

<研究課題> 長寿遺伝子(Sirt1)の筋骨格系の与える影響、加齢変化に関する研究
The role of SIRT1 in skeletal muscle function and aging

代表研究者 東京大学大学医学部附属病院在宅医療学講座 特任研究員 細井 達矢
共同研究者 東京大学大学医学部附属病院在宅医療学講座 特任准教授 山中 崇

【抄録】

長寿遺伝子である Sirt1 は、骨格筋におけるミトコンドリア容量や機能の維持に関与するとの報告もあるが、そのメカニズムやサルコペニアとの関連は未解明である。本課題では長寿遺伝子 Sirt1 の速筋特異的作用に着目し、サルコペニアの制御メカニズム解明を目的とした。具体的には速筋特異的な Sirt1KO (fmSirt1KO)マウスを樹立し、体重・骨格筋量・筋力・持久力の変化、及び遺伝子発現を比較した。fmSirt1KO マウスは正常発育し、13 週齢時点で対照群と比較して、体重や骨格筋量・筋力・持久力とも有意差を認めなかった。一方加齢に伴い、fmSirt1KO 群で持久力の低下を認めるようになった。骨格筋分化に関与する MyoD などの遺伝子発現変化も示唆され、Sirt1 は加齢に伴う筋質の変化に影響することが示唆された。今後このモデルを用い、長寿遺伝子 Sirt1 とサルコペニア・筋骨連関の発症機序解明を目指したい。

1. 研究の目的

1-1 長寿遺伝子としての Sirt1

高度な哺乳類において、長寿遺伝子である Sirt1 は NAD⁺依存性脱アセチル化酵素として、多くの細胞内でミトコンドリアの制御やエネルギー代謝、細胞増殖と分化、インスリン分泌などに関与し、寿命を制御する分子の一つとして働くことが報告されている。(Chang HC and Guarente L. Trends Endocrinol Metab. 2015) 以前よりカロリー制限や絶食が長寿に資することが知られているが、その過程ではあらゆる臓器での Sirt1 活性化の影響が示唆されている。骨格筋においても、Sirt1 はミトコンドリア容量と機能の維持・インスリン取り込み能などに大きな役割を果たしている。老齢マウスや筋ジストロフィーマウスモデルの骨格筋においては、NAD⁺生合成系の中間体量(NMN: nicotinamide mononucleotide)の低下が報告されており、これらのマウス骨格筋での Sirtuin 活性低下が示されている。(Yoshino J, et al. Cell Metab, 2011; Zhang H, et al. Science 2016)

サルコペニアは「筋量と筋力の進行性かつ全身性の減少に特徴づけられる症候群で、身体機能障害、Quality of Life 低下、死のリスクを伴うもの」と定義されるが、速筋 (type II) 優位に筋萎縮が進行し、速筋割合の低下を認めること、筋量低下に先行して筋力が低下するなど、廃用や加齢に伴う筋萎縮とは異なる新しい疾患概念である。(Delmonico, MJ, et al. Am J Clin Nutr 2009; Lang T et al. Osteoporos Int 2010; Talbot J and Maves L. Wiley

Interdiscip Rev Dev Biol 2016) しかしながら、速筋・遅筋や性差まで深耕した、Sirt1 とサルコペニア関連の研究はなく、その破綻が筋肉に与える影響も明らかではない。(Schenk S. J Clin Invest. 2011) そのため骨格筋での Sirt1 機能、とりわけ筋繊維タイプ特異的な Sirt1 機能を解明することは、Sirt1 のサルコペニアに与える影響を明らかにするために重要と考えられた。

本研究では Cre-LoxP システムを用いて速筋特異的な Sirt1 欠損 (fmSirt1KO)マウスを作成し、その表現型を解析することを目的とした。これにより、他部位に影響を与えることなく、骨格筋特異的な Sirt1 機能を調べることが可能となったことは本研究の最も重要な強みである。また長寿遺伝子を検討する以上、加齢性変化も検討課題と考えられた。

2. 研究方法と経過

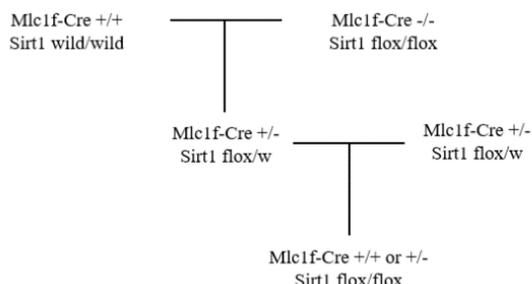
2-1 速筋特異的 Sirt1KO マウスの作成

全ての動物の飼育や実験は東京大学の倫理規定に従い、動物実験委員会の承認を受けている(医-P17-135)。Sirt1 flox/flox マウスと MCL1f-Cre マウスを用い、Cre-LoxP システムにより fmSirt1KO マウスを作成した。(Gerald W, et al. genesis 2002) 同腹の flox マウスをコントロールとし、表現型の違いを比較検討した。

マウスは specific-pathogen-free (SPF) 環境において飼育され、明暗サイクルは 12/12 hr,

室温 21 ± 1 °C, 湿度 50 ± 10 %で飼育され, 自由飲水摂食状態であった.

図 1. fmSirt1KO マウスモデルの作成



2-2 筋量・身体機能の測定

13週齢, 及び24か月齢での雄マウスの筋量と身体機能(筋力・持久力)を測定した. 具体的には, 筋力について牽引力試験(ワイヤハンダ試験), 持久力についてはトレッドミル試験を用いた. また各週齢でマウスを解剖し, 必要臓器(骨格筋, 心臓, 精巣, および各種臓器)を摘出し, 0.1 mg 単位で測定, 今後の実験のために凍結保存した.

2-3 遺伝子発現解析

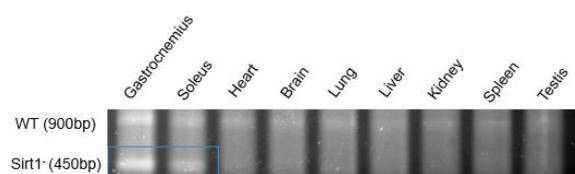
凍結保存した臓器のうち腓腹筋よりRNAを精製し, mRNA 発現変化を比較した. 具体的には速筋・遅筋関連遺伝子(MHC1, 2a, 2b, TnI slow), 筋分解系(MuRF1, Myostatin), 筋分化系(PGC1 α , MyoD)を測定した. acidic ribosomal phosphoprotein P0 (36B4)を不変対照とし, 比較CT法を用いて計算した.

3. 研究の成果

3-1 fmSirt1KO マウスの作成

当初の目標通り, fmSirt1KO マウスを樹立・維持を続けている. 各組織にPCRを行い, 骨格筋特異的に Sirt1 knockout allele (450 bp fragment) が存在することを確認した.(図1)

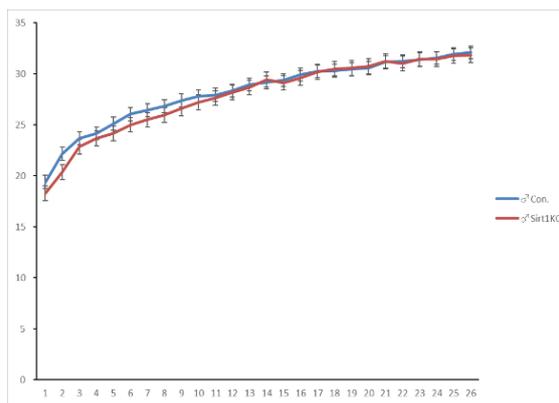
図 1. 各臓器での PCR 結果



筋特異的な KO が示された.

2 群のマウスは共に生殖能を有し, 正常発育し, 同様の成長曲線を描いた.(図2)

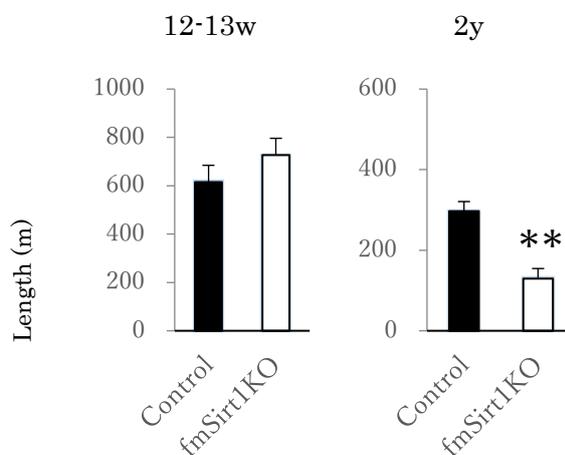
図 2. fmSirt1KO マウスの成長曲線



3-2 fmSirt1KO マウスでの各種組織重量及び筋量・筋力の変化

13 週齢での fmSirt1KO マウスは対照群と比較し, 体重および各種骨格筋重量でも有意差を認めず, これらは加齢によっても変わらなかった (n=3-9). 握力についても筋での Sirt1 機能欠損に伴う有意差を認めなかった一方, 持久力については老齢の fmSirt1KO マウスでコントロールマウスに比して有意に低下することを見出した (n=3-10).

図 3. 若齢・老齢における持久力の差



3-3 筋繊維関連遺伝子と筋量関連遺伝子の発現変化

腓腹筋における速筋・遅筋関連遺伝子/筋分解系については, 今回解析した範囲では有意差を認めなかった. 一方, 骨格筋分化に関与する MyoD の有意な遺伝子発現変化を認めた.

4. 今後の課題

骨格筋における Sirt1 作用は若年期においては筋重量・筋質に影響を与えないが, 加齢に伴

う筋質の変化に影響することが示唆された。現時点では長寿遺伝子がサルコペニアを誘導するメカニズムの解明には至っていないが、今後は更に性差の解析やミトコンドリア容量や機能を介した筋代謝の解明、網羅的遺伝子発現解析を行い、詳細な発生機序の解明を目指したい。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部を第 64 回日本老年医学会学術集会(2022.6)で発表した。今後、原著論文にまとめて学術雑誌に投稿する予定である。

以上

(The role of SIRT1 in skeletal muscle function and aging)

Primary Researcher:

Tatsuya Hosoi

project researcher, Department of Home Care Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Co-researchers:

Takashi Yamanaka

Project Associate Professor, Department of Home Care Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Sirtuin 1 (Sirt1) is a gene associated with aging and longevity. In skeletal muscle, it was reported that Sirt1 was associated with mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation; however, the function of the Sirt1 pathway in sarcopenia remains poorly understood.

In this study, we generated a mouse model (fmSirt1KO mice) in which the Sirt1 was selectively deleted in fast-twitch muscle fibers without affecting other organs. fmSirt1KO mice were capable of reproduction and grew up normally as well as the control mice. In young male mice, the deletion caused no significant difference in muscle mass, strength, and fatigue resistance. However, with aging, fmSirt1KO mice showed lower fatigue resistance compared with the control mice. The mRNA levels of genes related to muscle differentiation, including MyoD, was decreased in fmSirt1KO mice, indicating that Sirt1 affected changes in muscle quality with aging. For further study, we are to elucidate the pathogenic mechanism of Sirt1 and sarcopenia as well as muscle-bone linkage, using this mouse model.