

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

サルコペニアバイオマーカーの同定 (21-44)

主任研究者 細山 徹 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 (副部長)

研究要旨

サルコペニアに対する予防法や治療法の開発は、健康寿命延伸を目指す我が国において喫緊の課題である。しかし本疾患は、臨床病態を的確に表すバイオマーカーや疾患発症や増悪化を予測するバイオマーカーが同定されていない。本研究では、臨床検体や実験動物、ヒト培養細胞等の様々な技術を駆使して、サルコペニアバイオマーカーを同定することを目的として研究を進めてきた。昨年度までに得られた研究成果をさらに深化させるために、本年度は、バイオマーカー候補であるビタミンDの作用機構の解明、血液トランスクリプトーム解析の臨床情報との統合、筋萎縮関連因子の探索、Phase angleの有用性の検討、などの多角的アプローチから幾つかの興味深い結果を得た。例えば、遺伝子組換えマウスの解析からビタミンDが成熟筋線維の量的形質には影響を及ぼさず質的形質を制御することなどを明らかにし、前年度実施した疫学データ解析で得られた血中ビタミンD量とサルコペニアとの関連性が裏付けられた。いずれの研究も今後さらに詳細な解析を進めていくが、今後は得られた個々の結果を統合した解析を実施することでサルコペニアバイオマーカーの同定を進めていく。

主任研究者

細山 徹 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 (副部長)

分担研究者

重水 大智 国立長寿医療研究センター バイオインフォマティクス研究部 (部長)

松井 康素 国立長寿医療研究センター ロコモフレイルセンター (センター長)

渡邊 研 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 (部長)

竹村 真里枝 国立長寿医療研究センター ロコモフレイル診療部 (医長)

A. 研究目的

健康長寿社会の実現を標榜する我が国において、加齢に伴う骨格筋減弱症であるサルコペニアの予防や進行抑制は極めて重要な課題である。しかし、サルコペニアの病態生理は明らかになっておらず、また高齢者特有の背景因子の複雑さも相まって関連研究が順調に進展しているとは言い難い。一方、サルコペニア同様に治療法が確立していない認知症では、血液から得られる DNA 変異、遺伝子・タンパク質発現情報等から早期発症を予測するバイオマーカーの探索が盛んに行われ、実際 NCGG からアルツハイマー病発症の予測バイオマーカー候補分子が報告されている (Nakamura *et al.*, *Nature*. 2018; Shigemizu *et al.*, *Commun Biol*. 2019, Shigemizu *et al.*, *Alzheimers Res Ther*. 2020)。

現状、サルコペニアの発症あるいは症状を予測し得るバイオマーカーの同定には至っていないが、PubMed による文献検索では総説も含め 800 件以上ヒットすることから、その注目度は高い。また、疾患関連性を証明するに至っていないが、ヒト骨格筋組織における chronological な DNA メチル化パターンに関する報告や (Voisin *et al.*, *JCSM*. 2020)、ヒスパニックと非ヒスパニックを対象とした GWAS 解析による筋肉量に関わる *ACVR2B* 遺伝子変異の報告 (Klimentidis *et al.*, *Med Sci Sports Exerc*. 2016) から、今後ゲノムデータからサルコペニアの予測・診断に関与するリスク因子が同定される可能性は十分考えられる。しかし、高齢者の背景疾患（後期高齢者の 8 割以上で何らかの疾患を抱えている：東京都健康長寿医療センターの報告）やヒトの遺伝的多様性などを加味すると、サルコペニアのバイオマーカーを同定するには、単純化した非臨床実験系と高齢者検体を使った実験系を融合した、臨床情報、ゲノム情報、液性因子、および筋病理などの多層オミクス解析が重要である。

本研究では、「サルコペニアバイオマーカーの同定」を目指し、①遺伝的影響の小さい純系マウスの組織サンプルを用いた加齢性変動因子の同定 (細山・竹村・松井)、②サルコペニア患者の血液・骨格筋検体を用いた遺伝子・タンパク質発現解析 (重水・竹村)、③ゲノム情報とサルコペニアとの関連性に関する解析 (細山・竹村・松井)、④*in vitro*サルコペニアモデルの構築と疾患関連因子の同定 (渡邊)、などを組み合わせた解析を行う。本研究により、液性因子とゲノム情報を基にしたサルコペニアバイオマーカーの同定が期待される。

B. 研究方法

1) 成熟筋線維特異的 *Vdr* 欠損マウスの解析

昨年度に作出した成熟筋線維特異的 *Vdr* 欠損 (*Vdr^{mcKO}*) マウスから骨格筋を採取し、凍結薄切筋切片を用いて、筋線維径、筋線維タイプ、骨格筋幹細胞数、筋核ドメインサイズなどについての組織学的解析を行った。組織学的解析には、抗ラミニン抗体 (筋線維径、幹細胞数、筋核ドメインサイズ)、抗 MHC 抗体 (筋線維タイプ)、抗カルシトニン受容体

抗体（骨格筋幹細胞数）などの特異抗体を用い、核染色は DAPI を使用した。さらに、*Vdr*^{mcKO} マウス骨格筋における Ca²⁺ATPase 活性を測定し、Ca²⁺取り込み能を検証した。

2) 骨格筋内非筋細胞に対するビタミン D の作用

抗 Sca-1 抗体とマイクロビーズを用いて、マウス後肢骨格筋から間葉系前駆細胞を単離し、ビタミン D 受容体発現を遺伝子・タンパク質レベルで確認した。間葉系前駆細胞の増殖能に対するビタミン D の作用を検証するために、マウス骨格筋から単離した間葉系前駆細胞にビタミン D (100nM) を添加し、24 時間後に細胞増殖マーカーである Ki67 の遺伝子発現と EdU 取り込み能について検証した。

(倫理面への配慮)

当センター倫理・利益相反委員会の承認（認証番号 1557）を受け、1964 年のヘルシンキ宣言とその後の改正で定められた倫理基準に従って実施された。参加者全員から書面によるインフォームド・コンセントを得て研究を遂行した。

遺伝子組換え実験については、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換え実験安全規程に従って行い（遺 2-7）、また、動物実験に際しては国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に従って行った（動 4-15 および動 4-16）。特に動物実験時の苦痛軽減措置には十分な配慮をもって行った。

C. 研究結果

1) 成熟筋線維特異的 *Vdr* 欠損マウスの解析

前年度までに、*Vdr*^{mcKO} マウスにおいて有意な筋力低下が認められることを示しているが、骨格筋の量的形質に対する影響はほとんど検証してなかった。そこで本年度は cKO マウス骨格筋の組織学的解析を行い、成熟筋線維における VDR シグナルの阻害が筋線維および筋幹細胞に与える影響について検証した。その結果、後天的に *Vdr* 欠損を誘導した筋線維では筋線維タイプの変換や筋線維径に対する影響は認められなかった（図 1-A, B）。筋線維径に影響を及ぼすとされる筋核ドメインの変化や筋幹細胞数の変化も認められなかった（図 1-C, D）。さらに前年度に本マウスにおいて、筋張力に関与する SERCA 発現が有意に減少することを行っていることから、実際に筋線維への Ca²⁺取り込み能について生化学的手法で検証したところ、*Vdr*^{mcKO} マウスの骨格筋において Ca²⁺ATPase 活性の有意な低下を認めた（図 1-E）。

前年度および今年度の解析結果については、サルコペニア研究の専門学術誌である *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 誌に受理・掲載され、また関連学術集会において成果

発表を行った。

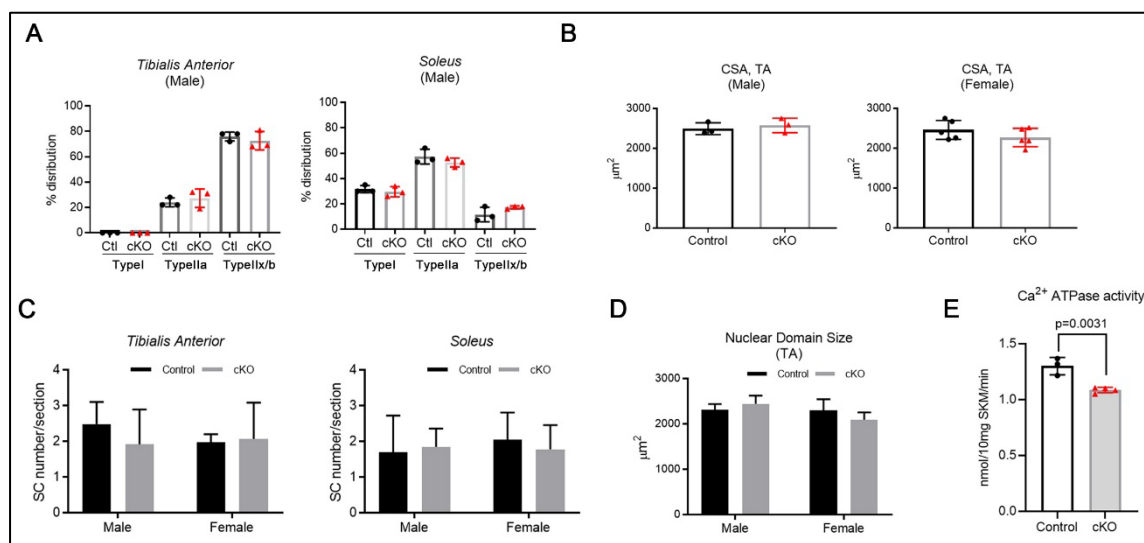


図 1: *Vdr*^{mcko} マウス骨格筋の組織学的解析 (A) 筋線維タイプ、(B) 筋線維径、(C) 骨格筋幹細胞数、(D) 各ドメインサイズ、(E) Ca^{2+} ATPase 活性の比較。

2) 骨格筋内非筋細胞に対するビタミン D の作用

マウス骨格筋から単離した間葉系前駆細胞から RNA およびたんぱく質を抽出し、それぞれ qPCR とウェスタンブロット法でビタミン D 受容体の発現を確認したところ、いずれの場合においても同時に単離した筋細胞よりも有意に高い発現を認めた (図 2-A)。ビタミン D 受容体の発現は、ビタミン D に対する応答性を有する可能性を意味していることから、その作用について検証した。本年度は検証の第一歩として、間葉系前駆細胞の増殖能に対するビタミン D の作用について、Ki67 発現および EdU 取り込み能を検証したが、これらのパラメータはいずれも有意性を示さなかった (図 2-B)。しかし、ビタミン D 添加により間葉系前駆細胞でのビタミン D 受容体発現の亢進が認められたことから、本細胞種がビタミン D に対して応答性を有することは確認できた。次年度に更なる検証を進める。

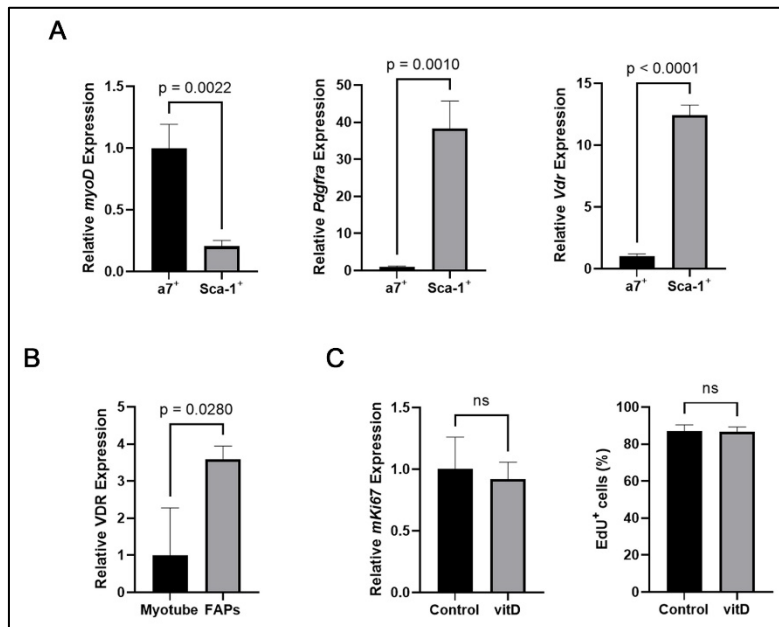


図 2 : Sca-1 陽性間葉系前駆細胞において VDR が高発現している。(A) 遺伝子発現、(B) タンパク質発現、(C) *mki67* 発現と Edu 陽性細胞数の比較

D. 考察と結論

前年度に疫学研究データを用いた解析から、血中ビタミン D 量と筋力およびサルコペニア新規発症率との間に相関性を認めており、その作用機構を明らかにする目的で成熟筋線維特異的にビタミン D 受容体を欠損した *Vdr^{mcKO}* マウスとした。本年度は本マウスの詳細な解析をすすめることで、ビタミン D のサルコペニアバイオマーカーとしての可能性を裏付けようと考えた。結果として、*Vdr^{mcKO}* マウスでは筋力低下は見られるものの、筋萎縮や筋線維タイプ変換、幹細胞数の減少といった骨格筋の量的形質を表す指標には何ら変化を認めなかった。一方、*Vdr^{mcKO}* マウスにおいて筋線維へのカルシウムイオン取り込みを表す *Ca²⁺ATPase* 活性の減少が認められた。前年度までに、本マウスにおいて筋線維へのカルシウムイオン取り込みに関わる *SERCA* の遺伝子発現低下を見出していることから、*Vdr* 欠損が機能的な低下に結び付いていることを証明することができた。疫学データ解析においてもビタミン D 欠乏者で筋量に変化はなく筋力低下のみが認められたことから、*Vdr^{mcKO}* マウスの解析で得られた一連の結果はヒトのビタミン D 欠乏者でみられる筋力低下機構やサルコペニア発症機構の一端を表しており、サルコペニアバイオマーカーとしての有用性を示している。一方、本年度は、マウス由来の間葉系前駆細胞においてビタミン D 受容体が強く発現していることを見出した。ビタミン D が間葉系前駆細胞の挙動にどのような影響を与えるのかについては次年度に更なる詳細な検討を進めるが、少なくとも増殖能には直接的には影響を及ぼさないことを示唆する結果が得られた。これまで、ビタミン D の骨

骨筋に対する作用点は、主要な筋構成細胞成分である筋線維や筋芽細胞であると信じられてきたが、今回の検討により、非筋細胞である間葉系前駆細胞もレスポonder細胞である可能性が示され、ビタミン D と骨格筋との関係に関する全く新しい視点をもたらすこととなり、サルコペニアのバイオマーカーとしてのビタミン D の重要性が益々高まったといえる。

E. 健康危険情報

なし

※班のすべての健康危険情報について記載すること。このため、分担項目に係る情報であっても分担研究報告ではなく、こちらに記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuno T, Hosoyama T, Tomida M, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Kato S, Kawai-Takaishi M, Ishizuka S, Nishita Y, Tange C, Shimokata H, Imagama S, Otsuka R. Influence of vitamin D on sarcopenia pathophysiology: A longitudinal study in humans and basic research in knockout mice. *Journal of Cachexia, Sarcopenia Muscle*. 13(6): 2961-2973. 2022.

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

2. 学会発表

- 1) Mizuno T, Matsui Y, Takemura M, Watanabe T, Hosoyama T, Kuriyama K, Suzuki Y, Ishizuka S, Imagama S, Arai H. Phase angle is associated with lower limb motor function in the older. 12th International Conference on Frailty & Sarcopenia Research. Apr 20-22, 2022, Boston & WEB (Hybrid)
- 2) 細山 徹 サルコペニア・フレイルのバイオマーカー探索の試み 第77回日本体力医学会大会 シンポジウム23「加齢・病態における骨格筋異常とその治療法」
2022年9月22日 Web開催
- 3) Motoki Furutani, Mutsumi Suganuma, Shintaro Akiyama, Risa Mitsumori, Tohru Hosoyama, Marie Takemura, Yasumoto Matsui, Shosuke Satake, Yuki Nakano, Shunpei Niida, Koichi Ozaki, Daichi Shigemizu. Identification of potential blood biomarkers for Sarcopenia through RNA sequencing analysis. The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Oct 28, 2022. Nagoya.

- 4) Tohru Hosoyama, Yoshihiro Miyagawa, Minako Takaishi-Kawai, Ken Watanabe.
Lack of vitamin D signaling accelerates muscle atrophy in cachexia. The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Oct 27th, 2022. Nagoya.
- 5) Tohru Hosoyama. Vitamin D, a potential role for tissue homeostasis and sarcopenia. The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Symposium 3, Oct 27th, 2022. Nagoya. (シンポジスト)
- 6) Tohru Hosoyama. Vitamin D as a biomarker candidate for sarcopenia and dynapenia;
from basic and epidemiological studies. The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Symposium 9, Oct 28th, 2022. Nagoya. (シンポジスト)
- 7) 古谷元樹, 菅沼睦美, 秋山真太郎, 光森理紗, 細山 徹, 竹村真里枝, 松井康素, 佐竹昭介, 中野由紀子, 尾崎浩一, 重水大智 網羅的遺伝子発現解析によるサルコペニアに関わるバイオマーカーの探索 第9回日本サルコペニア・フレイル学会大会 2022年10月29-30日 草津
- 8) 細山 徹、宮川良博、高石美菜子、渡邊 研 ビタミンDシグナルの低下は悪液質誘導性筋萎縮を促進する 第9回日本サルコペニア・フレイル学会大会 2022年10月29-30日 草津

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし