

## <研究課題> 老化血管および神経筋接合部に異常蓄積する MFG-E8 の機能解析を通じたサルコペニアの発症機序解明

代表研究者 地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所  
老年病態研究チーム 筋老化再生医学 研究員 上住 円

### 【まとめ】

加齢性脱神経はサルコペニアの一因と考えられている。本研究では、加齢に伴い NMJ で異常蓄積する MFG-E8 に着目し、それがサルコペニアの発症原因となり得るか否か調べた。MFG-E8 は加齢性脱神経に感受性のある速筋の NMJ 特異的に異常蓄積することが示された。また、老化 MFG-E8 KO マウスは加齢性脱神経に抵抗性を示す可能性が示され、MFG-E8 の蓄積と加齢性脱神経との関連が示唆される結果を得た。

### 1. 研究の目的

現在、我が国では平均寿命と健康寿命の間に約 10 年の乖離があり、健康的に老いることの必要性が高まっている。骨格筋量を維持できている人は種々の疾病に対する罹患率が低下し、長寿であることが明らかとなっており (BMJ.2009;339:b3292, Am J Med.2014;127(6):547)、骨格筋が健康寿命延伸の鍵を握っていると言っても過言ではない。こうした現状から、加齢に伴う筋の衰え (サルコペニア) は解決すべき重要課題である。我々は、サルコペニアの機序解明を目指して、老化マウスと若齢マウスの骨格筋組織を用いて網羅的プロテオーム解析を行い、老化筋で発現が最も増大する因子 Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8) を同定した。MFG-E8 は老化筋の血管 (動脈内腔) や神経筋接合部 (NMJ) で異常に高発現・蓄積し、その蓄積は老化による筋重量の減少に先行して起こることを見出している。サルコペニアは様々な成因为関与するが、NMJ における運動神経の部分的脱落 (加齢性脱神経) や動脈硬化もその一つと考えられている。そこで本研究では、加齢変化を模した MFG-E8 の過剰発現・投与系を用いて、MFG-E8 の異常蓄積が特に NMJ に及ぼす影響を調べる。また、MFG-E8 ノックアウトマウスを用いて、加齢性脱神経への影響を調べ、MFG-E8 の蓄積がサルコペニアの発症原因となり得るか否かが明らかにする。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 速筋と遅筋の NMJ における MFG-E8 発現の違い

- ① 若齢マウス (2~3 ヶ月齢) と老化マウス (24 ヶ月齢超) から前脛骨筋 (速筋) とヒラメ筋 (遅筋) を単離する。2%パラフォルムアルデヒドで固定し、20%スクロースで置換後、コンパウンドに埋めて凍結する。
- ② クリオスタットにて、20  $\mu\text{m}$  の縦断切片を作成し、透過処理、ブロッキングを行う。
- ③ 抗 MFG-E8 抗体、抗 Synaptophysin 抗体、蛍光コンジュゲート  $\alpha$ -Bungarotoxin で染色する。
- ④ 一次抗体を洗浄後、適切な蛍光コンジュゲート抗 hamster IgG 抗体、及び、抗 rabbit IgG 抗体で染色する。
- ⑤ 二次抗体を洗浄後、褪色防止用封入剤で封入する。蛍光顕微鏡で観察後、共焦点レーザー顕微鏡で画像取得する。

#### 2-2 MFG-E8 の過剰発現・投与系の構築

##### (1) MFG-E8 コンディショナルトランスジェニック (Tg) マウスの作製

- ① Cre 組換え酵素を発現する細胞でのみ MFG-E8 の発現を誘導できる Tg コンストラクトを作製し、現在、マウス受精卵へのマイクロインジェクションにより Tg マウスの作成を試みている。
- ② NMJ において、MFG-E8 は終末シュワン細胞で蓄積することを見出しているため、シュワン細胞特異的に Cre の発現を誘導できる Plp-CreER<sup>T</sup> マウスと上記①のマウスを掛け合わせる予定である。Plp-CreER<sup>T</sup> マウスは、Jackson Laboratory より入手済みである。

##### (2) MFG-E8 産生 CHO 細胞の免疫不全マウスへの移植

- ① マウス *Mfge8* 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを作製し、CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞に感染させる。レンチウイルスベクターには *Mfge8* の後ろにマーカーとして Venus 遺伝子が組み込まれている。Venus 遺伝子のみを発現するレンチウイルスベクターをコントロールとする。
- ② 数日間培養後、細胞を回収し、Venus 陽性

細胞をセルソーターで分取する。培養し、移植に必要な細胞数まで増殖させる。

③ 細胞を回収し、免疫不全マウス (BALB/c-nu) の皮下に  $5 \times 10^6$  cells/匹で移植する (MFG-E8, n=6; Control, n=5)。2 週後にサンプリングし、体重、筋重量を測定した。血中 MFG-E8 レベルや NMJ における MFG-E8 の蓄積、その影響については現在解析中である。

### 2-3 MFG-E8 の欠損が NMJ の老化に及ぼす影響

① MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスを 20-22 ヶ月齢まで老化させる。同腹子の野生型 (WT) マウスをコントロールとする。

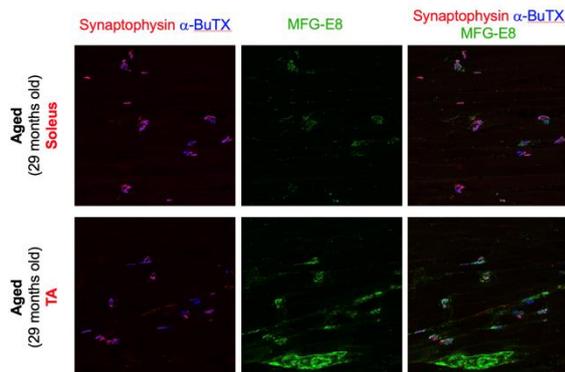
② サンプリングし、体重、筋重量を測定する (KO, n=9; WT, n=7)。上記 2-1 と同様の方法で筋縦断切片の免疫染色を行い、加齢性脱神経の割合を定量する。現在、n 数を増やして解析している途中である。

## 3. 研究の成果

### 3-1 速筋と遅筋の NMJ における MFG-E8 発現の違い

加齢性脱神経は、速筋で特異的に見られ、遅筋では見られないと報告されている (PLoS One. 2011;6(12):e28090)。そこで、老化マウスの速筋と遅筋の NMJ で、MFG-E8 の発現量に差が見られるか否か調べた。Fig. 1 に示すように、速筋 (TA) では遅筋 (soleus) に比べ、MFG-E8 の発現量がより高いことが分かった。

Fig. 1 Fast muscle specific accumulation of MFG-E8 in NMJ



また、若齢マウスでも速筋と遅筋で MFG-E8 の発現量を比較したところ、速筋でより高く、さらに、老化により速筋特異的に異常蓄積することが分かった。このような MFG-E8 の蓄積の速筋特異性から、加齢性脱神経との関連が示唆される。

### 3-2 MFG-E8 の過剰発現・投与系の構築

加齢変化を模した MFG-E8 の過剰発現・投与系を用いて、MFG-E8 の異常蓄積が NMJ に及ぼす影響を調べている。

#### (1) MFG-E8 コンディショナルトランスジェニック (Tg) マウスの作成

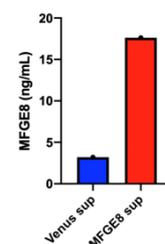
上記の研究方法と経過で記述した通り、現在作製中である。

#### (2) MFG-E8 産生 CHO 細胞の免疫不全マウスへの移植

コンディショナル Tg マウスの作成には時間を要するため、その代替手段として、MFG-E8 産生 CHO 細胞のマウスへの移植による持続投与を試みた。

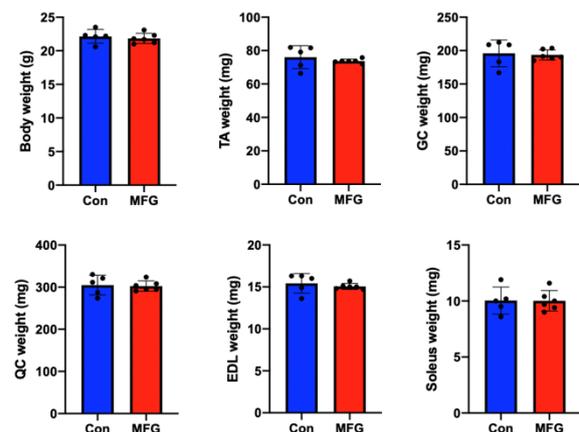
まず、CHO 細胞から安定的に MFG-E8 を産生させるため、レンチウイルスベクターを用いて CHO 細胞にマウス *Mfge8* 遺伝子を導入した。マーカー遺伝子として Venus が組み込まれているため、Venus 陽性細胞のみをセルソーターで分取し、さらに培養し、移植に必要な細胞数まで増殖させた。実際に、培養上清を回収し、ELISA にて、MFG-E8 が分泌されていることを確認している (Fig. 2)。

Fig. 2 培養上清中の MFG-E8 の量



この細胞を免疫不全マウスの皮下に  $5 \times 10^6$  cells/匹で移植し、2 週後にサンプリングを行った。体重、筋重量を測定した結果、いずれも有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。現在、血中 MFG-E8 レベルや NMJ における MFG-E8 の蓄積、その影響について解析中である。

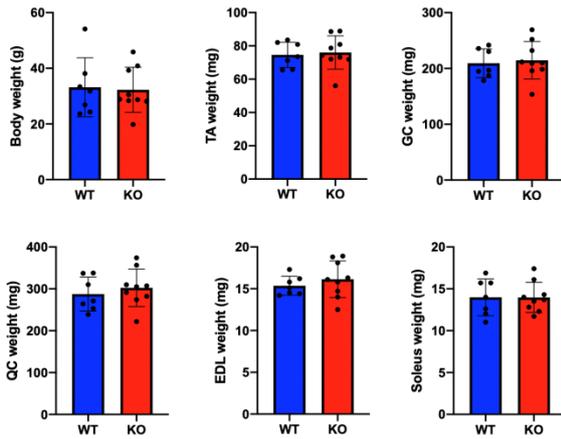
Fig. 3 移植2週後の体重および筋重量



### 3-3 MFG-E8 の欠損が NMJ の老化に及ぼす影響

MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスを用いて、加齢性脱神経への影響を調べた。MFG-E8 KO マウスを 20~22 ヶ月齢まで老化させた。また、同腹子の野生型マウスをコントロールとした。Fig. 4 に示すように、KO マウスの体重および筋重量は野生型 (WT) マウスと比べ有意な差は認められなかった。

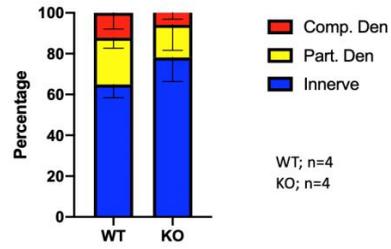
Fig. 4 老化MFG-E8 KOマウスの体重および筋重量



筋縦断切片の免疫染色により、NMJ における脱神経の割合を定量したところ、KO マウスにおいて、完全に脱神経された NMJ (Comp. Den) や部分的に脱神経された NMJ (Part. Den) の割合が減少傾向にあり (Fig. 5)、KO マウスは加齢性脱神経に対して抵抗性を示す可能性が示唆された。今後、n 数を増やしてさらに結果を

精査する予定である。

Fig. 5 老化MFG-E8 KOマウスにおける加齢性脱神経の割合



### 4. 今後の課題

老化により MFG-E8 が NMJ で異常蓄積することは明確であり、その蓄積は老化による筋重量の減少に先行して起こることも見出している。さらに、今回の結果から、加齢性脱神経により感受性のある速筋の NMJ で特異的に MFG-E8 が異常蓄積することも明らかとなった。しかしながら、加齢変化を模した MFG-E8 の過剰発現・投与の実験が継続途中であるため、今後さらに解析を進め、NMJ における MFG-E8 蓄積の直接的な影響を明らかにしたいと考えている。

### 5. 研究成果の公表方法

第 7 回若手による骨格筋細胞研究会 (2019 年 10 月 22 日、京都) で発表

以上