

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

サルコペニア・関節疾患の発症病理に関する研究（21-5）

主任研究者 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）

研究要旨

高齢者の日常生活動作を低下させるサルコペニアおよび関節疾患について、分子・遺伝子レベルの情報を得ることにより、新たな診療基盤の形成することを目的として、変形性関節症自然発症マウスの解析、脊柱管狭窄症の家族内集積例の家系ゲノム解析、MRI 画像データの QTL 解析、骨格筋幹細胞のシグナル伝達機構の解析、およびヒト骨格筋幹細胞の単離の確立を行う。研究計画書年度の2021年度では、変形性関節症発症要因としてのフェロトーシスの関与の知見を得るとともに、ゲノム解析等を進めた。また、サルコペニア研究では骨格筋幹細胞での研究ツールの整備を行った。

主任研究者

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）

分担研究者

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）

A. 研究目的

高齢者の日常生活動作を低下させる運動器疾患の中でも、サルコペニアおよび関節疾患は、その分子病理やマーカーが未だ確立せず、そのため効果的な薬物療法などもない。特に変形性関節症・変形性腰椎症はその潜在的な患者数が国内で数千万人という試算からも、早期診断、リスク診断、新規治療法の開発が望まれている。一方、サルコペニアはこれらの高齢者の関節疾患の基盤となっていることが示唆されており、運動器の退行性病変への対策は NCGG としても重要な課題である。本研究では、病院やメディカルゲノムセンターの協力を得て、バイオバンク試料・情報を用いたヒトでの検討から、マウス遺伝学などを用いた疾患基盤研究をとおしてこれらの運動器疾患の発症病理に関する研究を行う。近年、個体老化に伴う骨格筋幹細胞の減少や機能変化がサルコペニアの一要因となる可能性が示され、骨格筋幹細胞を標的としたサルコペニアの予防法や治療法の開発が期待されている。これまでに我々は、老齢動物の骨格筋幹細胞で ERK シグナルに変化が生じることを見出し、本研究ではこの ERK シグナルを軸に、骨格筋幹細胞の質的・量的維持における各種細胞内シグナル伝達機構の役割とその制御機構、さらにサルコペニアの発症や

増悪化との関わりを明らかにする。

関節研究では、変形性関節症のモデルマウスを用いた研究と、患者の臨床情報と遺伝情報を用いてバイオマーカーやリスク因子の開発・同定を行う。特に家族内集積症例を用いた遺伝因子の検討ならびに脊柱管狭窄症の中間表現型の開発においては、臨床情報と遺伝情報から得られた知見について、マウスモデルなどを通してエビデンスの取得を行い、診断や新規治療法の開発基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

家族内集積例の登録：家系の登録は発端者からの聞き取りとその家族内協力者の登録時に、研究参加とバイオバンク登録の同意を得て、全ゲノム解析を行い、発症者と関連のあるレアバリエントを抽出した。

中間表現型の開発：バイオバンクに登録の 600 例の各椎間における計測データを元に GWAS を行った。

変形性関節症マウス：STR/ort ならびに STR/ort に C57BL/6N を 8 回戻し交配した STR/B6 系統を使用した。In vitro では、野生型、変異型を発現させたマウス軟骨細胞株 ATDC5 を用いた。

p27mVenus マウスの導入と維持、Pax7CreER:Erk1-/-:Erk2flox/flox:p27mVenus マウスの作出：東京大学医科学研究所で作出された mVenus-p27K マウス（ヘテロ）を理研 BRC から導入し (Oki et al., Sci Rep. 2014)、野生型マウスとの交配による系統維持および mVenus-p27K ホモマウスの作出に供した。mVenus-p27K ホモマウスを更に Erk1-/-:Erk2flox/flox と交配して Erk1-/-:Erk2flox/flox:p27mVenus マウスを作出し、ブリーディングマウスとして系統維持した。

ヒト検体からの MuSC 単離：NCGG 整形外科において膝関節（TKA）置換術を施した高齢者、および重工記念病院整形外科において膝十字靱帯（ACL）再建術を施した若齢者からそれぞれ内側広筋と半腱様筋を採取し、CD82 に対する抗体を用いて MuSC を濃縮単離した。TKA 検体は採取後すぐに単離作業に供したが、ACL 検体は Hibernate A（ギブコ社）で満たしたフラスコに入れ院内冷蔵庫で数時間～一晩保存したのちに NCGG に移して細胞単離に供した。CD82 抗体を用いた MuSC 単離には磁気ビーズ法を用い、ビオチン標識抗 CD82 抗体（ミルテニー社）、磁気ビーズ標識抗ビオチン抗体（ミルテニー社）、MACS カラムを使用して CD82 陽性 MuSC を濃縮した。磁気ビーズ法で濃縮した CD82 陽性分画は、コラーゲンコートした 48 ウェルディッシュに播種し、Ultrocer-G を添加した 20%FBS/DMEM 中で培養維持した。MuSC 単離の有無を確認する為、細胞を一定期間培養し融合させ、多核筋管細胞形成が目視で確認された時点で抗 MHC 抗体での免疫蛍光染色を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究課題の実施にあたっては、令和 3 年「人を対象とする生命科学・医学系研究に関す

る倫理指針」、厚生科学審議会答申「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方」（平成 10 年 12 月 16 日）等の関連指針に則り、人間の尊厳及び人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、適正に研究を実施し、個人情報の保護を徹底する。本研究に関しては、手術材料を用いた研究、バイオバンク試料を用いた研究ならびにゲノム解析研究については既に倫理・利益相反委員会で承認を得ている。また、動物実験は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターの動物実験指針等に則り、動物愛護上の配慮に留意し、年度毎の動物実験倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

変形性関節症自然発症マウスの解析では、変異遺伝子について *in vitro* の系を用いて二価鉄およびシスチン取り込み活性についてデータを得た。現在論文作成中である。

脊柱管狭窄症の家族内集積例の解析では、新たに 1 家系 4 名の全ゲノム解析を行い、同胞解析から疾患と相関するレアバリエーションの抽出を行った。サンガー法によるバリデーションを行ったところ、8 遺伝子上の 8 SNVs が確認され、これらが疾患関連遺伝子多型候補として挙げられた。これらについて *in silico* での病的変異予測アルゴリズム Combined Annotation Dependent Depletion (CADD; <http://cadd.gs.washington.edu/home>) スコアを求め、候補抽出の基準とした。

脊柱管狭窄症の中間表現型について、600 名の腰椎の各椎間における MRI 画像計測データについて、SNP genotyping データを用いてゲノムワイド関連解析を行い、各椎間における関連遺伝子座の探索を行った。

新たに導入した p27mVenus マウスは、p27 を発現している G0 期の細胞を mVenus で可視化することを可能にする系統であり、本研究計画の進展には必須の研究ツールとなる。本系統を受精卵の状態に NCGG に導入し個体復元を行った。個体復元後に、あらかじめ系統維持していた *Erk1^{-/-}:Erk2^{flox/flox}* と交配して *Erk1^{-/-}:Erk2^{flox/flox}:p27mVenus* マウスを作出し、ブリーディングマウスとし維持した。さらに本マウス系統を、*Pax7CreER/CreER:Erk1^{-/-}:Erk2^{flox/flox}* マウスと交配し、最終的に *Pax7CreER/CreER:Erk1^{-/-}:Erk2^{flox/flox}:p27mVenus/homo* マウスを得た。現在、本マウスに *Erk1^{-/-}:Erk2^{flox/flox}:p27mVenus/homo* マウスを交配し、実際の実験に用いる系統を作出中である。

ヒト MuSC の単離には表面抗原として CD56 が古くから用いられてきたが、CD56 は myocyte である筋芽細胞でも発現しており、MuSC 単離用の表面抗原としての特異性が議論されている。そこで本研究では、最近ヒト MuSC 特異的表面抗原マーカーとして新たに報告された CD82 を用いて、本表面抗原が有用か否かについて老齢検体および若齢検体を用いて検討した。本研究では、特に若齢検体を用いる際の時間的ギャップを考慮して磁気ビーズ法を採用して MuSC の濃縮単離を検討した。何度かの検討の末、若齢・老齢いずれの検体においても 1g 程度のヒト骨格筋検体があれば比較的十分量の MuSC が濃縮単離できることがわかった。

D. 考察と結論

関節研究では、変形性関節症自然発症マウスの遺伝学的解析ならびにモデル解析、*in vitro*での機能解析を通して、フェロトーシスがその発症に関わっている可能性を示した。家族性鉄過剰症でも関節症の発症が見られることから、ヒトにおいても同様な関連が示唆された。また、神経変性疾患や心疾患などもフェロトーシスの関与が知られており、最近、長寿パラメータに関するゲノムワイド関連解析のメタ解析とメンデルランダム化解析と多変量解析により、ヘムの代謝、特に血清鉄とトランスフェリンの値が長寿と関連する可能性が示されている (Timmers et al. 2020)。ただ実際の検査値ではサポートされないことから、このヘム代謝と同様なパスウェイの関与も想定される。フェロトーシスはヘムと細胞内酸化ストレスおよびその解消の破綻による細胞死であり、高齢者の疾患との関与についてさらなる検討が必要と考える。

家系ゲノム同胞解析、脊柱管画像 QTL 解析については、候補遺伝子群のリストアップまで至ったが、

サルコペニア研究では、新しく導入した遺伝子組換えマウスの維持や交配、ヒト検体から MuSC の単離など、研究計画の基盤構築を行った。特にヒト検体を用いた研究では、遠方施設からいかに新鮮な状態で検体を運搬するかの検討、さらにごく微量な検体から効率良く MuSC を単離する方法の確立を行った。研究に関する条件はほぼ整ったため、次年度以降の研究の進展へとつなげる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujii Y, Taniguchi M, Nagaya S, Ueda Y, Hashizume C, Watanabe K, Takeya H, Kosaka T, Okazaki T. A novel mechanism of thrombocytopenia by PS exposure through TMEM16F in sphingomyelin synthase 1 deficiency. *Blood Adv.* 5(20):4265-4277. (2021)
- 2) 渡邊 研 骨粗鬆症と脆弱性骨折のゲノム解析 生活習慣病の克服に向けたゲノム医療 医学のあゆみ 278 巻 5 号 p. 456-461 (2021)
- 3) Hiranuma T, Watanabe K, Yamashita T, Okazaki T, Tokudome Y. Role of collagen degradation pathway in sphingomyelin synthase 2-deficient mouse skin. *Biomed. Dermatol.* 5, 1 (2021)
- 4) Yamanouchi K, Nakamura K, Takeuchi S, Hosoyama T, Matsuwaki T, Nishihara M. Suppression of MyoD Induces Spontaneous Adipogenesis in Skeletal

Muscle Progenitor Cell Culture. Animal Science Journal.
92(1):e13573. (2021)

2. 学会発表

- 1) 馬 凌云、重水大智、中村博幸、尾崎浩一、渡邊 研 変形性関節症自然発症マウスモデル STR/ort の軟骨変性に関わる遺伝子変異の同定と ferroptosis の関与 第 94 回日本生化学会大会 2021 年 11 月 5 日 (Web 開催)
- 2) Hosoyama T., Kawai-Takaishi M. Role of the ERK signalling in muscle stem cells and muscle aging. 第 44 回日本基礎老化学会大会, 大府市, 2021 年 6 月 13 日
- 3) Hosoyama T. Stem Cell Aging in Muscle and Sarcopenia. Asia Pacific Virtual Symposium on Sarcopenia and Frailty Research, Web, May 22nd, 2021.
- 4) 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「微小重力環境培養装置クリノスタット Zeromo を用いた最先端の研究」, Web, 2021 年 6 月 2 日
- 5) 細山 徹 筋幹・前駆細胞の維持機構と加齢 第 129 回日本畜産学会大会シンポジウム「畜産学における組織幹細胞研究の現在・未来」 2021 年 9 月 15 日 Web 開催
- 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 (シンポジスト)
- 7) Hosoyama T. Exploration of sarcopenia-related factors using in vitro human muscle model. NCGG-ITRI Joint Symposium 2022. Feb. 14th. 2022. (オンライン).
- 8) 細山 徹、高石美菜子、遠藤昌吾、深田宗一朗、渡邊 研 骨格筋幹細胞の維持制御における ERK 経路の役割とその加齢性変化 第 21 回日本再生医療学会総会 2022 年 3 月 18 日 (オンライン)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし