

老化ストレス応答による骨老化制御機構解明研究（19－50）

主任研究者 清水 孝彦 国立長寿医療研究センター
老化ストレス応答研究プロジェクトチーム（プロジェクトリーダー）

研究要旨

加齢に伴い、骨組織は緩やかに骨量が減少し、多様な生理機能が失われる。近年、骨組織の主要細胞である骨細胞の加齢変化に細胞老化の寄与が示され、骨細胞老化と骨の加齢変化の関係性が注目されている。主任研究者は、骨細胞でミトコンドリア機能不全がストレス応答転写因子ATF4を核集積させ、核ラミナタンパク質減少による核構造変化と骨関連遺伝子群の発現変化を誘導し、細胞老化様変化と加齢様骨量減少をもたらすことを明らかにしつつある。本研究では、ミトコンドリアストレスに応答するATF4因子の分子動態と核ラミナタンパク質の分子接点を明らかにし、老化ストレスによる骨細胞を起点とした骨老化の分子メカニズム解明を目指す。

主任研究者

清水 孝彦 国立長寿医療研究センター 老化ストレス応答研究 PT（プロジェクトリーダー）

分担研究者

なし

A. 研究目的

骨組織は、骨格を支持する役割に加えて、造血やカルシウムの貯蔵庫、さらに骨由来ホルモンの産生を担う動的な組織である。骨量は加齢とともに緩やかに減少する。活動量低下に伴う機械的刺激低下や、それを感知する骨細胞の機能低下が要因とも考えられている。骨基質に埋没している骨細胞は骨細管を伸ばし周囲の細胞と情報伝達を行うとともに、RANKLやSclerostinに代表される骨制御因子の分泌細胞でもある。また興味深い事に、細胞寿命が1～50年と非常に長く、老化ストレスの標的細胞となり、細胞の配向や、骨細管数および形態が加齢変化することも知られている（Manolagas, SC. et al. Trends Endocrinol Metab 2010）。

主任研究者は、加齢様骨量減少モデルマウスを用いた解析過程で、加齢した大腿骨内の骨細胞でLamin AおよびLamin Bの発現低下を伴う核ラミナ構造変化とSclerostinの過剰発現

が認められること、また人為的な骨細胞ミトコンドリア機能不全モデル系（骨細胞特異的 SOD2欠損マウス、Kobayashi, K. et al. Sci Rep, 2015）や薬剤処理によるミトコンドリア機能不全誘導でも同様の変化が認められることを発見した。さらに、ミトコンドリア機能不全と核ラミナタンパク質変化を繋ぐ分子として、ストレス応答転写因子ATF4とヒストンのエピジェネティクス変化を見いだした。本研究では、ミトコンドリア機能低下によるストレス応答が、どのように転写因子ATF4を活性化させるのか、また核ラミナ構成タンパク質であるLamin AおよびLamin Bをどのような分子機構で減少させるかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

①ミトコンドリア機能不全による eIF2 α のリン酸化を介した ATF4 活性化機構の解析

ATF4 活性化の分子機構として真核生物タンパク質合成開始因子 eIF2 α のリン酸化制御を中心とした「統合的ストレス応答経路」が知られている。eIF2 α キナーゼはウイルス感染、虚血、栄養欠乏、熱ショックなどのストレス刺激により eIF2 α の 51 番目の Ser 残基をリン酸化し、ストレス応答を伝達する。骨細胞株でミトコンドリア機能不全における細胞性ストレスが ATF4 を活性化に統合的ストレス応答経路が関与しているかどうかを調べる。骨細胞株 MLO-Y4 細胞に、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP 共存下で、統合的ストレス応答経路阻害剤 ISRIB を添加し、ATF4 の活性化が抑制されるか、また下流の Lamin タンパク質の発現低下と核肥大を調べた。逆の実験として、MLO-Y4 細胞に eIF2 α フォスファターゼ阻害剤 Salubrinal を添加し、ATF4 の活性化が生ずるか調べた。

②ミトコンドリアストレス応答による ATF4 活性化

個体レベルでの ATF4 活性化を可視化するために、レポーターマウスを導入する。生体ストレス可視化マウス(UMAI マウス、トラスジェニック社)は、ストレスに応答して、ATF 翻訳誘導を可視化でき、活性化 ATF4 量を個体レベルで解析できる。骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスと交配し、実際の個体レベルで ATF4 活性化を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本申請に関して、申請者の属する施設ではヒト試料を対象とする研究は実施していない。一方、すべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえて確実に管理した。その他、移動等を伴う遺伝子組換え体の扱いについてはカルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組換え生物等の使用に規則による生物多様性の確保に関する法律」に従って遂行した。本研究はいくつかの組み換え DNA 実験と動物実験より構成されるので、我が国の感染症新法とカルタヘナ条約の批准による組み換え生物拡散防止に関する法の 2 つの法令に沿って計画・準備された。動物実験の実施にあたっては、事前に国立長寿医療研究センター倫理委員会から承認を得た動物実験プロトコールに準じた。

C. 研究結果

①ミトコンドリア機能不全による eIF2 α のリン酸化を介した ATF4 活性化機構の解析

統合的ストレス応答経路が、骨細胞株でミトコンドリア機能不全による ATF4 活性化に関与するかどうかを調べるために、統合的ストレス応答経路阻害剤 ISRIB を添加し、ATF4 の活性化抑制と核膜構造変化を調べた。その結果、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP 共存下で、ATF4 の核集積と核ラミナタンパク質発現低下に伴う核肥大を有意に抑制できた。さらに逆の実験として、統合的ストレス応答経路活性化剤 Salubrinal を添加した。しかし、細胞死が強く認められ、解析が困難であった。

②ミトコンドリアストレス応答による ATF4 活性化

活性化 ATF4 量を個体レベルで解析できるレポーターマウス (UMAI マウス) をトラスジェニック社から導入し、骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスと交配を進めている。個体の組織レベルで ATF4 活性化を Luciferase 発光で可視化することで、ミトコンドリアストレス応答が実際に骨細胞内で生じるか明らかにする。

D. 考察と結論

本研究成果から、骨細胞でミトコンドリア機能不全が、「統合的ストレス応答経路」を介して ATF4 の活性化をもたらし、核ラミナタンパク質 Lamin A と Lamin B の発現低下を導き、核肥大を引き起こすことが強く示唆された。今後、4 種類の eIF2 α キナーゼの中でどのキナーゼが本ストレス応答において主要な役割を担うか特定する必要がある。また、転写因子 ATF4 の下流遺伝子を調べることで、核ラミナタンパク質 Lamin A と Lamin B の発現低下の分子機構を明らかにする必要がある。さらに、レポーターマウスとの交配実験で、個体レベルでの実証が進めば細胞寿命が極めて長い骨細胞が、加齢プロセスの中で骨恒常性を維持する分子機構の一端が明らかになることが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, J., Toda, T., Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Izuo, N., Cho, S., Seo, D.B., Yokote, K., Shimizu, T. Syringaresinol reverses age-related skin atrophy by suppressing FoxO3a-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in copper/zinc superoxide dismutase-deficient mice. **J. Investig. Dermatol.**, 139(3), 648-655 (2019).
- 2) Ozawa, Y., Watanabe, K., Toda, T., Shibuya, S., Okumura, N., Okamoto, N., Sato, Y., Kawashima, I., Kawamura, K., Shimizu, T. Heterosis extends the reproductive ability in aged female mice. **Biol Reprod** 100(4), 1082-1089 (2019).

- 3) Shibuya, S., Watanabe, K., Tsuji, G., Ichihashi, M., Shimizu, T. Platinum and palladium nanoparticles-containing mixture, PAPANAL, does not induce palladium allergy. **Exp. Dermatol.** 28(9), 1025-1028 (2019).
- 4) Izuo, N., Murakami, K., Fujihara, Y., Maeda, M., Saito, T., Saido, T., Irie, Y., Shimizu, T. An App knock-in mouse inducing the formation of a toxic conformer of A β as a model for evaluating only oligomer-induced cognitive decline in Alzheimer's disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 515(3), 462-467 (2019).
- 5) Kim, J., Funayama, S., Izuo, N., Shimizu, T. Dietary supplementation of a high-temperature-processed green tea extract attenuates cognitive impairment in PS2 and Tg2576 mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 83(12), 2364-2371 (2019).
- 6) Sagi, H., Shibuya, S., Kato, T., Nakanishi, Y., Tsuboi, A., Moriya, S., Ohno, H., Miyamoto, H., Kodama, H., Shimizu, T. SOD1 deficiency alters gastrointestinal microbiota and metabolites in mice. **Exp. Gerontol.** 130, 110795 (2020).
- 7) Shibuya, S., Toda, T., Ozawa, Y., Yata, M.J.V., Shimizu, T. Acai extract transiently upregulates erythropoietin by inducing a renal hypoxic condition in mice. **Nutrients**, 12(2), 533 (2020).

2. 学会発表

- 1) 清水孝彦、渡辺 憲史、澁谷 修一. 骨老化プロセスにおける核構造変化とエピゲノム変化におよぼすミトコンドリア機能の役割. 第 42 回(2019 年)日本基礎老化学会大会, 仙台, 2019 年 6 月 7 日
- 2) 清水孝彦. 骨格筋ミトコンドリアで過剰発生した活性酸素種はグリコーゲン代謝酵素を失活させ、顕著なグリコーゲン蓄積による運動不耐となる. 第 4 回(2019 年)NCGG サマーセミナー, 国立長寿医療研究センター, 2019 年 8 月 9 日
- 3) Shimizu, T., Watanabe, K., Shibuya, S. SOD-mediated superoxide metabolism regulates cell fate in fibroblasts. International Cellular Senescence Association (ICSA) 2019 conference, Athene, Greece, 2019 年 9 月 10 日
- 4) Shimizu, T., Kim, J., Watanabe, K., Shibuya, S. Syringaresinol attenuates age-related skin atrophy by suppressing FoxO3a-mediated MMP-2 activation in Sod1-deficient mice. 11th International Association of Gerontology and Geriatrics Asia/Oceania Regional Congress (IAGG-AOR), 台北, 2019 年 10 月 24 日
- 5) 清水孝彦. SOD が制御する細胞死と臓器傷害の分子機構研究. 秋のミニシンポジウム「老化と老年病・認知症」, 国立長寿医療研究センター, 2019 年 11 月 15 日
- 6) Masuda, I., Koike, M., Watanabe, K., Nojiri, H., Yokote, K., Shimizu, T. Apple procyanidins facilitate PGC-1 α -associated mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2019), 神戸, 2019 年 11 月 29 日

- 7) Shimizu, T., Masuda, I. Oligomeric catechins, procyanidins, promote mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 4 日
- 8) 清水孝彦. 臓器老化を標的にした食品素材の機能性解析. 第 16 回ファンクショナルフード学会学術集会, 東京, 2020 年 1 月 11 日
- 9) Shimizu, T. Mitochondrial superoxide in muscle reversibly regulates glycogen metabolism and motor function via glycogen phosphorylase activity. 第 1 回 CIBoG (第 12 回 NAGOYA グローバル) リトリート, あいち健康プラザ, 2020 年 2 月 7 日
- 10) Shibuya, S., Shimizu, T. Generation of a novel progeroid mouse model for Werner syndrome. 第 1 回 CIBoG (第 12 回 NAGOYA グローバル) リトリート, あいち健康プラザ, 2020 年 2 月 7 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし