

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18081

研究課題名（和文）骨細胞のミトコンドリア機能不全による核膜構造異常の分子機構解明

研究課題名（英文）Analyze of nuclear deformation caused by mitochondria dysfunction in osteocytes

研究代表者

渡辺 憲史（Watanabe, Kenji）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 老化ストレス応答研究プロジェクトチーム・研究員

研究者番号：90866766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢依存的な骨量減少発症分子機構を核膜構造に注目して解析を行った。ミトコンドリア機能不全となった骨細胞は核膜構造異常と骨形成抑制因子SOSTの発現亢進を示すが、この骨代謝制御不全と核膜構造タンパク質Lamin A/CとLamin Bの発現レベルに関連性があることを明らかとした。また、この分子機構で統合的ストレス応答の中心的な転写因子ATF4が関与していることも明らかとした。この研究によって加齢依存的な骨量減少の分子機構の一部を解明できたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってミトコンドリア機能不全を起因とした核膜構造異常と骨代謝制御不全の関連性が確認できたことから、加齢依存的に骨量減少が起こる分子機構の一端を明らかにしたと言える。これまで骨細胞が骨代謝機能不全に陥る原因が分かっていなかったが、本研究によってミトコンドリア機能不全を起因とした核膜構造不全によって骨代謝制御異常が起こることが明らかになったことから学術的意義が高い研究であると言える。さらにこの研究成果は骨量減少の予防や治療戦略を立てる為に重要であり、ロコモティブシンドローム発症予防に貢献できることが期待されることから社会的意義の大きな研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria dysfunction in osteocytes induced lamin A/C and lamin B expression decline accompanied with nuclear deformation as well as Sost upregulation resulted in bone-loss.

We clarified the lamin A/C and/or lamin C supplementation effectively suppressed nuclear deformation and Sost upregulation in osteocytes. In addition, lamin A/C and/or lamin C knockdown induced nuclear deformation and SOST upregulation. These data indicated that nuclear envelope protein lamin A/C and lamin B expression levels are closely associated with nuclear morphology and bone homeostasis.

Furthermore, we also revealed the ATF4 is a major transcriptional factor for age-related bone loss caused by mitochondrial dysfunction.

研究分野：老年医学

キーワード：加齢性組織変化 骨粗鬆症 ミトコンドリア 骨代謝制御 核膜構造

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では急速な高齢化が進行して社会保障制度と財政の持続可能性が問題視されている。高齢化が進行する理由の一因として医療技術の進歩による平均寿命の延長があると考えられ、平均寿命と健康寿命の乖離が進むことで医療費や介護費の増加による家計への影響や支援・介護者の負担増大などが大きな問題となっている(厚生労働省「第11回健康日本21(第二次)推進専門委員会資料より)。健康寿命を損なう要因として骨や筋肉、関節が衰え、運動器に障害がでることで Activities of Daily Living (ADL)が低下し、要介護になるリスクが高くなる運動器症候群(ロコモティブシンドローム)の発症が挙げられる。その症状の1つに骨粗鬆症が挙げられ、平成28年度厚生省国民生活基礎調査では骨折・転倒などの運動器障害が原因となって要支援者となる割合が第1位に挙げられ、要介護者になる原因では第3位に挙げられている。これらの背景から、骨粗鬆症に注目して加齢による組織障害の分子機構を解明し、その予防や治療法の開発による健康寿命の延伸が社会的にも求められており、基礎老化研究が果たす役割は非常に大きいと思われる。

骨粗鬆症の原因となる骨量減少は骨代謝制御を行う骨細胞が加齢による機能低下状態となり、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランス破綻が引き起こすと考えられるが、その詳細な分子機構は明らかになっていない(Bonewald LF et al. J Bone Miner Res. 2011)。加齢した骨組織中の骨細胞は活性酸素種の増加(Kobayashi et al. Sci Rep. 2015)、ミトコンドリア肥大(Shum LC et al. PLoS One. 2016)、骨細管ネットワークの減少(Milovanovic P. et al. ACS Nano. 2013)を示すことが報告されているが、骨細胞の加齢変化と骨代謝制御不全の関連性はよく分かっていない。老化によってミトコンドリア機能不全が起こることは良く知られているが(López-Otín C et al. Cell. 2013)、骨細胞の加齢変化とミトコンドリア機能不全に関する分子機構は不明な点が多く残る。

2. 研究の目的

これまでにミトコンドリアに局在して生体内の主要な抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD2)を骨細胞特異的に欠損させたマウスが加齢依存的な骨量減少モデルマウスとして非常に有用であることを報告した。また、この SOD2 欠損マウスの骨細胞は核膜構造タンパク質の lamin A/C と lamin B の発現低下を伴う核肥大を示すことが明らかとした。興味深いことに2年齢の老齢マウスの骨細胞でも同様の核構造異常が起こり、さらには培養骨細胞でも酸化剤(PQ)やミトコンドリア脱共益剤(CCCP)処理によってミトコンドリア機能不全を誘導すると核肥大が誘導された。これらの結果からミトコンドリア機能不全による核構造異常が骨代謝制御不全を引き起こし、骨量減少が起こることが示唆された。これまでにミトコンドリア機能不全と核膜構造異常の関連性は報告されていない。本研究ではミトコンドリア機能不全を起因とした lamin A/C と lamin B の発現低下分子機構を調べ、核膜構造不全と骨代謝制御不全の関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) lamin A/C と lamin B の発現低下と核膜構造異常の関連性を明らかにする

培養骨細胞に siRNA による *Lmna* や *Lmnb* のノックダウンを行い、lamin A/C と lamin B の発現低下を誘導することでミトコンドリア機能不全非依存的な核膜構造異常が誘導されるか調べる。また、ミトコンドリア機能不全による lamin A/C と lamin B 発現低下を示した骨細胞に対して lamin A/C と lamin B の発現ベクターを遺伝子導入して発現低下を補充することで核膜構造異常や骨代謝制御不全を抑制することが出来るかどうか評価する。

(2) lamin A/C および lamin B 発現低下を引き起こす原因因子を特定する

CCCp や PQ 処理によってミトコンドリア機能不全を誘導した骨細胞、骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスの骨組織を用いて RNA-seq を行い、ミトコンドリア機能不全によって活性化する転写因子を特定し、解析する。RNA-seq によって得られた候補遺伝子のノックダウンを行い、ミトコンドリア機能不全による核膜構造異常や骨代謝制御不全が抑制出来るかどうか調べる。

(3) lamin A/C と lamin B の発現低下分子機構を明らかにする

これまでに lamin A/C と lamin B の発現制御分子機構がいくつか報告されている。しかし、その分子機構が骨細胞でも起こるのか、ミトコンドリア機能不全によって誘導されるのかどうかは分かっていない。そこで、ミトコンドリア機能不全を誘導した骨細胞でこれらの分子機構が誘導されているか確認する。また、これらの分子機構の阻害によって核膜構造異常や骨代謝制御不全が抑制出来るかどうか評価する。

4. 研究成果

(1) lamin A/C と lamin B の発現低下と核膜構造異常の関連性を明らかにする

培養骨細胞に siRNA を遺伝子導入し、lamin A/C と lamin B の発現低下を誘導するとミトコンドリア機能不全を誘導した時と同様の核肥大が起こった(図 1)。興味深いことに lamin A/C と lamin B を両方ノックダウンした時だけでなくどちらか片方をノックダウンした時でも核肥大は起こり、両方ノックダウンした時と同程度の核肥大であった。さらに lamin A/C と lamin B を発現低下させると骨形成抑制因子 SOST の発現亢進が起こることも明らかとなった(図 1)。

Lamin A/C もしくは lamin B を過剰発現させた細胞は CCCP 処理によってミトコンドリア機能不全を誘導しても核肥大は起こらなかった。過剰発現による核肥大抑制でも lamin A/C もしくは lamin B のどちらかを補充するだけで核肥大抑制効果が認められた(図 2)。さらに RT-qPCR で Lamin A/C もしくは lamin B を過剰発現するとミトコンドリア機能不全を起因とする Sost 遺伝子発現亢進を抑制することが出来ることが明らかとなった。これらの結果から Lamin A/C と lamin B 発現レベルが核構造を規定し、骨細胞で核膜構造異常が起こると骨代謝制御不全が誘導されて骨量減少の原因となることが示唆された。

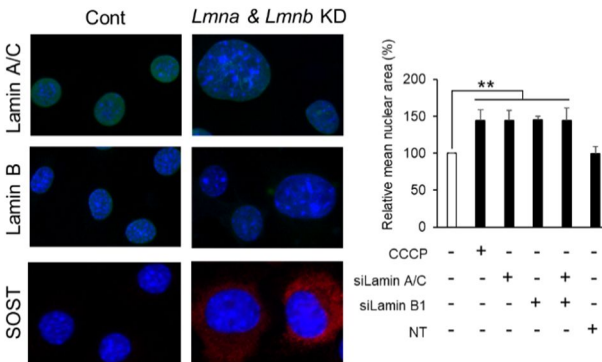


図 1. Lamin A/C と lamin B の発現低下は核肥大と SOST 発現亢進を引き起こす。

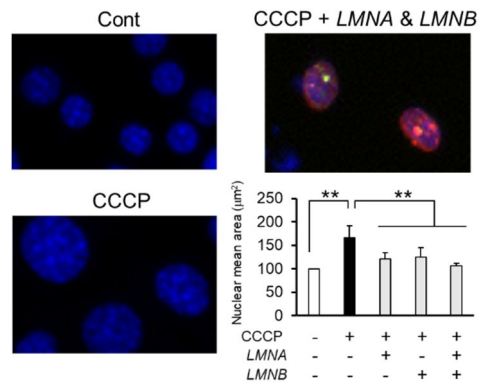


図 2. Lamin A/C と lamin B 過剰発現は核構造異常を抑制する。

(2) lamin A/C および lamin B 発現低下を引き起こす原因因子を特定する

骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスの大腿骨、脛骨から抽出した RNA を用いて RNA-seq を行った。SOD2 欠損マウスの骨細胞において SOST の発現亢進と転写因子 ATF4 の発現増加が確認された(図 3)。ATF4 はミトコンドリアストレス応答で中心的な役割を担っていることが報告されていることから(Quirós PM et al. J Cell Biol. 2017)、ミトコンドリア機能不全を起因とした lamin A/C および lamin B 発現低下と SOST 発現亢進において ATF4 の関与が示唆された。そこで siRNA によるノックダウンや統合的ストレス応答阻害剤 ISRIB 処理によって ATF4 の活性化を阻害することで核構造異常と骨代謝制御不全が抑制出来るかどうか調べた。ノックダウンや阻害剤による ATF4 活性化阻害はミトコンドリア機能不全とした lamin A/C と lamin B 発現低下を伴う核肥大と SOST 発現亢進を抑制した(図 4)。小胞体ストレス応答で活性化する ATF6 をノックダウンしても核肥大と SOST 発現亢進は抑制出来なかった。これらの結果は転写因子 ATF4 がミトコンドリア機能不全を起因とした骨量減少における原因因子であることが強く示唆された。

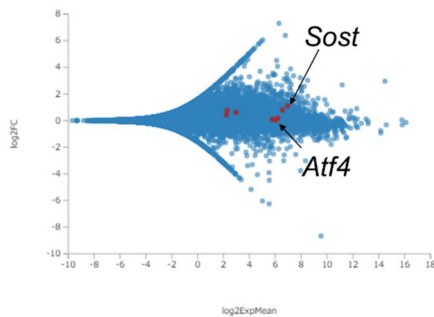


図 3. マウス骨組織サンプルで測定した RNA-seq データの MA plot。

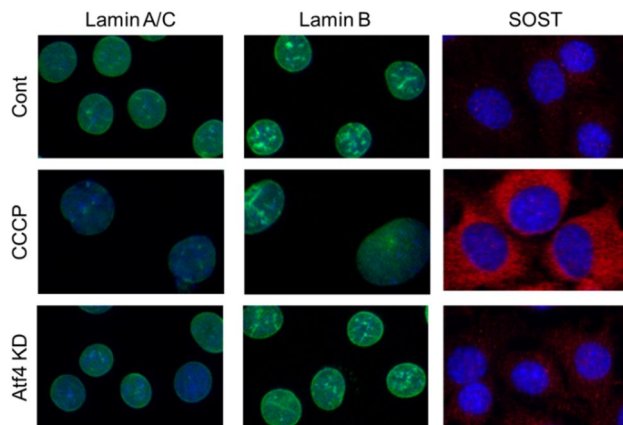


図 4. ATF4 活性化阻害は lamin A/C と lamin B 発現低下を伴う核肥大と SOST 発現亢進を抑制する。

(3) lamin A/C と lamin B の発現低下分子機構を明らかにする

Caspase-6 や LC3 による分解、microRNA による発現抑制などこれまでに報告されている lamin A/C の発現低下分子機構が骨細胞でもミトコンドリア機能不全によって誘導されているかどうか調べたが骨細胞ではこれらの分子機構は動いていなかった。ATF4 が lamin A/C と lamin B の発現低下や SOST の発現亢進に関与していると考えられるが、これらの遺伝子のプロモーター領域には ATF4 結合配列が無いことから直接的な制御ではなく、別の転写因子を介した間接制御によるものだと示唆された。しかし、本研究期間中ではその分子機構を明らかにすることは出来なかった。ATF4 による発現制御分子機構を解明することが今後の研究の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenji WATANABE, Shuichi SHIBUYA, Keiji KOBAYASHI, Hidetoshi NOJIRI, Takahiko SHIMIZU
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction in osteocytes caused age-related bone loss due to the nuclear lamina abnormalities
3. 学会等名 第45回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺憲史、澁谷修一、清水孝彦
2. 発表標題 ミトコンドリア機能不全を起因とする核ラミナ構造破綻が骨量減少の原因となる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------