

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03141

研究課題名(和文) ヒト老化に伴うSHMT2とGCAT遺伝子発現抑制が誘発するのは短命か長寿か？

研究課題名(英文) Does age-associated down regulation of human SHMT2 and GCAT genes induce short lifespan or longevity?

研究代表者

林 純一 (Hayashi, Jun-Ichi)

筑波大学・生命環境系(名誉教授)・名誉教授

研究者番号：60142113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は我々が作製したShmt2とGcat遺伝子破壊マウスを用いて一つの逆説的仮説(ヒトの老化に伴うSHMT2とGCAT遺伝子の発現抑制は老化を促進するのではなくミトホルミシス効果により長寿に貢献する)を検証することである。なぜならアンチエイジングとしての安易なサプリメント摂取は、逆に短命を誘発する危険性があるからである。その結果、Shmt2遺伝子破壊マウスは13.5日で胚性致死となり仮説の正否を検証できなかった。一方Gcat遺伝子破壊マウスは胚性致死にならず少なくとも2年の生存が確認できたが、ミトホルミシス効果により寿命が延長されるか否かの結論を出すには今後1年以上の飼育が必要。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的意義：ヒトの老化現象は極めて多様だが、その一つである「老化に伴うエネルギー欠乏」に着目すると、どうやらグリシン摂取が「老化に伴うエネルギー欠乏」の緩和のみならず、「老化に伴う細胞分裂遅延」の緩和にも有効であるという成果をあげた。

学術的意義：「老化に伴うエネルギー欠乏」は老化とともに発症頻度が高まるがん細胞の細胞分裂を抑制し、逆に健全な老化(長寿)に貢献しているという可能性、つまり老化を促進することでがん化を抑制するという正の側面があるかもしれない。グリシン摂取による若返りについては社会的関心が高いが、がん細胞の増殖を促進する可能性を考慮したすべきであるというメッセージを発信した。

研究成果の概要(英文)：We proposed that age-related mitochondrial respiration defects observed in elderly human subjects are partially due to age-associated downregulation of nuclear-encoded genes, including SHMT2 and GCAT, which are involved in one carbon metabolism. This assertion is supported by evidence that the disruption of mouse Shmt2 induces mitochondrial respiration defects in Shmt2-knockout E13.5 embryos experiencing anaemia and lethality. In contrast, Gcat-knockout mice did not show abnormal phenotypes. We are now examining a possibility of whether Gcat-knockout may extend rather than shorten the life time by increasing "mitohormesis" effects, resulting in elongation of their lifetime by overproduction of reactive oxidative species.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヒト老化モデル ミトコンドリア呼吸欠損 Shmt2遺伝子 Gcat遺伝子 一炭素代謝

1. 研究開始当初の背景

我国はすでに超高齢化社会を迎えており、老化機構の解明と対処法の確立は急務である。この分野の定説・老化ミトコンドリア原因説によると、ミトコンドリア呼吸欠損を誘発する mtDNA 突然変異がミトコンドリア病の原因となるだけでなく、全人類の宿命である老化にも関与している。特に老化とともに後天的に生じる mtDNA 突然変異の蓄積はミトコンドリア呼吸欠損を進行させ、老化や老化関連疾患(がん化や糖尿病などの生活習慣病、神経変性疾患)の原因にもなるという。この定説はその後、mtDNA 複製酵素の校正機能破壊マウス(mtDNA 複製の際に生じるエラーの校正機能を破壊したマウス)が後天的 mtDNA 突然変異を急激に蓄積し、若年時にミトコンドリア呼吸欠損を進行させてヒト老化表現型を発現したことで、確固たる定説として現在でもこの分野の研究者に広く支持されている。

一方応募者はこの定説を検証するため、世界で初めて mtDNA 突然変異導入マウスの作製に成功しミトコンドリア呼吸欠損を誘発する先天的 mtDNA 突然変異がミトコンドリア病の原因になることを証明した。またマウス mtDNA 突然変異が ROS を漏出させ、かつ核ゲノムの背景が B6J 系統である場合は高転移性とリンパ腫を発症すること、ヒトがん組織の mtDNA 突然変異が ROS を漏出させる場合はがん患者さんの予後の悪さ(悪性化)と密接に関連していることを示し mtDNA 突然変異が老化関連疾患(がん化)にも関与していることを立証した。

しかしこの定説の最大の問題は「本当に 老化に伴い後天的 mtDNA 突然変異が蓄積し、それが呼吸欠損を誘発するのか」という点にある。応募者は近年開発された二つの革新的技術(次世代シーケンサーと iPS 細胞作製法)を活用し、次の二つの決定的証拠を提出してこの定説を否定した:(1) mtDNA 突然変異が高齢者の繊維芽細胞株に選択的に蓄積していないこと;(2) 高齢者の繊維芽細胞株をリプログラミングすると呼吸欠損が回復すること。

これらの事実から「ヒトの老化は mtDNA 突然変異の蓄積ではなく、核ゲノムのゲノム修飾という可逆的なプロセスで進行し、リプログラミングすれば原理的には若返りが可能である」という新仮説を提出した。この新仮説は世界的な注目を集め国内外のマスコミで報道された(英国 THE TIMES 2015.5.30.; 毎日新聞夕刊 2015.6.9.)。

さらに具体的に核ゲノムのどのような遺伝子の発現変化がヒトの老化に伴う呼吸欠損を誘発するのかを明らかにするため ヒト繊維芽細胞株を用いてマイクロアレイ解析等を行った。その結果、核ゲノムにある SHMT2 と GCAT 遺伝子の発現量が高齢者で低下していることを突き止めた。またマウスでこれらの遺伝子を破壊すると Gcat 遺伝子破壊は全く表現型に影響しないが、Shmt2 遺伝子破壊では胚致死となること、そして胚致死となる直前の 13.5 日胚の皮膚から樹立した MEFs (mouse embryonic fibroblasts) は呼吸欠損になるだけでなく、分裂速度が大きく遅延することも明らかにした。

これらの結果はヒトの老化で SHMT2 遺伝子などの発現抑制が老化に伴う呼吸欠損と分裂遅延に関与するという応募者の仮説を支持するものである。そこで応募者は、「老化に伴う呼吸欠損の原因」が「mtDNA 突然変異」にあるのではなく「核ゲノムのゲノム修飾」による特定遺伝子の発現制御にあるという老化機構のパラダイム転換を提案した。

実は今回破壊した Shmt2 と Gcat 遺伝子は「One Carbon Metabolism (1CM): セリンを用いて細胞分裂に必須な核酸合成を行う経路」で重要な生理役割を演じている。核酸合成はがん細胞の増殖に必須なため 1CM 関連遺伝子群の注目度が高くほとんどの遺伝子で破壊マウスが作製されていたが Shmt2 と Gcat 遺伝子破壊マウスは応募者の報告が初めてであった。この報告が 1CM 分野でも注目された理由はこれらのマウスが以下の本研究課題の核心をなす 2 つの学術的「問い」に明確な解答を与える可能性を持っていたからである。

第 1 の問いは、ヒトの老化に伴う SHMT2 遺伝子発現の抑制が老化を促進して短命にするのではなく、がん化を抑制して長寿にするのではないかという逆説的問いである。実は SHMT2 遺伝子はセリンをグリシンに変換することでプリンを合成し細胞分裂を促進させるため、ヒトがん細胞はこの遺伝子発現を上昇させて大量のプリンを合成し その異常な増殖を可能にしている。従って老化に伴う SHMT2 遺伝子の発現抑制は 逆にがん化を抑制することでヒトの長寿に貢献している可能性がある。

第 2 の問いは、ヒトの老化に伴う GCAT 遺伝子発現の抑制も老化を促進して短命にするのではなく、ホルミシス効果で長寿にするのではないかという逆説的問いである。最近の論文(Ravichandran M, Cell Metab 2018)によると、線虫・魚類・マウスの老化で共通に発現抑制される遺伝子を選別した結果 Gcat 遺伝子が同定され、線虫で Gcat 遺伝子を破壊すると酸化ストレスによるホルミシス効果が誘発され線虫を長寿にするという。さらに応募者の論文(Tani H, Sci Rep 2018)を引用し Gcat 破壊マウスでの寿命調査が重要であると記載している。

2. 研究の目的

第 1 の目的: 第 1 の問いに答えるため、Shmt2 遺伝子発現量が野生型マウスの半分しかない Shmt2 破壊ヘテロマウス (Shmt2^{+/m}) はがん発症率低下で長寿になるのかを明らかにする。また Shmt2 破壊ホモマウス (Shmt2^{m/m}) がなぜ胚致死になるのかその分子機構を解明する。

第2の目的：第2の問いに答えるため、Gcat 破壊ホモマウス (Gcatm/m) に Gcat 破壊線虫のようなホルミシス効果が出現し、このマウスが長寿になる否かを明らかにする。

以上により本申請で提案する応募者の逆説的仮説（ヒトの老化で進行する SHMT2 と GCAT 遺伝子の発現抑制は短命ではなく長寿に貢献する）を検証することが本研究の目的である。

本申請の学術的独自性はこの 1CM 分野の研究者がこれまで誰も注目してこなかった「老化」を対象としている点と、応募者だけが Shmt2 と Gcat 遺伝子破壊マウスの作製に成功している点にあり 3 年間でこの逆説的仮説を検証できる状況にある。

3. 研究の方法

実験 1：Shmt2 破壊ヘテロマウス (Shmt2+/m) が短命か長寿かを寿命調査で明らかにする

実験 2：Shmt2 破壊ホモマウス (Shmt2m/m) が胚致死になる原因を明らかにする

胚致死になる直前の 13.5 日胚では脳に比べ肝臓の萎縮が激しく貧血様症状を呈することから、それぞれの臓器の 1CM 代謝産物の質量分析等により貧血と胚致死の原因を明らかにする。

実験 3：胚致死と老化をレスキューする栄養素を明らかにする

実験 4：Shmt2m/m 胚から樹立した MEFs を用いがん化への影響を明らかにする

実験 5：Gcat 破壊ホモマウス (Gcatm/m) と Gcat 遺伝子を破壊していないマウスをそれぞれ 20 頭以上準備し Gcat 遺伝子を破壊すると酸化ストレスによるホルミシス効果が誘発されマウスを長寿にするか否かを調査する。

4. 研究成果

新型コロナウイルス感染拡大に伴う「緊急事態宣言」への対応の一環として、動物飼育施設の飼育規模縮小の要請に従ったため、本研究目的を達成するためのほとんどの実験を長期間中断せざるを得なかった。1 年以上前から実験が再開できる状況となったが、特に寿命調査は 3 年以上必要なため、本研究の終了時点では結論を出すことができなかった。

実験 1：Shmt2 破壊ヘテロマウス (Shmt2+/m) が長寿になるかの寿命調査：Shmt2 破壊ヘテロマウス (Shmt2+/m) と Shmt2 遺伝子を破壊していないマウス (Shmt2+/+) をそれぞれ 20 頭以上の飼育を開始した。Shmt2 破壊ヘテロマウス (Shmt2+/m) はこの遺伝子の発現量が半分であるため細胞のがん化が抑制され寿命が延長される可能性を確かめる目的であったが、十分な飼育スペースを確保できず、本実験を中止した。

実験 2：Shmt2 破壊ホモマウス (Shmt2m/m) の胚致死の原因を解明：胚致死になる直前の 13.5 日胚では脳に比べ肝臓の萎縮が激しく貧血様症状を呈することからそれぞれの臓器の 1CM 代謝産物の質量分析と FACS 解析した。その結果 Shmt2 遺伝子破壊により胎児肝臓の血球細胞特異的に 1CM 代謝産物異常が生じていること、そしてこれにより血球細胞の細胞分化と細胞分裂が阻害され胎児貧血になることが胚致死の原因であることを解明した。本研究結果は Scientific Reports 9, 16054. doi:10.1038/s41598-019-52372-6. に公表し、実験 2 は目的を達成した。

実験 3：胚致死と老化のレスキュー実験：妊娠メスに葉酸やグリシンなどの栄養素（サプリメント）を投与しても Shmt2 破壊ホモマウス (Shmt2m/m) を胚致死からレスキューできなかった。

実験 4：Shmt2m/m 胚から樹立した MEFs を用いて細胞のがん化への影響調査：Shmt2 破壊ホモマウスの胚から Shmt2m/mMEFs を樹立し、さらにこの細胞株の不死化に成功した。Shmt2 破壊は細胞分裂を抑制するため、不死化細胞のがん化も抑制される可能性があるが、結論を出せなかった。

実験 5：Gcat 破壊ホモマウス (Gcatm/m) と Gcat 遺伝子を破壊していないマウスをそれぞれ 20 頭以上準備し寿命調査を再開した。Gcat 破壊ホモマウスにも Gcat 破壊センチウと同じホルミシス効果が出現するとすれば、センチウ同様長寿になる可能性が期待できる。現在 2 年程度飼育しているが、結論が出るまでもう 1 年程度必要である。

以上、ヒトの老化現象は極めて多様だが、その一つである「老化に伴うエネルギー欠乏」に着目すると、どうやらグリシン摂取が「老化に伴うエネルギー欠乏」の緩和みならず、「老化に伴う細胞分裂遅延」の緩和にも有効であるという成果をあげた。なお「老化に伴うエネルギー欠乏」は老化とともに発症頻度が高まるがん細胞の細胞分裂を抑制し、逆に健全な老化（長寿）に貢献しているという可能性、つまり老化を促進することでがん化を抑制するという正の側面があるかもしれない。グリシン摂取による若返りについては社会的関心が高いが、がん細胞の増殖を促進する可能性を考慮したすべきであるというメッセージを発信した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Haruna Tani, Takayuki Mito, Vidya Velagapudi, Kaori Ishikawa, Moe Umehara, Kazuto Nakada, Anu Suomalainen, Jun-Ichi Hayashi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Disruption of the mouse Shmt2 gene confers embryonic anaemia via foetal liver-specific metabolomic disorders. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16054 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52372-6. | 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 |

〔学会発表〕 計0件

〔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 | 米川 博通 (Yonekawa Hiromichi) (30142110) | 公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医学研究分野・研究員 (82609) | |
| 研究分担者 | 高橋 智 (Takahashi Satoru) (50271896) | 筑波大学・医学医療系・教授 (12102) | |

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 |
|---------|---------|