

## 筋の萎縮を検出する新たな尿中バイオマーカーとしての コネクチンの役割の解明

東京慈恵会医科大学 谷 端 淳  
(共同研究者) 同 南 沢 享  
同 寺 田 昌 弘

### **The Role of Connectin as a New Urinary Biomarker to Detect Muscle Atrophy**

by

Jun Tanihata,  
Susumu Minamisawa, Masahiro Terada  
*Department of Cell Physiology,  
The Jikei University School of Medicine*

#### ABSTRACT

Many studies have attempted to determine the associations between blood and urine biomarkers and muscle damage and atrophy. However, poor correlations between the changes in biomarker levels and the magnitude of muscle damage and atrophy have been reported. Recently, the N-terminal fragment (N-titin) of titin (connectin), a giant sarcomeric protein that is involved in muscular passive tension and viscoelasticity, has been reported to detect muscle damage in patients with skeletal muscle dystrophy and in healthy volunteers with endurance exercise. In the present study, we evaluated whether urinary N-titin is changed during a muscle atrophy period and whether its increase reflects muscle atrophy. C57BL/6 mice (male, 10 weeks of age) were used of this study. Urine samples were obtained after sciatic nerve removal surgery

to induce muscle atrophy. We measured the urinary levels of N-titin with a highly sensitive ELISA system. 11 days after sciatic nerve removal surgery, dissection was performed and the limb muscle was removed and weighed. Unfortunately, although skeletal muscle weights were predominantly reduced and mRNA levels of Atrogin-1 and MuRF-1 as markers of muscle atrophy, were increased, there was no significant changes in urinary titin levels. These results suggest that it is difficult to identify the muscle atrophy with urinary titin levels.

## 要 旨

筋損傷や筋萎縮を同定する新規バイオマーカーを血中並びに尿中から同定する研究が数多く行われているが明らかな相関が認められたという報告は少ない。近年、筋ジストロフィー患者や健康人の持久運動において、筋肉の弾力性と伸展性に関与する巨大サルコメアタンパク質・タイチン（コネクチン）が尿中で検出可能であると報告された。そこで、本研究では既報の筋損傷ではなく、筋萎縮の際に尿中タイチンレベルが変化するかどうか、その変化が筋萎縮を反映するか否かを検討した。10週齢雄 C57BL/6 マウスに対して坐骨神経切除術を行い筋萎縮誘導後、経日的に採尿を行った。我々は、高感度の ELISA システムを用いて、タイチンの尿中濃度を測定した。術後の 11 日目に四肢筋の摘出・重量測定を行った。残念なことに、骨格筋重量は大きく減少し、筋萎縮のマーカーである Atrogin-1 および MuRF-1 の mRNA レベルは増加したが、尿中のタイチンレベルは変化しなかった。これらの結果は、筋萎縮の程度を尿中タイチンレベルで同定することは困難であることを示唆している。

## 緒 言

骨格筋は自身の活動状態に応じ、環境に適した筋重量を維持している。筋力トレーニング、スポーツ運動等の運動負荷やリハビリテーションに

より筋重量は増し、逆に加齢性の筋萎縮（サルコペニア）、宇宙飛行、寝たきりやギブス固定に伴う筋の不動、あるいは悪性腫瘍、慢性疾患に伴うカヘキシアにより筋重量は減少する。このような筋肥大・筋萎縮（筋の可塑性）という現象は骨格筋におけるタンパク質の合成と分解のバランスによって制御されている。超高齢社会をむかえた本邦では宇宙飛行や不活動、サルコペニア、カヘキシアに伴う筋萎縮の克服が健康寿命延長のための社会的に重要な課題となっている。しかし、筋の萎縮の程度を検出する方法は現在のところ CT 等の手法しかなく、生化学的な手法で簡便にその程度を検出するバイオマーカーはまだ同定されていない。近年のプロテオミクスの研究成果から筋ジストロフィーによる筋変性<sup>1)</sup>や運動後の筋損傷<sup>2)</sup>を検出する尿中バイオマーカーとして横紋筋タンパク質の一つであるタイチン（コネクチン）が有用である可能性が示唆された。また、拡張型心筋症（Dilated cardio myopathy: DCM）患者における尿中タイチンと心機能ならびに生命予後の関係を検討したところ、尿中タイチンは DCM 患者における、低左心機能および予後不良と相関が高いことが報告されている<sup>3)</sup>。

尿中タイチンが筋萎縮の程度を同定することが出来れば、早期のリハビリテーション開始が可能となるだけでなく、病態の発症・進行を示す新たな指標となる可能性がある。さらに、不動化による筋萎縮の程度まで同定することが出来れば、宇

宙飛行時の筋萎縮の程度や骨格筋状態を的確にとらえ、宇宙滞在時のトレーニング開始時期・負荷の程度を決定できる可能性がある。筋萎縮の程度を血中バイオマーカーとは異なり、非侵襲的な採尿により明らかにすることが出来れば、将来的に患者自身によって自宅でも判定可能な点からも臨床的な応用価値は非常に高いと考えられるだけでなく、筋萎縮を早期に同定することが出来れば、医療費の削減や健康寿命の延長が期待できるため、超高齢社会に突入した本邦において社会的な貢献度は高いと考えられる。近年、骨格筋の萎縮は骨格筋に対する直接的な負荷の減少だけでなく、糖尿病や慢性腎不全により惹起されることも明らかになってきている。この様な多臓器連関によって惹き起こされる筋萎縮も尿中タイチンがバイオマーカーとして用いることが出来れば、早期介入が可能となると考えられる。

そこで、本研究では尿中タイチンが筋活動の低下によって誘導される筋萎縮を反映した新規バイオマーカーになり得るかを明らかにすることを目的とする。

## 1. 研究方法

### 1. 1 実験動物

10週齢のC57/BL6J雄マウス(n=12)を日本クレア株式会社から購入した。3日間の予備飼育後にマウスは坐骨神経切除術群(Den群:n=7)と疑似手術群(CON群:n=5)の2群に分けた。なお、本実験は東京慈恵会医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### 1. 2 飼育条件

坐骨神経除去/疑似手術後、採尿ケージにて飼育を行い、経日的に尿の採集を行った。餌・水は自由摂取とした。

### 1. 3 尿中タイチン・クレアチニンの測定

マウス尿中タイチンの測定にはサンドイッチ法を用いたタイチン測定ELISAキット(Cloud-Clone Corporation)を使用した。また、尿中タイチン値は尿中クレアチニン値で補正するため、尿中クレアチニン値の測定はLabAssay™ Creatinineキット(富士フイルム和光純薬株式会社)を使用した。両測定方法はキットのプロトコルに従い、duplicateで行った。

### 1. 4 解剖および骨格筋採取

マウスは術後11日目に頸椎脱臼にて安楽殺後、前脛骨筋(Tibialis anterior: TA)、長趾伸筋(Extensor digitorum longus: EDL)、腓腹筋(Gastrocnemius: GC)、ヒラメ筋(Soleus: SOL)を摘出し、重量を測定し、トラガガントゴムをのせたコルク片上に摘出筋を立て、液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結させ、-80℃の冷凍庫にて保存した。

### 1. 5 Real-time quantitative PCR

RNA抽出サンプルは、典型的な速筋であるTAと典型的な遅筋であるSOLを用いた。骨格筋のTotal RNAはイソペンタンで急速凍結させたサンプルをクライオスタッドで20μmの厚さで50~100枚薄切し、エッペンチューブに回収した後、Trizol(Thermo Fisher Scientific社)を用いて抽出した。その後、Nano Drop system(Nano Drop Technologies社)を用いてRNA濃度を測定した。Total RNAからQuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen)を用いて逆転写反応によりcDNAを作製した。cDNAはTB Green Premix Taq II(Tli RNaseH Plus)(タカラバイオ株式会社)を用いてThermal Cycler Dice Real Time System II(タカラバイオ株式会社)により定量した。PCR条件は95℃で5分間cDNAを変性させた後、1サイクル95℃15秒、60℃15秒の条件で50サイクル繰り返した。コントロール遺伝子と

して 18S rRNA を使用した。

### 1. 6 統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には student-t テストを用いて行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 2. 研究結果

### 2. 1 坐骨神経切除が体重・骨格筋重量に及ぼす影響

Den 群の体重は CON 群と同程度である一方で、坐骨神経切除により、速筋、遅筋の区別なく優位に筋重量が減少した (図 1)。

### 2. 2 坐骨神経切除が尿中タイチン濃度に及ぼす影響

坐骨神経切除後の尿中タイチン/クレアチニン

(Titin/Cr) 値の経日的変動を図 2 に示す。CON 群の Titin/Cr 値は安定して低値を示す一方、Den 群の尿中 Titin/Cr 値は術直後に上昇傾向 ( $p = 0.09$ ) を示したが、術後 3 日では CON 群と同値まで低下した。術後 8 日に一過性に尿中 Titin/Cr 値の上昇が認められたが ( $p < 0.01$ )、速やかに CON 群と同値まで低下した。

### 2. 3 坐骨神経切除により惹起される筋萎縮がトロポニン複合体の遺伝子発現に及ぼす影響

骨格筋および心筋に特異的なユビキチンリガーゼである Atrogin-1 や MuRF-1 は筋萎縮原因遺伝子として知られており、これら遺伝子の発現増加が筋萎縮の指標となることが知られている。図 3 は TA と SOL を用いてそれら遺伝子の発現解析を行った結果を示す。坐骨神経除去により筋萎縮

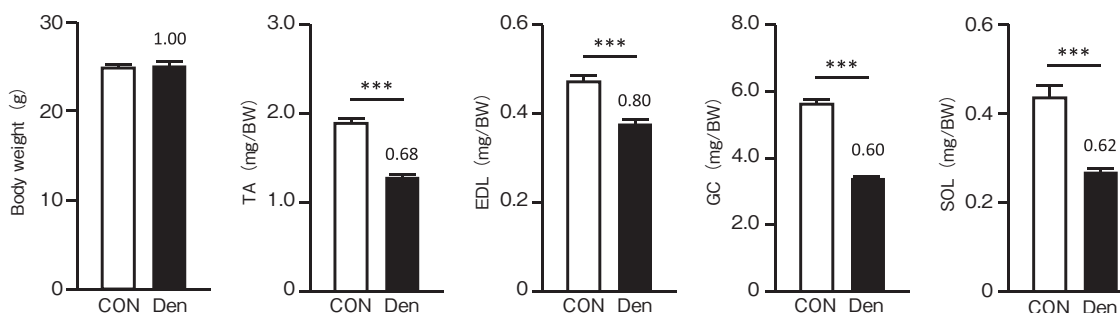


図 1 坐骨神経除去が体重、筋重量に及ぼす影響

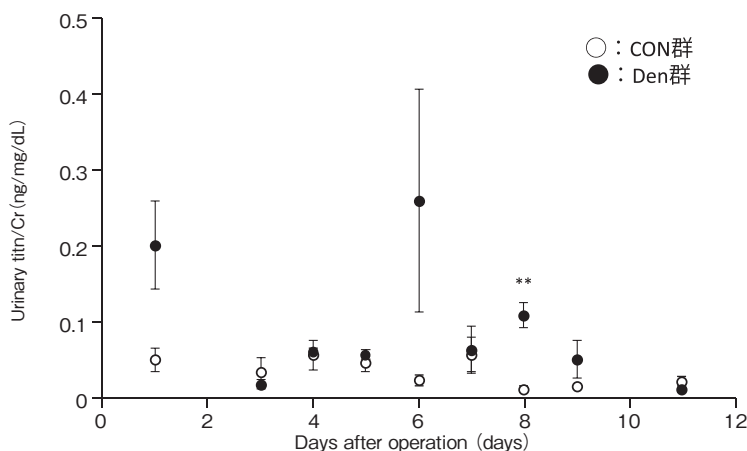


図 2 坐骨神経除去が尿中 Titin/Cr 値に及ぼす影響

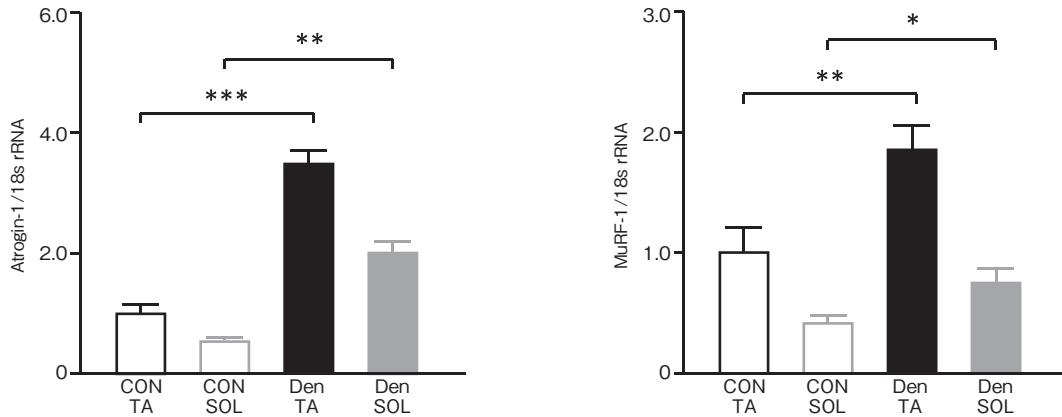


図3 坐骨神経除去が筋萎縮マーカーの発現に及ぼす影響

マーカーの発現はTA, SOLともに優位に増加していたが、その程度は遅筋より速筋の方が大きかった。

坐骨神経除去によって誘導される筋萎縮と尿中titin/Cr濃度に相関が認められなかったことから、筋萎縮がタイチン以外の構造/収縮タンパク質にどのような影響を与えるか検討するため、slow skeletal type troponin I (ssTnI), troponin C (TnC), fast skeletal type troponin T (fsTnT), slow skeletal type troponin T (ssTnT), tropomyosinの発現を調べた結果を図4に示す。その結果、坐骨神経除去により、速筋の遅筋化が認められる一方で、遅筋SOLでは坐骨神経除去によりssTnIは減少する一方で、ssTnTの発現が増加し、troponin isoformごとに応答性が異なっていた。

#### 2. 4 坐骨神経切除により惹起される筋萎縮がミトコンドリアの融合/分裂に及ぼす影響

近年、筋萎縮とミトコンドリアの構造並びに機能が大きく関わっており、ミトコンドリアの機能を外因的に維持すると、筋萎縮が抑制されるという報告もある。そこで、坐骨神経除去による筋萎縮がミトコンドリアの融合/分裂にどのように関与するかを検討するために、関連遺伝子(Mitofusin 1, 2: 外膜融合, OPA1: 内膜融

合, Drp1: 分裂, Fis1: 分裂, PDZD8: 小胞体とミトコンドリアの接触に関与)の発現を測定した。その結果を図5に示す。ミトコンドリア外膜の融合に働くmitofusin1, 2の発現は坐骨神経除去による筋萎縮の影響はTA, SOLともに受けなかった。一方、ミトコンドリア内膜の融合に関与するOPA1の発現は筋萎縮によりTAでは増加し、SOLでは減少した。また、ミトコンドリア分裂に働くDrp1の発現はTAでのみ増加した。Drp1と同様にミトコンドリア分裂に働くFis1もTAのみ増加傾向が認められた。また、小胞体とミトコンドリアの接触に必要なPDZD8の発現もTAで上昇しており、坐骨神経除去による筋萎縮がミトコンドリアの構造・機能・形態に何らかの影響を与えていることが示唆された。

### 3. 考 察

本研究は、筋の萎縮を新たな尿中バイオマーカーであるタイチンで検出可能かを検討することを目的として実施した。

本研究の結果より、坐骨神経除去による筋萎縮を誘導しても、経時的な尿中タイチンの上昇は認められなかったことから、筋萎縮の程度を尿中タイチンで検出することが難しいことが明らかになった。この結果は、筋ジストロフィーのような筋疾患<sup>1)</sup>や負荷の高い筋力トレーニング<sup>2)</sup>によ

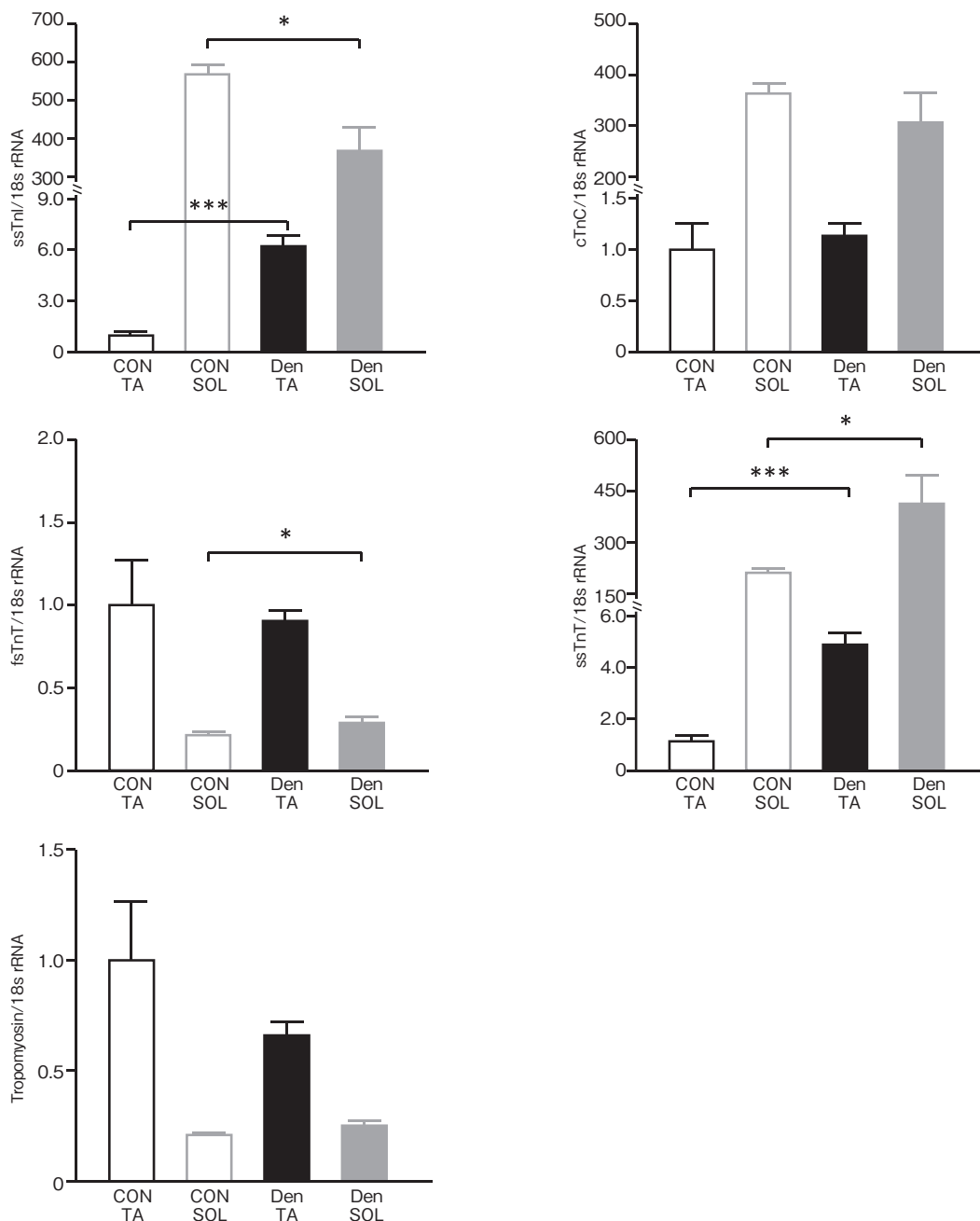


図4 坐骨神経除去が筋構造/収縮タンパク質発現に及ぼす影響

り尿中タイチン濃度が上昇するという既報とは異なる結果であった。このことは、筋ジストロフィーや筋力トレーニングでは筋細胞膜の不安定化により、タイチンを含む筋構成タンパク質が細胞外に放出されやすいが、今回の筋萎縮モデルでは細胞膜への影響は少なく、細胞膜が安定であるために

細胞外へ構造タンパク質が放出されず、タンパク質分解のみが起こったためと考えられる。また、今回用いた筋萎縮モデルは下肢筋のみが萎縮するモデルであるため、全身が萎縮する宇宙飛行や不活動、サルコペニア、カヘキシアにより惹起される筋萎縮よりも萎縮の量が少ない可能性がある

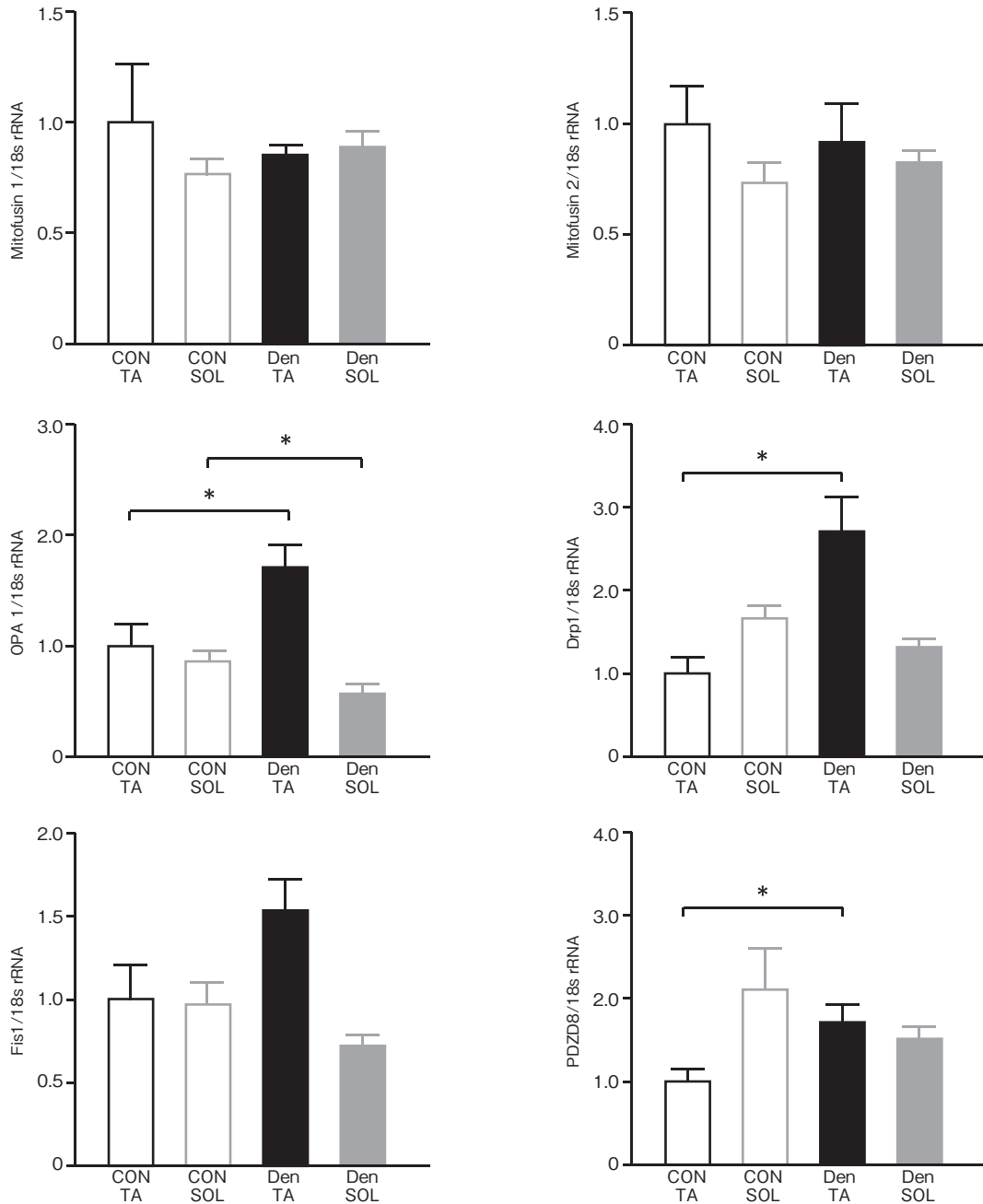


図5 坐骨神経除去がミトコンドリア融合/分裂に及ぼす影響

る。今後の検討課題としてステロイドが誘導する全身性の筋萎縮モデルを用いて尿中タイチンの動態を検討することが必要である。実際、ステロイド (Dexamethasone) 誘発性の筋萎縮では MMP-2 (Matrix metalloproteinase-2) によって断片化されたタイチンが血清中で同定されるという報告も

ある<sup>4)</sup>。しかし、筋萎縮により骨格筋タンパク質そのものが分解され減少するため、尿中に出てくるタイチンも同様に分解されると考えられる。このタンパク質分解経路からタイチンのみが除外され、尿中に放出することは考えにくいことから、タンパク質分解による筋萎縮が絶対的なタイチン



量の減少を誘導し、尿中への漏出量が減少すると想定され、筋萎縮を尿中タイチンで同定することは困難であると考えられる。また、ステロイド誘発性筋萎縮では MMP-2 でタイチンは断片化されるものの、坐骨神経除去による筋萎縮ではどのタイチンの断片化に関わる分子や断片化されたタイチンのサイズは不明であり、血清中に出るタイチンと尿中に出るタイチンとでは切断され得る部位が異なる可能性もあり、今後この点も詳細に検討しながら、筋萎縮とタイチンの関りを追求していきたいと考えている。

また、構造タンパク質、収縮タンパク質の発現変化の結果から坐骨神経除去に伴う筋萎縮は速筋の TA が遅筋化する一方で、遅筋の SOL は遅筋型 TnI の発現が減少し速筋化が認められたものの、遅筋型 TnT の発現は増加していたことから、今後の検討課題としてミオシン重鎖に対する免疫染色を行い、SOL の筋線維タイプの変化をより詳細に検討する必要がある。

近年、骨格筋の量的調節・質的調節にミトコンドリアが関連すること<sup>5)</sup>、ミトコンドリアがサルコペニアを誘導する候補機関として重要である<sup>6)</sup>ことが多く報告されている。また、坐骨神経除去による筋萎縮によりミトコンドリアの機能が低下することも知られている<sup>7)</sup>。本研究により、特に速筋の TA でミトコンドリア融合/分裂のマーカの発現が対照群と比較して上昇していたことから、ミトコンドリアの構造・機能に何らかの影響があることが示唆される。今後ミトコンドリアの構造的な変化が筋萎縮誘導後いつから始まるのかを電子顕微鏡を用いて詳細に検討するとともに、筋萎縮誘導後どのタイミングでミトコンドリア融合/分裂マーカー発現の変化、筋萎縮とミトコンドリアの機能低下を関連付けるシグナル経路などを検討していきたいと考えている。その候補としてはミトコンドリアから出る ROS シグナルを起点として筋小胞体からの  $Ca^{2+}$  シグナルを想

定しているが、まだ想定の域を出ないので、網羅的解析を含めながら検討していく必要がある。また、除神経がミトコンドリアの形態・機能にどのように影響するのか、メカニカルストレスからミトコンドリア機能低下へのシグナル伝達がどのようなものかも併せて検討したい。

#### 4. 結 論

坐骨神経除去により誘導される下肢筋のみの萎縮の程度を尿中のタイチン濃度で同定するのは現状では難しいと考えられる。また、坐骨神経除去による筋萎縮により troponin isoform の変化やミトコンドリアの構造・機能的な変化が筋線維タイプ別に起こることが明らかとなった。

#### 謝 辞

本研究の遂行にご助成賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Maruyama N., Asai T., Abe C., Inada A., Kawauchi T., Miyashita K., et al., Establishment of a highly sensitive sandwich ELISA for the N-terminal fragment of titin in urine, *Sci. Rep.*, 6: 39375 (2016)
- 2) Kanda K., Sakuma J., Akimoto T., Kawakami Y., Suzuki K., Detection of titin fragments in urine in response to exercise-induced muscle damage, *PLoS One*, 12: e0181623 (2017)
- 3) Yoshihisa A., Kimishima Y., Kiko T., Sato Y., Watanabe S., Kanno Y., et al., Usefulness of Urinary N-Terminal Fragment of Titin to Predict Mortality in Dilated Cardiomyopathy, *Am. J. Cardiol.*, 121: 1260-5 (2018)
- 4) Sun S., Henriksen K., Karsdal M.A., Armbrecht G., Belavý D.L., et al., Measurement of a MMP-2 degraded Titin fragment in serum reflects changes in muscle turnover induced by atrophy, *Exp. Gerontol.*, 58: 83-9 (2014)
- 5) Kitaoka Y., Takeda K., Tamura Y., Fujimaki S., Takemasa T., et al., Nrf2 deficiency does not affect



- denervation-induced alterations in mitochondrial fission and fusion proteins in skeletal muscle, *Physiol. Rep.*, **4**: e13064 (2016)
- 6) Alway S.E., Mohamed J.S., Myers M.J., Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia, *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **45**: 58-69 (2017)
- 7) Spendiff S., Vuda M., Gousspillou G., Aare S., Perez A., et al., Denervation drives mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of octogenarians, *J. Physiol.*, **594**: 7361-79 (2016)