

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：33915

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293166

研究課題名(和文) 老化関連疾患のERストレス、自然免疫系からの解析とiPS細胞治療のモデル実験

研究課題名(英文) Age-related diseases analyzed by ER stresses and immune functions using murine models including iPSCs

研究代表者

磯部 健一 (isobe, ken-ichi)

名古屋女子大学・家政学部・教授

研究者番号：20151441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は老化に伴って発生する疾患の発生過程に関与する生体応答を細胞内ERストレス応答と免疫応答から解析し、疾患の防御から不可逆性変化の過程を解析しiPS細胞等自己由来細胞による治療をめざした。その結果、タバコに含まれるアクロレインによって発症するCOPDはERストレス応答が関与することを分子レベルで明らかにした。ERストレスで上昇するGADD34欠損マウスは老化に伴って肥満から糖尿病、脂肪肝、肝硬変を発症することを見出した。この発症にはマクロファージが関与するが、GADD34はインスリンシグナル伝達系に関与することを明らかにした。iPS細胞を様々な組織に分化させ、治療実験の基礎をつくった。

研究成果の概要(英文)：We intended to analyze age-related disease from the points of ER stresses and immune responses. Acrolein, which is abundant in cigarette smoke, and cooking emission, plays a major role in COPD. Acrolein induced the expression of GADD34 and acute inflammation in airways, which followed COPD. Acrolein-induced phosphorylation of eIF2 in GADD34-knockout epithelial cells by shRNA protected cell death by reducing misfolded protein-caused oxidative stress. We examine the effects of GADD34 on natural life span by using GADD34-deficient mice. We found that with age GADD34-deficient mice become obese, developing fatty liver followed by liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and insulin resistance. GADD34 suppresses insulin signaling in young mice. However, by aging macrophages in fat tissues work to induce insulin resistance. We succeeded to differentiate to various tissue cells from iPSCs established from aged mice, which may repair damaged tissues by age-related diseases.

研究分野：免疫学、老化学

キーワード：老化 GADD34 ERストレス

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめ、先進国は急速に高齢化社会に突入している。本研究では老化に伴って発生する様々な疾患の発生過程に関与する生体応答を解析し、その予防、治療を考えるマウスモデル実験を行う。老化のメカニズムを解明することは、老化に伴う様々な内的変化や、外的ストレスに対して私たち生体は細胞内レベル、細胞レベルの防御機構を持っている。私たちはこれまで GADD34/PPP1R15A に着目して、これに関連する蛋白質を探し出し、その機能解析を行ってきた(Zfp148; 2003 Nature Genetics, mTOR; 2011 BBRC 等)。また GADD34 が ER ストレスによる蛋白合成のシャットオフからの回避に働くことを遺伝子欠損マウスで報告してきた(2003; FASEB J)。老化によって生じる疾患が不可逆的变化に至る機構とそれを治療するため自己組織から iPS 細胞を作成する研究を前年度までの基盤研究で行ってきた。その中で、私たちは老化マウスを含む様々な年齢の B6 マウスから iPS 細胞を作成し (2011JMBC) この細胞が3胚葉系に分化すること、下肢虚血モデルで血管を新生すること(2010 BMC Cell Biol. 2012 Plos One)を報告してきた。

## 2. 研究の目的

本研究は老化に伴って発生する様々な疾患の発生過程に関与する生体応答を細胞内 ER ストレス応答と細胞間防御機構としての免疫応答から解析し、疾患の防御から不可逆性変化の過程とその治療としての自己由来細胞、特に iPS 細胞による治療をめざした。

## 3. 研究の方法

GADD34 遺伝子欠損マウスを使用して、GADD34 の発現を上昇させる可能性があるストレス刺激でマウスを刺激したり、細胞培養でストレス刺激物質を添加したりして、病態形成に与える影響を研究した。また、GADD34 遺

子欠損マウスを自然と老化させ、WT マウスと比較して、寿命の変化や疾病の変化が現れるか否かを検討した。特に ER ストレスに関しては eIF2 $\alpha$  のリン酸化や関連するストレスシグナル伝達系を検索した。GADD34 を上昇させるストレスシグナルで慢性炎症から発癌に関係する、LPS, アクロレイン、DEN, ADM といった刺激物質の実験では炎症、発癌過程を免疫学的、生化学的、組織学的に検索した。また、我々が開発した C57BL/6 由来 iPS 細胞 (GFP 陽性) を様々な組織細胞に分化させることで、炎症から組織不全となった組織の再生が可能かどうか検討した。

## 4. 研究成果

本研究においての最も重要と思われる発見は GADD34 遺伝子欠損マウスが老化に伴って、肥満、2型糖尿病、脂肪肝、肝硬変、肝癌を発症してくることである。2型糖尿病はインスリンシグナル伝達系が抑制されることで発症する(耐糖能異常)。この GADD34 遺伝子欠損マウスは若い時期にはむしろインスリンシグナルが亢進している。マウスにインスリン注射して、肝臓のインスリンシグナルを検索すると、pAKT のリン酸化、その下流シグナルが若い GADD34 遺伝子欠損マウスで亢進していた。インスリンシグナル伝達は脂肪細胞への分化を促進する。MEF や骨髄細胞を使用して、脂肪細胞の分化を検索すると、GADD34 遺伝子欠損マウスの方が WT マウスに比べて増殖分化が亢進していた。そのため、GADD34 遺伝子欠損マウスは脂肪沈着が進み、6ヶ月ころより肥満が進行し、脂肪肝も見られるようになってきた。肥満になった GADD34 遺伝子欠損マウスの脂肪細胞から TNF $\alpha$  が産生され、これが、インスリンシグナルを抑制するように働いた。このインスリンシグナルの年齢による逆転によって2型糖尿病、脂肪肝が発症することが判明した。若いマウスに高脂肪食を投与すると、GADD34 遺伝子欠損マウスはより肥

満と脂肪肝がみられ、高脂肪食投与後インスリンシグナルが逆転した (2015: Scientific Reports)。GADD34 がインスリンシグナル伝達系のどの分子に関与するか、インスリンシグナル伝達系が若い GADD34 遺伝子欠損マウスで亢進して、老化すると抑制される現象の分子レベルのメカニズム解明は今後の課題である。

GADD34 は アクロレイン、Diethylnitrosamine (DEN)、azoxymethane (AOM) といった発癌剤投与によって発現が上昇することを見出した。アクロレインはタバコ、脂肪の多い食品の高温料理の煙等に含まれ、長期の暴露で閉塞性呼吸器障害である Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) から、肺癌の原因物質である。アクロレインをマウスの鼻に添付することによって気道から肺に入る系を確立して、アクロレインによる炎症を解析した。アクロレインは肺に炎症を誘起し、活性酸素を放出し、肺胞を傷害した。GADD34 遺伝子欠損マウスでは炎症、活性酸素産生ともに抑制され、肺障害も減弱した。解析の結果、アクロレインは活性酸素を産生し、それによるミスフォールディング蛋白質によって eIF2 $\alpha$  のリン酸化が誘導されること、GADD34 がいないと eIF2 $\alpha$  のリン酸化により蛋白合成がシャットオフされることでミスフォールディング蛋白質によって肺が傷害を受けることが回避され、疾患の進行が止められることが判明した (2015: Oxid Med Cell Longev.)。亜硝酸ナトリウムはハム、ベーコン、ソーセージ、いくらといった食品のみためをよくする発色剤として、また、ボツリヌス感染を防ぐ意味でもよく使われる。亜硝酸ナトリウムとアミンが反応してニトロソ化合物ができる。その1つ DEN をマウスに投与した。DNE は肝臓細胞を傷害し、そこにクッパー細胞、マクロファージが浸潤して炎症が起こり、GADD34 が誘導された。DEN を繰り返し投与すると、慢性肝炎から肝

癌の発症が見られた。GADD34 遺伝子欠損マウスでは炎症が抑制されていて、肝臓がんの発生が低下していた。(2015 年 Cancer Immunol Immunother.)。さらに、azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS) をマウスに投与すると、腸に炎症が見られ、TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS/NOS2 の発現が上昇した。繰り返し投与すると、慢性炎症が見られ、IL-6/STAT3 経路を介して大腸がんが発生した。GADD34 遺伝子欠損マウスでは炎症が抑制されていて、大腸がんの発生が低下していた (2015 年 Br J. Cancer)。このように発癌剤は急性炎症を起こさせ、GADD34 を上昇させる。GADD34 を欠損させると急性炎症のレベルが低下する。GADD34 は PP1 と結合して酵素を脱リン酸化させる。これらの現象ではどの酵素の脱リン酸化に働いているかの詳細は今後の検討課題である。

絶食によってオートファジーが誘導され、自己の細胞内成分が分解されてアミノ酸等が再利用される。GADD34 は絶食によって発現が上昇し、ER ストレスを誘起し、mTOR を活性化し、オートファジーを誘導することを我々は報告している (2011: BBRC)。この実験では in vivo で食事を除去しているため、特定の栄養素の生体への影響が明らかでない。そこで、本研究では in vitro で栄養素特にアミノ酸の除去の GADD34 発現への影響を調べた。培養系 RAW264.7 細胞を使用してどのアミノ酸の除去で GADD34 が誘導されるかを調べた所、Tyr/Cys の除去で強く GADD34 が誘導されることが判明した。そこで、RAW264.7 細胞を Tyr/Cys の除去と同時に LPS で刺激し、RAW264.7 細胞の増殖、生存を調べた。すると、GADD34 の発現を RNAi で低下させた RAW264.7 細胞は一旦増殖し、アポトーシスによって死んでいった。一方、RAW264.7 細胞は GADD34 欠損細胞に比べ、アポトーシスが遥かに弱かった。同様に GADD34 遺伝子欠損マウス由来の骨髄由来マクロファージを Tyr/Cys の除去

と LPS 刺激したところ、GADD34 欠損マクロファージはアポトーシスで死ぬ割合が強かった。分子レベルで検索したところ、GADD34 は TSC 2 に結合して、脱リン酸化することが判明した。このことで、GADD34 遺伝子欠損マクロファージ、あるいは RNAi で発現を低下させた RAW264.7 細胞は増殖がより盛んになりいわゆる activation-induced cell death なることが判明した。WT マクロファージ、RAW264.7 細胞はこの処理によりオートファジーを誘導し、アミノ酸が供給されることで死を免れることが判明した (2015:Scientific Report)。老化関連疾患で、傷害された組織を自己由来 iPS 細胞で修復できるかを調べるために、老化マウス由来 iPS 細胞 (GFP+) を様々な組織に分化させ、C57BL/6 マウスに移植する実験を繰り返した。例えば、動脈塞栓症マウスに血管細胞に分化させた iPS 細胞を移植した場合、移植は確認できた。この場合、閉塞血管の前方より、新たな自己血管が再生してくる。iPS 細胞移植群は早期には血管新生による組織回復が速いが、時間が立つと、自己再生血管と組織回復が同等に近づく。実際の自己細胞移植の場合、自己再生ができない条件での精密な実験が必要になる。その場合、iPS 細胞再生の問題が最も重要と考えられた。

#### 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 21 件)

1 Okabe M, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Isobe K. Thymic Epithelial Cells Induced from Pluripotent Stem Cells by a Three-Dimensional Spheroid Culture System Regenerates Functional T Cells in Nude Mice. *Cell Reprogram*. 2015 Oct;17(5):368-75. doi: 10.1089/cell.2015.0006.

2 Nishio N, Isobe K. GADD34-deficient mice develop obesity, nonalcoholic fatty liver disease, hepatic carcinoma and insulin resistance. *Sci*

*Rep*. 2015 , 5:13519. doi: 10.1038/srep13519

3 Tanaka Y, Ito S, Oshino R, Chen N, Nishio N, Isobe K. Effects of growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34) on inflammation-induced colon cancer in mice. *Br J Cancer*. 2015 ,113(4):669-79. doi: 10.1038/bjc.2015.263.

4 Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Cheng Z, Ito S, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fujiya A, Suzuki H, Kito T, Hamada Y, Oiso Y, Isobe K, Nakamura J. *J Diabetes Res*. 2015;2015:257230. doi: 10.1155/2015/257230.

5 Chen N, Nishio N, Ito S, Tanaka Y, Sun Y, Isobe K. Growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) enhanced liver inflammation and tumorigenesis in a diethylnitrosamine (DEN)-treated murine model. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Jun;64:777. doi: 10.1007/s00262-015-1690-8.

5 Sun Y, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Chen N, Liu L, Isobe K. Enhancement of the Acrolein-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Lung Injury by GADD34. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:170309. doi: 10.1155/2015/170309.

6 Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Aiba K, Thanasegaran S, Nishio N, Isobe K. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Sci Rep*. 2015;5:8327. doi: 10.1038/srep08327.

7 Isobe K, Cheng Z, Nishio N, Suganya T, Tanaka Y, Ito S. (Review) iPSCs, aging and age-related diseases. *N Biotechnol*. 2014 Sep 25;31(5):411-21. doi: 10.1016/j.nbt.2014.04.004.

8 Nishio N, Ito S, Isobe K. Loss of GADD34 induces early age-dependent deviation to the myeloid lineage. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(2):170-80.

9 Ito S, Tanaka Y, Nishio N, Thanasegaran S, Isobe K. Establishment of self-renewable

GM-CSF-dependent immature macrophages in vitro from murine bone marrow. PLoS One. 2013;8(10):e76943.doi:10.1371/journal.pone.0076943.

<sup>10</sup>Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. Sci Rep. 2013;3:1418. doi: 10.1038/srep01418.

<sup>11</sup>Okawa T, Kamiya H, Himeno T, Kato J, Seino Y, Fujiya A, Kondo M, Tsunekawa S, Naruse K, Hamada Y, Ozaki N, Cheng Z, Kito T, Suzuki H, Ito S, Oiso Y, Nakamura J, Isobe K. Transplantation of neural crest-like cells derived from induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. Cell Transplant. 2013;22(10):1767-83. doi: 10.3727/096368912X657710.

〔学会発表〕(計 28件)

<sup>1</sup> Nishio N, Isobe K. GADD34 works to suppress obesity and fatty acid-induced insulin resistance. 19th International Conference of FFC (Kobe) 平成 27 年 11 月 17-18 日

<sup>2</sup> Nishio N, Isobe K. GADD34 works to suppress obesity-induced metabolic disease including type 2 diabetes and NASH-2 第 38 回日本基礎老化学会大会、平成 27 年 6 月 12-14 日

<sup>3</sup> Chen N, Nishio N, Ito S, Sun Y, Tanaka Y, Isobe K. The involvement of growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) in the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma 第 43 回日本免疫学会学術総会、平成 26 年 12 月 10-12 日

<sup>4</sup> Nishio N, Ito S, Isobe K. GADD34 works to suppress obesity-induced non alcoholic steatohepatitis (NASH) by regulation of

insulin/IGF signaling.

第 43 回日本免疫学会学術総会、平成 26 年 12 月 10-12 日

<sup>5</sup> Oshino R, Ito S, Tanaka Y, Nishio N, Isobe K. The effects of GADD34 on LPS stimulation in mice. 第 43 回日本免疫学会学術総会、平成 26 年、12 月 10-12 日

<sup>6</sup> Tanaka Y, Ito S, Oshino R, Nishio N Isobe K. GADD34 promotes colon inflammation and tumorigenesis. 第 43 回日本免疫学会学術総会 平成 26 年 12 月 10-12 日

<sup>7</sup> Ito S, Oshino R Tanaka Y, Nishio N Isobe K. Establishment of macrophage stem-like cells from murine yolk sac. 第 43 回日本免疫学会学術総会、平成 26 年 12 月 10-12 日

<sup>8</sup> Sun Y, Ito S, Chen N, Tanaka Y, Liu L, Nishio N, Isobe K. Murine model of age-related COPD and lung defense system. 第 37 回日本基礎老化学会大会、平成 26 年 6 月 26-27 日

<sup>9</sup> Tanaka Y, Ito S, Oshino R, Nishio N, Isobe K. Effects of GADD34 to TLR signaling. 第 37 回日本基礎老化学会大会。平成 26 年 6 月 26-27 日

<sup>10</sup> Liu L, Nishio N, Ito S, Isobe K. Negative regulation of GADD34 on mofibroblasts during cutaneous wound healing. 第 42 回日本免疫学会学術総会。平成 25 年 12 月 11-13 日

〔図書〕(計 3件)

<sup>1</sup> 磯部健一；老化の生物学(石井直明、丸山直記編)化学出版平成 26 年 7 月

<sup>2</sup> Isobe K. Aging Mechanism. Springer.平成 27 年 8 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 健一 (ISOBE Ken-ichi)

名古屋女子大学・家政学部・教授

研究者番号：20151441

(2)研究分担者

伊藤佐知子 (ITO Sachiko)

名古屋大学・医学研究科・講師

研究者番号：70447845

西尾尚美 (NISHIO Naomi)

名古屋市立大学・医学研究科・研究員

研究者番号：80513457

大橋憲太郎 (OHASHI Kentaro)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50332953

祖父江元 (SOBUE Gen)

(平成25、26年分担研究者)

研究者番号：

長谷川忠男 (HASEGAWA Tadao)

名古屋市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10314014

(平成27年度より分担研究者)