

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08063

研究課題名(和文)新規老化関連分子SAGPを標的とした老化細胞除去による加齢関連疾患治療法の開発

研究課題名(英文)The therapeutic potential of senolysis targeting SAGP for age related disorders

研究代表者

須田 将吉 (Suda, Masayoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・専任助教

研究者番号：70714509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が老化抗原として同定したSAGPを標的とした老化細胞除去治療の有用性を検討するため、SAGP陽性細胞を除去するワクチンを確立した。SAGPの一部のペプチドを抗原としたワクチンを肥満、糖尿病マウスにこのワクチンを投与すると脂肪組織における老化細胞が低下し、耐糖能の改善を認めた。また動脈硬化モデルマウスであるApoE欠損マウスにワクチンを投与すると炎症性サイトカインなどの低下と動脈硬化巣の減少とを認めた。さらに早老症モデルマウスの寿命を延長することも明らかとなった。これらの結果から、SAGPを標的とした老化細胞除去治療は糖尿病、動脈硬化をはじめとする生活習慣病の新しい治療となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、老化細胞除去により加齢に伴う様々な疾患および個体老化を改善するという報告が出てきているが、老化細胞除去に用いる薬剤の多くは抗がん剤であり、新たな標的分子が必要であった。本研究ではSAGPを老化細胞除去の新しい標的分子として有用であることを示した。またSAGPを標的としたワクチン治療が糖尿病や動脈硬化、個体老化に有用である事を明らかにした。また、既存の老化細胞除去薬は投与後比較的早期に老化細胞が再度蓄積される事から、生活習慣病や老化といった慢性的病態において長期間作用の持続するワクチン療法は非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel protein, senescence-associated glycoprotein (SAGP), as a biomarker of cellular senescence. SAGP expression in aorta and adipose tissue were significantly increased in chronological aging mice, atherosclerosis mice and obese mice. We developed a cytotoxic vaccine targeting SAGP. Treatment with SAGP vaccine successfully eliminated SAGP positive senescent cells in the adipose tissue of the obese mice and improve glucose metabolism. Administration of SAGP vaccine to ApoE-KO mice significantly reduced atherogenesis with the improvement of inflammation. Furthermore, vaccine treatment extended the lifespan of progeroid mice. These data indicate that senolytic therapy targeting SAGP-positive cells could become a strategy for aging and age related diseases.

研究分野：生活習慣病

キーワード：細胞老化

1. 研究開始当初の背景

申請者らは生活習慣病における細胞老化の関与に着目し、ヒトの動脈硬化巣やマウスの脂肪組織において老化細胞が蓄積していること (Circ Res 2007, Circulation 2002, Nat Med 2009)、生活習慣病において細胞老化の中心分子である p53 が活性化していること (EMBO J 2004, Circ Res 2001, 2006, 2008, Circulation 2002, 2003, 2006)、p53 細胞老化シグナルを制御することで、動脈硬化や心不全や糖尿病などの加齢関連疾患の発症や進展を制御できることを報告した (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)。

老化細胞の蓄積が様々な疾患の原因であると考えられており、近年、その老化細胞を除去することで疾患の治療を行おうという試みが行われるようになってきている。老化細胞特異的にアポトーシスを起こすように設計されたマウスでは、加齢による腎機能低下や心臓のストレス耐性低下、認知機能低下といった加齢関連疾患の発症が抑制され、見た目も若々しく、驚くべきことに寿命まで延長されるという研究が報告された。この結果を受け老化細胞除去治療薬の開発も試みられているが、幾つかの抗癌剤が比較的特異的に老化細胞を除去できるというのが現状であり、臨床応用できるような良い治療標的や効果的な薬剤は未だ見つかっていない。

申請者らは、老化のメカニズムを解明するために、新たな老化関連分子の探索をおこなった。血管内皮細胞の継代老化の DNA マイクロアレイの結果から、老化にて発現が特異的に上昇する分子、新規老化関連分子 (Senescence associated glycoprotein; SAGP) を同定した。予備実験から、老化マウス、動脈硬化モデルマウスの大動脈において SAGP の発現が上昇していることを明らかにした。また、SAGP は肥満マウスの脂肪組織でも高発現していることもわかり、老化や加齢関連疾患の病巣で高発現する分子であることが示唆された。さらに当院の患者の手術標本を解析したところ、動脈硬化性疾患を有する患者の血管では SAGP の発現が高いことがわかった。また、動脈硬化性疾患を有する患者の白血球でも SAGP の発現が有意に高いことも分かった。

2. 研究の目的

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ており、予備実験の結果より、SAGP 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と考えられた。そこで本研究では SAGP を標的とした老化細胞除去治療を開発し、生活習慣病の改善ならびに寿命の延伸効果の検証を行うことを目的とした。申請者らは既に SAGP 発現細胞を特異的に除去するよう設計したマウスの作成と SAGP 発現細胞を傷害する抗体 (ワクチン) 製剤の開発にも着手しており、病態モデルでの効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) SAGP 陽性細胞特異的除去マウスの解析

老化や生活習慣病の病変部で SAGP の発現が上昇していたことから、SAGP 陽性の老化細胞の蓄積が組織の機能異常の一因となり、老化や生活習慣病の発症や進展に関与していることが示唆される。そこで SAGP 陽性の老化細胞を除去することで老化や生活習慣病の発症、進展が抑制できるかを検証することとした。SAGP のプロモーター領域にヒトジフテリア毒素受容体を発現させたマウスを作製した。このマウスではジフテリア毒素投与により、SAGP 陽性細胞特異的に細胞死を起こすことが可能である。このマウスに高脂肪食負荷を行い、肥満、糖尿病モデルを作成し、ジフテリア毒素を用いて脂肪組織における老化細胞除去を行い、体重や耐糖能、インスリン抵抗性などの改善作用を検証する。内臓脂肪重量や糖尿病、脂質異常などの血中マーカーの改善なども検証する。また、動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスと交配し、動脈硬化モデルマウスにおいて SAGP 陽性の老化細胞除去を行い、動脈硬化巣の退縮効果を検証する。

(2) SAGP 陽性細胞特異的除去ワクチンの有用性の検討

SAGP 除去治療を臨床応用するために、申請者らは抗体 (ワクチン) 治療に着目した。共同研究者である中神らは、標的タンパクのペプチドと核酸アジュバントを用いて陽性細胞を攻撃する抗体を作製させる方法を確立している。そこで SAGP を標的としたワクチンの作製とその効果の検証を行うこととした。すでに共同研究者協力のもと、ワクチンの作製に着手している。ワクチンでの老化、生活習慣病治療の有効性が明らかとなれば、世界初の抗老化治療薬の臨床応用も可能になる。高脂肪症負荷による肥満、糖尿病モデルマウスや動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスを用いて、ワクチン投与により SAGP 陽性の老化細胞を除去し、肥満や糖尿病の改善効果、動脈硬化巣の退縮効果の検証を行う。さらに、老化マウスや Zmpste 欠損マウスなどの老化モデルマウスに対しても抗体製剤の投与を行い、老化形質の抑制や寿命の延伸効果の検証を行う。

(3) 老化における SAGP 発現制御メカニズムの解明

老化における SAGP の発現制御機構とその生理的意義を解明すれば、ワクチンだけではなく、内因性に老化細胞除去を誘導することも可能になる。そこで老化で SAGP の発現が上昇する機序を明らかにするために、老化における SAGP 制御分子の探索を行なう。現在、共同研究者である

岩間らとともに、若い血管内皮細胞と継代老化させた血管内皮細胞の ATAC-seq 解析を行ない、SAGP のエピジェネティックな制御機構について調べている。さらに ChIP-seq 解析も行ない、SAGP の上流の制御分子の解明だけではなく、**老化分子の発現制御メカニズムについて網羅的に解析を行ない、老化のエピジェネティクスについて解析を行なう。**

また、申請者らはこれまで SAGP 発現抑制細胞と過剰発現細胞を作成し、予備実験をおこなった。SAGP 発現抑制細胞を作成し解析を行ったところ、**SAGP 発現抑制細胞では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抑制され、活性酸素が蓄積していた。一方で、SAGP 過剰発現細胞では過酸化水素による酸化ストレスによる細胞死が抑制されるという結果も得られた。**このことから、老化細胞は SAGP の発現を増加させ、ミトコンドリアの恒常性を維持し、活性酸素蓄積による細胞死を回避している可能性が示唆される。そこで SAGP がマイトファジーのどの過程に関与しているのかを明らかにし、老化細胞の細胞死回避メカニズムを明らかにする。すでに SAGP 抑制細胞および過剰発現細胞は得られており、電子顕微鏡や免疫染色などの解析を進めている。

4. 研究成果

(1) SAGP 陽性細胞特異的除去マウスの解析

SAGP 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ジフテリア毒素投与により SAGP 陽性細胞を特異的に除去できるように設計したモデルマウスを作成した。このマウスに対し、高脂肪食投与で糖尿病モデルを作成し、SAGP 陽性細胞除去効果の検討を行った。高脂肪食負荷により脂肪組織において老化細胞は増加し、これとともに SAGP 陽性細胞も増加していた。SAGP 陽性細胞を除去すると、老化細胞も減少していることがわかり、このマウスは老化細胞除去治療の効果を検討するのに有用であることが示唆された。そしてこのマウスでは SAGP 陽性老化細胞を除去すると体重が減少し、耐糖能が改善することが明らかとなった。さらに動脈硬化モデルマウスで同様に SAGP 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わかった。

2) SAGP 陽性細胞特異的除去ワクチンの有用性の検討

SAGP を老化抗原(seno-antigen)とした細胞傷害性の抗体を誘導するワクチンを樹立した。このワクチンにより 2-4 週で SAGP に対する抗体価が上昇した。肥満モデルマウスにこのワクチンを投与すると、脂肪組織における SAGP 陽性老化細胞が減少し、耐糖能が改善するという、SAGP 除去マウスと同様の結果が得られた。また、動脈硬化モデルマウスで同様に、ワクチン投与により動脈硬化巣形成が抑制されることがわかった。さらに、加齢マウスと早老症モデルマウスに対してこの SAGP 陽性細胞除去ワクチンを投与し、個体老化や老化形質の改善効果について検討を行った。50 週齢の加齢マウスにワクチンを投与し、20 週後にオープンフィールドテストを用いて運動機能の評価を行なったところ、SAGP ワクチン群ではコントロールワクチン群に比して加齢による平均移動速度や移動距離などの加齢による運動機能の低下が軽減されることが明らかとなった。SAGP は筋肉での発現量は多くなく、そのメカニズムについてはさらなる検討を要する。さらに Zmpste24 欠損マウスに SAGP ワクチンを投与し寿命を計測したところ、SAGP ワクチン投与群では平均寿命が延長した。以上より SAGP を標的とした老化細胞除去治療は生活習慣病の病態を改善し健康寿命を伸ばすのみならず、個体寿命も延伸する可能性が示唆された。

既存の老化細胞除去薬である Navitoclax と D+Q (Dasatinib+Quercetin) を肥満モデルマウスに投与したところ、1 週間で老化細胞の除去が確認された。しかし投与後比較的早期に老化細胞が再度蓄積される事と、血球減少などの副作用を認めることが明らかとなった。ワクチン療法では効果発現は緩徐であるが、持続期間は長く続くこと、血球減少の副作用は来さないという優位性を見出した。老化や生活習慣病では長期に渡る治療を必要とし、また少ない副作用が必須と考えられることからワクチン療法の有用性が示されたと考えられる。

またフローサイトメトリーを用いた解析で細胞種別の SAGP ワクチンの効果について検討を行なった。SAGP はこれまで炎症細胞、特にマクロファージで高発現しているという報告がなされており、ワクチン療法のメカニズムが本当に老化細胞除去によるものなのか、炎症細胞の抑制によるものなのかが明らかになっていなかったが、実際肥満マウスの脂肪組織では老化した繊維芽細胞や内皮細胞、炎症細胞で高発現していることがわかり、これらの細胞がワクチンで除去される事が確認されたことから、細胞種によらず老化細胞を特異的に除去していることが示された。これまでの結果をまとめると、SAGP は老化細胞に特異的な Seno-antigen であり、SAGP を標的としたワクチン療法は糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の治療標的として有用であることが明らかとなった。

(3) 老化における SAGP 発現制御メカニズムの解明

SAGP はパフィロマイシンやクロロキンなどのリソソームストレス刺激により発現が増加することや TFEB などのリソソームの生合成、恒常性維持に関与する転写因子により発現が調整されることがわかった。ChIP-seq や ATAC-seq 解析をおこない、老化した血管内皮細胞で実際に TFEB などの転写因子が結合する領域が開いている事も明らかにした。SAGP は細胞表面から細胞内に取り込まれることやリソソームに多く局在し、プロトンポンプである VATPase と結合することも分かった。以上をまとめると老化細胞ではリソソームストレスがかかっており、これに应答しリソソームの恒常性を維持するために SAGP の発現が上昇する可能性が示唆された。

総括

我々は細胞老化で発現が上昇する分子、senescence-associated glycoprotein (SAGP)を同定した。SAGP は老化マウスの血管や脂肪、動脈硬化性疾患を有する患者の血管内皮で発現が上昇していた。そこで我々は SAGP を標的とした老化細胞除去治療の有用性を検討するため、SAGP 陽性細胞を除去するワクチンを確立した。SAGP の一部のペプチドを抗原としたワクチンを肥満、糖尿病マウスにこのワクチンを投与すると脂肪組織における老化細胞が低下し、耐糖能の改善を認めた。また動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスにワクチンを投与すると炎症性サイトカインなどの低下と動脈硬化巣の減少とを認めた。さらに早老症モデルマウスの寿命を延長することも明らかとなった。これらの結果から、SAGP を標的とした老化細胞除去治療は糖尿病、動脈硬化をはじめとする生活習慣病の新しい治療となると考えられた。また早老症モデルマウスの寿命を延長することや加齢マウスの運動機能低下を抑制する事も明らかとなり、個体老化を抑制できる可能性も示唆された。

近年、老化細胞除去により加齢に伴う様々な疾患および個体老化を改善するという報告が出てきているが、老化細胞除去に用いる薬剤の多くは抗がん剤であり、新たな標的分子が必要であった。本研究では SAGP を老化細胞除去の新しい標的分子として有用であることを示した。また SAGP を標的としたワクチン治療が糖尿病や動脈硬化、個体老化に有用である事を明らかにした。また、既存の老化細胞除去薬は投与後比較的早期に老化細胞が再度蓄積される事から、生活習慣病や老化といった慢性の病態において長期間作用の持続するワクチン療法は非常に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 新規血管老化関連分子SAGPを標的とした抗老化治療
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 Senescence-associated glycoprotein (SAGP) inhibits age-related endothelial dysfunction by the activation of mitophagy in vascular diseases.
3. 学会等名 European Society of Cardiology(ESC) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 新規血管老化関連分子SAGPを標的とした抗老化治療
3. 学会等名 European Society of Cardiology(ESC) 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 Senescence-associated glycoprotein (SAGP) improves age-related endothelial dysfunction by regulating lysosomal homeostasis and mitophagy
3. 学会等名 American Heart Association (AHA) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 新規血管老化関連分子SAGPを標的とした抗老化治療
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田 将吉
2. 発表標題 Senescence-associated glycoprotein (SAGP) inhibits age-related endothelial dysfunction by the regulating mitophagy in vascular diseases
3. 学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------