

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689013

研究課題名(和文)概日NAD+代謝制御の破綻による老化関連疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Effects of Circadian NAD+ oscillation on the onset of age-related diseases

## 研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50390810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：NAD+増加は概日時計周期に影響を及ぼさないことを生体および細胞レベルで明らかにした。一方で、NAD+減少は概日時計周期を延長させることが細胞レベルで明らかになった。老化関連疾患のうち今回検証した脂肪蓄積、糖代謝異常は、Nampt/NAD+増加により改善も悪化もしないことが示唆された。しかし、細胞老化の開始とNAD+量は正の相関、すなわち、NAD+量依存的に細胞老化開始が遅延することを見出した。これらの結果は、NAD+減少が概日時計異常や細胞老化を惹起している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that circadian machinery is not affected by high intracellular NAD+ at cellular and systemic levels, on the other hand, low intracellular NAD+ prolongs the period of circadian clock at the cellular level. Transgenic mice with high Nampt/NAD+ in the whole body did not show any improvements or deteriorations on glucose/lipid homeostasis. Primary MEF cells with high Nampt/NAD+ showed the delay onset of cellular senescence. These results suggest that intracellular NAD+ level in cells is associated with the maintenance of circadian clock and the onset of cellular senescence.

研究分野：時間生物学

キーワード：NAD代謝 概日時計 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの老化研究により、非常に多岐にわたる分子が細胞・個体レベルで老化現象に関わっていることが明らかになった。そのなかで近年、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 Sirtuin ファミリー、特に Sir2 (哺乳類 SIRT1 オートログ) が酵母、ショウジョウバエなどの下等動物で寿命制御に重要な役割を果たしていることが報告されて以来、爆発的に研究が進められ、SIRT1 が老化や代謝制御に非常に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。例えば、Sirtuin ファミリー欠損マウスでは、代謝機能異常に陥りやすい、また逆に SIRT1 高発現マウス、または SIRT1 活性化薬投与マウスでは、代謝機能亢進が見られることが明らかになってきた。しかし一方で、加齢に伴い、SIRT1 高発現マウスと対照マウスで遺伝子発現、インスリン分泌等に有意な差がなくなること、さらにその原因が NAD<sup>+</sup>不足であることが示唆されていた。

一方で概日時計は、睡眠・覚醒リズムを支配するだけの機構ではなく、関連した複数の生理機能が最も効率的に機能するための生体全体を統合させる機構/システムとして働いていることが明らかになりつつあった。さらに、概日時計の破綻は代謝性疾患や早老など種々の老化関連疾患を引き起こすことも知られていた。

私たちは、SIRT1 の脱アセチル化活性が概日変動を示すこと、さらにヒストン H3 および概日時計分子 BMAL1 のアセチル化状態を制御することで概日時計を調節すること (Nakahata Y *et al.*, Cell. 2008)、さらに SIRT1 の活性に必須である細胞内 NAD<sup>+</sup>量 が概日時計に制御されていること、その分子メカニズムが NAD<sup>+</sup>再利用経路の律速酵素 NAMPT の遺伝子発現が概日時計により制御されているためであることを発見した (Nakahata Y *et al.*, Science. 2009)。これらの研究成果は、概日時計とエネルギー代謝の相互関連を遺伝子/分子レベルで初めて示し、「概日時計」「老化」「代謝」という重要な生命現象を“統一的に結び付ける新規概念”を提示した。

## 2. 研究の目的

私たちは上記研究成果を発展させ、概日時計と NAD<sup>+</sup>/Sirtuin による老化制御の解明を研究目標としている。本研究では特に、細胞内 NAD<sup>+</sup>量と概日時計機構、そして老化進行との関連性を遺伝子/分子レベルで解明することを目標とした。具体的には、概日

NAD<sup>+</sup>変動の破綻 (恒常的増加もしくは減少) が概日時計、糖・脂質代謝、さらに老化進行にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Nampt 高発現トランスジェニックマウスの作成および評価

CAG プロモーター制御により全身で Nampt を高発現するトランスジェニック (Tg) マウスの作成を行った。導入遺伝子特異的プライマーおよび導入遺伝子および内在性 Nampt 遺伝子両方を認識するプライマーを作成し、定量的 PCR にて各ラインでの発現量を評価した。また、導入 NAMPT タンパク質は C 末端に HA タグが付加されているため、HA 抗体によるウェスタンブロッティングによりタンパク質量の評価も行った。

### (2) 高脂肪食負荷による体重・代謝への影響

Tg マウスおよび対照野生型 C57BL/6 マウスが 9 週齢になった時点より Research Diet 社の 60%高脂肪食 (HFD) にて飼育し、毎週体重測定を行った。また HFD 開始 1 週目および 7 週目に 1 日あたりの食餌摂取量を比較した。C57BL/6 マウスへの HFD 実験は肥満誘導性 II 型糖尿病のモデルであるため、HFD 開始 4 および 8 週目に血中グルコース値、インスリン値、中性脂肪値を測定した。さらに HFD 開始 8 週目に耐糖能試験を行った。

### (3) NAD<sup>+</sup>増加による概日行動リズムへの影響

3~5 ヶ月齢の雄 Tg マウスおよび対照野生型 C57BL/6 マウスを専用行動測定ボックスで個飼いにし、赤外線センサーにより数ヶ月間の活動量を測定した。

### (4) NAD<sup>+</sup>増加/減少による概日リズムへの影響

細胞レベルでの概日時計機構研究に用いられている線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に Nampt を安定発現させる、または NAD<sup>+</sup>前駆体 NMN を培地に添加し、細胞内 NAD<sup>+</sup>を増加させた状態、および NAMPT 酵素活性阻害剤 FK866 で細胞内 NAD<sup>+</sup>を減少させた状態で概日時計遺伝子発現リズムがどのような影響を受けるかを *bmal1* プロモーター制御下で発現するルシフェラーゼタンパク質の周期的発光を比較することで検証した。

### (5) Tg-MEF 細胞細胞老化の検証

各 Tg および対照野生型マウス胚由来初代線維芽 (MEF) 細胞を樹立し、細胞増殖能、細胞老化関連  $\beta$ -galactosidase 染色、細胞老化

マーカー遺伝子発現量により細胞老化に対する評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト *Nampt*-HA 高発現 Tg マウスの樹立

3'末端に HA タグが付加されたヒト *Nampt* 遺伝子を C57BL/6 受精卵に導入し、Tg マウスを4ライン樹立した。

各ラインの成獣マウス脳、骨格筋より RNA を抽出し、ライン間の総 *Nampt* mRNA 発現量を比較した。その結果、野生型と比較した時の増加量に臓器間で違いが見られたが、ライン間の発現量は両臓器ともライン#1 が最も多く、ライン#2、#3、#4 の順に少なかった。総 NAMPT タンパク質量は両臓器とも mRNA の発現量と相関していた。

骨格筋内  $NAD^+$  量を測定したところ、*Nampt* mRNA 量と相関して、最も *Nampt* mRNA 発現量が多かったライン#1 で野生型と比較して4倍程度上昇していた。

##### (2) 高脂肪食による影響は Tg マウスと野生型マウスで変わらない

ライン#1 の肝臓において、脂質代謝を制御している *PPAR $\gamma$*  mRNA 発現量が2倍程度上昇していたため、肝臓の脂質蓄積の機能が向上している可能性が考えられた。そこで、Tg および野生型マウスを高脂肪食 (HFD) で飼育し、体重変動、耐糖能などを比較した。体重変化を調べた結果、ライン#1 と#4 は野生型と比較して体重が軽い傾向にあったが、統計的有意差は見られなかった。対して、ライン Tg#2 は体重が重い傾向であったが、統計的有意差はなかった。体重の観察と並行して、HFD 開始より1~2週目と7~8週目の摂食量の変遷を調べたところ、ライン#2 は、野生型に比べて食餌摂食量の多い日が多かったが、他のラインは野生型と変わらない変遷を示した。

C57BL/6 マウスへの HFD 実験は、肥満誘導性 II 型糖尿病のモデルである。そこで、HFD 負荷時の血糖値、インスリン値および耐糖能試験を行ったが、Tg マウス全ラインと対照野生型マウスで全ての項目において有意な差を見出すことはできなかった。

##### (3) Tg マウスは行動レベルで概日時計異常を示さない

雄 Tg ライン#1、#2、#3 マウスおよび同腹仔野生型マウスを専用行動測定ボックスにて1ヶ月程度12時間周期の明暗環境で飼育したのち、8時間明暗周期を前進させた環境で新規環境に順応するまでの日数を比較

した。同様に、8時間明暗周期を後退させた条件でも検証した。その後、恒暗条件下にて自由行動周期を調べた。これまでにライン#1 (10匹)、#2 (2匹)、#3 (4匹)、野生型 (24匹) を調べたが、すべての検証において対照野生型マウスと比較して有意な差異は無かった。

##### (4) $NAD^+$ 増加/減少による概日リズムへの影響

つぎに、細胞内  $NAD^+$  量と概日時計機構との関連性について培養細胞を用いて検証した。まず、NIH3T3 細胞にヒト *Nampt*-HA を安定的に発現させた細胞 (*Nampt*-HA/NIH3T3) を作成した。この細胞内  $NAD^+$  量は対照 NIH3T3 細胞に比べて約2倍程度上昇していた。*Bmal1* プロモーター制御下 luciferase (*bmal1*-luc) の発光周期を比較した結果、対照 NIH3T3 と *Nampt*-HA/NIH3T3 に有意な細胞周期長の変化、位相のズレは観察されなかった。また、 $NAD^+$  の前駆体である NMN (nicotinamide mononucleotide) 処理により  $NAD^+$  を約2倍程度上昇させた状態でも周期長などに変化は見られなかった。

さらに、NAMPT 酵素阻害剤 FK866 で NIH3T3 細胞を処理し、細胞内  $NAD^+$  量を減少させることで概日時計機構に影響が表れるかを検証した。その結果、FK866 濃度依存的、すなわち細胞内  $NAD^+$  減少量依存的に概日時計周期が延長することを明らかにした (図1)。さらに、FK866 と  $NAD^+$  前駆体 NMN の同時処理により細胞内  $NAD^+$  減少を抑制すると概日時計周期の延長も抑制することができたため、FK866 処理による  $NAD^+$  減少が概日時計周期の延長を惹起していることが明らかになった。

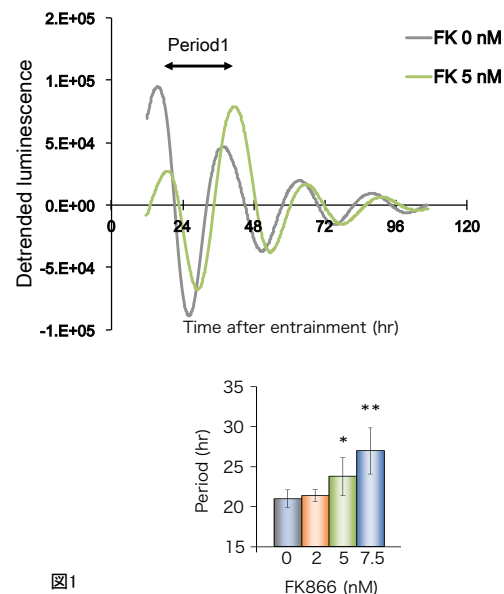


図1

### (5) ヒト Nampt-HA 発現量依存的に初代 MEF 細胞は細胞老化遅延を引き起こす

つぎに、細胞内 NAD<sup>+</sup>量と細胞老化の関連性を検証するために、ライン#1~4 胚由来初代 MEF 細胞を樹立し、ライン間の NAMPT タンパク質を比較した。その結果、総タンパク質量はライン#4 で野生型 MEF 細胞の約 6 倍、ライン#1 で約 4 倍、ライン#2 で約 2 倍、ライン#3 で約 1.3 倍高かった。NAMPT 発現量と相関して細胞内 NAD<sup>+</sup>量もライン#4 で約 2.5 倍、ライン#1 で約 1.8 倍、ライン#2 で約 1.5 倍、ライン#3 で約 1.2 倍上昇していた。これら 4 ラインの細胞老化への影響を検証するために細胞増殖能を調べた結果、野生型 MEF 細胞は継代日数 16 で細胞老化が始まったが、ライン#4、#1、#2 はそれぞれ継代日数 25、23、23 で細胞老化が開始することがわかった (図 2)。一方で NAD<sup>+</sup>の上昇がほとんど見られなかったライン#3 は野生型 MEF 細胞と同じ継代日数 (16) で細胞老化が開始した。さらに、細胞老化関連β-galactosidase 染色、細胞老化マーカー遺伝子発現量の定量を同継代日数で比較したところ、Tg-MEF 細胞でβ-galactosidase 染色陽性細胞の割合、すべての細胞老化マーカー遺伝子 (*p16<sup>INK4a</sup>*、*p19<sup>ARF</sup>*、*p21<sup>CIP1</sup>*) 発現量が有意に低いことを明らかにした。これらの実験結果より、Nampt/NAD<sup>+</sup>量依存的に細胞老化が遅延することが示唆された。

さらに、老化遅延の原因の一つとして

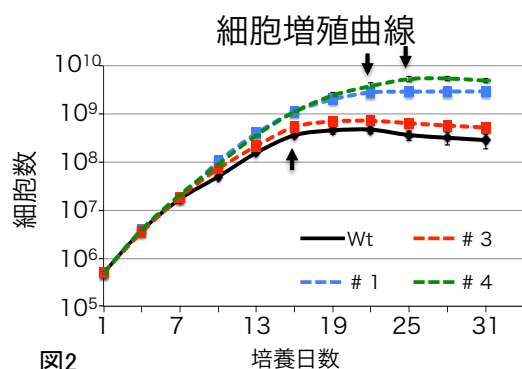


図2

Tg-MEF 細胞で活性酸素種が減少していることを見出した。過酸化水素処理後の活性酸素種量も Tg-MEF 細胞で有意に低かったため、活性酸素除去能力が Tg-MEF 細胞で上昇していると考え、抗酸化ストレス遺伝子の発現量を定量した。その結果、Tg-MEF 細胞内で *sod2* と *Catalase* mRNA が有意に上昇していた。以上の結果は、Nampt/NAD<sup>+</sup>増加により抗酸化ストレス分子の発現量の上昇/酸化ストレスの軽減を惹起し、細胞老化遅延を引き起こしている可能性を示唆している。

### 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 1 件)

Bellet MM, Nakahata Y, Boudjelal M, Watts E, Mossakowska DE, Edwards KA, Cervantes M, Astarita G, Loh C, Ellis JL, Vlasuk GP, Sassone-Corsi P. Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(9):3333-3338, 2013 査読有  
doi: 10.1073/pnas.1214266110

[学会発表] (計 3 件)

1. 芦森温茂、中畑泰和、隅澤杏介、松井貴輝、別所康全、「時計遺伝子発現制御における Nampt/NAD<sup>+</sup>の影響」、第21回日本時間生物学会学術大会 2014年11月8日、九州大学医学部 百年講堂 (福岡県福岡市)
2. Yasukazu Nakahata, “Circadian Rhythm Regulation by NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase “SIRT1””, The 1<sup>st</sup> International Symposium of Blue Light Society, 2013年6月7日、JPタワー ホール&カンファレンス (東京都千代田区)
3. 中畑泰和、別所康全、「概日時計と分節時計を制御する脱アセチル化酵素 SIRT1」、第19回日本時間生物学会学術大会 2012年9月16日、北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ : <http://bsw3.naist.jp/bessho/>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 50390810

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし