

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15649

研究課題名（和文）老年症候群の受容体連関とミトコンドリア質管理を軸とした機序解明及び治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of Mechanisms and Development of Treatment Methods for Geriatric Syndromes Based on Receptor Association and Mitochondrial Quality Control

研究代表者

佐々木 雄一（SASAKI, Yuichi）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教

研究者番号：00887656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：高齢化が進む本邦において加齢や生活習慣病による老年症候群の予防が重要である。老年疾患発症の鍵となるミトコンドリアの質管理と原因となる受容体連関に関する研究を行った。脂質異常症、糖尿病、閉経はオートファジー発現抑制によるミトコンドリア機能低下、さらに細胞老化、骨格筋分化抑制を認めた。一方、アンジオテンシン受容体を阻害することで機能は維持されたことから、この機序が老年症候群の治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や生活習慣病は、認知機能障害、心血管疾患、サルコペニアの原因となり、わが国の超高齢化社会の中で健康寿命の延伸を考える際に、発症前に予防することが重要である。ミトコンドリアはオートファジーによる質管理を受けており、ミトコンドリアの質管理を維持することが重要となる。本研究においては、脂質異常、糖尿病、閉経に関してオートファジー発現抑制によるミトコンドリアの機能低下を認め、血管の細胞老化や骨格筋修復を抑制していた。これらはアンジオテンシン受容体を阻害することで改善したことから、この機序が老年症候群の治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In Japan, where the aging population is advancing, the prevention of geriatric syndromes caused by aging and lifestyle diseases is important. We conducted research on the quality management of mitochondria, which is key to the onset of geriatric diseases, and receptor associations that cause these conditions. Dyslipidemia, diabetes, and menopause were observed to cause mitochondrial dysfunction due to suppression of autophagy expression, leading to cellular aging and inhibition of skeletal muscle differentiation. On the other hand, it was suggested that by inhibiting the angiotensin receptor, these functions were maintained, indicating that this mechanism could be a treatment target for geriatric syndromes.

研究分野：内科学

キーワード：老化 アンジオテンシン 受容体 ミトコンドリア マイトファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では高齢化に伴い、神経疾患、心血管疾患、サルコペニアなどが複合的に形成する「老年症候群」を生じた症例が増加している。老年症候群を形成する疾患は、認知症、Parkinson病、冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患、心不全、炎症性疾患などを原因とするが、これらは主に生活習慣病を基盤に発症することから、老年症候群形成には基軸となる発症形態を有していることが予想される。

現代の生活習慣病である糖尿病、高血圧、脂質代謝異常は生体内でのアンジオテンシン II (AngII) の過剰発現を招き、酸化ストレスの過剰産生から認知機能障害、動脈硬化性疾患、サルコペニアと関連することが示唆される。糖尿病において糖化終末産物 (AGE) が RAGE (receptor for AGE) を介して細胞内の過酸化酸素種 (ROS) を増加させることで AngII が増加、また過酸化脂質 (ox-LDL) と LOX-1 の結合によりアンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R) を介して AngII が増加するという報告がある。しかし、RAGE、LOX-1、AT1R の受容体連関と AngII との関連、また AngII とミトコンドリアの質管理に關与するダイナミクスやマイトファジーとの関連を示した報告はない。ミトコンドリアダイナミクスおよびマイトファジーと LOX-1、RAGE、AT1R の受容体連関との関連性が加齢と生活習慣病に關与している可能性があり、これらのメカニズムを解明することにより疾患ごとの治療に加え、新たな治療法の確立ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では老年症候群の発症基軸となる臨床的かつ分子生物学的機序を明らかにし、最終的に有効な治療介入法を構築することである。

3. 研究の方法

脂質異常、高血糖、閉経モデルマウスを使用し、C57BL6 (野生型) マウスとの間で以下 ~ について評価項目をもとに比較検討する。また、AT1 受容体ノックアウトマウス、AT1 受容体拮抗薬 (カンデサルタン)、ミトコンドリアの fission 化阻害薬 (mdivi-1) を用いた rescue 実験においても同様に比較検討する。平行してヒト血管平滑筋細胞 (HASMC)、マウス骨格筋由来筋芽細胞株 (C2C12) を用いた培養細胞実験も行う。

脂質異常: C57BL6 マウスと ApoE KO マウスを使用し比較検討する。各種培養細胞に ox-LDL 投与群、非投与群で比較検討する。

Rescue 実験: ApoE KO を mdivi-1 投与群、非投与群に分ける、ApoE KO と ApoE KO に AT1R KO マウスを交配したダブルノックアウト (DKO) マウスを仕様、ApoE KO をカンデサルタン投与群、非投与群に分けて比較検討する。ox-LDL を投与した各種培養細胞にカンデサルタン投与群、非投与群に分けて比較検討する。

高血糖: C57BL6 マウスと 2 型糖尿病モデルである C57BLKS/J *Iar*⁻ + *Leprdb* / + *Leprdb* (db/db マウス) を使用し比較検討する。各種培養細胞に AGE 投与群、非投与群で比較検討する。

Rescue 実験: db/db マウスに mdivi-1 投与群、非投与群に分ける、db/db マウスにカンデサルタン投与群、非投与群に分けて比較検討する。AGE を投与した各種培養細胞にカンデサルタン投与群、非投与群に分けて比較検討する。

閉経: 雌の C57BL6 において両側卵巣摘除モデルと Sham を作成し比較検討する。各種培養細胞に 17 estradiol (E2) 投与群、非投与群に分けて比較検討する。

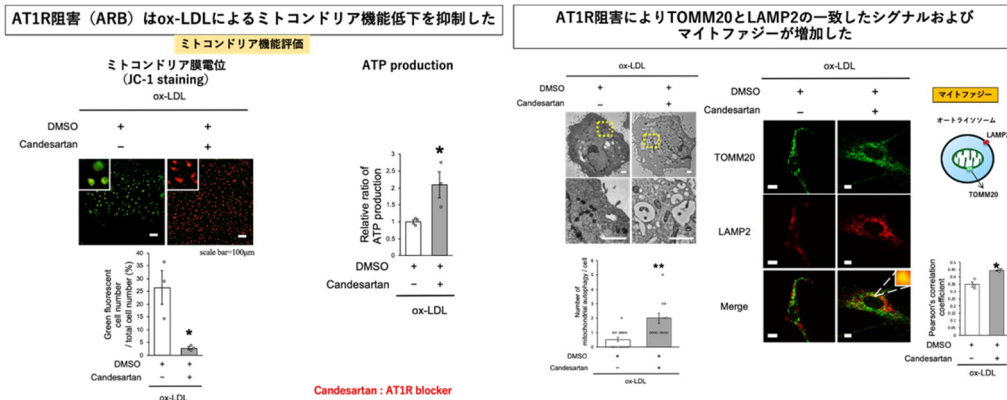
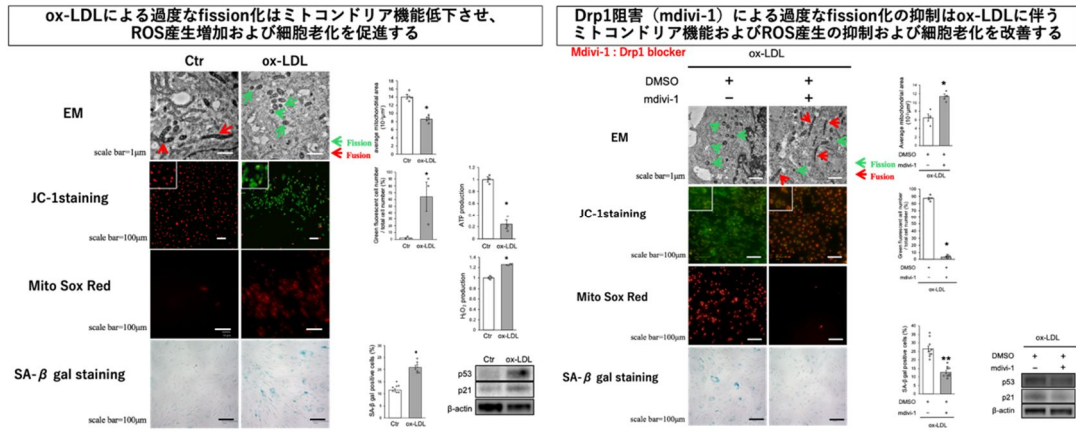
Rescue 実験: E2 を投与した各種培養細胞にカンデサルタン投与群、非投与群に分けて比較検討する。

