

長寿シグナル IGF による老化制御機構の解明 (29-39)

主任研究者 津川 陽司 国立長寿医療研究センター 流動研究員

A 研究要旨

これまでに認知症、長寿化の原因因子の一つである **Insulin** 分泌制御機構の研究を行ってきた。最近、アルギニン(Arg)をベースとした特殊磁気ビーズを作製し、Arg および **Insulin** と結合する **APBP1(Arg/Proinsulin Binding Protein 1)**の単離に成功した。組換えタンパク質や **APBP1** 遺伝子改変マウスなどの解析により、「Arg の競合によって **Insulin-APBP1** 複合体の解離が **Insulin** 分泌を促進する」ことを明らかにした。

一方、細胞や組織はアミノ酸のような栄養のバランス変化に適応することが生理的に必要不可欠である。哺乳類において、特に Arg はいくつかの重要な機能を担っており、**Insulin/Insulin-like growth factor-1 (IGF1)** シグナル経路を活性化することによって、免疫細胞活性化、**Insulin** 分泌および筋肉成長等の生理学的機能を促進する。小胞体タンパク質品質管理関連酵素の1つである **APBP1** は Arg 結合タンパク質の1つだが、この生理現象の根底にある栄養センサーとしての生理機能はいまだに明らかでない。我々は本研究において、**APBP1** が Arg と結合し、その競合作用により **proIGF1-APBP1** 複合体の解離を促進することを明らかにした。肝臓特異的 **APBP1** の過剰発現が、Arg 応答性 **IGF1** 分泌レベルを低下させ、食餌後 **IGF1** 分泌を負に調節することを示した。*in vitro* 解析により、**APBP1** が C 末端ドメインを介して **proIGF1** と結合し、当該ドメインにて **proIGF1** と Arg の間で競合していた。さらに、Arg が **proIGF1-APBP1** 複合体を解離させること、およびその複合体が **proIGF1** の小胞体におけるタンパク質の分解抑制に関与していることを見出した。したがって、我々のデータは、**APBP1** が栄養環境における **proIGF1-APBP1** シグナルの維持とそれに続く **IGF1** 分泌経路をコントロールする中枢機関として定義しうる。

しかし、この **IGF1** 分泌制御・維持機構がどのようにして加齢に伴う疾患や老化現象に関与するのか不明である。本研究では、**APBP1** を介した **IGF1** の維持・分泌制御機構と加齢性疾患あるいは寿命にどのように寄与するのかを明らかにし、分子メカニズムを基とした治療法の開発をおこなう。

## B 研究目的

長寿化シグナルIGF1のAPBP1を介した分泌制御機構の解明およびその生理的意義を以下の3点について解析した。

### IGF1- APBP1の分泌制御機構の解析

現在までに、膵臓ランゲルハンス島 $\alpha$ 細胞株や $\beta$ 細胞特異的APBP1強制発現トランスジェニックマウスにおいてArg刺激によるIns- APBP1複合体の解離・分泌促進を確認できた。この手技を用いて、肝臓由来細胞株においてIGF1がAPBP1と結合し、Arg刺激によるIGF1の分泌を確認する。また、IGF1-APBP1結合活性化ドメイン候補がいくつか同定されたため、IGF自身の結合活性化ドメインを明らかにし、シグナル制御機構に関して詳細に解析する。

### IGF1- APBP1結合解離制御因子の探索

まず、IGF1- APBP1結合を元に化合物のスクリーニングを行う。これまでの研究によりIGF1に対するAPBP1結合予測部位をいくつか同定しているため、IGF1およびAPBP1 (変異体)強制発現培養細胞株を用いることでスクリーニングの感度・特異性を上げることが可能である。

### 老齢マウス及び早老症マウスにおける寿命延伸効果の検証

2)で選択した候補薬剤による寿命延伸効果とそのメカニズムを明らかにするため、肝臓由来細胞株においてIGF1分泌を亢進あるいは抑制するような投与条件を検討する。また、老齢マウスおよび早老症モデルマウスによる検討では、実際の効能や副作用について抗老化治療の観点から加齢疾患の病態進行時に候補薬剤を投与することで検証する。

## C 研究方法

### (1)全体計画

#### ①IGF1- APBP1 の肝細胞における分泌制御機構の解析

Arg 処理を施した APBP1 強制発現ヒト肝細胞株あるいは APBP1 と IGF1(または IGF2) を強制発現した膵臓β細胞株の細胞抽出液に対して細胞内における結合解離が認められるか検討する。次に、インフォマティクス的手法を用いて、APBP1 の IGF 標的ドメイン(あるいは APBP1 結合部位)を予測し、それを基に作成したドメイン変異体を肝細胞株に発現させ、その IP-WB により結合解離活性を測定することで IGF 結合活性ドメインを明らかにする。また、IGF 全長と同定した結合部位の欠損 IGF ベクターを作製し、これらを肝細胞株に遺伝子導入し、IGF- APBP1 による下流のシグナルを探る。

#### ②IGF- APBP1結合解離制御因子の探索

マイクロアレイ解析から老化・寿命制御に関わる遺伝子から長寿化のシグナル経路候補を抽出する。これまでの報告から、特に細胞周期、代謝、DNA 修復、細胞増殖関連因子の発現変動についてパスウェイ解析を行う。さらに、IGF1 または APBP1 強制発現肝細胞株への抽出パスウェイに対する阻害剤投与等により上記機能の抑制効果が得られるのか検証する。その後、IGF1-APBP1 結合を元に化合物のスクリーニングを行う。Arg と IGF1 が競合的に APBP1 に結合し、IGF 分泌が制御されるため、APBP1 に結合した物質は、Arg と同様に、IGF1 分泌を促進する可能性がある。そのため、IGF/APBP1 強制発現肝細胞株を用いて Arg 模倣化合物あるいは APBP1 結合因子を標的としたアゴニストやアンタゴニストを候補として IGF1- APBP1 結合解離活性を検証する。

#### ③老齢マウス及び早老症マウスにおける寿命延伸効果の検証

##### 3-1: 老齢マウスおよび早老症モデルマウス)の解析

まず、①の *in vitro* 解析で得られた肝細胞株の抗老化メカニズムをより詳細に理解するため、生体内における IGF1-APBP1 の影響を解析する。老齢マウス(現在のところ 18 月齢を想定)と若年マウス(8-12 週齢)間において肝細胞内 IGF1 および APBP1 発現量、IGF1- APBP1 結合量、Arg による IGF1- APBP1 結合解離効率を比較する。

##### 3-2: ②候補因子の老齢マウス生体投与による肝細胞 IGF1 分泌能への影響を解析

最初に、野生型マウスへ投与し、候補薬剤の生体内動態を検討する。候補因子の血液中動態、組織指向性、肝細胞への取込み量といった項目を免疫染色やイムノブロット法により測定する。また、IGF1-APBP1 結合解離率は、血中 IGF1 量を ELISA によって測定する。分泌 IGF1 の受容体活性化効率は IGF1 受容体発現細胞株によりや細胞分裂マーカーや酸化ストレスマーカー等の免疫染色、定量的 PCR により確認する。また、この候補因子刺激が肝細胞特異的なものかどうか検討するため、Ins 感受性組織や肝臓内非実質細胞系列における APBP1 標的因子の影響を解析する。

## (2)年度別計画

### <平成 29 年度>

肝細胞における IGF1-APBP1 の作用機序を明らかにするため、IGF1 と APBP1 の結合活性化ドメイン同定とそのシグナル制御機構、および肝細胞に対する機能解析を行う。さらに、IGF1-APBP1 結変異体の強制発現肝細胞株を作製し、IGF1 分泌の促進剤の探索を行った。

### <平成 30 年度>

前年度に行った *in vitro*、*in vivo* の解析結果をもとに、候補因子の IGF1- APBP1 機能調節による老化モデルマウスの治療効果とその作用機序を明らかにする。平成 30 年度は主に、これまでの IGF1/APBP1 の Arg を介した IGF 分泌制御メカニズムと生理的意義についての解析結果を公表するため、補完データの解析、および発展的な研究の先駆けとして、加齢あるいは老化による APBP1-IGF1 への影響の解析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では動物実験(2年目以降)と組換え DNA に関する実験を行う。動物実験に関する研究は日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して行う。本研究が実施する動物実験に関する研究は国立長寿医療研究センター実験動物倫理委員会の承認を得たのち研究を開始する。組換え DNA に関する研究は「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」を遵守し、国立長寿医療研究センター遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得たのち研究を開始する。

## D 研究結果

平成29年度、平成30年度は主に、IGF1/ APBP1のArgを介したIGF1分泌制御メカニズムの解析を行った。結果・進捗状況を以下に示した。

### ①IGF1- APBP1 の肝細胞における分泌制御機構の解析

#### 肝細胞におけるIGF1/ APBP1のArgを介した結合解離を確認した

独自に作成したArg化合物を基質としたビーズを用い、ヒト肝臓由来細胞株(HepG2)の抽出液からAPBP1を単離することができた。また、Arg飢餓状態のHepG2抽出液から免疫沈降法によりL-Arg濃度依存的なIGF1- APBP1複合体解離が認められた。APBP1-FLAG/IGF1-myc強制発現293T細胞抽出液を利用し、アミノ酸あるいはArg模倣化合物によるAPBP1/IGF1複合体の解離効率を比較したところ、特にL-Argによる複合体の解離効率が高く、この解離効率は化合物のプラス電荷の高さに比例傾向であった。

#### 肝細胞においてAPBP1はArg依存的なIGF1分泌を制御している

初代マウス肝細胞とHepG2では、IGF1/2がAPBP1と結合し、ArgあるいはArg模倣化合物刺激によるAPBP1-IGF1複合体の解離・分泌を確認できた。上記細胞を用いたIGF1/ APBP1遺伝子強制発現やAPBP1に対するRNA干渉法により、APBP1はIGF1の前駆体であるproIGF1と結合しており、小胞体においてIGF1の分泌を制御していることが明らかとなった。さらに、APBP1発現細胞株に対するAMPK活性化剤刺激により、Arg誘導性IGF1分泌はcAMP依存的な分泌抑制を受けることが分かった。また同様のシグナル経路として、IGF1の産生を促進することで代表的な成長ホルモン(GH)による刺激応答試験を行ったところ、Arg飢餓状態あるいはAPBP1強制発現細胞においてGH誘導性IGF1分泌が減弱された。APBP1強制発現細胞において、これらのIGF1の発現制御や分泌機構に関与する遺伝子のうちIGF1、IGFBP3、SOCS2、IGFALSはコントロールと比較して有意なmRNA発現変動は認められなかった。

この現象が、他組織において、共通のシグナル経路として成立しているのか検討すべく、マウス線維芽細胞から分化誘導した脂肪細胞あるいは分化させた骨芽細胞を利用し、解析を行った。その結果、肝細胞IGF1-APBP1と同様のArgによって解離し、他の組織由来細胞においても共通のシグナルとしてArgを認識することが確認できた。

#### Arg依存的なAPBP1/IGF1結合活性化ドメインの同定

IGF1- APBP1結合活性化ドメイン予測からC末端結合ドメイン欠損(あるいは1アミノ酸置換)変異体を作製し、APBP1におけるIGF1結合ドメイン(E-Boxドメイン)を同定した。IGF1におけるAPBP1結合ドメインの解析には、IGF1とInsのアミノ酸配列と立体構造的に高い相同性があることから、いくつかの候補ドメインを選出することができた。また、APBP1の元来保有するグリコシルトランスフェラーゼ活性を欠損した変異体あるいは糖

鎖を受けないマウス由来のIGF1の強制発現細胞により、Arg依存的なIGF1分泌制御にグリコシルトランスフェラーゼ活性は関与せず、糖鎖修飾から独立した分子メカニズムの存在が示唆された。

### 肝細胞APBP1はproIGF1の恒常性維持に関与している

HepG2に対するRNA干渉によりAPBP1発現量を抑制したところ、細胞内IGF1量は減少する一方、細胞外へのIGF1分泌に変化はなかった。また、Arg飢餓状態において細胞内のproIGF1の存在量が上昇した。これらのことから、APBP1のproIGF1の恒常性維持への影響を検討し、タンパク質合成阻害剤により、APBP1がproIGF1のタンパク質分解の抑制に寄与することが明らかとなった。ヒトユビキチン-HA、IGF1-myc、APBP1-FLAGの共強制発現細胞からIGF1-mycの免疫沈降により、APBP1発現細胞ではコントロールと比較してproIGF1のユビキチン化効率が減少した。これらのことから、APBP1が何らかのタンパク質分解機構をたどり、細胞内proIGF1の品質維持に関わっている可能性が示唆された。

### 生体内におけるAPBP1を介したストレス応答の分子メカニズム解析を検討

加齢動物に関わるデータベースから若齢ラットと老齢ラットの肝臓におけるインフォマティクス解析を行ったところ、老齢ラットにおいてAPBP1タンパク質発現量が1.5-2倍程度上昇していることが分かった(mRNAでは変化なし)。一方で、C57BL6j雄マウス(6週、2年齢)の肝臓におけるAPBP1タンパク質発現量を比較したところ、6週に対して2年齢で1.5倍程度の上昇を確認することができた。生体内でのAPBP1の機能解析を行うため、ハイドロダイナミックインジェクション法によりAPBP1発現DNAプラスミドをC57BL6jマウス(オス6週齢)の肝臓特異的に強制発現させたところ(LIA: Liver-inducible APBP1-overexpressing)、コントロール群と比較して肝臓内proIGF1量の増加、そして血中IGF1(およびIGF2)の分泌量が低下していることが分かった。また現在、当研究室で作出した膵臓β細胞特異的なAPBP1 Tgマウスでの解析結果を踏まえ、アルブミンプロモーターを用いてHep APBP1 Tgマウスの作製を計画している。現在コンストラクトの作製は完了しており、資金調達等の諸処の事情が解消でき次第、マウス個体へ遺伝子を導入する。

### ②IGF- APBP1結合解離制御因子の探索

#### IGF1分解関連シグナル転写因子の抽出と検証

APBP1の生体内での役割を詳細に解析するにあたり、これまでの解析結果から、APBP1の元来の未成熟タンパク質の校正機能(refolding)とは異なる機能としてタンパク質恒常性維持機構の関与を想定した。データベース解析から絶食状態から再栄養化したときにマウス肝臓内における遺伝子変化を調べた。絶食後、通常の食餌を与えて24時間後の肝臓内遺伝子プロファイリングを行った。Gene ontology解析の結果、再栄養化に伴い小胞体ストレスや小胞体内でのUPRシグナルが活性化していることが明らかとなった。また、こ

