

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659181

研究課題名(和文) 老化に伴う疾患の発症及び進行を抑制する物質の単離とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Development of a bioassay system to screen anti-aging chemicals and characterization of candidate molecules

研究代表者

千葉 卓哉 (CHIBA, Takuya)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞およびマウスをもちいた抗老化物質探索系の構築と実験系の評価、および抗老化状態と関連する細胞内シグナル伝達系の解析を行った。細胞、およびマウスをもちいた両方の実験系において、複数の既存物質を添加、または投与することによって、抗老化と関連した代謝状態を模倣できる可能性が示唆された。これらの結果から、構築した実験系が有効に機能することが示唆され、さらに抗老化状態と関連する細胞内シグナル伝達系の一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify the intracellular signaling pathways and develop a system to screen anti-aging chemicals both in vitro and in vivo. We found that one of the synthesized sequences of identified motifs bound to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). When the reporter construct, containing an element upstream of a secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene, was co-transfected with HNF-4 and its regulator peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 (PGC-1), activity of SEAP was increased dose-dependently in comparison to untransfected controls. Moreover, transgenic mice established using this construct showed increased SEAP activity both in calorie restriction (CR) and candidate chemical-fed mice in comparison to ad libitum fed mice. Interestingly, oxidative stress resistance was correlated with SEAP activity of these transgenic mice. These data suggest that our bioassay would be useful to screen for CR mimetic photochemical both in vitro and in vivo.

研究分野：加齢医学・実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：老化 トランスジェニックマウス 機能性食品 ガン 臓器関連 メタボリックシンドローム カロリー制限 転写因子

1. 研究開始当初の背景

ガンや生活習慣病、神経変性疾患などの発症リスクに「老化」が含まれている。したがって、老化を制御することが可能となれば、これらの疾患の発症を遅延、または抑制することが可能となる。酵母や線虫などの下等生物では、インスリンシグナル系の分子機能を改変することで老化の制御が可能となっている。

哺乳類を含む多くの生物種において、食餌カロリーを制限することは、寿命を延長させるとともに、老化関連疾患の発症を遅延させる確実な方法として知られている。カロリー制限による抗老化作用にも、インスリンシグナル系の関与が示唆されていることから、このシグナルを標的とした高等生物における老化制御機構の解明が、現在世界中で盛んに行われている。それらの研究の多くは不老不死を目指した夢物語ではなく、老化疾患改善薬の開発を目指したものである。

米国の一部のベンチャー企業はすでに開発した薬剤を、ガンや糖尿病の治療薬として臨床試験を実施している。このような薬剤は純国産で開発できなければ、莫大な特許使用料等を他国に支払う必要性が生じ、我が国の医療費のさらなる増大を招く恐れがある。急激な速度で高齢化が進む我が国において、インスリンシグナル系による老化制御機構を明らかにし、その応用により、健康で活動的な人生の期間を延長させる方法を開発する、長寿科学の推進は、科学的のみならず社会的にも重要な喫緊の研究課題である。

2. 研究の目的

老化関連疾患を抑制する方法として、食餌カロリー制限とインスリンシグナルの抑制が知られている。しかし、その本態は不明である。申請者は、その本態に重要であると示唆される特異的 DNA 配列(cis-エレメント)を同定した。この配列に結合する転写因子は、抗老化に関わる遺伝子発現を調節する、情報統括の役割を果たしていると考えられる。本研究では、この配列の活性化の様子を分泌型レポーターアッセイシステムと組み合わせることで *in vitro* および *in vivo* において、リアルタイムでモニタリングできるシステムを構築する。さらに、これまでに同定されている機能性分子の老化疾患改善剤としての再評価、および化合物ライブラリーのスクリーニングによる新規物質(リード化合物)の単離を目指す。また、作用メカニズムの解明を通じて本実験系の科学的基盤を築くとともに、成果として得られたリソースは広く研究者に提供し、当該および関連研究領域の発展を期す。これらの研究を通してカロリー制限による抗老化作用に重要な細胞内シグナル伝達系の同定を目指す。

3. 研究の方法

我々が同定した、老化疾患の予防に関連す

る遺伝子の発現を一括して制御すると示唆される、転写因子が結合配列をもちいてレポーターアッセイ系を構築した。レポーターは、酵素反応によって検出が容易な分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP: secreted alkaline phosphatase)をもちいた。

In vitro 系においては2種類のマウス肝臓由来培養細胞(SV40 細胞および TLR2 細胞)をもちいて複数の構成的発現細胞株を樹立した。これらの細胞から定常状態でのレポーターの発現を指標としてそれぞれ1系統の細胞株を選択し、研究を行った。

in vivo 系においてはハイドロダイナミック法をもちいた一過性トランスジェニックマウスを作製し、レポーターの活性化を解析した。さらに、レポーターを構成的に発現するトランスジェニックマウスについても開発を行った。

トランスジェニックマウスをもちいた実験においては、酸化ストレスを発生させ、マウスに対して心筋症を発症させる薬剤であるドキシソルピシンに対する耐性亢進と投与した候補物質、およびカロリー制限との関連を解析した。

4. 研究成果

老化に伴って発症頻度が亢進する疾患に対する予防・治療効果をもつ物質を探索するレポーターアッセイ系の構築とそのシステムをもちいた候補物質のスクリーニング、および作用機序に関する解析を行った。培養細胞をもちいた *in vitro* 系においては、高脂血症に対する治療薬、およびその標的分子である核内受容体の活性化物質等をもちいてレポーターの発現を解析したところ、樹立した細胞がこれらの薬剤に反応してレポーター活性が上昇する可能性が示唆された。

一過性トランスジェニックマウスをもちいた *in vivo* 実験系により、カロリー制限を行った動物ではこのレポーターが活性化されることが確認された。このように、レポーターの有効性が示されたことから、構成的な遺伝子組換えマウスをもちいた *in vivo* 系を開発した。このマウスをもちいて自由摂食およびカロリー制限下でのレポーターの発現を解析したところ、カロリー制限を行ったマウスでは、導入されたレポーター遺伝子の発現活性が、自由摂食群のそれと比較して有意に上昇することが明らかとなった。次に高脂血症等の治療薬、および既存の機能性食品成分を餌に混ぜて投与した遺伝子組換えマウスにおけるレポーター活性を確認したところ、一部の成分においてレポーターの活性化が確認された。このレポーターの活性化と、酸化ストレスに対する抵抗性に正の相関が見られ、確立した実験系が *in vitro* および *in vivo* において老化疾患を改善する物質の探索に利用可能であることが示唆された。

細胞内シグナル伝達系の解析により、ストレス誘導後の心筋細胞の機能維持に重要な

分子の発現が、機能性成分の投与、およびカロリー制限を実施することによって維持されており、このことがストレス耐性と関連していることが示唆された。これらの成果を踏まえ、抗老化物質に対する応答性をさらに高めたレポーターコンストラクトを構築し、in vitro におけるスクリーニング系の開発を行うとともに、2つの異なるレポーター系を導入した細胞およびマウスの開発に着手した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Sci Rep.* 2014, 4:4517. doi: 10.1038/srep04517

千葉卓哉, 下川 功. カロリー制限模倣物老化・寿命のサイエンス. 今井眞一郎, 吉野 純編集. *実験医学* 31(20), 2013, pp.182-189.

Chiba T, Dong K, Nishizono S, Shimokawa I. Mechanisms of lifespan extension and preventive effects of calorie restriction on tumor development: Possible link between central neuroendocrine system and peripheral metabolic adaptation. *J Phys Fitness Sports Med.* 2013, 2(3): 259-266. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfs/2/3/2_259/_article

Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Narita T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age.* 2013, 35(4):1143-156. doi: 10.1007/s11357-012-9439-1.

〔学会発表〕(計 7 件)

千葉 卓哉: Neuropeptide Y は酸化ストレス耐性に関与しカロリー制限による寿命延長作用に重要である. 第8回臨床ストレス 応答学会大会, 2013年 11月 15日~16日, 松本.

Chiba T: Development of a reporter assay system to screen for chemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction. *IUNS 20th*

International Congress of Nutrition, September 14-20, 2013, Granada, Spain.

Chiba T: Development of a bioassay to screen for anti-aging phytochemicals. 2012 *International Society of Nutrition and Food Factor. Functional Foods congress, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements*, December 1-6, 2012, Kailua-kona, Hawaii.

Shimokawa I: Necessity of Neuropeptide Y for the Effect of Dietary Restriction in Mice. The 65th Annual Meeting of Gerontological Society of America. November 14-18, 2012, San Diego, USA.

Shimokawa I: The necessity of neuropeptide Y in the effect of dietary restriction in mice. *Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging*. October 22-27, 2012, Tokyo, Japan.

Chiba T: Disruption of neuropeptide Y gene limits stress resistance and lifespan extension effects of calorie restriction in mice. 10th *Euro Fed Lipid Congress*. September 23-26, 2012, Cracow, Poland.

Chiba T: CRISP: a mouse platform for anti-Aging drug screening. *International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka*, August 24-26, 2012, Fukuoka, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

Shimokawa I and Chiba T. Food and longevity genes, Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population. Edited by Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy. Elsevier Inc, pp. 61-70, 2013.

下川 功, 千葉卓哉, 森 亮一. サーチインと老化, 寿命. *レスベラトロールの基礎と応用*, 坪田 一男監修, シーエムシー出版. pp. 66-75, 2012.

〔その他〕

ホームページ等
研究者データベース
<http://www.f.waseda.jp/takuya/index.html>

研究室ホームページ
https://www.wnp7.waseda.jp/Rdb/app/ip/pi0211.html?lang_kbn=0&kensaku_no=6128

報道発表

日経産業新聞（2014年4月16日朝刊10面）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 卓哉 (CHIBA, Takuya)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152