

老化における Anisocytosis の生物学的意義と運動器疾患の予後に関する研究 (23-8)

主任研究者 酒井 義人 国立長寿医療研究センター 整形外科 (部長)

研究要旨

高齢者における老化マーカーの探索において anisocytosis、すなわち血球大小不同が貧血や血液疾患に非依存的に高齢者の ADL に関連していることを整形外科における臨床研究結果から見出し、臨床応用をめざして縦断的臨床研究および生物学的意義の解明を求めて動物実験、ゲノム解析を行った。臨床的には anisocytosis の指標となる赤血球容積分布幅 (red cell distribution width ; RDW) の異常高値は骨格筋量減少と関連しており、縦断的にも筋量減少及び姿勢異常や歩行機能悪化と関連していた。動物実験では高齢化による RDW 上昇を認め、ヒト-マウスに共通して RDW の表現型と関連して遺伝子発現亢進が認められた *Ppp1r15a* に対して、高齢マウス個体を用いた阻害剤の投与試験でもこれら赤血球指標との関連傾向が認められた。本阻害剤による anti-senescence 効果が期待される。またヒト GWAS によるゲノム解析結果では新たな SNP として、様々な生体ストレスによる mRNA 監視機構の活性制御機構に関わる *SMG5* のゲノム有意性が認められた。Anisocytosis の新たな病態側面の解明が期待される。

主任研究者

酒井 義人 国立長寿医療研究センター 整形外科 (部長)

分担研究者

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)

勝見 章 国立長寿医療研究センター 血液内科部 (部長)、バイオリソース管理部 (副部長)

A. 研究目的

臨床研究においては整形外科において高齢者運動器疾患データベースが構築されている利点を生かし、当センターで取り扱う変形性脊椎症や関節症をはじめ、慢性疼痛疾患や神経障害

性疾患、骨粗鬆症性脆弱骨折などの治療経過を RDW の推移とともに縦断的に解析する。基礎研究においては、ヒトゲノムワイド関連解析 (GWAS) やマウスの系統的表現型解析から得られる数百に上る関連・原因遺伝子群には、むしろ赤芽球分化との関与が知られていないものの方が多い。一方で、多くの表現型において遺伝的関与は加齢とともに低下するにも関わらず、RDW の遺伝的関与は 60 歳以上で高いことが報告されており、高齢者においてはその意味が増していると想定される。また、マウスの遺伝子欠損による表現型の系統的解析では、RDW が減少する表現型も 60 以上の遺伝子のノックアウトマウスで見出されており、老化や炎症への RDW 表現型の感受性に関与することも示唆される。一方、PDW (platelet distribution width) も慢性炎症との関連が報告されている。そのため血小板を加味することにより生物学的意義の精緻に繋がる可能性がある。これまでにマウスにおける運動器疾患モデルでの RDW や PDW の血球パラメータの検討例はなく、疾患の進行、程度、治癒の過程でのこれらの検討と、老化や炎症に関与する経路を見出すことで生物学的意義を明らかにすることが目的である。またヒト検体を用いたゲノム研究も病態解明には必須であり、バイオバンク保存の全ゲノムとジェノタイプングアレイデータを利用した GWAS を行い、高 RDW における統計的に有意な遺伝子多型を網羅的に検索する。これにより RDW 高値に関わる感受性領域の同定を行うとともに、パスウェイ解析等により機能的候補遺伝子の抽出も行う。

本研究の目的は、加齢に伴う anisocytosis が高齢者の運動機能の回復閾値を表現する可能性を探求するものであり、最終的には RDW がいかなる臨床的条件のもとその閾値としての効力を発揮するか多変量解析を行うものである。そのための基盤研究として、RDW の生物学的意義、特に老化や炎症に関与する遺伝子、パスウェイ解析、老化動物モデルおよび運動器疾患モデルにおける anisocytosis の解析、ヒト血液を用いたゲノムワイド関連解析が重要となる。国立長寿医療研究センターにおける病院、ジェロサイエンス研究センター、メディカルゲノムセンターの連携による共同研究で anisocytosis の病態解明と高齢者疾患治療への応用を目指す基盤研究とする。本研究の目的は、加齢に伴う anisocytosis が高齢者の運動機能の回復閾値を表現する可能性を探求するものであり、最終的には RDW がいかなる臨床的条件のもとその閾値としての効力を発揮するか多変量解析を行うものである。そのための基盤研究として、RDW の生物学的意義、特に老化や炎症に関与する遺伝子、パスウェイ解析、老化動物モデルおよび運動器疾患モデルにおける anisocytosis の解析、ヒト血液を用いたゲノムワイド関連解析が重要となる。国立長寿医療研究センターにおける病院、ジェロサイエンス研究センター、メディカルゲノムセンターの連携による共同研究で anisocytosis の病態解明と高齢者疾患治療への応用を目指す基盤研究とする。

B. 研究方法

各研究課題に対して倫理・利益相反委員会の承認を得て下記研究を行った。

① 運動器疾患における anisocytosis に関する縦断研究 (酒井)

2019 年 1 月から 2021 年 12 月までに、同意を得て J-BINC に参加した 65 歳以上の 3 ヶ月以上持続する、visual analogue scale (VAS) が 4 以上の慢性腰痛患者 363 例のうち、1 年間の縦断評価が

可能であった 361 例(平均 78.4±6.2 歳、男 141 例、女 220 例)を対象として、慢性疼痛治療により腰痛 VAS が 3 以下に改善した改善群と、しなかった非改善群につき臨床所見を比較した。体組成評価を全身二重エネルギー吸収法 (DXA)により腰椎骨密度、上下肢骨格筋量、脂肪量、四肢筋量を身長²で除した骨格筋指数 (skeletal muscle mass index; SMI) (kg/m²)、体脂肪率を算出した。体幹筋量は MRI T2 横断像の L1/2 および L4/5 高位の両側腰部多裂筋と脊柱起立筋の和で評価した。脊椎立位側面 X 線像での矢状面アライメントを腰椎前弯角 (lumbar lordosis; LL)、仙骨傾斜角 (sacral slope; SS)、胸椎後弯角 (thoracic kyphosis; TK)、sagittal vertical axis (SVA)、骨盤傾斜角 (pelvic tilt; PT)、pelvic incidence と LL の差 (PI-LL) で評価し、腰椎前後屈側面像で腰椎可動域 (L-ROM) を評価した。終板変性は MRI T1 および T2 で Modic 変化を評価し、腰椎すべりは Myerding I°以上をすべりありとした。また RDW を含む血液生化学所見に加え、ビタミン D (25 OHD) の評価を CLIA 法で行った。2 群比較で p<0.05 と有意差を認めたものを説明変数としたロジスティック回帰分析を行った。

② RDWのマーカーとしての生物学的意義の検討 (渡邊)

1) 運動器疾患モデルの作出

1-1 卵巣摘出モデル

エストロゲン欠乏性の骨粗鬆症を誘導する閉経後骨粗鬆症のモデルとして使用した。8 週齢の C57BL/6N 系統のメスマウスに対し麻酔下で両側の卵巣を摘出(n=6)、対照群(n=6)は開腹縫合のみとした。術後、1 週間毎に採血し血算を行った。

1-2 膝関節 MIA 注入モデル

モノヨード酢酸 (monoiodo acetate, MIA) を膝関節に注入し関節軟骨変性を誘導する変形性関節症モデルとして使用した。8 週齢の C57BL/6N 系統のオスマウスに対し麻酔下で膝関節腔に MIA (20 mg/mL) を 10 μL 注入(n=5)、対照群(n=5)には PBS を同量注入した。術後、1 週間毎に採血し血算を行った。

1-3 加齢育成 (エイジングファーム) マウス

NCGG エイジングファームから加齢マウス (33 週齢) を得て血算および骨髓細胞の解析を行った。

2) マウス血算

マウス尾部もしくは頬部より EDTA 採血を行い、多項目自動血液計測装置 (POCH、シスメックス社) により解析を行った。

3) 骨髓赤血球系の解析

マウス大腿骨・脛骨の骨髓細胞を採取し、マウス表面抗原抗体 Ter-119 および CD71 を用いて、FACS 解析を行った。また、Ter-119 標識 MACS ビーズを用いて MACS により赤芽球系細胞の単離を行い、Q-PCR を行った。

③ ヒトRDWに関するゲノムワイド関連解析 (勝見)

1. GWAS による高 RDW 感受性領域の同定：当センターバイオバンクに保存されている Asian Screening Array(ASA)データ 11,138 例を利用して GWAS を行い、RDW high の集団と RDW low の対照集団の間で統計的に有意な頻度差を示す遺伝子多型を網羅的に検索し、RDW 高値に関わる感受性領域の同定を行う。
2. 候補バリエントの抽出：同定された感受性領域において最も強い関連を示したバリエント（リードバリエント）と連鎖不均衡（linkage disequilibrium, LD）にあるバリエントを確認する。これに加えて対象領域における Bayesian Fine-mapping により原因変異である事後確率の高いバリエントを抽出する。
3. 候補バリエントの注釈・解釈：RDW 高値に関わる候補バリエント毎に非同義変異の関連を統合する gene-based test を行い、候補遺伝子を同定する。
4. 同定した感受性領域の総合的解釈：GWAS の結果を用いたパスウェイ解析、タンパク質の相互作用、論文データベース、データベースによるノックアウトマウスの表現型等の情報により候補遺伝子についてスコアリングを行い、RDW 高値を来す機能的候補遺伝子を抽出する。

（倫理面への配慮）

患者を対象にした調査、臨床研究であり、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」と「臨床研究法」を遵守して行う。臨床データの収集においては患者への口頭説明とホームページ上での同意撤回の機会（オプトアウト）を提供する。令和 5 年 3 月に国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得た。（「高齢者運動器疾患における血液学的老化の評価」No.1688）（酒井）

マウスモデル実験の実施においては、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、動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

（渡邊）

ゲノムワイド関連解析に関する研究では、「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」並びに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するとともに、文書によるインフォームド・コンセントの取得および倫理委員会における承認を得て実施した。（勝見）

分析においては、参加者のデータをすべて集団的に解析し個々のデータの提示は行わず、個人のプライバシーの保護に努める。データはインターネットに接続しないコンピュータまたは記憶媒体に保存する。

C. 研究結果

① 運動器疾患における anisocytosis に関する縦断研究（酒井）

高齢者において RDW \geq 15 である anisocytosis の状態では、経時的にみた骨格筋量の現

象と前傾姿勢の進行が明らかであった。またRDWを経時的に観察し、異常化を呈する要素として高齢、男性、高RDW、低SMIがリスク因子であった。OVF保存治療患者における歩行予後の縦断解析では、骨折後の歩行状態悪化要素として高齢、高RDW、認知症、腰痛の持続がリスク因子であった。

② RDWのマーカーとしての生物学的意義の検討 (渡邊)

NCGG 実験動物施設エイジングファームから供給された月齢 24 ヶ月を超えたマウスにおいて、後方視的に死亡マウスの死亡前計測時とそれまでの決算を比較すると、RDW、MCV の増加、HCT、HGB の低下が特に良好群で顕著であった。老化マウスから採取した骨髄赤芽球系細胞において、老化及び RDW の増加に伴って遺伝子発現量が増加する *Ppp1r15a* 遺伝子に着目し、30 か月齢のオスマウスに *Ppp1r15a* 阻害薬、*Sepin1* を週 2 回腹腔内投与してその影響について検討を行ったところ、MCV、RDW の増加も *Sepin1* 投与によって抑制されていた。さらに、血小板に関する MPV、PDW、P-LCR といった指標も PBS 投与では増加したが、*Sepin1* 投与で抑制された。

③ ヒトRDWに関するゲノムワイド関連解析 (勝見)

NCGG バイオバンクに保存されているジェノタイプングアレイデータを利用してゲノムワイド関連解析 (GWAS) で、線形回帰により唆的有意性 ($P < 1 \times 10^{-6}$) を示した新規座位を示した SNP は *SMG5* 遺伝子上の rs12126696 と、*SLC12A7* 遺伝子上の rs56287436 であった。15%をカットオフとするロジスティック回帰分析では、示唆的特異性を示す SNP として *SMG5* 遺伝子上の rs12126696 と *LINC02359* 遺伝子上の rs200803826 が検出された。

