

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870920

研究課題名(和文) 老化細胞を標的とした2型糖尿病治療の可能性

研究課題名(英文) Potential for the therapy of type 2 diabetes by removal of senescent cells from adipose tissue

研究代表者

橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：90724253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では2型糖尿病の罹患率が社会問題となっており、その発症メカニズムの解明や有効な疾患治療法の開発が急務となっている。我々は、加齢と共に脂肪組織に蓄積する老化細胞が、2型糖尿病の発症や進行に関与している可能性を考えた。本研究では、新規に樹立した生きたまま生体内の老化細胞を検出可能であり、かつジフテリアトキシン投与により老化細胞を特異的に除去可能なTg-マウスを駆使し、加齢に伴う脂肪組織における老化細胞の増加がインスリン抵抗性を助長しており、加えて加齢に伴い進行した糖代謝能が、老化細胞除去により一部改善がみられることを示唆する興味深い成果を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：It is imperative to inhibit increased morbidity of type 2 diabetes in Japan. We then have to elucidate the pathogenic mechanism and establish the new effective therapy of that. Senescent cells accumulate in adipose tissue as animal's age, and are considered to underlie several aging-associated pathologies such as type 2 diabetes. During cellular senescence, the tumor suppressor p19ARF play definitive roles in inducing and maintaining permanent cell cycle arrest. Accordingly, aging-associated type 2 diabetes may be improved by the clearance of p19ARF-expressing cells from adipose tissue. We herein demonstrated that glucose metabolism was reversibly restored by the partial elimination of p19ARF-expressing cells. The ablation of p19ARF-expressing cells using a toxin receptor-mediated cell-knockout system in adult transgenic mice ameliorated insulin resistance. These results suggest that the aging-associated decline in metabolic activity was recovered by eliminating senescent cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 2型糖尿病 生体イメージングシステム トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

我々哺乳動物の細胞は、ストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。細胞老化には複数の癌抑制タンパク質が関与していることが報告されており、細胞老化は生体内において極めて重要な癌抑制機構として機能していることが多くの研究報告によって明らかとなっている (1)。また細胞老化を引き起こした細胞は、加齢に伴い様々な組織において蓄積が認められることが知られていたため、一部の研究者は多くの加齢疾患に細胞老化が関与している可能性を考えていた。しかしながら細胞老化発見後、約半世紀が経過した現代においても、個体レベルの加齢疾患と細胞老化との関連性を示すような有力な証拠はあまり得られていないのが現状である。このように個体の老化と細胞老化との関連についての研究が前進しなかったのには、各組織における細胞老化の出現頻度が極めて低いため、生体に及ぼす影響が小さいものと見積もられ、研究が積極的に行われてこなかったという背景がある。加えて、老化細胞の生理的な機能に対する理解が乏しかったことも、着眼を逃れていた一因である。細胞老化は、発見以来長い間、単に増殖停止するだけの現象として捉えられてきた歴史があり、周囲の細胞に対する影響力は小さいと考えられてきた。しかしながら近年になり、細胞老化を引き起こした細胞 (老化細胞) からは様々な生理活性物質が分泌されており、周囲の正常細胞の機能に対して積極的に影響を与えることが明らかとされた (2)。この様な細胞老化特異的な分泌表現型は、SASP (senescence-associated secretory phenotype) と名付けられ、SASP を介した非細胞自律的な老化細胞の機能が、様々な生体機能の変化に関与しているのではないかと考えられるようになってきた。近年では、脂肪組織における細胞老化が末梢組織のインスリン抵抗性を惹起していることを示す研究成果が報告されるなど (3)、様々な生理機能の変化に細胞老化が積極的に関与している可能性が強く示唆されている。

本申請研究では、細胞老化と加齢に伴う組織機能の変化との関連性を明らかとすることを目的とし、新規に樹立したモデルマウスを用いて解析を行うことを予定した。本研究では特に、脂肪組織における細胞老化の出現と、加齢に伴い生じるインスリン感受性の変化との関連を明らかにすることを目標として開始された。

