

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21761

研究課題名（和文）加齢性疾患に対するLipoqualityを利用した新規治療法開発の挑戦

研究課題名（英文）Study for the establishment of new treatment methods using lipoquality for age-related diseases.

研究代表者

増田 真志（MASUDA, Masashi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：50754488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、加齢性疾患の発症に関わる老化細胞から分泌される senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子を削除する戦略の構築とその分子機序の解明を目指す。

マウス線維芽細胞株NIH3T3細胞を用いて継代数を重ねることで細胞老化を誘導してリン酸の細胞老化への影響を検討した結果、培養培地へのリン酸添加による細胞内のSASP因子の遺伝子発現変化に対する影響は、P9よりもP40の方が小さかった。以上から、細胞老化が進んでいない細胞に対する細胞外リン濃度の上昇は細胞老化を進行させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢と共に増える老化細胞から分泌されるSASP因子は、個体の老化を更に加速させて様々な加齢性疾患を発症させる。また、脂質の多様性が様々な生理機能や病因の中心的な役割を担うことが明らかになり、脂質の量ではなく質（lipoquality）が注目されている。加齢性疾患の慢性腎臓病で上昇する血中のリンはlipoqualityを変化させることでオートファジー不全や小胞体ストレスを誘発する結果、血管石灰化を引き起こすことが分かっている。本研究の成果は、血中リン濃度の上昇を抑えることでオートファジー不全や小胞体ストレスだけでなく細胞老化の進行も抑制できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to establish a strategy to delete senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors secreted by senescent cells involved in the pathogenesis of age-related diseases and to elucidate their molecular mechanisms. We investigated the effect of phosphate on cellular senescence by inducing cellular senescence in NIH3T3 cells, a mouse fibroblast cell line, through a series of passages, and found that the effect of P40 on changes in gene expression of SASP factors in cells by the addition of phosphate to the culture medium was smaller than that of P9. These results suggest that an increase in extracellular phosphorus concentration in cells that have not yet undergone cellular senescence may promote cellular senescence.

研究分野：リン研究

キーワード：老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、加齢性疾患の1つの慢性腎臓病で上昇する血中リンが慢性腎臓病で起きる様々な弊害（血管内皮機能の低下、脂肪蓄積減少などの低栄養、炎症性腸疾患の悪化、異所性石灰化）を惹起することを明らかにしてきた (Nishi T, [Masuda M. J Med Invest](#) 62, 2015, Abuduli M, [Masuda M. Am J Physiol Endocrinol Metab](#) 310, 2016, Sugihara K, [Masuda M. J Clin Biochem Nutr](#) 61, 2017, Fukuda-Tatano S, [Masuda M. Calcific Tissue](#) 104, 2019)。このような加齢性疾患の治療の標的として注目されているのが加齢と共に増える老化細胞から分泌される SASP 因子で、この因子が加齢性疾患を発症させる。興味深いことに、小胞体ストレスは SASP 因子だけでなく、老化細胞で増加するストレス顆粒の形成にも関わっている。

(2) 近年、脂質の多様性が様々な生理機能や病因の中心的な役割を担うことが明らかになり、lipoqualityが注目されている。慢性腎臓病で上昇する血中リンや逆に低下する抗老化遺伝子 α -klothoによって抑制される脂肪酸不飽和化酵素SCDは、リン脂質のC18:1/C18:0比の減少により誘発される小胞体ストレスを介して血管石灰化を誘発するが、C18:1を補充するとそれを抑制することを我々は証明した ([Masuda M. J Clin Invest](#) 125, 2015)。さらに、小胞体とミトコンドリア接触部 (MAM) のリン脂質のC18:1/C18:0比の減少はオートファゴソーム形成に重要なオメガソームの異常によりオートファジー不全を引き起こすことを明らかにしている (Shiozaki Y, [Masuda M. iScience](#) 23, 2020)。

2. 研究の目的

本研究は、老化細胞から分泌される SASP 因子を脂肪酸の質の違い(Lipoquality)を生じさせるリンにより削除する戦略の構築とその分子機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス繊維芽細胞株NIH3T3細胞を用いて、継代数を重ねることで老化細胞を作製する。細胞老化の程度は、SA- β -galは測定キットを用いて、SASP因子 (IL-6、IL-8、TNF α)、その誘導因子 (C/EBP β)、老化マーカー (p21) の遺伝子発現量はreal-time PCR法で評価する。細胞老化による細胞内リン濃度への影響は測定キットを用いて、そしてリン酸インポーター (PiT1/2) とリン酸エクスポーター (Xpr1) の遺伝子発現量はreal-time PCR法で評価する。

(2) 細胞外リン濃度の変化による細胞老化への影響を検討するために、継代数が異なるP9とP40のNIH3T3細胞の培地のリン濃度を変えた条件 (1, 2, 5, 10 mM) で培養し、SASP因子 (IL-6、IL-8、TNF α)、その誘導因子 (C/EBP β)、老化マーカー (p21) の遺伝子発現量はreal-time PCR法で評価する。細胞老化による細胞内リン濃度への影響は測定キットを用いて、そしてリン酸インポーター (PiT1/2) とリン酸エクスポーター (Xpr1) の遺伝子発現量はreal-time PCR法で評価する。

(3) 若齢マウス (9週齢) と高齢マウス (76週齢) に低リン食 (0.1%) またはコントロールリン食 (1.2%) を15週間与えて、摂食量、血中リン濃度、体重、腎臓重量、腎臓内リン量、腎臓のリン酸トランスポーター (Npt2a/2c) と繊維化関連因子 (TGF- β 1、 α -SMA、Coll1a1) の遺伝子発現量をreal-time PCR法で評価する。

4. 研究成果

(1) NIH3T3細胞を用いて、継代数を重ねることで老化細胞を作製できるかを検討した。継代数の異なるP4とP21のNIH3T3細胞の細胞老化の程度をSA- β -galで評価した結果、有意にSA- β -galの値がP4に比してP21の方が高かった。また、老化マーカーのp21のmRNA発現量には変化はみられなかったが、SASP因子 (IL-6、IL-8、TNF α)、その誘導因子 (C/EBP β) のmRNA発現量はP9よりもP40のNIH3T3細胞の方が有意に増加していた。次に、P9とP40のNIH3T3細胞の細胞内リン濃度を評価した結果、P9とP40のNIH3T3細胞の細胞内リン濃度に変化は見られなかった。また、リン酸インポーター (PiT1/2) とリン酸エクスポーター (Xpr1) のmRNA発現量はP9とP40のNIH3T3細胞で差はみられなかった。

(2) 実験(1)で継代数を重ねることで細胞の老化度が進んでいることを確認した細胞を用いて、細胞外リン濃度の違いによる細胞老化への影響を検討した。P9とP40のNIH3T3細胞の評価した結果、SASP因子 (IL-6、IL-8、TNF α)、その誘導因子 (C/EBP β)、老化マーカー (p21) のmRNA発現量はP4もP21も細胞外リン濃度の上昇に伴い増加した。さらに、細胞外リン濃度の上昇に対するIL-6、IL-8、TNF α 、p21のmRNA発現量増加のsensitivityはP9よりもP40の方が高かった。次に、細胞内リン濃度への影響を検討した結果、P9とP40ともに細胞外リン濃度の上昇により細胞内リン濃度も上昇するが、その増加率はP40よりもP9の方が高かった。次に、リン酸インポーター (PiT1/2) とリン酸エクスポーター (Xpr1) の遺伝子発現量はP9とP40ともに細胞外リン濃度の上昇によりこれらのmRNA発現量も上昇し、細胞外リン濃度の上昇に対するPiT1/2やXpr1 mRNA発現量増加のsensitivityはP9よりもP40の方が高かった。

(3) 若齢および高齢マウスに低リン食またはコントロール食を15週間与えた結果、摂食量に差は見られなかった。高齢マウスの血中リン濃度は、コントロール食に比して低リン食摂取で有意に低下したが、若齢と高齢で差は認められなかった。高齢マウスの体重はコントロール食に比して低リン食摂取により有意に増加した。しかしながら、高齢マウスの腎臓重量はコントロール食に比して低リン食摂取により有意に減少した。腎臓重量あたりの腎臓内リン量は加齢により減少するが、低リン食摂取により増加傾向を示した。次に、腎臓のリン酸トランスポーター (Npt2a/2c) のmRNA発現量は高齢マウスへの低リン食で増加するが、加齢による変化は認められなかった。また、腎臓の線維化関連因子の遺伝子発現変化を検討した結果、若齢マウスと比して高齢マウスで増加したTGF- β 1、 α -SMA、Col1a1 mRNA発現量は、低リン食によりその増加は抑制された。

以上の結果から、継代数を重ねることでNIH3T3細胞の老化度が進むことを確認した。また、細胞老化による細胞内リン濃度やリン酸トランスポーターの遺伝子発現に影響はないが、細胞外リン濃度の上昇によるSASP因子の遺伝子発現量増加のsensitivityは老化細胞の方が高いことが示唆された。さらに、加齢による腎臓の線維化は低リン食投与により軽減する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyazaki-Anzai Shinobu, Masuda Masashi, Shiozaki Yuji, Keenan Audrey L., Chonchol Michel, Kremoser Claus, Miyazaki Makoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Free Deoxycholic Acid Exacerbates Vascular Calcification in CKD through ER Stress-Mediated ATF4 Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 857 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/kid.0007502020	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
1. 著者名 Adachi Yuichiro, Masuda Masashi, Sakakibara Iori, Uchida Takayuki, Niida Yuki, Mori Yuki, Kamei Yuki, Okumura Yosuke, Ohminami Hirokazu, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Nikawa Takeshi, Taketani Yutaka	4. 巻 5
2. 論文標題 All-trans retinoic acid changes muscle fiber type via increasing GADD34 dependent on MAPK signal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101345	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 Ohnishi Kohta, Yano Satoshi, Fujimoto Moe, Sakai Maiko, Harumoto Erika, Furuichi Airi, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Dietary Phytochemicals Capable of Enhancing the Autophagy Flux in HeLa and Caco-2 Human Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9121193	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 Niida Yuki, Masuda Masashi, Adachi Yuichiro, Yoshizawa Aika, Ohminami Hirokazu, Mori Yuki, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Uchida Takayuki, Nikawa Takeshi, Yamamoto Hironori, Miyazaki Makoto, Taketani Yutaka	4. 巻 67
2. 論文標題 Reduction of stearyl-CoA desaturase (SCD) contributes muscle atrophy through the excess endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 179 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.20-24	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村玲奈、増田真志、山本菜摘、野邊悠太郎、大南博和、奥村仙示、竹谷豊
2. 発表標題 食餌性リン負荷が高齢期の脳に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田 真志、山本 浩範、竹谷 豊
2. 発表標題 All-trans retinoic acidは腸管II型ナトリウム依存性リン酸輸送担体（Npt2b）遺伝子発現を低下させる
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	大西 康太 (OHNISHI Kohta) (80723816)	京都府立大学・生命環境科学研究科・講師 (24302)	
研究分担者	大南 博和 (OHMINAMI Hi rokazu) (90803057)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	木村 玲奈 (KIMURA Rena)		

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			
米国	University of Colorado			