

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20844

研究課題名（和文）ヒト老化モデルの小胞体ストレスを介した老化促進機序の解明

研究課題名（英文）Role of endoplasmic reticulum stress on accelerated aging in the progeroid Werner syndrome.

研究代表者

金子 ひより（Kaneko, Hiyori）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80960799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：トランスクリプトーム解析ではウェルナー（WS）線維芽細胞で各種コラーゲンや小胞体に関する遺伝子発現が上昇していることを発見した。折りたたみ不全蛋白質の蓄積が小胞体ストレスをもたらしている可能性を考え、変性コラーゲンを蛍光色素で定量化したところ、WS線維芽細胞で蓄積を認めた。また、複数のWS患者の皮膚組織を電子顕微鏡で観察したところ、生体内におけるWSの小胞体ストレスの指標となる小胞体の拡張を認めた。さらに、蛋白質の正しい折りたたみを助け、小胞体ストレスを抑制する Tauroursodeoxycholic acidをWS- iPS細胞由来間葉系幹細胞に投与したところ、細胞増殖も改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々はWSでは小胞体ストレスが亢進し、一般高齢者にも共通している可能性や、その抑制により、細胞および個体老化を抑制することを見出してきた。本研究ではWSの小胞体ストレスの上流にある折りたたみ不全蛋白の一因を突き止め、WSでは、酸化ストレスが亢進し、その抑制により小胞体ストレスが抑制されることを発見した。

WSはヒト老化モデルとして知られており、小胞体ストレス亢進の機序解明、その抑制は一般老化においても新たな治療戦略となり得る。

研究成果の概要（英文）：In our transcriptome analysis, we found that Werner (WS) fibroblasts have elevated gene expression for various collagen and endoplasmic reticulum-related genes. Considering the possibility that the accumulation of unfolded proteins may result in endoplasmic reticulum (ER) stress, we quantified denatured collagen with fluorescent dyes and found accumulation in WS fibroblasts.

In addition, electron microscopy of skin tissues from several WS patients showed expansion of the endoplasmic reticulum, an indicator of ER stress in WS in vivo.

Furthermore, treatment of WS- iPS cell-derived mesenchymal stem cells with Tauroursodeoxycholic acid, which aids in correct protein folding and suppresses ER stress, also improved cell proliferation.

研究分野：老化

キーワード：ウェルナー症候群 小胞体ストレス 細胞老化 異常蛋白 化学シャペロン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、老化のメカニズム解明は重要な課題である。

ウェルナー症候群(以下、WS)は RecQ 型ヘリカーゼファミリーの変異によって生じる遺伝性早老症である。思春期以降に白内障、糖尿病、動脈硬化、悪性腫瘍などの種々の老化症状が出現するため、ヒト老化のモデル疾患として注目されている。近年、小胞体ストレスは、多くの加齢関連疾患に関与していることが報告されている(G. Martínez, Aging cell. 2017)。蛋白質恒常性の破綻は老化を特徴づける Hallmarks の一つと捉えられている(López-Otín C. Cell. 2013)。折りたたみ不全蛋白質が蓄積することにより生じる小胞体ストレスは、健常人における白内障、糖尿病、動脈硬化、悪性腫瘍などの老化関連疾患発症に繋がると考えられている(Lindholm D. Front Cell Dev Biol. 2017)。また、他の遺伝性早老症であるコケイン症候群やハッチンソン・ギルフォード症候群においても小胞体ストレスの亢進が報告されており(Alupe MC. Cell Rep. 2018; Hamczyk MR. EMBO Mol Med. 2019)、小胞体ストレス亢進は早老症に共通する病態である可能性がある。

WS の早期老化徴候と小胞体ストレスの関わりを解明するため、申請者らはこれまでに、以下の予備的データを得ている(全て未発表データ)。

- (1) 健常線維芽細胞への小胞体ストレス誘導により細胞老化が促進する。
- (2) 蛋白質の正しい折りたたみを促進し、小胞体ストレスを抑制するTUDCA (Tauroursodeoxycholic acid) はWS患者由来線維芽細胞(以下、WS線維芽細胞)の早期細胞老化を抑制し、WSモデル線虫の寿命を延長させる。
- (3) 健常者由来線維芽細胞でも同様にTUDCAは細胞老化を抑制し、野生型線虫の寿命を延長させる。
- (4) 一般高齢者の末梢血単核球でもWSと同様の小胞体ストレス亢進を認める。

これらの結果から、小胞体ストレスはWS の早期老化を促進し、一般老化にも共通する病態であることが予想される。しかし、定常状態におけるWS の小胞体ストレスの評価は不十分であり、その機序も未解明である。

## 2. 研究の目的

以上の背景より、本研究ではWSの老化促進フェノタイプと、折りたたみ不全蛋白質がもたらす小胞体ストレスとの関連を解明する。WSの定常状態における小胞体ストレスの評価、折りたたみ不全タンパク質の解析、小胞体ストレス亢進の機序解明を行い、その知見に基づく治療開発や、一般老化への治療応用を目指す。

## 3. 研究の方法

健常者およびWS線維芽細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い、小胞体ストレス関連経路及びタンパク質の発現プロファイルを明らかにした。次に異常タンパク蓄積の詳細を明らかにするため、健常者由来線維芽細胞およびWS来線維芽細胞を蛍光色素で標識し変性コラーゲンの有無を比較した。また、定常状態におけるWSの生体内での小胞体ストレスの蓄積を明らかにするため、健常者とWS患者2名の皮膚組織を電子顕微鏡で観察し、各々の小胞体面積の平均を比較した。

次に酸化ストレスはタンパク質の折りたたみ不全の原因となることが知られているが、定常状態においてDNA酸化ストレスの指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)をWS線維芽細胞で定量し、酸化ストレスを評価した。また、酸化ストレス抑制剤であるascorbic acidの投与により、小胞体ストレスや細胞老化が抑制されるかをqPCRにより評価した。最後に組織による

小胞体ストレスの影響を評価した。まず、健常者、WS患者由来、およびWSの原因遺伝子であるWRNを修復したiPS細胞をそれぞれ筋芽細胞に分化誘導し、トランスクリプトーム解析で評価した。次にWS患者由来iPS細胞を間葉系幹細胞に分化させ、TUDCAを投与し、細胞増殖を評価した。

#### 4. 研究成果

折りたたみ不全蛋白質の発現プロファイルを解析するためウェルナー線維芽細胞のトランスクリプトーム解析を試行した。パスウェイ解析ではウェルナー線維芽細胞では健常者と比較して、小胞体および小胞体膜、タンパク質の輸送や消化に関わるゴルジ体、リソソームに関連する遺伝子群の上昇を認めた。また、COL4A1, COL4A2を始めとする、計8種のコラーゲンの遺伝子発現の上昇を認めた。これらの結果からウェルナー線維芽細胞では変性コラーゲン、すなわち折りたたみ不全タンパク質が小胞体ストレスをもたらしているのではないかと考えた。そこで、コラーゲンの変性箇所に特異的に結合する試薬を用い、蛍光色素で標識し変性コラーゲンの有無を比較したところ、健常者と比較し有意差をもって変性コラーゲンの増加を認めた。(P=0.0386)

次に健常者1名、WS患者2名の皮膚組織を電子顕微鏡で観察したところ、小胞体ストレスを示唆する小胞体内腔の液体貯留を認めたことに加え、生体内における小胞体ストレスの指標とされる、小胞体面積の拡張を有意差を持って認め(P<0.0001)、生体内においても小胞体ストレスが亢進していることが示唆された(図1)。

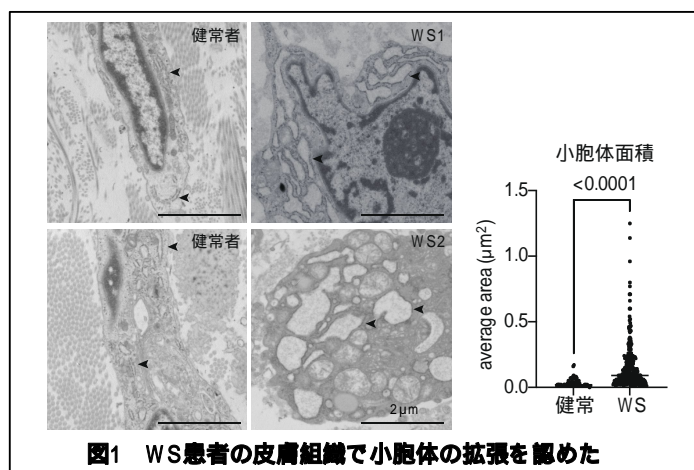


図1 WS患者の皮膚組織で小胞体の拡張を認めた

次に小胞体ストレスの原因の一つである酸化ストレスの評価を行った。すでに我々は健常者6名WS患者7名の線維芽細胞について、定常状態におけるDNA酸化ストレスの指標である8-OHdGを測定し、WS患者で有意差を持って上昇していることを明らかにしている。(P=0.044)そこで今回、ウェルナー

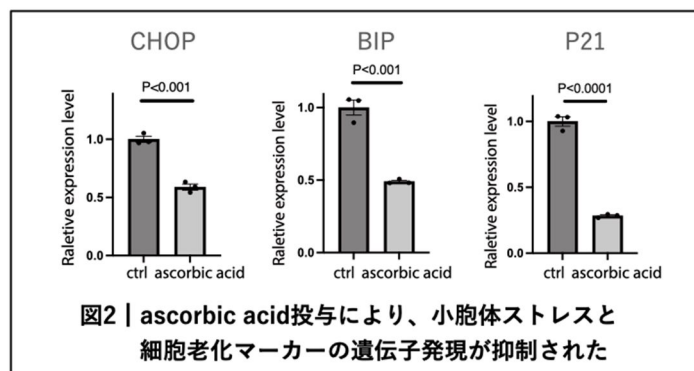


図2 | ascorbic acid投与により、小胞体ストレスと細胞老化マーカーの遺伝子発現が抑制された

線維芽細胞に酸化ストレス抑制剤である ascorbic acid 250 μM を4日間投与したところ、小胞体ストレスマーカーである CHOP, BIP, ATF4 の遺伝子発現と、老化マーカーである p21 が有意差を持って抑制された(図2)。(P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.0001) また、SA-β-gal 染色は、一般的に細胞老化の指標とみなされるが ascorbic acid 投与により、SA-β-gal 染色陽性率の低下を認めた。(P=0.0073)

次に別組織でもWSの小胞体ストレス亢進が共通するか評価するため、WS患者由来iPS細胞を筋芽細胞に分化誘導し、トランスクリプトーム解析で評価したところ、パスウェイ解析では健常者・WRN修復iPS細胞由来筋芽細胞と比較し、WS筋芽細胞で、シャペロン(タンパク質の正しい折りたたみを誘導するタンパク質)を介したタンパク質の折りたたみやタンパク質の折りたたみに関する経路などを始めとした、小胞体に関わる複数の経路の低下を認めた。一方で細胞外基質や蛋白

質の代謝・吸収に関わる経路はWSで亢進していた。これらの結果から、WS患者由来iPS細胞を間葉系幹細胞に分化させ、分子シャペロンであるTUDCAを投与したところ、細胞増殖の改善を認めた。

これまで、健常者由来線維芽細胞において、小胞体ストレス促進で細胞老化が促進され、その抑制で細胞老化が抑制されることが報告されていた(Druehle C, Oncotarget. 2016)。しかし、個体の老化における小胞体ストレスの役割については、不明な点が多かった。申請者らは、WSで小胞体ストレスが亢進し、細胞老化促進することを明らかにした。また、小胞体ストレス亢進は一般高齢者にも共通する病態であること、その抑制は細胞老化のみならず、個体老化を抑制し、野生型線虫にも有用であることを世界で初めて明らかにしてきた。

小胞体ストレス抑制を新たな治療開発へ応用するため、本研究では WS の小胞体ストレス亢進の機序解明に着目した。その結果、ウェルナー線維芽細胞では折りたたみ不全蛋白が蓄積している可能性が考えられ、その一部は異常コラーゲンであることが明らかになった。ウェルナー線維芽細胞で酸化ストレスが亢進し、その抑制により小胞体ストレス、細胞老化が抑制されたことから、酸化ストレス阻害も今後の有用な治療戦略となりうると考えられた。

さらに WS-iPS 細胞由来筋芽細胞の解析から WS では分子シャペロンを介した蛋白質の正しい折りたたみを促す経路が低下していることが明らかとなった。今回、ウェルナー線維芽細胞に加え、WS-iPS 細胞由来間葉系幹細胞においても分子シャペロンである TUDCA の投与により細胞増殖が改善したことから、折りたたみ不全蛋白の抑制は、ヒト老化のモデル疾患である WS の複数の組織に有用であり、今後の WS、さらには一般老化においても新たな治療応用が期待できる。

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 0件 / うち国際学会 1件）

1．発表者名 金子ひより，加藤尚也，前澤善朗，大内靖夫，高山直也，岩間厚志，江藤浩之，横手幸太郎
2．発表標題 小胞体ストレスが早老症ウェルナー症候群の老化促進に与える影響の解明
3．学会等名 第64回日本老年医学会学術集会
4．発表年 2022年

1．発表者名 Hiyori Kaneko, Hisaya Kato, Yoshiro Maezawa, Yasuo Ouchi, Naoya Takayama, Atsushi Iwama, Koji Eto, Koutaro Yokote
2．発表標題 Role of endoplasmic reticulum stress on accelerated aging in the progeroid Werner syndrome
3．学会等名 IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023（国際学会）
4．発表年 2023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
---------	---------