

アンジオテンシン・C1q 系による老化制御と病態形成の機序解明

赤澤 宏

東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学

【研究の背景】

加齢にともない様々な環境的因子や遺伝的因子によって、高血圧や動脈硬化、心不全、糖尿病、認知症、骨粗鬆症、がんなどのいわゆる老化関連疾患が併発しやすくなり、臓器障害や機能低下が病的に促進されて個体死の時期が早まる。わが国では高齢化が急速な勢いで進行し、高齢者に対する医療費が増大傾向にあることから、老化関連疾患の有効な予防法や治療法の確立が社会全体の急務となっている。

老化は慢性炎症を惹起し、老化関連疾患の発症において慢性炎症の重要性が示唆されており、慢性炎症は個体老化と老化関連疾患に共通する基盤病態であると考えられる。しかし、慢性炎症がどのようなメカニズムで個体老化の進行や老化関連疾患の発症に寄与しているのかはこれまで明らかではなかった。

私たちは、補体分子 C1q が老化にともなう骨格筋萎縮の原因となることを明らかにした (Cell. 2012)。C1q はマクロファージで産生され、C1r、C1s と共に C1 複合体を形成し、Wnt の共役受容体である LRP5/6 を切断することにより β カテニンシグナルを活性化し、骨格筋再生能低下を引き起こす。これまでの解析から、C1q・ β カテニン系は高血圧にともなう大動脈リモデリング (Nat Commun. 2015) や心不全における骨格筋萎縮 (Circ Heart Fail. 2015) においても重要な役割を果たしていることを明らかにしている。一方で、アンジオテンシン II タイプ 1 (AT_1) 受容体ノックアウトマウスは老化にともなう骨格筋萎縮が軽度で、寿命が延長していること、さらに AT_1 受容体シグナルの阻害によって C1q の発現が低下し、筋力の回復が促進することから (Sci Rep. 2015)、アンジオテンシン・C1q 系の活性化が老化関連疾患の発症や進展に関わっている可能性が示唆されている。

【目 的】

本研究では、アンジオテンシン・C1q 系による老化制御と疾患発症機序を解明し、その研究成果を基盤として老化関連疾患に対する新たな治療戦略の確立を目指す。

【方 法】

① アンジオテンシン・C1q 系活性化の分子機構の解明

AT_1 受容体が活性化し β -arrestin 2 と会合することを検出できる AT_1 受容体-EGFP レポーターマウスを新たに作成し、老化にともない AT_1 受容体が活性化し C1q を産生する細胞を同定する。

② 老化関連疾患におけるアンジオテンシン・C1q 系の病態生理学的意義の解明

老化関連疾患である心不全のモデルマウスを作成し、 AT_1 受容体ノックアウトマウスにおける C1q・ β カテニン系の活性化を評価し、アンジオテンシン・C1q 系の病態生理学的意義を解明する。

③ アンジオテンシン・C1q 系を標的とした新たな老化関連疾患治療法の開発

C1q の発現と作用を検出するルシフェラーゼアッセイ系と C1q 蛋白質の分泌を指標とした ELISA を用いたアッセイ系で、化合物ライブラリーを用いた網羅的なスクリーニングを行い、アンジオテンシン・C1q 系活性化の阻害因子の探索を行う。

【結 果】

① アンジオテンシン・C1q 系活性化の分子機構の解明

AT₁ 受容体の C 末端に TEV プロテアーゼ認識配列 (tevs)+テトラサイクリン制御性トランス化因子 (tTA)、その下流に IRES-β-arrestin 2-TEV を繋いだコンストラクトを使い、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集の手法でノックインマウスを作成し、このマウスと TRE-ヒストン H2B-EGFP レポーターマウスの交配を行っている。AT₁ 受容体が活性化すると β-arrestin 2-TEV が AT₁ 受容体-tevs-tTA にリクルートされ、TEV によって tevs が切断されて tTA が切り離され、TRE に結合し H2B-EGFP の発現が誘導される。

② 老化関連疾患におけるアンジオテンシン・C1q 系の病態生理学的意義の解明

左前下行枝結紮による心筋梗塞モデル、および横行大動脈縮窄による圧負荷モデルを作成したところ、AT₁ 受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて、血中および心筋組織での C1q の発現増加が抑制されていた。

③ アンジオテンシン・C1q 系を標的とした新たな老化関連疾患治療法の開発

C1qa 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を結合させたコンストラクトを用いた解析系の確立のためにマウスマクロファージ由来株である Raw264.7 細胞を用いていたが、Raw264.7 細胞とプライマリーマクロファージ(骨髄由来マクロファージ、腹腔内マクロファージ)との間では C1q の発現制御が大きく異なっていることが強く示唆されるデータを得た。また、C1q タンパク分泌を指標としたスクリーニング系の構築がより生理的に有意義であると考えられるので、単球系細胞が分泌した C1q を検出する評価系の確立を進めた。ハイスループット解析が可能な系としてフローサイトメリーと ELISA を用いたアッセイ系を検討した結果、ELISA がスクリーニングに適していることを確認できた。その上で、単球系細胞において IL-4 および IFN γ が相乗的に *C1qa* の遺伝子発現および C1q タンパク発現・分泌を増加させることを確認した。

【考 察】

AT₁ 受容体の活性化を可視化できるインディケーターマウスを作成した。AT₁ 受容体-EGFP レポーターマウスと C1q-LacZ レポーターマウスと交配することで、AT₁ 受容体が活性化し C1q を産生する細胞を標識することができる。この手法を用いて、老化関連疾患において AT₁ 受容体が活性化し C1q を産生する細胞の同定を試みている。

心筋梗塞モデルおよび圧負荷モデルでは、AT₁ 受容体ノックアウトマウスで血中および心筋組織での C1q 発現増加が抑制されていたことから、心不全の発症においてもアンジオテンシン・C1q 系の活性化が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。現在は、この系において C1q 投与が AT₁ 受容体ノックアウトマウスにおける心不全発症にどのような影響を与えるかを検討している。

C1q タンパク分泌を指標とした ELISA によるスクリーニング系を確立したので、今後は C1q 発現増加を抑制する因子の探索を化合物ライブラリーや siRNA,shRNA ライブラリーを用いた網羅的なスクリーニングを今後行う予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

医療技術の進歩、公衆衛生の充実によって日本人の平均寿命は延長しており、65歳以上の高齢者の割合は2050年には約40%まで増加するものと予想されている。したがって、高齢者に多くみられる疾患の発症機構を明らかにし、その予防法と治療法を開発することは、社会的にも必須の課題である。本研究から得られる成果は、老化関連疾患に共通の基盤病態を明らかにするとともに、老化関連疾患全般に広く応用可能な新たな治療法の開発につながる可能性が考えられる。わが国における老化関連疾患の治療を推進させることで、国民の健康を増進させ、高騰する医療費の軽減に貢献しようという点においても、社会的・経済的メリットが非常に大きいと言える。

【参考・引用文献】

1. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 149:1298-1313,2012.
2. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Morita H, Komuro I. Complement C1q-induced activation of β-catenin signaling causes hypertensive arterial remodeling. *Nat*

Commun. 6:6241,2015.

3. Okada K, Naito AT, Higo T, Nakagawa A, Shibamoto T, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Sumida T, Nomura S, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Morimoto S, Sakata Y, Shiojima I, Komuro I. Wnt/ β -catenin signaling contributes to skeletal myopathy in heart failure via direct interaction with FoxO. *Circ Heart Fail.* 8:799-808,2015.
4. Yabumoto C, Akazawa H, Yamamoto R, Yano M, Kudo-Sakamoto Y, Sumida T, Kamo T, Yagi H, Shimizu Y, Saga-Kamo A, Naito AT, Oka T, Lee JK, Suzuki J, Sakata Y, Uejima E, Komuro I. Angiotensin II receptor blockade promotes repair of skeletal muscle through down-regulation of aging-promoting C1q expression. *Sci Rep.* 5:14453,2015.