

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790383

研究課題名（和文） カロリー制限の抗老化機構における p53, FoxO1 の相互作用

研究課題名（英文） Interaction between p53 and FoxO1 transcription factor in the anti-aging effect of calorie restriction

研究代表者

林 洋子 (HAYASHI HIROKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40513221

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、カロリー制限（CR）の抗老化機構を p53 と FoxO1 の相互作用という観点から解明することである。まず、CRによって p53 の発現および p53 によって発現制御される Cdkn2a や p21 の加齢にともなう上昇が抑制されることを確かめた。P53 (m/+) マウス（p53 の活性化型が過剰に発現する）の繁殖が困難であったため、p53 の役割は in vivo では検討できなかった。しかしながら、CR の寿命延長効果には FoxO3 が必要であること、抗腫瘍効果には FoxO1 が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted to elucidate an interaction between p53 and FoxO1 transcription factor in the anti-aging effect of calorie restriction (CR). We confirmed that CR reduced the protein expression level of p53 in the tissues and age-related increases in the mRNA levels of Cdkn2a and p21, those are known to be regulated by p53. During the period of the present study, we could not evaluate the interaction of p53 in vivo, because of difficulty of propagation of p53 (m/+) mice, in which an active form of p53 is overexpressed. However, the present study demonstrated that FoxO3 is needed for the life-extending effect of CR; by contrast, FoxO1 plays an important role for the anti-neoplastic effect of CR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 実験動物の摂食カロリーを適度に制限

すると、自由に摂食させた場合に比べ、様々

な加齢現象が遅延し、腫瘍、非腫瘍性疾患が抑制され、寿命が延長する。この効果は、マウス、ラットだけではなくアカゲザルまで確認されている。よって、CR 関連シグナルを解明することによって、ヒトの老化や関連疾患の制御が期待できる点で、重要な研究モデルである。

(2) 我々は、線虫の寿命延長に関連するほ乳類のオルソログである FoxO 転写因子のうち、FoxO1 の機能 (抗ストレス、エネルギー代謝制御) に着目し、CR の抗老化作用への関与を検討した。CR ラット組織では、対照自由摂食ラット組織に対して、FoxO1 の活性化が維持された (Hayashi H et al., Exp Gerontol 2008)。酸化ストレス後に誘導される FoxO1 標的遺伝子の解析から、CR 特異的発現誘導に FoxO1 が関与していることが示された (Yamaza H, Hayashi H et al., Aging Cell 2010)。FoxO1-knockout (+/-, HT) マウスに CR を加えた実験では、2 の結果を反映するように、FoxO1 の半欠失によって、CR の抗腫瘍効果が減弱するが、全体の寿命には影響を与えないことが示された。この結果は、FoxO1 の低下は、腫瘍死を早めるが、非腫瘍死を遅延すること、よって老化を遅延することを示唆している (Yamaza H, hayashi H et al., Aging Cell 2010)

(3) 我々の FoxO1 の結果は、p53 の結果と表裏をなす。p53 の活性化がおこる変異マウス (p53(m/+)) では、腫瘍発生が抑制されるが、早老形質を示し、寿命が短縮する (Tyner SD, et al., Nature 2002 )。一方、p53-knockout マウス (p53(-/-)) では、腫瘍が多発し、短命化する (Denhower LA et al., Nature 1992) が、腫瘍が生じない線虫では、p53 の神経細胞での発現抑制によって寿命が延長した (Bauer JH et al., Curr Biol 2005)。一方、p53 と FoxO3 が酸化ストレス状態で、

物理的に結合し、標的遺伝子を発現させ、細胞周期停止、DNA 傷害修復、細胞老化を引き起こすことが示された (Brunet A et al., Science 2004)。FoxO1 と p53 の結合は報告されていないが、我々の FoxO1 の結果から、同様な物理的結合あるいは密接な関連と転写活性の増強が予測される。

以上の結果は、CR の抗腫瘍効果と抗老化効果を分子レベルで区別できること、p53, FoxO1 の相互作用と標的遺伝子の発現誘導を明らかにすることによって、拮抗する抗腫瘍、抗老化作用を最適化できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、カロリー制限 (CR) の抗老化機構を p53 と FoxO の相互作用という観点から解明することを目的とする。

(1) 酸化ストレス後の p53, FoxO 1 の CR 特異的活性化動態: 野生型 CR マウス組織を用いて、CR によって、p53, FoxO1 の転写活性が増強するか、p53 と FoxO1 の物理的な結合があるか、各遺伝子の KO マウスを用いて、CR のストレス応答効果が減弱するかを検証することで2つの分子の相互作用の存在を実証する。

(2) CR の疾患抵抗性における p53, FoxO1 の役割: 他グループの研究によって、p53, FoxO の欠失と腫瘍発生は検討されている。本研究では、非腫瘍性疾患感受性にしぼり、p53, FoxO の役割を検討する。非腫瘍性老齢疾患として、酸化ストレス誘発 Parkinson 病モデルを用いる。野生型 CR マウスでは、疾患の抑制が期待できるが、p53, FoxO の発現レベルの変化によって、疾患感受性の増減が予測され、その結果に基づいて、各分子の CR における抗老化作用における役割を解明する。

(3) CR の寿命延長、抗腫瘍、抗老化作用における p53, FoxO の役割: p53, FoxO1 および FoxO3 の発現レベルが異なる変異マウスを作出し、自由摂食、CR 下で飼育する。寿命、自然発症性腫瘍、非腫瘍性疾患頻度を計測することによって、異なった摂食状況における p53, FoxO の老化や寿命制御における役割とその相互作用を明らかにする。さらに、p53, FoxO の共通の標的遺伝子である p21, p27 の役割についても検討する。

### 3. 研究の方法

野生型、p53, FoxO1, FoxO3 の遺伝子改変マウスを自由摂食、CR 条件下にて飼育する。p53-FoxO1 のダブル変異種を作出し、2つの転写因子の発現レベルの組み合わせを変え、以下を計画していた。

- (1) 酸化ストレスに対する p53, FoxO1, FoxO3 の CR 特異的活性動態:
- (2) p53-FoxO ダブルミュータントの作出と寿命集団の確立
- (3) パーキンソン病モデルを用いた疾患感受性の評価
- (4) 寿命集団の維持、自然死マウスの病理検索

### 4. 研究成果

(1) 研究期間内に p53 (m/+)マウスの繁殖が困難であったため、FoxO1, FoxO3-ノックアウトマウスを用いた研究結果が主体となった。しかしながら、CR によって野生型マウス (WT) 組織における p53 の発現が抑制されること (図 1)、p53 によって制御される Cdkn2a の加齢変化が抑制されることを明らかにした (図 2)。

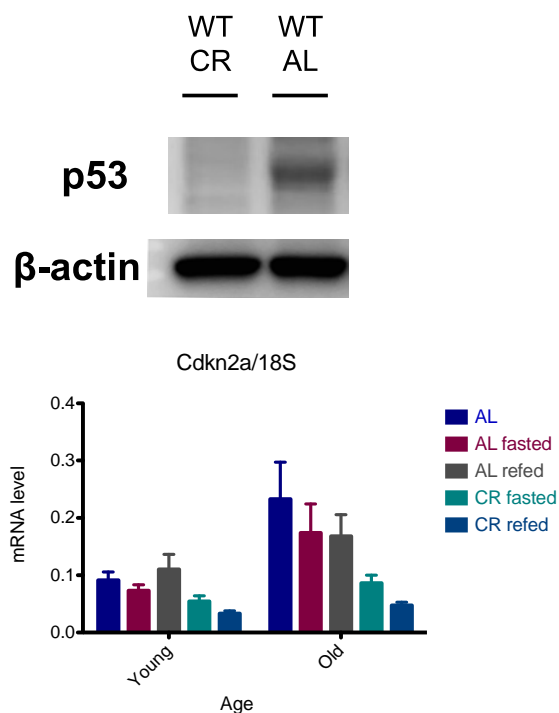
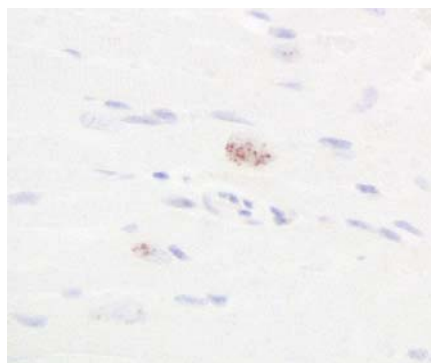


図 1. p53 Western blot(白色脂肪)。図 2 Cdkn2a-mRNA 発現の加齢変化

(2) CR による p21 の発現上昇抑制: 酸化ストレス後の p53, FoxO1 の CR 特異的動態を検討するために、酸化ストレスによる DNA 傷害を引き起こす Doxorubicin (Dox) を投与後、経時的に p53, FoxO1 により転写制御される p21 の mRNA 発現レベルを検討した。まず、DNA 障害のレベルを、 $\gamma$ H2AX をマーカーとして、その陽性細胞を計測した (図 3A, B)。Dox 投与後の陽性細胞数に CR, FoxO1-(HT, +/-) マウス組織では有意な差はなかった。



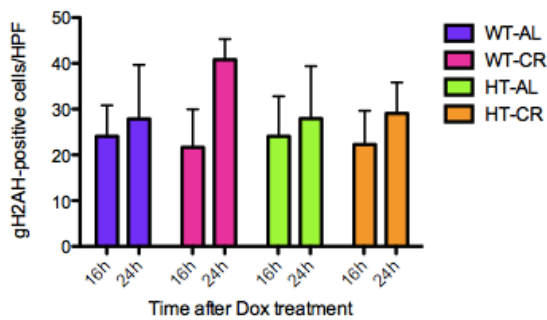


図3. A) 心筋の $\gamma$ H2AX 陽性細胞、B) 陽性細胞数

p21-mRNA レベルは、Dox 投与により、対照の自由摂食 (AL) マウス心臓組織において有意に発現が増加した。CR はその発現上昇を抑制した (図4) が、FoxO1-HT と野生型 (WT) マウスによる差はなかった。

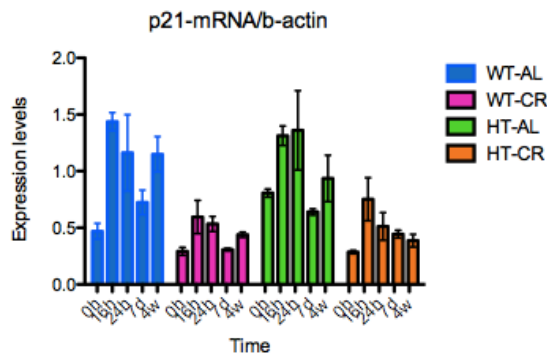


図4. 心臓における p21-mRNA の発現レベル

以上の結果は、心臓においては、酸化ストレス、DNA 傷害に対する CR の効果に FoxO1 の影響はほとんどないと考えられた。

(3) CR の疾患抵抗性における p53, FoxO1 の役割: Parkinson 病モデルを作成するために、3-nitropropionic acid (3-NPA) を投与した。CR ラットを用いた予備実験を行い、CR の効果を確認したが、実験期間内に p53 (m/+), FoxO1-HT, FoxO3-HT マウスを用いた実験は終

了しなかった。今後、実験を継続する予定である。

(4) CR の寿命延長効果における FoxO3 の役割: FoxO1-HT マウスにおいては、CR の抗腫瘍効果は減弱するが、寿命延長効果は保たれていた (Yamaza H, Hayashi H 他、Aging Cell 2010)。P53 は、FoxO3 と結合することが報告されていたので、FoxO3 (+/-, HT) マウスにおける CR の寿命延長効果を検討した。FoxO3-HT マウスにおいては、CR による腫瘍抑制効果は保たれていた (図5) が、寿命延長効果が消失した (図6)。これらの結果は、CR の効果が FoxO1 と FoxO3 の発現レベルによって個別に制御されていることを示唆している。今後は、p53 との関連性を含めて、FoxO1、FoxO3 によって個別に制御される標的遺伝子、シグナル系を明らかにする。

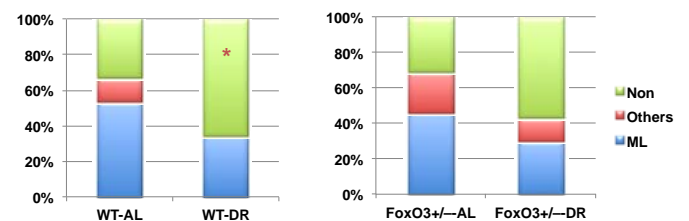


図6. 死亡時の腫瘍発生率

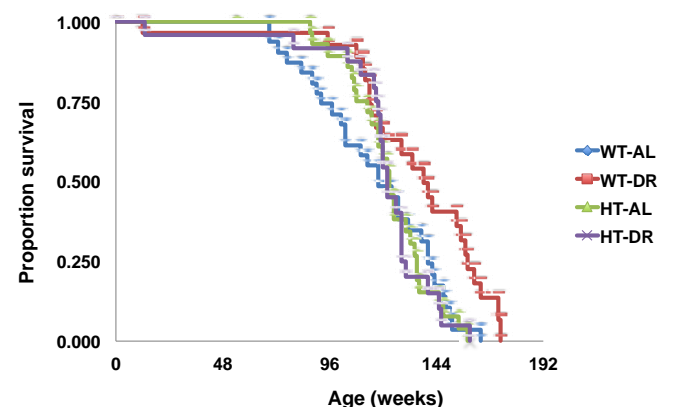


図7. FoxO3-HT マウス、野生型 (WT) マウスの寿命: カロリー制限 (DR) の影響

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 3 件)

1. Komatsu T, Hayashi H(4 番目), 他 6 名:  
"Acute stress response modified by  
modest inhibition of growth hormone  
axis : Apotential machinery of the  
anti-aging effect of calorie  
restriction" Mechanisms of Ageing and  
Development 132. 103-109 (2011), doi:  
10.1016/j.mad.2011.01.002. 査読有
2. Chiba T, Hayashi H(5 番目), 他 6 名:  
"Development of a bioassay to screen  
for chemicals mimicking the anti-aging  
effects of calorie restriction."  
Biochemical and Biophysical Research  
Communications 401. 213-218 (2010),  
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.032. 査  
読有
3. Yamaza H, Hayashi H(6 番目), 他 7 名:  
"FoxO1 is involved in the  
antineoplastic effect of calorie  
restriction." Aging Cell 9. 372-382  
(2010), doi:  
10.1111/j.1474-9726.2010.00563.x. 査  
読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 【International Symposium of Asian  
Association of Aging Research 2012 in  
Fukuoka - Biology of Aging and  
Disorders- (24 ~ 26 August, 2012,  
Fukuoka, Japan)】 Komatsu T, Mori R,  
Hayashi H, Kamohara R, Kim SE, Chiba T,  
Shimokawa I FoxO1 plays a key role in  
anti-neoplastic effect but not lifespan  
extension of Calorie Restriction in mice

2. 【第 12 回日本抗加齢医学会総会、2012 年  
6 月 22 日~24 日、横浜】小松 利光、森 亮  
一、林 洋子、蒲原 涼太郎、金 湘殷、千  
葉 卓哉、下川 功  
カロリー制限の抗腫瘍効果と寿命延長効  
果における FoxO1 の役割(優秀演題に選出)

3. 【第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月  
28 日~30 日、横浜】千葉 卓哉、小松 利  
光、森 亮一、林 洋子、下川 功  
Neuropeptide Y の欠損はカロリー制限によ  
る抗老化効果を減弱させる

4. 【第 34 回日本基礎老化学会、2011 年 6 月  
17 日~18 日、東京】小松 利光、森 亮一、  
林 洋子、蒲原 涼太郎、Kim Sang Eun、粕  
谷 泰祐、永富 裕子、千葉 卓哉、下川 功  
カロリー制限の抗腫瘍効果における FoxO1  
の役割

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 洋子 (HAYASHI HIROKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教

研究者番号 : 40513221

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし