

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462283

研究課題名(和文)骨酸化ストレスによる骨格筋恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文)Oxidative stress in bone regulates skeletal homeostasis in mice

研究代表者

清水 孝彦(Shimizu, Takahiko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：40301791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞機能と骨格筋恒常性の生理的な関連を明らかにするために、骨細胞特異的にレドックス制御分子Sod2を欠損させミトコンドリア機能不全による細胞機能障害を誘導した。骨細胞特異的Sod2欠損マウスは、加齢依存的な骨量減少を示すとともに、骨細胞の骨細管ネットワーク破綻とRANKLやSclerostinなどの液性因子の過剰産生を明らかにした。さらに本欠損マウスは、中年齢以降に骨格筋タンパク質の構成的合成低下により2型骨格筋量が有意に減少し、強制運動能力が著しく低下していた。骨細胞の機能不全が骨格筋タンパク質の恒常性を破綻させ、骨格筋萎縮を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Superoxide dismutase 2 (Sod2) is a mitochondrial antioxidant enzyme that plays a pivotal role in the maintenance of mitochondrial function to regulate redox balance. However, the physiological function of Sod2 in bone metabolism has not been fully elucidated. In order to address this question, mice lacking Sod2 in osteocytes were generated by crossbreeding mice harboring a Sod2 conditional allele with Dmp1-Cre transgenic mice (Dmp1-Sod2^{-/-}). The Sod2 ablation in osteocytes significantly caused bone loss and fragility in an age-dependent manner. In addition, histomorphometric analyses also revealed that Sod2 loss markedly disorganized bone canaliculi in the cortical bones, indicating osteocyte dysfunction. Interestingly, we found specific up-regulation of Sost and Rankl genes in bone. These findings demonstrated that mitochondrial SOD in osteocytes regulates osteocyte fate and RANKL- and Sclerostin-mediated bone metabolism in mice.

研究分野：運動器老化

キーワード：骨 酸化ストレス 老化 SOD 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、単に骨格を支持する為の支持組織ではなく、造血の場でもあり、また全ての細胞の活動に必要とされるカルシウムの貯蔵庫としての役割を担う動的な組織である。骨量は生後急速に増加し20～30歳代でピークを迎えるが、その後加齢とともに減少する。同様に骨格筋も加齢と共に萎縮し、運動器能力を著しく低下させ、転倒骨折や寝たきりのリスクを高める。一方、活性酸素による酸化ストレス傷害蓄積が、加齢性退行変化の原因であるという「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。活性酸素はミトコンドリア代謝などの副産物として産生され、タンパク質、核酸、脂質といった生体物質を酸化することで機能不全を起こす結果、細胞障害を発生させる。酸化ストレスの軽減は、骨や骨格筋の加齢性退行変化を緩和する手段として有力な方法の一つと考えられる。しかし、酸化ストレスの骨代謝に与える影響や骨格筋機能に与える影響は不明な点が多く、解明すべき課題は多い。

2. 研究の目的

これまでの全身性 SOD1 欠損マウスや組織特異的 SOD2 欠損マウスの解析から、各組織の酸化ストレス傷害は、概ねその組織に障害や変性をもたらすことが明らかとなった。しかし興味深いことに、骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスは、顕著な筋力低下は示すが、老齢期まで対照マウスと同等に骨格筋量を保持していた (Kuwahara, *et al.* FRBM 2010)。一方、骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスは、加齢依存的な骨量減少に加え、骨格筋量の萎縮を示すことが予備的に明らかとなった。この対照的な結果は、骨格筋量が骨格筋自身の調節機構に加えて、骨組織による調節機構の存在を示唆した。

これらの実験事実から、骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスの骨組織解析に加えて骨格筋を解析すること、逆に骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスの骨組織を解析することを着想した。これらの解析により、骨と骨格筋が相互関連して互いの組織恒常性を維持する制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

骨および骨格筋における SOD2 機能とミトコンドリア酸化ストレスの病因的役割を解析するため、SOD2 flox マウスと骨細胞特異的 Cre マウス (Dmp1-Cre) または骨格筋特異的 Cre マウス (Hsa-Cre) を交配し、作出する。3ヶ月齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢を解析群として用意する。各週齢で体重、摂餌量、行動量 (ACTIMO)、強制走行時間 (トレッドミル)、Grip 筋力を測定し、体重や行動量に違いが無いことを確認する。全身の骨密度 (BMD) と石灰化量 (BMC)、扁平骨 (脊椎) 及び長管骨 (四肢骨) の pQCT、マイクロ CT を行い、海綿骨及び皮質骨量の定量化を行う。また腓腹筋 (速筋) およびヒラメ筋 (遅筋) 重量を測定し、対照群との比較と加齢変化を調べる。コブラ毒である cardiotoxin を腓腹筋に筋注し骨格筋傷害を誘導する。0, 5, 18 日後に腓腹筋を取り出し、凍結切片の HE 染色による継時的な筋再生過程を評価する。骨格筋萎縮の要因が筋再生能の低下がどうか明らかにする。

(倫理面への配慮)

組換え動物実験に関する研究は、千葉大学の実験動物委員会および遺伝子組換え実験に関する指針に基づいてこれを実施する。

4. 研究成果

骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスは体重や骨格に異常は認められなかったが、3ヶ月齢から月齢依存的な海綿骨と皮質骨の骨量減少を示した。

骨代謝パラメーターを調べたところ骨形成低下と骨吸収増加が認められた。また骨関連遺伝子として骨形成抑制因子 SOST と骨吸収促進因子 RANKL が発現亢進し、骨代謝異常を裏付けた。さらに興味深いことに、このマウスの骨細胞は有意な ROS 産生亢進に加えて形態異常や骨細管数の減少が認められ、骨細胞間ネットワークが破綻していることが明らかとなった。単離骨細胞に脱共役剤を添加し、ミトコンドリア機能不全を誘導すると RANKL の発現増加や形態異常が起こることも判明した。また、欠損マウス骨と同様の変化が 2 年齢の老齢マウス骨でも認められた。以上の結果からミトコンドリア機能不全による骨量減少は加齢性骨量減少にも認められるは共通のメカニズムであるが示唆された。骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスは加齢性骨量減少を模倣するモデルとして有用であると考えられた。

また、本マウスの骨格筋量を調べたところ、中年齢以降に有意な 2 型骨格筋量の減少が認められた。また、トレッドミルによる強制運動を行ったところ、有意な強制走行時間の短縮が明らかとなった。また、本マウスの骨格筋幹細胞であるサテライト細胞の細胞数、増殖能、筋管細胞への分化能を調べたところ、対照マウスと欠損マウスで有意な差が認められなかった。さらに骨格筋関連遺伝子の発現を調べたところ、筋形成および筋分解のいずれの遺伝子発現も有意に低下しており、骨格筋タンパク質の構成的な合成低下を明らかにした。以上の結果から、骨細胞の機能不全が間接的に、かつサテライト細胞非依存的に骨格筋タンパク質の恒常性破綻させ、骨格筋萎縮を引き起こしたことを示唆した。

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 7 件)

1. Koike, M., Nojiri, H., Ozawa, Y., Watanabe, K., Muramatsu, Y., Kaneko, H., Morikawa,

- D., Kobayashi, K., Saita, Y., Sasho, T., Shirasawa, T., Yokote, K., Kaneko, K., Shimizu, T. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci. Rep.* 5, 11722 (2015). 査読有
2. Kobayashi, K., Nojiri, H., Saita, Y., Morikawa, D., Ozawa, Y., Watanabe, K., Koike, M., Asou, Y., Shirasawa, T., Yokote, K., Kaneko, K., Shimizu, T. Mitochondrial superoxide in osteocyte perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. *Sci. Rep.* 5, 9148 (2015). 査読有
3. Kojima, T., Dogru, M., Ibrahim, O. M., Wakamatsu, T. H., Ito, M., Igarashi, A., Inaba, T., Shimizu, T., Shirasawa, T., Shimazaki, J., Tsubota, K. The effects of 2% rebapimide ophthalmic solution on the tear functions and ocular surface of the superoxide dismutase-1 (*Sod1*) knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7793-7802 (2015). 査読有
4. Munetomo, A., Hojo, Y., Higo, S., Kato, A., Yoshida, K., Shirasawa, T., Shimizu, T., Kimoto, T., and Kawato, S. Aging-induced changes in sex-steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in cortex, hypothalamus and cerebellum. *J Physiol Sci* 65, 253-263 (2015). 査読有
5. Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Izuo, N., Shimizu, T. Resveratrol derivative-rich melinjo seed extract attenuates skin atrophy in *Sod1*-deficient mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 391075, (2015). 査読有
6. Izuo, N., Nojiri, H., Uchiyama, S., Noda, Y., Kawakami, S., Kojima, S., Sasaki, T., Shirasawa, T., Shimizu, T. Brain-specific superoxide dismutase 2 deficiency causes perinatal death with spongiform encephalopathy in mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 238914, (2015). 査読有
7. Rowley, S., Liang, LP., Fulton, R., Shimizu, T., Day, B., Patel, M. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.*, 75, 151-158 (2015). 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. Masato Koike, Hidetoshi Nojiri, Haruka Kaneko, Daichi Morikawa, Keiji Kobayashi, Yoshitomo Saita, Kazuo Kaneko, Takahiko Shimizu. Mitochondrial superoxide regulation in chondrocytes suppresses mechanical overloading-induced

cartilage degeneration. *Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting 2016, Disney's Coronado Springs Resort, Lake Buena Vista, Orlando, Florida, USA, March 5-8 (2016).*

2. Takahiko Shimizu, Keiji Kobayashi, Hidetoshi Nojiri, Koutaro Yokote. SOD2 loss in osteocytes perturbs canalicular networks associated with impairment of bone remodeling in age-related osteoporosis. *Biology of Ageing Conference, Singapore, Singapore, October 22-24 (2015).*
3. Takahiko Shimizu, Keiji Kobayashi, Hidetoshi Nojiri. Mn-SOD loss in osteocytes causes age-related bone loss associated with impairment of bone remodeling. *The 10th IAGG (International Association of Gerontology and Geriatrics) Asia/Oceania 2015 Congress, Chiang Mai, Thailand, October 19-22 (2015).*

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 孝彦 (SHIMIZU, Takahiko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：40301791

(2)研究分担者

(3)連携研究者

野尻 英俊 (NOJIRI, Hidetoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10317456