

サルコペニア(加齢性筋肉減弱症)における 疾患モデルの確立および発症機序の解明

聖マリアンナ医科大学 代謝・内分泌内科
准教授 横田 健一

(共同研究者)

聖マリアンナ医科大学 代謝・内分泌内科	教授	曾根 正勝
京都大学 iPS細胞研究所	准教授	櫻井 英俊
京都大学 糖尿病・内分泌・栄養内科	助教	藤倉 純二

はじめに

高齢者の寝たきりや要介護状態につながる転倒の原因としてサルコペニア（加齢性筋肉減弱症）が近年注目されているが、発症メカニズムの詳細な解明には至っていない。筋ミトコンドリア機能の低下は、筋肉量の減少や肥満・糖尿病につながることで報告されているため、ミトコンドリア機能不全がサルコペニアや代謝性疾患の共通原因である可能性に着目した。そこでミトコンドリアDNA (mtDNA) A3243G変異をもつ糖尿病患者からホストの核遺伝子が同じでmtDNAのA3243G変異の有無のみが異なるヒトiPS細胞を骨格筋細胞に誘導し、両者の機能を比較解析することにより、ミトコンドリア機能低下がサルコペニアや代謝性疾患に果たす役割を解明することを目的とした。

結 果

mtDNAのA3243G変異を有するミトコンドリア糖尿病患者の疾患iPS細胞(Diabetologia 2012; 55(6):1689-98)については、2名の患者由来のもの(Pt1(Mt1 iPS細胞)およびPt2(Mt2 iPS細胞))を使用した。まずMt1およびMt2からそれぞれ8つのクローンを選択した。Mt1 iPS細胞からは、2つの変異が検出されないクローン (Mt1-1、Mt1-2) と2つの変異が高いクローン (mtA3243G変異頻度77%[Mt1-3]と91%[Mt1-4])、Mt2 iPS細胞からは変異不検出クローン (Mt2-3、Mt2-8) と2つの変異が高いクローン (mtA3243G変異頻度70% [Mt2-6]および85%[Mt2-5])を選択した。次に共同研究者である京都大学iPS細胞研究所(CiRA)の櫻井らにより確立された方法により (Methods Mol Biol. 2016; 1353:89-99、Cell Rep Med.2021; 2:100298)、iPS細胞から骨格筋細胞への誘導を試みた (図1)。骨格筋への分化誘導後の細胞は光学顕微鏡において骨格筋様に形態変化し、骨格筋のマーカーであるミオシン重鎖 (MHC) や筋型クレアチニンキナーゼ (CKM) の発現を蛍光免疫染色 (図2) で確認できた。

図1

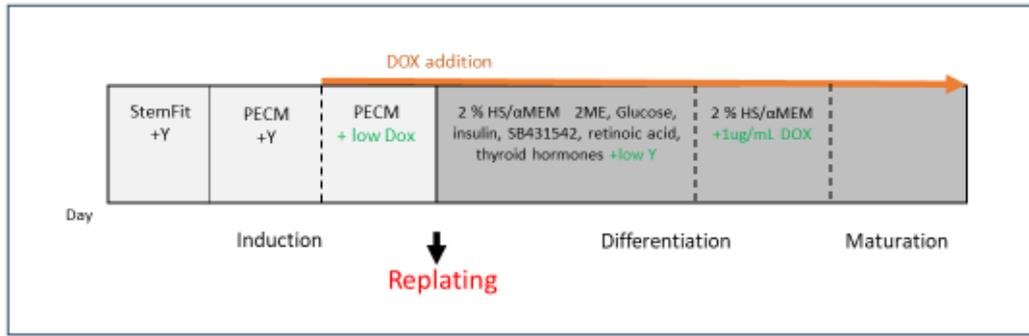
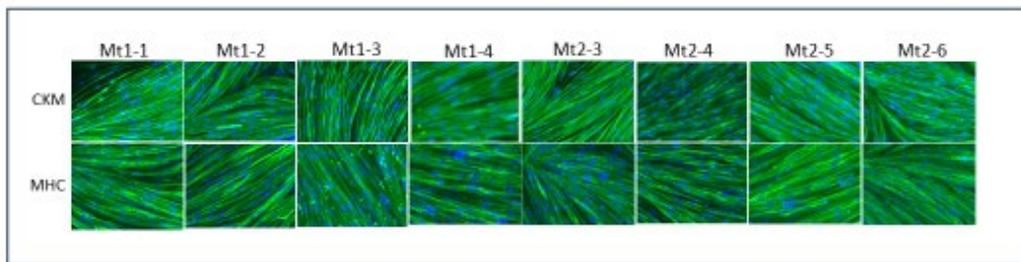
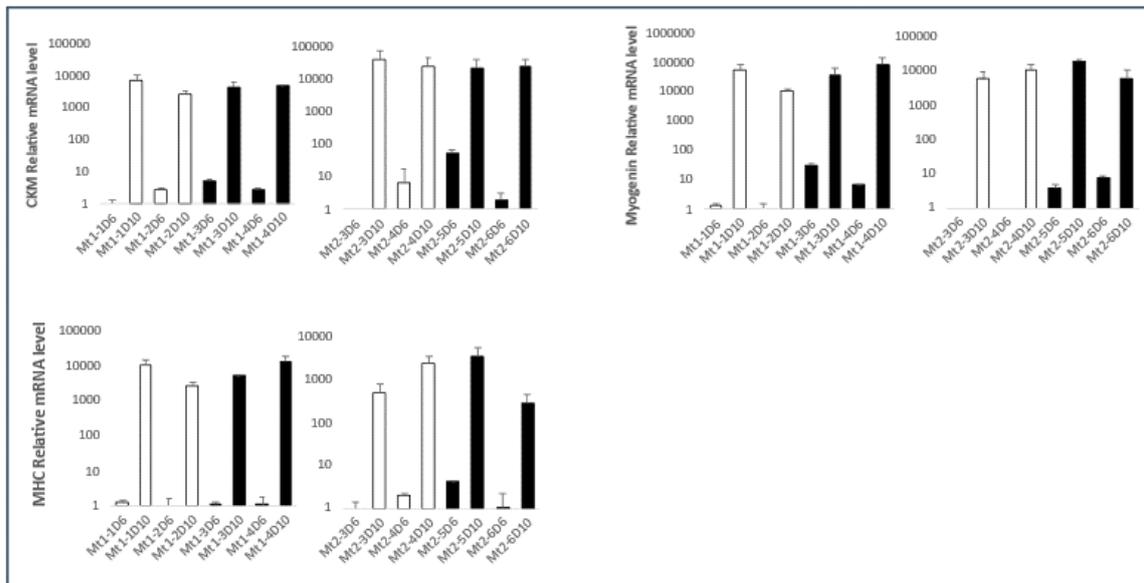


図2



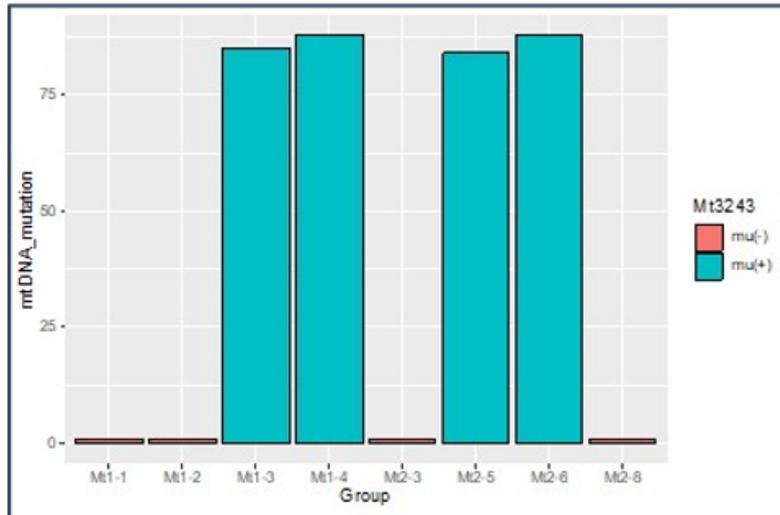
また得られた細胞において、骨格筋マーカーであるCKM、Myogenin、MHCの発現をリアルタイム定量PCR法で定量したところ、これらのマーカーが分化誘導後に有意に上昇していることが確認できた(図3)。

図3



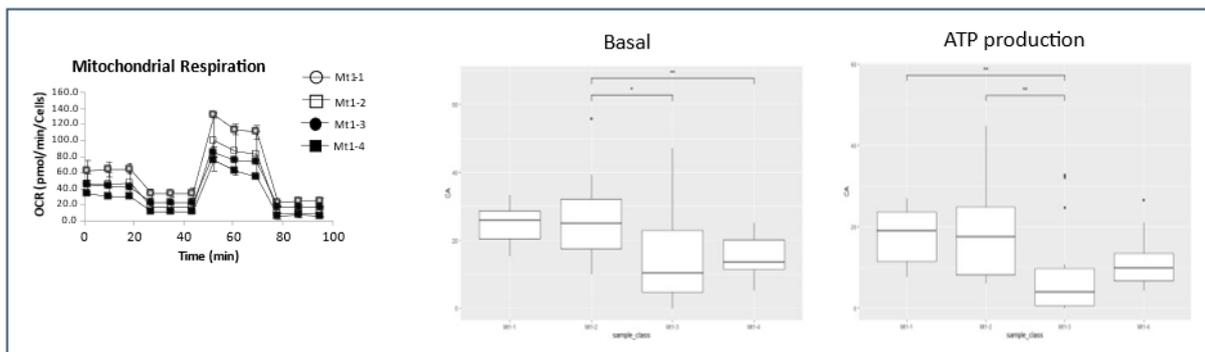
次に、これらの細胞におけるミトコンドリア変異率をInvader法にて測定したところ、Mt1-1、Mt1-2、Mt2-3、Mt2-8クローンでは変異が不検出であった一方、iPS細胞において変異が高いクローンであるMt1-3、Mt1-4、Mt2-5およびMt2-6では、変異率が高かった(図4)。

図4



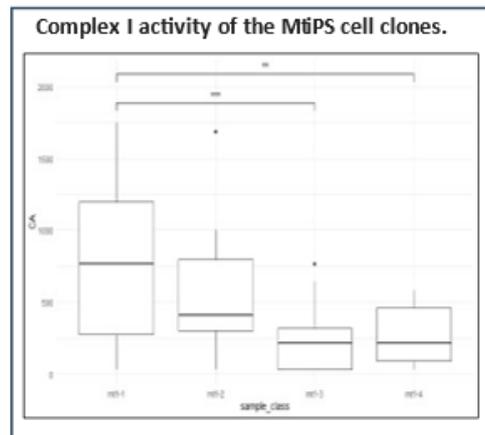
そこで次に、フラックスアナライザーを用いて細胞当たりの酸素消費速度(OCR)をミトコンドリア変異の有無で比較し、細胞内のミトコンドリアの活性に差が生じているかを検証した。その結果、Mt1-3、Mt1-4はMt1-1、Mt1-2に比較して、有意に基礎呼吸およびATP産生が低下していることが示された(図5)。

図5



また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の活性を定量した結果、Mt1-3、Mt1-4はMt1-1、Mt1-2に比較して、有意に活性が低下していることが示された(図6)。

図6



考 察

ミトコンドリアDNA (mtDNA) A3243G変異をもつ糖尿病患者からホストの核遺伝子が同じでmtDNAのA3243G変異の有無のみが異なるヒトiPS細胞において、共同研究者の櫻井らの報告した骨格筋への分化誘導法を行ったところ、骨格筋マーカーの蛍光免疫染色およびリアルタイム定量PCR法で骨格筋分化マーカーの発現が観察されたことから、iPS細胞は骨格筋に分化誘導されたことが示唆された。また、iPS細胞においてミトコンドリア変異未検出のMt1-1、Mt1-2、Mt2-3、Mt2-8細胞では骨格筋に分化後も変異が不検出であった一方で、iPS細胞において変異が高いクローンであったMt1-3、Mt1-4、Mt2-5およびMt2-6では、骨格筋に誘導後も高い変異率が維持されていることが確認できたことから、iPS細胞から骨格筋への分化誘導法はミトコンドリアDNAの変異率に影響を与えないことが示唆された。そしてフラックスアナライザーでの解析により、ミトコンドリアDNA変異を有する骨格筋誘導細胞では、ミトコンドリア機能が有意に低下し、その原因として、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの活性低下が考えられた。これまでの既報の研究ではホストのDNAが異なる細胞同士の比較であったが、本研究ではホストのDNAが同一で、ミトコンドリアDNAのみがことなる2群間でミトコンドリア機能の差異を観察できたことから、両群間におけるこの差異は、純粋にミトコンドリアDNAの差異によるものと結論付けられる。今後はミトコンドリア膜電位、および細胞当たりのミトコンドリア量、ATP含有量などを両群で比較検証する。また、インスリン刺激に対するグルコースの取り込みと応答を測定し、インスリン抵抗性に及ぼす影響を評価する。またインスリン受容体やグルコーストランスポーター(GLUT4など)の発現および膜移行の比較解析なども行っていく。さらに、エネルギー代謝の主要な調節因子であり筋肉タンパク質発現増強や筋肉機能に関与するAMPKの発現やリン酸化、mTORやIGF-1シグナルの活性、ミトコンドリア合成や運動による骨格筋の変化などに関与する転写共役因子PGC-1 α の各種アイソフォームの発現なども比較解析する。筋肉クレアチンキナーゼや、ミオスタチンなどマイオカインの発現や分泌も比較検討し、ミトコンドリア機能

低下によるサルコペニア機序の解明を目指す。

要 約

ミトコンドリアDNAの (mtDNA) A3243G変異をもつ糖尿病患者からホストの核遺伝子が同じでmtDNAのA3243G変異の有無のみが異なるヒトiPS細胞を骨格筋細胞に分化誘導させることに成功した。A3243G変異を有する骨格筋誘導細胞では、A3243G変異を有さない骨格筋誘導細胞と比較してミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iの酵素活性が低下し、その結果ミトコンドリアの基礎呼吸およびATP産生が低下していた。

文 献

1. Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, Nakao K, Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation, *Diabetologia*. 55 (6) :1689-98, 2012
2. Shoji E, Woltjen K, Sakurai H, Directed Myogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Methods Mol Biol*. 1353:89-99, 2016
3. Tomoya U, Toshifumi A, Takao N, Akitsu H, Hidetoshi S, A muscle fatigue-like contractile decline was recapitulated using skeletal myotubes from Duchenne muscular dystrophy patient-derived iPSCs, *Cell Rep Med*. 2:100298, 2021