

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06852

研究課題名（和文）分岐鎖アミノ酸代謝を起点とする新規細胞老化機構の解明と細胞老化制御法確立への戦略

研究課題名（英文）Elucidation of a novel cellular senescence mechanism modulated by branched-chain amino acid metabolism.

研究代表者

小西 昭充 (Konishi, Akimitsu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50381877

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）：老化は体内に蓄積する老化細胞が原因の一つとされる。本研究では必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸の代謝異常が、どのようにして細胞の老化を引き起こすのかのメカニズム解明に取り組んだ。分岐鎖アミノ酸の代謝が障害されると、細胞のエネルギーや生体分子の産生が不足し、細胞が老化した。また、分岐鎖アミノ酸の代謝機能が低下すると、細胞内で酸化ストレスが増加し老化が進むことも分かった。さらに、マウスで分岐鎖アミノ酸の代謝を抑制すると老化細胞が蓄積して老化が進むことや、ヒトの高齢者では分岐鎖アミノ酸の代謝が低下していることから、分岐鎖アミノ酸の代謝機能が老化の抑制に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本を含め世界は超高齢化社会に入り、高齢者の健康をどのように維持していくかは重要な社会的課題となっている。分岐鎖アミノ酸は必須アミノ酸であり、高齢者での摂取量調節に関する研究が栄養学的な観点から多く行われている。しかし、分岐鎖アミノ酸代謝が細胞の老化を制御しているという報告はこれまでになく、本研究が初めてのものになる。さらに、ヒトの老化抑制にも分岐鎖アミノ酸代謝が重要であることを示した本研究から得られる知見は、高齢者の健康維持対策に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Aging is thought to be caused, in part, by the accumulation of senescent cells in the body. In this study, we investigated the mechanisms by which metabolic abnormalities of branched-chain amino acids (BCAAs), which are essential amino acids, lead to cellular senescence. When the metabolism of BCAAs is impaired, the production of cellular energy and biomolecules is insufficient, causing cells to become senescent. We also found that when the metabolic function of BCAAs declines, oxidative stress within cells increases, accelerating cellular senescence. Furthermore, it has been shown that inhibition of BCAA metabolism in mice leads to accumulation of senescent cells and accelerated aging, and that BCAA metabolism is reduced in elderly humans. These findings suggest that the metabolic function of BCAAs is critical in suppressing aging.

研究分野：生化学、細胞生物学

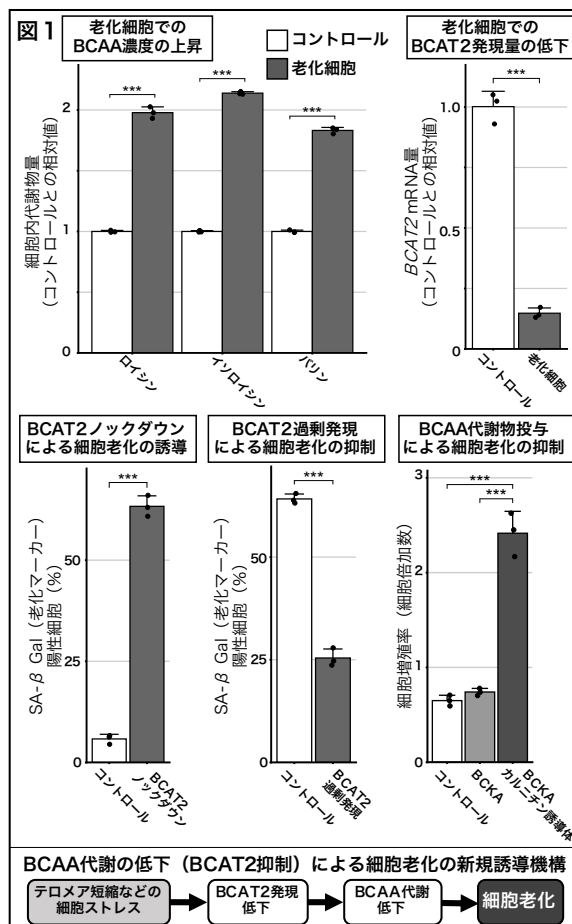
キーワード：細胞老化 分岐鎖アミノ酸 テロメア 活性酸素 アミノ酸代謝 エネルギー代謝 DNA損傷応答

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、細胞老化時に細胞内代謝がドラスティックに変化する事が明らかとなってきたが、その生物学的な意義についてはほとんど分かっていない。

最近、我々は分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝の変化が起点となる細胞老化の新たな誘導機構を発見した。老化細胞ではBCAAアミノ基転移酵素BCAT2の発現量が低下し、ロイシン・イソロイシン・バリンの3種類全てのBCAAが細胞内に蓄積することを見出した (図1)。BCAT2をノックダウンすると細胞老化が誘導され、BCAT2を過剰発現すると細胞老化が抑制されること等から、BCAA代謝の変調は細胞老化の結果ではなく、細胞老化の誘導に必須の変化であることが明らかとなった (図1)。

これまでにBCAA代謝と細胞老化の関連については全く報告がなく、その分子機序は今のところ全く不明である。そこで、本研究では『BCAA代謝はどのように細胞老化に関与しているか?』という問いに取り組むこととした。



2. 研究の目的

以下のアプローチにより、BCAA代謝による細胞老化機構の理解と応用を目指した。

- (1) 細胞老化誘導によるBCAT2の発現制御機構の解明
- (2) BCAA代謝の変調による細胞老化の誘導機構の解明
- (3) BCAT2ノックアウトマウスの作成と解析

3. 研究の方法

(1) 細胞老化誘導によるBCAT2の発現制御機構の解明

細胞老化誘導によりBCAT2のmRNA量が低下するが (図1)、その機序は不明である。そこで、KLF15、PGC1Aなどの既知のBCAT2発現調節因子について、細胞老化時の発現量変化、ノックダウン・過剰発現によるBCAT2発現調節への効果を解析し、細胞

老化時のBCAT2発現低下に関与する転写調節因子の同定を行なった。

(2) BCAA代謝の変調による細胞老化の誘導機構の解明

BCAT2のノックダウンによってBCAA代謝を抑制すると細胞老化が誘導されるが(図1)、その機序は不明である。我々は次の二つの作業仮説(図2)について、検証を行なった。

(A) BCAA代謝抑制によるミトコンドリアのATP産生の低下が細胞老化を誘導する。

BCAAは異化反応の後、TCA回路の基質となる(図2)。TCA回路関連代謝物を、BCAT2ノックダウン細胞へ投与して細胞老化の抑制効果を検討した。

(B) BCAA代謝抑制による細胞の抗酸化活性の低下が細胞老化を誘導する。

BCAT2によるBCAA異化は、抗酸化物質であるグルタチオン生成に重要なグルタミン酸生成と共役している(図2)。活性酸素による酸化ストレスは細胞老化の原因とされており¹⁾、BCAT2の抑制による細胞の抗酸化活性の低下が細胞老化の誘引となる可能性がある。

BCAT2ノックダウン細胞でのグルタミン酸・グルタチオン量、活性酸素量を解析し、BCAT2が細胞の抗酸化活性に及ぼす影響を調べた。また、N-アセチルシステイン等の抗酸化薬をBCAT2ノックダウン細胞へ投与して細胞老化の抑制効果を検討した。

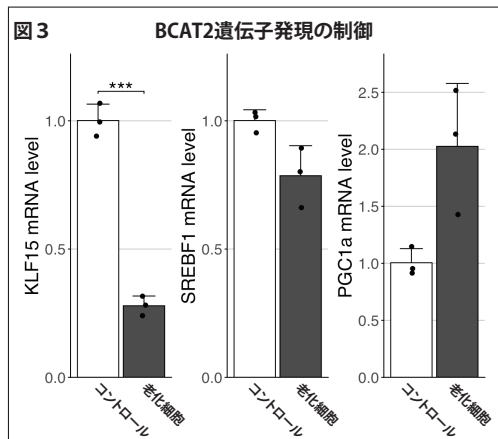
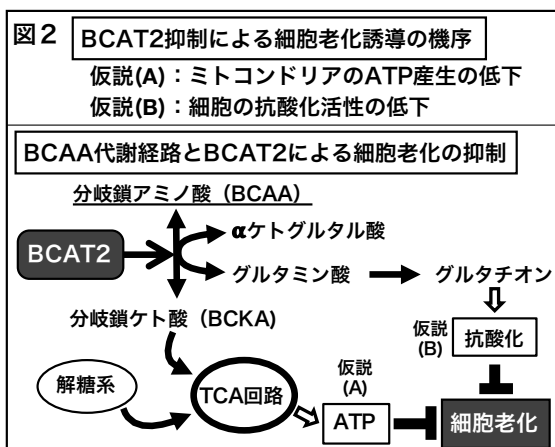
(3) BCAT2ノックアウトマウスの作成と解析

個体老化におけるBCAA代謝の寄与を検討するために、BCAT2ノックアウトマウスを作成して組織内での老化細胞の蓄積等を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞老化誘導によるBCAT2の発現制御機構

これまで報告のあるBCAT2転写調節因子はKLF15, SREBF1, PGC1Aの3つである。老化誘導によりこれらの転写因子の発現量がどのように変化しているかを定量PCR法により解析した。その結果、KLF15のみが有意に細胞老化の誘導により発現量が低下していた。この結果から、老化細胞でのBCAT2発現抑制はKLF15の発現低下によるものだと考えられた(図3)。



そこで、正常ヒト線維芽細胞 IMR90 を用いて、KLF15 をノックダウンし発現を抑制したところ、BCAT2 発現が抑制された。また、あらかじめ KLF15 を過剰発現させておくと、老化誘導を行っても BCAT2 の発現抑制は見られなかったことから、細胞老化誘導時に BCAT2 発現を制御している転写調節因子は KLF15 であることが示された (図4)。

(2) BCAA代謝の変調による細胞老化の誘導機構

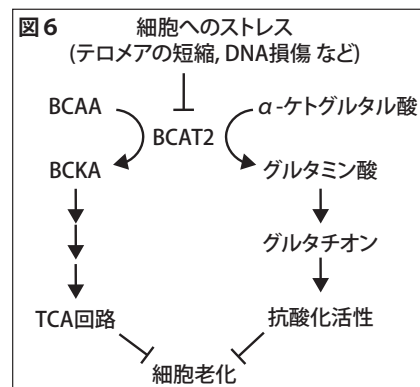
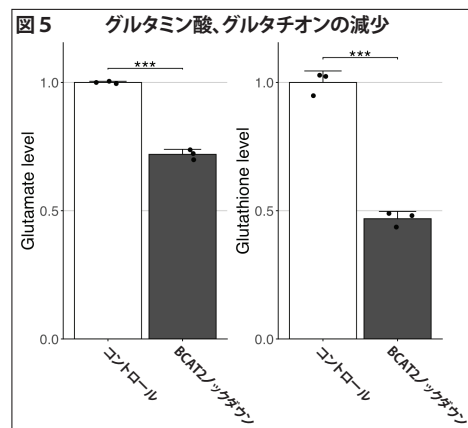
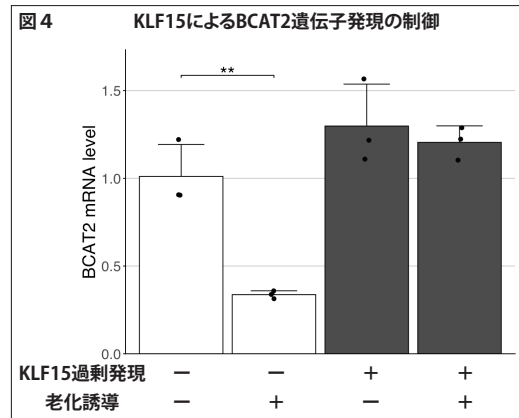
(A) BCAA代謝産物による細胞老化の抑制

BCAA の最終代謝産物は TCA 回路に入り、細胞のエネルギー源やアミノ酸などの他の代謝物合成の基質となる。そこで、BCAA 代謝産物の不足が細胞老化の原因となっているかを検証するために、BCAA 代謝産物である BCKA (ミトコンドリアへの透過性を上げるためにカルニチン誘導体化したもの) を BCAT2 ノックダウンと同時に細胞に投与して細胞老化への影響を調べた。その結果、BCKA 投与により有意に細胞老化が抑制されたことから、BCAA 代謝産物の不足が細胞老化の原因となることが示された。しかし、その抑制効果は完全ではなかったため、そのほかの原因が存在することが示唆された。

(B) BCAA 代謝抑制による細胞の抗酸化活性の低下

BCAT2 は BCAA を代謝する際に同時にグルタミン酸を産生する。グルタミン酸は細胞の抗酸化活性に重要なグルタチオン合成の基質であるため、BCAT2 ノックダウンによってグルタミン酸産生が低下した場合グルタチオン合成も同時に低下し、その結果、細胞の抗酸化活性が低下することが予想される。そこで BCAT2 ノックダウン細胞でのグルタミン酸、グルタチオン濃度を測定した。すると予想通り、BCAT2 ノックダウンにより細胞内のグルタミン酸、グルタチオン濃度は低下することが分かった (図5)。

次に抗酸化活性の低下を調べるために細胞内の活性酸素種を測定したところ、BCAT2 ノックダウンにより活性酸素種の細胞内濃度が亢進することが分かった。活性酸素種により酸化ストレスは細胞老化の主要な原因の一つであることから、細胞内に増加した活性酸素種が BCAT2 ノックダウン細胞で誘導される細胞老化のもう一つの原因であることが示唆された。そこで、BCAT2 ノックダウン細胞へグルタチオンを投与すると、予想通り細胞老化は抑制された。さらに、BCKA とグルタチオンを同時に投与すると細胞老化の誘導はほぼ全てキャンセルされたことから、BCAT2 は、BCAA 代謝産物とグルタミン酸の供給の二つの独立した経路により細胞老化を制御していることが示された (図6)。



(3) BCAT2 ノックアウトマウスの作成と解析

BCAT2 が生体内でも細胞老化の制御に関与しているかを調べるために、BCAT2 ノックアウトマウスを作成した(群馬大学生体調節研究所、畑田出穂教授との共同研究)。ノックアウトマウスは正常に出生したが、離乳後の体重増加の抑制、骨格筋と脂肪組織の高度萎縮、早期死亡率の亢進が見られた。この原因は組織内での細胞老化の亢進によるものだと考え、骨格筋、脂肪組織を中心に老化細胞の解析を行なった。その結果、骨格筋、脂肪組織では SA- β gal 陽性細胞の増加、老化マーカーの増加など老化細胞が蓄積していることが分かった(図7)。この結果から、BCAT2 は生体内でも細胞老化の抑制に関与していることが示された。

図7 脂肪組織のSA- β gal染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 小西 昭充	4. 巻 283
2. 論文標題 ミトコンドリアを経由するアポトーシス	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 317-321
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 -

1. 著者名 大日方英、小西昭充	4. 巻 48(1)
2. 論文標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と老化・加齢性疾患	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 3-8
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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小西 昭充
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と細胞・個体老化
3. 学会等名 第9回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西 昭充
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と細胞・個体老化
3. 学会等名 第8回 がんと代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zhao Xian, Keisuke Kyozyuka, Akimitsu Konishi, Yoji A. Minamishima, Hideru Obinata
2. 発表標題 Filamin B regulates the endocytosis of endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西 昭充
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と細胞・個体老化
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 土田 愛子, 入江 和樹, 荒牧 佑磨, 南嶋 洋司, 小西 昭充
2. 発表標題 テロメア短縮による細胞老化の過程で変化する細胞内タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuma Aramaki, Hideru Obinata, Shinya Honda, Takashi Izumi, Shigeomi Shimizu, Yoji A. Minamishima, Akimitsu Konishi
2. 発表標題 Modulation of Cellular Senescence by Branched- Chain Amino Acid Metabolism
3. 学会等名 International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Aramaki, Kazuki Irie, Aiko Tsuchida, Takashi Izumi, Yoji A. Minamishima, Akimitsu Konishi
2. 発表標題 Development of rapid and efficient induction system for replicative senescence by mimicking telomere shortening
3. 学会等名 International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西昭充、荒牧佑磨、大日方英、本田真也、和泉孝志、清水重臣、南嶋洋司
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調による細胞老化制御機構
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒牧佑磨、大日方英、本田真也、和泉孝志、清水重臣、南嶋洋司、小西昭充
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調による細胞老化制御機構
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院医学系研究科テニユアトラック普及推進室 http://tenure.showa.gunma-u.ac.jp 群馬大学大学院医学研究科生化学分野 http://biochemistry.med.gunma-u.ac.jp 群馬大学大学院医学系研究科テニユアトラック普及推進室 http://tenure.showa.gunma-u.ac.jp 群馬大学大学院医学研究科生化学分野 http://biochemistry.med.gunma-u.ac.jp
--

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	大日方 英 (Obinata Hiders) (50332557)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

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