

長寿医療研究開発費 2025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 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

サルコペニアは関節疾患などの運動器障害の基盤となる疾患であり、超高齢社会にある我が国においてその対応は喫緊の課題である。しかし、加齢などを背景とする多因子関連疾患であるサルコペニアの病態生理解明には至っておらず、予防法や治療法の開発には程遠いのが現状である。最近我々は、マウスやヒト骨格筋組織を用いて、老齢個体骨格筋で α -アミラーゼが高発現することを見出した。しかし現状、成体骨格筋における α -アミラーゼの機能や役割は不明であり、加齢性疾患との関わりも明らかではない。そこで本研究では、空間トランスクリプトーム解析や *in vitro* ヒト骨格筋モデル、ヒト検体などを用いて、老齢筋で特異的に発現増加する α -アミラーゼの機能、制御機構、意義などについて検証する。本年度は、*AMY1* 発現が高齢者骨格筋で減少すること、老齢動物骨格筋において従来とは異なる α -アミラーゼを介した新規グリコーゲン分解機構が存在することを示した。さらに、老齢マウス骨格筋においてマグネシウムトランスポーターの発現変動が生じることなどを明らかにした。次年度以降も引き続き骨格筋由来 α -アミラーゼのマイオカインとしての可能性や疾患バイオマーカーとしての可能性、さらにマグネシウム代謝について検証していく。

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：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）。

2：ウェスタンブロット解析

マウス（腓腹筋）およびヒト筋組織（内側広筋）からタンパク質を抽出し、BCA 法によりタンパク質濃度を測定後に Laemmli SDS-PAGE による分離し、抗 pPYGM 抗体 (Abcam)、抗 α -Amylase 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 SLC41A3 抗体 (ThermoFisher) の各抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。得られた各バンドは Image J software を用いて数値化しバンド強度を比較した。

3：遺伝子発現 (qPCR) 解析

サルコペニア患者 (AWGS2019 基準) と高齢健常者 (n=4) の内側広筋から 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。

4：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。AMY-1 の過剰発現に用いたウイルスベクターは Vector Builder から購入し、筋芽細胞に AAV を感染後に筋管細胞へ分化させ、分化 3 日目に RNA 抽出、細胞内グルコ

ース (Sigma-Aldrich)、細胞内マルトース (Sigma-Aldrich)、さらに ATP (Dojin) の測定を行った。

5 : バイオバンク試料での α -Amylase の検出

NCGG バイオバンク (ISO20387:2018) 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)

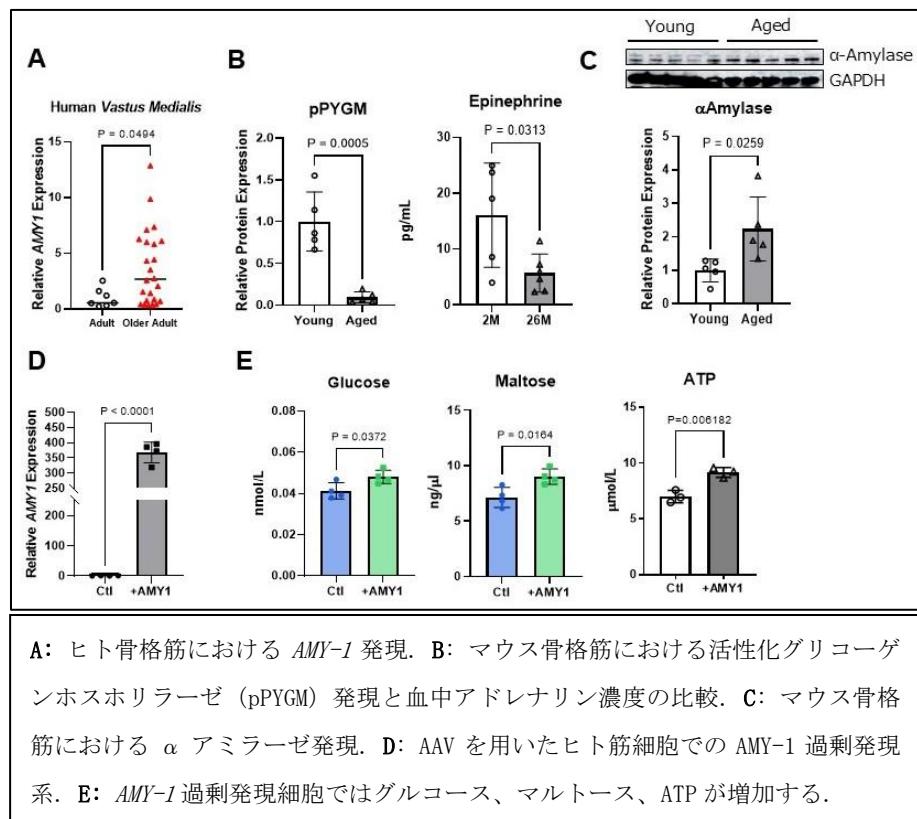
本研究課題の実施にあたっては、令和 3 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、厚生科学審議会答申「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方」(平成 10 年 12 月 16 日)等の関連指針に則り、人間の尊厳及び人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、適正に研究を実施し、個人情報保護を徹底する。本研究に関しては、バイオバンク試料を用いた研究ならびにゲノム解析研究については倫理・利益相反委員会で承認を得て行った (No. 1557, 990-14)。また、動物実験に際しては、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に従い行った (動 7-3, 7-6, 7-7)。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. α アミラーゼの骨格筋における役割についての検証

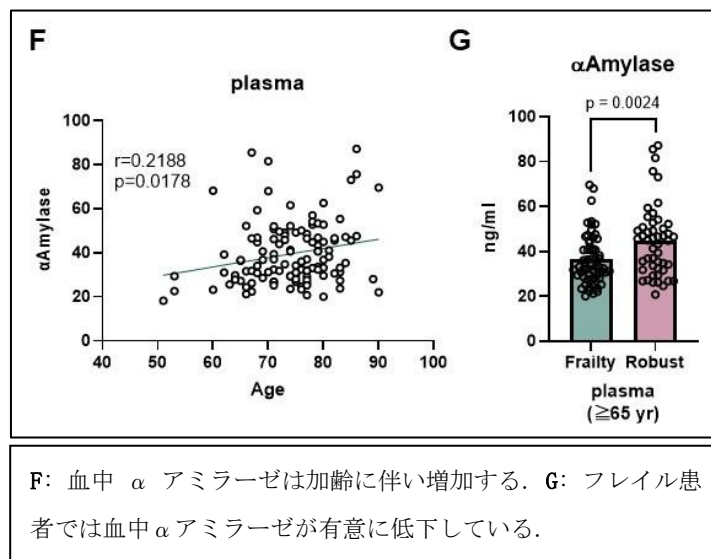
昨年度までに老齢マウス骨格筋において Amy-1 の発現が増加することを明らかにしていることから、本年度はまず、ヒト骨格筋においても AMY-1 発現の増減が認められるかを qPCR により検証した。その結果、マウス同様に、高齢者骨格筋においても *AMY-1* 発現の増加が確認された (図 A)。Amy-1 がコードする α アミラーゼは、澱粉やグリコーゲンをマルトースなどのオリゴ糖に分解する最も古典的な消化酵素であり、骨格筋においても同様の働きが予想される。しかし筋グリコーゲンの分解には、グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) が主要酵素として働き、 α アミラーゼがその過程に入り込む余地はないことから、骨格筋において何をしているのかは不明である。

本研究では、 α アミラーゼが老化骨格筋で増加する意義を明らかにするために、まずはマウス骨格筋における筋グリコーゲン代謝について改めて検証することとした。その結果、老齢マウス骨格筋では PYGM の活性化（リン



酸化) を導くアドレナリン量の有意な低下も認めた (図 B)。一方、老齢マウス骨格筋では、遺伝子発現と同様に α アミラーゼの増加を確認した (図 C)。これらの結果は、老齢個体の骨格筋において若齢期とは異なるグリコーゲン分解経路が存在し、その中核を α アミラーゼが担っていることを示唆している。

次に、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いてヒト筋細胞で *AMY-1* (α アミラーゼ) を過剰発現する系を構築し、骨格筋における α アミラーゼの作用について検証した。AAV-*AMY-1* をヒト筋管細胞で過剰発現した結果、筋グリコーゲンの分解産物であるマルトースとグルコースの増加と ATP 産生亢進を認めた (図 D, E)。この結果は、 α アミラーゼが骨格筋においても筋グリコーゲン分解に関与することを明確に示しており、老齢マウスや高齢者の骨格筋で増加する α アミラーゼが PYGM の代わりに筋グリコーゲン分解とそれに



伴うエネルギー産生を担っていることを示唆している。

2. ヒト血中 α アミラーゼの加齢性変化

NCGG バイオバンクの血液試料を用いて、血中 α アミラーゼの加齢性変動について検証した。血中 α アミラーゼの検出には ELISA を用い、51 歳から 89 歳の血中 α アミラーゼ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 アミラーゼ量と年齢との間に正の相関を見出した ($r=0.2188$, $p=0.0178$) (図 F)。マウスにおいても同様に老齢個体で血中 α アミラーゼが有意に増加しており、これらの結果は、動物種を問わず血中 α アミラーゼが不変的に加齢に伴い増加することを示している。さらに興味深いことに、血中 α アミラーゼ量はフレイル患者において有意に減少しており、疾患バイオマーカーとしての可能性を示している (図 G)。

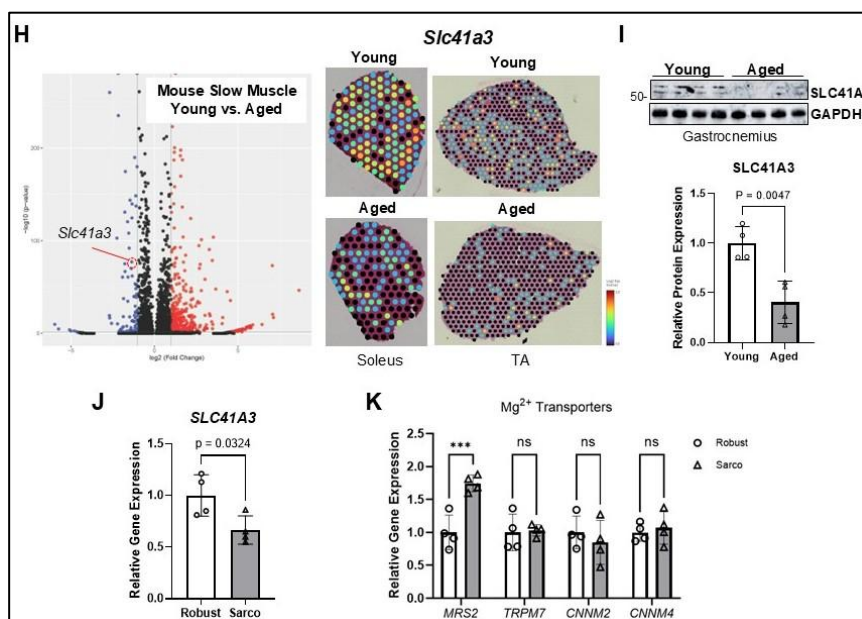
3. マグネシウムトランスポーターの加齢性変化

Amy-1 以外の加齢性筋内変動因子を同定するために、前年度に実施したマウス筋組織に

対する空間トランスクリプトーム解析のデータセットの再解析を行った。その結果、多くの age-DEGs (加齢変動性遺伝子) を同定したが、その中でマグネシウムトランスポーターをコードする

Slc41a3 に注目した。*Slc41a3* はマウスの遅筋 (ヒラメ筋) と速筋 (前脛骨筋) のいずれにおいても老齢マウ

スで発現が低下しており、また、発現の局在変化を生じずに筋全体でその発現が減少する (図 H)。また、タンパク質発現レベルにおいても老齢マウス骨格筋で発現が低下していた (図 I)。さらに、高齢者から採取した内側広筋組織を用いて、サルコペニア患者と高齢健康者との間での *SLC41A3* 発現について小規模解析を行ったところ、サルコペニア患者において *ALC41A3* 発現が有意に減少し (図 J)、その一方で、別のマグネシウムトランスポー



H: *Slc41a3* のマウス筋組織における局在と発現の比較. I: マウス骨格筋の *Slc41a3* タンパク質発現の比較. J, K: サルコペニア患者と高齢健康者の骨格筋での *SLC41A3* とそれ以外のマグネシウムトランスポーターの発現の比較.

ターである *MRS2* 発現の増加を認めた (図 K)。これらの結果は、サルコペニア患者の骨格筋においてマグネシウム代謝に特異的な変化が生じている可能性を示している。

D. 考察と結論

マウス骨格筋のトランスクリプトーム解析から加齢変動性液性因子として同定した Amy-1 とその産物である α アミラーゼは、これまでの様々な検証により、新しい筋グリコーゲン分解酵素としての役割が予想される。重要なことは、若齢期には α アミラーゼがほぼ発現せず、高齢期になり初めてその機能が発揮される可能性があることである。グリコーゲン研究の長い歴史の中で、筋グリコーゲン分解の主要な経路として「アドレナリンによるグリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) の活性化」が広く認知されてきたが、今回の研究により、PYGM を介した従来の筋グリコーゲン代謝経路が高齢者骨格筋では阻害され、その代替機構として α アミラーゼを介した経路が発動する可能性が示された。この知見は、高齢者骨格筋における全く新しいエネルギー供給系の存在を示唆しており、これまでの常識を覆す新たな発見となり得る。

アドレナリンによる筋グリコーゲン分解は、ストレスに対する骨格筋の適応機構の一つと考えられており (ATP を産生することで外的ストレスに対する骨格筋の抵抗性を示す)、高齢者のストレス適応機構に α アミラーゼが関わる可能性や、その機構破綻によるフレイル発症の可能性なども考えられる。実際本研究において、加齢に伴い増加する血中 α アミラーゼがフレイル患者では有意に低下することを見出しており、 α アミラーゼがフレイル発症の分水嶺となる可能性や疾患バイオマーカーとしての有用性も考えられる。さらに、筋由来 α アミラーゼが血液を介して、脳や肝臓など他の筋グリコーゲン代謝臓器に働きかけるマイオカインとしての役割も想定され、研究しつくされた感のある α アミラーゼの新たな可能性を示すことができる。現状、加齢に伴って増加する血中 α アミラーゼがどの臓器に由来するのかを示す明確な答えを有しておらず、フレイルをはじめとする高齢者疾患のバイオマーカーと言い切ることは出来ない。この点については、現在、本課題で同時に進めている BONCAT 法 (筋由来タンパク質にタグを付加することができる *in vivo* 実験系) を用いることで、加齢に伴い増加する血中 α アミラーゼの主要な産生臓器 (起源) が骨格筋であるか否かを証明することができ、課題解決は可能である。を用いて筋由来因子にタグ付けし筋由来の α アミラーゼがどれほど血中レベルに反映されるかを検証することで解決できると考えており、マイオカインとしての機能についても同様の方法で明らかに出来る。

さらに本年度は、空間トランスクリプトーム解析データの再解析から、新たな加齢変動性因子として *Slc41a3* を同定した。興味深いことに、*SLC41A3* は高齢者骨格筋およびサルコペニア患者骨格筋で有意に発現が低下しており、新たなサルコペニア関連因子として期待される。*Slc41a3* は腎臓などではマグネシウムトランスポーターとして機能することが示さ

