

令和元年5月31日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08604

研究課題名(和文)細胞の老化に起因する肺組織の病態解析

研究課題名(英文)Roles of cellular senescence in pulmonary disease

研究代表者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO, Masataka)

国立研究開発法人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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主任研究者が樹立した肺組織から老化細胞を特異的に排除可能な遺伝子改変マウスを利用し、肺組織の老化および呼吸器疾患における老化細胞の役割について解析を行った。

老齢個体の肺組織から老化細胞を排除すると、加齢によって低下した呼吸器能の回復が認められたことから、肺組織の老化に細胞老化は重要な役割を持つことが示唆された。肺組織の老化は、様々な呼吸器疾患のリスク因子となることが知られている。本研究では、肺気腫モデルにおいて老化細胞が病態を増悪化させる因子であることを明らかにした。さらにsenolytic薬が肺気腫モデルにおいて病態を緩和させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞は加齢とともに組織中に蓄積することは古くから知られていたが、組織老化との関係については不明であった。本研究では主任研究者が独自に樹立した老化細胞除去マウスを用い、肺組織の老化と細胞老化の因果関係について初めて明らかにした。また、先進諸国では慢性閉塞性肺疾患(COPD)による死亡が増加している。本研究ではCOPDの主要病態である肺気腫モデルを用いて解析を行い、老化細胞が気腫を増悪化させる因子であること、さらに老化細胞が同疾患の有効な創薬標的であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Senescent cells accumulate in several tissues during aging, while its biological consequence remains unclear. In this study, we addressed the roles of cellular senescence in pulmonary aging and disease using transgenic mice of which senescent cells can be eliminated through toxin-mediated cell knockout system.

We found that the pulmonary function, which was declined in aged animals, was restored upon the elimination of senescent cells, suggesting that senescent cells contribute to the lung aging and that aging phenotypes are at least partly reversed by targeting the senescent cells.

Next, we investigated if senescent cell-dependent changes in lung tissue are involved in the development of pulmonary emphysema. We found that genetic or pharmacological elimination of senescent cells ameliorates the emphysema-associated pathologies. Together, these results strongly suggest that senescent cells are potential therapeutic target for pulmonary emphysema.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 老化 肺 呼吸器疾患 肺気腫 モデル動物 Senolytic薬

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

1. 研究開始当初の背景

細胞老化を起し多細胞(老化細胞)は加齢とともに様々な組織に蓄積する。細胞老化は古くからがん抑制機構として機能することが知られていたが、組織老化との因果関係については不明であった。10年ほど前に、老化細胞は SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる特異的な分泌表現型を示し、周辺の環境に影響を与えることが明らかになった。近年、SASP と組織老化の関係が注目されている。

2. 研究の目的

主任研究者は、マウス細胞老化に必須である *ARF* 遺伝子発現制御領域を用いて、老化細胞特異的にジフテリア毒素受容体 (DTR) およびルシフェラーゼ (Luc) を発現するトランスジェニックマウス (ARF-DTR マウス) を最近樹立した。ARF-DTR マウスでは特に肺組織で加齢に伴って高いルシフェラーゼ発光シグナルが観察される。本研究では ARF-DTR マウスを用い、肺組織の老化や疾患において細胞老化が持つ役割について明らかにすることを最初の目的とし、続いて新たな創薬基盤の確立を目指し、老化細胞を標的とした創薬の有効性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ARF-DTR マウスに PBS またはジフテリア毒素 (DT) を 2 週間おきに 2 回投与し、最初の投与から約 1 か月後に、生体イメージングと呼吸機能検査、組織切片の作製、RNA の抽出を行った。

(2) 5 ヶ月齢 ARF-DTR マウスに豚膵臓由来エラスターゼ (PPE) を経鼻投与し、投与 3 週間後に肺組織の解析を行った。また PPE 投与 1 週間後に肺胞洗浄液を採取した。

