

内在性選択的老化細胞除去システムによる動脈硬化性疾患リバーシブル法の開発

清水逸平

国立循環器病研究センター 研究所 心血管老化制御部

【研究の背景】

加齢に伴い全身の臓器で老化細胞が蓄積する。老化細胞は周囲の若い細胞の老化形質を促進し(バイスタンダー効果)、加齢性疾患(動脈硬化性疾患、心不全、心房細動、糖尿病、サルコペニアなど)の主要な病態基盤を形成する(Lopez-Otin et al., 2023)。細胞老化抑制は癌化のリスクが懸念されるため、選択的老化細胞除去(セノリシス)が注目されている。老化細胞除去効果を有する薬剤はセノリティクスと総称される。ABT263、ダサチニブやケルセチン(D+Q)はセノリティクス効果を有し、マウスに投与すると動脈硬化、肥満や糖尿病、心不全、老齢マウスに伴う病態がリバーシブルすることが報告されている(Chaib et al., 2022)。セノリティクスを用いた治験も海外で進行中であるが、現在探索されているセノリティクスの多くは抗がん剤などの薬剤であり安全性の面で懸念がある(Chaib et al., 2022)。安全性が高いセノリティクスを探索することで疾患横断的治療法を開発できる可能性が高い。そこで私はセノリシス効果を有する食品成分を探索したいと考えた。予備的検討の結果、セノリシス効果を発揮するハーブ(Seno-H)が存在する可能性が示唆され本研究課題で詳細なメカニズムの解明を目指した。Seno-Hは老化細胞で補体経路を活性化させ、老化細胞を除去している可能性が強く示唆されていた。セノリシス効果を持つハーブのスクリーニングを新たに行い、細胞やマウスを用いた検討を行った。老化細胞特異的補体経路活性化マウスを開発し、内在性老化細胞除去システムの構築を目指した。

【目的】

補体経路による選択的老化細胞除去(セノリシス)システムの開発を通して動脈硬化性疾患のリバーシブル法を確立することが本研究課題の目的であった。ハーブ成分が補体経路を活性化させセノリシス効果を発揮する点に着目し検討を行った。老化細胞特異的補体経路活性化マウス、補体インディケーターマウス、動脈硬化モデルマウス、各種細胞実験による検討を目指した。

【方法】

本研究課題は以下のように行った。

1) 老化細胞除去効果を保有する食品成分の探索

常磐植物化学研究所からハーブの提供を受け検討を行った。内皮細胞や線維芽細胞を老化させ、選択的老化細胞除去効果を保有するハーブのスクリーニングを行った。セノリシス・ライブセルイメージングの系の確立を *in vitro*(共焦点顕微鏡)、*in vivo*(多光子顕微鏡)で目指した。

2) 動脈硬化モデルマウスの開発

In house で飼育し交配可能な動脈硬化モデルマウスを作製するために ApoE KO マウスを作製した。

3) 選択的老化細胞除去システムとしての補体経路の検討(*in vitro*)

予備的検討の結果、老化マウスの大動脈、老化内皮細胞(HUVEC)で補体経路抑制分子が上昇することがわかってきた。老化細胞除去ハーブにより補体経路抑制分子の発現が減少し老化細胞が死滅することも明らかになっており詳細な分子機序の解明を目指した。

4) 内在性老化細胞除去システムとしての補体経路の検討 (*in vivo*)

老化→補体経路抑制分子の発現上昇→補体経路による細胞障害回避→老化細胞蓄積という仮説の検討を目指した。p16-Cre ERT2マウスの提供を中西らから受け、補体経路抑制分子^{flox/flox}マウスを作製した。これらを交配し老化細胞特異的補体経路活性化モデルマウスの作製を目指した。NIHのClaudia Kemperから補体C3インディケーターマウス(C3 TdTomatoマウス)の提供を受け、p16-Cre ERT2:C3 TdTomatoマウスの作製を目指した。

【結 果】

1) 老化細胞除去効果を保有する食品成分の探索

常磐植物化学研究所からハーブの提供を受け検討を行ったところ、7つのハーブ成分に老化細胞除去効果があることがわかった。補体経路を介して老化細胞除去効果を発揮するハーブ及びハーブ成分、補体経路を介さないで老化細胞除去効果を発揮するハーブ及びハーブ成分、に大別できる可能性が示唆された。補体経路を介して老化細胞除去効果を発揮するハーブ-C及びそのハーブ成分C(成分C)を用いた検討を重点的に行った。

2) 動脈硬化モデルマウスの開発

In house で飼育し交配可能な動脈硬化モデルマウスを作製するために ApoE KO マウスを作製した。2系統のインハウス ApoE KO マウスが作製され、現在高脂肪食負荷を行い表現型を検討している。

3) 選択的老化細胞除去システムとしての補体経路の検討 (*in vitro*)

In vitro で老化細胞除去ライブイメージング法を開発し検討したところ、成分Cを添加することで老化細胞にのみ穴が開き細胞死することがわかった。補体抑制剤を用いて成分Cによる細胞死が抑制されることも明らかになった。老化細胞に成分Cを投与しプロテオミクスを含む検討を行ったところ、成分Cが補体経路抑制分子を抑制し Membrane Attack Complex (MAC)を介した細胞死を誘導している可能性が示唆された。補体経路抑制分子の中和抗体でも老化細胞除去効果が発揮されるが、成分Cを投与することで細胞死が強く誘導されることもわかった。成分Cは補体経路抑制分子の抑制効果に加えMAC形成促進作用があると考えられ検討を続けている。

4) 内在性老化細胞除去システムとしての補体経路の検討 (*in vivo*)

補体経路抑制分子^{flox/flox}マウスの作製に成功し、現在 p16-Cre ERT2マウスと交配している。今後これらのマウスを老化させ、老化細胞特異的に補体経路抑制分子をタモキシフェンによるノックアウトした際の表現型を解析する予定である。老化促進モデルを作製するために、野生型マウスに放射線照射もしくはドキシソルビシン投与を行った。ドキシソルビシン投与では明らかな毛髪の変化は認められなかったが、放射線照射マウスは毛髪がグレーになった。多光子顕微鏡を用いた老化細胞除去ライブセルイメージング法の開発を行うために、放射線照射マウスの老化細胞の検出及び除去イメージング法の開発を現在行なっている。理研とも共同で老化細胞インディケーターマウスの開発を行った。現在マウスコロニーを拡大中であり、老化促進インディケーターマウス、加齢インディケーターマウスで成分C等を用いた際の老化細胞除去をライブで観察予定である。肥満モデルは老化促進モデルの一つであるが、本モデルに成分Cを投与したところマウスの糖利用障害が改善することもわかった。引き続き今後も検討を行う予定である。

【考 察】

本研究課題により、食材の中に補体経路を介して老化細胞除去効果を発揮するものが存在することがわかった。プロテオミクス解析を含む検討により、補体防御因子抑制を介したMAC形成により選択的老化細胞除去効果が発揮されることが明らかになりつつある。成分Cが補体防御経路を抑制するメカニズムの解明を現在目指している。遺伝子改変動物を用いた検討により、老化細胞特異的補体経路活性化による老化細胞除去が個体に与える影響の検討を行うことが可能となる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

既存のセノリティクスの多くは抗がん剤に分類され安全面でも懸念がある。成分Cは食品成分であり、引き続き検討を行うことで老化細胞除去を日々の生活に組み込むことが可能となる(デイリーセノリシス)。これにより動脈硬化性疾患をはじめと

する加齢性疾患に対する先制医療が可能となる。

【参考・引用文献】

Chaib, S., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2022). Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med* 28, 1556–1568.

Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278.