

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689038

研究課題名(和文) 老化および糖尿病発症におけるC1q誘導性Wntシグナルの果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of C1q and Wnt signaling in aging and diabetes

研究代表者

内藤 篤彦(Naito, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10588891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円、(間接経費) 5,790,000円

研究成果の概要(和文)：老化に伴い心不全や糖尿病などの老化関連疾患の発症率が増加するが、老化および老化関連疾患の病態生理に関わる分子機構は明らかになっていない。本研究で我々は、病原体から身を守るために重要な役割を果たしている補体分子が、加齢に伴って身体の中で増加し、Wntシグナルを活性化することで骨格筋の再生能を低下させることを見出した。また、肥満・加齢に伴う糖尿病発症にもC1q増加が関係している可能性を見出した。さらに圧負荷による心不全発症にも補体分子が重要である可能性や、心臓でのWntシグナル活性化が心不全の原因となっている可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Aging is associated with various diseases, including diabetes mellitus and heart failure. However, the molecular mechanism of aging is not known yet. In the present study, we identified that complement C1q, which plays an important role in immune system, increases with advancing age and plays a pivotal role in aging and in the pathophysiology of various 'aging-associated disorders'. Complement C1q impairs skeletal muscle regeneration through activation of Wnt signaling and inhibition of C1q-induced Wnt signaling activation recovered the regenerative capacity of the aged mice. Elevation of C1q is also observed in obesity- and aging-induced diabetes, and may play causative role in pathogenesis of diabetes. We also identified that C1q expression is increased during heart failure and that cardiomyocyte-specific and endothelial cell-specific Wnt signaling activation leads to progressive cardiac dysfunction and heart failure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老化 Wntシグナル 心不全 糖尿病 C1q

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化および様々な病態の基盤としての慢性炎症

老化は、生命の誕生から死までに全ての人類が経験する不可避の生命現象であり、加齢に伴う個体の生命機能の低下および死亡率の増加として定義づけられる。

我々には外来生物や非自己に対して免疫、炎症反応を起こすことで除去する防御機構が備わっているが、短期的には感染症に対抗するために不可欠なこの機構も、長期にわたり繰り返す外来生物の侵入に対抗するために恒常的に活性化されることで、加齢に伴う慢性炎症の原因となってしまう。加齢に伴う慢性炎症は、自己免疫疾患だけでなく、糖尿病、動脈硬化や癌といった疾患を引き起こすことで個体の生命機能の低下および死亡率の増加、すなわち老化の原因となっている。

また加齢による慢性炎症のみならず、飽食による高度肥満など現代人特有の慢性炎症状態も糖尿病、動脈硬化や癌などの疾患を引き起こすことが明らかとなっており、近年注目を集めている。

(2) Wnt シグナルと老化、慢性炎症関連疾患

若齢マウスと老齢マウスを結合させ体内の血液循環を共有させる実験より老化誘導物質が老齢マウス中には存在し、その物質は Wnt シグナルを活性化させるということが報告されている。しかし古典的 Wnt タンパクは、疎水性が非常に強いため血中には存在し得ず、血中に存在する老化誘導物質は古典的 Wnt タンパク質ではないことが予想された。

研究代表者は既に、マクロファージから分泌される補体分子 C1q が老齢マウスの血中で増加し、Wnt シグナルを活性化させる老化誘導物質であることを同定した。また C1q は老齢マウスだけでなく 2 型糖尿病モデルマウスの血中でも増加していることを見出している。

これらの知見は、老化および慢性炎症関連疾患発症の分子的機構に血中に増加した C1q による Wnt シグナル活性化が関与している可能性、および C1q 誘導性 Wnt シグナルを標的とした老化および慢性炎症関連疾患に対する新たな予防・治療戦略の可能性を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

研究代表者は老齢マウスの血中で増加した補体分子 C1q が Wnt シグナルを活性化することで老齢マウスにおける老化、すなわち骨格筋の再生能低下と線維化促進を引き起こすこと、

老化および糖尿病モデルマウスでは血中 C1q が増加し、老齢マウスでは C1q 増加により全身の、糖尿病モデルマウスでは脂肪組織の Wnt シグナル活性化がおこなわれていることを見出している。また、研究代表者はこれまで、幹細胞の心筋細胞への分化において Wnt シグナルが時期特異的に相反する作用を示し、Wnt シグナルの持続的な活性化が異常な幹細胞分化をもたらすことを世界に先駆けて明らかにしてきた。

そこで本研究では、

(1) C1q による組織幹細胞での Wnt シグナル活性化が老化において果たす役割の解明。

(2) C1q による脂肪組織での Wnt シグナル活性化が糖尿病において果たす役割の解明。

(3) C1q による Wnt シグナル活性化を特異的に阻害する手法の開発。

を行い、老化および慢性炎症関連疾患発症の新しい分子的機構を明らかにするとともに、老化および慢性炎症関連疾患に対する新たな予防・治療戦略の基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) 老化における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の分子的機構の解明

① 補体分子 C1q による Wnt シグナル活性化メカニズムの解明

補体分子 C1q による Wnt シグナル活性化機構について、下流の補体分子のタンパク分解活性に注目して解析を行った。

② C1q による Wnt シグナル活性化が老化表現型に与える影響の解明

補体分子 C1q による Wnt シグナル活性化が老化に与える影響を観察するため、骨格筋に対して凍結障害を加え、その後の再生能を評価した。

(2) 糖尿病における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の果たす役割の解明

① 肥満による糖尿病発症における役割

肥満による糖尿病発症における役割を解明するため、中枢系メラノコルチンシステム系の変異により肥満と耐糖能低下の表現型を示す Ay マウス (C57BL/6 バックグラウンド) と C1q ノックアウトマウスを交配し、得られたマウスに高脂肪食を負荷し糖尿病を誘発した。

② 加齢による糖尿病発症における役割

加齢による糖尿病発症における役割を解明するため、野生型マウス、C1q ノックアウトマウス、C3 ノックアウトマウスを長期飼育し、経時的に耐糖能の評価を行った。

(3) 心不全発症における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の果たす役割の解明

① 圧負荷モデルマウスにおける役割

横行大動脈を外科的に結紮し、心臓に対して持続的な圧負荷を加えることで心不全を

誘導するモデル (TAC モデル) を用い、C1q および Wnt シグナル活性化が果たす役割を解析した。

② Wnt シグナル活性化モデルマウスを用いた検討

心筋細胞や血管内皮特異的にタモキシフェン誘導性に Cre/LoxP 反応を引き起こすことが出来るマウスと、b-catenin 遺伝子の第三エクソンが LoxP 部位で挟まれたマウスを交配し、タモキシフェン誘導性に心筋細胞や血管内皮細胞で Wnt シグナルが活性化するモデルマウスを作成し、その表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 老化における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の分子的機構の解明

① 補体分子 C1q による Wnt シグナル活性化メカニズムの解明

研究開始時に既にマクロファージから分泌される補体分子 C1q が老齢マウスの血中で増加し、Wnt シグナルを活性化させる可能性を見出していたため、そのメカニズムを解明した。

補体分子 C1q は補体分子 C1r および C1s と C1 複合体を形成している。補体分子 C1r と C1s はタンパク分解酵素であり、C1q の活性化と連動して活性化を受け、古典的補体経路の下流に存在する補体分子 C2 や C4 を分解する。C1s の阻害剤や C1s に対する中和抗体が C1q による Wnt シグナル活性化は抑制された (図 1) ことから、C1r および C1s が C1q による Wnt シグナル活性化に必須であることが明らかになった。

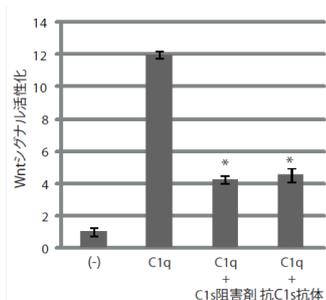


図 1. C1s を抑制することで C1q による Wnt シグナル活性化は阻害される。

C1s による切断を受け Wnt シグナルを活性化する分子として Wnt シグナルの共受容体である LRP5/6 が同定された。C1s によって切断を受ける部位に変異を入れた LRP6 を強制発現することで C1q による Wnt シグナル活性化が抑制される一方で切断部位より N 末端側を欠く LRP6 は Wnt シグナルを恒常的に活性化することから、C1q は C1s を介した LRP6 の切断を介して Wnt シグナルを活性化することが明らかになった。

② C1q による Wnt シグナル活性化が老化表現型に与える影響の解明

加齢に伴う老化表現型として、様々な臓器の再生能低下が挙げられる。例えば、骨格筋

に対して凍結障害を加えると、加齢マウスでは若齢マウスと比べて強い線維化と骨格筋の再生能低下が観察される。

若齢マウスに対して凍結障害を加えた後に C1q を含むゲルを注入したところ、障害を受けた骨格筋において強く Wnt シグナルが活性化し、若齢マウスでも線維化と骨格筋再生能低下が観察された (図 2)。

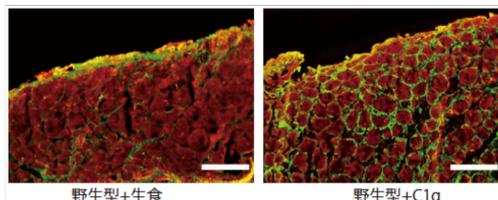


図 2. C1q を投与することで若齢マウスの骨格筋再生能が低下する。(緑: 線維化、赤: 再生した骨格筋)

一方、加齢マウスに対して凍結障害を加えた後に C1s に対する中和抗体を含むゲルを注入したところ、障害を受けた骨格筋における Wnt シグナル活性化と線維化が抑制され、骨格筋再生能が回復した。

(2) 糖尿病における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の果たす役割の解明

① 肥満による糖尿病発症における役割

肥満による糖尿病発症における役割を解明するため、中枢系メラノコルチンシステム系の変異により肥満と耐糖能低下の表現型を示す Ay マウス (C57BL/6 バックグラウンド) と C1q ノックアウトマウスおよび C3 ノックアウトマウスを交配し、得られたマウスに高脂肪高シヨ糖食を負荷し糖尿病を誘発した。

Ay マウスに高脂肪高シヨ糖を負荷したところ、経時的に血中の C1q 濃度は上昇した (図 3)。

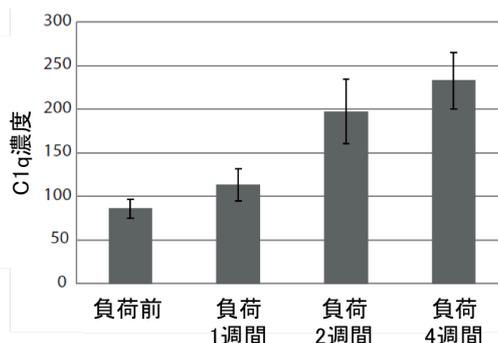


図 3. Ay マウスに高脂肪高シヨ糖食を負荷することで血中 C1q 濃度は増加する。

Ay マウスと C1q ノックアウトマウスおよび C3 ノックアウトマウスを交配し、得られたマウスに対して経口グルコース負荷試験を実施したところ、Ay-C1q ノックアウトマウスでのみ耐糖能異常の出現が穏やかであることが確認された (図 4)。

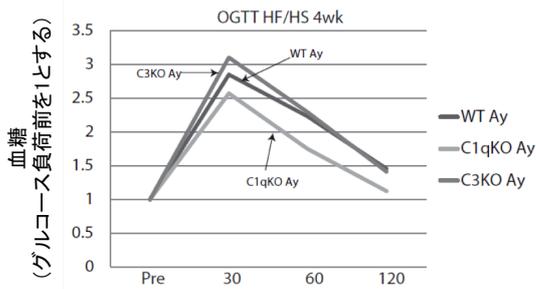


図4. C1qノックアウトマウスは肥満による耐糖能異常が出現しにくい
4週間脂肪高シヨ糖食を负荷した後に経口グルコース负荷試験を実施した。

② 加齢による糖尿病発症における役割

野生型マウス、C1q ノックアウトマウス、C3 ノックアウトマウスを長期飼育し、寿命および加齢に伴う糖尿病発症を観察した。C1q ノックアウトマウスと野生型マウスの寿命には有意差を認めなかったが、C3 ノックアウトマウスは有意に寿命が短縮した。野生型マウスでは加齢に伴い体重の増加率は減少するが、興味深いことにC1q ノックアウトマウスでは体重が増加し続けた。また、空腹時血糖については野生型マウス、C1q ノックアウトマウスおよび C3 ノックアウトマウスの間に変化は認められず、加齢に伴う耐糖能異常の出現にC1qは無関係であることが考えられた。一方、C1q ノックアウトマウスと野生型マウスの寿命に差はなかったものの、C1q ノックアウトマウスは C3 ノックアウトマウスと同様に補体系に異常があることが予想されることから、Wnt シグナル抑制の表現型が補体系の異常によって打ち消された可能性も考えられる。

(3) 心不全発症における補体分子 C1q および Wnt シグナル活性化の果たす役割の解明

① 圧负荷モデルマウスにおける役割

TAC モデルマウスでは心臓における C1q, C1r, C1s といった補体系遺伝子の発現や Wispl, Wisp2, Nkd1, Nkd2 といった Wnt シグナルの標的遺伝子の発現が増加しており、TAC 術後の持続的圧负荷が引き起す心不全に補体系遺伝子および Wnt シグナル活性化が何らかの役割を果たしていることが示された。

② Wnt シグナル活性化モデルマウスを用いた検討

Wnt シグナルの活性化と心不全発症の因果関係を解析するため、心筋細胞および血管内皮細胞特異的にタモキシフェン誘導性に Wnt シグナルを活性化することができる遺伝子改変マウスを作成したところ、いずれのマウスでも進行性の心機能低下および心不全による死亡が観察されたことから、Wnt シグナルの活性化が心不全の原因となっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

英文論文

1. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res.* 2014 Jan 31;114(3):565-71. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300507. 査読有り
2. Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2013 Oct;36(10):859-65. Doi: 10.1038/hr.2013.52. 査読有り
3. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell.* 2012 Jun 8;149(6):1298-313. Doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047. 査読有り
4. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer M, Komuro I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. *Hypertension.* 2012 Mar;59(3):627-33. Doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175208. Epub 2012 Jan 30. 査読有り
5. Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, Naito AT, Murata A, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Increase of sensitivity to mechanical stimulus after transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in a rat spinal cord injury model. *J Neurosurg Spine.* 2011 Dec;15(6):582-93. Doi:10.3171/2011.7.SPINE10775. 査読

有り

和文論文

1. 内藤篤彦 Wnt シグナルと心臓の生老病死 心臓 2014 46:290-295 査読無し
2. 内藤篤彦 補体分子 Clq と心血管疾患 血管医学 2013 14:87(427)-93(433) 査読無し
3. Naito AT, Komuro I. [Chronic inflammation and organismal aging]. Clin Calcium. 2013 Jan;23(1):51-8. Doi: CliCal3015158 査読無し
4. 内藤篤彦 Wnt シグナルによる心臓・大血管発生の制御 心臓 2011 43:594-598 査読無し
5. 内藤篤彦、住田智一、小室一成 ヒト循環器疾患モデルとしての iPS 細胞の利用 再生医療 2011 10:204 査読無し

[学会発表] (計 12 件)

1. 内藤篤彦 Wnt シグナルと老化関連疾患 日本心血管内分泌代謝学会 2013 年 11 月 22 日-23 日 吹田市
2. Atsuhiko Naito. Wnt signaling in the Heart ~From the Cradle to the Grave~ 河口湖カンファレンス 2013 年 7 月 13 日-14 日 東京
3. 内藤篤彦 Wnt signaling in the Heart ~From the Cradle to the Grave~ 日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 日-6 日 神戸市
4. 内藤篤彦 心臓の生老病死における Wnt シグナルの役割 北海道カルディアックセミナー 2013 年 9 月 28 日 札幌市
5. Atsuhiko Naito. The role of Endothelial Wnt signaling on Cardiac function. International Society for Heart Research Jun 29-Jul 3 2013 San Diego, CA.
6. Katsuki Okada, Atsuhiko Naito, Issei Komuro. The Interaction of FoxO with β -catenin Contributes to Skeletal Muscle Myopathy. International Society for Heart Research Jun 29-Jul 3 2013 San Diego, CA.
7. 内藤篤彦 Wnt シグナルと老化関連疾患 脳心血管抗加齢研究会 2013 年 12 月 14 日-15 日 大阪市
8. 内藤篤彦 The Role of Complement Protein Clq in activation of Wnt signaling during aging. 日本臨床分子医学会 2012 年 4 月 13 日-14 日 京都市
9. 内藤篤彦 The role of complement protein Clq in activation of Wnt signaling during aging. 日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日-14 日 博多市

10. 内藤篤彦 補体 Clq は Wnt シグナル活性化を通じて老化を誘導する 日本薬理学会 2012 年 3 月 21 日-23 日 博多市
11. 内藤篤彦 Clq-induced Wnt signaling activation in arterial remodeling associated with hypertension. 血管生物医学会学術集会 2012 年 12 月 5 日-7 日 徳島市
12. 内藤篤彦 新規老化因子による Wnt シグナル活性化と血管リモデリング 日本高血圧学会総会 2012 年 9 月 20 日-22 日

[図書] (計 3 件)

1. 内藤篤彦 Annual Review 循環器 2013 中外医薬社 2013 年 285 ページ
2. 内藤篤彦 慢性炎症と生活習慣病 南山堂 2013 年 175 ページ
3. Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Novel Therapeutic Targets and Strategies against Myocardial Diseases. In Hill J, Willerson JT, Ryburn FM, Olson E, Welch RA (Eds.), *MUSCLE FUNDAMENTAL BIOLOGY AND MECHANISMS OF DISEASE* 2012:739-743. Elsevier Inc. (ISBN: 978-0-12-381510-1) 1528 ページ

[産業財産権]

該当無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 篤彦 (NAITO, Atsuhiko)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：10588891