

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04682

研究課題名(和文) FoxO転写因子による癌と老化の制御機構とその制御化合物の探索

研究課題名(英文) Regulation of cancer and aging by FoxO and investigation of compounds for regulation of FoxO

研究代表者

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：70187475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：FoxO1、FoxO3がカロリー制限(CR)による癌の抑制と寿命延伸に個別に関わるメカニズムを解明するために、ミトコンドリアの機能と代謝に着目した。老齢のマウスの肝ミトコンドリアでは、状態3の呼吸速度と膜電位がFoxo3+/-マウスで対照に比べ高かった。メタボローム解析では、解糖系の代謝産物がFoxo3+/-マウスで有意に変動していた。これらの結果は、ミトコンドリアの加齢変化の抑制にFoxO3が必要であることを示唆している。肝臓癌モデルでは、腫瘍の発生にFoxO3が必要であることを示した。組織特異的Foxo3遺伝子の欠失モデルは、脳や白色脂肪は、CRの寿命延伸効果に必須ではないことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのFOXO3遺伝子多形と長寿の関連性が複数の集団で指摘されていた。CRによる寿命延伸に関わるFoxO3関連メカニズムを解明することは、ヒトの健康寿命の延伸メカニズムに迫ることができる点で、学術的、社会的意義は大きい。今後、アイソフォーム特異的活性化化合物を探索できれば、老化関連疾患の制御を目指す創薬に発展できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the differential roles of FoxO1 and 3 in inhibition of cancer and extension of lifespan by calorie restriction (CR), we focused on mitochondria functions and metabolism in Foxo1+/- and Foxo3+/- mice. Oxygen consumption rates in the state 3 of mitochondria isolated from liver tissues were greater in Foxo3+/- CR mice than in WT CR mice at 24 months of age (mo). The mitochondrial membrane potential was also elevated in Foxo3+/- CR mice. A hepatic metabolome revealed that some metabolites in the glycolysis were significantly affected in Foxo3+/- CR mice. These findings suggest necessity of FoxO3 for inhibition by CR of aging-related declines in mitochondrial functions and metabolism. A carcinogen-induced hepatocellular carcinoma model suggests that FoxO3 is required for development of the tumor. Conditional knock-out of Foxo3 gene in the white adipose tissue and in the brain indicated that these tissues are not essential for the life-extending effect of CR.

研究分野：基礎老化学

キーワード：老化 カロリー制限 FoxO転写因子 癌

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

1. 研究開始当初の背景

高齢者の健康寿命を延伸することは、現代社会の喫緊の課題である。線虫やマウスを用いた実験的研究では、摂食カロリーを制限すること(カロリー制限(CR))によって、加齢関連疾患を抑制し、寿命を延伸できる。CRは酵母や線虫からマウスを含む広範囲な実験動物の寿命を延長する。アカゲザルの健康寿命も延長することが示唆され(Mattison JA 他、Nature 2012)。実験動物ばかりではなく、ヒトの寿命や老化を制御するシグナルを解明する上で、重要な研究モデルと考えられている。

線虫を用いた研究において、長寿命化には、IGF-1系シグナルの減弱による転写因子Daf-16の活性化が必要であること(Kenyon C, Nature 1993)、特にアイソフォームの一つであるDaf-16d/fが重要であることが報告された(Kwon ES 他、Nature 2010)。Daf-16は、ほ乳類ではFoxO転写因子群(FoxO1, 3, 4, 6)である。CRによっても、IGF-1系は抑制されるので、FoxO転写因子は、ほ乳類の癌や寿命、よって老化を制御する主要な因子であると予測される。実際に、ヒトの長寿とFoxO3遺伝子多型との関連性も報告されているが(Willcox BJ 他、PNAS 2008)、その分子メカニズムは不明である。

我々は、FoxO遺伝子改変マウスを用いて、CR環境においては、たった一つの遺伝子FoxO1の半欠失によって、癌の抑制効果が減弱した(Yamaza H 他、Aging Cell 2010)。一方、FoxO3遺伝子の半欠失によって寿命延長効果が消失することを示した(Shimokawa I 他、Aging Cell 2015)。

2. 研究の目的

カロリー制限(CR)による長寿命化機構を解明し、ヒトの老化および関連疾患の制御に応用するための基盤を作る。我々のCR研究は、FoxO1転写因子が癌を、FoxO3転写因子が老化を選択的に抑制していることを示唆した。本研究は、ほ乳類の癌と老化、よって寿命を個別に制御するFoxO関連メカニズムをミトコンドリア機能制御、エネルギー代謝制御、ストレス応答遺伝子発現ネットワークの観点から明らかにする。また、FoxO1,3の組織特異的のノックアウトマウスを用いて、寿命を制御する責任組織を同定する。さらに、FoxO1、FoxO3を活性化する化合物をスクリーニングし、カロリー摂取を制限することなく老化および関連疾患を制御するCR模倣剤(CR mimetics, CRM)の開発へと発展させる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の作製と維持：

全身性のFoxo1^{+/-}、Foxo3^{+/-}マウス(C57BL6/J)は長崎大学動物実験施設において維持している。組織特異性ノックアウトマウスは、Cre-loxPシステムを用いて作製した。FoxO1L/L、FoxO3L/LマウスとNestin-Cre/ERT2マウス(脳、特に神経幹細胞特異的)、FABP4-Creマウス(白色脂肪、褐色脂肪特異的)、Alb-Creマウス(肝臓特異的)を交配した。FoxO1L/L:Nestin-Cre/ERT2マウス、FoxO3L/L:Nestin-Cre/ERT2マウスでは、生後8週でタモキシフェンを投与することによって、FoxO1、FoxO3をノックダウンした。CR(自由摂食群の70%量を給餌する)は生後12週より行った。ノックアウトマウスによる寿命集団、経時的屠殺集団を確立し、以下の実験へ供給した。寿命集団は自然死後、病理解剖し腫瘍を中心とした病変の解析を行った。

(2) ミトコンドリアの機能、Redox制御に対するFoxO1、FoxO3の役割：CRによるミトコンドリア機能制御にFoxO1、FoxO3が関与していることを明らかにするために、細胞および組織から分離したミトコンドリアの機能解析を行なった。既に飼育を行なっているFoxO1(+/-)、FoxO3(+/-)全身性ノックアウトCRマウス肝臓から分離したミトコンドリア分画において評価した。細胞外フラックスアナライザー(XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA))を用いて、酸素消費速度および細胞外酸性化速度を計測し、ミトコンドリア機能(定常状態、予備呼吸能、共役、脱供役状態)を評価した。同時に活性酸素種(ROS)の発生も計測した。

ミトコンドリアバイオエナージェティクスにおけるFoxo3とFoxo1の役割を明らかにするために、肝癌、肝細胞のセルラインを用いて、Foxo3、Foxo1をsiRNAによりノックダウンし、標準的方法に従い、フラックスアナライザーによって酸素消費量を計測した。

(3) ミトコンドリアの形態的変化の観察：

常法にしたがい、透過型電子顕微鏡を用いて、肝臓組織のミトコンドリアの形態計測を行った。

(4) 肝臓組織を用いたメタボローム解析：CE-TOFMSおよびCE-QqQMSを用いて24ヶ月肝臓組織の代謝産物を解析し、Foxo1、Foxo3遺伝子半欠失の影響を比較した。

(5) 遺伝子毒性応答と発癌: 発癌に関連する、遺伝子毒性応答を評価した。各系統のマウス(生後 15 日)に DENA を投与後、24 時間、48 時間で、マウスを屠殺し、肝臓組織を採取した。免疫染色された組織切片上で細胞死、細胞増殖を計測した。免疫染色による H2AX を指標として、DNA 傷害の指標とした。FoxO1、FoxO3、Myc の発現、細胞回転停止(p21, p27)、DNA 修復(Gadd45a)、ストレス応答(SOD2、Gclc、など)、細胞増殖(Cdk など)に関連する遺伝子、蛋白質の発現を比較した。また、肝細胞癌の発生に重要な Glycogen synthesis kinase (GSK)-3beta/beta-catenin 系の活性化を検索した。マウスは、DENA 投与後、24、32、40 週後に屠殺し、肝臓の発生率を比較した。

(6) FoxO1、FoxO3 を活性化する化合物の同定: Venus(蛍光物質)で標識した FoxO1 および FoxO3 プロモーターベクターを作製し、培養細胞へ遺伝子導入し、InCellAnalyzer 及び 384 プレート・30 枚程度で、9600 コアライブラリを用いたハイスループットスクリーニング(HTS)を行なう予定であった。しかしながら、研究期間内にアッセイ系の構築に至らなかった。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの機能、Redox 制御に対する FoxO1、FoxO3 の役割:

マウス肝臓からミトコンドリア分画を調整した。細胞外フラックスアナライザーを用いて、酸素消費速度および細胞外酸性化速度を計測し、ミトコンドリア機能(定常状態、予備呼吸能、共役、脱共役状態)を評価した。WT マウス-CR では、10 カ月齢、15 カ月齢、24 カ月齢において、年齢による大きな変化はなかった。Foxo3 (+/-)-CR 群では、10 カ月齢では、WT-CR に比べて、脱共役状態における呼吸が減少していた。一方、24 カ月齢では、逆に酸素消費量が Foxo3 (+/-)-CR において有意に上昇していた。Foxo1 (+/-)-CR では、WT-CR と有意な差はなかった。以上の結果は、Foxo3 が加齢にともなうミトコンドリア呼吸機能の制御、維持に役割を果たしていること、高齢期では、Foxo3 による抑制的な制御が破綻していることを示唆している。

ミトコンドリアバイオエナージェティクスにおける Foxo3 と Foxo1 の役割を明らかにするために、肝臓、肝細胞のセルラインを用いて、Foxo3、Foxo1 を siRNA によりノックダウンし、標準的方法に従い、フラックスアナライザーによって酸素消費量を計測した。Foxo3 のノックダウンは、肝細胞において、酸素消費量の低下や解糖系の機能低下を示唆する所見を得た。

FoxO3 の役割をさらに解析するために、解糖系酵素の発現、ピルビン酸デヒドロゲナーゼのリン酸化レベルなどを計測したが、FoxO3 特異的な変化は捉えられなかった。今後、FoxO3 特異的な DR のエネルギー代謝について解析を続ける。

(2) ミトコンドリアの形態的变化:

Foxo3 (+/-)マウスでは、高齢期にミトコンドリアの機能が破綻していることが示唆されたので、形態的な変化を電子顕微鏡的に観察した。Foxo3 (+/-)-CR マウスの肝細胞では、WT-CR に比較して、長径が伸びたミトコンドリアや異常な分枝をともなうミトコンドリアが観察された。

(3) 肝臓におけるメタボローム解析:

Foxo3 (+/-) DR では、解糖系の代謝産物の減少、NADH/NAD⁺比の増加、乳酸/ピルビン酸比の増加がみとめられた。この結果から、Foxo3 が半欠失した場合、DR 条件下では、pseudo-hypoxic な状態にあることが示唆された。加えて、Foxo3 (+/-)マウスでは、GTP、GDP が増加していた。ミトコンドリア膜電位を計測すると、WT では、自由摂食(AL)マウスに比べ、DR では低かったが、Foxo3(+/-)では、膜電位が WT-DR よりも高い傾向があった。これらの結果は、WT-DR の特徴であるミトコンドリアの uncoupling 機能が Foxo3(+/-)では低下していることが示唆された。ミトコンドリアの機能解析結果を加えて、DR によるエネルギー代謝の変容に Foxo3 が必要であることが示された。

(4) 遺伝子毒性応答と発癌における FoxO の役割:

各系統のマウス(生後 15 日)に発癌剤 DEN を投与後、24 週、32 週、40 週齢で屠殺し、肝臓の発生率を比較した。WT-AL に対して、CR は肝細胞癌の発生を抑制した。WT-CR に比較し、Foxo3(+/-)-CR、Foxo1/3 (+/-)-CR の肝臓発生頻度がより低下していた。この所見は、腫瘍の増殖に FoxO3 が必要であることを示唆している。

FoxO3 の腫瘍発生における役割を解析するために、DEN 投与後 24 週(HCC が発生し始める時期)の肝臓組織を用いて、DNA 障害と修復、ストレス応答などに関連する FoxO3、FoxO1 の標的遺伝子の発現を計測した。しかしながら、現時点では、FoxO3 特異的で、発癌に必要な要素は特定できていない。

さらに、発癌剤 DEN に対する初期の遺伝子毒性とそれに対する応答を評価するために、DEN を投与後、24 時間、48 時間後に屠殺し、肝臓組織を採取し、解析を進めている。

(5) DR による寿命、老化制御に重要な組織の同定:

脳や白色脂肪特異的 Foxo3 欠失マウスを用いて、DR の寿命延長効果に必須な組織を同定する

試みを継続している。当初、脂肪特異的と考えられた FABP4-Cre は、脳組織にも発現していることが確認された。FABP4-Cre によって、脳と脂肪組織において Foxo3 が半欠失したマウスを用いた寿命研究では、予測に反して、自由摂食下では、寿命が短縮するが、DR では、野生型マウスと同じように寿命が延伸することが示された。よって、DR に寿命延伸効果に脳や脂肪組織は大きな影響を与えていないことが示唆された。

<引用文献>

Mattison JA, 他. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* (August 29, 2012). doi: 10.1038/nature11432.

Kenyon C, 他. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464, 1993.

Kwon E-S, 他. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 466: 498-502, 2010.

Willcox BJ, 他. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13987-13992, 2008.

Yamaza H, 他. FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell* 9: 372-382, 2010.

Shimokawa I, 他. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell* 14: 707-709, 2015.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Park S, Nayantai E, Komatsu T, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. NPY Deficiency Prevents Postmenopausal Adiposity by Augmenting Estradiol-Mediated Browning. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2018. doi: 10.1093/gerona/gly282. (査読あり)

Jenwitheesuk A, Park S, Wongchitrat P, Tocharus J, Mukda S, Shimokawa I, Govitrapong P. Comparing the Effects of Melatonin with Caloric Restriction in the Hippocampus of Aging Mice: Involvement of Sirtuin1 and the FOXOs Pathway. *Neurochem Res* 43: 144-152, 2017 doi: 10.1007/s11064-017-2369-7. (査読あり)

Park S, Komatsu T, Kim SE, Tanaka K, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. Neuropeptide Y resists excess loss of fat by lipolysis in calorie-restricted mice: A trait potential for the life-extending effect of calorie restriction. *Aging Cell* 16: 339-348, 2017. doi: 10.1111/ace1.12558. (査読あり)

Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Shimokawa I, Mori N, Furuyama T. FoxO1 signaling plays a pivotal role in the cardiac telomere biology responses to calorie restriction. *Mol Cell Biochem* 412: 119-130, 2016. doi: 10.1007/s11010-015-2615-8. (査読あり)

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* 14: 707-709, 2015. doi: 10.1111/ace1.12340. (査読あり)

[学会発表](計6件)

下川 功. カロリー制限による老化制御機構, 第29回フォーラム・イン・ドージン、2018年11月22日、熊本(招待講演)

Shimokawa I. Roles for FoxO transcription factors in the anti-aging effect of dietary restriction. The 12th International Symposium for Aging. 2-3 November, 2018, Gwangju, Korea (招待講演)(国際学会)

下川 功. ほ乳類の老化制御機構. 第70回西日本泌尿器科学会総会、2018年11月2日、長崎(招待講演)

Shimokawa I. Differential roles for FoxO1 and FoxO3 in regulation of cancer and lifespan in dietary-restricted mice. The 21st IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics. 22-26 July, 2017, San Francisco, USA (国際学会)

Shimokawa I. Anti-Ageing Effect of Dietary Restriction. *Biomembrane* 2016: Mechanisms of aging

and age-related diseases. 26-30 September, 2016 Moscow, Russia (招待講演)(国際学会)

Shimokawa I. Distinct roles of Foxo1 and Foxo3 in the anti-neoplastic and the life-extending effects of dietary restriction-Implication of Foxo3 in regulation of mitochondrial integrity during the aging process. The 2015 Cold Spring Harbor Asia Conference, 14-18 September, 2015 Suzhou, China(招待講演)(国際学会)

〔図書〕(計 4 件)

下川 功. 基礎老化研究の展望:基礎老化学会が果たす役割. 老年医学(上巻) 基礎・臨床研究の最新動向 : 51-56, 2018, 日本臨床

Shimokawa I. Growth hormone and IGF-1 axis in aging and longevity. In “Hormones in ageing and longevity” eds. Rattan SIS and Sharma R. pp. 91-106. 2017. Springer International Publishing, Gewerbestrasse, Switzerland.

Mori R, Park S, Shimokawa I. Role of the Forkhead Box O Family and Neuropeptide Y in calorie restriction. In “ Aging Mechanisms-Longevity, Metabolism, and Brain Aging, eds. Mori N, Mook-Jung I. pp199-208. 2015 Springer Japan.

Shimokawa I. Hormonal influence and modulation in aging. In Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions. Ed. Yu BP. Pp. 69-84, 2015, Springer International Publishing, Gewerbestrasse, Switzerland

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森 亮一

ローマ字氏名：MORI, Ryoichi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30509310

研究分担者氏名：パク センジュン

ローマ字氏名：PARK, Seongjoon

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：60635853

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小松 利光

ローマ字氏名：KOMATSU, Toshimitsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。