

研究報告書

研究課題名：
老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 南野 徹

(研究期間: 2007年 10月 1日～ 2011年 3月 31日)

研究報告書

1. 研究課題名

老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明

2. 氏名

南野 徹

3. 研究のねらい

加齢に伴って、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率が増加し、その結果、虚血性心疾患や脳卒中の発症の基盤病態となっている。また加齢に伴い、認知症・神経変性疾患などの中枢性神経系疾患やがんなどもその有病率が増加し、現代の高齢化社会の大きな課題となっている。しかし、加齢がどのようにしてこれらの疾患を増加させるのかについては明らかとなっていない。一方、これらの病態は、多くの高齢者において共通に認められることから、老化の形質の一部としてとらえることができる。すなわち、次世代の加齢関連疾患に対する治療法の開発には、寿命・老化制御の分子基盤の探索も視野に入れた包括的な研究が必要であると考えられる。

通常ヒト正常体細胞は、ある一定回数の分裂増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。このような細胞の分裂寿命に重要な因子が、テロメアである。テロメアは、染色体の両端に存在し、その安定性に寄与するが、DNA複製が不完全であるため、細胞分裂とともに短縮する。ある一定の長さまで短縮したテロメアは、DNA損傷として認識され、p53依存性細胞老化シグナルの活性化によって、細胞は老化する(図1)。最近では、酸化ストレスや紫外線などのストレスによってDNA損傷が生じると、テロメアの短縮を伴わずに細胞が老化することが知られている(ストレス誘導性細胞老化)(図1)。老化した細胞が高齢者の皮膚へ集積することや、寿命の短い早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことなどが報告されていることから、加齢に伴って生じる組織における老化細胞の集積、あるいは、細胞老化シグナルの活性化が、寿命や加齢関連疾患の病態生理に関与する可能性がある。

実際、私はこのような仮説のもとに研究を進め、ヒト動脈硬化巣に老化した血管細胞が存在すること、テロメア短縮によるp53依存性細胞老化シグナルの活性化が加齢に伴う血管老化の病態生理に関与していることなどを報告してきた。

また、生活習慣病において認

められる高インスリン血症や高血糖、アンジオテンシン II の活性化が、テロメア非依存性にp53細胞老化シグナルを活性化し、血管細胞を老化させることによって動脈硬化を促進していることを、マウスモデルによって明らかにし、これらのマウスにおいてp53依存性の細胞老化シグナル活性化を抑制すると、動脈硬化の進展を制御できることなども報告した。さらに、加齢や心負荷に伴って心臓におけるp53依存性細胞老化シグナルが活性化され、心不全の発症・進展を促進していることなども明らかにした。以上のように、加齢や生活習慣に伴う様々なストレスが、細胞老化シグナルを活性化することによって、寿命や加齢関連疾患の病態に関与していることが予想される。そこで本研究では、細胞老化シグナルによって制御される加齢関連疾患の病態生理を解明し、次世代の治療法を開発することを目指した。

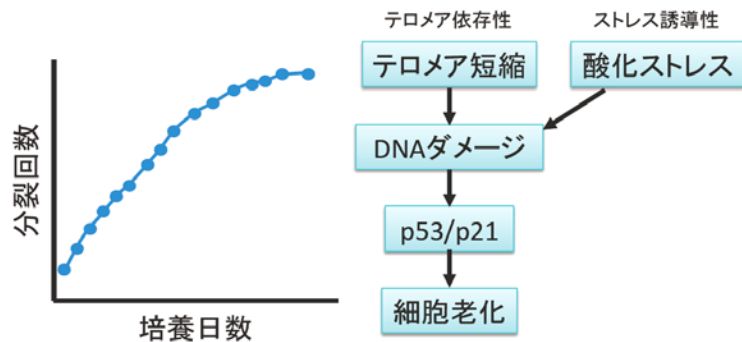


図1 細胞老化のメカニズム

4. 研究成果

近年、循環器疾患の発症基盤として、糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患が重要視されている。これらの疾患では、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と、それによって惹起されるインスリン抵抗性とその病態の基盤にあると考えられている。しかし、蓄積した内臓脂肪がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するのか、また、加齢に伴ってこれらの疾患が増えるのはなぜかといったことについては明らかとなっていない。一方、糖尿病患者ではテロメアの短縮が亢進していることが報告されており、細胞老化シグナルと糖尿病の発症の関連性が示唆されている。そこで私は、p53 依存性の細胞老化シグナルと糖尿病の関係について検討した。

4-1 2 型糖尿病の脂肪組織における老化シグナル

過食により脂肪組織に特異的に酸化ストレスが増加することが知られている。そこで、2 型糖尿病モデルマウス (Ay マウス) の脂肪組織の老化形質について調べてみることにした。その結果、糖尿病マウスの脂肪組織では細胞老化染色 (Senescence-associated β -galactosidase 染色) に陽性の老化細胞が多数存在することがわかった (図 2)。また、老化分子 p53 や p21 の発現を調べてみると増加していたことから、2 型糖尿病マウスの脂肪組織は老化形質を示しているものと考えられた (図 2)。これらの老化形質に伴って、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が増加していた。また、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では脂肪細胞分画、間質細胞分画のいずれにおいても p53 の蓄積と、悪玉アディポカインの産生を認め、炎症の惹起には脂肪細胞、脂肪組織のマクロファージ両者が老化形質を獲得することが関与していると考えられた。

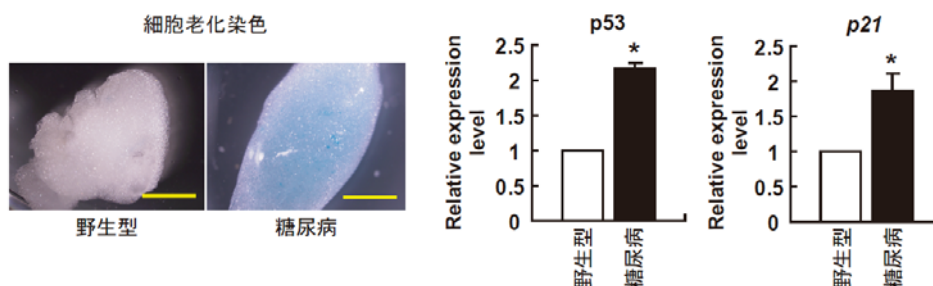


図 2 糖尿病マウスの脂肪老化

次に、p53 の役割を調べるために、p53 を欠損した糖尿病マウス (p53KO 糖尿病モデル) を作成した。その結果、このマウスでは脂肪組織の老化が抑制され、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が抑制されていた。これらに伴って、インスリン抵抗性や耐糖能異常が改善していたことから、p53 が糖尿病モデルマウスの脂肪組織の老化や炎症を制御している key molecule であると考えられた。

より生理的な肥満モデルにおいて検証するために、高脂肪高蔗糖食負荷マウスの脂肪組織を調べたところ、やはり p53 の蓄積と悪玉アディポカインの産生を認め、老化形質を獲得していた。また、脂肪組織特異的に p53 を欠損させたマウスに高脂肪高蔗糖食を負荷したところ、脂肪組織の老化形質とそれに伴う炎症が著明に改善し、全身のインスリン抵抗性も改善したことより、脂肪組織における p53 依存性

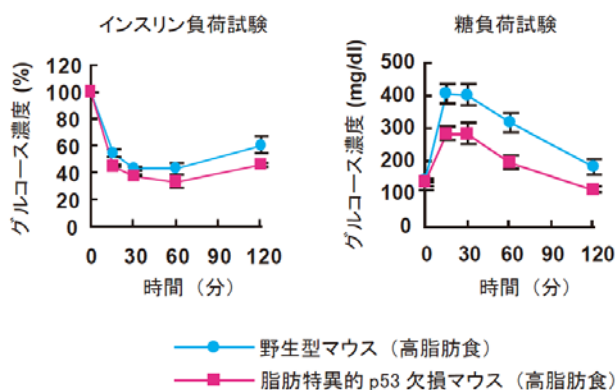


図 3 脂肪特異的 p53 欠損マウス

老化シグナルがインスリン抵抗性を制御しているものと考えられた(図 3)。

さらに、脂肪組織における p53 の役割についてさらに検証するために、我々は脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスを作成した。脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスの脂肪組織では悪玉アディポカインの産生を認め、炎症が惹起されていた。またこのマウスでは全身のインスリン感受性が低下していた。以上より、糖尿病の脂肪組織では p53 が活性化されることによって悪玉アディポカインの産生が増加し、全身のインスリン感受性を低下させていると考えられた。

4-2 脂肪組織における老化シグナルの活性化とインスリン抵抗性

次に私は、脂肪組織の老化を促進させた際の表現系を解析することにした。染色体の DNA 末端はテロメア構造により保護され、テロメアの伸長はテロメラーゼという酵素によって行われているが、ほとんどの細胞でテロメラーゼの量が不十分なため、細胞分裂のたびにテロメアが徐々に短縮することが知られている。そこで私は、全身でテロメラーゼを欠損したマウスを解析に用いることにした。マウスのテロメア長は長いため、テロメラーゼ欠損マウスを 4 世代経代させたマウス(G4 マウス)を実際の解析に用いたところ、G4 マウスでは脂肪細胞のテロメア長が短縮することを確認することができた。

G4 マウスの脂肪組織では、老化染色陽性細胞を多数認め、p53 の蓄積を伴い、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が亢進していた。G4 マウスに高脂肪高蔗糖食負荷を行うと、全身のインスリン抵抗性が惹起され、肝臓、骨格筋においてインスリン抵抗性が惹起されていた(図 4)。

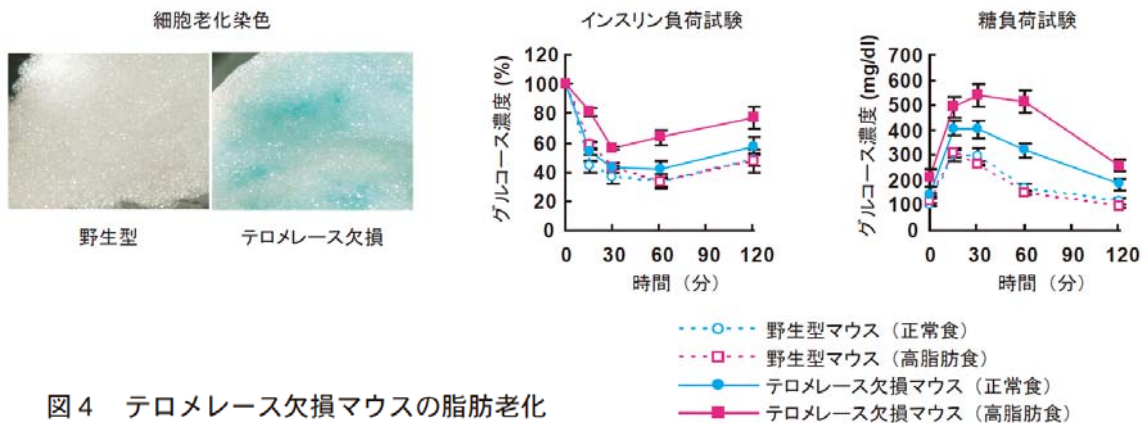


図 4 テロメラーゼ欠損マウスの脂肪老化

G4 マウスにおける脂肪の老化の役割を検討するため、G4 マウス(ドナー)の脂肪を野生型マウス(レシピエント)へ移植するという実験を行った。その結果、老化した脂肪を移植されたレシピエントマウスでは全身のインスリン抵抗性が惹起されるのに対して、老化した脂肪を摘出された G4 ドナーマウスでは全身のインスリン抵抗性が改善することがわかった。次に、p53 ヘテロ欠損 G4 マウスの脂肪を野生型マウスに移植したところ、G4 マウスの脂肪を移植された野生型マウスと比較して、相対的な改善を認めた。以上より、テロメアの短縮モデルにおいても、p53 依存性の老化シグナルにより、脂肪組織において炎症が惹起され、全身のインスリン抵抗性が生じるものと考えられた。

4-3 脂肪組織の老化シグナル活性化の機序

次に私は、脂肪組織において、p53 が蓄積する機序について検証した。以前報告されているように、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では活性酸素の産生が亢進していることが観察された。酸化ストレスは DNA 損傷を惹起することによって、細胞老化を誘導することが知られている。そこで、DNA 傷害の指標である γ -H2AX について検討したところ、G4 マウスと同様に、糖尿病モデルマウスの脂肪組織においても γ -H2AX が増加していた。さらに酸化ストレスと

p53、炎症の関連性を調べるために、脂肪前駆細胞を用いて検討した。脂肪前駆細胞を過酸化水素で処理すると、p53 の蓄積と活性化とともに、NF- κ B 活性の増加がみとめられた。酸化ストレスによる NF- κ B の活性化は、p53 の siRNA によって抑制されたことから、p53 依存性であることがわかった。過酸化水素処理により悪玉アディポカインの産生の増加も生じるが、その増加は、p53 や NF- κ B 活性の抑制によって改善した。以上より糖尿病では、脂肪組織で産生される活性酸素により DNA 傷害が生じ、p53 依存的な老化シグナルの活性化により、NF- κ B を介して悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン感受性が低下するものと考えられた。

4-4 糖尿病患者の脂肪組織の老化形質

ヒトにおいて、同様の機序が存在するかどうかを調べるために、私は糖尿病患者の脂肪組織の老化形質を検討した。千葉大学医学部附属病院において胃癌、大腸癌患者の手術に際して摘出される内臓脂肪を解析したところ、糖尿病を合併した脂肪組織では老化染色陽性細胞を複数認め、p53 が蓄積し、悪玉アディポカインの産生の増加を認めた。以上より、ヒトの脂肪組織においても p53 依存性の老化シグナルが活性化され、糖尿病の発症・進展に密接に関わっている可能性が示唆された。

5. 今後の展開

本研究により、加齢や過食による脂肪組織の p53 依存性老化シグナル活性化によって、悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン抵抗性が惹起されることが明らかとなった(図 5)。これらの結果は、加齢に伴って増加する生活習慣病の発症機転を探る糸口となると思われる。また、脂肪組織の老化シグナルを標的とした治療方法を開発することで脂肪の老化を制御し、糖尿病の新たな治療法につながる可能性があると考えられる。

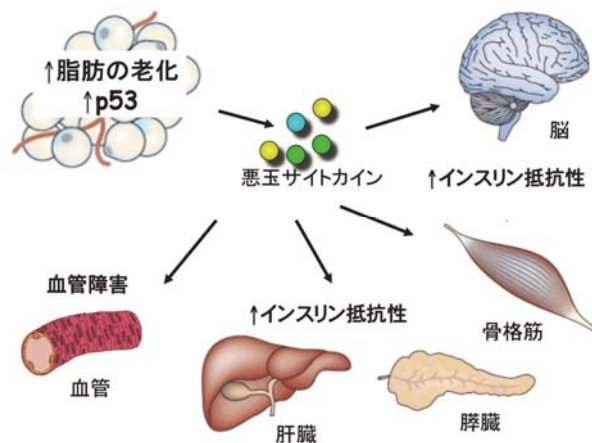


図 5 脂肪老化とインスリン抵抗性

p53 はがん抑制遺伝子として有名であるが、そのシグナルの過剰な活性化は、細胞老化を促進することによって、加齢に伴う様々な疾患に関与する。一方、その活性を過剰に抑制するとがんの発症を招くことになる。多くの病態では、p53 依存性の老化シグナルによって炎症を惹起することが病態生理に直接関与していることから、そのような慢性炎症を惹起するメカニズムの解明によってがん化のリスクない抗老化治療の開発が可能と考えられる。

