

老化ストレスによる運動器老化の機構解明研究（21-9）

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

高齢者の多くは骨粗鬆症（骨量減少）とサルコペニア（筋量減少）が同時並行的に生じており、骨量減少-筋量減少-痛み（腰や膝）の悪循環が高齢期の自立を妨げ、健康維持の大きな問題となっている。加齢性筋萎縮は、筋サテライト細胞枯渇や、神経-筋相互作用不全、性ホルモン低下、酸化ストレスなどが提唱されているが、分子機構に不明な点が多く、隣り合う骨組織との相互連関に関しても研究は発展途上である。本研究では、老齢マウス、ミトコンドリア局在型 Superoxide dismutase 2 (SOD2) 酵素欠損、および細胞質型 SOD1 酵素欠損によるミトコンドリアストレスや酸化ストレス誘導で臓器加齢を模倣したモデル系で、骨および骨格筋両組織の機能不全が相互に作用仕合い、萎縮変化を生じることを明らかにする。組織間連関による骨格筋量維持機構を提示し、加齢性筋萎縮の機構解明を目指す。

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 2021年4月1日～2022年3月31日

A. 研究目的

骨細胞特異的*Sod2*欠損マウスは、骨細胞のミトコンドリア活性酸素亢進によるミトコンドリア機能不全で骨細管形態異常や*Rankl*、*Sclerostin (Sost)* 産生亢進で加齢様骨量減少を示す。また興味深いことに並行して顕著な速筋型骨格筋の萎縮を示すことから、骨-骨格筋組織の相互連関を示唆した。他方、骨格筋特異的*Sod2*欠損マウスは、ATP枯渇による顕著な運動不耐を示す。ミトコンドリア機能不全に加え、グリコーゲン分解酵素

の活性低下によるグリコーゲン代謝異常も明らかになりつつある。しかし骨格筋萎縮を示さないことから、骨格筋量を維持する保護機構活性化の可能性を示唆した。また *Sod1* 欠損マウスは様々な組織で加齢様変化を示す。特に骨組織に加え、速筋型骨格筋も顕著な萎縮を示す。骨格筋に加え、運動神経および神経筋シナプス結合部の異常が要因と考えられている。また本研究では、酸化ストレスを起点として骨や骨格筋組織に萎縮や機能異常を呈する3系統のマウスモデルを用いて運動器老化の機構解明を目指す。これまでの解析から明らかになったミトコンドリア機能不全による統合的ストレス応答 *eIF2 α -ATF4* 軸の活性化や、細胞質酸化ストレスによる *FoxO3a-MMP2* 軸の活性化に着目して機構解明を進める。さらに骨組織から分泌される液性因子による骨格筋恒常性抑制因子の探索も加え、骨-骨格筋組織連関も考察する。

B. 研究方法

① ミトコンドリア-統合的応答軸による骨および骨格筋老化の機構解明

骨細胞特異的 *SOD2* 欠損マウスは、骨細管形態異常と高代謝回転型の骨量減少を示す。骨組織の網羅的遺伝子発現解析を進めるため、欠損マウスと対照マウス大腿骨と脛骨を単離し、骨髄を除去し、常法に従い総 RNA 抽出を行い、RNA-seq 解析を行った。

② ミトコンドリア酸化ストレスに起因する筋グリコーゲン代謝制御解明研究

骨格筋特異的 *SOD2* 欠損マウスは、筋損傷に加え、ATP 枯渇で顕著な運動不耐を示す。ミトコンドリア機能不全に加え、グリコーゲン代謝異常も明らかになりつつある。RNA-Seq による骨格筋組織の発現解析を進めるため、欠損マウスと対照マウス腓腹筋を単離し、常法に従い総 RNA 抽出を行い、RNA-seq 解析を行った。

③ 細胞質酸化ストレスに起因する筋萎縮における *FoxO3a-MMP2* 軸の役割解明

SOD1 欠損マウスは加齢様の組織変化を示し、*FoxO3a-MMP2* 軸の過剰活性化が一因と推定している。本欠損マウスの神経筋接合部変性による骨格筋萎縮の分子機構に *FoxO3a-MMP2* 軸が寄与するか明らかにするために、*Sod1* 欠損マウスと *Mmp2* 欠損マウスの交配を開始し、二重欠損ヘテロマウスが作出を進めた。

(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-統合的応答軸による骨および骨格筋老化の機構解明

骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスは、骨細管形態異常と高代謝回転型の骨量減少を示す。RNA-seq による骨組織の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、*Tnfrsf11* (RANKL), *Sost*, *Dmp1* などの骨関連遺伝子の発現増加に加え、*Lmna* および *Lmnb* などの核膜構成遺伝子の発現低下が判明し、免疫組織染色はウエスタンブロッティングによるタンパク質発現結果を裏付けた。統合的ストレス応答に関連する遺伝子の転写レベルでの変動は認められず、リン酸化や翻訳による制御を示唆した。

②ミトコンドリア酸化ストレスに起因する筋グリコーゲン代謝制御解明研究

骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスは、筋損傷に加え、ATP 枯渇で顕著な運動不耐を示す。ミトコンドリア機能不全に加え、グリコーゲン代謝異常も明らかになりつつある。RNA-Seq による骨格筋組織の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、筋制御転写因子 *Myog* およびミトコンドリア関連遺伝子 *Opal*, *Dnm1l* の発現増加とグリコーゲン分岐鎖切断酵素遺伝子 *Agl* の発現低下が判明し、表現型の一部を説明する変化が明らかとなった。

③細胞質酸化ストレスに起因する筋萎縮における FoxO3a-MMP2 軸の役割解明

SOD1 欠損マウスは加齢様の組織変化を示し、FoxO3a-MMP2 軸の過剰活性化が一因と推定している。本欠損マウスの神経筋接合部変性による骨格筋萎縮の分子機構に FoxO3a-MMP2 軸が寄与するか明らかにするために、*Sod1* 欠損マウスと *Mmp2* 欠損マウスの交配を開始し、二重欠損ヘテロマウスが作出でき、順調に二重欠損マウスの作成を進めている。

D. 考察と結論

骨細胞で酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全がストレス応答の起点となり、「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明らかになっている。骨細胞のミトコンドリアストレス応答により遺伝子発現が変化することが確認された。骨格筋恒常性に影響与えうる因子（特に分泌性因子）を明らかにする必要がある。また骨格筋の酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全は、ATP 産生能を著しく低下させ、好氣的 ATP 産生低下だけでなく、グリコーゲン代謝による嫌氣的 ATP 産生能も低下することが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021年度

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Fulton, R.E., Pearson-Smith, J.N., Huynh, C.Q., Fabisiak, T., Liang, L., Aivazidis, S., High, B.A., Buscaglia, G., Corrigan, T., Valdez, R., Danis, E., Shimizu, T., and Patel, M.N. Neuron-specific mitochondrial oxidative stress results in epilepsy, glucose dysregulation and a striking astrocyte response. **Neurobiol. Dis.** 158, 105470 (2021).
- 4) 泉尾 直孝, 清水孝彦, 村上 一馬, 入江 一浩. 毒性配座アミロイド β に着目した新規アルツハイマー病モデルマウスの開発 YAKUGAKU ZASSHI. 141(6) 843-849 (2021).
- 5) 清水孝彦. 老化制御研究におけるファンクショナルフードの役割. **Functional Food Research**, 17, 135-141 (2021).
- 6) 清水孝彦. 老化ストレス応答研究. **医学のあゆみ**. 279, 364-369 (2021).
- 7) 渡辺憲史, 澁谷修一, 清水孝彦. ミトコンドリアストレスと臓器障害. ミトコンドリアダイナミクス. エヌ・ティー・エス, pp.307-317 (2021).
- 8) Zhuang, A., Yang, C., Liu, Y., Tan, Y., Bond, S.T., Walker, S., Sikora, T., Laskowski, A., Sharma, A., de Haan, J.B., Meikle, P.J., Shimizu, T., Coughlan, M.T., Calkin, A.C., Drew, B.G. SOD2 in skeletal muscle: New insights from an inducible deletion model. **Redox Biology** 47, 102135 (2021).
- 9) 清水孝彦, 渡辺憲史, 澁谷修一. 酸化ストレスと骨格筋老化. **実験医学**. 40(2) 78-85 (2022).
- 10) 清水孝彦. SOD による骨格筋恒常性維持機構. **体力科学**. 71(1) 118 (2022).
- 11) 清水孝彦. 大豆イソフラボンによる筋グリコーゲン代謝制御機構解明. 大豆たん白質研究. 印刷中

2. 学会発表

2021年度

- 1) Shibuya, S., Ozawa, Y., Yokote, K., Shimizu, T. Wrn and Recq15 deletions promote adipose

- senescence and dyslipidemia. 第 44 回(2021 年)日本基礎老化学会大会、名古屋、2021.6.11-13
- 2) Watanabe, K., Shibuya, S., Shimizu, T. Pathological cross-talk between intracellular superoxide metabolism and p53 signaling in murine models. 第 44 回(2021 年)日本基礎老化学会大会、名古屋、2021.6.11-13
 - 3) Watanabe, N., Noda, Y., Nemoto, T., Iimura, K., Shimizu, T., Hotta, H. Influence of amyloid β deposition around the cerebral artery on cerebrovascular response during transient ischemia. 第 44 回(2021 年)日本基礎老化学会大会、名古屋、2021.6.11-13
 - 4) Shiraki, A., Oyama, J., Shimizu, T., Nakashima, T., Yokota, T., Node, K. Empagliflozin Improves Prognosis and Energy Properties in Failing Murine Heart. European Society of Cardiology Congress 2021 (ESC 2021), Virtual meeting, 2021.8.27-30
 - 5) Itoyama, T., Watanabe, K., Kadowaki, M., Kaneko, H., Yoshida, S., Shimizu, T., Maeda, H. Superoxide dismutase 2 is involved in the senescence of dentin-pulp complex. The 19th Joint Scientific Meeting between Japan Endodontic Association and Korean Association of Endodontic 2021 (JEA-KAE 2021), Virtual meeting, 2021.9.23-25
 - 6) 清水孝彦. SOD による骨格筋恒常性維持機構. 第 76 回日本体力医学会大会、オンライン、2021.9.17-19.
 - 7) 清水孝彦. SOD による抗酸化防御と臓器老化. 第 94 回日本生化学会年会、オンライン、2021.11.3-5.
 - 8) 清水孝彦. 知っておきたい老化の仕組み. 第 2 回日本基礎老化学会市民フォーラム、山陽小野田、2021.11.27.
 - 9) 澁谷修一、小澤裕介、横手幸太郎、清水孝彦. 新規ウェルナー早老症モデルマウスは脂肪細胞老化および脂質代謝異常を呈する. 第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021.12.1-3.
 - 1 0) 渡辺憲史、澁谷修一、清水孝彦. 酸化ストレスを起因とした加齢性組織変化と p53 シグナルの関連性. 第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021.12.1-3.
 - 1 1) 澁谷修一、戸田年彦、渡辺憲史、Mario Jose Villegas Yata、清水孝彦. アサイー果実パルプ水溶液は腎低酸素誘導を介して造血因子 erythropoietin を増加する. 第 18 回ファンクショナルフード学会学術集会、東京、2022.1.8.
 - 1 2) 清水孝彦. マトリックスプロテアーゼと組織老化. 第 9 回骨格筋生物学研究会、東京、2022.3.4-6
 - 1 3) 澁谷修一、清水孝彦. 早老症サルコペニアの発症機構解明. 第 9 回骨格筋生物学研究会、東京、2022.3.4-6.
 - 1 4) 岩田拓磨、澁谷修一、渡辺憲史、清水孝彦. SOD/カタラーゼ模倣薬は接触皮膚炎を緩和する. 日本農芸化学会 2022 年度大会、オンライン、2022.3.16-18

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