEG	4.27 μ L
• RNase OUT	0.33 μ L
• Inorganic pyrophosphatase	0.4 μ L

これらの混合溶液と上記で合成した cDNA の溶液と混合する直前に T7 RNA polymerase を 0.53 μ L 添加し、さらに Cy3-CTP, あるいは Cy5-CTP を1サンプルあたり 1.6 μ L ずつ添加して遮光の条件下で 40°C, 2時間インキュベートし、RNA 合成およびラベル化反応を行った。

3.2.2. ラベル化 RNA の精製

ラベル化 RNA の精製は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のプロトコールに従った。

3.2.3. ラベル化 RNA の濃度と取り込み率の測定および fragmentation (断片化) 反応

3.2.2. で精製したラベル化 RNA を NFW で 10 倍希釈し、 A_{260} 値および Cy3 は 552 nm, Cy5 は 650 nm の吸収を測定後、RNA 濃度と取り込み効率を算出した。fragmentation には、競合ペアのサンプル (Wild-Cy3 と GDE5Tg-Cy5 および両方の色素を入れ替えた競合サンプル) を、1 サンプル RNA として 825 ng 相当ずつ混合し使用した。ここに 10 \times Blocking Agent を 11 μ L, 25 \times Fragmentation buffer を 2.2 μ L 入れ、NFW により総量 55 μ L とした。

3.2.4. ハイブリダイゼーション, および洗浄

3.2.3. で調整したサンプルを ASTEC PC-700 サーマルサイクラーに入れ、遮光およびラップをして 60°C, 30 分間(時間厳守)で fragmentation 反応を行った。その後、2 \times GEx Hybridization Buffer を 55 μ L ずつ加え、泡立てないように穏やかにピペッティングした。この溶液を Agilent ガスケットスライドにアプライし、以降は Agilent オリゴ DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションプロトコールに従ってマイクロアレイスライドとガスケットスライドを固定した。これをハイブリオーブンに入れ、65°C, speed10 で 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄用に、洗浄バッファ-2 および S&D 溶液を、それぞれ 37°C および 42°C で加温

した。翌日、洗浄バッファー2 とスターラーをガラス容器に入れ、パラフィルムとアルミホイルをかぶせ、37°C で使用直前まで加温した。また以下の器具、溶液をドラフトに搬入した。

- ・ バット 1：洗浄バッファー1 を入れた
- ・ 染色バット 3：洗浄バッファー1 とスターラーを入れた
- ・ スライドラック：染色バット 3 にセット
- ・ アセトニトリル（特級）：スターラーの入った染色バットに入れた
- ・ S&D 溶液：結晶を完全に溶かして使用，スターラーの入った染色バットに入れた
- ・ キムタオル
- ・ タイマー

溶液の準備を行った後、アレイをチャンバーから取り出しドラフトの染色バット 3 のラックへセットし、スターラーで 1 分間攪拌した。この間に洗浄バッファー2 をドラフトに運び、洗浄バッファー1 での洗浄が終了した後、ラックを洗浄バッファー2 のバットに移した。時間厳守で 1 分間攪拌し、ラックについた水分をキムタオル上で軽く落とし、次いでアセトニトリル用のバットに移した。再び 1 分間攪拌し、最後に S&D 溶液の入ったバットに移し 30 秒間攪拌した。スターラーの回転を止めてゆっくりラックを引き上げ、アレイスライドの端の液滴を取り除いた後、遮光ケースに保存し、窒素置換した。

3.2.5. シグナルのスキヤニング，およびデータ解析

Agilent オリゴ DNA マイクロアレイスキヤニングプロトコールに従って、遮光ケースに保存したマイクロアレイスライドのスキヤンは Agilent スキャナーを用いて行い、蛍光強度を測定した。測定値は PValueLogRatio 値が 0.5 未満の遺伝子のみに着目し、GDE5Tg マウスの骨格筋において発現変動する候補遺伝子として、LogRatio 値が 0.2 以上のものを選択した。

4. 2 週齢マウス大腿筋における RT-PCR 法による mRNA 発現解析

4.1. DNA マイクロアレイ解析に使用した RNA を鋳型とした cDNA の合成

3.1. において調製し、-80°C に保存しておいた大腿筋由来の RNA を 12,000 rpm (13,000 G)，4°C の条件下で 15 分間遠心し、上清を除去した後、70% EtOH 1 ml を加え、さらに 12,000 rpm (13,000 G)，4°C の条件下で 5 分間遠心した。上清を完全に除去し、RNA のペレットを減圧滅菌により乾燥させた後、diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を 50 μ L 加え voltex により溶解させた。この RNA 溶液を 85°C で 5 分間熱変性させ、A₂₆₀ の吸光度を測定し、RNA 濃

度を算出した。次いで、1 µg 相当の RNA 溶液を新しいチューブに移し、ここに random primer, および 10 mM dNTP 溶液を各 1 µL 加え、DEPC 水により総量 11 µL とした。全量を穏やかにピペッティングし、65°C で 5 分間処理した後、氷上で 5 分間以上静置した。続いて氷上の溶液に以下の試薬を添加し、総量 20 µL の反応溶液とした。

• 5×first strand buffer	4 µL
• 0.1 M DTT	1 µL
• RNase inhibitor	1 µL
• SuperScript™III RT	1 µL

試薬の添加後は穏やかにピペッティングし、ASTEPC PC-700 サーマルサイクラーを用いて、25°C, 5 分→50°C, 40 分→75°C, 15 分→4°C, ∞のサイクルを 1 サイクル行った。反応後スピンドウンし、蒸留水を各 100 µL 加え、cDNA 溶液とした。

4.2. プライマーの設計

DNA マイクロアレイ解析において発現変動が認められた候補遺伝子について、PCR 増幅による増幅断片が 200~400bp となるようにプライマーを設計した。PCR に使用する場合は、10 ng/µL となるように調製した。なお、プライマー配列については表 5 に示した。

4.3. RT-PCR 法による mRNA 発現解析

PCR 用 8 連チューブ (Applied Biosystems) に以下の試薬を調製した。

• 5×Green Go-Taq™ Reaction Buffer (Promega)	3 µL
• dNTP mix (Takara Bio, または TOYOBO)	1.2 µL
• Go-Taq polymerase (5 U/µl, Promega)	0.075 µL
• sense primer	0.5 µL
• antisense primer	0.5 µL
• cDNA	1 µL

逆転写反応に用いる RNA については、2 週齢の Wild および GDE5Tg マウスの RNA をプールしたもの、また個体別の RNA については 2 個体より調製し、cDNA 合成に用いた。上記の cDNA を含む反応溶液を均一に混合し、GeneAmp PCR System 9700 サーマルサイクラーにセットした。94°C, 2 分の熱変性後、94°C, 30 秒→55°C, 30 秒→72°C, 1 分を 1 サイクルとして 30 または 35 サイクル行い、次いで 72°C, 2 分の伸長反応後は 4°C, ∞の条件下で PCR

反応を行った。PCR 増幅産物をポリアクリルアミドゲルに 5~7 μ L アプライし、100V, あるいは 200V の定電圧で電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液にゲルを 10~15 分間浸し、UV 照射により増幅した DNA 断片の増幅パターンを解析した。

5. マウス腓腹筋における細胞増殖活性の検出

細胞増殖活性は、DNA を構成する thymidine のアナログである、bromodeoxyuridine (BrdU) を免疫組織化学染色法により検出することできる [94]。本研究では幼若期における GDE5Tg マウスの細胞増殖活性を、腓腹筋を用いて解析した。

5.1. BrdU 投与

細胞増殖 S 期にある細胞への BrdU の取り込みを目的として、解剖 4 時間前に、500 mg/kg となるように調製した BrdU 溶液をマウスに単回腹腔内投与した。

5.2. 凍結切片の作製

抗 BrdU 抗体による免疫染色には、アルデヒド系の固定液で固定した後に凍結させた試料を使用した。すなわち、BrdU 溶液が投与された生後 4 週間（幼若期）の GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより得たのちに、約 5 mm に細切した小腸および腓腹筋を 4% paraformaldehyde (PFA) に 2 日間浸漬固定した。固定後、急激な冷却による組織内への氷晶発生を防止するため、蒸留水にアラビアゴムを 1% (w/v) とスクロースを 30% (w/v) 溶解させた、ホルトの 0.88 mol/L ゴムサッカロース液にて 2 日間置換させた。置換後は、PBS (-) で組織表面を軽く洗浄した後に Tissue-Tek® OTC-compound (サクラファインテックジャパン、東京) を用いて腓腹筋分割面あるいは小腸管腔横断面を同時に薄切できるように包埋し、ドライアイス上にキムワイプを敷き、緩やかに凍結しブロック化した。凍結ブロックはクリオスタット（設定温度：-25°C）によって薄切し、約 6 μ m の最低 5 枚以上の連続組織切片として薄切し、スライドガラス上に貼り付けた。その後ドライヤーの冷風を 30 分間当てて切片を乾燥させ、免疫染色時まで -80°C の超低温庫にて保存した。

5.3. 凍結切片の二本鎖 DNA の解離および中和

2.2. の方法に従って解剖し作製された、腓腹筋および小腸が同ブロックに包埋されている凍結切片スライドを、-80°C の超低温庫から取り出した後、ドライヤーの冷風で 10 分間乾燥させた。BrdU 抗体を二本鎖 DNA に取り込まれた BrdU と反応させるため、二本鎖 DNA の

解離を目的として 2N HCl を 1 スライドあたり約 100 μ L ずつ滴下し、30 分間室温に静置した。その後、余剰の HCl をキムワイプで吸い取り、中和反応のため 0.1M ホウ酸バッファー (pH8.5) を HCl 同様に滴下し、室温に 10 分間静置した。次いで、PBS (-) による 5 分間の浸漬洗浄を 3 回行った。

5.4. ブロッキング

二本鎖 DNA 解離・中和反応させたスライドに、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル, 大阪) を滴下し、室温で 1 時間静置しブロッキングを行った。次いで、PBS -T による 5 分間の浸漬洗浄を 3 回行った。

5.5. 免疫染色

ブロッキング後、PBS (-) にて 500 倍希釈した Anti-BrdU rat monoclonal antibody (Abcam) をスライドに滴下し、湿潤箱に静置し 4°C で一晩、一次抗体反応を行った。次いで、PBS (-) による 5 分間の浸漬洗浄を 3 回行った後、1,000 倍希釈した DAPI と Anti-rat IgG (H+L) Alexa® Fluor 488 conjugate (cell signaling technology) の混合液をスライドに滴下し、遮光下で 4°C で 1 時間、二次抗体反応を行った。二次抗体反応後は PBS (-) による 5 分間の浸漬洗浄を 3 回行い、PBS (-) と glycerol を 1 対 2 の割合で混合した水溶性封入剤によって封入後、蛍光顕微鏡にて写真撮影した。

5.6. 骨格筋細胞核あたりの BrdU 染色陽性率 (%) の算出

骨格筋細胞核あたりの BrdU 染色陽性率の算出は、2. 5. で作製したスライドを用いて行った。第一章、第二節 6. と同様に、近位および遠位より無作為に抽出した 2 箇所以上のエリアの写真撮影を実施し、BrdU 陽性核を含む各個体 200 個以上の骨格筋細胞核をカウントし、BrdU 染色陽性率 (%) を算出した。

6. 統計解析

GDE5Tg マウスと同腹の Wild マウスより得られた全ての数値データについて、対応のない t 検定によって統計学的有意性を解析した。いずれも両側検定とし、有意水準は 5%未満 ($p<0.05$) と 1%未満 ($p<0.01$) とに分けて表示した。なお、統計解析は Prism 7 version 7.01 software (GraphPad Software) を使用し実施した。

表 5 RT-PCR に用いたプライマーの一覧

Accession No.	Gene	sense		anti-sense	
		5'	3'	5'	3'
NM_212441	Aesm3	CCTGATCCTATGAGAGTCTTG		GCAGTATCACCATTACTCTGTC	
NM_011978	Slc27a2	GCGGCAACCATCAATCATCA		CGGTGTGTTGCACAGGTACC	
NM_170727	Scgb3a1	CCACAATCAGCAAGGCACAG		CCAGCAGTGACTTCACAGCT	
NM_007393	Actb	TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC		CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC	

第三節 結果

1. 幼若期マウスの大腿筋における HSP70 タンパク質の発現

12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いた遺伝子発現の網羅的解析によって、骨格筋萎縮には細胞ストレスが伴うことが示唆されている [56, 59]。GDE5Tg マウスの骨格筋病態の発症にも細胞ストレスが関与するか否かを明らかにする目的のため、第一章で明らかとなった、骨格筋萎縮を認めない幼若期の 4 週齢 (4wk) GDE5Tg マウスの腓腹筋から抽出したタンパク質を用いて、熱ショックや酸化ストレス、あるいは異常タンパクのリフォールディングなど幅広いストレスに応答し発現上昇する HSP70 を [88-92]，ウエスタンブロッティング法により発現解析し、さらに、より若い 2 週齢 (2wk) のマウスについても同様の解析を行った (図 15)。その結果、同腹の Wild マウスが示す内在性の HSP70 タンパク質のバンドと比較して、2wk と 4wk とともに、HSP70 タンパク質が高発現していることが明らかとなった。したがって、GDE5Tg マウスにおいて、骨格筋萎縮を示す以前より腓腹筋におけるストレス応答が惹起されていたことが考えられ、筋萎縮発症への細胞ストレスの関与が示唆された。

2. GDE5dC471 過剰発現 C2C12 細胞における HSP70 タンパク質の発現

骨格筋細胞での GDE5dC471 の過剰発現が HSP70 の発現を直接誘導しているのかを検証するために、マウス由来筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、GDE5dC471 を一過性に過剰発現させた形質転換体を作製し、未分化の筋芽細胞および分化刺激後の筋管細胞における GDE5 あるいは HSP70 タンパク質の発現を免疫蛍光染色法により検討した。その結果、図 16A に示すように、未分化な筋芽細胞の段階にある C2C12 細胞において、GDE5dC471 が細胞質のみに過剰に発現するのに伴って、HSP70 が共発現していることが明らかになった。また、図 16B に示すように、筋管に分化した後の C2C12 細胞においても同様な発現が認められた。以上より、筋分化のステージに関係なく、細胞質に局在する GDE5Tg によって直接的に細胞ストレス応答が惹起されることが判明した。

3. 幼若期マウスの大腿筋において発現変動する遺伝子群の探索

上記の解析結果から、GDE5Tg マウスの後肢骨格筋において、骨格筋萎縮を認める以前の

2 週齢より細胞ストレス応答が誘導されていたことから、2 週齢の骨格筋において発症における重要な病態因子が関与していることが示唆され、詳細な遺伝子解析が必要であると考えられた。2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いて、マウスゲノム由来の約 4 万 4 千個の遺伝子がスポットされたオリゴ DNA マイクロアレイに対してハイブリダイゼーションを行い、発現変動する遺伝子の網羅的な探索を行った。本研究では、オリゴ DNA マイクロアレイ法では、蛍光色素の取り込み効率やハイブリダイゼーション効率の差異による偽陽性が極めて多いことから、比較する RNA サンプルの標識に用いる蛍光色素の組み合わせを交互に 2 通り行う DyeSwap 法を利用した [93]。

Wild マウスと比較して発現変動が認められる遺伝子群が単離され、統計学的に有意な発現強度を示した遺伝子のうち、発現上昇する遺伝子は 69 個、また減少する遺伝子は 148 個存在した (図 17A, B)。しかし、以前に行われた 12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋をもちいて探索した遺伝子発現変動 [56, 59] と共通する遺伝子群において、既知遺伝子の発現上昇は 6 個、発現減少は 13 個と極めて少なく (表 6, 図 17A, B), GDE5Tg マウスの初期ステージにおいて限定した組織応答が行なわれていると考えられた。

次に、2 週齢の GDE5Tg マウスにおける大腿筋で発現変動した代表的な遺伝子を生理機能ごとに分類したところ、ストレス応答、分泌タンパク質および脂質代謝に関する遺伝子群が多いことがわかった (表 7)。

ストレス応答に関与する遺伝子群について、HSP ファミリーとして HSP70 をコードする *Hspa1a* および *Hspa8*, さらに *Hspa4l* (HSP40) および *Hsp110* (HSP110) 遺伝子が発現上昇していた (表 7)。これらの変化は前述の HSP70 のタンパク質レベルの発現上昇に関連していると考えられた。ストレス応答を示唆する遺伝子の中では炎症性サイトカインである interleukin-1 (IL-1), およびその受容体によって複合体が形成されるときに必要な修飾タンパク質である *Il1rap* が最も発現上昇していた [95]。次いで多く発現上昇していた *Sesn2* 遺伝子の産物である Sestrin 2 は mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害作用を持つことが知られている [96, 97]。これら以外にも、*Fkbp5*, *Arrdc2*, *Gadd45g*, *Mt1* といった HSP 以外にも様々なストレス応答関連遺伝子の発現が上昇していた。

脂肪酸代謝に関わる遺伝子群においては、uncoupling protein 1 (*Ucp1*), β 酸化の初期段階に重要なアシル CoA 合成酵素の *Acs3* の他、遊離脂肪酸トランスポーターの一つである *Slc27a2* の遺伝子発現 (表 7) および mRNA 発現減少が著明であった (図 18A) [98, 99]。また、分泌タンパク質の遺伝子群では *Scgb3a1* の遺伝子発現 (表 7) および mRNA 発現上昇

が認められた (図 18B)。Scgb3a1 遺伝子の産物である secretoglobulin は内在性の phospholipase A2 (PLA2) inhibitor としての生理作用が報告されている [100]。アシルエステラーゼファミリーである PLA2 は、グリセロリン脂質を加水分解し脂肪酸を遊離させる [105]。したがって、GDE5dc471 の過剰発現によって脂肪酸代謝の基質の産生が阻害されることにより、脂肪酸を利用したエネルギー代謝の低下が誘導されることが示唆された。

4. 幼若期マウスの腓腹筋における細胞増殖

筋繊維は最終分化した細胞であるため、それ自体が再び細胞周期に入ることはなく、骨格筋細胞の増殖は、骨格筋細胞を取り巻く筋衛星細胞 (satellite cell, SC) の活性化と増殖、および融合前の筋芽細胞の増殖を意味する。上記の結果から GDE5dc471 の過剰発現により細胞分化のステージに関係なく細胞ストレス応答が誘導されることが明らかとなった。また第一章の結果より、GDE5Tg マウスの筋萎縮時における筋分化は野生型と変わらない可能性が示唆された。これらのことから、筋萎縮を示さない GDE5Tg マウスにおいて、骨格筋細胞の増殖に与える影響を検討した。4 週齢の GDE5Tg マウスおよび同腹の Wild マウスに対して、解剖 5 時間前に、増殖期にある細胞の 2 本鎖 DNA に取り込まれるアナログである BrdU を単回腹腔内投与し、採取した腓腹筋における抗 BrdU 抗体の免疫組織化学染色結果を図 19A に示した。DAPI により染色された約 200 個の核あたりの BrdU 陽性核の割合を算出したところ (図 19B)、GDE5Tg マウスは Wild マウスと比較して軽度な減少傾向がみられたが有意差はなく、GDE5dc471 の発現が誘導する細胞ストレスは細胞増殖能に影響を与えない可能性が示唆された。

