

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11627

研究課題名（和文）細胞老化の成因とストレスの影響も考慮した細胞老化随伴分泌現象を緩和する方法の探索

研究課題名（英文）A study on the ways to alleviate senescence-associated secretory phenotype

研究代表者

齋藤 靖和 (Saitoh, Yasukazu)

県立広島大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90405514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たな老化細胞制御法の探索を目的に研究を進めた。ヒト線維芽細胞を用い、細胞老化の成因による（Senescence-Associated Secretory Phenotype：SASP）発現の違い、老化細胞特異的除去（Senolysis）作用を示す化合物の探索、SASP制御に有効な（Senostatics）化合物の探索を行った。その結果、細胞老化の成因によりSASP発現が異なること、Senolysis効果を示す化合物は見つからなかったものの、Senostatics効果を示す化合物としてプテロスチルベン多糖体を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞を知り、適切な制御を実現することは、加齢に伴う組織・臓器の健全性を高め、健康状態を改善し、疾病予防や見た目の加齢性変化の緩和にもつながることが期待される。疾患の発症・進展に関わる老化細胞のSASP制御に取り組み、学術データを蓄積することは、細胞老化が進み、老化細胞の蓄積が起きていると推定される中高齢者の健康を改善するための新たなエビデンスの提供につながる。また、老化細胞をターゲットとした薬剤開発という新たな概念に基づいた疾病予防、健康寿命延伸を目的として、老化細胞の特性に応じたSASP制御効果をもつ有効成分の発見・開発など新たな研究領域開拓や産業利用への波及効果も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to explore a new method to control senescent cells. Using human fibroblasts, we investigated the differences in Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) expression depending on the cause of cellular senescence, the search for compounds that exhibit senescence-associated cell-specific elimination (Senolysis), and the search for compounds effective for SASP control (Senostatics) compounds that are effective in regulating SASP. As a result, we found that SASP expression differed depending on the cause of cellular senescence, and newly discovered that pterostilbene polysaccharide could exert Senostatic effect.

研究分野：栄養学および健康科学

キーワード：細胞老化 細胞老化随伴分泌現象(SASP) Senolysis Senostatics ヒト線維芽細胞 スチルベノイド  
スチルベノイド誘導体 プテロスチルベン多糖体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は老化する。体内における老化細胞の発生は、当初、がん抑制機構の一つとして注目されていたが、近年、加齢に伴い老化細胞の蓄積が起こることやその死滅による細胞数減少が組織や器官の機能に影響を与え、組織機能の低下や炎症誘導、疾病発症や進展、発がんや悪性化など人体へ様々な悪影響をもたらすことが明らかになってきた。この老化細胞の蓄積による悪影響の主因となるのが細胞老化随伴分泌現象 (Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP) であり、炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素や増殖因子、エクソソーム等さまざまな生理活性物質等の関与が知られている。このような背景から、体内に蓄積した老化細胞を人為的に死滅・除去することでがんを含む様々な加齢性疾患の発症率が低下し、健康寿命を延伸することが期待されている。実際マウスにおいてその有効性が報告されるなど (Baker DJ et al., Nature 2016)、老化細胞を除去する効果がある薬剤 (Senolytic drug) 候補の開発が精力的に進められており、これまでに 14 種類の化合物が見出され、臨床応用へ向けた研究が進んでいる (Katsuomi G et al., Front Cardiovasc Med. 2018)。

一方、細胞老化は細胞自身にも様々な変化をもたらす。これまでに申請者らは、細胞老化に伴い細胞の増殖速度は低下し、細胞の形態変化、テロメアの短小化、遺伝子の発現プロファイルが大きく変化すること (Watanabe, Saitoh et al., Biomed Pharmacother. 2010, Saitoh et al., Mol Cell Biochem. 2018)、SASP が周囲の非老化細胞に細胞老化を誘導すること、メラノサイトに作用して老人性色素斑のような加齢性変化を助長すること (抗加齢医学会 2017, 2019)、老化細胞で細胞内酸化ストレスの増大が起こることなど、細胞内外の環境に大きな変化をもたらすことを明らかにしてきた (Saitoh et al., Mol Cell Biochem. 2013, 2018, 抗加齢医学会 2016, 2019)。さらに、細胞の老化の進行度によって細胞に対する薬剤 (化合物) の影響が異なる可能性も見出しており (Saitoh et al., Mol Cell Biochem. 2013, 斉藤 靖和ら, ビタミン 2014, Saitoh et al., Mol Cell Biochem. 2018)、現在、非老化細胞と老化細胞でストレス防御効果が異なる化合物を探索し、既にいくつか発見・報告しているところである (日本酸化ストレス学会学術集会 2019, Hamada, Saitoh et al., Natural product communications 2018)。

体内の老化細胞の除去や制御はヒトの加齢性疾患の低減や改善につながる可能性を秘めており、新規創薬ターゲットとして注目を集めている。老化細胞を除去する Senolytic drug については、細胞により効果が異なること、ヒトでの有効性が確認されていないこと、一方で老化細胞は、がん抑制、個体発生、組織修復、免疫制御など生体の恒常性維持に重要な役割も担っていることから、老化細胞除去には予期せぬ副作用を引き起こす危険性があり、実用化には課題があることが指摘されている (Wilson WH et al., Lancet Oncol. 2010, Schoenwaelder SM et al., Blood. 2011)。そこで申請者は、Senolytic drug だけでなく、老化細胞に対するより高い実現可能性を有するアプローチとして、老化細胞由来の SASP による悪影響を緩和する Senostatic drug も加齢性疾患に対するより安全かつ柔軟性のある手段になりうると考え、注目している。

## 2. 研究の目的

老化細胞の SASP 制御を実現するためには、老化細胞の SASP 発現に影響を与える因子など、老化細胞の特性を把握しておく必要があるが、老化細胞の性質に関しては未解明な部分が多く、老化細胞の成因の違いによる SASP の違い (SASP の種類や量) についてさえもまだ良く分かっていない。そこで、本研究は、老化細胞の成因に基づく SASP 発現の相違を見出すと共に、それら SASP を適切に制御可能な化合物の探索とそのメカニズム解明を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、老化細胞の誘導契機の違いにより SASP 発現は異なるのかについて検討を行い、次に、老化細胞を除去する Senolytic 作用を示す化合物 および老化細胞由来の SASP による悪影響を緩和する Senostatic 作用を示す化合物の探索を以下の方法により検討した。

### (1) 細胞老化の成因による SASP 発現の違い

#### 複製老化細胞の取得

ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 (TIG-1) を用い、継代培養を繰り返すことにより複製老化細胞を取得した。研究室での先行研究を参考に、累積分裂回数 (Population Doubling Level: PDL) 35 未満の細胞を非老化細胞、PDL55 以上の細胞を老化細胞として用いた。細胞老化については顕微鏡観察による形態異常および分裂速度、粒度分析装置による細胞サイズの変化、老化マーカーの一つである senescence-associated galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 染色により確認を行った。

## ストレス誘導性老化細胞の取得

### ・酸化ストレス刺激による細胞老化誘導

先行研究事例および研究室での予備検討を参考に、非老化細胞へ過酸化水素を 1 時間処理することで酸化ストレス誘導性老化細胞の作製を試みた。過酸化水素曝露後の細胞数の変化を追跡するとともに、SA-β-gal 染色により細胞老化が誘導されたかどうか確認した。

### ・接触阻害による細胞老化誘導

非老化細胞を高密度で播種し、6 日間培養することで接触阻害状態とし、ストレス誘導性老化細胞の作製を試みた。その後、SA-β-gal 染色により細胞老化が誘導されたかどうか確認した。

## 細胞老化の成因による SASP 発現の違い

非老化細胞と接触阻害条件で培養した非老化細胞（以下、接触阻害細胞）、老化細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、SASP 関連遺伝子、老化関連遺伝子、抗酸化関連遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR で比較した。

### (2)老化細胞特異的除去(Senolytic)作用を示す化合物の探索

非老化細胞および複製老化細胞にスチルベン化合物を含む候補化合物（8 種）をそれぞれ添加し、48 時間培養後の細胞数を WST-1 法で評価することにより、非老化細胞と老化細胞間におけるそれぞれの化合物に対する感受性の違いを評価、比較した。非老化細胞と比べ、老化細胞において顕著な細胞数の低下が認められた場合は、Senolytic 作用を示すことになる。

### (3)SASP 制御に有効な(Senostatic) 作用を示す化合物の探索

非老化細胞と複製老化細胞に対し、スチルベン化合物とそれら誘導体計 7 種をそれぞれ添加し、24 時間培養後、各細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR により SASP および老化関連遺伝子の発現変化を調べた。また、顕著な SASP 関連遺伝子の発現低下を示した化合物については、SPiDER-Gal を用いて SA-β-gal 活性に対する影響を評価した。

### (4)SASP 制御に有効な(Senostatic) 作用を示す化合物の作用メカニズムについて

SA-β-gal 活性抑制効果が見られた化合物についてはその作用メカニズムの推定を目的として、処理 24 時間後の細胞内活性酸素(ROS)レベルへの影響を 6-Carboxy-2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CDCFH-DA)を用いて評価した。また、リアルタイム PCR により細胞老化に伴う抗酸化、Sirtuin、Interferon、Autophagy 関連遺伝子の発現変化について検討した。

## 4 . 研究成果

### (1)細胞老化の成因による SASP 発現の違い

生体内には長い年月を経て生じた老化細胞や一時的な強いストレスなどを契機に生じたストレス老化細胞が混在している。このことから、これら細胞老化の誘導契機の違いにより SASP 発現は異なるのかについてまず検証を行った。また、老化細胞の取得には通常、長期間にわたる継代培養の繰り返しが必要となる。このため、老化細胞を短期で大量に準備することが難しく、細胞老化研究の一つの障害ともなっている。そこで、本研究では細胞老化の成因による SASP 発現の違いのみならず、老化細胞の簡易かつ大量に確保することも視野に、ストレス刺激と細胞の接触阻害の 2 つの老化細胞誘導法に着目し、これらの方法を利用した老化様細胞モデルの作製についても検討した。

まず、先行研究を参考にストレス刺激として過酸化水素を用いて検討したところ、過酸化水素曝露により細胞増殖の低下が認められたものの、細胞死や異常形態を示す細胞の増加や SA-β-gal 染色中に脱落する細胞が多数現れるなど、多くの課題が認められた。また、再現性にバラツキがあり、安定した老化細胞の確保に至らなかったことから、今回の検討において、過酸化水素を用いたストレス細胞老化作製に関するさらなる検討は断念し、方法をもう一つの接触阻害による誘導法へ切り替えた。接触阻害細胞について SA-β-gal 染色を行ったところ、非老化細胞と比べ有意な SA-β-gal 陽性率の増加が確認され、細胞老化が誘導されていることが示された（図 1）。

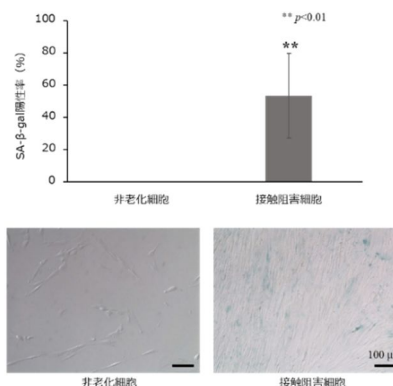


図1 接触阻害細胞における細胞老化マーカーSA-β-gal陽性率（上図）、と染色像（下図）

そこで、非老化細胞と接触阻害細胞、老化細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、リアルタイム PCR による老化関連遺伝子を含む 25 遺伝子の解析比較を行った。その結果、複製老化と接触老化細胞間に一部類似性は認められるものの、両者で異なる変化を示す遺伝子が多数認められた

(図 2)。このことから、老化契機が異なる複製老化細胞と接触障害細胞は、類似の表現型は示すが、同様の性質を有する細胞とは言い難いこと、老化細胞の研究において、簡易的に大量に老化細胞を得られる可能性はあるものの、先の理由から老化細胞の成因も踏まえた上で、使い分けて研究に用いるべきであるという結論に至った。これらの検討結果をもとに以降の研究においては、細胞の準備に手間はかかるが、細胞の表現型の変化が比較的均一で安定していた複製老化細胞の方が研究遂行に適していると判断した。

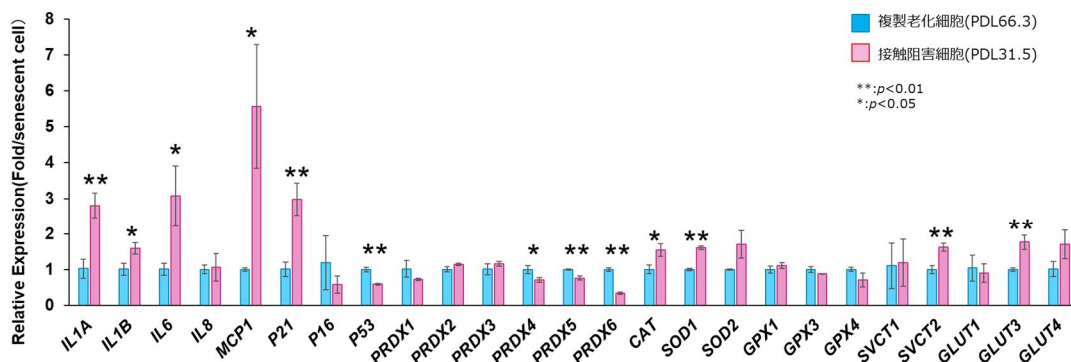


図2 複製老化と接触障害細胞の遺伝子発現の違い

## (2) 老化細胞特異的除去 (Senolytic) 作用を示す化合物の探索

老化細胞の解析及び慢性炎症の緩和を目的とした最近の研究において、Senolysis や Senostatics といった概念が提唱され、Senolytic 及び Senostatic 作用を持つ化合物の探索が行われつつある。そこで、Senolytic/Senostatic 作用を有する化合物の探索を目的として検討を行った。非老化細胞および複製老化細胞を用い、まずは Senolytic 作用について検討を行った。過去の研究結果から注目していたスチルベン化合物などについて Senolytic 作用の検討を行ったところ、非老化細胞と比べ老化細胞の細胞生存率を顕著に抑制するような作用は認められず、期待していた効果は得られなかった。図 3 に検討した 8 種のうちスチルベン化合物 5 種の結果を示す (右図赤矢印の方へ大きくシフトしていれば Senolytic 作用ありと判断される)。

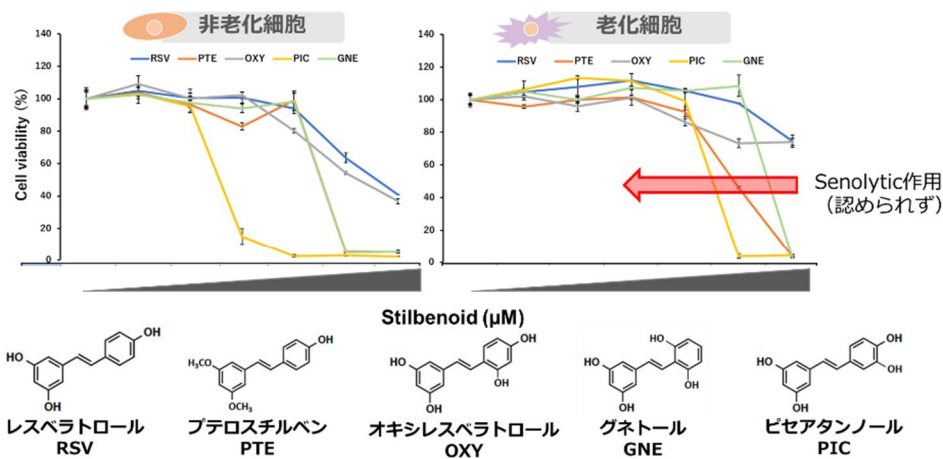


図3 スチルベン化合物によるSenolytic作用

### (3)SASP 制御に有効な Senostatic 作用を示す化合物の探索

候補としていた化合物に Senolysis 作用が認められなかったことから、次に Senostatic 作用について検討を行った。まず、非老化細胞と複製老化細胞を比較した結果、MCP-1、IL-1、IL-6、P21 遺伝子の有意な発現上昇がみられたことから、これら細胞老化に伴って変動する遺伝子に着目し、スチルベン化合物 7 種の Senostatic 作用について検討を行った。その結果、レスベラトロール多糖体 (RSVgly)、プテロスチルベン多糖体 (PTEgly)、オキシレスベラトロール (OXY) において SASP 関連遺伝子の発現低下が認められ、特に PTEgly、OXY において SASP 関連遺伝子の発現が顕著に抑制された。また、RSVgly、PTEgly においては p21 の発現低下がみられるなど、Senostatic 効果が期待される化合物を見出すことができた。さらに、PTEgly が老化マーカーである SA-β-gal 活性を顕著に抑制することも明らかとなった (図 4)。

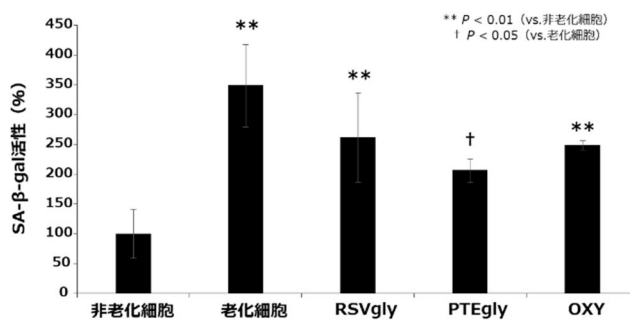


図4 スチルベン化合物のSA-β-gal活性に対する影響

### (4)SASP 制御に有効な Senostatic 作用を示す化合物の作用メカニズムについて

複製細胞老化に伴い細胞内の ROS レベルが上昇することから、Senostatic 作用を示した化合物 (RSVgly、PTEgly、OXY) による細胞内 ROS レベルへの影響を CDCFH-DA を用いて測定した。その結果、非老化細胞と比較して老化細胞で有意な細胞内 ROS の増加が認められ、RSVgly、PTEgly により老化細胞における細胞内 ROS レベルの減少傾向がみられた。しかしながら、細胞内 ROS 低下は顕著であるとはいえず、Senostatic 作用とのはっきりとした関連性は認められなかった (図 5)。

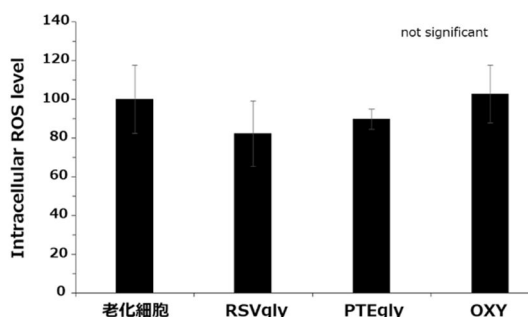


図5 スチルベン化合物の細胞内ROSレベルに対する影響

そこで最も Senostatic 作用の強かった PTEgly のメカニズムを推定するため、リアルタイム PCR により細胞老化に伴う抗酸化、Sirtuin、Interferon、Autophagy 関連遺伝子の発現変化と PTEgly による影響を検討した。その結果、PTEgly は細胞老化に伴い減少した抗酸化、Sirtuin、Autophagy 関連遺伝子の発現を増加させ、抗酸化能の促進や選択的オートファジーを介した損傷ミトコンドリアやリソソーム除去の促進、Interferon や SASP 産生に関与する cGAS-STING 経路、NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで Senostatic 効果を発揮している可能性を見出した。

