

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

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

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）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）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という知見を得ている。

本研究では、このマウスを用いて肺気腫や肺への癌転移モデルを作製し、老化細胞を排除したときにこれら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う。

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。

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。

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。

(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」を遵守する。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する。

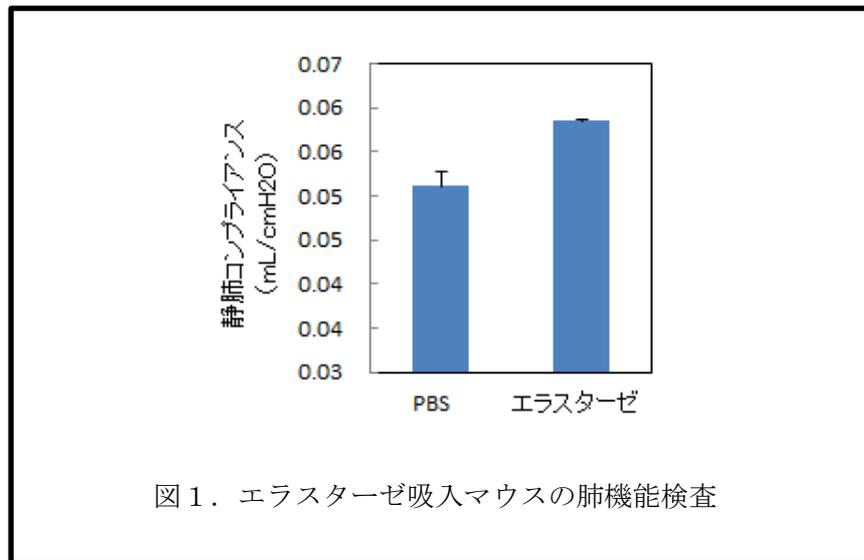
当該研究ではヒトサンプルを取り扱う予定はない。

C. 研究結果

1) エラスターゼ吸入肺障害モデルの樹立と解析

本計画では最初に、エラスターゼにより肺障害が誘導可能かについて確認を行った。5ヶ月齢雌性マウスにエラスターゼを経鼻投与し、3週間後に肺機能検査を行ったところ、エラスターゼ投与マウスでは PBS 投与マウスと比較して顕著な静肺コンプライアンスの上昇 (組織弾性の低下) が認められた (図1)。この結果から、エラスターゼ吸入による肺障害を定量的に解析可能であることが確認された。

次にこの系を用い、老化細胞除去がエラスターゼによる肺障害に及ぼす影響について解析を行った。生体イメージングにより、肺組織の老化細胞の動態を調べたところ、DT 処理により肺組織のルシフェラーゼシグナルの消失が認められるが、エラスターゼによってシグナル強度等に有意な差は認められなかった。したがって短期間 (3週間) の肺障害では組織内の老化細胞量に変化はないと考えられた。この DT 処理を行ったマウスにおいてエラスターゼによる肺障害を調べた結果、DT 処理により老化細胞を排除した肺組織ではエラスターゼによる静肺コンプライアンスの上昇が抑制された。このことから、肺組織中の老化細胞を排除することにより、エラスターゼによる障害に抵抗性を持つようになることが強く示唆された。



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解析した。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たところ、非処理群と比較してルシフェラーゼシグナルに差は認められなかった。したがって短期間(4週間の)喫煙刺激では肺組織に細胞老化は誘導されることが示唆された。

次に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) と比較して有意に静肺コンプライアンスの上昇が見られた。したがって4週間の喫煙刺激は、肺機能の低下を誘導するのに十分であることが示された。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ことから、老化細胞を排除することにより肺組織が喫煙刺激に抵抗性を持つようになることが強く示唆された。

3) メラノーマ肺転移モデルの解析

さらに本研究では、肺組織内の老化細胞がメラノーマの肺転移に及ぼす影響について調べた。マウスメラノーマ由来 B16-F10 細胞株は転移性が高く、尾静脈から注入することにより肺への転移が高い再現性をもって起こる。この系を用いて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った。細胞を注入2週間後の転移について評価したところ、老化細胞を排除したマウスの肺では明らかに癌細胞の転移が低下していた。このような効果は、皮下に細胞を移植したときには見られないことから、肺組織に老化細胞が存在することにより、局所的に癌転移が起こりやすい環境が形成されることが考えら

れた。

D. 考察と結論

本年度我々は、加齢とともに肺組織に蓄積する老化細胞が肺組織の加齢性変化の原因となり得ること、さらに老齢個体肺組織から老化細胞を排除することにより、肺機能を回復可能であることを報告した。肺組織の老化は他組織同様に様々な疾患のリスクを増大させる。このことから本計画では、肺組織内に蓄積する老化細胞が呼吸器疾患の発症に関与する可能性について検討を行った。本計画では複数の（エラスターゼ肺障害モデル、喫煙モデル、メラノーマ肺転移モデル）の肺疾患モデルを樹立した。これらの系で解析を行ったところいずれのモデルにおいても、老化細胞を排除することにより疾患や肺機能の低下がよくされることを示す結果を得た。したがって肺組織内に蓄積する老化細胞は、肺組織機能の低下とともに疾患が生じやすい環境の形成を行っていることが強く示唆された。本研究結果に関しては、次年度以降も詳細かつ多面的な解析が必要であるが、呼吸器疾患の治療や予防において、老化細胞が有効なターゲットとなり得ることを示している。

これらの知見を臨床に応用するためには、外来遺伝子に依存しない老化細胞排除方法を確立する必要がある。この点に関して近年薬学的に老化細胞を排除する方法が複数の研究室で試みられており、そのうちいくつかの化合物に関しては実験動物レベルでは成功している。本計画で樹立したモデルマウスにおいてもこれら化合物の効果を試し、呼吸器疾患に有効であるか検討を行いたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, Mikawa R, Iwashita Y, Kanayama K, Sugimoto K, Sato T, Maruyama M, Sugimoto M. Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight*. 1:e87732, 2016
- 2) Sato T, Baskoro H, Rennard SI, Seyama K, Takahashi K. MicroRNAs as therapeutic targets in lung disease: Prospects and challenges. *Chronic Obstr Pulm Dis (Miami)*. 3:382-88, 2016
- 3) Kodama Y, Kishimoto Y, Muramatsu Y, Tatebe J, Yamamoto Y, Hirota N,

Itoigawa Y, Atsuta R, Koike K, Sato T, Aizawa K, Takahashi K, Morita T, Homma S, Seyama K, Ishigami A. Antioxidant nutrients in plasma of Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma-COPD overlap syndrome, and bronchial asthma. *Clin Respir J*. Dec 14, 2015

2. 学会発表

- 1) Masataka Sugimoto Pathophysiological roles of p19ARF in pulmonary aging. 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム 横浜、2016年11月30日
- 2) 杉本昌隆 呼吸器の加齢性変化における癌抑制タンパク質 ARF の役割 第9回 Symphony 東京、2016年9月18日
- 3) Sugimoto M. Pathophysiological roles of cellular senescence in lung aging. NCGG-ICAH symposium, 台北、2016年4月15日
- 4) 烏谷恵子、佐藤匡、Hario Baskoro、鈴木洋平、関谷充晃、児玉裕三、瀬山邦明、高橋和久. COPD 急性増悪における microRNA-146a の役割の解明. 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 京都. 2016年4月9日
- 5) 鈴木洋平、佐藤匡、Hario Baskoro、烏谷恵子、三井亜樹、関谷充晃、児玉裕三、杉本昌隆、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56回日本呼吸器学会学術講演会. 京都. 2016年4月9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

特許出願

名称：慢性閉塞性肺疾患の抑制剤

発明者：佐藤匡、高橋和久、瀬山邦明、鈴木洋平、佐藤文平、平野伸一、瀬尾知樹、黒川 亮介、番号：PM16111、出願年月日：2016年8月22日