

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04033

研究課題名(和文) カロリー制限による抗老化機構：マクロファージにおけるFoxO転写因子の役割

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the anti-aging effect of calorie restriction: Roles for FoxO transcription factors in macrophages

研究代表者

下川 功 (Shimokawa, Isao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：70187475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限(CR)の抗老化機構におけるFoxO1及びFoxO3転写因子の役割、特に炎症抑制に着目し、研究を行なった。まず、骨髄球系細胞特異的にFoxO1あるいはFoxO3遺伝子が欠失するマウスを複製し、野生型マウスとともに自由摂食(AL)、CR環境下で飼育した。細胞レベルでの炎症の指標となるInflammasomeの活性化を腹腔内マクロファージにおいて解析した。Inflammasomeの活性化は、CRによって抑制されること、AL飼育下では、FoxO1欠失によって活性化が減弱し、炎症ストレス耐性が増強することを示した。今後、CR条件下でのFoxO1、FoxO3の役割をさらに検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軽微だが慢性的に持続する細胞レベルの炎症が老化や関連する疾患の発症を促進すると考えられている。本研究は、実験動物だけではなくヒトにも応用可能と期待されるカロリー制限(CR)の抗老化効果が、細胞レベルにおける炎症を抑制することを示唆した。この成果は、CRの抗老化効果の分子メカニズムを解明するうえで、学術的な意義が高いこと、また、自由摂食下では、炎症細胞におけるFoxO1の減弱が抗老化効果を生み出す可能性を指摘し、それを老化や関連疾患の制御に応用できることを示唆した点は、高齢化社会における健康寿命延伸に貢献する上で、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to elucidate the role for forkhead box O (FoxO)1 and FoxO3 transcription factors in the anti-aging mechanism of calorie restriction (CR) regarding suppression of inflammation. First, we generated mice lacking myelomonocyte-specific Foxo1 or Foxo3 gene (Foxo1 cKO, Foxo3 cKO), and kept those mice under ad-libitum (AL) or CR feeding condition. Activation of inflammasome, a marker of inflammation at the cellular level, was analyzed in intraperitoneal macrophages. The results indicated that inflammasome activation was suppressed by CR. Although the potential role for FoxOs in the effect of CR remains unknown, macrophages derived from Foxo1 cKO mice displayed attenuated activation of inflammasome even in AL conditions. Foxo1 cKO mice also resisted against lipopolysaccharide-induced inflammatory stress. The present study will continue to elucidate the roles for FoxO1 and 3 in the effect of CR.

研究分野：病理学

キーワード：老化 カロリー制限 炎症 FoxO転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 摂食カロリー (Calorie restriction, CR) を適度に制限すると、哺乳類を含む広範囲な動物の寿命が延伸する。アカゲザルを用いた研究は、霊長類においても CR による疾病抑制、健康寿命延伸効果が期待できることを示した。これまでの研究は、CR の抗老化効果に成長ホルモン (GH) -インスリン様成長因子 1 (IGF-1) シグナルの抑制と下流にある FoxO 転写因子の活性化が必要であることを示唆した。我々は、FoxO 転写因子のアイソフォームである Foxo1、Foxo3 遺伝子半欠失 (+/-) マウスを用いて寿命研究を行い、CR による寿命延長に FoxO3 が主要な役割を果たしていること<sup>1)</sup>、寿命制御には大きな役割はないが、腫瘍抑制には FoxO1 が関連していることを明らかにした<sup>2)</sup>。

(2) 近年、細胞レベルにおいて、inflammasome と呼ばれる自然免疫のセンサーが活性化され、マクロファージは、炎症性サイトカインを分泌し、炎症反応を増悪させ、周囲の実質細胞に傷害を与えることが報告されるようになった<sup>3)</sup>。この細胞レベルにおける軽微だが慢性的な炎症反応が老化および癌を含む老化関連疾患を進行させる主な要因と考えられている (Inflammaging 仮説)。長寿化する GH 受容体欠損マウスのマクロファージでは、加齢にともなう inflammasome の活性化と免疫系の老化が抑制されていた<sup>4)</sup>。マクロファージでは、GH-IGF-1 系による FoxO3 もしくは FoxO1 の抑制が、細胞レベルの炎症の増悪に関与している可能性が高い。CR による FoxO 転写因子を介した炎症抑制メカニズムは、ヒトの健康寿命延伸にも応用可能である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、inflammasome の活性化に起因する細胞レベルにおける炎症を CR が抑制すること、この抑制に FoxO1 もしくは FoxO3 が関与していることを明らかにする。加えて、神経細胞、肝細胞、脂肪細胞特異的 Foxo3 欠失マウスと比較することによって、CR の抗老化作用におけるマクロファージの寄与度を解析する。

(2) 脳内における炎症と海馬の歯状回や第 3 脳室周囲に存在する神経幹細胞の加齢変化、酸化ストレスや遺伝子毒性に誘発された炎症と肝細胞の傷害や発癌、脂肪組織の加齢変化とインスリン耐性を指標として、加齢関連疾患におけるマクロファージの役割を解析する。加えて、マクロファージ特異的 Foxo1 欠失マウスと比較することによって、CR の老化と癌の制御機構の違いを解明する。

## 3. 研究の方法

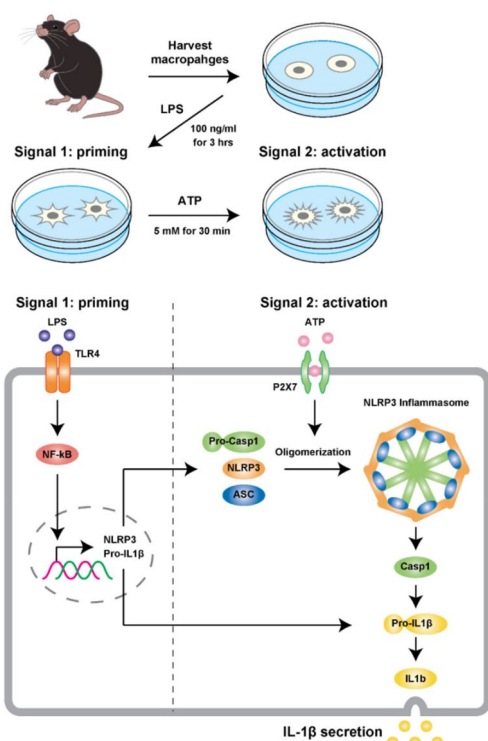


図 1. 腹腔内マクロファージを用いた inflammasome の活性化 (Kim SE, Shimokawa I. et al. 2020)

(1) **骨髄球系特異的ノックアウトマウスの作製**: Cre-loxP システムを用いてマクロファージ特異的 Foxo1、Foxo3 遺伝子欠失マウス (Foxo1 cKO, Foxo3 cKO) を作製した。つまり、Foxo1<sup>L/L</sup>、Foxo3<sup>L/L</sup> マウスと LysM-Cre マウスを交配した。CR (自由摂食群 (AL 群) の 70% 量を給餌する) は生後 12 週より行った。各 Foxo 遺伝子欠失マウスによる寿命集団、経時的屠殺集団を確立し、以下の実験に供給した。

(2) **マクロファージにおける inflammasome の活性化**: マウス腹腔内に thioglycolate を投与後、滲出したマクロファージを回収し、培養系に移した。図 1 に示すように、Lipopolysaccharides (LPS) によるプライミング、ATP による inflammasome 活性化過程を NF-κB、Caspase1、Interleukin-1beta (IL-1b) など指標として解析した (図 1<sup>5)</sup>)。

### (3) ストレス耐性

Lipopolysaccharide (LPS) 投与によるエンドトキシンショックモデルを用いて、炎症ストレス耐性を解析した。

## 4. 研究成果

(1) inflammasome 活性化の評価系の確立：7-8 ヶ月齢マウスを用いて、野生型マウスにおける CR の影響、AL 群における Foxo1、Foxo3 の欠失の影響を検討した。培養上澄、cell lysate (細胞溶解物) の解析から、CR は培養上澄中の活性型 caspase-1、IL-1b の量を減少させること、細胞レベルで、pro-caspase-1 の活性化を抑制することを明らかにした (図 2)。よって、CR は inflammasome の活性化を抑制すると考えられた。細胞溶解物の解析によって、AL 群では、Foxo1 欠失によって、活性型 IL-1b が野生型 (WT) に対して減少すること、Foxo3 欠失では、有意な変化がないことを明らかにした (図 2)。よって、AL 飼育マウスでは、Inflammasome の活性化に Foxo1 が関与していることを示唆した。

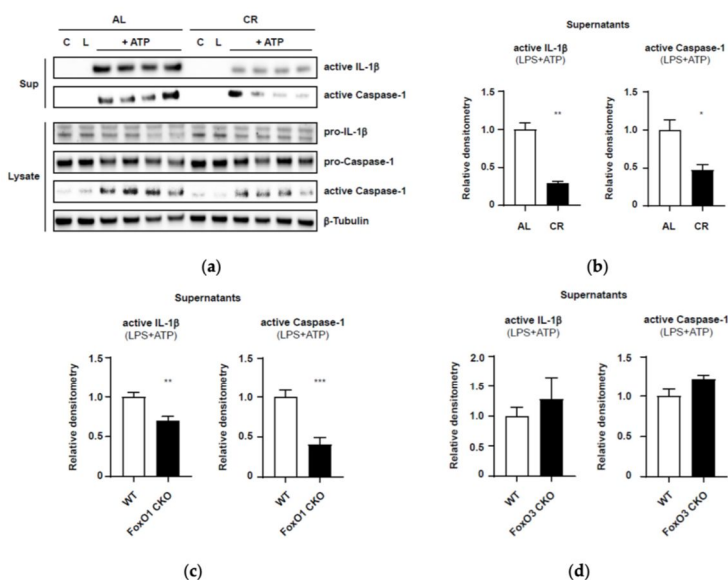


図2. マクロファージにおける Inflammasome の活性化 (7-8 ヶ月齢マウス)。  
a) 野生型マウス AL 及び CR マウス腹腔内マクロファージにおける免疫プロット。Sup: 培養上澄, Lysate: 細胞溶解物。b, c, d) 免疫プロットの定量的解析。WT: 野生型マウス、Foxo1 CKO、骨髓球系特異的 Foxo1 欠失マウス、Foxo3 CKO、骨髓球系特異的 Foxo3 欠失マウス (Kim SE, Shimokawa I. et al. 2020)

### (2) 加齢と CR、Foxo1 欠失の影響：

**加齢変化：**野生型マウスでは、10-11 ヶ月に対して、16-18 ヶ月では、AL 群で IL-1b の濃度は低下した (図 3A, C)。CR 群ではその加齢変化が抑制されていた。Foxo1 欠失マウスでは、AL、CR 群とも加齢に伴い、IL-1b が増加する傾向があった。

**CR と Foxo1 欠失の影響：**野生型マウス、10-11 か月齢では、CR 群由来の腹腔内マクロファージにおいて、培養上澄中の活性型 IL-1b が AL 群に比較して減少していた (図 3A)。Foxo1 欠失マウスでは、AL、CR 群とも IL-1b は WT より低い傾向があったが (図 3B)、特に AL 群で低下傾向が強かった。結果的に、Foxo1 欠失マウスでは、AL 群に比し、CR 群の方が高かった (図 3B)。16-18 ヶ月齢では、WT、Foxo1 欠失マウスいずれにおいても、IL-1b 濃度は AL 群に対して CR 群が高

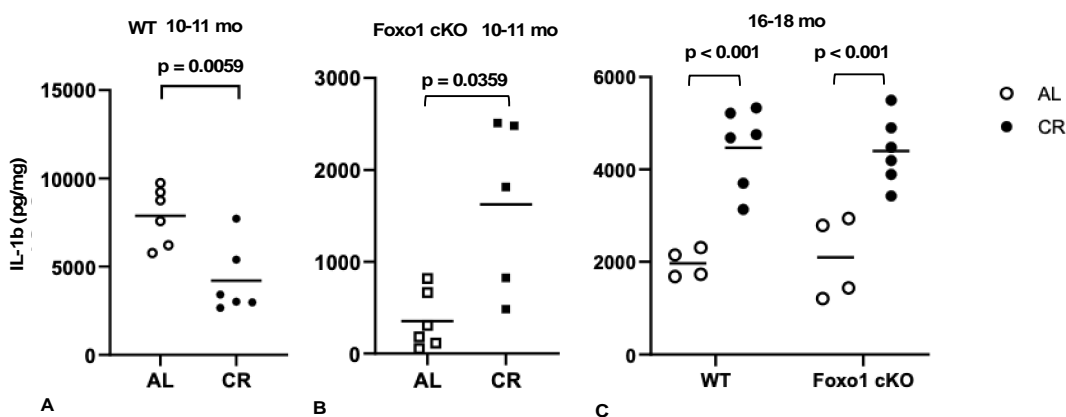


図3. マクロファージにおける inflammasome の活性化。腹腔内マクロファージを LPS でプライミング後、ATP で活性化し、培養上澄中の IL-1b を ELISA 法にて計測した。

かった (図 3C)。WT と Foxo1 欠失マウス間に有意な差はなかった。

(3) Foxo3 欠失の影響：18 ヶ月齢マウスマクロファージの解析では、CR 群の方が AL 群に比べ、IL-1b の濃度が高い傾向があるが、Foxo3 の欠失による有意な変化はなかった (図 4)。現在、6-7 か月齢マウスの解析を行なっている。

(4) ストレス耐性における Foxo0 の役割：CR マウスの特徴の一つは、様々なストレスに対する耐性の増強である。本研究では、LPS 投与後の生存率を解析した。LPS 投与後の生存率は、対照群 (C57/BL6 及び Foxo1<sup>L/L</sup> マウス) に比し、Foxo1 欠失マウスで高かった (図 5)。現在 Foxo3 欠

マウスのストレス耐性について、実験を予定している。

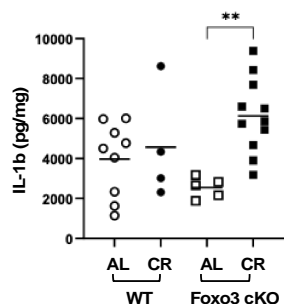


図4. マクロファージにおける inflammasome の活性化。Foxo3欠失の影響、18ヶ月齢

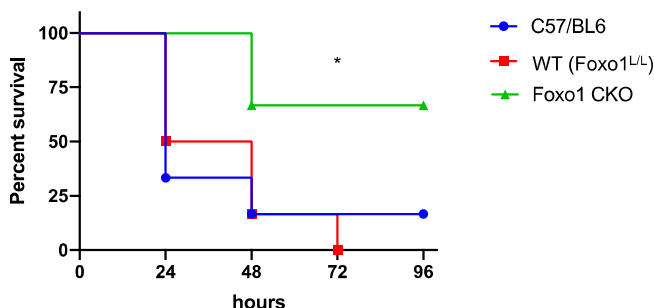


図5. LPSストレス耐性。LPS投与後の生存率 (n = 6) \*, p < 0.05 versus C57/BL6 and WT by Log-rank test

## まとめと展望

本研究の期間中に、骨髄球系細胞特異的 Foxo1, Foxo3 欠失マウスを作製し、腹腔内マクロファージを用いて、inflammasome の活性化を評価した。加齢に伴い、Inflammasome の活性化は減弱した。CR は 7-8 ヶ月、10-11 ヶ月齢で活性化を抑制するが、加齢に伴う変化は少なかった。Foxo1 が欠失すると AL 飼育下でも Inflammasome の活性化が減弱した。動物個体レベルにおけるストレス耐性も Foxo1 欠失マウスで増強していた。Foxo3 の欠失の影響は、現時点では捉えられていない。現在、6-7 ヶ月齢のマクロファージを用いた解析、ストレス耐性を検討している。本研究期間中に得られた結果は、CR 飼育下における FoxO1, FoxO3 の役割は明確ではないが、AL 条件下では、Foxo1 が欠失した方が、炎症やストレスを抑制することを示唆している。今後は寿命集団の解析、加齢疾患モデルなどを用いた研究を行い、Foxo1、Foxo3 遺伝子と CR、炎症と寿命や加齢疾患との関連性を明らかにする。

## <引用文献>

- 1) Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, Kim SE, Kawata T, Park S, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Mori R. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*. 2015 Aug;14(4):707-9. doi: 10.1111/ace1.12340.
- 2) Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I. FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell*. 2010 Jun;9(3):372-82. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00563.x.
- 3) Goldberg EL, Dixit VD. Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunol Rev* 2015 May;265(1):63-74. doi: 10.1111/imr.12295.
- 4) Spadaro O et al., Growth Hormone Receptor Deficiency Protects against Age-Related NLRP3 Inflammasome Activation and Immune Senescence. *Cell Rep*. 2016 Feb 23;14(7):1571-1580. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.044.
- 5) Kim SE, Mori R, Shimokawa I. Does Calorie Restriction Modulate Inflammation via FoxO Transcription Factors? *Nutrients*. 2020 Jun 30;12(7):1959. doi: 10.3390/nu12071959.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kim Sang-Eun, Mori Ryoichi, Shimokawa Isao	4. 巻 12
2. 論文標題 Does Calorie Restriction Modulate Inflammation via FoxO Transcription Factors?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1959 ~ 1959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12071959	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 Komatsu T, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamaza H, Shimokawa I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanisms of Calorie Restriction: A Review of Genes Required for the Life-Extending and Tumor-Inhibiting Effects of Calorie Restriction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11123068.	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下川 功
2. 発表標題 カロリー制限研究の歴史と展望
3. 学会等名 日本基礎老化学会 第一回市民フォーラム in 松本（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Isao Shimokawa
2. 発表標題 Roles for FoxO3 in mitochondrial and metabolic responses to dietary restriction
3. 学会等名 14th International Congress of Cell Biology & 9th Asian Pacific Organization for Cell Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下川 功
2. 発表標題 摂食エネルギー制限による老化制御機構
3. 学会等名 第112回日本病理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・医療科学専攻・長崎大学医学部病理学・病理学分野 <a href="https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/">https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/</a> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・病理学分野 <a href="http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/">http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/</a>
--

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

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
---------	---------