下等動物の老化研究において、脂肪における長寿シグナルの活性化が全身の老化シグナルに影響を与えることによって、寿命の延長をもたらすことが知られている。従って、私の研究結果は、脂肪における p53 の活性化が非細胞自律性に他の組織の老化シグナルに影響を与えることによって、個体の寿命にも影響を与える可能性があることを示唆している。したがって、脂肪の老化シグナル制御によって、糖尿病だけでなく、個体の老化を制御できるかもしれない。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tohru Minamino, Issei Komuro, Role of telomeres in vascular senescence, Front. Biosci., vol. 13, 2971-2979 (2008)

2. Takeshige Kunieda, Tohru Minamino, Kentaro Miura, Taro Katsuno, Kaoru Tateno, Hideyuki Miyauchi, Shuichi Kaneko, Christopher A. Bradfield, Garret A. FitzGerald, Issei Komuro, Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity, *Circ. Res.*, vol. 102, 607–614 (2008)
3. Jun-ichiro Nishi, Tohru Minamino, Hideyuki Miyauchi, Aika Nojima, Kaoru Tateno, Sho Okada, Masayuki Orimo, Junji Moriya, Guo-Hua Fong, Kenji Sunagawa, Masabumi Shibuya, Issei Komuro, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Regulates Postnatal Angiogenesis Through Inhibition of the Excessive Activation of Akt, *Circ. Res.*, vol. 103, 261–268 (2008)
4. Haruhiro Toko, Tohru Minamino, Issei Komuro, Role of heat shock transcriptional factor 1 and heat shock proteins in cardiac hypertrophy, *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 18, 88–93 (2008)
5. Masayuki Orimo, Tohru Minamino, Hideyuki Miyauchi, Kaoru Tateno, Sho Okada, Junji Moriya, Issei Komuro, Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, 889–894 (2009)
6. Yosuke Kayama, Tohru Minamino, Haruhiro Toko, Masaya Sakamoto, Ippei Shimizu, Hidehisa Takahashi, Sho Okada, Kaoru Tateno, Junji Moriya, Masataka Yokoyama, Aika Nojima, Michihiro Yoshimura, Kensuke Egashira, Hiroyuki Aburatani, Issei Komuro, Cardiac 12/15-lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure, *J. Exp. Med.*, vol. 206, 1565–1574 (2009)
7. Tohru Minamino, Masayuki Orimo, Ippei Shimizu, Takeshige Kunieda, Masataka Yokoyama, Takashi Ito, Aika Nojima, Akira Nabetani, Yuichi Oike, Hisahiro Matsubara, Fuyuki Ishikawa, Issei Komuro, A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance, *Nature Medicine*, vol. 15, 1082–1087 (2009)
8. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I, Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis, *Circulation Research*, vol. 106, 391–398 (2010)
9. Ippei Shimizu, Tohru Minamino, Haruhiro Toko, Sho Okada, Hiroyuki Ikeda, Noritaka Yasuda, Kaoru Tateno, Junji Moriya, Masataka Yokoyama, Aika Nojima, Gou Young Koh, Hiroshi Akazawa, Ichiro Shiojima, C Ronald Kahn, E Dale Abel, Issei Komuro, Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents, *J. Clin. Invest.*, vol. 120, 1506–1514 (2010)
10. Haruhiro Toko, Hidehisa Takahashi, Yosuke Kayama, Sho Okada, Tohru Minamino, Fumio Terasaki, Yasushi Kitaura and Issei Komuro, ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 49, 113–20 (2010)
11. Atsuhiko T. Naito, Sho Okada, Tohru Minamino, Koji Iwanaga, Mei-Lan Liu, Tomokazu Sumida, Seitaro Nomura, Naruhiko Sahara, Tatsuya Mizoroki, Akihiko Takashima, Hiroshi Akazawa, Toshio Nagai, Ichiro Shiojima, Issei Komuro, Promotion of CHIP-Mediated p53 Degradation Protects the Heart From Ischemic Injury, *Circ. Res.*, vol. 106, 1692–1702 (2010)
12. Haruhiro Toko, Hidehisa Takahashi, Yosuke Kayama, Toru Oka, Tohru Minamino, Sho Okada, Sachio Morimoto, Dong-Yun Zhan, Fumio Terasaki, Mark E. Anderson, Masashi Inoue, Atsushi Yao, Ryoza Nagai, Yasushi Kitaura, Toshiyuki Sasaguri, Issei Komuro, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy, *Circulation*, vol. 122, 891–899 (2010)

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

1. 発明者:森谷純治、南野徹、小室一成、古閑比佐志、岡田光浩

発明の名称:虚血性心血管系疾患の治療剤(PlexinD1-Fc)

出願人:千葉大学

出願日:2008年11月7日

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. 南野徹、血管老化とアンジオテンシン II、日本高血圧学会(沖縄)(2007年10月25日)
2. 南野徹、老化シグナルと時計遺伝子、生活習慣病、日本時間生物学会学術大会(東京)(2007年11月7日)
3. 南野徹、心血管代謝と老化シグナル、日本組織工学会(東京)(2007年11月9日)
4. 南野徹、老化シグナルによって制御される心血管代謝ネットワークの解明、第11回日本心血管内分泌代謝学会高峰譲吉研究奨励賞受賞講演(東京)(2007年11月16日)
5. 南野徹、血管細胞老化シグナルと動脈硬化、日本血管生物医学学会学術大会(福岡)(2007年11月29日)
6. 南野徹、p53-induced Inhibition of Angiogenesis Causes Cardiac Dysfunction during Pressure Overload、BMB2007(横浜)(2007年12月14日)
7. 南野徹、老化分子 p53 による新たな心不全発症メカニズム、第72回日本循環器学会(福岡)(2008年3月29日)
8. Tohru Minamino, Role of Cellular Aging in Cardiovascular Disease, Annual Spring Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis, Busan, Korea (2008/4/18)
9. 南野徹、血管再生療法の臨床研究と次世代の再生治療を目指した基礎研究、第24回日本医工学治療学会 シンポジウム(千葉)(2008年4月20日)
10. 南野徹、老化シグナル制御による生活習慣病の治療戦略、第8回日本抗加齢医学会シンポジウム(東京)(2008年6月7日)
11. 南野徹、血管の老化は制御可能か?第50回日本老年医学会学術集会 若手企画シンポジウム(千葉)(2008年6月20日)
12. 南野徹、老化による動脈硬化形成の分子機序、第50回日本老年医学会学術集会 イブニングセミナー(千葉)(2008年6月20日)
13. Tohru Minamino, Therapeutic neovascularization using peripheral mononuclear cells、第40回日本動脈硬化学会総会シンポジウム(つくば)(2008年7月10日)
14. 南野徹、抗老化からみた高血圧の治療戦略、第12回日本心血管内分泌代謝学会(熊本)(2008年11月28日)
15. 南野徹、老化シグナルによる心血管制御メカニズム、第12回日本心血管内分泌代謝学会(熊本)(2008年11月28日)
16. Tohru Minamino, p53 as a novel target for the treatment of heart failure, The 25th Annual Meeting of the International Society for Heart Research, Yokohama, Japan (2008/12/5)
17. Tohru Minamino, Cardiovascular aging and circadian rhythm, BMB2008(神戸)(2008年12月11日)
18. 南野徹、老化シグナルと心血管制御メカニズム、第38回日本心脈管作動物質学会(岡山)(2009年2月6日)
19. Tohru Minamino, Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia、第73回日本循環器学会総会(大阪)(2009年3月20日)
20. Tohru Minamino, p53 as a new therapeutic target for heart failure、第73回日本循環器学会総会(大阪)(2009年3月20日)
21. Tohru Minamino, Impact of Cellular Aging on Cardiovascular Regeneration、第73回日本循環器学会総会(大阪)(2009年3月21日)
22. Tohru Minamino, Role of Cellular Aging in Cardiovascular and Metabolic Disease、第73

- 回日本循環器学会総会(大阪)(2009年3月22日)
23. Tohru Minamino, Role of p53 in heart failure, 17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Kyoto, Japan (2009/5/21)
 24. 南野徹、老化シグナルと心血管制御ネットワーク、第52回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)(2009年5月22日)
 25. 南野徹、抗老化からみた生活習慣病治療、第9回日本抗加齢医学会総会(東京)(2009年5月28日)
 26. 南野徹、血管の老化は可能か? 第9回日本抗加齢医学会総会(東京)(2009年5月28日)
 27. 南野徹、血管再生治療のUpdateと次世代治療法の開発、第54回透析医学会学術集会・総会(横浜)(2009年6月6日)
 28. Tohru Minamino, Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia, 第41回日本動脈硬化学会総会シンポジウム(下関)(2009年7月17-18日)
 29. Tohru Minamino, Life style-related disease and cellular aging signal network, 2009 AVDRC International Symposium, Daegu, Korea (2009/9/17)
 30. 南野徹、心血管代謝と老化制御、第17回日本血管生物医学会(東京)(2009年10月8-9日)
 31. 南野徹、小室一成、バージャー病に対する血管新生療法、第50回日本脈管学会総会シンポジウム(東京)(2009年10月29-31日)
 32. 南野徹、生活習慣病と老化シグナルネットワーク、第32回日本分子生物学会年会ワークショップ(横浜)(2009年12月9日)
 33. 南野徹、Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease, 第74回日本循環器学会総会・学術集会プレナリーセッション(京都)(2010年3月6日)
 34. 南野徹、Molecular mechanism of cardiovascular aging and regeneration (日本循環器学会佐藤賞受賞講演)、第74回日本循環器学会総会・学術集会(京都)(2010年3月6日)
 35. Tohru Minamino, Aging signals involved in glucose homeostasis, Japan-Denmark Joint Workshop on Molecular Diabetology, Copenhagen, Denmark (2010/3/24)
 36. Tohru Minamino, Vascular aging and vascular injury: synonymous or analogous? 20th World Congress of the International Society of Heart Research, Kyoto, Japan (2010/5/14)
 37. 南野徹、脂肪老化制御とインスリン抵抗性、第53回日本糖尿病学会年次学術集会(岡山)(2010年5月28日)
 38. 南野徹、心血管系の再生と老化のメカニズム、第10回日本抗加齢医学会総会(京都)(2010年6月11日)
 39. 南野徹、老化シグナルと心血管代謝、第52回日本老年医学会学術集会・総会(神戸)(2010年6月24日)
 40. 南野徹、心血管代謝と老化制御、第63回日本酸化ストレス学会(横浜)(2010年6月25日)
 41. 南野徹、Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease, 第16回日本遺伝子治療学会学術集会(宇都宮)(2010年7月2日)
 42. 南野徹、Cardiovascular aging and circadian rhythm, Neuro 2010(神戸)(2010年9月2日)
 43. 南野徹、分子標的医薬による血管新生治療の開発、第51回日本脈管学会(旭川)(2010年10月15日)
 44. 南野徹、老化シグナルによる心血管代謝制御、2010年度日本農芸化学学会(福岡)(2010年10月23日)
- (B)受賞
1. 日本心血管内分泌代謝学会高峰讓吉研究奨励賞(2007年11月16日)

2. 千葉大学医学部いのはな同窓会学術賞(2008年6月21日)
3. 日本循環器学会日本心臓財団佐藤賞(2010年3月6日)

(C) 著作物

1. Tohru Minamino, Issei Komuro, Vascular Aging: Insights from Studies on Cellular Senescence, Stem Cell Aging, and Progeroid Syndromes, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, 637-648 (2008)