

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

細胞老化が生体機能に及ぼす影響とその機構に関する研究（25-18）

主任研究者 杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部（室長）

## 研究要旨

### 3年間全体について

本研究では細胞老化に着目し、細胞老化が個体老化においてどのような役割を持つのか、また加齢に伴って見られる組織機能の変化や疾患にどのような寄与をするのかを解明し、細胞老化が加齢性疾患の有効な創薬ターゲットとなる可能性について検討を行う。

ヒトを含む哺乳動物の細胞は、酸化ストレスやDNAダメージの蓄積などにより、細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。このようなストレスに対する感受性は、細胞の由来となる生物種の平均寿命と逆相関を示すことから、細胞老化が個体の寿命を規定する一因子ではないかと考えられてきた。細胞老化を起こした細胞（ここでは老化細胞と定義する）は、生体内においても様々な組織で加齢に伴い蓄積が認められている。しかしながらその頻度はきわめて低く、加齢に伴って見られる組織機能の低下に老化細胞が貢献しているかについては疑問視されてきた。しかし近年、老化細胞は単に増殖を停止しているだけでなく、様々な生理活性物質を分泌することにより積極的に老化細胞の周辺の環境に影響を及ぼすことが示された。このような老化細胞特異的な分泌表現型はSASP (Senescence-associated secreting phenotype) と呼ばれ、加齢に伴う組織機能の低下に関与する可能性が指摘されている。これまでに少なくとも、SASPを介した老化細胞の非細胞自立的機能により、癌細胞の増殖や幹細胞の異所的分化などを誘発し得ることが報告されている。しかしながら、老化細胞と生体機能の加齢性変化の関連については不明な点が多く残されている。

呼吸器では他の組織と比較して早期から老化細胞が蓄積し、機能低下が起こる。平成26年度までの成果から、遺伝子改変マウスを用いて老化細胞を特異的に生体から除去することにより、衰えた呼吸機能を回復可能であることを示す結果を得た。

### 平成27年度について

当該年度は、通常の老化過程においては肺組織中の肺胞線維芽細胞が細胞老化を起こしていることを明らかにし、またより高齢のマウスにおいても老化細胞の排除が肺機能を回復であることを見出した。また酸化ストレスを軽減する薬剤を野生型マウスに投与し、老化細胞の発生を抑制することにより組織機能を回復可能であるか検討を行った。

主任研究者

杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 (室長)

研究期間 平成25年4月1日～平成28年3月31日

#### A. 研究目的

本研究では細胞生物学的視点から加齢現象を理解することを目標とし、モデル生物を利用して個体老化における細胞老化の役割について明らかにすること、また分子細胞生物学的手法を用いて細胞老化の表現型を発揮・維持するメカニズムについて明らかにすることを目的とする。本研究の成果をもとに、将来的には細胞老化を原因となる加齢性疾患の治療・予防法の開発を目指す。

#### B. 研究方法

3年間全体について

本研究では、加齢に伴う生体機能の変化に老化細胞がどのように関与するのかを明らかにすることを目的とし、研究計画期間に以下の解析を行う。

- ・老化細胞を検出・排除可能なモデルマウスの確立。
- ・モデルマウスを利用し、生体における老化細胞の動態の解析。
- ・老化細胞が発生した組織ではどのような生体機能の変化が見られるのか。
- ・老化細胞を生体から排除することにより、組織機能に変化(回復)は認められるのか。
- ・なぜ老化細胞の出現が組織機能に変化をもたらすのか。

以上の点について解析を行うことにより、老化細胞の生体における役割、および加齢性疾患に関与する可能性について知見を得る。

さらに、モデルマウスを用いて老化細胞を標的とする薬剤の有効性について検討を行う。

平成27年度について

前年度に引き続き、老化細胞と呼吸器の加齢性変化に関し詳細な解析を行う。前年度までは約1年齢のマウスを使用し結果を得た。当該年度は、より老齢のマウスを用いて化細胞排除の影響について呼吸機能検査、および組織形態解析を行う。

また前年度までの結果から、加齢により低下した呼吸器の機能は、老化細胞を排除することによって回復可能であることが強く示唆された。本年度はトランスジーン非依存

的に薬剤によって老化細胞を抑制した時に、呼吸器の機能が回復可能であることを検討する。抗酸化ストレス作用があるとされるN-acetyl cysteine (NAC) は、細胞老化を抑制可能であることが報告されている。我々の行った予備実験においても、培養系細胞老化モデルではNACを培地中に添加することにより、細胞老化が強く抑制されることが確認されている。

本年度は、モデルマウスにNACを投与することにより、ルシフェラーゼシグナルを指標に老化細胞の動態を調べ、NACによって呼吸器内の老化細胞を抑制可能であることを調べる。

NACにより老化細胞の動態に変化が見られたら、スパイロメトリーにより生理機能に対する影響を、また免疫染色により形態学的変化を、RNA解析により老化関連遺伝子の変化を調べる。

(倫理面への配慮)

3年間全体について

実験上必要とされた遺伝子サンプル、動物の取り扱いは「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守した。動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、当該研究施設の動物実験倫理委員会で承認を受けた後に動物実験ガイドラインに則って実施した。

当該研究ではヒトサンプルを取り扱わなかった。

## C. 研究結果

3年間全体について

当該研究では、申請者が樹立したトランスジェニックマウスを用いて解析を行った。このマウスは、細胞老化マーカーである *ARF/INK4a* 遺伝子座を含む約70 kbの人工染色体をトランスジーンとして保持しており、トランスジーン *ARF* 遺伝子エクソンをジフテリア毒素受容体とルシフェラーゼ発現ユニットに置換した。したがって老化細胞特異的にジフテリア毒素 (DT) に感受性を持つようになることが期待される。

まず、このマウス (ARF-DTR マウス) から、生体イメージングシステムを用いて老化細胞の検出を行った。2ヶ月齢と12ヶ月齢マウスを用いてルシフェラーゼ発光を比較したところ、2ヶ月齢では殆ど発光は検出されなかったのに対し、12ヶ月齢では複数の組織で発光が検出された。次にどの組織においてルシフェラーゼ発光が見られるのか調べるために、12ヶ月齢マウスを開腹してイメージングを行ったところ、12ヶ月齢時点では主に脂肪組織と肺ルシフェラーゼの活性が認められた。12ヶ月齢におけるルシフェラーゼ活性の分布は、以前に我々が示した内在性の細胞老化マーカーの発現分布と一致していることから、老化細胞の蓄積を反映するものと考えられた。

以上の結果を踏まえ、マウス生体から老化細胞の除去可能かどうかを検証した。マウスの細胞は、ジフテリア毒素受容体分子が存在しないため、同毒素に対し耐性を持つ。しかしながらマウスの細胞にも、ジフテリア毒素受容体として機能するヒト HB-EGF を発現させることにより、毒素に対して感受性を持つようになることが知られている。肺、脂肪組織にルシフェラーゼ活性が認められた 12 ヶ月齢のマウスに、ジフテリア毒素を投与したところ、投与後 2 日で肺組織からルシフェラーゼ活性の消失が認められた。ルシフェラーゼ活性はその後 2 週間は検出されなかったが、3 週間目には回復が認められた。一方、脂肪組織に関しては肺組織とは異なり、高い再現性を持ってルシフェラーゼ活性の消失は見られなかった。

次に、加齢による肺の生理機能の変化と老化細胞の関係について解析を行った。比較対象として、2 ヶ月齢のマウス、12 ヶ月齢マウス、薬剤投与 12 ヶ月齢マウス（11 ヶ月齢の時点から 2 週間毎に 2 回ジフテリア毒素を投与）を準備した。これらのマウスについて呼吸機能検査（スパイロメトリー）を行ったところ、2 ヶ月齢と比較して 12 ヶ月齢マウスでは明らかなコンプライアンス（伸展性）の増加と組織抵抗の低下が認められた。一方、薬剤を投与したマウスでは、これらのパラメーターが優位に変化し、若い時期に近い値を示した。このような薬剤の効果は、野生型マウスでは見られなかったことから、老化細胞依存的な現象であることが強く示唆された。次に、老化細胞が肺組織の形態に与える影響について解析を行った。上記マウスから肺組織を採取し、定圧で肺を膨らませながら固定し、組織像の解析を行った。肺組織は加齢とともに個々の肺胞の径が大きくなる。これは弾性繊維が失われることにより収縮が不完全になることに起因しており、いわゆる「老人肺」の特徴のひとつである。モデルマウスにおいて肺胞径の測定を行ったところ、2 ヶ月齢と比較して 12 ヶ月齢のマウス肺組織では、肺胞径の顕著な増大が認められた。しかしながら DT 処理を行ったマウスの肺組織では、肺胞径の有意な減少が認められた。これらの結果は、前年度までに行ったスパイロメトリー解析の結果（老化細胞を排除することにより弾性が回復する）と一致している。

次に、肺組織から RNA を抽出し、遺伝子発現の変化について解析を行った。老化した細胞の特徴である SASP に関連した遺伝子群について、リアルタイム PCR で定量を行ったところ、いくつかの遺伝子の変動については老化細胞の動態と強い相関関係が認められた。

さらに老化細胞の動態に関連した遺伝子発現の変化について網羅的に解析するために、抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、加齢により変動があった遺伝子群のうち、約 60% の遺伝子が、若い状態へと近づくことが明らかになった。また Gene Ontology 解析の結果、免疫や炎症反応に関わる遺伝子の多くが、老化細胞の動態と関連した変動を示した。従って生理機能だけでなく、遺伝子発現の観点からも老化細胞を排除した肺組織は“若返って”いることが示唆された。

肺組織の弾性の低下は、加齢に伴って生じるエラスチンを主成分とする弾性繊維の低下に起因する。そこで次にこれらマウスの肺組織におけるエラスチン量の変化について、解

析を行った。肺組織切片を同一条件下で、エラスチン抗体で染色し、視野あたりの総シグナル強度について、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて定量した。その結果、12ヶ月齢マウスの肺組織では、2ヶ月齢マウスに比べて顕著なエラスチン量の低下が確認された。しかしながら DT 処理を行った12ヶ月齢マウスの肺組織では、コントロール処理群と比較して、有意なエラスチン量の回復が見られた。野生型マウス組織ではこのような効果は見られないことから、12ヶ月齢マウス肺組織におけるエラスチン量の回復は、老化細胞の排除に起因するものと思われる。

前年度までに得られた結果を含め、以上の結果を統合的に考えると、呼吸器の加齢性変化の特徴のひとつである組織弾性の低下は、老化細胞の蓄積によって肺組織内のエラスチン繊維量が低下することに起因することが強く示唆される。また、肺組織内に老化細胞が出現すると、老化していない細胞を含め、肺組織全体の遺伝子発現プロファイルに大きな変化が現れる。このような変化が組織全体のエラスチン量に影響を与えている可能性が考えられる。

平成27年度について

当該年度は、より老齢20カ月齢以上のマウスを入手できるようになったので、これら老齢マウスについて同様の実験を行った。まず、老齢マウスで生体イメージングを行ったところ、1年齢マウス同様に肺組織と脂肪組織に強いルシフェラーゼ発光が観察された。DTを2週間おきに2回投与したマウスでは、1年齢マウス同様に肺組織においてのみ再現性を持ってルシフェラーゼ発光シグナルの消失が認められた。

次にこれらのマウスを用いて呼吸機能の解析を行った。老齢マウスの静肺コンプライアンスは、1年齢マウスのそれと大きく変わらないことから、組織弾性の低下は1年齢の時点でプラトーに達しているものと考えられた。DT処理を行った老齢マウスは、静肺コンプライアンスに有意な低下は認められたが、1年齢に比べその影響は小さいものであった。

次に老齢マウス肺組織を定圧で膨らませ、平均肺胞壁間距離の測定を行った。DT処理を行ったマウスでは、1年齢マウスよりも影響は小さいが同様に肺胞サイズが縮小する傾向にあることが分かった。

以上の結果から、老化細胞は肺組織における加齢性変化の一因であり、さらに老化細胞を排除したマウスでは肺組織弾性が回復することが強く示唆された。

次に本研究では、細胞老化を抑制する薬剤を投与し、肺組織機能を回復させることが可能であるかについて検討を行った。本研究では、活性酸素種のスカベンジャーとして機能することが知られている NAC について評価を行った。最初に、NAC が *ARF/INK4a* の発現に影響を与えるか、*ARF-DTR* マウスから採取した *MEF* を用いて検討を行った。

*ARF-DTR MEF* を NAC 存在下もしくは非存在下で継代培養を行い、ルシフェラーゼ活性をそれぞれの継代サンプルで測定を行ったところ、非存在下で培養したものについてはけいだいとともに著しいルシフェラーゼ活性の上昇が見られたのに対し、NAC 存在下で培養した *MEF* においてはルシフェラーゼ活性は継代による変化は見られなかった。また *ARF*

および INK4a タンパク質についても発現を調べたところ、NAC により強い発現の抑制が見られた。これらのことから、NAC が ARF-DTR マウス細胞の細胞老化を抑制することが確認された。

次に 1 年齢 ARF-DTR マウスに NAC を投与し、肺組織のルシフェラーゼ活性に対する影響を評価した。8 週間 NAC を含む飲料水を投与したマウスでは、コントロール群と体重の変化は見られなかったが、肺組織のルシフェラーゼ活性は有意に低下していた。これらのマウスを用いて、NAC 投与の肺組織機能に対する影響を検討したところ、静肺コンプライアンスは NAC 投与群では有意に減少が認められた。

また、これらマウスから肺組織切片を作製し、形態的評価を行ったところ、NAC 投与群では肺胞径の縮小が認められた。さらにエラスチン量についても免疫組織染色サンプルの定量により評価を行ったところ、NAC 投与群では顕著な増加が認められた。以上の結果から、NAC は肺の加齢性変化を改善する作用を持つことが示唆された。

次に NAC が肺組織における細胞老化関連遺伝子の発現に対し、どのような影響を持つのかについて調べた。肺組織から抽出した RNA をリアルタイム PCR 法により、一連の細胞老化関連遺伝子について相対的発現定量を行ったところ、*ARF*、*INK4a* の発現が NAC 投与群では有意に減少していた。このことから、NAC は肺組織の細胞老化を抑制する効果があることが示唆された、またその他複数の細胞老化関連遺伝子の発現を調べた結果、*IL-6* や *MMP* 遺伝子群の発現が NAC により抑制されることが示唆された。

以上の実験結果から、NAC は生体内においても細胞老化を抑制し、肺の機能を改善する効果を持つことが強く示唆された。

#### D. 考察と結論

##### 3 年間全体について

ヒトやマウスにおいて老化細胞は、加齢とともに様々な組織に蓄積することが知られている。しかし老化細胞が組織の加齢性変化にどのような影響を及ぼすのかについては、殆どわかっていない。本研究では、独自に樹立したモデルマウスを用いて、呼吸器の加齢性変化における老化細胞の役割について解析を行った。

呼吸器の老化は、弾性繊維の低下による収縮力の低下に特徴づけられる。このような機能が低下した呼吸器は老人肺とも呼ばれ、肺気腫のリスクになると考えられている。本研究からは、肺組織内の老化細胞を排除することにより、呼吸器の生理機能が回復することを示す結果が得られた。組織学的解析から、老化細胞を排除した肺組織では、エラスチン量の回復が認められた。肺組織における遺伝子発現変化を調べたところ、老化細胞の動態と強い相関を示して *MMP* などのエラスチン分解活性を持つ因子の増減が見られた。培養細胞系の細胞老化モデルでは、*MMP* の活性を阻害することにより、細胞老化時にエラスチ

ン量の回復がみられた。肺組織内においても、同様の機構を介してエラスチン量の変化が変化するのではないかと考えられる。

網羅的な遺伝子発現解析の結果から、数百に及ぶ遺伝子の発現が加齢により変化することが示された。そのうち約6割の遺伝子発現変化は老化細胞を排除することにより可逆的な変化を見せたが、4割については老化細胞排除の影響を受けなかった。これらの結果は肺組織の加齢性変化のすべてが細胞老化に依存しているわけではないことを強く示唆している。

本研究では、遺伝子改変マウスを用いて老化細胞の排除を行い、老化細胞を排除することにより肺組織の機能を改善させることが可能であることを示した。このことは、老化細胞が肺組織の機能を改善させるための創薬を行う上で極めて有効な標的であることを示唆している。本研究ではさらに、薬剤を用いてトランスジーン非依存的に老化細胞の阻害を試みた。NACは細胞内で活性酸素腫のスカルベンジャーであるグルタチオン合成を亢進させる。活性酸素腫は細胞老化を誘導する大きな要因であり、本研究においても培養系の細胞老化をほぼ完全にNACが抑制することを示した。生体内においても、効果は小さいがNACが肺組織の細胞老化を抑制し、組織機能を改善することを示すデータを得た。しかしながら、細胞老化は生体内で癌抑制機構としての側面を持っており、モデルマウスにおいてNACの投与により癌が亢進することが報告されている。したがってヒトへのNACの投与は避けるべきかも知れない（米国においてはサプリメントとして販売されている）。しかし近年、老化細胞だけを選択的に死滅させる薬剤（senolytic agents）の開発が試みられている。現在までにチロシンキナーゼとPI3キナーゼ阻害剤の併用やBCL-2ファミリー阻害剤が生体で老化細胞を排除することができると報告されている。しかしながらこれら薬剤の標的は細胞の増殖に大きく影響を与えることが考えられるので、副作用も大きく、臨床応用は困難であると考えられる。したがってsenolytic agentとしては、より老化細胞に特異的な機能を発見し、標的とすることが必要である。

細胞老化は現在、様々なヒトの疾患との関連が示唆されている。本研究では肺組織の老化細胞の役割に焦点を当てて研究を行ったが、本研究で樹立したマウスは、将来的には様々な組織の老化現象や疾患の研究に応用が可能であると期待される。

## E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

平成25年度

- 1) Kawagishi, H., Hashimoto, M., Nakamura, H., Tsugawa, T., Watanabe, A., Kontoyiannis, D. L., and **Sugimoto, M.** HuR maintains replicative lifespan by suppressing ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* *33*. 1886-1900. 2013. (Featured article)
- 2) Takagi, M., Piao, J., Kawagishi, H., Imai, C., Ogawa, A., Watanabe, A., Akiyama, K., Kobayashi, C., Mori, M., Ko, K., **Sugimoto, M.**, and Mizutani, S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous repression of JMML. *Leukemia* *27*. 1926-1928 2013.
- 3) Unno, J., Takagi, M., Piao, J., **Sugimoto, M.**, Honda, F., Maeda, D., Masutani, M., Kiyono, T., Watanabe, F., Morio, T., Teraoka, H., and Mizutani, S. Artemis-dependent DNA double strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Science* *104*. 703-710. 2013.

平成 26 年度

- 1) Takagi M., Uno M., Nishii R., Sugimoto M., Hasegawa S., Piao J., Ihara N., Kanai S., Kakei S., Tamura Y., Suganami T., Kamei Y., Shimizu T., Yasuda A., Ogawa Y., and Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation and contributes to glucose homeostasis. *Cell Rep.* *10*. 957-967. 2015
- 2) Hashimoto M, Tsugawa T, Kawagishi H, Asai A, Sugimoto M. Loss of HuR leads to senescence-like cytokine induction in rodent fibroblasts by activating NF- $\kappa$ B. *Biochim Biophys Acta.* *1840*. 3079-3087. 2014

平成 27 年度

なし

2. 学会発表 平成 25 年度

- 1) 杉本昌隆 転写後発現調節機構を介した細胞老化の制御 第 65 回日本細胞生物学会 シンポジウム 名古屋, 2013 年 6 月 21 日 (招待講演)
- 2) 橋本理尋、川岸裕幸、杉本昌隆 転写後発現調節機構を介した細胞老化の制御 日本基礎老化学会第 35 回大会, 大阪, 2013 年 6 月 5 日
- 3) Tusugawa, T., Hashimoto, M., Kawagishi, H., and Sugimoto, M. Regulation of senescence-associated phenotypes by RNA-binding protein HuR. *Salk Symposia Mechanisms and Models of Cancer*, August 9, 2013.

平成 26 年度

- 1) Sugimoto, M. Restoration of pulmonary function in aged animal by eliminating senescent cells. *The 2015 Aging Summit*, London (UK), February 11, 2015
- 2) 橋本理尋、浅井あづさ、杉本昌隆 老化細胞除去による呼吸機能の回復 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日



- 3) 杉本昌隆、橋本理尋、浅井あづさ Ablation of senescent cells ameliorates age-associated pulmonary hypofunction 日本基礎老化学会第 37 回大会, 愛知, 2014 年 6 月 27 日

平成 27 年度

- 1) Sugimoto, M. Role of cellular senescence in lung aging. 日本基礎老化学会第 38 回大会 日韓合同シンポジウム 横浜市, 2015 年 6 月 13 日
- 2) Sugimoto, M. Ablation of ARF-expressing cells ameliorates aging-associated pulmonary hypofunction. Biology of Ageing, Singapore, 2015 年 10 月 23 日
- 3) 杉本昌隆 Pathophysiological roles of cellular senescence in pulmonary aging. BMB2015 ワークショップ, 神戸, 2015 年 12 月 2 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

名称: ハイブリドーマ

発明者: 杉本昌隆、中村英亮

権利者: ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 特許第 5671669 号

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし