

## Inflammaging に起因する骨格筋萎縮の病態解明

山口大学大学院医学系研究科 高次脳機能病態学講座  
富永 香菜

### [研究背景]

Dysferlin (DYSF)は、筋細胞に損傷を受けた際、細胞内へのカルシウムの流入に応答してリン脂質膜を誘導し、細胞膜を修復する働きをもつ事が知られている。DYSF病的変異をもつ筋ジストロフィー患者 (Dysferlinopathy) の筋組織ではDYSFの細胞膜局在が見られず、運動等で骨格筋に損傷を受けた際の膜修復が乏しいため、結果、著しい筋力の衰えと生命活動の低下が生じていると考えられている。これまでに、我々は、DYSFの膜局在量を定量化する独自のアッセイを構築し、患者から見つかったミスセンス変異115個の中から新規病的変異を64個特定することに成功した。さらに、病的変異をもつ筋ジストロフィーマウスの骨格筋のDYSF細胞膜局在量を上昇させ、損傷後の膜修復を有意に改善できる化合物を発見した (Tominaga K, Tominaga N et al., iScience, 2022, WO2023278684A1)。これは、これまで根治治療法がなかったDysferlinopathyに関して、初めて有効な治療薬を見出した画期的な成果である。

筋量が減少して筋力が低下する現象は、遺伝性疾患だけでなく加齢による筋萎縮でも引き起こされる。筋力維持には骨格筋の再生が重要な鍵であるが、その過程では、DYSFなどの膜修復関連タンパク質が関わる筋膜の修復だけでなく、骨格筋幹細胞の増殖、分化、融合による筋繊維形成機構が関わっている。そして、骨格筋再生には、筋細胞周辺に存在するさまざまな細胞との相互作用が重要である。単球は組織に移動したあとマクロファージへと分化するが、そのマクロファージにはM1型とM2型という主に2つの状態がある (Tidball J et al Development, 2014)。M1型(古典的活性化)マクロファージへの分化は、皮膚や脂肪組織等において加齢に伴う過剰な炎症反応傾向などの特徴的な変化を表す免疫老化 (Inflammaging) と深く関わっている。また、骨格筋繊維の融合段階ではM2型(代替活性化)マクロファージが関与しているとの報告がある。筋萎縮が生じる過程では、これらの分化様式のバランスが崩れている可能性がある。その一方で、DYSFは上述の通り骨格筋の細胞膜に局在しているが、単球にも骨格筋と同レベルで高発現していることがわかっている。Dysferlinopathy患者では、単球と骨格筋のDYSF発現量や遺伝子変異が相関していることから、より低浸潤な診断法として末梢血単球が用いられることもある (Zhang H et al., Frontiers in Neurology, 2021)。しかし、DYSFは筋ジストロフィーの原因遺伝子であることから主に骨格筋における機能についての研究報告が多く、単球のDYSFについての研究報告は乏しい。また、これまでにDYSFが単球の活性化を亢進するとの報告 (Zhang X et al., Translational Research, 2022) と、反対に、抑制的に働くとの報告 (Nagaraju K et al., AJP, 2008) があり、さらに疾患や加齢への関与についても未解明の部分が多い。

### [研究目的]

本研究では、骨格筋の膜修復関連タンパク質であるDYSFが単球で多く発現している事に着目し、新たな視点で免疫-骨格筋の連関による筋萎縮発症メカニズムを明らかにする。さらに、将来的には、加齢性筋萎縮症患者の末梢血単球に対するリプログラミングにより正常なDYSF発現量を維持し、全身の筋肉の再生を促進するような革新的な治療法の研究開発を目指す。

### [研究成果]

#### 1. 単球のDYSF発現量は加齢により増加する。

加齢とDYSF発現量の関係について検討した。まずヒトCD14陽性単球のDYSFタンパク発現量をNCBI Datasets (GSE56047) のデータを用いて再解析を行ったところ、年齢依存的にDYSFタンパク発現量が増加していることが明らかになった (図1a)。マウスでも同様の傾向がみられるか確認するために、若齢マウス (8W, ♂5匹, ♀5匹) と高齢マウス (12M, ♂5匹, ♀5匹) の大腿骨髄からCD11b陽性単球を分取し、DYSFタンパク発現量をウェスタンブロットングにて比較したところ、高齢マウスの方が有意に増加していることがわかった (図1b,  $p = 0.019$ )。

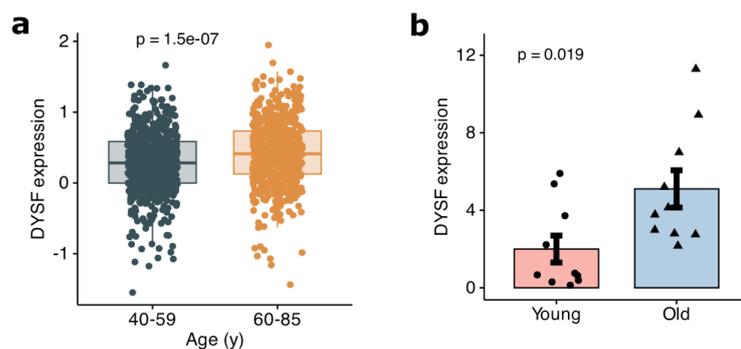


図1. DYSF発現量と加齢との関わり

a. NCBI Database (GSE56047) によるヒトCD14陽性単球のDYSFタンパク発現量の比較. 40 - 50 years old; n = 714, 60 - 85 years old; n = 702, Student t-test. b. マウスCD11b陽性単球のDYSFタンパク発現量の比較. ♂5匹、♀5匹、若齢(Young); 6w, 高齢(Old), 12M. S. D. Student t-test.

## 2. DYSF過剰発現はM1マクロファージへの分化を誘導する.

単球は、微生物由来の物質LPSやIFN- $\gamma$  (IFN-g)などのサイトカインの刺激により、主に炎症を引き起こすM1型と、IL-4およびIL-13の刺激により、主に組織修復に関わるM2型に分化することが報告されている。そこで、加齢により発現が亢進したDYSFが、単球の分化様式にどのような影響を与えているのか検討するために、培養マウス単球・マクロファージJ774A. 1細胞にDYSFを過剰発現させた細胞株を作製した。M1型に分化誘導するIFN- $\gamma$ 、または、M2型に分化誘導するIL-4を添加し、24時間培養後、リアルタイムPCR、フローサイトメトリー、ELISAにて分化様式の確認をした。その結果、IFN-gを処理したDYSF過剰発現単球では、コントロールベクターを導入した単球(コントロール)と比較して、M1型のマーカーであるinducible nitric oxide synthase (iNOS)やStat1のmRNA量が有意に増加していることが明らかになった(図2a)。また、DYSF過剰発現単球およびコントロールの生細胞を用いて、M1型の細胞膜表面で特徴的に発現するCD80、および、M2型で特徴的に発現するCD206をフローサイトメトリーにて解析したところ、DYSF過剰発現単球ではCD80が発現していることがわかった(図2b)。さらに、各々の細胞の培養培地中の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)をELISAにて測定したところ、IFN-gを処理したDYSF過剰発現単球では炎症性サイトカイン量が有意に増加していた(図2c)。

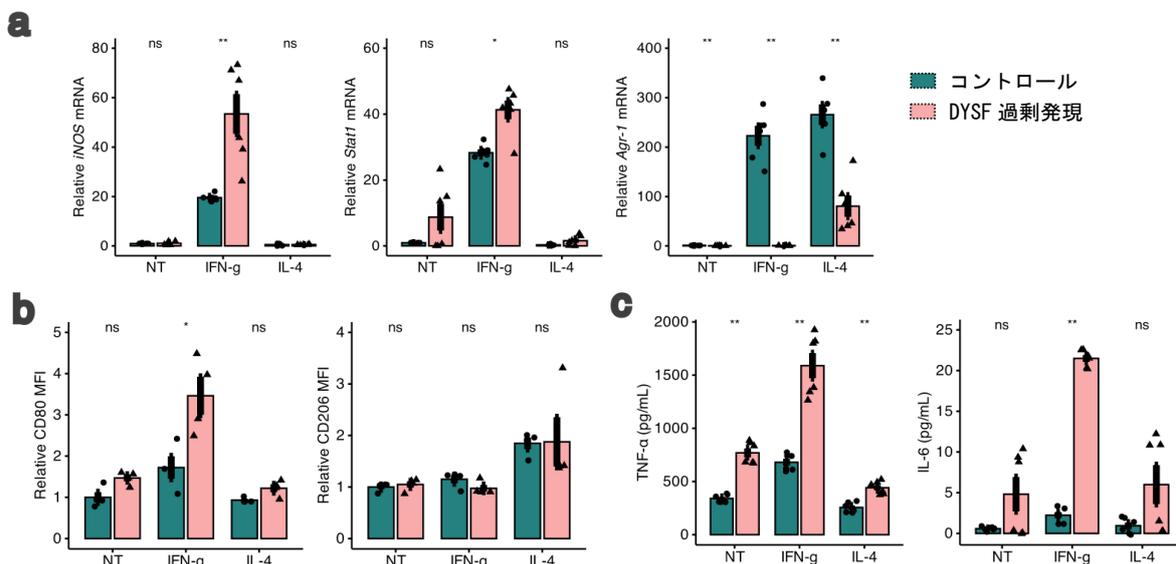


図2. DYSFはM1マクロファージへの分化を誘導する.

a. IFN-gおよびIL-4処理マウス単球J774A. 1のリアルタイムPCR. n = 6. b. IFN-gおよびIL-4処理J774A. 1のフローサイトメトリーによる細胞膜表面抗原の検出. n = 4. c. IFN-gおよびIL-4処理J774A. 1の培養培地を使用したELISAによる炎症性サイトカインの検出. n = 6. S. E. Student t-test.

### 3. DYSFを介したM1マクロファージへの分化は筋細胞分化・融合に影響する。

骨格筋繊維の融合段階ではM2型マクロファージが関与しているとの報告から、DYSF過剰発現によるM1型マクロファージへの分化は、筋繊維融合を抑制している可能性がある。そこで、DYSFの制御により分化したM1マクロファージが、筋繊維形成にどのような影響を与えるのかを確認するために、マウス単球・マクロファージJ774A.1とマウス筋芽細胞C2C12の共培養を行った。DYSF過剰発現した単球とコントロールベクターを導入した単球(コントロール)をボイデンチャンバーのインサートの上部へ各々培養し、C2C12を下部のウェルへ播種した。筋芽細胞の分化融合のために2%ウマ血清を含む培地で培養し、筋芽細胞(myoblasts)から筋管細胞(myotubes)への分化を経時的に観察した。筋繊維融合はウエスタンブロッティングおよび免疫染色による筋分化マーカー(myosin heavy chain isoform; MyHC, Dysferlin, Myogenin)の発現量により評価した。共培養の結果、コントロールでは分化誘導により、Dysferlinと筋管分化因子であるMyogeninの発現量が増加したが、DYSF過剰発現単球ではそれらのタンパク質の発現が抑制されていた(図3a)。また、同条件の細胞をMyHCの免疫染色により評価したところ、コントロールと共培養した場合は、分化誘導によりMyHC発現量が増加し筋管細胞への融合が多く確認できたのに対して、DYSF過剰発現単球の共培養では融合が抑制されていることが明らかになった(図3b, c)。さらに、MyHC陽性筋管細胞のFusion indexを計測したところ、コントロールと比較して、DYSF過剰発現単球と共培養した筋芽細胞の方では、高いFusion index値を示した(図3d)。

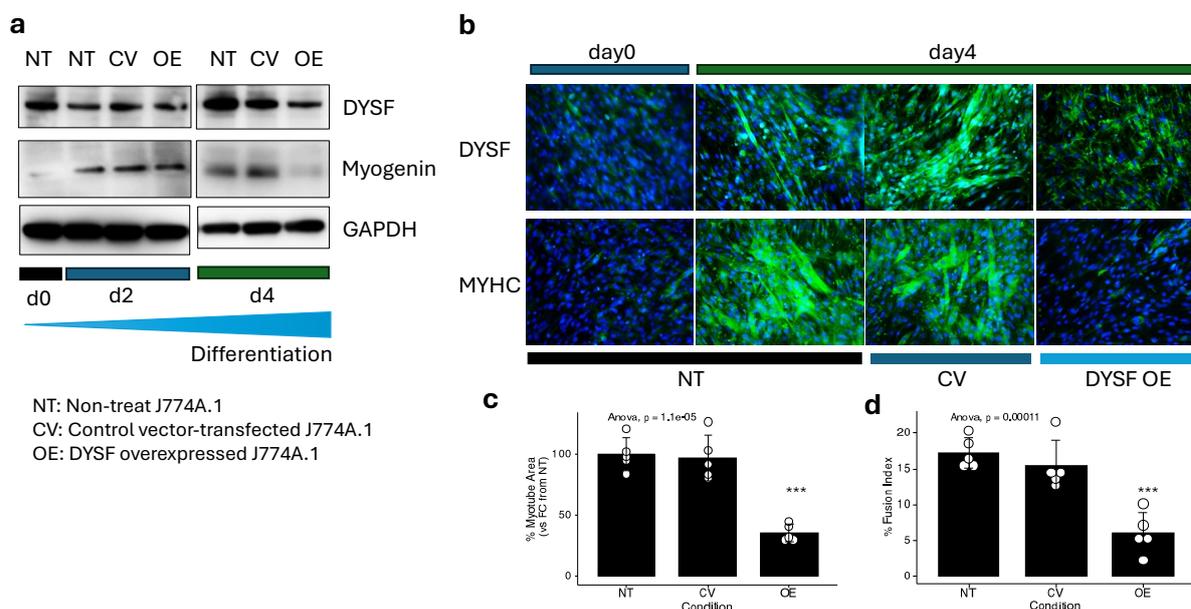


図3. DYSFによるM1マクロファージへの分化が筋細胞分化、融合に影響する。

a. IFN-gおよびIL-4処理マウス単球J774A.1と共培養したマウス筋芽細胞C2C12のウエスタンブロッティング。b. IFN-gおよびIL-4処理J774A.1と共培養したC2C12の抗MYHC抗体による免疫染色。200x。c. 分化後day4におけるMyotube Area. n = 4。d. 分化後day4におけるFusion index. n = 4。S.D. Student t-test.

#### [考察]

本研究では、免疫-骨格筋の連関に関わる新規因子としてDYSFに着目した。加齢により単球のDYSF発現量が増加することが明らかとなったが、今後、加齢に伴いなぜDYSFタンパク量が増加するのか、そのメカニズムに関して検討を行う必要があると考えている。アテローム性動脈硬化では、DNAメチル化酵素DNMT1がDYSFプロモーターのメチル化を制御しているとの報告があることから(Zhang X et. al., Translational Research, 2022)、加齢に伴ってDYSFプロモーターのメチル化に変化がある可能性がある。さらに、加齢によってDYSFタンパクが過剰に蓄積している可能性を考慮し、小胞体ストレスなどのタンパク質品質管理機構と加齢との関連性を検討することを考えている。単球でDYSFが過剰に発現した場合、炎症性マクロファージであるM1型へ誘導され、筋細胞の融合が抑制されることがわかった。しかし、今回の研究成果からは、これらの分化・融合の抑制がDYSF過剰発現単球から分泌される炎症性サイトカインによるものであるか、他の因子が関わっているのか未解明である。今後、DYSFに起因するマクロファージと骨格筋の相互作用に関してより詳細な解析が必要である。以上の研究成果は、今後高齢化に伴って有病率が増加すると推測されているサルコペニアやフレイルに対する新規治療法への応用につながることを期待している。

本研究は現在プレプリントにて公開されている(Tominaga K and Tominaga N. bioRxiv 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.10.02.679938>).