

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11034

研究課題名(和文) 脂肪組織特異的CREG1-Tgマウスによる老化制御・寿命延長の検討

研究課題名(英文) Effects of CREG1 on Age-Associated Phenotypes and life span in Mice

研究代表者

橋本 理尋 (Michihiro, Hashimoto)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90724253

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)：高齢化社会を迎えた先進国では、老化制御に関する研究が渴望されている。我々は、脂肪組織特異的にCellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) の発現が誘導されるトランスジェニック (aP2-CREG1-Tg) マウスを用いて、CREG1血中濃度が腎加齢疾患に与える影響について解析した。aP2-CREG1-Tgマウスでは、野生型で認められた加齢性のCREG1上昇が抑制されていた。加えて、aP2-CREG1-Tgマウスの腎臓では、癌抑制機構として重要な役割を担う細胞老化の蓄積が減少しており、腎加齢疾患の進行が抑制されていることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自に樹立したaP2-CREG1-Tgマウスを用いて、加齢に伴う生体内CREG1量の変化が、腎臓における細胞老化の蓄積に関与しており、腎加齢疾患の増悪化に影響を与えていることを示すことに成功した。本研究結果により、CREG1の生体レベル制御により様々な加齢性疾患を予防・治療する新規の健康増進法の開発に繋がる可能性が示唆された。また、CREG1はヒトにも多量に存在する生体内分泌因子であることから、臨床へも応用可能な安全な標的分子となり得る。

研究成果の概要(英文)：Aging societies have become a problem in developed countries, and research on aging control is eagerly desired. We use transgenic mice, the expression of Cellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) is induced specifically in adipose tissue (aP2-CREG1-Tg mice), and examined the effects of blood concentration of CREG1 on age-associated phenotypes. The age-related increase in CREG1 observed in the wild type mice was suppressed in aP2-CREG1-Tg mice. Moreover, we have found that the accumulation of cellular senescence, plays an important role in tumor suppression, is reduced in the kidneys of aP2-CREG1-Tg mice, and the progression of renal age-associated phenotypes is suppressed.

研究分野：アンチエイジング

キーワード：CREG1 細胞老化 腎加齢疾患 癌抑制機構 アンチエイジング

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え生活習慣病の増悪化が社会問題となっている先進国では、健康寿命延長や老化抑制に関する研究推進が渴望されている。一般的に、肥満や糖尿病などの生活習慣病態が進行した条件下では、健常者と比較してインスリン抵抗性が高まり、老化の進行が加速される。我々は先行研究で、脂肪組織特異的に Cellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) の発現が誘導されるトランスジェニック (aP2-CREG1-Tg) マウスを作製し、CREG1 が脂肪燃焼を介して抗肥満に働く褐色脂肪の分化を促進し、高脂肪食投与による食餌誘導性肥満を抑制することを見出した。加えて、褐色脂肪化の促進により抗肥満作用を示すだけでなく、脂肪肝やインスリン抵抗性等の様々な生活習慣病を改善する新規内分泌因子であることを明らかにしていた [参考文献 (1)]。また CREG1 は細胞増殖や分化制御に関わる転写因子である Rb との相互作用があることや [参考文献 (2)]、癌抑制遺伝子である p16^{INK4a} に依存した細胞老化に影響を与えている可能性も報告されていることから [参考文献 (3)]、CREG1 細胞レベルの老化や組織レベルの老化制御を通じて、個体の老化に影響を及ぼす分子である可能性が考えられた。しかしながら、CREG1 が加齢疾患へ与える影響については報告がなかった。加えて、CREG1 がどのような分子作用機序で細胞老化を制御しているかについても知見が得られていなかった。

2. 研究の目的

我々は、脂肪細胞からの恒常的な発現を介して、生体内の CREG1 レベルが変化している aP2-CREG1-Tg マウスを利用し、CREG1 血中濃度と老化・発癌性との関係性を明らかにすると共に、CREG1 が細胞老化を制御する分子機序を明らかにし、CREG1 が抗肥満や生活習慣病改善に寄与するだけでなく、細胞・組織レベルの老化を制御する新規の内分泌因子と成り得るかを検証することを目的とした。加えて、生体内内分泌因子である CREG1 が、組織レベルでの加齢性疾患の増悪化を制御する新規の標的分子となり得るかについて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

我々が着目している CREG1 は、肝臓や褐色脂肪組織をはじめとする様々な組織から分泌され、血中に多量に存在しているが、加齢に伴う CREG1 血中濃度の変化については知見がなかった。よって、我々は、月齢と CREG1 血中濃度の関連を明らかにするため、通常食で飼育した野生型と aP2-CREG1-Tg マウスの両群から、9ヶ月齢以降に、3ヶ月毎に血清を採取し、ウェスタンブロットリング法を用いて CREG1 血中濃度の解析を実施した。また、CREG1 発現量が腎加齢疾患に与える影響について解析するため、通常食で25ヶ月齢まで飼育した野生型と aP2-CREG1-Tg マウスの両群から腎臓を採取し、H&E 染色や糖を染色する PAS 染色による組織学的な解析を行った。加えて、細胞老化の蓄積や、細胞老化特異的な分泌表現型である SASP 因子の発現レベルを評価するため、定量的 RT-PCR 解析を行った。また、腎組織から調整したタンパク質溶液についてウェスタンブロットリング解析を行い、p38MAPK タンパク質のリン酸化レベルについて評価した。

4. 研究成果

我々が研究標的とした CREG1 は、肝臓や褐色脂肪組織をはじめとする様々な組織から分泌される分泌糖タンパク質であり、ヒトの血中にも多量に存在している。我々は、マウスを用いた先行研究により、生体内の CREG1 発現量が代謝状況により変化することを見出したが、一方で、加齢に伴う CREG1 血中濃度の推移については知見がなかった。

よって、我々は、まず通常食で9ヶ月齢まで飼育した野生型と aP2-CREG1-Tg マウスから、3ヶ月毎に血清を採取し、ウェスタンブロットリング法を用いて CREG1 血中濃度の解析を行った。興味深いことに、野生型マウスでは、若齢と比較して18ヶ月齢以降では、著しく CREG1 血中濃度が上昇していることが明らかとなった。一方で、分子機序は不明であるが、aP2-CREG1-Tg マウスでは、加齢に伴う CREG1 血中濃度の著しい上昇が抑制されていた [参考文献 (4); 図 1]。これらの結果は、CREG1 血中濃度の上昇と、加齢に伴う全身の組織機能の低下に何らかの関係性があることを示唆している。

次に、我々は、生体内の CREG1 発現レベルの変化が組織の加齢性疾患に与える影響について解析を行うため、25ヶ月齢の老齢マウスの腎臓について組織学的な解析を行った。興味深いことに、H&E 染色による解析では、野生型マウスと比較して Tg マウスの腎臓では加齢性の腎硬化の進行が抑制されていることが示唆された。加えて、加齢性の腎硬化の進行に伴い、糸球体の粘液多糖が増加することが知られていることから、糖を染色する PAS 染色法を用いて腎組織を染色し、糸球体の染色強度について画像定量解析を行った。若齢マウスと比較して、老齢の野生型マウスでは糸球体の粘液多糖が増加していたが、老齢の Tg マウスの糸球体では粘液多糖の増加は抑制されていた [参考文献 (4); 図 2]。

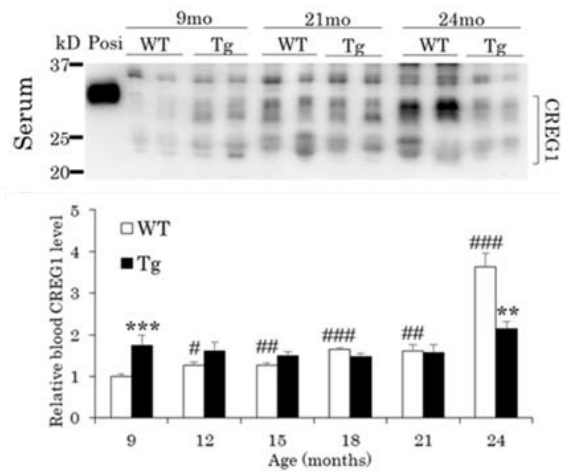


図1 加齢とCREG1血中濃度の推移（※参考文献（4），Fig. 1 E, Fを改変）
 上段：血清のウェスタンブロッティング解析，
 下段：ウェスタンブロッティングのシグナル定量解析

