

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860297

研究課題名(和文) カロリー制限によるFoxO1、FoxO3を介した抗がん・抗老化遺伝子群の同定

研究課題名(英文) Identify FoxO1 and FoxO3a target genes that relate to anti-neoplastic effect and the anti-aging effect of calorie restriction

研究代表者

小松 利光 (KOMATSU, Toshimitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・技術職員

研究者番号：70380962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2つの転写因子FoxO1とFoxO3aがカロリー制限(CR)による抗腫瘍効果と寿命延長効果を、それぞれ独立に制御している可能性があるが、標的遺伝子群はほぼ共通しており、特異的に制御されている遺伝子はほとんどわかっていない。両転写因子によってそれぞれ特異的に制御されるCRの抗腫瘍効果と寿命延長効果に関連する遺伝子群をマイクロアレイ解析により特定した。特にFoxO3a欠損はミトコンドリア関連遺伝子に影響を与えており、実際のCR下のFoxO3a欠損マウスのミトコンドリアの生理機能にも異常が観察された。このことはFoxO3aによるミトコンドリア制御がCRの抗老化効果に重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor, FoxO1 and FoxO3a, may regulate anti-neoplastic effect and lifespan extension effect of calorie restriction (CR), respectively. However, most of target genes of FoxO1 and FoxO3a are common, and the mechanisms that the specific target genes are regulated by each FoxOs are unknown. In this study, we identified the anti-neoplastic effect related genes and the lifespan extension effect related genes using microarray analysis that were regulated by FoxO1 and FoxO3a, respectively. Especially, FoxO3a knock down affected to the expression of mitochondria related genes. Actually, isolated mitochondria from FoxO3a KO mice under CR showed abnormal activity compared with the mitochondria from the wild type-CR mice. These results suggest that the regulation of mitochondria function by FoxO3a, not FoxO1, might be important for CR induced lifespan extension effect.

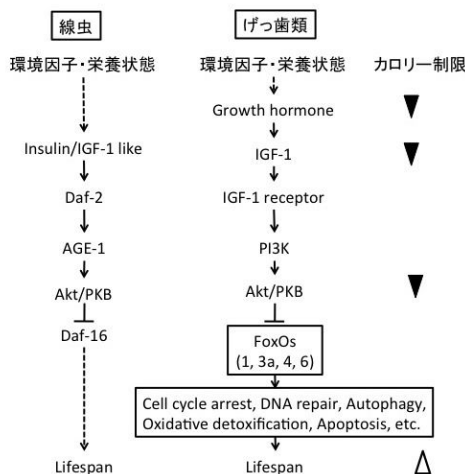
研究分野：老化学

キーワード：カロリー制限 抗老化 抗腫瘍効果 FoxO ミトコンドリア マイクロアレイ解析 肝臓

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の老化や加齢に伴う疾患の発症を抑制し、寿命を延長する最も単純で再現性の高い方法は、実験動物の摂食量(カロリー)を制限することである。1930年代からその効果は知られていたが、その分子メカニズムについては、いまだ不明な点は多い。センチュウを用いた研究によって、IGF-1(insulin-like growth factor-1)系シグナルが減弱し、長寿化する際にDaf-16(哺乳類ではFoxO)転写因子が必要であることが示された。CRマウスにおいても血中インスリン、IGF-1が低下する。またGH-IGF-1系抑制ラット、マウスともに寿命が延長することから、この経路はCRの効果の少なくとも一部分を担っていると考えられる(図1参照)。哺乳類のFoxO(Forkhead box O transcription factor)転写因子は、現在4分子(FoxO1, 3, 4, 6)が知られている。これまでの研究で、FoxO1, 3がヒトを含む哺乳類のがんや代謝疾患の発症に重要な役割を果たしていることが示されてきた。FoxO3遺伝子の多型と寿命との関連性も示唆されている。我々は、FoxO1ノックアウトマウス(ヘテロ、+/-)を用いた研究によって、FoxO1が50%程度低下した状態では、CRの寿命延長効果は保たれるが、腫瘍抑制効果は減弱することを示した(Yamazaki H et al. Aging Cell 2010)。一方、FoxO3ノックアウトマウス(ヘテロ、+/-)を用いた実験では、CRの腫瘍抑制効果は維持されるが、寿命延長効果は消失した(2012年度抗加齢医学会、シンポジウム発表)。この結果は、CRによる腫瘍抑制、寿命延長効果が、FoxO1とFoxO3によって個別に制御されていることを示している。我々のこの結果は、哺乳類の老化や寿命はこれまで想定されていた複雑な制御過程とは異なり、2つの転写因子に収束することを示唆してい

図1. CRの寿命延長メカニズム仮説



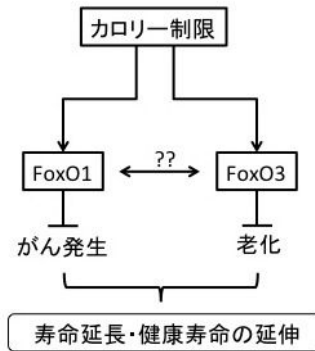
る(表1及び図2参照)。

近年、CRによる老化、寿命制御に関して、国際的には複数のタンパク質を脱アセチル化することによって老化を制御する脱アセチル化酵素 Sirtuin(哺乳類ではSIRT1-7の7分子)が注目されてきた。FoxO1,3とも細胞内シグナルによるリン酸化とアセチル化によってその転写活性が制御されることが知られている。よってFoxOに関する本研究は、Sirtuinを含む細胞内シグナルと遺伝子発現制御を連結させる点でも重要な意味を持つ。

表1: FoxOとCRの抗腫瘍、寿命延長効果との関係

	CRの抗腫瘍効果	CRの寿命延長効果
FoxO1 KO mice	✖	○
FoxO3a KO mice	○	✖

図2: CRの抗腫瘍・寿命延長効果は2つのFoxOに収束する?



FoxO1とFoxO3の標的遺伝子群はほぼ共通しており、どの遺伝子がCRによってisoform特異的に制御されているかほとんどわかっていない。そのため本研究では、まずCRを行ったFoxO1, FoxO3ノックアウトマウス組織を用いて、特異的に変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析によって同定する。CR-FoxO1 KOマウスで発現が変化する遺伝子群は抗腫瘍効果に、CR-FoxO3 KOマウスで発現が変化する遺伝子群は老化の抑制に、それぞれ関与していると予測できる。Gene set enrichment analysis法などのbioinformatics解析技術を用いて、これまでに蓄積された遺伝子発現データベースを解析することにより、これらの遺伝子群が意味するシグナル経路あるいは生理機能を予測することが出来る。また、本研究で使用するアジレント社のアレイは、遺伝子発現だけではなく近年注目されている非翻訳RNA(long intergenic noncoding RNAs;lincRNA)も解析することが出来る。lincRNAは細胞周期、免疫監視機構、転写調節などに関与すると言われていたが、その役割はまだ未知の部分が多い。2010年の報告には、HOTAIRと呼ばれるlincRNAが乳がんが高く発現してお

り、ヒストンの異常なメチル化、遺伝子発現、癌細胞の浸潤移転を引き起こすことが示された(Gupta RA, et al. Nature 2010)。この研究例では、マイクロアレイ解析を足がかりにして、lincRNA の発現ががんのエピゲノムを調節していることを明らかにしている。本研究においてもマイクロアレイ解析を足がかりに lincRNA と CR, FoxO 転写因子との関係を検索することによって、CR のがん抑制や抗老化作用における未知の制御機構の発見が期待できる。

2. 研究の目的

転写因子 FoxO1 と FoxO3a によってそれぞれ特異的に制御されるカロリー制限 (Calorie restriction, CR) の抗腫瘍効果と寿命延長効果に関連する遺伝子群をマイクロアレイ解析により特定し、Bioinformatics 解析により関連するシグナル経路を推測する。これにより、哺乳類のがんと老化の制御機構解析の分子基盤を構築する。また同時に、細胞周期、免疫監視機構、転写調節などに関与すると言われる非翻訳 RNA (long intergenic noncoding RNAs; lincRNA) と CR, FoxO との関連を解析することにより、CR のがん抑制、抗老化作用における未知の制御機構の発見を試みる。

3. 研究の方法

実験動物：カロリー制限(CR)は、生後 12 週齢から自由摂食群(AL)と比較して摂食量を 30%カットし安楽死させるまで与えた。マイクロアレイ解析には Wild type mice-CR(野生型は共通), FoxO1 hetero KO(HT)-CR, FoxO3 hetero KO(HT)-CR の 3 群を用いた。標的臓器には海馬と肝臓を用いた。

