

研 究 報 告 書

「老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：南野 徹

1. 研究のねらい

加齢に伴って、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率が増加し、その結果、虚血性心疾患や脳卒中の発症の基盤病態となっている。また加齢に伴い、認知症・神経変性疾患などの中枢性神経系疾患やがんなどもその有病率が増加し、現代の高齢化社会の大きな課題となっている。しかし、加齢がどのようにしてこれらの疾患を増加させるのかについては明らかとなっていない。一方、これらの病態は、多くの高齢者において共通に認められることから、老化の形質の一部としてとらえることができる。すなわち、次世代の加齢関連疾患に対する治療法の開発には、寿命・老化制御の分子基盤の探索も視野に入れた包括的な研究が必要であると考えられる。

通常ヒト正常体細胞は、ある一定回数の分裂増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。このような細胞の分裂寿命に重要な因子が、テロメアである。テロメアは、染色体の両端に存在し、その安定性に寄与するが、DNA複製が不完全であるため、細胞分裂とともに短縮する。ある一定の長さまで短縮したテロメアは、DNA損傷として認識され、p53依存性細胞老化シグナルの活性化によって、細胞は老化する(図1)。最近では、酸化ストレスや紫外線などのストレスによってDNA損傷が生じると、テロメアの短縮を伴わずに細胞が老化することが知られている(ストレス誘導性細胞老化)(図1)。老化した細胞が高齢者の皮膚へ集積することや、寿命の短い早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことなどが報告されていることから、加齢に伴って生じる組織における老化細胞の集積、あるいは、細胞老化シグナルの活性化が、寿命や加齢関連疾患の病態生理に關与する可能性がある。

実際、私はこのような仮説のもとに研究を進め、ヒト動脈硬化巣に老化した血管細胞が存在すること、テロメア短縮によるp53依存性細胞老化シグナルの活性化が加齢に伴う血管老化の病態生理に關与していることなどを報告してきた。

また、生活習慣病において認

められる高インスリン血症や高血糖、アンジオテンシン II の活性化が、テロメア非依存性にp53細胞老化シグナルを活性化し、血管細胞を老化させることによって動脈硬化を促進していることを、マウスモデルによって明らかにし、これらのマウスにおいてp53依存性の細胞老化シグナル活性化を抑制すると、動脈硬化の進展を制御できることなども報告した。さらに、加齢や心負荷に伴って心臓におけるp53依存性細胞老化シグナルが活性化され、心不全の発症・進展を促進していることなども明らかにした。以上のように、加齢や生活習慣に伴う様々なストレスが、細胞老化シグナルを活性化することによって、寿命や加齢関連疾患の病態に關わっていることが予想される。そこで本研究では、細胞老化シグナルによって制御される加齢関連疾患の病態生理を解明し、次世代の治療法を開発することを目指した。

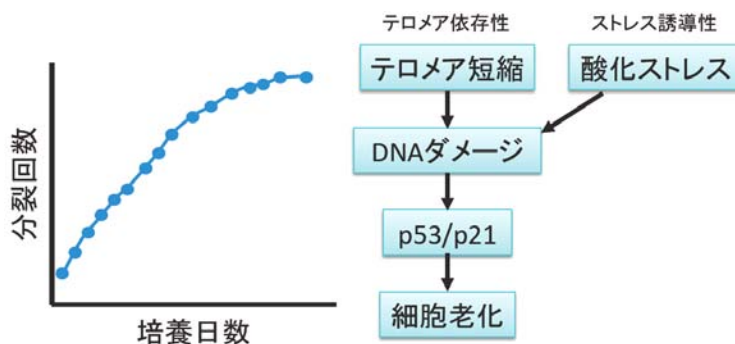


図1 細胞老化のメカニズム

2. 研究成果

近年、循環器疾患の発症基盤として、糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患が重要視されている。これらの疾患では、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と、それによって惹起されるインスリン抵抗性とその病態の基盤にあると考えられている。しかし、蓄積した内臓脂肪がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するのか、また、加齢に伴ってこれらの疾患が増えるのはなぜかといったことについては明らかとなっていない。一方、糖尿病患者ではテロメアの短縮が亢進していることが報告されており、細胞老化シグナルと糖尿病の発症の関連性が示唆されている。そこで私は、p53 依存性の細胞老化シグナルと糖尿病の関係について検討した。

2-1 2型糖尿病の脂肪組織における老化シグナル

過食により脂肪組織に特異的に酸化ストレスが増加することが知られている。そこで、2 型糖尿病モデルマウス (Ay マウス) の脂肪組織の老化形質について調べてみることにした。その結果、糖尿病マウスの脂肪組織では細胞老化染色 (Senescence-associated β -galactosidase 染色) に陽性の老化細胞が多数存在することがわかった (図 2)。また、老化分子 p53 や p21 の発現を調べてみると増加していたことから、2 型糖尿病マウスの脂肪組織は老化形質を示しているものと考えられた (図 2)。これらの老化形質に伴って、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が増加していた。また、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では脂肪細胞分画、間質細胞分画のいずれにおいても p53 の蓄積と、悪玉アディポカインの産生を認め、炎症の惹起には脂肪細胞、脂肪組織のマクロファージ両者が老化形質を獲得することが関与していると考えられた。

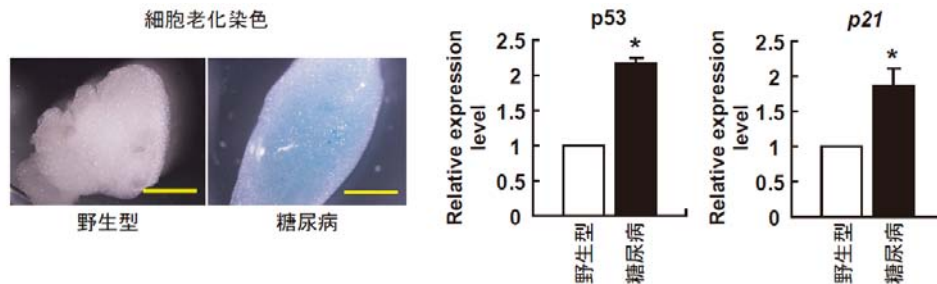


図 2 糖尿病マウスの脂肪老化

次に、p53 の役割を調べるために、p53 を欠損した糖尿病マウス (p53KO 糖尿病モデル) を作成した。その結果、このマウスでは脂肪組織の老化が抑制され、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が抑制されていた。これらに伴って、インスリン抵抗性や耐糖能異常が改善していたことから、p53 が糖尿病モデルマウスの脂肪組織の老化や炎症を制御している key molecule であると考えられた。

より生理的な肥満モデルにおいて検証するために、高脂肪高蔗糖食負荷マウスの脂肪組織を調べたところ、やはり p53 の蓄積と悪玉アディポカインの産生を認め、老化形質を獲得していた。また、脂肪組織特異的に p53 を欠損させたマウスに高脂肪高蔗糖食を負荷したところ、脂肪組織の老化形質とそれに伴う炎症が著明に改善し、全身のインスリン抵抗性も改善したことより、脂肪組織における p53 依存性老化シグナルがインスリン抵抗性を

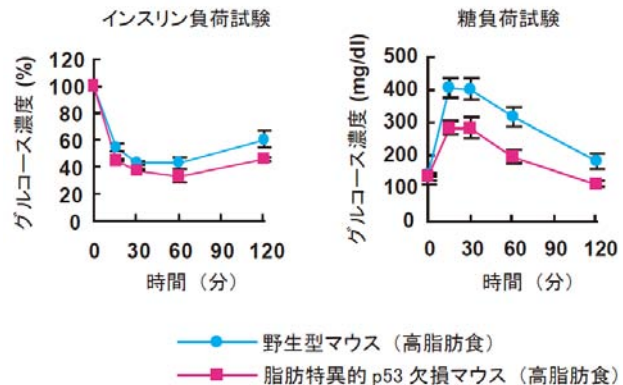


図 3 脂肪特異的 p53 欠損マウス

制御しているものと考えられた(図 3)。

さらに、脂肪組織における p53 の役割についてさらに検証するために、我々は脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスを作成した。脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスの脂肪組織では悪玉アディポカインの産生を認め、炎症が惹起されていた。またこのマウスでは全身のインスリン感受性が低下していた。以上より、糖尿病の脂肪組織では p53 が活性化されることによって悪玉アディポカインの産生が増加し、全身のインスリン感受性を低下させていると考えられた。

2-2 脂肪組織における老化シグナルの活性化とインスリン抵抗性

次に私は、脂肪組織の老化を促進させた際の表現系を解析することにした。染色体の DNA 末端はテロメア構造により保護され、テロメアの伸長はテロメラーゼという酵素によって行われているが、ほとんどの細胞でテロメラーゼの量が不十分なため、細胞分裂のたびにテロメアが徐々に短縮することが知られている。そこで私は、全身でテロメラーゼを欠損したマウスを解析に用いることにした。マウスのテロメア長は長いため、テロメラーゼ欠損マウスを 4 世代経代させたマウス(G4 マウス)を実際の解析に用いたところ、G4 マウスでは脂肪細胞のテロメア長が短縮することを確認することができた。

G4 マウスの脂肪組織では、老化染色陽性細胞を多数認め、p53 の蓄積を伴い、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が亢進していた。G4 マウスに高脂肪高蔗糖食負荷を行うと、全身のインスリン抵抗性が惹起され、肝臓、骨格筋においてインスリン抵抗性が惹起されていた(図 4)。

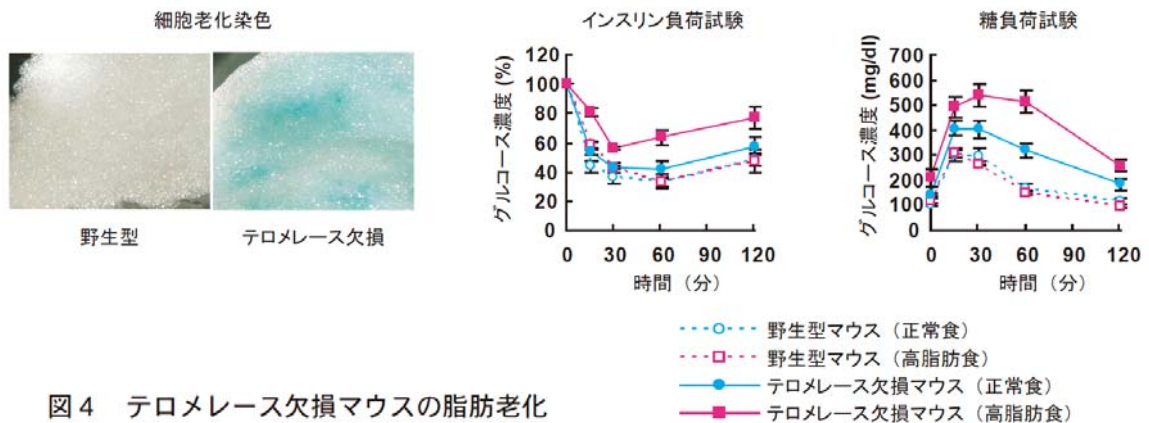


図 4 テロメラーゼ欠損マウスの脂肪老化

G4 マウスにおける脂肪の老化の役割を検討するため、G4 マウス(ドナー)の脂肪を野生型マウス(レシピエント)へ移植するという実験を行った。その結果、老化した脂肪を移植されたレシピエントマウスでは全身のインスリン抵抗性が惹起されるのに対して、老化した脂肪を摘出された G4 ドナーマウスでは全身のインスリン抵抗性が改善することがわかった。次に、p53 ヘテロ欠損 G4 マウスの脂肪を野生型マウスに移植したところ、G4 マウスの脂肪を移植された野生型マウスと比較して、相対的な改善を認めた。以上より、テロメアの短縮モデルにおいても、p53 依存性の老化シグナルにより、脂肪組織において炎症が惹起され、全身のインスリン抵抗性が生じるものと考えられた。

2-3 脂肪組織の老化シグナル活性化の機序

次に私は、脂肪組織において、p53 が蓄積する機序について検証した。以前報告されているように、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では活性酸素の産生が亢進していることが観察された。酸化ストレスは DNA 損傷を惹起することによって、細胞老化を誘導することが知られている。そこで、DNA 傷害の指標である γ -H2AX について検討したところ、G4 マウスと同様に、糖尿病モデルマウスの脂肪組織においても γ -H2AX が増加していた。さらに酸化ストレスと

p53、炎症の関連性を調べるために、脂肪前駆細胞を用いて検討した。脂肪前駆細胞を過酸化水素で処理すると、p53 の蓄積と活性化とともに、NF- κ B 活性の増加がみとめられた。酸化ストレスによる NF- κ B の活性化は、p53 の siRNA によって抑制されたことから、p53 依存性であることがわかった。過酸化水素処理により悪玉アディポカインの産生の増加も生じるが、その増加は、p53 や NF- κ B 活性の抑制によって改善した。以上より糖尿病では、脂肪組織で産生される活性酸素により DNA 傷害が生じ、p53 依存的な老化シグナルの活性化により、NF- κ B を介して悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン感受性が低下するものと考えられた。

2-4 糖尿病患者の脂肪組織の老化形質

ヒトにおいて、同様の機序が存在するかどうかを調べるために、私は糖尿病患者の脂肪組織の老化形質を検討した。千葉大学医学部附属病院において胃癌、大腸癌患者の手術に際して摘出される内臓脂肪を解析したところ、糖尿病を合併した脂肪組織では老化染色陽性細胞を複数認め、p53 が蓄積し、悪玉アディポカインの産生の増加を認めた。以上より、ヒトの脂肪組織においても p53 依存性の老化シグナルが活性化され、糖尿病の発症・進展に密接に関わっている可能性が示唆された。

3. 今後の展開

本研究により、加齢や過食による脂肪組織の p53 依存性老化シグナル活性化によって、悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン抵抗性が惹起されることが明らかとなった(図 5)。これらの結果は、加齢に伴って増加する生活習慣病の発症機転を探る糸口となると思われる。また、脂肪組織の老化シグナルを標的とした治療方法を開発することで脂肪の老化を制御し、糖尿病の新たな治療法につながる可能性があると考えられる。

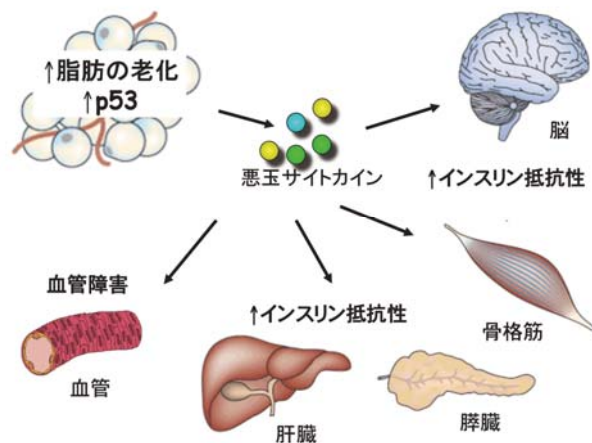


図 5 脂肪老化とインスリン抵抗性

p53 はがん抑制遺伝子として有名であるが、そのシグナルの過剰な活性化は、細胞老化を促進することによって、加齢に伴う様々な疾患に関与する。一方、その活性を過剰に抑制するとがんの発症を招くことになる。多くの病態では、p53 依存性の老化シグナルによって炎症を惹起することが病態生理に直接関与していることから、そのような慢性炎症を惹起するメカニズムの解明によってがん化のリスクない抗老化治療の開発が可能と考えられる。

下等動物の老化研究において、脂肪における長寿シグナルの活性化が全身の老化シグナルに影響を与えることによって、寿命の延長をもたらすことが知られている。従って、私の研究結果は、脂肪における p53 の活性化が非細胞自律性に他の組織の老化シグナルに影響を与えることによって、個体の寿命にも影響を与える可能性があることを示唆している。したがって、脂肪の老化シグナル制御によって、糖尿病だけでなく、個体の老化を制御できるかもしれない。

4. 自己評価

本研究の結果は、加齢に伴う様々な疾患の病態の解明や治療の開発に貢献できると考えられることから、当初の目標は達成できたものと評価する。その解明のためにメタボローム解析も行ったが、現時点までにその結果を基盤とした研究展開となっていない。今後、メタボロ

ーム解析結果も利用して、新たな展開を図っていきたい。

5. 研究総括の見解

加齢や過食による脂肪組織におけるp53の活性化が、悪玉サイトカインの産生を更新させ、全身のインスリン抵抗性を惹起させるとする新しい知見を得、結果をNat. Med.に発表するなど、科学的に大きなインパクトのある成果を挙げたものと高く評価できる。p53抑制は発がんとの関係から、正確な調整が必要であり、今後の課題として残されているが、新たな治療法の開発に繋がる方向性を示した点でも評価できる。今後、p53の活性化によって惹起される炎症のメカニズムについて、メタボロームの視点からも研究が更に展開されることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. <u>Minamino T</u> and Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. <i>Nat Clin Pract Cardiovasc Med</i> 5, 637-648 (2008).
2. Kayama Y, <u>Minamino T*</u> , Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H and Komuro I. Cardiac 12/15-lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. <i>J Exp Med</i> 206, 1565-1574 (2008). (*Co-first author)
3. <u>Minamino T</u> , Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. <i>Nat Med</i> 15, 1082-1087 (2009).
4. Moriya J, <u>Minamino T*</u> , Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I. Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. <i>Circ Res</i> 106, 391-398 (2010). (*Co-first author)
5. Shimizu I, <u>Minamino T*</u> , Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED and Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload. <i>J Clin Invest</i> 120, 1506-1514 (2010). (*Co-first author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 森谷純治、南野徹、小室一成、古閑比佐志、岡田光浩

発明の名称: 虚血性心血管系疾患の治療剤(PlexinD1-Fc)

出 願 人: 千葉大学

出 願 日: 2008/11/7

(3) その他(主要な招待講演(学会発表)、受賞、著作物等)

招待講演

1. Minamino T. Role of Cellular Aging in Cardiovascular Disease. Annual Spring Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis Busan, Korea 2008/4/18

2. Minamino T. Life style-related disease and cellular aging signal network. 2009 AVDR International Symposium Daegu, Korea 2009/9/17

3. Minamino T. Aging signals involved in glucose homeostasis. JST Danish-Japanese Workshop "Molecular Diabetology" Copenhagen, Denmark 2010/03/23-24

4. Minamino T. (2010) Vascular aging and vascular injury: synonymous or analogous? 20th World Congress of the International Society of Heart Research 2010/5/13-16.

Kyoto

5. Minamino T. Cellular aging and lifestyle-related disease. 7th Japanese-German Frontiers of Science Potsdam, Germany 2010/11/11-14

受賞

1. 日本循環器学会 第 35 回日本心臓財団佐藤賞 「Molecular mechanism of cardiovascular aging and regeneration」 (2010 年 3 月 6 日)