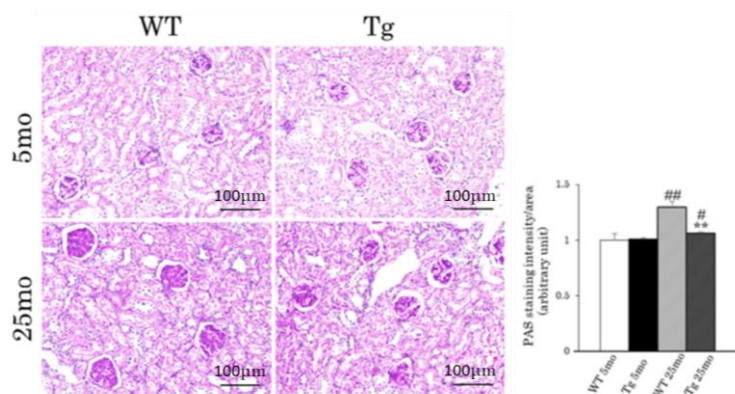


図2 老齢マウスの腎糸球体における粘液多糖の蓄積（※参考文献（4），Fig. 4 C, Dを改変）
 左：腎糸球体のPAS染色画像，
 右：PAS染色画像のシグナル定量解析

続いて、組織学的に変化が認められた腎臓において、実際に腎機能に変化があるかを調べるため、腎ろ過機能の評価する指標となるクレアチニンとシスタチンCの血中濃度についてELISA法による解析を行い、野生型マウスでは加齢に伴い腎ろ過機能が低下していたのに対して、Tgマウスではそれらの低下が抑制されていることを見出した [参考文献（4）；図3]。これらの結果は、加齢に伴うCREG1血中濃度の著しい上昇が、腎臓のろ過機能の低下に影響を与えている可能性を示唆している。しかしながら、CREG1が加齢性の腎機能の低下を制御する分子機構については報告がない。

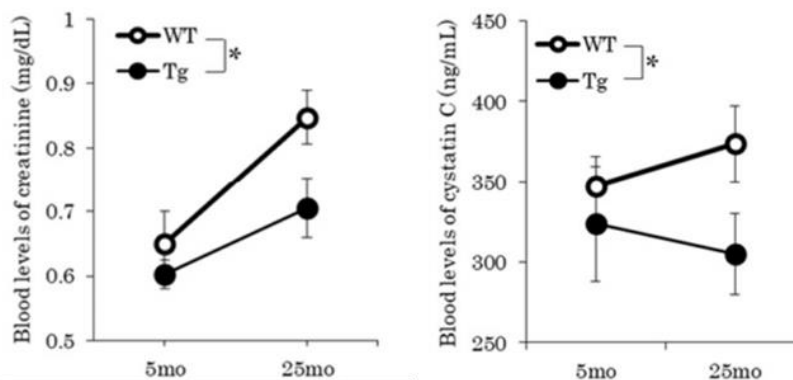


図3 血清を用いた腎ろ過機能の評価（※参考文献（4），Fig. 4 E, Fを改変）

我々は以前に、生体における主要な癌抑制機構である細胞老化が、加齢に伴う肺組織機能の低下の一因となっていることを報告している。具体的には、ジフテリアトキシン投与により、生体から老化細胞を特異的に除去可能な ARF-DTR マウスを独自に作製し、加齢により一旦低下した肺組織の機能が、老化細胞除去により可逆的に改善されることを見出していた [参考文献 (5)]。よって、我々は CREG1 と腎機能との関連性について調べるため、老齢の野生型と Tg マウスの腎臓における *Ink4a* 及び *Arf* の遺伝子発現解析を行った。*Ink4a* と *Arf* は共に主要な細胞老化のマーカー遺伝子である。

若齢マウスと比較して、老齢の野生型マウスの腎臓では *Ink4a* と *Arf* の発現上昇が認められたのに対し、Tg マウスの腎臓ではそれらの上昇が緩和されていた [参考文献 (4); 図 4]。これらの結果は、老齢の野生型マウスでは、CREG1 血中濃度の増加により腎臓への細胞老化の蓄積が促進されている可能性があることを示唆している。しかしながら、CREG1 がどのような分子機序で細胞老化を制御しているかについてはほとんどわかっていない。

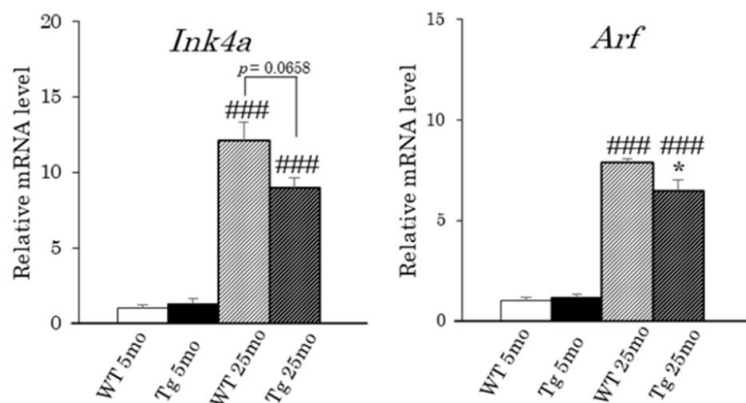


図 4 腎臓における細胞老化マーカーの発現量 (※参考文献 (4), Fig. 5 A を改変)

よって、次に我々は、CREG1 がどのような分子機序で腎臓への細胞老化蓄積に影響を与えているかについて調べるため、*Ink4a* や *Arf* の上流で細胞老化を制御している p38MAPK のリン酸化レベルについて検討を行った。若齢と比較して、炎症が惹起されている老齢の野生型マウスの腎臓では p38MAPK のリン酸化レベルが上昇していたが、炎症が緩和されている老齢の Tg マウスの腎臓では、p38MAPK のリン酸化が抑制されていた [参考文献 (4); 図 5]。これらの結果は、加齢性の CREG1 血中濃度の上昇を抑制することにより、p38MAPK 経路を介して細胞老化の蓄積が抑制され、腎臓の炎症が緩和されている可能性を示唆している。p38MAPK のリン酸化の促進が腎臓の炎症の重篤化に関与していることも報告されており、本研究結果とも一致している。

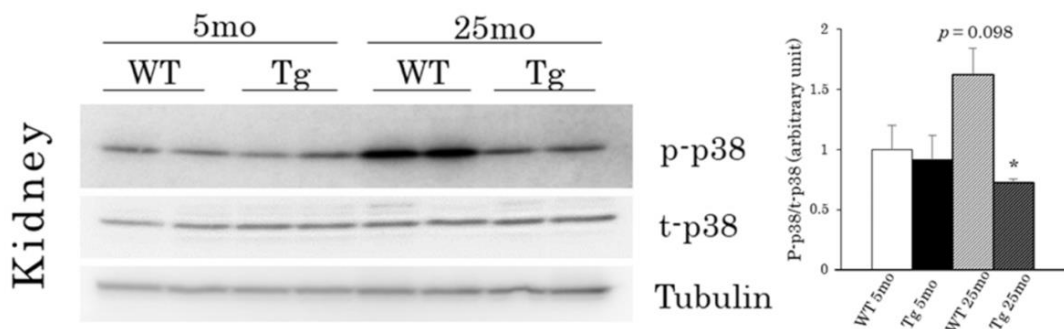


図 5 腎臓における p38MAPK のリン酸化レベル (※参考文献 (4), Fig. 6 A, B を改変)

左: ウェスタンブロッティング解析,

右: ウェスタンブロッティングのシグナル定量解析

申請当初、aP2-CREG1-Tg マウスを用いた大規模なエイジング検討実験を計画していたが、旭川医科大学教育研究推進センターに赴任した当時、研究計画を実施するに足る研究環境を得ることができなかった。また、研究期間内に 3 ヶ月間の病気休暇を取得し、その後も 1 ヶ月以上の自宅待機を大学から命じられたため、その期間実験動物の管理ができず、動物実験計画全体の推進に大幅な遅延が生じた。現在の医学部先端医科学講座に異動してからは、動物実験環境

が整備され、研究の遅れを取り戻すことができた。

一方、我々は中部大学で実施した高脂肪食を投与したマウスでの寿命検討実験で、大変興味深い研究結果を得ることに成功している。生活習慣病が惹起され、増悪しやすい食餌誘導性肥満の条件下では、野生型マウスと比較して、aP2-CREG1-Tg マウスの平均寿命が延長されていることが明らかとなった [参考文献 (6), (7)]。

本研究より、CREG1 血中濃度が加齢と共に上昇し、加齢性の腎硬化をはじめとする組織レベルの老化現象と密接に関連している可能性が示唆された。また、CREG1 が癌抑制機構である細胞老化を制御することにより、加齢性腎硬化の増悪を促進している可能性が示唆された。加えて、CREG1 が p38MAPK 経路を介して細胞老化を制御している可能性を見出した。本研究成果から、CREG1 が褐色脂肪化の促進や組織レベルの老化制御により、平均寿命や健康寿命に影響を与えている新規の寿命制御因子である可能性が見出された。CREG1 は我々の生体内に存在する内分泌因子であることから、臨床にも応用可能な分子である。将来的には CREG1 血中濃度の制御による腎加齢疾患の新規治療法の開発が可能になるかもしれない。また、生体での発癌性との関連については、動物実験計画遅延のため、本研究期間内では結論が得られなかったが、CREG1 が癌抑制機構として主要な役割を果たしている細胞老化と密接に関わっていることが示されたことから、今後の癌研究に更なる発展性が期待される。

[参考文献]

- (1) Hashimoto, M., Kusudo, T., Takeuchi, T., Kataoka, N., Mukai, T., Yamashita, H., 「CREG1 stimulates brown adipocyte formation and ameliorates diet-induced obesity in mice」, FASEB J 33 (7):8069-8082. (2019).
- (2) Veal, E. A., Eisenstein, M., Tseng, Z. H., Gill, G. A. 「Cellular Repressor of E1A-Stimulated Genes That Inhibits Activation by E2F」, Mol Cell Biol 18:5032-5041. (1998).
- (3) Moolmuang, B. and Tainsky, M. A., 「CREG1 enhances p16INK4a-induced cellular senescence」, Cell Cycle 10(3):518-530. (2011).
- (4) Hashimoto, M., Goto, A., Endo, Y., Sugimoto, M., Ueda, J., Yamashita, H., 「Effects of CREG1 on Age-Associated Metabolic Phenotypes and Renal Senescence in Mice」, IJMS 22(3):1276. (2021).
- (5) 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(12):e87732. (2016).
- (6) 橋本 理尋, 上田 潤, 山下 均, 「脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスを利用した老化研究」, 月間『細胞』52(11):41-45. (2020).
- (7) 橋本 理尋, 上田 潤, 山下 均, 「脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスを利用した老化研究 (転載)」, 月間『アグリバイオ』4(12):54-60. (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hashimoto Michihiro, Goto Ayumi, Endo Yuki, Sugimoto Masataka, Ueda Jun, Yamashita Hitoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of CREG1 on Age-Associated Metabolic Phenotypes and Renal Senescence in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1276 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hashimoto Michihiro, Kusudo Tatsuya, Takeuchi Tamaki, Kataoka Naoya, Mukai Takako, Yamashita Hitoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 CREG1 stimulates brown adipocyte formation and ameliorates diet induced obesity in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8069 ~ 8082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802147rr	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kusudo Tatsuya, Hashimoto Michihiro, Kataoka Naoya, Li Yongxue, Nozaki Aya, Yamashita Hitoshi	4. 巻 165
2. 論文標題 CREG1 promotes uncoupling protein 1 expression and brown adipogenesis in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 47 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 橋本 理尋、上田 潤、山下 均	4. 巻 4
2. 論文標題 脂肪組織特異的 CREG1-Tgマウスを利用した老化研究 (転載)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月間『アグリバイオ』	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本 理尋、上田 潤、山下 均	4. 巻 52
2. 論文標題 脂肪組織特異的 CREG1-Tgマウスを利用した老化研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月間『細胞』	6. 最初と最後の頁 41～45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本理尋、後藤亜由美、遠藤優貴、竹内環、喬善楼、山下均
2. 発表標題 aP2-CREG1-Tgマウスにおける腎加齢変性の改善
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下均、橋本理尋、竹内環、遠藤優貴、後藤亜由美、片岡直也、岡田只士、向井貴子、楠堂達也
2. 発表標題 CREG1の病態生理学的役割の解明
3. 学会等名 温熱生理研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 亜由美、遠藤 優貴、橋本 理尋、山下 均
2. 発表標題 CREG1が老齢マウスのエネルギー代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 優貴、後藤 亜由美、橋本 理尋、松井 美佳、山下 均
2. 発表標題 絶食下におけるCREG1の生理的役割の検討
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
連携研究者	山下 均 (Yamashita Hitoshi) (20342967)	中部大学・生命健康科学部・教授 (33910)	
連携研究者	杉本 昌隆 (Sugimoto Masataka) (50426491)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・ジェロサイエンス研究センター・副部長 (83903)	

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
---------	---------