

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11732

研究課題名(和文)メタロチオネイン遺伝子欠損による間葉系組織の老化機構の解明と新規老化防止法の創生

研究課題名(英文)Elucidation of Aging Regulatory Mechanisms in Mesenchymal Tissues of Metallothionein Knockout mice.

研究代表者

門田 佳人(Kadota, Yoshito)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：60461365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタロチオネイン遺伝子欠損マウス(MTKOマウス)の寿命短縮および老化機構を明らかにするために壮齢期および老齢期のMTKOと野生型(WT)の雄性マウスの血漿メタボロームを比較解析した。その結果、WTマウスとMTKOマウスの血漿間で濃度が異なる物質としてカルニチンや合成前駆体トリメチルリジン(TML)、アシルカルニチン類などのカルニチン関連物質が多く検出された。また腎臓および肝臓中のカルニチン合成に関与する酵素の遺伝子Tmlheの発現量が野生型マウスと比較してMTKOマウスにおいて顕著に低く、MTKOマウスの寿命短縮にカルニチン代謝異常が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MTKOマウスの寿命短縮の一要因として、カルニチンの代謝異常が考えられた。カルニチンは、食事あるいは生体内で合成され、ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸代謝に必須であり、ミトコンドリアの保護効果も有する。近年カルニチンは、不妊治療、がんや心不全に対する臨床研究にも用いられ、注目されている。カルニチンの寿命延伸効果は容易に想像できるが、哺乳動物でそれを証明した研究は未だにない。またカルニチン合成に関与する遺伝子Tmlheの発現低下はほとんど報告例がなく、カルニチン合成経路の制御系が解明されれば、ヒトの(健康)寿命延伸に貢献できると考えられる。その基礎となる本研究における発見は、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Metallothionein gene knockout (MTKO) mice show shorter lifespans than wild-type (WT) mice. In this study, we aimed to investigate how MT gene deficiency accelerates aging. We performed comparative metabolomic analyses of plasma between MTKO and WT male mice at middle age and advanced age using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF-MS). The concentration of trimethyl-L-lysine (TML), which is a metabolic intermediate in carnitine biosynthesis, was consistently higher in the plasma of MTKO mice compared to that of WT mice at middle and advanced age. Quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis revealed remarkably lower mRNA levels of Tmlhe, which encodes TML dioxygenase, in the liver and kidney of male MTKO mice compared to that of WT mice. L-carnitine is closely related to aging. Our results suggest that reduced carnitine biosynthesis capacity in MTKO mice compared to WT mice led to a shorter lifespans.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：メタロチオネイン メタボローム 老化 カルニチン トリメチルリジン 寿命

## 1. 研究開始当初の背景

メタロチオネイン (metallothionein, 以下 MT) は、亜鉛などの必須微量元素との結合能、カドミウムなどの有害金属毒性軽減作用および抗酸化能を有する多機能な低タンパク質である。

本研究代表者は、MT 遺伝子欠損 (MTKO) マウスの寿命がオス・メスとも野生型と比較して有意に短縮することを明らかにしている (図 1 A)。特筆すべきは、壮齢期までは認められない背骨の湾曲や運動機能の低下など、骨や筋肉などの間葉系組織に高度な老化所見が高齢期の雄性 MTKO マウス (図 1B 右下) にのみ認められた。しかし、その機構については不明である。これらの結果をふまえ、「MT は、どのようなメカニズムで、特にオスの老化に対する防御因子としてはたらくか？」また「MT の抗老化機構は、身体老化の予防・治療に応用は可能であるか？」という問いに至った。

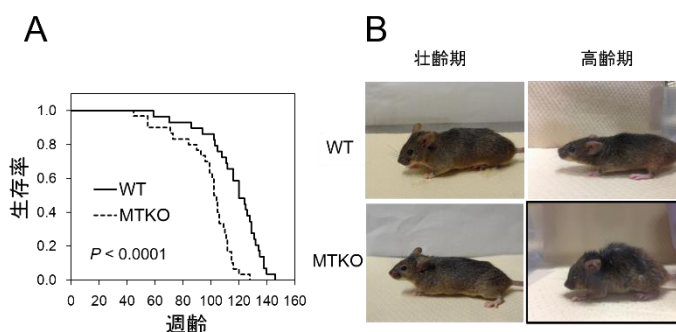


図1 MTKOマウスと野生型 (WT) マウスの生存曲線とオスの外見的特徴  
A) MTKOマウスは、WTマウスと比較して有意に寿命が短縮する。  
B) 高齢のオスのMTKOマウスは、高齢期で高度な老化所見が観察された。

