-Reviews-

Mn-SOD コンディショナルノックアウトマウスを用いた抗老化研究

清水孝彦,*,ª白澤卓二b

Anti-aging Research Using Mn-SOD Conditional Knockout Mice

Takahiko SHIMIZU^{*,a} and Takuji SHIRASAWA^b

^aMolecular Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35–2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173–0015, Japan, and ^bDepartment Ageing Control Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine, 3–3–10–201 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0033, Japan

(Received August 5, 2009)

Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) is a mitochondrial enzyme that converts toxic O_2^- to H_2O_2 . Previous studies have reported that a systemic deficiency in Mn-SOD causes neonatal lethality in mice. Therefore, no mouse model is available for the analysis of the pathological role of O_2^- injuries in adult tissues. To explore an adult-type mouse model, we generated tissue-specific Mn-SOD conditional knockout mice using a Cre-loxp system. First, we generated liver-specific Mn-SOD-deficient mice by crossbreeding with albumin-Cre transgenic mice. Mn-SOD proteins were significantly downregulated in the liver of liver-specific Mn-SOD knockout mice. Interestingly, the mutant mice showed no obvious morphological abnormalities or biochemical alterations in the liver, suggesting a redundant or less important physiological role for Mn-SOD in the liver than previously thought. Next, we generated heart/muscle-specific Mn-SOD-deficient mice by crossbreeding with muscle creatine kinase-Cre transgenic mice. The mutant mice developed progressive dilated cardiomyopathy with specific molecular defects in mitochondrial respiration. Furthermore, skeletal muscle-specific Mn-SOD-deficient mice that had been generated by crossbreeding with human skeletal actin-Cre transgenic mice developed a severe physical disturbance associated with impaired cellular ATP metabolism. These results imply that the superoxide generated in mitochondria plays a pivotal role in the development and progression of pathologies in the heart and skeletal muscle, but not in the liver. In conclusion, we successfully generated various tissue-specific Mn-SOD conditional knockout mice that provide useful tools for the analysis of various oxidative stress-associated diseases.

Key words-manganese superoxide dismutase; reactive oxygen species; oxidative stress; knockout mice

1. はじめに

細胞内で発生する活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の大部分はミトコンドリア呼吸の副 産物として産生される. ROS はタンパク質,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,細胞毒性を発生させると考えられ ている.スーパーオキサイドジスムターゼ(superoxide dismutase, SOD)は ROS の1種,スー パーオキサイド(O_2^5)を過酸化水素(H_2O_2)と酸 素(O_2)に変換する主要な酸化ストレス防御酵素 である.CuZn-SOD は細胞質で発生する O_2^5 を処理

し、一方、Mn-SOD はミトコンドリア内で O₂を処 理する (Fig. 1). Mn-SOD により産生されたミト コンドリア内の H₂O₂ はグルタチオンペルオキシ ダーゼ (GPx) とグルタチオン (GSH) により水 と酸素に分解され完全に無毒化される(Fig. 1). 細胞内で SOD などの抗酸化酵素群の生理活性が不 十分で,活性酸素が十分に分解されなかったり,活 性酸素を分解する能力以上の量の活性酸素が発生す ると、処理されなかった活性酸素がミトコンドリア DNA を傷害したり、細胞膜の脂質を酸化し過酸化 脂質を産生したり、最終的には、核 DNA を酸化傷 害し老化の症状を引き起こすと考えられる.しか し、個体レベルで活性酸素を人為的に制御すること が困難であるため、フリーラジカル仮説を実証する in vivo データは少ないのが現状である. このよう な背景の中で, 個体レベルでの細胞内酸化ストレス の生物学的・病理学的意義を明らかにするために,

 [・]東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム(〒173-0015東京都板橋区栄町35-2), ⁶順天堂大学 大学院医学研究科加齢制御医学講座(〒113-0033 東京 都文京区本郷3-3-10-201)
 *e-mail: shimizut@tmig.or.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S10 で 発表したものを中心に記述したものである.



Fig. 1. Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Protection from Superoxide (O2) by Mn-SOD in Mitochondria

抗酸化酵素のノックアウトマウスが作製され表現型 の解析が進められてきた.本稿では、ミトコンドリ アから発生する活性酸素に注目するため、Mn-SOD ノックアウトマウスと組織特異的 Mn-SOD ノック アウトマウス(コンディショナルノックアウトマウ ス)の解析の現状を紹介する.

2. Mn-SOD ノックアウトマウス

1995年に Li らは Mn-SOD ノックアウトマウス を作製し、ホモマウスが拡張性心筋症を伴い生後早 期に死亡することを報告した.1)ほぼ同時期に別の グループからも Mn-SOD 欠損マウスの報告があ り、脂肪肝、代謝性アシドーシス、及び神経変性の 症状を呈することも明らかとなった.²⁾ Mn-SOD 欠 損マウスが成体まで生存し、老化過程の解析ができ れば、慢性的なミトコンドリア酸化ストレスを長期 に渡って解析できる.しかし、早期死亡のため、長 期的な解析は困難で, 抗酸化剤によるレスキュー実 験が行われた. SOD 活性を有する低分子化合物 MnTBAP を生後直後から Mn-SOD 欠損マウスに投 与すると、心臓の拡張型心筋症は発症せず平均寿命 を延命したが、神経系の変性で死亡することが明ら かになった.³⁾この結果は MnTBAP は心臓の臓器 障害を抑制したが、脳血管障壁を通過できないため 神経系の変性は抑制できなかったと考えられた.3) さらに SOD/カタラーゼ活性を有するサレン-マン ガン錯体 EUK-8 によるレスキュー実験が報告され た. EUK-8 投与は、心臓及び神経変性のいずれの 病態も改善し、延命効果が認められた.しかし、 Mn-SOD 欠損マウスは生後 40 日までに死亡した.4) 心臓や神経系の病理学的な所見を改善しても、薬剤 投与によっては、個体致死は回避できないことが考 察された.

3. Mn-SOD コンディショナルノックアウトマ ウス

このような背景の中で、われわれは臓器別にミト コンドリア酸化ストレスの病理学的役割を検討する ために、Cre-loxp システムを使って、組織特異的 に Mn-SOD を欠損できるモデルマウス (Mn-SOD flox マウス)を作製してきた.まず Mn-SOD flox マウスを Albumin-Cre マウスと交配して、肝臓特 異的に Mn-SOD を欠損させ、表現型を調べた (Fig. 2).⁵⁾ 組織特異的な Mn-SOD タンパク質の欠 失を調べるために、各臓器の Mn-SOD タンパク質 をウエスタンブロットで調べた。その結果、肝臓抽 出物だけで、Mn-SOD タンパク質の顕著な減少が 認められ、Cre-loxp システムの有用性を確認した [Fig. 3(A)].^{5,6)} さらに, 肝臓抽出物の SOD 活性を 調べたところ、Mn-SOD 活性の有意な低下が確認 できた [Fig. 3(C)]. ^{5,6)} 一方, CuZn-SOD 活性は対 照マウスと同程度の活性があり、代償的な活性亢進 や変動は認められなかった [Fig. 3(B)].^{5,6)} 興味深 いことに、全身性 Mn-SOD 欠損マウスは肝臓に激 しい脂肪蓄積を認めるにもかかわらず、肝臓特異的 Mn-SOD 欠損マウスは正常に発育し、肝臓機能障 害や脂肪蓄積が認められなかった [Fig. 3(D)].^{5,6)} また肝臓での過酸化脂質量に差が認められなかった ことから, 5,6) 肝臓での Mn-SOD 欠損は脂質の過酸 化を引き起こさないこと、また肝機能も障害されな いことが明らかとなった。この結果は、全身性 Mn-SOD 欠損の表現型と肝臓特異的な Mn-SOD 欠 損の表現型の違いを示しており、臓器毎の Mn-SOD 欠損の病態を調べて、各組織における Mn-



Fig. 2. Generation of Liver-specific Mn-SOD-deficient Mice (Liver-Sod2^{-/-} or L-Sod2^{-/-}) Homozygous Mn-SOD flanked lox mice (Mn-SOD flox mice) were crossed with albumin-cre transgenic mice. The resulting heterozygous Mn-SOD flox and hemizygous cre transgenic mice were selected and mated with homozygous Mn-SOD flox mice. The pups included Liver-Sod2^{-/-}.

SOD の役割を個別に調べる必要性を強く示唆した.

次に、心筋・骨格筋特異的に Cre リコンビナー ゼを発現する Muscle creatine kinase-Cre マウスを 交配し、心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウス を作製した.⁷⁾その結果、欠損マウスは体重減を伴 い、生後6ヵ月までに死亡することを明らかにした. 4ヵ月齢欠損マウスの心臓は著しく拡大し肥大を伴 わない拡張型心筋症を示し [Fig. 4(A)], 心臓重量 は約3倍に増加していた. さらに欠損マウスの1日 運動量を自走行装置で測定すると欠損マウスの活動 量は著しく低下していた."これらの結果より心 筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは活動性低 下を伴う進行性の拡張型心筋症を呈することが判明 した. 組織学的所見として心筋細胞の不整配列、細 胞膨化、変性像が明らかとなった.⁷⁾ TUNEL 染色 では明らかな差が認められず、アポトーシスという よりはむしろ変性による組織学変化であった."電 子顕微鏡ではミトコンドリアサイズが小さくなり、 数が増加し、クリステは中央に収束するような異常 構造を示していた [Fig. 4(B)].⁷⁾ これらはミトコ ンドリア内での呼吸機能障害を示唆すると考えら れ、心筋凍結切片の呼吸鎖酵素活性染色を行った. 呼吸鎖複合体Ⅱであるコハク酸デヒドロゲナーゼ

(SDH) 活性は著しく低下しているのに対し、呼吸 鎖複合体ⅣであるシトクロームCオキシダーゼ (COX) 活性は変化が認められず、選択的な呼吸機 能障害が生じていることが判明した「Fig. 4(C)]. 活性低下の原因を解明するためにミトコンドリア呼 吸鎖の構成要素をタンパク質レベルで調べた結果, 呼吸鎖複合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、及びⅤのサブユニットの 量が有意に減少していた.⁷⁾一方,呼吸鎖複合体Ⅳ のサブユニットは野生型マウスの量と同等であっ た.⁷⁾ さらに RT-PCR により呼吸鎖複合体 II サブユ ニットの mRNA 量を調べたところ, mRNA 量は野 生型マウスの mRNA 量と同レベルに保持されてい た.⁷⁾ これらの結果は、ROS によるタンパク質レベ ルの翻訳後修飾によって呼吸鎖複合体Ⅱサブユニッ トの変性、又は分解が亢進したことを示唆した、本 欠損マウス心臓からミトコンドリアを単離し, O2 と H₂O₂の発生量を調べた.その結果、欠損マウス ミトコンドリアは O_2 が 40% 増加し、逆に H_2O_2 は 約70%産生量が減少していた [Fig. 4(D)]. これ らの結果から、心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損 マウスの心臓ミトコンドリアでは O2の過剰産生が 生じ、ミトコンドリアの不可逆的機能不全に至り心 不全を引き起こすと考えられた. 前述した EUK-8



Fig. 3. Liver- $Sod2^{-/-}$ Showing No Obvious Abnormality in Liver

(A) Mn-SOD expression in 4-weeks-old Liver-Sod2^{-/-}. Ten micrograms of protein extract from brain, heart, liver, or kidney of Liver-Sod2^{-/-} or control mice were immunblotted with anti-Mn-SOD antibody. The duplicated blot was probed with anti-GAPDH antibody as an internal control. (B, C) CuZn-SOD and Mn-SOD activity in the liver of Liver-Sod2^{-/-} and control mice (n=3, *p<0.05). Mn-SOD activity was significantly reduced in Liver-Sod2^{-/-} (C), but CuZn-SOD activity was not reduced (B). (D) HE staining of Liver-Sod2^{-/-} and control mice shows no abnormality in the liver. Scale bar, 100 mm. (E) Measurement of lipid peroxidation (malon-dialded hyde and 4-hydroxyalkenals) in liver extract. No increase in lipid peroxidation was observed in Liver-Sod2^{-/-}.