表 6 2 週齢と 12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋において共通し発現変動した代表的な遺伝子

Gene ID	Gene symbol	Gene description
Up-regurate		
AF221104	Kifc5c	FK506 binding protein 5
NM_170727	Scgb3a1	secretoglobin, family 3A, member 1
NM_144907	Sesn2	sestrin 2
AK083209	Il1rap	interleukin 1 receptor accessory protein
NM_010230	Fmn1	formin 1
NM_010234	Fos	proto-oncogene c-Fos
Down-regurate		
NM_172778	Maob	monoamine oxidase B
NM_024406	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
NM_021282	Cyp2e1	cytochrome P450 2E1
NM_020567	Gmn	geminin
NM_145365	Creb3l3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3
NM_010616	Kif12	kinesin family member 12
NM_053200	Ces3	carboxylesterase 3
NM_007606	Car3	carbonic anhydrase 3
NM_011134	Pon1	paraoxonase 1
NM_031188	Mup1	major urinary protein 1
NM_145572	Gys2	glycogen synthase 2
NM_201531	Kcnf1	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1
NM_212441	Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3

表 7 2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋において発現変動した代表的な遺伝子群

Gene ID	Gene symbol	Gene description	Fold change	P value
Cell defence and stress response				
NM_010220	Fkbp5	FK506 binding protein 5	2.26	0.000
NM_027560	Arrdc2	arrestin domain containing 2	1.96	0.000
NM_011817	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	1.74	0.000
NM_013559	Hsp110	heat shock protein 110	1.85	0.000
NM_010479	Hspa1a	heat shock protein 1A	2.47	0.000
NM_011020	Hspa4l	heat shock protein 4 like	1.63	0.001
NM_031165	Hspa8	heat shock protein 8	1.75	0.000
AK005714	Hspb9	hypothetical Heat shock hsp20 (alpha crystallin) proteins family containing protein	2.39	0.000
AK083209	Il1rap	interleukin 1 receptor accessory protein	11.18	0.001
NM_019946	Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	0.61	0.001
BC027262	Mt1	metallothionein 1	2.24	0.000
NM_144907	Sesn2	sestrin 2	5.83	0.000
Glucose strage and metabolism				
NM_177741	Ppp1r3b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	0.45	0.000
NM_146118	Slc25a25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	1.98	0.000
NM_145572	Gys2	glycogen synthase 2	0.57	0.000
Lipid strage and metabolism				
NM_007469	Apoc1	apolipoprotein C-I	0.29	0.000
NM_212441	Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	0.24	0.000
NM_053200	Ces3	carboxylesterase 3	0.26	0.000
NM_008493	Lep	leptin	0.32	0.000
NM_011146	Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma	0.67	0.006
NM_022984	Retn	resistin	0.59	0.000
NM_011978	Slc27a2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	0.18	0.000
NM_009463	Ucp1	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	0.16	0.000
Secreted proteins				
NM_146125	Itpka	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	0.35	0.000
NM_023125	Kng1	kininogen 1	0.24	0.000
NM_031192	Ren1	renin 1 precursor	1.93	0.003
NM_170727	Scgb3a1	secretoglobin, family 3A, member 1	9.58	0.000
NM_198190	Ntf5	neurotrophin 5	1.40	0.020
Structural proteins				
NM_010230	Fmn1	formin 1	8.72	0.000
NM_009597	Accn2	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	2.04	0.000
AF221104	Kifc5c	kinesin-related protein KIFC5C	25.76	0.000

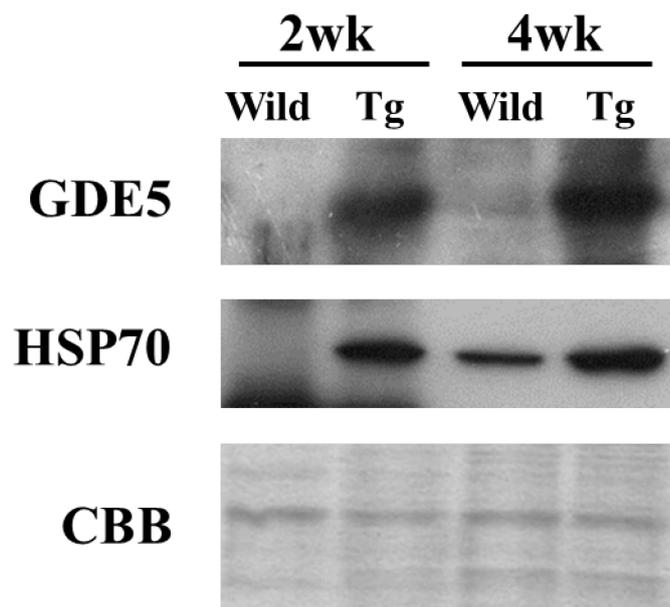


図 15 2 週齢および 4 週齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型における GDE5 および HSP70 タンパク質の発現

2 週齢および 4 週齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の腓腹筋 y よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティング法により GDE5 および HSP70 タンパク質の発現解析結果を行った。タンパク質の相対的な定量比較は coomassie brilliant blue (CBB) 染色によるバンドを用いた。

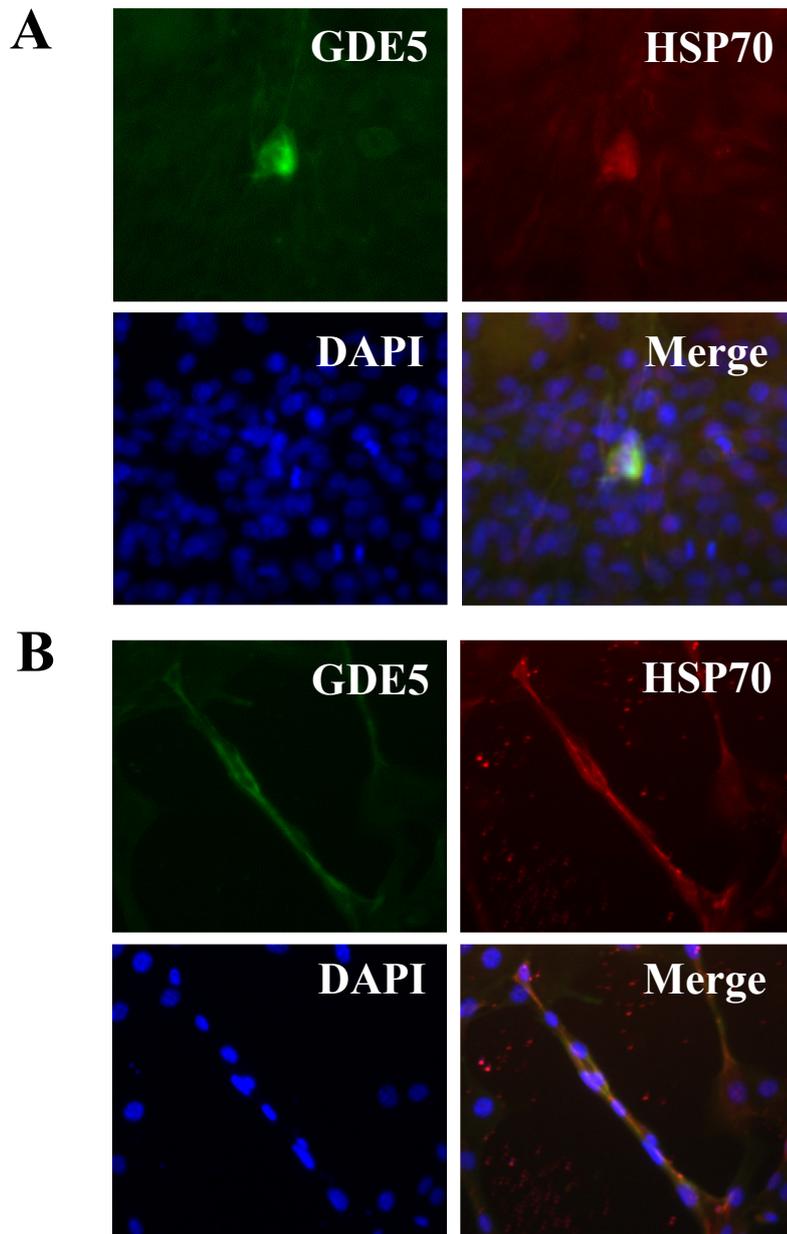
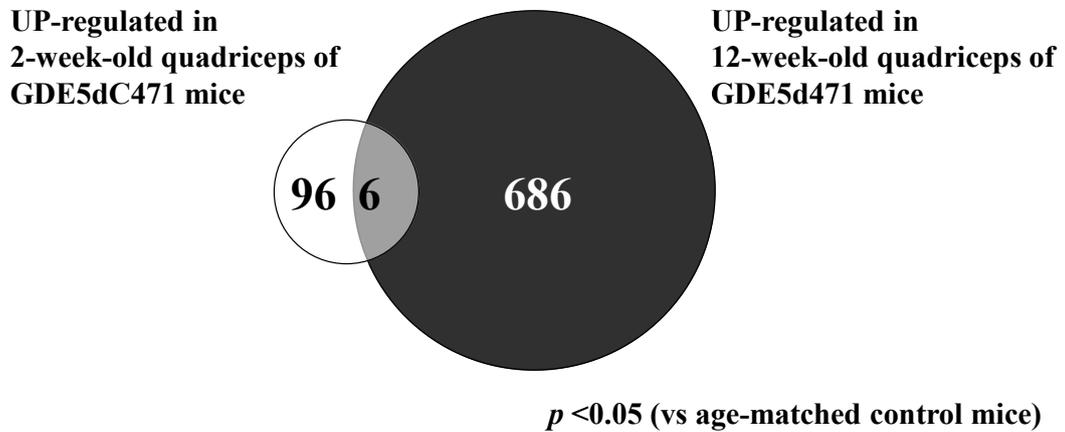


図 16 GDE5dC471 過剰発現マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞における GDE5 および HSP70 の代表的な染色像

GDE5dC471 を一過性に過剰発現させたマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞における抗 GDE5 抗体、抗 HSP70 抗体および DAPI を用いた蛍光免疫多重染色法の代表的な染色像を示した。A：未分化の C2C12 細胞，B：筋管に分化した後の C2C12 細胞，緑色：抗 GDE5 抗体による染色，赤色：抗 HSP70 抗体による染色，青色：DAPI による核染色，Merge：抗 GDE5，抗 HSP70 および DAPI の染色像を重ねたもの

A



B

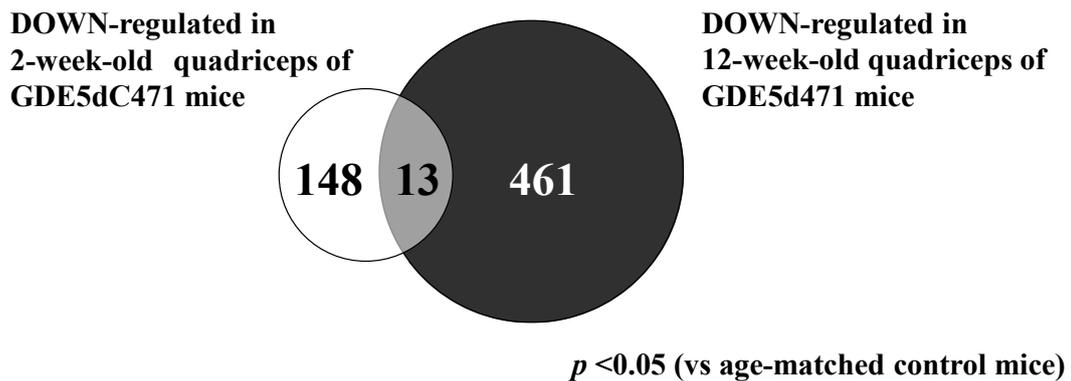


図 17 2 週齢と 12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋において発現変動した遺伝子数の比較

2 週齢の GDE5Tg マウス (Tg) の大腿筋から得た totalRNA を基に DNA マイクロアレイ解析を実施し、同腹の野生型に比して統計学的に有意に発現変動した遺伝子数を白色のサークル内に示した。また、先行研究 [56, 59] において、同様の手法によって得られている 12 週齢の GDE5Tg マウスの結果を黒色サークルに示した。2 週齢と 12 週齢で共通して発現変動した遺伝子数は各円の重合部の灰色部に示した。A : 発現上昇した遺伝子数の比較, B : 発現減少した遺伝子数の比較

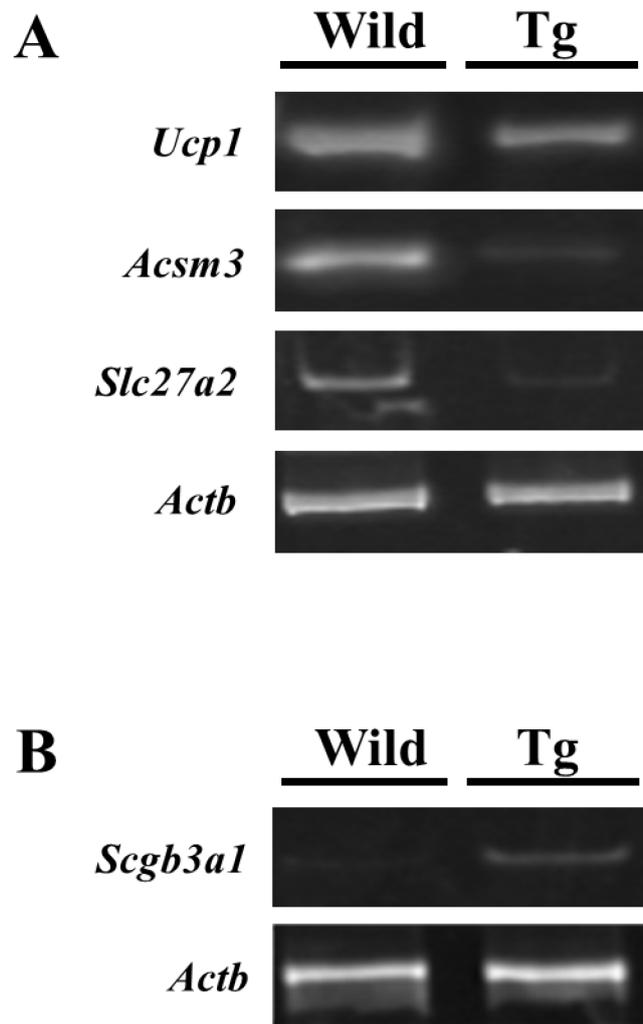


図 18 2 週齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型における脂質代謝関連 mRNA の発現および分泌タンパク質関連 mRNA の発現

2 週齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の大腿筋より抽出した totalRNA を用いて、A : 脂質代謝に関連する *Ucp1*, *Acsm3* および *Slc27a2*, また、B : 分泌タンパク質である *Scgb3a1* について、各 mRNA の発現を RT-PCR により解析した。内部標準遺伝子による標準化には *Actb* を用いた。

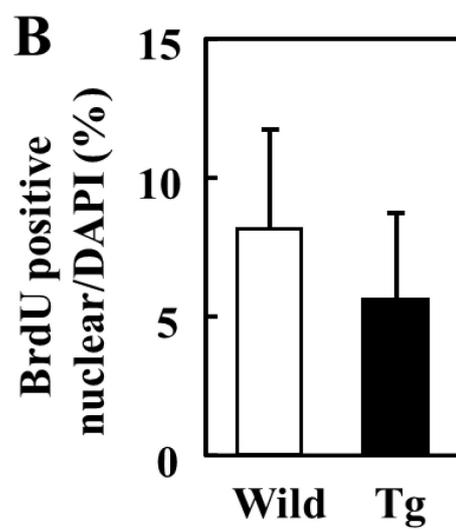
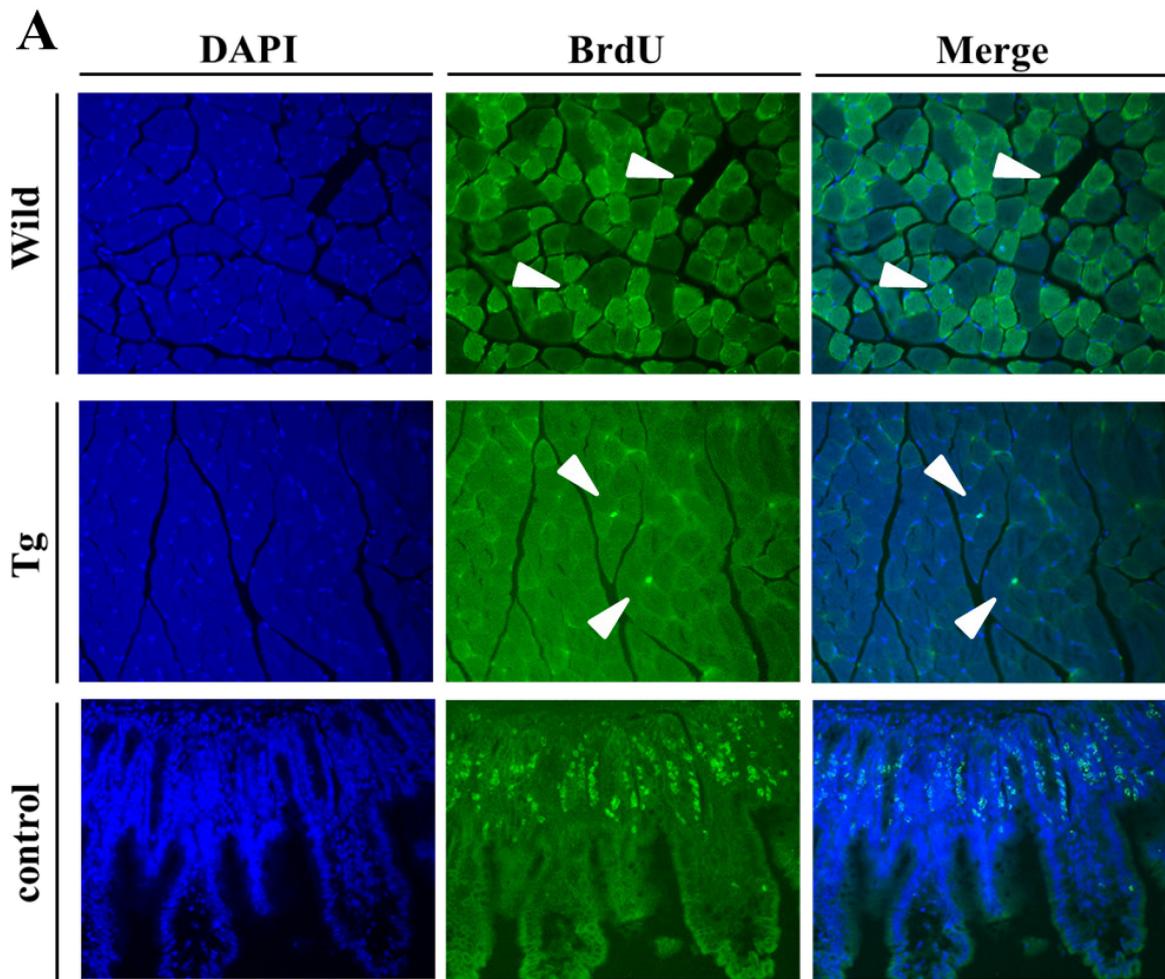


図 19 4 週齢の GDE5Tg マウスと同腹の野生型の腓腹筋横断面における BrdU 染色像および BrdU 陽性核の出現率

A : 4 週齢の GDE5Tg マウス (Tg) と同腹の野生型マウス (Wild) の剖検 4 時間前に BrdU 500 mg/kg を腹腔内投与し, 採材した腓腹筋の細胞増殖 S 期に取り込まれた BrdU を免疫組織化学的に検出した代表的な病理像を示した。陽性対象 (control) には同時に採材した Wild の小腸を用いた。青色 : DAPI による核染色, 緑色 : 抗 BrdU 抗体による BrdU 陽性核染色 (白矢印), Merge : DAPI と BrdU 染色像を重ねたもの, B : Tg および Wild マウスにおける腓腹筋の一横断面あたりの BrdU 陽性核出現率を示した。データは平均値±標準誤差で示した。

第四節 考察

第一章において、GDE5Tg マウスの示す Type2 筋繊維の優先的な萎縮の進展に伴って、筋細胞質中に特にエオシンに濃く染まるタンパク質様物質の蓄積が認められており、また、GDE5Tg マウスに関する先行研究によって、炎症性サイトカインの $\text{IL-}\beta$ および薬物代謝第二相酵素として知られる *Gsta1* の遺伝子発現が著明に上昇したことを報告している [56, 59]。これらのことから GDE5Tg マウスの筋萎縮の発症にも異常タンパク質の蓄積を含む細胞ストレスが関与するという可能性を考えた。本研究では、炎症や酸化ストレスなど幅広いストレスに対して応答する HSP70 のタンパク質の発現量に着目しており、GDE5Tg マウスの腓腹筋において、萎縮を呈さない 4 週齢のみならず、生後間もない 2 週齢においても HSP70 タンパク質の発現上昇が認められた。また、C2C12 細胞に GDE5dc471 を一過性に過剰発現させた際、筋芽細胞のみならず、分化させた筋管においても、GDE5dc471 と HSP70 タンパク質が共発現していることを見出した。内在性の HSP70 は、細胞ストレスによって細胞質内に強く発現することから [102]、GDE5Tg マウスは極めて幼若な時期よりストレス応答が誘導されている可能性が示唆された。

序論に述べたように、GDE5Tg マウスの骨格筋に過剰発現させている GDE5dc471 は C 末端に欠失部分があるものの、GDE5 と同一のタンパク質である。しかし、生理的には存在しえないタンパク質であることから、このタンパク質の過剰発現が異常タンパク質と認識され、細胞ストレス応答として HSP70 が誘導された可能性が考えられた。実際、2 週齢の大腿筋を用いた遺伝子発現の網羅的探索によって、*Hspa1a*, *Hspa8* (HSP70) の他にも *Hspa4l* (HSP40) および *Hsp110* (HSP110) の顕著な発現上昇を見出している。HSP40 は HSP70 のコシャペロンとして働き、HSP110 はこれらの複合体による巨大タンパク質の脱凝集を促進させるときに相乗的に機能することから [103]、GDE5Tg マウスの骨格筋においても異常タンパク質の凝集に対応するために発現上昇したことが示唆された。一方、*Hsp90aa1* や *Hsp90ab1* の発現変動は認められなかった。HSP90 は DMD など炎症反応に関わる筋萎縮において発現上昇することが知られている [104, 105]。これは第一章において示唆された炎症反応を伴わない病理像を支持するものであり、GDE5dc471 の過剰発現による HSP ファミリーの誘導は、異常タンパク質の蓄積が関与するストレス応答である可能性が高いと考えられた。

本研究では、上記の HSP ファミリーの他にもストレス応答に関わる様々な遺伝子が発現上昇していた。*Il1rap* はストレス応答関連の遺伝子群において最も発現強度が高く、炎症性サイトカ

インである IL-1 とその受容体が複合体を形成する際に発現誘導することが知られている [95]。また、*Il1rap* は、脳内においてマクロファージ様細胞として機能するミクログリア細胞の活性化に重要な役割を果たすことが報告されている [106]。近年では、Alzheimer 病患者における Amyloid β ($A\beta$) の蓄積量において *Il1rap* 遺伝子の一塩基多型が報告されていることから [107]、加齢により脳内に蓄積する $A\beta$ の貪食、および除去に関与すると考えられている。骨格筋における *Il1rap* の生理的意義は未だ明らかにされていないが、GDE5Tg マウスで認められた *Il1rap* の発現上昇は、異常タンパク質、あるいは apoptosis による死細胞のクリアランスに関連している可能性が考えられた。*Il1rap* に次いで高発現していた *Sesn2* は、酸化ストレス、DNA 傷害、低酸素など様々なストレスにより誘導されることが知られているほか、AMP-activated protein kinase や tuberous sclerosis complex 依存的な経路を介して *Sesn2* は mammalian toll like receptor complex 1 (mTORC1) を負に調節することが報告されている [96, 97]。mTOR は序論に述べたように、タンパク質合成を活性化する以外にもオートファジー機構の抑制において中心的な役割を持つことから、*Sesn2* の発現上昇は、mTOR シグナル伝達の抑制による骨格筋タンパク質の恒常性の破綻を示唆する。興味深いことに、*Il1rap*、および *Sesn2* はいずれも、筋萎縮を示す 12 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いた遺伝子発現解析においても著しい発現上昇を認めており、筋萎縮の発症のみならず、進展過程においても、骨格筋タンパク質の合成低下や非特異的なタンパク質分解が関与することが推察された。生体内のタンパク質は、細胞ストレスなどにより正常な折り畳み構造を失う場合があるが、HSP70 などの分子シャペロンによって修復される [89, 92]。しかし、HSP70 の分子シャペロンとしての機能は加齢とともに低下することが知られており [108]、異常な折り畳み (ミスフォールディング) による異常タンパク質凝集体が蓄積し、いわゆるフォールディング病と呼ばれる疾患の発症が引き起こされる。フォールディング病は、近年までに少なくとも 30 以上報告されており、特に、神経変性疾患において広く研究されている。例えば、Alzheimer's disease におけるアミロイド β 繊維 [109]、Parkinson's disease におけるレビー小体 [110]、Huntington's disease における huntingtin [111]、Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) における TDP-43 [112] といった、各疾患の発症要因となる異常タンパク質の蓄積が知られている。骨格筋に関しては、肢帯型筋ジストロフィ (limb-girdle muscular dystrophy : LGMD) において、desmin の突然変異タンパク質の蓄積などが報告されている [113]。これらと同様に、GDE5Tg マウスの病態は、フォールディング病の一面としても捉えられることができる。

本研究では、2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いた遺伝子発現変動における、分泌タンパク質遺伝子群の著しい発現上昇に加え、脂肪酸代謝に関わる遺伝子群の著しい発現低下を見出し

ている。分泌タンパク質のうち最も強く発現上昇した *Scgb3a1* 遺伝子の産物、secretoglobin は、内在性の phospholipase A2 (PLA2) inhibitor として機能することが報告されているため [100] , グリセロリン脂質からの脂肪酸の遊離を阻害した可能性が考えられ、その結果、*Ucp1*, *Acsm3* あるいは *Slc27a2* といった脂肪酸代謝に関連する遺伝子群の低下を引き起こしたと推察された。なお、*Scgb3a1* 遺伝子は nuclear transcription factor Y (NF-Y) の転写活性化により発現上昇することが知られている [114] 。NF-Y は *Scgb3a1* のみならず HSP70 のほか、小胞体ストレス応答センサーである activating transcription factor 6 (ATF6) 等の様々なシャペロン遺伝子の発現に関わる転写調節因子であるため [115-117] , 上述の細胞ストレス応答と同調し発現上昇した可能性が考えられた。今後、レポーターアッセイによって、GDE5dc471 による NF-Y の転写活性化を検討し、GDE5dc471 の過剰発現による細胞ストレスと脂肪酸代謝の低下の関係性および時系列が明らかになることが期待される。

2 週齢と 12 週齢の GDE5Tg マウス大腿筋において、共通して発現量の高かった遺伝子群が存在し、その中の一つがキネシン様タンパク質をコードする *Kifc5c* であった。キネシンは、ダイニンとともに微小管に沿って細胞内の様々な分子の輸送するモータータンパクである [118] 。哺乳類のキネシンは 45 種類同定されており、*Kifc5c* は、キネシン様タンパク質である KIFC5A として、胎児期 14 日のマウスの肝、脾臓、および精巣において発現が確認されている [119] 。KIFC5A は細胞分裂時の中心体に豊富に含まれる Nubp1 および Nubp2 とともに細胞周期 M 期を阻害するという報告があることから [120] , GDE5Tg マウスにおいても発現上昇した KIFC5A は細胞周期の阻害に関連している可能性も考えられた。しかし、本研究において、4 週齢の GDE5Tg マウス腓腹筋における BrdU 染色像の結果、野生型との差異が認められなかったため、今後、M 期を指標とした細胞増殖に関する解析が必要であるかもしれない。また、Barberi らは、高齢者の外側広筋から単離した satellite cell (SC) 数およびその増殖能が青年期に比して低下することを報告しており [121] , SC のみを指標とした増殖能の検討 [122] も大変興味深い。いずれにしても *Kifc5c* の骨格筋における生理的意義は未だ不明な点が多いため、GDE5Tg マウスの筋萎縮への関与に関しては、さらなる検討が必要である。

以上より、GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態は、異常タンパク質の蓄積による細胞ストレスが引き金となり、タンパク質合成の低下や非特異的なタンパク質分解が引き起こされることによって発症し、その際、脂質代謝の低下も伴うことが示唆された。

総合討論

ヒトの健康寿命を考える上で、sarcopenia の予防や改善は重要な課題である。しかし、sarcopenia に対する医薬品や食品の機能評価、あるいは発症機序解明を目的とした動物実験では長期の飼育を必要とし、除神経や後肢懸垂などにより急性的に骨格筋萎縮を起こすモデルを用いた場合には、ヒトの病態を再現することは極めて困難であった。そのため、sarcopenia を短期で発症するモデル動物が待ち望まれていた。先行研究より、哺乳類の GDE ファミリーの一種である、GDE5 は非酵素的な働きにより筋分化を調節することが示唆されている [56, 58]。その後、GDE5 の酵素活性を欠損させた GDE5dc471 を骨格筋特異的に過剰発現させ、GDE5Tg マウスを確立した [56, 59]。GDE5Tg マウスはわずか 12 週齢で Type2 筋繊維が豊富な大腿筋や腓腹筋の萎縮を示し、さらに、筋繊維への神経伝達に関わる 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示した [56, 59]。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 の短期自然発症モデル動物として期待されてきた。しかし、GDE5Tg マウスの骨格筋病態の発症要因や 12 週齢以降の進展過程など、詳細なメカニズムは不明な点が多く、病態生理をさらに詳しく理解することが必要であったため、本研究では、GDE5Tg マウスの骨格筋病態の経時解析を通して、筋萎縮の進展メカニズムを明らかにするとともに、発症要因の探索を目的とした。

本研究により見出された、GDE5Tg マウスの示す骨格筋病態および生理機構の特徴と、sarcopenia との類似点および相違点を表 8 に示した。GDE5Tg マウスにおける後肢骨格筋の病理像の経時解析によって、4 週齢では筋萎縮を示さず、8 週齢では大腿筋と腓腹筋の選択的な萎縮を示した。さらに、全身の複合的な運動機能の低下および肥満傾向を示すことが明らかになった。これら形質は 1 年齢まで急激に悪化することなく、不可逆的に継続した。また、筋萎縮の進展に伴って中心核をもつ筋細胞が増加したため、筋自体の異常が GDE5Tg マウスの筋萎縮の原因であることが示唆された。以上の病態生理は、ヒトの加齢性の骨格筋萎縮で報告のある表現型であり、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と考えられた。

本研究では、GDE5Tg マウスの骨格筋萎縮の進展に伴って、細胞質内における異常タンパク質の蓄積を初めて見出した。HSP ファミリーなどの分子シャペロンは、異常な構造をもったタンパク質に対して正しい折り畳み構造をとる役割をもつが [89, 92]、加齢に伴ってその機能は低下する [108]。細胞質内における異常タンパク質の蓄積は小胞体ストレス応答を誘導し、そして小胞体ストレスの過剰な活性化は apoptosis による細胞死を誘導することが知られている [123,

124]。実際、GDE5Tg マウスの筋萎縮の進展において apoptosis の関与が示唆されたことから、異常タンパク質の蓄積による過剰なストレスが GDE5Tg マウスの筋萎縮進展に深く関与したと推察される。本研究では、筋萎縮を発症しない 2 週齢の GDE5Tg マウスの腓腹筋においても、様々な細胞ストレスに応答する HSP70 タンパク質の著しい発現上昇を見出しており、さらに、2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋における遺伝子発現の網羅的探索によって、HSP70 以外にも異常タンパク質のクリアランスに関わる HSP40, HSP110 が強く発現上昇したほか、mTOR の調節に関わる Sestrin2 の遺伝子発現上昇も確認している。以上のことから、GDE5Tg マウスの骨格筋萎縮は、異常タンパク質の蓄積が細胞ストレスの引き金となり、タンパク質合成の低下や非特異的なタンパク質分解によって発症すると考えられた。また、萎縮の進展過程においても、異常タンパク質の蓄積による過剰な細胞ストレスが apoptosis による細胞死を引き起こすと考えられた。これまで、加齢性の疾患における異常タンパク質の蓄積は、Alzheimer's disease (AD) におけるアミロイド β 繊維など、中枢神経疾患領域においては広く知られているが [109-112], sarcopenia に関連した報告はない。したがって、GDE5Tg マウスは sarcopenia の発症と進展機序の解明において新しい切り口を提供できると考える。

これまで sarcopenia の進展には、加齢による神経支配の低下と NMJ の形態変化が深く関与すると考えられてきたが [13, 15-18, 21, 23], 萎縮が長期間続いた 1 年齢の GDE5Tg マウスでさえも NMJ の形態変化を示さなかった。一方、複数の骨格筋特異的 nAChR サブユニット mRNA は、4 週齢から 1 年齢まで明らかに発現上昇していた。nAChR サブユニット mRNA は除神経などによって神経伝達が減少した場合に発現上昇し、神経伝達が再び構築されると速やかに元に戻ることが知られ、また、myogenin など筋分化マーカーによって正に制御されることが知られているが [23, 125], 1 年齢においても myogenin mRNA の発現は GDE5Tg マウスと野生型は同等であった。したがって、GDE5Tg マウスにおいて発現上昇した nAChR サブユニット mRNA は、筋萎縮や神経伝達の低下とは異なるメカニズムにより誘導された可能性が考えられた。AD において、nAChR α 7 サブユニットの活性化は PI3K/Akt 経路を介して、神経細胞の apoptosis による細胞死に対して保護的な役割をもつことが注目されており [126-128], GDE5Tg マウスの筋萎縮においても骨格筋細胞の apoptosis の関与が示唆されたため、保護的なメカニズムにより nAChR サブユニット mRNA が発現誘導された可能性が考えられる一方で、骨格筋の細胞ストレスによって発現誘導される、新規機構が存在するのかもしれない。このように、GDE5Tg マウスは sarcopenia のモデル動物としてだけでなく、骨格筋特異的 nAChR mRNA の新たな発現機構を解明するためにも有用なモデルであると考えられた。

以上、本研究において、骨格筋特異的 GDE5dc471 過剰発現マウスの経時的な病態生理を解析することにより、ヒトにおける骨格筋の加齢性変化と共通する、Type2 筋繊維の選択的萎縮と運動機能の低下および肥満傾向の形質がわずか 8 週齢で得られ、その後 1 年まで緩やかに進展することが明らかになった。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示された。また、GDE5Tg マウスは筋細胞の apoptosis からの保護あるいは NMJ の維持のために nAChR サブユニット mRNA を発現誘導させた可能性が示唆され、新たな NMJ 維持機構の解明においても有用性は計り知れない。本研究成果を足掛かりに医薬品ならびに機能性食品の評価が重ねられ、人々の健康寿命・QOL の向上に貢献することが期待される。

表 8 GDE5Tg マウスの示す骨格筋病態および生理機構の特徴と, sarcopenia との類似点
および相違点

	比較項目	sarcopenia	GDE5Tgマウス
類似点	萎縮する筋繊維	Type1<Type2	Type2選択的
	運動機能	低下	低下
	萎縮の進行	緩やか	(発症後) 緩やか
	回復性	不可逆的	不可逆的
	apoptosis	誘導	DNAの断片化
	中心核	出現	出現
	肥満	除脂肪体重の減少	中性脂肪の増加
	解糖系	低下	低下
	NMJ関連mRNA	上昇	上昇
相違点	NMJ形態	断片化・伸展	変化なし
	異常タンパク質	報告なし	細胞質内の蓄積
	ミトコンドリア機能	低下	変化なし
	筋線維タイプ変化	Type1⇔Type2	変化なし

引用文献

1. 吉岡利忠, 後藤勝正, 石井直方 (2008). 筋力をデザインする, 第二刷, 杏林書院
2. Talmadge, R. J., & Roy, R. R. (1993). Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology*, 75(5), 2337-2340.
3. Edström, L., & Kugelberg, E. R. I. C. (1968). Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 31(5), 424-433.
4. Hood, D. A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 90(3), 1137-1157.47.
5. Tintignac, L. A., Brenner, H. R., & Rüegg, M. A. (2015). Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiological reviews*, 95(3), 809-852.
6. Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle*, 1(1), 4.
7. Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E., & Goldberg, A. L. (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *The Journal of nutrition*, 129(1), 227S-237S.
8. Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), 2121-2129.
9. Huang, J., & Forsberg, N. E. (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(21), 12100-12105.
10. Furuno, K., Goodman, M. N., & Goldberg, A. L. (1990). Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 265(15), 8550-8557.
11. Taillandier, D., Aourousseau, E., Meynial-Denis, D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P., et al. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochemical Journal*, 316(1), 65-72.
12. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*,

- 117(3), 399-412.
13. Nowak, K. J., & Davies, K. E. (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports*, 5(9), 872-876.
 14. Keefe, A. C., & Kardon, G. (2015). A new role for dystrophin in muscle stem cells. *Nature medicine*, 21(12), 1391.
 15. Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., .et al. (1998). An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394(6691), 388-392.
 16. Lexell, J., Taylor, C. C., & Sjöström, M. (1988). What is the cause of the ageing atrophy?: Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15-to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences*, 84(2), 275-294.
 17. Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age ageing*, 39(4), 412-423.
 18. 内閣府, (2017). 平成 27 年度 高齢化の状況および高齢社会対策の実施状況, 平成 28 年版 高齢社会白書
 19. Morley, J. E., Baumgartner, R. N., Roubenoff, R., Mayer, J., & Nair, K. S. (2001). Sarcopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(4), 231-243.
 20. Sayer, A. A., Robinson, S. M., Patel, H. P., Shavlakadze, T., Cooper, C., & Grounds, M. D. (2013). New horizons in the pathogenesis, diagnosis and management of sarcopenia. *Age and ageing*, 42(2), 145-150.
 21. Hepple, R. T., & Rice, C. L. (2016). Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 594(8), 1965-1978.
 22. Korhonen, M. T., Cristea, A., Alén, M., Häkkinen, K., Sipilä, S., Mero, A., et al. (2006). Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes. *Journal of Applied Physiology*, 101(3), 906-917.
 23. Jang, Y. C., & Van Remmen, H. (2011). Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental gerontology*, 46(2), 193-198.
 24. Gomes, R. R., & Booth, F. W. (1998). Expression of acetylcholine receptor mRNAs in atrophying and nonatrophying skeletal muscles of old rats. *Journal of Applied Physiology*, 85(5), 1903-1908.

