

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09289

研究課題名（和文）ビタミンDシグナルによる骨格筋の維持制御機構とサルコペニア病態生理の解明

研究課題名（英文）Elucidation of vitamin D signaling on muscle homeostasis and sarcopenia pathophysiology

研究代表者

細山 徹（Hosoyama, Tohru）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 ジェロサイエンス研究センター・副部長

研究者番号：20638803

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンDは様々な生命現象に寄与しており、その産生量の低下と疾患との関連性が指摘されている。本研究では、老年性疾患であるサルコペニアとビタミンD欠乏やビタミンDシグナル阻害との関連性について、遺伝子組換えマウスや疫学解析などを用いて検討した。その結果、成熟筋線維におけるビタミンDシグナル阻害によって筋力低下が生じること、また、ビタミンD欠乏者においてサルコペニア発症率が増加することを見出した。さらに、高齢者に頻発する骨格筋内脂肪蓄積にビタミンD欠乏やビタミンDシグナル阻害が関わることなどを明らかにした。これらの研究成果は、サルコペニアの予防法や治療法の開発の一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアに対する予防法や治療法の開発は、超高齢社会にある我が国において喫緊の課題であるが、その病態生理研究は進んでいない。本研究で我々は、ビタミンDの低下やそのシグナル阻害が筋力低下やサルコペニア発症率の増加に直接関わることを明らかにし、サルコペニアの発症機構の一端や本ビタミンの治療有用性を示すことが出来た。さらに、近年サルコペニアとの関連性が指摘されている骨格筋内脂肪蓄積において、脂肪組織の起源細胞におけるビタミンDシグナル阻害が関与する可能性を世界で初めて示すことが出来た。これらの結果は、サルコペニア発症の分子機構の解明のみならず、健康寿命延伸に向けた重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Vitamin D contributes to a variety of life phenomenon, and its decreased production has been linked to several diseases. In this study, we investigated the relationship between sarcopenia, a geriatric disease, and vitamin D deficiency or vitamin D signaling inhibition, using genetically-engineered mice and epidemiological analysis. As a consequence, we found that inhibition of vitamin D signaling in mature myofibers causes muscle weakness and that the incidence of sarcopenia is increased in vitamin D-deficient individuals. We also found that vitamin D deficiency and inhibition of vitamin D signaling are associated with fat accumulation in skeletal muscle, which frequently occurs in older adults. The results of these studies are expected to assist in the development of methods for the prevention and treatment of sarcopenia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：サルコペニア ビタミンD 筋力低下 骨格筋内脂肪蓄積 間葉系前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

“ビタミン D とサルコペニアとの関連性”については、多くの疫学研究で指摘されているが、ビタミン D の作用機序を基盤として病態発生との関連性を示した報告はない。またこれまでは、ビタミン D の骨格筋に対する作用や機序について主に *in vitro* の実験系で検討されてきたが、正・負の相反する結果が報告されており未だ定まっていない (Wagatsuma. InTech Open. 2017)。このような現状を受けて申請者は、サルコペニアとビタミン D との関連性を科学的根拠に基づいて結び付けるためには、*in vitro* 実験系や疫学研究だけでは限界があり、「適切な *in vivo* 実験系での検討と臨床データを結びつける必要がある」との考えに至った。さらに、*in vitro* 実験で散見される結果の非統一性から、発生期から成長期 (筋の形成期) と、壮年期以降 (成熟期) とでは、骨格筋に対するビタミン D の作用機序が異なると推察した。実際 *in vitro* 実験では、筋管細胞でのタンパク質合成促進効果 (成熟期に相当) と筋芽細胞の融合阻害作用 (形成期に相当) という“ビタミン D の二面性”が示されている (Hosoyama *et al.*, Nutrients. 2020)。すなわち、筋形成期に影響を与えずに成熟骨格筋に対するビタミン D の“真の”作用や機序を明らかにするためには、成熟筋線維など筋特異的に VDR を欠損し得る CreER マウスを用いた検討が重要であり、さらに、サルコペニア動物モデルが存在しない現状においては、基礎研究の成果を臨床データ (疫学データを含む) と突き合せた検証が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、「成熟骨格筋に対するビタミン D の役割の解明」と「ビタミン D とサルコペニアとの関連性の証明」を目指し、成熟骨格筋特異的 VDR 欠損マウスの表現型解析や臨床データとの比較解析、老齢マウスでの検証、などにより以下の 3 点を明らかにすることを主要な研究目的とした。

“成熟”骨格筋に対するビタミン D の作用とその分子機構
ビタミン D 欠乏はサルコペニアの発症や増悪化 (病態生理) に関係するか
ビタミン D シグナルを標的としたサルコペニア予防・治療の可能性

3. 研究の方法

・ 骨格筋特異的 VDR 欠損マウスの作出とその表現型解析

壮年期の筋線維および間葉系前駆細胞で特異的にビタミン D 受容体 (VDR) を欠損させる為、Myf6-CreER マウス (筋線維での欠損) と Pdgfra-CreER マウス (間葉系前駆細胞での欠損) を、VDR-floxed マウス (Yamamoto *et al.*, Endocrinology. 2013) と交配し、Myf6^{CE/wt}; VDR^{flox/flox} マウスおよび Pdgfra^{CE/wt}; VDR^{flox/flox} マウスを作出した。8 週齢雄マウスにタモキシフェン (2mg/体重 20g) を 5 日間連続腹腔内投与し、細胞種特異的な VDR 欠損を誘導した (コントロールはコーンオイル投与群)。

タモキシフェンを投与した筋線維特異的 VDR 欠損 (VDR^{skmKO}) マウスと間葉系前駆細胞特異的 VDR 欠損 (VDR^{mpKO}) マウスの表現型について、筋力 (ハンドグリップ試験)、筋重量、筋線維径、筋線維タイプの表現型解析を行い、VDR^{mpKO} マウスではさらに筋内脂肪蓄積についても検討するために、アキレス腱切除 (テノトミー術) を施した。VDR^{skmKO} マウスについては、筋小胞多へのカルシウム取り込みに関与する SERCA の発現なども検証した。

・ ヒト臨床検体の組織学的解析

国立長寿医療研究センターで人工関節置換術を施した高齢者の内側・外側広筋検体から薄切凍結筋切片を作製し、組織学的解析を行った。主な解析項目は、筋線維横断面積、筋線維タイプ (遅筋・速筋線維の割合)、筋線維・脂肪組織・線維化部位の算出、などである。

・ NILS-LSA のデータ解析

国立長寿医療研究センターで 1997 年から実施している地域住民に対する老化に関する疫学研究 NILS-LSA データの再解析により、ビタミン D 欠乏者の 4 年度の筋力、筋量、サルコペニア発症率の変化を検証した。具体的には、NILS-LSA の第五期～第七期のデータセットを用いて、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。

4. 研究成果

【結果】

1. ビタミン D 欠乏者は近い将来に筋力低下が生じ、サルコペニア発症率も増加する

NILS-LSA のデータセットを用いて血中ビタミン D 量がサルコペニアバイオマーカーとなり得るかについて検討したところ、4 年間の縦断研究により、「血中ビタミン D 欠乏者が 4 年後に有意な筋力低下を示す割合が高くなり、サルコペニア発症率も増加する」ことを見出した。

2. VDR^{skmKO} マウスは SERCA 活性の低下により筋力低下を生じる

成熟筋線維特異的に VDR を欠損させるために、Myf6-CreER マウスと Vdr-floxed マウスを交配し VDR^{skmKO} マウスを作出した。タモキシフェン投与により生後の成熟筋線維特異的に VDR を欠損させ、骨格筋の変化について、形態学的・分子生物学的に検証した。その結果、成熟筋線維特異的な VDR 欠損は、筋重量や筋線維径、筋線維タイプなど筋の形態学的な変化は生じさせず、その一方で、骨格筋での SERCA 活性の低下が生じていることを見出した (図 1)。 VDR^{skmKO} マウスは有意な筋力低下を呈することから、成熟筋線維において SERCA 活性が低下したことが、本マウスの筋力低下を導いた一つの要因であると結論付けた。興味深いことに、先に行った疫学データ解析においても、ビタミン D 欠乏者において筋力低下が生じることを見出しており、これらの結果を考え合わせると、成熟筋線維に対するビタミン D の主な役割は、SERCA 活性制御による筋力発揮であると推察される。これらの研究成果の一部を学術誌に投稿した (Mizuno, Hosoyama *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022)。

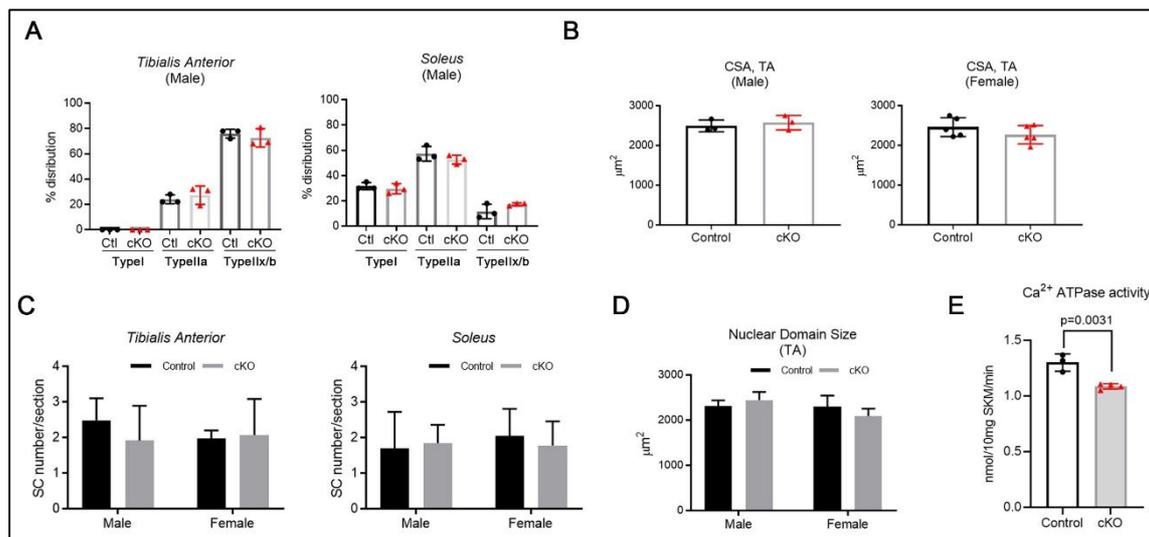


図 1: Vdr^{mcko} マウス骨格筋の組織学的解析 (A) 筋線維タイプ、(B) 筋線維径、(C) 骨格筋幹細胞数、(D) 核ドメインサイズ、(E) Ca^{2+} ATPase 活性の比較

3. ビタミン D は間葉系前駆細胞の脂肪分化を抑制し筋内脂肪蓄積を阻害する働きがある

骨格筋は収縮特性を有する筋線維を主要な構成成分としているが、近年、筋線維間の間質に存在する間葉系前駆細胞の存在が注目されている (Uezumi *et al.*, *Nat Cell Biol*. 2010)。本研究で、間葉系前駆細胞において VDR が高発現していることを発見し、さらに、ビタミン D が間葉系前駆細胞の脂肪分化を強力に抑制すること、などを見出した。これらの結果を受けて、間葉系前駆細胞特異的に VDR を欠損した VDR^{mpKO} マウスを作出し、生体内での間葉系前駆細胞に対するビタミン D の作用について検証した。その結果、 VDR^{mpKO} マウスに人為的な筋萎縮 (腱切除によるテノトミー術) を誘導した場合に、骨格筋内に異所性脂肪蓄積が生じた。これらの結果を考え合わせると、ビタミン D は間葉系前駆細胞の脂肪分化を抑制する働きを有し、何らかの理由によりそのシグナル伝達が阻害されると骨格筋内への脂肪蓄積 (霜降り化) が誘導されることが示された。これらの研究成果の一部を学術誌に投稿した (Hosoyama *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2024)。

【結論】

成体におけるビタミン D の重要性を示す報告は多数あるが、実際に骨格筋に対してどのような働きをするのかははっきりとしていない。同様にビタミン D とサルコペニアとの関連性についても多くの報告があるが、科学的根拠を元にしたはっきりとした結論は得られていない。

本研究では、疫学データと遺伝子組換えマウスを用いて、ビタミン D が成熟した筋線維の張力発揮に直接寄与することを明らかにした。本研究では、ビタミン D が筋線維の弛緩に関わる SERCA を制御している可能性を示したにすぎず、筋線維収縮機構の制御の機構を明らかにすることはできなかったが、恐らく、ビタミン D 欠乏により収縮・弛緩のバランスが崩れることで、高齢者の筋力が低下するものと考えられる。ビタミン D 量は加齢に伴って減少することから、ビタミン D 欠乏により筋力低下が生じ、結果としてサルコペニア有病率が増加することが推察される。実際疫学データ解析により、ビタミン D 欠乏者が近い将来に筋力低下に陥り、サルコペニア有病率も増加することが示された。これらの結果は、ビタミン D の成熟筋線維に対する作用を明確にしたばかりでなく、疾患バイオマーカーとしての有用性も示唆している、

一方、本研究においては、骨格筋の恒常性維持に重要な働きをする間葉系前駆細胞に対するビタミン D の作用の一端も明らかにした。高齢者の骨格筋は線維化や脂肪化が進行し、これらの形態学的変化が筋肉の質を低下させる非常に大きな要因になるとされる。本研究では、*in vitro* 実験系でビタミン D が間葉系前駆細胞の脂肪分化を強力に抑制する働きを有することを示しただけでなく、間葉系前駆細胞特異的 VDR 欠損マウスの作出およびその解析から、間葉系前駆細胞におけるビタミン D シグナル阻害が、骨格筋の脂肪化に関与する可能性を示した。これまで行われてきたビタミン D と骨格筋との関連性に関する研究のほぼ全てが筋線維に焦点を絞ったものであり、今回の研究成果はビタミン D の全く新しい作用を示すものである。今後はヒトでの検証を重ね、高齢者骨格筋の霜降り化の新しい予防法となり得るか検証していく。

本研究は、ビタミン D の骨格筋に対する多様な作用を示しており、サルコペニアの予防法や治療法の開発に向けた重要な知見を提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuno Takafumi, Hosoyama Tohru, Tomida Makiko, Yamamoto Yoko, Nakamichi Yuko, Kato Shigeaki, Kawai Takaishi Minako, Ishizuka Shinya, Nishita Yukiko, Tange Chikako, Shimokata Hiroshi, Imagama Shiro, Otsuka Rei	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of vitamin D on sarcopenia pathophysiology: A longitudinal study in humans and basic research in knockout mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 2961 ~ 2973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosoyama Tohru, Kawai Takaishi Minako, Iida Hiroki, Yamamoto Yoko, Nakamichi Yuko, Watanabe Tsuyoshi, Takemura Marie, Kato Shigeaki, Uezumi Akiyoshi, Matsui Yasumoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Lack of vitamin D signalling in mesenchymal progenitors causes fatty infiltration in muscle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 907 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13448	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 細山 徹
2. 発表標題 サルコペニア・フレイルのバイオマーカー探索の試み
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama, Yoshihiro Miyagawa, Minako Takaishi-Kawai, Ken Watanabe.
2. 発表標題 Lack of vitamin D signaling accelerates muscle atrophy in cachexia.
3. 学会等名 The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama
2. 発表標題 Vitamin D, a potential role for tissue homeostasis and sarcopenia.
3. 学会等名 The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama
2. 発表標題 Vitamin D as a biomarker candidate for sarcopenia and dynapenia; from basic and epidemiological studies.
3. 学会等名 The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細山徹、高石美菜子、飯田浩貴、渡邊剛、松井康素、渡邊研
2. 発表標題 成熟筋線維におけるビタミンDシグナルの役割
3. 学会等名 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama, Hiroki Iida, Minako Kawai-Takaishi, Akiyoshi Uezumi, Ken Watanabe.
2. 発表標題 Vitamin D signaling plays an inhibitory role in formation of intramuscular adipose tissue.
3. 学会等名 IAGG-AOR2023. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama
2. 発表標題 Impact of cell-cell communications and environmental changes surrounding muscle on IMAT formation.
3. 学会等名 IAGG-AOR2023. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tohru Hosoyama, Minako Kawai-Takaishi, Hiroki Iida, Tsuyoshi Watanabe, Yasumoto Matsui, Akiyoshi Uezumi, Ken Watanabe.
2. 発表標題 Vitamin D signaling plays an inhibitory role in intramuscular adipogenesis of FAPs.
3. 学会等名 16th International Conference on Sarcopenia, Cachexia & Wasting Disorders. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細山 徹, 飯田浩貴, 高石美奈子, 上住聡芳, 渡邊 剛, 竹村真里枝, 松井康素.
2. 発表標題 ビタミンDシグナル阻害やビタミンD欠乏は骨格筋内脂肪浸潤を導く
3. 学会等名 第10回日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細山 徹
2. 発表標題 ビタミンD欠乏とサルコペニア・フレイルリスク
3. 学会等名 第26回健康栄養シンポジウム「人体最大器官<皮膚、血管、骨格筋>の健康維持と栄養」(招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------