

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11634

研究課題名(和文) Senostatics活性を有する食品由来因子の同定と機能評価に関する研究

研究課題名(英文) Identificaiton of nutritional factors which suppresses SASP

研究代表者

本山 昇 (Noboru, Motoyama)

椋山女学園大学・生活科学部・教授

研究者番号：50277282

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)：細胞老化(Cellular Senescence)を起こした老化細胞は、加齢とともに蓄積する。また、老化細胞から炎症性サイトカインなどの液性因子が分泌されるSenescence-associated secretory phenotype：SASPが、がんの進展や動脈硬化症など種々の老年性疾患の発症や個体老化が遅延することが実証されてきており、細胞老化とりわけSASPの制御が個体老化、老年性疾患の予防・治療のターゲットと考えられている。そこで本研究では、SASP獲得の分子メカニズムを明らかにするとともに、SASP因子発現を抑制する食品・食品利用可能な天然物由来生理活性因子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞を特異的に除去する(Senolysis)薬剤の開発が進み、Senolysisによって老年性疾患の発症が遅延し、平均寿命が延長することが示されてきた。本研究でSASP誘導時に発現が変化する遺伝子産物を同定した。また、SASPを抑制する種々の食品由来抽出液の同定を行った。この研究を通して、SASPをターゲットとした老年病発症の予防方法を開発する基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Senescent cells accumulate during aging and secrete several factors such as pro-inflammatory cytokines. This phenomenon is known as the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). It has been reported that SASP is involved in the development of geriatric diseases. Due to the potential of inhibiting SASP to delay the onset of these diseases, it serves as a potential target for their prevention. In this study, our aim was to elucidate the mechanism of SASP and explore bioactive factors derived from natural products for the prevention of SASP.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 SASP 炎症 老年病 食品

1. 研究開始当初の背景

細胞老化 (Cellular Senescence) を起こした老化細胞は、加齢とともに蓄積する。また、老化細胞から炎症性サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼや増殖因子などの液性因子が分泌される細胞老化付随分泌現象 (Senescence-associated secretory phenotype : SASP) がみいだされている。老化細胞を特異的に除去する (Senolysis) や SASP 因子の発現を抑制 (Senostatics) する因子によって、がんの進展や動脈硬化症など種々の老年性疾患の発症や個体老化が遅延することが実証されてきており、細胞老化とりわけ SASP の制御が個体老化、老年性疾患の予防・治療のターゲットと考えられている。動物を用いた研究において、タマネギやブロッコリーなどに含まれるポリフェノールの一種であるケルセチンやフィセチンは、単独もしくは抗がん剤ダサチニブとの併用投与で選択的に老化細胞を除去することによりフレイリティや種々の加齢性疾患の予防・改善効果があることがわかっている。また、ケルセチンやフィセチンのように食品に含まれる天然物にも効果があることから、食品による介入は生体の恒常性を維持しつつ老年性疾患などの発症を遅延させ健康寿命を延長させる有効な手段の一つと考えられた。

2. 研究の目的

SASP 因子発現を制御する食品・食品利用可能な天然物由来因子の同定を目指して研究を進めてきた。その過程で、トマトやスイカなどに豊富に含まれるカルテノイドが老化細胞からの SASP 因子の発現を抑制することを見出してきた。そこで本研究では、カルテノイドによる SASP 抑制メカニズムを明らかにすることを目的として、RNAseq 解析により SASP 誘導に關与する遺伝子の同定とその機能解析を目的とした。

また、カルテノイド以外の種々の食品の水溶性および脂溶性抽出物を用いて SASP 抑制因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 細胞培養

ヒト皮膚由来線維芽細胞 (BJ 細胞) を不死化させた BJ-5ta 細胞、およびヒト肺由来初代培養線維芽細胞 (TIG-3 細胞) を 10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。

2. 細胞老化誘導と食品抽出液添加

細胞を食品抽出液添加した培地で培養した。無添加の細胞には、溶媒である水、もしくは、DMSO を同量添加した(水・DMSO の最終濃度 0.05%)、食品抽出液添加、無添加の細胞を 100nM の Doxorubicin で DNA 損傷を誘導することで、細胞老化を誘導した。Doxorubicin 無処理の細胞を Control とした。老化誘導後、TRIzol Reagent®を用いて細胞の可溶化処理を行った。その後 RNA 抽出を行い、cDNA 作成した。

3. RNAseq・解析

Control と細胞老化誘導後 4 日目の遺伝子の発現量の変化を検討するために、次世代シーケンサーによる RNAseq を業者に委託した。Control と細胞老化誘導後 4 日目の解析結果を用いて比較解析を行い、Lycopene 添加によって発現上昇が抑制された遺伝子を解析した。

4. リアルタイム PCR

RNAseq でカルテノイド添加によって遺伝子の発現上昇が抑制された候補遺伝子を SYBR

Green 法を用いてリアルタイム PCR にかけて、実際に 4 日目の細胞で遺伝子の発現が抑制されたかを調べた。

IL-6 mRNA の発現量(代表的な SASP 因子)を調べるために、TaqMan プローブ法を用いて、StepOne Plus を用いたリアルタイム PCR を行い、StepOnePlus Software v2.3 を用いて解析した。

5. 統計解析

統計処理は、SPSS ver. 27 を用いて、一元配置分散分析によって有意差を確認した後、多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) SASP 誘導に關与する遺伝子の同定

細胞老化発生前の遺伝子の変化が SASP 発生に關与していると考え、細胞老化誘導後 4 日目の細胞を用いて、カルテノイド添加による SASP 因子発現抑制に關わる遺伝子の RNAseq 解析を実施した。RNAseq 解析により、細胞中の全遺伝子は 27,690 種類であった。カルテノイド無添加細胞で細胞老化誘導後 4 日目の遺伝子の発現量が上昇したものは、27,690 種類中 77 種類であった。この 77 種類の遺伝子は、RNAseq での解析により一定数以上の発現量があったものである。また Lycopene 添加細胞で細胞老化誘導後 4 日目の遺伝子の発現量が上昇したものは 27,690 種類中 79 種類だった。この 2 つの解析結果をさらに解析すると、カルテノイド添加によって遺伝子の発現上昇が抑制された遺伝子を 12 種類に絞り込むことができた。そして、実際に同定した遺伝子の発現上昇が抑制されているかを TIG-3 細胞で SYBR Green 法を用いて検証した。

TIG-3 細胞では、細胞老化誘導後 4 日目で SASP 発生に關与すると考えられた 12 種類の候補遺伝子の中で発現が抑制された遺伝子は 7 種類であった。

TIG-3 細胞においてカルテノイドが発現を抑制した遺伝子は疾病の発症や免疫を担う細胞をコードする遺伝子であると考えられる。また、SASP は疾患の発症や免疫に關与していることが明らかになっている。以上のことから、本研究で同定した遺伝子は、SASP 発生に關与する可能性があると考えた。

(2) SASP を抑制する食品由来生理活性因子の探索

検討した 18 種類の食品抽出液のうち、抹茶(水)、マヨネーズ(水)、卵黄(水)、黒砂糖(水)、ココアパウダー(DMSO)、はちみつ(水)抽出液は、再現性と有意差を持って SASP 抑制効果が認められた。抹茶に SASP 抑制効果が認められたので、以下の種々の茶葉、玄米茶、ほうじ茶、ウーロン茶、白牡丹、ダージリン、釜炒り茶、プーアル茶、藁かぶせ、玉露、煎茶、キーン、ウバ、マテ、ルイボス、グリーンルイボス、ハトムギ、ネトル、抹茶(粉末)、麦茶、黒烏龍茶の水溶性抽出液について SASP 抑制効果を検討した結果、抹茶、玉露、煎茶、プーアル茶、ダージリン、ウーロン茶、ほうじ茶で SASP を抑制する効果が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本山昇
2. 発表標題 細胞老化と個体老化を結ぶ鍵となるSASP
3. 学会等名 日本基礎老化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本山昇
2. 発表標題 細胞老化から個体老化へ 歴史と展望
3. 学会等名 日本基礎老化学会市民フォーラム（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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