《評価項目》

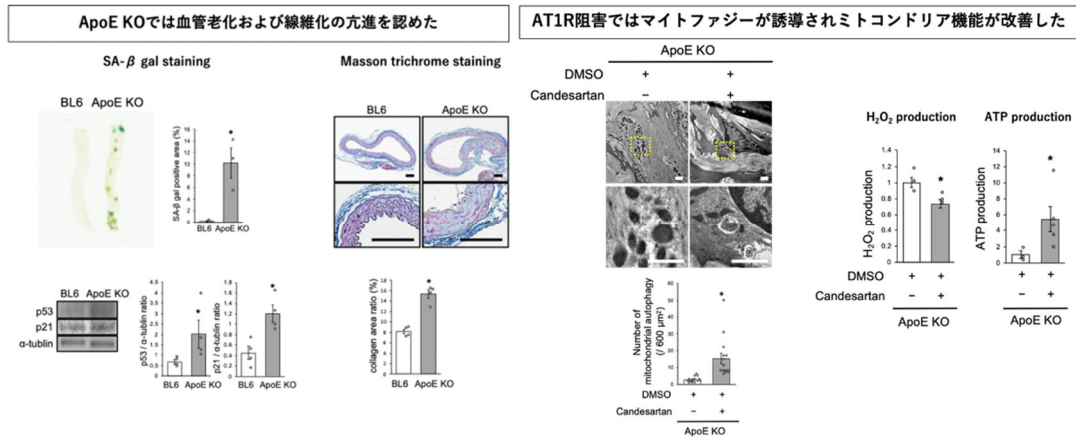
- A. 生理学的評価: (a) 血清脂質濃度、(b) 血圧測定: tail-cuff 法による血圧測定装置で測定、(c) 筋力測定: コンピューター制御下筋力測定、(d) 組織重量: 脳、心臓、骨格筋の重量を測定。
- B. 動脈硬化の評価: 大動脈根の凍結標本を作成、クライオスタットにてバルサルバ洞の連続切片を作成し Oil Red O 染色を行う。画像解析ソフトを用いて動脈硬化領域の定量評価を行う。
- C. 老化の評価: 組織からタンパク質や mRNA を抽出し、p53、p21、p16、PAI-1 などの老化マーカーに関する Immunoblot、real time PCR、また組織の SA- β Gal 染色を行う。
- F. RAGE、LOX-1 の発現: 各組織を免疫組織化学染色、Immunoblot にて発現量を評価する。
- D. ミトコンドリアダイナミクスの評価: 電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態を観察し、画像解析ソフトを用いて面積を計測し、fission、fusion の割合を定量評価する。Immunoblot で p-Drp1、Drp1、Mfn1、Mfn2、Opa1 などのダイナミクス関連タンパクの発現を評価する。
- E. ミトコンドリア機能の評価: 各組織からミトコンドリアを単離し、H2O2 産生能測定、ATP 産生能、および Immunoblot によるユビキチン化ミトコンドリアを測定する。
- F. マイトファジーの評価: 電子顕微鏡でマイトファジーの発現を観察。Immunoblot で LC3、p62、Rab7、Rab9 などのコンベンショナルおよびオルタナティブオートファジー関連タンパク発現や LC3、Rab7、Rab9、Lamp2、TOMM20 などの免疫組織化学染色を施行する。

4. 研究成果

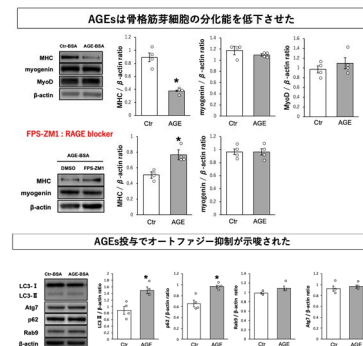
(1) VSMC への ox-LDL 投与では、ミトコンドリアは過度な fission 化を呈し、さらにミトコンドリア機能は低下し、ROS 産生増加および細胞老化を促進したが、mdivi-1 投与や ARB 投与により回復した。Ox-LDL 投与下での AT1R 阻害実験では、LAMP2、/TOMM20 の免疫染色によりマイトファジーを誘導していた。



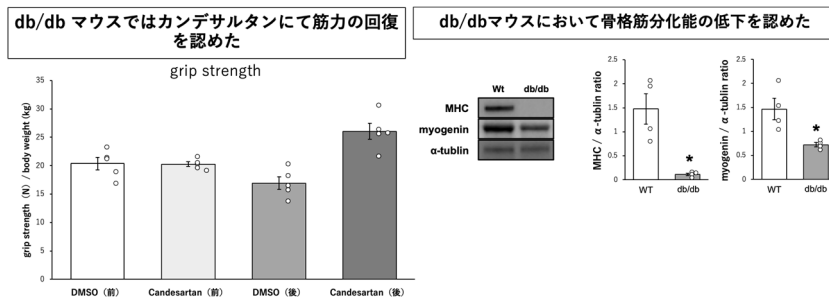
動物実験においては、C57BL6 マウスと比較し、ApoE KO マウスでは、Drp1 を介した過度な fission 化を認め、血管老化の進展、ATP 産生の低下、ROS の増加を認めた。ApoE KO マウスへの mdivi-1 投与では過度な fission 化が抑制され、血管老化の進展が抑制された。ARB の投与では、fission 化を抑制し、さらにマイトファジーを誘導することでミトコンドリア機能は維持され、血管老化の進展は抑制された。



(2) 骨格筋筋芽細胞 (Human skeletal muscle myoblasts: HSMM) を用いた。HSMM に AGE 200 μg/mL を投与したところ、ミオシン重鎖 (MHC) の発現低下を認めた。一方、RAGE blocker である FPS-ZM1 を投与することにより MHC は回復を認めたことから、AGE は骨格筋芽細胞の分化能を低下させることが示唆された。さらに、AGE 投与により筋萎縮のマーカーである MURF-1 の増加を認めた。オートファジーに関しては、オートファジーのマーカーである LC3-II の増加を認めたが、p62 の増加も認めることから、AGE によりオートファジーが抑制されることが示唆された。



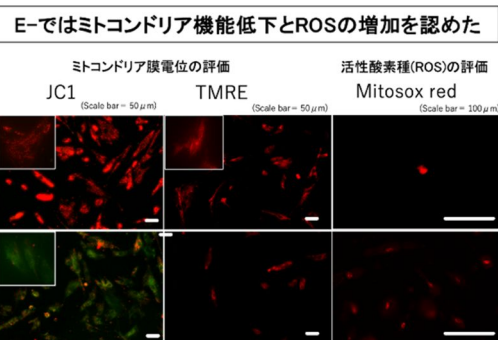
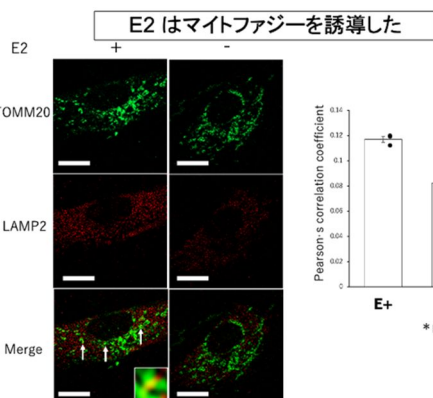
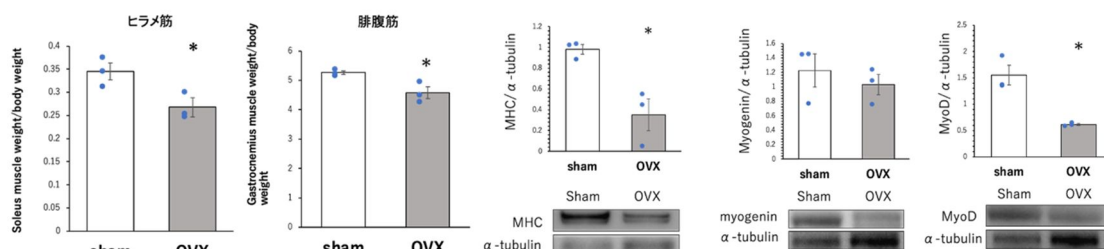
動物実験では、糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いた。C57BL6 マウスと比較して、db/db マウスでは腓腹筋、ヒラメ筋、長趾伸筋の筋肉重量の低下、骨格筋力（握力）の低下を認めた。また、MHC の発現低下を認め、db/db マウスでの骨格筋の分化能が低下していることが示唆された。一方、db/db マウスに ARB であるカンデサルタンを投与することにより骨格筋力の回復を認めたことから、糖尿病はサルコペニアの誘因となること、また ARB によりサルコペニアへの進展が抑制されることが示唆された。



db/db マウスでの骨格筋の分化能が低下していることが示唆された。一方、db/db マウスに ARB であるカンデサルタンを投与することにより骨格筋力の回復を認めたことから、糖尿病はサルコペニアの誘因となること、また ARB によりサルコペニアへの進展が抑制されることが示唆された。

(3)動物実験では C57BL6 マウスを用い、卵巣摘除術を行なった閉経モデルマウスを作成し、sham 手術群と比較した。閉経モデルマウスでは腓腹筋、ヒラメ筋の筋肉量の低下を認めた。また、ミオシ重鎖（MHC）の発現低下を認め、骨格筋の分化能の低下が示唆された。

培養細胞実験では、骨格筋筋芽細胞を用い、17-β-エストラジールを投与した群 (E2+) と非投与群 (E2-) に分け実験を行なった。E2- では E2+ に比べ MHC の発現低下を認め、分化能の低下が示唆された。また、免疫組織化学染色では E2+ では LAMP2 と TOMM20 の共局在の増加を認め、エストロゲンは骨格筋においてミトファジーを誘導することが示唆された。さらに、JC-1 染色、TMRE 染色、Mitox red 染色の結果より E2- ではミトコンドリア機能低下及び ROS の増加を認めた。また、Westernblot では E2+ 群で Rab9 の減少を認め、また免疫組織化学染色においても E2- 群では LAMP2 と Rab9 の共局在の減少を認めた。以上より、エストロゲンは、Rab9 依存性オートファジーを誘導し、ミトファジーを介してミトコンドリアの機能を維持し、骨格筋分化能を維持することにより骨格筋萎縮に対して保護的に働くことが示唆された。



以上の結果から、脂質異常症、糖尿病、閉経はマウスにおいて、血管老化の進展、骨格筋重量減少、また骨格筋の分化能低下を認めた。細胞レベルにおいてもオートファジー発現抑制によるミトコンドリア機能低下を認め、さらに細胞老化、骨格筋分化抑制を認めた。一方、ARB 投与により機能は維持されていたことから、この機序が老年症候群の治療ターゲットになることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuichi Sasaki, Yoshiyuki Ikeda, Yoshihiro Uchikado, Yuichi Akasaki, Junichi Sadoshima, Mitsuru Ohishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Estrogen Plays a Crucial Role in Rab9-Dependent Mitochondrial Autophagy, Delaying Arterial Senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.019310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Uchikado, Yoshiyuki Ikeda, Yuichi Sasaki, Masaaki Iwabayashi, Yuichi Akasaki, Mitsuru Ohishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 With Angiotensin II Type 1 Receptor Impacts Mitochondrial Quality Control, Offering Promise for the Treatment of Vascular Senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cardiovasc Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2021.788655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 上坊翔太, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 AT1受容体阻害は脂質異常に伴う動脈硬化性心血管疾患予防上の残余リスク軽減の要である：基礎研究による検討
3. 学会等名 第59回日本循環器病予防学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上坊翔太, 池田義之, 内門義博, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 Rab9依存性オルタナティブオートファジーは閉経後女性サルコペニア発症を予防するための治療ターゲットとなる
3. 学会等名 第59回日本循環器病予防学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 上坊翔太, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 糖尿病に伴うサルコペニアの病態に終末糖化産物によるAutophagic Flux抑制を介した骨格筋分化能低下が関与する
3. 学会等名 第65回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上坊翔太, 池田義之, 内門義博, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 エストロゲンのマイトファジーを介した骨格筋芽細胞分化効果
3. 学会等名 第65回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上坊翔太, 池田義之, 佐々木雄一, 内門義博, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 マイトファジーは閉経に伴う血管老化やサルコペニア進展に対する包括的治療ターゲットとなる
3. 学会等名 第71回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上坊翔太, 池田義之, 内門義博, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 血管老化および骨格筋萎縮に対するエストロゲンのマイトファジーを介した多面的保護効果について
3. 学会等名 第45回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上坊翔太, 池田義之, 内門義博, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 エストロゲンはミトファジーを介して骨格筋細胞分化を制御する
3. 学会等名 第33回日本老年医学会九州地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 上坊翔太, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 終末糖化産物はオートファジー抑制により骨格筋分化能を低下させる
3. 学会等名 第33回日本老年医学会九州地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 ARBIはミトコンドリアダイナミクスのバランスを取ることで脂質異常症による血管老化を抑制する
3. 学会等名 第64回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uchikado Y, Ikeda Y, Uebo S, Sasaki Y, Akasaki Y, Ohishi M.
2. 発表標題 Angiotensin II type1 receptor inhibition improves vascular senescence through improvement of mitochondrial quality control via CRAF/MEK/ERK pathway.
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木雄一, 池田義之, 内門義博, 赤崎雄一, 大石 充
2. 発表標題 血管老化研究
3. 学会等名 第133回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充
2. 発表標題 LOX-1-AT1R受容体連関/ミトコンドリアダイナミクス/マイトファジーは動脈硬化治療の重要な治療ターゲットである
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sasaki Y, Ikeda Y, Uchikado Y, Akasaki Y, Ohishi M.
2. 発表標題 Estrogen induces Atg7-independent and Rab9-dependent mitophagy which dose not require mitochondrial fission and protects artery from senescence and atherosclerosis.
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchikado Y, Ikeda Y, Sasaki Y, Akasaki Y, Ohishi M.
2. 発表標題 Angiotensin type1 receptor/Raf/MEK axis facilitates vasclular senescence via dual modification of mitochondrial dynamics and mitophagy.
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木雄一, 赤崎 雄一, 大石 充.
2. 発表標題 過酸化脂質による血管老化の治療はLOXとAT1受容体との受容体連関によるミトコンドリア質管理低下が重要なターゲットとなる.
3. 学会等名 第21回 日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 雄一, 池田義之, 内門義博, 赤崎 雄一, 大石 充.
2. 発表標題 エストロゲンのSirt1/LKB1/UIk1/Rab9経路を介したミトファジー誘導による血管老化・動脈硬化抑制作用
3. 学会等名 第69回 日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木 雄一, 赤崎 雄一, 大石 充.
2. 発表標題 脂質異常に対するAT1R阻害の新たな可能性: ミトコンドリア質管理を介した抗血管老化および抗動脈硬化効果
3. 学会等名 第69回 日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木 雄一, 赤崎 雄一, 大石 充.
2. 発表標題 AT1R阻害はLOX/AT1R受容体連関によるRaf/MEK/ERK系を介したミトコンドリア質管理によりox-LDL誘発の血管老化を改善する
3. 学会等名 第43回 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内門義博, 池田義之, 佐々木 雄一, 赤崎 雄一, 大石 充.
2. 発表標題 T1R阻害はLOX/AT1R受容体連関によるRas/Raf/MEK/ERK系を介したミトコンドリア質管理を改善することで抗血管老化を来たす
3. 学会等名 第53回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchikado Y, Ikeda Y, Sasaki Y, Akasaki Y, Ohishi M.
2. 発表標題 Receptor association of lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor-1 with angiotensin II type 1 receptor followed by mitochondrial quality control is an innovative therapeutic concept for targeting vascular senescence induced by oxidized low-density lipoprotein.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------