

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

肺組織病態の形成・修復における細胞老化の役割に関する研究（19-14）

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

ヒトを含む哺乳動物の細胞は、DNA損傷や酸化ストレスなどの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、細胞自律的な癌抑制機構として、極めて重要な役割を持つことが古くから知られていた。さらに近年、申請者を含む複数の研究グループは、生体から細胞老化を起こした細胞（老化細胞）を排除（senolysis）可能な遺伝子可変マウスを樹立し、これらを用いて細胞老化が癌以外にも組織の老化や様々な加齢性疾患に関与することを明らかにした。

老化細胞からは、様々な生理活性物質が分泌され、周辺環境に影響を与える。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、現在ではSASPを介した老化細胞の細胞非自律的な働きが、組織の老化や疾患において重要な役割を持つと考えられている。

申請者は平成30年度までの長寿医療研究開発費（28-22）によって行った研究において、senolysisマウス（ARF-DTRマウス）を独自に作製し、肺組織の老化が加齢に伴って蓄積する老化細胞に起因すること、さらにエラストラーゼ誘導性肺気腫モデルマウスを用いて、老化細胞が存在することにより気腫病態が増悪化されることを報告した（Hashimoto et al, 2016; Mikawa et al, 2018）。

本研究では呼吸器疾患における新規創薬標的の探索や治療法開発の基盤形成を行うことを目的とし、先進国で死因の上位を占める肺気腫および転移性肺がんの疾患モデルを用い、細胞老化の視点から病態の形成・修復機構について解析を行った。

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)

分担研究者 (2020年度～)

上田 潤 旭川医科大学 研究教育推進センター (准教授)

A. 研究目的

現在、先進国では慢性閉塞性肺疾患（COPD）や肺がんなどの呼吸器疾患が死因の上位を占めており、基礎分野を含めた研究開発は極めて重要である。本研究では、モデル動物を用いた研究により、呼吸器疾患における新規創薬標的の探索や治療法開発の基盤形成を行うことを目的とした。

B. 研究方法

申請者の研究グループでは、生体から任意の時期に老化細胞を排除可能なマウス（ARF-DTR）マウスを樹立した。このマウスは、細胞老化特異的にルシフェラーゼとジフテリア毒素受容体（DTR; diphtheria toxin receptor）を発現するため、生体イメージングによりルシフェラーゼ活性を指標として老化細胞の動態を解析することが可能であり、さらにジフテリア毒素（DT; diphtheria toxin）を投与することにより、老化細胞を生体から排除することが可能である。これまでにこのマウスを利用して、加齢した個体において低下した肺機能を回復可能であること、エラストラーゼ誘導性肺気腫モデルにおいて老化細胞の除去により病態が軽減されることを報告した（Hashimoto et al, 2016; Mikawa et al, 2018）。

本研究では、1）エラストラーゼ誘導性肺気腫および2）メラノーマ細胞移植による転移性肺がんの動物モデルを使用し、ARF-DTRマウスを用いた老化細胞除去系と組み合わせ、細胞老化の視点から疾患の発症および病態形成機構の解析を行った。

2020年度には外部機関研究者を分担研究者とし、新たな呼吸器病態解析マウスモデルの樹立を進めた。

（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遵守し、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。ヒト検体の解析は国立長寿医療研究センターの規則に則って行った。

C. 研究結果

報告者は以前に、エラストラーゼ誘導性肺気腫モデルを用いて老化細胞の病態形成におけ

る役割について報告した (Mikawa et al. 2018)。エラストラーゼモデルは簡便で再現性が高いモデルであるが、ヒトにおいては希少な汎小葉性肺気腫モデルに近い秒謡を示す。そこで、ヒトで一般的な小葉中心性肺気腫に近いモデルとして、昨年度までに喫煙刺激誘導性肺障害モデルの解析を行い、本モデルにおいても老化細胞の排除が病態を緩和することを報告した (Mikawa et al. 2020)。これらの研究結果から、老化細胞が肺気腫の創薬・治療標的として有効であることが期待された。しかしながら、本年度までの解析から、既に病態を発症した肺気腫マウスにおいては、老化細胞の排除の表現型は限定的であり、呼吸機能の回復は殆ど見られなかった。しかしながら、機能的回復が認められた肺組織においても、老化細胞を排除した

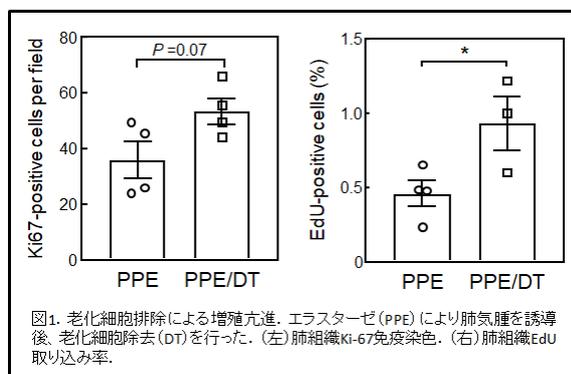


図1. 老化細胞排除による増殖亢進。エラストラーゼ (PPE) により肺気腫を誘導後、老化細胞除去 (DT) を行った。(左) 肺組織Ki-67免疫染色。(右) 肺組織EdU取り込み率。

肺柔組織の細胞では明らかな増殖傾向が認められたことから、組織の再生が老化細胞の除去により促進されている可能性が示唆された (図1)。そこで本研究では、肺組織のニッチ環境を整えて組織再生をさらに促進することを目的として、肺組織前駆細胞の移植と老化細胞廃除の併用による治療モデルの確立を試みた。肺線維症モデルを用いた先行研究においては、間葉系幹細胞や脂肪由来幹細胞の移植が有効であることが示されているが、これら幹細胞は長期間にわたり肺組織への生着が見られず、その効果も限定的であることが指摘されていた。そこで、本研究では肺スフェロイド細胞 (LSC) の調整と移植を行った。LSC は肺組織に移植しても長期間生着が可能であり、またヒトにおいても気管支生検により採取可能であることが報告されている。

報告者は昨年度、マウス LSC 培養系を確立して肺組織への移植実験を行い、移植 4 週間後においても LSC の肺組織内への生着していることを確認した (図2)。本年度はこの系を用い、肺気腫モデルマウスに対する老化細胞除去との併用効果について調べた。スパイロメトリーによる呼吸機能検査の結果から、エラストラーゼ投与により気腫病態を発症したマウスでは、老化細胞除去または

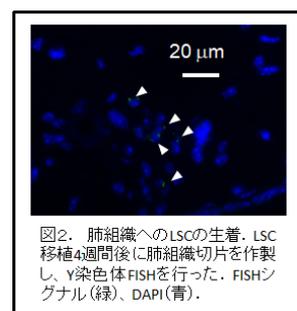


図2. 肺組織へのLSCの生着。LSC移植4週間後に肺組織切片を作製し、Y染色体FISHを行った。FISHシグナル(緑)、DAPI(青)。

LSC 移植単独では有意なレベルまで呼吸機能の回復は見られなかった。しかしながら両者を併用した肺気腫マウスでは、形態的变化とともに呼吸機能のパラメータに有意な回復が認め

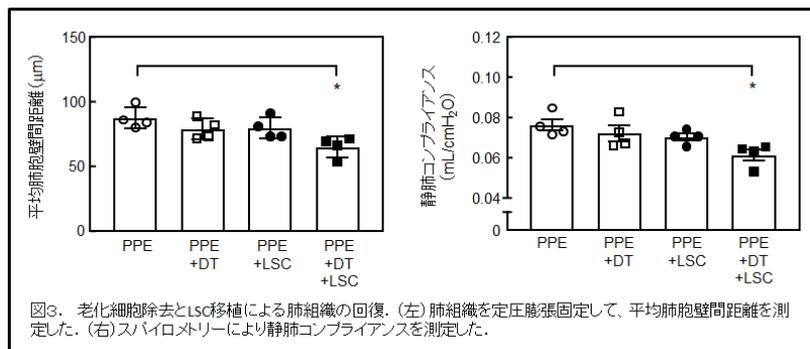


図3. 老化細胞除去とLSC移植による肺組織の回復。(左) 肺組織を定圧膨張固定して、平均肺胞壁間距離を測定した。(右) スパイロメトリーにより静肺コンプライアンスを測定した。

られ (図3)、老化細胞が肺組織前駆細胞の活性に影響を与えることが強く示唆された。

肺組織では多くの細胞が組織幹・前駆細胞として機能し得ることが報告されている。その中でも終末細気管支に存在する BASC (bronchioalveolar stem cell) は、組織が障害を受けたときに活性化され、気管と肺胞の再形成を促進する重要な役割を持つことが報告されている。老化細胞除去と LSC 移植を併用した際に観察された組織機能再生と BASC の関連について調べるために、気腫マウスにおける BASC の動態について解析を行った。その結果、終末細気管支における BASC (CC10⁺; Sftpc⁺) 数は、老化細胞除去または LSC 移植単独では変化を示さなかったが、両者を併用した気腫肺では有意な増加が認められた (図4)。これらの結果は、老化細胞の除去は BASC 依存的な肺組織再生を促進することを強く示唆している。BASC と老化細胞の関係について明らかにするために、本年度から旭川医科大学の上田 潤博士を分担研究者とし、BASC を ablation 可能な遺伝子改変マウスの作製を開始した。

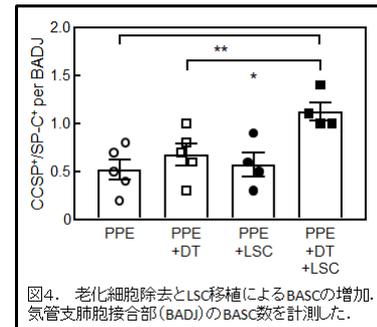


図4. 老化細胞除去とLSC移植によるBASCの増加. 気管支肺胞接合部 (BADJ) のBASC数を計測した。

2) 転移性肺がんにおける細胞老化の役割

昨年度までに、メラノーマ肺転移モデルを用いて肺組織の老化細胞の除去ががん細胞の肺転移を抑制することを見出した。この現象は、老化細胞依存的な液性因子の変化によって引き起こされることが考えられ、報告者は老化細胞依存的に肺組織・血中で変動する因子 SAF-1 を見出した

(図5)。これまでの解析から、この因子はがん細胞に直接作用して、その浸潤活性を上昇させることを示す結果を得ている (図

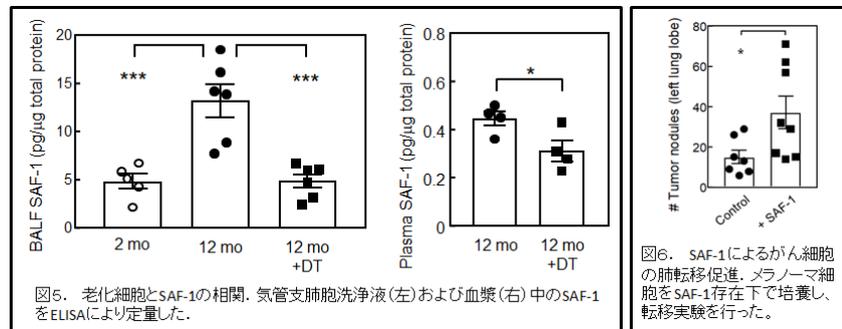


図5. 老化細胞とSAF-1の相関. 気管支肺胞洗浄液(左)および血漿(右)中のSAF-1をELISAにより定量した。

図6. SAF-1によるがん細胞の肺転移促進. メラノーマ細胞をSAF-1存在下で培養し、転移実験を行った。

6)。

本年度は、転移性肺がんにおける SAF-1 の役割について明らかにするために、を転移性肺がんモデルへの SAF-1 中和抗体の投与実験を行った。中和抗体を予め投与したマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスに比べ、がんの肺転移に顕著な低下が認められた (図7)。これらの結果からは、老化細胞依存的ながん転移の促進に SAF-1 極めて重要な役割を持つことが示唆された。

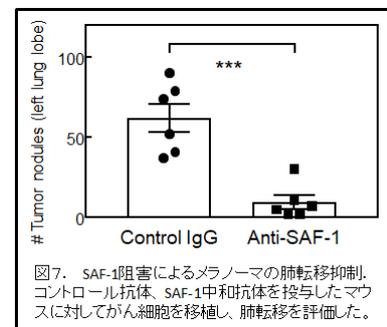


図7. SAF-1阻害によるメラノーマの肺転移抑制. コントロール抗体, SAF-1中和抗体を投与したマウスに対してがん細胞を移植し、肺転移を評価した。

SAF-1 はがん細胞に直接作用してその浸潤活性を上昇させることから、がん細胞で SAF-1 によって影響を受ける遺伝子について解析を行った。その結果、数十の遺伝子が再現性を持って SAF-1 によって増加または減少することが示された。これらの遺伝子につい

て、ヒトのメラノーマ患者における予後との関連について解析したところ、SAF-1によって誘導される遺伝子群には、その発現上昇がメラノーマの予後不良と相関する遺伝子が多く含まれることが明らかとなった（図8）。

さらに本年度は、ヒト血清（健常人およびメラノーマ患者）を入手

し、病態と血中 SAF-1 の関係について解析を行った。血清はすべて市販されているものを使用した。その結果、転移が認められないメラノーマ患者と健常人の間では血中 SAF-1 濃度に有意な差は認められなかったが、肺転移が認められるメラノーマ患者では血中 SAF-1 濃度の上昇が認められた（図9）。以上の結果より、老化細胞依存的に産生される SAF-1 は、がんの転移や進行度、さらに予後を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。

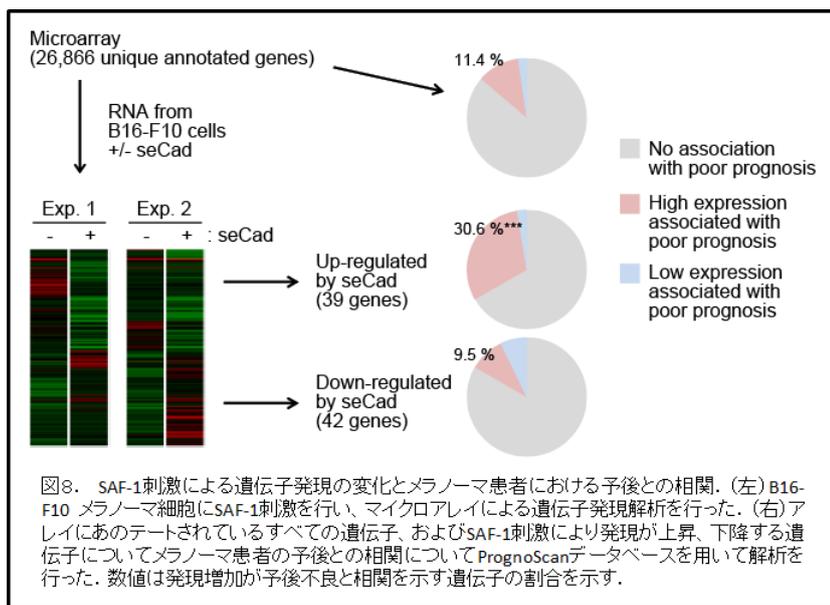


図8. SAF-1刺激による遺伝子発現の変化とメラノーマ患者における予後との相関。(左)B16-F10メラノーマ細胞にSAF-1刺激を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。(右)アレイにあのテストされているすべての遺伝子、およびSAF-1刺激により発現が上昇、下降する遺伝子についてメラノーマ患者の予後との相関についてPrognScanデータベースを用いて解析を行った。数値は発現増加が予後不良と相関を示す遺伝子の割合を示す。

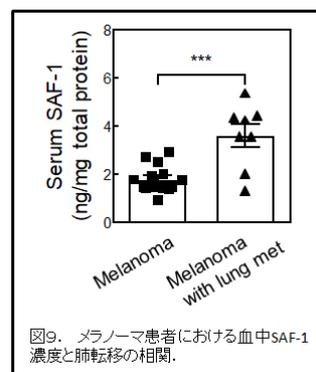


図9. メラノーマ患者における血中SAF-1濃度と肺転移の相関。

D. 考察と結論

呼吸器疾患による死亡率は、年々増加傾向にある。特に、慢性閉塞性肺疾患（COPD）は現在世界で死因の第3位を占めている。我が国において COPD は死因の10位であるが、COPD の罹患率は加齢とともに上昇する傾向にあり、超高齢化社会を迎えた我が国において、この問題は今後肥大化することが予測される。COPD の主要病態である肺気腫に対しては現時点で有効な治療法が確立されておらず、新しい創薬・治療基盤の開発が必要とされる。報告者は動物モデルを用いた解析から、肺組織の細胞老化が病態を増悪化させる因子であることをこれまでに見出した。これらのことから、老化細胞の除去が気腫病態の対して有効であることが期待されたが、本年度までの解析からは、老化細胞の除去だけでは気腫病態に対して十分な効果は得られないことが示された。しかしながら、動物モデルにおいて老化細胞の除去と同時に細胞移植を行うと、肺組織機能の有意な回復が認められたことから、肺気腫の治療に老化細胞の除去と細胞移植の併用が有効である可能性が示唆された。現在、ヒトにおける老化細胞のターゲッティングを目指し、世界中でセノリティッ

ク（老化細胞特異的に細胞死を誘導する薬剤）やセノモルフィック（老化細胞の機能を阻害する薬剤）の開発が進められている。また前述のしたように、本研究で移植に使用した細胞（LSC）はヒトにおいても生検で採取可能であることから、老化細胞除去と細胞移植の併用治療がヒトにおいて実現可能であると考えられる。

一方、転移性肺がんモデルの解析からは、老化細胞依存的ながん転移促進因子の同定と解析が行われた。中和抗体を用いた機能阻害実験から、本研究で同定された因子ががんの転移に極めて重要な役割を持つことが示唆された。また、ヒト患者検体の調査から、血中当該因子の濃度はがんの進行度と強い相関を示すことが明らかになった。これらの結果から、同因子ががん転移に対する創薬標的として有効であること、また血中における同因子量が、がんの予後予測マーカーとして有効である可能性が期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto M., Goto A., Endo Y., Sugimoto M., Ueda J., Yamashita H. Effects of CREG1 on age-associated metabolic phenotypes and renal senescence in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**. 1276. 2021.
- 2) Kawaguchi K., Hashimoto M., Sugimoto M. An antioxidant suppressed lung cellular senescence and enhanced pulmonary function in aged mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **541**. 43-49. 2021.
- 3) Johmura Y., Yamanaka T., Omori S., Wang T.W., Sugiura Y., Matsumoto M., Suzuki N., Kumamoto S., Yamaguchi K., Hatakeyama S., Takami T., Yamaguchi R., Shimizu E., Ikeda K., Okahashi N., Mikawa R., Suematsu M., Arita M., Sugimoto M., Nakayama K.I., Furukawa Y., Imoto S., Nakanishi M. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* **371**. 265-270. 2021.
- 4) Shimizu T., Yamada K., Suzumura A., Kataoka K., Takayama K., Sugimoto M., Terasaki H., Kaneko H. Caveolin-1 Promotes Cellular Senescence in Exchange for Blocking Subretinal Fibrosis in Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61**. 21. 2020.
- 5) Yamada K., Kaneko H., Shimizu H., Suzumura A., Namba R., Takayama K., Ito S., Sugimoto M., Terasaki H. Lamivudine Inhibits *A/u* RNA-induced Retinal

Pigment Epithelium Degeneration via Anti-inflammatory and Anti-senescence Activities. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 9. 1. 2020.

- 6) Mikawa R., Sato T., Suzuki Y., Baskoro H., Kawaguchi K., and Sugimoto M. p19^{Arf} exacerbates cigarette smoke-induced lung dysfunction. *Biomolecules* 10, E462, 2020.
- 7) 川口耕一郎、杉本昌隆 肺疾患における細胞老化の役割 老年内科 2 (6), 552-559, 2020
- 8) 杉本昌隆、川口耕一郎 老化細胞の除去 (senolysis) による加齢性疾患治療へのアプローチ ファルマシア Vol. 56 No 11, 1009-1013, 2020
- 9) 川口耕一郎、杉本昌隆 呼吸器の老化・疾患と細胞老化 基礎老化研究 44 (3), 21-26, 2020
- 10) 川口耕一郎、三河隆太、杉本昌隆 細胞老化 医学のあゆみ Vol. 273 No. 4, 332-337, 2020
- 11) 杉本昌隆 喫煙病態における細胞老化の役割 喫煙科学 Vol. 35 No. 1, 3, 2020
- 12) 杉本昌隆 組織老化・疾患における細胞老化の役割 Aging & Health Vol. 28 No. 2, 38-41, 2019
- 13) 杉本昌隆、三河隆太 老化細胞除去マウスと senolytic 薬 実験医学 Vol. 37 No.11, 1755-1760, 2019

2. 学会発表

- 1) Kawaguchi K, and Sugimoto M. Senescence-dependent alveolar factor promotes metastatic lung cancer. Mechanism of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, USA, September 22-25, 2020 (リモート開催)
- 2) 杉本昌隆 組織老化・疾患における細胞老化の役割 老化と代謝セミナー、特別講演、京都、2021年3月19日 (リモート開催)
- 3) 杉本昌隆 呼吸器疾患における細胞老化の役割 第20回日本再生医療学会学術総会シンポジウム、神戸、2021年3月11日 (リモート開催)
- 4) 杉本昌隆 組織老化における細胞老化の役割：動物モデルを用いた解析から医工学フォーラム、特別講演、京都、2021年1月18日 (リモート開催)
- 5) 川口耕一郎、古茂田かおり、三河隆太、浅井あづさ、杉本昌隆 Alveolar senescence promotes lung metastasis of melanoma cells. 第43回日本基礎老化学会大会、長崎、2020年5月27日 (誌上開催)
- 6) 杉本昌隆 疾患モデルにおける senolysis の効果 第40回日本基礎老化学会シンポジウム、名古屋、2020年2月9日
- 7) 川口耕一郎、古茂田かおり、三河隆太、浅井あづさ、杉本昌隆 Alveolar senescence promotes lung metastasis of melanoma cells. 第43回日本基礎 老化学会

大会、長崎、2020年5月27日（誌上開催）

- 8) 川口耕一郎、古茂田かおり、三河隆太、杉本昌隆 肺組織の老化細胞は転移性肺がんを促進する 第42回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月6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