

## <研究課題> 骨格筋の創傷治癒遅延に着目したサルコペニア発症メカニズム解明

代表研究者 東京大学大学院医学系研究科 准教授 西 裕志  
共同研究者 東京大学大学院医学系研究科 教授 南学 正臣  
東京大学大学院医学系研究科 大学院生 東原 崇明  
東京大学大学院医学系研究科 大学院生 小田原 幹

### 【抄録】

高齢者ではサルコペニア進展と腎機能低下が認められることから、腎機能低下が骨格筋の再生・分化過程に与える影響を検証した。まず、慢性腎臓病モデルマウスでは損傷した前脛骨筋の創傷治癒が遅延していた。培養骨格筋細胞では、尿毒症毒素による刺激により分化が遅延した。細胞トランスクリプトーム解析により、尿毒症刺激によって低下する遺伝子群が同定された。このうち **myomixer** 遺伝子は、その発現抑制が筋細胞の融合を損ない、過剰発現が尿毒症による分化遅延に拮抗した。また、蛍光色素アッセイにより、尿毒症刺激が初期の筋融合を阻害することがわかった。モデルマウスでは創傷後の筋湿重量に加えて筋肉組織における同遺伝子発現が減少していた。以上より、尿毒症が **myomixer** 発現を低下させ、筋融合を障害した。高齢者では腎機能が低下し、筋骨格系受傷が高頻度であり、損傷後の筋細胞融合の遅れがサルコペニアの一因かもしれない。

### 1. 研究の目的

#### 1-1 加齢と腎機能低下とサルコペニア

高齢者のサルコペニアやダイナペニアは身体活動・社会生活の大きな支障となる。サルコペニア対策は健康寿命の延伸を図る上で極めて重要な課題である。

一方、高齢者の身体的特徴の一つに腎機能（糸球体ろ過率）の低下が挙げられる。人工透析が必要となるような末期腎不全に至らないとしても、糖尿病や高血圧を背景として、あるいは加齢自体によっても腎機能が低下した高齢者は一般住民に数多く存在し、腎機能正常者と比較した場合に腎機能低下者のサルコペニアの有病率が段階的に上昇することが知られている（Gamboa: *Clin J Am Soc Nephrol* 2020）。

#### 1-2 骨格筋の創傷治癒遅延に着目したサルコペニア発症メカニズム解明

加齢や腎機能低下で見られるサルコペニアの原因としては従前主に低栄養や循環不全、ホルモン・アンバランス等を背景とした骨格筋構成蛋白のコピキチン・プロテオソーム系分解亢進、或いは、合成低下が注目されてきた。中も転写因子 **Atrogin**, **Murf-1** や **Myostatin** が係る分子経路は再現性が高く、大規模な創薬研究の標的にもなってきた。実際、2018年度本助成で申請者は、クリアランス低下によって体内

に蓄積する尿毒症が合成低下を介してサルコペニア発症に寄与することを明らかにした（Higashihara: *Sci Rep* 2021）。

骨格筋構成蛋白の合成低下、分解促進がサルコペニアの主因であることは今日でも論を待たないが、これ以外の原因が否定されているわけではない。申請者は、フレイルやロコモティブシンドロームを有する高齢者は転倒やスポーツ事故を起こしやすく、筋骨格系損傷を起こしやすいこと、そして、骨格筋は腸管上皮や毛根と同様に生体における再生器官であることに尺然した。すなわち、「高齢者や腎機能低下者のサルコペニアの一因が、骨格筋の創傷治癒過程における筋再生能の低下にあるのではないか」と仮説建てた。

本研究では腎機能が低下した環境における骨格筋の再生・分化過程を個体および細胞レベルで明らかにするとともに、骨格筋の創傷治癒を活性化し、高齢者サルコペニア、特に受傷後の筋力低下の予防的介入手段の樹立を目指す。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 腎機能低下モデルマウス・筋障害実験

7-8週齢 C57BL/6J 雄マウス（日本 CLEA）に 0.2%アデニン含有食を3週間与えた。血液サンプルを採取し血漿クレアチニンおよび尿素濃度を検査キット（和光純薬）で測定した。イソフルラン麻酔下にマウスに 1.2%塩化バ

リウム (BaCl<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich) 50 uL を前脛骨筋内に注射し、その後 1 週間通常食を与えた。別実験では L-アスコルビン酸 (L-AsA) 100 mg/kg 体重も筋肉内注射の 30 分前に 1 週間毎日腹腔内注射した。

以上、東京大学動物福祉委員会の関連ガイドラインおよび規制 (M-P19-003) によって承認された。

## 2-2 細胞実験

マウス C2C12 筋芽細胞 (ATCC) を増殖培地 (10% ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 100 単位/mL を含む DMEM 培地 (#D6046; Sigma-Aldrich) ) で培養した。また、セミコンフルエンスに達した後は分化培地 (2% 熱不活化ウマ血清を含む DMEM 培地) に変更して筋管への分化を誘導した。実験目的に応じて、インドキシル硫酸 (IS, ナカライ) および L-AsA を培地添加した。

## 2-3 トランスクリプトーム解析

Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent) を使用して RNA を質的に評価後、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina および NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) を使用して mRNA シークエンシング用ライブラリーを作成した。これらを NextSeq 500/550 キットを使用して NextSeq 500 システム (Illumina) での次世代シーケンスに適用した。FASTQ ファイルを抽出し、CLC Genomics Workbench ソフトウェア (QIAGEN) で評価した。

## 2-4 細胞融合アッセイ

既報 (Isobe: *Biomed Res* 2022) にしたがって、C2C12 筋芽細胞を 12 ウェルまたは 24 ウェルプレートに播種し分化培地で 5 日間培養した。別実験では、IS および L-AsA の存在下で 3 日間培養した。4% パラホルムアルデヒド固定した細胞を 0.3% Triton X-100 で透過処理し、細胞を抗ミオシン重鎖 (Myh) 抗体 (希釈 1:1000、MF-20; Developmental Studies Hybridoma Bank) で 4°C で一晩インキュベート後に、Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体 (希釈 1:2000) および Hoechst 33342 (希釈 1:10,000) などの二次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。PBS 洗浄後、倒立蛍

光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス) で画像取得した。Myh 陽性筋管の核の数を、ImageJ ソフトウェアを使用して各ウェル内の約 200 個の隣接する筋管について測定しました。

## 2-5 細胞融合アッセイ

既報 (Isobe: *Biomed Res* 2022) に従い、HiBiT ベースの筋細胞融合アッセイを行った。すなわち、EGFP-LgBiT と mCh-HiBiT をそれぞれ発現する C2C12 テスター細胞株を 1:1 の比率であらかじめ混合し、4000 個の細胞 (各細胞株から 2000 個ずつ) を底部透明の 96 ウェルプレート (アズワン) の各ウェルに播種した。増殖培地中での 24 時間インキュベーション後、IS 及び L-AsA の存在下または非存在下で培地を分化培地に移した。分化開始 24 時間後に Nano-Glo Live Cell Assay System (Promega) による EGFP-LgBiT および mCherry-HiBiT の細胞内での結合を、照度計 ARVO MX 1420 (PerkinElmer) で発光強度を 5 秒間隔で測定することで評価した。発光測定後、培地を 5% (v/v) WST-8 試薬 (同仁科学) を含む増殖培地に交換した後、37°C で 2 時間インキュベートして細胞生存率を評価した。

## 3. 研究の成果

### 3-1 腎機能低下マウスでは骨格筋の創傷治癒が十分ではない

マウスに 21 日間アデニン含有食を与えたところ、血漿中のクレアチニン濃度と尿素濃度が上昇していた。通常食またはアデニン含有食を与えたマウスの前脛骨筋に塩化バリウムをそれぞれ注射し 7 日後に屠殺したところ、アデニン食マウスの同骨格筋の体重比湿重量は通常食マウスのそれよりも低下していた。前脛骨筋の病理組織学的な評価でも、筋線維束の断面積の分布が、アデニン食マウスでは有意に小さかった。これらは、腎障害マウスでの骨格筋の創傷治癒が十分ではないことを示す。