【実験 1】CR における FoxO1, FoxO3 特異的遺伝子群の同定：6 ヶ月齢で安楽死させた各マウスの凍結組織(n=3)から total RNA を抽出し、bioanalyzer による品質検証後に cRNA 合成し、Agilent 社のアレイを用いて WT-CR を対照群にした 1 色法にてマイクロアレイを行った。Ingenuity 社の iReport 解析サービスを利用してアレイデータを解析した。同定した遺伝子群は、リアルタイム PCR で発現量を定量して確認を行った。

【実験 2】ミトコンドリアの機能検証：アレイ解析の結果から、CR で FoxO3 特異的に変動する遺伝子群がミトコンドリアの機能に関係していることが示唆されたため、実際に FoxO3 の欠損がミトコンドリアの機能に影響を与えるか、細胞外フラックスアナライザーを用いて培養細胞及び単離ミトコンドリアの酸素消費量を測定した。

(1) 培養細胞系：SV40 hepatocyte に FoxO3a siRNA を遺伝子導入し、細胞外フラックスアナライザーと Mitostress test 試薬によるミトコンドリア機能解析を行った。

(2) 単離ミトコンドリア；10 ヶ月齢の野生型マウスの AL(WT-AL)と CR (WT-CR)、FoxO3 HT-AL と HT-CR マウスの肝臓を摘出し、ミトコンドリアを遠心法にて単離後、細胞外フラックスアナライザーでミトコンドリア呼吸鎖阻害剤および基質を適宜添加して酸素消費量を測定し、その機能を評価した(各群 n=3-4)。また、加齢変化によるミトコンドリアへの影響も検証するため、それぞれ 24 ヶ月齢の野生型マウスの CR(WT-CR old)、FoxO3 HT-CR、FoxO1 HT-CR マウスの肝臓を摘出し、ミトコンドリアを単離後に前述の方法と同様に細胞外フラックスアナライザーでミトコンドリアの機能を検証した(各群 n=3-4)。

4. 研究成果

【実験 1】

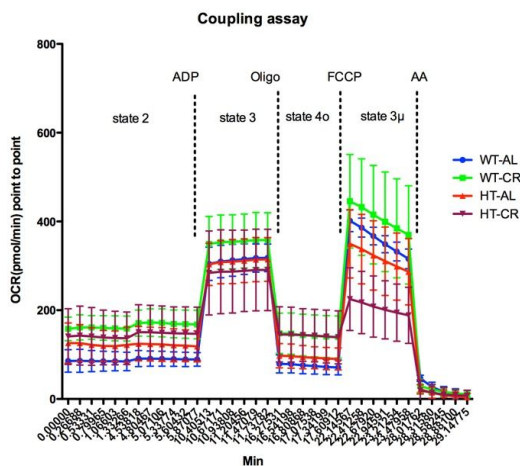
肝臓のマイクロアレイ解析の結果、野生型 CR (WT-CR) と比較して FoxO3 HT-CR で特異的に変動した遺伝子は 565 遺伝子、FoxO1 HT-CR 特異的に変動した遺伝子は 329 遺伝子、共通して変動した遺伝子は 97 遺伝子であった。海馬のマイクロアレイ解析では、WT-CR と比較して FoxO3 特異的に変動した遺伝子は 241 遺伝子、FoxO1 特異的に変動した遺伝子は 229 遺伝子、共通して変動した遺伝子は 55 遺伝子であった。これらの結果は、FoxO1 と FoxO3 でほぼ共通していると考えられている標的遺伝子群が、CR 条件下では FoxO の isoform 特異的に制御されることを示している。

- (1) 肝臓で FoxO1 特異的に変動する遺伝子群には、SREBP1 など脂質代謝やがんに関与する遺伝子が多く含まれていた。また、海馬では炎症、免疫、がんに関与する遺伝子群が変動していた。これらの結果は、CR による抗腫瘍効果には、FoxO1 によって特異的に制御される遺伝子群が関与しているという仮説を裏付けるものである。
- (2) 肝臓で FoxO3a 特異的に変動した遺伝子群の機能で特徴的なのは、ミトコンドリア、細胞増殖・分化、イオンチャンネルなど細胞内シグナルに関連する遺伝子群が挙げられた。FoxO3 と Myc は、ミトコンドリアの機能と細胞の増殖を互いに拮抗的に制御しているという報告や (Peck B et al., 2012)、老化の原因にミトコンドリアの生理機能の異常を挙げる報告 (Lopez-Lluch et al., 2008) もあることから、CR における FoxO3a 欠損がミトコンドリアの生理機能に異常をもたらす、細胞内のエネルギーバランスが変化し、活性酸素の増加や細胞

