

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19693

研究課題名（和文）新規サルコペニア動物モデルの開発と応用

研究課題名（英文）A novel animal model of sarcopenia

研究代表者

安藤 恵子（ANDO, KEIKO）

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：40221741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：サルコペニアは加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力が低下する加齢性筋肉減弱症で、高齢化が進むわが国ではサルコペニアの患者数が急増している。サルコペニアの克服は健康寿命の延伸に繋がり、医学的にも社会的にも極めて重要である。しかし、加齢に伴う筋萎縮のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、その解明は喫緊の課題である。本研究ではサルコペニアのメカニズムを解明するため、寿命が短く筋老化研究に有用な線虫*C. elegans*を用いて、迅速かつ低コストな生体モデル系を新たに開発した。さらに、このモデルを用いた機能解析によってリソソーム系のSec1/Munc18因子が筋老化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアによる筋力の低下は高齢者の寝たきりやオーラルフレイルによる低栄養などの要因となり、高齢者の健康寿命とQOLを著しく低下させる。本研究によって、高齢化に時間を有する従来の哺乳動物モデルを補完する新しい動物モデルが開発された。遺伝的に均一で個体差が少ない高齢動物を対象にして、加齢による筋肉の減弱と運動機能の低下を体系的に解析することが可能となった。この迅速・低コストの生体モデルを遺伝子スクリーニングや創薬研究に応用することで、筋萎縮の予防や治療に役立つ新しい医薬品の開発につながる可能性があり、健康長寿社会の実現に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia is an age-related muscle loss that occurs as a result of aging. In our country, where the population is aging, the number of sarcopenia patients is rapidly increasing. Overcoming sarcopenia leads to an increase in healthy life expectancy, which is important for both medical science and society. However, the mechanism of age-related muscle atrophy is still poorly understood. In this study, to understand the mechanism of sarcopenia, we developed a new rapid and low-cost animal model using *C. elegans*, which has a short life span and is useful for muscle aging research. Furthermore, functional analysis using the animal model showed that the lysosomal Sec1/Munc18 protein may be involved in muscle aging.

研究分野：分子生物学

キーワード：サルコペニア 線虫 リソソーム

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力が低下する加齢性筋肉減弱症である。高齢化が進む我が国においてサルコペニアに罹患する高齢者は急速に増え続けている。老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)での調査から、サルコペニア有病数は65歳以上の日本人高齢者全体で850万人と推定されている(厚労省の資料より)。高齢者のサルコペニア有病率は年齢とともに増加傾向にあり、筋力の低下は転倒・骨折、寝たきり、オーラルフレイルによる低栄養などの要因となり、高齢者のQOLを著しく低下させる。したがって、サルコペニアのメカニズムの理解と治療法の確立は健康寿命の延伸に直結し、医学・社会の両面で極めて重要な課題である。

しかしながら、サルコペニアの治療に関して、運動療法、タンパク質摂取、カロリー制限、ビタミンD補充などに一定の改善効果はあるものの、現時点で根本的な治療法は見つかっていない。また、加齢性筋萎縮の主要な要因としてリソソームを介したオートファジー(マクロオートファジー)の機能不全が関連しているが、疾患メカニズムは十分に分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

サルコペニアの分子メカニズムを理解するためには、動物モデルを用いた基礎研究が不可欠である。加齢性および疾患による筋萎縮の解析にはマウスなどの哺乳類モデルがよく用いられている。しかし、哺乳類モデルは動物の高齢化に年単位の時間を要し、多くの検体を短期間で解析することは難しい(マウス:寿命2年から2年半)。また、サルコペニア以外の疾患の影響や老化における個体差などの要因を考慮する必要がある。そこで本研究ではサルコペニア研究の新しいモデル系として、無脊椎動物の線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) に着目した。*C. elegans* は非寄生性の土壌自活性線虫の一種で、寿命が短い(2週間から3週間)、低コストで多検体の解析が可能、遺伝的に均一(個体差が少ない)、骨格筋に類似する横紋筋(斜紋筋)を持つ、老化やタンパク質分解に関連する哺乳動物と共通の分子機構を持つ、体が透明で蛍光ラベルした筋を生きのまま観察できる、などの利点を持つ。そこで、本研究では迅速・低コストの新しいサルコペニア研究の動物モデル系を開発するため、以下に関して取り組む。