D. 考察と結論

Anisocytosis は老化との関連が示唆され、病態解明が期待されるが、臨床的な縦断的解析が不十分であった。本課題における臨床研究では高 RDW 高齢者の骨格筋量の減少都市性以上の進行が縦断的に確認された。また RDW 自体の縦断変化から、異常化のリスク因子が明らかとなり、そのうち低骨格筋量が含まれていたことは興味深い知見であった。老化に関する運動器学では歩行自立、歩行状態の悪化が重要であり、anisocytosis と歩行予後に関する縦断的解析により、骨粗鬆症性椎体骨折後という限定された条件であるが歩行機能の悪化と RDW の関連も明らかとなった。Anisocytosis を運動器分野における老化マーカーとしての有効性を示す研究成果であり、臨床応用に向けた長期縦断研究への期待が高まる。

また動物実験により高齢マウスにおける RDW 増加、赤血球減少が認められ、死亡と赤血球指標の予後予測としての利用価値を見出すことができた。老化においてはヒト-マウスに共通して RDW の表現型と関連して遺伝子発現亢進が認められた *Ppp1r15a* に対して、高齢マウス個体を用いた阻害剤の投与試験でもこれら赤血球指標との関連傾向が認められた。RDW と相関する赤芽球系で見出した遺伝子 (*Ppp1r15a*) の発現亢進に抗する阻害剤についての今後のさらなる研究成果が期待される。

ヒトにおける GWAS 結果では、変異遺伝子由来の mRNA を分解し、様々な生体ストレスによる mRNA 監視機構の活性制御機構に関わる SMG5 のゲノム有意性が認められた。新規性の高い知見であり、anisocytosis に関わる感受性領域の同定を行うとともに、パスウェイ解析等により機能的候補遺伝子の抽出を行う。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroki Iida, Yasuhiko Takegami, Yoshihito Sakai, Tsuyoshi Watanabe, Yusuke Osawa, Shiro Imagama. Early surgery within 48 hours of admission for hip fracture did not improve 1-year mortality in Japan: a single-institution cohort study. *HIP Int.* 11207000241248836, 2024.
- 2) Kazunori Yamazaki, Yoshihito Sakai, Tadashi Ito, Jo Fukuhara, Yoshifumi Morita. Percentage of decline in individual proprioceptors in older adults. *J Phys Ther.* 36;492-497, 2024.
- 3) Yoshihito Sakai, Yoshifumi Morita, Keitaro Kawai, Jo Fukuhara, Tadashi Ito, Kazunori Yamazaki, Tsuyoshi Watanabe, Norimitsu Wakao, Hiroki Matsui. Targeted vibratory therapy as a treatment for proprioceptive dysfunction: Clinical trial in older patients with chronic low back pain. *PLOS ONE* 19(7); e0306898, 2024.
- 4) Yoshihito Sakai, Norimitsu Wakao, Hiroki Matsui, Naoaki Osada, Tsuyoshi Watanabe, Ken Watanabe. Insulin resistance as a risk factor for flavum hypertrophy in lumbar spinal stenosis. *Spine Surg Relat Res.* 8(6): 583-90, 2024.
- 5) 酒井義人 加齢と老化-高齢者はなぜ歩けなくなるのか? - 臨床歩行分析研究会誌 Vol.11, No.2, 2024.
- 6) 酒井義人 サルコペニアと高齢者の慢性疼痛 日本整形外科学会誌 99:40-48, 202
- 7) Matsui Y, Katsumi A, Tanaka K, Ohara F, Motegi K, Abe A, Tamura S, Yamamoto K, Matsushita T, Adachi M, Nagata Y, Hasegawa M. A case of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type with MYC rearrangement and high BCL2 protein expression due to trisomy 18. *Nagoya J Med Sci.* 2025 in press.
- 8) Nara R, Notoh H, Sasaki T, Tsukiji N, Shirai T, Kamata A, Suzuki N, Suzuki A, Okamoto S, Kanematsu T, Suzuki N, Katsumi A, Kojima T, Suzuki-Inoue K, Matsushita T, Tamura S. PDPN/CLEC-2 axis modulates megakaryocyte subtypes in a hematopoietic stem cell-regulating megakaryocyte-dominant manner. *Thromb Res.* 2025 Jan;245:109230.
- 9) Ohara F, Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, Okamoto S, Tamura S, Kiyoi H, Matsushita T,

Katsumi A. Newly diagnosed multiple myeloma with bleeding and coagulation abnormalities caused by a thrombin-inhibiting substance. **Int J Hematol.** 2024 Dec;120(6):743-749.

- 1 0) Motegi K, Katsumi A. Successful treatment with venetoclax and azacitidine in a patient with acute myeloid leukemia with BCR: ABL1 fusion. **Rinsho Ketsueki.** 2025;66(3):184-188. Japanese.
- 1 1) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, Okamoto S, Suzuki N, Tamura S, Kikuchi R, Katsumi A., Kojima T, Matsushita T. Variability in combinations of APTT reagent and substrate plasma for a one-stage clotting assay to measure factor VIII products. **Int J Lab Hematol.** 2024 Aug;46(4):705-713.
- 1 2) Okamoto S, Suzuki A, Tamura S, Suzuki N, Kanematsu T, Suzuki N, Kawaguchi Y, Katsumi A., Hayakawa F, Kiyoi H, Kojima T, Matsushita T. Misleading antigenic von Willebrand factor levels in acquired von Willebrand syndrome secondary to monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Int J Hematol.** 2025 Jan;121(1):131-136.

2. 学会発表

- 1) 酒井義人 松井寛樹 竹市陽介 長田直祥. 加齢による歩行機能障害に寄与する脊椎関連因子 (主題) 第 53 回日本脊椎脊髄病学会 2024.4.18-20. 横浜
- 2) 酒井義人 若尾典充 松井寛樹 長田直祥 渡邊 剛 杉浦喬也 渡邊 研. 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚とインスリン抵抗性 (JSSR 関連学会受賞セッション) 第 53 回日本脊椎脊髄病学会 2024.4.18-20. 横浜
- 3) 酒井義人 サルコペニアと高齢者の慢性疼痛 (教育研修講演) 第 97 回日本整形外科学会学術総会 2024.5.23-26. 福岡
- 4) 酒井義人 黄色靭帯を科学する—腰部脊柱管狭窄症の新しい治療を目指して— (教育研修講演) 第 143 回北海道整形災害外科学会 2024. 6. 8. -6. 9. 旭川
- 5) 酒井義人 渡邊 剛 松井寛樹 長田直祥 足立 惟 竹市陽介. 高齢者の歩行機能低下と骨格筋の質 -Muscle Quality- 第 66 回日本老年医学会 2024.6.13-15. 名古屋
- 6) 酒井義人 渡邊 剛. 高齢者の腰痛における骨格筋の量と質. 第 61 回日本リハビリテーション医学会 2024.6.13.-6.16. 東京
- 7) 酒井義人 高齢者の腰痛とサルコペニア (シンポジウム) 第 32 回日本腰痛学会 2024.10.26. 幕張
- 8) 能藤日向子、山崎智司、鈴木伸明、岡本修一、鈴木敦夫、兼松 毅、鈴木奈瑠子、勝見 章、小嶋哲人、松下 正、田村彰吾 マウス骨幹骨髄におけるポドプラニン陽性間質細胞の時空間的変遷の解明 第 46 回日本血栓止血学会学術集会 2024 年 6 月 13 日、金沢
- 9) 小原史也、勝見 章、鈴木伸明、兼松 毅、鈴木敦夫、田村彰吾、清井 仁、松下 正 トロンビン阻害物質による出血傾向と凝固異常を伴う初発多発性骨髄腫の一例 第 86

回日本血液学会学術集会 2024年10月11日 京都

- 10) 能藤日向子、奈良陸斗、山崎智司、鈴木伸明、岡本修一、鈴木敦夫、兼松毅、鈴木奈瑠子、勝見 章、小嶋哲人、松下正、田村彰吾 生後早期マウス骨幹に存在する PDPN 陽性間質細胞の時空間的極材解析 第86回日本血液学会学術集会 2024年10月13日 京都

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