

課題番号 29

アルギニン代謝産物による細胞老化制御機構の解明

〔1〕組織

代表者：辻 竣也

(山口大学大学院医学系研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

朝霧 成孝

(山口大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 13 万円

〔2〕研究経過

細菌・ウイルス感染時に引き起こされる炎症反応は、老化でも誘導されることが知られている。そのような炎症反応が加齢とともに体内のあらゆる臓器で慢性的に生じることで、さまざまな加齢性疾患が引き起こされると考えられる。このような加齢性の炎症反応を起こす原因の一つに、細胞老化を起こした細胞の蓄積が知られている。細胞老化とは、分裂限界やさまざまな発がんの危険性のあるストレスに晒された細胞に生じる不可逆的な細胞周期の停止現象であり、細胞周期チェックポイント因子である p16^{INK4a} や p21^{CIP1} などの働きで誘導される。細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は体内から除去され難く、加齢とともに蓄積することが、多種の臓器で認められる (Yamakoshi K. 2009, *J. Cell Biol.*)。さらに、老化細胞の病理学的重要性は、細胞周期の停止だけではなく、炎症性サイトカインやケモカインなどの分泌因子の放出にある。申請者は老化細胞の蓄積した臓器において慢性炎症が惹起されること、また炎症性サイトカインの1つ TNF が細胞老化を惹起することを筆頭著者として 2022 年に *Nature Aging* 誌に報告した。これらの知見から、TNF シグナルの制御は、病的な細胞老化の誘発を阻止する有効な手段になりうると考えられる。抗 TNF 抗体による TNF 阻害の治療戦略は、様々な炎症性疾患で好成績を示す一方、感染リスク増大の課題もある。TNF は TNFR (TNF 受容体) を介して、通常は炎症性サイトカイン産生に重要な NF- κ B シグナル経路を活性化するが、ある条件下では細胞死シグナルへと切り替わる特徴を持つ。近年、この「細胞死 or 炎症惹起」を決定するチェックポイント機構が明らかにされ、炎症性疾

患における新たな創薬標的として注目されている。すなわちチェックポイント制御因子を調節して、TNF シグナルを細胞死へと偏向させる戦略となる。我々は生体内に多く存在する天然ポリアミンの一種、スperlミジンが TNF 刺激に依存してマクロファージに細胞死を誘導させることを見出した。これは TNF で刺激を受けた細胞のみを排除する、より特異的な炎症制御の可能性を示している。このことからスperlミジンの添加は TNF 刺激による細胞老化誘導や炎症反応を細胞死へと切り替える可能性があると考えた。そこで本研究では、線維芽細胞、マクロファージ等をはじめ、TNF により細胞老化や炎症反応を惹起する可能性のある細胞について、スperlミジンが TNF 刺激を受容した細胞に特異的な細胞死効果をもたらすかを調べ、さらにスperlミジンによる TNF シグナル制御の分子機構を解析することにより、病的発現量、またリン酸化などの細胞内シグナル経路を解析し、炎症あるいは細胞死応答の偏向を調べ、さらにスperlミジンによる細胞運命のスイッチに関わる標的因子を調査する。これらの研究の中で、貴研究所の機器類を用いた加齢研担当教員の 小笠原康悦先生の解析システムにより RNA サンプルを分析し、遺伝子発現変化をパswエイ解析で比較検討することで、炎症性破骨細胞特異的なシグナル因子の同定を目指すことを目的とした。

【打ち合せ等の開催状況】受け入れ教官である小笠原康悦教授とは、頻度としては、月 1 回程度、電話や e-mail を用いて連絡を取って、研究を進めてきた。小笠原康悦先生は免疫、炎症のスペシャリストであり、老化細胞の炎症反応を引き起こすシグナルに関して、ディスカッションを重ねている。

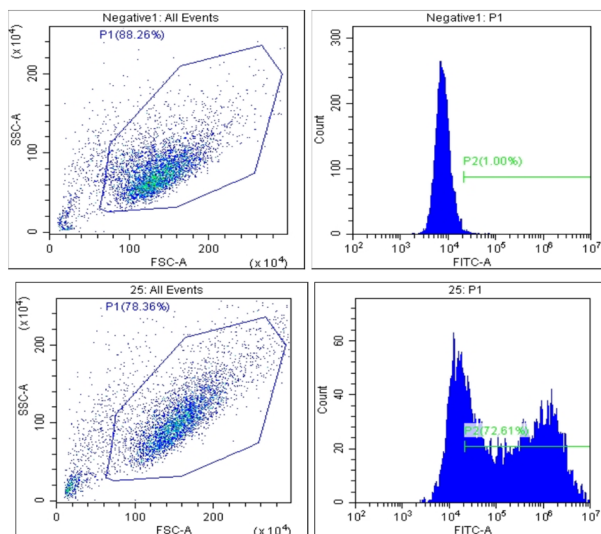
〔3〕成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

スperlミジンが TNF 刺激を細胞死型へと切り替える分子機構解明のため、TNF 受容体直下に存在し、細胞死を制御しているタンパク質である cIAP1/2 に注目した。cIAP1/2 は TNFR1 に刺激が入ると、TRADD、TRAF2、RIPK1 とともに複合体 (Complex I) を形成し、RIPK1 をユビキチン化することで、TNF シグナルを炎症型へと移行させる。我々はスperlミジ

ンがTNFシグナルをcIAP1/2の機能を抑制することで細胞死型へと移行させていると仮説を立て、実証しているところである。現在は、cIAP1/2の過剰発現、発現抑制実験に用いる plasmid を作成した。Lentivirus vector である pLVSIIN-EF1α-IRES-ZsGreen に cIAP1 をインサートし、HEK293T 細胞にトランスフェクションした細胞を FACS で解析した(下図)。本 vector は cIAP1 発現細胞で、蛍光タンパク質である ZsGreen が発現する。70%以上の細胞で ZsGreen の蛍光が認められた。また、western blotting でも cIAP1 発現が確認できている。



現在、本 plasmid を用いて、bone marrow derived macrophage 等に TNF+スぺルミジン刺激を行った際に、過剰発現をさせ、スぺルミジンの効果に影響するのかを解析中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果を基盤として、今後さらに国内外の拠点と連携を行いながら、AMED 等の大型研究費の獲得に向けて準備しているところである。

[4] 成果資料

現在、論文準備中である。