

機関番号：82674

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500641

研究課題名 (和文) ミトコンドリア酸化ストレスによる骨格筋老化の分子機構解明

研究課題名 (英文) Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity

研究代表者 清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40301791

研究成果の概要 (和文)：加齢性の運動器老化は高齢者の生活の質を低下させる要因となっている。レドックスバランスの調節が加齢に伴い破綻し、運動器老化を促進すると考えられているが詳細な分子機構は不明である。本研究は運動器老化における抗酸化酵素 Mn-SOD の役割を調べるために、Mn-SOD 欠損マウスの運動器を解析した。骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは、体重、摂餌量、耐糖能、筋量は野生型マウスと変わらず正常であったが、筋細胞の中央に核が偏在した中心核を呈し筋再生像が顕著に認められた。また筋ミトコンドリアでのスーパーオキシドの産生と酸化 DNA 量が有意に増加していた。運動能力は細胞内 ATP 枯渇により著しく低下し、ミトコンドリア機能不全を支持した。さらに抗酸化剤の単回投与により可逆的に運動機能が改善した。以上の結果から、運動器のレドックスバランス破綻は骨格筋の機能低下を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The increase in reactive oxygen species (ROS) levels that occurs during intense exercise has been proposed to be one of the major causes of muscle fatigue. To investigate the pathological significance of oxidative stress in skeletal muscle, we generated skeletal muscle-specific manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)-deficient (muscle-*Sod2*^{-/-}) mice. The mutant mice showed severe disturbances in exercise activity, but no atrophic changes in their skeletal muscles. In histological and histochemical analyses, the mutant mice showed centralized nuclei in their muscle fibers and selective loss of enzymatic activity in mitochondrial respiratory chain complexes. In addition, the mutant mice displayed increased oxidative damage and reduced ATP content in their muscle tissue. Furthermore, a single administration of the antioxidant EUK-8 significantly improved exercise activity and increased the cellular ATP level in skeletal muscle. These results imply that the superoxide anions generated in mitochondria play a pivotal role in the progression of exercise intolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：骨格筋、酸化ストレス、運動器老化、ミトコンドリア、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素の蓄積が、加齢による緩やかな生体機能の低下、すなわち老化を進行させる原因であるという「活性酸素説（フリーラジカル説）」が提唱され、最も有力な説として支持されている。活性酸素の大部分はミトコンドリア呼吸の副産物として産生され、生体物質を酸化することで機能不全を起こす結果、細胞毒性を発生させると考えられているが筋細胞ミトコンドリア活性酸素の病理学的役割、障害機序、加齢性筋力低下との関連については不明である。

2. 研究の目的

(1) 筋細胞ミトコンドリア活性酸素の病理学的役割、障害機序を解明する。
(2) 酸化ストレスと加齢性筋力低下との関連について分子生物学的にアドレスする。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋特異的 Cre マウスと Mn-SOD flox マウスとの交配にて骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを作製し、解析する。
(2) 本マウスの形態変化の抗酸化剤によるレスキュー効果を確認する。

4. 研究成果

(1) 本欠損マウスを解析したところ正常に発育し、伸長、体重等の形態学的な異常は認められなかった。骨格筋重量は若齢および 30 ヶ月齢においても変化なく筋萎縮は認められなかったがミトコンドリア内スーパーオキシドの過剰発生、DNA 酸化障害の更新が確認された。
(2) 組織学的解析では腓腹筋において中心核が顕著に認められ、筋繊維の再生像が観察された。

(3) ミトコンドリアに顕著な形態学的異常は認められなかったが、ミトコンドリア呼吸酵素活性を調べたところ、呼吸酵素複合体 II 活性が著しく低下していた。

(4) 運動機能を調べるために自発行動量と強制走行能を調べた。その結果、自発行動量は野生型マウスと有意差は認められなかったが、トレッドミルによる強制走行能力が著しく低下していた。またその低下は著しい血中乳酸値の増加と骨格筋内 ATP 量の低下を伴っていた。

(5) 抗酸化剤レスキュー実験として、SOD/カタラーゼ活性を有するサレン-マンガン錯体を腹腔内に単回投与した。その結果、24 時間後に著しく強制走行時間が延長し、96 時間まで走行能力が持続した。投与により、骨格筋内 ATP 量の著明な回復が捉えられた。

