

サルコペニア解決のための新規標的候補分子 SPARC の抗骨格筋量減少作用機構の解明

代表研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻
獣医生理学教室 准教授 山内啓太郎

研究協力者 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻
獣医生理学教室 博士3年 中村克行

【まとめ】

運動機能、特に骨格筋量の減少による筋力の低下はサルコペニアとよばれ、高齢者の虚弱を招く大きな要因とされる。本研究ではマウス骨格筋への *in vivo* siRNA 導入法を用い、多機能性細胞外環境因子である SPARC が骨格筋量を維持する機構の解明を試みた。その結果、SPARC は筋萎縮因子 atrogen1 の発現を亢進させる TGF- β シグナルを抑制することで、抗骨格筋量減少作用を示すことが明らかとなった。

1. 研究の目的

加齢に伴う骨格筋機能の低下はサルコペニアとよばれ、高齢者の転倒や骨折、それによる寝たきりを引き起こす要因である。これまでの報告から、骨格筋におこる加齢性変化として骨格筋量の減少や筋力低下に加え、筋線維直径が減少することや筋線維型については速筋型が減少し遅筋型が増加することがわかってきた。

SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) は 43kDa の分泌性の糖タンパク質で、線維性コラーゲンやファイブロネクチン、ラミニンなどの構造的マトリクスとは異なり、組織の機械的支持には関与しない非

構造的マトリクス因子の一つである。SPARC ノックアウトマウスは正常に出生するものの、さまざま表現型を示すことが多くの先行研究から明らかとなっている。SPARC ノックアウトマウスは出生後、早期に白内障を呈する他、骨量の低下といった表現型を示す。また SPARC ノックアウトマウスの体重は野生型と差はないものの、皮下脂肪をはじめとする体重あたりに占める脂肪組織重量が多いことから、骨ならびに骨格筋などの非脂肪組織重量が代償的に減少していることが推測されている。これらの表現型は高齢者でみられる症状とよく一致していることから、SPARC の発現低下は加齢性疾患となんらかの関わりを持つ可能性が高いと考えられる。

骨格筋での加齢に伴う SPARC の発現低下がサルコペニア病態にどのように寄与するかを考察する上で、骨格筋における SPARC の役割を理解することは重要であるが、骨格筋における SPARC の生理作用に言及した報告はこれまでにほとんどない。そこで、成体骨格筋における SPARC の役割を明らかにすることを目的とし、マウスの前脛骨筋において、*in vivo* における siRNA 導入により SPARC をノックダウンし、加齢に伴う SPARC の発現低下を

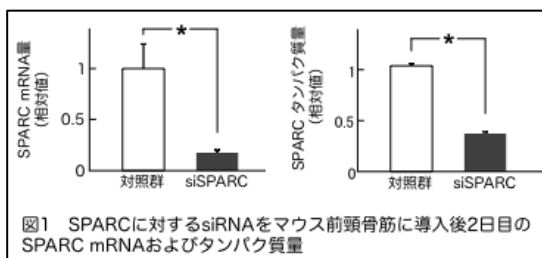
若齢個体で再現することを試みた。

2. 研究方法と経過

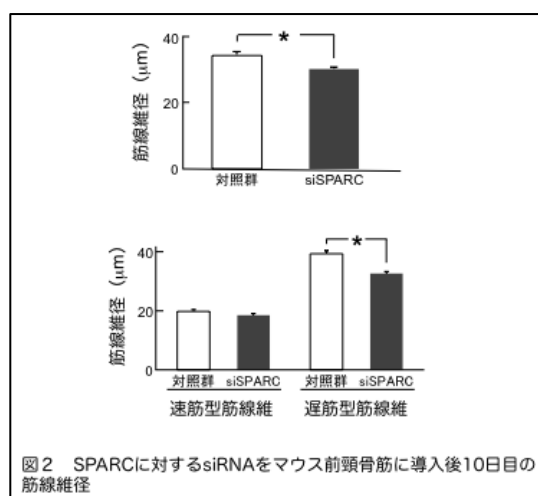
In vivoにおけるsiRNA導入は発生後の個体で遺伝子発現を抑制できる強力かつ簡便なツールである。SPARCを標的としたsiRNAをリポフェクション法によりC57BL/6Jマウス前脛骨筋に直接投与しその2日後にSPARCのmRNA、タンパク質量を調べた。また、siRNA導入10日後において筋線維直径を計測するとともに、遅筋型ミオシン重鎖に対する免疫染色により筋線維型の判定を行った。その他の遺伝子発現やタンパク質の定量については、研究の成果の項に述べたとおりである。

3. 研究の成果

SPARCを標的としたsiRNA投与により、SPARCのmRNA、タンパク質量ともに50%以上抑制することができた(図1)。



この条件下において筋線維直径を調べたところ、siRNA導入10日後においてSPARC発現抑制群で有意な筋線維直径の減少を認めた。また、遅筋型ミオシン重鎖に対する抗体による免疫染色を同時に行い、速筋型・遅筋型のどちらの筋線維にこの萎縮が起きているのかを調べたところ、SPARCの発現抑制は速筋型筋線維に対し顕著な筋線維直径の減少を引き起こすことが明らかとなった(図2)。



このことは、高齢者では遅筋型よりも速筋型筋線維で萎縮が著しいという知見と一致するものであったが、高齢者で見られるような遅筋型筋線維の割合の増加はSPARCの発現抑制では引き起こされなかった。

SPARCの発現抑制によりみられた筋線維の萎縮には筋萎縮遺伝子 atrogen1 の遺伝子発現量の増加が伴っていたため(図3)、SPARCの発現抑制が atrogen1 の発現量増加を引き起こすメカニズムについて考察するべく、筋萎縮の原因となるサイトカインである腫瘍壊死因子 $TNF\alpha$ および $TGF\beta$ の遺伝子発現量とその下流シグナルのリン酸化を調べた。その結果、これらのサイトカインの遺伝子発現量には変化はないものの、SPARC発現抑制群において $TGF\beta$ の下流シグナルである Smad3 のリン酸化が亢進していた(図3)。 $TNF\alpha$ の下流である p38 については変化がないことから、SPARCは $TGF\beta$ シグナルを選択的に抑制することで、筋萎縮から筋線維を保護する役割を担っていると考えられた。Smad3 のリン酸化をはじめとする $TGF\beta$ シグナルは加齢に伴いマウス骨格筋で亢進していることが報告されており、加齢に伴う SPARC 発現量低下がこの $TGF\beta$ シグナルの異常によるサルコペニア

の病態悪化に関与することが示唆される。

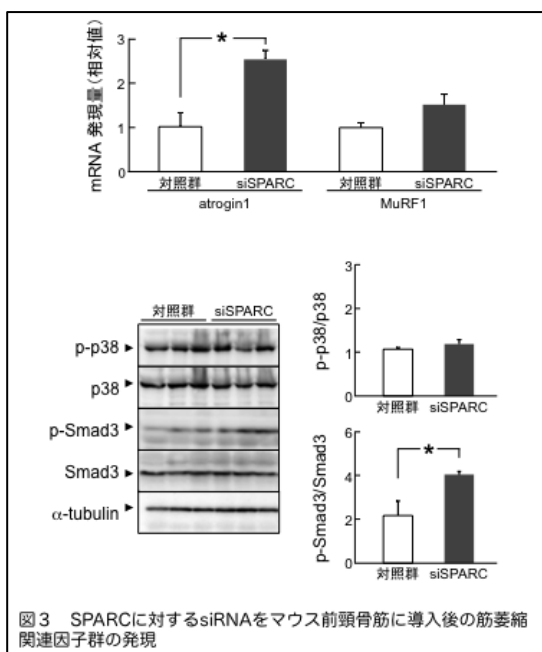


図3 SPARCに対するsiRNAをマウス前頭骨筋に導入後の筋萎縮関連因子群の発現

4. 今後の課題

本研究では骨格筋に発現するSPARCが筋線維の萎縮に対して保護的な作用をもつことを明らかにした。我々は以前に、骨格筋では加齢に伴いSPARCの発現量が低下することに加え、SPARCの標的であると考えられる筋前駆細胞においてSPARCに対する抵抗性が生じることを報告した。加齢に伴い筋前駆細胞でSPARCに対する反応性が低下することは、高齢者において筋線維の萎縮に対して保護的な作用を持つSPARCの量を増加させるだけではサルコペニアの完全な解決には至らないことを含意する。SPARCがもつ筋線維萎縮に対する保護作用ならびに筋前駆細胞におけるSPARCに対する反応性低下の機序を考える上で、その受容体ならびにシグナル経路を理解することは必要不可欠であるが、SPARCの分子メカニズムは不明な点が多く、特に筋分化制御に関してはほとんど明らかとなって

いない。今後SPARCの分子メカニズムに関してのさらなる研究を通じ、サルコペニア治療に貢献できるような知見が得られることを期待している。

5. 研究成果の公表方法

Nakamura K, Nakano SI, Miyoshi T, Yamanouchi K, Nishihara M. Loss of SPARC in mouse skeletal muscle causes myofiber atrophy. *Muscle and Nerve*. 2013 Feb 20. doi: 0.1002/mus.23822 として既に公表済である。