

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03173

研究課題名(和文) 肺の抗酸化能修飾による老化制御の試みとアンチエイジングへの応用

研究課題名(英文) The role of oxidative stress on aging

研究代表者

石井 幸雄 (Ishii, Yukio)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80272194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：老化のスピードは環境因子に大きく影響される。肺は環境因子に対するファーストラインの防御を司る組織であり、肺のストレス消去能の差異は老化スピードを規定するのではないかとの仮説のもとに研究を行った。Nrf2は酸化ストレス応答の基幹をなす因子であり、肺に多く存在する。Nrf2の活性化は肺組織の酸化ストレス防御を高め、疾患に関連した細胞老化を抑制しうることで、さらに老化関連肺感染症である、肺非結核性抗酸菌症、および肺炎球菌性肺炎の発症進展に抑制的に作用することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命を延伸することは高齢化社会における本質的な対策である。老化を遅らせること、老化関連疾患を予防管理することは健康寿命延伸の最も有効な方法と考えられる。今回の研究において、肺の抗酸化能の差異が老化スピードに影響を及ぼすことが明らかになり、Nrf2の誘導的活性化が健康寿命の延伸や、アンチエイジングに有用である可能性が示された。またNrf2の活性化は、老化関連肺感染症であり最近関心の高まっている肺非結核性抗酸菌症や肺炎球菌性肺炎の発症予防や重症化予防にもつながることが示され、研究成果は老年医学および感染症学分野で意義のあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aging rate is regulated by environmental factors, such as oxidative stress. Because lung is the most important organ exposed to environmental agents, the degree of lung antioxidative activity is thought to be related to aging rate. Nrf2 is a transcription factor regulating the intracellular antioxidant responses. Nrf2 is expressed abundantly in the lung. In the present study, therefore, we investigate the protective effects of Nrf2 on the development of aging-related pulmonary infections. In both pneumococcal pneumonia and non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease models in mice, survival rate after the infections was lower in elderly mice than in young mice. The degree of pulmonary inflammation and lung bacterial growth after the infections were higher in elderly mice than in young mice with less pulmonary activation of Nrf2. These results suggest that Nrf2 plays a protective role in the development of aging-related pulmonary infections.

研究分野：老年医学

キーワード：老化 肺 転写因子 酸化ストレス アンチエイジング

## 1. 研究開始当初の背景

世界の高齢化率は急速に上昇しており、高齢化社会への対策は喫緊の課題である。我が国は世界一の長寿国であるが、平均寿命と日常生活に支障のない寿命、すなわち健康寿命との差は約10年と、両者にはかなりの差があるのが実状であり、健康寿命を延伸することは喫緊の課題である。老化とは、生物学的には個体の成熟終了後の生体機能の衰退であり、社会的には日常生活の支障を伴う。老化は様々な疾病の発症にも密接に関与し、老化を遅らせることは健康寿命延伸の最も本質かつ有効な方法と考えられる。実際、食事制限やサーチュイン遺伝子導入による老化遅延が、健康寿命を反映する指標である中間寿命を延伸することが、マウスなどのモデル動物で示されている。

老化のスピードには個人差があり、そのスピードは遺伝子情報などの内因性の要素に加え、環境因子の影響により大きく変わることは喫煙、非喫煙の双子研究からも明らかである。血流を介した因子が老化を制御することが、マウス並体結合を用いた研究で示され、喫煙による全身の老化促進も何らかの液性因子が関与していることは想像に難くない。肺は大気と直接につながり、全ての血液が流れる組織でもあることから、環境因子に対するファーストラインの防御組織と考えることができる。喫煙を始めとする環境因子の生体影響の主体は酸化物や中間代謝物による酸化ストレスである。以上より、肺組織における酸化ストレスは液性因子を介して老化を促進するのではないかと、環境因子処理機能(ストレス消去能)の差異は老化のスピードを規定するのではないかと、および肺組織における抗酸化能の強化は老化スピードを遅延させうるのではないかと、との問いを持つに至った。

## 2. 研究の目的

上述の問い、すなわち、1)肺への環境因子によるストレス負荷が全身の老化を促進すること、2)肺組織のストレス消去能の差異が個体の老化スピードを規定すること、および3)肺の抗酸化能を強化することで老化のスピードを遅延させることができること、これらを明らかにすることを本研究の目的とした。

転写因子 Nrf2 は酸化ストレスなどの環境因子で活性化され、様々な抗酸化遺伝子を統一的に誘導する、細胞レベルの抗酸化ストレス応答の基幹をなす因子である。肺には Nrf2 が豊富に存在しており、肺に端を発する老化制御に Nrf2 が密接に関与している可能性がある。肺感染症は高齢者に発症しやすく、健康寿命を脅かす呼吸器系の代表的疾患である。肺非結核性抗酸菌症は中年以降の女性に好発する高齢者感染症で近年その罹患率は増加している。肺炎球菌は高齢者肺炎の起原菌として最多であり、高齢者では重症化しやすいことが知られている。

したがって、本研究では肺の抗酸化能と老化スピードとの関連を動物モデル、特に Nrf2 遺伝子改変マウスを用いたモデルを用いて明らかにするとともに、上述の高齢肺感染症に及ぼす老化の影響を解析し、Nrf2 を介した抗酸化修飾がこれら高齢感染症の感受性に及ぼす影響を明らかにするため、研究を行った。

## 3. 研究の方法

・1歳齢の野生型マウス、および同系の Nrf2 を欠損するマウスを清浄空気曝露、標準飼料摂取下に1年間飼育し、生存率、中間寿命を測定した。各マウスから経時的に肺組織、主要

臓器（肝臓、腎臓、心臓）を採取し、老化関連βガラクタゲ-ゼ、p16INK4aの発現などを指標に細胞老化を定量評価した。各組織のNrf2活性化を免疫染色で解析した。血液・尿を採取し、酸化ストレス、抗酸化力の程度を測定した。

・1歳齢の野生型マウス、および同系のNrf2を欠損するマウスに対し、Nrf2の誘導的活性化化合物として、スルフォラファンを経口投与し、生存率、中間寿命を同様に測定した。各臓器のNrf2活性化を確認し、細胞老化を定量評価した。

・70週齢の野生型マウス、および同系のNrf2を欠損するマウスに、非結核性抗酸菌（*M. avium*）、ないしは肺炎球菌を経気道投与し、肺非結核性抗酸菌症モデル、肺炎球菌性肺炎モデルを作成した。それぞれのモデルにおいて、感染後の生存率を測定し、各マウスで比較した。経時的に気管支肺洗浄を施行し、炎症細胞数を測定した。同様に経時的に肺組織を採取し、菌量を定量するとともに、病理変化を観察した。老化関連βガラクタゲ-ゼ、p16INK4aの発現、Nrf2活性化の程度を解析した。血液・尿を採取し、酸化ストレス、抗酸化力の程度を測定した。

#### 4. 研究成果

初年度研究ではNrf2を欠損するマウスを用い、通常環境における老化スピードや臓器の老化の程度を評価した。清浄空気曝露、標準飼料摂取下に飼育したNrf2欠損マウスは、80週齢までの時点で死亡率、および主要臓器の老化関連マーカーの経時変化において、野生型マウスとの間での差異を認めなかった。Nrf2は誘導型のストレス防御システムであり、本飼育条件ではNrf2活性化そのものが限定的であると考えられた。

次年度研究では、Nrf2を活性化させたモデルを用いて、老化に及ぼす影響を検討した。野生型マウスに、Nrf2の誘導的活性化化合物としてスルフォラファンを投与し、清浄空気曝露、標準飼料摂取下に飼育した。同条件下でもNrf2誘導的活性化の有無による死亡率や老化関連マーカーの経時変化に差異は見られず、非ストレス環境におけるNrf2活性化の老化に及ぼす上乗せ効果は限定的と思われた。

3年目には、老化関連疾患として肺非結核性抗酸菌症モデルを作成し、死亡率等の検討を行った。Nrf2欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、感染後の死亡率や肺組織の病理変化の程度が高まっており、疾患に関連した老化に対し、抑制的に作用するものと思われた。

最終年度では、老化関連疾患として肺非結核性抗酸菌症モデル、および肺炎球菌性肺炎モデルを作成し、解析を行った。両モデルともに、高齢マウスでは若年マウスに比べ感染後の死亡率や肺炎症の程度が亢進しており、高齢マウスの比較ではNrf2欠損マウスは野生型マウスに比べて更なる増悪が見られた。Nrf2は、老化に関連した疾患の発症に対し抑制的に作用する可能性が示唆された。肺炎球菌性肺炎モデルの肺組織を用いたシングルセルRNA-seq解析では幾つかの動遺伝子が同定され、今後これら遺伝子の老化関連疾患感受性に及ぼす役割を解明していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsunoda Yoshiya, Sherpa Mingma Thsering, Kiwamoto Takumi, Matsuyama Masashi, Osawa Hajime, Sakurai Hirofumi, Hayashi Shigen, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Has2 deficiency enhances OVA induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2214 ~ 2218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuyama Masashi, Nonaka Mizu, Nakajima Masayuki, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of NRF2 in Mycobacterial Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10121861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kawaguchi Mio, Matsumura Sosuke, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma Thsering, Yazaki Kai, Tanaka Ryota, Okiyama Naoko, Muratani Masafumi, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Depletion of PD-1 or PD-L1 did not affect the mortality of mice infected with Mycobacterium avium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97391-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazaki Kai, Matsuno Yosuke, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma, Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 100
2. 論文標題 ROS-Nrf2 pathway mediates the development of TGF- 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the activation of Notch signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2021.151181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ano Satoshi, Kikuchi Norihiro, Matsuyama Masashi, Nakajima Masayuki, Kondo Yuzuru, Masuda Michiko, Osawa Hajime, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptome genetic differences between responders and non-responders before bronchial thermoplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asthma	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02770903.2021.1945088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda Yoshiya, Sherpa Mingma Thsering, Kiwamoto Takumi, Matsuyama Masashi, Osawa Hajime, Sakurai Hirofumi, Hayashi Shigen, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Has2 deficiency enhances OVA induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2214-2218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kawaguchi Mio, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma, Yazaki Kai, Osawa Hajime, Muratani Masafumi, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Nrf2 Regulates Granuloma Formation and Macrophage Activation during Mycobacterium avium Infection via Mediating Nramp1 and HO-1 Expressions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01947-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01947-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Shigen, Matsuno Yosuke, Tsunoda Yoshiya, Sakurai Hirofumi, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoh Keigyou, Takahashi Satoru, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Transcription Factor T-bet Attenuates the Development of Elastase-induced Emphysema in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 525~536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-01090C	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai Hirofumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoshida Kazufumi, Nakajima Masayuki, Tsunoda Yoshiya, Hayashi Shih-Yuan, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Kawaguchi Mio, Yamamoto Masayuki, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 129
2. 論文標題 Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno Yosuke, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki, Hogaboam Cory M.	4. 巻 97
2. 論文標題 Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 512 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2018.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Nakajima M, Matsuyama M, Kawaguchi M, Sherpa M, Osawa H, Yoshida K, Yazaki K, Kiwamoto T, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N
2. 発表標題 Role of Nrf2 in pulmonary MAC infection using mice model.
3. 学会等名 2020 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sherpa M, Kiwamoto T, Tsunoda Y, Osawa H, Yoshida K, Nakajima M, Matsuyama M, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Hyaluronan synthase 2 attenuates airway inflammation and remodeling in an ovalbumin-induced chronic mouse model of asthma.
3. 学会等名 2020 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋 真之, 松山 政史, 川口未央, Mingma Sherpa, 大澤 翔, 矢崎 海, 吉田 和史, 塩澤利博, 中澤健介, 小川良子, 際本 拓未, 松野 洋輔, 森島 祐子, 石井 幸雄, 坂本 透, 檜澤 伸之
2. 発表標題 マウスを用いた肺MAC感染モデルにおけるNrf2の役割
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida K, Morishima Y, Sakurai H, Sherpa M, Tsunoda Y, Nakajima M, Matsuyama M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Deletion of Elovl6 alters fatty acid composition in lung tissue and enhances allergic airway inflammation.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima M, Matsuyama M, Kawaguchi M, Sherpa M, Yoshida K, Kiwamoto T, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Role of PD-1 pathway in pulmonary MAC infection using mice model.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sherpa M, Kiwamoto T, Tsunoda Y, Yoshida K, Osawa H, Nakajima M, Matsuyama M, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Hyaluronan synthase 2 (HAS2) mediates airway inflammation and remodeling in chronic ovalbumin model of asthma.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuno Y, Matsuyama M, Kiwamoto T, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N
2. 発表標題 ROS-Nrf2 pathway mediates the development of TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the interaction with notch signaling
3. 学会等名 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森島 祐子  (MORISHIMA YUKO)  (10375511)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	
研究分担者	松野 洋輔  (MATSUNO YOSUKE)  (30633177)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------