以上の結果から、骨格筋特異的 Mn-SOD

欠損マウスは骨格筋ミトコンドリア呼吸鎖が障害され ATP 量が枯渇することで強制走行能力が低下し、抗酸化剤投与により ATP 量が回復し、走行能力が延長することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Makino, N., Maeda, T., Oyama, J.I., Sasaki, M., Higuchi, Y., Mimori, K. & Shimizu, T. Antioxidant therapy attenuates myocardial telomerase activity reduction in superoxide dismutase-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol* 50, 670-677 (2011).
2. Lustgarten, M.S., Jang, Y.C., Liu, Y., Qi, W., Qin, Y., Dahia, P.L., Shi, Y., Bhattacharya, A., Muller, F.L., Shimizu, T., Shirasawa, T., Richardson, A. & Van Remmen, H. MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. *Aging Cell* 10, 493-505 (2011).
3. Sasaki, T., Shimizu, T., Koyama, T., Sakai, M., Uchiyama, S., Kawakami, S., Noda, Y., Shirasawa, T., Kojima, S. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *J Neurosci Res* 89, 601-610 (2011).
4. Murakami, K., Shimizu, T. & Irie, K. Formation of the 42-mer amyloid β radical and the therapeutic role of superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *J Amino Acid* 2011, 654207 (2011).
5. Shimizu, T., Kawakami, S., Nojiri, N., Shirasawa, T. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene. *Geriatr Gerontol Int* 10, S70-S79 (2010).
6. Kuwahara, H., Horie, T. Ishikawa, S. Tsuda, C., Kawakami, S., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Tachibana, T., Okabe, M., Melki, J., Takano, R., Toda, T., Morikawa, D., Nojiri, H., Kurosawa, H., Shirasawa, T., Shimizu, T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of

exercise activity without muscle atrophy. *Free Rad Biol Med* 48, 1252-1262 (2010).

7. Lustgarten, M., Jang, Y., Liu, Y., Muller, F., Qi, W., Steinhilber, M., Brooks, S., Larkin, L. M., Shimizu, T., Shirasawa, T., McManus, L., Bhattacharya, A., Richardson, A., Van Remmen, H. Conditional knockout of MnSOD targeted to type IIB skeletal muscle fibers increases oxidative stress and is sufficient to alter aerobic exercise capacity. *Am J Physiol* 297 C1520-1532 (2009).
 8. Kawakami, S., Matsuda, A., Sunagawa, T., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Hiraumi, Y., Adachi, S., Matsui, H., Ando, K., Fujita, T., Maruyama, N., Shirasawa, T., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. *Cir J* 73, 2125-2134 (2009).
 9. Murakami, K., Inagaki, J., Saito, M., Ikeda, Y., Tsuda, C., Noda, Y., Kawakami, S., Shirasawa, T., Shimizu, T. Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 457-61 (2009).
 10. Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E. & Shirasawa, T. *Clk-1* deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech Ageing Dev* 129, 291-298 (2008).
 11. Hashizume, K., Hirasawa, M., Imamura, Y., Noda, S., Shimizu, T., Shinoda, K., Kurihara, T., Noda, K., Ozawa, Y., Ishida, S., Miyake, Y., Shirasawa, T. & Tsubota, K. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol* 172, 1325-1331 (2008).
- [学会発表] (計 19 件)
1. 清水孝彦、白澤卓二. 細胞内 SOD 欠損による運動器障害の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.7-10.
 2. 森川大智、野尻英俊、斎田良知、津田千鶴、斎藤充、宮崎剛、金子和夫、清水孝彦. 細胞質酸化ストレスは低代謝型骨減少症を引き起こす. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.7-10.
 3. Saita, Y. Nojiri, H. Tsuda, C. Miyazaki, T. Morikawa, D., Kaneko, K. Shimizu, T. Intracellular superoxide dismutase deficiency decreased bone mass *in vivo* by impairment of cell viability and redox balance in osteoblasts. *The 32th Annual Meeting, The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Tronto, Canada, October 15-19 (2010).*
 4. 野尻英俊、桑原宏朋、森川大智、斎田良知、金子和夫、清水孝彦. 筋細胞におけるミトコンドリア内酸化ストレスは呼吸鎖を障害し著しい運動能力の低下をきたす. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.14-15.
 5. Shirasawa, T., Kawakami, S., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. Gordon Research Conferences, Les Diablerets, Switzerland, August 22-27 (2010).
 6. Shimizu, T., Horie, T. Kuwahara, H. Ishikawa, S. Tsuda, C. Kaneko, T. Tahara, S. Nojiri, N. Shirasawa, T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12.
 7. Tsuda, C. Nojiri, H. Saita, Y. Miyazaki, T. Ozawa, Y. Morikawa, D. Shimizu, T. Copper/zinc superoxide dismutase deficiency causes low turnover osteopenia. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12.
 8. Nojiri, H. Saita, Y. Tsuda, C. Morikawa, D., Kurosawa, H. Shimizu, T. Copper/zinc superoxide dismutase deficiency causes low turnover osteopenia via osteoblastic dysfunction. *The 31th Annual Meeting, The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Denver, Colorado, September 11-15 (2009).*
 9. 清水孝彦、白澤卓二. ミ活性酸素と臓器老化 -SOD 欠損マウスを用いた解析-. 第 9 回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2009.5.28-29.
 10. 立花利公、野尻英俊、清水孝彦、岡部正隆、白澤卓二. 臓器特異的に Mn-SOD

- をノックアウトしたマウス・心筋組織のミトコンドリアの形態. 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 仙台, 2009.5.26-29.
11. 堀江哲郎、津田千鶴、石川 慎、野田義博、桑原宏朋、川上 哲、小澤裕介、白澤卓二、清水孝彦. 骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの酸化ストレスによる運動能不全の解析. 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009.3.27-29.
 12. 清水孝彦、白澤卓二. Mn-SOD コンディショナルノックアウトマウスを用いた抗老化研究. 第 123 回日本薬学会年会, 京都, 2009.3.26-28.
 13. Shimizu, T. Analysis of heart/muscle-specific Mn-SOD-deficient mice. The Japan-Korea Joint Seminar: Toward the Establishment of Asian Aging Research and Education Center, Nagasaki, 2008.9.4-9.6.
 14. 清水孝彦、堀江哲郎、桑原宏朋、津田千鶴、石川 慎、野田義博、川上 哲、白澤卓二. 骨格筋の運動機能における Mn-SOD の役割. 日本基礎老化学会第 31 回大会, 松本, 2008.6.12-13.
 15. 川上 哲、松田瑛奈、金子孝夫、田原正一、砂川忠広、白澤卓二、清水孝彦. 抗酸化剤投与による Mn-SOD 欠損に起因する拡張型心筋症の予防と治療. 日本基礎老化学会第 31 回大会, 松本, 2008.6.12-13.
 16. 清水孝彦、白澤卓二. ミトコンドリアフリーラジカルと臓器障害. 第 8 回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2008.6.6-7.
 17. 堀江哲郎、津田千鶴、石川 慎、野田義博、桑原宏朋、川上 哲、小澤裕介、吉田朋恵、白澤卓二、清水孝彦. 骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを用いた筋機能と活性酸素過剰解析. 第 8 回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2008.6.6-7.
 18. 稲垣 潤、池田泰隆、川上 哲、白澤卓二、清水孝彦. CuZn-SOD 欠損マウスは加齢性皮膚炎を発症する. 第 8 回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2008.6.6-7.
 19. 川上 哲、松田瑛奈、金子孝夫、田原正一、白澤卓二、清水孝彦. 抗酸化剤投与による mitochondrial cardiomyopathy の予防と治療. 第 8 回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2008.6.6-7.
- 〔図書〕 (計 4 件)
1. 清水孝彦、白澤卓二. 老化遺伝子, 新老年学「第 3 版」 編集代表: 大内尉義、秋山弘子. 東京大学出版会, 213-236 (2010).
 2. 清水孝彦. 臓器老化モデルマウスを用いた抗老化食品の探索, 化学と生物 化学と生物編集部 49 巻 1 号、6-8 (2010).
 3. 清水孝彦、白澤卓二. Mn-SOD コンディショナルノックアウトマウスを用いた抗老化研究, 薬学雑誌 日本薬学会 130 巻 1 号、19-24 (2010).
 4. 清水孝彦、川上 哲、白澤卓二. 酸化ストレスモデルマウス, 老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック 日本基礎老化学会編 アドスリー社 115-122 (2008).
- 〔産業財産権〕 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
清水孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
地方独立法人東京都健康長寿医療センター 東京都健康長寿医療センター研究所 研究員
研究者番号: 40301791