

PRESS RELEASE (2024/09/25)

加齢に伴う筋萎縮と柔軟性低下を抑制する抗体を開発

—治療法の開発による健康寿命の延伸に期待—

ポイント

- ① 超高齢化社会において健康寿命の延伸は喫緊の課題
- ② 筋幹細胞(※1)活性化因子 HGF(※2)のニトロ化(※3)・不活化を抑制するモノクローナル抗体の作出に成功
- ③ ヒトや伴侶動物の加齢性筋萎縮・再生不全に対する抗体医薬への応用など、健康寿命の延伸に貢献すると期待

概要

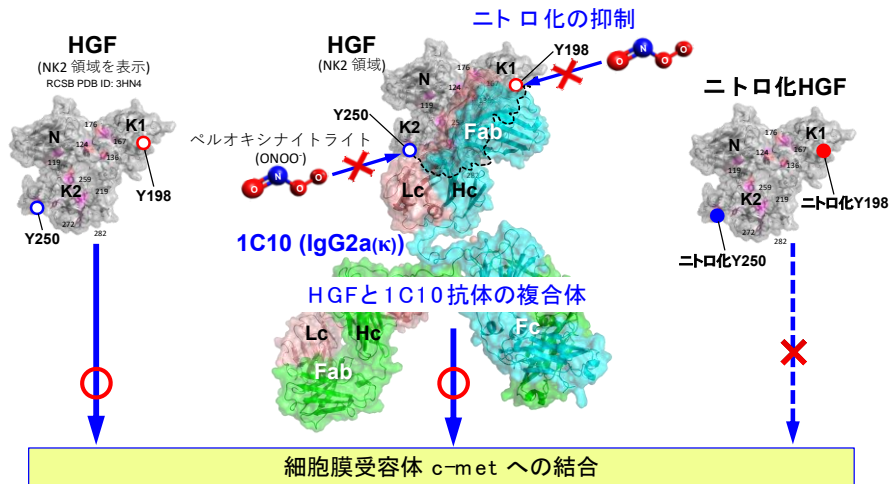
歳をとると、骨格筋はなぜ萎縮するのでしょうか？筋の柔軟性もなぜ低下するのでしょうか？効果的な予防法や治療法は何でしょうか？簡単そうに聞こえても答えるのは容易ではありません。酸化ストレスの軽減や適度な運動というこれまでの一般的な健康科学的施策に加えて、筋肉の加齢変化を引き起こす根本的な仕組みに基づいた画期的な方法の開発が望まれていました。

九州大学大学院農学研究院の辰巳隆一教授、鈴木貴弘准教授、中島崇助教、中村真子教授らの共同研究グループは、筋幹細胞（衛星細胞と呼ばれる”眠れる筋組織幹細胞”）の活性化因子 HGF（肝細胞増殖因子）がニトロ化されると生理活性を失うこと(※4)を見出し、この現象が加齢に伴い進行・蓄積することによって筋萎縮が進行するという新しい学説を本年1月に発表しました（2023年11月にプレスリリース；*Aging Cell* 23(2), e14041, 2024, <https://doi.org/10.1111/accel.14041> に掲載）。この研究成果に基づいて、HGF のニトロ化・不活化を抑制するモノクローナル抗体の作出を目指し、これに成功しました（抗体識別記号 1H41C10；略記号 1C10）。

この1C10抗体は、ニトロ化されるチロシン残基の極近傍に結合することで、HGF のニトロ化を抑制する特殊な抗体です。抗体が結合した状態でも細胞膜受容体との結合性は保持されているので、筋幹細胞の活性化とこれに続く増殖・分化などの生理活性も損なうことはありません。また、抗体のFab領域（抗体分子の「Y」の上半分の「V」の部分）がニトロ化抑制効果を発揮することも明らかにしました。

これらの研究成果はヒト・ネコ・イヌなどの HGF にも広く適用可能です。ヒトや伴侶動物の加齢性筋萎縮症に対する抗体医薬への応用が期待され、健康寿命の延伸に大きく貢献すると期待されます。

本研究成果は英国の雑誌「*Aging Cell*」に2024年9月19日（木）（日本時間）に掲載されました。



研究成果の概要 (何が“はじめてなのか”を中心に)：骨格筋を含めて様々な組織で多彩な機能を有する細胞増殖因子 HGF (筋組織では筋幹細胞の活性化因子) のニトロ化・不活化を抑制するモノクローナル抗体 (識別記号 1C10) の作出に成功しました。抗体の Fab 領域がニトロ化抑制効果を発揮します。抗体医薬への応用が期待され、これまで不可能とされてきた積極的な治療法の開発がはじめて見えてきました。

【研究の背景と経緯】

本研究代表者の辰巳隆一教授はこれまでに、骨格筋の肥大・再生の最初のイベントある「筋幹細胞(衛星細胞)の活性化」に関する研究を行い、物理刺激を引き金とする HGF (肝細胞増殖因子) 依存的な分子機構を明らかにしました。即ち、細胞外マトリックス(ECM)に保持されている HGF が遊離し、これが細胞膜受容体 c-met に結合すると筋幹細胞が活性化する連鎖調節機構(カスケード)を解明しました。HGF は現在までに認知されている唯一の活性化因子(液性因子)です。

この研究の過程で、活性化因子 HGF がニトロ化されると、細胞膜受容体 c-met への結合能を失うことを見出しました (生理活性の消失)。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・蓄積することを明らかにし、この現象が加齢性筋萎縮・再生不全 (結合組織の浸潤により筋線維(※5)の数が減少し筋収縮張力が十分に回復しない他、筋の柔軟性も低下する現象) の基礎的要因であるとする学説を、昨年 11 月にプレスリリースしました (Elgaabari *et al.*, *Aging Cell*23(2), e14041, 2024, <https://doi.org/10.1111/accel.14041> に掲載)。この学説を支える重要な知見を以下に追記します。(下図参照)

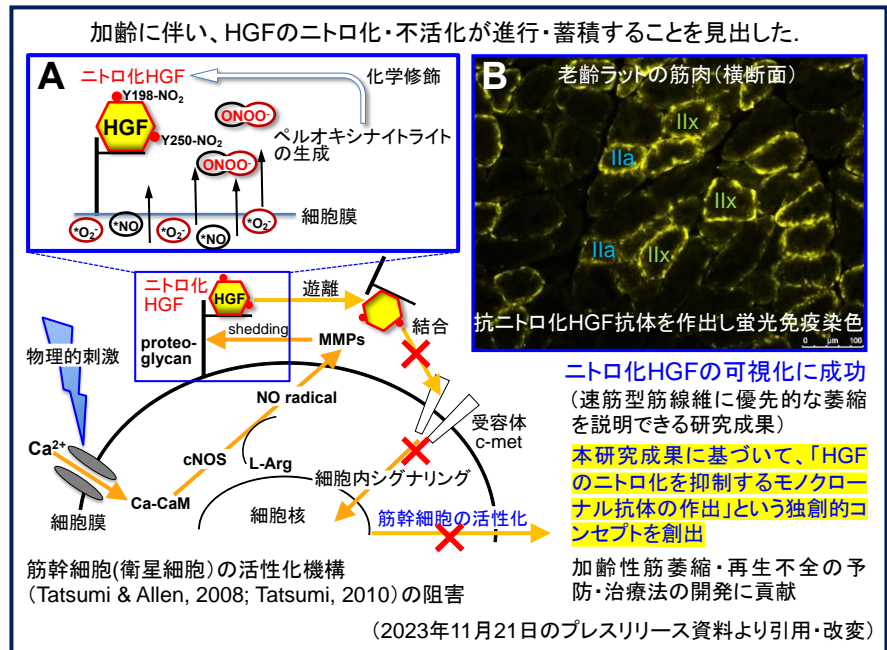
- HGF による筋幹細胞の活性化は、筋肥大・再生の最初の必須イベントとして筋の恒常性に寄与しているので、これが加齢に伴い機能しなくなることが筋萎縮の根幹要因であることは容易に理解できます。また、HGF はコラーゲンを合成する線維芽細胞の増殖を抑制する機能を有しているので、HGF のニトロ化は結合組織の増加も説明できます。このように、筋幹細胞の活性化因子 HGF のニトロ化・不活化によって筋の加齢変化を明確に説明できます。
- 筋幹細胞の増殖や分化を制御する他の細胞増殖因子 (FGF2, IGF1, TGF- β 3) ではニトロ化は認められないことから、HGF のニトロ化・不活化は特異的かつ重要な生理学的意義を持つと考えられます。
- HGF がニトロ化を受けるチロシン残基(Y)は Y198 と Y250 です。この 2 つのチロシン残基は受容体 c-met との結合部位を構成していることから、ニトロ化によって立体構造が変化し c-met に結合できなくなると推測されます (【用語解説】(※4)HGF の生理活性の消失 を参照)。

- ・ HGF のニトロ化は、速筋型の IIx, IIa 型筋線維で顕著に進行・蓄積することを見出しました（下図のパネル B 参照）。このことは、ヒトの骨格筋の加齢性萎縮の筋線維型選択性（速筋型筋線維が優先的に萎縮すること）を説明できるはじめての成果です。ヒトでは、速筋型の IIb 型筋線維は殆ど存在しませんので、IIx, IIa 型筋線維が主要な速筋型筋線維といえます。従って、HGF のニトロ化を原因とする加齢性筋萎縮・再生不全はヒトでは特に顕著に進行すると考えられます。

これらの研究成果は、ニトロ化 HGF を特異的に認識するモノクローナル抗体（ニトロ化 Y198-HGF

抗体およびニトロ化 Y250-HGF 抗体）の作出に成功したことに大きく依存しています（市販のニトロ化チロシン抗体とは異なり、ニトロ化した HGF に特異的に結合する抗体です）。この作業過程で多種類の抗体が得られ、この中から、HGF のニトロ化を抑制するモノクローナル抗体を選抜（スクリーニング）することを計画しました。研究用試薬や抗体医薬としての利用を意識した研究コンセプトです。最終的に、

ニトロ化 Y198 を含む合成ペプチド(11 残基)を抗原として得られた抗体から抗体識別記号 1H41C10 と 1H42F4N のモノクローナル抗体が得られました。本研究ではこれら 2 つの抗 Y198 ペプチド抗体のニトロ化抑制活性を調べることから研究を開始しました。詳細は次項をご覧ください。

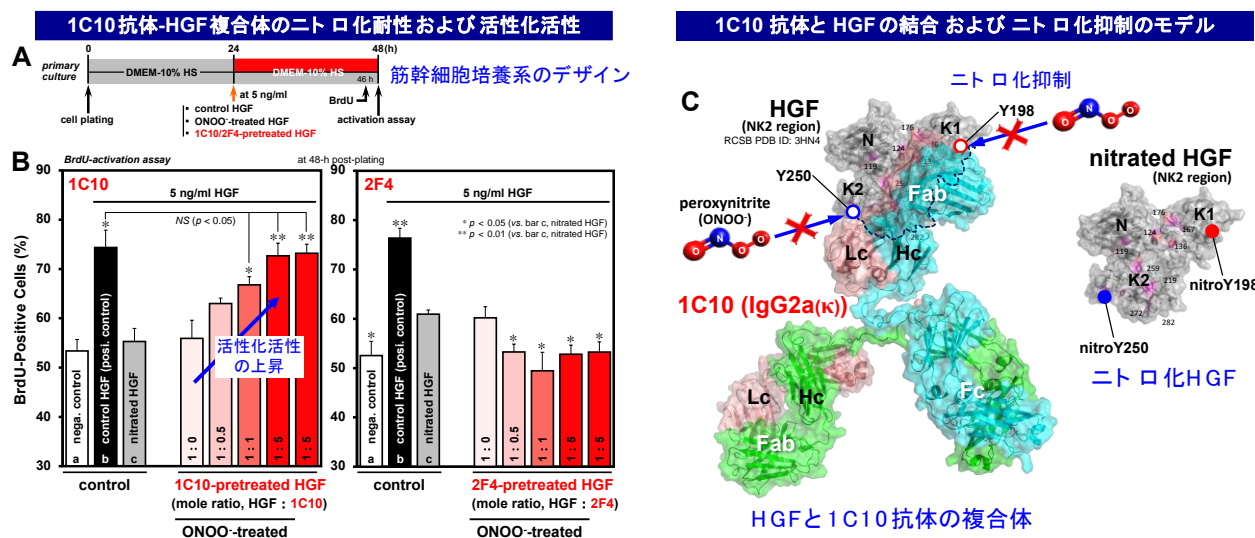


【研究の内容と成果】(第1図参照)

