

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24年4月28日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390237

研究課題名（和文）細胞老化・個体老化シグナル制御による心血管治療法の開発に関する
基盤研究研究課題名（英文）Basic Research on the Treatment of Cardiovascular Disease by Regulating
Aging Signals

研究代表者

南野 徹（MINAMINO TOHRU）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：90328063

研究成果の概要（和文）：ヒトは老化するにしたがって様々な疾患、例えば、動脈硬化や糖尿病、高血圧とそれに伴う心不全などを発症する。しかしこれまで老化の側面から見たこれらの疾患の治療開発は行われていなかった。本研究では、細胞老化分子である p53 や個体老化シグナルの一つであるインスリン経路が心不全の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The incidence and the prevalence of diabetes, heart failure, coronary heart disease and hypertension increase with advancing age. However, the molecular mechanisms underlying the increased risk of such diseases that is conferred by aging remain unclear. In the present study, we demonstrated that cellular aging signals contribute to the pathogenesis of cardiovascular disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、老化

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴って、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率が増加し、その結果、虚血性心疾患や脳卒中の発症の基盤病態となっている。これらの疾患は、多くの高齢者において共通に認められることから、老化の形質の一部として捉えることができる。すなわち、これらの疾患の究極的な治療のターゲットは、寿命を調節する仕組みそのものかもしれない。しかし、これまで加齢に伴って個々の病態がどのように変化するかという観点からの研究は行われてきたが、老化・寿

命という側面からみた包括的な研究は行われていない。通常ヒト正常体細胞の分裂回数は有限であり、ある一定期間増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。その寿命は培養細胞のドナーの年齢に相関すること、また、早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことも報告されている。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に病的な形質を担う」という仮説に基づいて進めることにした。

これまで血管細胞老化が血管の老化、動脈硬化に関与しているかどうかについては明

らかでなかったのに対し、私は senescence-associated (SA) β -gal assay という方法を用いて、はじめてヒト動脈硬化巣に老化した血管細胞認められることを報告した (Circulation 2002)。また、これらの老化血管細胞は炎症性のサイトカインの発現亢進など血管機能障害の形質を示していたことから、血管細胞老化が動脈硬化病態生理の新たなメカニズムの一つであると考えられた。細胞老化のメカニズムとして重要な仮説がテロメア仮説である。テロメアは細胞分裂に伴って短縮し、p53 依存性に細胞老化を誘導する。これに対し、テロメアを付加する酵素がテロメラーゼである。私は血管細胞におけるテロメラーゼの活性調節機構を明らかとするとともに (Circ Res 2001)、その導入によって細胞老化を抑制し血管内皮機能を維持することができること (Mol Cell Biol 2001)、逆にテロメアの機能不全を導入すると、ただちに血管細胞が老化するとともに、NO 産生の低下、炎症分子の発現亢進などの機能障害がもたらされることを観察した (Circulation 2002)。さらに私はテロメア非依存性の細胞老化も動脈硬化における細胞老化に重要であることを報告した (Circulation 2003, 2006, EMBO J 2004)。

2. 研究の目的

以上のように、細胞レベルの老化シグナルが、個体の老化に伴う疾患の病態生理に関与している一方で、個体の寿命にかかわるシグナルが細胞レベルの老化にも関与し、老化に伴う疾患の病態生理にもかかわっていることがわかる。実際、多くの早老症状を呈するヒトの疾患原因遺伝子は DNA repair に関わるもので、その分子の障害は細胞レベルの老化を促進する。従って、細胞老化シグナルや個体老化シグナルと心血管系の老化の病態を総合的に検討することによって、新たな治療のストラテジーの開発の基盤となりうると考えられる。そこで本研究では、細胞老化シグナルが個体老化や心血管老化にどのように関与するのか？これまで報告されている個体老化シグナルがどのように心血管老化に関与するのか？について、様々な遺伝子改変マウスや心血管疾患モデルを用いて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 個体老化シグナルによる心血管老化の制御

インスリンシグナルを抑制すると寿命が延長することが、酵母、線虫、ハエ、マウスで報告されている。

これに対して我々は、インスリンシグナルが血管細胞老化を促進し、糖尿病性血管障害の一因となっていることを報告した。さらに最近これらのシグナルが、心不全に対して促進的に働くというデータも得ている。そこでこれらのデータについて、心筋特異的なインスリン受容体ノックアウトマウスやストレプトゾシンによるインスリン欠失モデルなどに心不全モデルを作成することによって解析を進める。

(2) 細胞老化シグナルの循環器疾患における病態生理学的な役割の検討

加齢に伴い心不全の発症率は増加する。また、加齢に伴って心筋のテロメアの機能異常や DNA 損傷の集積により p53 シグナルの増強がみられることが示唆されている。加齢に伴う高血圧に対しては、初期には適応反応としての心肥大が生じ、長期の圧負荷後には心不全となることが知られているが、そのメカニズムは明らかでなかった。私はそのメカニズムについてマウス圧負荷モデルを用いて検討し、心肥大非代償期の p53 の発現の亢進が血管新生能を低下させ、心機能を障害していることを明らかにした。すなわち、p53 の活性化は心不全発症の病態生理に重要であり、加齢に伴うその活性化は、高齢者の心不全発症率増加の一因である可能性がある。

本計画ではその仮説をさらに検討するため、心筋特異的 p53 ノックアウトマウス、血管内皮特異的 p53 ノックアウトマウス、脂肪特異的 p53 ノックアウトマウスなどを用いて心肥大モデルや心筋梗塞モデルを作成し、心不全を制御することができないかについて調べる。

4. 研究成果

(1) 個体老化シグナルによる心血管老化の制御

老化した心臓の特徴は、若い心臓と比較して心筋細胞数が減少し、心筋細胞が肥大傾向にある点にある。加齢に伴い心不全の発症率が増加することが疫学的に示されているように、高血圧等の心負荷に対して心筋組織と

しての予備能が低下し、心不全を発症しやすくなることが問題となる。インスリンシグナルを抑制すると寿命が延長することが多くの動物実験を用いた研究で示されているが、心筋組織のインスリンシグナルが心臓老化を促進するか否かは未だ明らかではない。

動物実験を用いた多くの研究では、インスリンは不全心に対してアポトーシスを抑制するなど保護的に作用すると報告されている。その一方で、複数の臨床研究により全身のインスリン抵抗性（高インスリン血症）が心イベントと関連することが報告されており、心臓のインスリンシグナルと心不全との関連は未だ明らかではないといえる。

我々は、持続的な圧負荷により、心筋組織内のインスリンシグナルが過剰に活性化し心不全の発症・増悪を促進することを明らかにした。圧負荷モデルでは心不全慢性期において、全身のインスリン抵抗性（高インスリン血症）が惹起され、血清インスリン濃度の高値を示した。肝臓ではインスリン抵抗性が惹起されていたが、心臓では対照的にインスリンシグナルは著明に活性化していた。その機序として心筋組織の伸展刺激によるインスリン受容体の活性化が重要であることがわかった。圧負荷により心筋細胞肥大が生じると、血管数とのミスマッチが生じ、心筋組織内の虚血を介した心筋細胞死により心機能の著明な低下が生じるが、高インスリン血症を抑制すると、心筋細胞肥大とそれに伴う心筋組織内の虚血が抑制され、心機能は保たれていた。インスリン受容体を心筋細胞特異的に減少させることによっても、心筋組織内の虚血が抑制され心機能は著明に保たれた。1型糖尿病マウスでは著明な高血糖にも関わらず、圧負荷後の心機能が保たれていたが、インスリンで治療を行うと高血糖が是正されるものの、心筋組織内の虚血と心筋細胞死が惹起され、心機能は著明に低下した。本研究によって、高血糖を改善するためにインスリンを用いることは、心臓に圧負荷が生じている状況では心機能に悪影響を与える可能性のあることが明らかとなった。これらの結果は、高インスリン血症が心イベントと関連することを報告した臨床研究の結果とも合致するものと考えられ、糖尿病のみならず心不全の治療においても、臓器間のインスリンシグナルの調節を標的とした治療は不可欠であると考えられる。心負荷時に心筋組織の

インスリンシグナルが活性化することは、マウスによる心筋梗塞モデル、本態性高血圧ラットでも認められており、不全心に共通した病態である可能性が高いと考えられる。

(2) 細胞老化シグナルの循環器疾患における病態生理学的な役割の検討

予想通り、心筋特異的 p53 ノックアウトマウスにおいて、心肥大モデルや心筋梗塞モデルにおける心不全の発症は抑制された。さらに圧負荷に伴う心不全モデルにおいて、心臓における p53 依存性老化シグナルの活性化について詳細に検討したところ、心臓組織内の血管における p53 の活性化が認められることがわかった。そこで、血管特異的 p53 欠失マウスを用いて検討したところ、それらのマウスでは、圧負荷による心不全発症が抑制されることがわかったことから、圧負荷に伴う心不全モデルにおける心臓組織内の血管における p53 の活性化の重要性も示唆された。

多くの臨床研究から、心不全と糖尿病、特にインスリン抵抗性との関連性が示唆されている。例えば、心機能異常がない症例において、インスリン抵抗性の存在は心不全発症の危険因子となりうること、また、インスリン感受性の低下している群において、20年後の心不全の発症率が高いことなども示されている。これらの臨床データは、インスリン抵抗性の発現が心不全の発症に先んじており、単に心不全に伴っている訳ではないことを示している。報告によると、心筋組織におけるインスリン抵抗性が、心不全に伴う心筋代謝異常の病態において重要な役割を果たしており、心不全発症進展に関わっているとされている。最近では、不全心において、インスリンシグナルが活性化されており、このような過剰なシグナルが心機能異常に関与しうることも報告されている。

逆に、心不全が全身性のインスリン抵抗性を惹起することを示唆するデータも存在する。インスリン感受性の低下や糖代謝異常が認められる割合は、心不全の患者群で有意に高いことが示されている。また、心不全の存在は、将来的な糖尿病の発症を予測しうることも示されている。しかしながら、心不全とインスリン抵抗性が相互に関与し合う分子機序については、明らかになっていない。

心不全とインスリン抵抗性について調べるために、我々は2つの心不全モデル（圧負荷モデルと急性心筋梗塞モデル）を用いた。

両心不全モデルにおいて、インスリン感受性の低下や耐糖能異常が認められ、それらの異常には、脂肪組織における炎症性サイトカインの発現亢進やマクロファージの浸潤といった炎症形質を伴っていた。これらの炎症や代謝異常は、TNF- α に対する中和抗体による治療によって一部改善を認めたことから、心不全による脂肪組織の炎症亢進が、全身性のインスリン抵抗性の発症に関与しているものと考えられた。

CT などによる解析により、心不全によって脂肪組織の脂肪融解が亢進していることが観察された。このような心不全に伴う脂肪融解には、交感神経系の活性化が重要であると考えられているが、実際我々の心不全モデルにおいても、脂肪組織のノルアドレナリン濃度の上昇と遊離脂肪酸レベルの増加が確認された。過剰な遊離脂肪酸は p53 を活性化すること、脂肪組織における p53 の活性化は炎症を惹起することなどが報告されている。そこで、我々の心不全モデルにおいて p53 の発現レベルをみると、心不全誘導後に脂肪組織における p53 が活性化されていること、マクロファージの浸潤や炎症性サイトカインの発現が亢進し、インスリン抵抗性が惹起されていることが観察された。これらの代謝異常や炎症性の亢進は、脂肪特異的 p53 欠失マウスでは認めなかったことから、心不全に伴うインスリン抵抗性の発症には、p53 依存性脂肪老化とそれに伴う炎症性の亢進が関与していることが明らかとなった。

心不全モデルにおける交感神経系の活性化と p53 依存性脂肪老化の関連性について調べるため、脂肪組織に分布する交感神経の切断後による効果について検討した。その結果、心不全誘導による脂肪組織の交感神経系の活性化は抑制され、脂肪融解は抑制された。さらに、脂肪における p53 の活性化とサイトカイン発現亢進などの炎症も抑制され、糖代謝異常の改善が認められた。薬理的な交感神経系遮断によっても同様の効果が認められたことから、脂肪融解が p53 活性化に重要であることが示唆された。

さらにその重要性について検証するため、マウスに脂肪融解抑制薬を投与し心不全を誘導した。その結果、心不全に伴う脂肪融解は抑制され、p53 活性化とそれに伴う脂肪炎症やインスリン抵抗性などの代謝異常が改善した。逆に、ベータアゴニストによって脂

肪融解を促進すると、脂肪組織における p53 活性化と炎症亢進の形質が認められた。脂肪融解を制御するリパーゼ欠失によって、ベータアゴニストによる脂肪融解は抑制され、p53 活性化も抑制されたことから、交感神経系活性化による脂肪融解と p53 依存性脂肪老化・炎症には密接な関連があると考えられた。

次に、脂肪組織における p53 活性化と心機能異常の関連性について検証した。その結果、脂肪特異的 p53 欠失は、心不全に伴う代謝異常を改善するだけでなく、慢性期の心機能異常や生存率を改善した。このような改善は、心不全誘導後に p53 阻害薬を脂肪組織に投与することによっても観察された。さらに、交感神経切断や薬理的交感神経遮断によっても、心不全誘導後の心機能は改善した。以上の結果より、p53 依存性脂肪老化制御は新たな心不全の治療標的となりうることが示された。

これまでのマウスモデルの結果から、過剰な遊離脂肪酸が p53 活性化に関与していることが予想される。そこで、次に培養脂肪細胞に対するパルミチン酸の影響について調べることにした。パルミチン酸によって培養細胞を処理すると、活性酸素種の蓄積と、それに伴う DNA 損傷や p53 の活性化が認められた。これらの変化は、抗酸化剤による処理によって抑制された。また、パルミチン酸によって誘導される p53 活性化に伴い NF- κ B の転写活性の亢進とその標的遺伝子である炎症性サイトカインの発現亢進がみられた。これらの炎症性変化は、p53 活性阻害や NF- κ B の転写活性阻害によって改善した。DNA 損傷は、心不全モデルにおける脂肪組織においても認められた。また、NF- κ B の転写活性の亢進も心不全モデルにおける脂肪組織において認められたが、脂肪特異的 p53 欠失によって抑制されたことから、心不全による p53 依存性脂肪老化が NF- κ B の転写活性化を介して炎症性の亢進と代謝異常を引き起こしているものと考えられた。

本研究によって我々は、心不全が脂肪における p53 活性化とそれに伴う炎症性の亢進によって全身性のインスリン抵抗性を惹起していることを明らかにした。p53 の活性化には、交感神経系の活性化による脂肪融解が重要な役割を果たしていた。このような代謝異常は、心不全における心機能低下を促進することから、心不全とそれに伴う代謝異常には

悪循環の機序が存在し、p53 依存性脂肪老化制御が心不全の新たな治療標的となりうることを示している。興味深いことに、非選択的なベータアンタゴニスト（脂肪融解に関与するベータ 3 阻害を含む）は、心筋特異的なベータ 1 アンタゴニストによる治療より心不全の予後を改善すること、また糖尿病発症を抑制することが大規模臨床試験によって明らかとなっている。また、心不全モデル動物において、インスリン抵抗性改善薬はその心機能を改善すること、逆に、インスリン強化療法は糖尿病患者の心不全発症率を増加させることなどが報告されている。これらの知見は、心不全治療における脂肪老化制御の重要性を示唆しており、今後更なる検証が必要であると考えられた。

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 94 件）

英文論文 16 件（すべて査読あり）

1. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Nemer M, Komuro I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. **Hypertension**. 2012; 59: 627-633. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175208
2. Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Ito T, Zechner R, Komuro I, Kobayashi Y, Minamino T. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. **Cell Metab** 2012; 15: 51-64. DOI 10.1016/j.cmet.2011.12.006
3. Wu X, Zou Y, Zhou Q, Huang L, Gong H, Sun A, Tateno K, Katsube K, Radtke F, Ge J, Minamino T, Komuro I. Role of JAGGED1 in arterial lesions after vascular injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2011; 31: 2000-2006. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.225144
4. Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, Komuro I. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. **Circulation** 2010; 122: 891-899. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.935296
5. Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, and Komuro I. ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. **J. Mol. Cell Cardiol**. 2010; 49:113-20. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.03.020
6. Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu M, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. **Circ Res** 2010; 106 :1692-1702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214346
7. Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED and Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload. **J Clin Invest** 2010; 120 :1506-1514. DOI: 10.1172/JCI40096.
8. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I. Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. **Circ. Res.** 2010; 106: 391-398. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210815
9. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. **Nat. Med.** 2009; 15: 1082-1087. DOI: 10.1038/nm.2014

10. Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H and Komuro I. Cardiac 12/15-lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. **J. Exp. Med.** 2009; 206: 1565-1574. DOI: 10.1084/jem.20082596
11. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y and Komuro I. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. **Circ Cardiovasc Intervent** 2009; 2: 245-254. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.799361
12. Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Okada S, Moriya J, Komuro I. Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2009; 29: 889-894. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.185694

和文論文 78 件 (すべて査読なし)

13. 南野 徹 (2011) 心不全と炎症. 日本薬理学会雑誌 138: 187-191.
14. 南野 徹 (2011) 脂肪老化とインスリン抵抗性. 日本老年医学会雑誌 48, 123-126.
15. 小笠原陽子, 南野 徹 (2010) 老化と酸化ストレス. **Heart View** 14, 74-78.
16. 南野 徹 (2010) 心血管老化のメカニズム. **循環器専門医** 18, 11-17.
17. 南野 徹 (2010) 老化分子としての p53 と生活習慣病. **実験医学** 28, 383-389.
18. 南野 徹 (2009) アンジオテンシン II. 高血圧 (上) 第 4 版 日本における最新の研究動向. **日本臨床** 67, 179-183.

[学会発表] (計 100 件)

招聘講演 39 件

1. Minamino T. Cellular aging and lifestyle-related disease. 7th Japanese-German Frontiers of Science Symposium Potsdam, Germany 2010/11/11-14
2. Minamino T. Aging signals involved in

glucose homeostasis JST Danish-Japanese Workshop "Molecular Diabetology" Copenhagen, Denmark 2010/03/23-24

国際学会発表 24 件

3. Minamino T. Vascular aging and vascular injury: synonymous or analogous? 20th World Congress of the International Society of Heart Research 2010/5/13-16.

国内学会発表 37 件

4. Minamino T. Lifespan regulatory system and cardiovascular disease 第 76 回日本循環器学会・学術集会 Topics 福岡 2012/3/16-18

[図書] (計 13 件)

森谷純治, 南野徹 II. 疾患の病因と病態, 1. p53 と生活習慣病, **Annual Review 循環器** 2011, 山口徹編, 中外医学社, 東京, 60-65.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 糖尿病の治療剤

発明者: 南野徹、森谷純治

権利者: 千葉大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-232400

出願年月日: 2010 年 10 月 15 日

国内外の別: 国内出願

○取得状況 (計 1 件)

名称: 抗ノッチ 1 アゴニスト抗体を含む組織再生治療剤及び該抗体を使用する組織再生治療方法

発明者: 南野徹、舘野馨、八木田秀雄

権利者: 千葉大学

種類: 特許権

番号: 特開 2012-056934

取得年月日: 2012 年 3 月 22 日

国内外の別: 国内公開

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野 徹 (MINAMINO TOHRU)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 90328063

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし