

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09154

研究課題名(和文)新規血管老化関連分子による老化制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of aging mechanism by novel aging related molecules

研究代表者

須田 将吉 (Suda, Masayoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70714509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：老化細胞の蓄積が様々な疾患の原因と考えられている。本研究ではSAGPという老化で発現が上昇し、細胞老化を防ぐ分子に注目した。SAGPはリソソームの恒常性を維持し細胞老化を防ぐ分子であり、SAGPを補うと動脈硬化や血管機能、血管新生の能が改善することが分かった。さらに、近年、老化細胞は保護するのではなく、除去してしまい、正常な若い細胞の増殖を促した方が良いという報告も多く出てきている。そこでSAGP陽性の老化細胞を除去したところ、糖尿病や動脈硬化の進展が抑制されることが分かった。これらの結果から、SAGPは新たな疾患の治療になりうるということが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の治療は様々開発されてきているが、近年ポリファーマシーの問題も顕在化してきており、新しい治療が望まれている。老化はこれらの疾患の基盤の病態であるが、老化を標的とした治療はこれまで成功していない。本研究では細胞老化を標的として、生活習慣病の治療を行うという全く新しい治療の開発を目的とした研究である。研究の結果から、SAGPという細胞を老化から保護する分子を新たに同定し、SAGPを標的とした治療、動脈硬化や糖尿病などの疾患に有用である可能性を示すことができた。現在SAGPに対するワクチン療法など臨床応用を視野にいれた研究も行っている。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of senescent cells is one of the causes of aging related diseases. We identified Senescent associated glycoprotein (SAGP) as a novel senescent antigen (seno-antigen). SAGP protects senescent cells from dysfunction by maintaining lysosomal homeostasis. Angiogenesis and endothelial function were improved by SAGP overexpression. Recent study showed that elimination of senescent cells improved age related diseases. Elimination of SAGP positive senescent cells attenuated atherosclerosis and glucose intolerance. These data indicate that SAGP would become a novel therapeutic target of age related disorders.

研究分野：老化

キーワード：細胞老化 老化細胞除去

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は動脈硬化のメカニズムについて研究し、テロメアシグナルや Ras/ERK シグナル、インスリン・Akt シグナル (EMBO J 2004, Circ Res 2001, 2006, 2008, Circulation 2002, 2003, 2006) が p53 依存性細胞老化シグナルを活性化することを明らかにした。また、その活性化は血管老化・動脈硬化だけではなく、脂質異常症や高血圧などの生活習慣病の病態生理に関与することを示してきた (Nat Rev Cardiol 2008)。近年では、これらの細胞老化シグナルが、心不全や糖尿病の病態生理にも関わっていること、さらに細胞老化を標的とした治療がこれらの疾患の発症や進展を抑制することを報告した (Nature 2007, Nat Med 2009, J Exp Med 2009, J Clin Invest 2010, Circ Res 2010, Circulation 2010, Cell Metab 2012, Cell Metab 2013, Cell Reports 2014)。

これらの結果より、新規血管老化関連分子を発見することで、動脈硬化性疾患だけではなく、糖尿病などの冠危険因子を含めた総合的な循環器疾患の重症度・予後マーカーになる可能性があり、さらにその分子の生理機能を解明することで、動脈硬化疾患をはじめとする生活習慣病の包括的な治療標的になりうると考えた。

### 2. 研究の目的

細胞レベルの老化は動脈硬化をはじめとする様々な生活習慣病の発症・進展に関与しており、細胞老化を制御することは新たな治療標的になりうる。申請者は血管細胞老化で発現が上昇する新規血管老化関連分子 (GP-X、SEMA-A) を同定した。実際、ヒト血管内皮細胞においてこれらの遺伝子が分裂老化に伴って発現が上昇することを確認した。そこで本研究では、GP-X の血管老化マーカーとしての有用性を検証するとともに、その発現が老化に伴って上昇するメカニズムや、さらに細胞老化を制御するメカニズムを解明することによって、GP-X を標的とした新規の血管治療の開発を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

血管老化に伴って上昇する GP-X の血管老化マーカーとしての有用性を検証するとともに、これらの分子を標的とした治療法の開発を目指し、以下の研究を推進する。

- 1) GP-X の発現抑制または過剰発現を行なったヒト血管内皮細胞を用い、血管老化や老化シグナルへの影響を検証し、これらの分子による老化制御メカニズムを明らかにする。
- 2) 老化や加齢関連疾患モデルマウスにおいて、各臓器での GP-X の発現変化について検証し、血管老化、脂肪老化におけるこれらの分子の機能について明らかにする。
- 3) 循環器疾患患者において GP-X の血中濃度を測定し、血管老化マーカーとしての有用性について明らかにする
- 4) GP-X 欠損マウス及び過剰発現マウスにおいて、個体老化、加齢関連疾患への影響を検討し、個体寿命や疾患発症・進展への関与について明らかにする。
- 5) GP-X 陽性細胞除去マウスを作成し、GP-X を標的とした老化細胞除去治療の有用性について検討する。

### 4. 研究成果

#### 1) GP-X による老化制御メカニズム

GP-X は老化で発現が上昇していたことから、GP-X を抑制することで老化を抑制できるのではないかと考えた。そこで siRNA, shRNA を用いて血管内皮細胞において GP-X の発現を抑制したところ、細胞寿命は短縮し、細胞老化マーカーが上昇することが明らかとなり、GP-X は老化で発現が増加し、細胞保護的に働いている分子であることが示唆された。細胞老化仮説から、活性酸素種に注目したところ、GP-X 発現抑制細胞では活性酸素、特にミトコンドリア活性酸素が低下していた。さらに電子顕微鏡で観察したところ、GP-X 発現抑制細胞では異常なリソソームの蓄積が見られた。血管内皮細胞に GP-X - mCherry を過剰発現させたところ、GP-X はリソソーム、エンドソームなどの細胞内オルガネラに局在することがわかった。細胞老化でリソソームストレスが増加していることはよく知られており、GP-X はリソソームの恒常性維持を介して細胞保護的に働いていると仮説を立て、リソソームに注目したところ、GP-X 発現抑制細胞ではリソソームの pH が上昇しており、酵素活性が低下していることがわかった。さらにミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーが GP-X 発現抑制細胞で抑制されていることから、これにより傷害を受けたミトコンドリアが除去されず、細胞老化が促進している可能性が示唆された。さらに proteomics 解析から、GP-X はリソソームの pH を調整するプロトンポンプである V-ATPase と結合することもわかった。また、GP-X を制御する転写因子として、リソソームの恒常性維持に関わる MITF/TFEs ファミリーが老化細胞において GP-X の発現を制御していることを明らかとした。老化では異常な分子などの消化によりリソソームストレスがかかることが一般的に知られていることから、GP-X が老化で誘導されるという知見と合致すると考えられた。

#### 2) 老化や加齢関連疾患モデルマウスにおける GP-X の発現変化

老齢マウスの各臓器での GP-X の発現を調べたところ、血管の豊富な大動脈、肺の他に、白色脂肪組織、骨髄において発現が高く、老化でその発現が上昇することがわかった。そこで病態

モデルマウスとして、動脈硬化モデルマウス(ApoE KO マウス)と高脂肪食負荷による肥満・糖尿病モデルマウスでの発現について検討したところ、動脈硬化モデルマウスの大動脈や血管内皮細胞、肥満・糖尿病モデルマウスの白色脂肪組織において GP-X の発現が顕著に上昇していることが明らかとなった。

さらに、動脈硬化モデルマウスや糖尿病、肥満モデルマウス、老化マウスなどの病態モデルマウスを作成し、大動脈の GP-X の発現を確認したところ、GP-X の発現が亢進していることがわかった。それらのマウスの肺から内皮細胞を磁気細胞分離で単離し、GP-X の発現を比較したところ、やはり動脈硬化、肥満、老化マウスでは発現が上昇していた。これらのことから GP-X は加齢関連疾患のバイオマーカーになり得ることが示唆された。

### 3) 循環器疾患患者にける GP-X の発現変化

当科に入院した患者の血液から RNA を抽出し、GP-X の発現を測定したところ、動脈硬化性疾患を有する患者では GP-X の発現が有意に増加していることがわかった。また手術標本を用いた検討から、動脈硬化性疾患を有する患者の血管内皮細胞において、GP-X の発現が高いこともわかり、ヒトにおいても GP-X は加齢関連疾患のバイオマーカーになり得ることが示された。

### 4) GP-X 欠損マウス及び過剰発現マウスを用いた病態モデルマウスにおける GP-X の機能

疾患における GP-X の機能を評価するため、GP-X 欠損マウスと GP-X 過剰発現マウスを作成し、病態モデルを作成した。下肢虚血モデルを作成し解析したところ、下肢虚血後、GP-X の発現は著明に高くなることを見出した。血管新生能をレーザードップラーで評価したところ、GP-X 欠損マウスでは下肢虚血後の活性酸素が増加しており、血流改善が遅延していたのに対し、GP-X 過剰発現マウスでは、血流改善が促進することが明らかとなった。また高脂肪食を付加したマウスの腸骨動脈を取り出し、血管機能を評価したところ、GP-X 欠損マウスでは高脂肪食負荷による内皮機能が悪化していたのに対し、GP-X 過剰発現マウスでは悪化は軽度にとどまった。さらに動脈硬化病変における GP-X の役割を明らかにするべく、動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスを交配させ、GP-X の有無による動脈硬化病変形成への影響を検討したところ、GP-X 欠損マウスでは動脈硬化巣が増加していたのに対し、GP-X 過剰発現マウスでは減少していた。これらの結果から、GP-X はこれらの病態で発現が上昇し、細胞保護的に働く分子であることがわかり、GP-X の発現調節はこれらの疾患の治療標的になりうると考えられた。

### 5) GP-X 陽性細胞を標的とした老化細胞除去治療の有用性

さらに近年、老化細胞除去により個体老化を制御できるという研究が次々と報告された。GP-X は老化細胞の良い分子マーカーであり、老化細胞除去治療の標的になりうることを考え、GP-X のプロモーターの下流にジフテリア毒素受容体を発現させるように設計したトランスジェニックマウスを作成し、GP-X 陽性細胞除去による老化への影響について検討した。糖尿病モデルにおいて GP-X 陽性細胞を除去すると、老化細胞が除去され、肥満、糖尿病が改善する事を明らかにした。また、動脈硬化モデルマウスで同様に GP-X 陽性細胞を除去すると、動脈硬化巣形成が抑制されることが明らかとなった。以上より、GP-X の modulation だけでなく、GP-X を老化抗原(seno-antigen)として細胞老化を抑制することは新たな治療標的になるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Masayoshi Suda, A crucial role for senescence-associated glycoprotein(SAGP) in the maintenance of vessel homeostasis, American Heart Association (AHA) congress 2015 (国際学会)、2015 年
2. 清水 逸平, A crucial role for senescence-associated glycoprotein(SAGP) in the maintenance of vessel homeostasis, 第 12 回脳血管抗加齢研究会、2015 年
3. 須田 将吉, A crucial role for senescence-associated glycoprotein(SAGP) in the maintenance of vessel homeostasis, 第 32 回国際心臓研究学会日本部会(ISHR2015)、2015 年
4. 須田 将吉, A crucial role for senescence-associated glycoprotein(SAGP) in the maintenance of vessel homeostasis, 第 80 回日本循環器学会、2016 年
5. Masayoshi Suda, A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis, European Society of Cardiology (ESC) congress 2016(国際学会)、2016 年
6. Masayoshi Suda, A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the

maintenance of vessel homeostasis、19th International Vascular Biology Meeting (IVBM) (国際学会)、2016年

7. Masayoshi Suda、A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis、第81回日本循環器学会学術集会、2017年
8. Masayoshi Suda、A novel protein Senescence-associated glycoprotein (SAGP) is involved in the vessel homeostasis in murine hind limb ischemia model、European Society of Cardiology (ESC) congress 2017(国際学会)、2017年
9. Masayoshi Suda、A novel protein Senescence-associated glycoprotein (SAGP) is involved in the mitochondrial homeostasis by regulating mitophagy and attenuates atherosclerotic diseases、第34回国際心臓研究学会日本部会(ISHR) 2017、2017年
10. Masayoshi Suda、A novel protein Senescence-associated glycoprotein (SAGP) is involved in the mitochondrial autophagy and improves atherosclerotic disease、第82回日本循環器学会学術集会、2018年
11. 須田 将吉、新規血管老化関連分子 SAGP を標的とした抗老化治療、第22回日本心血管内分泌代謝学会学術集会(CVEM)、2018年
12. Masayoshi Suda、Senescence-associated glycoprotein (SAGP) inhibits age-related endothelial dysfunction by the activation of mitophagy in vascular diseases、European Society of Cardiology (ESC) congress 2018 (国際学会)、2018年
13. 須田 将吉、新規血管老化関連分子 SAGP を標的とした抗老化治療、第39回日本肥満学会、2018年
14. Masayoshi Suda、Senescence-associated glycoprotein (SAGP) improves age-related endothelial dysfunction by regulating lysosomal homeostasis and mitophagy、American Heart Association (AHA) congress 2018 (国際学会)、2018年
15. 須田 将吉、新規血管老化関連分子 SAGP を標的とした抗老化治療、第26回日本血管生物医学会学術集会、2018年
16. Masayoshi Suda、Senescence-associated glycoprotein (SAGP) inhibits age-related endothelial dysfunction by the regulating mitophagy in vascular diseases、第83回日本循環器学会学術集会、2019年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：清水 逸平

ローマ字氏名：Ippei Shimizu

所属研究機関名：新潟大学  
部局名：医歯学総合研究科  
職名：特任准教授  
研究者番号（8桁）：60444056

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：南野 徹  
ローマ字氏名：Thoru Minamino

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。