

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0228

研究課題名（和文）ミトコンドリアUPRを基盤としたヒトへも応用可能な健康長寿因子の探索的研究

研究課題名（英文）Investigative research on the extension of healthy lifespan that can be applied to humans based on mitochondrial unfolded protein response

研究代表者

樋上 賀一（Higami, Yoshikazu）

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授

研究者番号：90253640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体に有益なカロリーの制限（CR）、その対極である食餌誘導性肥満（DIO）と脂肪特異的にミトコンドリア（mt）プロテオスタシス異常を示すMIPEP欠損（aMKO）マウス、mtストレス誘導性ミトカインGDF15、CR模倣薬レスベラトロール（RS）の作用を比較検討した。その結果、DIOとaMKOでは炎症は亢進し、GDF15発現を含むmtストレスは増加し、脂肪酸合成やmt生合成は抑制された。一方、CRは相反する結果を示した。また、RSのCR模倣効果は限定的であった。加えて、GDF15は末梢組織において老化に伴うストレスに対して防御的に作用してい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

CRは、代謝改善・抗老化・寿命延伸を誘導する。CRの有益な効果は、近年、サルにおいても観察されることが報告されている。それゆえ、CRはヒトの健康寿命延伸にも有効であると考えられ、CR模倣薬の開発が望まれている。レスベラトロール（RS）はCR模倣薬として注目されている。本研究により、サルの脂肪組織において、RSによるCR模倣効果は、脂肪酸生合成の亢進や炎症の抑制に関して、わずかに見られるものの、限定的であること、さらに、CR作用とは異なるものの、老化の制御にはGDF15シグナルの活性化が有益である可能性が示唆され、ヒトへ外挿する前にサルを用いた解析が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We compared the effects of caloric restriction (CR), which is beneficial to the organism, its counterpart, diet-induced obesity (DIO), fat-specific mitochondrial mitochondria proteostasis disorder by mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP) deficiency, the mitochondria stress-induced mitokine Growth differentiation factor 15 (GDF15), and the CR-mimetic drug resveratrol (RS). The results showed that DIO and aMKO enhanced inflammation, increased mitochondria stress including GDF15 expression, and suppressed fatty acid synthesis and mitochondria biosynthesis. CR, on the other hand, showed conflicting results. The CR-mimetic effect of RS was limited. In addition, GDF15 was shown to play a defensive role against aging-associated stress in vivo.

研究分野：老化生物学、健康科学

キーワード：カロリー制限 食餌誘導性肥満 脂肪萎縮 老化 脂肪酸生合成 ミトコンドリア生合成 ミトコンドリアストレス応答 GDF15

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。

1. 研究開始当初の背景

適度な摂取カロリーの制限 (CR) は、代謝を改善し、老化に伴う生理学的・病理学的変化を抑制し、寿命を延伸する。この有益な効果は、酵母や線虫といった下等生物からマウスやラットを含む哺乳類まで幅広い生物種で観察される。さらに、米国 National Institute on Aging (NIA) を中心としたグループでのサルを用いた研究により、げっ歯類とサルで CR による変化の特徴が類似することが報告されている (Science, 2004)。また、ヒトコホートをを用いた研究でも、サルにおける CR の特徴を有するヒト集団の余命が延伸することも報告されている (Science, 2002)。加えて、最近、本申請の海外共同研究者らは、CR による寿命延伸を含む有益な効果は、サルにおいても観察されることを報告した (Nat Commun, 2017)。それゆえ、CR はヒトの健康寿命延伸にも有効であると考えられる。しかしながら、ヒトへ長期間 CR を行うことは難しく、CR 模倣薬の開発が望まれる。レスベラトロールは CR 模倣薬の候補と考えられているが、哺乳類においてはその有益な作用は、議論の別れるところでもある (Adv Nutr, 2021)。有効な CR 模倣薬の開発のためには、CR の有益な効果の分子メカニズムのさらなる詳細な解明が必須である。また、げっ歯類の知見をヒトへ直接外挿することは難しく、サルを用いた検証が不可欠である。残念ながら、本邦ではサルを用いた CR 研究は実施されておらず、サルを用いた 10 年を超える介入研究は不可能である。加えて、その貴重さから、本邦において米国の NIA などからサル組織標本の提供を受けることは困難であり、我が国においてサルを用いた検証はできない。

成長ホルモン (GH) /IGF-1 シグナルの抑制は、寿命延伸に重要であることは広く知られている。CR により GH/IGF-1 シグナルが抑制されることから、CR の分子メカニズム解明を目指した研究は、主として GH/IGF-1 シグナルを中心に行われてきた (Pathol Int, 2023)。しかしながら、中高齢のヒトへも有効な CR 模倣薬の開発を目指す場合、GH/IGF-1 を抑制するような CR 模倣薬は骨格筋や骨を脆弱化させるリスクが高いと考えられる。そこで、我々は CR の分子メカニズムのうち、GH/IGF-1 シグナル抑制非依存性に制御されるメカニズムの中から、新たなヒトへも有効な分子メカニズムを明らかにすることを目的に、マウスやラットを用いて研究した。その結果、CR の分子メカニズムとして、白色脂肪組織 (WAT) 選択的かつ GH/IGF-1 シグナル抑制非依存性に制御される脂肪酸合成系転写因子 *sterol regulatory element binding protein 1c* (*Srebp-1c*) に直接転写制御される『Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1 α) を介したミトコンドリア生合成の亢進と酸化ストレスの抑制』 (Mech Ageing Dev, 2012; Age, 2013; Exp Gerontol, 2015, 2018, 2019; Aging Cell, 2017)、*Srebp-1c* に間接的に制御されるミトコンドリアシグナルペプチダーゼの 1 つである『Mitochondria intermediate peptidase (MIPEP) によるミトコンドリアの質の向上』が重要であることを示した (FEBS Lett, 2017; Pathol Int, 2023)。

脂肪組織における MIPEP 機能を解析するため、Adiponectin-Cre マウスと *Mipep*^{flax/flax} マウスとの交配により脂肪特異的に MIPEP を欠損するマウス (aMKO) を世界に先駆けて作製した (全身性 MIPEP 欠損マウスは胎生致死)。aMKO マウスは顕著な脂肪萎縮を呈した。また、MIPEP 基質タンパク質の増加や減少によるミトコンドリアプロテオスタシス異常を起点として、脂肪細胞分化の抑制やミトコンドリア機能障害、さらにミトコンドリアストレス応答によりミトカインである Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) の発現が増加した。一方で、高脂肪食誘導性肥満症 (DIO) マウスでも、GDF15 の発現は増加して、脂肪組織において *Srebp-1c* と PGC-1 α 発現抑制を介して脂肪酸合成は抑制され、ミトコンドリア生合成も抑制される (IJMS, 2021)。

GDF15 の作用として、後脳孤束核に特異的に発現する GFRAL 受容体を介して食欲抑制や代謝改善など中枢に関する報告が多く、末梢作用に関する報告は少ない。また、GDF15 トランスジェニックマウスは長寿であることが報告されており、その作用メカニズムとして GH/IGF-1 シグナル抑制の可能性が示されている (Aging, 2014)。しかし、GDF15 の生体に対する作用に関しては功罪両面の報告があり、さらなるメカニズムの解析が必要である。

2. 研究の目的

本申請では、研究代表者らが国内に保有する遺伝子改変マウス (aMKO マウス、GDF15 を全身的に欠損した GKO マウス、aMKO マウスを遺伝的背景として GDF15 を全身的に欠損した DKO マウス) や米国 National Institute on Aging (NIA) で飼育しているサルの脂肪組織における脂質代謝やミトコンドリア機能およびそれに引き続く *mitochondrial unfolded response* (UPR_{mt}) や炎症を切り口として、双方向から解析することにより、ヒトの中高齢者へも介入可能な健康長寿を志向する CR 模倣薬の分子標的を明らかにするとともに、中高齢者への介入試験での評価に応用可能な優れたバイオマーカーを明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) CR マウスやラット、DIO マウス、aMKO マウスの WAT における RNA-seq 解析など様々なパラメータを比較する。
- 2) aMKO マウスにおける CR による WAT における遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析などにより比較する。
- 3) サルにおける CR 模倣薬として知られているレスベラトロールによる作用を解析し、1) の結果と比較する。
- 4) aMKO マウスを遺伝的背景として GDF15 を全身的に欠損した DKO マウスを作製して、老化や寿命制御における GDF15 の役割を解析する。

4. 研究成果

- 1) CR、DIO、aMKO マウスの RNA-seq データを用いて脂肪組織における遺伝子発現の変化を解析した。その結果、DIO と aMKO マウスとも、免疫・炎症関連遺伝子や GDF15 発現は増加し、脂肪酸合成関連遺伝子、Pgc-1 α やミトコンドリア関連遺伝子発現は抑制され、DIO と aMKO マウスは類似した遺伝子発現プロファイルを示した (図 1)。一方、CR マウスでは、脂質関連遺伝子群やミトコンドリア関連遺伝子群の発現が増加し (図 2、3、4)、免疫・炎症関連遺伝子や GDF15 発現は抑制され、ごく一部を除き DIO と aMKO とは類似した遺伝子発現プロファイルは示さなかった。
- 2) CR により野生型マウスにおいて発現が増加した 1459 遺伝子、aMKO おいて発現が減少した 1055 遺伝子、そのうち 473 遺伝子が共通しており、脂質代謝やミトコンドリア、小胞体関連遺伝子群であった (図 2、3)。また、CR により野生型でのみ増加した遺伝子群として、リボゾームや翻訳に関わる遺伝子群が抽出された (図 4)。以上から、脂質代謝やミトコンドリア、小胞体、翻訳、リボゾーム関連遺伝子群の CR による発現増加は、ミトコンドリア機能異常によりキャンセルされることが明らかとなった。
- 3) 研究分担者が NIA において、DIO サルの白色脂肪組織におけるレスベラトロール効果と CR マウス脂肪組織の RNA-seq データを比較した。その結果、レスベラトロールにより、CR と同様に、特に皮下脂肪組織において脂肪酸合成系関連遺伝子群の一部の増加が観察された (図 5)。それゆえ、レスベラトロールは、弱いながらも一部 CR の表現型を模倣していると考えられたが、その作用は極めて限定的であった (図 5)。
- 4) 全身性 GDF15 欠損マウスの寿命はわずかに短縮した。aMKO マウスの寿命は有意に短縮し、GDF15 を欠損させた DKO マウスの寿命は、さらに有意に短縮した (図 6)。また、GDF15 欠損による中枢性の影響は見られなかった。一方で、脂肪組織において、GDF15 欠損によりミトコンドリアストレス応答は減弱し (図 7)、炎症は亢進した。また、糖代謝、特に耐糖能が増悪した (図 8)。また、aMKO では脂肪肝が観察された。GDF15 欠損により野生型でも脂肪肝となったが、特に aMKO において脂肪肝の増悪は顕著であった (図 8)。GDF15 の発現はミトコンドリアストレスのみならず、小胞体ストレスにおいても増加する。GDF15 発現は老化にともない増加することが報告されている。それゆえ、老化にともなう GDF15 発現の増加は、ミトコンドリアや小胞体ストレスに対する応答を亢進し、炎症を抑制し、全身の糖代謝や脂質代謝の増悪を防ぎ、結果的に老化に伴うストレスに対して抵抗性を示していると考えられた。

本研究により、CR 模倣薬としてのレスベラトロールの作用は極めて限定的であり、CR 模倣薬とは言いがたいことが示された。図 2、3 において、CR により誘導されるミトコンドリア機能に関連する遺伝子群が明らかとなった。この 473 遺伝子をさらに詳細に解析することにより、CR による代謝改善・抗老化・寿命延伸に関連する中心的な分子メカニズムの解明が進むのではないかと期待される。そのためには、aMKO マウスの寿命に対する CR の影響を解析することが必須である。加えて、GDF15 の末梢作用は CR のメカニズムとは関係なく、老化抑制を目指す薬剤の開発に貢献する可能性が示唆された。

図1. RNAseqデータのMAプロット (野生型 vs. aMKO)

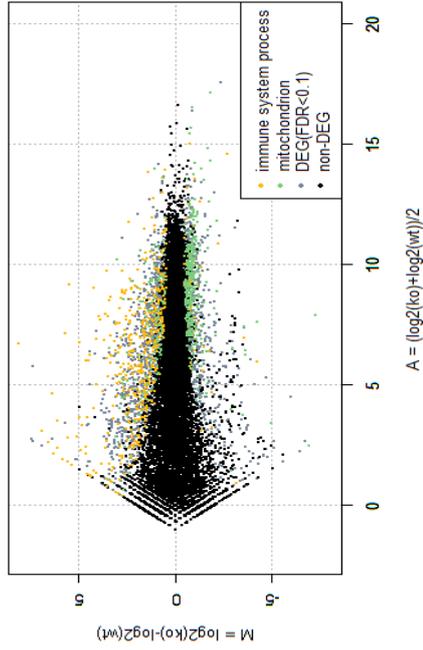


図2. The enrichment analysis of the DEGs by DAVID

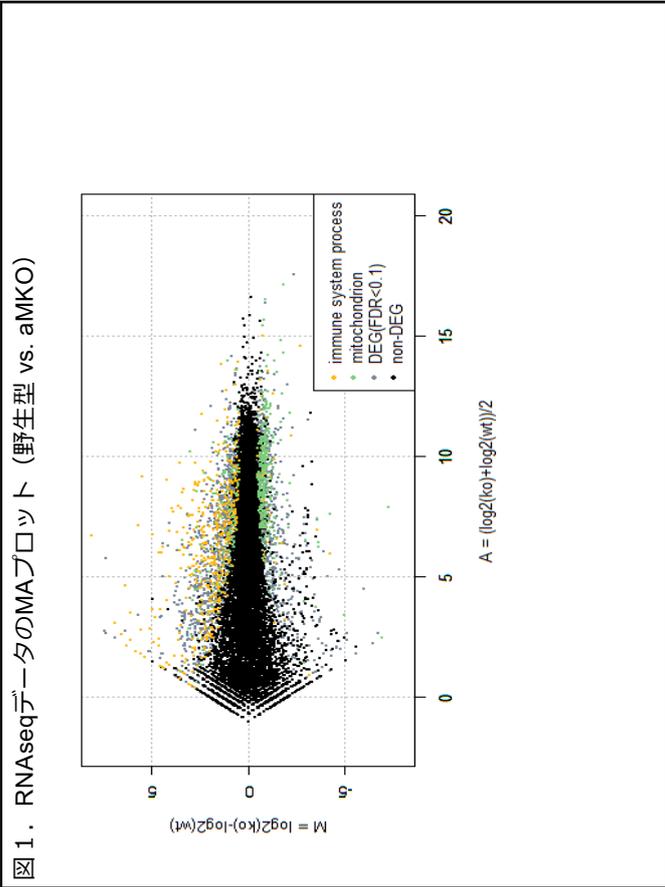
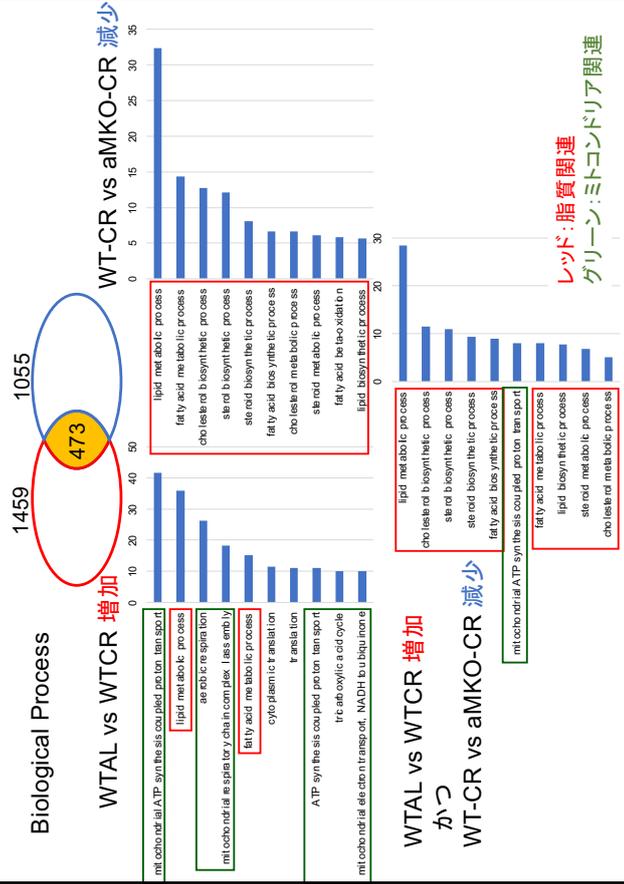


図3. The enrichment analysis of the DEGs by DAVID

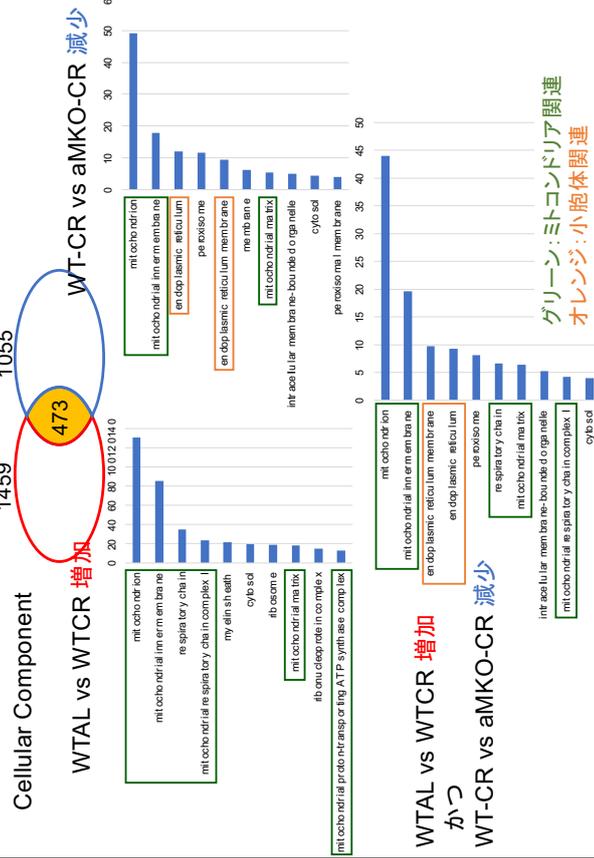


図4. The enrichment analysis of the DEGs by DAVID

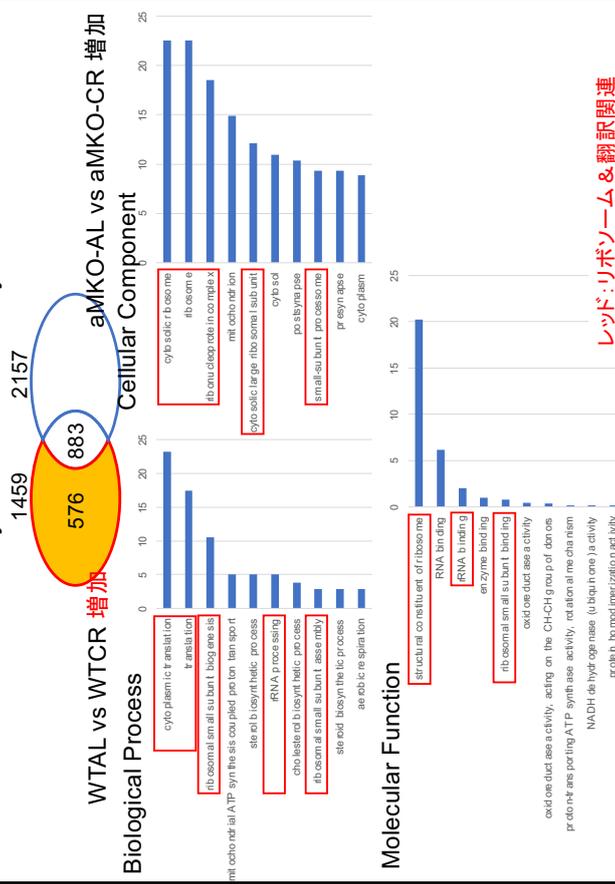


図5. マウスのCRとHFD摂餌サルへのレスベラトロール投与との比較

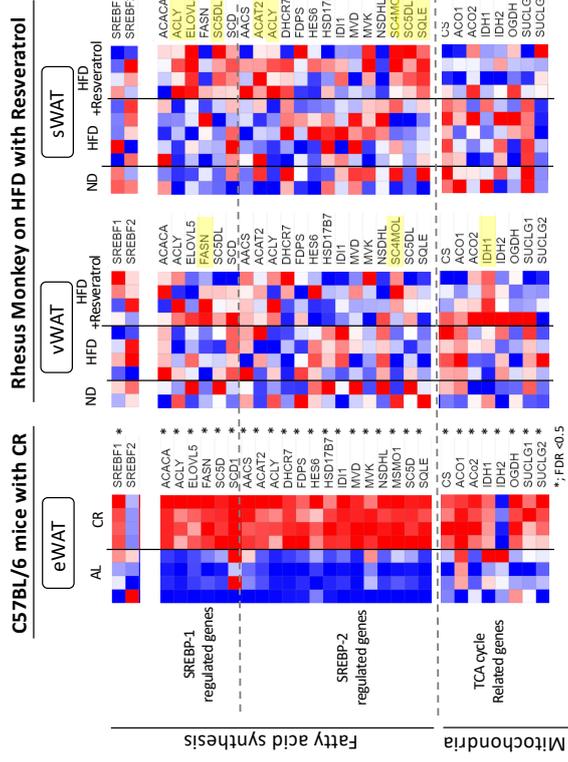


図6

aMKOマウスを遺伝的背景としたマウスの寿命へのGDF15欠損の影響

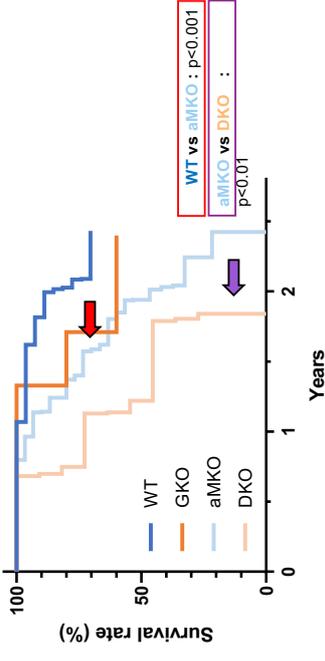
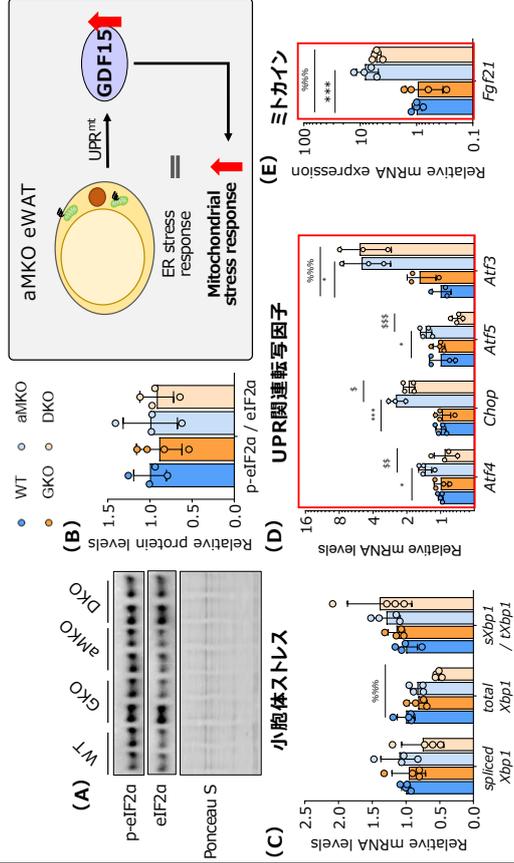


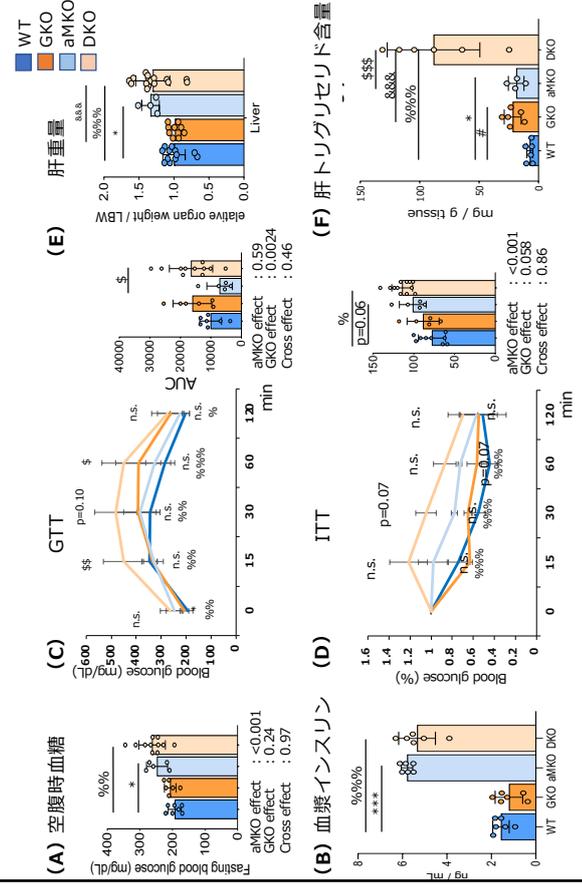
図7 aMKOマウスを遺伝的背景としたマウスの細胞内ストレスへのGDF15欠損の影響



aMKOにより、eWATのUPR^{mt}が活性化

⇒GDF15欠損により、UPR^{mt}転写因子の誘導が抑制

図8 糖代謝や肝臓重量、肝トリグリセリド含量へのGDF15欠損の影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kobayashi Masaki, Nezu Yuichiro, Itoh Mayu, Uchida Rio, Arikawa Tomoya, Otsubo Minami, Nozaki Yuka, Tagawa Ryoma, Fujishima Yuya, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro, Higami Yoshikazu	4. 巻 164
2. 論文標題 Individual evaluation of aging- and caloric restriction-related changes to distinct multimeric complexes of circulating adiponectin by immunoblotting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111821 ~ 111821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2022.111821	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 Kobayashi Masaki, Deguchi Yusuke, Nozaki Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Contribution of PGC-1 to Obesity- and Caloric Restriction-Related Physiological Changes in White Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6025 ~ 6025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22116025	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 Kobayashi Masaki, Nezu Yuichiro, Tagawa Ryoma, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Mitochondrial Unfolded Protein Responses in White Adipose Tissue: Lipoatrophy, Whole-Body Metabolism and Lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062854	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 Otani Yuina, Nozaki Yuka, Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Higami Yoshikazu	4. 巻 73
2. 論文標題 Effect of mitochondrial quantity and quality controls in white adipose tissue on healthy lifespan: Essential roles of GH/IGF 1 independent pathways in caloric restriction mediated metabolic remodeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 479 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13371	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 Fukuoh Tomoyoshi、Nozaki Yuka、Mizunoe Yuhei、Higami Yoshikazu	4. 巻 144
2. 論文標題 脂肪組織による老化・寿命制御	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 411～417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.23-00165-4	査読の有無 無
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13件(うち招待講演 12件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 野崎優香、水之江雄平、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 脂肪組織のミトコンドリアがカロリー制限による寿命延伸効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第46回日本分生生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nozaki, Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Age-related transition of adipose-specific mitochondrial stress
3. 学会等名 IAGG-AOR2023(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野崎優香、水之江雄平、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 脂肪組織のミトコンドリアがカロリー制限による寿命延伸効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋上賀一
2. 発表標題 ミトコンドリアプロテオスタシス障害に伴う細胞老化と個体老化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋上賀一
2. 発表標題 脂肪細胞による老化・寿命制御
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nozaki, Yuhei Mizunoe, Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Mitochondrial stress in adipose tissue improves LPS-induced acute inflammation
3. 学会等名 The 40th Spring Conference of the Korean Society for Gerontology & Korea-Japan Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshikazu Higami
2. 発表標題 OGC-1a and MIPEP, Key regulators of mitochondria function in white adipose tissue
3. 学会等名 The 40th Spring Conference of the Korean Society for Gerontology & Korea-Japan Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋上賀一
2. 発表標題 脂肪組織のミトコンドリアマトリクスプロテオシタシスと老化・寿命制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野崎優香、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 脂肪組織特異的ミトコンドリアストレスが惹起する全身性抗炎症反応
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林正樹、野崎優香、樋上賀一
2. 発表標題 ミトコンドリアシグナルペプチターゼMIPEPの脂肪組織特異的欠損マウスの解析
3. 学会等名 第42回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 白色脂肪組織におけるカロリー制限に伴う代謝リモデリング
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋上賀一
2. 発表標題 Caloric restriction-associated improvement of mitochondrial quality in white adipose tissue
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋上賀一
2. 発表標題 Caloric restriction-associated improvement of mitochondrial quality in white adipose tissue
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
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	小林 正樹 (Kobayashi Masaki) (30795612)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教 (32660)	2022年9月末日にお茶の水女子大学へ転出
研究分担者	下川 功 (Shimokawa Isao) (70187475)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授 (17301)	
研究分担者	田川 亮真 (Tagawa Ryoma) (70844455)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教 (32660)	2020年度末に退職

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	野崎 優香 (Nozaki Yuka)		
研究協力者	水之江 雄平 (Mizunoe Yuhei)		

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	National Institute on Aging			