

令和元年6月10日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08713

研究課題名(和文)新規エネルギー代謝関連分子WDR6による老化制御機構と新たな老化病態モデル構築

研究課題名(英文) Analysis the aging mechanisms via WDR6 and aim for building new animal aging model

研究代表者

小松 利光 (KOMATSU, Toshimitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・技術職員

研究者番号：70380962

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)：新規代謝調節分子WDR6について、その機能を明らかにするため全身性および脳特異的にWDR6を欠損したマウスを作製し、解析を行った。その結果、全身性WDR6欠損マウスは成熟後に皮膚と関節に著しい炎症、脾臓・リンパ節腫大を示し、単球系細胞の増殖など、老化ではなく自己炎症性疾患を強く疑う表現型を示した。カロリー制限(CR)を施すと、これらの病態が抑制された。一方、通常飼育下の脳特異的WDR6欠損マウスでは、全身性欠損マウスで見られた病態は観察されなかったが、CR下ではCRの抗老化効果を減弱させるような結果が得られた。このことは、WDR6が各組織において異なる役割を有していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりWDR6の変異が自己炎症性疾患を引き起こす可能性が示された。遺伝性自己炎症性疾患は難病に指定されているものが多く、近年次々と新たな自己炎症性疾患が発見されている。WDR6はまた未発見の自己炎症性疾患の原因遺伝子である可能性が高く、今後のヒトを含めた更なる解析により自己炎症性疾患の動物モデル構築と治療法開発に期待できる。脳特異的欠損モデルでは、全身性欠損マウスのような疾患を示さない点、CRの低インスリンなどの特徴的变化を減弱させる点などから、WDR6が組織特異的な機能を有していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Insulin signal is one of the major regulatory signals of aging processes. Previously, we have been reported that WDR6 (WD repeat protein 6) functions as a novel insulin signal molecule. In this research, we analyzed the function of WDR6 using ubiquitous WDR6 KO mice and brain-specific WDR6 KO (bWDR6 KO) mice to reveal the function of WDR6 gene. Unexpectedly, ubiquitous WDR6 KO mice showed autoinflammatory-like symptoms, not aging-symptoms, in adult. Calorie restriction (CR) suppressed the autoinflammatory-like symptoms. It is possible that WDR6 is one of the responsible gene of autoinflammatory. The phenotype of bWDR6 KO mice was normal like that of wild type mice under normal condition. However, the benefit effect of CR in bWDR6 KO mice was attenuated under CR. These results suggest that WDR6 has different roles in tissues.

研究分野：基礎老化学

キーワード：WDR6 自己炎症性疾患 老化 カロリー制限

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

1. 研究開始当初の背景

カロリー制限 (CR) は、哺乳類の老化や加齢に伴う疾患の発症を抑制し、寿命を延長する最も単純で再現性の高い方法である。この分子メカニズムについては、まだ完全に解明されておらず不明な点が多いが、特徴としてインスリンシグナルの減弱が挙げられる。CR マウスでは、インスリン、IGF-1 が低下し、GH-IGH-1 系抑制ラット、マウスともに寿命が延長することから、この経路は CR 効果の少なくとも一部を担っていると考えられる。このインスリンの重要な作用点として、摂食とエネルギー代謝を制御するニューロンが存在する視床下部弓状核が挙げられる。これまでの研究で、CR はインスリンなどの末梢由来ホルモンを介して視床下部に作用し、限られたエネルギーを成長・繁殖から生存に不可欠な機能へと適応させ個体の老化遅延をもたらすと考えられている。

このような背景から、我々は CR によって視床下部で抑制され、インスリン受容体基質 IRS4 に結合する分子として、新規代謝調節分子 WD repeat protein 6 (WDR6) を同定した (Chiba T, et al., 2009)。このタンパクは、タンパク質-タンパク質相互作用に重要な WD-repeat モチーフを持っており、インスリン受容体基質-4 (IRS4) およびレプチン下流シグナルで AMPK をリン酸化する LKB1 と相互作用することが報告されている (Chiba, et al., 2009, Xie, et al., 2007)。我々は WDR6 の機能と CR における役割を解析するため、本研究計画の開始前に cre-loxP システムを用いた全身性および脳特異的欠損マウスを作出した。

戻し交配を行っていない全身性の WDR6 欠損マウスの先行予備実験では、全身性 WDR6 ホモ KO マウス (WDR6 KO) を作製し、12 ヶ月間飼育した。その結果、興味深いことに全身性 WDR6 ホモ KO マウスは摂食量が多いにもかかわらず、低体重・低脂肪であった。さらに、KO マウスは同月齢の対照群と比較して、毛艶、毛並みが悪く、皮膚病変を伴っていた。このような症状はラミノパシー、早老症モデルとも似ており、全身性の WDR6 完全欠損が恒常性を破綻させ、早期に老化病態を発症させたと考えた。本実験計画では、これらの結果が遺伝的背景の影響による可能性も考慮し、戻し交配実験群を作出してこれを解析し、より詳細な表現型評価を行った。

また、WDR6 は CR ラットおよび長寿命を示す GH 抑制系ラットの脳で減少する分子として特定された (Chiba, et al., 2009) が、その機能は不明である。しかしながら、脳特異的な IRS-2 ノックアウトマウスは、インスリン感受性が増強し、長寿命であることが報告されている (Taguchi A et al, 2007)。WDR6 と結合する IRS-4 は視床下部特異的発現を示し、IRS-4 null マウスは body size の減少、繁殖能力の低下、耐糖能の上昇など CR と似た表現型を示した (Frantin VR, et al., 2000)。これらことから、脳特異的に WDR-6 を欠損させた場合、抗老化・長寿命の表現型を示すと予測された。抗老化・寿命延長作用における WDR6 の機能を明らかにする事ができれば、哺乳類の老化や関連疾患を抑制し、健康寿命を延長するカロリー制限模倣薬の開発につながることも期待できる。

2. 研究の目的

全身性および脳特異的 WDR6 欠損マウスの表現型を解析することにより、WDR6 の機能解析および CR の抗老化・寿命延長効果における WDR6 の役割を明らかにする。

- (1) 全身性 WDR6 KO マウスが早期に過食、低体重、低脂肪並びに老化病態を示す原因及びそのメカニズムを明らかにすることにより、新たな老化病態モデルの構築を目指す。
- (2) WDR6 KO マウスにおいて、CR の抗老化効果が維持あるいは消失するのか検証し、CR における WDR6 の役割を解明する。
- (3) WDR6 の脳特異的欠損が CR と同様に抗老化・寿命延長効果をもたらすか検証する。

3. 研究の方法

実験動物：WDR6 KO マウス作製には Cre-loxP システムを用いた。実験には全て雄マウスを使用した。

全身性 KO マウスの作出には、CAG-cre ノックインマウスと WDR6-flox ノックインマウスを交配し、得たヘテロ KO マウス(+, +/-)同士の交配から、CAG-cre を持たない全身性 KO マウス(-, +/-)を選抜し、C57BL6/J マウスと 10 回戻し交配した。戻し交配完了後は、ヘテロマウス (+/-) で系統を維持し、実験群には野生型、ヘテロ KO、ホモ KO を使用した。

脳特異的 KO マウスの作出のために、Nestin-creERT2 ノックインマウスと WDR6-flox ノックインマウスを交配し、得られたヘテロノックインマウス(+, +/-)を C57BL6/J マウスと 10 回戻し交配した。戻し交配完了後に Nestin-creERT2, WDR6-flox のホモ個体(+, +/+)を選抜し、実験に使用した。脳特異的モデルは、タモキシフェンの経口投与により cre 発現を神経細胞に誘導し、時期特異的に WDR6 をノックアウトすることが可能である。本研究では、生後 11 週齢よりタモキシフェン経口投与を開始し 5 日間連続投与することにより脳特異的 WDR6 KO マウス(Tam)を作製した。対照群 (Cont) には溶媒を投与した。

カロリー制限 (CR) は、生後 12 週齢から自由摂食群 (AL) と比較して摂食量を 30% カットし安楽死させるまで与えた。

【実験 1】

- (1) 全身性 WDR6 KO マウスの表現型評価をするため、WT-AL、WT-CR、ヘテロ (HT) -AL、HT-CR、KO-AL、KO-CR の 6 群 (n=15) を作製し、12 ヶ月以上飼育した。経時的に摂食量、体重、直腸温度を計測し、尾静脈血を採取し血糖値、血球組成の測定および外見の変化を観察した。血球の測定にはアークレイ動物自動血球計算装置を使用した。62-67 週齢で安楽死させ、血漿及び臓器を採取し凍結保存した。採取した各臓器から total RNA を抽出し、遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。組織化学的観察のため、各臓器をホルマリン固定後にパラフィン包埋切片を作製して H&E 染色を行い、形態的な観察を行った。血漿中の甲状腺ホルモン (T3, T4, TSH) の測定には ELISA キットを使用した。
- (2) KO マウスの表現型解析から免疫系の異常が疑われたため、(1) と同様の実験群を作製して経時変化を記録し、免疫細胞系の分布解析をするために 52-54 週齢のマウスの脾臓、リンパ節を用いてフローサイトメトリー解析を行った。また骨髄を H&E 染色、ASD ギムザ染色を行い、形態を観察した。

【実験 2】脳特異的 WDR6 KO マウスの表現型、特に、脳特異的な WDR6 欠損が寿命に与える影響を評価するため、Cont-AL、Con-CR、KO-AL、KO-CR の 4 群 (n=15) を作製した。経時的に摂食量、体重を計測し、109 週齢で安楽死させ臓器を採取した。血漿のグルコース、インスリンを測定し、視床下部から total RNA を抽出し、遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) 全身性 WDR6 KO マウスの表現型評価; 実験 1-(1)、-(2) の結果、全身性 WDR6 欠損マウス (KO) は、12 週齢以降に摂食量が有意に増えるにもかかわらず、体重は有意に減少するか、あるいは変化しなかった (図 1, 2)。63 週齢では、脂肪重量は著しく減少し、脾臓重量は有意に増加した。さらに脾臓重量増大と比例するように腫大したリンパ節が観察された。また、直腸温度が有意に高く、体毛の白化、脱毛、重度の皮膚炎症が観察され、予備実験で得られた表現型に再現性があることを確認した (図 3)。視床下部の摂食亢進ペプチド NPY 遺伝子の発現は有意に高く、抑制性ペプチド CART の発現が有意に減少していた。このことは摂食量の増加と一致している。最初に、KO マウスは摂食量の増加にもかかわらず、体重が増えず、脂肪重量の著しい減少と高体温を示すことから、甲状腺機能障害を疑った。血漿 TSH は KO マウスで有意に減少し、甲状腺機能亢進症患者の症状と一致するものの、

T3, T4 は有意な変化はなく、甲状腺の肥大あるいは縮小は観察されず、甲状腺 HE 染色切片の形態観察においても特に異常は認められなかった。これらのことから、甲状腺異常が KO マウスの表現型の原因である可能性は低いと判断した。

次に、血球検査を行った結果、KO マウスの白血球、リンパ球、単球が有意に減少し、顆粒球、平均血小板量が増加傾向にあるが、統計的有意差はなかった。ただし、皮膚炎症症状が重篤な KO マウスでは、顆粒球の有意な増加が観察された。また、赤血球数、赤血球あたりのヘモグロビン含有量が有意に減少したことから、貧血症状を呈していると考えられる。MCV (平均赤血球) 値に有意差がないことから赤血球の大きさに違いがなく、赤血球あたりに含まれるヘモグロビン量が少ないタイプの貧血と考えられる。さらに行動観察の結果、皮膚炎症がある KO マウスは頻繁な掻き走り行動がみられた。歩行にも異常が見られ、後肢関節に炎症とみられる腫れが観察された (図 3)。H&E 染色で関節部分を観察した結果、KO マウスでは筋組織の線維化、軟骨組織の異常形成がみられ、関節の変形が観察された (図 4)。このような症状に加え、血球検査の結果と脾臓・リンパ節腫大をあわせて考えると、WDR6 KO マウスでは免疫系に異常がある可能性が高いと判断した。骨髄の形態観察では、細胞分布に目立った偏りは観察できなかったが、KO マウスの骨髄で線維化した細胞が見られた。WDR6 と同様に WD repeat 構造をもつ WDR1 は、ヒトでは actin interacting protein1 (Aip1) として同定されており、その変異マウスは自己炎症性疾患および macrothrombocytopenia (巨大血小板

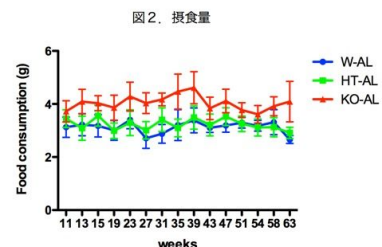
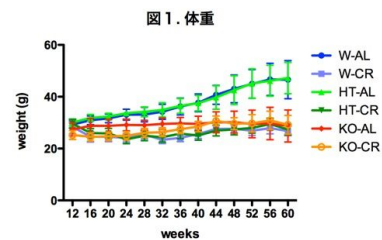


図 3. WDR6 KO マウスの症状 (59 週齢)

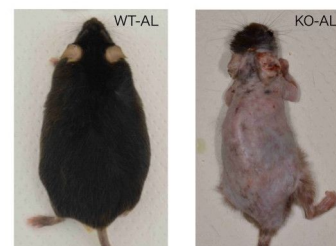
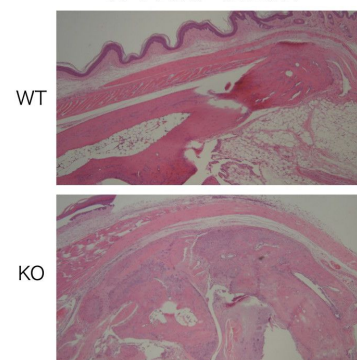


図 4. 関節部の形態的異常

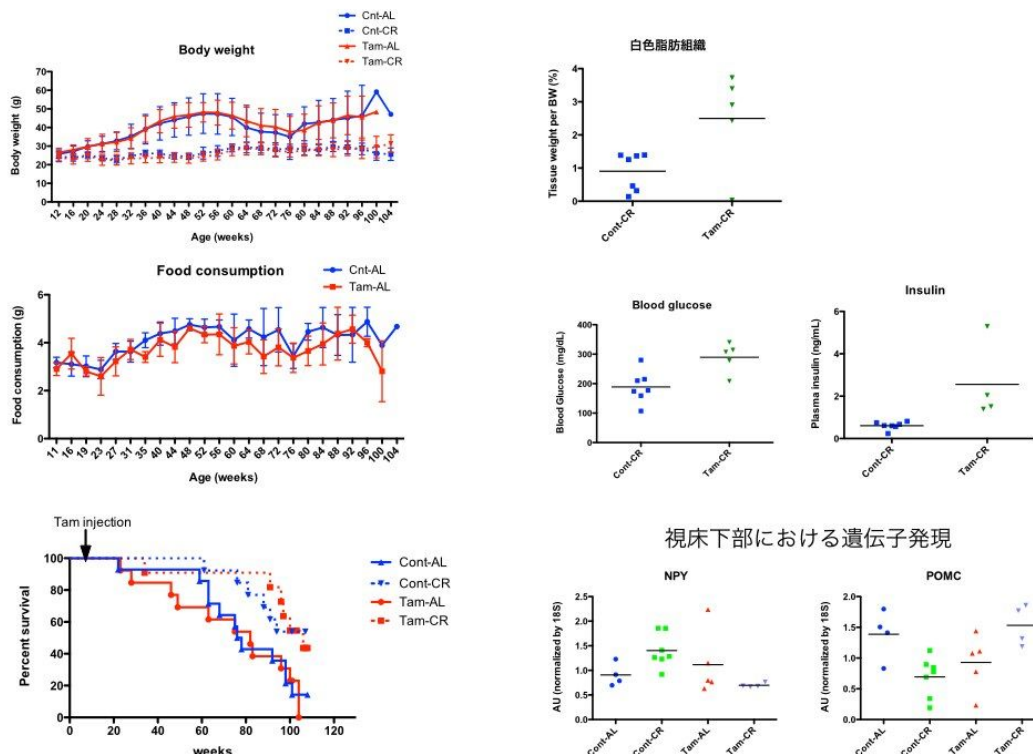


性血小板減少症)を引き起こすことが確認されている (Kile BT et al, Blood, 2007)。ヒトでも WDR1 変異が原因となる重篤な自己炎症性疾患が報告されており (Ariane SI Standing, et al. J Exp Med, 2017) その発症メカニズムは WDR1 変異により樹状細胞やマクロファージでの F-actin 重合が異常をきたし、インフラマソームの活性化と異常な IL-18 分泌を刺激し、自己炎症性疾患を引き起こしている。これらのことから、同様の構造を持つ WDR6 がヒトの自己炎症性疾患に関与している可能性は高いと考えられ、今回の WDR6 KO マウスの表現型解析の結果も自己炎症性疾患と相似した点が多い。確定するためにはより詳細な解析が必要である。

(2) CR における WDR6 の機能評価；全身性 WDR6 KO マウスの AL で観察された皮膚病変等の異常は、KO-CR マウスでは観察されなかった。これは、CR が WDR6 欠損によって引き起こされる炎症や疾患を抑制することが出来ることを示しており、同時に、CR の炎症・疾患抑制メカニズムに WDR6 は関与していないことを示唆している。このことは、WDR6 欠損が自己炎症性疾患を引き起こすと仮定した場合、CR が症状を抑制する手段となりうることも示している。

(3) 脳特異的 WDR6 KO マウスの表現型評価；【実験 2】の結果 (図 5)、脳特異的 WDR6 欠損マウスでは、自由摂食群 (AL) では全身性 KO で見られた摂食亢進、体重減少や皮膚病変等は観察されなかった。25 ヶ月齢時点で殆どの AL 群は自然死しており、寿命に有意差はなかった。このことは、通常飼育下では WDR6 の脳特異的欠損は CR のような抗老化・寿命延長効果をもたらさないことを示している。一方、カロリー制限下では興味深い結果を示した。Tam-CR 群では、Cont-CR に比べて白色脂肪組織が増加し、高血糖、高インスリンを示し、その値は AL 群に近い。また Tam-CR の視床下部において摂食亢進ペプチド NPY, AGRP 遺伝子発現が Cont-CR と比較して有意に減少し、摂食抑制ペプチド POMC, CART 遺伝子発現が有意に増加した。これは CR の効果を減弱させる結果であり、脳の WDR6 が CR において重要な役割を担っており、全体の代謝にも影響を与えていることを示唆している。

図5. bWDR6 KO マウスの表現型



【総括】

全身性 WDR6 KO マウスの表現型解析の結果、当初想定していた早期老化病態モデルとは異なり、自己炎症性疾患が強く疑われる結果となった。今後は更に WDR6 の機能解析を進め、新たな自己炎症性疾患動物モデルと治療方法開発等への応用を目指す。脳特異的 WDR6 KO マウスは CR のような長寿命表現型を示さなかったが、CR の代謝適応反応に関係する経路に関与していると考えられる。また、WDR6 の全身性 KO と脳特異的 KO マウスでの表現型の違いは、WDR6 が各組織において異なる役割を有していることを示しており、より詳細な機能解析には組織特異的 KO マウスを用いた検証が必要と考えられる。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小松 利光、全身性および脳特異的 WDR6 欠損マウスの表現型解析(ポスター)、第 42 回日本基礎老化学会大会、仙台市 仙台国際センター、2019 年 6 月 6 日-8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 下川 功

ローマ字氏名: SHIMOKAWA, Isao

研究協力者氏名: 林 洋子

ローマ字氏名: HAYASHI, Hiroko

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。