

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	細胞老化の多様性とその病態生理学的意義の解明	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①細胞老化②生活習慣病		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 野 徹	大学院医学研究科	教 授	研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 西 博 応	大学院医学研究科	准 教 授	オミックス解析
清 水 逸 平	大学院医学研究科	准 教 授	マウスの解析
吉 田 陽 子	大学院医学研究科	特任准教授	マウスの解析
須 田 将 吉	大学院医学研究科	非常勤助教	マウスの解析
勝 海 悟 郎	大学院医学研究科	特 任 助 教	オミックス解析
降 旗 高 明	大学院医学研究科	助 教	マウスの解析

# 細胞老化の多様性とその病態生理学的意義の解明

## 1. 研究の目的

加齢に伴う糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率の増加は、虚血性心疾患や脳卒中の発症をもたらすことによって、健康寿命の短縮に関与している。加齢に伴う様々な臓器機能不全（病的臓器老化）が、これらの生活習慣病の発症・進展の原因の一つとなっていることが示唆されているが、その機序は不明である。

これまで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に加齢に伴う病的老化形質を担う」という細胞老化仮説に基づいて進めてきた。その結果、ヒト動脈硬化巣に老化血管細胞の集積が認められること（*Circulation* 2002）、蓄積した老化血管細胞が様々な血管機能障害の形質（NO 産生の低下や炎症分子の発現の亢進など）を示すことによって、動脈硬化やインスリン抵抗性の発症・進展に関与していることを明らかにした（*Circulation* 2003, 2006, *EMBO J* 2004, *Cell Rep* 2014, *JMCC* 2019）。また、肥満マウスや2型糖尿病患者の内臓脂肪においても老化細胞が蓄積しており、p53/p21 シグナルの活性化とともに Senescence-associated secretary phenotype (SASP) 因子による慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性を誘導していた。これらの形質は、脂肪特異的 p53 欠失によって改善したことから、脂肪組織における老化細胞の蓄積が、2型糖尿病の発症・進展に重要であることが明らかとなった（*Nat Med* 2009）。さらに、心不全の病態において、心臓組織内の心筋・血管・マクロファージの p53 シグナルの活性化がその発症・進展に関与していること（*Nature* 2007, *JMCC* 2015）、心不全に伴って脂肪組織における p53 シグナルの活性化が惹起されることでさらに心機能が負に制御されていること、これらの悪循環は脂肪組織特異的 p53 欠失・抑制により改善することを明らかにしてきた（*Cell Metab* 2012）。

以上の結果は、p53 依存性老化シグナルの活性化が病的老化に関与しており、その活性化を抑制することによって動脈硬化や心不全、糖尿病などの加齢関連疾患の発症・進展を抑制できる可能性を示唆する（*Circ Res* 2007, *Nat Rev Cardiol* 2008, *Cell Metab* 2014）。しかしながら、実際には p53 を標的とした抗老化治療はがん化を促進する可能性が高いため、異なった治療のストラテジーの開発が必要である。これに対して Baker らは、薬剤によって p16 陽性老化細胞をアポトーシス誘導により除去しうる遺伝子改変マウスを作製し、老化細胞の除去 (Senolysis) が早老症モデルマウスや高齢マウスの様々な老化形質を改善するとともに、寿命を延長させることを報告した（*Nature* 2011, *Nature* 2016, *Science* 2016）。さらに最近、老化細胞除去薬 (Senolytics) が、老化細胞の除去が高齢マウスの様々な老化形質を改善するとともに、寿命を延長させること、逆に少量の老化細胞の移入によって病的老化形質を促進され、寿命短縮をもたらされることが示された（*Nat Med* 2018）。しかしながら、これまで報告されている Senolytics は老化細胞がアポトーシス抵抗性になることを標的とした非特異的なものが多く、その副作用の発現が危惧されている。また、老化細胞が分泌する炎症分子を標的とした治療についても、免疫抑制など副作用の発現が危惧されている。そこで研究提案では、下記の項目を明らかにすることで、老化細胞蓄積の病的意義を検証するとともに、老化細胞を標的とした新規治療開発の基盤とすることを目指す。

1. 細胞老化の多様性を明らかにする
2. Senescence-associated secretary phenotype (SASP) の多様性を明らかにする
3. 生理的細胞老化の制御メカニズムを明らかにする

## 2. 研究の計画

### (1) 細胞老化の多様性を明らかにする

組織に蓄積する老化細胞は一様でないことが予想され、その老化形質や遺伝子発現、病的老化に対する病態生理学的な役割なども細胞・組織特異的な変化を示すと考えられる。このような細胞・組織特異的な相違を明らかにすることは、細胞・組織特異的な老化細胞除去治療の確立に対して、重要な知見をもたらす。そこでまず、細胞・組織特異的な老化細胞の多様性を明らかにするため、細胞・組織特異的な老化細胞リポーターマウスを確立する。具体的には、p16 遺伝子座に *in frame* で floxed stop-tTA をノックインした (p16-stop-tTA KI) マウスを作製する。これまでの老化細胞標識・除去モデルマウスは、p16/Arf BAC clone やその一部 (~2kb) のプロモータを用いたトランスジェニックマウスであったのに対して、このマウスでは、内因性の p16 の発現を変化させることなく、同モル数の tTA を発現し、その転写効果を Cre-TetO システムにより組織特異的に増幅できるようにデザインした (確立済み)。p16-stop-tTA KI マウスに TetO-Tomato マウス ; 組織特異的 (内皮・平滑筋・脂肪細胞・単球など) Cre マウスを交配することで、細胞特異的な老化細胞の標識を行う。これらのマウスから細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、細胞・組織特異的な老化細胞の特異的抗原を同定するとともに、その老化形質の相違を明らかにすることで、細胞・組織特異的な老化細胞除去治療開発の基盤とする。

### (2) Senescence-associated secretory phenotype (SASP) の多様性を明らかにする

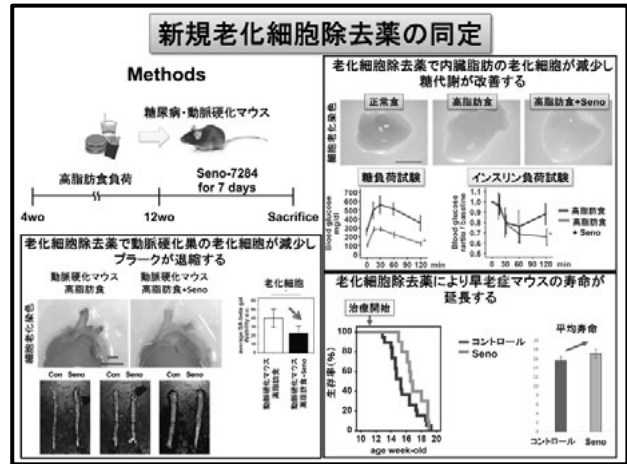
蓄積した老化細胞は NF- $\kappa$ B 依存的に SASP 因子の発現を増加させることで、組織の慢性炎症を惹起し、病的老化形質の発現に寄与することが知られている。培養老化細胞を用いた研究において、SASP 因子は細胞の種類によって多様であることが知られているが、個体の組織における SASP 因子の多様性やそれぞれの SASP 因子の病的役割については明らかでない。そこでまず、p16-stop-tTA KI ; TetO-Tomato ; 組織特異的 Cre マウスから、細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、細胞・組織特異的な SASP 因子を同定する。次に、p16-stop-tTA KI マウスに TetO-mutant I- $\kappa$ B ; 組織特異的 Cre マウスを交配することで、時間・空間的に老化細胞の SASP 因子の発現を制御可能なモデルを確立し、それぞれ組織特異的 SASP 因子が、どのように病的老化形質に関与しているかについての検証も進めていくことで、細胞・組織特異的な SASP 因子治療開発の基盤とする。

### (3) 生理的細胞老化の制御メカニズムを明らかにする

組織における老化細胞の蓄積は、加齢やメタボリックストレスなどによって加速し、臓器老化に関与していると考えられている。一方、創傷治癒過程においても老化細胞の特徴を持った細胞が出現し、創傷治癒を促進していることも観察されている。病的な老化細胞の蓄積は持続的であるのに対して、生理的な老化細胞の蓄積は一過性であり、病的なインパクトを持たないことが知られている。したがって、これらの制御メカニズムの相違を明らかにすることは、老化細胞を標的とした新規治療開発につながる可能性がある。そこでまず、p16-stop-tTA KI ; TetO-Tomato ; 組織特異的 Cre マウスにおいて、病的な老化細胞の蓄積モデル (高カロリー食負荷など) と生理的な老化細胞の蓄積モデル (創傷治癒モデルなど) を作製し、それぞれのモデルから、細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、病的細胞老化と生理的細胞老化の相違点を理解する。特に、病的な老化細胞の蓄積が持続的であるのに対して生理的な老化細胞の蓄積が一過性であるメカニズムについて、老化細胞に対する免疫制御に焦点を当てて解析を進める。

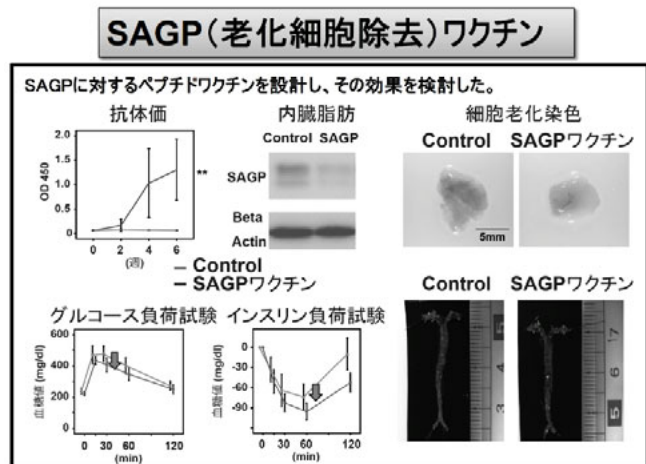
### 3. 研究の成果

2022年度は計画1-3で得られた知見に基づいて、新規抗老化治療の開発を行なった。その中で我々は新規の老化細胞除去薬のスクリーニングを行い、候補薬剤 Seno-7284 を同定した。その効果を病態モデルで確認したところ、高脂肪食負荷によって内臓脂肪組織に蓄積した老化細胞は、短期間の Seno-7284 投与により減少し、その結果、高脂肪食負荷による糖代謝異常やインスリン抵抗性が改善していた。動脈硬化マウスモデルに対する短期間の Seno-7284 投与によっても、動脈硬化巣に蓄積した老化細胞は減少し、可逆的に動脈硬化プラークの退縮が認められた。さらに、早老症モデルマウスに対する効果を検証したところ、Seno-7284 を中年期から投与したにもかかわらず、その寿命の有意な延長を認めた。Seno-7284 による治療前後の高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪から老化細胞を FACS で単離し、RNA-seq を行ってみると、治療直後に NK/CD8T 細胞に対するケモカインの発現が老化細胞特異的に増加していたこと、その阻害により Seno-7284 の老化細胞除去効果が減弱したことから、Seno-7284 は内因性の Senolysis 機構を増強することで、老化細胞除去に働いていることが示唆された。



オミックスデータから得られた老化抗原である SAGP は、ヒト老化血管内皮細胞において発現が著明に増加していた。その発現の亢進は、高齢マウスや動脈硬化マウスの大動脈や肺組織から単離した血管内皮細胞においても観察された。特に加齢マウスにおいては、大動脈だけではなく血管の多い組織や内臓脂肪、骨髄組織においてもその発現の亢進が見られた。動脈硬化のある患者の動脈組織においてもその発現の亢進は認められた。ヒト血管内皮細胞において SAGP をノックダウンすると、分裂寿命がむしろ短縮しており、p53 や p21 の発現上昇を伴っていたことから、SAGP はヒト血管内皮細胞の分裂寿命を正に制御していることがわかった。局在を検討すると、細胞膜のみならず、細胞内への internalization を認め、その局在はライソゾームであることがわかった。SAGP をノックダウンした細胞では、ライソゾーム機能が低下していることも観察された。さらに、SAGP はライソゾームにおける V-ATPase と結合しており、その V1 サブユニットと V0 サブユニットの結合制御によって V-ATPase 活性を調整していることがわかった。SAGP の発現制御を調べるために ATAC-seq を行ったところ、老化細胞の SAGP 遺伝子領域において MITF/TFE の結合領域が活性化していることがわかった。実際、ChIP-PCR にて老化細胞における MITF/TFE の結合の増強を確認した。MITF/TFE の発現は老化細胞において上昇していること、MITF/TFE をノックダウンすると SAGP の発現が低下すること、ライソゾームストレスを加えると、MITF/TFE の活性化とともに SAGP の発現が亢進することなどから、SAGP は老化に伴うライソゾームストレスによって増加し、ライソゾーム機能を性に制御する老化細胞の Survival factor であることが示唆された。

次に、SAGP が Senolysis の標的になるかどうかについて調べるために SAGP 陽性老化細胞を標識しつつ、DT 投与により老化細胞を除去できるマウスモデルを作製した。その結果、SAGP 陽性老化細胞除去によって、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することがわかった。そこで、SAGP を標的としたワク



チン SAGP に対するペプチドワクチンを設計し、その効果を検討した。抗体価、内臓脂肪、細胞老化染色、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験の結果を示す。

チンの作成を試みた。その結果、ワクチン接種により ADCC 活性を持った抗体の誘導が確認できた。さらに、高脂肪食負荷に伴って内臓脂肪や動脈硬化巣に蓄積する SAGP 陽性老化細胞がワクチン摂取により除去されていること、その結果、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することが明らかとなった。これらの効果は SAGP 欠失マウスでは認められなかった。また、NK/T 細胞を除去することでワクチンの効果が減弱したことから、ワクチンによって誘導される ADCC 活性を持った抗体が作用していることが示唆された。これまでの Senolytics と効果を比較したところ、ワクチンはより持続的に作用し、血球減少などの副作用が少ないことがわかった。さらに、ワクチンによる SAGP 陽性老化細胞除去は、高齢マウスのフレイルの改善や早老症マウスの寿命の延長といった効果があることも明らかとなった。

#### 4. 研究の反省・考察

計画 2 と計画 3 の進捗がやや遅れたが、全体的にはおおむね計画通りに進めることができた。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

1. Furuuchi R, Minamino T. Endothelial SIRT-1 has a critical role in the maintenance of capillarization in brown adipose tissue. **iScience**. 2022 Oct 20;25(11):105424. doi: 10.1016/j.isci.2022.105424.
2. Yoshida Y, Minamino T. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. **Sci Rep**. 2022 Sep 1;12(1):14883. doi: 10.1038/s41598-022-19245-x.
3. Hayashi Y, Minamino T. Coagulation factors promote brown adipose tissue dysfunction and abnormal systemic metabolism in obesity. **iScience** 2022; 25(7): 104547. doi: 10.1016/j.isci.2022.104547.
4. Yoshida Y, Minamino T. Differing impact of phosphoglycerate mutase 1-deficiency on brown and white adipose tissue. **iScience** 2022; 25(5): 104268. doi: 10.1016/j.isci.2022.104268.
5. Suda M, Minamino T. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B regulates lysosomal integrity and lifespan of senescent cells. **Sci Rep** 2022; 12(1): 6522. doi: 10.1038/s41598-022-10522-3.
6. Iwata H, Minamino T. Identification of a novel therapeutic target in vascular dysfunction: A showcase of reverse and forward translational research linking between bench and bedside. **Eur Heart J**. 2022; 43(6): 501-503. doi: 10.1093/eurheartj/ehab263.

##### (2) 口頭発表

全て招聘講演

1. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. 23rd Northeastern Asian Symposium, "Cellular senescence: from pathophysiology to treatment" 2022/9/1, Hilton Tokyo
2. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. 7th Taiwan-Japan Academic Research Organization Workshop, 2022/9/15, Web
3. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. The 11<sup>th</sup> International Congress on Lipid & Atherosclerosis with Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease. Symposium 14 Impact of aging of vascular cells on atherosclerosis & its protection. 2022/9/16, Seoul
4. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for age-associated disease. The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2022/9/16 Kyoto
5. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of cardiovascular disease. 22nd International Vascular Biology Meeting Vascular Aging 2022/10/14 San Francisco Bay Area at the Oakland Marriott City Center

##### (3) 出版物

なし