- ・ 前項に記載したようにまず、抗 Y198 ペプチド抗体から抗体識別記号 1H41C10 (略記号 IC10) と 1H42F4N (略記号 2F4) の 2 種のモノクローナル抗体をスクリーニングしました。共に、ELISA および Western blotting においてニトロ化 HGF と非ニトロ化 HGF の両方を認識すること、また、HGF のニトロ化の有無によって抗体の結合親和性が大きく異なることを観察しました。このことから、Y198 のニトロ化の有無を認識できるように Y198 の極近傍に抗体が結合すること、つまり、抗体の Fab 領域の先端部にある抗原認識部位が Y198 の極近傍に結合すると洞察しました。
- ・ 1C10 抗体と 2F4 抗体をそれぞれ HGF に添加し 30 分間反応させた後（抗体を Y198 の極近傍に結合させる前処理）、ペルオキシナイトライト (ONOO⁻) による HGF のニトロ化を誘導したところ、1C10 抗体の濃度依存的にニトロ化が抑制されることを見出しました。一方、2F4 抗体には活性は認められませんでした。類似した結合様式を持つ 2 種の抗体ですが、ニトロ化抑制活性は異なっていました。
- ・ 更に興味深いことに、1C10 抗体は Y250 のニトロ化も Y198 と同様に抑制しました。全く予想していなかった結果です。1C10 を Fab 領域と Fc 領域の 2 つに切断し、どちらにニトロ化抑制活性があるかを調べたところ、Fab 領域に Y198 と Y250 の両方に対してニトロ化抑制活性があることを見出しました。Fab 領域の抗原認識部位が Y198 の極近傍に結合すると、Fab 領域の特定の部位が Y250 に接近するようになり、ペルオキシナイトライトのアクセスを生化学的あるいは物理化学的に制限すると考察しました（立体障害; steric hindrance; 第1図のパネル C 参照）。
- ・ 1C10 抗体を結合させた HGF（ニトロ化誘導処理済み）を衛星細胞の培養系に添加し活性化活性を測

定したところ、コントロール HGF (1C10 抗体が結合していない非ニトロ化 HGF) に匹敵する活性を保持していることを確認しました (第 1 図のパネル A, B 参照)。このことは、c-met 結合アッセイ (ELISA 様アッセイ) によって支持されました。これらの実験結果は、1C10 抗体が Y198 近傍に結合した状態でも、細胞膜受容体 c-met に結合できることを示しています。Y198 を含む結合領域が c-met に結合するとは考えられず、Y250 領域を介して c-met に結合すると考えるのが適当です。1C10 抗体と HGF の結合複合体は衛星細胞を活性化する生理活性を保持していることがわかりました。

このように、作出した 1C10 抗体は極めて特殊な免疫グロブリン タイプ G (IgG) であると言えます。HGF に結合しニトロ化を強力に抑制する一方で、1C10-HGF 複合体は細胞膜受容体 c-met への結合親和性を保持するという特性は、HGF の活性保護剤として極めて有用です。前述の 2F4 抗体がそのことを傍証しています。1C10 抗体の Fab 領域の構造がその特殊性を担保していることは前述の通りです。



第 1 図. 1C10 抗体-HGF 複合体のニトロ化耐性および筋幹細胞活性化活性 (2F4 抗体との比較) .

1C10 抗体を結合させた HGF (ニトロ化誘導処理済み) を衛星細胞の培養系に添加し、BrdU 取り込み法により活性化活性を測定した (パネル A に示した培養系デザイン参照)。HGF に対する 1C10 抗体の添加モル比の増加に伴い活性化活性が上昇し、モル比 1:1 以上で陽性コントロール (bar b) に匹敵するレベルに達した (パネル B の左カラム)。この結果は 2F4 抗体とは対照的であった (パネル B の右カラム)。パネル C には、1C10 抗体と HGF の結合モデルおよびニトロ化抑制機構モデル (ペルオキシナイトライト (ONOO) の Y198, Y250 へのアクセスに対する立体障害) を示した。(当該論文の Fig. 2 から抜粋し加筆・改変)

【今後の展開】

本研究で作出した 1C10 抗体はヒト・ネコ・イヌ・マウス・ラットなどの HGF に広く適用可能です。したがって、ヒトや伴侶動物の加齢性筋萎縮・再生不全 (加齢性サルコペニアとその前段階のフレイルを含めて) の積極的な予防・治療法への展開が期待されます。それによって、高齢期の ADL・QOL 低下のリスク要因を軽減し健康寿命の延伸に貢献が期待されます。

また、肝硬変、慢性腎不全、肺線維症、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症、筋萎縮性側索硬化症、急性脊髄損傷など様々な疾患や病態に対する治療法として HGF ドラッグの投与が試行されていますので、酸化ストレスレベルが高い環境での HGF 活性保護剤として 1C10 抗体の有用性も期待されます。

本研究の実験結果は *in vitro* 実験系で得られたものですので、実験動物に対する投与実験を行い *in vivo* での有効性や安全性を確認することが必要です。ヒトの製薬化に向けては治験を含めて多数のステップがあります。前項で記載した研究成果は 1C10 抗体およびその Fab セグメントのポテンシャルを明らかにしたものであり、それらの *in vivo* での高い有効性や有用性を実証する予定です。

【用語解説】

(※1) 筋幹細胞（別名：衛星細胞）：

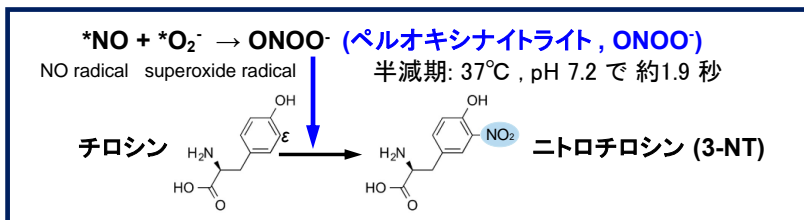
骨格筋組織に存在する幹細胞。通常は休止した状態にあるが（細胞周期でいう休止期）、運動や筋損傷などの物理刺激を受けると HGF（肝細胞増殖因子）依存的に活性化し増殖を開始する。その後、増殖した細胞は互いに融合し新しい筋線維（骨格筋を構成する主要な細胞。細長く大きな多核細胞なので“筋線維”と呼ばれる）を形成するほか、既存の筋細胞に融合する。これにより筋線維の肥大・再生が起きる。

(※2) 活性化因子 HGF（肝細胞増殖因子）：

1980年代前半に、肝臓から同定された細胞増殖因子。英語表記（hepatocyte growth factor）の頭文字をとって HGF と命名された。種々の組織や細胞で多彩な機能を発揮しており、多機能性細胞制御因子として認知されている。骨格筋においては、筋幹細胞の活性化を誘導することが認知されている唯一の因子である。活性化した筋幹細胞の増殖を促進する一方で、線維芽細胞の増殖や脂肪細胞の肥大化を抑制する働きを知られている。全身性のノックアウトは致死性であることから、HGF の重要性は容易に理解される。

(※3) ニトロ化（下図参照）：

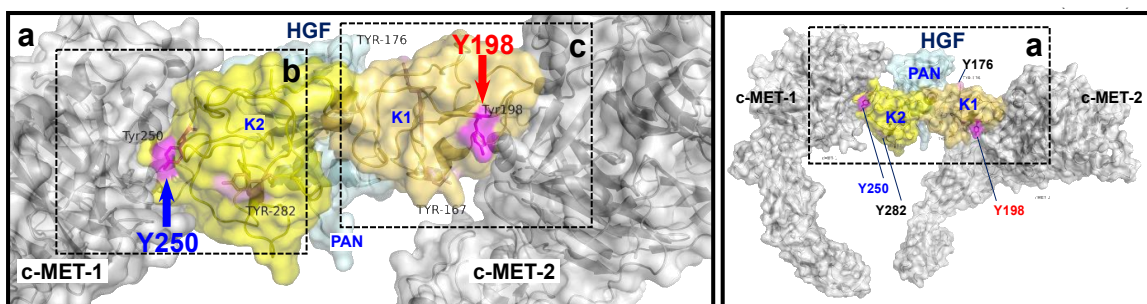
特定の芳香族アミノ酸（主にチロシン残基）の側鎖にニトロ基（-NO₂）を導入する翻訳後化学修飾反応。酸化反応に分類される。生体内において、一酸化窒素ラジカル(*NO)と活性酸素(*O₂⁻)との反応により速やかに生成するペルオキシナイトライト(ONOO⁻、別名 ペルオキシ亜硝酸イオン；単寿命の高反応性生体内分子)によって非酵素的にニトロ化が起こる。-NO 基が導入されるニトロソ化(ニトロシル化)とは異なる。また、「タンパク質の有機化学反応として古くは硫酸酸性条件下での硝酸あるいはテトラニトロメタンによるニトロ化」と「本研究でのペルオキシナイトライトによるニトロ化(生体内反応)」とは区別される。



(※4) HGF の生理活性の消失：

前述の通り、HGF は細胞増殖因子であるので、細胞膜受容体 c-met に結合して細胞内シグナリング活性を発現する。HGF のニトロ化はチロシン残基(Y)198 と 250 の 2箇所で起き、これにより受容体 c-met への結合性が消失することを明らかにした (Elgaabari *et al.* 2024)。Y198 と Y250 は c-met 結合部位を構成していることから、ニトロ化により立体構造が局部的に変化し c-met に結合できなくなったと推測される。

(下図参照；Elgaabari *et al.* (2024) の Supplementary Fig.より抜粋；Uchikawa *et al.* 2021, *Nature Communications* より引用し、加筆・改変して作成)



(※5)筋線維：

筋線維は速筋型（易疲労性あるいはⅡ型とも呼ばれる）と遅筋型（抗疲労性,Ⅰ型）の2つに分類され、速筋型はⅡb,Ⅱx,Ⅱaに細分化される。筋線維型組成（速筋型と遅筋型筋線維の相対比）は骨格筋の収縮速度や疲労耐性などの収縮特性を決める重要な要素である。また、毛細血管の密度、運動神経末端の接着様式、細胞内脂肪滴の程度も両者で異なることが知られている。

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費（JP21H02347, JP24K01911）の助成研究の一部として実施したものです。

【論文情報】

掲載誌：Aging Cell (John Wiley & Sons Inc.)

タイトル： *In vitro* immuno-prevention of nitration/dysfunction of myogenic stem cell activator HGF, towards developing a strategy for age-related muscle atrophy

著者名： Sakiho Tanaka, Alaa Elgaabari, Miyumi Seki, So Kuwakado, Kahona Zushi, Junri Miyamoto, Shoko Sawano, Wataru Mizunoya, Kenshiro Ehara, Naruha Watanabe, Yohei Ogawa, Hikaru Imakyure, Reina Fujimaru, Rika Osaki, Kazuki Shitamitsu, Kaoru Mizoguchi, Tomoki Ushijima, Takahiro Maeno, Takashi Nakashima, Takahiro Suzuki, Mako Nakamura, Judy E. Anderson, & Ryuichi Tatsumi[®] (責任著者)

D O I : 10.1111/accel.14337

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学 大学院農学研究院 動物・海洋生物科学講座 教授 辰巳隆一（タツミ リュウイチ）

TEL：092-802-4593(居室), 092-802-4595(スタッフルーム) FAX：092-802-4593

Mail：rtatsumi@agr.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報課

TEL：092-802-2130 FAX：092-802-2139

Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp