

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03367

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を応用した食事および運動介入による加齢性疾患予防の分子機構解析

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Age-Related Disease Prevention through Diet and Exercise Interventions Applying Genome Editing Technology

研究代表者

千葉 卓哉（Chiba, Takuya）

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152

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）：老化は様々な疾患の危険因子となっている。そのため、老化を遅らせる介入方法の検討がこれまで様々に行われてきた。その中でも、食事制限と運動は一部共通したメカニズムで抗老化作用を発揮すると考えられている。本研究では、その作用に重要と示唆されるWD repeat protein 6 (WDR6)の遺伝子改変動物を用いた研究と、siRNAによる肝臓特異的な機能阻害が、それぞれ肥満症モデルマウス、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態にどのような影響が見られるかを中心に解析した。その結果、いずれの動物モデルにおいてもWDR6の機能阻害が病態進行を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WDR6は全身性に発現しているが、その機能はまだあまり解明されていない。本研究結果により、肥満症やNASHが誘導される際には、その病態進行を促進する可能性があり、そのためWDR6の機能を阻害することで病態進行を抑制することが可能であることが示唆された。これらの結果は、WDR6を標的とした肥満症およびNASHに対する新たな治療薬の開発が可能であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Aging is a risk factor for various diseases. For this reason, various interventions to delay aging have been investigated. Among them, dietary restriction and exercise are thought to exert their anti-aging effects partly through a common mechanism. In this study, we focused on the effects of gene-modified animal models of WD repeat protein 6 (WDR6), which is suggested to be important for such effects, and liver-specific functional inhibition by siRNA on the pathogenesis of obesity model mice and nonalcoholic steatohepatitis (NASH), respectively. The results suggest that inhibition of WDR6 function suppresses disease progression in both animal models.

研究分野：実験病理学

キーワード：肥満症 NASH siRNA 炎症

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食事および運動介入によってマウスの健康寿命は延伸することが知られている。食事介入においては、カロリー制限によって様々な病気の発症および進行が抑制され、寿命が延長することが、様々な実験動物で実証されている。食事および運動介入による抗加齢効果の共通点を探索する過程で、我々はアミノ酸制限時のオートファジー活性化に関与すると示唆される因子として **WDR6 repeat protein 6 (WDR6)** を同定した。本研究課題では、**WDR6** 遺伝子改変細胞、および動物を作成し、**WDR6** の機能阻害による肥満症などの病態抑制効果についての解析を行った。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、**WDR6** 遺伝子の発現が長寿動物の脳内で低下していることを明らかにしていた。**WDR6** は全身性に発現していることから、全身性の **WDR6** ノックアウトマウスを用いた解析、および肥満症モデルマウスである **ob/ob** マウスとの交配により作出したマウスの表現型解析を行った。また、**WDR6** に対する **siRNA** を肝臓特異的に導入することで非アルコール性脂肪肝炎(**NASH**)モデルマウスの病態改善作用について解析し、生体における **WDR6** の機能阻害による影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

肥満症モデルマウスを用いた解析

**Lepob/+**マウスと **Wdr6+/-**マウスを交配し、**Wdr6+/+Lepob/ob** 群、**Wdr6+/-Lepob/ob** 群、**Wdr6-/-Lepob/ob** 群を作出した。通常食で飼育し、若齢期に安楽死処置を行い、基本的なパラメータとして体重、摂食量、臓器重量を測定した。精巣上体周囲脂肪および皮下脂肪の組織標本作製し、**Hematoxylin Eosin (HE)** 染色を行い、切片上の脂肪細胞の断面積を画像解析により算出した。

**NASH** モデルを用いた解析

食事誘導性 **NASH** モデルを作成し、肝臓の組織標本に対して、**HE** 染色と **Sirius Red (SR)** 染色を行った。また、**SR** 染色の結果から肝線維化面積率を画像解析により算出した。さらに、肝臓を用いて **Folch** 法により総脂質を抽出し、中性脂肪 (**TG**) および総コレステロール (**TC**) 含量を定量した。血漿 **ALT**, **TG**, **TC**, 遊離脂肪酸 (**NEFA**) 濃度を比色定量法で測定した。肝臓の遺伝子発現は定量的 **PCR** 法で定量した。

### 4. 研究成果

**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の体重は、**Wdr6+/+Lepob/ob** 群および **Wdr6+/-Lepob/ob** 群と比較して有意に低い値を示した。**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の累積摂食量は **Wdr6+/+Lepob/ob** 群と比較して有意な差は認められなかった。**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の肝臓重量および精巣上体周囲脂肪重量は **Wdr6+/+Lepob/ob** 群と比較して減少していた。**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の皮下脂肪重量においては **Wdr6+/+Lepob/ob** 群と比較して有意に低い値を示した。また、皮下脂肪の脂肪細胞のサイズを定量した結果、**Wdr6+/+Lepob/ob** 群と比較して、**Wdr6-/-Lepob/ob** 群で有意に減少していた。

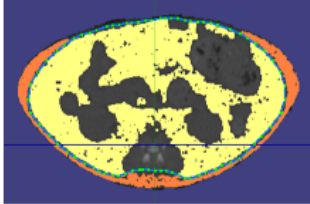
累積摂食量に有意な差が認められないにもかかわらず、**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の体重は **Wdr6+/+Lepob/ob** 群および **Wdr6+/-Lepob/ob** 群と比較して有意に低い値を示したことから、**WDR6** の機能阻害は体重増加および脂肪組織重量の増加を抑制することが明らかとなった。また、**Wdr6-/-Lepob/ob** 群の脂肪細胞はサイズも小さいことは、分化・成熟が抑制されたことが示唆される。今後は、生体内の脂肪前駆細胞についてさらに詳しく解析を行う必要がある。

**NASH** モデルを用いた実験に関して、**WDR6 siRNA** 投与群の肝臓重量は非治療群と比較して有意に低値を示した。**NASH** の各病態である肝細胞傷害 (血漿 **ALT** 濃度)、脂質蓄積 (肝臓中の **TG** および **TC** 含量)、炎症 (**F4/80** に対する免疫染色の陽性面積率、炎症性サイトカイン **TNF- $\alpha$** , **MCP-1** の遺伝子発現量)、線維化 (肝線維化面積率、活性化星細胞のマーカータンパク質  **$\alpha$ -SMA**, **コラーゲン分解酵素 MMP9**, その不活化分子である **TIMP-1** の遺伝子発現量) について、**WDR6 siRNA** 群は非治療群と比較してそれぞれ有意に低値を示した。

これらの結果から、**WDR6** が **NASH** に対する新規の治療標的となる可能性を明らかにした。**WDR6 siRNA** は **NASH** 病態における肝臓の脂質蓄積に対し、脂肪酸  $\beta$  酸化の亢進や脂質新生の抑制を通じて抑制的に作用し、その後の炎症および線維化の進行を抑制していると示唆される。今後はタンパク質レベルの解析に加えて、**WDR6 siRNA** の投与量やタイミングについても検討を行い、より詳細な **WDR6 siRNA** の作用メカニズムを明らかにする必要がある。

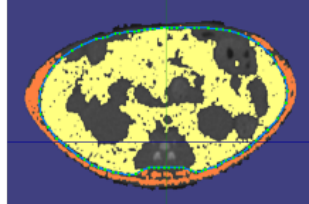
# Wdr6欠損は脂肪組織量を低下させる

*Wdr6<sup>+/+</sup>Lep<sup>ab/ob</sup>*



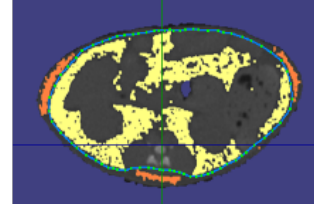
内臓脂肪： 3187 mm<sup>3</sup>  
皮下脂肪： 872 mm<sup>3</sup>  
除脂肪： 2438 mm<sup>3</sup>

*Wdr6<sup>+/-</sup>Lep<sup>ab/ob</sup>*



内臓脂肪： 2980 mm<sup>3</sup>  
皮下脂肪： 852 mm<sup>3</sup>  
除脂肪： 2535 mm<sup>3</sup>

*Wdr6<sup>-/-</sup>Lep<sup>ab/ob</sup>*



内臓脂肪： 1666 mm<sup>3</sup>  
皮下脂肪： 575 mm<sup>3</sup>  
除脂肪： 4138 mm<sup>3</sup>

色：オレンジ（皮下脂肪）、イエロー（内臓脂肪）、ブラック（除脂肪）

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li Shibo, Wang Hailong, Jehi Sanaa, Li Jun, Liu Shuo, Wang Zi, Truong Lan, Chiba Takuya, Wang Zefeng, Wu Xiaohua	4. 巻 40
2. 論文標題 PIF1 helicase promotes break induced replication in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104509	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 Saito Kenji, Ito Maiko, Chiba Takuya, Jia Huijuan, Kato Hisanori	4. 巻 13
2. 論文標題 A Comparison of Gene Expression Profiles of Rat Tissues after Mild and Short-Term Calorie Restrictions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2277 ~ 2277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13072277	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0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 吉井幸、近藤嘉高、千葉卓哉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 92
3. 書名 カロリー制限の抗老化作用とヒトへの応用に向けた最近の知見、食と医療 18号 SUMMER-FALL	

1. 著者名 近藤嘉高、伊藤麻衣子、千葉卓哉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 132
3. 書名 カロリー制限による抗老化機構の解明とその制御物質の探索、別冊「医学のあゆみ」 老化メカニズムの徹底究明 分子からアンチエイジングまで、石井直明 編	

〔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	近藤 嘉高  (Kondo Yoshitaka)  (20507397)	早稲田大学・人間科学学術院・講師(任期付)    (32689)	
研究 分担者	石神 昭人  (Ishigami Akihito)  (50270658)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長    (82674)	

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