

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02693

研究課題名(和文) 老化細胞の分泌する新規老化誘導因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel senescence-inducing factors secreted by senescent cells.

研究代表者

秋山 徹 (AKIYAMA, Tetsu)

東京大学・定量生命科学研究所・特任教授

研究者番号：70150745

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)：我々は膜/分泌タンパク質NTMの老化・炎症における役割を解明することを目的として研究を進めた。その結果、NTMは細胞老化/炎症を惹起すること、NTM欠損マウスは加齢に伴う老化や肥満に伴うインスリン感受性の悪化が抑制されていることが明らかとなった。これらの知見の創薬への応用を目的として、NTM中和活性を有するモノクローナル抗体を作製した。また、NTMによる老化誘導機構を解明するため、質量分析器を用いたNTM結合タンパク質の網羅的同定を行った。今後は、NTM-結合タンパク質複合体を手掛かりとした老化・炎症誘導の分子機構の解析を進める。また、モノクローナル抗体のマウス老化への効果の検証も進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、老化細胞を除去したマウスの寿命が延長することが示され、細胞老化が個体老化の原因の1つであることが明らかになったが、細胞老化が個体老化を誘導する分子機構には不明な点が多い。本研究により、新たに分泌タンパク質NTMが老化を誘導する機能を有することが明らかになった。今後、NTM作用の分子機構を解析すると同時にNTMに対する阻害剤を創製することは、老化・炎症に対する新たな治療法の発見・開発につながり、社会的インパクトの高い応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the role of the membrane/secretory protein NTM in aging and inflammation. We found that NTM possesses functions to induce cellular aging/inflammation, and that NTM-deficient mice exhibit amelioration of age-related aging and insulin sensitivity associated with obesity. To apply these findings to drug discovery, we generated monoclonal antibodies with neutralizing activity against NTM. Furthermore, to elucidate the molecular mechanisms by which NTM controls aging, we conducted comprehensive identification of NTM-binding proteins using a mass spectrometer. In the future, we will further analyze the molecular mechanisms of aging/inflammation through analysis of the NTM-binding protein complex. We will also advance verification of the effectiveness of monoclonal NTM antibodies in aging mice.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：老化 細胞老化 分泌タンパク質 膜タンパク質 モノクローナル抗体 中和抗体

1. 研究開始当初の背景

個体老化に対する細胞老化 (Senescence) の関与については長年議論されてきたが、近年老化細胞を除去したマウスの老化の表現型が改善し寿命が延長することが報告され、細胞老化が個体老化の原因の一端であることが明らかになった。一方で、細胞老化が個体老化を誘導する分子機構には未だ不明な点が多いが、最近になって老化細胞が分泌する炎症系サイトカイン、増殖因子、細胞外基質等が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。これらの因子が細胞老化や炎症を惹起することにより組織の機能不全を引き起こすことや、がん細胞の増殖を促進することが示されている。また、抗体アレイや質量分析器を用いた老化細胞の分泌する因子の同定が進行中ではあるが、何れの因子が細胞老化および個体老化に対してどの程度貢献しているのか未知である。また、個体老化を生物学的に正しくかつ簡便に定量・評価を行うためには、老化を定量・評価できる血液中成分の同定が求められているが、未だ実現されていない。

我々は、細胞老化に関わる可能性のある因子として膜タンパク質 NTM を同定し、当該タンパク質が細胞から分泌されて他の細胞の老化・炎症の誘導に重要な役割を果たしていることを想定して、その生理機能ならびに作用機構の解析に着手した。

2. 研究の目的

我々は分泌される膜タンパク質 NTM の老化および炎症に関わる機能を培養細胞レベルならびにマウス個体レベルの両方で解明することを目指した。また、ヒト検体のデータベースを用いて、老化やがんに対して NTM の及ぼす影響を検討した。さらに、NTM に対するヒトならびにマウス中和抗体を作製し、NTM 阻害剤が新たな抗老化・炎症薬となる可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞レベルでの老化・炎症における NTM の機能解析

Ras タンパク質を強制発現することにより細胞老化を誘導したヒト正常線維芽細胞 IMR90 に、NTM を強制発現もしくはノックダウンした時に、細胞老化誘導遺伝子 p15、p16 ならびに炎症系サイトカイン IL6 の発現がどのように変動するかを検討した。続いて、野生型および NTM ノックアウトマウス胎児より調製した MEF を継代することにより細胞老化を誘導し、p15、p16 および IL6 の発現変動を比較検討した。さらに、NTM をノックダウンした IMR90 細胞および NTM KO マウス由来の MEF に HDAC 阻害剤 NaBu を作用させて細胞老化を誘導し、同様な比較検討を行った。

また、NTM が培養上清に放出されていることを確認するために、IMR90 細胞の培養上清中のタンパク質を質量分析器により解析し、培地中に NTM が存在することを確認した。NTM が細胞外に分泌されて、他の細胞の細胞老化・炎症を誘導する効果があることを確認するために、NTM を強制発現させた HeLa 細胞を IMR90 細胞と共培養し、IMR90 細胞における p15、p16 および IL6 の発現変動を比較検討した。加えて、リコンビナントの NTM 蛋白質を大腸菌および HEK293 細胞から調製し、IMR90 細胞に作用させ同様の件等を行った。

(2) 動物個体レベルでの老化・炎症における NTM の機能解析

ヒトがん検体データベースを用いて、正常組織とがん組織における NTM の発現量と予後の比較を行った。また、正常組織において、NTM とサイトカインや増殖因子との発現相関を検討した。さらに、正常組織における、加齢に伴う NTM の発現量の変化を検討した。

続いて、慢性炎症状態を示す肥満状態モデルマウス db/db や、逆にカロリー制限を行ったマウスの脂肪組織を中心に NTM の発現変動を検討した。また、NTM 欠損マウスに高脂肪食負荷を行うことで細胞老化を誘導し、その時の肥満・インスリン感受性・炎症の

変化を検討した。さらに、自然老化させた NTM 欠損マウスにおける老化の表現型の解析を行った。

(3)NTM 中和抗体の作製

マウスまたはヒト NTM を強制発現した細胞を野生型マウスおよびヒト化マウスに免疫し、マウスおよびヒトモノクローナル抗体を産生させた。産生されたモノクローナル抗体の中で抗老化・炎症活性を有するマウスおよびヒト NTM 中和抗体を、Ras を発現誘導した IMR90 細胞の系もしくは Etoposide 処理を行った MEF の系を用いて選別した。選択したマウス NTM モノクローナル抗体を、拡大培養・大量精製した後に、高脂肪食負荷による肥満マウスならびに自然老化マウスに投与した。

(4)NTM 結合タンパク質の同定

HEK293 細胞から精製した NTM を IMR90 細胞の細胞膜画分と混合・攪拌してから NTM を免疫沈降し、共沈したタンパク質を質量分析器を用いて網羅的に同定した。同定された候補タンパク質はリコンビナント蛋白質を用いた Pull-down 実験および強制発現細胞を用いた免疫沈降実験により結合を検証した後に、同定タンパク質の有無による NTM の発現や局在の変化を検討した。

4. 研究成果

(1)培養細胞レベルの細胞老化・炎症における NTM の機能

ヒト正常線維芽細胞 IMR90 の NTM 遺伝子を siRNA を用いてノックダウンし、Ras タンパク質強制発現により細胞老化を誘導した。その結果、Ras 誘導に伴う細胞老化遺伝子 p15 や p16 ならびに炎症系サイトカイン IL6 の発現誘導が低下することを見出した。逆に、NTM を強制発現すると p15 や IL6 の発現は増大した。野生型および NTM KO マウス胎児より調製した MEF を継代することにより細胞老化を誘導し、p15、p16、IL6 の発現変動を野生型マウス由来の MEF と比較検討した。その結果、NTM の欠損により継代数増加に伴う p16 や IL6 の発現誘導が減少しており、継代数増加に伴う細胞老化が抑制されていることが示唆された。この NTM 欠損による細胞老化誘導の抑制効果は、HDAC 阻害剤 NaBu や DNA 障害誘導剤 Etoposide により誘導される細胞老化においても、IMR90 細胞、MEF と同様の結果が得られた。

