

研究報告書

「長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27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。加齢に伴って様々な組織に慢性的な炎症が惹起されることが、これらの生活習慣病の発症・進展の原因となっていることが示唆されているが、その機序は不明である。一方、慢性炎症を含めたこれらの病態は、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捉えることができる。すなわち、次世代の生活習慣病の治療法の開発に向けた究極的な研究ターゲットは、老化や寿命を調節する仕組みそのものであると考えられる。しかし、これまで加齢に伴って個々の病態がどのように変化するかという観点からの研究は行われてきたが、老化・寿命という側面からみれば包括的な研究は行われていない。

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。その寿命は培養細胞のドナーの年齢に相関すること、また、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も報告されている。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に病的な形質を担う」という仮説に基づいて始めることにした。

これまで私は、主に老化モデルマウスの解析を通じて、加齢や過食による生活習慣病の発症には、神経・液性因子による臓器間シグナルネットワークと、それらによって制御される組織の p53 依存性老化シグナル活性化に伴う慢性炎症が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方、我々が確立した複数の長寿モデルマウスにおいては、加齢に伴う組織の p53 依存性老化シグナルの活性化や慢性炎症亢進が抑制されていることを観察している。そこで、本研究では、長寿・老化モデルマウスを用いて、慢性炎症を惹起する過剰な p53 依存性老化シグナルの上流あるいは下流に存在する分子基盤を探索することによって、生活習慣病における慢性炎症の制御を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

近年、肥満や糖尿病の患者は劇的に増加しており、現代社会の大きな問題となっている。肥満に関連した脂肪組織の炎症は全身のインスリン抵抗性や糖尿病の発症に深く関与していることが知られている。肥満脂肪では、増大した遊離脂肪酸や酸化ストレスが炎症細胞の浸潤や TNF- α 、CCL2(MCP-1)といった炎症性サイトカインの産生を促進し、過剰に産生された CCL2 が脂肪組織にマクロファージを誘導することでさらに炎症性サイトカインが産生されるという悪循環を生じさせる。炎症が生じた脂肪組織から産生された炎症性サイトカインが全身に循環することで、骨格筋や肝臓といったインスリン標的臓器にも影響を及ぼし、全身のインスリン抵抗性や糖尿病が引き起こされると考えられている。

セマフォリンおよびその受容体であるプレキシンは胎生期の神経発生を制御する反発性神経軸索ガイダンス分子として見出されたが、今日では心血管系、骨格筋、腎臓、神経系といった多種多様な臓器の発生の制御に重要であることがわかっている。セマフォリンは脊椎動物においてはクラス3～クラス7まで存在し、分泌型タンパクであるクラス3セマフォリンはセマフォリン3A～3Gの7つのサブタイプが存在する。クラス3セマフォリンは神経および心血管系の器官形成に重要であるが、細胞増殖や細胞死、遊走などにも関与し、神経疾患や癌などにも関連していることが報告されている。セマフォリン 3E(Sema3E)はその特異的な受容体としてプレキシシンD1が知られているが、これらは器官形成だけでなく心血管疾患や腫瘍増殖にも関連していることが知られている。以前我々は、糖尿病では Sema3E の発現が亢進しており、これが虚血組織の血管新生を阻害することを報告した。セマフォリン-プレキシシン経路は免疫系の制御に関わっていることも報告されており、このシグナル経路が炎症の制御に関わっていることが示唆されるが、今回我々は肥満時に Sema3E が脂肪組織の炎症と全身のインスリン抵抗性を惹起することを明らかにした。

(2) 詳細

1) セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルは肥満時の内蔵脂肪組織で亢進する

肥満脂肪におけるセマフォリンとプレキシシンの役割を調べるため、野生型マウスに高脂肪高シヨ糖食を与え、食餌誘導性肥満モデルを作成した。肥満マウスではマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が見られ、TNF- α や Ccl2(MCP-1)などの炎症性サイトカインの発現が著明に亢進していた。さらにインスリン抵抗性や耐糖能異常といった糖代謝異常を来していた。そこで、肥満脂肪における Sema3E やプレキシシン D1 の発現を調べたところ、脂肪組織におけるこれらの発現は著明に亢進しており、さらに詳細に解析すると Sema3E は主に脂肪細胞の細胞質で、プレキシシンD1は脂肪組織への浸潤細胞、特にマクロファージにおいて発現が亢進していた。その際に血中 Sema3E 濃度も上昇しており、脂肪組織から分泌される Sema3E とマクロファージに発現するプレキシシンD1の相互作用が、肥満時の脂肪炎症に関与している可能性が示唆された。さらにヒト糖尿病患者について調べると、糖尿病患者では血中 Sema3E レベルが上昇しており、ヒトの代謝性疾患においてもセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルが重要な働きをしている可能性が示唆された。

