

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08569

研究課題名（和文）概日時計とNAD+代謝による細胞老化への影響

研究課題名（英文）Effects of circadian clock and NAD+ metabolism on cellular senescence

研究代表者

中畑 泰和（NAKAHATA, Yasukazu）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：50390810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、老化進行による概日時計への影響の可能性、またその逆の概日時計による老化進行制御の可能性、さらに、細胞内NAD+量の減少が概日時計特性をどう変化させるのかを細胞レベルで詳細に解析することを目的として研究を開始した。その結果、細胞老化進行にともない概日時計特性が変化、周期延長および振幅低下、することを明らかにした。一方で概日時計は、細胞老化進行に関与しないことが明らかになった。さらに細胞老化による概日時計特性変化の分子機序として、NAD+/SIRT1依存的な時計タンパク質PER2の細胞内局在変化が概日リズムの振幅制御に関わる可能性を示す知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗老化・QOL維持を目指した研究であり、社会的意義は疑う余地がないと考えている。生体の概日リズムは、細胞での概日リズムを反映することが知られており、今回の発見“老化細胞での概日時計周期延長”は、これまで報告されている個体での加齢による概日時計周期延長と一致する。すなわち、今回の発見は、老化による概日時計の影響を分子レベルで解明する方法として、細胞を用いた研究が有用であることを示した初めての報告であり、老化概日時計研究が飛躍的に発展できる可能性を示した。また概日時計老化の分子機序として、NAD+が鍵となる可能性を示し、概日時計と老化進行が密接に関連している証拠を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Our research purpose of this project was to elucidate effects of i) cellular senescence on circadian clock property and ii) circadian clock on the process of cellular senescence. Furthermore, we investigated molecular mechanisms of how low NAD+, which mimics senescent cells, affects circadian clock property. We revealed that cellular senescence alters circadian clock property, especially circadian period and amplitude. On the other hand, the circadian clock had no effects on the process of cellular senescence. Molecular dissection demonstrated that low NAD+ in cells alters subcellular localizations of PER2, the key circadian clock molecule, which changes circadian gene expressions via the attenuation of SIRT1 activity.

研究分野：時間生物学

キーワード：細胞老化 概日時計 NAD代謝

### 1. 研究開始当初の背景

時間生物学研究、特に24時間周期の体内時計である概日時計研究は、この20年ほどの間に飛躍的な発展を遂げてきた。要因として、概日時計がほぼ全身の細胞ひとつひとつに存在し、あらゆる生理機能に関与することが明らかになり始めたことが考えられる。例えば、哺乳類概日時計機構において重要な役割を果たしている転写因子CLOCKまたはBMAL1を欠失させた遺伝子改変マウスは、24時間周期の睡眠覚醒リズムが消失するのみならず、肥満・糖尿病、白内障、サルコペニアなどの老化関連疾患に罹患しやすい、さらには短命であることが報告されている。

研究代表者は、哺乳類をモデル生物として概日時計の分子機構の解明を目指して研究を行っており、これまでに、NAD<sup>+</sup>代謝およびNAD<sup>+</sup>依存性酵素SIRT1が概日時計を調節することを報告した。近年、加齢にともないヒトおよびマウス組織/細胞内NAD<sup>+</sup>量が減少すること、さらに老齢マウスへのNAD<sup>+</sup>前駆体投与が種々の生理機能を回復させることが報告され、NAD<sup>+</sup>代謝が寿命や老化関連疾患と深く関わっていることが明らかになり始めたことから、概日時計の観点からNAD<sup>+</sup>代謝と老化の関連性の分子機構の解明を目指した。これまでのヒト初代細胞を用いた予備的知見より、増殖期の細胞と比して老化細胞の概日時計周期は長いこと、老化細胞内NAD<sup>+</sup>量は増殖期の細胞より減少していることを明らかにしていた。これらの結果は、加齢にともなうマウスの行動周期の延長、組織内NAD<sup>+</sup>量の減少とも一致した。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、細胞レベルでの(1)老化進行による概日時計への影響の可能性、またその逆の(2)概日時計による老化進行制御の可能性、さらに(3)細胞内NAD<sup>+</sup>量の減少が概日時計特性をどう変化させるのかを詳細に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 老化進行による概日時計への影響の可能性を検証するため、①複製老化細胞および、②ストレス誘導性老化細胞を用いて概日時計特性を調べた。複製老化細胞は、細胞増殖が停止するまで継代を繰り返すことで得た。ストレス誘導性老化細胞は、増殖期の細胞を過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)処理により細胞老化を誘導することで得た。これら老化細胞に概日時計遺伝子 *Bmal1* プロモーター制御下で発現する *luciferase* 遺伝子を導入し、リアルタイム生物発光測定装置にて概日リズムを測定した。

(2) 概日時計による老化進行制御の可能性を検証するため、概日時計が完全に消失している遺伝子欠損マウスである *Bmal1* 欠損マウス胚由来初代線維芽 (*Bmal1*<sup>-/-</sup>MEF) 細胞を用いて細胞老化進行を検証した。評価は、細胞増殖能、細胞老化関連 β-galactosidase 活性、老化関連遺伝子 (*p16<sup>INK4a</sup>*) 発現により行った。

(3) 細胞内NAD<sup>+</sup>量の減少が概日時計特性をどう変化させるかを詳細に検証するため、時間分解能に優れたリアルタイム生物発光測定装置を用いた。NAD<sup>+</sup>合成に関わる酵素 NAMPT の阻害剤処理により NIH3T3 細胞内NAD<sup>+</sup>を減少させたのち、概日リズムを測定した。さらに、薬理的、遺伝学的手法を用いて概日時計制御に関与するNAD<sup>+</sup>依存性酵素の同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) ①複製老化細胞と増殖細胞の概日リズムを比較した結果、老化細胞 (sen) の周期は、増殖期細胞 (pro) の周期に比べ、1.5時間程度延長することを見出した (図1) (Ahmed et al., 2019)。

この結果は、概日時計周期延長と老化進行に相関があることを示したが、概日時計周期の延長と老化進行に因果関係があるかは不明であった。そこでこの周期延長が老化進行により惹起されるかを検証するため、②過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)処理により細胞老化を惹起し、

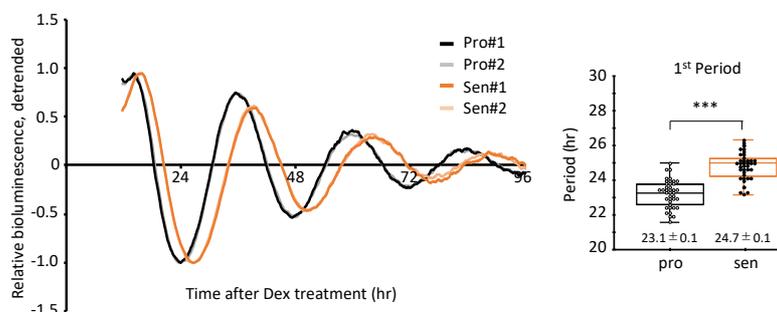


図1

その細胞での概日時計周期延長の有無を検証した。その結果、細胞老化進行にともない概日時計周期が延長することを明らかにした (図2) (Ahmed et al., 2021)。

以上の結果より、老化細胞の種類によらず概日時計は、細胞老化進行にともない概日時計特性が変化、特に周期延長、することが明らかになった。これまで概日時計の特徴として、個体レベルの概日リズムは、細胞レベルでの概日リズムを反映することが知られており、今回の老化細胞での周期延長は、これまでに報告されている個体レベルでの加齢による概日時計周期延長と一致する。すなわち、今回の発見は、老化による概日リズム延長の分子機序を解析するにあたり細胞レベルでの研究が有用であることを示した初めての報告であり、老化概日時計研究が飛躍する端緒となると考えている。

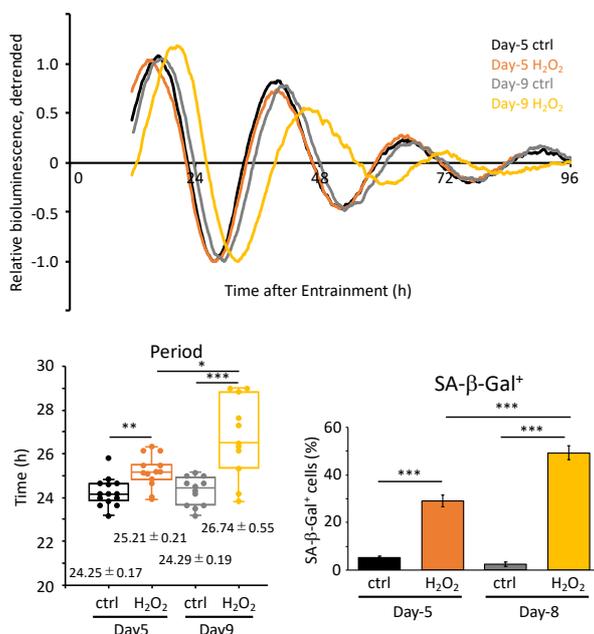


図2

(2) 次に概日時計が細胞老化進行にどのような影響を与えるかを検証するために、*Bmal1*<sup>-/-</sup>MEF細胞を用いて複製老化進行および、過酸化水素またはERストレス誘導性老化進行について調べた。その結果、細胞老化の種類によらず細胞老化進行に概日時計は関与しないことが明らかになった (図3) (Nakahata et al., 2018)。*Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは若齢で種々の臓器に老化細胞が蓄積していることが報告されている。今回の結果は、*Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの生体内細胞老化進行は正常だが老化細胞が蓄積しやすい、すなわち、NK細胞やマクロファージなどの免疫細胞による老化細胞除去に問題がある可能性を示唆している。既に免疫系は、概日時計に制御されていることが報告されているので、免疫細胞による老化細胞除去も概日時計により制御されている可能性は十分考えられる。今後はこの可能性についても検討していきたい。

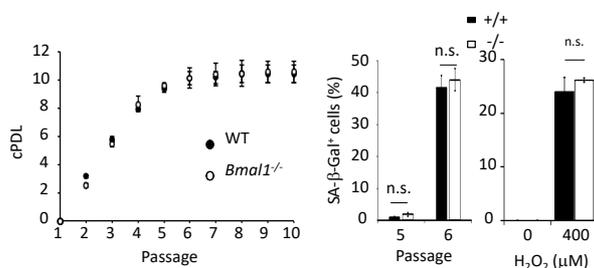


図3

(3) われわれは細胞老化にともない細胞内 NAD<sup>+</sup>量が減少することを報告している (Khaidizar et al., 2017)。そこで、細胞内 NAD<sup>+</sup>量減少による概日時計特性への影響を詳細に検証するためリアルタイム生物発光測定装置を用いた。NAD<sup>+</sup>再利用経路の律速酵素 NAMPT 阻害剤処理により細胞内 NAD<sup>+</sup>量減少させ、概日リズムを測定した結果、振幅減少および周期延長することを見出した (図4)。さらに NAD<sup>+</sup>依存性酵素に注目し、振幅制御に関与する酵素を探索した結果、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 を見出した (図4)。また、NAD<sup>+</sup>および SIRT1 依存的に時計タンパク質 PER2 の細胞内局在が変化することを見出した。PER2 の局在変化が振幅減少に関与している可能性を示唆する知見も得ることができた (Ashimori et al., 2021)。

