

## 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 2022年4月1日～2023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 $\alpha$ -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ーディングによるタンパク質発現結果を裏付けた。ミトコンドリア機能不全からストレス応答に関連シグナルを細胞実験で検討したところ、脱共益剤によるミトコンドリア機能不全実験系で、転写因子 ATF4 の増大や核内移行が明らかとなった。ATF4 は統合的ストレス応答に関わることから、上流の eIF2 $\alpha$ リン酸化体 (活性化型) を調べると、ATF4 増加に先行して増加することが明らかとなり、eIF2 $\alpha$ -ATF4 軸の寄与を強く示唆した。阻害剤やノックダウン実験から核ラミナタンパク質 LaminA と LaminB の減少や骨形成抑制因子 *Sost* 発現亢進に eIF2 $\alpha$ -ATF4 軸の寄与が明らかとなった。加齢や SOD2 欠乏などの骨細胞のミトコンドリアストレスは、eIF2 $\alpha$ -ATF4 軸 (統合的ストレス応答) を活性化し、核ラミナタンパク質減少や *Sost* 増加による骨量減少を示すことが明らかになった。

### 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、ミトコンドリア ROS 増加による機能不全と ATP 枯渇や筋傷害を伴う顕著な運動不耐を示した。ヒト遺伝性疾患の中で表現型が類似する症例を調べたところ、ATP 供給不足、運動不耐、横紋筋融解症、血清 CK 高値を示す先天性 V 型糖原病 McArdle 病が浮上し、原因遺伝子 *PYGM* (筋グリコーゲンホスホリラーゼ: GP-M) の寄与が疑われた。予備的に McArdle 病の病理診断法である筋組織の PAS 染色によるグリコーゲン蓄積と GP 活性染色を行ったところ、有意な PAS 陽性像と GP 活性減少が認められ、GP-M の寄与を強く示唆した。これらの結果は、本マウスはミトコンドリア呼吸由来の ATP 産生低下に加え、グリコーゲン利用不全による解糖系 ATP 産生も低下することを示唆した。解糖系エネルギー産生の加算的低下は II 型速筋に表現型が偏重する事実を支持した。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。次に GP-M はレドクス感受性の報告があることから、酸化剤や抗酸化剤による活性変化を調べた結果、SOD2 欠損や酸化剤添加による酸化条件下で不活性化され、また抗酸化剤投与で、可逆的に活性が復活する結果を得ている。Cys 残基などの可逆的な酸化修飾が想定された。Flag 標識した mPYGM 遺伝子ベクターを GP 活性が低い HEK293 細胞に遺伝子導入したところ、GP 活性が確認できた。酸化剤添加で活性低下、かつ還元剤の後追い添加で活性復活を確認し、可逆的な活性制御が確

認された。

また、骨細胞での SOD2 欠乏は統合的ストレス応答-ATF4 軸の活性化が認めれる。骨格筋で同様のストレス応答が生じるか組織学的に調べた所、ATF4 の発現に変化が無いことが判明した。組織毎にミトコンドリアストレスに対する応答性の違いが考察された。

### 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、皮膚萎縮の機構解析から FoxO3a-MMP2 軸の過剰活性化が明らかとなり、他組織の萎縮変化にも共通の分子機構が示唆されている。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、二重欠損マウスを作成した。小規模ながら、期待通り目的の遺伝子型を持つマウスが作成できたが、2 重欠損の *Mmp-2<sup>-/-</sup>*, *Sod1<sup>-/-</sup>* マウスは産仔数がメンデル法則の期待値よりも低く、胎生、または新生仔致死が推定された。生存した *Mmp-2<sup>-/-</sup>*, *Sod1<sup>-/-</sup>* マウスも加えて、骨密度と皮膚厚の組織解析を行ったところ、MMP-2 が半分少ない *Mmp-2<sup>+/-</sup>*, *Sod1<sup>-/-</sup>* マウスで皮膚厚と骨密度の改善が認められた。また薬理的解析で、MMP-2 阻害剤の 2 週間塗布により、*Sod1<sup>-/-</sup>* マウス皮膚厚が有意に改善した。FoxO3a-MMP-2 シグナル軸が、*Sod1<sup>-/-</sup>* マウス皮膚真皮厚の維持に大きく寄与することが示唆されが、筋萎縮への影響は限定的と推定された。

## 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

2022年度

- 1) Okamoto, N., Sato, Y., Kawagoe, Y., Shimizu, T., Kawamura, K. Short-term resveratrol treatment restored the quality of oocytes in aging mice. *Aging* 14(14), 5628-5640 (2022).
- 2) Shiraki, A., Jun-ichi Oyama, J., Shimizu, T., Nakashima, T., Yokota, T., Node, K. Empagliflozin improves cardiac mitochondrial function and survival through energy regulation in a murine model of heart failure. *Eur J Pharmacol* 931, 175194 (2022).
- 3) 澁谷修一, 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エリスロポエチンを増加させる. *Functional Food Research*, 18, 65-69 (2022).
- 4) 清水孝彦. 加齢脳とストレス応答異常. 基礎講座『エイジング・サイエンスと脳』老年精神医学雑誌. 33(9) 947-955 (2022).
- 5) 清水孝彦, 澁谷修一, 渡辺憲史. 酸化ストレスと運動器老化 特集: 老化はなぜ進むのか? *BIO Clinica*. 37(14), 1287-1292 (2022).
- 6) 清水孝彦. 第1章「老化」の不思議を科学してみると?. 『眠れなくなるほど面白い 図解 老化=エイジングの話』, 編集: 長岡 功, 日本文芸社. 2022年12月10日.
- 7) Murakami, K., Sakaguchi, Y., Taniwa, K., Izuo, N., Hanaki, M., Kawase, T., Hirose, K., Nagao, C., Mizoguchi, K., Shimizu, T., Irie, K. Lysine-targeting inhibition of amyloid  $\beta$  oligomerization by a green perilla-derived metastable chalcone in vitro and in vivo. *RSC Chem. Biol.* 3, 1380 (2022).
- 8) Maki, T., Sawahata, M., Akutsu, I., Amaike, S., Hiramatsu, G., Uta, D., Izuo, N., Shimizu, T., Irie, K., Kume, T. APP knock-in mice produce E22P-A $\beta$  exhibiting an Alzheimer's disease-like phenotype with dysregulation of hypoxia-3 inducible factor expression. *Int J. Mol. Sci.* 23, 13259 (2022).
- 9) Shuichi, S., Watanabe, K., Sakuraba, D., Abe, T., and Shimizu, T. Natural compounds that enhance the motor function in a mouse model of muscle fatigue. *Biomedicines*. 10, 3073 (2022).
- 1 0) 澁谷修一, 坂本一晃, 渡辺憲史, 野尻英俊, 清水孝彦. 骨格筋特異的 SOD2 欠損はミトコンドリア機能不全に伴う運動不耐を引き起こす. *基礎老化研究誌*. 47(1), 32-34 (2023).
- 1 2) Shiraki, A., Jun-ichi Oyama, J., Shimizu, T., Node, K. Linagliptin exacerbates heart failure due to energy deficiency via downregulation of glucose utilization and absorption in a mouse model. *Eur J Pharmacol* 948, 175673 (2023).

## 2. 学会発表

2022年度

- 1) 清水孝彦. 教育講演: 個体老化と細胞老化の基礎研究. 第 64 回日本老年医学会学術

集会、オンライン、2022.6.2-4.

- 2) 澁谷修一、渡辺憲史、Mario Jose Villegas Yata、清水孝彦. アサイー果実は腎臓の低酸素化を介して造血ホルモンを増加する. 第 22 回日本抗加齢医学会総会、大阪、2022.6.17-19.
- 3) 清水孝彦. 「基礎老化研究」シンポジウム：SODs が制御する酸化ストレスと臓器老化. 日本組織培養学会第 94 回大会、大阪、2022.7.7-8.
- 4) Shibuya, S., Sakamoto, I., Watanabe, K., Nojiri, H., Shimizu, T. Mitochondrial ROS in fast muscle reversibly regulates glycogen metabolism and physical activity in mice. 第 45 回 (2022 年)日本基礎老化学会大会、京都、2022.7.27-28.
- 5) Watanabe, K., Shibuya, S., Kobayashi, K., Nojiri, H., Shimizu, T. Mitochondrial dysfunction in osteocytes caused age-related bone loss due to the nuclear lamina abnormalities. 第 45 回 (2022 年)日本基礎老化学会大会、京都、2022.7.27-28.
- 6) 澁谷修一、清水孝彦. アサイー果実による造血因子エリスロポエチン誘導作用. 第 7 回(2022 年)NCGG サマーセミナー、大府、2022.8.24.
- 7) 清水孝彦、澁谷修一. 早老症の分子基盤から考えるエイジングリサーチ. 第 95 回日本生化学会大会、名古屋、2022.11.9-11.
- 8) 清水孝彦. 臓器老化モデルマウスを用いた機能性食品評価. 機能性食品開発のための動物セミナー、オンライン、2022.11.22.
- 9) 清水孝彦. 個体老化と細胞老化の基礎研究. 第 12 回運動器抗加齢医学研究会、東京、2022.11.27.
- 1 0) 清水孝彦、澁谷修一、金 周元. Syringaresinol ameliorates FoxO3a-mediated skin atrophy and pigmentation. 第 45 回日本分子生物学会年会、千葉、2022.11.30-12.2.
- 1 1) 澁谷修一、坂本一晃、渡辺憲史、野尻英俊、清水孝彦. Mitochondrial ROS in fast muscle reversibly regulates glycogen metabolism and physical activity in mice. 第 45 回日本分子生物学会年会、千葉、2022.11.30-12.2.
- 1 2) 渡辺憲史、澁谷修一、清水孝彦. Nuclear lamina structure deformation through mitochondrial dysregulation induced age-related bone loss. 第 45 回日本分子生物学会年会、千葉、2022.11.30-12.2.
- 1 3) 澁谷修一、渡辺憲史、桜庭大樹、阿部卓哉、清水孝彦. 筋疲労モデルマウスの運動機能を改善する機能性食品素材. 第 19 回ファンクショナルフード学会学術集会、名古屋、2023.1.6-7.
- 1 4) 清水孝彦. 臓器老化モデルマウスを用いたファンクショナルフードの機能性解析. 第 19 回ファンクショナルフード学会学術集会、名古屋、2023.1.6-7.
- 1 5) Watanabe, N., Noda, Y., Nemoto, T., Iimura, K., Shimizu, T., Hotta, H. Influence of amyloid  $\beta$  deposition around the pial artery on cerebral artery response during transient ischemia in Alzheimer's disease model mice. Neurovascular Unit Conference 2023、Tokyo、2023.1.6-9

- 1 6) 澁谷修一、坂本一晃、渡辺憲史、野尻英俊、清水孝彦。速筋ミトコンドリア ROS は可逆的にグリコーゲン代謝及び運動機能を調節する。第 9 回骨格筋生物学研究会、伊勢原、2023.3.3-5
- 1 7) 澁谷修一、上條真弘、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 2023 年度大会、オンライン、2023.3.14-17

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