2. 研究の目的

日本では 2 型糖尿病の罹患率の大幅な増加が重大な社会問題となっており、その発症メカニズムの解明や疾患の治療法の開発が急がれている。故に本研究の目的は、脂肪組

織における細胞老化を引き起こした細胞 (老化細胞) の増加が、加齢に伴うインスリン感受性にどのような影響を与えているかを明らかにし、脂肪組織の老化細胞を除去すれば、一旦加齢により低下してしまったインスリン感受性が可逆的に回復可能であるのかを調べ、老化細胞が 2 型糖尿病治療薬開発の有効なターゲットと成り得るかを検証することにあつた。

3. 研究の方法

全ての解析に、雌性の ARF-DTR トランスジェニックマウスを使用した。生体イメージング解析には、IVIS イメージングシステム (Perkin Elmer) を使用した。血糖値は、マウス尾部の静脈から血液を採取し、グルコースメーター (LifeScan) を用いて測定を行った。インスリン値の測定は、レビス・インスリン (シバヤギ) を用いた ELISA 法によって測定を行った。各組織からの RNA 抽出は、NucleoSpin (マッハライナーゲル) を使用して行った。cDNA 合成およびリアルタイム PCR 解析は、それぞれ PrimeScript (タカラバイオ) と SYBR Green qPCR mix (東洋紡) を用いて行った。

尚、本研究計画に関わる動物実験は、すべて国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会の承認を得て遂行した。

4. 研究成果

ヒトや実験に使用される様々な動物において、一般的にインスリン感受性の低下は加齢と共に促進されるとされているが、その程度は種や系統間である程度の差がみられる。よって、我々はまず、本申請研究に使用する C57BL における加齢とインスリン感受性の関連について解析を行った。2 ヶ月齢、6 ヶ月齢、12 ヶ月齢の C57BL におけるインスリン負荷試験では、2 ヶ月齢のマウスと比較して、6 ヶ月齢のマウスではインスリン感受性が著しく低下していることが明らかとなった。一方で、6 ヶ月齢のマウスと 12 ヶ月齢のマウスでは、インスリン感受性に差は認められなかった (図 1A)。この結果は、C57BL 系統のマウスにおいては、インスリン感受性の低下が 2 ヶ月齢から 6 ヶ月齢の間に引き起こされることを示している。次に、インスリン負荷試験に使用したマウスに対し、グルコース負荷試験を行った。驚くべきことに、インスリン負荷試験とは異なり、空腹時の血糖値や糖代謝能においては各月齢間で有意差は認められなかった (図 1B)。加えて、同マウスにおける空腹時の血中インスリンレベルの測定を行い、血中インスリンレベルが加齢に伴い増加する傾向があることが明らかとした (Data not shown)。これらの結果は、加齢に

に伴い低下したインスリン感受性を、インスリン量を増加させることにより補い、糖代謝能力の恒常性が保たれていることを示唆している。

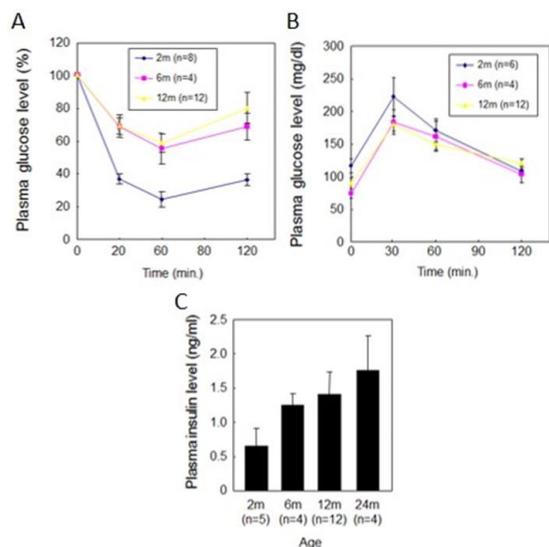


図 1. 野生型マウスにおける加齢依存的なインスリン感受性の低下。(A) 図中に示した各月齢の C57BL マウス (雌雄混合) に対し、6 時間の絶食後にインスリンの腹腔内投与を行い、継時的に採血を行って血中グルコース濃度を測定した。(B) 同様に絶食したマウス腹腔内にグルコースを投与後、継時的に血中グルコース濃度を測定した。(C) 図中に示した各月齢のマウスに対し、絶食後に採血を行い、血中インスリン濃度を ELISA 法にて測定した。

次に我々は、脂肪組織に生じた細胞老化が生体内のインスリン抵抗性惹起に寄与していることが報告されていることから (3)、加齢に伴うマウス生体内における細胞老化の動態解析を行った。哺乳動物では、細胞老化が CDKN2A 遺伝子座にコードされる p16INK4a および p19ARF (ヒトは p14ARF) の発現誘導により引き起こされる。p16INK4a は癌抑制タンパク質である RB をリン酸化して失活することにより、D タイプサイクリン依存性キナーゼ CDK4/6 の活性を阻害して細胞老化を誘導する。一方で、p19ARF はユビキチンリガーゼ Mdm2 の活性を阻害することにより、癌抑制タンパク質 p53 の分解を抑制して細胞老化を誘導する。これらは共に細胞老化において重要な役割を果たしているが、げっ歯類においては特に p19ARF の寄与が大きいことが明らかとなっている。例として、p16INK4a 遺伝子を欠損したマウスでは細胞老化や発癌性に顕著な変化は認められないのに対して (4, 5)、p19ARF 遺伝子欠損マウスから調製した細胞は分裂寿命を持たず、生体においては高頻度に癌が自然発症することが報告されてい

る (6)。次に我々は、加齢に伴う脂肪組織における ARF 発現レベルの動態解析を行うために、1.5 ヶ月齢と 6 ヶ月齢マウスの脂肪組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により ARF 遺伝子の発現量を解析した。1.5 ヶ月齢と比較して 6 ヶ月齢マウスの脂肪組織では、ARF の発現量が顕著に増加していた (図 2)。この結果は、生体の様々な組織において ARF 遺伝子の発現量が加齢と共に増加するという報告とも一致している (7)。これらの研究成果は、脂肪組織における ARF 遺伝子発現量の増加により誘導された細胞老化が、生体のインスリン抵抗性惹起の一因となっている可能性を示唆している。

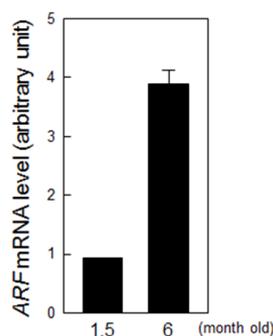


図 2. マウス脂肪組織における加齢に伴う ARF 遺伝子の発現量の増加。1.5 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の野生型 C57BL マウス白色脂肪組織から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて ARF 遺伝子の発現量の測定を行った。各サンプル中の ARF 遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子の発現量で補正を行った。

故に、我々は脂肪組織で ARF 発現量が上昇した細胞数が増加することが、実際に生体のインスリン感受性低下と関連があるかを調べるため、本研究室で新規に樹立したトランスジェニックマウス (ARF-DTR マウス) を用いて詳細な解析を実施した。ARF 遺伝子の発現制御機構は極めて複雑であり、ポリコームタンパク質群を介した染色体レベルのダイナミックな構造変化を伴うため、プロモーター領域のみを使用しても内在性 ARF 遺伝子の発現様式を模倣することはできない。よって我々は、トランスジーンとして CDKN2A 遺伝子座を含むおよそ 80kb の非常に大きな人工染色体を用いて、トランスジェニックマウスの作成を行った。この作成に用いた人工染色体は、ARF 遺伝子発現制御に重要な役割を担うエレメントを含んでおり、Super ARF/INK4a マウスの作製にも使用された実績を持っており (8)、信頼性の高いデザインとなっている。また、この人工染色体中の ARF 遺伝子の第一エクソンには、ヒトのジフテリア毒素受容体である HB-EGF 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた設計となっている

