

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07316

研究課題名(和文) 老化細胞の選択的除去効果を有する新規薬剤の導出と加齢性疾患への効果の検討

研究課題名(英文) Identification of novel senolytic drugs to treat age-related diseases

研究代表者

勝海 悟郎 (Katsuumi, Goro)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：60815356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが発見した新規老化細胞除去薬Seno-7284(特許の都合により便宜名とする)は肥満糖尿病モデルマウスや動脈硬化モデルマウスなどにおいて体内から老化細胞を除去し、病態を改善させることがこれまでの検討で明らかになっている。また、老齢マウスの身体機能や早老症マウスの寿命延長効果も認めている。Seno-7284の投与により血中で内因性のAICARが有意に増加し、Cxcl9-Cxcr3シグナルを通じてT細胞・NK細胞を脂肪組織中に誘導することで老化細胞除去を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞除去治療は加齢関連性疾患の治療のみならず「老化」自体を治療可能な次世代の治療法として注目を集めており、その臨床応用のインパクトは大きい。Seno-7284は既に臨床応用に至っている薬剤であり、その応用は新規に薬剤を導出するよりもはるかに容易である。また、老化細胞除去に内因性の免疫機能の関与を示したことは新たな知見であり、本領域における研究に一定の学術的意義をもたらしたと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to identify a novel senolytic reagent effective for cardiometabolic disease in compounds already available in clinical settings. We found a compound called "Seno-7284" exhibits senolytic effect in murine models of type 2 diabetes, atherosclerosis and progeroid. Seno-7284 reduced the accumulation of senescent cells in visceral adipose tissue of Diabetic mice. This associated with the suppression in systemic glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. Administrating Seno-7284 also reduced accumulation of senescent cells in atherosclerotic lesion in aorta of ApoE-KO mice, and inhibited the progression of atherosclerosis. This drug significantly improved the lifespan of Zmpste24 KO progeroid mice. Further analysis indicated that Seno-7284 increase AICAR level in blood and stimulates endogenous senolytic function of NK cells and CD8+ T cells via Cxcl9-Cxcr3 axis. Collectively, Seno-7284 would become promising therapies for age-related disorders

研究分野：細胞老化

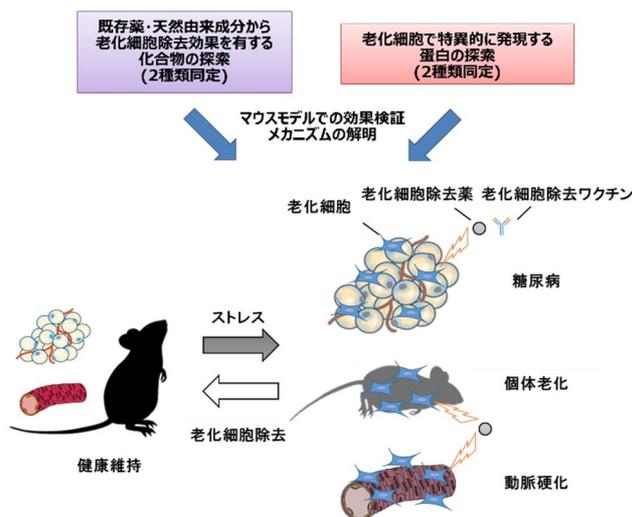
キーワード：細胞老化 老化細胞除去

1. 研究開始当初の背景

多くの体細胞は加齢や種々の DNA ストレスによって老化する。老化した細胞 (以下老化細胞) は細胞分裂能をなくし、senescence-associated secretory phenotype (SASP) とよばれる炎症性サイトカインやケモカインの産生・分泌の亢進を伴い、所属臓器の機能低下や慢性炎症を惹起する。老化細胞は加齢とともに個体内に蓄積し、加齢関連疾患発症の基盤病態に寄与することが明らかになっている。応募者の所属研究グループでは、心血管代謝疾患の発症過程において、血管や心臓、脂肪組織に老化細胞が蓄積し、病態の進行を促進することを多数報告してきた。

近年「senolysis」と称するこの老化細胞で特異的に体内から除去することにより個体老化が抑制され、加齢関連疾患の発症・進行を抑制し、個体寿命を延長しうることがマウス実験で明らかとなった。細胞老化はがん抑制機構として機能することが知られているが、老化細胞除去治療では発がんリスクをむしろ低下させることも明らかとなった。現在 20 種類以上の老化細胞除去作用を有する候補薬剤が導出されているが、多くが抗がん剤の一種であることから正常細胞への重大な悪影響が懸念された。そこで、応募者の研究グループでは非抗がん剤の既存薬や天然由来成分のライブラリから老化細胞除去効果を有する化合物を探索し 2 種同定した。また、GEO データベースを用いて老化細胞で増加する細胞表面蛋白を 2 種同定し、同蛋白に対するワクチンを作製・接種することで老化細胞を除去する治療方法を試みた。これらの治療法によりマウス個体における老化細胞の除去に伴い、動脈硬化、糖尿病の病態改善や個体老化の進行抑制効果が認められた (図 1 に概要を示す)。

図 1. 所属研究グループにおける新規老化細胞除去治療の開発



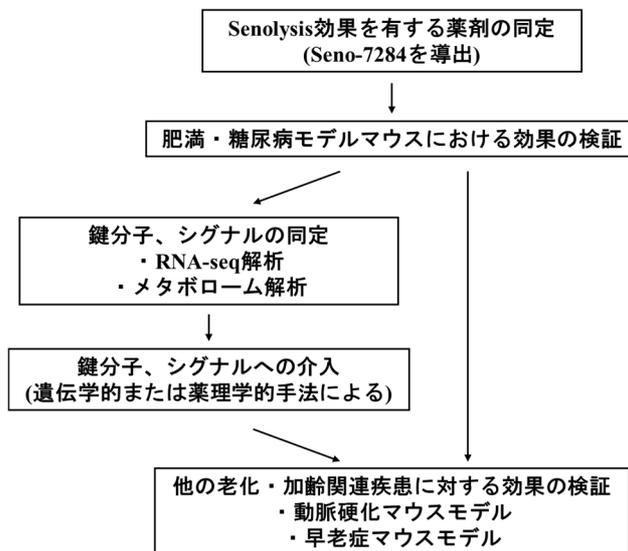
2. 研究の目的

本研究ではそのうちの 1 つである Seno-7284 と称する薬剤 (特許の関係上便宜名とする) が有する老化細胞除去効果を複数の加齢関連マウスで検証し詳細な機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で着目した Seno-7284 の老化細胞除去効果は肥満糖尿病モデルマウスにおける治療効果の検討の過程で発見したものであり、まず同モデルマウスにおける詳細な解析を行った。申請者らは過去に肥満・糖尿病マウスモデルの内臓脂肪組織において細胞老化が促進することを報告しており、本研究でもこのモデルを主に用いる。4 週齢より 8~10 週間高脂肪食を与えた野生型 C57BL/6 マウスに Seno-7284 (0.03%w/w) を 3、7 日間または 4 週間混餌投与した後、内臓脂肪 (精巣周囲脂肪) を採取し各種検証に供した。具体的にはグルコース負荷またはインスリン負荷試験による糖代謝能の評価、senescence-associated galactosidase 染色 (SA-gal 染色) による組織への老化細胞蓄積の評価、RT-PCR 法、western blot 法、フローサイトメトリー法を用いた分子生物学的解析、HE 染色等組織学的解析を順次行った。

図 2. 本研究のフローチャート



また、網羅的解析として血漿のメタボローム解析や、脂肪組織の間葉血管系分画(stromal-vascular fraction: SVF)を用いたシングルセル RNA-seq 解析も行った。

また、他の評価モデルとして、動脈硬化マウスにおける検証も行った。ApoE ノックアウト(ApoE-KO)マウスに動脈硬化誘導食を 3 か月間与え動脈硬化マウスモデルを作製した後、2 週間 Seno-7284(0.03% w/w)を混餌投与し上行～弓部大動脈の動脈硬化巣が抑制されるか検討した。また、老化形質への効果の検証として、早老症モデルマウスである Zmpste24KO マウスおよび 50 週齢超の加齢マウスに対しても Seno-7284 (0.03% w/w)を長期に混餌投与し身体機能や個体寿命を評価した。(図 2 にフローチャートを図示)

4. 研究成果

(1). 高脂肪食負荷モデルマウスにおける検証：

Seno-7284 を肥満糖尿病モデルマウスに 4 週間混じ投与すると、脂肪組織中への老化細胞蓄積が抑制されることが SA-gal 染色の結果より明らかとなった。また、p53, p16 といった細胞老化マーカーも Seno-7284 投与群で有意な発現低下を認めた(図 3a)。脂肪炎症も Seno-7284 投与群で明らかに抑制されていることが分かり、耐糖能も有意な改善を認めた(図 3b)。また、Seno-7284 の 1 週間の投与でも同様に老化細胞の蓄積が抑制されていたことから、本薬剤は老化細胞除去効果を有すると考えられた。

Seno-7284 の老化細胞除去効果の詳細な機序の検討として、まずマウス線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト脂肪前駆細胞に継代老化や放射線照射といった細胞老化を誘導して老化し安房除去効果を確認したが、既存薬に見られるような老化細胞に直接細胞死を誘導する効果は認めなかった。

そこで、他の因子の介在を想定し、血漿のメタボローム解析および SVF のシングルセル RNAseq 解析を行った。前者では血中の AICAR 濃度の有意な増加を認めた。後者では血管内皮細胞中の Cxcl9 の Seno-7284 投与群で有意な発現増加を認め、NK 細胞および T 細胞の浸潤が増加していることが分かった。フローサイトメトリー法でも脂肪組織中の老化細胞の減少のほか、NK 細胞および T 細胞の浸潤増加が確認できた。他方マクロファージの浸潤は抑制されていた。肥満糖尿病マウスに AICAR(0.5mg/g 腹腔内投与)を連日行うと Seno-7284 と同様に脂肪組織中の老化細胞の蓄積が抑制されたが、AMPK 阻害薬である Compound C を Seno-7284 と同時投与すると、老化細胞除去効果が抑制されることが分かり、Seno-7284 は血中の AICAR 増加を介した AMPK シグナルの活性化が重要であることが分かった。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた検討でも、AICAR を添加すると HUVEC における CXCL9 の発現・分泌が増加することも確認した。中和抗体を用いて Cxcl9-Cxcr3 シグナルを阻害すると、Seno-7284 の老化細胞除去効果が低下することから、Seno-7284 の効果は AICAR の産生増加と Cxcl9-Cxcr3 シグナルを介した内因性の免疫機能による老化細胞除去機能の惹起が寄与しているものと考えられた。(図 3e)

(2). 動脈硬化モデルマウス

Seno-7284 を ApoE-KO マウスに 2 週間投与すると、大動脈における老化細胞蓄積が低減し、動脈硬化層の進展抑制がみられた(図 3c)。血中の脂質プロファイルも測定したが総コレステロール値、LDL-C、HDL-C、TG、FFA 等に有意な差は認めなかった。本モデルマウスにおいても Seno-7284 は老化細胞除去効果を発揮し、疾患の進展抑制に寄与しうることが分かった。

(3). 早老症モデルマウス、

Seno-7284 を 12 週齢より Zmpste24KO マウスに混じ投与し個体寿命を測定したところ、雄・雌共に有意な生存期間の延長が認められた(図 3d)。

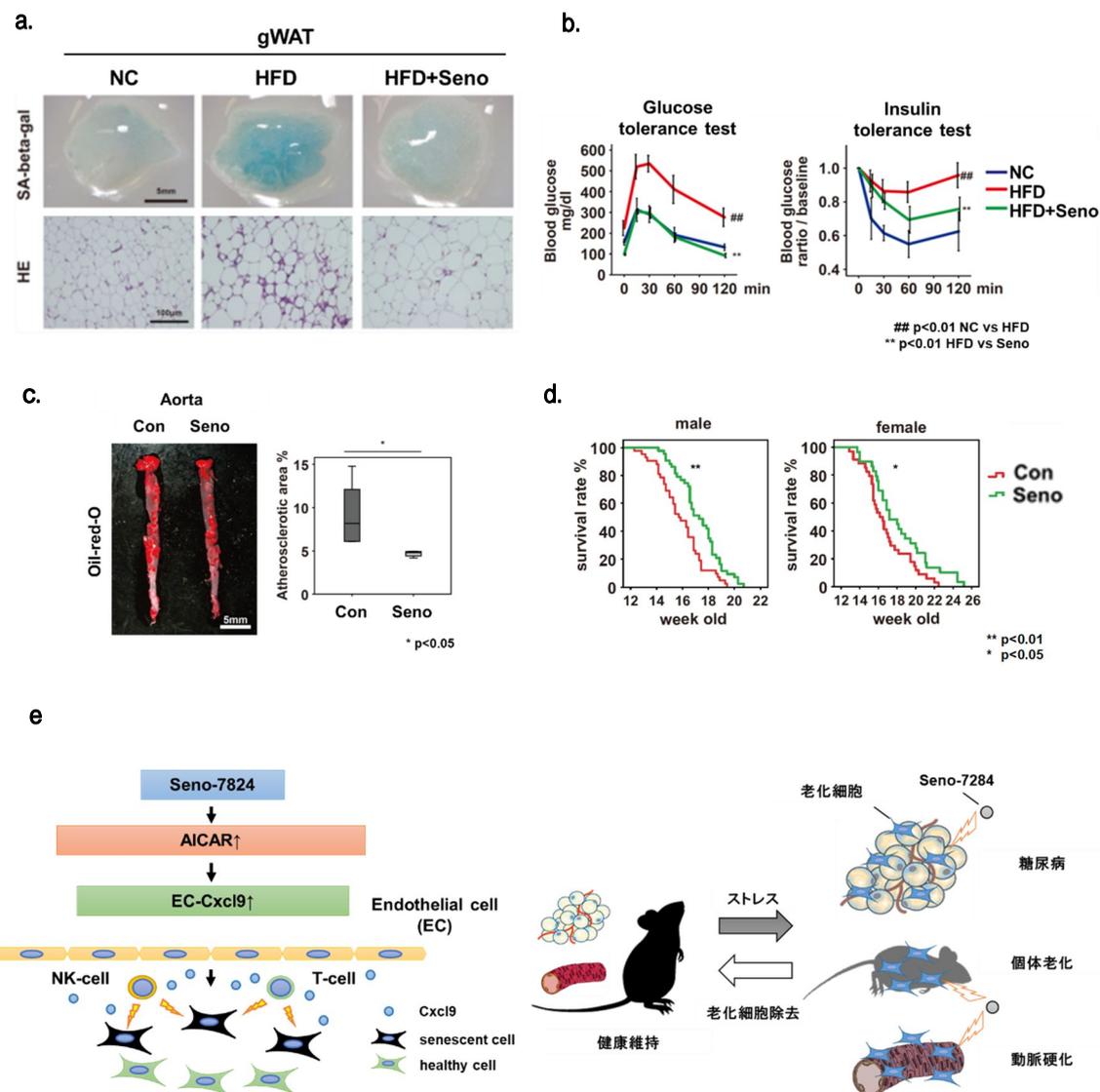
(4). 加齢マウスにおける検証

50 週齢超の野生型マウスに Seno-7284 を混じ投与し 20 週経過した時点での身体機能を測定したところ、握力測定、Rotarod 試験において有意に高い身体機能が認められた。

以上から、Seno-7284 は種々の加齢関連疾患モデルマウスにおいて老化細胞除去効果を発揮し、病態進展の抑制や老化形質の抑制に寄与することが明らかとなった。本剤に直接的な老化細胞死誘導効果は認めなかったが、免疫機能の活性化を通じた間接的な老化細胞除去効果の存在を見出した。これまで導出された薬剤の多くは直接老化細胞を細胞死に至らしめるもので、時に正常細胞にも影響を及ぼし得る分子を標的にしていることから、その副作用が懸念される。Seno-7284 は直接的な細胞毒性を有さないという意味では安全性が既存の老化細胞除去薬よりも高いと考えられる。また、既に臨床応用に至っている薬剤でもあり、抗老化治療および加齢関連疾患治療への転用も比較的容易である。近年筆者らのグループが開発した老化細胞除去ワクチンや、老化細胞除去 CAR-T 療法など免疫機能に着目した老化細胞除去治療の概念が確立しつつあり、

本研究もその領域の学術的見地を深めるものになるう。

図3. 各種モデルマウスにおける Seno-7284 の効果の検証



- 高脂肪食負荷マウスへの seno-7284 4 週間投与後の内臓脂肪組織(gWAT)への老化細胞蓄積 (SA- gal 染色)および脂肪炎症評価 (HE 染色)
 - 上記マウスにおけるグルコース負荷およびインスリン負荷試験
 - 動脈硬化モデルマウスへの Seno-7284 2 週間投与後の大動脈中の動脈硬化巣の範囲評価 (Oil-red-O 染色)
 - Zmpste24KO マウスの個体寿命測定
 - 本研究成果の概要図
- NC : 普通食群、HFD : 高脂肪食群、HDS+Seno : 高脂肪食+Seno-7284 投与群
 Con : コントロール群、Seno : Seno-7284 投与群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Goro Katsuumi, et al
2. 発表標題 A novel senolytic drug, seno-7284 ameliorates age-related cardiometabolic diseases
3. 学会等名 AHA scientific sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Katsuumi, et al
2. 発表標題 A novel senolytic drug, seno-7284 ameliorates age-related cardiometabolic diseases
3. 学会等名 ESC congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝海悟郎 ほか
2. 発表標題 老化細胞の選択的除去効果を有する新規薬剤の導出と加齢性疾患への効果の検討
3. 学会等名 第20回抗加齢医学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Katsuumi, et al
2. 発表標題 A novel senolytic drug, seno-7284 ameliorates age-related cardiometabolic diseases
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会/World congress of cardiology 2021
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
研究 分担者	清水 逸平 (Shimizu Ippei) (60444056)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究 分担者	南野 徹 (Minamino Tohru) (90328063)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

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