

長寿医療研究開発費 2024年度 総括研究報告

運動器疾患病態と個体老化に関する研究（24－5）

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

関節研究では *in vitro* において細胞外鉄による軟骨細胞死の誘導、*in vivo* 関節症モデルにおけるタウリン関節内投与による病態進行の抑制の効果を見出した。

血中の骨格筋特異的タンパク質のプロファイリングでは、生体直交性非定型アミノ酸タギング法を使用するため、マウス交配により骨格筋特異的非定型アミノ酸取り込みの系を作出し、実際、骨格筋由来タンパク質をマウス血清より同定した。

マイオカインの研究では、マウス骨格筋に対する2種類の遺伝子発現解析（バルク・空間トランスクリプトーム）から加齢変動する複数の遺伝子（ag-DEG）を同定し、最も発現変動の大きかった液性因子の中に *Amy1* を見出した。

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、ヒト試料・情報を用いた検討から、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から新たな予防・治療法に繋がるシーズ開発を行う。

サルコペニアや関節疾患は、身体的フレイルの代表的な状態・疾患であり、適切な介入により介護予防となることが期待されている。一方で、高齢者の運動器疾患の中でも、分子レベルの解析が進み低分子化合物や生物製剤が上市され治療選択肢の多い骨粗鬆症と比較しても、分子病態や発症病理の研究が進んでおらず、また病態を反映する有効なバイオマーカーも確立していない。マウスモデルならびにヒトゲノム情報を用いて変形性関節症発症に関わる新たな分子ならびにパスウェイを同定しており、その知見を元に新たな治療法に結びつく分子標的を得るべく解析を進める。関節疾患は高齢者の運動器疾患で最も推定患者数が多いのにも関わらず、エビデンスで支持された治療選択肢は限られている。関節疾患の研究では老化との関連が報告されている ビタミン K やタウリンにより軟骨細胞死が抑制されることを当研究部で見出し、システイン代謝経路が発症病理に関わることを示してきている。そこでシステイン代謝ならびに関連細胞死についてさらに検証し、創薬標的の候補を見出し、新たな治療法選択肢の提供を目指す。

これまでのバイオマーカー探索は **case-control** で血液等を網羅的に解析する手法を中心に進められてきたが、この方法では余程の解析深度・精度がないと微量分子を捉えきれず、またどの組織由来かも不明でありマーカーの **POC** が確立せず、またコホート間で再現性がないことが多い。そこで骨格筋由来血中バイオマーカーの研究ではマウスを用いて **in vivo** で骨格筋特異的に非定型型アミノ酸をタンパク質に取り込ませる方法（生体直交性非定型アミノ酸タギング法）により遺伝学的にラベルし、血中に放出される骨格筋由来ペプチドのプロファイリングを行い、運動や老化、各種疾患モデルでのこれらのペプチドの動態を解析する。本年度においては生体直交性非定型アミノ酸タギング法により遺伝学的に骨格筋で生合成されるタンパク質をラベルし、血中に放出される骨格筋由来ペプチドのプロファイリングを行う。

近年、骨格筋が運動器としてだけでなく内分泌器官としても機能することが示され、骨格筋から分泌される液性の生理活性物質は総称してマイオカインと呼ばれている。マイオカインは、骨格筋の恒常性維持に働くだけでなく遠隔臓器の機能や状態を維持することなどが明らかになっており、マイオカインを介した臓器連関機構と加齢に伴う全身性の減弱との関連性も指摘されている。本研究では、我々が先行研究で同定した新しいマイオカイン候補 **Amy-1** の機能や **Amy-1** を介した臓器連関機構について、マウスモデルやヒト臓器オルガノイドなどによる機能解析から明らかにする。また、筋組織や血液などの臨床検体などを用いた解析により、本因子のサルコペニア・フレイルとの関りについて検証する。マイオカインの研究では、マウス骨格筋に対する 2 種類の遺伝子発現解析（バルク・空間トランスクリプトーム）から加齢変動する複数の遺伝子（**ag-DEG**）を同定し、最も発現変動の大きかった液性因子の中に **Amy-1** を見出した。ヒト骨格筋組織を用いた予備的な発現解析においても高齢者で **AMY-1** が特異的に発現増加していたことから、本因子が骨格筋老化やフレイル/サルコペニアの病態生理に関連する可能性がある。また、**Amy-1** は液性因子をコードする因子であることから、骨格筋だけでなく新規のマイオカインとして

遠隔臓器の恒常性維持に関わる可能性がある。本研究では、Amy-1 の骨格筋における機能、骨格筋老化・フレイル/サルコペニアとの関わり、マイオカインとしての他臓器連関への関与などについて、ヒト検体、マウスモデル、オルガノイドを用いて検証する。

病院整形外科、ロコモフレイルセンター、研究所メディカルゲノムセンターの本研究への協力を頂けることになっており、臨床情報やゲノム情報を加味した形でオール NCGG でのタッグを組んだ成果として創薬やバイオマーカー創出に結びつく基盤研究を進める。

B. 研究方法

1) 関節疾患発症における老化関連因子の解析

1-1 細胞外鉄による軟骨細胞死誘導

マウス軟骨細胞株 ATDC5 に、Slc7a13 野生型、Slc7a13 変異型（変形性関節症自然発症マウスにおける変異）を恒常的に発現する細胞系統を 2 週間分化培地で培養し軟骨細胞への分化を誘導した。これらの細胞系統に対して、クエン酸鉄（Wako）、もしくは細胞内鉄複合体ヘミン（TCI）を IL-1 β 存在下、非存在化で添加し細胞死を LDH assay で評価した。

溶血赤血球は、成体マウスより血液を採取し、eBioscience 1X RBC Lysis Buffer にて定法により溶血させた。溶血試料を上記の鉄添加試験同様、軟骨細胞系統に添加して細胞死を評価した。

1-2 変形性関節症モデルの作出

C57BL6/N 雄マウスを入手し、8 週齢で右脚膝部に、部分的半月板切除（半月板不安定化、destabilization of the medial meniscus : DMM）と（前十字靭帯切断、anterior cruciate ligament transection : ACLT）の併用モデル（Moderate, MOD; Kamekura et al., 2005）を施し、対側（左脚膝部）に偽手術（sham-operated）を施した。隔日で関節内に taurine を注入し 4 週間後、採取して組織標本（safranin-O/methy green）し、OARSI scoring により変形性関節症の重症度の評価を行った。

2) 生体直交性非定型アミノ酸タギング法

2-1 遺伝子組換えマウス

生体直交性非定型アミノ酸タギング法を行うため、横紋筋特異的 Cre マウス (ACTA1-Cre) は理研 BRC、Cre 依存的に変異型メチオニン tRNA transferase (MetRS*)を発現するマウス (*C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-GFP; Mars**L274G*)Esm/J*) は米ジャクソン研究所より入手した。交配により ACTA1(+/-)、MetRS(+/-)の遺伝子型を有するマウスを得て横紋筋特異的に MetRS*を発現するマウスモデル (Acta1-Cre::R26-MetRS*) を作出した。このマウスでは、骨格筋などの ACTA-Cre 発現細胞でのみ、アミノ酸誘導体をメチオニンの代わりにタンパク質を取り込むことができるマウスである。

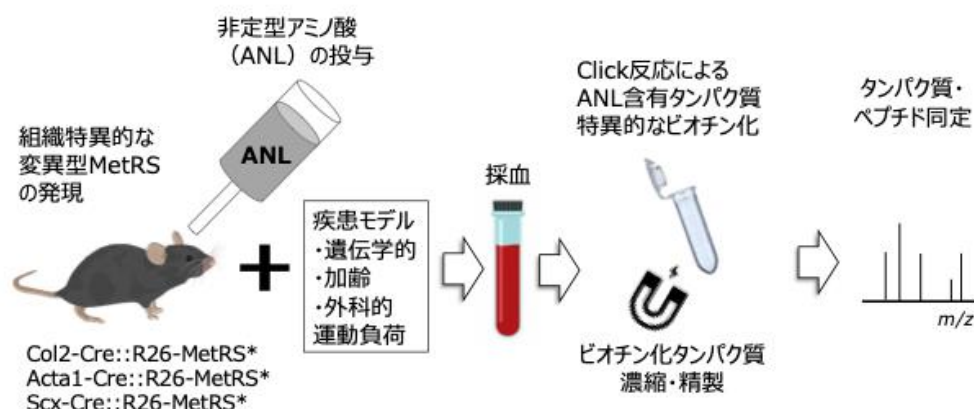


図1 生体直交性非定型アミノ酸タギング法による組織・細胞特異的血中タンパク質同定の概略

2-2 血中タンパク質の検出

Acta1-Cre::R26-MetRS*マウスに変異アミノ酸誘導体 (非定型アミノ酸) ANL を一日1回・5日間腹腔投与し、血清を採取した。血清タンパク質は Click-iT Protein Enrichment Kit, for click chemistry capture of azide-modified proteins (Invitrogen) で Click 反応によりアミノ酸誘導体特異的にビオチンラベルを施した。フリーのビオチンは Zeba Dye and Biotin Removal Spin Columns 0.5ml 25 カラム (Thermo Scientific) で除去した。ビオチンラベル化されたタンパク質は Sera-Mag™ SpeedBeads Blocked Streptavidin particles で精製・濃縮し、ウェスタンブロット法で検出した。

3) 新規マイオカイン候補の解析

3-1 空間トランスクリプトーム解析

空間トランスクリプトーム解析には 10 x Genomics 社の Visium 空間的遺伝子発現解析システムを用い、同社プロトコルに従って解析を進めた。若齢マウス (2 ヶ月齢) と老齢マウス (27-31 ヶ月齢) の前脛骨筋 (速筋) およびヒラメ筋 (遅筋) を液体窒素で冷やしたイソペンタン溶液中で凍結し、10- μ m 厚の薄切凍結切片を Visium 空間的遺伝子発現スライド上のキャプチャー領域に貼付した。HE 染色した組織切片像を顕微鏡下で画像撮影し、事前の条件検討により決定した浸透時間を用いて薄切凍結切片よりバーコード付き

RNA を抽出した。抽出 RNA からライブラリを作成しトランスクリプトーム解析を行った。空間トランスクリプトーム解析は、国立がん研究センター研究所で実施した（関根圭輔ユニット長のご協力の下で行った）。

3-2 遺伝子発現（qPCR）解析

若齢マウス（2 ヶ月齢）と老齢マウス（27~31 ヶ月齢）の前脛骨筋、若齢者（7 例）と高齢者（24 例）の内側広筋からそれぞれ RNA を抽出し、cDNA 合成後に qPCR 法による発現比較を行った。RNA 抽出および qPCR は、SuperPrep II Cell Lysis & RT Kit for qPCR（TOYOBO）を用いて実施した。

3-3 *In vitro* ヒト骨格筋モデルを用いた解析

不死化ヒト筋芽細胞株 Hu5KD3（Shiomi *et al.*, Gene Therapy. 2010）は pMGM 培地にて維持し、分化誘導時に培地を 2%HS/ITS/DMEM 培地に置換することで多核筋管細胞形成を促した。筋芽細胞と筋管細胞から RNA とタンパク質を抽出し、qPCR により *AMY1* 発現、さらに抗 α -Amylase 抗体（Sigma）を用いたウェスタンブロット法により α -Amylase 発現を比較した。さらに、筋芽細胞と筋管細胞の培養上清を回収し、培養上清中の α -Amylase 量の比較（ELISA 法；Cloud-Clone）およびアミラーゼ活性（Sigma）について比較検証した。また、ヒト筋管細胞における α -Amylase タンパク質発現は免疫蛍光染色によっても確認した。

3-4 バイオバンク試料での α -Amylase の検出

NCGG バイオバンクから凍結血漿サンプル（51~89 歳；118 例）を入手し、血中 α -Amylase 量の加齢性変化を ELISA 法により検証した。入手した凍結血漿サンプルは低温（4℃で一晩）で融解し、必要量分注後に-80℃フリーザーに保管した。ELISA 実施前夜に分注した血漿サンプルをフリーザーから 4℃冷蔵庫に移し、再融解後にアッセイに用いた。また、全てのサンプルの凍結・融解回数は統一して実験に供した。

（倫理面への配慮）

本研究課題の実施にあたっては、令和 3 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省「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）等の関連指針に照り、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、個人情報保護を徹底する。本研究に関しては、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倫理・利益相反委員会で承認を得て行った（No. 1618）。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

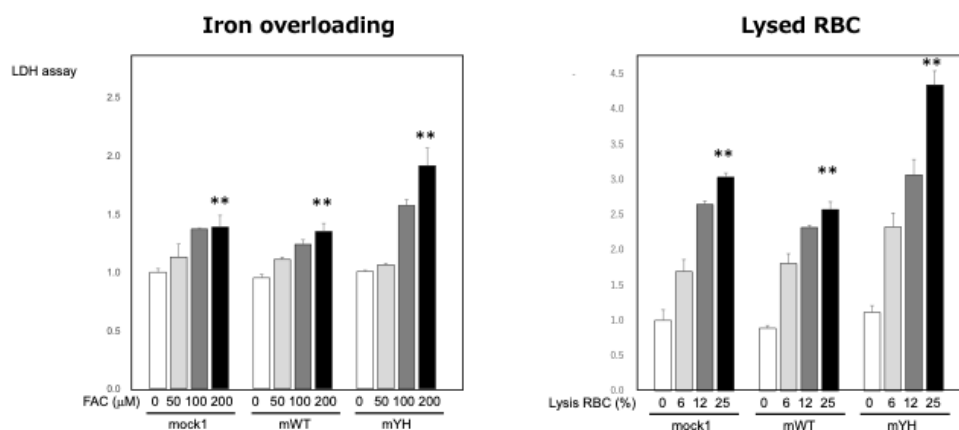
(動 6-6、6-7 および 6-44)。特に動物実験時の苦痛軽減措置には十分な配慮をもって行った。

C. 研究結果

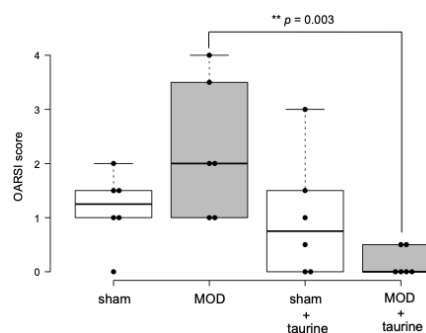
1) 関節疾患発症における老化関連因子の解析

これまでに変形性関節症自然発症マウスの解析から、**Ferroptosis** による関節軟骨細胞死がその発症の一因となっていることを見出した。一方、最近、細胞外鉄は細胞老化を引き起こすことが報告され、細胞外鉄の軟骨細胞への影響について *in vitro* の系を用いて検討を行った。**Hemin** を 0 から 1m M までの用量で添加したところ、最大用量の 1mM で細胞死の部分的な亢進は観察されたが、顕著な細胞死誘導はおきなかった。クエン酸鉄 (FAC)を用いた実験では、0-200 μ M で用量依存的に細胞死が誘導された。また、FAC 添加により、変異型を発現する細胞系統では細胞死がより顕著であった。

赤血球ライセートの添加ではより顕著に細胞死の誘導が観察された。(下図)

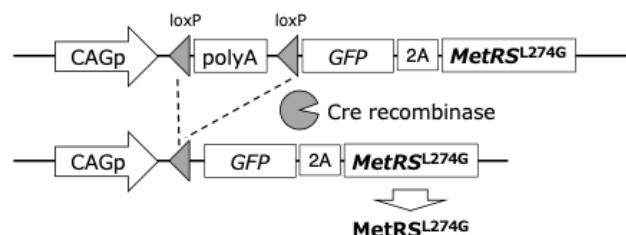


変形性関節症モデルを作出し、タウリンの関節内投与により、発症進行への影響を検討した。タウリンの投与により、顕著に発症進行が抑制された。(右図)

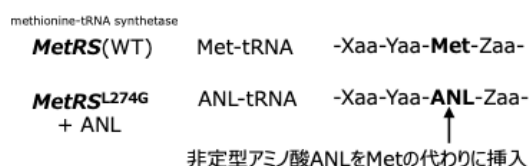


2) 骨格筋由来血中バイオマーカーの探索

生体直交性非定型アミノ酸タギング法 (Bio-Orthogonal Non-Canonical Amino acid



Cre活性依存的にMetRS変異体を発現するマウス系統



非定型アミノ酸ANLをMetの代わりに挿入

Tagging: BONCAT) を用いた muscle-specific BONCAT (mBONCAT)系を構築した (Acta1-Cre::R26-MetRS*)。mBONCAT では、Cre が発現する筋肉組織でのみ、変異型メチオニン tRNA 合成酵素が発現して、非定型アミノ酸 (ANL) をメチオニンの代わりにタンパク質やペプチドに

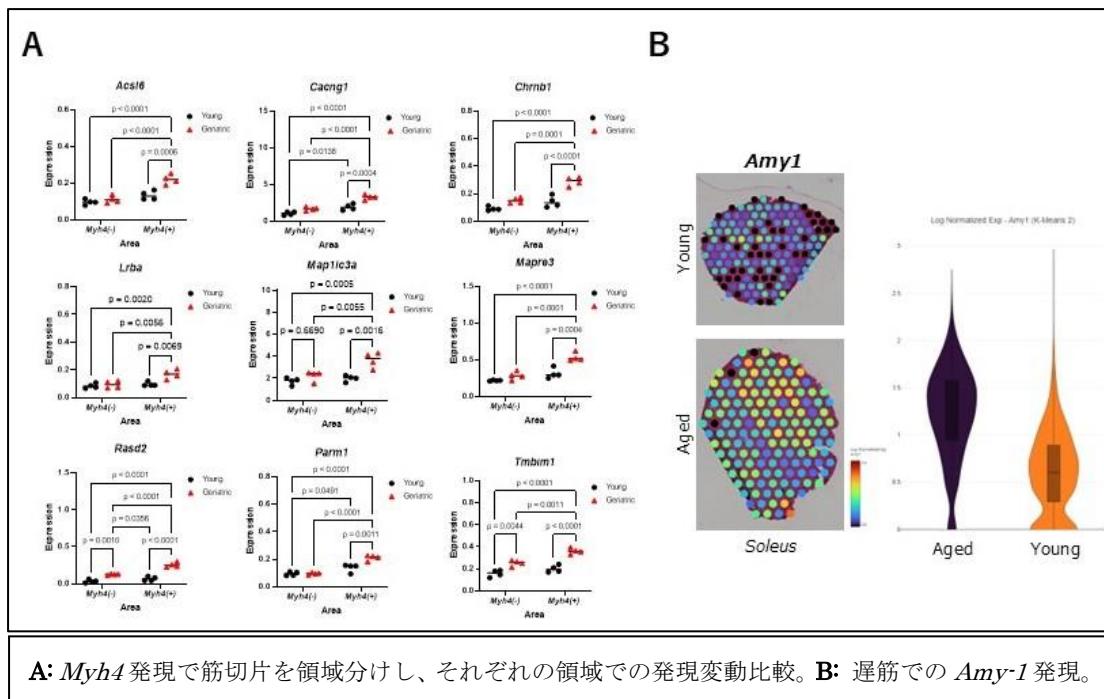


導入する。ANL はアジド基を有するため、Click 反応で簡単かつ特異的にビオチン化が可能となる。そのため、mBONCAT マウス (ANL-injected Acta1-Cre::R26-MetRS*) では血中タンパク質に対して Click 反応を行うと筋組織由来タンパク質のみがビオチン化され、それをストレプトアビジンにより、精製・検出が可能となった。右図はその一例で、ACTA1-Cre の有無でビオチン化タンパク質のプロファイルが異なり、特に Cre 依存的にビオチン化されたタンパク質 (赤※で示されるバンドとして検出) が観察された。このことから血中にはかなりの筋由来タンパク質が存在することが示された。

3) 新規マイオカイン候補の解析

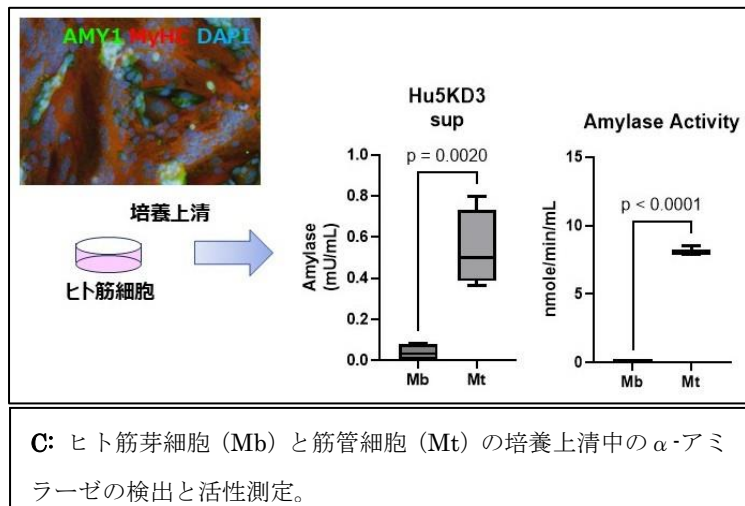
1: 空間トランスクリプトーム解析による *Amy-1* の加齢性局在変化に関する解析

若齢マウスおよび老齢マウスの速筋 (前脛骨筋; TA) と遅筋 (ヒラメ筋; Soleus) について空間トランスクリプトーム解析を行った。結果として、速筋・遅筋のいずれの筋タイプにおいても数百個の遺伝子発現変動が認められ、速筋と遅筋で独自に変動する遺伝子を複数個同定した。得られたトランスクリプトーム情報を基に、特に速筋においてミオシン重鎖 (*Myh*) アイソフォームの発現をベースとした領域分けを行い、*Myh4* 発現の強い領域と弱い領域のそれぞれで加齢変動する遺伝子群を探索した。加齢にともなう領域が変化する遺伝子 (発現が弱い領域⇔発現が強い領域) の同定には至らなかったが、*Myh4* 発現が強い真皮側 (表層部) で老化に伴って発現増加する遺伝子として *Map1lc3a* や *Chrnbl*、脛骨側 (深部) で加齢に伴って発現が増加する遺伝子として *Rasd2* や *Tmbim1* などを同定した (図 A)。一方、本研究で着目している *Amy-1* は加齢性局在変化が生じず、加齢に伴って組織全体で発現増加することが明らかとなった。同様に、遅筋においても老齢マウスヒラメ筋の組織切片全体で *Amy-1* の発現増加が認められた (図 B)。



2 : *In vitro* ヒト骨格筋モデルを用いた解析

α -アミラーゼは主に唾液腺や膵臓で産生される消化酵素であり、局所臓器におけるグリコーゲン分解への関与に加えて血中へ分泌される（実臨床において膵炎マーカーとして用いられている）。しかし、骨格筋で作られた α -アミラーゼが細胞外に分泌されるか否かは明らかではない。そこでヒト筋細胞を用いて、筋 α -アミラーゼの分泌能について検証した。ヒト筋細胞株 Hu5KD3 を筋管細胞に分化させ、48 時間の分化誘導後に培養上清を回収し、未分化な筋芽細胞の培養上清をコントロールとして培養上清中の α -アミラーゼ濃度を ELISA により測定・比較した。その結果、筋芽細胞培養上清では α -アミラーゼタンパク質がほとんど検出されなかったが、筋管細胞培養上清では十分量の α -アミラーゼを検出した。また、ヒト筋管細胞培養上清中の筋 α -アミラーゼは活性を有していることも明らかとなった（図 C）。これらの結果は、筋線維で産生された α -アミラーゼが活性を有しながら細胞外（血液中）に分泌されることを示している。



3：ヒト血中 α -Amylase 量の加齢性変化

NCGG バイオバンクから入手した血液試料を用いて、血中 α -Amylase 量の加齢性変動について検証した。血中 α -Amylase の検出には ELISA を用い、51 歳から 89 歳の血中 α -Amylase 量の加齢性変化量を測定・比較した。定量後に相関解析を行い、血中 α -Amylase 量と年齢との間に正の相関があることを見出した ($r=0.2188$, $p=0.0178$)。若齢マウスと老齢マウスの血中 α -Amylase 量を比較しても、ヒト同様に老齢個体で有意に増加していた。これらの結果は、血中 α -Amylase が加齢に伴って増加することを示している。

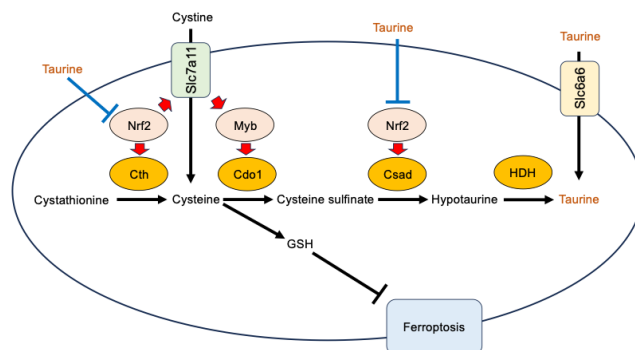
D. 考察と結論

関節疾患発症における老化関連因子の解析

2023 年に Serrano のグループから、鉄の細胞内蓄積が細胞老化や線維化を誘導することが報告された (Maus et al. Nature Metab. 2023)。肺や腎臓の線維化モデルで鉄の蓄積と細胞老化の誘導、*in vitro* でも鉄または赤血球ライセートによる細胞老化誘導が見られている。細胞内の鉄の蓄積は細胞損傷によって開始され、老化表現型の進展とともに徐々に増加することが報告されている。このプロセスは、異常な量の細胞外鉄の存在を必要とせず、むしろ老化による細胞周期の終了に内在する特徴であるとしている。一方、本年度の実験結果からこれは変形性関節症の発症において関節外力等による関節内傷害・炎症による出血（それに伴う部分的な溶血）が軟骨細胞死を誘導する可能性を示し、また、自然発症モデルにおけるトランスポーター遺伝子変異が細胞外鉄や溶血による細胞死誘導に対して感受性が増していることを示唆し、変形性関節症発症病理の一端を担っていると考えられた。炎症時における細胞外鉄に対する応答性が細胞によって異なる可能性も示された。

タウリン (taurine) 欠乏マウス (Slc6a6 ノックアウトマウス) では老化表現型の亢進が認められると報告されている (Singh et al. Science 2023)。Taurine は、Slc6a6 により細胞内に取り込まれるが、細胞内ではシステイン (cysteine) から合成され、グルタチオン (GSH) 合成系と枝分かれしており、細胞内システインがこれらの細胞内抗酸化物質の源となっている。Ferroptosis が変形

性関節症に関与する可能性を我々はこれまでに新たな病理として見出しており、炎症やシスチン取り込みの減少によりひく起こされる GSH や taurine の低下に対して taurine の補充が軟骨細胞の ferroptosis 抑制に繋がる、変形性関節症の進行抑制に寄与する可能



性が示された。

骨格筋由来血中バイオマーカーの探索

現在、広く利用されている Creatinine/Cystatin C ratio (CCR)は骨格筋量との相関が報告され、CCR が高いほど一般的に筋肉量が多く、身体機能が向上する可能性があり、また CCR は、筋肉の減少を特徴とするサルコペニアを評価するための貴重なツールとなっている。しかし、CCR は数少ない血中マーカーであり、サルコペニアの多様な原因を考えるとマーカーの選択肢は必要と思われる。本研究では mBONCAT を用いて血中で筋由来タンパク質を検出しており、現在、これらのタンパク質についてマスマススペクトルによる同定を進めている。同定されれば、マウスの月齢、食餌、運動等でのプロファイルの変化と、バイオバンクサンプルを用いたヒト血液での検証を行い、マーカーの有効性や意義を検討していくことになる。

新規マイオカイン候補の解析

本年度は、まず空間トランスクリプトーム解析を用いて、マウス骨格筋組織における α -Amylase 遺伝子 *Amy-1* の加齢性局在変化について検証した。その結果、速筋においても遅筋においても加齢に伴う *Amy-1* の組織内局在変化は認められず、老齢マウス骨格筋では組織全域に渡り発現増加していることが明らかになった。特に速筋において行った *Myh* アイソフォームによる領域分けの結果は、*Amy-1* が速筋線維の種類によって発現変化するものではないことを示している。一方、マウス骨格筋に対する qPCR の結果 (data not shown) から、速筋に比べて遅筋において *Amy-1* が高発現していることも明らかとなった。これらの知見は、 α -Amylase が遅筋においてより重要な役割を果たしている可能性を示している。次に我々は、培養細胞を用いて筋 α -Amylase の分泌能について検証し、筋管細胞 (筋線維 *in vitro* モデル) から α -Amylase が分泌されることを確認した。筋線維から分泌された α -Amylase は生理活性を有しており、このことは筋由来 α -Amylase がマイオカインとして遠位臓器の恒常性維持に寄与している可能性を示している。この点については、今後の研究でも引き続き追及していく。さらに本研究では、NCGG バイオバンクの血液試料を用いた解析を実施し、血中 α -Amylase 量が加齢に伴って増加することを明らかにした。今後、サルコペニア・フレイルの患者検体を用いた血中 α -Amylase 量の比較解析を行うことで、筋由来 α -Amylase の疾患バイオマーカーとしての有用性について検証していく。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai Y, Wakao N, Matsui H, Osada N, Watanabe T, Watanabe K.
Insulin Resistance as a Risk Factor for Flavum Hypertrophy in Lumbar Spinal Stenosis. Spine Surg. Related Res. 2024 Apr 3;8(6):583-590.
- 2) Sakai Y, Watanabe T, Wakao N, Matsui H, Osada N, Adachi Y, Takeichi Y, Katsumi A, Watanabe K.
Clinical Factors Contributing to Age-Related Gait Dysfunction in Older Adults. Geriat. Orthopaed. Surg. Rehab. 2025 May 20:16:21514593251340758.

2. 学会発表

- 1) Hosoyama T. Muscle-derived Amylase. Novel Myokine? Potential Biomarker for Age-related Disease? World Sarcopenia Day ANZSSFR-AAFS Event, July 4th, 2024. (Web).
- 2) Hosoyama T, Kawai-Takaishi M, Takemura M, Watanabe T, Sekine K, Shigemizu D, Satake S. Muscle-derived α -amylase is age-variable myokine and useful for the frailty biomarker. 10th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. Bangkok, Thailand, Oct 10th, 2024.
- 3) 細山 徹, 漆畑拓弥, 高石美菜子, 佐藤亜希子, 渡邊 剛, 竹村真里枝, 重水大智, 関根圭輔, 佐竹昭介. 加齢変動性マイオカインの α アミラーゼは疾患バイオマーカーになり得る. 第11回日本サルコペニア・フレイル学会大会, 2024年11月3日, 東京都.
- 4) 細山 徹. 骨格筋加齢変動因子の疾患バイオマーカーとしての可能性. 第3回熊本大学健康長寿代謝制御研究センター・国立長寿医療研究センター共同シンポジウム, 2025年3月22日, 熊本市.

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