

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590902

研究課題名(和文) 早老症(ウエルナー症候群)における炎症老化の解析

研究課題名(英文) Characterization of inflammageing in progeroid "Werner syndrome"

研究代表者

後藤 眞 (Goto, Makoto)

東京女子医科大学・医学部・その他

研究者番号：00170465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：微細な慢性炎症による老化機構(炎症老化)をサイトカインから解析した。代表的な炎症マーカーである、高感度CRPが、健常者では、加齢に従って有意に増加し、ウエルナー症候群では、年齢にかかわらず、健常者と比較して10倍ほど増加していた。同じ検体で、26種類の炎症に関与するサイトカインを同時測定すると、健常者では、加齢とともに、TH2系のサイトカイン(IL-4, 6, 13, 15, GM-CSF)の増加を認め、ウエルナー症候群でもほぼおなじように、TH2系のサイトカイン(IL-4, 6, 10, GM-CSF)の増加を認めた。炎症老化の背景因子が、健常者とウエルナー症候群で類似していることを発見できた。

研究成果の概要(英文)：Minor-inflammation driven "Inflammageing" was investigated by using 26-cytokine multiplex assay system in the sera from healthy volunteers aged between 0 and 100 and 41 patients with mutation-proven Werner syndrome. TH2 cytokine levels including IL-4, 6, 13, 15 and GM-CSF were significantly elevated with healthy ageing. In the patients with Werner syndrome, TH2 cytokine levels including IL-4, 6, 10 and GM-CSF were significantly elevated compared with age sex-matched healthy counterpart, although age-associated elevation of TH2 cytokines was not observed. Inflammageing may be a common deriving force to accelerate ageing both in healthy ageing and Werner syndrome.

研究分野：老化学、免疫学

キーワード：炎症老化 炎症 老化 サイトカイン CRP ウエルナー症候群 ケモカイン 早老症

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで 40 年以上にわたって、加齢に及ぼす、遺伝、炎症、免疫につき、1 歳から 100 歳までの健康日本人と、ヒト老化の自然モデルとして研究されてきた遺伝性早老症である、ウエルナー症候群を用いて、広範な研究を継続してきた。また、ヒト加齢を推進する機構として、多くの仮説が提出され、研究されてきたが、最近では、微細慢性炎症の寄与が、炎症老化 (Inflammaging) として、広く支持されるようになっており、研究代表者らは、すでに、217 名の健康日本人の血清で、微細慢性炎症のよいマーカーとされる高感度 CRP が、加齢に従って有意に増加することを見出し、41 名の遺伝性早老症のウエルナー症候群でも、対照健常者と比べ、有意に増加していることを報告してきた (M. Goto et al. Exp Gerontol 47:936,2012)。しかし、細かい機序については、不明な点が多く残されており、解析が待たれている。

### 2. 研究の目的

高感度 CRP で示される有意に増加した炎症が、どのような免疫学的機序を背景に起きているのか、サイトカイン/ケモカインの同時測定から解析を行った。また、他の代表的な加齢マーカーとして考えられている MMP(matrix metalloproteinase)-9 濃度の測定も、同時に併行してすべての検体でおこなった。

### 3. 研究の方法

少量の血清を用いて、26 種類のサイトカイン/ケモカイン (IL-1, IL-2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, basic FGF, G-CSF, GM-CSF, PDGF, VEGF, TNF, IL-1receptor antagonist, IFN, IP-10, MCP-1, MIP-1, MIP-1, eotaxin を同時測定可能な BioPlex microarray assay system を用い、25 歳から 100 歳まで、113 名の健康人血清と、wrn 遺伝子変異がはっきりした 32 歳から 70 歳までの 35 名のウエルナー症候群の血清を解析した。MMP9 の測定は、ELISA で行った。統計解析は、非線形相関を統計専門家に依頼して行った。

### 4. 研究成果

健康人では、1 歳から 100 歳までの加齢に伴って、IL-4, 6, 13, 15, GM-CSF, IFN, IP-10, TNF が有意に増加し、一方、IL-2, 8, MIP-1 は、有意に低下した。高感度 CRP と有意に相関するサイトカイン/ケモカインは、IL-6, 13, 15, IP-10 で、IL-8, MIP-1 は有意に逆相関した。さらに、加齢と高感度 CRP を加味して、有意に相関したのは、IL-6 と IL-13 のみであった。ウエルナー症候群では、加齢と関連して有意に変化するサイトカイン/ケモカインは、無かったが、健康人対照群と比較して、Th1 産物である IL-2, 12, TNF, IFN, Th2 産物である IL-4, 6, 10, GM-CSF, 単球・マクロファージ産物である MCP-1,

basicFGF, G-CSF が有意に増加していた。また、増加していた高感度 CRP と年齢を加味して有意に相関したのは、IL-6, 12, VEGF であった。

ウエルナー症候群では、糖尿病、皮膚潰瘍など、炎症を惹起する症状があり、健康人加齢とやや異なるサイトカイン/ケモカイン変化が認められるが、健康人、ウエルナー症候群ともに、基本的には、Th1 から Th2 への偏移という共通の変化が認められた。

健康人では、hsCRP と同じように、1 歳から 100 歳まで加齢に従って、有意に増加した。日本人の血中 hsCRP, MMP9 濃度は、欧米人データと比較すると、すべての年代で、ほぼ 1 / 10 程度と低値だった。ウエルナー症候群では、健康などの年代と比較しても、有意差は認められず、加齢とは、有意な逆相関が認められた。

代表的な炎症のマーカーで検討すると、健康人加齢と早老症ウエルナー症候群では、異なった動きを示すことが分かった。

現在、健康人とウエルナー症候群で、MMP9 と相関する 26 種類のサイトカイン/ケモカインの統計解析を行っている。

Ageing is tightly associated with minor and life-long environmental insults, leading to a chronic and systemic inflammation named "inflammaging". We reported the healthy ageing-associated elevation of highly sensitive CRP (hsCRP) in Japanese individuals aged between 1 and 100 years and the patients with Werner syndrome in the previous paper. To further study the association of ageing, hsCRP and 26 cytokines/chemokines, a multiple cytokine array system was used in the same serum samples as were examined for hsCRP from 113 healthy Japanese adults and 35 patients with mutation-proven Werner syndrome.

(1) Th2 cytokines (IL-4, 6, 13 and GM-CSF), IL-15, IP-10, and Th1 cytokines (IFN and TNF) were significantly associated with normal ageing. IL-2, 8, and MIP-1 were significantly negatively associated with normal ageing.

(2) Elevated hsCRP level was significantly associated with IL-6, 13, 15 and IP-10, while IL-8 and MIP-1 were negatively associated with hsCRP. Both IL-6 and 13 were significantly associated with serum level of hsCRP, if age and sex were taken into account.

(3) Th2 cytokines (IL-4, 6, 10 and GM-CSF), Th1 cytokines (IL-2, 12, TNF and IFN) and monocyte/macrophage

products(MCP-1, basic FGF and G-CSF) were significantly elevated compared with normal ageing.

(4) Elevated hsCRP level was significantly correlated with IL-6, 12 and VEGF levels, if age sex were taken into account.

(5) A pro-inflammatory cytokine/chemokine circuit-stimulated immunological shift to Th2 in Werner syndrome was similar to normal ageing.

(6) Another possible ageing biomarker: matrix metalloproteinase-9 (MMP9) was examined in the same sera from 217 normal Japanese individuals aged between 1 and 100 years and 41 mutation-proven Werner syndrome aged 32 and 70 years. The serum level of MMP9 was elevated significantly with normal ageing from both sexes as hsCRP.

(7) In contrast to normal ageing, the serum MMP9 level in Werner syndrome decreased significantly with calendar age. The MMP9 level in Werner syndrome was not significantly different in comparison with those from age-matched normal adult population aged between 25 and 70 years, nor normal elderly population aged between 71 and 100 years.

(8) Although both normal ageing and Werner syndrome were associated with monor inflammation, the inflammatory parameters such as MMP9 and hsCRP changed differently between normal ageing and Werner syndrome. The Werner syndrome-specific chronic inflammation including skin ulcer and diabetes mellitus may contribute the different behavior of both ageing biomarkers from normal ageing.

(9) Association of MMP9 level and 26 cytokines/chemokines has been under an extensive evaluation by the colleague statistician both in normal ageing and Werner syndrome.

#### 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6件)

1. Goto M, Chiba J, Matsuura M, Iwaki-Egawa, Watanabe Y.  
Inflammageing assessed by MMP9 in normal Japanese individuals and the patients with Werner syndrome.

J Intract Rare Dis Res (査読有)5:103-108,2016

2. Goto M, Hayata K, Chiba J, Matsuura M, Iwaki-Egawa S, Watanabe Y.  
Multiplex cytokine analysis of Werner syndrome.

J Intract Rare Dis Res (査読有)4:190-197,2015

3. Sadahira Y, Sugihara T, Fujiwara H, Nishimura H, Suetsugu Y, Takeshita M, Okamura S, Goto M.

WRN protein as a novel erythroblast immunohistochemical marker with applications for the diagnosis of Werner syndrome.

Virch Arch (査読有)466:343-350,2015

4. Goto M, Hayata K, Chiba J, Matsuura M, Iwaki-Egawa S, Watanabe Y.

Ageing-associated Inflammageing: multiplex cytokine analysis of healthy Japanese individuals.

Jacob J Gerontol(査読有) 1:10-17,2015

5. Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu H, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H.

Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture.

PlosOne(査読有) 9:e12900,2014.

6. Motegi S, Yokoyama Y, Uchiyama A, Ogino S, Takeuchi Y, Yamada K, Hattori T, hashizume H, Ishikawa Y, Goto M, Ishikawa O.

First Japanese case of atypical progeroid syndrome/atypical Werner syndrome with heterozygous LANA mutation.

J Dermatol (査読有)41:1-6,2014.

[学会発表](計3件)

1. Goto M (発表者). K.Hayata, J.Chiba, M.Matsuura, S.Iwaki-Egawa, Y. Watanabe.

Multiplex cytokine analysis of Inflammageing in normal individuals and Werner syndrome.

Ageing 2016 (London:England) 2016.02.

2. Goto M (発表者). K. Hayata, J. Chiba, M. Matsuura.

Multiplex cytokine/chemokine analysis of ageing-associated inflammation in healthy

Japanese individuals.  
World Congress of Gerontology and Geriatrics 3<sup>rd</sup> International Conference on Healthy ageing in the changing world 2014(Bangalore:India) 2014.11.

3. Goto M(発表者).  
Inflammageing associated cytokine/chemokine changes in healthy Japanese population.  
BIT's 2<sup>nd</sup> Annual World Congress of Geriatrics and Gerontology 2014(Taiyuan: China) 2014.10.

〔図書〕(計 1件)  
老けない人になる 36 の習慣 後藤眞 中経  
出版 2015

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
後藤 眞(Goto, Makoto)  
東京女子医科大学・医学部・研究生  
研究者番号：00170465