25. Witzemann, V., Stein, E., Barg, B., KONNO, T., Koenen, M., KUES, W., et al. (1990). Primary structure and functional expression of the α -, β -, γ -, δ - and ϵ - subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. *The FEBS Journal*, 194(2), 437-448.
26. Goldman, D., Brenner, H. R., & Heinemann, S. (1988). Acetylcholine receptor α -, β -, γ -, and δ -subunit mRNA levels are regulated by muscle activity. *Neuron*, 1(4), 329-333.
27. Desplanches, D., Mayet, M. H., Sempore, B., & Flandrois, R. (1987). Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *Journal of Applied Physiology*, 63(2), 558-563.
28. Macpherson, P. C., Wang, X., & Goldman, D. (2011). Myogenin regulates denervation - dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. *Journal of cellular biochemistry*, 112(8), 2149-2159.
29. Ma, J., Shen, J., Garrett, J. P., Lee, C. A., Li, Z., Elsaidi, G. A., et al. (2007). Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP - 43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(11), 1498-1505.
30. Adams, L., Carlson, B. M., Henderson, L., & Goldman, D. (1995). Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *The Journal of cell biology*, 131(5), 1341-1349.
31. 高橋道人, 福島昭治 (2013). 伊東毒性病理組織学, 丸善出版
32. Brown, M., & Hasser, E. M. (1996). Complexity of age-related change in skeletal muscle. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 51(2), B117-B123.
33. Chen, H., Yao, X. F., Emura, S., & Shoumura, S. (2006). Morphological changes of skeletal muscle, tendon and periosteum in the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Tissue and Cell*, 38(5), 325-335.
34. Corda, D., Mosca, M. G., Ohshima, N., Grauso, L., Yanaka, N., & Marigliò, S. (2014). The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family. *FEBS Journal*, 281(4), 998-1016.
35. Larson, T. J., Ehrmann, M., & Boos, W. (1983). Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the glp regulon. *Journal of Biological Chemistry*, 258(9), 5428-5432.
36. Tommassen, J., Eiglmeier, K., Cole, S. T., Overduin, P., Larson, T. J., & Boos, W. (1991). Characterization of two genes, glpQ and ugpQ, encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 226(1), 321-327.

37. Buccione, R., Baldassarre, M., Trapani, V., Catalano, C., Pompeo, A., Brancaccio, A., et al. (2005). Glycerophosphoinositols inhibit the ability of tumour cells to invade the extracellular matrix. *European Journal of Cancer*, 41(3), 470-476.
38. Burg, M. B., Ferraris, J. D., & Dmitrieva, N. I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological reviews*, 87(4), 1441-1474.
39. Walter, A., Korth, U., Hilgert, M., Hartmann, J., Weichel, O., Hilgert, M., et al. (2004). Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiology of aging*, 25(10), 1299-1303.
40. Dawson, R. M. C. (1956). Liver glycerylphosphorylcholine diesterase. *Biochemical Journal*, 62(4), 689.
41. Baldwin, J. J., Lanes, P., & Cornatzer, W. E. (1969). Glycerylphosphorylcholine diesterase: Effects of metal-binding agents. *Archives of biochemistry and biophysics*, 133(2), 224-232.
42. Zablocki, K., Miller, S. P., Garcia-Perez, A., & Burg, M. B. (1991). Accumulation of glycerophosphocholine (GPC) by renal cells: osmotic regulation of GPC: choline phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17), 7820-7824.
43. Bauernschmitt, H. G., & Kinne, R. K. H. (1993). Metabolism of the 'organic osmolyte' glycerophosphorylcholine in isolated rat inner medullary collecting duct cells. I. Pathways for synthesis and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1148(2), 331-341.
44. Webster, G. R., Marples, E. A., & Thompson, R. H. S. (1957). Glycerylphosphorylcholine diesterase activity of nervous tissue. *Biochemical Journal*, 65(2), 374.
45. Kanfer, J. N., & McCartney, D. G. (1988). Developmental and regional quantitation of glycerophosphorylcholine phosphodiesterase activities in rat brain. *Neurochemical research*, 13(9), 803-806.
46. Spanner, S., & Ansell, G. B. (1987). The hydrolysis of glycerophosphocholine by rat brain microsomes: activation and inhibition. *Neurochemical research*, 12(2), 203-206.
47. Lloyd-Davies, K. A., Michell, R. H., & Coleman, R. (1972). Glycerylphosphorylcholine phosphodiesterase in rat liver. Subcellular distribution and localization in plasma membranes. *Biochemical Journal*, 127(2), 357-368.
48. MITRA, J., & CHOWDHURY, M. (1991). Purification and Characterization of Rat Uterine

- Glycerolphosphorylcholine Diesterase and Its Tissue-Specific Induction by 17 β -Estradiol. *Endocrinology*, 129(3), 1147-1154.
49. Yanaka, N. (2007). Mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(8), 1811-1818.
 50. Zheng, B., Berrie, C. P., Corda, D., & Farquhar, M. G. (2003). GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1745-1750.
 51. Nogusa, Y., Fujioka, Y., Komatsu, R., Kato, N., & Yanaka, N. (2004). Isolation and characterization of two serpentine membrane proteins containing glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE2 and GDE6. *Gene*, 337, 173-179.
 52. Zheng, B., Chen, D., & Farquhar, M. G. (2000). MIR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 3999-4004.
 53. Yanaka, N., Imai, Y., Kawai, E., Akatsuka, H., Wakimoto, K., Nogusa, Y., et al. (2003). Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43595-43602.
 54. Rao, M., & Sockanathan, S. (2005). Transmembrane protein GDE2 induces motor neuron differentiation in vivo. *Science*, 309(5744), 2212-2215.
 55. Yanaka, N., Nogusa, Y., Fujioka, Y., Yamashita, Y., & Kato, N. (2007). Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid - induced neurite formation in Neuro2A cells. *FEBS letters*, 581(4), 712-718.
 56. Okazaki, Y., Ohshima, N., Yoshizawa, I., Kamei, Y., Mariggio, S., Okamoto, K., et al. (2010). A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE5, controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 27652-27663.
 57. 吉田富美代 (2006): 新規細胞骨格因子 GDE5 の糖代謝における生理的役割. 修士論文
 58. 岡本佳子 (2009): GDE5 の骨格筋細胞における生理機能の解明. 卒業論文
 59. 岡崎優利 (2008): GDE5 骨格筋過剰発現マウスの作製, および表現型解析. 修士論文
 60. Young, H. S., Herbet, L. G., & Skita, V. (2003). α -Bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle X-ray diffraction. *Biophysical journal*, 85(2), 943-953.
 61. 水口國雄 (2011) 最新染色法の全て, 医歯薬出版株式会社

62. 伊藤隆, 阿部和厚 (2014) 組織学, 改訂 19 版, 南山堂
63. Wredenberg, A., Wibom, R., Wilhelmsson, H., Graff, C., Wiener, H. H., Burden, S. J., et al. (2002). Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15066-15071.
64. Adhietty, P. J., Ugucioni, G., Leick, L., Hidalgo, J., Pilegaard, H., & Hood, D. A. (2009). The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(1), C217-C225.
65. Mráček, T., Drahot, Z., & Houštěk, J. (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 401-410.
66. Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., & Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo*, 23(5), 779-796.
67. Bradley, W. G., Fewings, J. D., Harris, J. B., & JOHNSON, M. A. (1976). Emetine myopathy in the rat. *British journal of pharmacology*, 57(1), 29-41.
68. Sathasivam, S., & Lecky, B. (2008). Statin induced myopathy. *Bmj*, 337, a2286.
69. Srikanthan, P., Hevener, A. L., & Karlamangla, A. S. (2010). Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PloS one*, 5(5), e10805.
70. Ellwanger, K., Kienzle, C., Lutz, S., Jin, Z. G., Wiekowski, M. T., Pfizenmaier, K., & Hausser, A. (2011). Protein kinase D controls voluntary-running-induced skeletal muscle remodelling. *Biochemical Journal*, 440(3), 327-335.
71. Staunton, L., Zweyer, M., Swandulla, D., & Ohlendieck, K. (2012). Mass spectrometry-based proteomic analysis of middle-aged vs. aged vastus lateralis reveals increased levels of carbonic anhydrase isoform 3 in senescent human skeletal muscle. *International journal of molecular medicine*, 30(4), 723-733.
72. Lowe, D. A., Degens, H., Chen, K. D., & Alway, S. E. (2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase varies with age in glycolytic muscles of rats. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(3), B160-B164.
73. Mazzotti, A. L., & Coletti, D. (2016). The Need for a Consensus on the Locution “Central Nuclei” in Striated Muscle Myopathies. *Frontiers in Physiology*, 7.

74. Huard JI, Li Y, Fu FH. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* May;84-A(5):822-32.
75. Sandri, M., Podhorska-Okolow, M., Geromel, V., Rizzi, C., Arslan, P., Franceschi, C., & Carraro, U. (1997). Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(1), 45-57.
76. Marzetti, E., Privitera, G., Simili, V., Wohlgemuth, S. E., Aulisa, L., Pahor, M., & Leeuwenburgh, C. (2010). Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *The Scientific World Journal*, 10, 340-349.
77. Strasser, H., Tiefenthaler, M., Steinlechner, M., Bartsch, G., and Konwalinka, G. (1999) Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet* 354, 918–919.
78. Whitman, S.A., Wacker, M.J., Richmond, S.R., and Godard, M.P. (2005) Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch.* 450, 437–446.
79. Malmgren, L.T., Jones, C.E., and Bookman, L.M. (2001) Muscle fiber and satellite cell apoptosis in the aging human thyroarytenoid muscle: a stereological study with confocal laser scanning microscopy. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125, 34–39.
80. Allen, D. L., Linderman, J. K., Roy, R. R., Bigbee, A. J., Grindeland, R. E., Mukku, V. E. N. K. A. T., & Edgerton, V. R. (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(2), C579-C587.
81. Alway, S. E., Degens, H., Krishnamurthy, G., & Chaudhrai, A. (2003). Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 58(8), B687-B697.
82. Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kohtz, S., Grzeschik, K. H., Arnold, H. H., & Kotz, S. (1989). Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *The EMBO Journal*, 8(12), 3617.
83. Witzemann, V., & Sakmann, B. (1991). Differential regulation of MyoD and myogenin mRNA levels by nerve induced muscle activity. *FEBS letters*, 282(2), 259-264.
84. Suzuki, T., Maruyama, A., Sugiura, T., Machida, S., & Miyata, H. (2009). Age-related changes in

- two-and three-dimensional morphology of type-identified endplates in the rat diaphragm. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(1), 57-62.
85. Li, Y., il Lee, Y., & Thompson, W. J. (2011). Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *Journal of Neuroscience*, 31(42), 14910-14919.
 86. Edström, E., & Ulfhake, B. (2005). Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging cell*, 4(2), 65-77.
 87. Rowan, S. L., Rygiel, K., Purves-Smith, F. M., Solbak, N. M., Turnbull, D. M., & Hepple, R. T. (2012). Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PloS one*, 7(1), e29082.
 88. Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J., Broere, F., Van Der Zee, R., Bonorino, C., & Van Eden, W. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70.
 89. Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 670.
 90. Multhoff, G. et al. (2001) A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress. Chaperones*, 6, 337-344.
 91. Schilling, D. et al. (2009) Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB J*, 23, 2467-2477.
 92. Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-579.
 93. Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., & Speed, T. P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research*, 30(4), e15-e15.
 94. HOSOKAWA, Y., TSUCHIHASHI, Y., MITSUFUJI, S., TOKITA, K., ISETANI, K., TANI, T., & ASHIHARA, T. (1990). CORRELATION OF FIXATION, HCL HYDROLYSIS AND PROTEOLYTIC DIGESTION IN BROMODEOXYURIDINE IMMUNOHISTO-CHEMISTRY OF HUMAN STOMACH LABELED BY EXTRACORPORIAL PERFUSION SYSTEM. *Acta histochemica et cytochemica*, 23(3), 261-270.
 95. Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K., & Martin, M. U. (1997). The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *Journal of*

- Biological Chemistry, 272(12), 7727-7731.
96. Budanov, A. V., Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008; 134(3): 451-60.
 97. Maiuri, M. C., Malik, S. A., Morselli, E., Kepp, O., Criollo, A., Mouchel, P. L., et al. (2009). Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell cycle*, 8(10), 1571-1576.
 98. Fujino, T., Takei, Y. A., Sone, H., Ioka, R. X., Kamataki, A., Magoori, K., et al. (2001). Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, MACS1 and the Sa gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35961-35966.
 99. Anderson, C. M., & Stahl, A. (2013). SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular aspects of medicine*, 34(2), 516-528.
 100. Miele, L., Cordella-Miele, E., & Mukherjee, A. B. (1987). Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocrine reviews*, 8(4), 474-490.
 101. Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., & Shindou, H. (2014). Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *Journal of lipid research*, 55(5), 799-807.
 102. Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
 103. Shorter, J. (2011). The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PloS one*, 6(10), e26319.
 104. Sevin, M., Girodon, F., Garrido, C., & de Thonel, A. (2015). HSP90 and HSP70: implication in inflammation processes and therapeutic approaches for myeloproliferative neoplasms. *Mediators of inflammation*, 2015.
 105. De Paepe, B., Creus, K. K., Weis, J., & De Bleecker, J. L. (2012). Heat shock protein families 70 and 90 in Duchenne muscular dystrophy and inflammatory myopathy: balancing muscle protection and destruction. *Neuromuscular Disorders*, 22(1), 26-33.
 106. Engler, J. R., Robinson, A. E., Smirnov, I., Hodgson, J. G., Berger, M. S., Gupta, N., et al. (2012). Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PloS one*, 7(8), e43339.

107. Ramanan, V. K., Risacher, S. L., Nho, K., Kim, S., Shen, L., McDonald, B. C. . (2015). GWAS of longitudinal amyloid accumulation on 18 F-florbetapir PET in Alzheimer's disease implicates microglial activation gene IL1RAP. *Brain*, 138(10), 3076-3088.
108. Shpund, S., & Gershon, D. (1997). Alterations in the chaperone activity of HSP70 in aging organisms. *Archives of gerontology and geriatrics*, 24(2), 125-131.
109. Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, 14(8), 837-842.
110. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
111. Bates, G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *The Lancet*, 361(9369), 1642.
112. Li, Q., Yokoshi, M., Okada, H., & Kawahara, Y. (2015). The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nature communications*, 6.
113. Ferreira, A., Ceuterick - de Groote, C., Marks, J. J., Goemans, N., Schreiber, G., Hanefeld, F., et al. (2004). Desmin-related myopathy with mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Annals of neurology*, 55(5), 676-686.
114. Tomita, T., & Kimura, S. (2008). Regulation of mouse *Scgb3a1* gene expression by NF-Y and association of CpG methylation with its tissue-specific expression. *BMC molecular biology*, 9(1), 5.
115. Imbriano, C., Bolognese, F., Gurtner, A., Piaggio, G., & Mantovani, R. (2001). HSP-CBF is an NF-Y-dependent coactivator of the heat shock promoters CCAAT boxes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26332-26339.
116. Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H., & Nukina, N. (2008). Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF - Y transcription factor. *The EMBO journal*, 27(6), 827-839.
117. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 20(18), 6755-6767.
118. Hirokawa, N., & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in

- neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 201-214.
119. Navolanic, P. M., & Sperry, A. O. (2000). Identification of Isoforms of a Mitotic Motor in Mammalian Spermatogenesis 1. *Biology of reproduction*, 62(5), 1360-1369.
120. Christodoulou, A., Lederer, C. W., Surrey, T., Vernos, I., & Santama, N. (2006). Motor protein KIFC5A interacts with Nubp1 and Nubp2, and is implicated in the regulation of centrosome duplication. *Journal of cell science*, 119(10), 2035-2047.
121. Barberi, L., Scicchitano, B. M., De Rossi, M., Bigot, A., Duguez, S., Wielgosik, A., et al. (2013). Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche. *Biogerontology*, 14(3), 273-292.
122. Troy, A., Cadwallader, A. B., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, K. K., & Olwin, B. B. (2012). Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38 α/β MAPK. *Cell stem cell*, 11(4), 541-553.
123. Oyadomari, S., & Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Differentiation*, 11(4), 381-389.
124. Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J. I., et al. (2004). Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell death and differentiation*, 11(4), 403.
125. Merlie, J. P., Mudd, J., Cheng, T. C., & Olson, E. N. (1994). Myogenin and acetylcholine receptor alpha gene promoters mediate transcriptional regulation in response to motor innervation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2461-2467.
126. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 89(1), 73-120.
127. Paulo, J. A., Brucker, W. J., & Hawrot, E. (2009). Proteomic analysis of an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor interactome. *Journal of proteome research*, 8(4), 1849-1858.
128. Melroy-Greif, W. E., Stitzel, J. A., & Ehringer, M. A. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age - related effects and associations with drug use. *Genes, Brain and Behavior*, 15(1), 89-107.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご助言およびご校閲頂いたのみならず、私に研究者としての活路を再び見出してくださった、広島大学大学院生物圏科学研究科 食資源科学講座准教授 矢中規之先生に深謝致します。また、副査を担当して頂き、論文作成におきまして有益なご助言を賜りました、陸域動物生産学講座教授 小櫃剛人先生、食資源科学講座教授 鈴木卓弥先生、分子生命開発学講座教授 堀内浩幸先生に深謝致します。

本研究の第一章の実験に関して、有益なご助言を賜りました広島大学大学院総合科学研究科 行動科学講座教授 和田正信先生に深謝いたします。

本研究の第一章および第二章の実験に関して、研究遂行に多大な貢献をされた、食資源科学講座 楊波氏、梶原香氏に感謝致します。また、研究立案にあたり大きく貢献された、先行研究者の岡崎優利氏、吉澤郁美氏に感謝致します。

本研究の第一章の実験に関して、病理組織学に関する技術指導および有益なご助言を賜りました、エーザイ株式会社メディスン開発センター バイオファーマシューティカル・アセスメント機能ユニット筑波安全性研究部、獣医師、毒性病理学専門家、日本獣医病理学専門家 早川和宏博士に感謝致します。

最後に、本論文の執筆に費やした多くの休日と早朝深夜の時間、陰ながら私を支えてくれた、妻 則子と執筆の励みになった二人の息子 佳樹、知季、また、終始激励してくれた、父 薫、母 敏子に感謝致します。