- (1) 線虫はヒトや他の動物同様に加齢とともに運動能が低下していく。本研究では、加齢に伴う運動機能低下の定量的評価法を検討する。
- (2) 加齢による筋の萎縮を解析するため、本研究では、筋の内部構造を生きのまま観察し、加齢に伴う筋構造の変化を定量的に評価する方法を検討する。
- (3) 加齢による筋力低下と細胞内カルシウム濃度の関連を明らかにするため、蛍光カルシウムセンサーを発現するトランスジェニック体を作成し、カルシウム濃度を定量的に解析する方法を確立する。
- (4) エンドソーム・リソソーム系オルガネラの構造と機能に重要な膜輸送遺伝子 VPS33 および VPS45 に着目して機能解析を行い、筋のホメオスタシスにおける役割を明らかにする。

3. 研究の方法

非寄生性線虫 *C. elegans* Bristol N2 株(野生型株)と N2 由来の変異体株を実験に用いた。定法に従い、大腸菌 OP50 を塗布した NGM 培地を用いて線虫を 20 で培養した。温度感受性 *vps-45* 変異体は許容温度の 15 で維持し、表現型解析時は制限温度の 25 で培養した個体を用いた。線虫の行動の観察は実体顕微鏡(SZX16, Olympus)を使用し、動画の撮影はデジタルハイスピード CMOS カメラ(HAS-U2, DITECT)を用いた。線虫の行動は温度の影響を受けるため SZX16 に

温度上昇が少ない薄型 LED 透過照明架台を新たに設置した。GFP 標識された筋サルコメア構造および筋ミトコンドリアの画像取得は正立蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ni, Nikon) とデジタルカメラ (DP28, Olympus) を用いた。カルシウム動態の可視化は独自に開発した高輝度・高感度の改良型 G-CaMP を用い、蛍光画像の取得は自動追尾装置を統合した共焦点レーザー顕微鏡 (A1R, Nikon) を用いた。蛍光画像のトラッキングと蛍光強度の解析は NIS-elements ソフトウェア (Nikon) を用いた。温度感受性 *vps-45* 変異体の新規サプレッサー変異体の樹立では、高頻度に変異を導入可能な突然変異誘発剤 (EMS) を用いた。新規変異体の責任遺伝子の同定は Hawaiian SNP マッピングと次世代シーケンス解析により行った。

4. 研究成果

(1) 加齢に伴う運動機能低下の評価法の検討

線虫の飼育は通常、餌 (大腸菌) を塗布した寒天培地を用いるが、線虫は体の側面を培地の表面につけ背腹を交互に動かして S 字型の二次元的運動を行う。線虫の運動機能を定量的に解析するため、まず、寒天培地上での運動について検討した。固形培地上での線虫の行動は、前進運動、後退運動、停止、オメガターン (深い屈曲による方向転換) の 4 つの基本的要素の組み合わせであり、基本的な移動運動は前進運動である。高速 CMOS カメラで自由行動中の線虫のタイムラプス撮影を行い、紐状物体計測ソフトウェアで画像データのノイズ除去および二値化処理後、計測点の自動追尾を行った。次いで 2 次元動画計測ソフトウェアで前進運動速度、後退運動速度、後退運動頻度、頭部・体幹部の屈曲角度、停止時間などの運動パターンを数値化した。次に、液体中の運動について検討した。線虫は液体中で特徴的な C 字型の運動を行う。M9 あるいは S basal 液体培地中の C 字型運動をタイムラプス撮影し、wormlab ソフトウェアを用いて画像処理を行い、屈曲角度、屈曲頻度、停止時間などの運動パターンを解析し、線虫の定量的な運動評価系を構築した。

(2) 加齢に伴う筋構造変化の評価法の検討

筋の内部構造を GFP で標識したトランスジェニックマーカーを用いて加齢による筋萎縮の客観的評価法を検討した (図 1)。体壁筋特異的ミオシン重鎖 - GFP 融合タンパク質を発現するトランスジェニックを導入し、筋のサルコメア構造を解析した。また、筋萎縮と筋のミトコンドリア障害の関連に着目し、ミトコンドリア外膜局在シグナル - GFP を発現するトランスジェニ

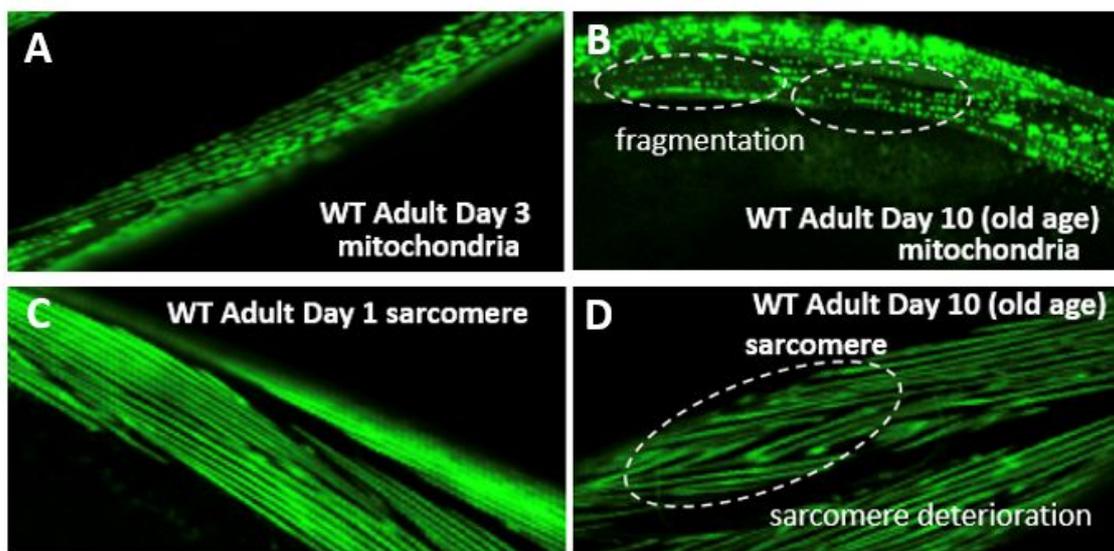


図 1 加齢による線虫体壁筋の変化

上段：筋のミトコンドリア (mit-GFP) の可視化、下段：ミオシン-GFP による生体の筋サルコメア構造の可視化。成虫 1 日目 (C), 3 日目 (A), 10 日目 (老齢線虫 B, D)。老齢線虫では、サルコメア構造の崩壊とミトコンドリアの断片化が観察される

ック系統も導入し、体壁筋のミトコンドリアの構造変化を評価した。DAY1(成虫1日目)から DAY14 まで経時的に構造を観察したところ、加齢にしたがってサルコメア構造の崩壊およびミトコンドリアの断片化がみられた。これらをクラス分けし加齢による筋萎縮の程度をスコア化した評価系を構築した。

(3) 筋カルシウム動態のイメージング

体壁筋特異的ミオシン重鎖遺伝子プロモーター制御下で改良型 G-CaMP および赤色蛍光タンパク質 RFP を発現するトランスジェニック系統を作成した。動きによるアーティファクトを軽減するため、G-CaMP/RFP の蛍光強度比により筋活動を解析する系を確立した。また、光遺伝学的手法で忌避行動を誘発する系を作成し、一定の刺激を受けたときの筋のカルシウム応答を測定する系を作成した。今後、老化と筋のカルシウム応答について検討していく。

(4) リソソーム関連遺伝子の機能解析

本研究ではエンドソーム・リソソーム系オルガネラの構造と機能に重要な膜輸送遺伝子 VPS33A および VPS45 に着目して機能解析を行った。VPS33A (*vps-33.1*) はリソソームの形成と輸送に重要な Sec1/Munc18(SM) タンパク質をコードし、

vps-33.1 遺伝子のヌル変異体は胚発生致死表現型を示す。ヘテロ個体から生まれた *vps-33.1* (-)ホモ接合体(m+z-)は母性効果により成虫まで発生し、老齢線虫を得ることができる。そこでこれらの個体を用いて解析を行った。*vps-33.1* (-)変異体はリソソーム形成異常を示し、老齢個体で強い筋構造の崩壊が認められたことから、VPS33A が筋萎縮に関与する可能性が示唆された。

また、最新の疾患ゲノム解析で、エンドソーム動態を制御するヒト Rabenosyn5 の変異が進行性の筋力低下の症例で報告された。そこで、Rabenosyn5 の相互作用分子である SM タンパク質



図2: *vps-45* の新規サプレッサー変異体
制限温度の 25 °C で培養 3 日後の *vps-45* 変異体 (左) とサプレッサー変異体 (右)。 *vps-45* の幼虫致死表現型が回復している。

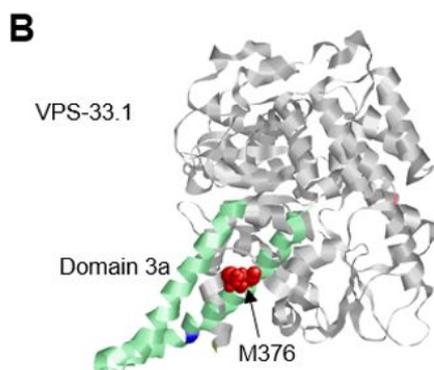
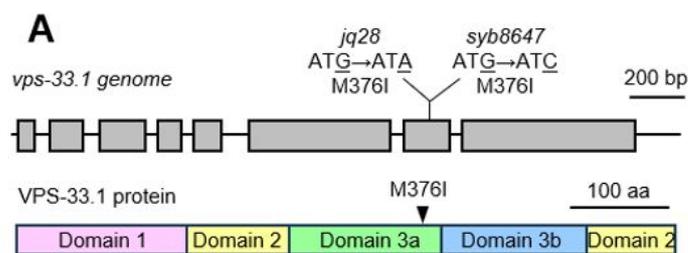


図3 新規サプレッサー遺伝子のゲノム解析
A: VPS33A(*vps-33.1*) 遺伝子にマッピングされた新規サプレッサー変異。SNP マッピングと全ゲノム解析で M376I 変異が同定された。
B: I-TASSER で予測された VPS-33.1 タンパク質の立体構造。M376 は重要な機能ドメイン 3a に位置していた。

VPS45 について解析を行った。VPS45 をコードする *vps-45* のヌル変異体は温度感受性幼虫致死表現型、エンドソーム異常、エンドサイトーシス異常を示す。VPS45 と機能的に関連する遺伝子

を探索するため、変異原 EMS による遺伝学的スクリーニングを行い、vps-45 変異体の新規サブプレッサー遺伝子を探索した。制限温度で成虫まで生存可能な 5 つの新規サブプレッサー変異を分離した(図2)。遺伝子マッピングを行ったところ、1 つのサブプレッサー変異は *vps-33.1* のミスセンス変異であることが明らかになった(図3)。この結果は VPS33A と VPS45 の機能的関連性を示すものであり、今後 VPS33A に加えて VPS45 および Rabenosyn5 の加齢性筋萎縮における役割を検討していく。

今後は、今回開発した迅速・低コストのモデル系を遺伝子スクリーニングや創薬研究に応用することで、筋の老化研究が進展し、サルコペニアの疾患メカニズムの解明と予防と治療に役立つ新しい医薬品の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Gengyo-Ando K, Osawa-Noguchi A, Ando H, Nakai J	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional analysis of epilepsy-linked pathogenic variants of the Munc18-1 gene in the inhibitory nervous system of <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.001174	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 Gengyo-Ando, K; Kumagai, M; Ando, H; Nakai, J	4. 巻 -
2. 論文標題 Domain 3a mutation of VPS33A suppresses larval arrest phenotype in the loss of VPS45 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.001155	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 Gengyo-Ando K, Tateyama M, Mitani S, Ando H, Nakai J	4. 巻 -
2. 論文標題 A humanized <i>Caenorhabditis elegans</i> model for studying pathogenic mutations in VPS45, a protein essential for membrane trafficking, associated with severe congenital neutropenia.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.001052.	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 Tominami Kanako, Kudo Tada-aki, Noguchi Takuya, Hayashi Yohei, Luo You-Ran, Tanaka Takakuni, Matsushita Ayumu, Izumi Satoshi, Sato Hajime, Gengyo-Ando Keiko, Matsuzawa Atsushi, Hong Guang, Nakai Junichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Physical Stimulation Methods Developed for In Vitro Neuronal Differentiation Studies of PC12 Cells: A Comprehensive Review	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25020772	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keiko Gengyo-Ando
2. 発表標題 Membrane trafficking
3. 学会等名 21th Yonsei Dental International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立山稔、中井淳一、安藤恵子
2. 発表標題 Physiological effects of the inhalation anesthetics sevoflurane in C. elegans
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Matsushita, Tada-aki Kudo, Yohei Hayashi, Kanako Tominami, Satoshi Izumi, Takakuni Tanaka, You-Ran Luo, Keiko Gengyo-Ando, Takuya Noguchi, Atsushi Matsuzawa, Guang Hong, Junichi Nakai
2. 発表標題 Investigation of the Frequency-Regulated Repeated Micro-Vibration (FRMV)-mediated osteo- blast differentiation mechanism in MC3T3-E1 cells
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会 (国際学会)
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
---------	---------