PER2 の局在変化は NAD<sup>+</sup>/SIRT1 を介して振幅制御に関わっている可能性を示したが、周期制御に関しては PER2 局在変化および SIRT1 は関与しないことを示す知見を得ている。NAD<sup>+</sup>を介した周期制御の分子機序解明は現在行なっている。これらの結果は、振幅制御には NAD<sup>+</sup>/SIRT1 経路が関わるが、周期制御には NAD<sup>+</sup>/SIRT1 経路以外の NAD<sup>+</sup>依存的経路が関与することを示唆しており、細胞内 NAD<sup>+</sup>量が概日時計老化を解明する鍵となる可能性を示すことができた。

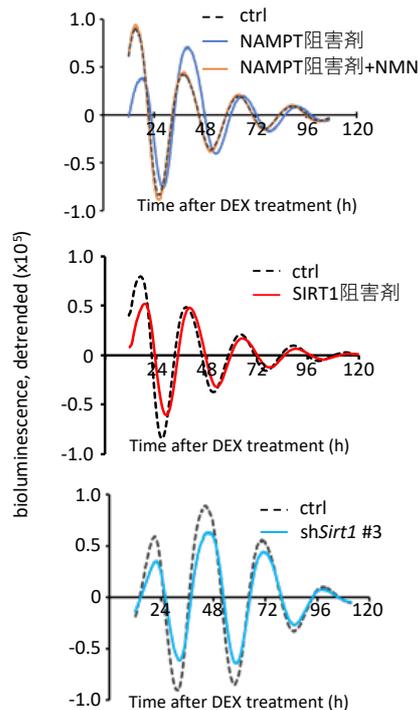


図4

<参考文献>

1. Ahmed R, Ashimori A, Iwamoto S, Matsui T, Nakahata Y\*, Bessho Y. Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time. *Aging (Albany NY)*, 11(3):950-973, 2019. \*correspondence author
2. Ahmed R, Nakahata Y\*, Shinohara K, Bessho Y. Cellular Senescence Triggers Altered Circadian Clocks With a Prolonged Period and Delayed Phases. *Front. Neurosci.* 15:638122, 2021. \*correspondence author
3. Ashimori A, Nakahata Y\*, Sato T, Fukamizu Y, Matsui T, Shinohara K, Bessho Y. Attenuated SIRT1 activity leads to PER2 cytoplasmic localization and dampens the amplitude of *Bmal1* promoter-driven circadian oscillation. *Front. Neurosci.* 15:647589, 2021. \*correspondence author
4. Khaidizar FD, Nakahata Y\*, Kume A, Sumizawa K, Kohno K, Matsui T, Bessho Y. Nicotinamide phosphoribosyltransferase delays cellular senescence by upregulating SIRT1 activity and antioxidant gene expression in mouse cells. *Genes Cells*, 22(12): 982-992, 2017. \*correspondence author
5. Nakahata Y\*, Yasukawa S, Khaidizar FD, Shimba S, Matsui T, Bessho Y. *Bmal1*-deficient mouse fibroblast cells do not provide premature cellular senescence in vitro. *Chronobiol Int.* 35(5): 730-738, 2018. \*correspondence author

