

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02920

研究課題名(和文) 老化制御因子のクロストーク解析を機軸とした運動器退行性変化制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of locomotor degenerative changes due to crosstalk of aging control factors

研究代表者

麻生 義則 (ASOU, YOSHINORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座教授

研究者番号：50345279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：今年度はDmp1cre::Sirt6f/fマウス(Sirt6cKO)とPAI-1KOマウスを交配しDmp1cre::Sirt6f/f;;PAI-1-/-マウス(dKOマウス)を作成し、Sirt6とPAI-1のシグナルクロストークを検証した。dKOではFGF23、SOSTの発現は対照群と同等まで低下した。老化したPAI-1KOマウスは同週齢の野生型マウスより骨量が多く、血中リン濃度も高かった。以上、SIRT6によりFGF23、SOSTの発現が制御され、その機構は少なくとも一部はPAI-1制御を介することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の成果は、サーチユイアゴニストのニコチンアミドモノヌクレオチドや、経口PAI-1阻害剤などの、加齢に伴う骨代謝の障害に対する治療への応用の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：This year, we crossed Dmp1cre::Sirt6f/f mice (Sirt6cKO) with PAI-1KO mice to generate Dmp1cre::Sirt6f/f;;PAI-1-/- mice (dKO mice) to verify the signal cross-talk between Sirt6 and PAI-1. dKO mice showed reduced FGF 23, and SOST expression was reduced to levels comparable to controls. Aged PAI-1KO mice had more bone mass and higher blood phosphorus levels than wild-type mice of the same week of age. These results indicate that FGF 23 and SOST expression is regulated by SIRT6 and that the mechanism is at least partly mediated by PAI-1 regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：SIRT6 PAI-1 osteoporosis ageing FGF23 SOST

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### 【要介護、要支援者の増加；ロコモティブシンドロームとサルコペニア】

骨粗鬆症、変形性関節症は、ロコモティブシンドロームの原因疾患として克服すべき疾患の筆頭に挙げられる。また加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。この加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）は日常生活の質の低下のみならず、骨粗鬆症の原因ともなる。しかし、加齢に伴う運動器退行性変化の発症機序の詳細については十分に解明されておらず、治療法もほとんどない。サルコペニア研究に動物モデルは不可欠だが、現状では良いモデルがない。

### 【Sirt6 と PAI-1 のクロストーク】

我々は老化制御因子サーチュインによる硬組織代謝制御機構に注目して研究を行い、Sirt6 が軟骨加齢を制御することを明らかにした。いずれの研究でも、Sirt6 を欠損した軟骨細胞では、PAI-1 の発現亢進が確認された。Sirt6 欠損マウスは早期老化の表現型を呈し、生後早期に死亡するが、PAI-1 は p53 の下流に位置し細胞の細胞老化を誘導するために必要十分な因子である (Kortlever ら 2006 Nat. cell. Biol.)

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、老化制御因子 Sirt6 と PAI-1 のシグナルカスケードに着目し、両者の制御機構を明らかにすると共に、運動器の退行性変化、具体的には加齢に伴う骨密度低下、軟骨変性、骨格筋減少の背景に存在する分子メカニズム、およびその治療法を明らかとすることである。

## 3. 研究の方法

### 【骨細胞特異的 SIRT6 欠損マウス (cKO)、SIRT6/PAI-1 欠損マウス (dKO) の解析】

骨細胞特異的 SIRT6 欠損マウス、Dmp1Cre::Sirt6f/f マウス (cKO) を作成した。cKO と PAI-1 欠損マウス (PAI-1KO) を交配させ cKO::Pai-1<sup>-/-</sup> マウス (dKO) を得た。大腿骨、腰椎に対して uCT 解析を行った。cKO を生後 5 ヶ月で屠殺し、皮質骨を採取し qPCR 法、免疫組織学的解析を行った。

### 【骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞株を用いた解析】

MLO-Y4 細胞株を培養し siRNA により Sir6 発現を抑制した。長期培養、あるいは 50 nM doxorubicin を投与し、senescence 誘導を行った。Fgf23, Sost, Pai-1 および senescence マーカーの発現を qPCR にて評価した。ChIP assay を行った。

