

長寿医療研究開発費 2021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。本年度には、老齢マウス骨格筋のトランスクリプトーム解析、サルコペニア患者血液を用いたトランスクリプトーム解析、長期縦断疫学解析データを用いた解析、*in vitro* サルコペニアモデルを用いた筋萎縮関連因子の探索、CTによる筋質解析法の確立、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、血中ビタミンD欠乏者が三年後にサルコペニアを発症する確率が増加するという結果は、血中ビタミンDがサルコペニア発症の予測マーカーになり得る可能性を示しており興味深い。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

*ここでは主に主任研究者担当分の研究方法を記載し、その他の方法等については各分担研究者の項を参照のこと。

1) 老化骨格筋特異的変動遺伝子の同定

1-1: マウス骨格筋からの RNA 抽出

国立長寿医療研究センターエイジングファーム（動物実験施設内）より 28 ヶ月齢オスマウス、日本 SLC より 2 ヶ月齢オスマウスをそれぞれ購入し、1 週間の環境馴化後に屠殺し前脛骨筋を切除した。切除した前脛骨筋は液体窒素で瞬間凍結し、使用時まで -80℃ 保存した。凍結前脛骨筋からの RNA 抽出には、TRI-reagent（MRC 社）および Direct-Zol RNA miniprep kit（Zymo Research 社）を用いた。抽出した RNA 1μg を RNA-

sequencing (RNA-seq) 解析に供した。

1-2 : RNA-seq 解析

マウス骨格筋から抽出したトータル RNA の RNA-seq 解析は、株式会社生物技研に外注し行った。解析には 2 ヶ月齢・28 ヶ月齢マウスともに 3 匹ずつを用い、シーケンシングで得られたデータについては、iDEGES による正規化後に edgeR/DESeq を用いて発現変動遺伝子を同定した。発現変動解析の結果から同定された遺伝子が、どのような代謝系に関わっているのかについては KEGG を用いたパスウェイ解析を用いて可視化した。また、発現変動遺伝子の GO term について、出現頻度の比較と Fisher 検定による有意差検定による発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析を実施した (解析は全て外注)。

2) 血中サルコペニアバイオマーカーの探索

2-1 : 臨床検体の解析

国立長寿医療研究センター整形外科で、膝関節置換術を施術した患者から採取した内側広筋の凍結切片を用いて筋線維径を測定し、測定値と筋線維径と血中 25OHD 量との相関性について検討した (臨床研究番号 : 1557)。内側広筋薄切凍結切片を用いて抗ラミニン抗体 (シグマ社) と抗 type I 線維抗体 (ミリポア者) の共染色をした後に、遅筋線維と速筋線維の面積を Image-J を用いて計測することで、それぞれの筋線維タイプの横断面積 (CSA) を算出した。

2-2 : NILS-LSA データの解析

国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究 (NILS-LSA) の第五期および第七期のデータを用いて、血中ビタミン D 値と筋力およびサルコペニア発症率についての解析を行った。第五期・第七期に登録されている 1919 人の中から、ビタミン D 値未測定、喫煙歴、活動性、アルコール・ビタミン摂取歴、Steps per day を除外基準として 1653 人を抽出し、その中でビタミン D 欠乏群 (433 人) とビタミン D 正常群 (1220 人) に群分けした。ここからさらに propensity score matching によりビタミン D 欠乏群 (384 人) とビタミン D 正常群 (384 人) を抽出し解析を行った。

2-3 : 成熟筋線維特異的 Vdr 欠損マウスの作製

成熟筋線維特異的に Vdr (ビタミン D 受容体) を欠損したマウスを作出する為、Myf6-CreER マウスと Vdr-floxed マウスを導入し・交配した。交配により得られた 8 週齢の *Myf6^{CE/wt}; Vdr^{flox/flox}* マウスの腹腔内にタモキシフェンを 5 日間連続投与し、成熟筋線維特異的 Vdr 欠損マウスを作出し、タモキシフェン投与 8 週間後に各種アッセイに供した。

(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い行った（動 3-55 および動 3-3）。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) 老化骨格筋特異的変動遺伝子の同定（細山、竹村、松井）

若齢マウス（2 ヶ月齢）と老齢マウス（28 ヶ月齢）の骨格筋を用いてトランスクリプトーム解析（RNA-seq）を行ったところ、骨格筋内でおおよそ 600 個の DEGs を同定した

（図 1；老化骨格筋で発現増加する遺伝子おおよそ 200 個、発現減少する遺伝子おおよそ 400 個）。また、同時に行ったパスウェイ解析などの結果から、加齢に伴い細胞外マトリックスなどの細胞構成成分に関連する経路が増減すること、炎症に関わる経路（IL-2 など）やプロテアーゼ関連経路（NEDD8 など）が増加することなどが明らかとなった。また、骨格筋内で生じる特徴

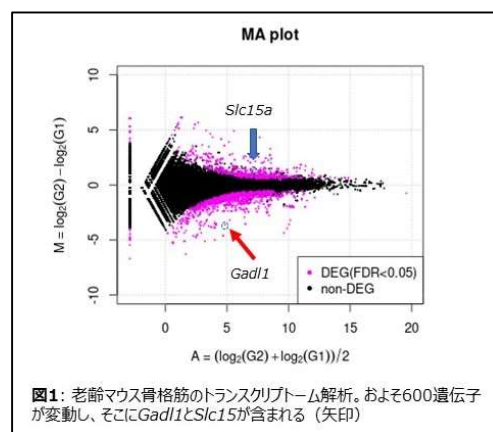


図1：老齢マウス骨格筋のトランスクリプトーム解析。おおよそ600遺伝子が発現変動し、そこに*Gad1*と*Slc15*が含まれる（矢印）

的な遺伝子発現変動の一つとして、カルノシン合成経路に関わる *Gad1* や *Slc15* などがそれぞれ減少および増加していることが挙げられる（図 1：矢印）。GADL1 については、ヒト筋芽細胞株を用いた発現解析を実施することで、単核の筋芽細胞期では発現がほとんど見られず、筋芽細胞の融合期から多核筋管細胞期に高発現することを明らかにした。これらの結果は、成熟した筋線維における GADL1 の発現特異性やその重要性を示唆するものである。

3) 血中サルコペニアバイオマーカーの探索

—筋力低下の予測因子としてのビタミン D の可能性—（細山、松井、竹村）

本研究では、NCGG のロコモフレイルセンター（分担研究者：松井）、整形外科（研究協力者：酒井義人部長）、および老化疫学研究部（研究協力者：大塚礼部長）と共同で（あるいは研究協力を仰ぎ）、臨床データ、骨格筋の組織学的解析、NILS-LSA データ、基礎研究を組み合わせることにより、血中ビタミン D がサルコペニアバイオマーカーとなり得るかについての検討も行った。これまでのところ、臨床データとヒト骨格筋の組織学的解析の横断的検討から、「血中ビタミン D 量と筋力との間に相関性」があること（図

2-a)、さらに、短期間（3 年間）の追跡調査ではあるが、NILS-LSA データを用いた縦断研究により、「血中ビタミン D 低値な方は 3 年後に有意な筋力低下を示す傾向にあり、サルコペニア発症率も増加する」こと、などの知見を得ることが出来ている（表 1）。

また、これら臨床検体での結果を裏付けるために、ビタミン D 受容体（*Vdr*）を成熟筋線維のみで欠損させたコンディショナルノックアウトマウス（*Vdr^{mcKO}* マウス）を作成し、その表現型解析を進めた。ここまでの結果として、*Vdr^{mcKO}* マウス

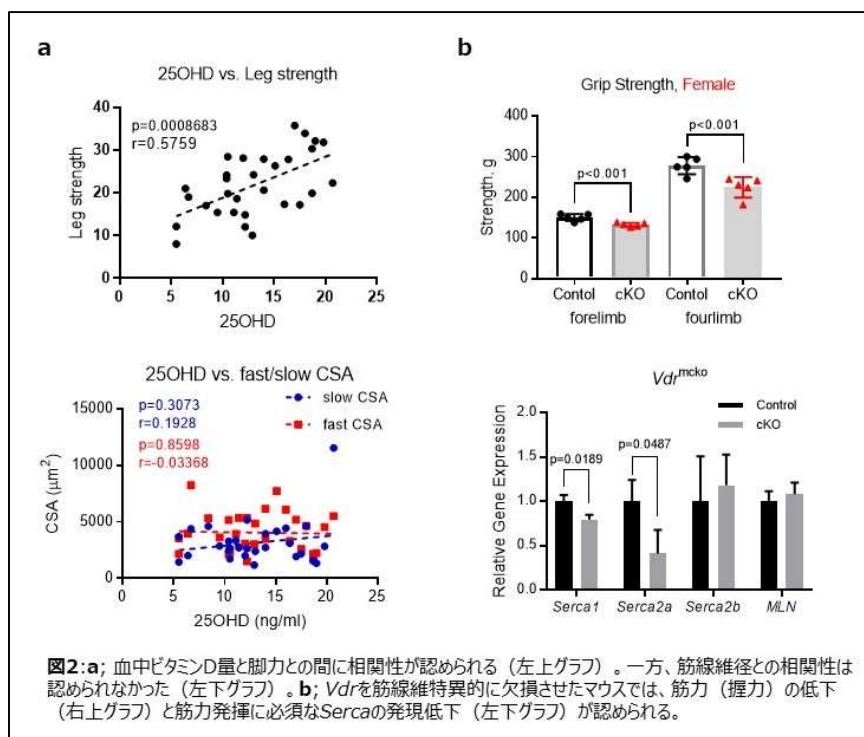


図2:a; 血中ビタミンD量と脚力との間に相関性が認められる（左上グラフ）。一方、筋線維径との相関性は認められなかった（左下グラフ）。b; *Vdr*を筋線維特異的に欠損させたマウスでは、筋力（握力）の低下（右上グラフ）と筋力発揮に必須な*Serca*の発現低下（左下グラフ）が認められる。

ウスにおける有意な筋力低下と、筋収縮に関連する *Serca* の発現低下を認めた（図 2-b）。一方、ヒトとマウスでは、いずれも血中ビタミン D 量と筋量（筋線維径や筋重量）との間に相関性は認めなかった。これらヒトおよびマウスを用いた研究で得られた結果は、ビタミン D が筋力発揮に重要な働きすること、さらに、血中ビタミン D 量が高齢者の筋力低下の予測因子（早期バイオマーカー）となり得ることを示しており、メカニズムも含めた更なる解析を進める（研究成果の一部を第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会で発表。現在、研究成果の一部を論文投稿中）。

表 1：血中ビタミン D 量欠乏者と非欠乏者の 3 年後（5 期から 7 期）の筋力とサルコペニア発症率の比較

	VitaminD non-deficient	VitaminD deficient	P value
	384	384	
Grip 7th (kg)	28.55 ±9.14	27.83 ±9.25	0.278
ASM 7th (kg)	16.67 ±4.24	16.37 ±3.99	0.307
SMI 7th (kg/m ²)	6.55 ±1.13	6.48 ±1.03	0.367

Δ Grip		-1.13 $\pm$ 2.47	-1.55 $\pm$ 2.47	0.019
Δ ASM		-0.01 $\pm$ 0.74	-0.05 $\pm$ 0.79	0.423
Δ SMI		0.02 $\pm$ 0.29	0.02 $\pm$ 0.29	0.743
Sarcopenia classification 7th (%)	Normal	266 (69.3)	263 (68.5)	0.299
	Dynapenia	26 (6.8)	29 (7.6)	
	Presarcopenia	75 (19.5)	64 (16.7)	
	Sarcopenia	14 (3.6)	26 (6.8)	
	Severe sarcopenia	3 (0.8)	2 (0.5)	
New sarcopenia (%)		5 (1.3)	15 (3.9)	0.039

Values are expressed as number (%)

Mean $\pm$ standard deviation

P values were obtained using the t-test for continuous data and fisher's exact test for categorical data.

ASM, appendicular skeletal muscle mass; SMI, skeletal muscle mass

D. 考察と結論

若齢マウスと老齢マウス骨格筋を用いた RNA-seq 解析の結果から、マウス骨格筋内で数百個の遺伝子に発現変動が生じることが明らかとなり、これらの結果は、加齢に対する骨格筋のレジリエンス変容の可能性を示している。また加齢によって変動する遺伝子群の中にはマトリックスの構成成分が多く含まれており、この結果は、加齢により骨格筋のリモデリングが生じていることを強く示唆しており、マイオカインをはじめとする様々な液性因子群の加齢性変動が推察される。また興味深い結果として、老齢マウス骨格筋における *Gad11* の発現減少と *Slc15a* の増加が挙げられる。*Gad11* と *Slc15a* の成熟骨格筋における機能についてはほとんど明らかになっていないが、最近の報告で、*GADL1* がカルノシンの構成因子である β -アラニンの代謝に必須であること、*SLC15* が β -アラニンの筋内取り込みのトランスポーター分子として機能することなどが示されている (Mahootch *et al.*, *Science Advances*. 2020)。それ故に本研究で得られた知見は、老化した骨格筋では何らかの理由による *GADL1* の減少とそれに伴う β -アラニンおよびカルノシンの産生低下、さらに *SLC15* の発現亢進による血中 β -アラニンの筋内供給の促進が生じていることを示唆している。またカルノシンや β -アラニンは、経口摂取などによる筋力発揮や運動機能向上への効果が示されていることから (Sale *et al.*, *Amino Acid*. 2010)、高齢者で認められる筋

力低下と GADL1 や SLC15 の増減との間の関連性、すなわち、加齢による骨格筋でのカルノシン合成経路の阻害により筋力低下が誘導される可能性がある。さらに、他の研究グループが実施した GWAS (Genome Wide Association Study) 解析において、GADL1 を含むカルノシン経路関連遺伝子のゲノム上にいくつかのバリエーションが存在し、筋力や BMI、血中アセチルカルノシン量との相関性が示されている (Mahootch *et al.*, *Science Advances*. 2020)。フレイルのバイオマーカー探索に関する最近の報告では、低活動性やフレイルと血中アセチルカルノシン量との間に相関性が示されており、今後、GADL1 をはじめとするカルノシン経路関連因子に焦点を当てたゲノム解析を実施することで、新たなサルコペニアバイオマーカーが同定できる可能性がある。

一方、ビタミン D に焦点を当てた研究では、ヒトおよびマウスを用いた研究において、ビタミン D が筋力発揮に重要な働きすること、さらに、血中ビタミン D 量が高齢者の筋力低下の予測因子 (早期バイオマーカー) となり得ることを示すことに成功した。今後は、メカニズムも含めた更なる解析を進める (研究成果の一部を第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会で発表。現在、研究成果の一部を論文投稿中)。

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) Yamanouchi K, Nakamura K, Takeuchi S, Hosoyama T, Matsuwaki T, Nishihara M. Suppression of MyoD induces spontaneous adipogenesis in skeletal muscle progenitor cell culture. *Anim Sci J*. 2021. 92(1): e13573. ○○○○○○○○
※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

1. 学会発表

- 1) Tohru Hosoyama. Stem Cell Aging in Muscle and Sarcopenia. Asia Pacific Virtual Meeting on Sarcopenia and Frailty Research. May 22nd, 2021. WEB 開催
- 2) 細山 徹 微小重力培養から見てきた骨格筋幹細胞の維持制御機構 ヤマト科学 Web セミナー 2021 年 6 月 2 日 WEB 開催
- 3) Tohru Hosoyama, Minako Takaishi-Kawai. Role of the ERK Signaling in Muscle Stem Cell and Muscle Aging. 第 44 回日本基礎老化学会大会 2021 年 6 月 13 日 大府市

- 4) 細山 徹 筋幹・前駆細胞の維持機構と加齢 日本畜産学会第 129 回大会 2021 年 9 月 15 日 WEB 開催
- 5) 水野隆文、細山 徹、飯田浩貴、石塚真哉、渡辺 剛、平岩秀樹、松井康素、今釜史郎 ビタミン D 低下がサルコペニア病態生理に与える影響について 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会 2021 年 10 月 15 日 伊勢市
- 6) Hosoyama T. Stem Cell Pool Maintenance and Muscle Aging. The 7th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. 2021 年 11 月 5 日、WEB 開催
- 7) 宮川良博、高石美菜子、本田 健、乾 誠、細山 徹 PDZRN3 は筋線維の維持制御に関与する 第 7 回日本筋学会学術集会 2021 年 12 月 11 日 京都市
- 8) 湊圭太郎、豊田雅士、東浩太郎、井上 聡、細山 徹、渡辺 慶、川島寛之、大野欽司、上住聡芳 運動依存性の筋線維由来因子の同定と機能解析 第 7 回日本筋学会学術集会 2021 年 12 月 11 日 京都市

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