4. 研究成果

(1) 2 ヶ月齢および 12 ヶ月齢の ARF-DTR マウスの Luc 発光シグナルを、生体イメージングにより解析した結果、2 ヶ月齢 ARF-DTR マウスおよび 12 ヶ月齢野生型マウスでは Luc 発光は検出されなかったが、12 ヶ月齢の ARF-DTR マウスでは複数の部位においてシグナルが確認された (図 1A)。開腹して確認したところ、発光シグナルは主に肺組織と脂肪組織で観察された。12 ヶ月齢の ARF-DTR マウスに、DT を腹腔内投与すると、投与後 48 時間以内に Luc 発光シグナルの消失が認められた (図 1B)。

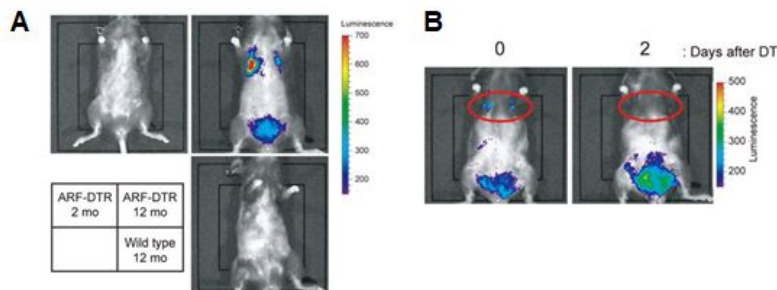


図 1. 生体イメージングによる Luc 発光シグナル解析。(A) 2 ヶ月齢および 12 ヶ月齢 ARF-DTR マウス、12 ヶ月齢野生型マウスにおける Luc 発光シグナル。(B) 12 ヶ月齢 ARF-DTR マウスの DT 投与前、および投与 2 日後の Luc 発光シグナル。赤線の枠は、肺組織の Luc 発光シグナルを示す。Hashimoto et al, *JCI Insight* 2016 より引用。

(2) 次に、ARF-DTR マウス肺組織における細胞老化遺伝子 (*ARF*, *INK4a*, *p21*) の発現を調べた。2 ヶ月齢と比べ 12 ヶ月齢マウスではすべての遺伝子の発現上昇が見られた (図 2)。しかしながら DT を投与した ARF-DTR マウスではこれら遺伝子の発現レベルは 2 ヶ月齢と同程度に低下しており、ARF-DTR マウス肺組織において DT 処理により老化細胞が排除されていることが示唆された。

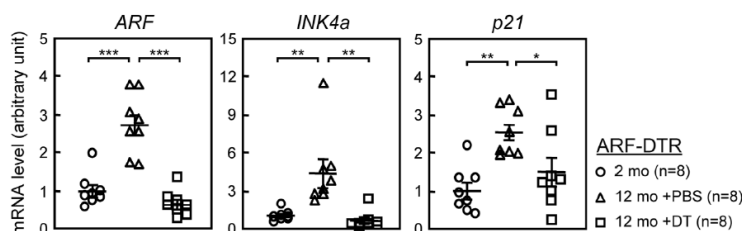


図 2. ARF-DTR マウス肺組織における *ARF*, *INK4a*, *p21* 遺伝子の発現。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Hashimoto et al, *JCI Insight* 2016 より引用。

(3) 肺組織の老化は、組織弾性の低下（コンプライアンス値の上昇）によって特徴づけられる。ARF-DTR マウスにおいて肺組織コンプライアンス値（Cst; 静肺コンプライアンス）を測定したところ、2ヶ月齢と比べ12ヶ月齢のマウスではCst値に顕著に上昇していた（図3）。一方、DTを投与したARF-DTRマウスではCst値の有意に低下していたが、野生型マウスでは、Cst値に変化は見られなかった。これらの結果から、老化細胞を排除することにより、肺組織の弾性を回復可能であることが強く示唆された。

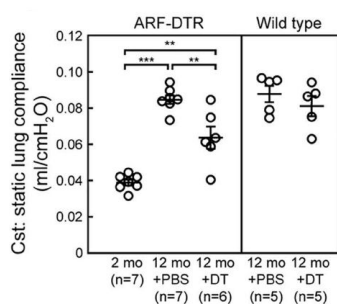


図 3. 老化細胞排除による肺組織弾性の回復.
Hashimoto et al, *JCI Insight* 2016 より引用.

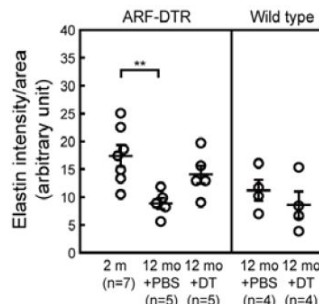


図 4. 老化細胞排除によるエラスチン線維の回復.
Hashimoto et al, *JCI Insight* 2016 より引用.

(4) 加齢に伴う肺組織弾性の低下は、エラスチン線維量の減少に起因すると考えられている。そこで次に、老化細胞を排除した時に観察された組織弾性の変化と、エラスチン線維量の関係について調べた。マウス肺組織切片を作製し、エラスチン線維を免疫染色後、染色像からイメージベースの半定量実験を行った。先行研究でも示されているように、2ヶ月齢のマウス肺組織と比べ、12ヶ月齢のマウス肺組織エラスチン線維量の低下が認められた（図4）。しかしながらDTを投与したARF-DTRマウスではエラスチン線維量が回復し、野生型マウスではDTの効果は見られなかった。以上の結果から、肺組織の老化細胞はエラスチン線維を減少させることにより組織弾性を低下させることが示唆された。

(5) 次に本研究では、肺組織から抽出したRNAを用いてSASP関連因子の遺伝子発現解析を行った。図5に示した様に、調べた遺伝子のうちマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-10およびMMP-12の発現に、老化細胞の動態と関連した変動がみられた（図5）。MMP-10とMMP-12タンパク質は、エラスチンを分解する活性を持つことが報告されている、このことから、老化細胞の動態とエラスチン線維の変動の相関は、これらMMP遺伝子の発現変化による可能性が考えられた。

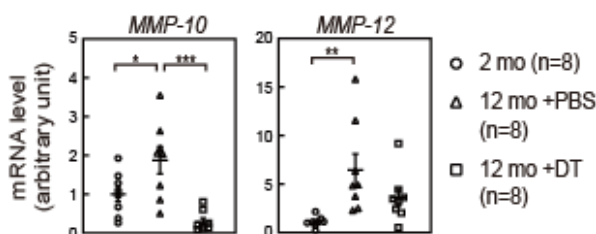


図 5. 老化細胞排除が肺組織遺伝子発現に及ぼす影響. ARF-DTR マウス肺組織からRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより図に示した遺伝子の発現変化について解析を行なった. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Hashimoto et al, *JCI Insight* 2016 より引用.

(6) 以上の結果より、肺組織の老化には加齢によって蓄積する老化細胞が重要な役割を持つことが強く示唆された。組織の老化は様々な疾患のリスク因子となる。肺組織でも同様に、現在先進国で死因の上位を占める慢性閉塞性肺疾患(COPD; chronic obstructive pulmonary disease)の罹患率は加齢とともに上昇する。本研究では、肺組織内の老化細胞が、呼吸器疾患の生じやすい環境を形成している可能性について検証を行った。COPDの主要病態である肺気腫のモデルとして、PPE誘導性肺気腫モデルを作製した。PPEとDTの投与は図6Aのスケジュールに従って行った。PPEを投与して3週間後の肺組織を観察したところ、広範囲に及ぶ肺胞壁の崩壊が認められた。しかしDTを投与したARF-DTRマウスの肺組織では、肺胞壁の崩壊は部分的に抑制されていた（図6B）。肺胞径（Mean linear intercept）を測定したところ、PPEによる肺胞径の拡大が確認されたが、DTにより肺胞径の拡大は抑制されていた（図6C）。

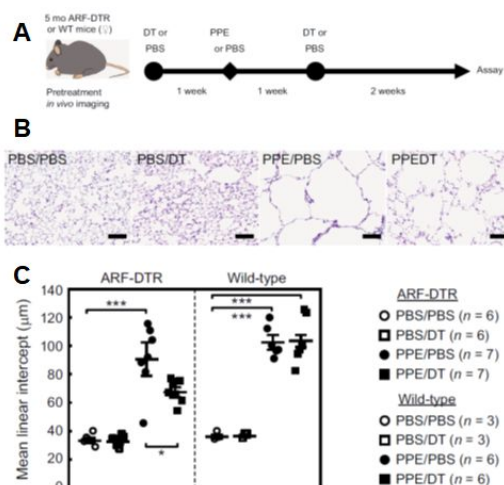


図 6. PPE誘導性肺気腫モデル。(A) PPE投与スケジュール。(B) HE染色像。Bar: 100μm。(C) 平均肺胞径. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Mikawa et al, *Aging Cell* 2018 より引用.

(7) 次に上記マウスを用いて、組織弾性の測定を行った。PPE を投与した野生型および ARF-DTR マウスでは、肺胞壁の崩壊により組織弾性が消失し、Cst 値に顕著な上昇が認められた。しかし DT を投与した ARF-DTR マウスでは、Cst 値の上昇はほぼ完全に抑えられていた。一方、野生型マウスにおいては、DT の効果は見られなかった。また、PPE 非投与の ARF-DTR マウスでは DT による Cst 値の変動は見られなかったが、これは図 4 の実験が 1 年齢のマウスを使用したのに対し、本実験ではまだ組織老化が見られない 5 ヶ月のマウスを使用したためであると考えられる。これらの結果から、老化細胞の排除により PPE による呼吸機能の低下を抑制することが可能であることが示唆された。

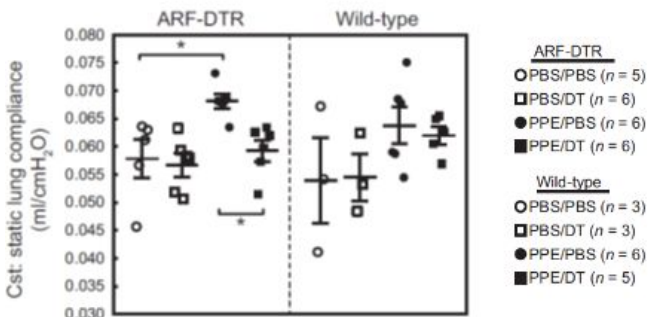


図 7. PPE 誘導性肺気腫モデルにおける肺組織コンプライアンス値。データは分散分析後多重検定を行った。
* $P < 0.05$. Mikawa et al, *Ageing Cell* 2018 より引用。

(8) PPE 誘導性肺気腫においては、PPE 処理後初期に肺胞内で惹起される炎症反応が病態の進行に重要であり、炎症を抑えることにより気腫の抑制・緩和が可能である。PPE 吸入 1 週間後のマウスから、肺胞洗浄液 (BALF; bronchoalveolar lavage fluid) を調製し、BALF 中の細胞を調べた結果、BALF 中に含まれる細胞数の顕著な上昇が認められた (図 8)。BALF 細胞の大部分 (8 割以上) は肺胞マクロファージが占めており、細胞数の変動は肺胞マクロファージの増加をほぼ反映するものであった。しかしマクロファージ以外にも、好中球、好酸球の増加が認められ、PPE により肺組織内の炎症が惹起されたことが示された。しかしながら、DT を投与した ARF-DTR マウスでは、これらの細胞増加は少なくとも部分的に抑制されていたことから、肺組織中の老化細胞は PPE によって惹起される炎症反応を促進することにより、病態を増悪化させることが示唆された。

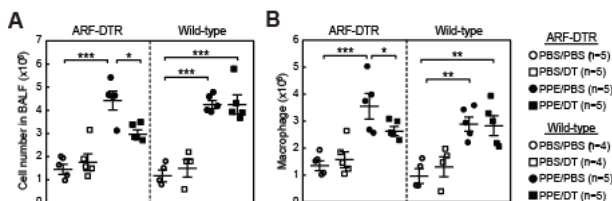


図 8. 老化細胞除去が肺胞内炎症細胞動態に与える影響。(A) BALF 全細胞数。(B) マクロファージ数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Mikawa et al, *Ageing Cell* 2018 より引用。

(9) 本研究の結果は、肺気腫の治療・予防において老化細胞が有効な標的となり得ることを強く示唆している。しかしながら、上の実験で用いた老化細胞の除去は遺伝子改変に依存した系であるために、ヒトへ応用するには薬理的な老化細胞のターゲティングが現実的な手段であると考えられる。近年、老化細胞特異的に細胞死を誘導する活性を持つ薬剤 (senolytic 薬) が複数報告されている。そこで本研究では senolytic 薬のひとつである ABT-263 を用い、PPE 誘導性肺気腫モデルにおける効果について調べた。ARF-DTR マウスに ABT-263 と PPE を図 9A に示したスケジュールで投与し、リアルタイム PCR により肺組織内の細胞老化マーカー遺伝子の発現について調べた結果、ABT-263 を投与したマウスでは減少が認められた (図 9B)。次にこれらのマウスを用いて呼吸機能検査を行った。その結果、ABT-263 を投与したマウスでは、PPE による Cst 値の上昇が抑制されていた (図 10A)。さらに、これらのマウス肺組織形態観察を行ったところ、ABT-263 を投与したマウスの肺組織では、PPE の投与によって生じる肺胞壁の崩壊が顕著に抑制されていた (図 10B および C)。以上の結果から、ABT-263 は PPE によって誘導される気腫病態を抑制する効果を持つことが強く示唆された。

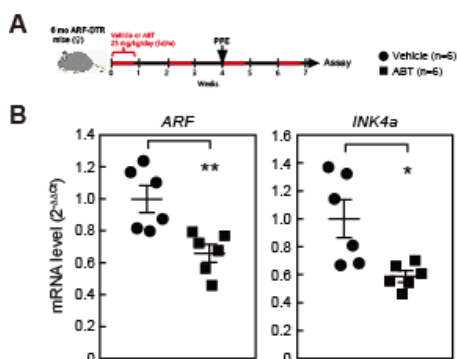


図 9. Senolytic 薬による老化細胞の排除。(A) 薬剤投与スケジュール。(B) 肺組織における ARF および INK4a mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析を行った。* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. Mikawa et al, *Ageing Cell* 2018 より引用。

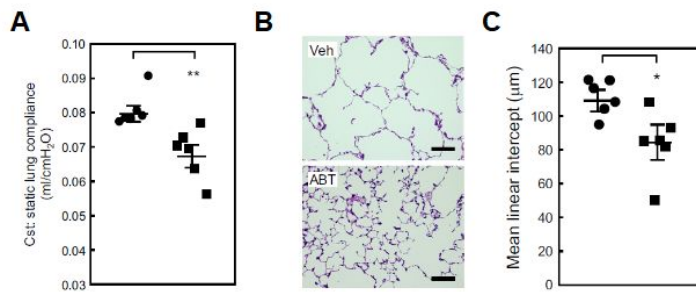


図 10. Senolytic 薬が肺気腫病態に与える影響。(A) 静肺コンプライアンス(Cst)値。(B) 肺組織切片の代表的 HE 染色像。(C) 平均肺胞径。データは両側 t 検定により統計解析を行った。*; $p < 0.05$. **; $p < 0.01$. Mikawa et al, *Aging Cell* 2018 より引用。

(10) 以上、本研究結果からは、肺組織の老化は少なくとも部分的に組織内に直積する老化細胞によって引き起こされ、老化細胞を排除することにより機能が低下した呼吸機能を回復可能であること、さらに肺気腫の進行が老化細胞をターゲティングすることにより抑えられることが強く示唆された。ABT-263 は抗アポトーシス活性をもつ Bcl-2 ファミリータンパク質の活性を阻害する薬剤であり、米国では抗がん剤としてヒトに使用されている。しかし、ABT-263 は重篤な副作用を示す可能性があり、ヒト肺気腫の治療に利用できるかは不明である。しかしながら本研究の結果は、少なくとも薬理学的な老化細胞のターゲティングが肺気腫の治療に有効な手段となり得ることを示唆しており、将来的に副作用の少ない senolytic 薬の開発と応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Mikawa R., Suzuki Y., Baskoro Y., Kanayama K., Sugimoto K., Sato T., and Sugimoto M. Elimination of p19^{ARF}-expressing cells protects against pulmonary emphysema in mice. *Aging Cell* 30. e12827. 2018. 査読有

Hashimoto M., Asai A., Kawagishi H., Mikawa R., Iwashita Y., Kanayama K., Sugimoto K., Sato T., Maruyama M., and Sugimoto M. Elimination of p19^{ARF}-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI insight* 1(12). e88057. 2016. 査読有 (2016 Aug. ICSA Research Article of the Month)

三河隆太、杉本昌隆 肺の老化メカニズムと肺気腫 - 細胞老化の視点から 分子呼吸病 23(1), 1-4, 2019 年 3 月

川岸裕幸、三河隆太、杉本昌隆 細胞老化と組織老化 日本臨牀 76 巻 増刊号 5, 114-118, 2018.

三河隆太、杉本昌隆 老化細胞除去モデルと senolytic 薬 Semigenetic and pharmacological approaches to senolysis. *Anti-Aging Medicine* 13(4), 30-36, 2017.

杉本昌隆、三河隆太 組織の老化と細胞老化 - Pathophysiological roles of cellular senescence in tissue aging *BIO Clinica* 32(8), 756-760, 2017.

三河隆太、杉本昌隆 細胞老化研究の新展開 - 老化細胞は新たな創薬標的となるか - *Biomedical Gerontology* 41 No.2, 31-37, 2017. 査読有

杉本昌隆 細胞老化研究の新展開—The light and dark sides of cellular senescence - *Geriatric Medicine 老年医学* Vol.55 No.5, 477-480, 2017

[学会発表](計 12 件)

杉本昌隆 肺組織の老化と細胞老化 第 18 回日本再生医療学会学術総会、神戸、2019 年 3 月 26 日 招待講演

Sugimoto M. Cellular senescence in pulmonary aging and disease. 第 77 回日本癌学会学術総会シンポジウム、大阪、2018 年 9 月 28 日 招待講演 (English)

杉本昌隆 呼吸器の老化・疾患における細胞老化の役割. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム、福岡、2018 年 9 月 7 日

Sugimoto M. Pathophysiological roles of cellular senescence in pulmonary diseases. The 4th ICAH-NCGG symposium, 台北, 2018 年 5 月 10 日 招待講演

杉本昌隆 組織老化・疾患における細胞老化の役割. 第 3 回川島カンファレンス 特別講演、岐阜県、2017 年 11 月 11 日 招待講演

杉本昌隆 Roles of cellular senescence in pulmonary aging and disease. 第 49 回日本結合組織学会学術大会ワークショップ、三重県、2017 年 6 月 17 日 招待講演

Sugimoto M. Pathophysiological roles of p19ARF in pulmonary aging. 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム 横浜、2016 年 11 月 30 日 招待講演 (English)

杉本昌隆 呼吸器の加齢性変化における癌抑制タンパク質 ARF の役割. 第 9 回 Symphony 東京、2016 年 9 月 18 日 招待講演

Sugimoto, M. Pathophysiological roles of cellular senescence in lung aging. NCGG-ICAH symposium, 台北、2016 年 4 月 15 日 招待講演 (English)

Komoda K., Mikawa R. and Sugimoto M. Senescence-dependent alveolar factor promotes metastatic lung cancer in mice. 第 41 回日本基礎老化学会大会、東京、2018 年 5 月 31 日

三河隆太、杉本昌隆 細胞老化の除去による肺気腫病変の抑制. ConBio 2017, 神戸、2017 年 12 月 8 日

三河隆太、鈴木洋平、佐藤 匡、杉本昌隆 Clearance of senescent cells ameliorates emphysema-associated pathologies in mice. 第 30 回日本老年学会総会、名古屋、2017 年 6 月 15 日

〔図書〕(計 1 件)

杉本昌隆 (共著日本語訳) 福井次矢、黒川 清 日本語版監修 ハリソン内科学日本語版 第 5 版、メディカル・サイエンス・インターナショナル 94e, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/research/news/20160810.html>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 匡

ローマ字氏名：(SATO, Tadashi)

研究協力者氏名：杉本和史

ローマ字氏名：(SUGIMOTO, Kazushi)

研究協力者氏名：金山和樹

ローマ字氏名：(KANAYAMA, Kazuki)

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。