

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0009

研究課題名(和文) 超百寿者由来iPS細胞を用いたストレス耐性機構の解明と疫学的検証

研究課題名(英文) Exceptional longevity and stress resistance: an integrated research between iPS cell biology and epidemiology

研究代表者

新井 康通 (ARAI, YASUMICHI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20255467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、超百寿者由来のiPS細胞を血管内皮細胞に分化させ、酸化ストレスや低酸素ストレス耐性の分子機構を解明し、得られた分子生化学的、遺伝学的成果を、多年代高齢者コホートを用いて疫学的検証を行うことを目的とした異分野連携プロジェクトである。症例数の不足のため、iPS細胞実験から、ターゲット分子を同定するには至らなかったため、心血管防御因子であるExtracellular superoxide dismutaseを目的変数としたQTL解析を行い、候補遺伝子(rs1799895)を同定した。その結果をSONIC研究対象者1890名で解析し、頸動脈硬化などの老化形質を関連することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to identify key molecules of stress resistance in supercentenarians by means of induced pluripotent stem (iPS) cells, and replicate the findings in a cohort study of older adults, the SONIC study. First, we established iPS cells-derived endothelial cells from supercentenarians, and examined key molecules of oxidative stress and hypoxic stress responses. However, transcriptional study failed to identify key molecules because of small sample size.

Alternatively, we performed QTL analysis for extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD), a circulating antioxidative stress molecule, and identified SNP in rs1799895 as significant determinant for circulating EC-SOD. We genotyped this SNP in 1,890 subjects in the SONIC study, and found significant associations between the SNP and carotid atherosclerosis, and geriatric phenotype.

研究分野：老年医学

キーワード：超百寿者 iPS細胞 健康長寿 疫学 血管内皮 異分野連携

1. 研究開始当初の背景

地球規模で急速に進行する高齢化を背景として、高齢者の生活機能障害(disability)の予防、健康寿命の延伸が国際社会の重要な課題の一つとなっている。後期高齢者では生活機能障害の原因として、虚弱(フレイル)、骨粗鬆症・骨折、認知症などの老年症候群や多病が大半を占めるため、従来の臓器別疾患の早期発見、早期治療による疾病管理モデルの限界が指摘されており、代わって高齢者機能評価(CGA)による一次スクリーニングと、身体機能維持・増進を目的とした運動・栄養介入の有効性が期待されている。しかし、コミュニティで継続実践する健康増進プログラムの実行性を担保するためには国民が納得する明確な科学的根拠(エビデンス)と効果を測定する客観的指標(分子マーカー等)の開発が重要である。

研究代表者らは1992年から百歳高齢者(百寿者)の調査を開始し、これまで800名以上の百寿者の疫学調査を実施した。これまでの研究から、百寿者の中でも、110歳以上の超百寿者は100歳時点でも認知機能が保たれ、日常生活が自立しており、健康長寿のスーパーエリートであることを示した(Arai Y, et al. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2014; 486-94)。さらに詳細な病歴、血液バイオマーカーの検討から超百寿者の特長として動脈硬化になりにくい、糖尿病の罹患率が低い、末梢血テロメア長の短縮が見られず、細胞老化が起こりにくいことを見出し(Arai Y, et al. Ebiomedicine 2015; 2(10): 1549-58。)強い酸化ストレス耐性を持っていることが推察された。従来の観察研究では超百寿者のストレス耐性の分子機序の解明は困難であったが、研究分担者の湯浅らが開発した末梢血Tリンパ球からのiPS細胞樹立方法を用いることにより、低侵襲で安全に百寿者由来の健康長寿細胞モデルを作成することが可能となった。

一方、超百寿者研究から得られる科学的知見を、一般の高齢者の健康増進、介護予防に応用するためには、70歳、80歳代の高齢者においても超百寿者研究の結果が再現されるか、検証する必要がある。研究代表者の新井が参加する多年代高齢者の学際的コホート研究であるSONIC研究は、人口構造や地域特性が異なる、関東と関西の都市部と非都市部の4地域において、70歳、80歳、90歳、100歳の多年代高齢者を対象とした長期縦断研究である。超百寿者研究の成果を一般化する研究として適しており、本研究課題の提案につながった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、究極の健康長寿モデルである超百寿者(110歳以上の高齢者)由来のiPS細胞を血管内皮細胞に分化させ、酸化ストレスや低酸素ストレス耐性の分子機構(ターゲット分子)を解明し、得られた分子生

化学的、遺伝学的成果を、老化形質、生活習慣、社会的背景の豊富なデータを集積した多年代高齢者コホートを用いて疫学的検証を行い、エビデンスに基づく健康増進法の提言につながる基盤データベースを確立することである。

3. 研究の方法

(1)プロジェクト1では、研究分担者の湯浅らが開発した末梢血を利用する方法により、世界的にも稀有な超百寿者のiPS細胞を樹立して、健康長寿のエリートの心血管ストレス抵抗性の分子メカニズムの解明と候補分子の同定を目指した。iPS細胞を血管内皮細胞に分化誘導し、ストレス抵抗性の指標として過酸化水素添加、高血糖ストレス、低酸素刺激によるtube formationを測定した。研究分担者の中岡がストレス刺激前後のRNA発現を網羅的に解析し、候補分子の同定を試みた。

(2)プロジェクト2では、Septuagenarian, Octogenarian, Nonagenarian Investigation with Centenarian (SONIC)研究において、プロジェクト1で同定された候補分子を、疫学的に検証した。SONIC研究は、人口構造や地域特性が異なる、関東(板橋区、および西多摩地区:檜原村、日の出町、奥多摩町、青梅市の一部)および関西(伊丹市、朝来市)の都市部と非都市部の4地域において、70歳、80歳、90歳、100歳の多年代高齢者の加齢プロセスの解明、長寿、健康アウトカムや幸福感の関連要因を明らかにすることを目的とした長期縦断研究である。研究分担者の石崎(関東)権藤、神出(関西)が中心となって研究チームを組織し、医学、生物学のみならず、歯学、栄養学、心理学、社会学といった幅広い領域の研究者が参画し、以下に挙げる加齢や健康に関連する幅広い領域の変数を収集しているのが大きな特徴である。

<医学変数> 病歴(問診)、肺活量、生活習慣(飲酒、喫煙、睡眠)一般的検査(血圧、肺活量、家庭血圧)、視聴覚機能(主観的評価)、一般生化学検査(血清アルブミン、クレアチニン等)DNA (ANRIL, Klotho, APOE4, FOXO3等)、RNA発現、プロテオーム解析

<心理変数> 性格傾向(NEO-PI)、健康行動、ライフイベント、幸福感(主観的Well-being、人生満足感)、精神的健康(GDS、WHO-5)、心理的適応(選択・最適化・補償、Valuation of Life)、心理的発達(世代性、老年的超越)

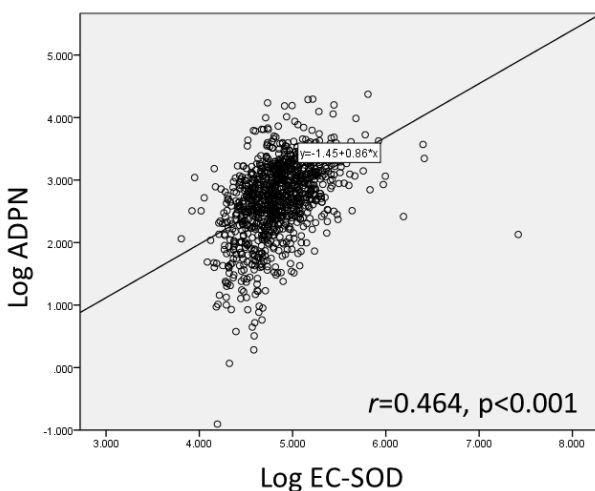
認知機能(推論、記憶、感情処理、空間認知能力)

本研究では、SONIC研究調査項目のうち、老化形質として超音波で評価した総頸動脈硬化、歩行速度・握力から評価したサルコペニア・フレイル、MOCA-Jで評価した認知機能をアウトカムとし、プロジェクト1で同定された心血管ストレス抵抗防御因子と老化形質の関連について検討した。

4. 研究成果

(1)プロジェクト1では、湯浅らの開発した方法により、超百寿者の末梢血からiPS細胞を樹立した。さらに、未分化iPS細胞を1型コラーゲンをコートした培養皿に移し、Wntシグナルを活性化し、VEGFを加えることにより血管内皮細胞に分化誘導することに成功した。予備的な実験では、超百寿者由来iPS細胞では、過酸化水素負荷、高血糖負荷に対する応答には差が見られなかったが、低酸素刺激下でtube formationに差がある傾向を認められた。しかし、解析例数が4例と少なく、ストレス抵抗性を制御する候補分子を同定するには至らなかった。

そこで、すでに解析結果が得られている超百寿者100名および百寿者300名の全ゲノム配列解析データを活用し、健康長寿エリートの血管防御因子に関連する遺伝多型を同定することにより、候補分子を絞り込む戦略を取り入れた。まず、超百寿者、百寿者の保存血漿を用いて、低酸素刺激応答のキー分子であるHIF-1により発現が制御されているエリスロポイエチン(EPO)濃度、血管内皮に分布し、血液中の酸化ストレス除去にはたらくextracellular superoxide dismutase (EC-SOD)、および抗炎症作用、インスリン感受性作用を持ち、長寿との関連が示されているアディポネクチン(ADPN)の濃度を測定した。その結果、EPO、ES-SOD、ADPN濃度とも超百寿者、百寿者では若年対照群に比較し、高くなっており、低酸素応答、酸化ストレス応答が亢進していることが明らかとなった(論文準備中)。さらに、EC-SOD、ADPN濃度は有意に相関し(図1)、両分子が協調して心血管システムの酸化ストレス、抗炎症防御的に働いている可能性が示唆された。



<図1. EC-SODとアディポネクチンの相関>

これらの結果は、血漿プロテオミクス解析によって酸化ストレス分子の発現亢進が超百寿者の特徴であることを示したMiuraらの報告(Miura Y, et al. Exp Gerontol. 2011;

46 :81-5.)と一致しており、健康長寿の達成のカギとなるパスウェイであることが示唆された。

次いで、超百寿者、百寿者の全ゲノム配列解析データを活用し、これらの分子を目的変数としたQTL解析を行い、EC-SOD濃度と有意に相関するSOD3のSNP(rs1799895)およびADPN濃度に相関するrs7648325を同定した。特にSOD3のrs1799895多型はヘテロ型で9倍、ホモ型では24倍もEC-SOD濃度が高く、これまで欧米のコホート研究で報告されている知見と一致した。この結果をプロジェクト2の多年代高齢者コホート研究で検討した。

(2)プロジェクト2では研究分担者の石崎(関東調査)、権藤(関西調査)を中心に、SONIC研究の追跡調査を行った。70歳コホートは、2016-2017年度は6年後の追跡調査を行い、関東地区、関西地区の合計で846名(男性459名、女性387名)の参加を得た。80歳コホートについては、2017年度は6年後追跡調査の合計488名(男性238名、女性250名)の参加を得た。これまでの調査を累計すると、両地区合わせて約3,000名の多年代高齢者コホートを確立した。

頸動脈エコーによる動脈硬化評価は関東調査では新井が、関西調査では神出が解析を行った。新井は、関東調査に参加した70歳高齢者503名、80歳高齢者462名、90歳高齢者160名における動脈硬化危険因子と頸動脈プラークの関連を解析し、70歳、80歳、90歳と高齢になるに従い、高血圧、脳梗塞、心疾患の既往が増えること、プラークのない対象者の割合が減り、中高度以上のプラークを認める者の割合が増えること、プラークスコアと微量アルブミン尿が関連することを報告した(学会発表1.)。

神出は、SONIC研究に参加した70歳代、80歳代の1890名を対象に、プロジェクト1で同定されたSOD3遺伝子のSNP rs1799895(CC:GC:GG=87.6:8.1:0.2%)の多型を測定し、老化形質である頸動脈エコー、歩行速度、認知機能との関連を検証した。SOD3 rs1799895のGアレルを持つものでは、SODのヘパリン結合部位にアミノ酸置換をきたす結果、血管内皮との結合力が弱く、SOD分子の分布が血管壁から血中に移行し、虚血性心疾患や慢性肺疾患のリスクが高まると報告されているが、本邦における報告は限られている。神出らの解析の結果、女性においてGアレルを有することが頸動脈硬化と有意に関連し、特に80歳代女性においてその傾向が顕著であった。さらに70歳代男性においてはGアレルを有することが歩行速度と関連した。これらはいずれも交絡因子調整後の結果であり、SOD3 rs1799895多型が老年症候群関連遺伝子であることが示唆された(論文準備中)。

超百寿者、百寿者のQTL解析からADPN濃度との関連が明らかとなったrs7648325につ

いても、SONIC 研究参加者 1890 名について、動脈硬化、フレイル、認知症の関連を検討したが、有意な関連は見られなかった。

さらに、研究期間中、SONIC 研究における遺伝解析を活用し、高齢者の国際共同研究に貢献することができた。ハワイ大学の Wilcox 教授の研究チームとの共同で、ハワイ在住日系人コホートで見つかった FOX3A 遺伝子多型と高血圧の関連を SONIC 研究の 70 歳コホートで追試し、論文報告した(文献 11)。

以上の結果から、超百寿由来 iPS 細胞のストレス耐性実験から健康長寿の分子マーカーを同定するには至らなかったが、超百寿者の血中酸化ストレス、低酸素ストレス応答分子の解析から、加齢に伴い EC-SOD、EPO、ADPN 濃度が上昇し、これらの分子が心血管システムの防御因子として働いている可能性を見出した(論文準備中)。さらに、超百寿者の全ゲノム配列解析結果を活用し、EC-SOD 濃度を規定する SNP を同定し、SONIC 研究の対象者である 70 歳、80 歳代高齢者 1890 名において、この SNP の老化形質との関連を見出した。本研究によって iPS 細胞研究と学際的高齢者コホート研究との連携が確立され、今後、さらに基礎医学と学際的コホート研究を繋ぐトランゼショナルな研究の展開を目指す。

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 16 件)

- 1) Nagasawa M, Takami Y, Akasaka H, Kabayama M, Maeda S, Yokoyama S, Fujimoto T, Nozato Y, Imaizumi Y, Takeda M, Itoh N, Takeya Y, Yamamoto K, Sugimoto K, Nakagawa T, Masui Y, Arai Y, Ishizaki T, Ikebe K, Gondo Y, Kamide K, Rakugi H. High plasma adiponectin levels are associated with frailty in a general old-old population: The Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians study. Geriatr Gerontol Int. 査読有, 2018 Feb 2. doi: 10.1111/ggi.13258.
- 2) Ikebe K, Gondo Y, Kamide K, Masui Y, Ishizaki T, Arai Y, et al. Occlusal force is correlated with cognitive function directly as well as indirectly via food intake in community-dwelling older Japanese: From the SONIC study. 査読有, PLoS One. 2018 Jan 5;13(1):e0190741. doi: 10.1371/journal.
- 3) Arai Y, Sasaki T, Hirose N. Demographic, phenotypic, and genetic characteristics of centenarians in Okinawa and Honshu, Japan: Part 2 Honshu, Japan. 査読有, Mech Ageing Dev. 2017 Feb 16. pii: S0047-6374(16)30235-4. doi: 10.1016/j.mad.2017.02.005.
- 4) Gondo Y, Hirose N, Yasumoto S, Arai Y, Saito Y. Age verification of the longest lived man in the world. Exp Gerontol. 査読有, 2017;99:7-17. doi: 10.1016/j.exger.2017.08.030.
- 5) Ogawa T, Uota M, Ikebe K, Arai Y, Kamide K, Gondo Y, Masui Y, Ishizaki T, et al. Longitudinal study of factors affecting taste sense decline in old-old individuals. J Oral Rehabil. 査読有, 2017; 44(1): 22-29. Doi:10.1111/joor.12454.
- 6) Ryuno H, Kamide K, Gondo Y, Kabayama M, Oguro R, Nakama C, Yokoyama S, Nagasawa M, Maeda-Hirao S, Imaizumi Y, Takeya M, Yamamoto H, Takeda M, Takami Y, Itoh N, Takeya Y, Yamamoto K, Sugimoto K, Nakagawa T, Yasumoto S, Ikebe K, Inagaki H, Masui Y, Takayama M, Arai Y, Ishizaki T, Takahashi R, Rakugi H. Longitudinal association of hypertension and diabetes mellitus with cognitive functioning in a general 70-year-old population: the SONIC study. 査読有, Hypertens Res. 2017. doi: 10.1038/hr.2017.15.
- 7) Okubo H, Inagaki H, Gondo Y, Kamide K, Ikebe K, Masui Y, Arai Y, Ishizaki T, et al. SONIC Study Group. Association between dietary patterns and cognitive function among 70-year-old Japanese elderly: a cross-sectional analysis of the SONIC study. 査読有, Nutr J. 2017; 16(1):56. doi: 10.1186/s12937-017-0273-2.
- 8) Tada S, Ikebe K, Kamide K, Gondo Y, Inomata C, Takeshita H, Matsuda KI, Kitamura M, Murakami S, Kabayama M, Oguro R, Nakama C, Kawai T, Yamamoto K, Sugimoto K, Shintani A, Ishihara T, Arai Y, et al. Relationship between atherosclerosis and occlusal support of natural teeth with mediating effect of atheroprotective nutrients: From the SONIC study. 査読有, PLoS One. 2017;12(8):e0182563. doi: 10.1371/journal.pone.0182563. eCollection 2017.
- 9) Takao M, Hirose N, Arai Y, Mihara B, Mimura M. Neuropathology of supercentenarians - four autopsy case studies. 査読有, Acta Neuropathol Commun 2016; 4: 97. PMID: 27590044; DOI: 10.1186/s4 0478-016-0368-6.
- 10) Ryuno H, Kamide K, Gondo Y, Nakama C, Oguro R, Kabayama M, Kawai T, Kusunoki H, Yokoyama S, Imaizumi Y, Takeya M,

Yamamoto H, Takeda M, Takami Y, Itoh N, Yamamoto K, Takeya Y, Sugimoto K, Nakagawa T, Ikebe K, Inagaki H, Masui Y, Ishizaki T, Takayama M, Arai Y, Takahashi R, Rakugi H. Differences in the association between high blood pressure and cognitive functioning among the general Japanese population aged 70 and 80 years: The SONIC study. *Hypertens Res.* 査読有, 2016; 39(7):557-63. doi: 10.1038/hr.2016.25.

- 11) Morris BJ, Chen R, Donlon TA, Evans DS, Tranah GJ, Parimi N, Ehret GB, Newton-Cheh C, Seto T, Willcox DC, Masaki KH, Kamide K, Ryuno H, Oguro R, Nakama C, Kabayama M, Yamamoto K, Sugimoto K, Ikebe K, Masui Y, Arai Y, Ishizaki T, Gondo Y, Rakugi H, Willcox BJ. Association Analysis of FOXO3 Longevity Variants With Blood Pressure and Essential Hypertension. *Am J Hypertens.* 査読有 2016; 29(11): 1292-1300. doi: 10.1093/ajh/hpv171.

〔学会発表〕(計 23 件)

- 1) ARAI Y, et al. Urinary albumin-to creatinine ratio and carotid atherosclerosis in the very old. The 21th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (2017.07.23-27).
- 2) Kabayama M, Kamide K, Gondo Y, et al. The Association of Blood Pressure With Frailty Among Community Dwelling Older People. The 21th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (2017.07.23-27).
- 3) Gondo Y, Hirose N, Masui Y, Inagaki H, Arai Y. Paradoxical Association Between Longevity Related Personality Traits and Mortality in Centenarians. The 21th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (2017.07.23-27).
- 4) Sekiguchi T, Kamide K, Ikebe K, et al. Association between Protein Intake and Change in Renal Function Among Japanese General Old Subjects. The 21th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (2017.07.23-27).
- 5) Ryuno H, Kamide K, Kabayama M, Sugimoto K, Ishizaki T, Arai Y, Gondo Y, Rakugi H. Association of Genetic Variation of TOMM40 with Cognitive Decline in Older Adults: The SONIC Study. The 21ST IAGG World Congress of Gerontology & Geriatrics. (2017.7.23-27).
- 6) Arai Y. Supercentenarian Study: The

Quest for Biological Determinants of Healthy Longevity. French-Japanese Scientific Meeting on Neurobiology of Diseases and Ageing (2017.03.24).

- 7) 新井康通. 超百寿者研究：長寿のエリート 105 歳の健康の秘訣第 145 回老年学・老年医学公開講座 (2017.01.20)
- 8) Masui Y, Gondo Y, Nakagawa T, Ishioka, Y, Arai Y, Kamide K, Ikebe K, Ishizaki T. Buffering Effects of Gerotranscendence on Mental Health When Experiencing Physical Function Decline, The Gerontological Society of America's 68th Annual Scientific Meeting (2016.11.16-20).
- 9) Arai Y. Supercentenarian study: translating basic aging research into geriatric practice. *Frontiers in aging research toward healthy longevity ~ 健康長寿をめざした老化研究の最前線 ~*. (2016.11.17).
- 10) Arai Y. From Centenarian to Supercentenarian. Toward deeper understanding of healthy longevity. A*STAR-AMED Join Workshop on Aging(2016.3.16).

〔図書〕(計 1 件)

Gondo Y, Masui Y, Kamide K, Ikebe K, Arai Y, and Ishizaki T. : SONIC Study: A Longitudinal Cohort Study of the Older People as Part of a Centenarian Study. In N.A. Pachana (ed.), *Encyclopedia of Geropsychology*, Springer Science+Business Media Singapore. pp. 2227-2236, 2017 (* 査読なし *)

〔その他〕

ホームページ
慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター
<http://www.keio-centenarian.com/>
SONIC 研究
<http://www.sonic-study.jp/>

新聞掲載

朝日新聞 2018 年 4 月 4 日朝刊
「75 歳以上のスタチン服用、必要？ 脂質異常症の治療」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 康通 (ARAI, Yasumichi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号 : 20255467

(2) 研究分担者

湯浅 慎介 (YUASA, Shinsuke)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号 : 90398628

石崎 達郎 (ISHIZAKI, Tatsuou)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号：30246045

神出 計 (KAMIDE, Kei)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30246045

権藤 恭之 (GONDO, Yasuyuki)
大阪大学・人間科学研究科・准教授
研究者番号：40250196

中岡 博史 (NAKAOKA, Hiroshi)
国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門・助教
研究者番号：70611193

(3) 連携研究者

池邊 一典 (IKEBE, Kazunori)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70273696

井ノ上 逸郎 (INOUE, Itsuro)
国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門・教授
研究者番号：00192500