

花豆由来低分子化合物が持つ抗老化作用の
分子機序解明と慢性炎症予防への応用

京都工芸繊維大学 応用生物学系

川口 耕一郎

超高齢社会にある我が国において健康長寿の実現は極めて重要な課題であり、この課題を解決するため加齢性疾患に対する新たな治療戦略の構築が求められている。近年、個体の老化や加齢性疾患の発症・悪性化に細胞老化という現象が関与していることが明らかになり注目されている。細胞老化とは、細胞が分裂を繰り返し増殖するなかで次第に増殖能を失い、やがて分裂寿命を迎え増殖を恒久的に停止した不可逆的な増殖停止状態のことである。細胞老化を起こした細胞のことを老化細胞と呼び、加齢に伴い生体内に蓄積し老化や加齢性疾患の一因となると考えられている。

老化細胞は抗アポトーシスシグナルに関与する Bcl-2 ファミリータンパク質が高発現しており、アポトーシス耐性を示すのが特徴である。これは部分的にがん細胞の性質と類似していることから、抗がん剤により老化細胞を選択的に除去することができるのではないかという戦略に基づき、老化細胞に対し特異的にアポトーシスを誘導する分子のスクリーニングが行われた。その結果、Bcl-2 ファミリータンパク質の阻害剤である ABT-263 に老化細胞を選択的に除去する効果があることが示され、様々な幹細胞の活性を回復させる効果があることが報告された[1] [2]。このように老化細胞に選択的細胞死を誘導することのできる分子はセノリティック分子と呼ばれ、複数の病態モデルにおいて細胞老化依存的な表現型を緩和することが明らかになっている。例えば、アテローム性動脈硬化症と神経変性のモデルマウスを用いた研究では、ABT-263 はそれぞれアテローム性動脈硬化症のプラークと脳組織から老化細胞を排除し、これらの加齢性疾患の進行を抑制することが報告されている[3] [4]。すでに抗がん剤として使用されているダサチニブ（チロシンキナーゼ阻害剤）に関しても、ケルセチン（PI3 キナーゼ阻害作用を持つフラボノイドの一種）との併用により早老症マウスの心機能が回復することがわかり[5]、同じ薬剤の組み合わせにより自然老化マウスの運動機能の改善と寿命延長が見られることも報告されている[6]。また、老化細胞に対しアポトーシスを促進

させるという同様のアプローチから、アポトーシス促進作用を持つ p53 タンパク質を活性化させるペプチドや UBX0101 (MDM2-p53 相互作用の阻害剤) がセノリティック分子として有効であることが示されている[7]。

以上のように、数多くのセノリティック分子が見出された一方で、これらの分子には副作用を示すものもあり、抗老化目的のヒトへの臨床応用にすぐにつながる訳ではない。このことから、食物などの天然物に由来する低分子化合物からもセノリティック分子はスクリーニングされ、ピペルロングミン (胡椒などに多く含まれるアルカロイド化合物) やフィセチン (フラボノイドの一種) などにその作用があることが報告されている[7]。これらは比較的低毒性であることや併用することにより ABT-263 のセノリティック活性に強い相乗効果をもたらすことから今後の臨床応用への可能性が大いに期待されている。

申請者はこれまで加齢性疾患の研究に取り組み、組織中の老化細胞ががんなどの加齢性疾患の病態進行に極めて重要な因子であることを報告してきた。また最近では、加齢に伴う脂質代謝制御異常の分子メカニズムを、脂肪酸結合タンパク質 FABP5 に着目して解析を進めてきた。その過程で、花豆抽出物が FABP5 の発現を低下させ、老化細胞にアポトーシスを誘導することを見出した。したがって、花豆抽出物は抗老化細胞作用を持つ新規の生理活性物質であり、その標的の一つとして FABP5 を介する脂質代謝経路があるのではないかと考えられた。

そこで本研究では、まず培養細胞系を用いて花豆抽出物による老化細胞特異的なアポトーシス誘導活性の違いを検証し、細胞種特異性を検証する。次に、FABP5 が関与する脂質代謝に着目してその作用機序を明らかにし、構造活性相関に基づく老化細胞特異的なアポトーシス誘導機構の分子基盤を構築することを目的とした。

【実験方法】

材料

花豆の熱水抽出物を凍結乾燥したサンプルを使用した。花豆抽出物凍結乾燥品を DMEM 培地 (FUJIFILM Wako) に溶解したストック溶液 (25 mg/mL) を作製し、細胞培養培地に任意の濃度で添加した。

細胞培養

3T3-L1 細胞 (マウス前駆脂肪細胞) 及び RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ様細胞) は 10% FBS と抗生物質 (100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン, FUJIFILM Wako) を含む DMEM 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下の CO₂ インキュベーター内で培養した。

細胞老化誘導

3T3-L1 細胞もしくは RAW264.7 細胞を 24 well plate に播種した後 24 時間培養し、BrdU (FUJIFILM Wako) 50 µM を加えさらに 24 時間培養したものを老化細胞とした。細胞老化マーカーである *Cdkn1a* (*p21*) 及び *Cdkn2a* (*Ink4a*) 遺伝子の発現で細胞老化誘導をモニターした。

細胞増殖試験

上記方法により細胞老化を誘導した各細胞に花豆抽出物 (0, 250 及び 500 µg/mL) を添加した後 48 時間培養した。細胞生存率は MTT アッセイにより評価した。

定量的 real-time PCR 解析

細胞から TRI reagent (Molecular Research Center) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。定量的 real-time PCR 解析は THUNDERBIRD® Next SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用い、CFX 96 real-time PCR system (Bio-Rad) を使用して実施した。

Western blot 法

プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含む RIPA 緩衝液で細胞を溶解し、全細胞溶解液を調製した。タンパク質濃度は、Protein Assay BCA kit (Nacalai Tesque) を用いて測定した。等量の全細胞溶解物を SDS-PAGE で分離した後 PVDF 膜に転写した。その後、標的分子に対する一次抗体 (p21, PARP, FABP5 及び β -actin, Cell Signaling Technology) 反応、HRP 標識二次抗体反応を行った。化学発光シグナルは、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) を用いて基質反応を行い、Amersham Imager 680 (Cytiva) を用いて検出した。

統計解析

統計解析には Prism 9 (GraphPad Software) を用いた。データは平均値 $\pm$ S.D. で表し、 $P < 0.05$ の時に有意であると判定した。

【実験結果及び考察】

花豆抽出物が有するセノリティック分子の細胞種特異性を明らかにするため、細胞老化を誘導した 3T3-L1 細胞と RAW264.7 細胞の培養培地に花豆抽出物を添加しその影響を検証した。両細胞種と

も細胞老化は BrdU 処理 (50 μ M, 24 時間) により誘導し (図 1a)、細胞老化マーカーである *Cdkn1a* (*p21*) 及び *Cdkn2a* (*Ink4a*) 遺伝子の発現量で評価した。その結果、Day 4 における p21 及び Ink4a の発現は 3T3-L1 細胞 (図 1b)、RAW264.7 細胞 (図 1c) でともに有意に上昇しており、細胞老化は誘導できていた。

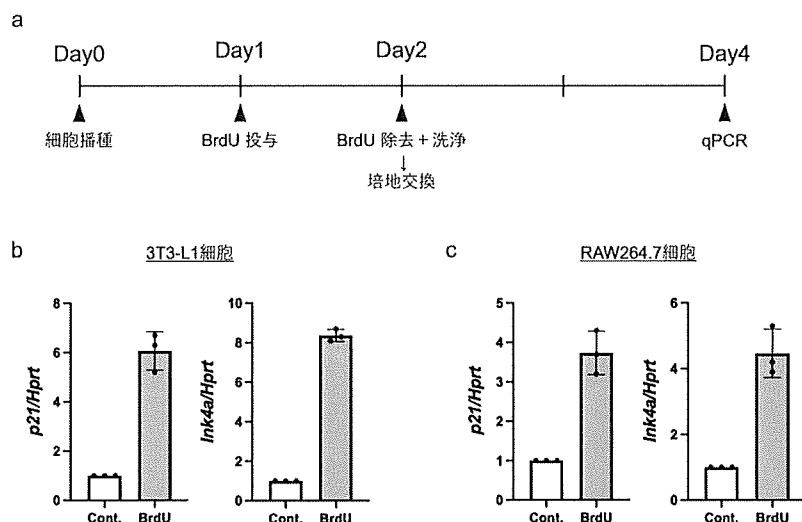


図 1. 細胞老化誘導方法とマーカー遺伝子の発現確認

細胞老化を誘導した両細胞種に花豆抽出物を添加 (0, 250, 500, 750 及び 1000 μ g/mL) し、48 時間培養後の細胞生存率を MTT アッセイで評価したところ (図 2a)、老化誘導していない 3T3-L1 細胞 (Cont.) ではほとんど変化が見られなかったが、老化誘導した 3T3-L1 細胞 (SC) では 500 μ g/mL 以上の濃度において細胞生存率が低下することがわかった (図 2b)。一方、RAW264.7 細胞では老化細胞特異的な細胞生存率の低下は見られなかった (図 2c)。

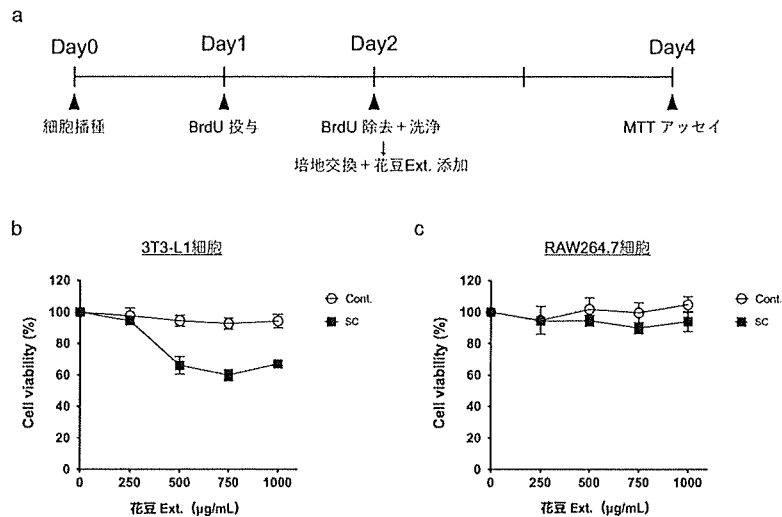


図 2. 花豆抽出物の細胞生存率への影響の検証

花豆抽出物による老化 3T3-L1 細胞に対する効果が老化細胞特異的なアポトーシス誘導によるものかを明らかにするため、p21 とアポトーシスマーカーである切断型 PARP の発現を WB 法で確認した。その結果、細胞老化誘導した 3T3-L1 細胞では花豆抽出物処理により p21 発現量が低下するとともに (図 3a)、切断型 PARP 発現量の増加が見られた (図 3b)。老化細胞特異的な生存率の低下が見られなかった RAW264.7 細胞では p21 発現量に変化はなかった (図 3c)。したがって、図 2a で見られた 3T3-L1 細胞の老化細胞特異的な生存率の低下は、老化細胞のアポトーシスによるものであることが示唆された。

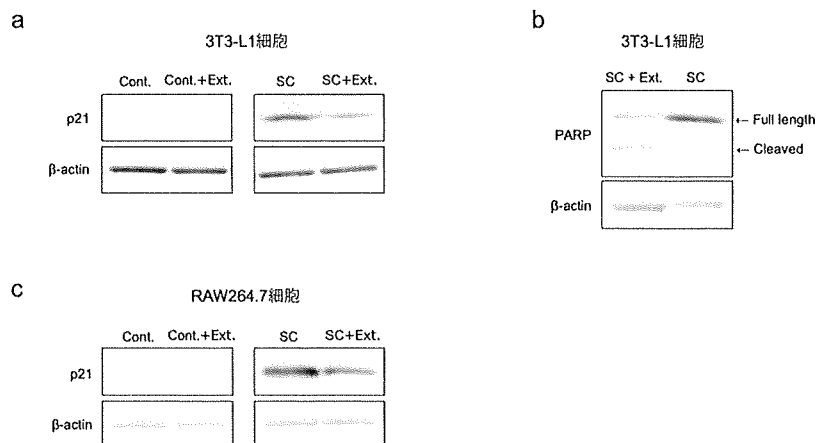


図3. WB 法による老化マーカー及びアポトーシスマーカーの解析

一部のがん細胞では FABP5 は様々な脂質代謝関連遺伝子の発現を制御し、FABP5 をノックダウンするとアポトーシスが誘導されることがわかっている。先述したように、老化細胞はがん細胞に似た性質を持つことから、老化細胞においても FABP5 がアポトーシスを制御している可能性が考えられた。そこで、老化誘導した 3T3-L1 細胞に対し花豆抽出物を添加した際の脂質代謝関連遺伝子の発現変化を検証した。その結果、細胞老化誘導で上昇した FABP5 の発現は花豆抽出物処理で低下しており（図 4a）、脂質代謝関連遺伝子では脂肪酸の β 酸化に関わる遺伝子の発現が低下していた（図 4b）。

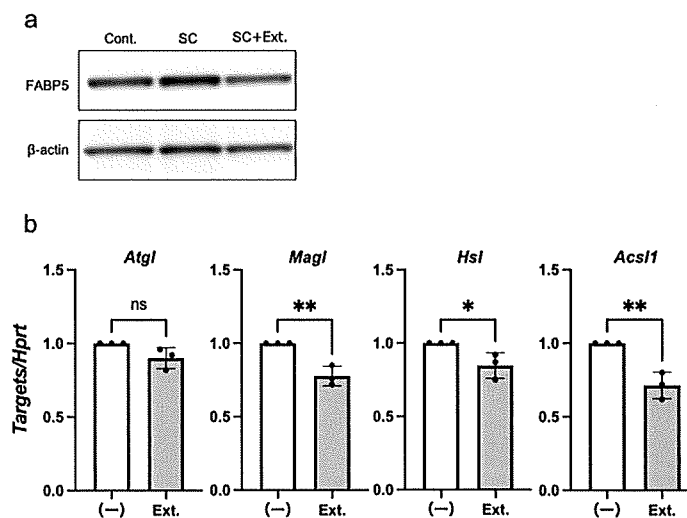


図4. 花豆抽出物による遺伝子プロファイルの発現変動解析

以上の結果より、花豆抽出物は老化した 3T3-L1 細胞に対し特異的なアポトーシス誘導活性を有し、その標的として脂質代謝関連遺伝子群があることが明らかとなった。老化した脂肪細胞は加齢に伴って脂肪組織中に蓄積し、炎症性サイトカインの分泌を介してさまざまな組織の慢性炎症状態に寄与することが示唆されている。花豆はこれまで明らかになっている抗腫瘍作用や免疫調節作用など

の生理活性に加え、脂肪組織の老化細胞を標的としたセノリティック作用もあることから、健康長寿に資する食資源として有用性が高いと言える。今後、老齢マウスに花豆抽出物を与えるなどの介入実験を行い生体に対しても効果があるのか検討する必要がある。

【要約】

本研究では、花豆由来低分子化合物が有する抗老化作用の分子機序解明を目指し、細胞老化を誘導した 3T3-L1 前駆脂肪細胞と RAW264.7 マクロファージ様細胞に花豆抽出物を添加しその影響を検証した。3T3-L1 細胞では、細胞老化誘導後に花豆抽出物を添加することで細胞生存率が低下し、それは老化細胞特異的なアポトーシスによるものだった。一方、RAW264.7 細胞ではそのような変化は見られなかった。また、老化 3T3-L1 細胞では、脂質代謝関連遺伝子の FABP5 や脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の発現が花豆抽出物処理により低下していた。これらの結果から、花豆抽出物は老化脂肪細胞に特異的に作用し、老化細胞の脂質代謝経路を標的の一つとしてアポトーシスを誘導するセノリティック効果を示すことが示唆された。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団に厚く御礼申し上げます。

【文献】

[1] R. Yosef, N. Pilpel, R. Tokarsky-Amiel, A. Biran, Y. Ovadya, S. Cohen, E. Vadai, L. Dassa, E. Shahar, R. Condiotti, I. Ben-Porath, V. Krizhanovsky, Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and

BCL-XL, *Nat Commun* 7 (2016) 11190.

[2] J. Chang, Y. Wang, L. Shao, R.M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, K. Janakiraman, N.E. Sharpless, S. Ding, W. Feng, Y. Luo, X. Wang, N. Aykin-Burns, K. Krager, U. Ponnappan, M. Hauer-Jensen, A. Meng, D. Zhou, Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice, *Nat Med* 22(1) (2016) 78-83.

[3] T.J. Bussian, A. Aziz, C.F. Meyer, B.L. Swenson, J.M. van Deursen, D.J. Baker, Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline, *Nature* 562(7728) (2018) 578-582.

[4] B.G. Childs, D.J. Baker, T. Wijshake, C.A. Conover, J. Campisi, J.M. van Deursen, Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis, *Science* 354(6311) (2016) 472-477.

[5] Y. Zhu, T. Tchkonina, T. Pirtskhalava, A.C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A.K. Palmer, Y. Ikeno, G.B. Hubbard, M. Lenburg, S.P. O'Hara, N.F. LaRusso, J.D. Miller, C.M. Roos, G.C. Verzosa, N.K. LeBrasseur, J.D. Wren, J.N. Farr, S. Khosla, M.B. Stout, S.J. McGowan, H. Fuhrmann-Stroissnigg, A.U. Gurkar, J. Zhao, D. Colangelo, A. Dorronsoro, Y.Y. Ling, A.S. Barghouthy, D.C. Navarro, T. Sano, P.D. Robbins, L.J. Niedernhofer, J.L. Kirkland, The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs, *Aging Cell* 14(4) (2015) 644-58.

[6] M. Xu, T. Pirtskhalava, J.N. Farr, B.M. Weigand, A.K. Palmer, M.M. Weivoda, C.L. Inman, M.B. Ogradnik, C.M. Hachfeld, D.G. Fraser, J.L. Onken, K.O. Johnson, G.C. Verzosa, L.G.P. Langhi, M. Weigl, N. Giorgadze, N.K. LeBrasseur, J.D. Miller, D. Jurk, R.J. Singh, D.B. Allison, K. Ejima, G.B. Hubbard, Y. Ikeno, H. Cubro, V.D. Garovic, X. Hou, S.J. Werooha, P.D. Robbins, L.J. Niedernhofer, S. Khosla, T. Tchkonina, J.L. Kirkland, Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age, *Nat Med* 24(8) (2018) 1246-1256.

[7] W. Li, L. Qin, R. Feng, G. Hu, H. Sun, Y. He, R. Zhang, Emerging senolytic agents derived from natural products, *Mech Ageing Dev* 181 (2019) 1-6.