

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

健康寿命延伸を目指したサルコペニアの分子機序の解明（22-30）

主任研究者 伊藤 尚基 国立長寿医療研究センター プロジェクトリーダー

研究要旨

超高齢社会である日本において、加齢による骨格筋機能の低下（サルコペニア）は健康寿命延伸を阻む大きな要因となっている。骨格筋は運動機能と代謝機能を併せ持つ組織であり、脂肪や肝臓といった他代謝臓器と密接に連携しながら全身性代謝を制御している。しかし、加齢に伴う骨格筋の代謝機能の低下が他の代謝臓器にどのような悪影響を与え、健康寿命低下に繋がっているかは明らかになっていない。

本研究では加齢性疾患に深く関わることで明らかになっているニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）代謝に着目し、加齢個体における骨格筋NAD⁺代謝の改善が、脂肪・肝臓も含めた他の代謝臓器に与える影響に焦点を当てる。骨格筋NAD⁺代謝の改善が運動器としての機能改善のみならず、全身性代謝の改善を介した健康寿命延伸にまで繋がらうか検証する。最終的にはニコチンアミド・モノヌクレオチド（NMN）といった細胞/組織NAD⁺量を上昇しうるNAD⁺ブースターを用い、骨格筋NAD⁺の低下に起因した全身性代謝の悪化が改善されるか検証し、健康寿命延伸に必要な個体としての抗老化機構を明らかにする。初年度は骨格筋特異的Namt knockdownマウスを用い、骨格筋NAD⁺によって制御される分泌因子の解析を実施した。

主任研究者

伊藤 尚基 国立長寿医療研究センター プロジェクトリーダー

A. 研究目的

超高齢社会である日本において、健康寿命延伸は喫緊の医学的・経済的課題である。特に加齢による骨格筋機能の低下（サルコペニア）は健康寿命延伸を阻む大きな要因となっている。骨格筋は運動器としてのみならず、代謝臓器としても働き、脂肪・肝臓をはじめとした他の代謝臓器と密接に連携し、全身性代謝を制御している。しかし、加齢に伴う運動機能の低下に加え、代謝機能の低下が、脂肪・肝臓をはじめとした他の代謝臓器にどのような悪影響を与え、健康寿命低下に繋がっているかは明らかになっていない。

これまで様々な分子・シグナル経路をターゲットとした寿命・健康寿命延伸に関する研究がなされ、加齢に伴うニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）の低下が、加齢性疾患に深く関わる事が明らかになっている。そこで本研究では、加齢個体における骨格筋 NAD⁺代謝の改善が、骨格筋そのものに加え、脂肪・肝臓といった他の代謝臓器に与える影響に焦点を当てる。それにより、骨格筋 NAD⁺代謝の改善が運動器としての機能改善のみならず、全身性代謝の改善を介した健康寿命延伸にまで繋がりを検証する。最終的にはニコチンアミド・モノヌクレオチド（NMN）といった NAD⁺ブースターを用い、骨格筋 NAD⁺の低下に起因した全身性代謝への悪影響が改善されるか検証する。まずはマウスにおける **Proof of concept** を取得し、ヒトへの検証へと繋げることで、健康寿命延伸に必要な不可欠な個体としての抗老化機構を明らかにする。

B. 研究方法

NAD⁺の維持に必須な NAD⁺ salvage 経路の律速酵素である Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) に着目し、同分子の knockdown により、骨格筋特異的に NAD⁺を低下させたマウスを作成した。老化を対象とした研究を行うため、発生期・成長期には knockdown を行わず、12週齢以降の生体マウスを用い、実験を行なった。これらの遺伝学的な手法には、Nampt に対する shRNA を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた。コントロールには Firefly Luciferase に対する shRNA を用いた。また加齢依存的な NAD⁺の低下との関係を明らかにするため、3~4ヶ月齢、18~20ヶ月齢、26~28ヶ月齢のマウスから骨格筋を採取し、比較解析を行なった。さらに *in vitro* による解析を実施するため、単一筋線維単離法により樹立したマウス初代筋芽細胞を用い、同じく Nampt の knockdown を行なった。

in vivo の解析においては、AAV を感染させ、3ヶ月後に骨格筋を摘出し、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による NAD⁺の測定、RT-qPCR による筋量・代謝関連分子の解析を行なった。また骨格筋特異的 Nampt knockdown マウスの骨格筋を用いた RNAseq 解析を実施し、骨格筋内の代謝系に加え、脂肪・肝臓といった他の代謝臓器に影響を与えうる分泌因子の解析を行なった。*in vitro* の解析においては、分化誘導と同時に AAV の感染を行い、分化四日目の筋管を用いた解析を行なった。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験、動物実験は国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験委員会、動物実験委員会の審査・承認を得て、研究を実施した。ヒトの検体は使用せず、その他の項目は該当しなかった。

C. 研究結果

腓腹筋に AAV を投与し、その 3 ヶ月後に骨格筋を摘出し、knockdown 効率を検証した。その結果、in vivo における Nampt の knockdown 効率は約 80%であることがわかった。HPLC を用いて NAD⁺を測定した結果、Nampt knockdown マウスでは骨格筋 NAD⁺量が約 60%低下していることがわかった。これらの骨格筋を用い、骨格筋量や代謝制御に関わる代表的な因子の発現解析を行なった。その結果、JunB といった筋量制御因子の発現が Nampt knockdown マウスで低下していることがわかった。しかし、筋タンパク質分解系や筋萎縮に関わる Atrogin-1、MuRF1、BCAT2、KLF15、REDD1 や糖代謝・脂質代謝にかかわる PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ の発現に変化は見られなかった。

そこで骨格筋特異的 Nampt knockdown マウスの骨格筋を用い、脂肪・肝臓といった他臓器に作用しうる分泌因子の解析を実施すべく、RNAseq 解析を行なった。その結果、骨格筋特異的 Nampt knockdown マウスでは Growth Differentiation Factor-11

(GDF11) の発現が上昇していることがわかった。そこで骨格筋における Nampt、GDF11 の発現と加齢との関連を検証するため、加齢マウスの骨格筋を用いた解析を行なった。その結果、Nampt の発現は加齢依存的に低下し、骨格筋 NAD⁺量も低下していくことがわかった。逆に、GDF11 の発現は加齢依存的に上昇していくことがわかった。

また単一筋線維単離法により樹立したマウス初代骨格筋培養細胞に AAV を感染させ、Nampt を knockdown した筋管を用いた解析を行なった。in vitro における knockdown 効率は約 98%であり、NAD⁺量も約 65%低下していた。これらの Nampt を knockdown した筋管においても有意な GDF11 の発現上昇が見られた。これらの結果から、Nampt の発現低下によって GDF11 の発現上昇が誘導されることがわかった。

引き続き骨格筋 NAD⁺と GDF11 の関係性、および脂肪・肝臓などの代謝臓器への影響に対する解析を進めるため、骨格筋特異的 Nampt knockout マウスの作出に必要な Nampt flox マウス、および骨格筋特異的かつ薬剤誘導的に Cre を発現させるプロモーターを持つ Human Skeletal muscle Actin (HSA) -MerCreMer マウスを導入した。両マウスの掛け合わせを実施し、2022 年度に得られた結果を元に、in vivo における解析を行う。

また、加齢依存的な Nampt の低下と GDF11 の発現上昇の関係をより詳細に解析するため、HSA プロモーター下において Nampt を過剰発現させる AAV ベクターを作成した。初代筋芽細胞を用いた検証を行なった結果、コントロール群と比べ、有意に Nampt の発現が

上昇することがわかった。

D. 考察と結論

本研究では、加齢個体における骨格筋 NAD⁺代謝の改善が、骨格筋そのものに加え、脂肪・肝臓といった他の代謝臓器に与える影響に焦点を当てることを目的とした。骨格筋 NAD⁺代謝が脂肪・肝臓などの代謝臓器に作用する分泌因子の発現調節に関わる可能性を検証するため、若齢マウスにおいて Nampt の knockdown を行い、RNAseq 解析を行った。Nampt の knockdown により発現が変動する分泌因子を複数得ることができたが、本研究では特に GDF11 に着目した。GDF11 を投与することにより、加齢マウスにおける骨格筋幹細胞の機能改善といった抗老化作用が見られることが報告されている (Sinha M et al., Science, 2014)。しかしその後、別の研究グループより、GDF11 は骨格筋量を負に制御している myostatin と相同性が高く、GDF11 の上昇は骨格筋機能に対して抑制的に働くことが示された (Egerman MA et al., Cell Metab, 2016)。またフレイルを有する高齢者では血中 GDF11 量が高いことも報告されている (Schafer MJ et al., Cell Metab, 2016)。骨格筋以外の臓器においても、GDF11 の正の作用と負の作用が報告されており、未だ老化における GDF11 の作用は明確になっていない。本研究により、骨格筋における GDF11 の発現は加齢に伴い上昇し、また Nampt の発現低下によって、顕著に GDF11 の発現が上昇することが明らかになった。これらの結果は、加齢に伴う NAD⁺の低下によって、骨格筋における GDF11 の発現上昇が引き起こされる可能性を示唆している。今後、Nampt の発現低下による GDF11 の発現上昇が、NAD⁺を介したものか検証する必要があるだろう。さらに、加齢に伴う Nampt/NAD⁺の低下を改善することで、骨格筋における GDF11 の発現上昇が抑制されるか検証する必要がある。

また GDF11 は肝臓において SA-β-gal 陽性細胞の増加、p16 の発現上昇といった老化促進作用があることが報告されている (Sun J et al., Aging Cell, 2022)。骨格筋から分泌された GDF11 が肝臓といった代謝臓器に与える影響を個体レベルで明らかにするため、今後、骨格筋特異的 Nampt knockout マウスを用いた解析を進める必要があるだろう。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Naoki Ito](#), Ai Takatsu, Hiromi Ito, Yuka Koike, Kiyoshi Yoshioka, Yasutomi Kamei, Shin-ichiro Imai. Slc12a8 in the lateral hypothalamus maintains energy metabolisms and skeletal muscle functions during aging. *Cell Reports*. 40(4). 111131. 2022.

2. 学会発表

- 1) Naoki Ito, Ai Takatsu, Hiromi Ito, Kiyoshi Yoshioka, Yasutomi Kamei, Shin-ichiro Imai. Slc12a8 in the lateral hypothalamus as a key regulator of energy metabolism and skeletal muscle functions during aging. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Aging. 28th September. 2022
- 2) Naoki Ito, Shin-ichiro Imai. Slc12a8 in the lateral hypothalamus as an important regulator of energy metabolism and skeletal muscle functions during aging. The 8th ASIAN CONFERENCE for FRAILTY AND SARCOPENIA, Nagoya. Japan. 27th October, 2022
- 3) 伊藤 尚基、高津 藍、伊藤 裕美、小池 悠華、吉岡 潔志、亀井 康富、今井 眞一郎、外側視床下部における NAD⁺関連分子と骨格筋機能およびフレイル・サルコペニアとの関係について、第 8 回日本筋学会学術集会、東京、8 月 6 日、2022
- 4) 伊藤 尚基、高津 藍、伊藤 裕美、小池 悠華、吉岡 潔志、亀井 康富、今井 眞一郎、外側視床下部における Slc12a8 が全身性エネルギー代謝・骨格筋機能を制御し、フレイル・サルコペニアの一因となっている、第 77 回日本体力医学会大会、栃木 (WEB)、9 月 22 日、2022
- 5) 伊藤 尚基、高津 藍、伊藤 裕美、小池 悠華、吉岡 潔志、亀井 康富、今井 眞一郎、外側視床下部における NAD⁺代謝関連分子に注目した中枢-骨格筋連関とサルコペニアとの関係について、優秀演題賞プレゼンテーション、第九回日本サルコペニア・フレイル学会大会、滋賀、10 月 30 日、2022

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