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Rezwana Ahmed, Atsushige Ashimori, Satoshi Iwamoto, Takaaki Matsui, Yasukazu Nakahata, and Yasumasa Bessho	4. 巻 11
2. 論文標題 Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY)	6. 最初と最後の頁 950-973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.101794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakahata Yasukazu, Yasukawa Shiori, Khaidizar Fiqri Dizar, Shimba Shigeki, Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa	4. 巻 35
2. 論文標題 Bmal1-deficient mouse fibroblast cells do not provide premature cellular senescence in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 730 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2018.1430038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Khaidizar Fiqri D., Nakahata Yasukazu, Kume Akira, Sumizawa Kyosuke, Kohno Kenji, Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa	4. 巻 22
2. 論文標題 Nicotinamide phosphoribosyltransferase delays cellular senescence by upregulating SIRT1 activity and antioxidant gene expression in mouse cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 982 ~ 992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nuriliani Ardaning, Nakahata Yasukazu, Ahmed Rezwana, Khaidizar Fiqri D., Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa	4. 巻 25
2. 論文標題 Over expression of Nicotinamide phosphoribosyltransferase in mouse cells confers protective effect against oxidative and ER stress induced premature senescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 593 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ahmed Rezwana, Nakahata Yasukazu, Shinohara Kazuyuki, Bessho Yasumasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Cellular Senescence Triggers Altered Circadian Clocks With a Prolonged Period and Delayed Phases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.638122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoyama Shinya, Nakahata Yasukazu, Shinohara Kazuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Chrono-Nutrition Has Potential in Preventing Age-Related Muscle Loss and Dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.659883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Khaidizar Fiqri D., Bessho Yasumasa, Nakahata Yasukazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Nicotinamide Phosphoribosyltransferase as a Key Molecule of the Aging/Senescence Process	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3709 ~ 3709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ashimori Atsushige, Nakahata Yasukazu, Sato Toshiya, Fukamizu Yuichiro, Matsui Takaaki, Yoshitane Hikari, Fukada Yoshitaka, Shinohara Kazuyuki, Bessho Yasumasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Attenuated SIRT1 Activity Leads to PER2 Cytoplasmic Localization and Dampens the Amplitude of Bmal1 Promoter-Driven Circadian Oscillation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.647589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Rezwana Ahmed, Satoshi Iwamoto, Yasukazu Nakahata, Takaaki Matsui, Yasumasa Bessho
2. 発表標題 Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time
3. 学会等名 XVI EUROPEAN BIOLOGICAL RHYTHMS SOCIETY CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasukazu Nakahata, Rezwana Ahmed, Atsushige Ashimori, Kazuyuki Shinohara, Yasumasa Bessho
2. 発表標題 Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time
3. 学会等名 第97会日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasukazu Nakahata
2. 発表標題 Cellular senescence alters the circadian clock via intracellular NAD+
3. 学会等名 13th Malaysia International Genetics Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦森温茂, 中畑泰和, 松井貴輝, 別所康全
2. 発表標題 Circadian Period extension due to impairment of NAD+/PARP1経路の機能低下による概日時計周期延長
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rezwana Ahmed, 岩本賢, 中畑泰和, 松井貴輝, 別所康全
2. 発表標題 Changes in Circadian Clock Properties of Replicative Senescent TIG-3 cells
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Ashimori, R. Ahmed, Y. Nakahata, S. Iwamoto, T. Matsui and Y. Bessho
2. 発表標題 Decrease in NAD+ causes period extension of circadian clock with aging
3. 学会等名 Cell Symposia: Aging and Metabolism 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasukazu Nakahata, Fiqri Dizar Khaidizar, Takaaki Matsui and Yasumasa Bessho
2. 発表標題 NAMPT overexpression delays cellular senescence by upregulating superoxide dismutase 2 and catalase gene expressions in mouse cells
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasukazu Nakahata
2. 発表標題 The Impact of Cellular Senescence on Circadian Clock
3. 学会等名 BIT's 5th Annual World Congress of Geriatrics and Gerontology-2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦森温茂, 中畑 泰和, 松井 貴輝, 別所 康全
2. 発表標題 NAD+減少に起因する概日時計周期延長の分子機構の解明
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中畑 泰和, 安川史織, 榛葉繁紀, 松井 貴輝, 別所 康全
2. 発表標題 概日時計はin vitroでの細胞老化進行に関与しない
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasukazu Nakahata
2. 発表標題 Intracellular NAD+ regulates the period of circadian clock
3. 学会等名 Internatioal Conference on Genomics, Nanotech and Bioengineerling 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rezwana Ahmed, Satoshi Iwamoto, Yasukazu Nakahata, Takaaki Matsui, Yasumasa Bessho
2. 発表標題 THE IMPACT OF CELLULAR SENESENCE ON CIRCADIAN CLOCK
3. 学会等名 Internatioal Conference on Genomics, Nanotech and Bioengineerling 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	別所 康全  (BESSHO Yasumasa)  (70261253)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授    (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
バングラデシュ	North South University			
マレーシア	University of Malaya			