(図 3)。生体内において ARF 遺伝子の発現が誘導される条件下では、トランスジーン的第一エクソンが破壊されているために ARF の発現は起こらず、代わりに HB-EGF 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導される仕組みとなっている。このモデルマウスでは、マウス細胞はジフテリア毒素 (DT) に耐性があるが、ヒト HB-EGF 遺伝子を発現させることにより DT に対して感受性を持つようになるという仕組みを利用することにより、内在性の ARF 遺伝子発現が誘導される条件下に陥った細胞を、DT 投与により生体内から特異的に排除可能であることが期待される。加えてこの条件下の細胞では、ルシフェラーゼ遺伝子も同時に発現することから、生体イメージング解析を行うことにより、生体における ARF 遺伝子の発現動態をモデルマウスが生きたまま解析することが可能である。加齢に伴い各組織で ARF 遺伝子の発現量が上昇することは前述したが、一方で精巣における発現量は他の組織の発現量と比較して著しく高く、加えて若齢期においても高い発現が認められるため、以降のモデルマウスを用いた解析にはすべて雌性の個体を使用することとした。

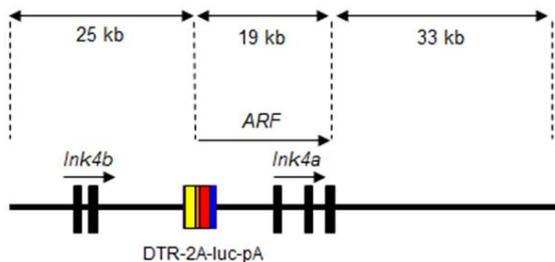


図 3. トランスジェニックマウス (ARF-DTR マウス) 樹立に使用したトランスジーンの様式図。ARF 遺伝子第一エクソンにヒトジフテリア毒素受容体 (HB-EGF) 遺伝子とルシフェラーゼ (luc) 遺伝子を導入した。両遺伝子は翻訳時に 2A ペプチドにより自己開裂するため、1:1 のモル比でタンパク質が合成されるように設計されている。

ARF-DTR マウスのルシフェラーゼ発光シグナルを検出した生体イメージング解析の結果を示す。2 ヶ月齢の雌性マウスでは発光シグナルは殆ど検出されなかったのに対して、6 ヶ月齢以降の雌性マウスでは脂肪組織と肺組織から強いシグナルが検出された (図 4)。この月齢のマウス組織におけるルシフェラーゼシグナルの発現動態は、内在性 ARF 遺伝子の発現動態と一致しているため、トランスジーンの様式図は生体内における細胞老化の出現動態を反映しているものと考えられた。

次に、ARF-DTR マウスに DT 投与を行い、ルシフェラーゼ発光シグナルを指標とした細胞老化の動態解析を行った結果を示す。6 ヶ月齢以降のマウスに DT 処理を行うと、投与後 3 日以内に肺組織で見られているルシフェラーゼ発光シグナルは消失したが、脂肪組織の発光シグナルに関しては、DT 処理後に明確な変化は認められなかった。故に、脂肪組織における同一個体を用いた DT 処理前後での比較検討は困難であるものと思われた。そこで我々は、脂肪組織に発光が認められた 6 ヶ月齢マウスをコントロール PBS 投与群と DT 投与群の二グループに分け、生体イメージング解析を行った。2 週間おきに PBS もしくは DT を ARF-DTR マウスに投与し、4 週間後のルシフェラーゼ発光シグナルを測定した。PBS 投与群 (上段) と DT 投与群 (下段) を比較すると、DT 投与群では肺組織由来の胸部の発光シグナルに顕著な低下が認められた。生殖器周囲の白色脂肪組織由来の発光シグナルに関しては、胸部に認められた顕著なシグナル消失程ではないが、DT 投与群では若干の発光シグナル低下が認められた。これらの結果から、DT 投与を長期的に行うことにより、脂肪組織における p19ARF の発現上昇をある程度抑制可能であることが示唆された。

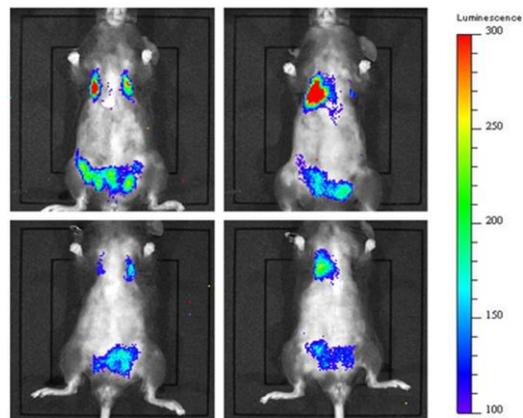


図 4. ARF-DTR マウスにおけるルシフェラーゼ発光シグナルの動態。6 ヶ月齢雌性 ARF-DTR マウスに PBS (上段) または DT (下段、50 μ g/1kg) を 2 週間おきに 2 回腹腔内投与した。最初の投与から 4 週間後に腹側を剃毛し、マウス腹腔内にルシフェリンを投与し、その 10 分後に生体イメージングシステムにより発光シグナルの検出を行った。

以上の実験で得られた二群のマウスを対象として、インスリン負荷試験を行った。DT投与群のマウスでは、PBS投与群のマウスと比較してインスリン投与後の血糖値低下がより顕著であった(図5)。このことから、DT投与により脂肪組織における細胞老化の出現や蓄積を抑制したマウスでは、加齢に伴い誘導されるインスリン感受性の低下が緩和されることが示唆された。

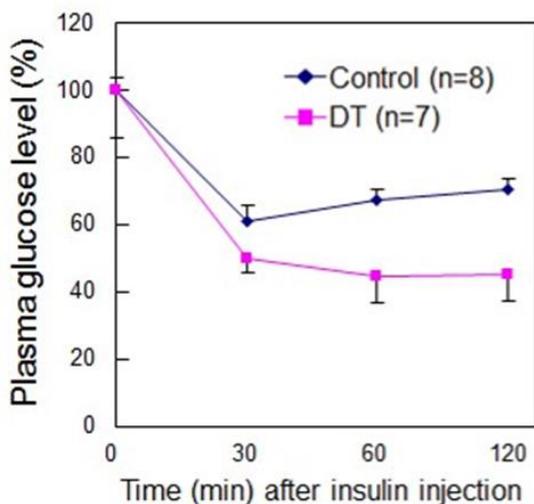


図5. ARF-DTR マウスにおけるインスリン負荷試験。6ヶ月齢の雌性ARF-DTRマウスに対し、2週間毎にPBSもしくはDTを2回腹腔内投与し、最初の投与から4週間後にインスリン負荷試験を実施した。

本研究では、脂肪組織における生理機能を対象とし、細胞老化を引き起こした細胞を特異的に排除することにより、加齢に伴い低下した糖代謝能が改善するかについて検討を行った。前述した通り、糖代謝能についてはある程度の改善が認められたが、その分子作用機構については明らかにすべき点が数多く残されており、今後の課題としていく所存である。生体内に出現した老化細胞を排除することにより、加齢に伴い一旦低下してしまった生体機能が回復可能であるという本研究の結果は、細胞老化が創薬標的として極めて有効であることを示唆しており、2型糖尿病の新たな治療法の開発に貢献できる可能性を秘めているものと思われる。

<引用文献>

- ① Ben Porath, I. & Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 961-976 (2005).
- ② Freund, A. *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* 16, 238-246 (2010).
- ③ Minamino, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* 15, 1082-1087 (2009).
- ④ Krimpenfort, P. *et al.* Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86 (2001).
- ⑤ Sharpless, N. E. *et al.* Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91 (2001).
- ⑥ Kamijo, T. *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659 (1997).
- ⑦ Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest* 114, 1299-1307 (2004).
- ⑧ Matheu, A. *et al.* Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18, 2736-2746, doi:10.1101/gad.310304 (2004).

5. 主な発表論文等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)
 中部大学・生命健康科学部・助手
 研究者番号：90724253

(2) 研究協力者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO, Masataka)
 国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・室長
 研究者番号：50426491