

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	日 本 体 育 大 学	研究所名等	体 育 研 究 所
研 究 課 題	アジア人の遺伝的背景に基づいたサルコペニア予防戦略		研究分野 体 育 学
キ ー ワ ー ド	①サルコペニア ②アジア人 ③アセトアルデヒド脱水素酵素2 ④アクチニン3 ⑤遺伝子多型 ⑥遺伝子編集 ⑦遺伝子改変動物 ⑧運動介入		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 里 浩 一	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 沼 憲 治	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	医学的見地からの助言
岡 本 孝 信	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	世田谷・青葉コホート研究の総括
小 林 正 利	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	アジア人サルコペニアモデル実験指導(病理学)
菊 池 直 樹	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	准 教 授	世田谷・青葉コホート研究の実施
田 村 優 樹	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の総括
鴻 崎 香 里 奈	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の実施
小 谷 鷹 哉	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の実施

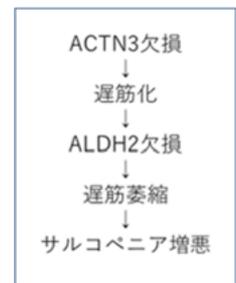
# アジア人の遺伝的背景に基づいたサルコペニア予防戦略

## 1. 研究の目的

サルコペニアは加齢に伴って生じる骨格筋機能・筋量の低下を指す。サルコペニアは日常生活活動動作に支障をきたすのみならず転倒リスク等の整形外科的疾患発生につながるため、超高齢社会においてその予防はすでに重要課題と位置付けられている。サルコペニアの診断基準はやはり筋力、筋機能、筋量による。2019年11月に日本サルコペニア・フレイル学会にてアジア人のエビデンスに基づいたサルコペニア診断基準が発表された。がん、感染症などと同様、サルコペニアも人種等の遺伝性要素が重要視されつつある。

近年、アルコール代謝欠損の原因となるALDH2(アルデヒド脱水素酵素2)遺伝子多型(rs671)はアジア人の遺伝的特性と報告された。すなわち、アジア人の遺伝的特性であるALDH2遺伝子多型はミトコンドリアおよびサルコペニア発生に関与することが示唆される。我々は既にALDH2ノックアウトマウスの骨格筋ミトコンドリアにおいて活性酸素種産生亢進を確認しており(Wakabayashi et al., Am J Physiol, 2020)、ミトコンドリアが豊富な遅筋においてその影響が強く出る可能性が示唆される。一方、速筋の構造タンパク質であるアクチニン3タンパク質を欠失するACTN3遺伝子多型(rs1815739)はスポーツパフォーマンスとの関連性が明らかになっていることに加え、特にアジア人コホートにて加齢性筋機能・筋量低下との関連性が報告されている(Cells. 2019 Dec 19;9(1):12)。従って、ACTN3遺伝子多型がアジア人のサルコペニア発生に影響を与える可能性が示唆される。

では、ALDH2およびACTN3遺伝子多型はどのようにアジア人サルコペニア発生に関与するのであろうか。ACTN3KOマウスでは骨格筋の遅筋化が促進されること(Hum Mol Genet. 2014)が報告されており、ALDH2KOマウスでのミトコンドリアの活性酸素産生能亢進による遅筋の萎縮を仮定すれば、ACTN3多型が遅筋化を促しALDH2多型による加齢時の遅筋萎縮の影響をより強く受けるとするALDH2、ACTN3遺伝子多型によるアジア人特異的サルコペニア発生の生理学的メカニズム(右図)が仮定できる。本研究の目的は遺伝子改変動物およびヒトを対象とした生理学的手法でこの仮説を検証することとする。



## 2. 研究の計画

### (1) 加齢ALDH2ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

ヒトALDH2遺伝子多型は酵素活性失活型であり、ALDH2ノックアウトマウスはヒトALDH2遺伝子多型のモデルとして利用可能である。本研究ではALDH2活性欠失がミトコンドリア活性酸素種産生を亢進することより、加齢ALDH2ノックアウトマウスにおける遅筋選択的な筋萎縮を仮定・検証することとした。

### (2) ヒトALDH2遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

本学キャンパスが存在する東京都世田谷区および横浜市青葉区の住民を対象に2011年より体力測定を実施しデータ収集している(世田谷・青葉コホート)。本研究ではヒトALDH2遺伝子多型と加齢による筋力低下の関係を検討することとした。

### (3) iGONAD法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

我々は既にC57B1/6Jを背景とするALDH2KOマウスを保有している。さらに我々はCRISPR/Cas9および卵管電気刺激を用いた受精卵の遺伝子編集技術(iGONAD法: improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery, Genome Biology, 2019)による遺伝子編集実験に着手し、すでに複数の遺伝子ノックアウトに成功している。これらの技術を用いてALDH2KOマウスに対してACTN3遺伝子を遺伝子編集にてノックアウトすることでアジア人特異的サルコペニアモデルであるALDH2, ACTN3ダブルノックアウト(DKO)マウスを得ることを本年度の計画とした。

## 3. 研究の成果

(1) 加齢 ALDH2 ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較して腓腹筋およびヒラメ筋の体重あたりの筋湿重量を有意に減少させた。また、ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較してヒラメ筋の筋線維断面積を減少させる傾向が見られた。断面積の低下はミトコンドリア含有が多い筋線維において特徴的であった。ALDH2 欠損が助長した骨格筋萎縮のメカニズムを検討するために ALDH2 欠損が加齢筋の酸化ストレス代謝やミトコンドリア恒常性に影響を及ぼすかどうかを検討した。その結果、ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較して酸化ストレスマーカーの 1 つである 4-HNE を増加させる傾向が見られた。また、ALDH2 欠損は、ROS 産生を増加させた。

(2) ヒト ALDH2 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

健康な日本人1,902名（23-94歳）を対象としてALDH2rs671遺伝子多型と筋力の関係を検討した。まず全体を対象として性別、年齢、体重などを考慮した比較を行うと欠損型（AA）における握力が低値であることが見出された。次に対象者の中でも55歳以上に限定して同様の検討を行ったところ、握力、椅子立ち上がりテストなどが欠損型において有意に低値であることが示された。以上から加齢性の筋力低下においてALDH2遺伝子多型の中でも欠損型であるAA型は増悪因子となりうることが示された。

(3) iGONAD 法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

我々はまず野生型マウスで ACTN3 遺伝子編集条件を確立し、ALDH2KO マウスにてその条件を用いて DKO マウスを得るという戦略で実験を進めている。これまでに、右表のような条件で野生型雌マウス 11 匹に対して iGONAD を行い ACTN3 遺伝子が KO された産仔を得ることに成功、さらに 7 月から ALDH2KO マウスに iGONAD を行い 9 月時点で 2 母親から産仔 8 匹を獲得済みである。

gRNA-L	GGCAGGAGTAAATATCATAG
gRNA-R	CAGAAGTACTTCTAGGATGG
欠失される領域	エクソン7~エクソン8*

※ mRNAタンパク質コード領域の79%がフレームシフトにより欠失することでノックアウトが達成される

さらに ALDH2KO マウスに対して同様の方法で iGONAD を実施し、7 匹以上の産仔を得た。mRNA およびタンパク質レベルにて ACTN3 発現が欠落していることも確認済みである。現在実験に十分な個体数を確保するために飼養中であり、2022 年 8 月にはアークリソース（株）に生殖工学によるコロニーエクспанションを依頼予定である。

## 4. 研究の反省・考察

(1) 加齢 ALDH2 ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

これまでに ALDH2 ノックアウトマウスにおける骨格筋ミトコンドリアは活性酸素種産生が亢進していることを見出していたが、若年齢における骨格筋量は野生型との差が観察されていなかった。今回加齢骨格筋においてその量に差が見られたことは、ALDH2 ノックアウトによる活性酸素種産生の影響は決して大きなものではないが、その蓄積によって加齢時に差が現れることを示唆している。そして骨格筋量に与える影響は速筋あるいは遅筋といった筋線維タイプではなくミトコンドリア量に依存することがわかった。このことから ALDH2 活性が低下しているアジア人においてはミトコンドリア生合成あるいはその健全性を高める有酸素運動などが特に加齢時における骨格筋量維持には有効であることを示唆している。

(2) ヒト ALDH2 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

マウスを用いた検討（1）におけるミトコンドリア含有量の多い筋線維での加齢時の骨格筋萎縮が顕著であることと同様、55 歳以上のヒトを対象とした横断的コホート研究においても同様に ALDH2 活性欠損者における筋力の低値が観察された。ただしマウスにおいては筋力、ヒトにおいては骨格筋量での検討が十分とは言えない。マウスでは筋力発揮に重要な神経筋接合部の解析、ヒトでは骨格筋量の精密な測定がそれぞれ今後の検討課題である。

(3) iGONAD 法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

現在までに iGONAD 法による ACTN3 ノックアウトには成功しており、実験に必要な個体数は 2022 年 10 月までに得られる予定である。11 月には骨格筋量、筋線維断面積、ミトコンドリア機能、骨格筋における RNAseq などを実施する予定であり、本年度内には若年齢

マウスにおけるDKOの影響の詳細が明らかになることが十分に期待できる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Kasai A, Jee E, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Nakazato K., Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency promotes skeletal muscle atrophy in aged mice., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2022 Jun 1;322(6):R511-R525.
- ② Kikuchi N, Tajima T, Tamura Y, Yamanaka Y, Menuki K, Okamoto T, Sakamaki-Sunaga M, Sakai A, Hiranuma K, Nakazato K., The ALDH2 rs671 polymorphism is associated with athletic status and muscle strength in a Japanese population., *Biol Sport.* 2022 Mar;39(2):429-434.

### (2) 口頭発表

- ① 笠井茜、Jee Eunbin、田村優樹、鴻崎香里奈、小谷鷹哉、中里浩一、ALDH2欠損が加齢性骨格筋萎縮および骨格筋ミトコンドリアに与える影響、第76回日本体力医学会、三重
- ② 服部桜、田村優樹、鴻崎香里奈、小谷鷹哉、中里浩一、C57B1/6J系統ノックアウトマウスにおけるiGONAD法を用いたダブルノックアウトマウスの作出、第69回日本実験動物学会、仙台

### (3) 出版物

とくになし