### 3-2 尿毒素培地添加された骨格筋細胞は分化が遅延する

マウス C2C12 筋芽細胞を分化培地で分化誘導すると同時に 0.3 mmol/L IS および 0.1 mmol/L L-AsA で 3 日間処理し筋細胞の直

径・長さの両面で細胞サイズを評価したところ、IS は細胞サイズを縮小させ、それに L-AsA を追加すると細胞サイズが回復した。この過程で、Myod1 および Myog 遺伝子発現を評価したが、IS 添加では差が見られなかった。これらは、尿毒素の培地添加が筋細胞の分化を障害し、L-AsA はそれに拮抗作用をもつことを示す。

### 3-3 IS と L-AsA 培地添加された骨格筋細胞のトランスクリプトーム解析と関連遺伝子の同定

培地中の IS、L-AsA それぞれの有無により計 4 条件で処理した分化過程の C2C12 細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った。まず、各条件間で明らかに異なる遺伝子発現パターンを呈することが主成分分析や階層クラスター分析で示された。続いて、IS 刺激によって発現が抑制され、IS および L-AsA 処理によって発現が亢進するような 54 遺伝子を同定した。これらに対して遺伝子オントロロジーパスウェイ解析が実行すると、筋細胞の分化に係る遺伝子群の尻野津が大きいことが分かった。

次にこの中でも、生物胎生期に骨格筋発生に Mymx 遺伝子に着目した。Mymx は骨格筋細胞の細胞膜に発現して、膜融合に不可欠な分子として報告されている (Bi: *Science* 2017)。分化過程の C2C12 細胞を用いた定量 PCR では、IS 刺激により Mymx 発現が低下し、L-AsA 劇によって Mymx 発現が亢進することが九人された。ウェスタンブロットでも、C2C12 細胞の分化過程で Mymx 発現が亢進するが IS 刺激ではそれが抑制されることがわかった。

### 3-4. IS 培地添加された骨格筋細胞の分化過程における Mymx 機能解析

IS 刺激による C2C12 細胞分化における網羅的解析において、筋細胞の膜融合に関与する Mymx 発現の変化が認められたことから、IS 刺激は Mymx 遺伝子の発現低下を介して筋細胞の膜融合に負の影響を与えているのではないかと仮説建てた。

そこでまず、Mymx mRNA を標的とする siRNA で C2C12 細胞を処理したところ、Mymx 遺伝子発現は低下し、また、成熟した筋管細胞の 1 細胞当たりの核数減少が見られた。一方、IS 刺激された C2C12 細胞に対してレンチウイルスベクターを用いて Mymx 遺伝子を高発現させたところ、細胞サイズ(直径・長さ)

の回復が見られた。

さらに、細胞膜融合のより厳格な定量的アッセイとして、細胞質内で GFP-LgBiT または mCherry-HiBiT 融合タンパク質を安定して発現する 2 系統の培養筋芽細胞を共培養した。共培養開始 24 時間後に、IS 無刺激では膜融合を示す発光強度の増大を認めたが、IS 刺激するとこれが低下した。一方、追加で L-AsA を添加すると、再び発光強度は増大した。

以上から、骨格筋細胞の分化過程において Mymx 遺伝子発現は形態学的な細胞分化に由来しており、かつ、IS 培地添加による不十分な細胞分化には Mymx 遺伝子発現低下が寄与していることがわかった。また、IS 刺激は筋細胞の初期の膜融合を負に制御することがわかった。

### 3-5. 腎機能低下マウスでは骨格筋創傷治癒過程で Mymx 遺伝子発現が低下している

以上の細胞実験結果をもとに、アデニン含有食誘発性の腎障害モデルマウスの骨格筋創傷治癒過程における Mymx の意義を評価した。実際、塩化バリウムを筋肉内注射されたアデニン食マウスの前脛骨筋の Mymx 発現は、通常食マウスのそれよりも低下していた。

また、塩化バリウムを筋肉内注射されたアデニン食マウスに L-AsA を 7 日間腹腔内投与したところ、まず、血漿中の尿素濃度に有意差は見られなかった。一方、塩化バリウムを筋肉内注射され L-AsA 腹腔内投与されたアデニン食マウスの前脛骨筋 Mymx 遺伝子発現は、L-AsA 媒介対照を腹腔内投与されたマウスのそれよりも、上昇していた。また、同骨格筋の体重比湿重量も増加しており、病理組織学的な評価では筋線維束の断面積の分布が正に傾いていた。

以上から、生物個体レベルにおいても、腎障害がある場合には骨格筋の創傷治癒過程における Mymx 遺伝子発現が抑制されていることが分かった。

## 4. 今後の課題

本研究成果はこれまであまり着目されていなかった再生器官としての骨格筋の機能不全が、腎機能低下で見られるサルコペニアの一因である可能性が判明した。また、その分子機序に従前は胎生期の機能が着目されていた Mymx について、成体の二次性骨格筋疾患での関与が示唆された。

腎機能低下がある環境でなぜ骨格筋障害後の *Mymx* 遺伝子の発現が低下するのか、例えばそれに *Mymx* の発現調節にかかわるとされている *MyoD* や *myomaker* との相互作用が関係しているのか今後の解明が求められる。

また、骨格筋細胞に対する尿毒素培地添加によって *myomixer* 分子が関与しないであろうごく早期の細胞膜融合ですら抑制されていたことは、尿毒素によるインテグリン等の細胞膜接着分子に対する直接影響が考えられ、これも今後解明すべき点である。

## 5. 研究成果の公表方法

(学術論文)

1. Takaaki Higashihara#, Motoki Odawara#, Hiroshi Nishi\*, Takehito Sugasawa, Yumika Suzuki, Satoshi Kametaka, Reiko Inagi, Masaomi Nangaku: Uremia impedes skeletal

myocyte *myomixer* expression and fusogenic activity: implication for uremic sarcopenia. *Am J Pathol* 194: 759-771, 2024. # equal contribution, \* corresponding author.

(学会発表)

1. 西裕志, 小田原幹, 東原崇明, 菅澤威仁, 亀高諭, 稲城玲子, 南学正臣: 尿毒症は骨格筋分化過程の細胞膜融合活性を阻害する. *日本メイラード学会*. 2023年10月12日. 東京.

2. 小田原幹, 東原崇明, 西裕志, 菅澤威仁, 鈴木裕美香, 亀高諭, 稲城玲子, 南学正臣: インドキシル硫酸は筋芽細胞における *Myomixer* の発現抑制と細胞融合能の低下をもたらす尿毒症性サルコペニアに関与する. *Uremic Toxin 研究会*. 2024年4月27日. 東京.

以上

# Deterioration of skeletal myocyte myomixer expression and fusogenic activity in uremic sarcopenia

**Primary Researcher:** Hiroshi Nishi  
Associate Professor, The University of Tokyo Graduate School of Medicine

**Co-researchers:** Masaomi Nangaku  
Dean and Professor, The University of Tokyo Graduate School of Medicine  
Takaaki Higashihara  
Graduate Student, The University of Tokyo Graduate School of Medicine  
Motoki Odawara  
Graduate Student, The University of Tokyo Graduate School of Medicine

Elderly people often have physiologically decreased renal function, and the influence of decreased renal function may not be ignored as a factor in sarcopenia in the elderly. In the context of declined skeletal muscle mass and function, the muscle regeneration and differentiation process has not been extensively studied. In mice with kidney dysfunction induced by adenine-containing diet compared to control mice, the tibialis anterior muscle damage was poorly recovered after muscle injury. In the cultured murine skeletal myocytes, stimulation with indoxyl sulfate (IS), a representative uremic toxin, morphologically jeopardized the differentiation, which was counteracted by L-ascorbic acid (L-AsA) treatment. Transcriptome analysis for those cultured myocytes identified a set of genes the expression of which was reduced by IS stimulation but reascended by L-AsA treatment. Silencing of myomixer, one of those genes, impaired myocyte fusion during the differentiation. In contrast, lentiviral overexpression of myomixer compensated a hypomorphic phenotype caused by IS treatment. The split-luciferase technique demonstrated that IS stimulation negatively affected early myofusion activity that was rescued by L-AsA treatment. Lastly, in mice with kidney dysfunction compared to control mice, myomixer expression in the muscle tissue in addition to the muscle weight after the injury were reduced, both of which were restored with L-AsA treatment. Collectively, the uremic milieu impairs the expression of myomixer and impedes the myofusion process. Considering frequent musculoskeletal injuries in those patients, defective myocyte fusion followed by delayed muscle damage recovery could underlie the muscle loss and weakness.