以上の結果から、老化細胞の誘導契機の違いにより SASP 発現は異なる可能性があること、今回検討した候補化合物のうち、OXY、RSVgly、PTEgly が SASP 関連因子の発現を抑制する Senostatic 効果を有すること、その中でも PTEgly が優れていることが明らかとなった。今後、さらにメカニズム解析を進めることで PTEgly が Senostatic drug としての応用されることを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saitoh Yasukazu, Kawasaki Naho, Eguchi Natsumi, Ikeshima Minoru	4. 巻 55
2. 論文標題 Combined treatment with dissolved hydrogen molecule and platinum nanocolloid exerts carcinostatic/carcinocidal effects by increasing hydrogen peroxide generation and cell death in the human gastric cancer cell line NUGC-4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 211 ~ 220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2021.1902514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Shinya, Saitoh Yasukazu, Miwa Nobuhiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Carcinostatic effects of alkanoyl ascorbate plus platinum nano-colloid and stabilization of the esterolytically resultant ascorbate by hydrogen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 436 ~ 444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-020-00462-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh Yasukazu, Tanaka Asuka, Hyodo Sayuri	4. 巻 21
2. 論文標題 Protective Effects of Polyvinylpyrrolidone-Wrapped Fullerene Against Nitric Oxide/Peroxynitrite-Induced Cellular Injury in Human Skin Keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nanoscience and Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 4579 ~ 4585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1166/jnn.2021.19279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh Yasukazu, Yamaguchi Yuuki, Okada Yuhei	4. 巻 476
2. 論文標題 Protective effects of dissolved molecular hydrogen against hydrogen peroxide-, hydroperoxide-, and glyoxal-induced injuries to human skin keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3613 ~ 3622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-021-04189-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Y, Yonekura N, Matsuoka D, Matsumoto A	4. 巻 477
2. 論文標題 Molecular hydrogen suppresses Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced increases in interleukin-1 alpha and interleukin-6 secretion in human gingival cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and cellular biochemistry	6. 最初と最後の頁 99 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-021-04262-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齋藤靖和	4. 巻 55
2. 論文標題 細胞老化に伴う特徴的な変化からみるSenolysis/Senostaticsの可能性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 32 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤靖和, 福田大智, 岩本大輝, 田邊朝弓, 金井直人, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト線維芽細胞におけるスチルベン化合物とそれら誘導体の抗老化作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤靖和, 福田大智, 岩本大輝, 田邊朝弓, 金井直人, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト線維芽細胞におけるスチルベン化合物の抗老化作用の可能性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (京都)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤靖和, 福田大智, 岩本大輝, 田邊朝弓, 濱田 博喜
2. 発表標題 老化ヒト線維芽細胞におけるスチルベン誘導体のSenostatic効果
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会(京都)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 靖和, 脇田 有瑳, 山口 諒子, 金輪 静夏, 野原 鞠, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト皮膚表皮細胞HaCaTにおけるcumene hydroperoxide誘導性細胞傷害に対するスチルベン誘導体の防御効果
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会(仙台)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 舜, 谷村 友翼, 古畑 朋也, 福喜多 優介, 齋藤 靖和
2. 発表標題 高濃度アスコルビン酸によるヒト線維肉腫細胞の増殖抑制/殺傷および浸潤抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷村 友翼, 福喜多 優介, 古畑 朋也, 齋藤 靖和
2. 発表標題 高濃度アスコルビン酸によるヒト線維肉腫細胞の増殖抑制/殺傷効果とそのメカニズム
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会学術集会(米子)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 齋藤靖和, 金輪静夏, 野原鞠, 脇田有瑛, 山口諒子, 池田千夏, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト皮膚表皮細胞HaCaTにおける紫外線誘導性細胞傷害に対するスチルベン化合物とそれら誘導体の防御効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会(札幌)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

県立広島大学 生物資源科学部 生命環境学科 齋藤靖和研究室のホームページ <a href="https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/ysaito/index.html">https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/ysaito/index.html</a> 老化細胞制御による健康増進・疾病予防法の開発 <a href="https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/kenhirosdgs/efforts/e10.html">https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/kenhirosdgs/efforts/e10.html</a> 齋藤教授の総説が、月刊 細胞 (特集 セノリティクス)に掲載されました。 <a href="https://www.pu-hiroshima.ac.jp/site/bioresourcesciencesf/2022sai tohh3.html">https://www.pu-hiroshima.ac.jp/site/bioresourcesciencesf/2022sai tohh3.html</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
---------	---------