

平成21年4月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007-2008	
課題番号：19590227	
研究課題名 (和文)	カロリー制限の抗老化機構：Neuropeptide Y と受容体サブタイプの解析
研究課題名 (英文)	Mechanisms underlying the effect of calorie restriction: Analyses of neuropeptide Y and receptor subtypes
研究代表者	
	下川 功 (Shimokawa Isao)
	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
	研究者番号：70187475

研究成果の概要：カロリー制限 (CR) の抗老化効果における Neuropeptide Y (NPY) の役割を実証するために、NPY ノックアウト (KO) マウスを自由摂食 (AL)、CR 下で飼育し、寿命や酸化ストレスに対する耐性をテストした。1) 寿命：NPY-ko マウスの生存率は AL, CR いずれの条件でも野生型マウスよりも低かった。2) 酸化ストレス耐性：NPY-KO マウスでは、CR の効果 (ストレス耐性) が減弱した。以上の結果から、CR の抗老化効果には、NPY が重要な役割を果たしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：カロリー制限

1. 研究開始当初の背景

カロリー制限 (CR) は、酵母や線虫からほ乳類まで、広範囲な生物の老化を遅延し、寿命を延長する実験的介入方法であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。我々は、CR にもなう神経内分泌系の適応と言う観点からメカニズムを説明できること、その中心的な役割は、視床下部弓状核に存在する Neuropeptide Y (NPY) 神経細胞群であることを示唆した。

2. 研究の目的

本研究は、CR による神経内分泌系の適応に NPY が重要であることを実証するために、

1) 野生型カロリー制限マウスにおいてみとめられる様々な特徴が NPY-KO マウスでは消失あるいは減弱することを明らかにする。
2) さらに、NPY の効果における NPY 受容体サブタイプ特異性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 実験動物：NPY-KO マウス、野生型マウスを生後12週より自由摂食 (AL) 群、30% カロリー制限 (CR) 下で飼育する。寿命集団を含む実験群を維持する。

2) 視床下部における神経ペプチドの発現：視床下部から mRNA を抽出し、RT-PCR 法

にて、NPY, Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)、GHRH (Growth hormone-releasing hormone)等の神経ペプチドの発現レベルを計測し、CRによる変化を野生型、KO マウスで比較する。

3) ストレス応答：ミトコンドリア呼吸鎖を抑制し、酸化ストレス発生させる

3-nitropropionic acid (NPA)を投与し、生存率、ストレス応答タンパク質の発現を調べる。

4) グルコース-インスリン系：寿命集団において、6ヶ月おきに、採血し、血中グルコース、インスリン濃度を計測する。

5) 寿命と病理：寿命集団を自然死するまで観察し、寿命データを収集する。同時に、剖検によって特異な病変の有無や頻度を調べる。

4. 研究成果

1) 視床下部における神経ペプチドの発現：NPY-mRNA は CR によって発現レベルは上昇した。KO マウスでは発現はみとめなかった。GHRH, GnRH, Thyrotropin-releasing hormone (TRH), Corticotropin-releasing hormone (CRH)の発現レベルは、KO-AL マウスで野生型に比べ増加した(図1)。よって、NPY はこれらの神経ペプチドを抑制的に制御していることが示唆された。KO-CR では、野生型 CR とほぼ同じ発現レベルであった。よって、CR による神経内分泌系の制御は、NPY だけにはよらない(他の要因が存在する)ことが示唆された。

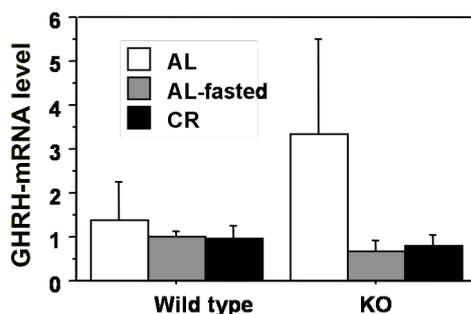


図1, 視床下部における GHRH-mRNA の発現レベル。

NPY 受容体サブタイプの解析では、type 2 (NPY2r)が CR によって増加することが示された(図2)。

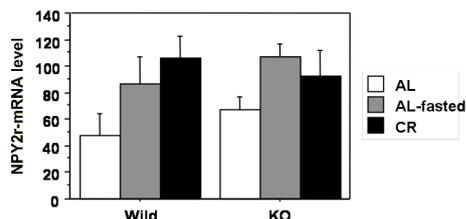


図2, 視床下部における NPY 受容体サブタイプ 2 の発現レベル

2) ストレス応答：3-NPA の高濃度投与による生存率は、40% (野生型 AL)、100% (野生型 CR)、0% (KO-AL)、20% (KO-CR)と、CR によるストレス耐性効果が NPY-KO マウスでは消失していた。低濃度 3-NPA 投与後の early response gene や stress response gene の発現解析では、c-fos の発現レベルが KO-CR で高く、酸化ストレスにおける NPY の役割が示唆された(図3)。

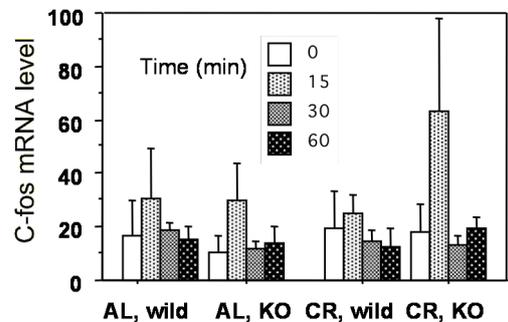


図3, 3-NPA 投与後、海馬における c-fos-mRNA の発現変化

3) グルコース-インスリン系：摂食前後、絶食時におけるインスリンの濃度は、KO マウスの方が高かった。これは、NPY のインスリン分泌に対する抑制的な効果を示唆している。老齢期におけるグルコース、インスリン濃度、インスリンレジスタンスなどについては、現在、検討中である。

4) 寿命と病理：

現在、寿命集団を120週まで観察した。NPY-KO マウスの寿命が短縮していた(図4)。CR の効果も減弱していた。病理学的には、特定の疾患が増加している証拠はなかった。以上の結果も、CR の効果に NPY が重要な役割を果たしていることを示唆している。

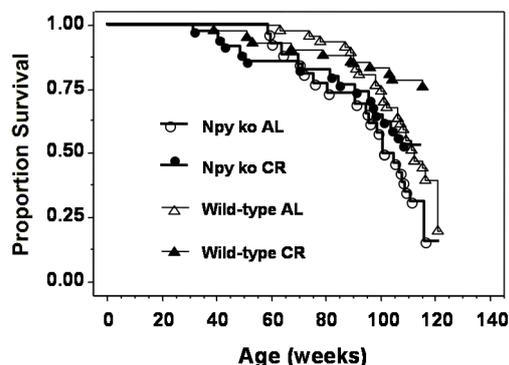


図4, 野生型、NPY-KO マウスの生存曲線(生後120週までの結果)

5) 考察とまとめ

NPY をノックアウトしても、視床下部にお

ける神経ペプチドへのCRの影響は保たれる。これは、Agouti-related peptide (AGRP) など他の制御機構が働いているためと考えられる。しかしながら、ストレス応答や寿命のデータからは、NPYを欠損するとCRの効果が減弱することが示唆された。よってNPYはCRの効果を仲介する分子であると考えられる。CRの神経内分泌仮説(図5)はさらに検証される価値のある仮説であろう。

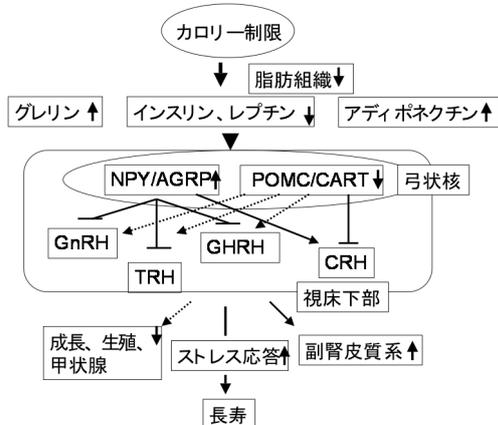


図5, CRの神経内分泌仮説

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13件)

- 1) 下川 功. カロリー制限の抗老化機構. 細胞, 2009年(印刷中)(査読無し)
- 2) 下川 功. 老化の基本メカニズムとアンチエイジング, 日本臨床, 2009年(印刷中)(査読無し)
- 3) 千葉卓哉, 山座治義, 下川 功. カロリー制限と老化. *Surgery Frontier* 2008; 15: 36-40. (査読無し)
- 4) Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T. Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells*. 2008, 30;26(5):427-35. (査読有り)
- 5) Hayashi H, Yamaza H, Komatsu T, Park S, Chiba T, Higami Y, Nagayasu T, Shimokawa I. Calorie restriction minimizes activation of insulin signaling in response to glucose: potential involvement of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis. *Exp Gerontol*. 2008;43(9):827-32 (査読有り)
- 6) Chiba T, Yamaza H, Komatsu T, Nakayama M, Fujita S, Hayashi H, Higami Y, Shimokawa I. Pituitary growth hormone suppression reduces resistin expression and enhances insulin effectiveness: relationship with caloric restriction. *Exp Gerontol*. 2008

Jun;43(6):595-600 (査読有り)

- 7) Zha Y, Taguchi T, Nazneen A, Shimokawa I, Higami Y, Razzaque MS. Genetic suppression of GH-IGF-1 activity, combined with lifelong caloric restriction, prevents age-related renal damage and prolongs the life span in rats. *Am J Nephrol*. 2008;28(5):755-64 (査読有り)
- 8) Komatsu T, Chiba T, Yamaza H, Yamashita K, Shimada A, Hoshiyama Y, Henmi T, Ohtani H, Higami Y, de Cabo R, Ingram DK, Shimokawa I. Manipulation of caloric content but not diet composition, attenuates the deficit in learning and memory of senescence-accelerated mouse strain P8. *Exp Gerontol*. 2008;43(4):339-46 (査読有り)

9) 千葉卓哉, 山座治義, 下川 功

カロリー制限による寿命延長・抗老化機構-神経内分泌仮説に基づく代謝調節の重要性-基礎老化研究 Vol. 32, No. 3, 2008, 15-20 (査読有り)

- 10) Chiba T, Fujita S, Kubota H, Inoue D, Mizuno A, Komatsu T, Yamaza H, Higami Y, Shimokawa I. Identification of fasting-induced genes in the rat hypothalamus: relationship with neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 ;1119:216-26 (査読有り)

- 11) Chiba T, Inoue D, Mizuno A, Komatsu T, Fujita S, Kubota H, Luisa Tagliaro M, Park S, Trindade LS, Hayashida T, Hayashi H, Yamaza H, Higami Y, Shimokawa I. Identification and characterization of an insulin receptor substrate 4-interacting protein in rat brain: implications for longevity. *Neurobiol Aging*. Epub 2007 Aug 27 (2009;30:474-82). (査読有り)

- 12) To K, Yamaza H, Komatsu T, Hayashida T, Hayashi H, Toyama H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I. Down-regulation of AMP-activated protein kinase by caloric restriction in rat liver. *Exp Gerontol*. 2007;42(11):1063-71. (査読有り)

- 13) Yamaza H, Komatsu T, To K, Toyama H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I. Involvement of insulin-like growth factor-1 in the effect of caloric restriction: regulation of plasma adiponectin and leptin. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(1):27-33. (査読有り)

[学会発表] (計9件)

- 1) Shimokawa I. The mechanism underlying the effect of caloric restriction: An insight from longevity genes. The 2nd

Hallym-Nagasaki International Joint Meeting on Aging & Neurodegenerative Diseases. Pyeongchon, Seoul, Korea, Feb 9, 2009

2) Shimokawa I., Longevity genes: with special reference to the mechanism underlying the effect of calorie restriction. The 10th International Symposium: Vascular aging: Molecular exploration and microinflammatory implications. Pusan National University, Korea, Dec 12, 2008

3) Shimokawa I. Calorie restriction modulates insulin signaling through suppression of growth hormone. In Symposium "Aging and anti-aging", The 9th International Congress on Cell Biology, Oct 7-10, 2008, Seoul, Korea

4) 下川 功, 「分子レベルからみたアンチエイジング・抗酸化サプリのこれから」、日本抗加齢医学会 Educational Seminar 2008、9月16日、東京

5) 下川 功, カロリー制限による老化遅延、加齢病態抑制のメカニズム. ワークショップ「老化機構解明のための病理学的アプローチ」第9回日本病理学会総会、金沢、5月15日、2008年

6) Lucas S. Trindade, Komatsu T, Yamaza H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I Calorie restriction increases TORC2-dependent CREB activity for induction of gluconeogenic gene expression by down-regulation of AMPK, 第31回日本基礎老化学会、2008年6月12-13日、松本

7) Seongjoon Park, Komatsu T, Yamaza H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I Caloric restriction upregulates the Akt-Glut pathway in the white adipose tissue possibly through moderate suppression of growth hormone, 第31回日本基礎老化学会、2008年6月12-13日、松本

8) Shimokawa I. Chungnam National University Annual Symposium on Microbiology and Molecular Genetics. "A role for growth hormone in the anti-aging effect of calorie restriction", February 15, 2008 (Daejeon, Korea)

9) Komatsu T, Fukumoto Y, Mashima H, Furuyama T, Chiba T, Yamaza H, Higami H, Shimokawa I. foxO1 is not involved in the calorie restriction -specific response to oxidative stress in mice liver. 36th Annual Meeting of American Aging Association, San Antonio, TX USA, June 2-4, 2007

[図書] (計3件)

1) Shimokawa I, Utsuyama M, Komatsu T,

Yamaza H, Chiba T. A transgenic dwarf rat strain as a tool for the study of immunosenescence in aging rats and the effect of calorie restriction. In Handbook of Immunosenescence. Eds. Fulop T et al., Springer Science+ Business Media B.V., (2009) 131-144.

2) 下川 功. カロリー制限. 新老年学3版、大内尉義、他編、東京大学出版会、2009年(印刷中)

3) 千葉卓哉、山座治義、下川 功. 内分泌モデル(GH/IGF-I)動物「老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック」基礎老化学会編、アドスリー、p130-138, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

千葉卓哉、下川 功、樋上賀一、山座治義、国立大学法人長崎大学
特願 2007-61075 寿命延長関連遺伝子およびその用途 (平成 19 年 3 月 7 日出願)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/index/index.htm>

日韓共同セミナー開催 (2008 年 9 月 4-6 日、長崎): The Japan-Korea Joint Seminar (AACL2008)-Toward the establishment of Asian Aging Research and Education Center. I. Shimokawa (Organizer), September 4-6, 2008 in Huis Ten Bosch, Nagasaki:

ホームページ:

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/AACL2008/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 功 (Shimokawa Isao)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70187475

(2) 研究分担者

千葉卓哉 (Chiba Takuya)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 40336152

山座治義 (Yamaza Haruyoshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究者番号: 30336151

樋上賀一 (Higami Yoshikazu)

東京理科大学薬学部・教授

研究者番号: 90253640