IMR90 細胞の培養上清を質量分析器により解析した結果、NTM のペプチド配列が同定された。この結果より、NTM は細胞外へ分泌されるタンパク質であることが確認された。続いて、細胞外に分泌された NTM が他の細胞に細胞老化・炎症を誘導する効果があるかどうかを検証するために、NTM を強制発現した HeLa 細胞を IMR90 細胞と共培養し、IMR90 細胞の老化・炎症の変化を検討した。その結果、NTM を強制発現した HeLa 細胞を共培養することにより、IMR90 細胞の老化が誘導されることが示された。さらに、大腸菌および HEK293 細胞を用いてリコンビナント NTM 蛋白質を作製して IMR90 細胞に作用させることにより老化・炎症に変化が生じるかどうかを検討した。その結果、リコンビナント NTM タンパク質は、IMR90 細胞に細胞老化を誘導することが明らかとなった。

(2)動物個体の老化・炎症における NTM の機能

ヒトがん検体データベースを用いて、正常組織とがん組織における NTM の発現比較を行ったところ、複数のがん種において NTM の発現増大が確認された。また、複数のがん種において NTM の発現が高い患者は予後が悪いことが認められた。さらに、正常組織において、NTM と各種サイトカインとの発現相関を検討したところ、NTM は IL6 の発現と正の相関関係を示していた。さらに、正常組織において、加齢による NTM の発現量の変化を検討した。その結果、脂肪組織などの一部の組織では加齢により NTM の発現が誘導されることが示された。

肥満モデルマウス db/db の脂肪組織を解析することにより、p16、p19、IL6 の発現誘導が確認されたが、この時 NTM の発現も誘導されていた。一方でカロリー制限を行った

マウスにおいては、全身で p16、p19、IL6 の発現抑制が確認され、NTM の発現抑制も認められた。

次に、NTM 欠損マウスに高脂肪食負荷を行うことにより細胞老化を誘導し、その時の肥満・インスリン感受性・炎症の変化を検討した。その結果、NTM 欠損マウスは高脂肪食負荷に伴うインスリン感受性の低下ならびに炎症誘導が緩和していることが明らかとなった。さらに、自然老化した NTM 欠損マウスにおける老化の表現型の解析を行った。その結果、NTM 欠損マウスは加齢に伴う筋力の減少および Frailty score の低下が抑制されていることが示された。以上の結果より、NTM はマウス個体においても炎症・老化を誘導する機能があると考えられた。

(3)NTM 中和抗体の作製

NTM の老化・炎症における役割をさらに明らかにするために、NTM の機能を中和できる抗体の作製を行った。NTM を強制発現した細胞を野生型マウスおよびヒト化マウスに免疫することにより産生されたモノクローナル抗体の中で抗老化・炎症活性を有するものを、Ras 誘導を行った IMR90 細胞の系もしくは Etoposide 処理を行った MEF の系を用いて選別した。その結果、抗細胞老化・炎症活性を有する、ヒトおよびマウス NTM に対するヒトおよびマウス中和抗体の作製に成功した。選択したマウス NTM モノクローナル抗体を、拡大培養・大量精製して、高脂肪食負荷による肥満マウスならびに自然老化マウスに投与し、炎症や老化にいかなる変化があるかを現在検証中である。

(4)NTM が老化・炎症を誘導する分子機構の解明

IMR90 細胞の細胞膜画分に含まれるタンパク質の中で NTM と結合するものを、質量分析器を用いて網羅的に同定した。その結果、多数のタンパク質の同定に成功したが、その中でも膜タンパク質 NTMBP-1 に着目して更なる解析を行った。

NTM と NTMBP-1 との結合は、リコンビナント蛋白質を用いた Pull-down 実験および免疫沈降実験にて確認した。さらに、NTMBP-1 を強制発現すると NTM の局在が膜から細胞外へと変化すること、さらには修飾が変化することが見出された。

今後、NTM と NTMBP-1 との結合が NTM の抗老化・炎症活性に果たす役割を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamamoto Mizuki, Gohda Jin, Kobayashi Ayako, Tomita Keiko, Hirayama Youko, Koshikawa Naohiko, Seiki Motoharu, Semba Kentaro, Akiyama Tetsu, Kawaguchi Yasushi, Inoue Jun-ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Metalloproteinase-Dependent and TMPRSS2-Independent Cell Surface Entry Pathway of SARS-CoV-2 Requires the Furin Cleavage Site and the S2 Domain of Spike Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00519 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00519-22	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 Cona Brandon, Hayashi Tomoatsu, Yamada Ai, Shimizu Naomi, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu	4. 巻 12
2. 論文標題 The splicing factor DHX38/PRP16 is required for ovarian clear cell carcinoma tumorigenesis, as revealed by a CRISPR Cas9 screen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 582 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13358	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 Kawabata Ayako, Hayashi Tomoatsu, Akasu-Nagayoshi Yoko, Yamada Ai, Shimizu Naomi, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 44
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Screening for Identification of Genes Required for the Growth of Ovarian Clear Cell Carcinoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44040108	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 Akasu Nagayoshi Yoko, Hayashi Tomoatsu, Kawabata Ayako, Shimizu Naomi, Yamada Ai, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 -
2. 論文標題 PHOSPHATE exporter XPR1/SLC53A1 is required for the tumorigenicity of epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2034 ~ 2043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15358	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 Orikasa Shion, Kawashima Nobuyuki, Tazawa Kento, Hashimoto Kentaro, Sunada-Nara Keisuke, Noda Sonoko, Fujii Mayuko, Akiyama Tetsu, Okiji Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor 1 induces osteo/odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells via Wnt/ -catenin transcriptional cofactor BCL9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 04453 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04453-8	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 Matsuura Ken, Kobayashi Shizuka, Konno Kohtarou, Yamasaki Miwako, Horiuchi Takahiro, Senda Takao, Hayashi Tomoatsu, Satoh Kiyotoshi, Arima-Yoshida Fumiko, (他8名), Yamamoto Tadashi, Manabe Toshiya, Akiyama Tetsu	4. 巻 42
2. 論文標題 SIPA1L1/SPAR1 Interacts with the Neurabin Family of Proteins and is Involved in GPCR Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2448 ~ 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0569-21.2022	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 Morikawa Asuka, Kawabata Ayako, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu, Okamoto Aikou, Sutani Takashi	4. 巻 811
2. 論文標題 Altered cervicovaginal microbiota in premenopausal ovarian cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 146083 ~ 146083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.146083	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 Nakajima Natsu, Hayashi Tomoatsu, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu, Akutsu Tatsuya, Nakato Ryuichiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Codependency and mutual exclusivity for gene community detection from sparse single-cell transcriptome data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e104 ~ e104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab601	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 Li Mengjiao et al.	4. 巻 133
2. 論文標題 FXYD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	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) 10.1172/JCI166666	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 -

1. 著者名 Taniue Kenzui, Oda Takeaki, Hayashi Tomoatsu, Kamoshida Yuki, Takeda Yasuko, Sugawara Anzu, Shimoura Yuki, Negishi Lumi, Nagashima Takeshi, Okada-Hatakeyama Mariko, Kawamura Yoshifumi, Goshima Naoki, Akimitsu Nobuyoshi, Akiyama Tetsu	4. 巻 2
2. 論文標題 LncRNA ZNNT1 induces p53 degradation by interfering with the interaction between p53 and the SART3-USP15 complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad220	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomoatsu Hayashi, Yoko Akasu-Nagayoshi, Ayako Kawabata, Aikou Okamoto and Tetsu Akiyama.
2. 発表標題 Identification and analysis of genes required for the growth of ovarian cancer cells by CRISPR/Cas9 screening
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 寛敦、川畑 絢子、藤木 克則、中戸 隆一郎、白髭 克彦、岡本 愛光、秋山 徹
2. 発表標題 1細胞発現解析による卵巣がんの多様性の理解
3. 学会等名 第4回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林 寛敦, 秋山 徹 (分担執筆、藤田 直也/編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 がん微小環境に1細胞レベルで挑む	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ニューロトリミンの機能阻害剤	発明者 秋山徹、鴨志田祐己、林寛敦、山角祐介、小田健昭、鹿内	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-120544	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	鴨志田 祐己 (KAMOSHIDA Yuki) (50835759)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員 (12601)	

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