2) 脂肪炎症におけるセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルの役割

肥満におけるセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルの果たす役割について詳細に検証するため、Sema3E と結合し、その作用を阻害する働きをもつ可溶性プレキシシン D1(プレキシシン D1-Fc)を肥満モデルマウスに投与した。その結果、投与群の肥満マウスは非投与群と比較し、体重や摂餌量、酸素消費量などの代謝プロファイルは変化しなかったにも関わらず、脂肪組織の炎症は有意に改善し、インスリン抵抗性や耐糖能異常といった糖代謝異常も著明に改善した。

さらに、遺伝的 Sema3E 欠損マウス(Sema3E ホモノックアウトマウス)においても同様に、肥満時の脂肪組織の炎症や糖代謝異常は著明に改善したことから、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルは肥満時の脂肪炎症や糖代謝異常を誘導する作用があることが示唆された。

一方、Sema3E を過剰発現した際の脂肪組織への影響を調べるため、脂肪組織特異的 Sema3E 過剰発現マウスを作成した。本モデルマウスでは、通常食を与えたにも関わらず脂肪組織および血中の Sema3E レベルは著明に上昇しており、その脂肪組織ではマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤や炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。さらに著明な糖代謝異常も来たしたが、これは TNF- α に対する中和抗体の投与によって改善した。

3) セマフォリン 3E はマクロファージ誘導因子として働く

マクロファージなどの炎症細胞では、その細胞表面に CCL2 受容体(C-C motif chemokine receptor-2, CCR2)を発現しているため、CCL2 が分泌されるとそれに反応して炎症組織や感染組織に炎症細胞が誘導されることが知られている。そこで培養マクロファージ細胞を用いて細胞遊走アッセイを行い、マクロファージの誘導性について検証したところ、Sema3E は CCL2(MCP-1)と同等にマクロファージを誘導する作用があり、マクロファージのプレキシシン D1 を抑制するとこの作用も抑制されることがわかった(図 3A)。また、肥満モデルの野生型マウスから採取した脂肪組織を培養した上清を用いて細胞遊走アッセイを行った際には培養マクロファージ細胞が誘導されたが、肥満モデルの Sema3E ホモノックアウトマウスから採取した脂肪組織を培養した上清ではマクロファージの誘導は抑制された。

これまでの研究により、Sema3E が神経反発因子として働く際にはプレキシシン D1 / Nrp1(neuropilin 1) / VEGFR2 (vascular endothelial cell growth factor receptor 複合体と作用し、PI3K/Akt シグナル経路を活性化させることが知られている。そこで我々のモデルにおいても検証したところ、Nrp1 や VEGFR2、PI3K、Akt の抑制により、Sema3E のマクロファージ誘導作用は著明に抑制され、Sema3E は plexinD1/Nrp1/VEGFR2 依存的にマクロファージ誘導因子として働くと考えられた。

さらに骨髄細胞で発現するプレキシシン D1 の脂肪炎症における役割を検証するため、プレキシシン D1 に対する shRNA(short hairpin RNA)を導入し、プレキシシン D1 の発現を抑制した骨髄を移植したマウスで肥満モデルを作成したところ、これらのマウスでは肥満時の脂肪炎症は抑制され、糖代謝異常も抑制された。このことから、肥満時にはプレキシシン D1 を介してマクロファージが脂肪組織に誘導されると考えられた。

4) p53 の活性化はセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルを介して、脂肪炎症を悪化させる

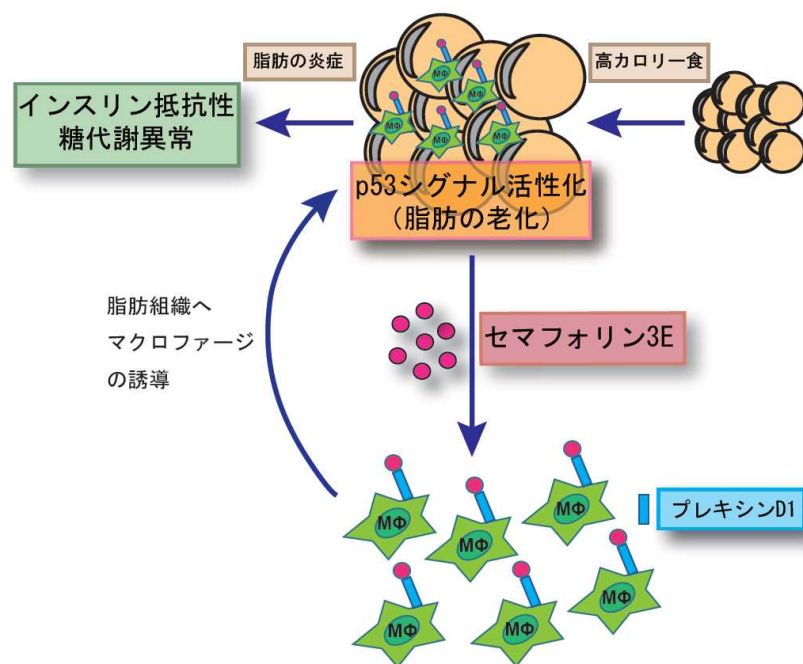
以前我々は、肥満時には酸化ストレスや DNA 損傷が蓄積し、脂肪組織で p53 が活性化すること、活性化した p53 は脂肪組織の炎症を惹起し、全身のインスリン抵抗性を引き起こすことを報告した。そこで p53 と Sema3E の関連性について調べるため、脂肪組織特異的 p53 ノックアウトマウスで肥満モデルを作成したところ、これらのマウスでは肥満時の脂肪組織や血液中の Sema3E レベルの上昇が著明に抑制されており、脂肪炎症や糖代謝異常も抑制されていた。しかし、このマウスにプレキシシン D1-Fc を投与し、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナル経路を抑制しても相加的な改善効果はなかった。このことから、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルは p53 依存性の脂肪炎症において、p53 の下流シグナルとして重要な働きをしている可能性が示唆された。

次に、Sema3E による糖代謝制御における p53 活性化の果たす役割について検証するた

め、野生型マウスの脂肪組織に p53 活性化剤であるキナクリンを投与した。その結果、脂肪組織の Sema3E や血中 Sema3E レベルが上昇するとともに、脂肪炎症や糖代謝異常が惹起されたが、これらの変化はキナクリンを投与した脂肪組織特異的 p53 ノックアウトマウスでは起こらず、キナクリンにより誘導される脂肪炎症は p53 依存的なものであると考えられた。また、クロマチン免疫沈降法を用いて検証したところ、p53 は Sema3E のプロモーター領域に結合しており、p53 は Sema3E の発現を直接的に制御している可能性が示唆された。さらに、キナクリンで脂肪組織の p53 を活性化させたマウスに対してプレキシシン D1-Fc や TNF- α に対する中和抗体を投与すると、脂肪炎症や糖代謝異常が改善した。これらの結果から、Sema3E は肥満時の p53 依存性の脂肪炎症において重要な役割を果たしていると考えられた。

3. 今後の展開

本研究において我々は、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルが脂肪炎症を惹起し、インスリン抵抗性や糖尿病の発症・進展に重要な役割を果たしていることを明らかにした。Sema3E がプレキシシン D1 陽性マクロファージを誘導し、脂肪組織での p53 活性化が Sema3E によるマクロファージ誘導を促進することで脂肪の炎症や糖代謝異常が惹起されることが明らかになった(図)。癌抑制遺伝子である p53 は、DNA 修復やアポトーシス、老化などに関連し、ゲノムの安定性の維持や発癌の抑制に寄与している。近年、p53 は加齢関連疾患にも関与しているということが知られてきており、加齢に伴って p53 の発現が亢進することや、p53 の持続的な活性化は早期老化を引き起こすこと、老化した心血管では p53 の発現が亢進していることなどが知られており、動脈硬化や心不全といった疾患においても重要な役割を果たしていると考えられる。また、最近では代謝異常や代謝制御との関連性を示唆する報告もされており、以前我々は肥満時に脂肪組織において p53 依存性の炎症が惹起されることを報告している。本研究ではセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルが p53 依存性の脂肪炎症において重要な役割を果たし、このシグナルの抑制が肥満時の代謝異常を改善させることを示した。p53 それ自体の抑制は発癌を誘導する可能性も考えられることから、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルの抑制は肥満患者の糖代謝異常に対する新規治療ターゲットとなる可能性が示唆される。



4. 評価

(1) 自己評価

セマフォリンは老化に伴う炎症に重要な役割を持っていることが予想されることから、老化の進んでいる集団を抽出するマーカーとして有用である。さらに、セマフォリンシグナルを標的とした生活習慣病治療開発も有望であり、「生活習慣病における慢性炎症の制御を目指す」という本研究の目的は十分に達成できたと考えられる。またその開発について、既に産学連携の可能性があり、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果も大きいものとなることが予想される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

食餌誘導性肥満モデルにおいて、肥満と高カロリー食負荷により老化状態となった脂肪細胞が、p53 依存的にセマフォリン 3E (Sema3E) を分泌し、それに対して Sema3E の受容体であるプレキシシン D1 を高発現する骨髄由来のマクロファージが引き寄せられて脂肪組織に浸潤し、脂肪炎症と糖代謝異常(インスリン抵抗性や耐糖能異常)を引き起こすことを極めて緻密な実験により明らかにした。さらに、糖尿病患者でも血中 Sema3E レベルの上昇を確認しており、ヒトにおいてもこの Sema3E-プレキシシン D1 経路が糖代謝異常に関与している可能性を示唆する発表を行った。その他に、高カロリー食負荷によって糖尿病を発症させたマウスの血管における p53 発現上昇により、血管細胞のグルコース輸送分子 Glut1 産生が障害されると共に、血管細胞での一酸化窒素産生の低下に伴う筋肉細胞内でのミトコンドリア合成抑制の結果として骨格筋におけるエネルギー消費量の低下をも招来することにより、余剰となったカロリーが内臓脂肪として蓄積して脂肪組織における炎症が生じ、肥満や糖尿病がさらに進行する悪循環が起こることを見出して発表している。以上のように、本領域の戦略目標に貢献する老化・生活習慣病における慢性炎症の関与について成果をあげ、国内外で評価され、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yokoyama M, Nakagomi A, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Yoshida Y, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Fruttiger M, Lozano G, Minamino T. Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary abesity. **Cell Rep** 2014; 7: 1691-1703.
2. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. **Cell Metab** 2014; 20: 967-977.
3. Ito TK, Yokoyama M, Yoshida Y, Nojima A, Kassai H, Oishi K, Okada S, Kinoshita D, Kobayashi Y, Fruttiger M, Aiba A, Minamino T. A crucial role for CDC42 in senescence-associated inflammation and atherosclerosis. **PLoS One** 2014; 9: e102186.
4. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, Minamino T. Semaphorin-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. **Cell Metab** 2013; 18: 491-504.

5. Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Naoaki I, Minamino T. Haploinsufficiency of Akt1 prolongs the lifespan of mice. **PLoS One** 2013; 8: e69178.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会・シンポジウム招待講演

1. Minamino T. Aging and cardiovascular disease. American Heart Association International Forum, 2012 Scientific Session. 2012/11/4 Los Angeles, USA
2. Minamino T. Lifespan regulatory system as a potential therapeutic target for cardiovascular disease. International Association of Gerontology and Geriatrics 2013/6/23-27 Seoul
3. Minamino T. Role of senescence-associated inflammation in lifestyle-related disease. ISHR 2013 2013/6/29 San Diego
4. Minamino T. Circadian clock and cardiovascular aging. IEEE EMBC 2013 2013/7/3-7 Osaka
5. Minamino T. Role of cellular aging signals in cardiovascular and metabolic disease. BCVS 2013 2013/7/22-24 Las Vegas

国内学会・シンポジウム招待講演

6. Minamino T. 寿命制御と細胞老化シグナル、加齢関連疾患の発症メカニズム 第33回日本基礎老化学会 シンポジウム 2011/10/8-9 Biomedical Gerontology 2011; 35: 6.
7. Minamino T. 次世代血管新生治療開発の展望 第52回日本脈管学会 シンポジウム 2011/10/20-22 岐阜 プログラム・抄録集 pageS86.
8. Minamino T. Cardiovascular aging and circadian clock 第76回日本循環器学会・学術集会 シンポジウム 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p
9. Minamino T. Lifespan regulatory system and cardiovascular disease 第76回日本循環器学会・学術集会 Topics 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p249
10. Minamino T. Lifespan regulatory system as a potential therapeutic target for cardiovascular disease 第76回日本循環器学会・学術集会 Topics 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p249
11. Minamino T. 臓器間ネットワークによる循環代謝制御 第85回日本内分泌学会総会シンポジウム 2012/4/19-21 名古屋
12. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第60回日本輸血・細胞治療学会総会シンポジウム 2012/5/25-27 郡山 プログラム・抄録集 2012; 58: 220.
13. Minamino T. Akt1による寿命調節機構 第12回日本抗加齢医学会総会シンポジウム 2012/6/22-24 横浜 プログラム・抄録集 p99
14. Minamino T. 脂肪老化制御と生活習慣病 第12回日本抗加齢医学会総会 研究助成記念講演 2012/6/22-24 横浜 プログラム・抄録集 p168
15. Minamino T. 老化、細胞死と循環代謝性疾患 第21回日本 Cell Death 学会シンポジウム 2012/7/28 名古屋 プログラム・抄録集 p41

16. Minamino T. Regulation of Cardiovascular Metabolism by the Aging Signal Network. 第 35 回日本高血圧学会シンポジウム 2012/9/20-22 名古屋
17. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 33 回日本肥満学会シンポジウム 2012/10/11-12 京都
18. Minamino T. 臓器間老化シグナル制御と生活習慣病 第 16 回日本心血管内分泌代謝学会シンポジウム 2012/11/23-24 東京
19. Minamino T. 高血圧と血管老化のメカニズム 第 20 回日本血管生物医学会シンポジウム 2012/12/5-7 徳島
20. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 35 回日本分子生物学会シンポジウム 2012/12/11-14 福岡
21. Minamino T. Cardiac-adipose vicious cycle is critically involved in the development of heart failure 第 77 回日本循環器学会・学術集会 シンポジウム 2013/3/15-17 横浜
22. Minamino T. Cellular aging signal network and lifestyle-related disease 第 77 回日本循環器学会・学術集会 ミートザエキスパートセッション 2013/3/15-17 横浜
23. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第 12 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 2013/3/21-23 横浜
24. Minamino T. 臓器連関とインスリン感受性 第 86 回日本内分泌学会総会シンポジウム 2013/4/25-27 仙台
25. Minamino T. 血管老化と NO 第 13 回日本抗加齢医学会ランチョンセミナー 2013/6/28-30 横浜
26. Minamino T. 心-脂肪連関による心不全発症のメカニズム 第 17 回日本心臓リハビリテーション学会シンポジウム 2013/7/13-15 仙台
27. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム 2013/9/11-13 横浜
28. Minamino T. 血管老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 21 回日本血管生物医学会シンポジウム 2013/9/26-28 大阪
29. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013/11/7 新潟
30. Minamino T. 老化からみた心血管治療としてのスタチンの有用性 第 17 回日本心不全学会学術集会 ランチョンセミナー 2013/11/30 大宮
31. Minamino T. 心血管系の老化のメカニズム 第 24 回日本老年医学会九州地方会 2014/3/8 北九州
32. Minamino T. 健康寿命は延伸可能か？ 第 14 回日本抗加齢医学会シンポジウム 2014/6/6-8 大阪
33. Minamino T. 細胞老化シグナルによる炎症制御と疾患 第 18 回日本適応学会シンポジウム 2014/6/21-22 東京
34. Minamino T. 老化再生からみた循環器疾患治療 第 32 回日本臨床化学会甲信越支部総会シンポジウム 2014/6/29 上越
35. Minamino T. 細胞老化シグナルによる炎症制御と疾患 第 35 回日本炎症・再生医学会シンポジウム 2014/7/1-4 沖縄

36. Minamino T. 老化の観点から生活習慣病を考える 第 135 回日本内科学会信越地方会
特別講演 2014/10/4 松本
37. Minamino T. A critical role of senescence-induced inflammation in cardiovascular disease.
第 18 回日本心不全学会 日本-台湾セッション 2014/10/11 大阪

プレスリリース

1. 「糖尿病の発症に関わる新たな分子を発見 -脂肪の老化と炎症を結ぶ鍵分子の同定-」、
JST・新潟大学、2013 年 10 月 2 日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131002/index.html>
2. 「血管の老化は、筋肉のエネルギー消費を妨げることを発見 ~肥満や糖尿病を悪化させている可能性~」、JST・新潟大学、2014 年 5 月 23 日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140523/index.html>