

細胞老化の分子メカニズムの解明と老化細胞除去治療の開発

Elucidation of molecular mechanism of cellular senescence and development of senolytic therapy

順天堂大学 須田 将吉
派遣期間 2021年9月7日～2022年9月6日
研究機関 Departments of Medicine and Physiology and Biomedical Engineering,
Mayo Clinic
First St., S.W., Rochester, MN 55905, USA.
研究指導者 Prof. James L. Kirkland

Senolytics, elimination of senescent cells, has been reported as a promising anti-aging therapy in pre-clinical and clinical studies. However, senescent cells are heterogenic cells and the contribution of cell-type specific senescent cell to the development of diseases and the effect of cell-type specific elimination of senescent cells have not been fully understood yet. In this study, I established the endothelial specific senolytic mice using cre-loxP system. I found elimination of senescent endothelial cells improved the glucose metabolism, vascular function, and cardiac function in this endothelial cell specific senolytic mice as well as in the non-specific elimination of senescent cell mouse. These findings suggests that senescent endothelial cells play an important role in cardiovascular diseases and targeting senescent endothelial cells would be a novel therapy for cardiovascular diseases.

研究目的

近年、老化細胞自体を除去する(senolytics)ことで疾病を治療するという画期的な研究が行われた。老化細胞を特異的に除去するように設計したマウスでは、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の発症が抑制され、驚くべきことに寿命も延長することが報告され、大きな注目を集めている。さらには特異的に老化細胞を除去できる薬剤も同定され、実際にヒトの肺線維症に対する老化細胞除去治療の有用性を証明した世界初の臨床研究が留学先の研究室より報告された。これらの結果から、細胞老化は老化や老年症候群の治療標的として有用であることが示されつつある。しかし、臨床研究を進めていく中で、依然として、ヒトの生体内で老化細胞を検出するマーカーが確立していないという課題が明らかとなった。この原因として、これまで様々な老化細胞を網羅する老化マーカーの探索が行われてきたが、老化細胞と一概に定義することは難しく、細胞種や体内における局在、細胞老化の原因などによって異なる性質を持つことが徐々にわかってきた。そこで本研究で

は細胞種特異的な老化細胞を除去することを可能にするモデルマウスを作製し、細胞種特異的な老化細胞除去治療の効果の検証ならびに、細胞種特異的な老化マーカーや分泌される分子を明らかにすることを目的とした。

研究経過

血管内皮細胞特異的な老化細胞除去マウスの解析

これまで本留学先の研究室で樹立されている、老化マーカーである p16 が陽性の老化細胞を特異的に薬剤投与で除去できるモデルマウス(systemic-p16-ATTAC マウス)を改良し、cre-loxP システムを用いて、cre 特異的に老化細胞を除去できるマウスを作製した (p16-loxP-ATTAC マウス)。この p16-loxP-ATTAC マウスは細胞種特異的な Cre と交配することで細胞種特異的に老化細胞を除去することができる。我々は血管内皮細胞特異的な Cre (Tie2-Cre) と交配し、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスを作製した。

p16-loxP-ATTAC マウスの繁殖のトラブルのため、

野生型マウスと戻し交配を行なうなど、モデルマウスの樹立に非常に難渋した。

野生型のマウス、全身の老化細胞除去マウス (systemic-p16-ATTAC マウス)、血管内皮細胞特異的老化細胞除去マウス (Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウス) に対し、細胞老化を誘導するため、高脂肪食を与えた。通常食のマウスが20-25gであるのに対し、高脂肪食を負荷したマウスは30-40gと肥満を呈した。これらのマウスに薬剤またはコントロールとして溶媒を与えたところ、systemic-p16-ATTAC マウス、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスともに薬剤投与群ではコントロール群と比較して、**空腹時血糖の低下、HbA1cの低下を認めた**。心血管系への影響を調べるため、心エコーで心機能を確認したところ、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスは薬剤投与群では**高脂肪食負荷による左室収縮能の低下が改善傾向**であった。さらに安楽死後、大動脈を取り出し血管機能を確認したところ、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスは**薬剤投与群でアセチルコリンに対する血管の弛緩が良好**であった。一方で systemic-p16-ATTAC マウスでは心機能、血管機能には明らかな改善は認めなかった。肺、脂肪組織、肝臓を用いて Cdkn2a (p16) の発現量を qPCR で調べたところ、**systemic-p16-ATTAC マウスではいずれの組織でも Cdkn2a の発現が認められたのに対し、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでは Cdkn2a の発現はほとんど変化がなかった**。

考察

血管内皮細胞特異的に老化細胞を除去できる Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスの樹立を行なった。繁殖のトラブルのため、その樹立に時間を要した。野生型との戻し交配を行なった後は繁殖は順調にすすんでおり、繁殖がうまくいかなかったのはマウスモデルの問題ではなさそうであった。

老化細胞は体内の数%と言われており、systemic-p16-ATTAC マウスよりも血管内皮細胞に限定した老化細胞を標的とする Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでは表現型が乏しい可能性も考慮し、まずは表現型の確認を行うことにした。

老齢のマウスの解析を行なうためにはマウスの寿命に近い2年待つ必要があるため、高脂肪食負荷を行ない老化の誘導を行なった。高脂肪食負荷による老化の誘導は簡便であり、心血管疾患や糖尿病とい

った病態による老化モデルとして広く利用されている。

systemic-p16-ATTAC マウスでは、既報どおり、耐糖能や血管弛緩能の改善を認めた。左室収縮能に関しては、心筋梗塞モデルや高齢マウスで心機能低下が軽減するという報告があったが、高脂肪食負荷では報告がなく、非常に興味深いデータであった。Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでも同様に、耐糖能、血管弛緩能、心機能の改善を認めた。血管弛緩能は内皮細胞の機能を直接評価するアッセイであり、血管内皮細胞を標的とした老化細胞除去マウスである Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでは予想通り改善を認めた。耐糖能や心機能に関しては、血管内皮細胞以外にも様々な細胞の関与が示唆されているが、これまで血管内皮細胞の老化を抑制したマウスで耐糖能や心機能の改善も報告されていることから、これらも血管内皮細胞の老化が改善している結果として矛盾しないものであった。これらの結果から、老化した血管内皮細胞だけを標的とした治療薬、senolytics は糖尿病や心血管疾患の治療に有用であると考えられた。

現在までに報告されている老化細胞除去治療薬 senolytics にダサチニブとケルセチンのカクテル療法というものがある。これはダサチニブが老化した脂肪前駆細胞に有効であり、ケルセチンが血管内皮細胞に有効であるため、より広範な老化細胞除去治療のため、2つの薬剤を組み合わせ用いている。ところが、本研究の結果、老化した血管内皮細胞だけでも効果が得られるという発見により、ケルセチンだけでも一定の効果が得られることを示唆している。Senolytics の問題点として、副作用や off-target 効果などが挙げられており、より安全な治療のために標的となる細胞を限定し、薬の量や種類を減らすことが望ましい。実際ケルセチンはこれまで抗線維化作用があり、肺線維症や心臓線維化に対して効果が報告されている。

Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでの表現型が確認されたため、分子生物学的に本モデルの正当性、p16 陽性細胞が除去されていることの確認を行なった。ところが、p16 の遺伝子である Cdkn2a は systemic-p16-ATTAC マウスでは低下していたのに対し、Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスでは低下が認められなかった。これは肺、肝臓、脂肪において内皮細胞以外の細胞の p16 が発現しているためと考え

られ、逆に Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスが非特異的に老化細胞を除去していないというデータとも捉えることができる。細胞種ごとの p16 の発現を調べるために、CyTOF や Flowcytometry、免疫染色などによるシングルセルレベルでの解析を現在確立している。

また、この Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスの血漿を systemic-p16-ATTAC マウスと比較して老化内皮細胞特異的な老化マーカーや SASP 因子の同定についても現在検討中である。すでに臨床試験も行われている senolytics であるが、非侵襲的に老化細胞の体内における蓄積を正確に評価できる老化マーカーは存在しない。これは老化細胞の多様性が一因であると考えられる。老化細胞も細胞種、老化誘導方法、疾患、局在などにより分類を行なう必要がある。様々な Cre マウスと交配することにより、免疫細胞特異的、脂肪組織特異的など様々な細胞種特異的な老化細胞除去マウスを作製することが可能であり、この Tie2-Cre ; p16-loxP-ATTAC マウスや systemic-p16-ATTAC マウスと比較することでそれぞれ特異的な老化マーカーや SASP 因子の同定が可能となる。臨床試験においては心疾患に対する老化細胞除去治療の効果、アルツハイマー病における老化

細胞除去治療の効果など疾患特異的に試験が計画されることが多い。この場合病態に寄与する老化細胞の種類は限定されている可能性があり、例えば心疾患に対する臨床試験では血管内皮細胞老化のマーカーが有用な治療指標になることが示唆される。このように細胞種特異的な老化マーカーは臨床試験においても非常に有用になると考えられ、解析を勧めていきたい。

他の老化の誘導方法として放射線照射やドキソルビシンなどの化学療法による老化の誘導についても検討している。ドキソルビシンは心毒性があり、左室機能の改善を認めたことから、心疾患モデルとしても有用である。これらのモデルによる老化誘導に関しても現在野生型マウスを用いて検証を行っている。

研究の発表

口頭発表

1. なし

誌上発表

1. なし