

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282027

研究課題名(和文) 老化関連疾患の予防効果が期待される機能性食品成分の評価系構築とその応用

研究課題名(英文) Development and application of a reporter bioassay system to screen for phytochemicals mimicking the anti-aging effects of caloric restriction

研究代表者

千葉 卓哉 (CHIBA, Takuya)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物に与える餌のカロリーを適度に制限すると、その動物は老化に伴って発症率が増加するガンなどの疾患の発症が抑制され、寿命も延長することが知られている。このカロリー制限による寿命延長効果の分子機構を明らかにし、実際に食事の量を制限することなく、その抗老化作用を発揮できるカロリー制限模倣物を探索する実験系の構築とその応用に関する研究を行った。研究成果により、抗老化作用に重要と考えられる遺伝子群と、その発現を調節する因子を複数同定した。また、アミノ酸の一種であるタウリンが、酸化ストレスを抑制することなどを通じてカロリー制限模倣物の候補になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Caloric restriction (CR) without malnutrition in normal mice, and suppression of the GH/IGF-I axis in spontaneous mutant Ames dwarf (DF) mice, extend lifespan and delay the onset of various age-dependent disorders. Combined, these two lifespan-prolonging interventions have an additive effect in DF mice. We aimed to identify the intracellular signaling pathways mediating these effects, and to develop a system to screen anti-aging phytochemicals both in vitro and in vivo. We identified HNF-4 alpha and Nrf2, important transcription factors involved in glucose and lipid metabolism and oxidative stress resistance, respectively, might critical regulators for longevity gene regulations. We also found that taurine could mimic the anti-aging effects such as increased oxidative stress resistance. These results indicate that our bioassay system would be useful to screen for chemicals, which mimic the beneficial effects of CR without actual food restriction.

研究分野：基礎老化学、実験病理学、食生活学

キーワード：老化 カロリー制限 酸化ストレス 脂質代謝 機能性食品 転写因子 がん 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

老化はガンや生活習慣病、神経変性疾患などの主要な発症リスクの一つである。したがって老化を制御することができれば、これらの疾患の発症を遅延、または抑制することができる。実験動物をもちいた研究では、インスリン/インスリン様成長因子-I (insulin/IGF-I) シグナル系の分子機能を改変することで、老化の制御が可能となっている。また、多くの生物種において食餌カロリーを制限すること (Calorie Restriction; CR) は、上記の老化関連疾患の発症を遅延させ、寿命を延長させる最も確実な介入方法として知られている。カロリー制限による抗老化作用にも、インスリンシグナル系の関与が示唆されていることから、このシグナルを標的とした、高等生物における老化制御機構の解明が、現在世界中で盛んに行われている。

我々が同定した遺伝子発現の調節配列 (DFCR-RE) の活性化は、抗老化作用をもつと示唆される遺伝子群の発現を亢進させる。また、タンパク質の品質管理に重要なオートファジー制御による神経細胞死の抑制や、転写因子 Foxo の活性化による腫瘍の抑制にもこの調節配列を介したシグナル系が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

近年、蛍光および発光タンパク質の発見とその改良や、CCD カメラの性能の向上によって、動物や細胞が生きのまま生体分子の活動を可視化する生体光科学が急速に進歩した。調節配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子等のレポーターをもつトランスジェニック (Tg) マウスや安定的発現細胞株を作製することで、結合因子が不明であっても、レポーターの活性化、すなわち光量子を測定することでカロリー制限模倣効果の期待される分子の探索が可能であると考えられる。この方法を応用することで、老化疾患改善剤の探索やそのシグナル伝達系の解析が可能であることが示唆された。

2. 研究の目的

老化に伴って発症してくる疾患を予防する方法として、インスリンシグナルの抑制と食餌カロリー制限が知られている。しかしそのメカニズムは不明な点が多い。申請者は、その抗老化作用の発揮に重要と示唆される特異的調節配列を同定した。この配列に結合する転写因子は、疾患予防に関わる遺伝子発現を調節する、情報統括の役割をもつと考えられる。本研究では、この配列の活性化の様子をレポーターアッセイシステムと組み合わせることで、*in vitro* および *in vivo* においてリアルタイムでモニタリングできるシステムを構築することを目指した。さらに、これまでに同定されている機能性食品成分の老化疾患改善剤としての再評価、および化合物ライブラリーのスクリーニングによる新規物質の単離を目指して研究を行った。

さらに、同定した分子の作用機構の解明を通じて、その抗老化作用の科学的基盤を築き、人々の健康増進に寄与する成果を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験系の構築 (*in vitro* および *in vivo* スクリーニング系の開発) : 抗老化物質を同定するためにレポータープラスミドを構築した。このプラスミドをトランスフェクションにより導入した安定的発現細胞株の樹立、およびスクリーニングとストレス応答解析を行った。また、このレポーターを導入したトランスジェニックマウスを2系統樹立し、スクリーニングを行った。細胞株については改良型レポーターの構築と細胞株の樹立を行い、その表現型解析を行った。

(2) 検証 (実験系が機能するかを既存の候補分子をもちいて検証した)

① *in vitro* 検証: 構築した細胞株を利用し、候補分子を培養液中に濃度、処理時間を変化させて添加し、レポーターの活性化についてルミノメーターをもちいて定量した。

② *in vivo* 検証: トランスジェニックマウスに8週間、複数の候補分子を食餌に混ぜて摂取させ、非投与群と比較してレポーターを有意に活性化させる候補分子を探索した。

(3) 調節配列結合因子の同定 (抗老化遺伝子発現制御に関わる分子の同定) : 抗老化遺伝子調節配列 (DFCR-RE) の末端をビオチン標識した DNA プローブをもちいて、マウス肝細胞核抽出タンパク質と結合反応を行い、相互作用する因子の探索を行った。

(4) タウリンの抗老化作用の関する解析 : 添加量の異なるタウリン食を SD ラットに 4 週間与え、基礎的な代謝パラメーターおよび肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変化を解析した。また C57BL/6 マウスにタウリン食を 12 週間与え、3-ニトロプロピオン酸 (3NPA) によって誘導される酸化ストレスに対する耐性、およびストレス応答遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 実験系の構築 : 安定的発現細胞株を樹立し、複数のカロリー制限模倣物の候補分子を同定した。老化関連遺伝子であるサーチュインの阻害剤によってレポーターの活性が低下したことから、このスクリーニング系はサーチュイン活性化剤のスクリーニングにも利用可能であることが示唆された。改良型レポーターを組み込んだ細胞株も複数樹立した。これらの細胞は紫外線や過酸化水素処理などの酸化ストレスの誘導によってレポーターが活性化されることが示唆された。

(2) 検証 : *in vivo* 検証において、レポーターを活性化した物質が実際に酸化ストレス耐性を増強させることが示唆された。マウスの肝臓における細胞内シグナル伝達系の解析結果から、インスリンシグナル系を介して

転写因子である Nrf2 を活性化することが、ストレス耐性に関与している可能性が示唆された。

(3) 調節配列結合因子の同定：レポーターアッセイ系をもちいた *in vitro* での転写調節因子の解析結果からも、酸化ストレス耐性に関与する Nrf2 の関与が示唆された。サーチインによるレポーターの活性化も示唆されたことから、これらのシグナル伝達系に関与する分子群が、本研究で構築したスクリーニング系をもちいて探索できる可能性が示唆された。

(4) タウリンの抗老化作用に関する解析：これまでの報告通り、血清総コレステロール濃度、肝臓のコレステロールおよびトリグリセリド濃度は、対照群に比べてタウリン添加食を与えた SD ラットで低下した。脂肪酸合成に関与する FAS の発現は、タウリンの添加量依存的に低下した。一方、脂肪酸の β 酸化に関与する CPT-1a の発現は、タウリン添加量に依存して増加する傾向を示した。また、C57BL/6 マウスにタウリン食を与えた場合、タウリン添加食群では 3NPA 投与による体重減少率が対照群と比較して低下し、生存率も有意に上昇した。これらの結果は、タウリンが脂質代謝と抗酸化効果に影響を与えるカロリー制限模倣物として作用する可能性を示唆している。

(5) 総括：カロリー制限模倣物の探索は、世界中で行われている。独自の研究から得られた成果をもとにしたスクリーニング系の構築に成功したインパクトは大きく、さらに候補分子の単離とそのシグナル伝達系の一部を明らかにしたことの意義は大きい。今後は、企業との共同研究などを通じて候補分子のさらなる解析と、その生体調節機能を明らかにすることで、機能性食品の開発など成果の応用を目指した研究を行っていく。

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 7 件)

- ① Kim SE, Mori R, Komatsu T, Chiba T, Hayashi H, Park S, Sugawa MD, Dencher NA, Shimokawa I. Upregulation of cytochrome c oxidase 1 subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: Implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction. *AGE*, 2015 ;37(3):9787. DOI: 10.1007/s11357-015-9787-8.
- ② Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, Kim SE, Kawata T, Park S, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Mori R. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*. 2015,

14(4): 707-9.

DOI: 10.1111/accel.12340.

- ③ Kamohara R, Yamaza H, Tsuchiya T, Komatsu T, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Otabe S, Yamada K, Nagayasu T, Shimokawa I. Overexpression of the adiponectin gene mimics the metabolic and stress resistance effects of calorie restriction, but not the anti-tumor effect. *Exp Gerontol*. 2015, 64C: 46-54. DOI: 10.1016/j.exger.2015.02.011.
- ④ Okita N, Tsuchiya T, Fukushima M, Itakura K, Yuguchi K, Narita T, Hashizume Y, Sudo Y, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Chronological analysis of caloric restriction-induced alteration of fatty acid biosynthesis in white adipose tissue of rats. *Exp Gerontol*. 2015, 63:59-66. DOI: 10.1016/j.exger.2015.01.043.
- ⑤ Park S, Fujishita C, Komatsu T, Kim SE, Chiba T, Mori R, Shimokawa I. NPY antagonism reduces adiposity and attenuates age-related imbalance of adipose tissue metabolism. *FASEB J*. 2014, 28(12): 5337-48. DOI: 10.1096/fj.14-258384.
- ⑥ Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Sci Rep*. 2014, 4:4517. DOI: 10.1038/srep04517.
- ⑦ Chiba T, Dong K, Nishizono S, Shimokawa I. Mechanisms of lifespan extension and preventive effects of calorie restriction on tumor development: Possible link between central neuroendocrine system and peripheral metabolic adaptation. *J Phys Fitness Sports Med*, 2013, 2(3): 259-266. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/2/3/2_259/_article

[学会発表] (計 14 件)

- ① 千葉卓哉. ラットを用いた老化制御因子の探索. 日本基礎老化学会大会シンポジウム. 2015年10月31日. 東京都健康長寿医療センター (東京都・板橋区)

- ② 千葉卓哉、王梓、大畑佳久、熊谷真帆、芹澤慎一郎、西園祥子. カロリー制限の抗老化作用を模倣する物質としてのタウリンの可能性. 第2回国際タウリン研究会日本部会. 2016年3月5日~6日. アオッサ福井 (福井県・福井市)
- ③ Chiba T, Ohata Y, Wang Z, Serizawa S, Shimokawa I. Development and application of a reporter bioassay system to screen for phytochemicals mimicking the anti-aging effects of caloric restriction Pacificchem 2015, December 15-20, 2015, Honolulu (USA)
- ④ 千葉卓哉. カロリー制限による抗老化作用の分子機構. 日本食品免疫学会シンポジウム. 2015年10月15日~16日. 東京大学 (東京都・文京区)
- ⑤ 王梓、大畑佳久、熊谷真帆、芹澤慎一郎、千葉卓哉. 隔日給餌によるカロリー制限と六君子湯投与の組み合わせが酸化ストレス耐性に与える効果. 第2回時間栄養科学研究会. 2015年9月2日. 早稲田大学国際会議場井深大記念ホール (東京都・新宿区)
- ⑥ 王梓、大畑佳久、熊谷真帆、芹澤慎一郎、千葉卓哉. 六君子湯のカロリー制限模倣効果に関する解析. 第38回日本基礎老化学会大会. 2015年6月12日~13日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑦ 王梓、大畑佳久、熊谷真帆、芹澤慎一郎、千葉卓哉. 六君子湯投与によるグレリン濃度の上昇とカロリー制限模倣効果との関連. 第15回日本抗加齢医学会総会. 2015年5月29日~31日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ⑧ Chiba T, Ohata Y, Wang Z, Nishizono S, Shimokawa I. Development of a reporter assay system to screen for phytochemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction 12th Asian Congress of Nutrition, May 14-18, 2015, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑨ 千葉卓哉、大畑佳久、王梓、熊谷真帆、下川 功. カロリー制限による寿命延長作用におけるニューロペプチドYの役割:酸化ストレス耐性の増強による発ガン抑制効果との関連. 第37回日本分子生物学会. 2014年11月25日~27日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑩ Chiba T, Nishizono S, Shimokawa I. An essential role for neuropeptide Y in anti-aging effects of calorie restriction. 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, October 14-17, 2014, Istanbul (Turkey)
- ⑪ Chiba T, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in anti-aging effects of dietary restriction in mice. 2014 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and the 13th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, June 19-21, 2014, Jeju (Korea)
- ⑫ 千葉卓哉、下川 功. Neuropeptide Yは酸化ストレス耐性に関与しカロリー制限による寿命延長作用に重要である. 第8回臨床ストレス 応答学会大会. 2013年11月15日~16日. 松本文化会館 (長野県・松本市)
- ⑬ Chiba T, Tsuchiya T, Shimokawa I. Development of a reporter assay system to screen for chemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction IUNS 20th International Congress of Nutrition, September 14-20, 2013, Granada (Spain)
- ⑭ Chiba T, Tsuchiya T, Shimokawa I. Development of a bioassay to screen for anti-aging phytochemicals. 2012 International Society of Nutrition and Food Factor. Functional Foods congress, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, December 1-6, 2012, Kailua-kona (USA)
- [図書] (計 4 件)
- ① 千葉卓哉、コロナ社、はじめての老化学・病理学-人間科学のためのライフサイエンス入門-, 2016, pp. 174
- ② 千葉卓哉、大畑佳久、医歯薬出版、老化抑制および老化関連疾患治療薬としてのカロリー制限模倣物-その標的分子とシグナル伝達系-, 医学のあゆみ, 2015, 259(9), pp. 745-750
- ③ 千葉卓哉、下川 功、羊土社、カロリー制限模倣物、老化・寿命のサイエンス、実験医学、2013, 31(20), pp. 182-189
- ④ Shimokawa I and Chiba T. Elsevier, Food and longevity genes, Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population. 2013, pp. 61-70

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 卓哉 (CHIBA, Takuya)
早稲田大学・人間科学学術院・教授
研究者番号：40336152

(2) 研究分担者

樋口 京一 (HIGUCHI, Keiichi)
信州大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：20173156

(3) 研究分担者

西園 祥子 (NISHIZONO, Shoko)
崇城大学・生物生命学部・准教授
研究者番号：40336970