

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不可欠な個体としての抗老化機構を明らかにする。2年度は骨格筋特異的 Nampt knockdown/knockout 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。また加齢マウスにおける遺伝学的な NAD⁺改善効果を検証した。

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てきた。特に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。NAD⁺は500以上の酵素反応に関わり、NAD⁺依存性脱アセチル化/脱アシル化酵素であるサーチュインファミリーをはじめ、代謝・生存などを含む非常に多くの生化学反応・細胞内過程に関わっている。組織/細胞 NAD⁺は加齢と共に低下し、NAD⁺の低下が加齢性疾患の発症・病態に深く関わっていることが明らかになっている。

そこで本研究では、加齢性疾患に深く関わる事が明らかになっている 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、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 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、3~4ヶ月齢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Nampt floxマウスおよび骨格筋特異的プロモーターによりtamoxifen-inducibleなCreを発現するhuman skeletal muscle actin (HSA)-MerCreMerマウスと掛け合わせ、骨格筋特異的なNampt knockoutマウスを作成した。AAVによるknockdownと同様、成長期にはknockoutせず、3~4ヶ月齢の生体マウスにtamoxifenを投与し、実験を行なった。

また加齢依存的なNAD⁺の低下が与える影響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。さらに加齢依存的なNamptの低下に対する改善効果を検証するため、骨格筋特異的であるACTA1プロモーターの下流においてNamptを発現させるAAVを用い、加齢マウスの骨格筋においてNamptの過剰発現を行った。

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、AAVを用いたNamptのknockdownを行なった。この際、NAD⁺の改善効果を検証するため、Namptのknockdownと同時にNMN処理を行った。また、Namptと同様、NAD⁺依存性脱アセチル化/アシル化酵素であるSirtuin 1 (Sirt1)のknockdownも行った。

*in vivo*の解析においては、AAVを感染させ、あるいはtamoxifenを投与して3ヶ月後に各臓器を摘出し、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。*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

サルコペニアを有する高齢者において、NAD⁺維持に必要不可欠なNAD⁺ salvage 経路の律速酵素 Nampt が低下し、骨格筋 NAD⁺が低下することによって筋量・筋力の低下が引き起こされることが明らかになっている (Migliavacca E et al., Nat Commun, 2019)。そこで加齢に伴う骨格筋 NAD⁺の低下を模擬する動物モデルとして、骨格筋特異的 Nampt knockdown/knockout マウスを作出した。

アデノ随伴ウイルス 9 (AAV9) を用い、12 週齢の若齢マウスの腓腹筋に AAV9 を投与し、その 3 ヶ月後に骨格筋を摘出した。初年度に実施した RNAseq 解析により、骨格筋 NAD⁺の低下によって誘導され、かつ肝臓・脂肪といった代謝臓器に作用しうる分泌因子の同定を試みた。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。

骨格筋特異的 Nampt knockdown マウスで得られた Nampt-GDF11 の関係性をより詳細に解析するため、初代骨格筋培養細胞を用いた実験を行った。その結果、*in vitro*における Nampt の knockdown によっても GDF11 の発現が上昇することがわかった。さらに、NAD⁺ブースターの一つであり、NAD⁺上昇作用を持つ NMN を用いた。その結果、Nampt の knockdown によって NAD⁺量が低下するところ、NMN 処理によって NAD⁺量が上昇し、かつ Nampt の knockdown 依存的な GDF11 の上昇も抑制さ

れることがわかった。これらのことから、NAD⁺の低下依存的に GDF11 の発現が誘起されることがわかった。また、NAD⁺の低下が GDF11 の発現上昇を引き起こす機序を明らかにするため、NAD⁺依存性脱アセチル化/アシル化酵素であり、老化・寿命制御に関わる制御因子であるサーチュインに着目した。その結果、Sirt1 の knockdown によっても、GDF11 の発現が上昇することがわかった。また、初年度の解析において、Nampt の発現は加齢依存的に低下し、骨格筋 NAD⁺量も低下していくところ、GDF11 の発現は加齢依存的に上昇していく結果を得ている。以上のことから、骨格筋 Nampt-NAD⁺-Sirt1 経路によって GDF11 の発現は制御されており、加齢に伴う骨格筋 Nampt-NAD⁺-Sirt1 経路の破綻によって GDF11 の発現上昇が引き起こされることが示唆された。

また骨格筋 NAD⁺と GDF11 の関係性を *in vivo* で解析するため、Nampt flox マウスと HSA-MerCreMer マウスを掛け合わせた。同マウスにおいて tamoxifen を投与し、3 ヶ月後に各組織を解析した。その結果、前頸骨筋において Nampt の発現が約 92%低下した。また HPLC による NAD⁺測定を行なった結果、前頸骨筋において NAD⁺量が約 75%低下し、ヒラメ筋において約 65%の NAD⁺低下が生じた。組織特異性を検証するため、骨格筋以外の組織においても NAD⁺を測定した結果、心筋・肝臓・腎臓・脾臓といった組織において、NAD⁺の低下は認められなかった。また HE 染色によって組織学的な解析を行った結果、中心核線維の増加といった明確な異常所見は認められなかった。引き続き、骨格筋 NAD⁺と GDF11 の関係やその生理学的な影響について、*in vivo* での解析を進めていく予定である。

また、加齢に伴う Nampt/NAD⁺の低下に対する改善が GDF11 の発現に与える影響を明らかにするため、AAV を用いた骨格筋特異的 Nampt 過剰発現を行った。骨格筋特異的な ACTA1 プロモーターによって Nampt を発現させる AAV ベクターを作成し、初代骨格筋培養細胞による検証を行なった。その結果、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。そこで 18~20 ヶ月齢の加齢マウスに 1 個体あたり 1.0×10^{11} genome copy の AAV9-ACTA1-empty あるいは AAV9-ACTA1-Nampt を尾静脈投与し、7 ヶ月後の解析を行った。その結果、AAV9-ACTA1-Nampt 投与群では骨格筋重量および精巣上体脂肪量が上昇し、骨格筋 Nampt および NAD⁺の上昇と共に、GDF11 の発現が低下した。

以上のことから、加齢に伴う Nampt-NAD⁺-Sirt1 経路の破綻により、骨格筋における GDF11 の発現上昇が誘起されることが明らかになった。また *in vitro* における NMN 処理、あるいは加齢マウスにおける Nampt の過剰発現により GDF11 の発現が抑制されたため、加齢依存的な NAD⁺の低下を抑制することによって、加齢に伴う GDF11 の上昇を抑制することが示唆された。

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しうる分泌因子の発現調節に関わる可能性を検証するため、若齢マウスにおける Nampt の knockdown によって変動する血中因子として GDF11 に着目している。

GDF11 は当初、若返り因子として注目され、GDF11 の投与によって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た (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 と相同性が非常に高く、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)。また骨格筋以外の組織においても、GDF11 の上昇は骨量の減少、肝臓における老化細胞の増加、p16 の発現上昇といった老化促進作用を示す (Liu W et al., Nat Commun, 2016. Sun J et al., Aging Cell, 2022)。さらに、フレイルを有する高齢者では血中 GDF11 量が高いことから、GDF11 は若返り因子ではなく、老化を促進する増悪因子であると考えられつつある (Schafer MJ et al., Cell Metab, 2016)。一方で、骨格筋以外の臓器において、GDF11 の正の作用も報告されており、未だ老化における GDF11 の作用は明確になっていない。特に、加齢に伴い GDF11 が上昇する原因は明らかになっていなかったが、本結果は骨格筋 NAD⁺の低下によって GDF11 の上昇が引き起こされることを示唆している。

今後、加齢に伴う骨格筋 Nampt-NAD⁺-Sirt1 経路の破綻が肝臓・脂肪といった他の臓器に与える影響を解析するためには、血中における GDF11 の解析が必要になる。GDF11 は myostatin と相同性が非常に高く、血中 GDF11 の解析を行うためには myostatin に cross-react しない特異的な抗体を用いる必要がある。これまで GDF11/myostatin 共通の抗体しか市販されていなかったものの、GDF11 特異的な抗体が最近になって販売され始めてきた。骨格筋特異的 Nampt knockout マウス、あるいは加齢マウスに NMN を投与することで、骨格筋 NAD⁺と血中 GDF11 の関係性を今後明らかにしておく予定である。

同じ骨格筋特異的な HSA プロモーターを用い、発生期・成長期から Nampt が knockout されるマウスが別の研究グループによって作出されている (Basse AL et al., Molecular Metabolism, 2021)。発生期・成長期から Cre が誘導される骨格筋特異的 Nampt knockout マウスは、4 週齢から体重および除脂肪体重の低下、6 週齢にて筋力の低下が生じ、4 週齢以降から 12 週齢の間に 6 割近い個体が死亡する。また中心核を伴う再生線維が確認され、骨格筋 NAD⁺の低下によって筋変性が生じることが示されている。しかし、本研究にて 3~4 ヶ月齢の生体マウスにおいて Nampt を knockout したところ、骨格筋 NAD⁺の低下は認められるものの、少なくとも半年間の間は生存率の低下は生じていない。おそらく発生期・成長期から骨格筋 NAD⁺が低下する場合、成長不全の影響も含めたより重篤な表現型が生じるのだと考えられる。このような表現型は遺伝性筋疾患で生じる筋変性に近い可能性があり、サルコペニアのモデルとして、加齢に伴う骨格筋 NAD⁺の低下を模擬する上では、生体マウスにおいて Nampt を knockout する方が、より加齢変化に近い現象を見られる可能性

がある。今後、NAD⁺と GDF11 の関係に加え、筋量・筋力の解析、生体において Nampt が knockout されたマウスの骨格筋・肝臓・脂肪における代謝・分子的な変化を解析することで、サルコペニアが個体老化に与える影響を明らかにできると考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Naoki Ito, Regulation of skeletal muscle by NAD⁺ metabolism-related genes in the hypothalamus and its relationship to sarcopenia. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023. 13th June. 2023
- 2) 伊藤 尚基、外側視床下部における NAD⁺代謝関連分子によって制御される中枢-骨格筋連関とサルコペニアの関係性、6NC リトリート、東京、4月22日、2023
- 3) 伊藤 尚基、中枢における NAD⁺代謝関連分子による骨格筋制御機構とサルコペニアとの関係について、第33回日本老年学会総会 合同ポスター発表、横浜、6月16日、2023年
- 4) 伊藤 尚基、中枢-骨格筋連関による骨格筋代謝・運動機能制御の分子機構、第41回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム13 「運動器科学の Cutting Edge」、東京、7月29日、2023年
- 5) 伊藤 尚基、サルコペニアと骨格筋可塑性、合同学術集会 第9回日本筋学会学術集会 第10回筋ジストロフィー医療研究会 シンポジウム2 骨格筋の基礎研究を医療・社会に活かすために、大阪、8月19日、2023年
- 6) 伊藤 尚基、中枢（視床下部）における NAD 代謝が骨格筋機能・サルコペニア病態に与える影響、第96回日本生化学会大会 シンポジウム：老化を制御するプロテオスタシスとその変容、福岡、11月1日、2023年
- 7) 伊藤 尚基、外側視床下部における NAD 代謝関連分子による骨格筋制御機構とサルコペニアの関係について、第10回日本サルコペニア・フレイル学会、東京、11月5日、2023年

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