### 【PAI-1 欠損マウスの解析】

雄の PAI-1<sup>-/-</sup> マウスとその同腹子を 72 週間飼育し、安楽死後にマイクロ CT と qPCR 分析で骨組織を解析した。血中リン濃度を測定した。

### 【高齢マウスに対する PAI-1 阻害剤の投与効果の解析】

生後 6 ヶ月の雄 C57Bl6/J マウスに対して、MR ストック飼料に PAI-1 阻害剤 TM-5484 を含有する混餌飼料 (0.01%, 100 mg/kg・d<sup>-1</sup>)、あるいは対照群に MR ストックを与えた。生後 12 ヶ月まで給餌を継続し、麻酔下で腓腹筋の筋張力を電気生理学的に計測した。腓腹筋組織を組織学的に解析した。生後 18 か月の雄 C57Bl6/J マウスに対して PAI-1 阻害剤 TM-5484 をゾンデにより毎日経口投与した。1 カ月後に麻酔下で腓腹筋の筋張力を電気生理学的に計測した。腓腹筋組

織を組織学的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### 【骨細胞特異的 SIRT6 欠損マウス (cKO) の解析】

cKO マウスは対象群と同等に成長したが、腰椎、大腿骨ともに骨量が低下した(図 1)。腰椎の骨形態計測の結果、破骨細胞が増加して骨吸収が増加、骨形成が低下していた。一方 dKO の骨量は対象群と同等であった。

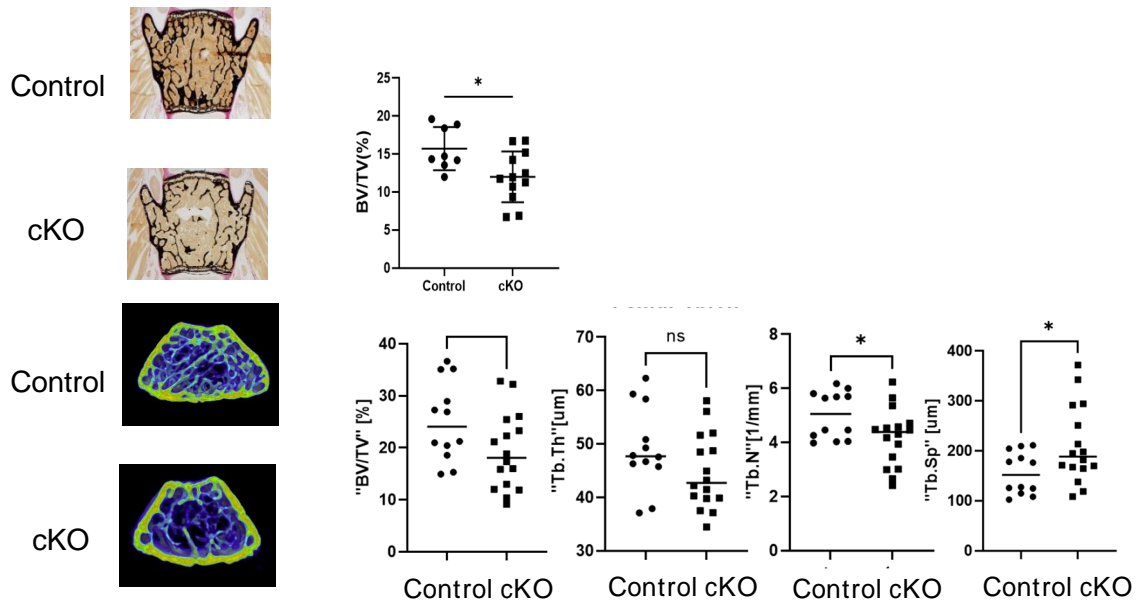
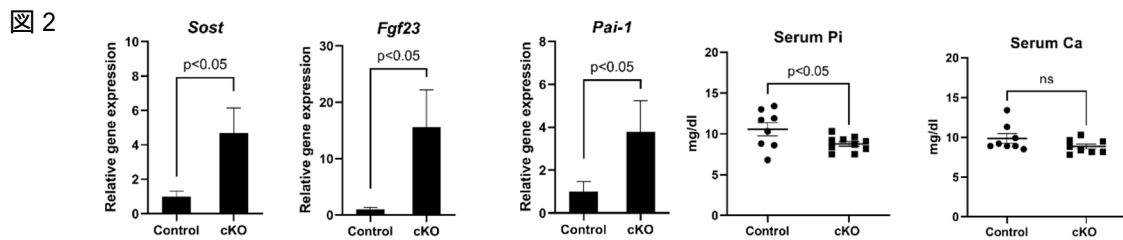


図 1 上；腰椎組織と骨量 下；大腿 3 DCT 画像と海綿骨パラメーター

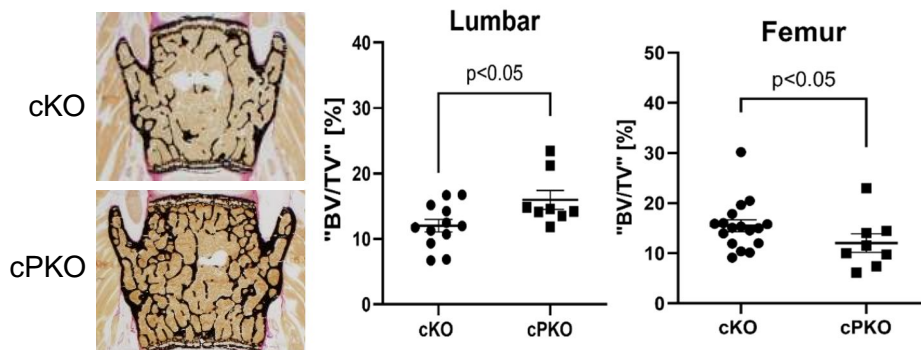
皮質骨の qPCR の結果、cKO では *Sost*, *Fgf23*, *Pai-1* の発現が上昇した。FGF23 の発現亢進に伴い cKO の血中リン濃度が低下した(図 2)。



##### 【SIRT6/PAI-1 欠損マウス(dKO)の解析】

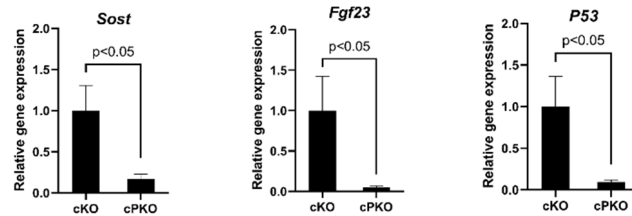
cKO と比較し dKO マウスでは骨量が増加し control マウスと近似となった(図 3)。

図 3



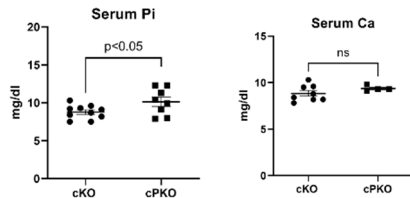
皮質骨の qPCR の結果、dKO では *Sost*, *Fgf23*, *Pai-1* の発現が上昇した (図 4)。

図 4



FGF23 発現低下に伴い血中リン濃度が増加した (図 5)。

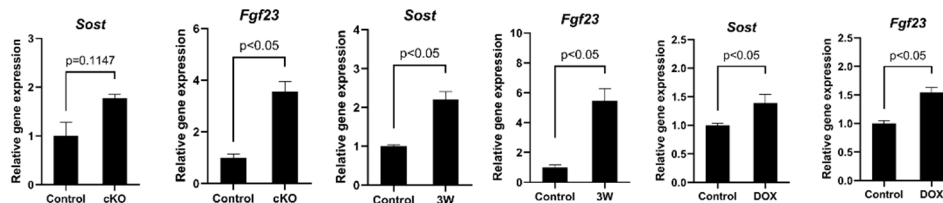
図 5



### 【骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞株を用いた解析】

MLO-Y4 細胞株に siRNA を作用させ *Sirt6* 発現を抑制したところ、*Sost*, *Fgf23* の発現が増加した。同様に長期培養、あるいは doxorubicin 投与により senescence を誘導したところ、*Sost*, *Fgf23* の発現が増加した (図 6)。

図 6

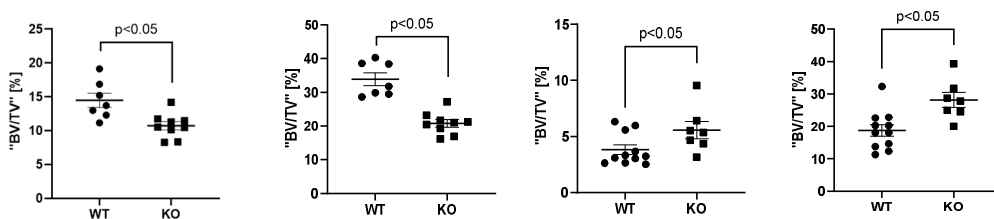


*Fgf23* プロモーター領域には HIF-1 結合領域が存在し、ChIP assay では、SIRT6 発現抑制、senescence 誘導のいずれにおいても HIF-1 の結合が促進された。HIF-1 活性抑制によって *Fgf23* の発現は低下した。

### 【PAI-1 欠損マウスの解析】

生後 72 週の PAI-1 欠損マウスは加齢に伴う骨量減少から回避された (図 7)。

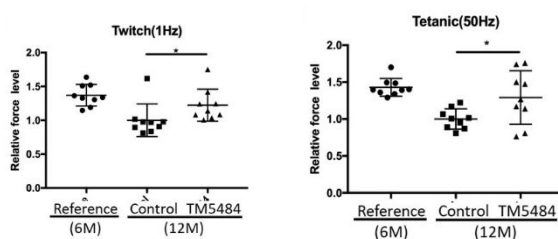
図 7



### 【PAI-1 阻害剤投与による筋肉代謝への影響の解析】

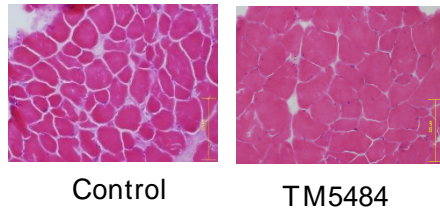
ヒトでは青年期に相当する生後 6 か月のマウスに対して、同じく中年期に相当する 12 か月まで、継続して TM-5484 を混餌飼料として投与した。生後 12 ヶ月の対照群では、若年マウスと比較して腓腹筋の Twitch, Tetanic とともに筋力が低下したが、混餌群は対照群と比較して有意に握力、腓腹筋力が高値を示した (図 8)。

図 8



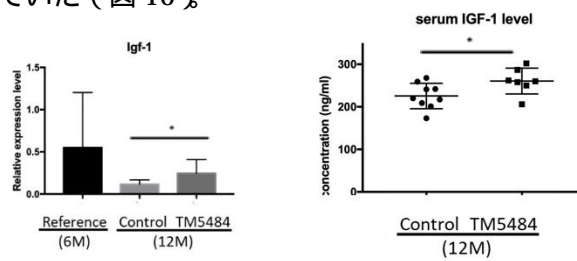
組織学的解析では生後 12 か月の対照群では有意に筋線維の萎縮が生じていたが、TM-5484 投与群では筋線維萎縮が予防された。次に、ヒトでは高齢者に相当する生後 18 か月マウスに対して、4 週間のみ TM-5484 をゾンデによって経口投与した。その結果、短期間の投与にもかかわらず筋線維の太さは TM-5484 投与群では対照群を上回った（図 9）。

図 9



TM-5484 は加齢に伴う筋線維萎縮、筋力低下を予防することが明らかとなったが、そのメカニズムを解析するため、筋組織の q-PCR 解析を行った。その結果、TM-5484 投与群の骨格筋では、Igf-1mRNA の発現が対照群よりも有意に高値を示し、血中 Igf-1 タンパク濃度も上昇していた（図 10）。

図 10



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Aihemaiti A, Yamamoto N, Piao J, Oyaizu T, Ochi H, Sato S, Okawa A, Miyata T, Tsuji K, Ezura Y, Asou Y.	4. 巻 Jan 1;534
2. 論文標題 A novel PAI-1 inhibitor prevents ageing-related muscle fiber atrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 849-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.089.	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 該当する
1. 著者名 Tenkumo T, Aobulikasimu A, Asou Y, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Nakamura K.	4. 巻 Jun 1;10(1)
2. 論文標題 Proanthocyanidin-rich grape seed extract improves bone loss, bone healing, and implant osseointegration in ovariectomized animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65403-4.	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 該当する
1. 著者名 Muroi N, Ochi H, Shimada M, Asou Y, Hara Y.	4. 巻 Feb 19;16(2)
2. 論文標題 Effects of long-term plate fixation with different fixation modes on the radial cortical bone in dogs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0247410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0247410. eCollection 2021.	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 麻生 義則・アディハム アハマト	4. 巻 52
2. 論文標題 PAI-1活性制御によるサルコペニア予防の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 709-712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Giang Thi Hien Nham 1, Xiang Zhang 1, Yoshinori Asou 2, Tamayuki Shinomura 3	4. 巻 704
2. 論文標題 Expression of Type II Collagen and Aggrecan Genes Is Regulated Through Distinct Epigenetic Modifications of Their Multiple Enhancer Elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene.	6. 最初と最後の頁 134-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2019.04.034.	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 該当する

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu*1, Hiroki Ochi1, Jinying Piao1, Shingo Sato1, Kunikazu Tsuji2, Atsushi Okawa1, Yoshinori Asou1
2. 発表標題 Osteocyte Sirt6 has crucial roles in bone and phosphate metabolism through senescence- dependent and -independent manner
3. 学会等名 米国骨代謝学会(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu、越智広樹、朴金瑛、佐藤信吾、辻邦和、大川淳、麻生義則
2. 発表標題 骨細胞Sirt6による骨代謝、リン代謝制御機構
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aidehamu Aihemaiti, Naoki Yamamoto, Alkebaier Aobulikasimu, Hiroki Ochi, Shingo Sato, Kunikazu Tsuji, Toshio Miyata, Atsushi Okawa, Yoshinori Asou
2. 発表標題 PAI-1 accelerates sarcopenia and ageing-related osteoporosis.
3. 学会等名 米国骨代謝学会(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アディハム アハマット1) アクバル アブルカスム 越智 広樹 山本 尚輝 小柳津 卓哉 宮田 敏男 佐藤 信吾 畑 裕 辻 邦和 大川 淳 麻生 義則
2. 発表標題 PAI-1はロコモティブシンドローム、サルコペニアを加速する。
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アディハム アハマット1) アクバル アブルカスム 越智 広樹 山本 尚輝 小柳津 卓哉 宮田 敏男 佐藤 信吾 畑 裕 辻 邦和 大川 淳 麻生 義則
2. 発表標題 PAI-1阻害は筋骨格系組織の退行性変化を予防する。
3. 学会等名 骨関節フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu*1, Zulipiya Aibibula1, Jinying Piao1, Shingo Sato2, Hiroki Ochi2, Kunikazu Tsuji3, Atsushi Okawa1, Yoshinori Asou1
2. 発表標題 骨細胞のSirt6はSOST発現を介して骨代謝を制御する
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu*1, Zulipiya Aibibula1, Jinying Piao1, Shingo Sato2, Hiroki Ochi2, Kunikazu Tsuji3, Atsushi Okawa1, Yoshinori Asou1
2. 発表標題 Osteocyte Sirt6 has crucial roles in bone and phosphate metabolism
3. 学会等名 annual meeting for american society of bone and mineral research (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu、Zulipiya Aibibula、朴金瑛、金光文、越智広樹、佐藤信吾、大川淳、麻生義則
2. 発表標題 骨細胞Sirt6による骨代謝制御機構
3. 学会等名 骨関節フォーラム
4. 発表年 2018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
研究分担者	辻 邦和  (TSUJI Kunikazu)  (20323694)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授    (12602)	

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
---------	---------