

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790272

研究課題名(和文) 老化血管内皮細胞の炎症亢進表現型における CDC42 シグナルの解析

研究課題名(英文) Role of CDC42 in pro-inflammatory phenotype of senescent vascular endothelial cells

研究代表者

伊藤 孝 (Ito, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20597124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症、すなわち弱くて長期に渡る免疫細胞の活性化はがん、動脈硬化、アルツハイマーなどの年齢とともに起こる多くの疾患の原因である。その原因はまだよくわかっておらず根本的な治療法もない。本研究では、体中に広く分布する血管内皮細胞で細胞老化が誘導されると、CDC42が活性化することをヒト培養細胞で見出した。さらにその働きにより炎症が強まり、動脈硬化が促進することをマウスでも見つけた。さらにモデル生物線虫を用いて、CDC42が過剰な免疫反応の促進と、それによる寿命の短縮を引き起こす事も見つけた。以上から生物種を超えて、CDC42が細胞老化に伴う慢性炎症の誘導、寿命短縮に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation underlies most age-related diseases such as cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative disorder. This research focuses on a phenomenon called cellular senescence, in which multiple genes associated with inflammation are upregulated. We identified CDC42 as a regulator of inflammatory genes in senescent vascular cells, and also as a regulator of atherosclerosis in mice. CDC42 was the cause of short lifespan of mutant worms with immune over activation, a model for chronic inflammation of mammals. These results suggest that CDC42 has a critical role in chronic inflammation and age-related diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：慢性炎症 細胞老化 血管内皮細胞 CDC42 動脈硬化 寿命 老化

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性炎症、すなわちある特定臓器内の免疫細胞の長期にわたる活性化は、がん、動脈硬化、神経変性疾患など、加齢に伴って起こる多くの病気の原因であると考えられるようになってきている。その重要性にも関わらず、加齢や生活習慣ストレスにより慢性炎症が起こるメカニズムはよくわかっていない。

(2) 細胞老化は細胞に傷害が蓄積されると誘導される表現型の1つであり、その特徴として炎症誘導遺伝子の発現が持続的に亢進する。動脈硬化などの加齢に伴う心血管病態でも、病態の危険因子によって血管内皮細胞の細胞老化が誘導される。患者動脈硬化巣にも老化血管内皮細胞は蓄積され、病態進行の主因となる慢性炎症に寄与すると考えられる。しかし老化細胞で炎症関連遺伝子が誘導される分子機構は、特に血管内皮細胞ではほとんど分かっていなかった。またその分子機構が動脈硬化の進展に関わるか、さらには老化や寿命に影響を及ぼすかも謎だった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、細胞老化を引き起こしたヒト血管内皮細胞において、炎症誘導遺伝子の発現が持続的に亢進する分子機構を解析する。

(2) この炎症誘導遺伝子群の発現亢進を持続する分子機構が、慢性炎症を引き起こすことで動脈硬化を進行させるという仮説に基づき、動物モデルにおける寄与を解析する。さらにはその寿命、老化への影響を寿命が短いモデル生物である線虫を用いて検討する。

(3) これらの一連の実験計画を通して動脈硬化性疾患をはじめとした現代の慢性炎症を伴う老化に関連する難治性疾患の治療法開発、人類の老化防止、寿命延長に将来的につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの実験結果から炎症への関わりが予想された CDC42 遺伝子とその下流で働く遺伝子経路が果たす役割をヒト老化血管内皮細胞、マウス、線虫の3種の実験モデルで解析を進める。動物種を超えて存在する、共通の基盤となる現象を解析することにより、慢性炎症、またそれが元となる加齢性疾患の本態を理解することを目指す。

4. 研究成果

(1) siRNA を用いたスクリーニングで、ヒト老化血管内皮細胞における炎症誘導の原因経路として CDC42 経路と NF B 経路を同定した。

CDC42, PAK2、もしくは IKK, RelA の siRNA 導入により、MCP-1, E-selectin, VCAM-1 等の動脈硬化進行に重要な炎症誘導遺伝子の発現が抑制された。老化細胞では CDC42 経路、NF B 経路ともに活性化されていたが、CDC42 経路を抑制すると NF B 経路の活性も失われた。さらに活性型 CDC42 遺伝子を老化していない血管内皮細胞に導入することでも炎症誘導が見られ、この表現型が NF B 経路を抑えることで失われた。よって CDC42 経路が NF B 系を活性化することが、細胞老化にともなう血管内皮細胞における炎症誘導する分子機構の一端であることが示唆された。

(2) 老化していない正常血管内皮細胞において、CDC42 を抑制しても LPS, TNF- などの急性刺激による MCP-1, E-selectin, VCAM-1 遺伝子の上昇を含む炎症誘導は保たれた。この反応は NF B 経路を抑えると強く抑制された。よって、CDC42 は NF B とは異なり、老化細胞による炎症誘導にある程度特異的な経路であると考えられた。NF B 経路は、広く免疫反応に関わる遺伝子として知られる。この経路自体を抑えると、細菌などの感染に対する防御反応も抑え、免疫不全などの副作用が起こると予想される。一方 CDC42 経路が関与する免疫反応の経路が限られているという本データから、CDC42 を抑えるような治療法が、感染症の増加を副作用として生まない老化に関連する慢性炎症を抑えることにつながることを期待される。

(3) Cre-loxP システムを用いて、血管内皮細胞限定的に細胞老化が誘導できるマウスを作製し、各種臓器で炎症が誘導されることを確認した。すなわち血管内皮細胞の細胞老化を組織内で特異的に誘導できるマウスがこれまでなかったが、それが本研究により可能となった。このマウスでもヒト老化血管内皮細胞と同様、NF B の活性化と炎症誘導遺伝子の誘導が組織レベルで見られた。CDC42 遺伝子を血管内皮細胞で同時に欠損することで炎症が抑制された。すなわち、マウスでも老化血管内皮細胞において CDC42 が炎症を制御すると予想された。

(4) 動脈硬化が起こるマウスモデルである ApoE ノックアウトマウスを用いて、動脈硬化進展とそれに伴う慢性炎症への CDC42 の役割を調べた。動脈硬化巣の血管内皮細胞では p21、H2AX などの細胞老化マーカーが上昇していたことから、動脈硬化モデルにおいて老化血管内皮細胞が増加していることが示唆された。Cre-loxP システムで血管内皮細胞特異的に CDC42 を欠損させることで、MCP-1, E-selectin, VCAM1 の発現が減少するとともに、マクロファージの動脈硬化巣内への浸潤が大きく減少した。マクロファージは動脈硬化における慢性炎症で主要な働きをする免疫細胞である。さらに動脈硬化巣の

面積も減少したことから、CDC42 が動脈硬化と慢性炎症を制御することがマウスモデルで確認された。

(4)さらにこれらのヒト、マウスの老化血管内皮細胞において CDC42 機能を消失させると炎症遺伝子の誘導が抑えられた一方で、その他の老化細胞の性質には変化が見られなかった。細胞老化はがんを抑える生体防御反応のひとつであることが知られる。CDC42 を抑えることは、細胞老化自体を抑制することを意味しない。将来的にこの経路を抑えるような治療法が、がんの増加を副作用として生まないような慢性炎症の治療法となることが期待される。

(5)免疫が異常活性化した線虫の変異体 nol-6 で CDC42 経路を抑制すると、自然免疫制御遺伝子が抑制されるとともに、短縮していた寿命が野生株同等レベルまで回復した。すなわち、ヒト、マウスといった哺乳類のみならず、進化的に距離がある線虫においても同等の遺伝子経路が保存されていたと考えられる。

さらに、野生型線虫、免疫異常変異体 nol-6、RNAi で線虫の CDC42、その下流 PAK2 のホモログである cdc-42、max-2 を抑制した変異体の 4 種を DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に定量解析した。その結果、野生型と変異体 nol-6 との間の発現パターンに大きく差がある一方で、CDC42 経路を抑えた変異体の発現パターンが野生型のものに近づいていることが分かった。つまり、自然免疫調節遺伝子の抑制、寿命の回復に加えて、後半な範囲の遺伝子の発現が CDC42 経路によって調節されていたことが分かった。これらの遺伝子経路を解析することで、CDC42 経路が免疫調節を介して老化を促進するメカニズムの理解が進む可能性がある。さらに将来的にはこの線虫で解明されたメカニズムが哺乳類の老化関連疾患や老化・寿命の理解につながる可能性があると考えられている。

以上より CDC42 経路が老化血管内皮細胞による炎症誘導と、それを原因とする病態、個体老化促進に寄与する可能性が考えられた。さらにその経路が種を超えて保存されていた。この研究により、慢性炎症と血管細胞、老化関連疾患、寿命の理解をつなげるメカニズムの一端が明らかになったと考える。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

伊藤 孝、南野 徹：CDC42 経路が老化血管内皮細胞の炎症誘導を制御する
第 13 回日本抗加齢医学総会
2013/6/28-30

(招待講演)

伊藤 孝、南野 徹：老化血管内皮細胞による炎症誘導に CDC42 経路と NF B 経路が寄与する
第 35 回日本分子生物学会年会 2012/12/11-14 (ポスター発表
かつ口頭発表)

Ito T, Minamino T : CDC42 and NF B signaling contribute to pro-inflammatory phenotype of senescent endothelial cells.
Keystone Symposium Aging and Diseases of Aging (S2)2012/10/22-26

(ポスター発表かつ口頭発表。Travel award 受賞)

Ito T, Minamino T : CDC42 and NF B signaling contribute to pro-inflammatory phenotype of senescent endothelial cells.
41st Annual Meeting of The American Aging Association 2012/6/1-4

(口頭発表)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

研究のまとめ

慢性炎症の新規経路が進化的に保存



取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

5. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 孝 (Ito, Takashi)
千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20597124

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

南野 徹 (Minamino, Tohru)
新潟大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90328063