

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19589

研究課題名（和文）SASP 細胞除去によるヒト皮膚若返り

研究課題名（英文）Human skin rejuvenation by removal of cells causing SASP

研究代表者

貴志 和生（Kishi, Kazuo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：40224919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞老化モデルと通常のヒト線維芽細胞の発現遺伝子をRNA-seq法にて比較することにより、老化細胞を特異的に標識するマーカーを探索した。線維芽細胞細胞膜表面に発現する因子に絞り込み、これら遺伝子のコードするタンパク質が実際に細胞膜表面にあることを分離同定した。対象となる分子に対する抗体には治光感受性物質をコンジュゲートし、免疫沈降法により確認した。本抗体を用いて光線暴露を行い、細胞の殺し分けができるか否かを確認したところ、若い細胞では細胞死はほとんど見られなかったが、老化した細胞で多くの細胞死の惹起を惹起することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に関連する疾患の発症には老化した細胞の蓄積が関与することから、抗加齢医療において生体から老化細胞を除去する治療法（senolysis）の開発が注目を集めてきた。皮膚においても老化細胞の除去は、SASPの悪影響を除去し、細胞外マトリックスの正常化、脂肪細胞の分化促進、炎症の軽減、および皮下構造の回復を介して老化の表現型を改善すると考えられた。本研究では、皮膚の老化に関与する老化線維芽細胞のみに特異的なマーカー分子を探索し、これを標的とした光免疫療法（Photoimmunotherapy; PIT）を用いた新しいアプローチのsenolysisを開発することで、有用な抗老化治療開発を目指した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we searched for markers that specifically label senescent cells by comparing genes expressed in cellular senescence models and normal human fibroblasts by RNA-seq. We narrowed our focus to factors expressed on the surface of fibroblast cell membranes, and isolated and identified that the proteins encoded by these genes are actually on the cell membrane surface. Antibodies to the target molecules were conjugated with a light-sensitive substance and confirmed by immunoprecipitation. The antibody was used to confirm whether or not light exposure can kill cells, and it was confirmed that young cells showed little cell death, but senescent cells induced a lot of cell death.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：SASP 老化細胞 若返り

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、老化研究が世界的に注目されている。老化現象の中で注目を集める細胞老化の中でも、特に老化関連分泌表現型(senescence-associated secretory phenotype ;SASP)と呼ばれる現象が重要視されている。しかしながら、生体から SASP を起こす細胞のみを特異的に分離、除去する方法は存在しない。SA-β-GAL 活性の増加および p16 Ink4a および p21 の転写物またはタンパク質レベルの上昇など、組織レベルでの主要な老化細胞 (SASP) のマーカーの探索は有用であるが、老化細胞にタグを付けて殺すための遺伝的戦略は、細胞のアイデンティティと生物学的プロセスでの役割を確認するために不可欠であると考えた。殊に皮膚の老化においても、真皮内での老化細胞の蓄積と、それに続く SASP による炎症、線維化が機序となっていると考えられているが、SASP 抑制・除去による皮膚の老化の阻止方法は、現時点で臨床応用されていない。

細胞を生体から除去する方法としては、既存のガン治療を参考とする。すなわち、標的細胞の細胞膜に特異的に発現する物質に対して結合する抗体を作成し、抗原抗体反応を用いて細胞死を惹起する方法である。既存の方法としては、抗体依存性細胞障害 (Kim KM, et al. Genes Dev. 2018)、ワクチンの作成 (Yoshida S, et al. Nat Commun. 2020)、光免疫療法 (Kobayashi S, et al. Acc Chem Res. 2019)、抗体薬物複合体 (2° ADC; Secondary antibody drug conjugate) (Saunders LR, et al. Sci Transl Med. 2015) などが存在する。すでに一部の方法は老化細胞研究にも導入されているが、いずれも生体での老化細胞除去及び若返りの実現には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、生体からの老化細胞を特異的に除去し、皮膚の若返りを目的とした治療戦略の開発を目的とした。このためにはまず老化細胞と正常細胞の違いを明確にし、両者を分類する必要がある。老化細胞を除去することによる寿命の延長は報告されているものの、その他の老化の評価に関しては意見が分かれる。さらに、老化細胞を特異的な細胞表面マーカーはわずかながら報告があるものの、現時点でこれを標的として生体から老化細胞を除去し抗老化あるいは若返りを達成し得た研究は乏しい。本研究を通して老化細胞特異的マーカーを発見し、生体内からの除去に成功すれば、皮膚の抗老化にとどまらず、加齢性疾患の治療方法の開発や全身性の若返りに直結する可能性があり、有用かつ独自性が高いと考えられた。さらに、その方法として近年注目を浴びている光免疫物質と近赤外線による細胞の特異的な破壊を皮膚のアンチエイジングの領域に活かすアイデアはこれまでにないものであった。すでに頭頸部がんの領域では臨床応用もされており人体に安全に使用できる点、抗体の作成に関して熟知する共同研究者がいる点からも実現可能性は非常に高いといえ、挑戦的研究としての潜在的可能性は十分にあると考えた。

3. 研究の方法

(1) 生体における老化細胞の標識

細胞老化モデル、すなわち Hayflick の理論に基づき細胞が分裂停止をした段階を老化と定義するもの (Proliferation-senescence cell)、Ionized radiation により DNA 損傷を惹起して分裂停止を引き起こすもの (Radiation-induced senescence cell)、DNA 障害性の薬剤を投与することにより分裂停止を引き起こすもの (Drug-induced senescence cell) の各種細胞と通常のヒト線維芽細胞の発現遺伝子をマイクロアレイ法にて比較することにより、老化細胞を特異的に標識するマーカーを探索した。その中でも、細胞膜表面に発現する因子に絞り込み、これら遺伝子のコードするタンパク質が実際に細胞膜表面にあることを分離同定する。その他、免疫染色、リアルタイム PCR によっても、老化細胞膜特異的なマーカーであることを確認した。

(2) 標的物質に対する特異的抗体の作成

先に述べた方法で老化細胞が標識できることが確認できたのち、その標的に対する抗体に光感受性物質をコンジュゲートした。すなわち、光免疫治療の場合は、近赤外線 (Near-infra red; NIR) に感受性のある レザフィリンを結合させた。抗体に対する物質の結合の可否や割合については、免疫沈降法により確認した。

(3) 光免疫治療

レザフィリンを結合させた細胞を、690 nm の NIR に曝露させると、光誘起リガンド放出反応が起こり、結合した抗体-抗原複合体に劇的な物理的および化学的変化をもたらすことで細胞膜に微細な穴を空け、細胞が破裂する。生体での実験に先んじて、まず培養細胞に対して当該の抗体を投与して光免疫反応の惹起と細胞死が起こるかを確認した。

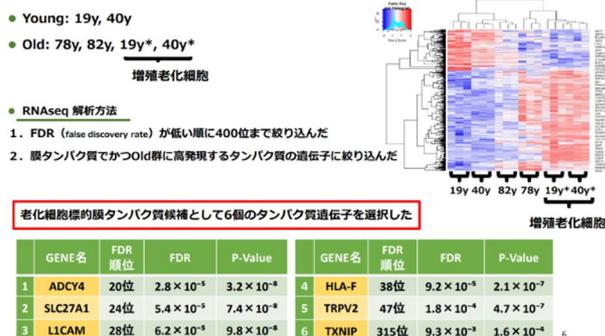
4. 研究成果

(1) 老化細胞特異的マーカーの探索 (RNA-seq)

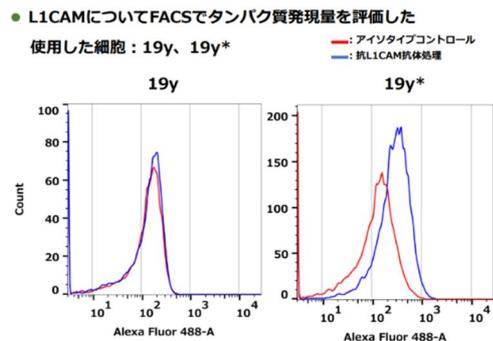
まず、老化細胞を標的とした治療法の開発において、その対象となる老化細胞の特異的マーカーの探索を試みた。高齢のヒトから採取された真皮線維芽細胞は老化を反映していると考えられるが、一方で古典的には増殖細胞が増殖促進刺激に対する抵抗性を獲得し、安定的に細胞周期

が停止した状態を細胞老化と呼ぶ。従って、我々は各年齢層の健常な成人ドナー（19歳、40歳、78歳、82歳）の細胞以外に、19歳および40歳由来の線維芽細胞を増殖しなくなるまで培養を継続し、複製老化細胞(Proliferation senescence)を樹立した(19y*, 40y*)。これらの細胞からRNAを単離し、RNA-seqによる老化細胞特異的発現遺伝子の網羅的解析を施行した。結果として、Old群(78y, 82y, 19y*, 40y*)とYoung群(19y, 40y)の2郡間でt検定を行い、False Discovery Rate (FDR) が低い順に上位400位まで絞り込んだ。絞り込んだ遺伝子をUniprotでOld群の細胞膜表面に発現するタンパク質をコードする遺伝子にさらに絞り込んだ(図1)。

その中でも、過去の文献にて老化した皮膚において発現していると報告されている分子として、L1CAMとHLA-Fを老化細胞特異的な標的として検証した。蛍光活性化セルソーティング(fluorescence-activated cell sorting)により、**現時点でL1CAMは老化細胞を識別するために有効である可能性が示された**(図2)。



(図1) 老化細胞特異的膜マーカーの探索のためのRNA-seq

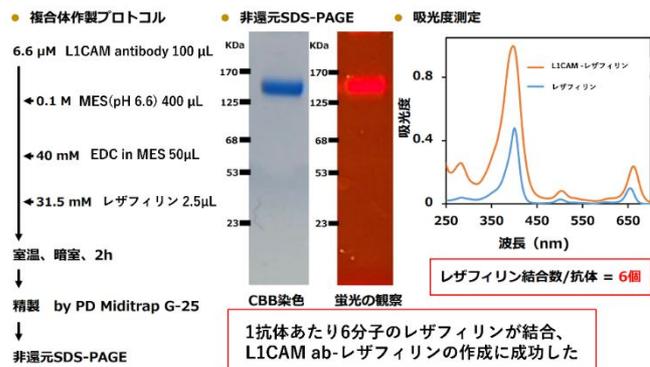


(図2) L1CAM抗体を用いた老化細胞のセルソーティング

(2)L1CAM抗体を用いた光免疫複合体の作成

老化細胞を標的とした光免疫療法のために、RNA-seqで同定された老化細胞特異的膜分子L1CAM抗体に、光感受性物質であるレザフィリン(タラポルフィンナトリウム)を結合させ複合体の形成を行った。

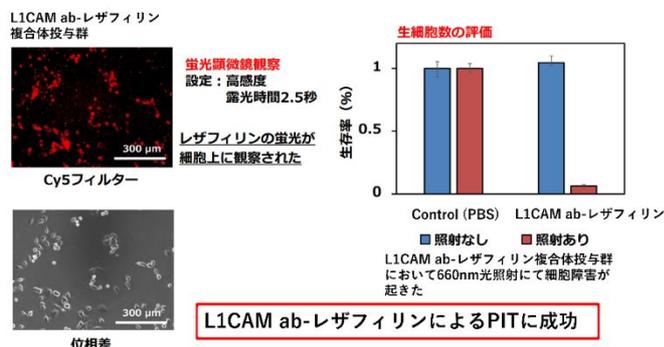
結果として、L1CAM抗体1分子あたり6分子のレザフィリンが結合し、**L1CAM抗体-レザフィリン複合体の形成に成功した**(図3)。



(図3) L1CAM抗体-レザフィリン複合体の形成

(3)L1CAM抗体-レザフィリン複合体による老化細胞PIT

(2)で用意したL1CAM抗体-レザフィリン複合体を老化線維芽細胞の培地内に投与し、Cy5フィルター(励起波長: 620/60nm, 吸収波長: 700/75nm)を用いて観察を行ったところ、レザフィリンの蛍光が細胞上に観察されたことがわかった。これにより、L1CAM陽性の老化細胞に、L1CAM-レザフィリン複合体が特異的に結合することが明らかになった。



(図4) L1CAM抗体-レザフィリン複合体と近赤外線による老化細胞PIT

その後、L660-66-60と直流安定化電源を使用して660nmの近赤外光(0.15 W/cm²)を10分間照射(90

J/cm²) 照射を行い細胞に PIT を施行した。

結果、24 時間後には複合体投与群において有意に細胞生存率が低下した(図 4)。増殖細胞(若い細胞)においては細胞生存率に有意差は生じず、L1CAM 抗体-レザフィリン複合体による PIT によって老化細胞が特異的に障害されたことがわかった。

(4)今後の展望

今回のように、L1CAM とレザフィリン複合体による PIT は細胞・動物いずれのレベルでも有用性を示したが、RNA-seq で絞り込んだその他の老化細胞特異的のマーカート、レザフィリンおよび他の光増感剤との組み合わせによる PIT の効果は比較検討していく必要がある。例えば、IRDye700DX (IR700) が代表的であるが、この合成は完了している。

また、皮膚における老化細胞除去治療を行う上では複合体の投与方法も検討の余地がある。これまでのデータでは溶液を皮内注射しているが、複合体が注入される皮膚の層にばらつきが生じてしまう。そこで、CO₂ フラクショナルレーザーによって真皮層までに均一な穴を空ける方法を応用する(Sakai S, et al. Biomedicines. 2023)。ここに複合体を導入することで、一定の層まで薬剤を到達させることができ、真皮内での効果的な PIT が行える可能性がある。

4-1 において皮膚における senolysis の効果が確認できた場合は、投与形態や投与期間を変更し、最適な治療プロトコルを評価する。同時に、老化促進マウス(SAM マウス)、早老症マウス(klotho マウス)、糖尿病モデル、動脈硬化モデル、肝線維症モデルなどにこの治療を行い、同様に加齢関連疾患や早老症を改善するか判定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 Takaya Kento, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 24
2. 論文標題 New Senolysis Approach via Antibody-Drug Conjugate Targeting of the Senescent Cell Marker Apolipoprotein D for Skin Rejuvenation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5857 ~ 5857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065857	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 Takaya Kento, Ishii Tatsuyuki, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Navitoclax (ABT-263) Rejuvenates Human Skin by Eliminating Senescent Dermal Fibroblasts in a Mouse/Human Chimeric Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rejuvenation Research	6. 最初と最後の頁 9 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/rej.2022.0048	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 Takaya Kento, Kishi Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of ENPP5, a senescence-associated secretory phenotype factor, prevents skin aging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biogerontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10522-024-10096-9	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 Takaya Kento, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification of resibufogenin, a component of toad venom, as a novel senolytic compound in vitro and for potential skin rejuvenation in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biogerontology	6. 最初と最後の頁 889 ~ 900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10522-023-10043-0	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 Takaya Kento, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Aging Fibroblasts Adversely Affect Extracellular Matrix Formation via the Senescent Humoral Factor Ependymin-Related Protein 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3749 ~ 3749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11233749	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 Takaya Kento, Kishi Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Ligustilide, A Novel Senolytic Compound Isolated from the Roots of <i>Angelica Acutiloba</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Advanced Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.202300434	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 Takaya Kento, Ishii Tatsuyuki, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Glutaminase inhibitors rejuvenate human skin via clearance of senescent cells: a study using a mouse/human chimeric model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 8914 ~ 8926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.204391	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 Takaya Kento, Asou Toru, Kishi Kazuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Cistanche deserticola Polysaccharide Reduces Inflammation and Aging Phenotypes in the Dermal Fibroblasts through the Activation of the NRF2/HO-1 Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15704 ~ 15704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242115704	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高谷健人、鈴木悠史、大滝真梨香、岡部圭介、貴志和生
2. 発表標題 グルタミナーゼ阻害薬BPTESを用いた老化細胞特異的除去による新規皮膚若返り治療
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高谷健人、小島宏建、貴志和生
2. 発表標題 皮膚の抗老化薬開発におけるドラッグリポジショニングの可能性
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	高谷 健人 (TAKAYA KENTO) (50869146)	慶應義塾大学・Department of Plastic and Reconstructive Surgery・Project Instructor (32612)	

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