

令和元年9月10日現在

機関番号：84503

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26115004

研究課題名(和文) 早期老化マウスにおける幹細胞システムの老化促進と加齢疾患の発症に関する研究

研究課題名(英文) Acceleration of stem cell aging and age-related disorder in premature aging model mouse

研究代表者

鍋島 陽一(Nabeshima, Yo-ichi)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・その他

研究者番号：60108024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 98,100,000円

研究成果の概要(和文)：a-klotho 変異マウスでは、早期老化症状の発症に伴い、腎臓、皮膚、小腸、血管などで顕著な細胞死、組織破壊が生じ、代償性の幹細胞増殖とそれに続く幹細胞の枯渇が起こることを見出した。次いで、a-klotho 変異マウスで観察される全身性の代謝異常が組織破壊を介して幹細胞の枯渇を促進し、老化症状を促進することが明らかになった。a-klotho 変異マウスではNAD代謝の副次的経路が顕著に亢進していることを見出し、a-klotho 変異マウスにおける幹細胞の維持、枯渇にNMN・NAD+代謝の変容がどのように関わるかについての解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化個体における幹細胞の振る舞いについての情報、幹細胞の枯渇に関する情報はほとんどないことから、本研究成果は幹細胞老化に関する基本情報としての意義が高い。老化に伴うNAD代謝の変化、NMNの低下は知られていたが、早期老化マウスにおいてNAD代謝の副次経路が顕著に亢進していることが初めて明らかになった意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Sever cell and tissue damages are observed in lung, kidney, skin, and blood vessels of a-klotho deficient mouse in association with the occurrence of multiple aging related disorders.

We found that increased stem cell growth and followed exhaustion of stem cells were induced to compensate sever cell and tissue damages. We next analyzed metabolic abnormalities and great activation of calpain-1 observed in a-klotho deficient mouse caused cell and tissue damages and followed compensatory responses of stem cells. In addition, we analyzed the abnormality of NAD metabolism in a-klotho deficient mouse and discovered the remarkable acceleration of secondary (usually minor) pathway of NAD metabolism.

研究分野：分子病態学

キーワード：老化 ビタミンD Calpain 1 NAD代謝 幹細胞の枯渇 幹細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は、ヒトの老化症状に類似した多彩な変異表現型を示すマウスを発見し、その原因遺伝子 *-klotho* を同定した(Nature 1997)。ついで、その機能を解析、*-Klotho* はカルシウム恒常性の制御因子であると提唱した。*-Klotho* K0 マウスでは、激しい組織損傷、早期老化変異表現型をもたらす。よって、*-klotho* K0 マウスの解析により組織破壊、組織修復に関する新たな機構が解明されると期待された。*-klotho* K0 マウスは、組織損傷、組織修復の制御を解析する優れたモデルであり、組織損傷、加齢疾患の発症プロセスにおける幹細胞の機能変化を解析する優れたモデルとなるのではと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

目標1: *-Klotho* の機能欠失、ビタミン D の過剰合成が幹細胞の増殖・分化のバランス制御の破綻、幹細胞の枯渇をおこす機構とどのように関わるかを解明する。

目標2: 海馬神経幹細胞などの増殖・維持は血中 NMN に大きく依存していると報告されており、ステムセルエイジング制御における Sirtuin/NAD システムの重要性を明らかにする。

目標3: *-klotho* 変異マウスにおける多能性幹細胞の活性化、動員による組織修復機構を解析し、組織の維持、再構築における多能性幹細胞の役割解明に結び付ける。

目的4: *-klotho* K0 マウスでは血糖値の制御異常が観察される。一方、細胞の加齢に伴う減少機構の解明、増殖誘導は幹細胞老化研究の中心的課題であり、その解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では *-klotho* K0 マウスの解析、近年の老化研究から推定される仮説を基盤に研究の方向性、仮説を設定し、解析を進めた。解析を進める手順として [I] *-klotho* K0 マウス、ビタミン D レベルを低下させたマウス、脂肪細胞分化が回復したマウスなどを準備した。次いで、[II] 海馬、小腸など幹細胞の動態解析に汎用されている手法を組み合わせ幹細胞に関する基本的な情報を得た。[III] *-Klotho* と関連分子の分子間相互作用の解析を試みた。[IV] 老化の基本メカニズムとの連関を視野に *-klotho* K0 マウスにおける NAD 代謝を再検討し、老化、加齢疾患モデルとしての *-klotho* K0 マウスの位置付けを検証した。[IV] *-klotho* K0 マウスにおける血糖値維持機構の変容、血糖値の制御に関わる因子を解析、膵細胞の幹細胞の解析、膵細胞の増殖を誘導する因子の解析を進めた。[V] これらの結果を総合してステムセルエイジングの分子機構解明に結びつけることを目指した。

4. 研究成果

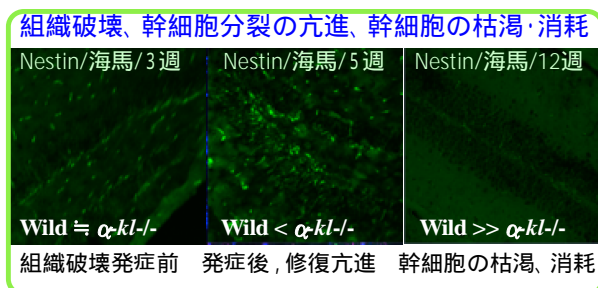
1) *-klotho* K0マウスをモデルとする組織損傷、加齢疾患発症の分子機構の解明

-klotho K0 マウスで起こっている顕著な組織破壊が一過的な幹細胞の動員 / 過剰な活性化、引き続く枯渇をもたらす可能性を検証するために α -*klotho* K0 マウスにおける組織損傷誘導プロセスを解析した。 α -*klotho* K0 マウスの特徴はリン、活性型ビタミン D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$)、FGF23 が顕著に亢進しており、大きな影響をもたらすことである。一方、ビタミン D 前駆体を含まない餌による飼育、 1α -hydroxylase 遺伝子と α -*klotho* の DK0 の作成などによりビタミン D 活性の低下・正常化を誘導すると変異症状は改善する。同様に高リン血症の改善も組織障害を大きく改善する。これらの結果はビタミン D の持続的な活性亢進、あるいは血中リン濃度の顕著な亢進が、 α -*klotho* K0 マウスの多彩な変異表現型の重要な要因 / 引き金であることを示している。次の課題は組織破壊の実行部隊の解明であるが、 α -*klotho* K0 マウスでは、Calpain-1 の顕著な活性化が生後 2 週、3 週より観察され、次いで生後 4 週頃より内在性の Calpain-1 阻害剤であるカルパスタチンによる分解阻害を乗り越えて細胞障害を引き起こす。この事実と符号するように K0 マウスでは生後 4 週頃から顕著な組織障害が観察されるようになる。そこ

でCalpain-1阻害剤を α -*klotho* K0マウスに投与し、その効果を解析したところ、外観、毛並み、体重、動脈の異所性石灰化、肺気腫、皮膚の老人性萎縮、骨密度の低下、骨の形成異常など、いずれも顕著に改善することを確認した。この結果はビタミンDの持続的な活性亢進がCalpain-1の活性化シグナルとして作用することを示唆している。組織破壊が激しい肺、腎臓等ではグランザイム、パーフォリン、FasL陽性細胞がコントロールに比して多数観察され、組織障害の現場を捉えることに成功した。一方、強い抗炎症作用を持つ化合物の投与により組織破壊が改善することも明らかとなり、活性型ビタミンD、リンの亢進が組織破壊に関わる事実と併せて、活性型ビタミンD、炎症反応の亢進が協同的に作用し腎臓、血管内皮、肺胞細胞、皮膚などの細胞においてCalpain-1の機能が亢進し、同時に細胞死シグナルが活性化し、組織障害 / 細胞死をもたらすと推定された。

2) α -*klotho* K0マウスで観察される組織損傷に幹細胞の制御異常が関わるか

α -*klotho* K0マウスでは生後3-4週より早期老化症状、組織破壊が進行する。そこで、生後3, 5, 6週、10週以後の α -*klotho* K0マウス、野生型マウスの海馬における幹細胞マーカーの発現、BrdUの取り込み、Ki67陽性細胞数を解析し、 α -*klotho* の欠失が幹細胞の増殖、分化に与える影響を詳細に解析した。生後3週ではK0、野生型マウス間で差異は見いだされなかったが、組織破壊が進行する生後4, 5週では α -*klotho* K0マウスの海馬において幹細胞数が増加しており、BrdUを取り込んだ細胞数も野生型より多く認められたが、10週以後の α -*klotho* K0マウスでは幹細胞数が有為に減少していた。生後3週以降に起こる顕著な組織破壊が一過的な幹細胞の動員 / 過剰な活性化をもたらしたものと推定され、組織破壊の進行を止めること(ビタミンDを含まない餌による飼育)を試み、Ki67陽性細胞数の増加、並びに幹細胞の枯渇が抑えられることを確認した。以上より、 α -*klotho* K0マウスは幹細胞の一過的増殖、減少・枯渇機構を解析する優れたモデル系であることが確認された。



次いで、幹細胞の自己複製、分化制御に α -Klothoが何らかの機構で関わる可能性を検討した。まず、 α -KlothoがWntに結合し幹細胞の運命制御に関わる可能性であるが、 α -Klotho 結合分子の網羅的解析で同定された候補分子の中にWntは含まれていない。また、 α -Klothoの構造解析、結合相手の糖鎖解析より、HNK-1糖鎖抗原が α -Klotho結合蛋白に共通に付加されていることを見いだしたが、WntにHNK-1糖鎖抗原が結合しているとの結果は得られなかった。また、 α -Klothoの発現は海馬の一部に限局されているが海馬における幹細胞マーカーの発現、BrdUの取り込み、Ki67陽性細胞数などの変化は海馬全体で確認されており、 α -Klothoの直接的作用は否定的である。第2の検討課題は、 α -*klotho* K0マウスで過剰に合成されるビタミンDとVDRの複合体が増殖と分化のバランス異常をきたす可能性である。培養細胞を用いた検討ではVDRが β -catenin とCBP、あるいはp300との複合体を形成することが知られているが、個体レベル(α -*klotho* K0マウス)では、複合体形成についての明確な結論が得られなかった。

3) α -*klotho* K0マウスにおけるNAD代謝異常について

NADは細胞におけるエネルギーレベルのセンサーであり、老化制御因子 Sirtuinの活性化に必須の分子である。興味深いことに、NAD、及び、その前駆体であるNMNの血中濃度が加齢に伴い低下するが、NMNを投与すると健康寿命の延長をもたらす、また、Sirtuin 1の視床下部における機能亢進は寿命延長、老化遅延をもたらすと報告されている。さらにNMNによる海馬の幹細胞の維持、増強についても報告されている。一方、細胞内で NMN を合成する活性、ひいては NMN から NAD を合成する活性は各種の細胞・組織で違いがあり、特に神経細胞、視床下部の神経細胞、膵 細胞などではNMNを合成する酵素 (iNampt) の活性が低く、脂肪細胞よりNMN合成酵素(eNampt) が分泌され、それを取り込んでNAD 産生に利用している。この事実は、血中 NMN、脂肪細胞から分泌されるeNampt濃度を維持すること、加齢に伴うNMN、eNamptの低下を抑えることの重要性を示しているが、*-klotho* KO マウスでは肝心の脂肪細胞がほとんどないことから *-klotho* KO マウスにおけるNAD代謝の変容が推定された。そこで、*-klotho* KOマウスの血液や肝臓などのメタボローム解析を行ったところ、血中トリプトファンの亢進、トリプトファンからNADを合成する経路の中間体メタボライトの顕著な亢進、肝臓におけるNADレベルの顕著な亢進を示すデータが得られた。また、トリプトファンからキノリン酸を介してNAD合成に至る酵素の発現増強が観察された。NADはニコチンアミドからNAMPTによりNMNに変換され、NmatsによりNADに変換される経路(主要経路)とトリプトファンからキノリン酸を介してNAD合成に至る副次的な経路によって合成されるが、*-klotho* KO マウスにおいては、肝臓で過剰に合成されたNADが細胞表面でCd38によってNAMに分解され、各種の臓器に運ばれ、再度NADへと変換される経路、すなわち副次的経路が顕著に亢進していた。副次的経路については情報が乏しく、老化、加齢関連疾患との関連も不明である。

4) 膵 細胞の加齢に伴う減少と膵 細胞の増殖誘導機構について

インスリン遺伝子の発現と 細胞量の制御という課題に取り組み、抑制因子 ICER (inducible cAMP early repressor) が活性化因子と競合して 細胞の機能と量をコントロールしていること、そして、これらの転写因子の発現バランスが崩れて抑制因子が過剰発現すると、インスリン産生と 細胞維持機構が破綻し、早期から重度のインスリン分泌不全による糖尿病を発症することを Tg マウスを作製して実証した。ついで 細胞の増殖には 細胞の分裂以外に幹細胞から供給される可能性(幹細胞説)を検証し、膵島が膵管上皮細胞に隣接して存在すること、肥満のヒトや組織再生時に 細胞が膵管上皮細胞に多く見られること、lineage trace により膵管上皮細胞に幹細胞が存在し、 細胞の増殖に貢献していることを証明した。一方、上記の糖尿病 Tg マウス(オス)の精巣を除去 (castration) あるいは 17 β -エストラジオールの投与により膵管上皮細胞中および膵島の 細胞を急激に増加させることに成功し、膵島の形態と血糖値が回復することを明らかにした。そこで、 細胞の増殖に関与する候補遺伝子、また、血糖値が正常化した際に 細胞の増殖停止に重要な役割を持つと推定される遺伝子の同定に成功した。Flox マウスを作製し解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計19件)以下抜粋

- 1) Komura H, Kakio S, Sasahara T, Arai Y, Takino N, Sato M, Satomura K, Ohnishi T, Nabeshima Y, Muramatsu SI, Kii I, Hoshi M*. Alzheimer A β Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAK α 3 Neurons by Secretion. **iScience**. 13:452-477 (2019)
- 2) Shikanai M, Nishimura Y, Sakurai M., Nabeshima Y, Yuzaki M., Kawauchi T*. Caveolin-1 promotes early neuronal maturation via caveolae-independent trafficking of N-cadherin and L1. **iScience** 7:53-67. (2018)

- 3) Fujiyama T., Miyashita S., Tsuneoka Y., Nagaoka M., Kakizaki M., Kanno S., Ishikawa Y., Kawaguchi Y., Yanagawa Y., Magnuson MA., Nabeshima Y., Yanagisawa M., Funato H., Hoshino M. * Forebrain Ptf1a is required for sexual differentiation of the brain. **Cell Reports** 24 (1):79-94. (2018)
- 4) Yanagihashi Y., Segawa K., Maeda R., Nabeshima Y., Nagata S.* Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 114(33):8800-8805. (2017) doi: 10.1073/pnas.1705365114.
- 5) Nakayama Y., Masuda Y., Ohta H., Tanaka T., Washida M., Nabeshima Y., Miyake A., Itoh N., Konishi M.* Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. **Sci Rep**. 7(1): 330. (2017)
- 6) Maruyama N., Asai T., Abe C., Inada A., Miyashita K., Maeda M., Matsuo M., Nabeshima Y.* Establishment of a highly sensitive sandwich ELISA for the N-terminal fragment of titin in urine. **Sci Rep**. 6, 39375; doi: 10.1038/srep39375 (2016).
- 7) Inada A.* , Fujii NL, Inada O., Higaki Y., Nabeshima Y. Effects of 17 β -estradiol and androgen on glucose metabolism in skeletal muscle. **Endocrinology** 157(12): 4691-4705 (2016)
- 8) Inada A.* , Inada O., Nagafuchi S., Katsuta H., Yasunami Y., Fujii NL., Matsubara T., Arai H., Fukatsu A. Nabeshima Y. Adjusting the 17 β -Estradiol to Androgen Ratio Ameriorates Diabetic Nephropathy **J. American Society of Nephrology** 27(10): 3035-3050 (2016)
- 9) Kobayashi K., Tanaka T., Okada S., Morimoto Y., Matsumura S., Inoue K., Kimura K., Yagi T., Saito Y., Fushiki T., Inoue H., Matsumoto M. Nabeshima Y.* Hepatocyte β -Klotho regulates lipid homeostasis but not body weight in mice. **FASEB J**. 30: 849-862 (2016)
- 10) Ohnishi T., Y., Nabeshima Y., Teplow DG., Hoshi M.* et.al. Na,K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 112(32) E4465-E4474 (2015)
- 11) Parthasarathy S, Inoue M, Xiao Y, Matsumura Y, Nabeshima Y., Hoshi M, Ishii Y.* Structural Insight into an Alzheimer's Brain-Derived Spherical Assembly of Amyloid β by Solid-state NMR. **J Am Chem Soc**. May 4. PMID: 25938164 (2015)
- 12) Nishimura YV., Shikanai M., Hoshino M., Ohshima T., Nabeshima Y., Mizutani K., Nagata K., Kazunori K., Kawauchi T.* Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. **Development**;141(18):3540-50 (2014)
- 13) Nabeshima Y., Washida M., Tamura M., Maeno A., Ohnishi M., Shiroishi T., Imura A., Razzaque MS., Nabeshima Y.* Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates α -klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. **Sci Rep**. Aug 1; 4: 5847. (2014)
- 14) Hayashi Y., Nabeshima Y., Kobayashi K., Miyakawa T., Tanda K., Takao K., Suzuki H., Esumi E., Noguchi S. Matsuda Y., Sasaoka T., Noda T., Miyazaki J., Mishina M., Funabiki K. Nabeshima Y.* Enhanced Stability of Hippocampal Place Representation Caused by Reduced Magnesium Block of NMDA Receptors in the Dentate Gyrus. **Molecular Brain** 7, 44-61(2014) MS ID1850664515130282
- 15) Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y. Konishi N, Saito Y.* Reduced Renal α -Klotho Expression in CKD Patients and Its Effect on Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism. **PLoS One**. 9(1); e86301 (2014)

〔学会発表〕(計30件)以下抜粋

- 1) 鍋島陽一 α -Klotho の機能と病態における意義 29回 Forum in Dojin 細胞と個体の老化生物学 2018 平成30年11月22日 熊本
- 2) 鍋島陽一 健康長寿の実現を目指した老化研究の推進 第65回日本実験動物学会総会学術集会委員会シンポジウム、健康長寿と老化研究の課題 平成30年5月17日 富山

- 3) 鍋島陽一 Klotho と FGF23、FGF15 による代謝の恒常性制御 第91回日本内分泌学会学術総会「FGFs と生体制御」2018年4月26日シーガイア宮崎
 - 4) 鍋島陽一 Klotho の発見を端緒とする老化・認知症研究の進展 基礎老化学会 2017 秋のシンポジウム 「老化の多様性と加齢性疾患のメカニズム」 2017年10月14日 京都
 - 5) Yo-ichi Nabeshima alpha-Klotho in health and diseases 2017 Tohoku Forum for Creativity Thematic Program “Aging Science: from Molecules to Society May 10 2017, Sendai
 - 6) 鍋島陽一 日本解剖学会シンポジウム「エイジング形態と先進医療の可能性について」2017年3月28日 長崎
 - 7) 鍋島陽一 健康長寿の実現を目指した老化研究の推進 第8回抗加齢内分泌研究会 2016年9月4日、東京
 - 8) Yo-ichi Nabeshima Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates alpha-Klotho deficiency phenotypes resembling human aging syndromes FASEB Symposium on The Biology of Calpain in Health and Disease. July 17-22 (2016) Big Sky, Montana
 - 9) Yo-ichi Nabeshima α -Klotho in Health and Disease CADM 2016 International Symposium of the Center for Animal Disease Model; Metabolic Disease and Aging July 16 (2016) Tokyo
 - 10) 鍋島陽一 α -Klotho in Health and Disease 日本生化学会近畿支部集会 28年(2016)年5月20日 神戸薬科大学
 - 11) 鍋島陽一 Klothoの分子機能解析—蛋白間相互作用における糖鎖の新たな機能—創薬薬理フォーラム第60回談話会 平成28年5月20日 東京渋谷日本薬学会長井会館
 - 12) 鍋島陽一 蛋白間相互作用における糖鎖の新たな機能 第38回日本分子生物学会年会ワークショップ分泌過程の修飾メカニズムとそのダイナミズム 12月1-4日、2015 神戸ポートアイランド
 - 13) 鍋島陽一 Klothoの分子機能と老化関連疾患 脳心血管抗加齢研究会 2015 特別講演 平成27年11月28日 大阪
 - 14) 鍋島陽一 クロトールの分子機能解析—蛋白間相互作用における糖鎖の新たな機能—第6回 Molecular Cardiovascular Conference II Keynote Lecture 平成27年9月4日 福岡
 - 15) 鍋島陽一 クロトールの分子機能と病態 特別講演 第一回日本筋学会学術集会 平成27年8月8日 東京
 - 16) 鍋島陽一 Klothoの構造機能連関—蛋白間相互作用における糖鎖の新たな機能—第37回東京成長ホルモン成長因子セミナー 2014年11月7日 東京
 - 17) 鍋島陽一 Klothoによって紡がれた生命の糸を解きほぐす 第7回糖化ストレス研究会 2014年10月18日(東京)
 - 18) Yo-ichi Nabeshima α - and β -Klothos in health and diseases. Asian-Aging 2011 Japan-Korea joint conference on aging and neurodegeneration Sep21-23 (2014) Jeju
- 〔図書〕(計 0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計3件) 公開を控えさせていただきます。
- 取得状況(計 0件)
- 〔その他〕市民公開講座等の開催、講演 3件
6. 研究組織 該当なし