

加齢性筋萎縮の主要因のブレークスルー

所属：九州大学 大学院農学研究院 動物・海洋生物科学講座

助成対象者：辰巳 隆一

共同研究者：中島 崇

概要

加齢に伴い筋細胞(筋線維)が萎縮する他、線維化や脂肪化も散見される。本研究では、これらの加齢性変化が「筋幹細胞の活性化因子 HGF(肝細胞増殖因子)のニトロ化・不活化」に起因すると着想し、この作業仮説を新規ツール(ニトロ化 HGF の特異的モノクローナル抗体 2 種を作出)を用いて検証した。若齢期・成熟期・老齢期の雌性ラット後肢下腿部筋切片を抗ニトロ化 HGF 抗体で蛍光免疫染色したところ、i)加齢に伴い、細胞外マトリックスに結合・保持されている HGF のニトロ化が進行・蓄積すること、ii)速筋型筋線維である IIa と IIx 型が顕著にニトロ化することを見出した。これらの結果は、遅筋型に比べ速筋型筋線維の加齢性変化が著しいというこれまでの知見とも合致した。長寿高齢化社会における「健康寿命」の延伸に寄与する成果と期待された。

abstract

Hepatocyte growth factor (HGF) is known to be an essential factor that activates quiescent myogenic stem satellite cells to enter the cell cycle and contributes to *postnatal* muscle growth and regeneration after injury. Very recently, we found that recombinant HGF is nitrated by incubation with peroxynitrite (ONOO^- : a highly reactive biomolecule generated by reaction of NO and superoxide radicals) to lose the biological activity *in vitro* in a mole-ratio (HGF : peroxynitrite) dependent manner. The subsequent experiments showed that nitration of HGF has clear pH dependence with a maximum range at pH 7.2-7.4 and the reaction occurs quickly within a few

seconds after adding of peroxyxynitrite to recombinant HGF. These emerging results may provide physiological significance of HGF nitration that abolishes satellite cell activation and the subsequent cell proliferation. Here we show that nitration of extracellular HGF was progressed in aging, as revealed by comparable direct-immunofluorescence microscopy of lower hind-limb muscle specimens collected from young (2-month-old), retired/adult (10-month-old), and old (20-month-old) male rats and stained with monoclonal antibodies against nitrated HGF ($n = 3$ per aged group). Importantly, the nitration of HGF was abundant for fast types IIa and IIx fibers visualized by Stained-Glass-like immunostaining of serial cryo-sections with anti-myosin heavy chain isoform antibodies. *In vivo* novel finding concerned may help in developing a novel strategy for application in human aging science that combats age-related atrophy, especially sarcopenia and frailty.

研究内容

< 研究背景と目的 >

骨格筋の成長・肥大・再生・維持は筋幹細胞(衛星細胞)の活性化とこれに続く増殖の活性に大きく依存していることが知られている¹⁻⁵⁾。本研究代表者は、衛星細胞の増殖活性を決定する活性化(休止期から G1 期への復帰)と休止化(セルフリニューアル)の制御機構に関する一連の研究の過程で、「筋幹細胞の活性化の抑制機構」の存在を洞察し、これが活性化因子 HGF (肝細胞増殖因子；現在認知されている唯一の活性化因子)のチロシン残基のニトロ化による不活化であることを明らかにした(論文執筆中)。

タンパク質のニトロ化とは、芳香族アミノ酸(主にチロシン残基の ϵ 位の炭素)に NO_2 基が導入される翻訳後化学修飾であり、生体内においては、 NO ラジカルと活性酸素の反応により速やかに生成するペルオキシナイトライト(ペルオキシ亜硝酸イオン: 短寿命・高反応性の生体内分子、半減期は 37°C , pH 7.2 で約 2 秒)によって非酵素的にニトロ化が起こることが知られている。 NO 基が導入されるニトロソ化とは異なる。また、「タンパク質の有機化学反応として古くは硫酸酸性条件下での硝酸やテトラニトロメタンによるニトロ化」と「生体内でのペルオキシナイトライトによるニトロ化」とは区別しなければならないことは自明である。衛星細胞の増殖や分化を制御する他の増殖因子(FGF2, IGF1, TGF- β 2, 3, EGF, PDGF-BB, transferrin)ではニトロ化は認められないこと、また、HGF のニトロ化は生理的 pH で極大となる顕著な pH 依存性を示すことから、HGF のニトロ化による「筋幹細胞の活性化抑制」は極めて重要かつ特異な生理学的意義を持つと考えられる。

一方、加齢に伴い筋肥大・再生能が減弱し、筋細胞(筋線維)が徐々に萎縮することが知

られている。また、筋が損傷した場合には、再生不全が起こり易く、筋線維が結合組織や脂肪組織に置き換わる現象も散見される(筋機能と柔軟性の低下)。これらの加齢性変化の要因に関してこれまでに、後述する「筋細胞老化説(細胞の刺激応答性の減弱や変質などを特徴とする加齢変化)」、「筋幹細胞(衛星細胞)数の減少」、「筋幹細胞に分化するとされる特殊な間質系細胞の減少」が報告されているが、研究者によって実験結果が異なっているなどの不整合性や矛盾がある。また、これらの要因(加齢に伴う諸現象)は列挙できても、なぜ・どのように誘導され徐々に進行するのかは不明である。加齢に伴う遺伝子発現プロファイルの変化などが幾つか指摘されているが、これを誘導する上流因子(細胞増殖因子を含めた細胞外微小環境(ニッチ)の変化など)とその作用機構を明らかにすることが強く求められている。従って現時点では、筋の加齢性変化を引き起こす仕組みは不明と言える。学術的に極めて重要な「問い」であると共に、健康寿命の延伸の鍵となる喫緊の課題である。筋機能低下を引き起こす主要な細胞外環境変化とその作用機構を解明できれば、これを積極的に予防・軽減・治療する方策を見出せると期待される。

本研究では、上記の加齢性変化(加齢性筋萎縮・再生不全)による筋機能低下が前述の「衛星細胞の活性化因子 HGF のニトロ化(不活化)」に起因すると着想し、これを新規ツール(ニトロ化 HGF に対する特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 2 クローンを作出済み)を用いて検証することを目的とした。国内外で主流な筋幹細胞老化説などを覆す独創的作業仮説であり、加齢に伴い筋幹細胞数が減少する現象を「HGF のニトロ化による不活化(筋幹細胞の活性化・増殖能の低下によるセルフリニューアルの減弱)」により説明するものである。また、HGF は線維芽細胞や脂肪細胞の増殖を抑制する働きがあるので筋組織の線維化・脂肪化も説明できる他、HGF のニトロ化は「リガンドと受容体の発現時期・場所・濃度等によって細胞動態が制御されている」とする細胞増殖因子科学の強力な新奇制御モードになると期待される。

<方法>

1. 筋肉試料の回収 : 室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間明・暗期サイクル、自由摂食・飲水条件下で S.D.系雌性ラットを飼育し、実験に供試した。若齢期(2 ヶ月齢)・成熟期(10 ヶ月齢)・老齢期(20 ヶ月齢)の後肢下腿部筋(ヒフク筋、足底筋、ヒラメ筋のふくらはぎ筋および前脛骨筋と EDL 筋)を採取した($n = 3$ 個体/月齢群)。試料は -80°C で凍結保存した。本研究に関する全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の審査・承認の下、実施した(承認番号: A30-143 および A20-014)。

2. ニトロ化 HGF の可視化 : 常法に従い、筋の長軸中央部から厚さ $20 \mu\text{m}$ の連続横断切片を作成し蛍光免疫顕微鏡法に供試した。使用した 2 種の抗ニトロ化 HGF モノクローナル抗体は、ヒト・マウス・ラット・イヌ・ネコ HGF のクリングルドメイン 1 および 2 のチロシン残基(Y)のニトロ化(ニトロチロシン)をそれぞれ特異的に認識するもので、それらの特