## 2. 研究の目的

本研究では、「MT 遺伝子が欠損することで起こる老化機構の解明」および「MT の老化の予防・治療効果を提案すること」を目的として、ヒトに応用する前段階の基礎研究として MTKO マウスおよび培養細胞を基盤とした生物学的手法を用いて研究を行った。MTKO マウスではオス・メスともに壮齢期 (ここでは 50 週齢とする) 前後から寿命の短縮が認められる。このことから、若齢から発症する稀有な早老症などの研究とは異なり、MT はより生理的な老化の抑制に特化した機能があることが示唆される。また一般にマウスの骨や筋肉などの身体的老化は、雌性においてヒトの閉経にあたる生殖寿命後の女性ホルモンの減少に起因する。しかしながら、MTKO マウスの身体的老化はオス・メス両方で見られる寿命短縮とは異なり、オスにのみ壮齢期からの体重減少に始まり、老齢期 (ここでは 100 週齢とする) を超えて異常な老化所見 (図 1B 右下) が観察される。その後 MTKO マウスと野生型マウスの間に死亡数の顕著な差が認められることから、ヒトで認められる現象では説明できない性差を介した新たな機構が存在する可能性が示唆される。ゆえに「MT の抗老化機能あるいはそれに関連した機構を解明できれば、高齢社会に特化した独自の老化予防および治療戦略を創造することができる」のではないかと考えた。

一般的に生体の代謝能を制御する化合物としてホルモンやビタミンなどが挙げられるが、これらの血中濃度は加齢により変化する。それらの加齢に伴う血中濃度の変化は、生体の恒常性を低下させて老化へと導く。そこで本研究では、MTKO マウスと野生型マウスの老化フェノタイプの差異を明らかにするための一つの手段として、血中の総代謝物 (メタボローム) を LC-MS を基盤に網羅的に解析し、MT 欠損による寿命短縮および主に雄性マウスで認められる老化の要因を明らかにすることを目的とした。具体的には、壮齢期 (50 週齢) および老齢期 (100 週齢) の雄性マウスの血漿中のメタボロームを比較し、得られた結果から MT の遺伝子欠損がどのようにメタボロームを変化させ、あるいは身体的老化に影響を与えるのかについて考察することとした。また、老齢の雄性 MTKO マウスが筋肉を含む異常な老化所見 (図 1B 右下) を示すことから、筋肉老化と MT 遺伝子との関連を調査するため、骨格筋細胞分化モデルであるマウス筋芽細胞株 C2C12 について CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術によって MT 遺伝子を欠損させた MTKO 細胞を樹立し、MT 遺伝子欠損が筋分化や筋形成および細胞老化に与える影響について解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 雄性の野生型 (WT) および MTKO マウス (129/Sv 系) を使用した。恒温 (22° C) 恒湿 (55 ± 5%) 下、明暗周期 12 : 12 時間の SPF 動物舎内で一般飼料を自由摂食・飲水条件下で生後 50 週および 100 週まで飼育した。麻酔下で血液および臓器を採取し、調製した血漿中の代謝物について LC-ESI-TOF-MS で解析した。各種代謝物のピーク強度から得られたデータについて多変量解析を行い、主成分分析および階層的クラスタ分析を実施した。各種遺伝子の発現量は、臓器から抽出した mRNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型とし、特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により算出した。

(2) マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に対して MT 遺伝子に対するガイド RNA と Cas9 ヌクレアーゼを同時発現するプラスミドベクターあるいはガイド RNA を含まないコントロール (mock) ベクターを導入し、MTKO 細胞及び mock 細胞を樹立した。サンガー法を基盤とした解析の結果、MT 遺

伝子は85%以上がゲノム編集されていることを確認した。各種筋芽細胞株は、分化誘導培地(2%ウマ血清を含むDMEM培地)を2日毎に培地交換しながら培養し、5日目の細胞を筋管細胞とした。筋管の染色はメイグリユンワルドギムザ染色により行った。筋融合指数は、全核数に対する筋管(2つ以上の核を有する筋細胞)中の核数の割合で表した。各種遺伝子の発現量は、cDNAを鋳型として特異的プライマーを用いた定量的PCR法により算出した。各種タンパク質の発現は、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。遅筋繊維の形成は、抗遅筋繊維型ミオシン重鎖抗体を用いた関節蛍光抗体により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 壮齢期(50週齢)および老齢期(100週齢)の雄性MTKOマウスのメタボローム解析

50週齢においてWTマウスと比較してMTKOマウスの血漿中で有意に濃度が高かった代謝物が19種、低かった物質が27種類であった。一方、100週齢では、MTKOマウス血漿中で濃度が高かった物質が42種類、低かった物質が40種類であった。その内、50と100週齢に共通してMTKOマウスの血漿中で高かった物質は、L-フェニルアラニン、トリメチルリジン(TML)、DL-2-アミノオクタン酸、低かった物質はタウリンのみであった(図2)。興味深いことに100週齢のMTKOマウスの血漿中で、L-カルニチンとアシルカルニチン類、カルニチン生合成の中間体γ-ブチロベタインが有意に低かった(図3)。また100週齢マウスにおいて、脂肪酸代謝物である脂肪酸ジカルボン酸(セバシン酸、ドデカン二酸、テトラドデカン二酸および3-ヒドロキシテトラドデカン二酸)、さらに3-ヒドロキシオキソドデカン酸と2-ヒドロキシミリスチン酸の血漿中濃度が野生型マウスと比較してMTKOマウスで高かった。これらの脂肪酸代謝物の多くは、脂肪酸代謝異常を示すカルニチン回路異常症患者の血中で高値を示す物質であった。そこで、カルニチンの生合成に着目し、合成が盛んな腎臓と肝臓におけるカルニチン生合成経路の遺伝子発現量を解析した。その結果、50

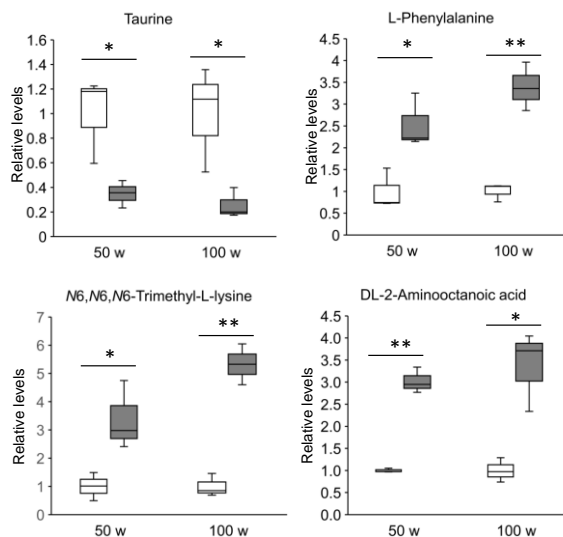


図2 50週齢と100週齢マウスで共通の傾向を示した血漿中代謝物  
□ 野生型マウス； ■ MTKOマウス  
\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to WT mice.

週齢、100週齢ともにMTKOマウスは、野生型マウスと比較してTMLの水酸化を触媒するトリメチルリジンヒドロキシラーゼイプシロン(Tmlhe) mRNAの発現が顕著に低いことを見出した(図4)。以上の結果から、カルニチン合成に係わる代謝酵素の発現低下によるL-カルニチン生合成異常が、MTKOマウスの寿命短縮の一要因であるかもしれない。L-カルニチンは、ミトコンドリア障害を抑制することで心血管疾患、がんや2型糖尿病、さらに老化に対する予防効果が期待されている。亜鉛などの金属元素は、MTの誘導因子として知られているが、カルニチン類の摂取だけでなく、亜鉛などの投与を介したMTの誘導がL-カルニチン合成を促し、これら疾患に予防効果を示すかもしれない。

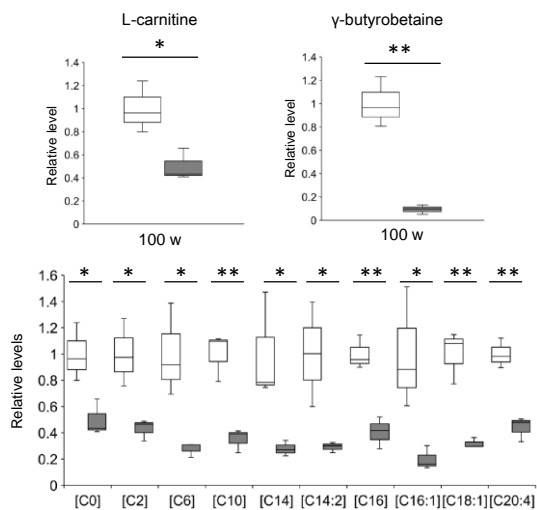


図3 カルニチン、γ-ブチロベタインおよびアシルカルニチン類の血漿中濃度  
□ 野生型マウス； ■ MTKOマウス  
\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to WT mice.  
[C2] L-Acetylcarnitine; [C6] Hexanoylcarnitine; [C10] Decanoylcarnitine  
[C14] 3,5-Tetradecadienylcarnitine; [C14:2] Tetradecanoylcarnitine  
[C16] 9-Hexadecenylcarnitine; [C16:2] L-Palmitoylcarnitine  
[C18:1] Oleoylcarnitine; [C20:4] Arachidonoylcarnitine

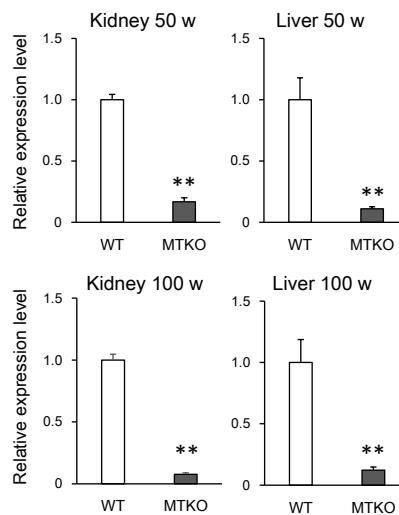


図4 50週齢と100週齢マウスの腎臓および肝臓中のTmlhe発現  
\*\* $P < 0.01$  compared to WT mice.

週齢、100週齢ともにMTKOマウスは、野生型マウスと比較してTMLの水酸化を触媒するトリメチルリジンヒドロキシラーゼイプシロン(Tmlhe) mRNAの発現が顕著に低いことを見出した(図4)。以上の結果から、カルニチン合成に係わる代謝酵素の発現低下によるL-カルニチン生合成異常が、MTKOマウスの寿命短縮の一要因であるかもしれない。L-カルニチンは、ミトコンドリア障害を抑制することで心血管疾患、がんや2型糖尿病、さらに老化に対する予防効果が期待されている。亜鉛などの金属元素は、MTの誘導因子として知られているが、カルニチン類の摂取だけでなく、亜鉛などの投与を介したMTの誘導がL-カルニチン合成を促し、これら疾患に予防効果を示すかもしれない。

(2) MT 遺伝子欠損がマウス筋芽細胞株 C2C12 の筋分化、筋形成、筋繊維タイプに与える影響

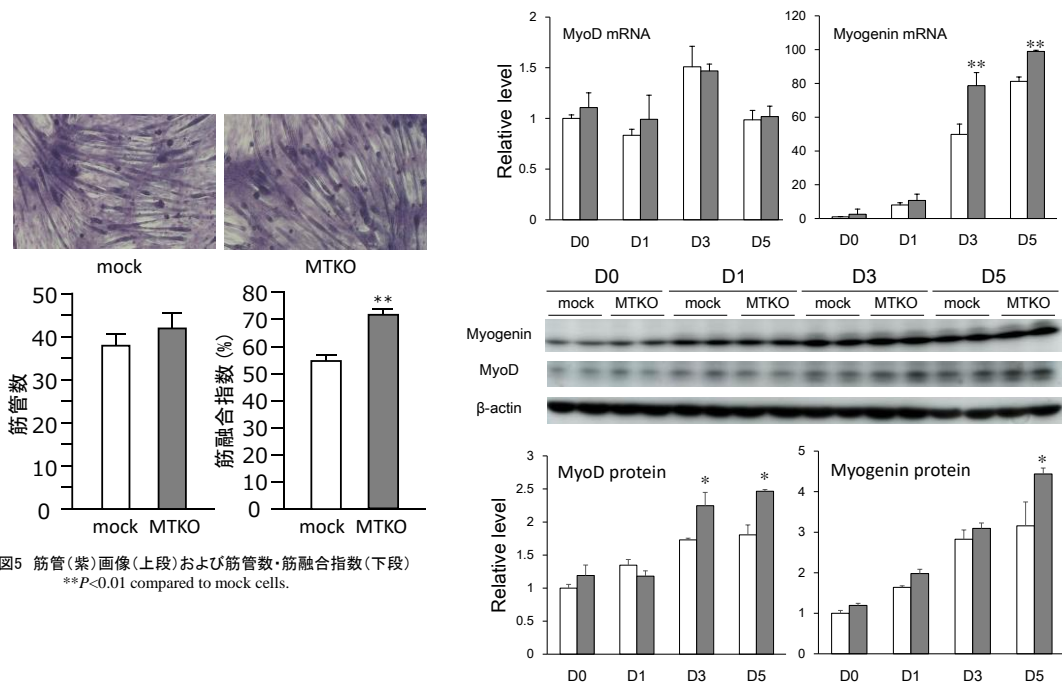


図5 筋管(紫)画像(上段)および筋管数・筋融合指数(下段)  
\*\* $P < 0.01$  compared to mock cells.

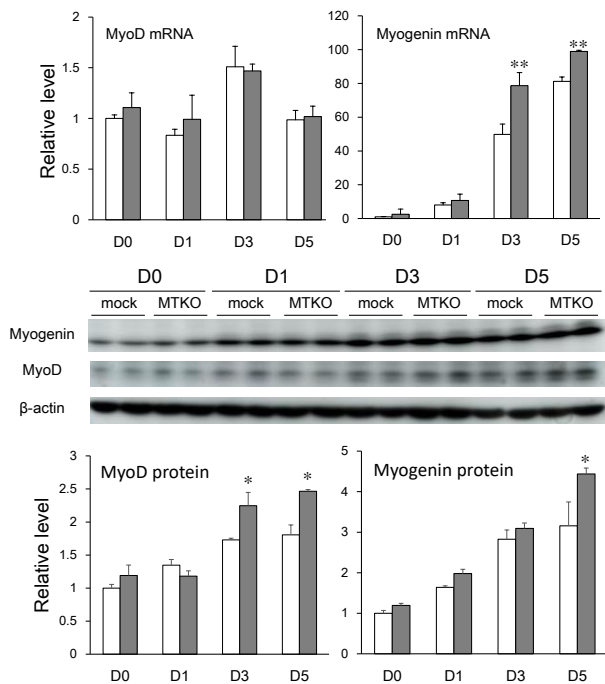


図6 C2C12 MTKO細胞における筋分化マーカー(MyoDとmyogenin)mRNAおよびタンパク質発現  
□ mock細胞: ■ MTKO細胞  
\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to mock cells.

MT の遺伝子欠損と筋老化の関連を調査する目的で、ゲノム編集によって MT 遺伝子を欠損させた C2C12 筋芽細胞株 (MTKO 細胞) および空ベクターを導入した細胞 (mock 細胞) を筋分化誘導処理し、処理後 5 日目の筋管を染色した (図 5 上段)。その結果、筋管数は、両細胞ともに同程度であったが、筋融合指数は MTKO 細胞で有意に高く (図 5 下段)、通常よりも筋細胞同士の融合が多くなることで筋管が太くなることがわかった。MT 遺伝子欠損は予想に反して C2C12 細胞の筋形成を促進したから、その要因を探るため、筋分化を制御する転写調節因子 MyoD と myogenin を分化マーカーとしてその発現量を解析した。筋分化の前期の調節因子として知られる MyoD の mRNA 発現量は、MTKO 細胞と mock 細胞間で有意な差は認められなかった (図 6 上段)。しかし、MyoD のタンパク質発現量は、分化誘導開始後 3 日目 (D3) および 5 日目 (D5) に mock 細胞と比較して MTKO 細胞で有意に高かった (図 6 中下段)。MyoD は mRNA 量とタンパク質量が相関しなかったため、MyoD の翻訳後修飾に MT 遺伝子欠損が関与する可能性が考えられた。また筋分化の後期、特に筋融合に係わる調節因子である myogenin の発現量は、mRNA については D3 および D5 (図 6 上段) で、タンパク質については D5 で mock 細胞と比較して MTKO 細胞で有意に高かった (図 6 中下段)。Myogenin の発現は、MyoD によって調節されるといわれており、MT 遺伝子欠損による筋形成および筋融合の促進には、分化後期における MyoD および myogenin という筋分化調節因子の発現増大が関与すると考えられる。

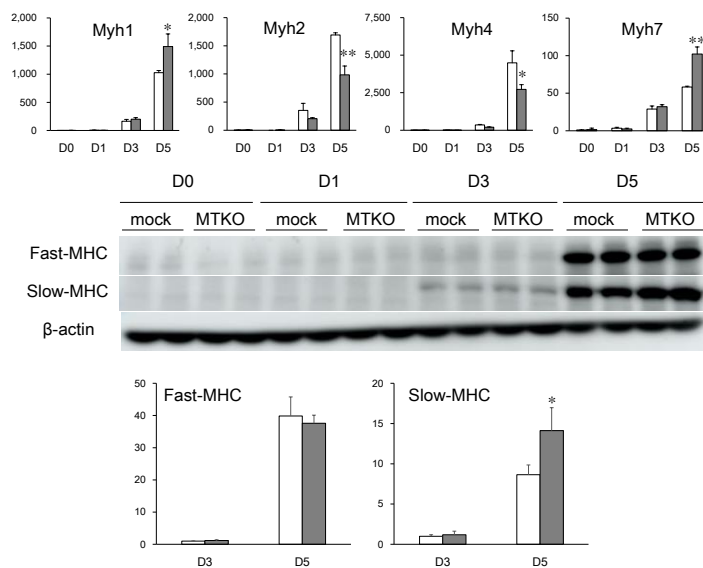


図7 C2C12 MTKO細胞におけるミオシン重鎖mRNAおよびタンパク質発現  
□ mock細胞: ■ MTKO細胞  
\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to mock cells.

骨格筋は、姿勢維持や持続的な運動に関わり酸化系酵素活性が高い遅筋と、瞬発力や大きな力を発揮する解糖系酵素活性が高い速筋に大きく分類される。MT 遺伝子欠損が筋繊維の形成に与える影響を解析するために、骨格筋の筋繊維タンパク質の 1 つであるミオシン重鎖 (Myosin heavy chain, MHC) について検討した。遅筋には MHC I が、速筋には MHC IIa, IIId/x および IIb がそれぞれ発現している。まず MTKO 細胞および mock 細胞の分化過程における MHC mRNA の発現量を解析した。MHC アイソフォーム遺伝子の発現は、いずれも分化過程で発現増大したが、速筋型 MHC IIId/x をコードする Myh1 mRNA の発現量は、D5 において mock 細胞と比較して MTKO 細胞で有意に高かった (図 7 上段)。一方、MHC IIb をコードする Myh2 および MHC IIa をコードする Myh4 の mRNA 発現量は、MTKO 細胞で有意に低かった (図 7 上段)。遅筋型 MHC I をコードする Myh7 mRNA の発現量は、mock 細胞と比較して MTKO 細胞で有意に高かった (図 7 上段)。速筋型の総 MHC (Fast-MHC) に対する抗体および抗遅筋型 MHC (Fast-MHC) 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析では、速筋型 MHC の発現量は MTKO 細胞と mock 細胞で同程度であったが、遅筋型 MHC の発現量は、mRNA の結果と同様に mock 細胞と比較して MTKO 細胞が高かった (図 7 中下段)。したがって、MT 遺伝子欠損による筋形成時には、速筋よりも遅筋型繊維が優位になると考えられる。老化時の筋繊維では、遅筋よりも速筋の方が減少しやすく、減少した筋繊維を補う筋再生も速筋繊維は起こりにくいといわれている。このことを踏まえて本研究の結果を考察すると、老齢 MTKO マウスの筋肉は遅筋に比べて収縮速度の速い速筋繊維が再生しづらい状態と考えられ、それが老化による運動機能の低下を引き起こすのかもしれない。

### (3) MT 遺伝子欠損がマウス筋芽細胞株 C2C12 のエトポシド誘発性筋老化に与える影響

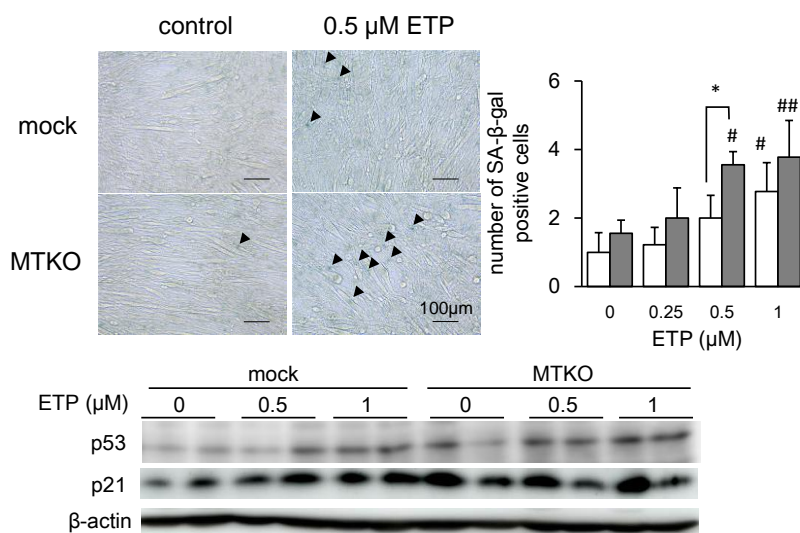


図8 C2C12 MTKO細胞におけるエトポシド誘発性細胞老化の促進

□ mock細胞 : ■ MTKO細胞

矢頭の緑色染色は、SA-β-Gal活性が亢進した老化細胞。

$P^* < 0.05$  vs the corresponding mock cells.  $P^# < 0.05$ ,  $P^{##} < 0.01$  vs the corresponding control treated cells.

抗がん剤であるエトポシド (ETP) は、がん細胞に対してアポトーシス性細胞死を引き起こすが、低用量処理では細胞老化を引き起こすことが知られている。そこで、筋細胞老化と MT 遺伝子欠損の関連性を検討するため、C2C12 MTKO 細胞と mock 細胞を分化誘導前にアポトーシスを引き起こさない程度の低濃度 ETP (0.25, 0.5, 1 μM) で 1 時間処理し、分化誘導処理 5 日後の細胞について、細胞老化および細胞老化マーカータンパク質の発現を解析した。細胞老化の指標の一つとして、老化関連 β-ガラクトシダーゼ (SA-β-Gal) 活性の上昇が挙げられる。0.5 および 1 μM ETP 処理により SA-β-Gal 活性陽性細胞が増加し、さらに MT 遺伝子欠損によりその数は増大した (図 8 上段)。また、細胞老化促進作用を有する老化マーカータンパク質として p53 および p21 の発現をウェスタンブロット法で解析した結果、MTKO 細胞は ETP 未処理時においても mock 細胞と比較しても p53 および p21 の発現量が高かった (図 8 下段)。SA-β-Gal 活性の結果より、MTKO 細胞は mock 細胞と比較して ETP に高感受性であったが、これは MT 遺伝子欠損による p53 および p21 の高発現が ETP 処理前から認められることと関係しているのかもしれない。ETP 未処理時では MTKO 細胞は老化を認めないため、p53 および p21 の高発現だけでは老化は成立しないが、MTKO 細胞の潜在的な筋細胞の易老化性を決定し、ETP 処理のような老化刺激に対して p53-p21 経路が活性化し、老化シグナルを強く伝達するのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kadota Yoshito, Yano Asuka, Kawakami Takashige, Sato Masao, Suzuki Shinya	4. 巻 13
2. 論文標題 Metabolomic profiling of plasma from middle-aged and advanced-age male mice reveals the metabolic abnormalities of carnitine biosynthesis in metallothionein gene knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 24963 ~ 24988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203731	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門田 佳人, 矢野 あすか, 川上 隆茂, 佐藤 政男, 鈴木 真也
2. 発表標題 老齡メタロチオネインノックアウトマウスの血漿メタボローム解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野 あすか, 門田 佳人, 川上 隆茂, 鈴木 真也
2. 発表標題 メタボロミクスから判明したメタロチオネイン遺伝子欠損マウスのカルニチン代謝能異常
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門田 佳人, 川上 隆茂, 鈴木 真也
2. 発表標題 メタロチオネイン遺伝子欠損がマウス筋芽細胞株C2C12 の筋分化・形成能に与える影響の解析
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 佳菜子、門田 佳人、川上 隆茂、鈴木 真也
2. 発表標題 メタロチオネイン遺伝子欠損によるマウス肝細胞株AML12の脂肪蓄積能亢進機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 真未、門田 佳人、川上 隆茂、鈴木 真也
2. 発表標題 メタロチオネイン遺伝子欠損がマウス筋芽細胞株C2C12の筋分化・形成能に与える影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門田 佳人、友竹 将貴、川上 隆茂、鈴木 真也
2. 発表標題 メタロチオネイン遺伝子欠損がマウス肝細胞株AML12の脂肪蓄積能に与える影響
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019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
---------	---------