

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

研究期間 2019年7月1日～2021年3月31日

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。加齢に伴い緩やかに骨量が減少し、多様な生理機能も低下する。その骨量減少は、性ホルモン低下に加え、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、加齢に伴い細胞の配向異常や、骨細管数減少および変形が生じる。

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、ミトコンドリア機能不全が骨細胞の加齢様変化を助長することを明らかにした。この結果は、ミトコンドリア由来のストレス応答が骨細胞の老化を促進する可能性を示唆した。また、分子機構としてミトコンドリア機能不全に付随して、統合的ストレス応答因子であるATF4転写因子を核集積（活性化）し、骨関連遺伝子群の発現を変化させること、さらに同時に核ラミナタンパク質（Lamin AとLamin B）減少による核構造変化も誘導して、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、ミトコンドリア機能不全によりストレス応答するATF4転写因子活性化の分子機構と核ラミナタンパク質動態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している。

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

骨細胞でのミトコンドリア機能不全による ATF4 活性化に統合的ストレス応答 (Integrated stress response, ISR) 経路が関与しているかどうか検証するために、骨細胞株 MLO-Y4 細胞をミトコンドリア機能不全誘導剤 (ミトコンドリア脱共役剤) CCCP 共存下で培養し、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、また下流の Lamin タンパク質の発現低下と核肥大を調べた。その結果、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、ISR 経路の関与を示した。しかし逆の実験として、ISR 経路活性化剤 salubrinal を添加したが、細胞死が強く認められ、骨細胞株での解析は困難であった。

次に、本活性化に関わる eIF2 α キナーゼを同定するために、4種類のキナーゼに対する阻害剤投与実験を行った。その予備検討結果、PKR 阻害剤 C16 もしくは GCN2 阻害剤 A-92 添加では核肥大は抑制できなかったが、PERK および HRI 阻害剤 GSK260414 添加で核肥大抑制の傾向が認められた。

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 (*in vivo*) 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した。生体ストレス可視化マウス (UMAI マウス) は、様々なストレスにตอบสนองして、ATF4 翻訳誘導を Luciferase による発光で可視化でき、活性化 ATF4 量を個体レベルで解析できる。UMAI マウスと骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスを交配し、順調に解析個体の産仔を得つつある。準備実験として、単独の UMAI マウスに tunicamycin を腹腔内投与し、6時間後に発光基質ルシフェリン投与により肝臓での ATF4 活性化の可視化を試みた。その結果、肝臓での強い発光を認めた。さらに骨格筋なども発光することが明らかとなり、骨組織での可視化を進める準備状況は整った。

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

2019年度

- 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, PAPTAL, 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).

2020年度

- 1) Yagi-Yaguchi, Y., Kojima, T., Higa, K., Dogru, M., Ibrahim, O., Shimizu, T., Tsubota, K.

- Shimazaki, J. The effects of 3% diquafosol sodium eye drops on tear functions and ocular surface of the Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (*Sod1*) knock out mice treated with antiglaucoma eye medications. **Diagnostics** 10, 20, (2020).
- 2) Murakami, K., Obata, Y., Sekikawa, A., Ueda, H., Izuo, N., Awano, T., Takabe, K., Shimizu, T., Irie, K. An RNA aptamer with potent affinity for a toxic dimer of amyloid β 42 has potential utility for histochemical studies of Alzheimer's disease. **J. Biol. Chem.** 295, 4870-4880 (2020).
 - 3) Teratani, T., Tomita, K., Toma-Fukai, S., Nakamura, Y., Itoh, T., Shimizu, H., Shiraishi, Y., Sugihara, N., Higashiyama, M., Shimizu, T., Inoue, I., Takenaka, Y., Hokari, R., Adachi, T., Shimizu, T., Miura, S. Kanai, T. Redox-dependent PPARgamma/Tnpo1 complex formation enhances PPARgamma nuclear localization and signaling. **Free Radic. Biol. Med.** 156, 45-56 (2020).
 - 4) Obata, Y., Murakami, K., Kawase, T., Hirose, K., Izuo, N., Shimizu, T., Irie, K. Detection of amyloid β oligomer with RNA aptamers in AppNL-G-F/NL-G-F mouse, a model of Arctic Alzheimer' disease. **ACS Omega** 5, 21531-21537 (2020).
 - 5) 清水孝彦. 加齢と骨代謝(連載:老化研究の進歩). **医学のあゆみ**. 273(7) 600-606 (2020).
 - 6) 清水孝彦. 臓器老化を標的にした食品素材の機能性解析. **Functional Food Research**. 16, 21-27 (2020).
 - 7) Sharma, S., Bhattarai, S., Ara, H., Sun G., St. Clair, D.K., Bhuiyan, S., Kevil, C., Watts, M.N., Dominic, P., Shimizu, T., McCarthy, K.J., Sun, H., Panchatcharam, M.*. SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. **Redox Biology** 37, 101740 (2020).
 - 8) Watanabe, N., Noda, Y., Iimura, K., Shimizu, T., Hotta, H.*. Cerebral artery dilation during transient ischemia is impaired by mechanical barrier of amyloid β deposition around cerebral artery in Alzheimer's disease model mice. **J. Physiol. Sci.** 70, 57 (2020).
 - 9) 清水孝彦*. マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) と組織老化 (特集: SASP から紐解く老化と老化関連疾患) . **老年内科**. 2(6) 638-644 (2020).
 - 1 0) Shibuya, S., Watanabe, K., Ozawa, Y., Shimizu, T.*. Xanthine oxidoreductase-mediated superoxide production is not involved in the age-related pathologies of Sod1-deficient mice. **Int J. Mol. Sci.** 22(7), 3542 (2021).
 - 1 1) Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Toda, T., Shimizu, T.*. Pathological relationship between intracellular superoxide metabolism and p53 signaling in mice. **Int J. Mol. Sci.** 22(7), 3548 (2021).

2. 学会発表

2 0 1 9 年 度

- 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-1alpha-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
- 2020年度
- 1) 澁谷修一、小澤裕介、横手幸太郎、清水孝彦. Wrn and Recq15 deletions accerelate adipose senescence and dyslipidemia. 第 43 回(2020 年)日本基礎老化学会大会、誌上開催、2020.5.29
 - 2) 渡辺信博、野田義博、飯村佳織、清水孝彦、堀田晴美. 体性感覚刺激による脳血流増加反応に対するアミロイドβの影響. 第 43 回(2020 年)日本基礎老化学会大会、誌上

開催、2020.5.29

- 3) Kazuma Murakami, Yayoi Obata, Tajii Kawase, Keiji Hirose, Naotaka Izuo, Takahiko Shimizu, Kazuhiro Irie. RNA aptamers that recognize amyloid β oligomers in AppNL-G-F/NL-G-F mice as a model of Arctic Alzheimer disease. Alzheimer's Association International Conference 2020 (AAIC 2020), Virtual meeting, 2020.7.29.
- 4) 渡辺信博、野田義博、根本妙子、飯村佳織、清水孝彦、堀田晴美. AD モデルマウスにおける大脳皮質動脈周囲のアミロイド β 蓄積が一過性虚血中の動脈径変化に対する影響. 第43回(2020年)日本神経科学大会、オンライン、2020.7.29-8.1
- 5) 村上一馬、小畑弥生、関川あさ、上田遥、川瀬泰司、広瀬賢治、泉尾直孝、清水孝彦、入江一浩. アミロイド β 42の毒性オリゴマーを認識するRNAアプタマーの開発. 第62回天然有機化合物討論会、オンライン、2020.9.22-24
- 6) Takahiko Shimizu. Mitochondrial ROS in muscle regulates motor function via glycogen metabolism in mice. The 6th NCGG-ICAH@オンライン、2020.10.21-22
- 7) 渡辺信博、野田義博、根本妙子、飯村佳織、清水孝彦、堀田晴美. 一過性脳虚血時の軟膜動脈拡張反応に対する血管周囲のアミロイド β 蓄積の影響 —アルツハイマー病モデルマウスを用いた検討—. 第73回日本自律神経学会総会、千葉、2020.11.20-21
- 8) 澁谷修一、渡辺憲史、清水孝彦. 白金/パラジウム黒色溶液はSOD/カタラーゼ活性を持つナノ医療素材である. 第43回日本分子生物学会年会、Webポスター、2020.12.2-4.
- 9) 渡辺憲史、澁谷修一、清水孝彦. 異なる部位でのsuperoxide代謝は細胞運命を規定する. 第43回日本分子生物学会年会、オンライン、2020.12.2-4.
- 10) Kenji Watanabe, Shuichi Shibuya, Takahiko Shimizu. Location-dependent superoxide metabolism by SODs divide cell fate in fibroblasts. 第2回CIBoGリトリート、オンライン、2021.2.6.
- 11) 清水孝彦. ミトコンドリア局在型SODによる骨格筋グリコーゲン代謝制御. 第8回骨格筋生物学研究会、オンライン、2021.3.5-7
- 12) 澁谷修一、清水孝彦. 新規早老症モデルマウスの骨格筋病態機能. 第8回骨格筋生物学研究会、オンライン、2021.3.5-7
- 13) 澁谷修一、戸田年彦、渡辺憲史、Mario Jose Villegas Yata、清水孝彦. アサイー果実抽出物は腎低酸素化を介して造血因子erythropoietinを増加する. 日本農芸化学会2021年度大会、オンライン、2021.3.19-21

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