異性は Western blotting と ELISA で確認済みである。抗体を蛍光物質 (ALEXA) で標識し使用した (2 次抗体は不必要)。本報告書では、ニトロ化されることを *in vitro* で確認した 2 つのチロシン残基をそれぞれ Yxxx、Yzzz と表記する。

< 結果と考察 >

若齢期・成熟期・老齢期のラット後肢下腿部筋の連続横断切片を抗ニトロ化 HGF モノクローナル抗体で蛍光免疫染色し、ニトロ化 HGF の有無を可視化した (第 1 図)。Yxxx および Yzzz のニトロ化をそれぞれ特異的に認識する抗体いずれの場合でも、ヒフク筋 (Gas) および足底筋 (Pla) の細胞外マトリックス (ECM) に結合・保持されている HGF のニトロ化を示す蛍光強度が、加齢に伴い増加することが観察された。この結果は他の後肢下腿部筋である EDL 筋でも同様であった (data not shown)。また、HGF のニトロ化は筋の全域で一様に進行・蓄積するのではなく、筋の内腔側 (骨に接する側) の領域で顕著に起こる現象であることも分かった。遅筋 (遅筋型筋線維の割合が優勢な筋) の代表であるヒラメ筋 (Sol) では HGF のニトロ化は殆ど進行しないことも第 1 図より明らかになった。これらの違いが ECM に存在する HGF の量に依存しないことは、ヒフク筋の体表側の免疫染色像からも明らかである (第 2 図 B で矢尻で示したヒフク筋と足底筋の筋線維も参照: HGF はニトロ化陽性の筋線維と同程度 ECM に存在しているが、ニトロ化を示す蛍光シグナルは殆ど検出されなかった)。

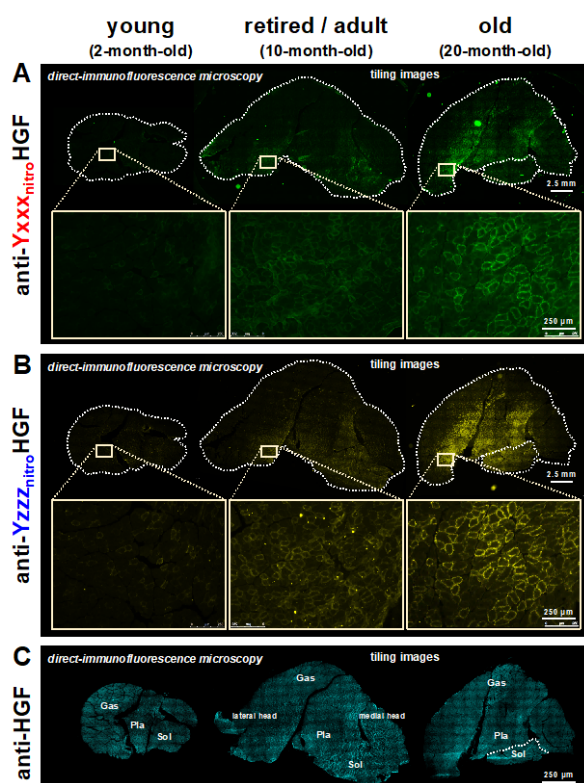
上述の HGF のニトロ化の筋部位・筋種選択性を考察するため、筋線維型との関連性を次に調べた (第 2 図)。Stained-Glass 様染色法⁶⁾により遅筋型筋線維 (I 型) と速筋型筋線維 (IIb, IIx, IIa 型) を 4 つの擬似カラーで表示することが可能であるので (第 2 図 A)、連続切片を用いて、それぞれの筋線維型と HGF のニトロ化との関係性を追究した。第 2 図 B に示すように、HGF のニトロ化が認められるのは速筋型筋線維のうち IIx と IIa 型のみであり、その他の筋線維型 (IIb と I 型) では HGF のニトロ化レベルは極めて低い (あるいはニトロ化しない) ことが明らかになった。これらの結果は IIb・IIx・IIa 型筋線維で構成されている EDL 筋でも同様であり、また、IIb 型が極めて優勢な前脛骨筋の体表側領域においては HGF のニトロ化は殆ど検出されないことも良く符合した。

以上、本研究により、ラットの加齢に伴い、ECM に結合・保持されている HGF のニトロ化 (不活化) が進行・蓄積することが明らかになった。速筋型筋線維である IIx と IIa 型で顕著に起きる加齢変化であり、速筋型筋線維が遅筋型に比べて萎縮しやすいというこれまでの知見とも矛盾はなかった。

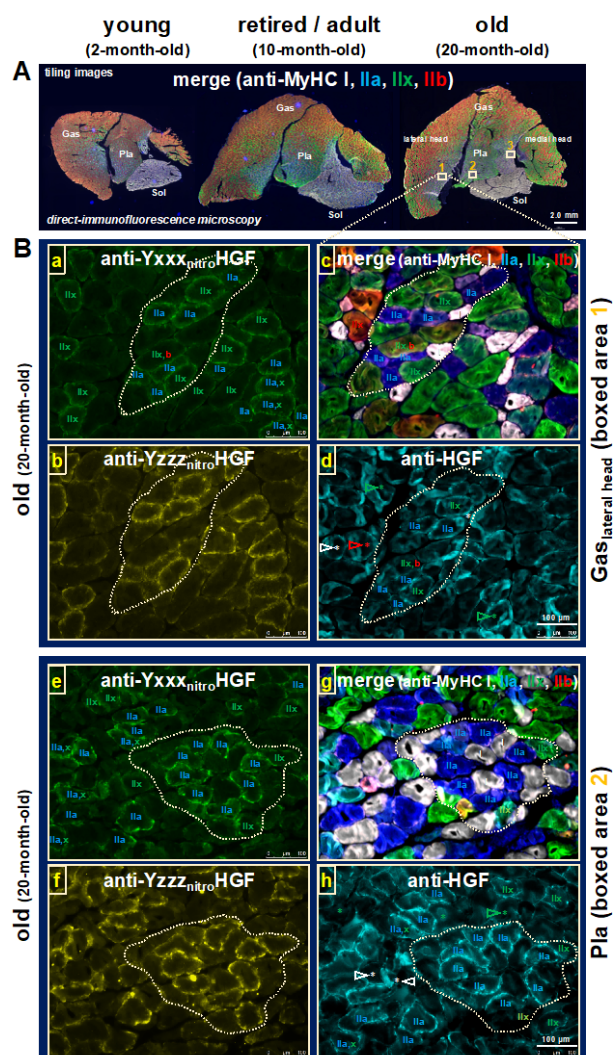
筋幹細胞 (衛星細胞) が物理刺激を受容すると、ECM に結合・保持されていた HGF が NO ラジカル依存的に遊離し細胞膜受容体 c-met に結合できるようになることが、衛星細胞の活性化カスケードの重要な要素である¹⁻⁵⁾。この活性化機構に基づいて、ECM に存在している HGF がニトロ化し生理活性を失うことは (c-met に結合できなくなることを既に確認

済み)、刺激を受けても衛星細胞は活性化し増殖できないことを意味しており、その影響が加齢変化（加齢性筋萎縮と再生不全、および筋幹細胞数の減少）として徐々に進行・蓄積すると考えられる。これまでの「細胞老化説」などの優れた研究成果に加えて新奇要因が明らかになりつつあると理解される一方、HGF のニトロ化・不活化だけで多くの加齢変化を明確に説明できることに本研究成果のインパクトがある。

今後、HGF のニトロ化（不活化）抑制活性を有する生体内分子や機能性食品成分を見出すことができれば、加齢に伴う筋萎縮・再生不全を積極的に予防・軽減する方策を見出せると期待される。現在、その候補物質 2 種の生理活性を精査しているところである。長寿高齢化社会における「健康寿命」の延伸に貢献すべく研究を継続する所存である。



第 1 図．加齢に伴う筋組織内 HGF のニトロ化の可視化．表記の月齢の S.D.系雌性ラットからふくらはぎ筋を採取し、それらの凍結連続切片を Alexa 標識抗ニトロ化 HGF モノクローナル抗体（A, B: ニトロ化 Yxxx と Yzzz をそれぞれ特異的に認識する抗体 2 種）および抗 HGF モノクローナル抗体（C: SantaCruz 社製）で蛍光免疫染色した。Gas, ヒフク筋; Pla, 足底筋; Sol, ヒラメ筋。各群 $n = 3$ の代表的なタイリング画像と拡大像を示した。



第 2 図．HGF のニトロ化と筋線維型（I 型および速筋型の IIa, IIx, IIb 型）との関連性．Stained-Glass 様染色によって筋線維型を識別し（A, タイリング画像）、その連続切片を Alexa 標識抗ニトロ化 HGF 抗体と抗 HGF 抗体で染色した（B）。

引用文献

- 1) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M. and Rice, G. M., *Methods in Cell Biol.* **52**: 155-176, 1997.
- 2) Tatsumi R., Anderson J. E., Nevoret C. J., Halevy O. and Allen R. E., HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* **194**: 114-128, 1998.
- 3) Tatsumi R., Hattori A., Ikeuchi Y., Anderson J. E. and Allen R. E., Release of hepatocyte growth factor from mechanical stretched skeletal muscle satellite cells and the role of pH and nitric oxide. *Mol. Biol. Cell* **13**: 2909-2918, 2002.
- 4) Tatsumi R. and Allen R. E., Mechano-biology of resident myogenic stem cells: molecular mechanism of stretch-induced activation of satellite cells. *Anim. Sci. J.* **79**: 279-290, 2008.
- 5) Tatsumi R., Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim. Sci. J.* **81**: 11-20, 2010.
- 6) Sawano S., Komiya Y., Ichitsubo R., Ohkawa Y., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y., and Mizunoya W. A one-step immunostaining method to visualize rodent muscle fiber type within a single specimen. *PLoS ONE* **11**: e0166080, 2016.

本助成に関わる成果物

[論文発表] なし（執筆中）

[口頭発表] 1 件

1. 今富菜々・城戸潤力・Alaa Elgaabari・中島 崇・澤野祥子・水野谷航・松吉祐児・鈴木貴弘・中村真子・辰巳隆一．筋幹細胞活性化因子 HGF のニトロ化による不活化の生理学的意義：加齢性筋萎縮・再生不全の主要因のブレークスルー（優秀発表賞応募演題）．日本畜産学会第128回大会（オンライン開催；2021年3月27-30日，九州大学）

[ポスター発表] 2 件

1. 城戸潤力・今富菜々・Alaa Elgaabari・奥田晶子・真鍋宜隆・中島 崇・澤野祥子・水野谷航・松吉祐児・鈴木貴弘・中村真子・辰巳隆一．筋幹細胞の活性化抑制機構の発見：活性化因子 HGFのニトロ化による生理活性の消失．日本畜産学会第128回大会（オンライン開催；2021年3月27-30日，九州大学）
2. Alaa Elgaabari・Nana Imatomi・Hirochika Kido・Yuji Matsuyoshi・Takashi Nakashima・Shoko Sawano・Wataru Mizunoya・Takahiro Suzuki・Mako Nakamura・Ryuichi Tatsumi．Insight linking between nitration and myogenic dysfunction of HGF/NK1 domain．日本畜産学会第128回大会（オンライン開催；2021年3月27-30日，九州大学）

[その他] なし