

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19580109
 研究課題名（和文）細胞老化により規定される個体老化の分子基盤の解明とアンチエイジング創薬への応用
 研究課題名（英文）Analysis of molecular basis for aging regulated by cellular senescence programs and its application to development of anti-aging drugs
 研究代表者
 片倉 喜範（KATAKURA YOSHINORI）
 九州大学・大学院農学研究院・准教授
 研究者番号：50264106

研究成果の概要：

若い細胞と老化細胞の間での発現の違いをもとに新奇細胞老化関連因子の同定を行った。本因子群は、細胞老化の進行時ばかりでなく、糖尿病患者由来組織においても高発現しており、新たな加齢性疾患発症を制御しうる因子と考えられた。また細胞老化を規定する因子を含むものであることも明らかになった。さらに、細胞老化因子として同定した TAK1 を中心とした細胞老化プログラムのネットワークを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞老化、アンチエイジング、細胞応答、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 個体老化に対する細胞老化プログラムの寄与の解析：これまで申請者は、内因性（分裂老化：Replicative senescence）及び外因性（早期老化：Premature senescence）の細胞老化プログラムにおいて必須の役割を担う因子として、TGF- β activated kinase 1 (TAK1) および Protein kinase C- δ (PKC- δ) を独自に同定してきた。また最近になり、これら様々な細胞老化プログラムの下流キナーゼとしてストレス性 MAP キナーゼ p38 や CDK インヒビター p16 が機能することが明らかになるとともに、個体老化に伴う p38 や p16 の発現増強が造血

系幹細胞の枯渇、幹細胞の再増殖能の抑制、 β 細胞の再生能の減少及び神経発生の抑制を誘引することが明らかとなり、細胞老化が個体の老化や寿命を決める上で重要なプログラムであるとの認識が高まりつつある。
 (2) 細胞老化阻害因子の探索とそれによる抗老化・延命の実現可能性の解析：最近、細胞老化に伴って細胞内に蓄積するリポフスチンが自然蛍光を発することが明らかとなり、細胞老化の進行度を生細胞のまま数値化することが可能になってきた。また最近になり、抗老化・延命を実現するシグナルの分子レベルの解析が進み、抗老化・延命に寄与する因

子の同定も進んでいる。特に、広い生物種にわたり延命を実現することが明らかになっているカロリー制限とそれによる延命の分子機構については最近相次いで報告がなされ、サーチュインや転写因子 Foxo の関与が推察されている。特にサーチュイン活性化物質は生物の延命を実現し、加齢性疾患の回避もしくはその進行を劇的に遅延させる鍵となる物質として期待されている。また最近の研究から、細胞内自己タンパク質分解機構として知られるオートファジーが線虫の延命に必須であること、またその活性がカロリー制限時に誘導されることなどから、老化・寿命決定に対するオートファジーの関与が推察されている。さらに Klotho はインスリンシグナル阻害及びストレス耐性獲得を通じて抗老化・延命を実現するホルモンであることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

(1) 個体老化に対する細胞老化プログラムの寄与の解析：本研究では、申請者の同定した細胞老化因子が個体の老化・寿命を規定する分子機構のなかで果たす役割を明らかにすることを目的とした。また申請者の同定した細胞老化因子は、ガン細胞や幹細胞の不死性を保証する酵素であるテロメラーゼ発現を抑制しうることを独自に見出しており、細胞老化因子により誘導されるテロメラーゼ抑制が個体の老化・寿命の決定に果たす役割について明らかにすることを目的とした。

(2) 細胞老化阻害因子の探索とそれによる抗老化・延命の実現可能性の解析：本研究では抗老化・延命因子に着目し、新たな視点のもと抗老化・延命因子の探索を行うこと、そしてそれら因子による細胞老化阻害、さらには細胞老化阻害を通じた抗老化・延命の実現の可能性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞老化因子が組織・細胞の機能・表現型発現に与える影響の解析

- ① 細胞老化因子はウイルス発現系を用いて細胞に導入する。
 - ② モデル細胞としては、組織幹細胞、腸管細胞、代謝系細胞、免疫系細胞を用い、細胞老化誘導に関し評価する。
 - ③ 各種細胞へ細胞老化因子導入後、様々な観点からそれぞれの細胞の表現型、機能性を評価する。
 - ④ 上記細胞群において、細胞老化誘導と機能変化の関係性について解析をさらに進める。
- (2) 加齢・加齢性疾患発症に伴う各組織・細胞変性に対する細胞老化因子の寄与の解析
- ① 早老マウス及び自然老化マウスの各組織・細胞での細胞老化因子の活性化状態・発

現状態を解析する。

② 加齢性疾患モデルマウスにおいても、上記と同様、細胞老化因子の活性化状態、発現状態を解析し、加齢性疾患発症に対する細胞老化因子の寄与を推察する。

(3) 細胞老化阻害因子の探索とそれによる抗老化・延命の実現可能性の解析

- ① SIRT1、Foxo、Klotho 発現を増強する因子の探索を行う。
- ② 上記因子及び SIRT1、Foxo、Klotho の抗細胞老化能を評価する。
- ③ 上記因子及び SIRT1、Foxo、Klotho により加齢依存的な組織・細胞の機能変化・崩壊を阻害可能であるかを評価する。

4. 研究成果

① 新奇細胞老化因子の同定：若い細胞と老化細胞との間で発現量の差が認められる因子の同定を行い、16 種の細胞老化関連因子の同定に成功した。

② 新奇細胞老化関連因子の発現解析：上記細胞老化関連因子のうち 9 種は、細胞老化に伴い発現が増強し、5 種は細胞老化に伴い発現が減少する遺伝子であり、これら 14 種は細胞老化特異的遺伝子であると考えられた。これら因子のほとんどのものは、未だ細胞老化との関連性が明らかになっておらず、これら遺伝子群の発現・機能解析を通じて、細胞老化制御に関わる新たな分子機構が明らかになるものと予想される。

③ 新奇細胞老化関連因子の糖尿病患者組織での発現解析：上記細胞老化関連因子の、糖尿病患者由来筋肉組織及び膵臓組織での発現解析を行った。その結果、多くの細胞老化関連因子の発現が、糖尿病患者由来組織において発現増強していることが明らかとなった。つまり、糖尿病患者組織では、細胞老化と同等の遺伝子発現変化及び表現型変化が誘導されているものと考えることができた。また糖尿病が一部細胞老化プログラムにより引き起こされているという新たな知見を得ることに成功した。

④ 新奇細胞老化関連因子の機能解析：レトロウイルス発現系を用い、細胞老化関連因子の発現を抑制する shRNA を導入し、細胞老化プログラムに与える影響を解析した。その結果、ヒト正常線維芽細胞の細胞老化プログラムを回避させる shRNA が存在しうることが明らかとなった。つまり、細胞老化誘導に必須の遺伝子が、これら細胞老化関連因子の中に存在していることが明らかとなった。これは、これまでに報告のない新たな細胞老化を規定する因子であり、細胞老化プログラムを制御する分子基盤解明に向けた新たな分子情報を提供しうるものと考えられた。さらに、細胞老化プログラムにより規定される各種加齢性疾患発症への寄与が推定され、今後

のさらなる研究が必須であると考えられた。
⑤細胞老化誘導ネットワークの解析：これまで申請者が明らかにしてきた細胞老化因子である MAPKKK の TAK1 を中心に、細胞老化誘導のネットワークを解析した。その結果、活性酸素蓄積がまず炎症性サイトカインの発現を上昇させ、それが TAK1 を活性化し、細胞老化誘導につながるものと考えることができた。この結果は、細胞老化誘導のネットワーク解明に向けた新たな情報を提供するものと考えられた。

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 10 件)

- ① Yoshinori Katakura, Miyako Udono, Kazuyuki Katsuki, Hisaya Nishide, Yukiko Tabira, Takahiro Ikei, Makiko Yamashita, Tsukasa Fujiki, Sanetaka Shirahata, Protein kinase C δ plays a key role in cellular senescence programs of human normal diploid cells, *J. Biochem.*, 査読有, (in press)
- ② Kaichi Yoshizaki, Tsukasa Fujiki, Takahiro Tsunematsu, Makiko Yamashita, Miyako Udono, Sanetaka Shirahata, Yoshinori Katakura, Pro-senescent effect of hydrogen peroxide on cancer cells and its possible application to tumor suppression, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 73, 311-315, 2009
- ③ Miyako Udono, Tsukasa Fujiki, Makiko Yamashita, Kazuyuki Katsuki, Masaaki Funata, Yusuke Imada, Kaichi Yoshizaki, Sanetaka Shirahata, Yoshinori Katakura, Construction of a regulatable cancer-specific adenoviral expression system using human telomerase reverse transcriptase gene promoter, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 72, 1638-1641, 2008
- ④ Yeon Suk Jung, Shin-ei Matsumoto, Yoshinori Katakura, Makiko Yamashita, Kosuke Tomimatsu, Shigeru Kabayama, Kiichiro Teruya, Sanetaka Shirahata, Generation of human monoclonal antibodies against *Propionibacterium acnes* by applying the phage display method to human peripheral blood mononuclear cells immunized *in vitro*, *Cytotechnol.*, 査読有, 57, 169-175, 2008
- ⑤ Shin-ei Matsumoto, Makiko Yamashita, Yoshinori Katakura, Yoshihiro Aiba, Kosuke Tomimatsu, Shigeru Kabayama, Kiichiro Teruya, Sanetaka Shirahata, A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by *in vitro* immunization and the phage display method, *J. Immunol. Methods.*, 査読有, 332, 2-9, 2008
- ⑥ Tsukasa Fujiki, Takumi Miura, Mariko Maura, Hiroshi Shiraiishi, Yusuke Imada, Norihisa Uehara, Kosuke Tashiro, Sanetaka Shirahata, Yoshinori Katakura, TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene, *Oncogene*, 査読有, 26, 5258-5266, 2007
- ⑦ Yeon Suk Jung, Shin-ei Matsumoto, Makiko Yamashita, Kosuke Tomimatsu, Kiichiro Teruya, Yoshinori Katakura, Sanetaka Shirahata, *Propionibacterium acnes* acts as an adjuvant in *in vitro* immunization of human peripheral blood mononuclear cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 71, 1963-1969, 2007
- ⑧ Makiko Yamashita, Yoshinori Katakura, Yoshihiro Aiba, Shin-ei Matsumoto, Kazuko Morihara, Kiichiro Teruya, Akira Ichikawa, Sanetaka Shirahata, Involvement of IL-10 in the suppression of antibody production by *in vitro* immunized peripheral blood mononuclear cells, *Cytotechnol.*, 査読有, 55, 71-77, 2007
- ⑨ Makiko Yamashita, Yoshinori Katakura, Sanetaka Shirahata, Recent advances in the generation of human monoclonal antibody, *Cytotechnol.*, 査読無, 55, 55-60, 2007
- ⑩ Takashi Tamura, Kosuke Tomimatsu, Yoshinori Katakura, Makiko Yamashita, Shin-ei Matsumoto, Yoshihiro Aiba, Yeon Suk Jung, Yoshiichi Abe, Tsukasa Fujiki, Kiichiro Teruya, Sanetaka Shirahata, Anti-peptide antibody production elicited by *in vitro* immunization of human peripheral blood mononuclear cells., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 71, 2871-2875, 2007

[学会発表] (計 18 件)

- ① 鶴殿美弥子、新規細胞老化因子の同定と生活習慣病発症への寄与の解析、日本農芸化学会、2009.3、福岡
- ② 小島規寛、MAPK p38 による細胞老化制御の分子基盤、日本農芸化学会、2009.3、福岡
- ③ 児玉龍彦、細胞老化制御ネットワークの分子基盤の解析、日本農芸化学会、2009.3、福岡
- ④ 小川香織、テロメラーゼ制御によるアンチエイジングの分子基盤の解析、日本農芸化学会、2009.3、福岡
- ⑤ 児玉龍彦、TAK1 依存的に細胞老化を誘導するシグナルネットワークに関する研究、日本分子生物学会、2008.12、神戸
- ⑥ 小島規寛、MAP キナーゼ p38 による hTERT 転写抑制の分子機構、日本分子生物学会、2008.12、神戸
- ⑦ 鶴殿美弥子、新規細胞老化関連因子の発現・機能解析、日本分子生物学会、2008.12、神戸

- ⑧小川香織、テロメラーゼ制御による延命の分子基盤の解明、日本分子生物学会、2008.12、神戸
- ⑨ Miyako Udono, Expression analysis of senescence-associated genes: their possible involvement in the diabetes, The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 2008.11, Fukuoka
- ⑩藤木司、浸透圧ストレスによるマウス TERT 遺伝子の転写制御機構の解析、日本農芸化学会、2008.3、名古屋
- ⑪鶴殿美弥子、新規細胞老化関連因子の同定と発現・機能解析、日本農芸化学会、2008.3、名古屋
- ⑫香月一志、細胞老化プログラムを規定する PKC-δ の機能解析、日本農芸化学会、2008.3、名古屋
- ⑬児玉龍彦、細胞老化プログラムにおける TAK1 の機能的役割、日本農芸化学会、2008.3、名古屋
- ⑭藤木司、NFAT5 によるマウス TERT 遺伝子の転写制御機構の解析、日本分子生物学会、2007.12、横浜
- ⑮中原ゆり、MAP キナーゼ p38 によるテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子転写抑制の分子機構、日本分子生物学会、2007.12、横浜
- ⑯白水祐輔、細胞老化を規定する因子としての TAK1 の機能解析、日本分子生物学会、2007.12、横浜
- ⑰鶴殿美弥子、新規細胞老化関連因子の同定と発現・機能解析、日本分子生物学会、2007.12、横浜
- ⑱藤木司、マウス TERT 遺伝子の転写制御機構の解析、日本動物細胞工学会大会、2007.7、高崎

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：延命効果物質、および感染防御効果・ワクチン効果促進物質、前期物質の検定用コンストラクト、並びにそれらの用途

発明者：片倉喜範、白畑實隆、照屋輝一郎、山下万貴子、松本貴之、長谷川隆則

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2007-034115

出願年月日：2007 年 2 月 14 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ：

<http://web.me.com/katakura/Site/TOP.html>

(1) 研究代表者

片倉 喜範 (KATAKURA YOSHINORI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50264106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：