

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11780

研究課題名（和文）サルコペニアモデル動物の確立を目標とした疾患モデル動物の病態解析

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of animal models of disease with the goal of establishing animal models of sarcopenia

研究代表者

祖父江 沙矢加（Sobue, Sayaka）

中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・准教授

研究者番号：50513347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、筋萎縮症の発症メカニズムを解明することを目的とし、筋萎縮症モデル動物を用いて研究を行った。我々は、筋萎縮症モデルラットの次世代シーケンス解析により、核-細胞質間輸送に関与する因子をコードする遺伝子の変異が、筋萎縮症の発症に関連する可能性を示唆する結果を得た。この結果に基づき、当該遺伝子変異が引き起こす筋萎縮が、加齢に伴う筋肉量の低下であるサルコペニアにおける筋萎縮と同様の表現型を示すか否かを評価するため、該当遺伝子に一塩基置換を導入したノックインマウスを作製し、検証を行った。ノックインマウスの骨格筋を組織学的および分子生物学的に解析した結果、速筋線維に優位な萎縮が実際に観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、BUF/Mna系ラットに認められる筋萎縮の発症原因が核-細胞質間輸送因子における変異によるものであることを明らかにした。これまで核-細胞質間輸送因子の変異による筋萎縮発症の報告はなく、新たなモデル動物として確立した。本研究の成果は、サルコペニアの新たな発症メカニズムの解明につながり得るものである。さらには、寝たきり高齢者の予防や健康寿命の延伸にも繋がると考えられることから、学術的にも社会的にも意義が大きい成果と言える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the pathogenic mechanisms underlying amyotrophy using animal models. Employing next-generation sequencing, we identified mutations in a gene encoding a nuclear-cytoplasmic transporter that may contribute to amyotrophy in rat models. To determine whether this mutation causes a sarcopenia-like phenotype, we generated knock-in mice carrying a single nucleotide substitution in the identified gene. Histological and molecular analyses revealed that the knock-in mice exhibited predominantly fast-twitch muscle atrophy. These findings suggest that the identified gene may play a crucial role in the development of amyotrophy and sarcopenic muscle atrophy.

研究分野：分子生物学

キーワード：疾患モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BUF/Mna 系ラットは、常染色体優性遺伝様式で骨格筋萎縮を 100%発症し、同時に胸腺腫や腎糸球体硬化症様病変も併せ持つラットとして 1977 年に樹立された。その後、松山らにより骨格筋萎縮の発症を制御する遺伝子座の領域を保有するコンジェニックラットが樹立され、このコンジェニックラットが 100%筋萎縮を発症する一方で、原系の BUF/Mna 系ラットに見られた胸腺腫等の病変は発症しないことが確認された。このことから、筋萎縮は他の病変によるものではなく、独自の発症原因によるものであることが証明された。系統樹立から約 35 年の間に、筋萎縮の発症に関与する遺伝子が存在する可能性のある領域が 1 番染色体のマーカー D1Rat53 の遠位 2cM の領域まで絞り込まれたものの、決定的な遺伝子の特定までは至っていない。

