

“老化遅延”を目指した新たな内分泌因子の 同定と応用



下村 伊一郎

大阪大学大学院医学系研究科／生命機能研究科

1. 私が知りたかったこと

老化加速病と言える生活習慣病の病態に、脂肪組織由来の分泌因子群が重要なかわりを持っていることを明らかにしてきた。脂肪組織以外の末梢臓器からもはたして分泌因子が産生されているのか、そしてそれらがどう疾患を関与しているのか、を知りたかった。

2. 背景と目標

広範な生物種において、種々の老年病の発症を遅延させ寿命を延長する最も効果的な方法はカロリー制限である。その対極に過食による生活習慣病があり、老化加速病と言える。本研究では、生活習慣病・老年病と直結する肝臓、小腸、筋肉、などの末梢組織由来の分泌因子とエネルギー代謝の相関を明らかにすると共に、カロリー制限による老化の遅延と健康寿命延長のメカニズムを探り、生活習慣病・老年病に対する新しい予防法及び治療法を開発することを目的とした。内分泌因子を選択的に同定する signal sequence trap (SST)法を導入し、骨格筋、肝臓、小腸、より摂食抑制および過食という老化の速度を決定する生理状況により、その産生が調節される新たな内分泌因子群を同定する。これらの内分泌因子群を介した新たな臓器連関を見いだすことで、摂取カロリー制限による「老化遅延」のメカニズムを探り、食事制限をすることなくカロリー制限の効果を模倣する新たな戦略” CR (caloric restriction) mimetics (模倣)” の発見・開発を目標とする。

3. 方法

a) SST 法による分泌蛋白 cDNA 断片クローニング

内分泌因子探索にあたり、signal sequence trap (SST)法を用いた。本法では分泌蛋白に比較的特有なシグナルシーケンスをアミノ末端に有する cDNA フラグメントのみを選択的に単離する。オリジナルのベクターは東京大学医科学研究所北村俊雄博士らにより開発された。

b) 試料とする組織サンプル

摂食量の減少および過食により、さまざまなホルモンをお互い産生しあうことで末梢臓器連関に関与している可能性を有する臓器として、骨格筋、小腸、肝臓をそのサンプルとする。極端な摂食抑制状態、過食状態、のモデルとして、24時間絶食マウス、および絶食後の12時間再摂食マウス、過食を呈する肥満糖尿病マウスのそれぞれ上記臓器より、Total RNA を採取。臓器ごとに、絶食群、再摂食群、過食群の全ての RNA サンプルを同量ずつプールした poly A RNA を SST 法への試料とした。

4. 結果

肝臓において1156クローンの解析を終了した。そのうち965クローンがシグナルシーケンスを有し、SST 方の系がうまくいっていることがわかった。958クローンは88種類の既知遺伝子であった。7クローンが新規あるいは機能未知遺伝子であった。7クローンの中6クローンは機能未知遺伝子として登録済みで、2クローンが膜貫通領域を有せず、シグナルシーケンスのみで、分泌蛋白である可能性が考えられた。また1クローンは完全な新規遺伝子であった。しかしこれらの遺伝子はいずれも肝臓特異的なものではなく、広く他臓器・組織にも発現しているものであり、さらなる解析に関して priority の高いものとは判断しなかった。

小腸において780クローンの解析を終了した。80種類の既知遺伝子と8種類の機能未知遺伝子よりなっていた。8種類のうち、4種類は膜貫通領域を持たず分泌蛋白と考えられた。そのうちインテグリンと命名した1つのクローンはシグナルシーケンスをふくんで111アミノ酸よりなる機能未知蛋白で、組織分布上完全に小腸特異的なものであった。さらに絶食・再摂食で小腸遺伝子発現量が低下・上昇し、かつ過食肥満糖尿病マウスである db/db マウス小腸で発現増強が見られ、栄養により活発に発現制御を受けていた。さらに in situ hybridization により小腸内での発現分布を見ると、小腸粘膜上端の粘膜上皮細胞にのみ強い遺伝子発現が見られた。粘膜上皮細胞への発現実験により、栄養因子である脂肪酸により引き起こされるアポトーシスを増強させる

作用が見られた。小腸粘膜上端の栄養性脱落に関わることが推察された。

骨格筋において1812クローンの解析を終了した。66種類の機能未知遺伝子が同定された。そのうちマスクリンと命名した遺伝子はマウスの組織分布において、ほぼ骨格筋特異的な遺伝子発現が見られた。シグナルシーケンスをふくんで約130アミノ酸よりなる新規蛋白であった。アミノ酸配列上、2種の蛋白切断部位が見られ、プロセッシングの可能性が考えられた。C2C12 myocyteの分化系で、本遺伝子の著明な発現誘導が見られた。さらに絶食・再摂食により遺伝子発現の低下・再上昇が見られ、栄養による活発な制御が見られた。そして *in vivo*, *in vitro* の系で、本遺伝子発現がインスリンにより正に、cAMPにより負に制御されることがわかった。さらに肥満糖尿病マウス筋肉において本遺伝子発現の上昇が見られ、生理作用として筋肉や肝臓に対してインスリン作用を抑制することがわかった。肥満時の糖尿病の発症および病態に関わることが推察された。現在ノックアウトマウスの解析を進めている。

5. 考 察

シグナルシーケンストラップ法を用いることにより、小腸、骨格筋で発現調節される分泌因子の候補遺伝子を同定した。

小腸由来のインテクチンに関しては、ヒトホモログを同定すべく解析を進めたが、分子生物学的手法およびデータベース上も当該クローンを同定することができず、老化予防の観点からヒトにおける意義付けの解明を進めるのは現在のところ困難である。

マスクリンについては、ヒトホモログも同定し、骨格筋における高発現も確認された。ノックアウトマウスの解析を通じて、本因子の生理病態学的意義を今後明らかにしていきたい。さらに、今後血中への分泌が証明されれば、血中濃度測定系の開発を通じて肥満・2型糖尿病の病態診断応用、受容体同定、受容体作動薬の開発を通じて創薬へと医学応用できる可能性を持つ。またMusclinの発見を通して、骨格筋が分泌臓器として機能するというミオカイン概念を提唱したい。

文献

Kitazawa H, Nishihara T, Nambu T, Nishizawa H, Iwaki M, Fukuhara A, Kitamura T, Matsuda M, and Shimomura I. Intectin, a novel small intestine-specific glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, accelerates apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:42867-42874, 2004.

Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, and Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle derived secretory factor. *J Biol Chem.* 279:19391-19395, 2004.