胞の老化促進などにより最終的に CR の寿命延長効果の消失につながっていると考えられた。この仮説に基づき、実際に FoxO3 の欠損がミトコンドリアの生理機能に影響を与えているか検証するため、次の実験を行った。

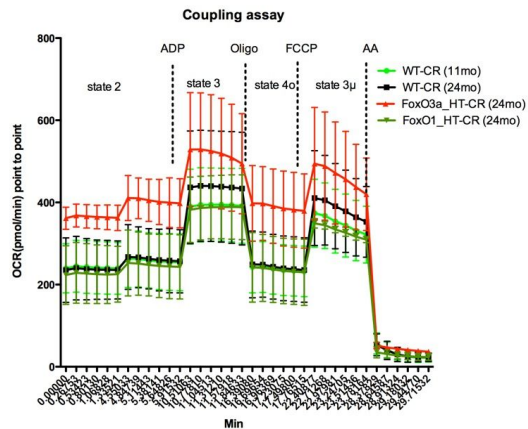
【実験 2】

- (1) SV40 hepatocyte に FoxO3a siRNA をトランスフェクションし、細胞外フラックスアナライザーでミトコンドリアの機能を検証した結果、対照群と比較して FoxO3a Knock down (KD) 細胞では基礎呼吸と最大呼吸におけるミトコンドリアの酸素消費量が有意に減少していた。これにより FoxO3 の欠損が培養細胞のミトコンドリア活性に異常をもたらすことを示した。
- (2) Coupling assay の結果(下図)、WT-CR マウスから単離したミトコンドリアは、全体に WT-AL マウスより酸素消費量が高く、ミトコンドリアの活性が高いことを示した。また、FoxO3 HT-AL マウスのミトコンドリア酸素消費量は、WT-AL と比較して差が見られなかった。しかし、FoxO3 HT-CR は最大呼吸 (state3 μ) における酸素消費量が、WT-CR と比較して有意に低く、また FoxO3 HT-AL と比較しても減少していた。これらのことから、FoxO3 の欠損が CR におけるミトコンドリアの活性に異常をもたらすことが明らかになった。



- (3) さらにミトコンドリアへの加齢の影響と FoxO3 と FoxO1 欠損の違いを検証するため、11 ヶ月齢の WT-CR、24 ヶ月齢の WT-CR old、FoxO3 HT-CR old、FoxO1 HT-CR old について、単離ミトコンドリアの Coupling assay により酸素消費量を測定した(右図)。WT-CR では加齢による有意な変化は観察されなかった。興味深いことに、FoxO3 HT-CR は WT-CR old よりも全体に高い酸素消費量を示した。また 11 ヶ月齢の FoxO3 HT-CR のパターンとも異なる

っており、FoxO3 の欠損がミトコンドリアの加齢への感受性を高め、ミトコンドリアの機能異常を強めた可能性がある。また、FoxO1 HT-CR は野生型と比較して有意な差は見られなかった。これは CR におけるミトコンドリアの機能への影響が FoxO3 特異的であることを示している。



【総括】

今回の研究で、それぞれ FoxO1 と FoxO3 が欠損することにより、CR において多くの遺伝子が FoxO1、FoxO3 特異的に変動することを示した。また、これらの遺伝子群は FoxO1 が抗がん、FoxO3 が抗老化関連遺伝子を制御するという仮説を裏付けるものであった。今後は、これらの遺伝子群について生理学的実験を行い、CR の抗がん、抗老化における詳細な制御機構解明を試みる。特に、本研究では CR においても FoxO3 がミトコンドリアの機能に大きな影響を与えていることが明らかになったことから、CR における FoxO3 のミトコンドリア制御機構と抗老化効果との関連の詳細な解析を目指す。

また、マイクロアレイ解析によっていくつかの lincRNA が検出されたが、生理機能が解明されておらず、CR の抗がん、抗老化機構における未知の制御機構である可能性を秘めている。これらの機能解析も今後の課題である。

これらの結果は FoxO 転写因子の重要性を再認識させ、CR における FoxO1 と FoxO3 の活性制御に関する翻訳後修飾への発展が期待できる。このことは哺乳類の老化や関連疾患を抑制し、健康寿命を延長する化合物を FoxO 転写因子という観点から開発可能であることを意味する。

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1件)

Shimokawa I, Komatsu T, et al. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*, 2015. Doi: 10.1111/acel.12340. 査読有り (著者数

10名、2番目)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 利光 (KOMATSU, Toshimitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

技術職員

研究者番号：70380962