

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16996

研究課題名（和文）老化をHDLで減速させる 早老症ウェルナー症候群から探る老化と脂質のクロストーク

研究課題名（英文）Slow down aging with high density lipoprotein &#8211; Crosstalk of aging and lipids from the pathology of Werner syndrome

研究代表者

山本 雅（Yamamoto, Masashi）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：40825064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウェルナー症候群（WS）患者血中エクソソーム中では一部のmicroRNAが健常者と比較し増加していた。本解析で同定したmicroRNA-128の過剰発現はWS皮膚線維芽細胞においてコレステロールを無毒化する酵素であるACAT1の発現を低下させた。また、コレステロール代謝とかかわる生理活性物質がWS血中では異常値を示し、その物質の濃度調節は皮膚線維芽細胞のセルサイクルを変化させることを見出した。さらに、コレステロール排泄促進物質のスクリーニングを実施し、ポリフェノール代謝物および機械受容チャネル抑制物質を候補物質として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通してコレステロール代謝異常に関与するmicroRNAおよびコレステロール搬出能を改善させる候補物質を同定することができ、新規のコレステロール代謝改善治療法を開発するうえでの治療標的を提案することができた。研究をさらに継続することで、これまでと異なるメカニズムでの脂質異常症治療薬の開発に貢献しうる。さらに、細胞のコレステロール代謝改善が細胞増殖に影響するデータは老化への新しい介入アプローチを示唆しており、老化研究における学術的意義もあると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In the blood exosomes of Werner syndrome (WS) patients, some microRNAs were increased compared to healthy subjects. Overexpression of microRNA-128 identified in this analysis reduced the expression of ACAT1, an enzyme that detoxifies cholesterol in WS skin fibroblasts. It was also found that a physiologically active substance involved in cholesterol metabolism shows an abnormal value in WS blood, and that the regulation of the concentration of the substance changes the cell cycle of skin fibroblasts. Furthermore, screening of cholesterol excretion-promoting substances was carried out, and polyphenol metabolites and mechanical receptor channel inhibitors were identified as candidate substances.

研究分野：老年医学

キーワード：ウェルナー症候群 細胞老化 HDL コレステロール

1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群(WS)はDNA修復に重要なタンパクをコードするWRNの変異により寿命短縮、皮膚潰瘍、糖代謝異常、冠動脈疾患などの老化兆候を呈する難病であり治療法がない。WSでは原因未明の細胞内コレステロール(Chol)蓄積が生じることが知られている(Atherosclerosis. 1989)。Cholは細胞毒性があるため、細胞はATP binding cassette transporter A1(ABCA1)やABCG1を介して高比重リポ蛋白(HDL)へCholを排泄する。このABCA1を欠損するタンジール病では皮膚線維芽細胞の細胞老化が促進し(BBRC. 2007)、また健康な高齢者はHDLへのChol排泄能が高いこと(J Lipid Res. 2017)が報告された。この既報を踏まえ、申請者は事前にマウス腹腔マクロファージ(Mφ)にWRN阻害、コレステリルエステル合成阻害、ABCA1阻害を同時にを行い細胞にChol蓄積を促すことで細胞老化が促進することを確認していた。

2. 研究の目的

上記の先行研究ならびに申請者の基礎検討から、WSではWRN欠損という1st hitとChol蓄積という2nd hitの相乗効果によりDNA損傷が増悪するという仮説を立てた。そして、①老化と細胞内脂質代謝を結ぶ分子メカニズムは何か?、②Chol排泄を促進する薬剤・食品により老化速度が軽減できるか?、③Chol蓄積という一つのhitだけでも細胞老化は促進するか?という3つの観点から研究を行い、WSにおいてHDLによるChol排泄促進が老化現象を抑制すること、さらにChol蓄積による細胞老化が野生型にも同様に生じることの立証することを本研究の目的とした(図1)。

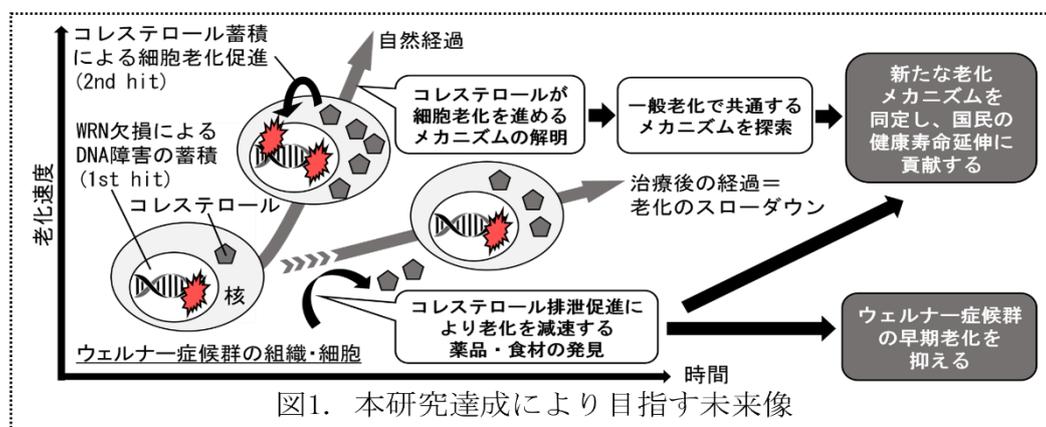


図1. 本研究達成により目指す未来像

3. 研究の方法

(1) 老化と細胞内脂質代謝を結ぶ分子メカニズムは何か?

WSのChol蓄積モデルとして基礎検討に用いたマウス腹腔Mφに加え、健常者およびWS患者から採取した皮膚線維芽細胞、さらに健常者・WS患者の末梢血単核球より樹立したiPS細胞を分化させることで得られた、間葉系幹細胞ならびに脂肪細胞を解析の対象とした。細胞老化の評価にはSA-β-ガラクトシダーゼ活性解析、insulin like growth factor-1 (IGF-1)・mammalian target of rapamycin (mTOR)発現解析などを実施した。Chol代謝解析は遺伝子発現をRNA-SeqやRT-PCRで検討し、蛋白発現はウエスタンブロット法を用いて解析した。

血中エクソソームは超遠心法を用いて回収し、microRNAの定量はPCR法を用いて行った。microRNA過剰発現実験はリポフェクション法を用いて実施した。microRNA過剰発現を行った線維芽細胞の転写をRT-PCR法により解析した。

(2) Chol 排泄を促進する薬剤・食品により老化速度が軽減できるか？

Chol 排泄が促進することを当研究室で確認している脂肪酸やポリフェノールのほか、Chol 代謝への影響はこれまで報告されていないが作用機序として Chol 排泄促進作用を期待できる小分子を細胞に添加することで Chol 排泄能と細胞老化抑制作用の変化を検討した。薬剤・食品スクリーニングにはヒト単球である THP-1 細胞から分化誘導した Mφ を用いた。Chol 排泄能は放射性同位元素で標識した Chol の動態解析を基に解析した。

(3) Chol 蓄積という一つの hit だけでも細胞老化は促進するか？

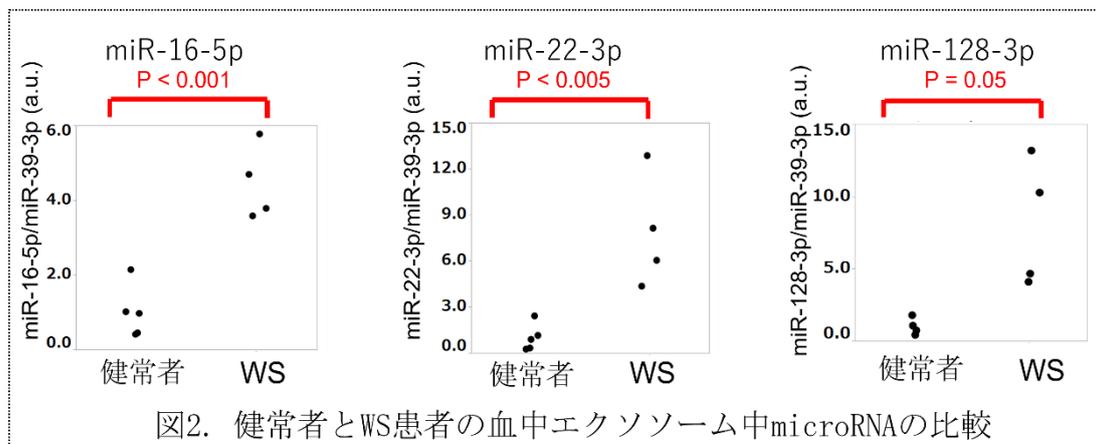
WRN 阻害を行っていないマウス腹腔 Mφ ならびに健常皮膚線維芽細胞を対象に(1)で実施した手法を用いて Chol 代謝ならびに細胞老化を評価した。

4. 研究成果

(1) 老化と細胞内脂質代謝を結ぶ分子メカニズムは何か？

マウス腹腔 Mφ を用いたモデルでは Chol 蓄積で細胞老化が促進し、HDL による Chol 排泄により老化が抑制された (SA-β-Gal 活性で評価) もの、IGF-1 や mTOR などの主要な細胞老化シグナル解析結果は偏差が大きく評価が困難であった。そこで、WS の代表的な老化兆候である皮膚潰瘍や糖代謝異常において主要な役割を担うと考えられる皮膚線維芽細胞、iPS 細胞由来の間葉系幹細胞および脂肪細胞について Chol 蓄積による細胞老化の評価を試みた。しかしながら、これらの細胞では Mφ と同様の方法を用いても Chol 蓄積を促すことが困難であった。さらに、in vitro の培養下においては健常者と WS の各種細胞において Chol 代謝関連遺伝子発現に差がないことも確認できた。そこで、WS の血中に存在する因子に Chol 代謝を破綻させる要因があると考え microRNA 解析に移行することとした。

健常者および WS の血液中ならびに培養皮膚線維芽細胞からそれぞれエクソソームを回収した後、エクソソーム中の microRNA を網羅的に解析した。そして健常者と WS において線維芽細胞中では差を認めず、血中エクソソーム内では差を認める microRNA を選別することで Chol 代謝を破綻させる microRNA の候補一覧を得た。このうち健常者と WS の血中で発現量の差が大きい microRNA-16、microRNA-22、microRNA-128 に注目し(図 2)、これらを WS 由来皮膚線維芽細胞に過剰発現させた。その結果、microRNA-128 過剰発現皮膚線維芽細胞において遊離 Chol を無毒化する ACAT1 発現が低下することを確認できた(図 3)。



また、Chol 代謝に関与する生理活性物質について臨床データを参照したところ、測定歴のある全例でその物質の血中濃度が異常値を示すことを確認した。そこで WS 皮膚線維芽細胞の

培養中にその物質の培養液中濃度を改善したところ、セルサイクルに変化が生じることを確認した。現時点で細胞培養は継続中であり最終的な細胞分裂回数の変化は解明できていないが、今後細胞寿命の変化や老化マーカー、Chol 蓄積の変化について解析可能である。

上記のように本研究では WS を集中的に診療している当院の強みを活用して Chol 代謝異常を引き起こす候補因子を複数同定することができてきており、Chol 代謝異常を引き起こす新規メカニズムの探索や老化研究の進展に貢献している。

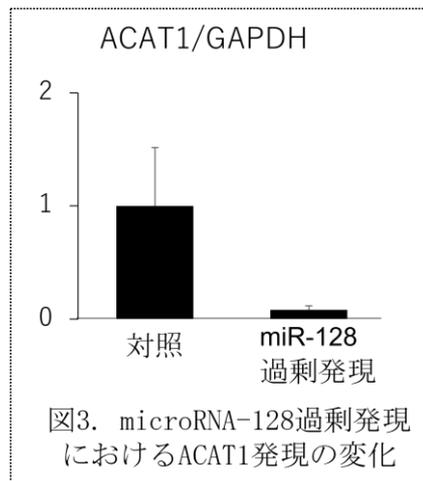


図3. microRNA-128過剰発現におけるACAT1発現の変化

(2) Chol 排泄を促進する薬剤・食品により老化速度が軽減できるか？

コーヒー飲用が抗動脈硬化・抗老化に寄与するという既報、細胞膜流動性低下は細胞老化と関連するという既報から着想を得て、コーヒー含有ポリフェノールおよびその腸内細菌代謝物、機械受容チャネル刺激または抑制物質を対象として Chol 排泄促進物質のスクリーニングを実施した。その結果、ある一種のフェルラ酸代謝物は 0.25 μ M で M ϕ から ApoA1 への Chol 排泄を促進することを確認した。また、ある機械受容チャネル抑制物質は 0.5 μ M から濃度依存的に M ϕ からの Chol 排泄を促進することを見出した(図 4)。しかしながら、機械受容チャネル抑制物質の Chol 排泄促進作用は ApoA1 および HDL 非依存的であり、M ϕ における ABCA1・ABCG1 の転写・翻訳・分解には差を認めず、作用機序解明には至らなかった。THP-1 細胞は寿命が短く細胞老化アッセイの結果が安定しなかったため皮膚線維芽細胞や iPS 細胞由来脂肪細胞を対象として抗老化作用を検討中である。今回同定した物質の抗老化作用については現時点で解析できていないものの、Chol 代謝を改善し抗動脈硬化作用を持つことが期待される複数の候補物質を同定できたことは本研究の成果である。

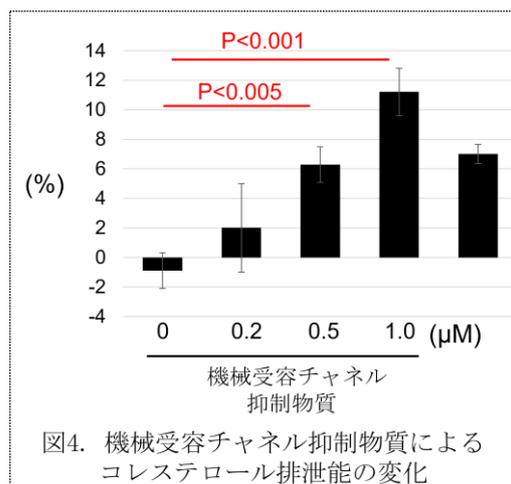


図4. 機械受容チャネル抑制物質によるコレステロール排泄能の変化

(3) Chol 蓄積という一つの hit だけでも細胞老化は促進するか？

(1)の成果をもとに健常者由来皮膚線維芽細胞に microRNA-128 を過剰発現させた。その結果、健常者由来皮膚線維芽細胞においても ACAT1 の転写は減少する傾向を示すことを確認した。本検討ではトランスフェクションの効率が安定しなかったことを PCR 法で確認しており、この点が明確な差を確認できなかった原因ととらえている。本項目はいまだ研究の途上ではあるが、WS から得られた知見の一部は一般老化にも当てはまることを期待させる結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------