

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19712

研究課題名（和文）グリコバイオロジーを駆使した細胞スローサイクリングによる老化予防薬の開発

研究課題名（英文）Glycobiology-based cellular slow cycling for the development of anti-ageing drugs

研究代表者

西山 成（Akira, Nishiyama）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10325334

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、単糖類である希少糖・D-allose によって生じる「細胞周期の減速」が細胞老化を抑制することを実証し、新しい視点の老化予防薬開発につなげることに挑戦した。その結果、D-alloseが培養ヒト細胞周期を停止させることなく速度を減速させることを証明し、特許出願した。さらに、細胞内へのD-allose取り込みとミトコンドリア呼吸と解糖系の細胞内エネルギー代謝への影響を同定した。本研究によりD-alloseの「細胞スローサイクリング」を介した細胞老化の予防効果を細胞・生体レベルで強く示唆するデータが得られたことから、新しい概念の老化予防薬の開発に繋がるものであると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、老化を「細胞レベルで生じる疾患」と捉え、細胞老化（cellular senescence）の分子機構の解明が世界レベルで進んでいるものの、有効な老化予防法は開発されていない。これに対して本研究は、単糖類である希少糖・D-allose によって生じる「細胞周期の減速（細胞スローサイクリング）」が、細胞老化を抑制することを実証したものであることから、全く新しい視点の老化予防薬開発につなげるきっかけとなるものであると考えられ、大きな学術的意義と社会的意義を持つ研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to demonstrate that the 'cell cycle deceleration' caused by the monosaccharide D-allose, a rare sugar, inhibits cellular senescence, thereby offering a new perspective for the development of anti-aging drugs. As a result, we proved that D-allose slows down the cultured human cell cycle without arresting it, and applied for a patent. Furthermore, we identified D-allose uptake into the cell and its effects on intracellular energy metabolism in mitochondrial respiration and glycolysis. The results of this research provide data strongly suggesting a preventive effect of D-allose on cellular aging via 'cellular slow cycling' at the cellular and biological level, which should lead to the development of a new concept of anti-aging drugs.

研究分野：薬理学

キーワード：老化 細胞周期 希少糖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、老化を「細胞レベルで生じる疾患」と捉え、細胞老化 (cellular senescence) の分子機構の解明が世界レベルで進んでいるものの、有効な老化予防法は開発されていない。一方、我々のカラダを構成する細胞は、ある一定の回数分裂・増殖を繰り返した後、やがて分裂を生じなくなる。このような現象は「分裂寿命」と呼ばれ、細胞分裂の異常で癌化することなどに対する安全装置であると考えられている (Serrano et al. Cell. 1997)。また、そのように分裂・増殖がストップした老化細胞は、細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype: SASP) という現象を生じ、生体の恒常性に寄与する反面、逆に慢性炎症を惹起して生体機能の低下や癌を発症させるなど、細胞の老化に直結することが明らかとなってきた。

この「分裂寿命 (細胞老化)」を時間軸で考えると、以下の数式で表される
分裂寿命・細胞老化 = (分裂回数) x (一回の分裂に要する「細胞周期」の時間)

上記式のうち、生きている間に分裂できる「分裂回数」は一定に決まっていることから、細胞老化が生じる時期は「一回の分裂に要する細胞周期に要する時間」に100%依存する。これに対して近年、細胞周期が停止 (静止) するのではなく、全体的にゆっくりと周り、増殖するスピードが遅い集団が実在することがバクテリアや酵母、癌細胞などで発見され、過酷な環境で生き残るために獲得された細胞機能として、「細胞スローサイクリング」と呼ばれている。このような「細胞スローサイクリング」現象は、生命体が進化の過程で獲得した細胞に潜在する能力であると考えられているものの、極限の状況のみで生じる細胞の変化であり、そもそも制御できるような現象として捉えられていない (Min et al. PLoS Biol. 2019)。これに対して申請者は最近、希少糖である D-allose が、細胞周期を停止することなく、全体的に減速させることを発見した (特許出願中)。申請者はまず、ヒト膀胱癌 PK-1 細胞に D-allose を投与すると、細胞周期の停止 (静止) やアポトーシスを生じずに細胞増殖能が低下することを見出した。そこで、細胞周期をノコダゾールによって一度ストップさせ、そこから細胞周期再開させたところ、D-allose が細胞周期の速度を全般的に低下させることが示され、特許を出願した。すなわち、単糖類である希少糖・D-allose が、細胞周期の速度を減速させる (細胞スローサイクリングを生じる) という実験的事実を得たため、老化予防に繋げることを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、希少糖・D-allose によるヒト細胞の周期速度を減速させる「細胞スローサイクリング」が細胞老化を抑制することを細胞・生体レベルで実証することにチャレンジする。本研究結果は、これまでのコンセプトとは全く異なった「細胞の分裂寿命延長による細胞老化の予防薬」の開発への突破口となりうるものであるが、これまでの香川大学の研究によって、すでに安全性が確保されている天然物である希少糖・D-allose の応用を試みることから、究極の健康長寿薬の実用化に直結する挑戦であると考えられる。

「細胞周期が停止せずにゆっくり回る」という「細胞スローサイクリング」現象が細胞で生じていることが発見されたのは21世紀に入ってからであり、細胞が究極の状況に置かれた場合のみに生じる細胞の変化であるとされている。従って、そもそも普通の状況では決して生じないとされ、制御可能な細胞の現象としては捉えられていない。これに対して本研究では、申請者が発見した「希少糖」のポテンシャルに対し、香川大学の知と技術を集結させ、世界で初めて細胞周期のスピードを減速させる「細胞スローサイクリング」の制御による老化予防薬の開発に「オール香川大学」で挑戦するものである。

3. 研究の方法

(1) 細胞スローサイクリングの可視化による実証 (培養細胞での実証)

細胞周期の変化で異なる蛍光を発色する Fucci ベクターを培養ヒト細胞に導入し、電動倒立顕微鏡蛍光タイムラプスを用いて、細胞周期を可視化できる実験システムを構築する。この測定システムを使用し、D-allose が細胞スローサイクリングを生じることをシングルセルレベルで可視化することにより実証する。

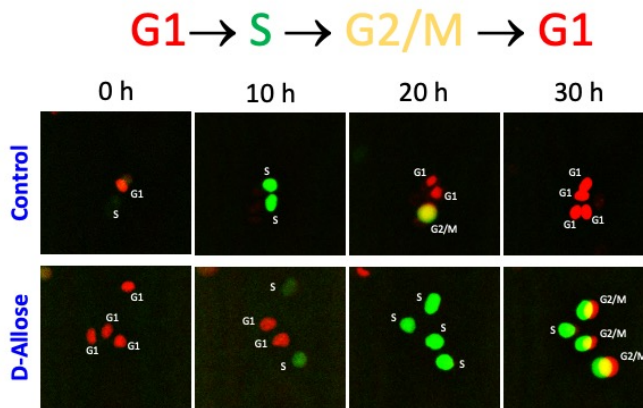
(2) 細胞老化の抑制作用実証

a) 培養ヒト細胞の継代で生じる分裂限界に対し、希少糖・D-allose が延長効果を持つことを実証する。また、D-allose を投与後の細胞内への D-allose 取り込みを HPLC 法で測定し、フラックスアナライザー (プライムテック社) を使用して、D-allose によるミトコンドリア呼吸と解糖系の細胞内エネルギー代謝への影響を同定する。

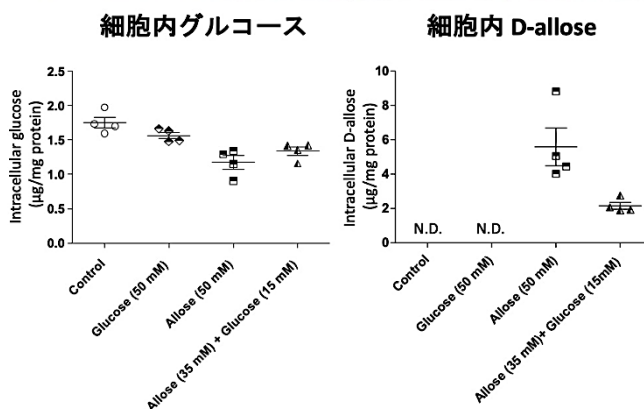
b) C57BL/6 マウスの老化モデルは1年以上の経過観察が必要であるため、初年度の早期から飼育を開始する (52 週齢より開始)。D-グルコースと D-allose を 400 mg/kg を連日経口投与し、1 ヶ月ごと経時的にプライムテック社・シンファクトリー社の最新モニタリング機器を使用して、全身の循環・代謝変化を測定する。104 週齢の老化したマウスの骨格筋を摘出し、重量の測定後に骨格筋組織を評価する。

4. 研究成果

細胞周期の変化で異なる蛍光を発色する Fucci ベクターを培養細胞に導入し、細胞周期を可視化できる実験システムの構築した。その後、実際に D-allose 50 mM を投与すると、細胞がスローサイクリングを生じることが明らかとなった。特に G1 期から S 期に移行する速度がゆっくりとなっていることが確認できた (右図の赤色から緑色)。



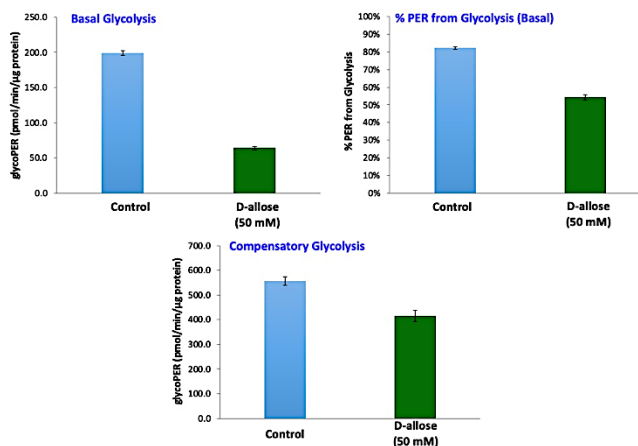
次に D-allose を投与後の細胞内への D-グルコースと D-allose 含有量を HPLC 法で測定した。その結果を右図に示すが、D-allose 50 mM を投与すると、細胞内 D-グルコース濃度は 30%ほど減少することが明らかとなった。この際、細胞内 D-allose 含有量も有意に増加していたことから、D-グルコースと D-allose は競合してグルコーストランスポーターなどを介して細胞内に取り込まれるのではないかと推測された。一方、主たるグルコーストランスポーターである GLUT1 の発現量には影響を与えなかった。



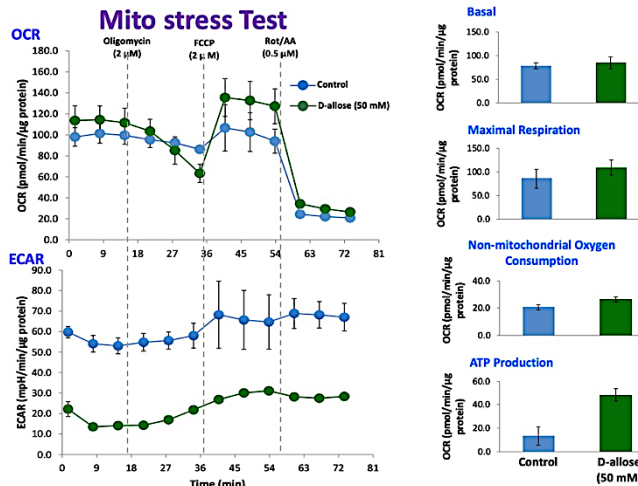
フラックスアナライザー (プライムテック社) を使用して、D-allose による解糖系とミトコンドリアの細胞内エネルギー代謝への影響を同定した。

右図に D-allose 50 mM を投与して 16 時間後の解糖系のデータのまとめを示す。D-allose を投与すると、解糖系、ならびに解糖予備能の有意な低下が示された。すなわち、グルコースが細胞内に取り込まれ、解糖系によって過剰なエネルギーが作られることが D-allose によって抑制できる可能性が示唆された。同様に D-allose 50 mM を投与して 16 時間後のミトコンドリアの細胞内エネルギー代謝への影響を解析した。その結果を右図に示すが、D-allose を細胞に投与すると、ミトコンドリアの代謝機能の活性化傾向が示され、ミトコンドリアによる ATP の産生は優位に増加することが示された。すなわち、D-allose は解糖系によるエネルギー産生を抑制するが、その代償としてミトコンドリア機能を活性化させ、ATP 産生を促すことが示された。

Glycolytic rate assay



Mito stress Test



一方、C57BL/6 マウスの老化モデルの実験については、高齢のオスのマウスが手に入らなかったため、9 週齢からの飼育となっており、現在も観察が続いている。

以上、本研究は、「細胞周期自体をゆっくり回すことができれば、老化が生じる時期を遅らせることができる」という、シンプルな発想に基づいて立案された。そもそも「細胞周期がゆっくり回る」といった現象自体が発見されたのも 21 世紀に入ってからであり、これを制御する因子も全く知られていない状況である。これに対して今回の研究によって、D-allose が「細胞スローサイクリング」を生じることが実証され、そのメカニズムの一部も明らかとなった。今後は老化の防止のみならず、様々な生活習慣病への未病対策や癌細胞の増殖抑制など、さらなる研究展開が必要であると考えられた。

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 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kitazaki Tomoya, Morimoto Yusuke, Yamashita So, Anabuki Daichi, Tahara Shiori, Nishiyama Akira, Wada Kenji, Ishimaru Ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Glucose emission spectra through mid-infrared passive spectroscopic imaging of the wrist for non-invasive glucose sensing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25161-x	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 Ishigaki Mika, Hitomi Hirofumi, Ozaki Yukihiro, Nishiyama Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Exposing intracellular molecular changes during the differentiation of human-induced pluripotent stem cells into erythropoietin-producing cells using Raman spectroscopy and imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24725-1	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 Rodriguez Ortiz Carlos J., Thorwald Max A., Rodriguez Ruben, Mejias Ortega Marina, Kieu Zanett, Maitra Neilabjo, Hawkins Charlesice, Valenzuela Joanna, Peng Marcus, Nishiyama Akira, Ortiz Rudy M., Kitazawa Masashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Angiotensin receptor blockade with olmesartan alleviates brain pathology in obese <scp>OLETF</scp> rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology	6. 最初と最後の頁 228 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1681.13738	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 Cornejo Manuel A., Jardines Eira, Nishiyama Akira, Nakano Daisuke, Ortiz Rudy M.	4. 巻 560
2. 論文標題 Simultaneous SGLT2 inhibition and caloric restriction improves insulin resistance and kidney function in OLETF rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111811 ~ 111811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2022.111811	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 Ogura Takahiro, Kitada Kento, Morisawa Norihiko, Fujisawa Yoshihide, Kidoguchi Satoshi, Nakano Daisuke, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu, Titze Jens, Nishiyama Akira	4. 巻 46
2. 論文標題 Contributions of renal water loss and skin water conservation to blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 32 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01044-6	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Hattori Mai, Rahman Asadur, Kidoguchi Satoshi, Jahan Nourin, Fujisawa Yoshihide, Morisawa Norihiko, Ohsaki Hiroyuki, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu, Hossain Akram, Steeve Akumwami, Nishiyama Akira	4. 巻 23
2. 論文標題 Association of Antihypertensive Effects of Esaxerenone with the Internal Sodium Balance in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8915 ~ 8915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23168915	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 Nishiyama Akira, Kitada Kento, Suzuki Miwa	4. 巻 102
2. 論文標題 Blood pressure adaptation in vertebrates: comparative biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 242 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2022.03.032	査読の有無 有
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 Kidoguchi Satoshi, Kitada Kento, Fujisawa Yoshihide, Nakano Daisuke, Yokoo Takashi, Titze Jens, Nishiyama Akira	4. 巻 149
2. 論文標題 Tolvaptan induces body fluid loss and subsequent water conservation in normal rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 115 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.04.008	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 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nishiyama A.
2. 発表標題 New salt concept and significance of MR inhibition
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishiyama A.
2. 発表標題 Onco-Hypertension.
3. 学会等名 International SHR meeting 2022. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞増殖遅延剤、それを含む化粧品、及び細胞増殖を遅延させる方法	発明者 西山成	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-004569	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

香川大学医学部薬理学ホームページ http://www.kms.ac.jp/%7Eyakuri/

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