れているが、骨格筋における役割や機能についての報告はこれまでになく、2026 年度はヒト筋細胞などを用いて検証していく。また、我々はこれまでに NCGG バイオバンク試料を用いた全ゲノム解析から、SLC41A3 のコード領域内にサルコペニア関連バリエントを同定しており (Furutani, Hosoyama et al., Gerontology. 2025)、2026 年度にはゲノム編集技術などを駆使してその機能解析を展開していき、SLC41A3 の骨格筋における機能やサルコペニアとの関連性を明らかにする。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroki Iida, Minako Kawai-Takaishi, Yoshihiro Miyagawa, Yasuhiko Takegami, Akiyoshi Uezumi, Takeshi Honda, Shiro Imagama, Tohru Hosoyama. PDZRN3 regulates adipogenesis of mesenchymal progenitors in muscle. Regenerative Therapy, 28, 474-480. 2025.
- 2) Kiyo-Aki Ishii, Ryo Hashimoto, Chikako Umeda, Tohru Hosoyama, Ken Watanabe. PLOS ONE, 20(7): e0326968. 2025.
- 3) Minako Kawai-Takaishi, Tohru Hosoyama. Muscle spindle afferent neurons preferentially degenerate with aging. Scientific Reports, 15(1): 23946. 2025.

2. 学会発表

- 1) Tohru Hosoyama. Muscle-derived digestive enzyme might be a novel biomarker for age-related muscle diseases. The 9th NCGG/TMIG-ICAH symposium, Apr 10th, 2025, Obu, Japan.
- 2) 馬本恒太郎, 坊内良太郎, 添田光太郎, 霍田裕明, 佐竹昭介, 細山 徹, 大杉 満, 田辺晶代, 植木浩二郎. 糖尿病患者において老化関連バイオマーカーは心血管イベント発生の予測に有用である. 第68回日本糖尿病学会年次学術集会, 5月29日, 2025年, 岡山市.
- 3) 邦武克彦, 高石美菜子, 江口貴大, 伊藤尚基, 細山 徹, 青木吉嗣. MYOD1 変換後尿由来細胞を用いたサルコペニア骨格筋細胞モデル構築と薬剤シース探索. JH リトリート 2025, 6月7日, 2025年, 中央区, 東京.

- 4) 坊内良太郎, 馬本恒太郎, 添田光太郎, 霍田裕明, 佐竹昭介, 細山 徹, 大杉満, 田辺晶代, 植木浩二郎. 糖尿病患者における老化関連バイオマーカーと心血管疾患発症の関連. 第 67 回日本老年医学会学術集会, 6 月 27 日, 2025 年, 千葉市.
- 5) 高石美菜子, 細山 徹. 単離筋紡錘を用いた筋紡錘の加齢性変化の解析. 第 79 回日本体力医学会大会, 2025 年 9 月 19 日, 草津市.
- 6) Tohru Hosoyama. Role of digestive enzymes in muscle homeostasis. The 11th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia, Oct 17th, 2025, Kaohsiung City, Taiwan.
- 7) 細山 徹. 骨格筋の霜降り化と間葉系前駆細胞. 第 12 回日本サルコペニア・フレイル学会大会, 2025 年 11 月 1 日, 熊本市.
- 8) Tohru Hosoyama. Potential Biomarkers of Age-related Muscle Diseases. Sarcopenia International Seminar 2025, Nov 8th, 2025, Taipei, Taiwan.
- 9) 細山 徹, 高石美菜子, 漆畑拓弥, 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. α -アミラーゼは高齢者の筋グリコーゲン分解に関与する. 第 48 回日本分子生物学会年会, 2025 年 12 月 3 日, 横浜市.
- 10) Motoki Furutani, Tetsuaki Kimura, Koya Fukunaga, Marie Takemura, Yasumoto Matsui, Shosuke Satake, Yukiko Nakano, Taisei Mushiroda, Shumpei Niida, Kouichi Ozaki, Tohru Hosoyama, Daichi Shigemizu. Identification of a risk allele at SLC41A3 and a protective allele HLA-DPB1*02:01 associated with sarcopenia in Japanese. 日本人類遺伝学会第 70 回大会, 2025 年 12 月 20 日, 横浜市.
- 11) 高石美菜子, 細山 徹. The muscle spindle -complex, unique, and beautiful sensory receptor-. 第 103 回日本生理学会大会, 2026 年 3 月 10 日, 新宿区, 東京.
- 12) 細山 徹, 木村哲晃, 重水大智. ヒト筋細胞を用いたサルコペニア関連バリアントの機能解析. 第 12 回骨格筋生物学研究会. 2026 年 3 月 13 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