を心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスに腹腔 内投与したところ,発症前,発症後のいずれの投与 も心拡張を著しく抑制し,心不全病態が顕著に改善 した [Fig. 4(E)].⁸⁾ この改善は,DNA の酸化修飾 体 8-oxodG 量の減少と単離ミトコンドリアからの O_2° の産生低下を伴っていた.この結果は,EUK-8 の直接的な SOD 活性とカタラーゼ活性による O_2° と H_2O_2 の分解とそれに伴う酸化傷害の低下が,心



Fig. 4. Heart/muscle-specific Mn-SOD-deficient Mice (H/M-Sod2^{-/-}) Developing Dilated Cardiomyopathy

(A) Isolated hearts (top panels) and sections of hearts (bottom panels) from a H/M-Sod2^{-/-} mouse (left) and a littermate control mouse (right) at 16 weeks of age. (B) Transmission electron micrographs of myocardia from H/M-Sod2^{-/-} mice. (top panels) Small mitochondria and abnormal vacuoles were observed in 15-weeks-old H/M-Sod2^{-/-} hearts (left) but not in control hearts (right, scale $bar=2 \mu m$). (bottom panels) The cristae of mutant mitochondria (left) were rough, irregular, and concentrated in the center, whereas control cristae (right) formed regularly (scale bar=500 nm). (C) Enzymatic histochemical staining for succinate dehydrogenase (SDH, top panels) and cytochrome c oxidase activity (COX: bottom panels) in hearts from 15-weeks-old mice of the indicated genotypes (scale bar=50 μ m). (D) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide formation in the hearts of saline WT mice (white bars, n=5) and H/M-Sod2^{-/-} (black bars. n=6) at 15-weeks-old mice. (E) Representative images of hearts after the EUK-8 treatment. Normalized heart weights are shown at 8-weeks-old.

拡張抑制と心機能改善をもたらしたと考察した.8)

さらに、骨格筋における活性酸素傷害モデルとし て、骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを作製し た.本欠損マウスは心臓での Mn-SOD 欠損が生じ ないことから、正常に発育し、体重等の形態学的な 異常は認められなかった。骨格筋重量を調べたとこ ろ、若齢及び 30ヵ月齢においても筋萎縮は認めら れなかった。組織学的な解析で、腓腹筋において中 心核(centralized nuclei)が顕著に認められ、筋線 維の再生像が観察された。さらに、ミトコンドリア 呼吸酵素活性を調べたところ、心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの心臓と同様に、呼吸酵素複 合体 II 活性が著しく低下していた。運動機能を調べ



Fig. 5. Reduced Physical Activities in Muscle-specific Mn-SOD-deficient Mice $(M-Sod2^{-/-})$

(A) Treadmill task of M-Sod2^{-/-} (n=4) and control (n=5) mice at 6-months-old (***p<0.001). (B) Measurement of 8-oxodG in the skeletal muscle of M-Sod2^{-/-}. Oxidative DNA marker, 8-oxodG, in the gastrocnemius of M-Sod2^{-/-} (n=7) and control mice (n=4) (6-months-old) (****p<0.0001). (C) EUK-8 improved the physical activity. The treadmill task was carried out every 24 h after injection until 96 h in M-Sod2^{-/-} mice treated with EUK-8 (n=8) or PBS (n=9) (6-months-old). The improvement was observed until 96 h after injection (**p<0.01).

るために自発行動量と強制走行能を調べた.その結 果,自発行動量は野生型マウスと有意差は認められ なかったが、トレッドミルによる強制走行能力が著 しく低下していた [Fig. 5(A)].またその低下は著 しい血中乳酸値の増加と骨格筋内 ATP 量の低下を 伴っていた.さらに骨格筋中の DNA 酸化マーカー 8-oxodG を定量したところ、有意に高値を示すこ とが判明した [Fig. 5(B)].抗酸化剤による運動機 能レスキューを試みるために、EUK-8 を 30 mg/kg で腹腔内単回投与した.その結果、24 時間後に著 しく強制走行時間が延長し、96 時間まで走行能力 が持続した [Fig. 5(C)].また EUK-8 投与により、 骨格筋内 ATP 量は野生型マウスと同レベルに回復 していた.一方、走行後の血中乳酸値は高値のまま であった.以上の結果から,骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは骨格筋内 ATP 量が枯渇すること で強制走行能力が低下し,抗酸化剤投与により ATP 量が回復し,走行能力が延長することが明ら かとなった.

4. おわりに

組織特異的 Mn-SOD 欠損マウスの解析から, 肝 臓, 心臓, 骨格筋は活性酸素に対する感受性が大き く異なることが明らかとなった.本研究から, 臓器 老化を調べるためには, 個別臓器毎の活性酸素に対 する脆弱性を, 詳細に解析する必要性が強く示唆さ れた.現在,神経系や骨組織での Mn-SOD コンデ ィショナルノックアウトマウスの解析を進めてい る.⁹様々の組織特異的 Mn-SOD 欠損マウスの解析 により, 臓器毎のミトコンドリア酸化ストレスの病 理学的意義が解明され, 臓器老化, ひいては個体老 化の理解が進むと期待される.

謝辞 本総説の実験の一部は,東京慈恵会医科 大学の立花利公博士,東京都健康長寿医療センター 研究所の金子孝夫博士らの協力を得て行ったもので す.また当研究室の卒業生の多くが実験に携わり成 果を上げました.この場をお借りして感謝の意を表 します.

REFERENCES

- Li Y., Huang T. T., Carlson E. J., Melov S., Ursell P. C., Olson J. L., Noble L. J., Yoshimura M. P., Berger C., Chan P. H., Wallace D. C., Eptein C. J., *Nat. Genet.*, 11, 376–381. (1995).
- Lebovitz R. M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J. Jr., Dionne L., Lu N., Huang S., Matzuk M. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9782–9787 (1996).
- Melov S., Schneider J. A., Day B. J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S. S., Crapo J. D., Wallace D. C., *Nat. Genet.*, 18, 159–163. (1998).
- Melov S., Doctrow S. R., Schneider J. A., Haberson J., Patel M., Coskun P. E., Huffman K., Wallace D. C., Malfroy B., J. *Neurosci.*, 21, 8348–8353 (2001).
- 5) Ikegami T., Suzuki Y., Shimizu T., Isono K., Koseki H., Shirasawa T., *Biochem. Biophys.*

Res. Commun., 296, 729-736 (2002).

- Uchiyama S., Shimizu T., Shirasawa T., J. Biol. Chem., 281, 31713-31719 (2006).
- Nojiri H., Shimizu T., Funakoshi M., Yamaguchi O., Zhou H., Kawakami S., Ohta Y., Sami M., Tachibana T., Ishikawa H., Kurosawa H., Kahn R. C., Otsu K., Shirasawa T., J. Biol. Chem., 281, 33789–33801 (2006).
- 8) Kawakami S., Matsuda A., Sunagawa T.,

Noda Y., Kaneko T., Tahara S., Hiraumi Y., Adachi S., Matsui H., Ando K., Fujita T., Maruyama N., Shirasawa T., Shimizu T., *Cir. J.*, **73**, 2125–2134 (2009).

Misawa H., Nakata K., Matsuura J., Moriwaki Y., Kawashima K., Shimizu T., Shirasawa T., Takahashi R., *Neurobiol. Dis.*, 23, 169–177 (2006).