

【奨励賞受賞者研究トピックス】

骨格筋特異的 SOD2 欠損はミトコンドリア機能不全に伴う運動不耐を引き起こす

澁谷 修一¹、渡辺 憲史¹、坂本 一晃²、野尻 英俊²、清水 孝彦¹

¹ 国立研究開発法人長寿医療研究センター ジェロサイエンス研究センター
老化ストレス応答研究プロジェクトチーム

² 順天堂大学医学部 整形外科学

キーワード：skeletal muscle, reactive oxygen species(ROS), superoxide dismutase(SOD), mitochondria

1. はじめに

強い運動は骨格筋の筋力と張力の低下により筋疲労を引き起こし、運動パフォーマンスを低下させる^[1]。活性酸素種 (ROS) は筋疲労の原因ともなることが報告されている^[2]。ROS は生体を構成するタンパク質、脂質、核酸を酸化することにより、組織の機能不全を引き起こす。カルボニル化タンパク質、過酸化脂質、酸化核酸などの酸化的損傷マーカーは老化やさまざまな疾患に関連しており、骨格筋を含む組織の病理と ROS が強い相関関係にあることを示唆している。実際、老化したラットの骨格筋は酸化損傷マーカーが蓄積する^[3]。高齢者骨格筋由来ミトコンドリアもミトコンドリア DNA の減少を伴う呼吸機能障害や酸化型核酸マーカー 8-OHdG の増加が見られる^[4]。また骨格筋における ROS の蓄積が進行性の骨格筋の減少と変性を引き起こす筋ジストロフィーの病因にも関与すると報告されている^[5]。これらの報告は、ROS の増加によって引き起こされるレドックスの不均衡が筋肉の機能低下を誘発することを示している。

我々生物は ROS から組織および細胞を保護するために様々な抗酸化システムを有する。SOD はスーパーオキシドを過酸化水素に変換する抗酸化酵素であり、過酸化水素はさらにカタラーゼ酵素および GPx 酵素により水と O₂ に変換され無毒化される。SOD ファミリーはそれぞれ局在が異なり、細胞質局在型 SOD1、ミトコンドリア局在型 SOD2、細胞外局在型 SOD3 の 3 種類が存在する。SOD2 はミトコンドリアを酸化障害から保護することによりミトコンドリア機能維持に寄与する。SOD1 欠損マウス^[6]、SOD3 欠損マウス^[7] はいずれも重篤な表現型を示さない。対照的に SOD2 欠損マウスは拡張型心筋症、神経変性、および脂肪肝を伴う新生児致死となり^[8]、抗酸化酵素の中でも重要な機能が想定される。成

体組織で詳細な解析を行うために、Cre-loxp システムによる組織特異的欠損マウスを作成した。その結果、心臓特異的 SOD2 欠損マウスは致死性の拡張型心筋症を発症し、SOD2 の心臓保護作用を明らかにした^[9]。本稿では、骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスの骨格筋病態解析から得られた骨格筋機能における ROS の関連についての新たな知見を紹介する。

2. 骨格筋恒常性維持における SOD2 の寄与

骨格筋機能における酸化ストレスの関連を明らかにするために骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスを作成し、骨格筋病態を解析した。欠損マウスは正常に生まれ、見た目の異常もなく発育した。骨格筋重量も正常マウスと差は認められなかった^[10]。しかし摘出した骨格筋組織を詳細に解析すると、筋再生マーカーである中心核が増加し (図 1 A)、血中 CPK (creatine phosphokinase) の有意な増加も示した。また骨格筋由来ミトコンドリア内の ROS 量を調べたところ、正常マウスは電子伝達系の基質であるコハク酸存在下でも ROS 量は増加せず、ミトコンドリア内の酸化還元バランスの維持が示された (図 1 B)。対照的に、欠損マウスは正常マウスと比較して通常状態でもミトコンドリア ROS が増加傾向を示し、コハク酸存在下では有意にミトコンドリア ROS が増加した (図 1 B)。これらの結果は、SOD2 欠損はエネルギー産生時のミトコンドリア酸化還元バランス破綻をもたらすことを示す。

さらに欠損マウスは骨格筋組織において酸化ダメージマーカー 8-OHdG 量も増加し (図 1 C)、酸化ストレスに起因する筋障害を呈していた。骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスの運動機能を調べるために、トレッドミルによる強制走行時間を測定した。興味深いことに欠損マウスは走行時間が著しく低下し、顕著な運動不耐を示した (図 1 D)。さらに骨格筋中 ATP 量も顕著に低下していた (図 1 E)。これらの結果から、SOD2 欠損は骨格筋組織の酸化障害を引き起こしエネルギー産生不足による運動不耐を引き起こすことが明らかとなった。

連絡先：澁谷 修一

〒 474-8511 愛知県大府市森岡町 7-430

TEL : 0562-44-5651 ext. 6101

E-mail : s-shibuya@ncgg.go.jp

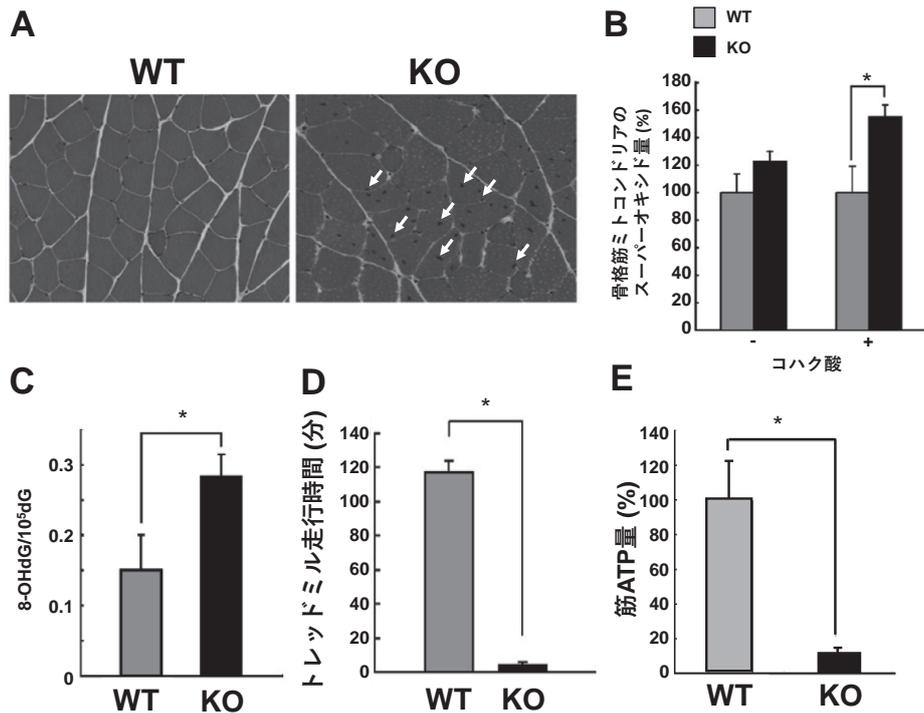


図1 骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスは骨格筋酸化ダメージ蓄積と筋 ATP 枯渇に伴う運動不耐を示す。(A) 骨格筋特異的 SOD2 欠損マウス骨格筋組織で再生マーカーである中心核 (矢印) が散見された。(B) 欠損マウス骨格筋由来ミトコンドリアは電子伝達系の基質であるコハク酸存在下でスーパーオキシド産生量が増加し、エネルギー産生時のミトコンドリア酸化還元バランス破綻を示した。(C) 欠損マウス骨格筋組織では酸化ダメージマーカー 8-OHdG 量が増加していた。欠損マウスは強制走行時間 (D) と筋 ATP 量 (E) の顕著な低下を示した。Error Bars: 平均値±標準誤差。* $P < 0.05$ (t -test)。

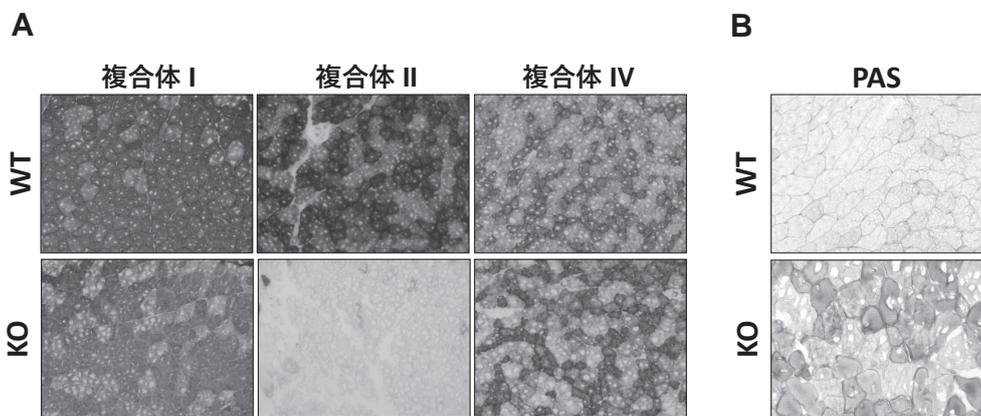


図2 骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスはミトコンドリア呼吸酵素活性低下を示す。(A) ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性染色像。ミトコンドリア呼吸活性は、欠損マウス骨格筋で呼吸鎖複合体 I (NADH 酸化還元酵素) と II (SDH) の染色性が低下し、顕著な活性低下を示した。一方、欠損マウス骨格筋の呼吸鎖複合体 IV の活性は正常に保たれていた。(B) PAS 染色により、欠損マウスは骨格筋中のグリコーゲン蓄積が増加していた。

3. SOD2 欠損により誘導される骨格筋ミトコンドリア機能不全

骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスは顕著な ATP 量低下を示したため、SOD2 欠損によるミトコンドリア機能への影響を評価した。SOD2 欠損骨格筋のミトコンドリア呼吸活性を活性染色法により調べた結果、ミトコンドリア

呼吸鎖複合体 IV の活性は正常に維持されていたが、呼吸鎖複合体 I (NADH 酸化還元酵素) と呼吸鎖複合体 II (SDH) は染色性が低下し顕著な活性低下を示した (図 2 A)。この結果は、心臓および脳組織で SOD2 を欠損させた場合と共通の変化であった^[11, 12]。この結果から、SOD2 欠損骨格筋は酸化障害により誘導されるミトコン

ドリア機能低下を起因として運動不耐を引き起こすことが示された。また、SOD2欠損は骨格筋ATP量の劇的な減少を引き起こしたため付加的要因の関与が示唆される。グリコーゲンおよびグルコースを利用する解糖系も骨格筋における主要なATP産生経路である。実際に、欠損マウス骨格筋ではグリコーゲンが顕著に蓄積し、グリコーゲン代謝異常が示唆される(図2B)。骨格筋におけるSOD2欠損はミトコンドリア機能低下に加えて、グリコーゲンを起点とした解糖系異常も引き起こし、相加的作用でATP産生能が低下し顕著な運動不耐をもたらす可能性が予想される。

4. 運動不耐モデルマウスとしての応用

著しく強制走行能が低下する骨格筋特異的SOD2欠損マウスは運動不耐モデルマウスとして骨格筋機能に対する抗酸化剤などの機能性素材の作用評価が可能である。SOD/カタラーゼ模倣剤であるEUK-8を欠損マウスに単回投与すると、骨格筋ATP量増加を伴う有意な強制走行時間の延長を示した^[10]。その他、複数のポリフェノール類にも同様の作用を認めている。本欠損マウスは骨格筋酸化ストレスやミトコンドリアを標的とした機能性素材のスクリーニング試験に有用なモデルであり、ロコモティブシンドロームやフレイル治療に寄与する素材開発への貢献が期待される。

5. おわりに

超高齢社会を迎えた我が国では健康長寿の実現が喫緊の課題となっている。加齢に伴う骨格筋の衰えは転倒、身体機能障害、要介護状態、フレイルのリスクになり、介護予防の観点からも重要視されている。本モデルマウスは加齢や疾患により引き起こされる骨格筋病態の分子機序の解明に大きく貢献し、社会的還元性が大きく期待できる。

引用文献

1. Allen D G, Lamb G D, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88(1): 287-332. 2008.
2. Reid M B. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med* 44(2): 169-179. 2008.
3. Hamilton M L, Van Remmen H, Drake J A. *et al.* Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10469-10474. 2001.
4. Short K R, Bigelow M L, Kahl J. *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(15): 5618-5623. 2005.
5. Tidball J G, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* (1985) 102(4): 1677-1686. 2007.
6. Reaume A G, Elliott J L, Hoffman E K. *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13(1): 43-47. 1996.
7. Carlsson L M, Jonsson J, Edlund T. *et al.* Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6264-6268. 1995.
8. Li Y, Huang T T, Carlson E J. *et al.* Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11(4): 376-381. 1995.
9. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M. *et al.* Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 281(44): 33789-33801. 2006.
10. Kuwahara H, Horie T, Ishikawa S. *et al.* Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 48(9): 1252-1262. 2010.
11. Izuo N, Nojiri H, Uchiyama S. *et al.* Brain-Specific Superoxide Dismutase 2 Deficiency Causes Perinatal Death with Spongiform Encephalopathy in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 238914. 2015.
12. Sharma S, Bhattarai S, Ara H. *et al.* SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. *Redox Biol* 37: 101740. 2020.