れまでに肝細胞APBP1のknock downにより細胞内あるいは細胞外IGF1の存在量に変化があるのか検討しており、APBP1 RNA干渉法により内在性APBP1はタンパク質レベルで顕著に減少し、細胞内IGF1が減少することが分かった。さらに興味深いことに、APBP1のknock downによって細胞外分泌および細胞内のIGF1量がともに減少していることが確認できた。一方で、Arg飢餓状態の肝細胞内IGF1の所在を確認してみたところ、小胞体内に局在しているIGF1の存在量がAPBP1の減少に伴って減少した。これらのことから、IGF1分泌におけるArgを引き金としたAPBP1によるproIGF1のタンパク質のホメオスタシス制御は外部の栄養環境に影響されることが示唆された。次に、小胞体においてAPBP1がIGF1のタンパク質ホメオスタシスをどのように制御しているのか検討した。proIGF1のタンパク質恒常性を検討すべく、cycloheximideによるタンパク質翻訳抑制においてAPBP1のproIGF1の分解への影響を解析した。コントロール細胞においてproIGF1は翻訳抑制により約半数まで減少し、4時間後には30%程度まで存在量が低下した。一方、APBP1過剰発現細胞においてproIGF1タンパク質量は翻訳抑制後、実験期間内において有意な発現変動は確認できなかった。このことから、APBP1にはタンパク質分解に対して抵抗性を示すことが想定された。続いて、具体的に、どの分解機序が影響しているのか区別するため、主要なタンパク質分解機構に対する阻害剤で処理し、proIGF1タンパク質変動量を比較した。ユビキチンプロテアソーム分解機構の阻害により、コントロールと同様にproIGF1は1-2時間で約半分まで減少したが、オートファジー阻害剤処理下においてこの減少は確認されなかった。また、ユビキチン-プロテアソーム分解機構の影響を受けない非ユビキチン修飾IGF1変異体を作製し、野生型IGF1と同様の分解を示すことが確認された。このことは、ユビキチン-プロテアソーム分解機構よりもオートファジーによる選択的なproIGF1の分解機序が存在する可能性が示唆された。現在、LIAマウスを使用し、絶食時あるいは再栄養化処理後(高フルクトース食)の肝臓内小胞体ストレスに対するAPBP1の役割について検討を進めている。

### ③老齢マウス及び早老症マウスにおける寿命延伸効果の検証

#### 老齢マウス及び老化細胞におけるIGF1- APBP1シグナルの解析

肝細胞の抗老化メカニズムをより詳細に理解するため、生体内における IGF1-APBP1 の影響を解析した。老齢マウス(24 月齢)と若年マウス(8-12 週齢)間において肝細胞内 APBP1 発現量を比較したところ、若齢と比較し老齢マウスにおいてメッセージレベルでは変化がない一方、1.5-2 倍程度の APBP1 タンパク質の増加が確認できた。またデータベース解析から、癌型 N-Ras(G12V)誘導性老化ヒト線維芽細胞(Day6)において、タンパク質レベルで 1.5 倍まで上昇していることを確認している。一方で、マウス胎児線維芽細胞に対する N-Ras(G12V)強制発現ではコントロール細胞と比較し

て 70-80%の APBP1 タンパク質量の減少を確認した。当該細胞の **replicative senescence** (継代モデル) の検討では、継代による APBP1 タンパク質量の変化は認められなかった。これらのことから、老化による肝臓 APBP1 タンパク質の変動は、肝細胞の直接的な老化によるものではなく 2 次的に誘発された可能性を考え解析を進めている。

#### **IGF- APBP1結合解離制御候補因子の同定と解析**

Arg と IGF1 が競合的に APBP1 に結合し、IGF 分泌が制御されるため、APBP1 に結合した物質は、Arg と同様に、IGF1 分泌を促進する可能性がある。そのため、Arg 模倣化合物あるいは APBP1 結合因子を標的としたアゴニストやアンタゴニストを候補として IGF1- APBP1 結合解離活性を検証した。細胞内 APBP1 の分解促進剤をいくつか同定し、現在、APBP1 分解促進剤の老齢マウス生体投与による肝細胞 IGF 分泌能への影響を解析しており、これらの薬剤を野生型マウスへ投与し、候補薬剤の生体内動態を検討している。候補因子の血液中動態、組織指向性、肝細胞への取込み量を免疫染色やイムノブロット法により測定予定である。



## E. 考察と結論

ハイドロダイナミックインジェクション法により作成したLIAマウスを用いて、コントロール群と比較して肝細胞小胞体におけるproIGF1量の増加、そして血中IGF1の分泌量が低下していることを明らかにしている。また、*in vitro*解析によりAPBP1のproIGF1のタンパク質分解に対する抑制的な機能が示唆された。これらのことから、APBP1が何らかのタンパク質分解機構制御し、細胞内proIGF1の恒常性維持に関わっている可能性が示唆された。

これまでに我々は認知症、長寿化の原因因子の一つであるIns分泌制御機構の研究を行ってきた。最近、Argをベースとした特殊磁気ビーズを作製し、ArgおよびInsと結合するAPBP1の単離に成功した。組換えタンパク質やAPBP1遺伝子改変マウスなどの解析により、「Argの競合によってIns - APBP1複合体の解離がIns分泌を促進する」ことを明らかにした。一方、線虫やハエにおいてInsおよびIGFシグナルは長寿化シグナルとして知られており、またInsとIGFのアミノ酸相同性、構造類似性は極めて高い。これまでの*in vitro*解析や一過性の肝臓特異的APBP1の強制発現マウスの*in vivo*解析から、生体内においてIGFもInsと同様に肝臓APBP1と結合し、ArgによってIGF1- APBP1複合体解離が促進されることを明らかにしている。さらに、APBP1の新たな機能として小胞体内でpro体のIGF1と結合し、生体内の栄養状態によってIGF1分泌を制御していることを見出した。これらのことから、APBP1は生体内の栄養状態を識別してIGF1のホメオスタシスも維持している可能性が示唆された。しかし、このIGF分泌制御・維持機構がどのようにして加齢に伴う疾患や老化現象に関与するのか不明である。APBP1を介したIGFの維持・分泌制御機構と加齢性疾患あるいは寿命にどのように寄与するのかを明らかにし、分子メカニズムを基とした治療法の開発をおこなう。本研究の遂行による「APBP1を介したIGF1分泌機構とその生理的意義」の解明は、加齢に伴う複合的な疾患への進行改善、さらには、予防として新薬の開発につながる可能性を秘めており、高齢者医療において大きな意義を有する。本研究はAPBP1が長寿化シグナルIGFの分泌制御機構に関わっていることを強く示唆し、さらにその分子メカニズムを明らかにすることで、老化予防、治療に対するこれまで知られていなかった新たな手掛かりになることが期待できる。また長寿研究業界においてもまだ認知の低いAPBP1について新たな知見を提供することは、当該研究分野の視野を広げ、未開拓な研究を展開させ得るという点で非常に重要であり、大きなインパクトがある。この研究の発展は、健康寿命の延伸に発展するという点で、現在日本の抱える医療保険問題に対する研究と考えている。これまで長寿に関する因子はほとんど報告されていない。我々はAPBP1が老化に関わる疾患を理解するのに重要な新規因子であることを明らかにしつつあり、これにより新たな老化制御システムの解明が可能になると考えている。

F. 研究成果の発表実績

(1)論文発表（主任研究者）

Yoji Tsugawa, Hiroshi Handa, Takeshi Imai, Arginine induces IGF-1 secretion from the endoplasmic reticulum, Biochemical and Biophysical Research Communications, in press

Yoji Tsugawa, Masaki Hiramoto, Takeshi Imai, (2019) Estrogen induces estrogen receptor alpha expression and hepatocyte proliferation in late pregnancy, Biochemical and Biophysical Research Communications, 511, 592-596

(2)学会発表（主任研究者）

Yoji Tsugawa, Takeshi Imai., ER quality control protein APBP1 regulates IGF1 secretion via sensing Arginine condition and controlling ER-associated degradation Flash talk, The 10th Nagoya global retreat, Aichi, 2018 Mar

Yoji Tsugawa, Takeshi Imai., ER quality control protein APBP1 regulates IGF1 secretion via sensing Arginine condition and controlling ER-associated degradation, 第41回日本分子生物学会, 2P-0567, Yokohama, 2018 Nov