2. 研究の目的

我々は、これまでに筋萎縮発症ラットの次世代シーケンス解析により同定した遺伝子変異情報を 62 種類のラット系統と比較することで、核 - 細胞質間輸送因子における変異が筋萎縮発症に関連するのではないかと推察した。そこで本研究では、筋萎縮発症ラットで見つかった核 - 細胞質間輸送因子の変異を有するノックインマウスを作製し、その表現型を確認することで、筋萎縮発症の原因が核 - 細胞質間輸送因子における変異であることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 骨格筋特異的に変異型核-細胞質間輸送因子を発現させたノックインマウスの作製
核 - 細胞質間輸送因子の一塩基変異により実際に速筋線維優位の筋萎縮が起きるのかを確かめるため、骨格筋特異的に変異型核-細胞質間輸送因子が発現するようにノックインマウスを作製した。ノックインマウスは、近交系の C57BL/6N を用いて CRISPR-Cpf1 (Cas12a) system と i-GONAD 法により作製した。
ゲノム編集によるノックインの有無は、Guide-it Knockin screening kit (タカラバイオ社) により確認を行った。
- (2) ノックインマウスの表現型の確認
生後 10 か月齢のオスのノックインマウスの後肢より、腓腹筋およびヒラメ筋を採取して重さを計測した後に凍結ブロックを作製した。コントロールは野生型マウスを用いて比較した。凍結ブロックからはクライオスタットで 8 μ m の厚さの凍結切片を薄切し、蛍光免疫染色により Laminin、Type 、 a、 b を染色した。蛍光免疫染色した検体は蛍光顕微鏡(キーエンス, BZ-X800)で画像を取得し、ImageJ で筋横断面積を算出した。同様の実験を生後 11 週齢の BUF/Mna 系ラットおよびコントロールとして ACI/N ラットを用いて実施し、マウスの結果と比較した。
- (3) ノックインマウスの筋力評価
握力測定には、マウス・ラット用握力測定装置(メルクエスト社)を使用した。マウスの場合は 3 か月齢、6 か月齢、10 か月齢、ラットの場合は 3 か月齢、6 か月齢と経時的に握力を測定し、コントロール動物の結果と比較した。
- (4) ノックインマウスの網羅的遺伝子発現解析
10 か月齢のノックインマウスおよび野生型マウスの後肢腓腹筋から RNA を抽出し、RT-PCR を用いて cDNA を合成した。その後、RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、さらに GSEA 解析の結果を基に、ノックインマウスで有意に発現量が減少している遺伝子を特定した。これらの発現変動遺伝子に関しては、real-time PCR を用いてその量を定量化した。

4. 研究成果

- (1) ノックインマウスの作製
施術数 3 匹のうち 2 匹で妊娠が確認でき、帝王切開により 3 匹の産仔を得ることができた。そのうちメス 2 匹が離乳まで育ったため、マウス尾部組織より DNA を抽出し、ノックイン領域の遺伝子配列を確認したところ、一塩基置換をホモで有するものとヘテロで有するものを 1 匹ずつ得ることができた。
それぞれのノックインマウスをオスの C57BL/6N と交配し、仔を兄弟間でさらに交配することで、一塩基置換をホモで有するものとヘテロで有するものを複数匹準備した。

(2) ノックインマウスの表現型の確認

速筋線維を多く含む腓腹筋では、野生型に比べてノックインマウスで筋重量の有意な減少を認めた。一方で、遅筋線維を多く含むヒラメ筋では、野生型とノックインマウスで筋重量に差は認められなかった。

ノックインマウスで筋重量の減少がみられた腓腹筋の筋線維横断面積を計測し、体重で補正した値を比較した ($CSA/BW^{2/3}$)。筋線維横断面積についても野生型よりノックインマウスで減少傾向にあった。

さらに線維ごとの違いを確認するために、蛍光免疫染色により Type a、b を染色し、それぞれの線維型での横断面積を算出した。Type b 線維の筋横断面積は、計測する部分で面積が異なる傾向があり、Type b 線維が密集する部分で比較したところ、野生型に比べてノックインマウスで筋横断面積が小さくなっていることが確認できた。

(3) ノックインマウスの筋力評価

組織学的評価および分子生物学的評価においてノックインマウスで筋萎縮が認められたことから、ノックインマウスにおいて実際に筋力低下が認められるか否かについても検討を行った。筋萎縮が認められる前から経時的にメルクエスト社の握力測定装置を用いて実施したが、全期間を通じて握力の低下は確認できなかった。同様に BUF/Mna 系ラットでも本機器で握力を測定したところ、対照動物である ACI 系ラットと比べて握力の低下は確認できなかった。本機器では同時に上肢、下肢を統合した筋力が握力として測定される。BUF/Mna 系ラットでは速筋優位な筋萎縮を引き起こすため、本機器での評価は困難であったと推察した。

(4) ノックインマウスの網羅的遺伝子発現解析

RNA-seq および GSEA の結果に基づき、Myogenesis 等に関連する分子の発現がノックインマウスで低下する傾向が観察された。Myogenesis に関連する分子の遺伝子群では、ノックインマウスで発現量が有意に低下しているとされた Myh1、Myh2、Myh4、Myh7 遺伝子を選択し、real-time PCR によりこれらの遺伝子の発現量を定量化した。発現量に有意差は認められなかったが、ノックインマウスにおいて野生型マウスと比較して減少傾向が認められた。組織学的検討では、ノックインマウスにおいて速筋優位の萎縮が観察されたが、速筋優位に限らず、筋線維を構成する Myh 全体の減少が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Naoi Hyogo, Suzuki Yuzo, Miyagi Asuka, Horiguchi Ryo, Aono Yuya, Inoue Yusuke, Yasui Hideki, Hozumi Hironao, Karayama Masato, Furuhashi Kazuki, Enomoto Noriyuki, Fujisawa Tomoyuki, Inui Naoki, Mii Shinji, Ichihara Masatoshi, Takahashi Masahide, Suda Takafumi	4. 巻 212
2. 論文標題 CD109 Attenuates Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Inhibiting TGF- Signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2300285	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tamaki Akihiro, Kato Takuya, Sakurai Yasutaka, Sato Keita, Adachi Kai, Tadehara Masayoshi, Kogami Taro, Matsushita Masahiro, Hoshino Akiyoshi, Sanoyama Itaru, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Ichinoe Masaaki, Ichihara Masatoshi, Kusano Chika, Murakumo Yoshiki	4. 巻 115
2. 論文標題 REV7 is involved in outcomes of platinum based chemotherapy in pancreatic cancer by controlling the DNA damage response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 660 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16044	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 Kojima Yasuhiro, Mii Shinji, Hayashi Shuto, Hirose Haruka, Ishikawa Masato, Akiyama Masashi, Enomoto Atsushi, Shimamura Teppei	4. 巻 15
2. 論文標題 Single-cell colocalization analysis using a deep generative model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Systems	6. 最初と最後の頁 180 ~ 192.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cels.2024.01.007	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ando Ryota, Shiraki Yukihiro, Miyai Yuki, Shimizu Hiroki, Furuhashi Kazuhiro, Minatoguchi Shun, Kato Katsuhiro, Kato Akira, Iida Tadashi, Mizutani Yasuyuki, Ito Kisuke, Asai Naoya, Mii Shinji, Esaki Nobutoshi, Takahashi Masahide, Enomoto Atsushi	4. 巻 262
2. 論文標題 Meflin is a marker of pancreatic stellate cells involved in fibrosis and epithelial regeneration in the pancreas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 61 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6211	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Mori Natsumi, Esaki Nobutoshi, Shimoyama Yoshie, Shiraki Yukihiro, Asai Naoya, Sakai Tomohisa, Nishida Yoshihiro, Takahashi Masahide, Enomoto Atsushi, Mii Shinji	4. 巻 245
2. 論文標題 Significance of expression of CD109 in osteosarcoma and its involvement in tumor progression via BMP signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154443 ~ 154443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2023.154443	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamashita Yukari, Takeuchi Tamaki, Endo Yuki, Goto Ayumi, Uno Misa, Sakaki Setsuko, Yamaguchi Yuji, Takenaka Hiroyuki, Yamashita Hitoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 The effect of Dunaliella tertiolecta supplementation on diet-induced obesity in UCP1-deficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 16 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad138	査読の有無 有
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0件

〔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
研究分担者	市原 正智 (Ichihara Masatoshi) (00314013)	中部大学・生命健康科学部・教授 (33910)	
研究分担者	後藤 亜由美 (Goto Ayumi) (20780969)	中部大学・生命健康科学部・客員研究員 (33910)	
研究分担者	三井 伸二 (Mii Shinji) (80646505)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

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
---------	---------