

コラム

炎症誘発細胞除去による加齢病態の改善

最近の知見から一我々の研究成果の追試を中心に

中西 真、城村由和

近年の高齢者や百寿者、さらには他の生物を用いた生理・病理学的解析や、細胞生物学的解析から、慢性炎症が老化病態の基本であり、がんや動脈硬化などの老年病発症の基盤であることが強く示唆されている。高齢個体において慢性炎症の引き金となる細胞や、なぜそのような細胞が蓄積するのかについては未だ未解明な部分が多い。しかしながら、これら炎症誘発細胞の除去や、炎症性性質の阻害が、高齢個体に見られる慢性炎症を抑制し老年病の発症を抑制し、病態を改善することは多くの研究成果から示されている。

我々はヒトの老化を予防し、老年病の発症を抑制することで健康長寿延伸を目指して研究を進めている。高齢個体の慢性炎症病態を理解するためには、炎症の引き金になるモデル細胞の同定とこれらの解析から炎症性性質の共通メカニズムを明らかにし、これらを標的とした技術の開発が必要になると考えた。細胞老化は様々なゲノムストレスに応答した細胞表現で、恒久的な細胞増殖停止を必須の性質とするが、試験管内で誘導した老化細胞は多様な炎症性サイトカインを分泌 (SASP) することが知られている。我々は個体内の老化細胞も同様に SASP 表現を示すと予想し、これらを解析することで、高齢者に蓄積する炎症誘発細胞の共通分子基盤の解明を試みた。これまでの DNA 損傷応答に関わる研究から、個体内で細胞老化誘導を制御可能にするため、まず初めに細胞老化誘導分子基盤の解明を試みた。

1) 細胞老化誘導機構

これまでの多くの研究から細胞老化誘導には p53 の存在が必要不可欠であることが知られているが、単純に正常細胞に p53 を発現させても p21 の発現誘導を介して一過性の G1 細胞周期停止が起こるのみで、細胞老化誘導は見られない。現在でも細胞老化誘導機構として p53-p21 経路を介した Cdk2 阻害と、p16 を介した Cdk4/6 阻害の両方で細胞老化が誘導されるというレビューが多く見られるが、これら Cdks を一過性に阻害しても細胞老化は誘導されない (阻害をやめると細胞は再び細胞周期に入る)。これらの知見は、p53 の活性化が細胞に何らかに質的变化をもたらし、p53 の活性化がなくなっても恒久的な細胞周期停止状態が継続することを意味している。

我々は FUCCI のシステムを用いて細胞老化誘導過程をリアルタイムで解析した。その結果、細胞周期の S 期を超えた時点で p53 が活性化されると、p21 を介した APC/C^{Cdh1} の早熟活性化が起こり、細胞分裂期への移行や進行を制御する因子を分解してしまうため、細胞分裂期の回避が起こり次の G1 期に移行することが細胞老化誘導に重要であることを示し、2014 年 Mol Cell 誌に発表した。この分子機構は 2023 年に John Diffley らにより追試され、同様

の研究成果が Cell 誌に報告された (DOI: [10.1016/j.cell.2022.12.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.036))。

2) p16 トレサーマウスにおける Neo カセット遺伝子の意味

近年、マウスを用いた研究から、老化細胞の除去が加齢に伴う多様な疾患を改善し、健康寿命を延伸させる可能性が示唆され、細胞老化が加齢変化において中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、生体内の老化細胞の同定および単離のための適切な研究ツールが欠如していたため、生体内の老化細胞がどのような細胞種から誘導されるのか、その性質に関する理解は依然として不十分な状況であった。

この課題を解決するため、我々は老化細胞の主要なマーカーである p16^{Ink4a} に着目し、1 細胞レベルで p16^{Ink4a} 陽性細胞を可視化可能なマウスモデルの樹立を試みた。モデルの開発においては、アメリカの Sharpless 博士らによる報告 (doi: [10.1016/j.cell.2012.12.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.010)) を参考に、内在性 p16^{Ink4a} 遺伝子の第 1 エクソンを標的遺伝子カセットで置換する手法を採用した。この手法は、同グループによる後続の論文 (doi: [10.1073/pnas.1818313116](https://doi.org/10.1073/pnas.1818313116)) においても採用され、p16^{Ink4a}-tdTomato マウスの樹立とその解析が行われた。このマウスでは、p16^{Ink4a} の第 1 エクソンを tdTomato 遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換することで、p16^{Ink4a} 陽性細胞の標識効率が大幅に向上することが示された。さらに、同論文では、tdTomato の発現が内在性 p16^{Ink4a} の発現と強く相関していることが明らかにされている。この現象は、以前の 2 つの研究 (doi: [10.1002/gene.10210](https://doi.org/10.1002/gene.10210), doi: [10.1007/s11248-007-9100-4](https://doi.org/10.1007/s11248-007-9100-4)) でも報告されており、ネオマイシン耐性遺伝子カセットが局所的なエンハンサーとして機能し、レポーター遺伝子の発現を増強する一方で、レポーターの特異性は損なわれないことが示唆されている。

これらの知見を踏まえ、我々は内在性 p16^{Ink4a} の第 1 エクソンを Cre^{ERT2} 遺伝子およびネオマイシン耐性カセットで置換した p16^{Ink4a}-Cre^{ERT2} マウスを作製した。このマウスを Rosa26-CAG-lsl-tdTomato マウスと交配することで、TAM (タモキシフェン) 依存的に p16^{Ink4a} 陽性細胞を赤色蛍光で標識することが可能な p16^{Ink4a}-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスを樹立した。この新たなマウスモデルを用いた実験では、胎児期の線維芽細胞において p16^{Ink4a}-tdTomato 陽性細胞が高い p16 発現を示すことが確認された。また、加齢に伴う p16^{Ink4a}-tdTomato 陽性細胞の蓄積もマウス個体を用いた解析において観察され、これまでの細胞老化研究の知見を裏付ける結果が得られた (doi: [10.1016/j.cmet.2020.09.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.09.006))。

さらに、膀胱組織における p16^{Ink4a}-tdTomato 陽性線維芽細胞の免疫染色解析を行った結果、これらの細胞の多くで内在性 p16^{Ink4a} の発現が検出された (doi: [10.1038/s43587-024-00704-1](https://doi.org/10.1038/s43587-024-00704-1))。これにより、我々のマウスモデルにおいても、p16^{Ink4a} の標識が内在性発現を忠実に反映していることが確認された。加えて、ごく最近内在性 p16^{Ink4a} の第 3 エクソンのストップコドンの代わりに、2A ペプチドを介して Cre^{ERT2} 遺伝子およびネオマイシン耐性カセットを導入した別の p16^{Ink4a} リポーターマウスの報告された (doi: [10.1016/j.cell.2024.09.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.021))。この報告でも、ネオマイシン耐性遺伝子カセットによって、我々のマウスモデルと同様に、

レポーターの特異性を損なうことなく、レポーター遺伝子の発現の増強が認められているようである。また多くの臓器において我々と類似の p16^{Ink4a} 陽性細胞パターンが検出されている。これらの知見に基づき、我々はネオマイシン耐性カセットの挿入が p16^{Ink4a}-Cre^{ERT2} マウスのレポーター特異性を損なっているという明確な証拠は存在しないと考えている。むしろ、ネオマイシン耐性カセットはエンハンサーとして機能し、p16^{Ink4a} 陽性細胞の可視化をより効率的に行うための有効なツールであると捉えている。

3) Glutamine 代謝を標的とした老化細胞除去—我々の論文と追試論文—

我々は老化細胞の新たなアキレス腱となりうる性質を明らかにし、それを利用した老化細胞除去技術の開発、さらには高齢者に蓄積する炎症誘発細胞に共通する性質を見出すために限りなく 100% に近く老化細胞を純化し、この細胞にレンチウイルス shRNA ライブラリーを感染させて、老化細胞の生存に必要な遺伝子をゲノムワイドに解析した。老化細胞を限りなく純化することは、老化細胞を選択的に除去する Senolytics を解析する上では非常に重要である。老化細胞に正常細胞の混入が多い場合、正常細胞は Senolytic 化合物では致死誘導されないため、見かけ上の Senolytics の活性はかなり低いものとなる。ゲノムワイドの解析から GLS1 が老化細胞特異的に必要な遺伝子として同定された。実際、GLS1 阻害剤である BPTES は老化細胞選択的に致死誘導することが明らかとなった (Johmura et al. Science 2021)。一方、正常細胞に対しても BPTES 処理は細胞増殖抑制活性を示したが、致死誘導は見られなかった (Science 論文で報告済み)。この増殖抑制活性は、培養細胞系による ATP 合成への Glutamine の依存性が高まっていることが原因と推察された。

(GLS1 阻害剤の生理学的効果に関するそれまでの背景)

GLS1 阻害剤 BPTES が培養細胞系において Senolytics 効果を示すことがわかったので、これまでの GLS1 阻害の薬効についての過去の研究結果を探索し、我々の研究結果との整合性を確認した。その結果以下の効果があることが報告されていた。

・抗がん剤としての GLS1 阻害剤

KRAS は、グルタミン代謝の調節因子として知られており、がん細胞の生存と増殖をグルタミンに依存させる「グルタミン中毒」として知られる状態にすることから、KRAS 変異がんに対する新しい治療標的として期待されていた。グルタミン代謝の第一段階は、グルタミンからグルタミン酸とアンモニアへの変換であり、これはグルタミナーゼ (GLS) によって触媒される。ビス-2-(5-フェニルアセトアミド-1,2,4-チアジアゾール-2-イル)エチルスルフィド(BPTES)は、GLS1 のアロステリック、時間依存性、特異的阻害剤であり、グルタミナーゼ 4 量体のオリゴマー化界面に特異的な結合を示す。BPTES は、6-ジアゾ-5-オキソ-1-ノルロイシンやエブセレンなどの他のプロトタイプのグルタミナーゼ阻害剤よりも選択性が高く、GLS1(13)や腫瘍増殖を効果的に阻害することができるが、溶解性が低いため (0.144 μg/mL)、臨床開発が制限されている。最近、別の GLS1 阻害剤である CB-839 が第 I 相臨床試験で試験されたが、BPTES では見られない肝・腎機能検査異常、リンパ球減少、

低血糖が報告され問題となっている。

(NASH や肝臓病態における Glutamine 代謝)

これまでの研究で、MASLD と、細胞内脂肪酸の蓄積や線維化に関与するグルタミン経路や尿素サイクルとの間に強い関連があることが報告されていた。実際、グルタミン代謝は脂肪性肝疾患の発症に重要な役割を果たしている。血清グルタミン濃度は健常人と脂肪性肝炎患者で有意差はないが、血清グルタミン酸濃度は一般的に脂肪性肝炎患者で高い。肝硬変や肝がんでは、低活性化型 GLS2 から高活性化型 GLS1 アイソフォームへの代謝転換が起こる (doi.org/10.18632/oncotarget.3196, DOI 10.1016/j.cmet.2011.12.015)。これはグルタミン分解の第一段階を触媒する。健康な肝臓では通常低値であるが、初期 MASH の前臨床マウスモデルや MASH 患者の肝生検では異常に高値であった。さらに、Duらは、線維化の重症度が上昇しても血清グルタミン濃度は変化しないが、グルタミン酸、グルタミン酸とグルタミンの比、トリカルボン酸(TCA)サイクルの中間体である α -ケトグルタル酸(α -KG)、および TCA サイクル内の後続代謝物が増加し、これらすべてが線維化の重症度の進行と相関することを指摘し、同等の結果を観察した(DOI: [10.1016/j.jcmgh.2019.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.12.006))。このことは、脂肪性肝疾患におけるホメオスタシスの破綻と類似している。さらに、Duらが、線維化した肝臓では GLS1 が誘導され、グルタミナーゼを阻害すると、線維化に関与する主要な肝細胞型である肝星状細胞(HSC)の活性化が阻害され、線維化の進行が停止することを示した (doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.022)。同様に、グルタミナーゼの有毒な副産物であるアンモニアの消去は、線維化の進行を防ぐために重要であることが示されている。これらの研究背景から、NASH モデルマウスを用いた GLS1 阻害の症状改善作用が詳細に解析されている。その結果は、NASH において GLS1 発現細胞が有意に増加し、肝線維化の進行と共に線維化部位に局在することが示されている。Gls1 の発現を siRNA で抑制すると、顕著に NASH 病態が改善することが示された。NASH 病態に老化細胞が関連していることは既に報告されており、これらの結果は NASH により生じた老化細胞の蓄積が GLS1 阻害により除去されて炎症症状が改善するとの考えに矛盾しないと考えた (doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.013)。

(老化細胞が GLS1 活性に依存する分子基盤)

GLS1 は KGA 型と GAC 型の 2 つのアイソフォームが存在し、老化細胞では特異的に KGA 型 GLS1 が発現誘導されることがわかった。KGA 型 GLS1 は尿細管上皮細胞において細胞内 pH の酸性化により mRNA が安定化し、その結果発現が増加することが知られている。興味深いことに、老化細胞でも同様の細胞内 pH の酸性化により KGA 型 GLS1 mRNA が安定化することで発現が増加することがわかった。

それではどうして老化細胞の細胞内 pH が酸性化するのだろうか？我々は老化細胞の細胞内構造の詳細な解析から、老化細胞内には異常なタンパク質凝集体が集積しており、その結果リソソーム膜に損傷が生じていることを見出した。興味深いことに、リソソーム膜の損傷

はそれだけで炎症性サイトカインの分泌を促進することもわかった。

以上の知見は、細胞内酸性化により誘導された KGA 型 GLS1 がアンモニアを産生させ、これが細胞内酸性化を中和させるために老化細胞の致死性が抑制されるものと考えられた。これらのことを踏まえて、老化、老化関連疾患に対して GLS1 阻害剤 BPTES の効果を解析した。老齢マウスを用いた老化表現は個体差が大きく解析が困難であると理解されている。このため、当時日本で最も厳密に老齢マウスを作製していた国立長寿医療研究センター老齢マウスファームで作製されたマウスコホートを用いて解析することにした。GLS1 阻害剤 BPTES は前述の様に水に難溶性のため投与方法にはコーンオイルを用いるなど工夫をし、薬物投与までを長寿医療研究センターで実施し、その後解析を医科学研究所で行なった。その結果、様々な老化病態や老年病が改善していることがわかった。

(我々の研究成果の追試)

我々の GLS1 阻害剤による老化関連病態の改善報告の後、多くの研究室から Senolytics や老齢病態の改善に関する類似の研究が追試され論文として報告されている。以下にその代表的な論文を紹介する。

Senolysis と直接関わるもの

- 1) Glutaminase inhibitors rejuvenate human skin via clearance of senescent cells: a study using a mouse/human chimeric model. Takaya K et al. *Aging* 14, 8914-1926 (2022) doi: 10.18632/aging.204391. 本研究では、ヒト皮膚細胞をマウスに移植するキメラ技術を用いて BPTES がヒト加齢皮膚に存在する老化細胞を効率的に除去し、皮膚の老化表現を改善することを報告している。
- 2) Removal of gemcitabine-induced senescent cancer cells by targeting glutaminase 1 improves the therapeutic effect in pancreatic ductal adenocarcinoma. Oyama K et al. *Int J Cancer* 154, 912-925 (2024) doi: 10.1002/ijc.34725. 本研究では、マウスに膵臓がん細胞を移植するモデルを用いて、不完全な gemcitabine により誘導された膵臓がん老化細胞が、BPTES により効率的に除去され、抗がん剤の効果を高めることを報告している。
- 3) Glutaminase-1 inhibition alleviates senescence of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells via senolysis. Lee EJ et al. *Stem Cells Transl Med* 13, 873-885 (2024) doi: 10.1093/stcltm/szae053. 本研究では、Ex vivo において老化間葉系幹細胞を BPTES が効率的に除去し、間葉系幹細胞移植による効果を顕著に高めることを報告している。
- 4) L-[5-¹¹C]Glutamine PET imaging noninvasively tracks dynamic responses of glutaminolysis in non-alcoholic steatohepatitis. Zhang Y et al. *Acta Pharmaceutica Sinica B* in press 2024 doi.org/10.1016/j.apsb.2024.07023 本研究は、NASH モデルにおいて BPTES を投与すると GLS1 陽性老化細胞を効率的に除去し、肝臓の炎症状態を改善することを報告している。

5) Inhibition of glutaminase elicits senolysis in therapy-induced senescent melanoma cells. Kim et al. bioRxiv 2024 doi.org/10.1101/2024.09.12.612728 本研究では、Cdk4/6 の阻害によるメラノーマ増殖抑制が生体内ではあまり効果的ではありません。この理由が、メラノーマ細胞の細胞老化誘導によると考え、Cdk4/6 阻害剤と GLS1 阻害剤と併用することでメラノーマ老化細胞を除去し、メラノーマの増殖を効果的に抑制できることを明らかにしました。

加齢病態の改善効果

1) Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis improves pathological cardiac remodeling. Am J Physiol. Heart and Circ Physiol 322, H749-H761 (2022) doi.org/10.1152/ajpheart.00692.2021

以上のように数年の間で多くの研究室から独立して GLS1 阻害剤 (BPTES, CB-839) の老化細胞除去、あるいは加齢病態の改善効果について in vivo および in vitro の両方において追試が成功している。しかしながら、BPTES 等の投与については水に難溶性であり投与方法には幾らかのコツがあるため、実験を独立して追試する場合は、中西 (mkt-naka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)、あるいは城村 (johmuray@staff.kanazawa-u.ac.jp) までご遠慮なくご連絡してください。

4) 老化細胞における免疫監視除去と免疫チェックポイント

我々の最近の研究により、老化細胞における免疫チェックポイント分子 PD-L1 (Programmed Cell Death Ligand 1) の発現に顕著な不均一性が存在することが明らかになった (doi: 10.1038/s41586-022-05388-4.)。加齢に伴い、PD-L1 陽性の老化細胞が蓄積し、これらの細胞は CD8 陽性 T 細胞による免疫監視を回避する高度な抵抗性を示す一方、PD-L1 陰性の老化細胞は免疫系による除去に対してより脆弱であることが示された。さらに、PD-L1 陽性の老化細胞は、PD-L1 陰性の老化細胞と比較して、より強い炎症特性を有することも確認された。

我々は、抗 PD-1 抗体が老化細胞の除去に与える影響について評価を行った。p16^{Ink4a}-Cre^{ERT2} マウスを用いて TAM 依存的に p16^{Ink4a} 陽性細胞を標識し、7 か月齢のマウスに抗 PD-1 抗体を投与したところ、肺、肝臓、腎臓における p16^{Ink4a} 陽性老化細胞が有意に減少することが明らかになった。特に、PD-L1 陽性老化細胞の減少が顕著であった。さらに、抗 PD-1 抗体と CD8 中和抗体を同時に投与した場合、老化細胞の減少は抑制され、これにより CD8 陽性 T 細胞が老化細胞の除去に不可欠な役割を果たしていることが示された。

続いて、老化細胞の除去が加齢に伴う老化表現型の改善に寄与するかを検討した。17.5 か月齢の老齢野生型マウスに抗 PD-1 抗体を投与した結果、老化に伴う肺胞容積の増加、肝臓の脂肪沈着、握力の低下、運動能力の低下が有意に改善された。これらの効果は 3 か月齢の

若年マウスでは観察されなかったことから、老化に特異的な現象であることが示唆された。また、コリン欠乏高脂肪食 (MCDHF) を与えて MASH (代謝機能障害関連脂肪性肝疾患) を誘発したマウスにおいても、抗 PD-1 抗体の投与は肝臓の脂肪沈着と炎症細胞の浸潤を顕著に抑制し、MASH 病態が劇的に改善した。

他の研究グループの成果との整合性も見られた。老齢マウスの糸球体上皮細胞では、PD-1 受容体およびその 2 つのリガンド (PD-L1 および PD-L2) の発現が増加することが報告されている (doi: 10.1172/JCI156250)。この研究では、抗 PD-1 抗体の投与が腎臓および肝臓の老化表現型を改善し、特に腎臓における糸球体上皮細胞の機能改善が顕著であったと報告されている。さらに、分節性糸球体硬化症 (FSGS) を誘発した若年マウスに抗 PD-1 抗体を投与したところ、尿タンパクの排泄量が減少し、糸球体上皮細胞の数が増加することが確認された。このメカニズムが、我々の解析で示された老化細胞の免疫除去を介したものかどうかは不明ではあるが、抗 PD-1 抗体の投与が健康寿命の改善につながることは両研究で一致している。

最近になり、CDK4/6 の阻害が、ユビキチン依存的な分解を抑制することで老化細胞における PD-L1 の安定性を高めることが報告された (doi: 10.1038/s41556-024-01465-0.)。同研究により、長期間の LPS 投与による慢性肺障害モデルマウスや加齢マウスにおいて、抗 PD-L1 抗体の投与により p16^{Ink4a} 陽性肺胞マクロファージの割合が減少することが示されたが、マクロファージ以外の p16^{Ink4a} 陽性の老化細胞種に対する影響は解析がなされていない。また、この介入により、慢性炎症の改善が認められる一方、慢性肺障害に関連する呼吸機能不全の改善や、加齢に伴う DNA メチル化時計の変化への影響は認められなかった。重要な点として、長期間の LPS 投与による慢性肺障害モデルマウスや加齢マウスに対する抗 PD-1 抗体の老化細胞の除去や病態改善の効果については、本論文中では検証されていない。一方、短期間の LPS 投与による急性肺障害モデルでは、抗 PD-L1 抗体と抗 PD-1 抗体の比較検討が行われており、抗 PD-L1 抗体の投与により p16^{Ink4a} 陽性肺胞マクロファージの割合が顕著に減少したが、抗 PD-1 抗体では同様の効果は見られなかった。p16^{Ink4a} を高発現するマクロファージを老化細胞と分類すべきか、活性化マクロファージと分類すべきかについては、現在も議論が続いている (doi: 10.18632/aging.101268.)。また、抗 PD-L1 抗体が FcγR 依存的なメカニズムを介して特定のマクロファージ集団の割合を減少させることが、別の報告 (doi: 10.1016/j.ccell.2015.08.004.) から示されている。これらの知見は、急性肺障害時に誘導される p16^{Ink4a} 陽性マクロファージが、MASH 等の加齢関連疾患の病態進行や加齢に伴い誘導される老化細胞と類似した特性を有するかどうかを解明する必要性を示唆している。さらに、抗 PD-L1 抗体が p16^{Ink4a} 陽性マクロファージの除去をどのような分子メカニズムで媒介するかを明らかにするためのさらなる研究が必要である。

以上の知見から、抗 PD-L1 抗体および抗 PD-1 抗体を用いた免疫チェックポイント阻害のいずれも、老化細胞に対する免疫監視機構を増強することで老化細胞の除去に関与しており、投与量や投与期間、および標的となる老化細胞種の特性に応じて、各抗体の効果に差

異が生じる可能性があると思われ、我々は考えている。

以上、これらの研究報告は我々の抗 PD-1 抗体投与による PD-L1 陽性 p16^{Ink4a} 陽性老化細胞の除去や、加齢関連病態の改善効果と全く相反するものではなく、これまでの個体内の老化細胞が示す多様な性質を裏付ける結果と理解している。