

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19390206  
研究課題名（和文）老化分子 p53 による心血管代謝制御メカニズムに関する基盤研究  
研究課題名（英文）Research on the Regulation of Cardiovascular and Metabolic System by p53  
研究代表者  
氏名（ローマ字）：南野 徹（TOHRU MINAMINO）  
所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90328063

研究成果の概要：ヒトは老化するにしたがって様々な疾患、例えば、動脈硬化や糖尿病、高血圧とそれに伴う心不全などを発症する。しかしこれまで老化の側面から見たこれらの疾患の治療開発は行われていなかった。本研究では、細胞の老化分子である p53 が心不全や糖尿病の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,600,000  | 2,280,000 | 9,880,000  |
| 2008 年度 | 6,800,000  | 2,040,000 | 8,840,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管病態学、老化

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトは老化するにしたがって様々な疾患、例えば、動脈硬化や糖尿病、高血圧とそれに伴う心不全などを発症する。しかしこれまで老化の側面から見たこれらの疾患の治療開発は行われていなかった。研究が進まない原因として、まずは老化を評価するアッセイ系がないこと、そしてなによりも多様な側面をもつ「老化」という生命現象をある1つの特定の物質と結びつけることが困難である点があげられるだろう。通常ヒト正常体細胞の分裂回数は有限であり、ある一定期間増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。その寿命は培養細胞のドナーの年齢に相関するこ

と、また、早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことも報告されている。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に病的な形質を担う」という仮説に基づいて進めることにした。この仮説が成り立つとすれば、細胞レベルで解明されたことで個体の老化を説明するためのブレイクスルーを得られる可能性がある。

私はこれまでに老化した心血管系の再生を目標に、老化のメカニズムの解明と心血管再生治療の開発・臨床応用に取り組んできた。これまで血管細胞老化が血管の老化、動脈硬化に関与しているかどうかについては明ら

かではなかったのに対し、私は senescence-associated (SA)  $\beta$ -gal assay という方法を用いて、はじめてヒト動脈硬化巣に老化した血管細胞認められることを報告した (Circulation 2002)。老化した血管細胞は同一患者から得られた非動脈硬化血管においてはみられなかった。また、これらの老化血管細胞は炎症性のサイトカインの発現亢進など血管機能障害の形質を示していたことから、血管細胞老化が動脈硬化病態生理の新たなメカニズムの一つであると考えられた。細胞老化のメカニズムとして重要な仮説がテロメア仮説である。テロメアは細胞分裂に伴って短縮し、細胞老化を誘導する。これに対し、テロメアを付加する酵素がテロメラーゼである。私は血管細胞におけるテロメラーゼの活性調節機構を明らかとするとともに (Circ Res 2001)、その導入によって細胞老化を抑制し血管内皮機能を維持することができること (Mol Cell Biol 2001)、逆にテロメアの機能不全を導入すると、ただちに血管細胞が老化するとともに、NO 産生の低下、炎症分子の発現亢進などの機能障害をもたらされることを観察した (Circulation 2002)。さらに私はテロメア非依存性の細胞老化も動脈硬化における細胞老化に重要であることを報告した (Circulation 2003)。そのひとつとして Ras の経路がある。Ras は様々な動脈硬化促進因子によって活性化されるが、その刺激が過剰になると血管細胞老化を引き起こしサイトカインの発現亢進などを介して血管の炎症性を促進していることが明らかとなった。従って、ヒト動脈硬化巣における過剰な増殖刺激は cell turnover の亢進や Ras 活性化を通じてテロメア依存性あるいは非依存性の細胞老化を誘導し血管細胞機能障害をもたらしていると考えられる。実際、Ras を活性化するアンジオテンシン II (Ang II) を ApoE ノックアウトマウスに投与すると細胞老化シグナル p53/p21 の活性化が起こり、血管炎症分子の発現亢進とそれに伴う動脈硬化の進展がみられることがわかった。p21/ApoE ダブルノックアウトマウス (DKO) では Ang II による血管老化は抑制され、動脈硬化の促進作用を認めなかったことから、動脈硬化に対する血管細胞老化の重要性が再確認された (Circulation 2006)。さらに最近私は、血管細胞老化が日内周期を司る時計遺伝子の発現を障害することによって、高齢者に認められるノンディッパー型高血圧にも関与することを示唆した (Circ Res 2006)。

カロリー制限は酵母からマウスに至る様々

な種において寿命を延長し、老化形質を抑制する。その作用に重要なシグナルがインスリン・Akt 経路である。これまで、この経路のシグナルの低下が、ハエや線虫の寿命の延長をもたらすことは知られていたが、ヒトの細胞寿命における作用は明らかではなかった。これに対して私は、過剰なインスリンシグナルが Akt を活性化することによりヒト血管細胞老化を促進していることを発見した (EMBO J 2004)。持続的な Akt の活性化は、p53/p21 を活性化して細胞老化を誘導した。その活性化には、Akt による FOXO 転写因子の不活性化とそれに伴う酸化ストレスの増大が重要であった。逆に、Akt の活性化を抑制すると細胞寿命の延長が認められた。持続的な Akt の活性化は、血管形成不全や炎症性接着因子の発現亢進など様々な内皮機能障害をもたらしたことから、糖尿病マウスやヒト糖尿病患者の血管においても Akt による細胞老化がみられたことから、インスリン・Akt 経路による血管細胞老化は糖尿病生血管障害の病態生理に関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

以上のように様々な病態において老化シグナルが関与し、それらの多くは老化分子 p53 に収束していた。さらに最近、これらの老化シグナルが心筋細胞や脂肪細胞においても重要な役割を担っており、それぞれ心不全や糖尿病の病態生理に深く関与していることを示唆するデータを得ている (後述)。そこで本研究では、老化分子 p53 を中心としたシグナルが心血管代謝疾患の病態生理に対してどのように関与しているかを検討し、関連シグナルの制御による新たな治療戦略を開発する基盤を構築することを目的とする。

特に今回の研究期間においては (1) 心不全モデルにおける p53 シグナルの役割の解明、(2) 2 型糖尿病モデルにおける p53 シグナルの役割の解明 を目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) 心不全モデルにおける p53 シグナルの役割の解明

加齢に伴い心不全の発症率は増加する。また、加齢に伴って心筋のテロメアの機能異常や DNA 損傷の集積により p53 シグナルの増強がみられることが示唆されている。加齢に伴う高血圧に対しては、初期には適応反応としての心肥大が生じ、長期の圧負荷後には心不全となることが知られているが、そのメカニズムは明らかでなかった。私はそのメカニズムについてマウス圧負荷モデルを用いて検

討した。本モデルでは、負荷後2週間までは心肥大が進行し左室収縮力が保たれるが（代償期）、負荷4週後になると心肥大はむしろ退縮し左室収縮力も低下する（非代償期）。心肥大の進行に伴って血管からの距離が増加することから、肥大過程では心筋は低酸素に陥ることが予想される。実際病理学的検討の結果、圧負荷後3日目より心筋低酸素が検出され、それに伴い血管新生が誘導されていた。しかし、14日目以降ではその誘導は減弱し、血管数は低下していた。つまり、心筋内の血管新生能の低下が非代償期における心肥大の退縮と左室収縮力の低下を促進している可能性がある。低酸素下では HIF1 と呼ばれる転写因子が血管新生因子の誘導に重要であることが知られている。事実、心肥大初期には HIF1 の発現は誘導されるが、14日目以降ではその発現が低下していた。p53 は長期の低酸素により誘導されること、HIF1 の発現や活性が p53 によって抑制されることなどが知られている。心肥大非代償期には p53 が誘導されることから、その発現の亢進が血管新生能を低下させ、心機能を障害していると考えられた。すなわち、p53 の活性化は心不全発症の病態生理に重要であり、加齢に伴うその活性化は、高齢者の心不全発症率増加の一因である可能性がある。本計画ではその仮説をさらに検討するため、心筋特異的 p53 ノックアウトマウス（交配中）を用いて心肥大モデルや心筋梗塞モデルを作成し、心不全を抑制することができないかについて調べる。また、心筋特異的 p53 過剰発現マウス（交配中）を確立して、心機能に与える影響を調べる。テロメアは t-loop と呼ばれる loop を形成しており、その構造の形成に最も重要なのが TRF2 というテロメア結合タンパクである。その抑制型 TRF2 (DNTRF2) を過剰に発現させるとテロメアの機能障害が誘導され、p53 シグナルが活性化される。そこで抑制型 TRF2 (DNTRF2) の心筋特異的過剰発現マウス（交配中）の心機能解析も同様に行う。心不全誘導時の DNA 修復シグナルについても検討し、expression cloning 法などにより、p53 シグナル活性化の原因（上流）を探る。

#### (2) 2型糖尿病モデルにおける p53 シグナルの役割の解明

テロメアの短縮はDNA修復機構の活性化を促し、p53の活性を増加させることによって細胞老化を促進する。テロメアはヒトにおいても年齢とともに短縮することは前述したが、特に糖尿病を発症した患者ではテロメアの短縮が進んでいることも知られている。私

はこれまでに脂肪組織における細胞老化・p53シグナルの意義について、テロメレースノックアウトマウスを用いて検討してきた。マウスのテロメアは長いいため、本マウスのホモ第1世代では、異常形質はみられないが、ホモ同士の交配の結果、4-6世代目には、生殖細胞の萎縮や骨髄機能の低下などがみられるようになる。これまで、代謝についての検討は詳細にはなされていないが、私は第4世代目以降のノックアウトマウスにおいてWestern diet負荷によりインスリン抵抗性が増悪することを発見した（図6a）。ノックアウトの脂肪組織ではp53シグナルの活性化が認められ、遺伝子発現プロファイリングによりインスリン抵抗性を誘導する炎症性サイトカインの発現亢進がみられたこと、脂肪組織を取り除くとインスリン抵抗性がほぼ正常化すること、摂食量やエネルギー消費量については野生型と比較して変化がなかったことなどから、脂肪組織の細胞老化・p53シグナルの重要性が示唆された（図6b, c）。さらにその役割について検討するため、テロメレースノックアウトマウスから得られた脂肪組織、あるいは、アデノウィルスによりp53を導入された野生型の脂肪組織を野生型マウスに移植し、インスリン抵抗性が誘導されるか検討する。すでにp53・テロメレースダブルノックアウトの作成も行っているので、p53抑制によりテロメレースノックアウトのインスリン抵抗性が改善されるかどうかも検討する。

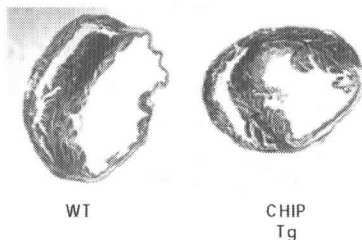
次に2型糖尿病マウスにおける脂肪組織の細胞老化・p53シグナルの意義を調べるために、過食による高インスリン血症を示すAyマウスを用いて検討する。2型糖尿病マウスの脂肪組織では、p53シグナルの活性化やSAβ-gal陽性の老化細胞が多数認められた（図7a, b）。現在、脂肪特異的p53ノックアウトマウスとの交配を開始しており、それによって、インスリン抵抗性の改善がみられるかを検討する。前述の組織特異的遺伝子過剰発現マウスの確立のため、LacZ遺伝子をCreリコンビネースにより欠失させると、その下流に連結されたp53遺伝子あるいは、抑制型のTRF2遺伝子が発現するデザインのコンストラクト（CAG floxed LacZ / p53あるいはCAG floxed LacZ / DNTRF2）を作成し、founderマウスの解析を行っている。これらのマウスを用いて脂肪特異的p53過剰発現トランスジェニックマウスの確立が可能となるので、その代謝に与える影響を調べる。

#### 4. 研究成果

(1)

不全心における p53 活性制御分子を同定するために、expression cloning を行った。まず、p53 binding sites を持ったルシフェラーゼコンストラクを作成した。また、心筋細胞の cDNA ライブラリーも準備した。cDNA ライブラリーのプールとルシフェラーゼコンストラクト、p53 発現ベクターを co-transfection し、p53 発現によるルシフェラーゼ活性の上昇を抑制するプールを選択することによって、新規の p53 抑制遺伝子の同定を行った。選択されたプールを分割し、同様のアッセイを繰り返し行うことによって、3つの positive clone を同定した。その一つが、CHIP とよばれる酵素であることがわかった。培養心筋細胞に CHIP を過剰発現させると p53 のユビキチン化の増加とともにその発現は低下した。逆に siRNA によって CHIP をノックダウンすると p53 の活性化が認められた。また、CHIP と p53 は互いに結合することも明らかとなった。すなわち、CHIP は p53 を標的としたユビキチンリガーゼであり、その活性を負に制御する因子であることがわかった。CHIP の発現は低酸素刺激によって負に制御されており、その制御には HIF-1 が抑制因子として関与していた。

次に、不全心における CHIP の役割を検討するため、マウスに急性心筋梗塞モデルを作成した。培養系の実験結果に合致して、梗塞心では CHIP の発現は一過性に低下し、それに伴い p53 は活性化していた。心筋細胞特異的 CHIP 過剰発現マウスを確立し、心筋梗塞モデルを作成すると、CHIP の発現の低下や p53 の活性化は抑制されていた。その結果、梗塞後の心機能や心室リモデリングは有意に改善していた。



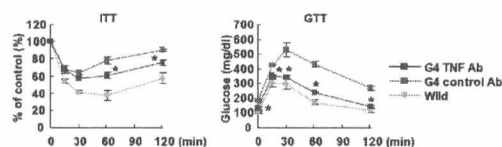
17AAG は CHIP の活性を増加させる薬物として知られている。そこで、17AAG の心筋梗塞後のリモデリングに対する効果について検討した。17AAG 投与群では、梗塞心における CHIP の発現は保たれており、それに伴って p53 の活性化は抑制されていた。その結果、心筋梗塞後の心筋細胞死が阻害され、梗塞範囲の縮小を認めた。これらの、17AAG の心筋保護効果は CHIP のノックアウトマウスでは、

認められなかったことから、17AAG は CHIP の活性化の促進と、それに伴う p53 の活性化の抑制によって、心筋保護に働いているものと考えられた。

p53 は加齢に伴う心機能低下だけでなく、様々なタイプの心不全の病態生理に関与している。また、p53 は転写因子としてアポトーシス、細胞周期にかかわる因子の発現を調節するばかりでなく、代謝に対する調節や他の分子と会合して血管新生抑制的に働くなど、心不全における役割も多岐にわたることもわかっている。従って、p53 の抑制は、様々なレベルでの心不全増悪因子の制御による効果的な治療となることが予想され、本研究によって進められた p53 をターゲットとした新たな心不全治療の開発は、日本の保健・医療の向上に大きく役立つものと考えられる。

(2) 2型糖尿病モデルにおける p53 シグナルの役割の解明

テロメレースノックアウトマウスに高脂肪食を負荷すると、インスリン抵抗性が惹起された。この形質は、内臓脂肪を取り除くと一部改善したことから、脂肪の老化形質がその病態に重要であることが示唆された。テロメア短縮により p53 依存性の老化シグナルが活性化されるが、実際、老化した脂肪では p53 や p21 などの発現亢進が認められた。p53 を欠失したテロメレースノックアウトマウスでは、脂肪の老化が抑制され、インスリン抵抗性の改善がみられた。そこで、これらの脂肪を Microarray にて解析した。その結果、テロメレースノックアウトマウスの脂肪で



は多くの炎症性サイトカインの発現が亢進しているのに対し、p53 を欠失したテロメレースノックアウトマウスの脂肪ではこれらの発現は抑制されていることがわかった。発現亢進が認められたサイトカインの一つである TNF-alpha に対する中和抗体をテロメレースノックアウトマウスに投与すると図のようにインスリン抵抗性や糖代謝が改善傾向を示したことから、老化した脂肪から産生される TNF-alpha の重要性が示唆された。

高脂肪食負荷後のテロメレースノックアウトマウスの脂肪では、酸化ストレスが増強していることから、テロメア短縮と酸化ストレスによるシグナルが p53 を活性化していると考えられた。そこで次に、どのように p53

が炎症性サイトカインの発現を誘導しているかについて、培養系実験を行った。その結果、炎症性サイトカインの発現を調整している転写因子NF- $\kappa$ Bが、酸化ストレスシグナルによってp53依存性に活性化されることがわかった。実際、酸化ストレスシグナルによってTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現が誘導されるが、p53やNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制すると、その誘導が阻害された。以上より、脂肪組織における酸化ストレス増加は、p53などの老化シグナルを活性化させることによって、炎症性分子の産生を誘導し、全身性のインスリン感受性に影響を与えている可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

英文論文 8 件

1. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y and Komuro I. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2009 in press 査読あり
2. Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Okada S, Moriya J, Komuro I. Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 in press 査読あり
3. Nishi JI, Minamino T, Miyauchi H, Nojima A, Tateno K, Okada S, Orimo M, Moriya J, Fong GH, Sunagawa K, Shibuya M, Komuro I. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Regulates Postnatal Angiogenesis Through Inhibition of the Excessive Activation of Akt. *Circ Res*. 2008; 103: 261-268. 査読あり
4. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M and Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signaling required for cardiogenesis. *Nature* 2008; 454:345-349. 査読あり
5. Kunieda T, Minamino T, Miura K,

Katsuno T, Tateno K, Miyauchi H, Kaneko S, Bradfield CA, FitzGerald GA, Komuro I. Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity. *Circ Res* 2008;102:607-614. 査読あり

6. Minamino T and Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008; 5: 637-648. 査読あり
7. Toko H, Minamino T, Komuro I. Role of heat shock transcriptional factor 1 and heat shock proteins in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:88-93. 査読あり
8. Minamino T and Komuro I. Role of telomeres in vascular senescence. *Front Biosci*. 2008;13:2971-2979. 査読あり

和文論文 26 件

9. 南野 徹, 小室一成 【細胞老化の多彩な機構と役割 DNA 損傷応答・SASP から癌抑制・老化現象へ】 細胞老化シグナルと動脈硬化 細胞工学(0287-3796)27 巻 9 号 Page894-898(2008.08) 査読なし
10. 南野 徹, 小室一成 【解明が進むメタボリックシンドローム 脂肪細胞の機能からエネルギー代謝・摂食・心血管系の制御機構、予防と治療まで】 血管とメタボリックシンドローム メタボリックシンドロームにおける血管老化の分子メカニズム 実験医学(0288-5514)25 巻 15 号 Page2401-2407(2007.09) 査読なし

[学会発表] (計 63 件)

招聘講演 25 件

1. Minamino T. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Symposium 2009/3/20-22 大阪 *Circulation Journal Supplement I* 2009; 73: 45.
2. Minamino T. p53 as a new therapeutic target for heart failure 第73回日本循環器学会総会・学術集会 KSC-JCS Joint Symposium 2009/3/20-22 大阪 *Circulation Journal Supplement I*

- 2009; 73: 70.
3. Minamino T. Impact of Cellular Aging on Cardiovascular Regeneration 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Topic 2009/3/20-22 大阪 Circulation Journal Supplement I 2009; 73: 86-87.
  4. Minamino T. Role of Cellular Aging in Cardiovascular and Metabolic Disease 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Topic 2009/3/20-22 大阪 Circulation Journal Supplement I 2009; 73: 91.
  5. Minamino T. Role of Cellular Aging in Cardiovascular Disease the Annual Spring Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis 2008/4/18 Busan, Korea Korean Circulation J (Supplement I) 2008; 38: 4-6.
  6. Minamino T. 老化シグナルによって制御される心血管代謝ネットワークの解明 第11回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 高峰讓吉研究奨励賞受賞講演 2007/11/16-17 東京
  7. Minamino T. ノバルティス老化および老年医学研究基金 2006年度受賞講演 老化シグナル制御による生活習慣病治療に関する基盤研究 第49回日本老年医学会学術集会 2007/06/20-22 札幌 日本老年医学会雑誌(0300-9173) 44巻 Suppl. Page31(2007.05)
  8. Minamino T. Contribution of cellular senescence to cardiovascular disease The 10th Anniversary International Symposium Kangwon National University College of Medicine 2007/4/3 Chuncheon, Korea
- 国際学会発表
9. Minamino T. Role of adipose p53 in regulating insulin resistance. Gordon Research Conference 2009/2/15-20 Ventura, CA, USA
  10. Minamino T., Orimo M, Komuro I. Critical role of adipose tissue p53 in regulating insulin resistance Keystone Symposia (Metabolic pathway of longevity) 2008/3/30-4/4 Copper Mountain, CO USA Abstract book page 60.

11. Minamino T., Sano M, Komuro I. Role of p53 in regulating cardiac function. Gordon Research Conference. The Biology of Aging. 2007/9/23-9/28 Les Diablerets, Switzerland

国内学会発表 23件

〔図書〕(計6件)

1. 南野 徹、小室一成: 2. 前駆細胞, 組織幹細胞 6) 末梢血単核球移植による血管再生治療 田畑泰彦編 遺伝子医学MOOK別冊 進み続ける細胞移植治療の実際-再生医療の実現に向けた科学・技術とその周辺要素の理解-株式会社メディカルドゥ 大阪 2008: 197-202.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

1. 特願 2008-286293

出願日: 2008年11月7日

権利者: 千葉大学

発明者: 森谷純治、南野 徹、小室一成、古閑比佐志、岡田光浩

発明の名称: 虚血性心血管系疾患の治療剤 (PlexinD1-Fc)

国内出願

2. 特願 2009-067021

出願日: 2009年3月18日

権利者: 千葉大学

発明者: 舘野 馨、南野 徹

発明の名称: ノッチシグナルを利用した虚血組織再生方法

国内出願

6. 研究組織

(1)研究代表者

南野 徹 (TOHRU MINAMINO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90328063

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし