

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07392

研究課題名（和文）細胞老化と個体老化へのチミジンホスホリラーゼの影響

研究課題名（英文）Effects of thymidine phosphorylase on cellular senescence and aging

研究代表者

中島 融一（Nakajima, Yuichi）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80372796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は細胞老化に対するチミジンホスホリラーゼ（TP）の影響を明らかとし、個体老化にも関連する新規の老化因子としての知見を得た。

TPノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して寿命が延長し、老齢期の外貌や行動性等の老齢性変化にも差異が認められた。これらの現象は、臓器の老化因子の減少および加齢に伴う慢性炎症「inflammaging」の軽減が原因の一つと考えられた。細胞レベルにおいても、老化誘導した細胞はTPの発現量が増加し、老化細胞の特徴的な表現型である細胞老化随伴分泌現象を示す炎症性因子の制御に関連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

本邦のみならず世界の先進国で高齢化は社会的な問題となっている。「老化と寿命」に関する学術研究が国内外で加速的に進展している。このように高い注目を集めている老化研究の中、TPを老化因子として見出したことは、老化研究に関して新たな基礎研究の推進に寄与することとなる。

現在、いくつかの老化細胞除去剤や老化治療薬の候補が見いだされてきた。本研究により見出したTPの老化制御メカニズムがより深く理解されることにより、臨床研究へとつながる可能性が高く、新たな老化治療薬開発の一助を担うことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed the effect of thymidine phosphorylase (TP) on cellular senescence and provided insight into this novel senescence factor as it relates to the control of aging.

TP knockout mice had an extended lifespan and delayed age-related changes in appearance and locomotor activity in old age compared to wild-type mice. These phenomena were accompanied by a decrease in senescence factors in organs and a reduction in age-related chronic inflammation, "inflammaging/inflammatory senescence". At the cellular level, senescence-induced cells showed increased expression of TP and may be associated with the regulation of the expression of inflammatory factors that exhibit the senescence-associated secretory phenotype (SASP) phenomenon.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞老化 個体老化 チミジンホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

世界の先進諸国において高齢化が急速に進んでいることが問題となっている。中でも、日本の総人口に占める65歳以上の人口比率(高齢化率)は令和2年度の高齢社会白書(内閣府)によると28.4%となっている。本邦における社会的な超高齢化問題は広く一般にも認知されている。高齢者が肉体的・精神的に健康で、個人にとっても社会に対しても生産的な生活が少しでも長く持続できる方法を見出すことは非常に重要である。これら社会的な関心のもと「老化と寿命」に関する学術研究が国内外で加速的に進展している。老化に関する基礎的な研究として、細胞老化と個体自体の老化との関連性が長く議論されてきた。細胞老化は様々な刺激により細胞増殖を不可逆的に停止させることにより誘導される。この老化細胞は加齢により組織内に蓄積することが明らかとなったが、ヒトから単離した培養細胞の増殖能とその細胞由来のヒト個人の年齢との相関性は一致していないとの報告もある(Cristofalo VJ et al., Mech Ageing Dev, 2004)。このような議論の中、2011年にBaker DJらは、早老型マウスから老化細胞を取り除くと加齢に伴う表現型が改善したと報告した(Nature Cell Biology)。この研究がブレイクスルーとなり、各種疾患と加齢により蓄積した老化細胞との関連があると報告が数多くされるようになった。さらに、正常マウスであっても老化細胞の除去が個体の老化進行を緩和し、寿命と健康寿命を延ばすことが報告された(Nature 2016)。

応募者はこれまでがんに関連した分野においてチミジンホスホリラーゼ(TP)について研究を行ってきた。TPは細胞の核酸代謝に関与する酵素であり、この代謝により種々の生理活性を持つことが知られている。そのTPの生理活性の1つに2-デオキシ-D-リボース(D-dRib)の生成がある。D-dRibはTPが関与する核酸代謝において、チミジンからチミンへの分解過程で生じる2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸から非酵素的に産生される。応募者を含むいくつかの研究グループにより、D-dRibは*in vitro*および*in vivo*において血管新生作用やがん細胞の転移・浸潤能の亢進作用を持つことが報告されている(Uchimiya H. et al., Cancer Res 2002, Nakajima Y. et al. Cancer Res 2004)。その研究過程において作成したTPノックアウト(TP KO)マウスの実験・観察を続ける中で、野生型マウスと比べ個体の外貌や行動性などにおいて老化スピードが遅延し、いわゆる“健康寿命”の延長が観察され、僅かながら有意差をもって生存曲線(寿命)の延長も見られた。過去20年ほどの間で国内外の研究により、多くの老化関連遺伝子や因子が報告されているが、このTPと老化に関連する報告は無い。本研究による新たな細胞老化および個体老化の制御機構の解明は老化・寿命の基礎研究の推進に寄与し、臨床研究へとつながる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本申請研究は細胞老化に対するTPの影響を明らかとし、個体老化への制御をも見据えた老化因子として新たな知見を得ることを目的とする。これは「老化と寿命」に関する基礎的研究にあたるが、トランスレーショナル型の臨床研究へ発展する可能性を持つ。

3. 研究の方法

以下の実験を行いTPの個体老化と細胞老化への影響を明らかとする。

(1) TP KOマウスを用いたTPの個体老化に対する影響

(a) TP KOマウス(129頭)およびWildマウス(90頭)の生存期間の観察、それぞれのマウス群の40~60週齢の雌マウスの妊孕性(TP KOマウス32頭およびWildマウス22頭)について観察する。

(b) 加齢に伴うサーカディアンリズムのずれや行動性の変化が認められることから、老齢期:80週齢のTP KOマウスとWildマウスとの活動量(夜間行動をタイムラプス撮影しケージ内の移動軌跡を動態解析ソフト(DIPP-MotionV)にてデジタル化し、をそれぞれの群の8週齢マウスを基準としてスコア化する。さらに、行動実験の一つとして用いられるオープンフィールド・テストにより両マウス群の8、60、および80週齢における20分間の運動量をフィールド内の移動軌跡(距離)を動画撮影し、DIPP-MotionVでスコア化する。

(c) 加齢に伴い臓器の機能低下や構築の変化といった生体の恒常性の破綻が進行していくことから、この“臓器老化”に差が認められるか組織学的手法を用いて明らかとする。皮膚の被毛(毛包)部、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、生殖器、小腸および大腿部骨格筋について、HE染色、オイルレッド染色、アリシアンブルー染色、およびアザン染色による組織ごとの比較を行う。加齢性変化に差が認められた臓器・器官は、細胞老化の指標となる老化関連ガラクトシターゼ(SA-gal)陽性細胞の割合やcyclin-dependent kinase inhibitor 2A(Cdkn2a, p16Ink4a)のmRNA発現量をRT-PCR法を用いて確認する。

(d) 上記(c)のマウスの組織学的実験時に採材した肝臓および脾臓からTotal RNAを抽出し、QIAGEN社製のRT² ProfilerTM PCR Array Mouse Agingキットを用いてPCRマイクロアレイ法を行う。TP欠損に関連して老化遅延現象を引き起こす因子の網羅的な探索を行う。TPが無いことにより動態の変化が認められた因子について、その臓器での役割と老化へのプロセスに関連性

があるかを探索する。

(2) TP の細胞老化に対する影響とそのメカニズムの解析

(a) マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を継代ストレスまたは、すでに老化誘導効果が知られている抗がん剤ドキシソルピシン添加により老化誘導した老化細胞を用いて TP および老化関連因子の発現量の変化および相関の有無について調べる。

(b) TP KO マウスまたは Wild マウスの背部皮膚から得た初代皮膚線維芽細胞を用いて、細胞増殖能、ドキシソルピシンによる老化誘導に対する耐性の有無、および老化関連因子の発現量の変化を調べる。併せて、QIAGEN 社製の RT² ProfilerTM PCR Array Mouse Cellular Senescence キットを用いて PCR マイクロアレイ法を行い、TP の有無による細胞老化関連因子の網羅的な探索を行う。

4. 研究成果

(1) TP KO マウスを用いた TP の個体老化に対する影響

(a) TP KO マウス (129 頭) および Wild マウス (90 頭) の生存期間を観察した結果、生存曲線は有意な差を持って TP KO マウス群が延長していた。それぞれのマウス群の 50% 生存日数は、Wild マウス群で 102 週 (25.5 か月)、TP KO マウス群で 112 週 (28 か月) であった。雌マウスの妊孕性においては両群に有意な差は認められなかった (40-60 週齢の妊娠率: Wild マウス群 59.1%、TP KO マウス群 56.3%)。

(b) 夜間行動量は 8 週齢のマウスでは両群に差はなかった。それに対し、老齢期: 80 週齢の TP KO マウスと Wild マウスとの夜間行動量は、TP KO マウスにおいて 8 週齢マウスに比較し行動量が Wild マウスより減少の幅が少なかった。一方、日中 (照明点灯) の行動量も測定し、24 時間のサーカディアンリズムをグラフ化したが、両群間の行動リズムに大きな差異は無かった。オープンフィールド・テストでは、60 および 80 週齢の TP KO マウスが同週齢の Wild マウスよりも 20 分間の運動量が多かった。

(c) 80 週齢および 100 週齢のマウスから採材した各種組織の解剖組織学的観察において、肝臓では脂肪変性は両群に差はなかったが、TP KO マウス群では線維化が軽減している像が得られた。また、心臓の組織像では顕著な差異が確認できなかった。統計学的な検定数に満たない個体数の実験ではあるもの心エコーを用いた心機能検査において、Wild マウスに比較し、TP KO マウスに心機能の低下が軽減している傾向がみられた。この実験に関しては、継続していく予定である。

(d) 採取した 8、60、および 80 週齢のマウスの各臓器・組織を用いて老化マーカーとして知られている cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a, p16Ink4a) の mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて比較したところ、肝臓において、Wild マウスでは若齢期から老齢期への推移で増加した p16Ink4a 発現量に比較し、TP KO マウスでは顕著な増加が抑えられていた。このことから、肝臓をサンプルとして PCR マイクロアレイを実施した。差異がみられた遺伝子群の中で、特に Calb1、Cdkn1c、および Cfhr1 等の老化に伴う炎症反応 (Inflammaging) に関連する遺伝子が低下していた。これらの減少は、脾臓や心臓をサンプルとして実施した PCR マイクロアレイにおいても、同様の現象が認められ、TP が体内のいくつかの臓器において Inflammaging に影響していることが示唆された。これまでの研究により、TP は p53 経路や NFK 経路に参与していることは報告されていたが、新たに、老化に関連する p16Ink4a/pRb 経路へ影響する可能性が見いだされた。

(2) TP の細胞老化に対する影響とそのメカニズムの解析

(a) マウス胎児線維芽細胞 (MEF) が老化誘導できたかの確認には、細胞の形態的な観察、細胞増殖の著しい低下、RT-PCR 法を用いた p16Ink4a 発現量の増加、および細胞老化の指標となる老化関連 ガラクトシターゼ (SA- gal) 陽性細胞の増加により行った。確立した老化細胞と継代回数の少ない (若い) 細胞を比較したところ、mRNA レベルおよび蛋白質発現量ともに TP が増加していた。併せて、老化細胞の特徴的な表現型である Senescence-associated secretory phenotype (SASP) に含まれる因子群の検出を試みたところ、FGF2、IL-8、および 1 インテグリンの発現の差異が認められた。TP 阻害剤 (TPI; チピラシル塩酸塩) を用いた阻害実験により SASP 現象が軽減したことから、老化による非感染性の炎症反応の表現型が TP の阻害により有効であることが細胞レベルでも確認された。

(b) 8 週齢および 80 週齢の TP KO マウスまたは Wild マウスの背部皮膚から得た初代皮膚線維芽細胞を用いた実験において、TP の有無によらず、細胞増殖能およびドキシソルピシンによる老化誘導に対する耐性に差はみられなかった。しかしながら、PCR マイクロアレイ (Mouse Cellular Senescence 関連) を行ったところ、老化に伴い増加した Col1a1、Col3a1、および TSP-1 が TP KO 線維芽細胞では Wild マウス線維芽細胞に比較して有意に低下していた。組織由来が異なる線維芽細胞での結果ではあるが、肝臓での線維化の抑制や心機能の低下軽減との関連が考えられる結果が得られた。

本研究によって、チミジンホスホリラーゼが老化細胞および生体内の臓器老化において増加すること、TP の阻害は SASP 現象を軽減することで Inflammaging を抑制し、老化の遅延に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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