

呼吸器の病態における細胞老化の役割に関する研究に関する研究（28-22）

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・免疫研究室（室長）

研究要旨

ヒトを含む哺乳動物の細胞は、DNA損傷や酸化ストレスによる慢性的なストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。細胞老化は生体内で極めて重要な癌抑制機構として機能することが知られていたが、近年では癌意外にも様々な疾患に関与することが明らかになりつつある。加齢に伴い細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は、ヒトやマウス等の実験動物において様々な組織において蓄積することが古くから知られていたが、その生理的意義については長い間不明であった。近年、老化した細胞からは様々な生理活性物質が分泌され、周辺の正常な細胞の機能に影響を与えることが示された。この様な老化細胞特異的な分泌表現型はSASP（senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれ、SASPを介した老化細胞の非細胞自律的な機能が加齢に伴う生体機能の変化に関与することが指摘されている。

慢性閉塞性呼吸器疾患（COPD）や肺癌などの呼吸器疾患は、我が国を含め世界中の多くの地域で死因の上位を占めている。これら疾患のリスクは加齢とともに上昇することから、老化に伴って生じる呼吸器の生理的な変化が、疾患が発生しやすい組織内の環境を形成していると考えられる。しかしながら、呼吸器の老化が組織機能の変化を起こす原因については殆ど解明されていない。

我々は最近、生体内から任意の時期に老化細胞を特異的に排除可能なマウスを作製した。このモデルマウスを用いた研究から、これまでに肺組織の細胞老化が呼吸器の機能低下を引き起こすことを見出している。ヒトの呼吸器疾患においても、細胞老化が亢進していることが報告されており、ヒトの病態においても老化細胞が関与する可能性が強く示唆される。そこで本研究では、細胞レベルでの老化に観点から、加齢に伴って生じる細胞の質的变化が呼吸器の生理機能に及ぼす機構について明らかにし、さらにモデル動物を用いて呼吸器疾患の発生や進行と細胞老化の因果関係について解明することにより、呼吸器疾患の病態解明と新たな創薬基盤の確立を目指す。

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・免疫研究室（室長）

分担研究者

佐藤 匡 順天堂大学 大学院医学研究科呼吸器内科学講座（准教授）

A. 研究目的

COPD や肺癌などの呼吸器疾患は、現在我が国においても死因の上位を占めており、その対策は急務とされる。しかしながら呼吸器の病態を研究する動物モデルは限定的であり、有用な病態解明モデルの開発が必要である。我々の樹立したモデルマウスでは、生体イメージングにより長期間に渡り同一個体で老化細胞の動態を調べることが可能であり、また呼吸器から老化細胞だけを特異的に排除可能である。このモデルマウスは呼吸器の加齢変化や細胞老化を原因とする疾患の解析に極めて有用なモデルである本研究では、我々の樹立したモデルマウスを用い、細胞老化が呼吸器の機能変化を引き起こす機構を明らかにすること、及び病態モデルを樹立し、老化細胞と呼吸器の疾患発症にどのように関与するのかについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、申請者が樹立した肺組織から老化細胞を特異的に排除可能なマウス（ARF-DTRマウス）と、肺気腫や肺への癌転移モデルを組み合わせ、老化細胞を排除したときにこれら肺組織病態の変化について調べることにより、加齢によって生じる肺組織の細胞老化が呼吸器の疾患にどのような影響を与えるのか解析を行った。

1) エラスターゼ吸入肺障害モデル

5ヶ月齢の雌性野生型およびARF-DTRマウス（C57BL/6J）に豚膵臓由来エラスターゼ5 unit またはPBSを経鼻投与し、3週間後に肺機能測定（スパイロメトリー）、サンプリングを昨年度から引き続き行った。

老化細胞除去はDT（50 μ g/kg）もしくはPBSを2週間おきに2回腹腔内投与し、サンプリングは2回目の投与から2週間後に行った。ARF-DTRマウスについてはサンプリング前日にルシフェラーゼ生体イメージングを行い、肺組織内の老化細胞の動態を確認した。

エラスターゼ誘導性肺気腫モデルにおいては、エラスターゼ処理後初期に生じる肺胞内の炎症が重要で洗うことが報告されている。そこでエラスターゼ吸入後1週間後の肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF）を調製し、BALF内の免疫細胞の動態について計測を行った。

2) 喫煙刺激モデル

2.5ヶ月齢の雌性 ARF-DTR マウス (C57BL/6J) に4週間 (1日30分間、週5日間) 喫煙刺激を行った。喫煙刺激時のタバコ煙は3.5%の濃度に希釈し、1分あたり 6puff×15 ml で行った。DT 処理と老化細胞の動態解析についてはエラスターゼ吸入時と同様に行った。喫煙刺激終了後肺機能の測定を行った。

3) メラノーマ肺転移モデル

12ヶ月齢雌性野生型もしくは ARF-DTR マウス (C57BL/6J) に2週間おきに2回 DT (対照群は PBS) 処理を行い、3回目の DT 処理と同日に尾 4×10^5 個のマウス転移性メラノーマ細胞株 B16-F10 を尾静脈より注入した。2週間後にマウスを安楽死させ、肺組織 (左肺) を解剖し、転移巣の数を調べた。

また老化細胞依存的に肺組織内での動態が変化する因子 (senescence-dependent alveolar factor, SAF) を同定するために、DT 処理・未処理肺組織から BALF を調製し、抗体アレイにより変動する液性因子について調べた。

(倫理面への配慮)

実験上必要とされる遺伝子サンプル、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は使用しなかった。

C. 研究結果

1) エラスターゼ吸入による障害モデルの解析

昨年度に主任研究者は、エラスターゼ吸入による再現性の高い肺気腫誘導モデルを樹立した。エラスターゼ吸入3週間後の肺組織を観察した結果、組織内で広範囲におよぶ肺胞壁の崩壊が認められた。しかしながら老化細胞を排除した ARF-DTR マウスにおいては、エラスターゼによる影響は低く抑えられる傾向が見られたため、形態計測による組織形態の変化について定量を行った。これらのマウスで呼吸機能検査を行ったところ、顕著な組織弾性の低下 (組織コンプライアンス値の上昇) がみられた。(昨年度報告書参照)。

エラスターゼ誘導性肺気腫においては、エラスターゼ処理後初期に肺胞内で惹起される炎症反応が病態の進行に重要であることが報告されている。エラスターゼ吸入1週間後のマウス BALF 細胞を調べたところ、細胞数の顕著な上昇が認められた。BALF 細胞の大部

分（8割以上）は肺胞マクロファージが占めていた。またマクロファージ以外にも、好中球、好酸球の増加が認められた。しかし老化細胞を除去したマウス BALF ではエラスターゼによる BALF 細胞動態の変化は抑えられていた。

2) 喫煙刺激モデルの解析

本研究では、ヒトの呼吸器疾患の主要な原因となる喫煙による肺機能低下モデルにおける老化細胞除去の影響について昨年度より引き続き解析を行った。2.5ヶ月齢の雌性マウスに喫煙刺激を4週間行い、同時に老化細胞除去群では DT 処理を行った。喫煙刺激開始4週間後に生体イメージングにより老化細胞の動態を解析し、また肺組織から抽出した RNA から細胞老化マーカーである *INK4a/ARF* 遺伝子の発現を調べた。その結果、DT 処理を行ったマウス肺ではルシフェラーゼの発現低下とともに *INK4a/ARF* 遺伝子の発現の低下が認められ、これらマウス肺から老化細胞を排除できたことが確認された。

これらのマウスの肺機能検査を行った。4週間の喫煙刺激を行ったマウスでは、コントロール群 (air) と比較して肺機能の低下が見られた。しかしながら DT 処理により老化細胞を肺組織から排除したマウスでは、コントロールマウスと静肺コンプライアンスの値に有意な差は見られなかった。

また、マウス肺組織切片を作製し、平均肺胞壁間距離および肺胞内に存在するマクロファージ数を計測したところ、喫煙刺激により共に値は有意に増加し、老化細胞除去により増加が抑えられた。

3) メラノーマ肺転移モデルの解析

本研究班では、マウスメラノーマ由来 B16-F10 細胞株を用い、メラノーマ肺転移モデルの樹立を行った。このモデルを用いて昨年度までに、老化細胞除去がメラノーマの肺転移へと及ぼす影響について解析を行い、肺組織内の老化細胞がメラノーマの肺転移を促進することを見出した（昨年度報告書）。しかし同じ細胞を皮下移植した際の腫瘍形成には変化がなかったことから、肺組織内に特異的な影響であることが示唆された。

これまでの結果から、老化細胞依存的に肺組織内で変動する液性因子がメラノーマの肺転移の影響を与える可能性が考えられたため、BALF 中に分泌される老化細胞依存的肺胞液性因子 (senescence-dependent alveolar factor, SAF と命名) の同定を抗体アレイにより試みた。その結果、老化細胞と関連した変動を示す因子を一つ見出した。この因子を SAF-1 と名付けた。免疫ブロットおよび ELISA 法により、SAF-1 の変動について確認したところ、どちらの実験結果からも肺組織内で老化細胞除去により SAF-1 量が低下することを示す結果を得た。しかしながらこのような変化は、血中では認められないことから、肺組織に特異的な変化があることが強く示唆された。

D. 考察と結論

平成 29 年度までの解析結果から、肺組織内の老化細胞は、肺気腫モデルにおいて病態を促進させることを示す結果を得た。肺気腫は肺胞内の炎症を伴い、マウスエラスターゼ誘導性肺気腫モデルにおいては、上述した様に初期の炎症が重要であり、これを抑制することにより病態の進行を抑えることが可能であることが報告されている。老化細胞を排除したマウス肺では、エラスターゼ吸入後初期に見られる炎症性細胞の増加が抑制されていた。したがって肺組織内の老化細胞は、炎症が惹起されやすい環境を作ることにより、病態を加速させる働きを持つことが考えられる。同様に、喫煙刺激モデルにおいても老化細胞の除去により、呼吸機能の保持と炎症の抑制が観察された。これらの結果から、肺組織内の老化細胞は、気腫のような疾患において有効な治療・予防標的であることが強く示唆された。本研究では、改変遺伝子に依存した老化細胞除去を行ったが、ヒトに本研究から得られた知見を応用するには、このような方法は不可能である。しかし近年、老化細胞特異的に細胞死を誘導する活性を持つ薬剤が複数報告された。この様な薬剤は“Senolytic”薬と呼ばれ、これら薬剤を用いることにより、ヒトにおいても老化細胞除去が可能になるかもしれない。最終年度は、肺気腫モデルにおいて Senolytic 薬の有効性について検討を行う。

メラノーマ肺転移モデルにおいては、老化細胞の排除が癌細胞の肺転移を抑制するという結果を得た。細胞老化は、古くからは癌抑制機構として機能することが知られていたが、近年発見された SASP を介して細胞非自律的に癌を促進することも報告されている。以前の解析から、肺組織内に存在する老化細胞の数は、他の組織と比較すると多いが、それでも絶対数は肺の細胞の 1%以下と極めて少ない。したがってメラノーマ肺転移に関しては老化細胞の細胞非自律的な機能を介することが考えられた。本研究では、老化細胞依存的に肺組織内に分泌される液性因子を少なくとも一つ同定した。最終年度はこの因子がメラノーマ細胞の転移能に与える影響について詳細な解析を行う。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Sato T, Sugimoto M, Baskoro H, Karasutani K, Mitsui A, Nurwidya F, Arano N, Kodama Y, Hirano S, Ishigami A, Seyama K, Takahashi K. Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*,

492(1):74-81, 2017.

- 2) Nishino K, Yoshimi K, Shibuya T, Hayashi T, Mitani K, Kobayashi E, Ichikawa M, Asao T, Suzuki Y, Sato T, Shiota S, Kodama Y, Takahashi K, Seyama K. Protein-losing Enteropathy Caused by Intestinal or Colonic Lymphangiectasia Complicated by Sporadic Lymphangiomyomatosis: A Report of Two Cases. Intern Med 56(8): 943-948, 2017.

2. 学会発表

- 1) 荒野直子、佐藤 匡、烏谷恵子、Hario Baskoro、鈴木洋平、三井亜樹、児玉裕三、近藤嘉高、石神昭人、瀬山邦明、高橋和久. COPD モデルマウスを用いたビタミンC 治療による肺胞修復メカニズムの遺伝子学的解析. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017 年 4 月 21 日
- 2) 小村萌起、荒野直子、佐藤 匡、鈴木洋平、吉川仁美、柳下薫寛、佐々木信一、高橋和久. COPD 増悪症例における再増悪と安定期治療との関連について. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017 年 4 月 22 日
- 3) Hario Baskoro, Tadashi Sato, Keiko Karasutani, Yohei Suzuki, Naoko Arano, Moegi Komura, Mitsuaki Sekiya, Yuzo Kodama, Kuniaki Seyama, Kazuhisa Takahashi. Regional heterogeneity of airway epithelial cells in response to cigarette smoke extract. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017 年 4 月 21 日
- 4) Yohei Suzuki, Tadashi Sato, Masataka Sugimoto, Hario Baskoro, Keiko Karasutani, Aki Mitsui, Yuzo Kodama, Mitsuaki Sekiya, Akihito Ishigami, Kuniaki Seyama, Kazuhisa Takahashi. Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice. American Thoracic Society International Conference 2017, Washington DC (USA), 2017 年 5 月 21 日
- 5) 三河隆太、鈴木洋平、佐藤 匡、杉本昌隆 Clearance of senescent cells ameliorates emphysema-associated pathologies in mice 第 30 回日本老年学会総会、名古屋, 2017 年 6 月 15 日
- 6) 杉本昌隆 Roles of cellular senescence in pulmonary aging and disease. 第 49 回日本結合組織学会学術大会ワークショップ、三重県、2017 年 6 月 17 日
- 7) 佐藤 匡、Hario Baskoro、荒野直子、鈴木洋平、烏谷恵子、三井亜樹、児玉裕三、瀬山邦明、高橋和久. 末梢気道と中枢気道におけるタバコ煙曝露に対する反応性の違い. 第 91 回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2017 年 7 月 15 日
- 8) 鈴木洋平、佐藤 匡、杉本昌隆、Hario Baskoro、烏谷恵子、三井亜樹、荒野直子、

児玉裕三、佐藤文平、平野伸一、黒川亮介、石神昭人、瀬山邦明、高橋和久. 水素分子が慢性タバコ煙曝露によるマウス肺組織傷害に与える影響. 第 7 回日本分子状水素医学生物学会大会, 名古屋, 2017 年 10 月 29 日

- 9) 杉本昌隆 組織老化・疾患における細胞老化の役割 第 3 回川島カンファレンス 特別講演、岐阜県、2017 年 11 月 11 日
- 10) 三河隆太、杉本昌隆 細胞老化の除去による肺気腫病変の抑制 ConBio 2017, 神戸, 2017 年 12 月 8 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし