



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117915953 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 19

(21) 申请号 202280060565.1	A61K 31/08 (2006.01)
(22) 申请日 2022.09.06	A61K 31/138 (2006.01)
(30) 优先权数据 2021-145812 2021.09.07 JP	A61K 31/166 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.03.07	A61K 31/352 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2022/033445 2022.09.06	A61K 31/366 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/038027 JA 2023.03.16	A61K 31/4025 (2006.01)
(71) 申请人 国立大学法人京都大学 地址 日本京都府	A61K 31/403 (2006.01)
(72) 发明人 近藤祥司 三河拓己	A61K 31/407 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事 务所(普通合伙) 11277 专利代理师 刘新宇 李茂家	A61K 31/409 (2006.01)
(51) Int. Cl. A61K 45/00 (2006.01)	A61K 31/4155 (2006.01)
	A61K 31/4178 (2006.01)
	A61K 31/4188 (2006.01)
	A61K 31/4196 (2006.01)
	A61K 31/437 (2006.01)
	A61K 31/4375 (2006.01)
	A61K 31/438 (2006.01)
	A61K 31/444 (2006.01)
	A61K 31/4709 (2006.01)
	A61K 31/473 (2006.01)

(续)

权利要求书2页 说明书27页
序列表(电子公布) 附图52页

(54) 发明名称

衰老细胞清除药的筛选方法和衰老细胞清除药

1种作为有效成分。

(57) 摘要

本发明的目的在于,提供能够高效地发现新的衰老细胞清除药的筛选方法,另外提供通过该筛选方法而得到的衰老细胞清除药。本发明为阻断PGAM与Chk1的结合、还选择性地使衰老细胞死亡的衰老细胞清除药。具体而言,本发明的衰老细胞清除药含有选自自由mRSK1激酶阻断剂、Fak激酶阻断剂、Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂、CDK阻断剂、钙拮抗剂、强心苷、DNA损伤剂、抗菌剂、极光激酶阻断剂、类黄酮、PI3K激酶阻断剂、HDAC阻断剂、老年性黄斑变性治疗药、p38MAPK阻断剂、mTOR阻断剂、酪氨酸激酶阻断剂、Bcl-2阻断剂、胆固醇合成酶阻断剂、血清素受体拮抗药、其它激酶阻断剂和Nutlin 3b组成的组中的至少



CN 117915953 A

[接上页]

(51) Int.Cl.

<i>A61K 31/495</i> (2006.01)	<i>A61K 31/7012</i> (2006.01)
<i>A61K 31/498</i> (2006.01)	<i>A61K 31/7028</i> (2006.01)
<i>A61K 31/4985</i> (2006.01)	<i>A61K 31/704</i> (2006.01)
<i>A61K 31/502</i> (2006.01)	<i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
<i>A61K 31/505</i> (2006.01)	<i>A61K 31/713</i> (2006.01)
<i>A61K 31/506</i> (2006.01)	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
<i>A61K 31/519</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)
<i>A61K 31/52</i> (2006.01)	<i>G01N 33/15</i> (2006.01)
<i>A61K 31/53</i> (2006.01)	<i>G01N 33/52</i> (2006.01)

1. 一种衰老细胞清除药,其阻断PGAM与Chk1的结合,还选择性地使衰老细胞死亡。
2. 根据权利要求1所述的衰老细胞清除药,其含有选自由RSK1激酶阻断剂、Fak激酶阻断剂、Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂、CDK阻断剂、钙拮抗剂、强心苷、DNA损伤剂、抗菌剂、极光激酶阻断剂、类黄酮、PI3K激酶阻断剂、HDAC阻断剂、老年性黄斑变性治疗药、p38MAPK阻断剂、mTOR阻断剂、酪氨酸激酶阻断剂、Bcl-2阻断剂、胆固醇合成酶阻断剂、血清素受体拮抗药、其它激酶阻断剂和Nutlin 3b组成的组中的至少1种作为有效成分。
3. 根据权利要求2所述的衰老细胞清除药,其中,
RSK1激酶阻断剂为RSK1的反义核酸、RSK1的siRNA或BI-D1870,
Fak激酶阻断剂为PF-00562271或PF-431396,
Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂为PHA-665752或CP-100356,
CDK阻断剂为SNS-032、AZD5438、夫拉平度(阿伏西地)、PHA-793887、AT7519或PHA-767491,
钙拮抗剂为马尼地平或洛美利嗪2HCl,
强心苷为海葱次苷A或地高辛,
DNA损伤剂为多柔比星(阿霉素)HCl、柔红霉素HCl、表柔比星HCl、米托蒽醌2HCl或羟喜树碱,
抗菌剂为氨基吡啶、三氯生或乳酸依沙吡啶,
极光激酶阻断剂为AMG-900或JNJ-7706621,
类黄酮为白杨素,
PI3K激酶阻断剂为PF-05212384或XL147,
HDAC阻断剂为曲古柳菌素A(TSA),
老年性黄斑变性治疗药为维替泊芬,
p38MAPK阻断剂为SB203580或达马莫德(BIRB796),
mTOR阻断剂为AZD8055或KU-0063794,
酪氨酸激酶阻断剂为来那替尼、尼达尼布或NVP-BHG712,
Bcl-2阻断剂为TW-37,
胆固醇合成酶阻断剂为美伐他汀,
血清素受体拮抗药为RS-127445,
其它激酶阻断剂为BMS-345541或CX-4945。
4. 一种衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:
(A) 对于受试物质,测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序;和
(B) 对于通过所述工序(A)判断为具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。
5. 根据权利要求4所述的筛选方法,其特征在于,在所述工序(B)中,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质。
6. 一种衰老细胞清除药,其具有使HIF-2 α 失活的作用,还选择性地使衰老细胞死亡。
7. 根据权利要求6所述的衰老细胞清除药,其含有HIF-2 α 阻断剂作为有效成分。
8. 根据权利要求7所述的衰老细胞清除药,其中,HIF-2 α 阻断剂为HIF-2 α 的反义核酸或

siRNA。

9. 一种衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:

(X) 对于受试物质,测定HIF-2 α 阻断活性的工序;和

(Y) 对于通过所述工序(X)判断为具有HIF-2 α 阻断活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。

10. 根据权利要求9所述的筛选方法,其特征在于,在所述工序(Y)中,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质。

衰老细胞清除药的筛选方法和衰老细胞清除药

技术领域

[0001] 本发明涉及衰老细胞清除药 (Senolytics Drug) 的筛选方法和通过该筛选方法得到的新的衰老细胞清除药。

背景技术

[0002] 目前,日本是世界上唯一的老龄化率超过25% (2014年) 的国家。虽然老龄化率的世界平均值为8%,但是全球老龄化的浪潮正在逐步推进,推测2050年左右欧洲各国、中国、韩国、泰国、新加坡、伊朗、智利、加拿大等的老龄化率会超过25%,世界平均值也将达到18% (WHO预测)。其中,全球老龄化的实际状态是,老年人整体上健康状况有所改善,同时疾病缠身的老年人增加。因此,仅基于时间轴的“衰老”定义与现状不符,需要重新对老年人进行定义 (2017年日本老年医学会提议),针对新增的老年性疾病的基于新策略的药品开发已成为紧迫的课题。

[0003] 基础性衰老研究中的细胞衰老研究的成果也日益表明,“日历年龄”与老年人的现状 (症状) 不符。以往,随着细胞的衰老,端粒 (随着细胞分裂而变短的染色体末端结构) 的长度会变短,因此端粒也被称为“衰老时钟”。但是,近年来,作为端粒非依赖性细胞衰老,发现了“应激性细胞衰老” (即使为年轻细胞、即端粒长的细胞,也由于各种应激而衰老)。该“应激性细胞衰老”一方面作为“抑制致癌的生物体防御机制” (正的效果) 受到关注,另一方面获知,由于应激而衰老的细胞也会牵连周围的细胞并有助于“慢性炎症”、“癌变”之类的负的效果。该发现正是最新的基础性衰老研究的成果之一。

[0004] 具体而言,首先,Adler等的详细研究表明,“衰老细胞与年轻细胞相比不易死亡”的原因之一是获得了Bcl-2活化等抗凋亡能力 (细胞死亡抗性) (非专利文献1:Adler et al., 2007)。负责该Bcl-2活化的转录因子为NF- κ B,但是NF- κ B也是炎症控制的关键因子,也成为衰老细胞中炎症得以活化的原因。几乎同时地,Campisi等发现,衰老细胞与年轻细胞相比容易分泌IL-1、IL-6等炎症性细胞因子,命名为SASP (Senescence associated secretory phenotype、衰老相关分泌因子) 并进行了报道 (非专利文献2:Coppe et al., 2008)。源自衰老细胞的SASP被认为有助于加速周围细胞的衰老、癌变,细胞衰老被认为是通过“慢性炎症”诱导个体衰老的一个因素。由以上的见解,推测“应激性细胞衰老”为衰老、老年性疾病的重要进展原因之一。

[0005] 基于上述见解而作为老年性疾病的新的可能的医疗手段而登场的是“衰老细胞清除” (Senolysis; 衰老细胞除去)。这是基于如果除去如上所述的作为慢性炎症的重要基础的衰老细胞则能够改善个体衰老这一崭新的设想而提出的。Darren Barker等使用BubR1亚效小鼠这一显示早衰的品系的小鼠,成功地仅选择性地使衰老细胞 (衰老标志物p16INK4a阳性细胞) 死亡,即除去了遗传学上的衰老细胞,同时也改善了各种器官的衰老现象。这是通过裂解遗传学上的衰老细胞而延迟小鼠个体衰老表型的首次报道 (非专利文献3:Baker et al., 2011)。另外,最近发现了显示同样行为的药剂 (ABT263),其被称为衰老细胞清除药 (非专利文献4:Chang et al., 2016)。以往,ABT263是作为Bcl-2阻断剂而开发的抗癌剂 (非

专利文献5:Tse et al.,2008),也与上述Adler等的见解(Bcl-2亢进为衰老细胞的抗凋亡原因)相符。ABT263处理在小鼠个体中也改善了衰老、动脉硬化(非专利文献4:Chang et al.,2016、非专利文献6:Childs et al.,2016)。

[0006] 作为衰老细胞清除药,除了上述Bcl-2阻断剂(ABT263)以外也有其它报道。Yi Zhu等(JL Kirkland研究组)从基于衰老细胞转录组分析等信息筛选而得的46种药剂中,发现D+Q(达沙替尼+槲皮素)这一组合可发挥衰老细胞清除效果。达沙替尼是作为BCR-ABL等酪氨酸激酶阻断剂起作用的抗癌剂,槲皮素是类黄酮中的一种,是PI3K激酶阻断剂(非专利文献7.:Zhu et al.,2015)。

[0007] 另外,两个研究组同时发现了强心苷所带来的衰老细胞清除效果(非专利文献8:Guerrero et al.,2019、非专利文献9:Triana-Martinez et al.,2019)。原本已知强心苷为通过阻断细胞表面的Na⁺/K⁺泵来增强心肌细胞的心衰治疗药。发现在衰老细胞中通过阻断Na⁺/K⁺泵而诱导NOXA(Bcl-2同源物)、诱导凋亡。

[0008] 另一方面,糖酵解代谢是通过将细胞所摄取的葡萄糖分解来合成ATP之类的高能分子的代谢过程的总称。糖酵解代谢存在两种途径:由作为糖酵解代谢的中间产物的丙酮酸来合成乳酸的过程,和在线粒体中进行氧化磷酸化的过程。前者由于不需要有氧呼吸而被称为厌氧糖酵解代谢,后者由于通过线粒体有氧呼吸而合成ATP,因此被称为有氧糖酵解代谢。该糖酵解代谢在几乎所有的常见细胞中承担着能量代谢的重要作用,是个体生存必不可少的。因此,糖酵解代谢的异常与人类疾病密接相关。

[0009] 糖酵解代谢降低时会导致神经变性疾病、心脏功能降低、糖尿病、肌肉萎缩、贫血等,另一方面,也已知一些糖酵解代谢亢进的疾病。作为糖酵解代谢亢进的疾病,可列举例如癌症、缺血(血流降低)、局部炎症等,特别地,在多种癌细胞中糖酵解代谢是亢进的(瓦氏效应;非专利文献10;Warburg O.,Science,1956,124:p.269-270),已知其为癌症细胞生物学的特征之一。实际上,在现在的临床现场中,利用该性质的FDG(氟脱氧葡萄糖)-PET被用于评价患者体内的肿瘤大小、有无转移,已广泛普及。

[0010] 糖酵解代谢途径由10种糖酵解酶的顺序反应构成。糖酵解酶磷酸甘油酸变位酶PGAM为其中的第8个酶,催化3-磷酸甘油酸(3PG)向2-磷酸甘油酸(2PG)的转化反应。本发明人们发现,通过使细胞强表达PGAM来诱导糖酵解亢进和氧化应激减弱效果,细胞变得不易衰老,另一方面,如果使PGAM失活则会诱导应激衰老(非专利文献11:Kondoh et al.,2005;非专利文献12:Mikawa et al.,2014)。另外,在细胞内,PGAM与作为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶的Chk1结合,并且该物理性结合在糖酵解代谢中发挥重要的作用,还发现,通过控制该物理性结合可控制糖酵解。进而,还成功发现了特异性阻断癌症中的糖酵解代谢的物质以及在想要抑制细胞衰老的细胞、组织中发挥抗衰老效果(anti aging effect)的物质等新的糖酵解代谢控制物质(专利文献1)。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:日本特开2018-194299号公报

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Adler et al.,Genes Dev.,2007,21,3244-3257

[0016] 非专利文献2:Coppe et al.,PLoS Biol.,2008,6,2853-2868

- [0017] 非专利文献3:Baker et al.,Nature,2011,479,232-236
- [0018] 非专利文献4:Chang et al.,Nat.Med.,2016,22,78-83
- [0019] 非专利文献5:Tse et al.,Cancer Res.,2008,68,3421-3428
- [0020] 非专利文献6:Childs et al.,Science,2016,354,472-477
- [0021] 非专利文献7:Zhu et al.,Aging Cell,2015,14,644-658
- [0022] 非专利文献8:Guerrero et al.,Nat Metab.2019,1,1074-1088
- [0023] 非专利文献9:Triana-Martinez et al.,Nat.Comm.,2019,10,4731
- [0024] 非专利文献10:Warburg O.,Science,1956,124,269-270
- [0025] 非专利文献11:Kondoh et al.,Cancer Res.,2005,65,177-185
- [0026] 非专利文献12:Mikawa et al.,J.Cell Biol.,2014,204,729-745

发明内容

[0027] 发明要解决的问题

[0028] 在上述这种现状下,本发明的目的在于,提供能够高效发现新的衰老细胞清除药的筛选方法,另外提供通过该筛选方法而得到的衰老细胞清除药。

[0029] 用于解决问题的方案

[0030] 本发明人们为了解决上述课题进行了深入研究,结果,作为能够高效发现新的衰老细胞清除药的筛选方法,建立了具有初级筛选工序和次级筛选工序的筛选方法,所述初级筛选工序测定受试物质的、阻断PGAM与Chk1物理性结合的活性,所述次级筛选工序测定选择性除去衰老细胞的活性。并且,利用该筛选方法发现了多种新的衰老细胞清除药。进而,对PGAM1-Chk1途径的下游转录因子进行了分析,结果获知PGAM1-Chk1结合的下游存在转录因子HIF-2 α ,发现HIF-2 α siRNA也具有衰老细胞清除活性。由此获知,除了控制PGAM1-Chk1结合以外,在控制HIF-2 α 的信号(也包括乙酰化、泛素化)的调节中,通过使HIF-2 α 失活也能够诱导衰老细胞清除。进而,还获知该转录因子HIF-2 α 作用于抑制凋亡诱导基因BIM的表达的方向。即,本发明如下所示。

[0031] [1]一种衰老细胞清除药,其阻断PGAM与Chk1的结合,还选择性地使衰老细胞死亡。

[0032] [2]根据[1]所述的衰老细胞清除药,其含有选自由RSK1激酶阻断剂、Fak激酶阻断剂、Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂、CDK阻断剂、钙拮抗剂、强心苷、DNA损伤剂、抗菌剂、极光激酶(Aurora kinase)阻断剂、类黄酮、PI3K激酶阻断剂、HDAC阻断剂、老年性黄斑变性治疗药、p38MAPK阻断剂、mTOR阻断剂、酪氨酸激酶阻断剂、Bcl-2阻断剂、胆固醇合成酶阻断剂(statin)、血清素受体拮抗药、其它激酶阻断剂和Nutlin 3b组成的组中的至少1种作为有效成分。

[0033] [3]根据[2]所述的衰老细胞清除药,其中,

[0034] RSK1激酶阻断剂为RSK1的反义核酸、RSK1的siRNA或BI-D1870,

[0035] Fak激酶阻断剂为PF-00562271或PF-431396,

[0036] Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂为PHA-665752或CP-100356,

[0037] CDK阻断剂为SNS-032、AZD5438、夫拉平度(Flavopiridol)(阿伏西地(Alvocidib))、PHA-793887、AT7519或PHA-767491,

- [0038] 钙拮抗剂为马尼地平 (Manidipine) 或洛美利嗪 (Lomerizine) 2HCl,
- [0039] 强心苷为海葱次苷 (Proscillaridin) A 或地高辛,
- [0040] DNA 损伤剂为多柔比星 (Doxorubicin) (阿霉素 (Adriamycin)) HCl、柔红霉素 (Daunorubicin) HCl、表柔比星 (Epirubicin) HCl、米托蒽醌 (Mitoxantrone) 2HCl 或羟喜树碱 (Hydroxy Camptothecine),
- [0041] 抗菌剂为氨基吡啶 (Aminoacridine)、三氯生 (Triclosan) 或乳酸依沙吡啶 (Ethacridine lactate),
- [0042] 极光激酶阻断剂为 AMG-900 或 JNJ-7706621,
- [0043] 类黄酮为白杨素 (Chrysin),
- [0044] PI3K 激酶阻断剂为 PF-05212384 或 XL147,
- [0045] HDAC 阻断剂为曲古柳菌素 A (Trichostatin A, TSA),
- [0046] 老年性黄斑变性治疗药为维替泊芬 (Verteporfin),
- [0047] p38MAPK 阻断剂为 SB203580 或达马莫德 (Doramapimod, BIRB796), mTOR 阻断剂为 AZD8055 或 KU-0063794,
- [0048] 酪氨酸激酶阻断剂为来那替尼 (Neratinib)、尼达尼布 (Vargatef) 或 NVP-BHG712,
- [0049] Bcl-2 阻断剂为 TW-37,
- [0050] 胆固醇合成酶阻断剂为美伐他汀 (Mevastatin),
- [0051] 血清素受体拮抗药为 RS-127445,
- [0052] 其它激酶阻断剂为 BMS-345541 或 CX-4945.
- [0053] [4] 一种衰老细胞清除药的筛选方法, 其包括下述工序:
- [0054] (A) 对于受试物质, 测定阻断 PGAM 与 Chk1 的结合的活性的工序; 和
- [0055] (B) 对于通过上述工序 (A) 判断为具有阻断 PGAM 与 Chk1 的结合的活性的受试物质, 测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。
- [0056] [5] 根据 [4] 所述的筛选方法, 其特征在于, 在上述工序 (B) 中, 测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性, 选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质。
- [0057] [6] 一种衰老细胞清除药, 其具有使 HIF-2 α 失活的作用, 还选择性地使衰老细胞死亡。
- [0058] [7] 根据 [6] 所述的衰老细胞清除药, 其含有 HIF-2 α 阻断剂作为有效成分。
- [0059] [8] 根据 [7] 所述的衰老细胞清除药, 其中, HIF-2 α 阻断剂为 HIF-2 α 的反义核酸或 siRNA。
- [0060] [9] 一种衰老细胞清除药的筛选方法, 其包括下述工序:
- [0061] (X) 对于受试物质, 测定 HIF-2 α 阻断活性的工序; 和
- [0062] (Y) 对于通过上述工序 (X) 判断为具有 HIF-2 α 阻断活性的受试物质, 测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。
- [0063] [10] 根据 [9] 所述的筛选方法, 其特征在于, 在上述工序 (Y) 中, 测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性, 选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质。
- [0064] 发明的效果

[0065] 本发明的衰老细胞清除药的筛选方法中,在测定选择性除去衰老细胞的活性的工序之前,进行包括测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序的初级筛选,由此可以显著提高衰老细胞清除药的筛选效率。本发明人们发现,PGAM与Chk1的结合在年轻的正常细胞中观察不到,但是在衰老细胞中显著亢进并因此而引起糖酵解代谢亢进。由此,通过从繁多的物质中首先筛选具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的物质,可以容易地得到能够在衰老细胞中阻断PGAM与Chk1的結合的物质,通过对它们测定选择性除去衰老细胞的活性,能够高效地发现衰老细胞清除药。实际上,使用本发明的筛选方法从安全性已得到确认的2300余种现有药品库中通过初级筛选而缩小到约200种候选药,进行衰老细胞选择性除去活性试验,最终成功地鉴定出约40种新的衰老细胞清除药。根据本发明人们的研究,还确认在端粒非依赖性细胞衰老即应激性细胞衰老中,也与所谓的衰老细胞同样地发生由PGAM与Chk1的结合所导致的糖酵解代谢亢进,根据本发明的筛选方法,还能够发现不仅对于老年性疾病、而且对于由应激性细胞衰老引起的疾病也能发挥治疗效果的物质。进而,由于发现了在PGAM1-Chk1结合的下游存在转录因子HIF-2 α ,还获知通过阻断HIF-2 α 能够诱导衰老细胞清除。基于该新见解,还能够通过筛选可使HIF-2 α 失活的药剂来发现更有效的衰老细胞清除药。

附图说明

[0066] 图1为能够在可通过他莫昔芬药剂诱导细胞衰老的细胞中测定PGAM-Chk1结合的实验体系的说明图。

[0067] 图2为诱导了细胞衰老时的、衰老标志物蛋白量的经时变化的图。

[0068] 图3为诱导了细胞衰老时的、衰老标志物SA- β -Gal的染色和PGAM-Chk1结合的经时变化的图。

[0069] 图4为诱导了细胞衰老时的、糖酵解代谢的经时变化的图。上图示出乳酸产生的变化,下图示出糖摄入率的变化。

[0070] 图5为示出Nutlin 3a和Nutlin 3b的化学结构的图。

[0071] 图6为示出Nutlin 3a和3b的、在衰老细胞中阻断PGAM-Chk1结合的效果的图。

[0072] 图7为示出通过对衰老细胞进行Nutlin 3b处理所带来的、抑制PGAM-Chk1结合的增强的效果的图。

[0073] 图8为示出Nutlin 3a和3b的、在衰老细胞中抑制糖酵解代谢的效果(糖摄入和乳酸产生)的图。

[0074] 图9为示出由Nutlin 3a和Nutlin 3b所带来的、在癌细胞中阻断PGAM-Chk1结合的效果的图。

[0075] 图10为示出Nutlin 3a和3b的p53活化效果的比较的图。

[0076] 图11为示出Nutlin 3a和3b的衰老细胞清除效果的比较的图。

[0077] 图12为示出Nutlin 3a和3b的衰老细胞清除效果的比较的图。

[0078] 图13为示出Nutlin 3b处理所引起的衰老细胞凋亡的图。

[0079] 图14-1为示出对老年小鼠给予Nutlin 3b的效果的图。

[0080] 图14-2为示出对老年小鼠给予Nutlin 3b的效果的图。

[0081] 图15为示出RSK激酶阻断剂所带来的、抑制Chk1激酶的S280磷酸化的效果的图。

- [0082] 图16为示出年轻细胞和衰老细胞中的、Chk1激酶的S280A、S280D变异型株中的PGAM-Chk1结合的比较的图。
- [0083] 图17为示出衰老细胞中的RSK1-Thr573的磷酸化亢进和Chk1-Ser280的磷酸化亢进的图。
- [0084] 图18为示出RSK1siRNA处理对衰老细胞的效果的图。
- [0085] 图19为示出RSK激酶阻断剂BID1870的衰老细胞清除效果的图。
- [0086] 图20为示出RSK1siRNA所带来的衰老细胞清除效果的图。
- [0087] 图21为示出年轻细胞和衰老细胞中的转录因子HIF-2 α 的表达的比较的图。
- [0088] 图22为示出Nutlin 3b、RSK激酶阻断剂BI-D 1870处理所带来的HIF-2 α 蛋白的减少的图。
- [0089] 图23为示出HIF-2 α siRNA处理对年轻细胞、衰老细胞的效果的图。
- [0090] 图24为示出HIF-2 α siRNA处理对年轻细胞、衰老细胞的效果的图。
- [0091] 图25为示出通过对衰老细胞进行Nutlin 3b处理所引起的BIM基因表达的分析结果的图。
- [0092] 图26为示出通过对衰老细胞进行HIF-2 α 敲除所引起的BIM基因表达的分析结果的图。
- [0093] 图27为示出由BIM基因敲除所带来的衰老细胞清除抑制效果的图。
- [0094] 图28为示出BIM基因的敲除对由HIF-2 α 敲除引起的衰老细胞清除的效果的图。
- [0095] 图29为示意性示出本发明的筛选方法的图。
- [0096] 图30为示出本发明的初级筛选的结果的图。
- [0097] 图31-1为示出本发明的次级筛选的结果的图。
- [0098] 图31-2为示出本发明的次级筛选的结果的图。
- [0099] 图32为示出基于本发明的筛选方法的衰老细胞清除候选药的图。
- [0100] 图33为示出对老年小鼠给予Nutlin 3b的试验流程的图。
- [0101] 图34为示出给予Nutlin 3b对肌力(线挂测试(wire hang test))、肾功能标志物(血浆BUN、血浆肌酐)的效果的图。
- [0102] 图35为示出给予Nutlin 3b对肝功能标志物(血浆白蛋白值)和血浆乳酸值的效果的图。
- [0103] 图36A为示出通过组织化学方式分析给予Nutlin 3b对肝脏的影响而得的结果的图。
- [0104] 图36B为示出给予Nutlin 3b对肝脏中的SASP因子(IL6、CXCL1、TNF α 和CCL5)mRNA表达的抑制效果的图。
- [0105] 图37为示出给予Nutlin 3b改善脂肪组织细胞衰老的效果的图(SA- β -Gal染色)。
- [0106] 图38为示出通过对衰老细胞进行Nutlin 3b处理所带来的HIF-2 α 蛋白表达阻断效果被蛋白酶体阻断剂MG132所抑制的图。
- [0107] 图39为示出在对衰老细胞进行Nutlin 3b处理时HIF-2 α mRNA的表达没有变化的图。
- [0108] 图40为示出位于HIF-2 α 的N末端的、可被Chk1磷酸化的共有序列的图。
- [0109] 图41为示出HIF-2 α 的S12A变异、S19A变异对衰老细胞中的HIF-2 α 蛋白稳定性的影

响的图。

[0110] 图42为示出HIF-2 α 的S12A变异、S19A变异对衰老细胞中的HIF-2 α 泛素化修饰的影响的图。

[0111] 图43为示出衰老细胞中的Chk1依赖性HIF-2 α 的Ser12残基的磷酸化的图。

[0112] 图44为示出人成纤维细胞中的PGAM-Chk1相互作用由于衰老细胞的培养上清而增强的图。

[0113] 图45为示出人成纤维细胞中的HIF-2 α 的累积和该HIF-2 α 的Ser12的磷酸化、PGAM-Chk1相互作用的增强依赖于乳酸浓度而发生的图。

[0114] 图46为示出乳酸对人成纤维细胞中的SASP表达、p21表达的影响的图。

[0115] 图47为示出衰老细胞中的乳酸受体(GPR81)的表达亢进的图。

[0116] 图48为示出乳酸受体(GPR81)敲除所引起的PGAM-Chk1结合阻断的图。

[0117] 图49为示出乳酸处理所引起的RSK、Chk1的磷酸化的亢进的图。

[0118] 图50为示出凋亡阻断剂QVD-Oph使Nutlin 3b处理下的衰老细胞存活性恢复的图。

[0119] 图51为示出经Nutlin 3b处理的衰老细胞的转录组分析结果的图。

[0120] 图52为示出经Nutlin 3b处理的衰老细胞的转录组分析结果的图。

[0121] 图53为示出使用ChIPAtlas从已报道的ChIP数据组中搜索与经Nutlin 3b处理的衰老细胞的转录组分析结果关系密切的转录因子而得的图。

[0122] 图54为示出衰老细胞中因Nutlin 3b处理而受到下调的基因中排在前150位的基因中包含的FOXM1的靶基因的图。

[0123] 图55为示出衰老细胞中因Nutlin 3b处理而受到影响的41个凋亡控制相关基因中排在前10位的下调基因的图。

[0124] 图56为示出衰老细胞中敲除存活蛋白的效果的图。

[0125] 图57为示出因Nutlin 3b处理而受到影响的衰老细胞中的mRNA表达的图。

[0126] 图58为示出由给予Nutlin 3b引起的FOX家族转录因子靶基因的表达波动分析(GSEA分析)结果的图。

[0127] 图59为示出由给予Nutlin 3b引起的FOX家族转录因子靶基因的表达波动分析(GSEA分析)结果的图。

[0128] 图60为示出由给予Nutlin 3b引起的FOX家族转录因子的表达波动的图。

[0129] 图61为示出由HIF-2 α 敲除引起的FOXM1、存活蛋白的表达降低的图。

具体实施方式

[0130] 以下,对本发明的衰老细胞清除药的筛选方法和衰老细胞清除药进行详细说明。

[0131] <衰老细胞清除药的筛选方法>

[0132] 本发明的衰老细胞清除药的筛选方法为发现阻断PGAM与Chk1的结合且选择性地使衰老细胞死亡的物质的方法,具体而言,其特征在于包括(A)对于受试物质,测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序、和(B)对于通过上述工序(A)判断为具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。本发明人们发现,PGAM与Chk1的结合在年轻的正常细胞中观察不到,但是在衰老细胞中显著亢进并因此而引起糖酵解代谢亢进。由此,通过从繁多的物质中首先筛选具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的

物质,从而能够容易地得到能够在衰老细胞中阻断PGAM与Chk1的结合的物质,通过对它们测定选择性除去衰老细胞的活性,从而能够高效地发现衰老细胞清除药。

[0133] 目前,细胞衰老的普遍性标志物并不存在,在衰老的细胞中表达的标志物根据诱导细胞衰老的刺激、细胞的种类、时机等而不同,一般认为在鉴定衰老细胞时需要调查多种细胞衰老相关因子。在此,为了明确本发明的技术内容,如下所述地定义本发明中的衰老细胞。即,本发明中,衰老细胞是指满足下述中的至少一个条件的细胞:原代细胞的增殖不可逆地停止;正常的细胞功能降低且显示出细胞质和细胞核扩大或细胞扁平化之类的细胞形态变化;SA-bGAL染色阳性(经典的细胞衰老标志物);p16Ink4A上升(细胞衰老标志物);H2AX γ 染色阳性(DNA损伤标志物)。本发明中的衰老细胞是包括因年龄增加而衰老(所谓的复制衰老)的细胞、发生了应激衰老的细胞(承受了各种生物学应激(放射线、诱变剂、氧化应激等)的细胞)中的任意者的概念。实验中,可以使用通过人工地造成DNA损伤而早衰的细胞作为衰老细胞。另一方面,年轻(正常)细胞是指上述衰老细胞以外的细胞,是指未发生因年龄增加所致衰老、应激衰老的细胞。

[0134] 本发明中,衰老细胞清除是指使衰老细胞选择性死亡,将选择性地使衰老细胞死亡的药剂称为衰老细胞清除药。

[0135] 本发明中,PGAM是指磷酸甘油酸变位酶,是在糖酵解代谢途径的10个糖酵解酶的顺序反应中负责其中的第8个反应的酶,是催化由3-磷酸甘油酸(3PG)转化为2-磷酸甘油酸(2PG)的反应的酶。PGAM负责细胞的衰老与癌变的衔接。PGAM存在PGAM1和PGAM2这两个亚型。PGAM1和PGAM2虽然组织表达谱可观察到不同,但是氨基酸序列具有高度同源性,一般认为功能、酶活性同等。人PGAM1、PGAM2的氨基酸序列分别在序列表中作为序列号1、序列号2示出,cDNA序列在序列表中分别作为序列号3、序列号4示出。

[0136] 本发明中,Chk1是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,是在细胞周期的G2期中起到活化DNA损伤检查点作用的检查点激酶。本发明人们发现,Chk1在糖酵解代谢中也发挥重要的作用。人Chk1的氨基酸序列在序列表中作为序列号5示出,cDNA序列在序列表中作为序列号6示出。

[0137] 本发明中的糖酵解代谢是通过将细胞摄取的葡萄糖分解来合成ATP的代谢过程的总称。糖酵解代谢存在两种途径:将葡萄糖分解为其中间产物-丙酮酸并合成乳酸的途径和在线粒体中进行氧化磷酸化的途径。前者由于不需要有氧呼吸而被称为厌氧糖酵解代谢,后者由于通过线粒体有氧呼吸来合成ATP,因此被称为有氧糖酵解代谢。该糖酵解代谢在几乎所有的常见细胞中承担着能量代谢的重要作用,是个体生存必不可少的。

[0138] 对本发明的筛选方法的各工序进行说明。本发明的筛选方法包括作为工序(A)的、对于受试物质测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序和作为工序(B)的、对于通过上述工序(A)判断为具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的受试物质测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。

[0139] 〈工序(A)〉

[0140] 本工序为对于受试物质测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序。本工序中,只要是能够对受试物质测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的方法则任意方法均可采用,可列举例如在受试物质存在下和不存在下测定PGAM与Chk1的结合量,由两种结合量的比计算上述受试物质的阻断PGAM与Chk1的结合的活性的方法等。该方法优选包括以下的工序1)~3)。

- [0141] 1) 测定向包含PGAM和Chk1的试样添加受试物质时的、PGAM与Chk1的结合量的工序
[0142] 2) 测定不添加上述受试物质时的PGAM与Chk1的结合量的工序
[0143] 3) 通过下述式 (i) 计算阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序
[0144] 由 {上述工序2) 得到的测定值 - 由上述工序1) 得到的测定值} / 由上述2) 得到的测定值 $\times 100$ (%) \cdots (i)

[0145] 本发明的筛选方法的工序1) 中, 首先, 通过向包含PGAM和Chk1的试样中添加受试物质而使受试物质与PGAM和/或Chk1接触。

[0146] 需要说明的是, 本发明的筛选方法中使用的PGAM和Chk1如上所述。本发明的筛选方法中使用的PGAM和Chk1还包括与上述公知的PGAM和Chk1在功能上同等的蛋白质。这样的蛋白质可列举例如PGAM和Chk1的变异体、等位基因、变体、同源物、PGAM和Chk1的部分肽、与其它蛋白的融合蛋白、标记有标签者等, 但是不限于这些。

[0147] 作为本发明中的PGAM和Chk1的变异体, 可列举作为由在上述氨基酸序列中置换、缺失、插入和/或添加1或多个氨基酸而成的氨基酸序列构成的源自天然的蛋白质、并且与由已述氨基酸序列构成的蛋白质在功能上同等的蛋白质。另外, 也可以列举作为在严谨条件下与由上述碱基序列构成的DNA杂交的源自天然的DNA所编码的蛋白质、并且与由已述氨基酸序列构成的蛋白质在功能上同等的蛋白质, 来作为PGAM和Chk1各自的变异体。

[0148] 本发明中, 变异氨基酸数没有特别限制, 认为通常为30个氨基酸以内, 优选为15个氨基酸以内, 进一步优选为5个氨基酸以内 (例如3个氨基酸以内)。变异氨基酸残基中, 期望变异成氨基酸侧链的性质保守的另外的氨基酸。例如, 作为氨基酸侧链的性质, 可列举疏水性氨基酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、具有脂肪族侧链的氨基酸 (G, A, V, L, I, P)、具有含有羟基的侧链的氨基酸 (S, T, Y)、具有含有硫原子的侧链的氨基酸 (C, M)、具有含有羧酸和酰胺的侧链的氨基酸 (D, N, E, Q)、具有含有碱的侧链的氨基酸 (R, K, H)、具有含有芳香族的侧链的氨基酸 (H, F, Y, W) (括弧内均表示氨基酸的单字母符号)。已知具有经修饰的氨基酸序列的多肽可维持其生物学活性, 所述经修饰的氨基酸序列是相对于某氨基酸序列通过1或多个氨基酸残基的缺失、添加和/或利用其它氨基酸序列的置换进行了修饰。

[0149] 本发明中, 在功能上同等是指成为对象的蛋白质与PGAM或Chk1具有同等的生物学功能、生物化学功能。作为PGAM的生物学功能、生物化学功能, 可列举作为糖酵解酶的功能, 具体而言可列举催化由3-磷酸甘油酸 (3PG) 转化为2-磷酸甘油酸 (2PG) 的的功能。另外, 作为Chk1的生物学功能、生物化学功能, 可列举作为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶的功能。

[0150] 为了制备编码与目标蛋白质在功能上同等的蛋白质的DNA, 作为本领域技术人员熟知的方法, 可列举利用杂交技术、聚合酶链式反应 (PCR) 技术的方法。即, 对于本领域技术人员而言, 通常进行如下操作: 将PGAM或Chk1的碱基序列或其一部分作为探针, 另外将与PGAM或Chk1特异性杂交的寡核苷酸作为引物, 来分离与PGAM或Chk1具有高同源性的DNA。可如此地通过杂交技术、PCR技术分离且编码与PGAM或Chk1具有同等功能的蛋白质的DNA也包括在本发明的DNA中。

[0151] 作为本发明的筛选方法中使用的PGAM和Chk1所来源的生物种属, 不限于特定的生物种属。可列举例如人、猴、小鼠、大鼠、豚鼠、猪、牛、酵母、昆虫等。

[0152] 作为本发明的筛选方法中使用的PGAM和Chk1的状态, 没有特别限制, 例如可以为

经纯化的状态、表达在细胞内的状态、表达在细胞提取液内的状态等。

[0153] 本发明的筛选方法中,可以使用标记有标签的PGAM和Chk1,作为这样的标记有标签的PGAM和Chk1,优选存在有针对它们的抗体、能够与它们特异性结合的树脂等的标记有标签的PGAM和Chk1,可列举例如FLAG标签、HA标签、Myc标签、His标签、GST标签等。另外,PGAM和Chk1也可以用后述那样的可彼此结合的标签来标记。

[0154] 本发明中的受试物质没有特别限定,可列举例如天然化合物、有机化合物、无机化合物、核酸、蛋白质(包括抗体)、肽等单一物质;化合物文库、核酸文库、肽文库、基因文库的表达产物;细胞提取物、细胞培养上清、发酵微生物产生物、海洋生物提取物、植物提取物、原核细胞提取物、真核单细胞提取物或动物细胞提取物之类提取物等。另外,作为本发明中的受试物质,可以为这些的混合物。另外,这些受试物质可以根据需要进行标记后使用。作为标记,可列举例如放射性标记、荧光标记等。

[0155] 另外,本发明中,接触可根据PGAM和Chk1的状态来进行。例如,PGAM和Chk1为经纯化的状态时,可以通过向纯化标准品中添加受试物质来进行。另外,为表达在细胞内的状态或表达在细胞提取液内的状态时,分别可通过向细胞的培养液或该细胞提取液中添加受试物质、或者直接给予于实验动物来进行。受试物质为蛋白质时,例如还可以通过将包含编码该蛋白质的DNA的载体导入到表达PGAM和Chk1的细胞或者将该载体添加到表达PGAM和Chk1的细胞提取液中而进行。另外,例如还可以利用使用酵母或动物细胞等的双杂交法。

[0156] 本发明中,可以通过向包含PGAM和Chk1的试样中添加受试物质而使PGAM和/或Chk1与受试物质接触。另外,也可以在向包含PGAM或Chk1中任一者的试样中添加受试物质后再加入未包含的另一者,从而各自与受试物质接触。

[0157] 本发明中,接下来测定PGAM与Chk1的结合量。需要说明的是,本发明的筛选方法的工序2)中,测定未向包含PGAM和Chk1的试样中添加受试物质时的PGAM与Chk1的结合量。具体而言,测定添加了受试物质时(接触时)以及未添加受试物质时(未使其接触时)的PGAM与Chk1的结合量,在本发明的筛选方法的工序3)中,对它们的值进行比较。如果添加受试物质时的PGAM与Chk1的结合量与未添加受试物质时相比减少,则可以判断为该受试物质具有阻断PGAM与Chk1的结合的效果(有阻断PGAM与Chk1的结合的活性)。并且,可以判断为这样的受试物质具有抑制、阻断糖酵解代谢的效果、对衰老细胞具有杀伤活性。

[0158] 作为测定PGAM与Chk1的结合量的方法,例如,具体可列举以下这样的方法。从进行PGAM2-FLAG和Chk1-myc-His表达载体的共表达的细胞的蛋白质提取液中,利用缀合于蛋白G琼脂糖的FLAG标签抗体进行PGAM2-FLAG蛋白的免疫沉淀。此时与PGAM2-FLAG蛋白结合并共沉淀的Chk1-myc-His蛋白通过免疫印迹来检测、定量。或者,从同样的蛋白质提取液中,利用Ni-NTA琼脂糖珠来沉淀Chk1-myc-His蛋白。此时与Chk1-myc-His蛋白结合并共沉淀的PGAM2-FLAG蛋白通过免疫印迹来检测、定量。

[0159] 作为测定PGAM与Chk1的结合量的方法,作为优选方法,除了上述以外还可列举例如使用通过可彼此结合的标签进行了标记的PGAM和Chk1的方法,具体而言,可列举使用Nanobit系统的以下这种方法。Nanobit中,在PGAM和Chk1上分别连接以萤光素酶为基础制作的发光蛋白的大亚基和小亚基,分别作为标签。这些标签形成了可彼此结合的结构。各亚基本身不发光,但是由于PGAM与Chk1结合而大亚基和小亚基缔合成完整的发光蛋白则发出发光信号。通过测定此时的发光信号的强度,可以以高灵敏度和高定量性测定结合量。

[0160] 〈工序(B)〉

[0161] 本工序中,对于通过上述工序(A)判断为具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的受试物质,测定衰老细胞选择性除去活性并选择衰老细胞选择性除去活性高的受试物质。作为上述选择衰老细胞选择性除去活性高的受试物质的方法,可列举下述方法:测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质。另外,也可以测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,并选择对衰老细胞的杀伤活性显著高于对年轻细胞的杀伤活性的受试物质。

[0162] 在此,本发明中,作为年轻细胞,小鼠培养细胞的情况下可列举小鼠原代成纤维细胞(MEFs;mouse embryonic fibroblasts、或REFs;rat embryonic fibroblasts(大鼠原代成纤维细胞))、小鼠原代皮肤角质形成细胞等。另外,本发明中,作为年轻细胞,人培养细胞的情况下可列举人胎肺成纤维细胞(IMR90、WI-38、TIG、MRC细胞)、人皮肤原代细胞(NHDF细胞、BJ细胞、NHEK细胞)、正常人乳腺上皮细胞(NHMEC细胞)、正常人血管内皮细胞(HUVEC细胞、HAEC细胞、HPAEC细胞、HCAEC细胞)、正常人前列腺上皮细胞(HPEC)等。需要说明的是,其增殖速度根据细胞种类而不同,衰老速度也根据细胞种类而不同,通常已知小鼠细胞从最初建立起持续培养1个月左右则成为衰老细胞,人类细胞在3个月左右成为衰老细胞。因此,小鼠细胞情况下,可以将最初建立起持续培养2-3周以内者称为年轻细胞,人细胞情况下,可以将最初建立起持续培养1个月以内者称为年轻细胞。另一方面,本发明中,作为衰老细胞,可列举超出上述持续培养期而培养的细胞,小鼠情况下可列举培养了3~4周以上者,人类情况下可列举培养了1~2个月以上者。进而,小鼠、人类的年轻细胞均可以通过诱导细胞衰老的应激(氧化应激、致癌应激、DNA损伤应激等)在短时间内转变成衰老细胞。

[0163] <衰老细胞清除药>

[0164] 如上所述,根据本发明的筛选方法,可以高效地发现衰老细胞清除药,本发明人们实际上成功发现了40种以上新的衰老细胞清除药(具有衰老细胞清除活性的化合物)。另外,本发明人们通过分析PGAM-Chk1结合的机制,发现对于PGAM-Chk1结合而言致癌性Ras变异的下游信号激酶-RSK1激酶所引起的Chk1激酶的S280磷酸化很重要。并且,基于该新见解还可以确认RSK1激酶阻断剂在阻断GAM-Chk1结合的同时还具有对衰老细胞的选择杀伤活性,获知其可发挥优异的衰老细胞清除效果。

[0165] 即,本发明的衰老细胞清除药是阻断PGAM与Chk1的结合、还选择性地使衰老细胞死亡的药物,含有这样的化合物作为有效成分。具体而言,本发明的衰老细胞清除药含有选自自由RSK1激酶阻断剂、Fak激酶阻断剂、Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂、CDK阻断剂、钙拮抗剂、强心苷、DNA损伤剂、抗菌剂、极光激酶阻断剂、类黄酮、PI3K激酶阻断剂、HDAC阻断剂、老年性黄斑变性治疗药、p38MAPK阻断剂、mTOR阻断剂、酪氨酸激酶阻断剂、Bcl-2阻断剂、胆固醇合成酶阻断剂、血清素受体拮抗药、其它激酶阻断剂和Nutlin 3b组成的组中的至少1种作为有效成分。

[0166] (RSK1激酶阻断剂)

[0167] RSK1为RSK(核糖体S6激酶)家族成员,为生长因子控制型丝氨酸苏氨酸激酶。RSK1具有2个不同的激酶催化结构域,对包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径成员在内的各种底物进行磷酸化。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的RSK1激酶的阻断剂,只

要是阻断上述RSK1激酶的活性的物质则没有特别限定,可列举例如与编码RSK1的DNA的转录产物互补的反义核酸和siRNA、BI-D1870(CAS号:501437-28-1)等化合物作为优选例。

[0168] 本发明中,使用的反义核酸优选阻断转录、剪接或翻译的过程从而抑制RSK1基因的表达的的反义核酸。作为反义序列的形态,认为如果在RSK1的mRNA的5'端附近的非翻译区设计互补的反义序列则有助于阻断基因的翻译。但是,也可以使用与编码区或3'侧的非翻译区互补的序列。从而,不仅可使用与基因的翻译区互补的序列,也可以使用与非翻译区互补的序列。因此,不仅包含基因的翻译区序列的反义序列的核酸,包含基因的非翻译区序列的反义序列的核酸也包含于本发明中可利用的反义核酸中。反义核酸相对于目标基因的转录产物具有优选90%以上、最优选95%以上的互补性。利用反义序列有效地阻断靶基因表达的反义RNA的长度没有特别限制。

[0169] 本发明中,使用的RSK1的siRNA表示:由在细胞内不显示毒性的范围的短链构成的双链RNA,例如,可以设为15~49个碱基对,优选设为15~35个碱基对,进一步优选设为21~30个碱基对。

[0170] RSK1的siRNA不需要与RSK1基因完全相同,具有至少70%以上、优选80%以上、进一步优选90%以上、最优选95%以上的序列同源性。关于siRNA中的RNA彼此配对的双链RNA部分,不限于完全配对,也可以包含因错配(对应的碱基不互补)、突出(一条链中无对应碱基)等而未配对的部分。本发明中,dsRNA中的RNA彼此配对的双链RNA区域中可以包含突出和错配这两者。

[0171] 本发明中,作为RSK1的siRNA,可列举例如包含序列号7或序列号8的序列者。需要说明的是,本发明中的siRNA中,可以出于提高核酸酶分解抗性等目的而在3'末端添加dTdT等突出的2个碱基。

[0172] (Fak激酶阻断剂)

[0173] Fak(粘着斑激酶)为非受体型蛋白酪氨酸激酶,参与来自介导与胞外底物的细胞粘着的整联蛋白浓缩粘着点的信号转导。可被FAK促进的信号已知与粘着依赖性细胞的生存有关,并且对于响应生长因子受体、整联蛋白刺激的高效细胞游走非常重要。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的Fak激酶阻断剂,只要是阻断上述Fak激酶活性的物质则没有特别限定,作为优选例,可列举例如PF-00562271(CAS No.939791-41-0)、PF-431396(CAS No.717906-29-1)、这些的盐或衍生物中与这些具有同等活性的化合物等。

[0174] (Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂)

[0175] 作为本发明的衰老细胞清除药所含有的Fak激酶所参与的信号途径的阻断剂,可列举c-Met阻断剂、Mdr-1阻断剂等。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的c-Met阻断剂,可列举PHA-665752(CAS No.477575-56-7)、这些的盐或衍生物中的与其具有同等活性的化合物等作为优选例。另外,作为本发明的衰老细胞清除药所含有的Mdr-1阻断剂,可列举CP-100356(CAS No.142715-48-8)、这些的盐或衍生物中的与其具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0176] (CDK阻断剂)

[0177] 周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase:CDK)是管理细胞周期的核内激酶组,是只有与周期蛋白结合才具有活性的蛋白。存在在细胞周期的不同时间点而活化的多种CDK。活性通过CDK自身的酪氨酸、苏氨酸残基的磷酸化和脱磷酸化来控制。本发明的衰

老细胞清除药所含有的CDK阻断剂为阻断、抑制这样的CDK活性的物质,可列举例如SNS-032 (CDK2/7/9阻断剂;CAS No.345627-80-7)、AZD5438 (CDK1/2/9阻断剂;CAS No.602306-29-6)、夫拉平度(阿伏西地) (CDK1/2/4/6/9阻断剂;CAS No.146426-40-6)、PHA-793887 (CDK7/9阻断剂;CAS No.718630-59-2)、AT7519 (CDK1/2/4/6/9阻断剂;CAS No.844442-38-2)、PHA-767491 (CDK7/9阻断剂;CAS No.942425-68-5)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0178] (钙拮抗剂)

[0179] 钙拮抗剂是与细胞膜上的钙通道结合而阻断钙离子流入细胞内的药剂。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的钙拮抗剂,可列举例如马尼地平 (CAS No.89226-50-6)、洛美利嗪2HCl (CAS No.101477-54-7)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0180] (强心苷)

[0181] 强心苷是用于心房颤动、心房扑动等室上性心动过速、伴有浮肿的充血性心衰或心律不齐的甙体苷的总称,作为本发明的衰老细胞清除药所含有的强心苷,可列举例如海葱次苷A (CAS No.466-06-8)、地高辛 (CAS No.20830-75-5)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0182] (DNA损伤型抗癌剂)

[0183] DNA损伤型抗癌剂为通过损伤癌细胞的DNA而选择性地引导癌细胞进入细胞死亡的类型的抗癌剂的创伤,作为本发明的衰老细胞清除药所含有的DNA损伤型抗癌剂,可列举例如多柔比星(阿霉素)HCl (CAS No.25316-40-9)、柔红霉素HCl (CAS No.23541-50-6)、表柔比星HCl (CAS No.56390-09-1)、米托蒽醌2HCl (CAS No.70476-82-3)、羟喜树碱 (CAS No.64439-81-2)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0184] (抗菌剂)

[0185] 作为本发明的衰老细胞清除药所含有的抗菌剂,可列举例如氨基吡啶 (CAS No.90-45-9)、三氯生 (CAS No.3380-34-5)、乳酸依沙吡啶 (TAZ活化;CAS No.1837-57-6)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0186] (极光激酶阻断剂)

[0187] 极光激酶为人体中的AURKA基因所编码的酶,为丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员。在正常的细胞增殖中,对有丝分裂和减数分裂的过程而言,极光激酶恰当地发挥功能是必不可少的。已知极光激酶可通过1个或多个位置的磷酸化而被活化,其活性在从细胞周期的G2期进入M期时达到顶峰。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的极光激酶阻断剂,可列举例如AMG-900 (CAS No.945595-80-2)、JNJ-7706621 (阻断CDK1、2和Aurora A、B;CAS No.443797-96-4)、这些的盐或衍生物中的与这些具有同等活性的化合物等作为优选例。

[0188] (Nutlin-3b)

[0189] Nutlin-3b (CAS No.675576-97-3)为Nutlin-3a的光学异构体。本发明的衰老细胞清除药优选含有Nutlin-3b (Nutlin-3b;CAS No.675576-97-3)。

[0190] 除了上述以外,类黄酮(白杨素;CAS No.480-40-0)、PI3K激酶阻断剂 (PF-05212384;CAS No.1197160-78-3、XL147;CAS No.934526-89-3)、HDAC阻断剂(曲古柳菌素A (TSA);CAS No.58880-19-6)、老年性黄斑变性治疗药(维替泊芬;CAS No.129497-78-5)、

p38MAPK阻断剂(SB203580;CAS No.152121-47-6、达马莫德(BIRB 796);CAS No.285983-48-4)、mTOR阻断剂(AZD8055;CAS No.1009298-09-2、KU-0063794;CAS No.938440-64-3)、酪氨酸激酶阻断剂(来那替尼(HER2、EGFR阻断);CAS No.698387-09-6、尼达尼布;CAS No.656247-17-5、NVP-BHG712(阻断C-raf、C-src);CAS No.940310-85-0)、Bcl-2阻断剂(TW-37;CAS No.877877-35-5)、胆固醇合成酶阻断剂(美伐他汀;CAS No.73573-88-3)、血清素受体拮抗药(RS-127445;CAS No.199864-87-4)、其它激酶阻断剂(BMS-345541;CAS No.445430-58-0、CX-4945;CAS No.1009820-21-6)也具有衰老细胞清除活性,因此也可以采用这些化合物以及这些的盐或衍生物中的与这些具有同等衰老细胞清除活性的化合物作为本发明的衰老细胞清除药的有效成分。

[0191] 本发明的衰老细胞清除药除了上述有效成分以外,还可以含有作为其它任意成分的制剂上、药理学上或生理学上可接受的一种或两种以上的载体、赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、分散剂、表面活性剂、增塑剂、悬浮剂、乳化剂、稀释剂、缓冲剂、抗氧化剂、细菌抑制剂等。另外,可以含有其它低分子量的多肽、血清白蛋白、明胶、免疫球蛋白等蛋白质;氨基酸、多糖和单糖等糖类;碳水化合物;糖醇。进而,可以根据需要含有其它有效成分。

[0192] 本发明的衰老细胞清除药可以通过药品、准药品、食品等领域中的现有公知的任意方法来制造。其制造过程中,可以通过任何公知的方法来添加·混合上述有效成分、其它任意成分。

[0193] 制成注射用水溶液时,可列举例如包含生理盐水、葡萄糖或其它辅助药的等渗液,例如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠,可以组合使用适当的溶解助剂,例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、PEG等)、非离子表面活性剂(聚山梨酯80、HCO-50)等。根据需要,可以进一步含有稀释剂、溶解助剂、pH调节剂、无痛化剂、含硫还原剂、抗氧化剂等。

[0194] 另外,也可以封入微胶囊(羟甲基纤维素、明胶、聚[甲基丙烯酸甲酯]等微胶囊)或制成胶体药物递送系统(脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊等)。进而,将药剂制成缓释性药剂的方法也是公知的,可用于本发明。

[0195] 将本发明的衰老细胞清除药用作人、其它动物的药物时,除了可以将这些物质本身直接给予于患者以外,也可以通过公知的制剂学方法制剂化后给予。制剂化时,可以添加上述所记载的制剂上可接受的成分。

[0196] 本发明的全部药剂均可以以药品的形态来给予,可通过经口或非经口的方式全身或局部性地给予。例如,可以选择点滴等静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、栓剂、灌肠、经口性肠溶剂等,可根据患者的年龄、症状来选择合适的给予方法。有效给予量可在每一次每千克体重为0.001mg至100mg的范围内选择。或者,可以选择每位患者0.1~1000mg、优选0.1~50mg的给予量。作为具体的例子,每千克体重1个月(4周)内1次或分成数次地给予0.1mg至40mg、优选1mg至20mg,例如以2次/周、1次/周、1次/2周、1次/4周等给予日程通过点滴等静脉内注射、皮下注射、经口给予等方法来进行给予。给予日程可一边观察给予后的状态和血液检查值的动向一边调整给予间隔,如从2次/周或1次/周延长到1次/2周、1次/3周、1次/4周等。

[0197] <衰老细胞清除药2>

[0198] 进而,对PGAM1-Chk1途径的下游转录因子进行了分析,结果获知在PGAM1-Chk1结合的下游存在转录因子HIF-2 α ,发现HIF-2 α siRNA也具有衰老细胞清除活性。由此可知,除

了控制PGAM1-Chk1结合以外,通过调节控制HIF-2 α 的信号(也包括乙酰化、泛素化)也可以介导HIF-2 α 失活、诱导衰老细胞清除。进而,还获知该转录因子HIF-2 α 作用于抑制凋亡诱导基因BIM的表达的方向。基于这些结果,本发明还包括具有使HIF-2 α 失活的作用、进而选择性地使衰老细胞死亡的衰老细胞清除药。具体而言,为含有HIF-2 α 阻断剂作为有效成分的衰老细胞清除药。

[0199] HIF-2 α 为转录因子HIF-1 α 的功能性同源物,在进化上保守。HIF-家族蛋白是当细胞、组织暴露于低氧状况时被活化的转录因子。低氧状况下线粒体不能进行有氧呼吸,因此细胞不得不依赖于糖酵解代谢来产生能量。低氧环境下,HIF蛋白活化而使糖酵解代谢mRNA亢进,实现糖酵解代谢亢进(Iyer et al., Genes and Development, 1998, Vol12, p149-62)。常规氧环境下,转录因子HIF蛋白为容易受到泛素化修饰而发生蛋白分解的不稳定蛋白,另一方面,低氧状况下,HIF的泛素化受到阻断,蛋白变得稳定而活性亢进。作为本发明的衰老细胞清除药所含有的HIF-2 α 阻断剂,只要是阻断上述HIF-2 α 的功能的物质则没有特别限定,可列举例如与编码HIF-2 α 的DNA的转录产物互补的反义核酸、siRNA(例如序列号9、序列号10)等作为优选例。需要说明的是,关于本发明中使用的反义核酸、siRNA,可以将上述的RSK1激酶阻断剂项目的说明中的RSK1替换为HIF-2 α 而直接应用。

[0200] 上述<衰老细胞清除药>中的关于通常药物所共通的内容的说明也可以应用于<衰老细胞清除药2>。

[0201] <衰老细胞清除药的筛选方法2>

[0202] 进而,本发明还包括衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:(X)对于受试物质,测定HIF-2 α 阻断活性的工序;和(Y)对于通过上述工序(X)判断为具有HIF-2 α 阻断活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。上述工序(Y)的特征在于,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质,具体的说明可以直接应用上述<衰老细胞清除药的筛选方法>的(B)工序的说明。需要说明的是,上述(X)工序中,HIF-2 α 的阻断活性不仅包括阻断HIF-2 α 作用的活性,还包括抑制HIF-2 α 表达的活性。

[0203] <衰老细胞清除药3>

[0204] 如上所述,Nutlin 3b具有优异的衰老细胞清除活性。本发明人们对Nutlin3b进行了进一步研究,结果发现CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55、BIRC5(存活蛋白;Survivin)的表达在衰老细胞中亢进,通过Nutlin 3b处理可抑制其表达。特别是BIRC5(存活蛋白;Survivin)的亢进较为显著。根据该结果,可以说针对CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55、BIRC5(存活蛋白;Survivin)的阻断剂、尤其是针对BIRC5(存活蛋白;Survivin)的阻断剂具有优异的衰老细胞清除活性。作为CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55、BIRC5的阻断剂,可列举例如与编码这些的DNA的转录产物互补的反义核酸、siRNA等。基于这些结果,本发明还包括衰老细胞清除药,其具有使CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5失活的作用,进而选择性地使衰老细胞死亡。具体而言,为含有CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的阻断剂作为有效成分的衰老细胞清除药。

[0205] 上述<衰老细胞清除药>中的关于通常药物所共通的内容的说明也可以应用于<衰老细胞清除药3>。

[0206] <衰老细胞清除药的筛选方法3>

[0207] 进而,本发明还包括衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:(X)对于受试物质,测定CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的阻断活性的工序;和(Y)对于通过上述工序(X)而判断为具有CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的阻断活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。上述工序(Y)的特征在于,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质,具体的说明可以直接应用上述<衰老细胞清除药的筛选方法>的(B)工序的说明。需要说明的是,上述(X)工序中,CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的阻断活性不仅包括阻断CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的作用的活性,还包括抑制CCNB1、CCNB2、PLK1、ASPM、CEP55和/或BIRC5的表达的活性。

[0208] <衰老细胞清除药4>

[0209] 根据对Nutlin 3b的进一步研究,获知特定的FOX家族基因的表达与基于Nutlin 3b的衰老细胞清除密切相关。FOXM1、FOXF1、FOXC1、FOXL1、FOXL2、FOXD1、FOXB2、FOXI2、FOXN1的表达会因Nutlin 3b处理而减少。特别地,FOXM1的表达减少较为显著。另外,FOXO1、FOXP1、FOXH1、FOXF2、FOXO4、FOXO3、FOXJ3、FOXQ1、FOXK2、FOXN3、FOXO6、FOXK1、FOXP4、FOXN2、FOXJ2的表达会因Nutlin 3b处理而亢进。特别地,FOXO1、FOXP1的表达亢进较为显著。根据该结果,可以说控制上述特定的FOX家族基因的表达的物质、尤其是控制FOXM1、包括FOXO1在内的FOXO家族和包括FOXP1在内的FOXP家族的表达的物质、特别是使FOXM1表达减少的物质、使包括FOXO1在内的FOXO家族和包括FOXP1在内的FOXP家族的表达亢进的物质具有优异的衰老细胞清除活性。

[0210] 例如,作为使FOXM1等的表达减少的物质,可列举与编码FOXM1等的DNA的转录产物互补的反义核酸、siRNA等。即,本发明还包括衰老细胞清除药,其具有使FOXM1、FOXF1、FOXC1、FOXL1、FOXL2、FOXD1、FOXB2、FOXI2和/或FOXN1、尤其是FOXM1失活的作用,进而选择性地使衰老细胞死亡。具体而言,为含有FOXM1、FOXF1、FOXC1、FOXL1、FOXL2、FOXD1、FOXB2、FOXI2和/或FOXN1、尤其是FOXM1的阻断剂作为有效成分的衰老细胞清除药。

[0211] 进而,本发明还包括衰老细胞清除药,其具有活化FOXO1、FOXP1、FOXH1、FOXF2、FOXO4、FOXO3、FOXJ3、FOXQ1、FOXK2、FOXN3、FOXO6、FOXK1、FOXP4、FOXN2和/或FOXJ2、尤其是包括FOXO1在内的FOXO家族和/或包括FOXP1在内的FOXP家族的作用,进而选择性地使衰老细胞死亡。具体而言,为含有FOXO1、FOXP1、FOXH1、FOXF2、FOXO4、FOXO3、FOXJ3、FOXQ1、FOXK2、FOXN3、FOXO6、FOXK1、FOXP4、FOXN2和/或FOXJ2、尤其是包括FOXO1在内的FOXO家族和/或包括FOXP1在内的FOXP家族的活化剂作为有效成分的衰老细胞清除药。

[0212] 上述<衰老细胞清除药>中的关于通常药物所共通的内容的说明也可以应用于<衰老细胞清除药4>。

[0213] <衰老细胞清除药的筛选方法4>

[0214] 进而,本发明还包括衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:(X)对于受试物质,测定FOXM1、FOXF1、FOXC1、FOXL1、FOXL2、FOXD1、FOXB2、FOXI2和/或FOXN1的阻断活性的工序;和(Y)对于通过上述工序(X)而判断为具有FOXM1、FOXF1、FOXC1、FOXL1、FOXL2、FOXD1、FOXB2、FOXI2和/或FOXN1的阻断活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。上述工序(Y)的特征在于,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质,具体的说

明可以直接应用上述<衰老细胞清除药的筛选方法>中的(B)工序的说明。需要说明的是,上述(X)工序中,FOX M1、FOX F1、FOX C1、FOX L1、FOX L2、FOX D1、FOX B2、FOX I2和/或FOX N1的阻断活性不仅包括阻断FOX M1、FOX F1、FOX C1、FOX L1、FOX L2、FOX D1、FOX B2、FOX I2和/或FOX N1的作用的活性,还包括抑制FOX M1、FOX F1、FOX C1、FOX L1、FOX L2、FOX D1、FOX B2、FOX I2和/或FOX N1的表达的活性。

[0215] 进而,本发明还包括衰老细胞清除药的筛选方法,其包括下述工序:(X)对于受试物质,测定使FOX O1、FOX P1、FOX H1、FOX F2、FOX O4、FOX O3、FOX J3、FOX Q1、FOX K2、FOX N3、FOX O6、FOX K1、FOX P4、FOX N2和/或FOX J2亢进的活性的工序;和(Y)对于通过上述工序(X)而判断为具有使FOX O1、FOX P1、FOX H1、FOX F2、FOX O4、FOX O3、FOX J3、FOX Q1、FOX K2、FOX N3、FOX O6、FOX K1、FOX P4、FOX N2和/或FOX J2亢进的活性的受试物质,测定选择性除去衰老细胞的活性的工序。上述工序(Y)的特征在于,测定受试物质对年轻细胞的杀伤活性和对衰老细胞的杀伤活性,选择对年轻细胞不具有杀伤活性、对衰老细胞具有杀伤活性的受试物质,具体的说明可以直接应用上述<衰老细胞清除药的筛选方法>中的(B)工序的说明。需要说明的是,上述(X)工序中,使FOX O1、FOX P1、FOX H1、FOX F2、FOX O4、FOX O3、FOX J3、FOX Q1、FOX K2、FOX N3、FOX O6、FOX K1、FOX P4、FOX N2和/或FOX J2亢进的活性不仅包括使FOX O1、FOX P1、FOX H1、FOX F2、FOX O4、FOX O3、FOX J3、FOX Q1、FOX K2、FOX N3、FOX O6、FOX K1、FOX P4、FOX N2和/或FOX J2的作用亢进的活性,还包括使FOX O1、FOX P1、FOX H1、FOX F2、FOX O4、FOX O3、FOX J3、FOX Q1、FOX K2、FOX N3、FOX O6、FOX K1、FOX P4、FOX N2和/或FOX J2的表达亢进的活性。

[0216] 实施例

[0217] 通过以下实施例具体说明本发明,但是本发明不受实施例限定。

[0218] 1.衰老细胞中的糖酵解亢进和PGAM-Chk1结合的亢进

[0219] 已知普通细胞会由于致癌性Ras变异而被诱导细胞早衰(Serrano et al. Cell 1997, Vol. 88, Issue 5, 593-602)。另外,据报道细胞衰老则糖酵解代谢亢进(Goldstein and Trieman, 1975; Goldstein et al., 1982)。因此,验证了衰老细胞中的PGAM-Chk1结合。具体而言,制作了向MCR5细胞(源自人胎肺的正常二倍体成纤维细胞)导入带有Nano-Bit标签的PGAM和Chk1激酶基因并能够稳定表达的细胞株。向该MCR5细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入RasER基因。RasER蛋白是能够通过给予他莫昔芬药剂(4OHT)而活化Ras基因的融合蛋白。如图1所示,向所制作的MCR5-RasER细胞给予他莫昔芬后,在经时观察衰老表型的同时,还能够利用Nano-Bit系统同时观测PGAM-Chk1结合。如图2所示,向该细胞给予他莫昔芬后,4天后开始观察到衰老标志物的变化(核纤层蛋白B1减少、累积p53、累积p21)。图3示出PGAM-Chk1结合的结果,通过作为细胞衰老指标的SA- β Gal染色,确认第8~16天阳性率显著上升。使用该细胞测定年轻细胞和衰老细胞的、各细胞内的基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号。另外,回收培养基,通过糖消耗量评价和乳酸产生测定,来评价各细胞内的糖酵解代谢效率。用细胞总蛋白质量对每小时分泌到培养基中的乳酸量($\mu\text{mol/h}$)进行校正,用所得的值($\mu\text{mol/mg/h}$)来测定算出乳酸值,以与第0天的实际值的相对值来记载。用细胞总蛋白质量对每小时培养基中减少的葡萄糖量($\mu\text{mol/h}$)进行校正,用所得的值($\mu\text{mol/mg/h}$)来测定算出糖消耗,以与第0天的实际值的相对值来记载。分别用葡萄糖检测试剂盒(BioVision)(图4的下图)和乳酸检测试剂盒(BioVision)(图4的上图)来测定糖和乳酸。

[0220] 以上,在衰老细胞中,如图3所示,观察到基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号显著

增加(纵轴),可确认PGAM-Chk1结合亢进。另外,如图4所示,可知在衰老细胞中乳酸产生和糖的摄入效率均上升。

[0221] 2.通过阻断衰老细胞中的PGAM-Chk1结合的衰老细胞清除-1

[0222] 研究了已知为PGAM-Chk1结合阻断剂的Nutlin 3a和作为其光学异构体的Nutlin 3b的衰老细胞清除效果。需要说明的是,Nutlin 3a购自Sigma-Aldrich公司,Nutlin 3b购自Cayman chemical公司。

[0223] 已知利用作为PGAM-Chk1结合阻断剂的Nutlin 3a,可观察到衰老细胞的凋亡。即,认为通过阻断衰老细胞中的PGAM-Chk1结合,可以诱导衰老细胞的凋亡。但是,已知Nutlin 3a会活化p53(Vassilev et al.,2004,Science 303,844-848;以下记作“Vassilev et al.,2004”),对年轻细胞·衰老细胞两者的增殖·存活有负面作用,因此不称为衰老细胞清除药。另一方面,我们发现了Nutlin 3a以外的其它PGAM-Chk1结合阻断剂。其是作为Nutlin 3a的光学异构体的Nutlin 3b(图5)。Nutlin 3b是作为阻断p53与Mdm2的结合的化学物质而与Nutlin 3a一起开发的抗癌剂之一。但是据报道,关于p53-Mdm2结合阻断活性,Nutlin 3a与Nutlin 3b的差异很大,与Nutlin 3a相比,Nutlin 3b的p53-Mdm2结合阻断活性为约百分之一(Vassilev et al.,2004)。

[0224] 首先,确认通过PGAM-Chk1结合阻断剂Nutlin 3a和3b,在衰老细胞中阻断PGAM-Chk1结合、导致糖酵解代谢降低。以下对具体的方法和结果进行说明。

[0225] 从JCRB细胞库获得人正常成纤维细胞、IMR90细胞。利用逆转录病毒向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras变异,获得应激衰老细胞。将得到的衰老细胞用浓度20 μ M或40 μ M的Nutlin 3a或3b处理48小时。之后,对这些细胞进行6小时的MG132处理,提取蛋白。对于得到的蛋白提取液,利用抗Chk1抗体进行免疫沉淀。将得到的免疫沉淀物用于利用抗PGAM抗体的免疫印迹,评价PGAM-Chk1的结合。其结果是,获知在衰老细胞中Nutlin 3a和3b可以同等程度地进行PGAM-Chk1阻断(图6)。

[0226] 另外,向IMR90细胞中导入带有Nano-Bit标签的PGAM和Chk1激酶基因,制作可稳定表达的细胞株。将该IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)用依托泊苷100 μ M处理48小时,获得衰老细胞。使用获得的上述的IMR90细胞的年轻细胞、衰老细胞,进行48小时的浓度不同的Nutlin 3b处理(20 μ M或40 μ M),分别测定细胞内的基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号。其结果是,通过Nutlin 3b处理,浓度依赖性抑制了衰老细胞中观察到的PGAM-Chk1结合的增强(图7)。

[0227] 然后,将IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)用100 μ M依托泊苷处理48小时,获得衰老细胞。将得到的衰老细胞用浓度20 μ M或40 μ M的Nutlin 3a或3b处理48小时。Nutlin处理后,回收培养基,进行糖消耗量评价和乳酸产生测定。用细胞总蛋白质量对每小时分泌到培养基中的乳酸量(μ mol/h)进行校正,用所得的值(μ mol/mg/h)来测定算出乳酸值,以与第0天的实际值的相对值来记载。用细胞总蛋白质量对每小时培养基中减少的葡萄糖量(μ mol/h)进行校正,用所得的值(μ mol/mg/h)来测定算出糖消耗,以与第0天的实际值的相对值来记载。分别用葡萄糖检测试剂盒(BioVision)(图8的上图)和乳酸检测试剂盒(BioVision)(图8的下图)来测定糖和乳酸。其结果是,确认在衰老细胞中,糖消耗和乳酸产生均被Nutlin 3a或3b浓度依赖性地抑制,糖酵解代谢得到抑制。

[0228] 如上所述,首先,确认通过PGAM-Chk1结合阻断剂Nutlin 3a和3b,在衰老细胞中阻

断PGAM-Chk1结合、导致糖酵解代谢降低。另外还获知,作为衰老细胞和癌细胞的代谢上的共通点,有PGAM-Chk1结合依赖性糖酵解代谢亢进,其结合阻断可在两者中诱导糖酵解代谢降低。

[0229] 然后,关于癌细胞中的PGAM-Chk1结合阻断效果,发现Nutlin 3a和Nutlin3b几乎同等(图9)。以下说明具体的试验方法和结果。

[0230] 向癌细胞株H1299中导入带有Nano-Bit标签的PGAM和Chk1激酶基因,制作能够稳定表达的细胞株。对于得到的细胞,用浓度40 μ M的Nutlin 3a或3b分别处理12、24、48小时。使用处理后的细胞,分别测定细胞内的基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号。其结果是,在Nutlin 3a或3b处理中,观察到基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号呈处理时间依赖性降低(纵轴),确认抑制了PGAM-Chk1结合(图9)。

[0231] 但是,关于年轻细胞中的p53活化,Nutlin 3a和Nutlin 3b差异很大,前者可充分活化,而后者完全不能活化(图10)。这与已报道(Vassilev et al.,2004)的、Nutlin 3a和Nutlin 3b在p53-Mdm2结合阻断活性方面差异很大的见解一致。以下说明具体的试验方法和结果。

[0232] 将IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)用20 μ M的Nutlin 3a或3b处理48小时。处理后从细胞中提取蛋白,进行免疫印迹。P53、其下游因子p21的蛋白量在Nutlin 3a情况下显著上升,另一方面在Nutlin 3b情况下几乎没有变化(图10)。

[0233] 然后,比较了Nutlin 3a和3b对年轻细胞和衰老细胞的效果。其结果是,发现与Nutlin 3a不同,Nutlin 3b对年轻细胞不显示毒性,另一方面,对衰老培养细胞选择性地诱导凋亡(衰老细胞清除)(图11)。另外,Nutlin 3b所带来的衰老细胞清除效果有浓度依赖性(图12),通过胱天蛋白酶3片段化的免疫印迹确认到衰老细胞的凋亡(图13)。以下说明具体的试验方法和结果。

[0234] 对于IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内),通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得衰老细胞。对于IMR90的年轻细胞、衰老细胞,分别用40 μ M的Nutlin 3a、40 μ M的Nutlin 3b处理72小时。对照仅进行DMSO处理。示出代表性的显微镜下的细胞观察图像(图11)。Nutlin 3a的情况下,年轻细胞也与衰老细胞同样地观察到细胞死亡·细胞减少,而Nutlin 3b处理的情况下,观察到衰老细胞清除现象(年轻细胞正常,衰老细胞选择性地细胞死亡)。

[0235] 然后,对上述的年轻细胞、衰老细胞分别用浓度不同的Nutlin 3b处理96小时,评价细胞死亡。在浓度20或40 μ M的Nutlin 3b时确认到显著的衰老细胞清除效果(图12)。

[0236] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中,通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得应激衰老细胞。对于年轻细胞、衰老细胞,分别用浓度不同的Nutlin 3b处理72小时,通过片段化胱天蛋白酶3的免疫印迹评价细胞死亡。年轻细胞的情况下,用Nutlin 3b处理也未发生胱天蛋白酶3的片段化。另一方面,衰老细胞的情况下,通过Nutlin 3b处理,浓度依赖性地观察到胱天蛋白酶3的片段化(图13)。

[0237] 然后,研究对老年小鼠给予Nutlin 3b的效果。具体而言,准备出生后90周的C57BL/6老年小鼠16只。分为2组(对照8只、药剂组8只),每周一次地进行腹腔内注射给予,持续2个月。对照组注射生理盐水,药剂组以11.63mg/kg的浓度给予Nutlin 3b。在末次给予结束起1周后将所有小鼠解剖,从各内脏提取RNA。通过RT-PCR评价衰老标志物、炎症标志物。

将其结果示于图14-1和14-2。如图14-1和14-2所示,药剂给予组 (Nutlin 3b) 确认到衰老标志物、炎症标志物的减少。与现有药物ABT263同样 (Chang et al., Nat. Med., 2016), 通过给予Nutlin 3b确认到各种衰老标志物减少。

[0238] 3. PGAM-Chk1激酶结合的机制分析

[0239] 致癌变异型Ras是最先发现的癌基因这一,在胰腺癌、肺癌、大肠癌等中频率非常高(分别为90%、30%、50%)。本发明人们发现,在表达致癌性Ras变异的癌细胞中会诱导PGAM-Chk1激酶结合,维持癌中的糖酵解代谢亢进(瓦氏效应) (Mikawa et al., 2020, iScience 23,101306;以下记作“Mikawa et al., 2020”)。Chk1激酶为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,是在细胞周期的G2期中起到活化DNA损伤检查点作用的检查点激酶。通过上述见解,发现Chk1在糖酵解代谢中也发挥重要作用 (Mikawa et al., 2020)。PGAM-Chk1激酶结合可以在表达致癌性Ras变异的癌细胞中观察到,但是在不表达致癌性Ras变异的普通细胞中观察不到 (Mikawa et al., 2020)。

[0240] 进一步详细调查了基于致癌性Ras变异的信号途径,结果获知存在于其下游的MEK激酶和RSK激酶很重要 (Mikawa et al., 2020)。将各阻断剂 (U126和BI-D1870) 给予于癌细胞,结果PGAM-Chk1激酶结合被阻断,糖酵解代谢降低 (Mikawa et al., 2020)。已经获知RSK激酶直接控制Chk1激酶的S280残基的磷酸化 (Li et al., 2012, Mol Biol Cell 23,1582-1592)。我们确认,在H1299细胞中,Chk1激酶的S280磷酸化也被RSK激酶阻断剂抑制 (图15)。具体而言,将癌细胞株H1299细胞用浓度10 μ M的MEK激酶阻断剂 (U126) 处理48小时。回收处理后的细胞并提取蛋白后进行免疫印迹。确认了Chk1激酶的蛋白量没有变化,但是其S280磷酸化得到抑制。另外,我们制作了Chk1激酶的S280A变异型。该不能磷酸化的变异型 (Chk1-S280A) 中,衰老细胞中PGAM-Chk1激酶结合得到抑制 (图16左)。相反,在模拟磷酸化的变异型 (Chk1-S280D) 中,发现年轻细胞中的PGAM-Chk1激酶结合是亢进的 (图16右)。具体而言,向IMR90细胞中导入带有Nano-Bit标签的PGAM和Chk1激酶基因,制作能够稳定表达的细胞株。此时,将野生型Chk1和S280A变异型、或S280D变异型的Chk1这三种分别导入细胞。向该细胞中,通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得应激衰老细胞。使用得到的衰老细胞,分别测定细胞内的基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号。其结果是, S280A变异的情况下,观察到基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号降低 (纵轴), 确认到PGAM-Chk1结合抑制 (图16左)。未导入致癌性变异Ras基因的年轻细胞中, S280D变异的情况下,观察到基于Nano-Bit的萤光素酶发光信号亢进 (图16右)。由以上可知,作为致癌性Ras变异的下游信号激酶的RSK激酶所催化的Chk1激酶的S280磷酸化对于PGAM-Chk1激酶结合而言很重要。

[0241] 进而发现,基于致癌性Ras变异的衰老细胞中,RSK1-Thr573磷酸化亢进,Chk1-Ser280磷酸化也亢进 (图17)。另外获知,通过RSKs iRNA处理可阻断衰老细胞中的PGAM-Chk1结合 (图18)。以下说明具体的试验方法和结果。

[0242] 向IMR90细胞的年轻细胞 (持续培养1个月以内) 中,通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得应激衰老细胞。回收所得到的年轻细胞、衰老细胞,提取蛋白后进行免疫印迹。衰老细胞中,Chk1激酶的S280磷酸化、RSK1激酶的Thr573磷酸化亢进,Chk1和RSK1激酶被活化 (图17)。

[0243] 然后,与上述同样地使用IMR90细胞,通过导入致癌性变异Ras基因而准备应激衰老细胞。对衰老细胞,进行RSK1s iRNA (序列号7) 或对照的转染而敲除RSK1。回收所得到的细

胞,提取蛋白。对于得到的蛋白提取液,利用抗Chk1抗体进行免疫沉淀。将得到的免疫沉淀物用于基于抗PGAM抗体的免疫印迹,评价PGAM-Chk1结合。其结果是,在衰老细胞中,通过敲除RSK1降低了Chk1激酶的S280磷酸化,可知能够阻断PGAM-Chk1(图18)。

[0244] 然后,验证了阻断RSK激酶所带来的衰老细胞清除效果。在RSK激酶阻断剂BID1870(图19)和利用RSK1siRNA的敲除(图20)中,与Nutlin 3b同样地观察到衰老细胞清除效果。RSK阻断剂所带来的衰老细胞清除有浓度依赖性(图19),siRNA所带来的衰老细胞清除效果与其同等或效率更好(图20)。以下说明具体的试验方法和结果。

[0245] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中,通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得应激衰老细胞。对于年轻细胞、衰老细胞,分别用浓度不同的RSK激酶阻断剂BI-D1870处理96小时,评价细胞死亡。在浓度10 μ M或20 μ M的BI-D1870情况下确认到显著的衰老细胞清除效果(图19)。

[0246] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中,通过逆转录病毒感染导入致癌性变异Ras基因,获得应激衰老细胞。对于IMR90的年轻细胞、衰老细胞,分别进行RSK1siRNA(目标序列的2种不同的siRNA#1(序列号7)或#2(序列号8))或对照的转染,从而敲除RSK1。示出代表性的显微镜下的细胞观察图像(图20上图)。敲除RSK1的情况下,观察到衰老细胞清除现象(年轻细胞正常,衰老细胞选择性地细胞死亡)(图20下图)。

[0247] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。通过免疫印迹来比较IMR90的年轻细胞、衰老细胞中的参与糖酵解控制的转录因子(HIF-2 α 、HIF-1 α 、E2F1、c-Myc)的表达。确认衰老细胞中作为衰老指标的核纤层蛋白B1显著减少。将其结果示于图21。如图21所示,可知衰老细胞中发生了HIF-2 α 的显著累积。

[0248] 另外,对于以同样浓度的不同的Nutlin3b、RSK激酶阻断剂BI-D1870处理96小时的年轻细胞、衰老细胞,分别进行转录因子HIF-2 α 的免疫印迹。其结果是,Nutlin3b、BI-D1870处理组中观察到HIF-2 α 蛋白减少(图22的上图和下图)。

[0249] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对于IMR90的年轻细胞、衰老细胞,进行HIF-2 α 特异性的目标序列不同的2种siRNA(序列号9、序列号10)的转染而敲除HIF-2 α 。之后,评价细胞死亡,结果在使用上述HIF-2 α 特异性的目标序列不同的2种siRNA敲除了HIF-2 α 的衰老细胞中,观察到选择性细胞死亡(衰老细胞清除)。将结果示于图23、24。

[0250] 4. PGAM1-Chk1途径的下游转录因子的分析

[0251] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对上述衰老细胞进行48小时Nutlin 3b处理,分析作为凋亡诱导基因的BIM基因的表达(图25)。如图25所示,确认衰老细胞由于Nutlin 3b处理而凋亡诱导基因BIM的表达上升。

[0252] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对上述衰老细胞进行HIF-2 α 特异性的siRNA(序列号9)的转染而敲除HIF-2 α 。之后,分析作为凋亡诱导基因的BIM基因的表达(图26)。如图26所示,确认衰老细胞通过HIF-2 α 敲除而凋亡诱导基因BIM的表达上升。

[0253] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对IMR90的年轻细胞、衰老细胞进行BIM特异性的siRNA的转染而敲除BIM。之后,进行96小时的Nutlin 3b处理,确认细胞死亡(图27)。如图27所示,可知通过Nutlin 3b处理而实

现的衰老细胞清除通过BIM敲除而解除。

[0254] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对于IMR90的年轻细胞、衰老细胞,分别使用特异性的siRNA(序列号9、序列号10)敲除HIF-2 α 单独或HIF-2 α 与BIM两者,确认细胞死亡(图28)。如图28所示,通过HIF-2 α 敲除而实现的衰老细胞清除通过BIM敲除而解除。

[0255] 5. 衰老细胞清除药的筛选

[0256] 对上述数据进行综合判断,推测如果以PGAM-Chk1结合为指标,能够鉴定出更强效的衰老细胞清除药。因此,以PGAM-Chk1结合可视化为指标,实施使用Cell-base NanoBiT系统的PGAM-Chk1结合阻断HTP(高通量)筛选。具体而言,通过以下方法来进行。NanoBiT中,在PGAM和Chk1上分别连接以萤光素酶为基础制作的发光蛋白的大亚基和小亚基,分别作为标签。这些标签形成了可彼此结合的结构。各亚基本身不发光,但是由于PGAM与Chk1结合而大亚基和小亚基缔合成完整的发光蛋白则发出发光信号。通过测定此时的发光信号的强度,可以以高灵敏度和高定量性测定结合量。此时,存在Nutlin之类的阻断PGAM与Chk1的结合的物质则发光信号降低。因此,以该发光信号的减少为指标,能够从药剂文库中筛选阻断PGAM与Chk1的结合的化合物。

[0257] 使用该PGAM-Chk1结合可视化Cell-base NanoBiT系统,在京都大学医学研究支援中心的辅助下,以安全性评价已完成的现有药物文库(2300余种)为对象进行PGAM-Chk1结合阻断HTP筛选,作为初级筛选,获得约200多种结合阻断候选药(图29、图30)。

[0258] 进而,在次级筛选中,以对普通细胞的衰老细胞清除活性为指标。发现了与具有衰老细胞清除活性的ABT263机制不同的约40种衰老细胞清除药(图29)。以下对具体的试验方法和结果进行说明。

[0259] 次级筛选中,比较了年轻IMR90细胞和衰老IMR90细胞的药物敏感性。通过诱导致癌性Ras变异而制作衰老IMR90细胞。在96孔板中分别播种年轻细胞和衰老细胞,2天后用通过初级筛选而得到的候选药以5 μ M和10 μ M的2阶段浓度进行处理。将72小时后仍存活的细胞用福尔马林固定,用结晶紫染色。之后,用2% Triton X100提取各孔的结晶紫而定量(图31-1、图31-2)。对于年轻细胞和衰老细胞,分别将溶剂(DMSO)处理细胞作为阴性对照,通过以下式子计算相对于阴性对照的存活率。进而,比较年轻细胞和衰老细胞的药物敏感性,评价为衰老细胞清除活性(年轻细胞存活率/衰老细胞存活率)。需要说明的是,阳性的基准是衰老细胞清除活性为1.14以上。

[0260] 存活率(%) = (样品/阴性对象) \times 100

[0261] 衰老细胞清除活性 = 年轻细胞存活率/衰老细胞存活率

[0262] 如上所述,在当前时刻,如果包含Nutlin 3b、RSK激酶阻断剂BI-D1870和通过次级筛选而获得的药剂,则如图32所汇总那样,已成功鉴定出40种以上衰老细胞清除药。通过次级筛选而获得的这些新的衰老细胞清除药根据功能分类大约可分为7组。

[0263] 6. 对老年小鼠给予Nutlin 3b的效果的研究2

[0264] 进一步详细评价了Nutlin 3b在老年小鼠中的体内效果。将试验日程示于图33。将20月龄的C57BL/6小鼠(日本杰克森实验室)分为2组,对于Nutlin 3b给予组,将悬浮于溶剂(PBS:PEG400=50:50)的Nutlin 3b以11.62mg/kg、每周1次地腹腔内给予3个月。对于介质组,以相同日程仅给予溶剂。其结果是,Nutlin 3b给予组在身体状态方面观察到若干改善。

肌力(线挂测试)、作为肾功能标志物的血浆BUN、血浆肌酐以及作为肝功能标志物的血浆白蛋白值和乳酸值均由于给予Nutlin 3b而改善(图34、35)。肝脏的组织化学分析表明,在老年小鼠中累积的p21阳性细胞在Nutlin 3b处理老年小鼠中显著减少(图36A)。表示衰老组织中的巨噬细胞浸润的F4/F80阳性细胞也由于Nutlin 3b处理而减少,与一些SASP因子(IL6、CXCL1、TNF α 和CCL5)的减少一致。另外,对各组的脂肪组织进行作为细胞衰老标志物的 β 半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA β -Gal)染色,结果Nutlin 3b给予组的细胞衰老程度得到改善(图37)。

[0265] 7. PGAM1-Chk1途径的下游转录因子的分析(Chk1对HIF-2 α 的控制)

[0266] 向IMR90细胞的年轻细胞(持续培养1个月以内)中导入致癌性Ras而诱导衰老细胞(OIS)。对该衰老细胞进行Nutlin 3b处理则HIF-2 α 蛋白的表达被抑制,但是用蛋白酶体阻断剂MG132进行处理则HIF-2 α 蛋白水平显著恢复(图38)。但是,对其mRNA的影响比较少(图39),表明Nutlin 3b处理期间可能参与对HIF-2 α 的泛素化。已知通过将泛素化部位附近磷酸化可诱导泛素化(Hagai et al., 2012)。位于HIF-2 α 的N末端的、由Chk1来磷酸化的共有序列(K/R-K/R-x-x-S/T)是保守的,它们被命名为Motif1(包含Ser12残基)和Motif2(包含Ser19残基)(图40、序列号77~81)。根据全球性磷酸化蛋白(<https://www.phosphosite.org>(Hornbecket al., 2015)数据库的报道,它们中的HIF-2 α 的Ser12在其它细胞类型中也被磷酸化。HIF-2 α 的S12A变异体在衰老细胞的泛素化中非常脆弱,但S19A变异体并非如此(图41、42)。一如既往地,Chk1依赖性地在衰老细胞中检测到Ser12残基的磷酸化(图43)。这些数据表明HIF-2 α 为PGAM-Chk1相互作用的衰老靶标。

[0267] 8. 衰老细胞中糖酵解亢进的生理意义研究

[0268] 为了探究糖酵解亢进在衰老中的生理学意义,制备包含衰老细胞和非衰老细胞的驯化培养基,添加于初代人成纤维细胞。PGAM-Chk1相互作用由于来自衰老细胞的培养上清而增强,对照则未增强(图44)。由此认为,来自衰老细胞的培养上清中包含了可增强PGAM-Chk1相互作用的成分。作为这样的成分的候选,想到了乳酸,因此对成人成纤维细胞进行乳酸处理。其结果是,乳酸浓度依赖性地观察到HIF-2 α 的累积和其Ser12的磷酸化、PGAM-Chk1相互作用的增强(图45)。该结果与在老年小鼠的血清和衰老细胞的培养上清中上升的乳酸水平的结果一致。另外,乳酸刺激SASP表达,但p21的水平与对照没有差异(图46)。进而针对乳酸的细胞表面受体GPR81在衰老细胞中上调(图47),将其敲除则乳酸所带来的PGAM-Chk1相互作用的增强消失(图48)。已知GPR81信号转导部分地参与包含Ras途径(Ohno et al., 2018)的致癌模块(oncogenic module)。衰老细胞或乳酸处理细胞中,处于Ras途径下游的RSK1激酶被活化,观察到伴有已知为RSK的靶标的Chk1的Ser280(Li等, 2012年)的磷酸化(图49)。

[0269] 9. 抑制存活蛋白(Survivin)表达所带来的衰老细胞清除效果的研究

[0270] 观察了凋亡阻断剂QVD-Oph在Nutlin 3b处理下使衰老细胞的存活性恢复(图50)。另外,为了阐明阻断PGAM-Chk1结合所带来的衰老细胞清除的分子机制而实施转录组分析(图51)。通过浓缩分析,对衰老细胞中因Nutlin3b而表达减少2倍以上的1168个基因(图52)和美国国家生物技术信息中心(NCBI)所报道的ChIP(chromatin immunoprecipitation, 染色质免疫沉淀)信息进行比较研究。后者的信息由基于903种抗原(转录因子、表观遗传调节因子)的12655个ChIP数据组构成。其结果是,在5078个ChIP数据组与因Nutlin 3b而表达减

少2倍以上的基因组之间出现10个以上重复基因,21个数据组显示出最高值(4倍以上)的富集倍数(fold enrichment,FE)。这21个数据组中,12组为基于FOX M1的ChIP数据,最高浓缩评分显示为8.77(图53),还包含另外几个因子(HDAC2、MYBL2、E2F4、RBL2/p130、Rad21)。另外,在通过Nutlin 3b而被控制在3.45倍以上的前150个基因中,约26.0%(39个基因)作为FOX M1靶标而被报道(图54)(Lam et al.,2013)。

[0271] 对于关于Nutlin 3b处理衰老细胞的微阵列数据组,分析了分类在凋亡过程调节中的202个基因(GO:0042981)。列出了因Nutlin 3b处理而受到影响的41个基因中排在前10位的下调基因(图55)。作为IAP蛋白之一的Survivin/BIRC5在抗凋亡家族中下调最为显著(约30倍)。一如既往地,Survivin(存活蛋白)蛋白在Nutlin 3b处理衰老细胞中是下调的。实际上衰老细胞中的存活蛋白的敲除对于凋亡诱导了中等程度的衰老细胞清除(图56),因此表明了Nutlin 3b所带来的衰老细胞清除效果是经由HIF2-FOX M1-Survivin途径的抑制。

[0272] 10.FOX M1对存活蛋白(Survivin)表达的控制的研究

[0273] 发现除了存活蛋白(Survivin)以外,针对包括细胞周期调节因子(CCNB1、B2和D1)和有丝分裂相关基因(PLK1、ASPM、和CEP55)(Lam et al.,2013)在内的Fox M1基因的其它转录靶标的mRNA也因Nutlin 3b处理而受到显著影响(图57)。微阵列数据的GESA(基因组浓缩分析)显示,Fox M1靶标下调显著(FDRq值小于0.001)(图58、59)。Fox家族中,Foxo蛋白与衰老过程密切相关。另外,FOX转录家族成员中,Fox M1 mRNA因Nutlin 3b而下调得最厉害(图60)。进而,在衰老细胞中,通过使HIF-2 α 失活,Fox M1蛋白下调,年轻的传代细胞并非如此(图61),与Fox M1在转录上受HIF-2 α 控制的想法一致(Bai et al.,2019)。

[0274] 将本实施例中使用的引物汇总于下表(序列号11~76)。

[0275] [表1-1]

[0276] 表S2.实时qRT-PCR的引物

	名称	序列	序列 ID
	人 <i>Rpl13a</i> qRT Fw	5'-CTG GAC CGT CTC AAG GTG TT-3'	11
	人 <i>Rpl13a</i> qRT Re	5'-GCC CCA GAT AGG CAA ACT T-3'	12
	人 <i>Aldoa</i> qRT Fw	5'-GGT GTC ATC CTC TTC CAT GAG-3'	13
	人 <i>Aldoa</i> qRT Re	5'-GTA GTC TCG CCA TTT GTC CC-3'	14
	人 <i>Gapdh</i> qRT Fw	5'-CTT TGT CAA GCT CAT TTC CTG G-3'	15
	人 <i>Gapdh</i> qRT Re	5'-TCT TCC TCT TGT GCT CTT GC-3'	16
	人 <i>Pgk1</i> qRT Fw	5'-GCT TCT GGG AAC AAG GTT AAA G-3'	17
	人 <i>Pgk1</i> qRT Re	5'-CTG TGG CAG ATT GAC TCC TAC-3'	18
	人 <i>Pgam1</i> qRT Fw	5'-GGA GGC GCT CCT ATG ATG TC-3'	19
	人 <i>Pgam1</i> qRT Re	5'-ATC TTC TGT GAG GTC TGC ATA C-3'	20
	人 <i>Eno1</i> qRT Fw	5'-TTG GAG CAG AGG TTT ACC AC-3'	21
	人 <i>Eno1</i> qRT Re	5'-TTC CCAATA GCA GTC TTC AGC-3'	22
	人 CCNB1 qRT Fw	5'-TGT GGA TGC AGA AGA TGG AG-3'	23
	人 CCNB1 qRT Re	5'-GTG ACT TCC CGA CCC AGT AG-3'	24
	人 CCNB2 qRT Fw	5'-AGT TCC AGT TCAACC CAC CAA-3'	25
	人 CCNB2 qRT Re	5'-TTG CAG AGC AAG GCA TCA GA-3'	26
[0277]	人 CCND1 qRT Fw	5'-CGT GGC CTC TAA GAT GAA GG-3'	27
	人 CCND1 qRT Re	5'-CCA CTT GAG CTT GTT CAC CA-3'	28
	人 PLK1 qRT Fw	5'-CTG ACC ATT CCA CCA AGG TT-3'	29
	人 PLK1 qRT Re	5'-AGT CGA CCA CCT CAC CTG TC-3'	30
	人 ASPM qRT Fw	5'-GAG ACC TTG GTG GAA TAC CTG C-3'	31
	人 ASPM qRT Re	5'-ACG AAG ATC CAA AAG CCT TGC AC-3'	32
	人 CEP55 qRT Fw	5'-TCG ACC GTC AAC ATG TGC AGC A-3'	33
	人 CEP55 qRT Re	5'-GGC TCT GTG ATG GCA AAC TCA TG-3'	34
	人 BIRC5 qRT Fw	5'-CCA CTG AGA ACG AGC CAG AC-3'	35
	人 BIRC5 qRT Re	5'-GAC AGA AAG GAA AGC GCA AC-3'	36
	人 GPR81 qRT Fw	5'-CTG GTC ATC CTG GGA ACA GT-3'	37
	人 GPR81 qRT Re	5'-CTT CTT CAT CCG AGC CTG TC-3'	38
	人 BIM qRT Fw	5'-TCC CTG CTG TCT CGA TCC TC-3'	39
	人 BIM qRT Re	5'-GGT CTT CGG CTG CTT GGT AA-3'	40
	人 PUMA qRT Fw	5'-GAC GAC CTC AAC GCA CAG TA-3'	41
	人 PUMA qRT Re	5'-AGG AGT CCC ATG ATG AGA TTG T-3'	42
	人 BAK qRT Fw	5'-GTT TTC CGC AGC TAC GTT TTT-3'	43
	人 BAK qRT Re	5'-GCA GAG GTA AGG TGA CCA TCT C-3'	44

[0278] [表1-2]

[0279] 表S2.实时qRT-PCR的引物(续)

	名称	序列	序列 ID
	人 BAD qRT Fw	5'-GCA CAG CAA CGC AGA TGC-3'	45
	人 BAD qRT Re	5'-AAG TTC CGA TCC CAC CAG G-3'	46
	人 BAX qRT Fw	5'-TCT ACT TTG CCA GCAAAC TGG TGC-3'	47
	人 BAX qRT Re	5'-TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT-3'	48
	人 BIK qRT Fw	5'-AGA CCC TCC TGT ATG AGC AG-3'	49
	人 BIK qRT Re	5'-GCA TTC CAA AGA ATC GAA GTC CT-3'	50
	人 BMF qRT Fw	5'-GAG CCA TCT CAG TGT GTG GAG-3'	51
	人 BMF qRT Re	5'-GCC AGC ATT GCC ATAAAA GAG TC-3'	52
	人 HRK qRT Fw	5'-TGC TCG GCA GGC GGA ACT TGT AG-3'	53
	人 HRK qRT Re	5'-CTT TCT CCA AGG ACA CAG GG-3'	54
	人 BID qRT Fw	5'-CTA CGA TGA GCT GCA GAC TG-3'	55
	人 BID qRT Re	5'-GAT GCT ACG GTC CAT GCT GTC-3'	56
	人 NOXA qRT Fw	5'-CCT GAG CAG AAG AGT TTG GA-3'	57
	人 NOXA qRT Re	5'-GCT GGA AGT CGA GTG TGC TA-3'	58
	人 p21 qRT Fw	5'-AGT CAG TTC CTT GTG GAG CC-3'	59
[0280]	人 p21 qRT Re	5'-CAT GGG TTC TGA CGG ACA T-3'	60
	人 IL6 qRT Fw	5'-TGA GAG TAG TGA GGA ACA AG-3'	61
	人 IL6 qRT Re	5'-CGC AGA ATG AGA TGA GTT G-3'	62
	人 TNF α qRT Fw	5'-TTG CCT TGA CCC TGA AGC TC-3'	63
	人 TNF α qRT Re	5'-TCA GAA GCC AGC GTT CAC C-3	64
	人 CSF2 qRT Fw	5'-ACT ACA AGCA GC ACT GCC CT-3'	65
	人 CSF2 qRT Re	5'-AGC AGT CAA AGG GGATGA CA-3'	66
小鼠	p16Ink4 qRT Fw	5'-CCC AAC GCC CCG AAC T-3'	67
小鼠	p16Ink4 qRT Re	5'-GCA GAA GAG CTG CTA CGT GAA-3'	68
小鼠	IL6 qRT Fw	5'-GAT AAG CTG GAG TCA CAG AAG G-3'	69
小鼠	IL6 qRT Re	5'-GGAATG TCC ACA AAC TGA TAT GC-3'	70
小鼠	CXCL1 qRT Fw	5'-TTG CCT TGA CCC TGA AGC TC-3'	71
小鼠	CXCL1 qRT Re	5'-TCA GAA GCC AGC GTT CAC C-3'	72
小鼠	TNF α qRT Fw	5'-CCAAGG TCA ACC TCC TCT CTG-3'	73
小鼠	TNF α qRT Re	5'-CCAAGG TAG ACC TGC CCA GAC-3'	74
小鼠	CCL5 qRT Fw	5'-GGG TAC CAT GAA GAT CTC TGC-3'	75
小鼠	CCL5 qRT Re	5'-TCT AGG GAG AGG TAG GCA AAG-3'	76

[0281] 产业上的可利用性

[0282] 本发明的衰老细胞清除药的筛选方法在测定选择性除去衰老细胞的活性的工序之前进行包括测定阻断PGAM与Chk1的结合的活性的工序的初级筛选,由此可以显著提高衰老细胞清除药的筛选效率。本发明人们发现,PGAM与Chk1的结合在年轻的正常细胞中观察不到,但是在衰老细胞中显著亢进并因此而引起糖酵解代谢亢进。由此,通过从繁多的物质中首先筛选具有阻断PGAM与Chk1的结合的活性的物质,可以容易地得到能够在衰老细胞中阻断PGAM与Chk1的結合的物质,通过对它们测定选择性除去衰老细胞的活性,能够高效地发现衰老细胞清除药。实际上,使用本发明的筛选方法从安全性已得到确认的2300余种现有药品库中通过初级筛选而缩小到约200种候选药,进行衰老细胞选择性除去活性试验,最

终成功地鉴定出约40种新的衰老细胞清除药。根据本发明人们的研究,还确认在端粒非依赖性细胞衰老即应激性细胞衰老中,也与所谓的衰老细胞同样地发生由PGAM与Chk1的结合所导致的糖酵解代谢亢进,根据本发明的筛选方法,还能够发现不仅对于老年性疾病、而且对于由应激性细胞衰老引起的疾病也能发挥治疗效果的物质。

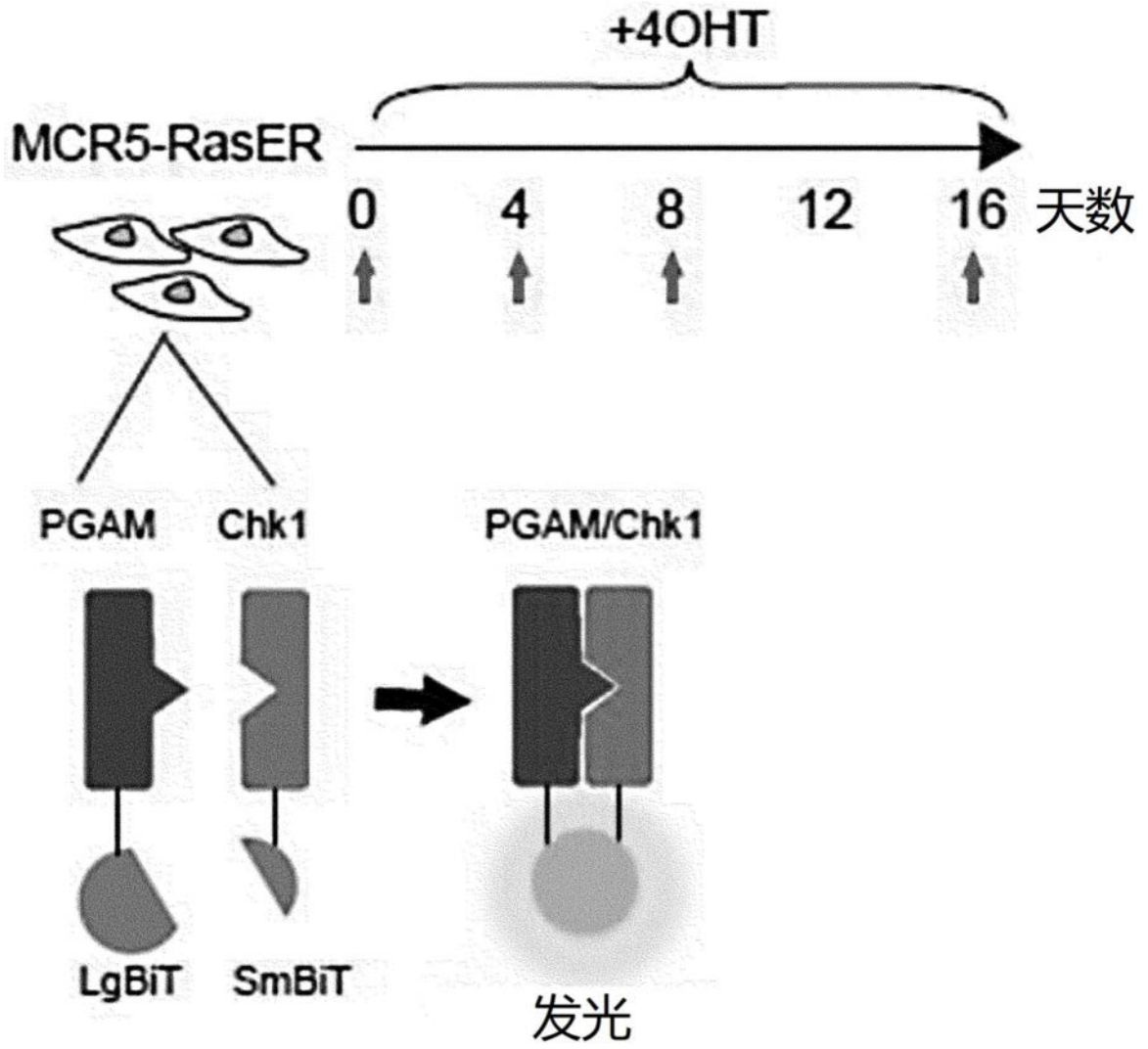


图1

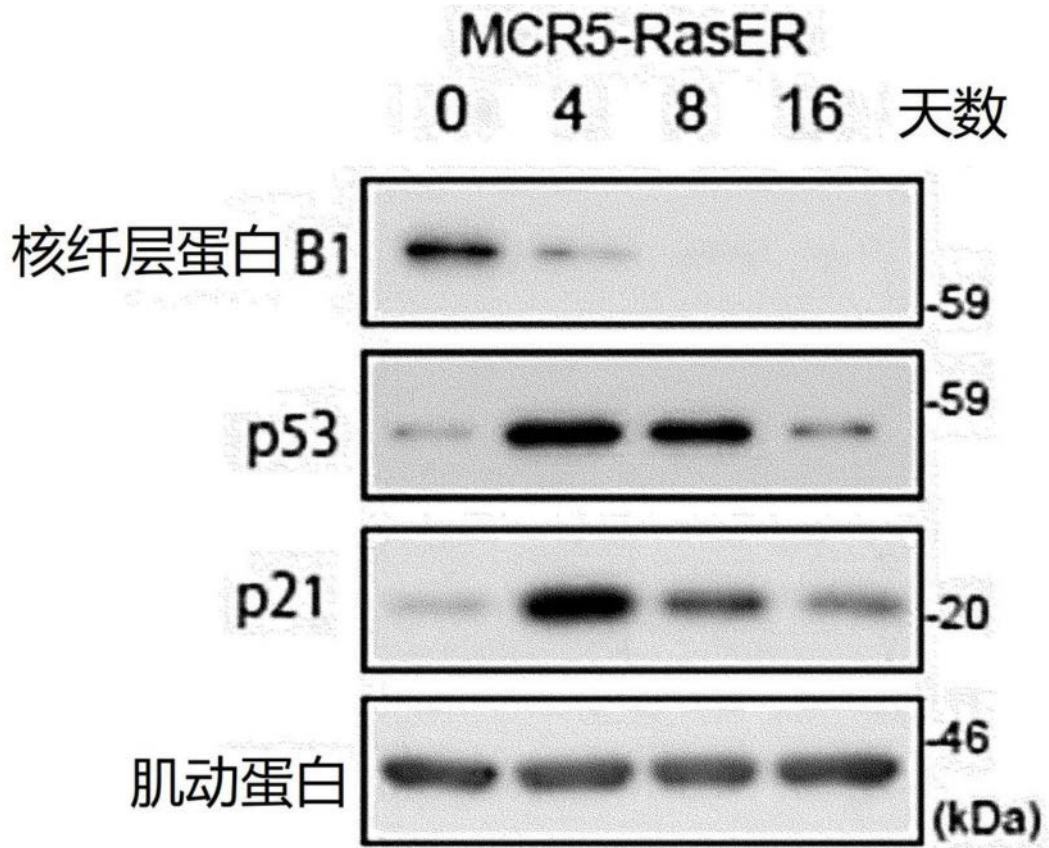


图2

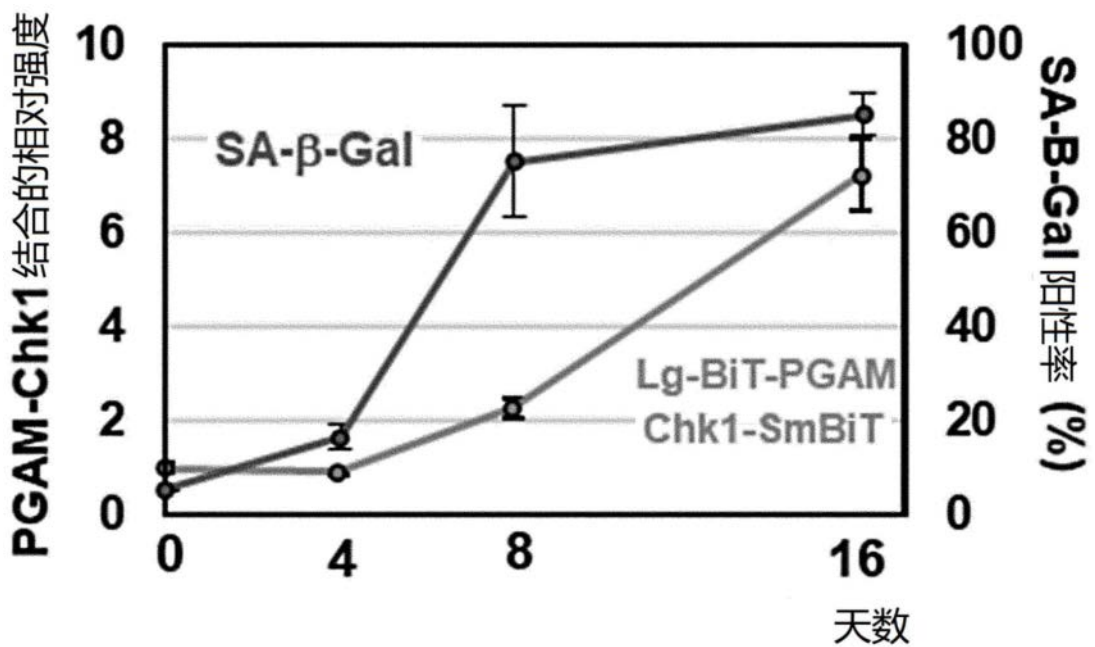


图3

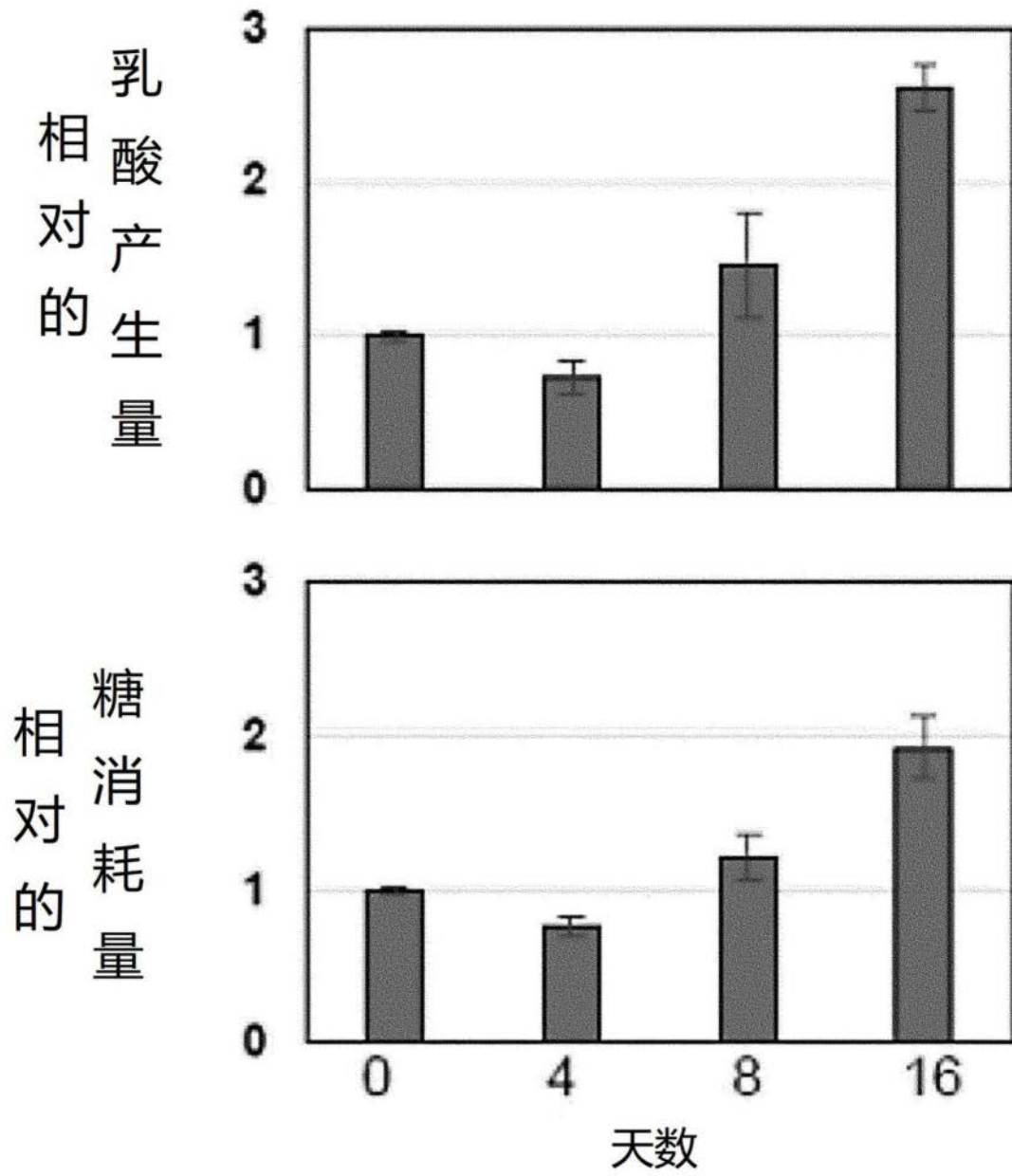


图4

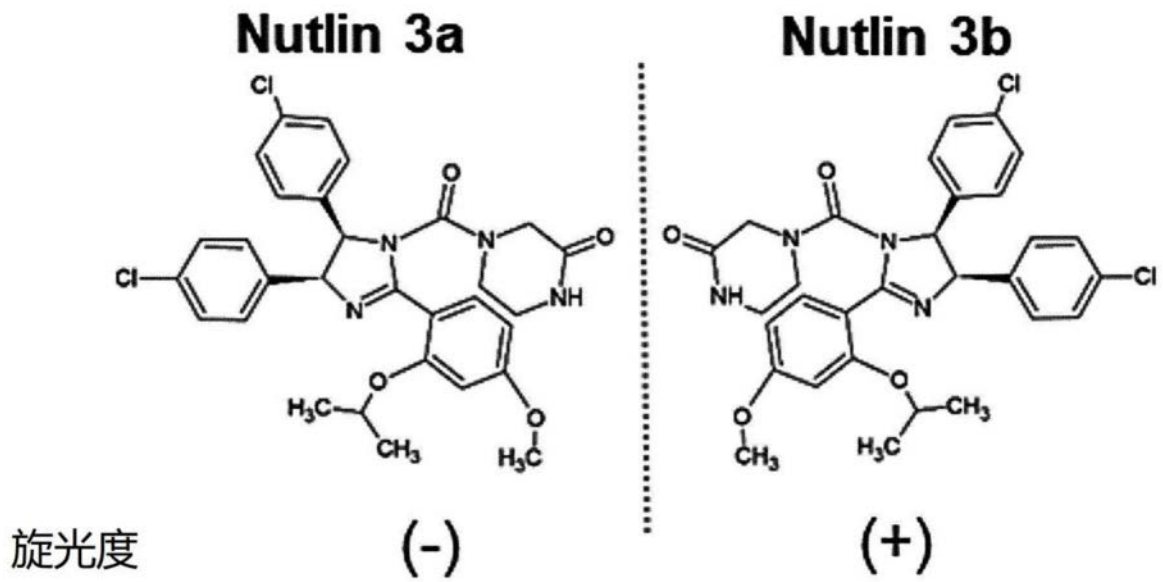


图5

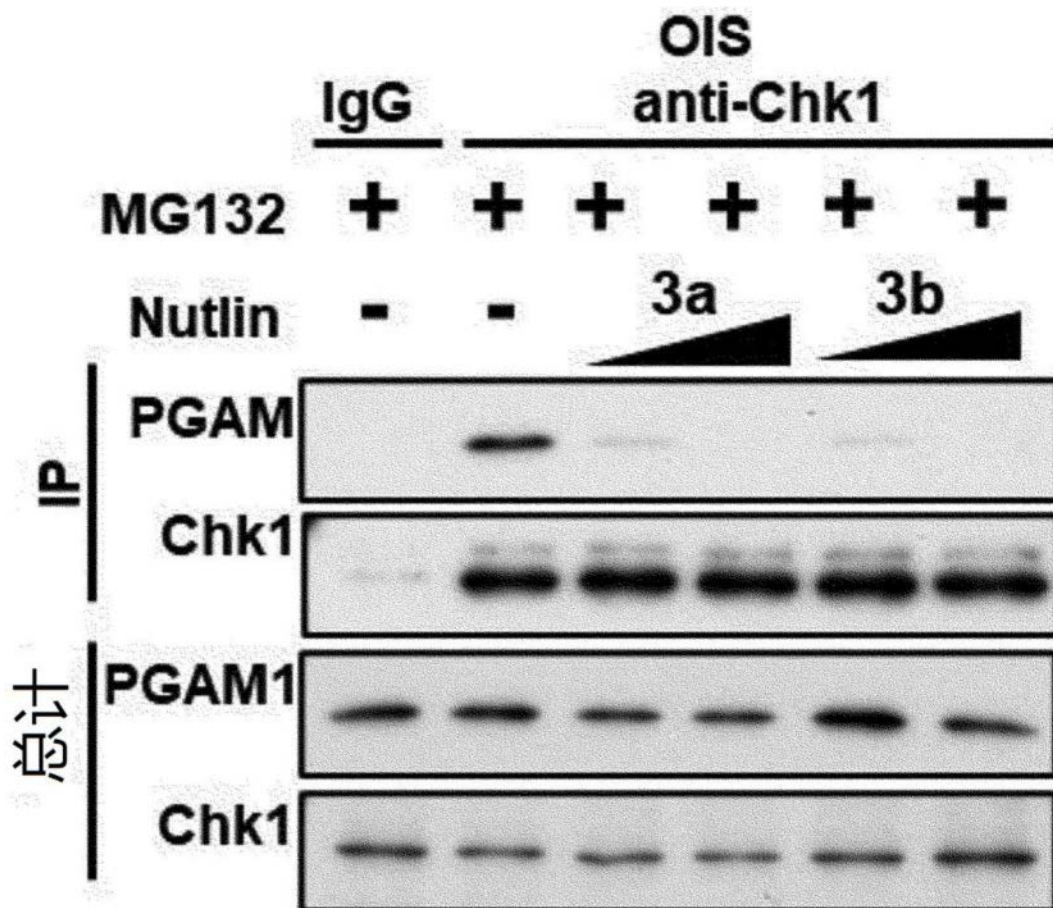


图6

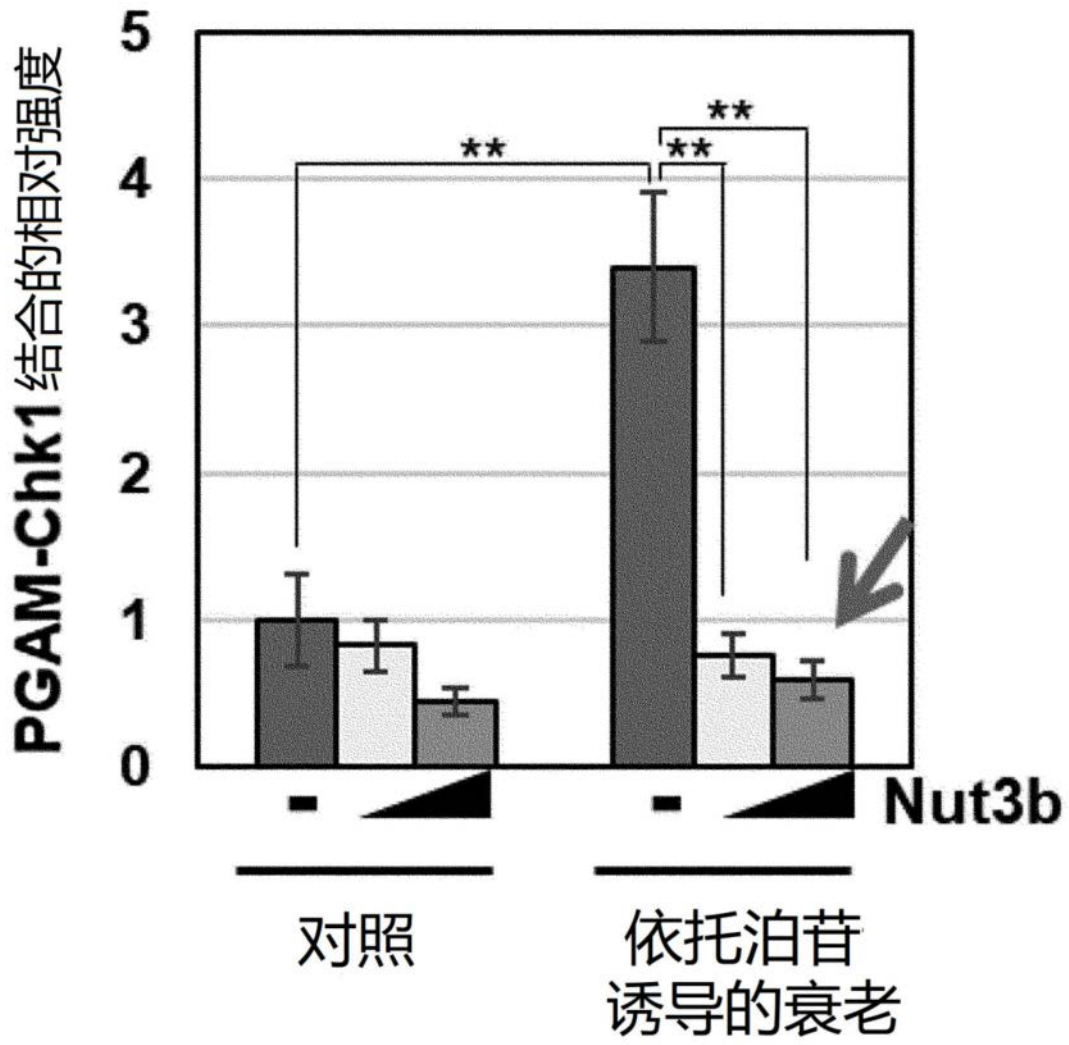


图7

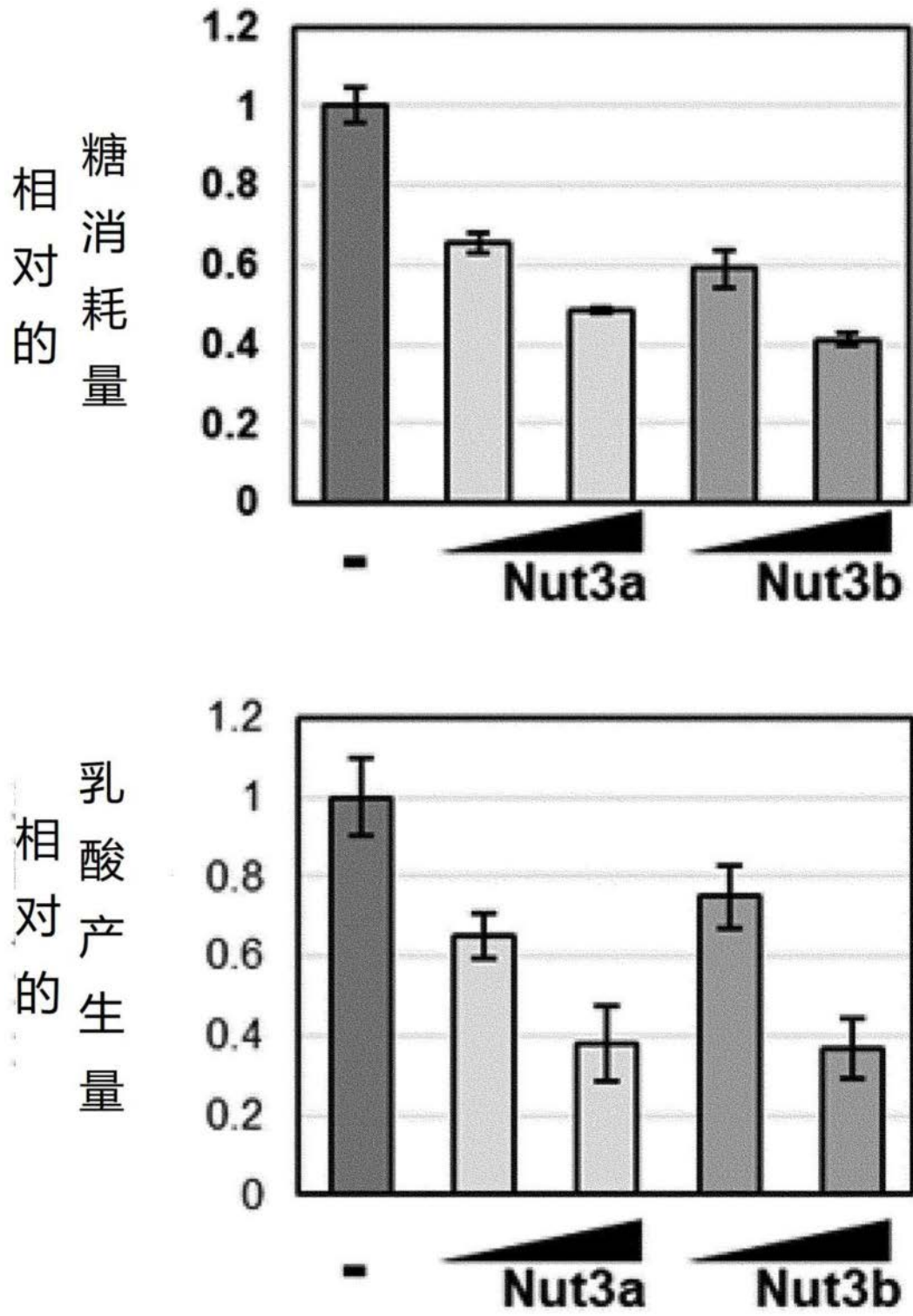


图8

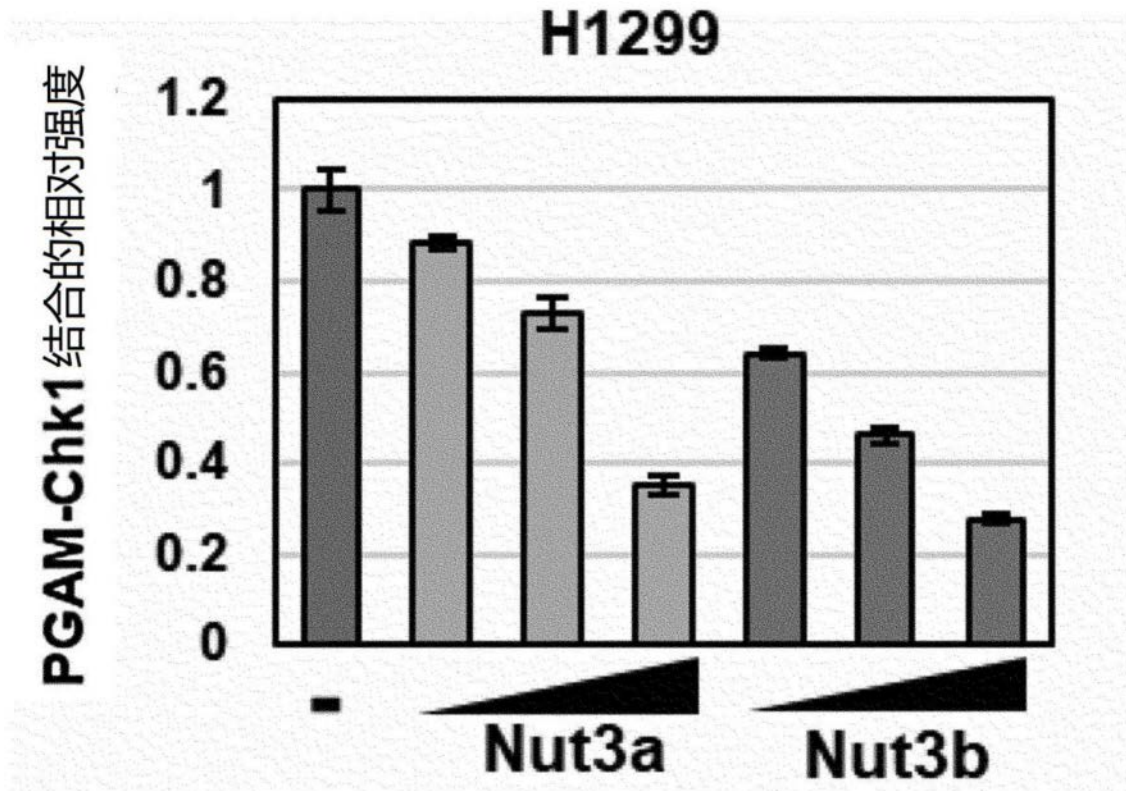


图9

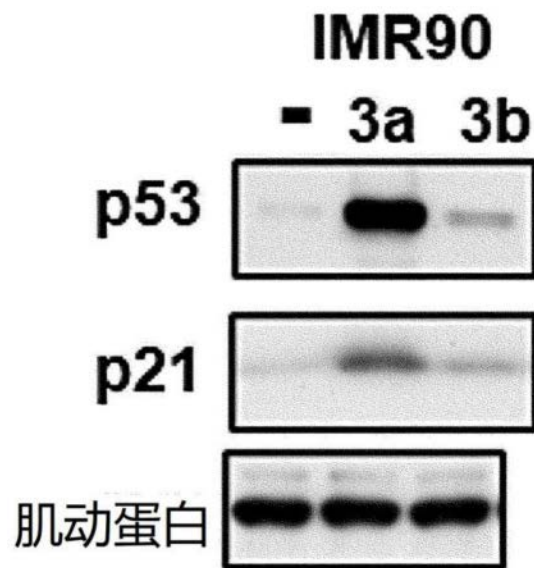


图10

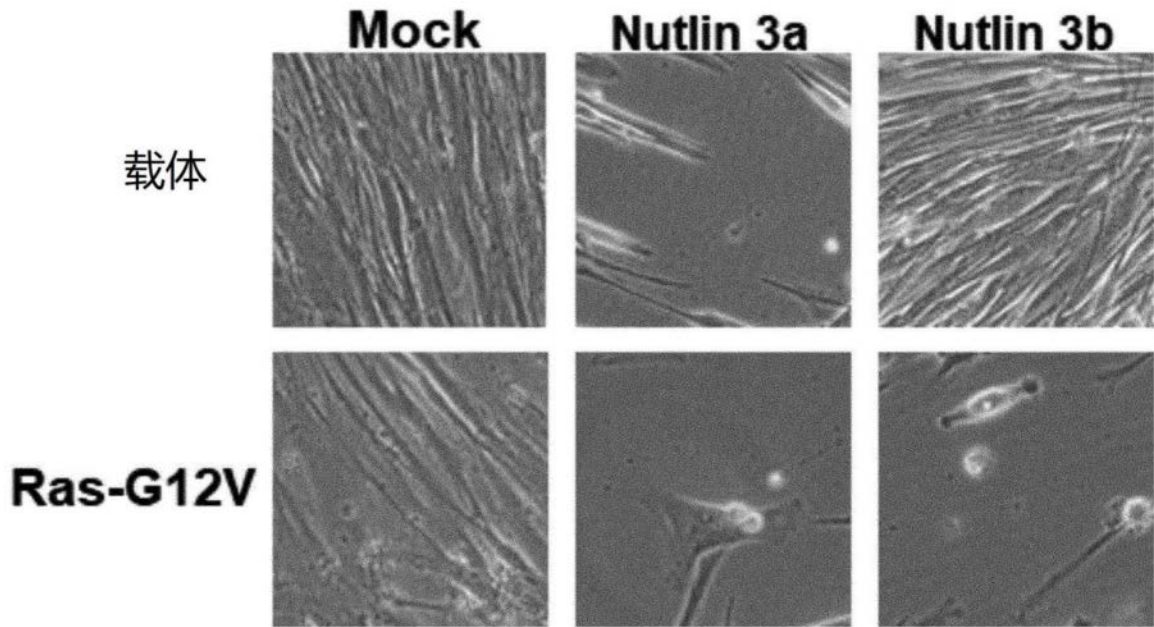


图11

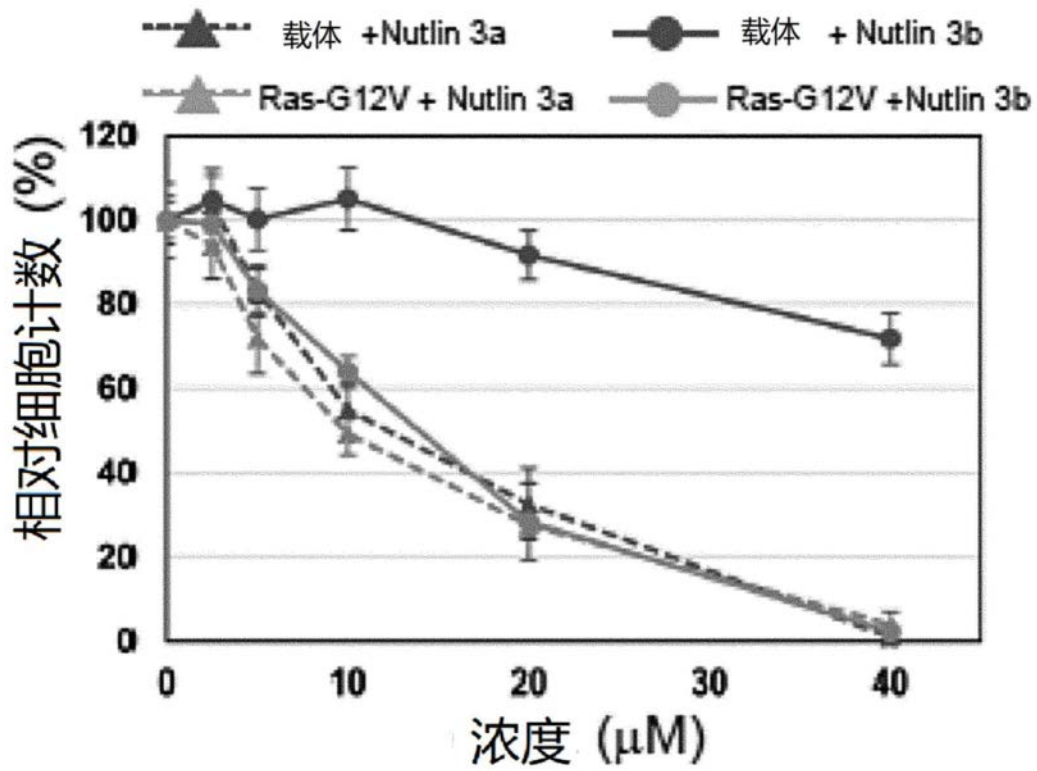


图12

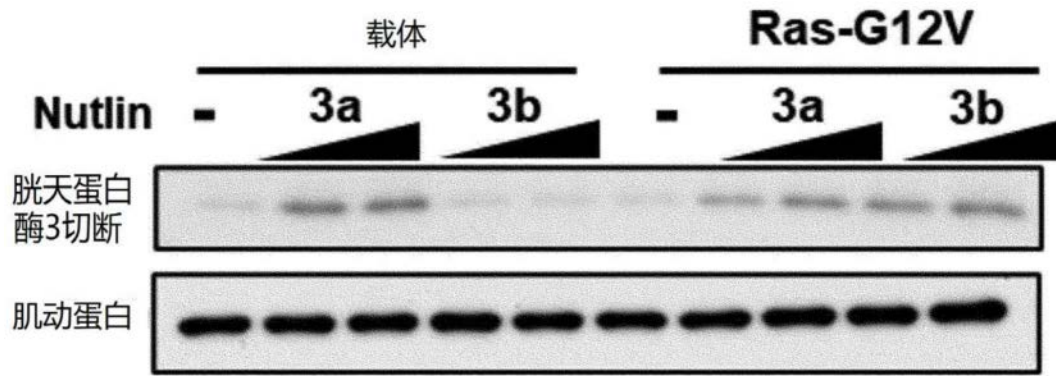


图13

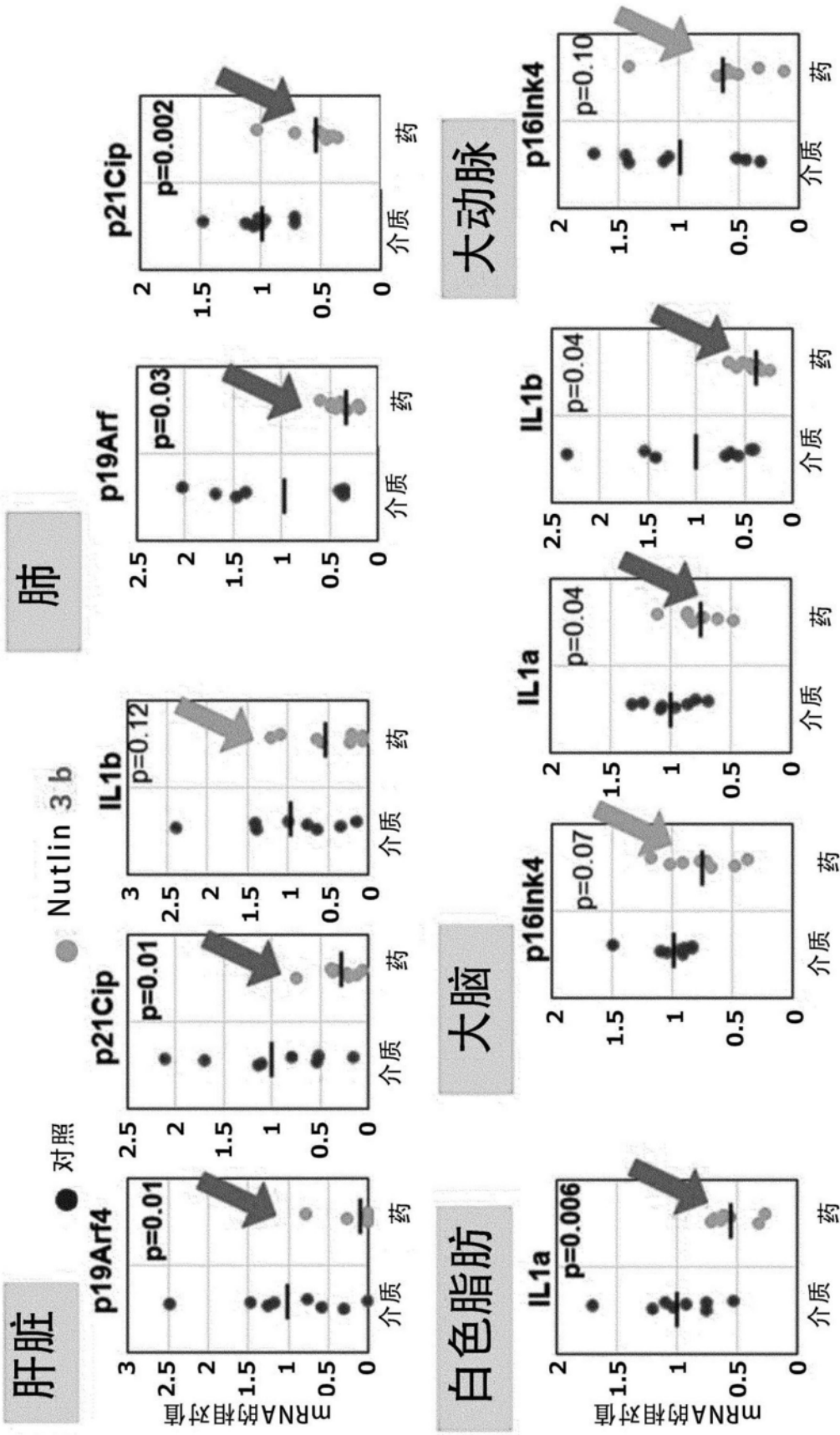


图14-1

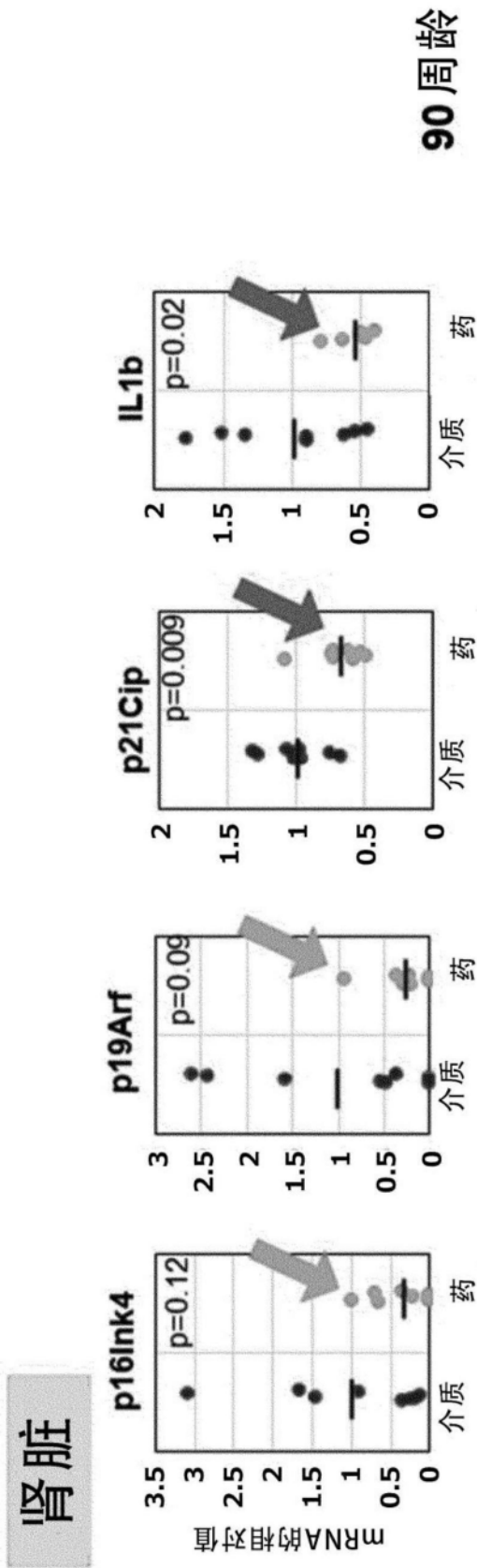


图14-2

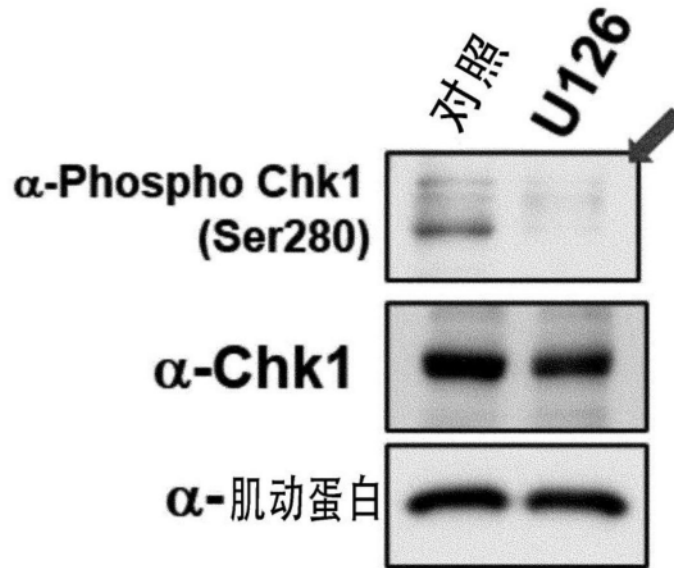


图15

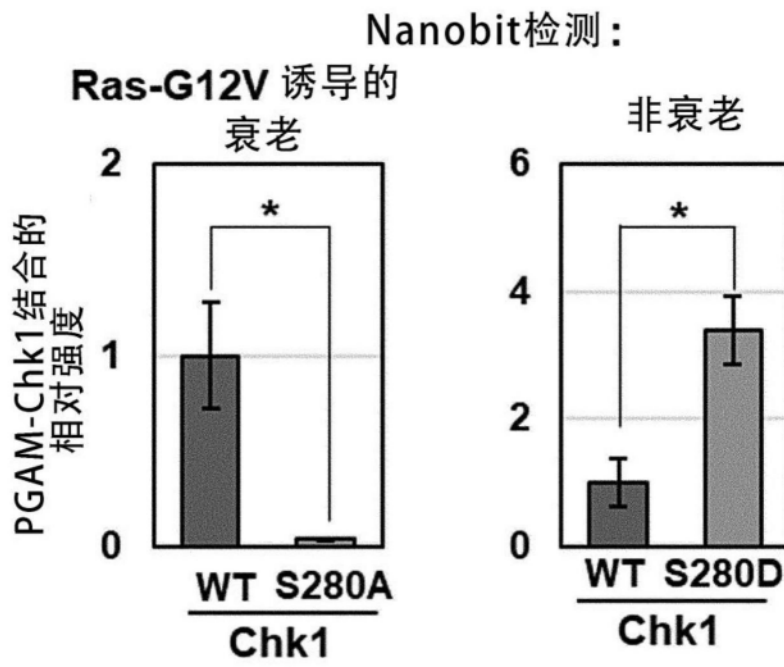


图16

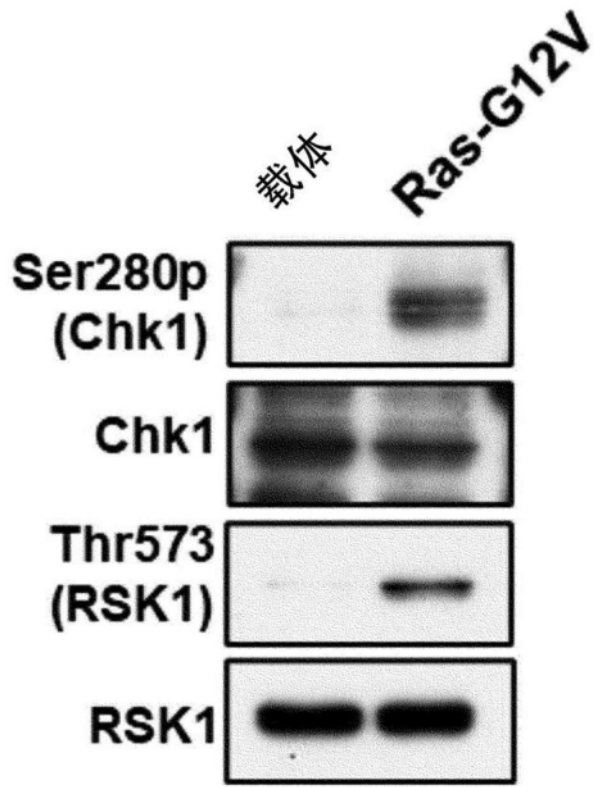


图17

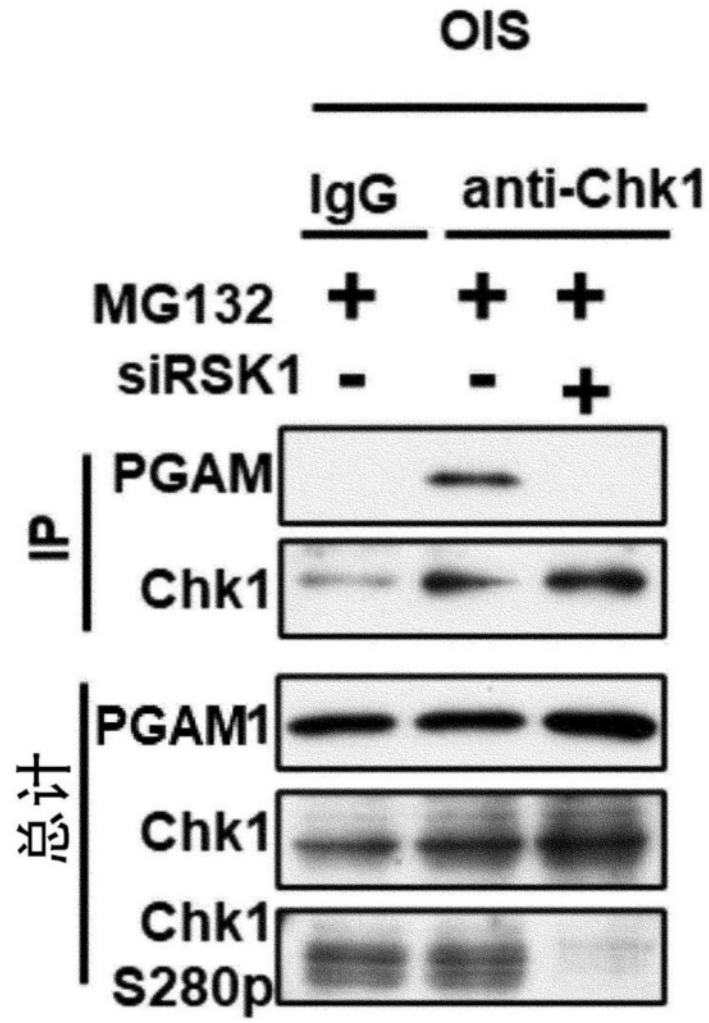


图18

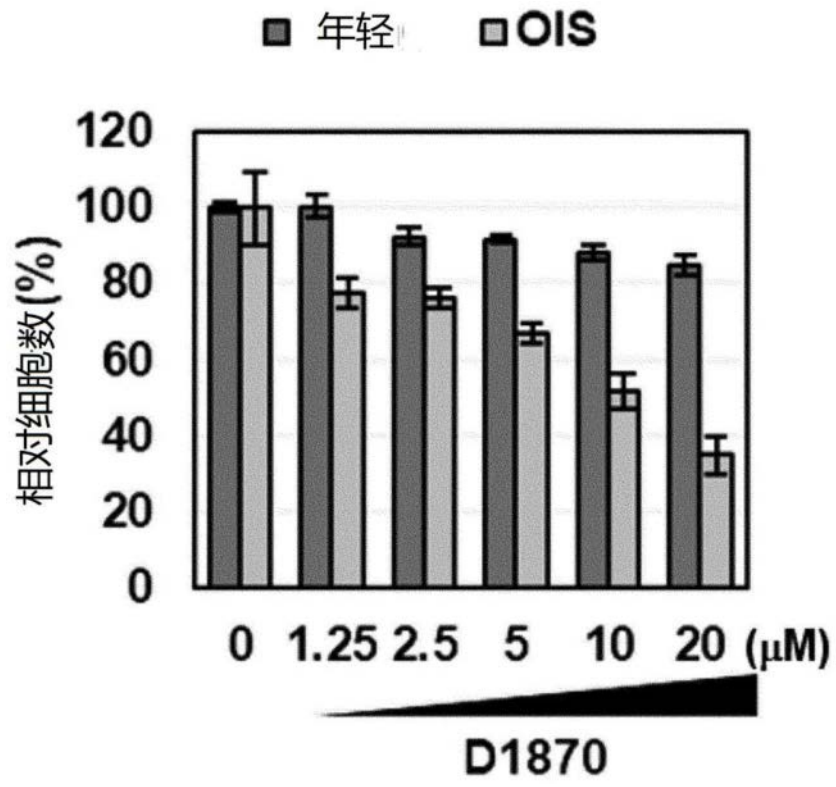


图19

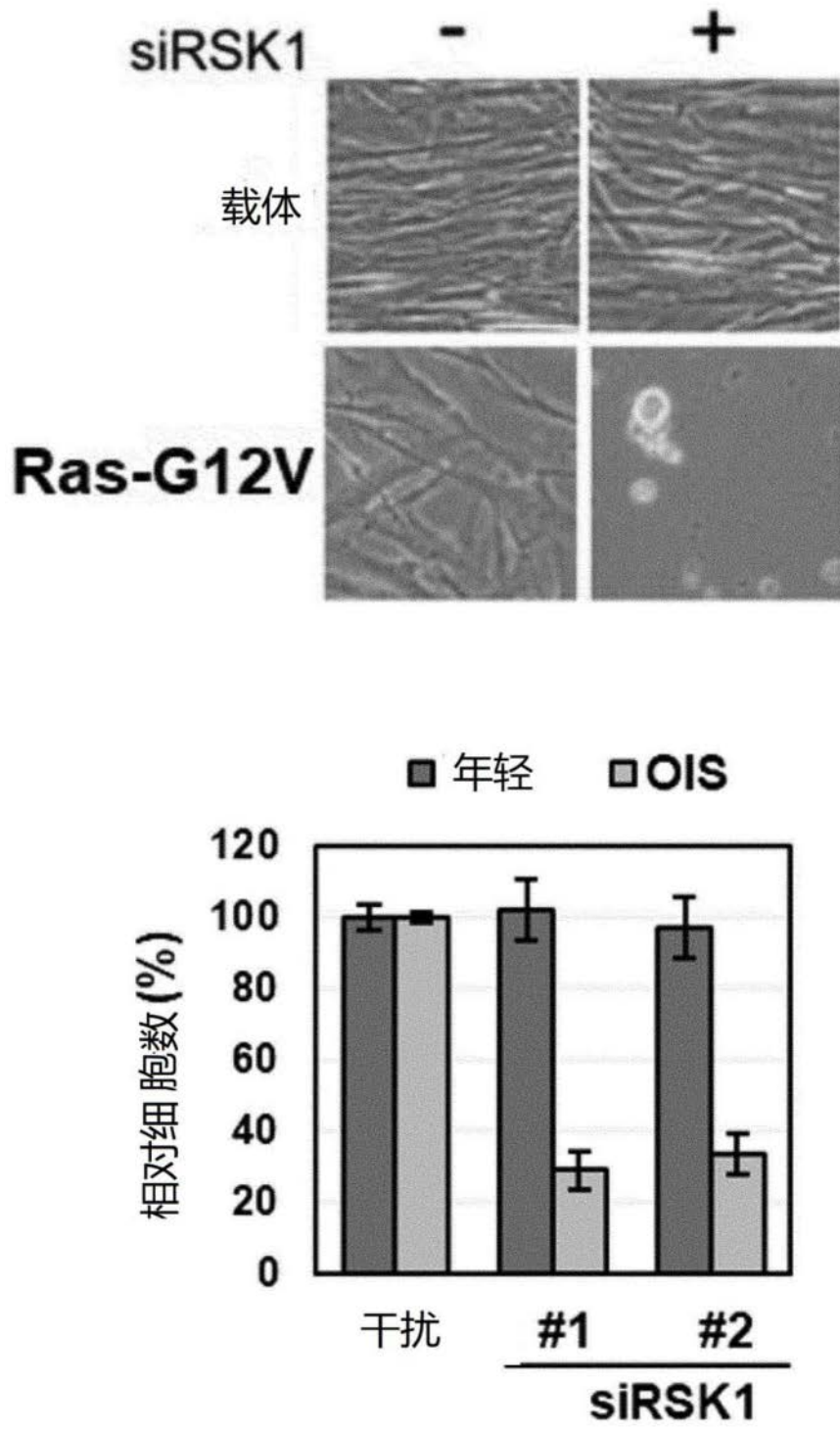


图20

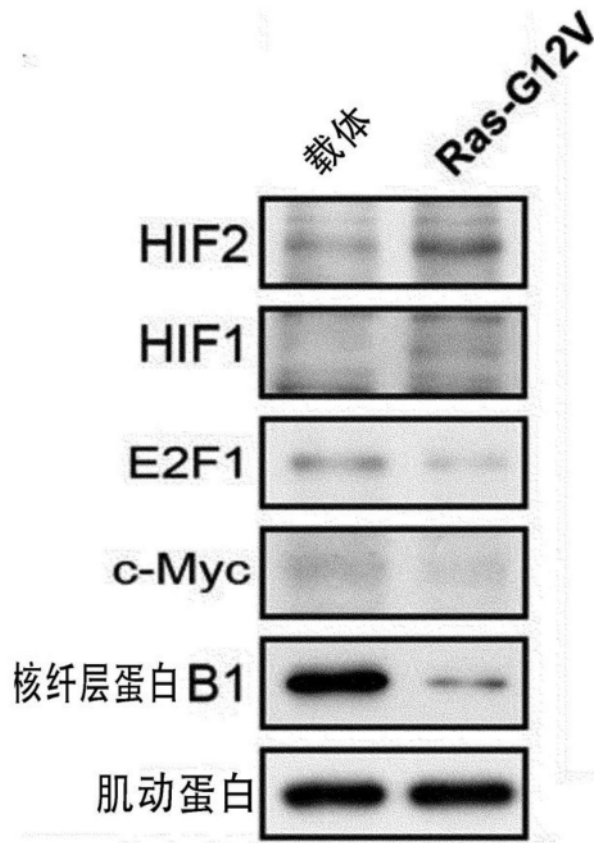


图21

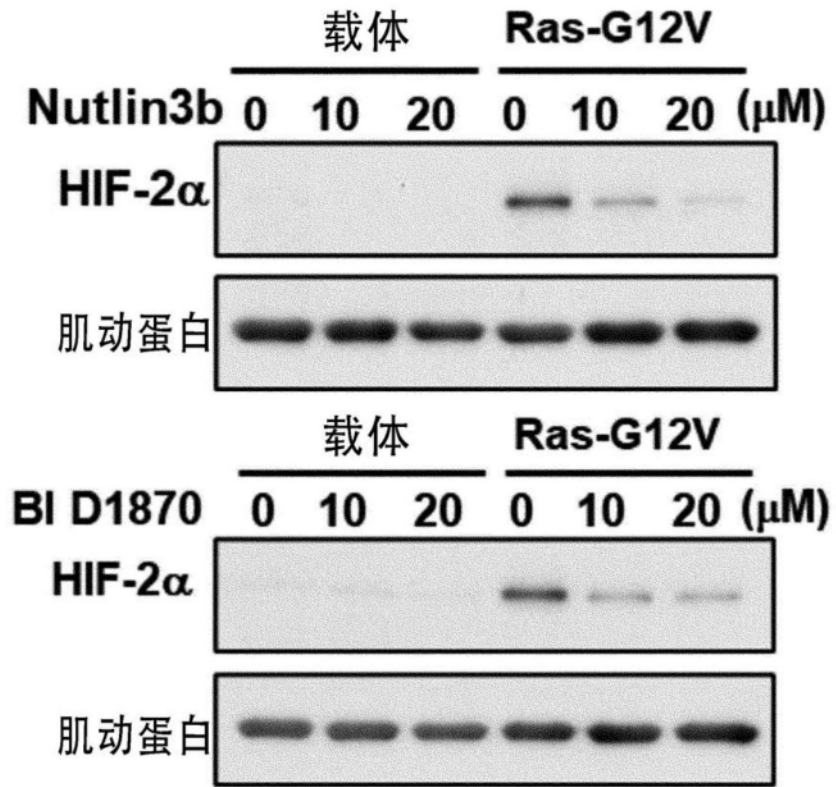


图22

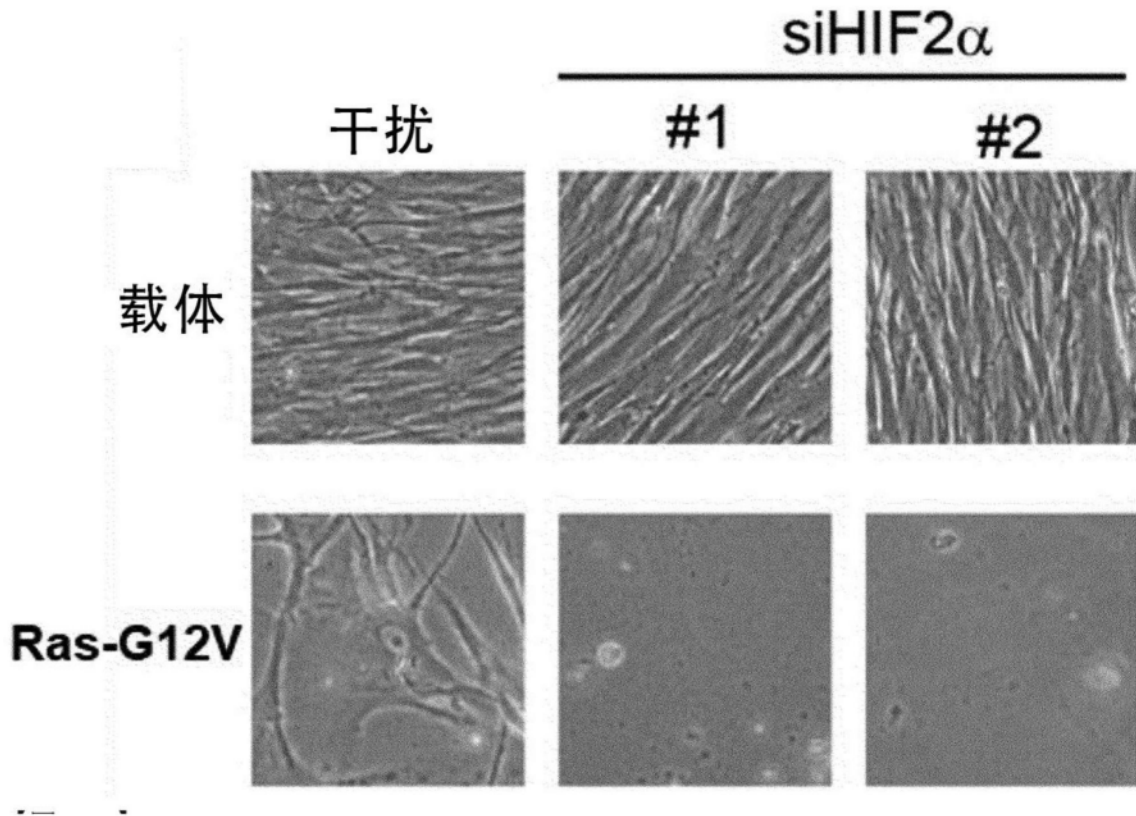


图23

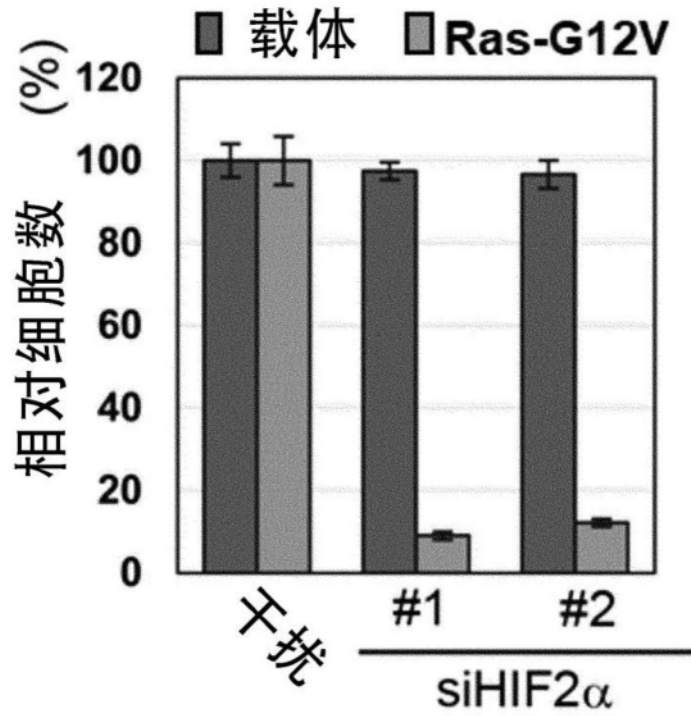


图24

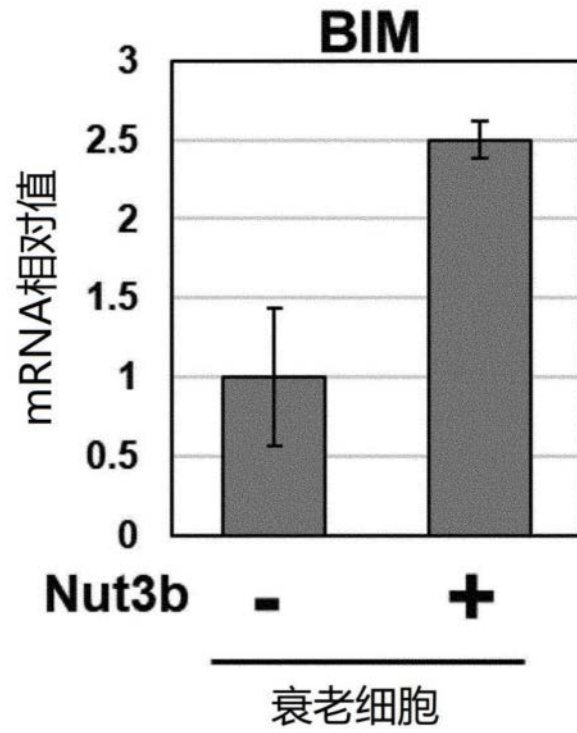


图25

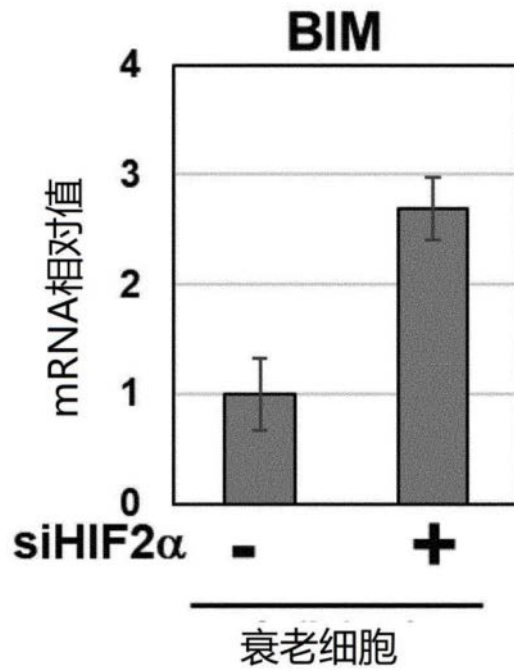


图26

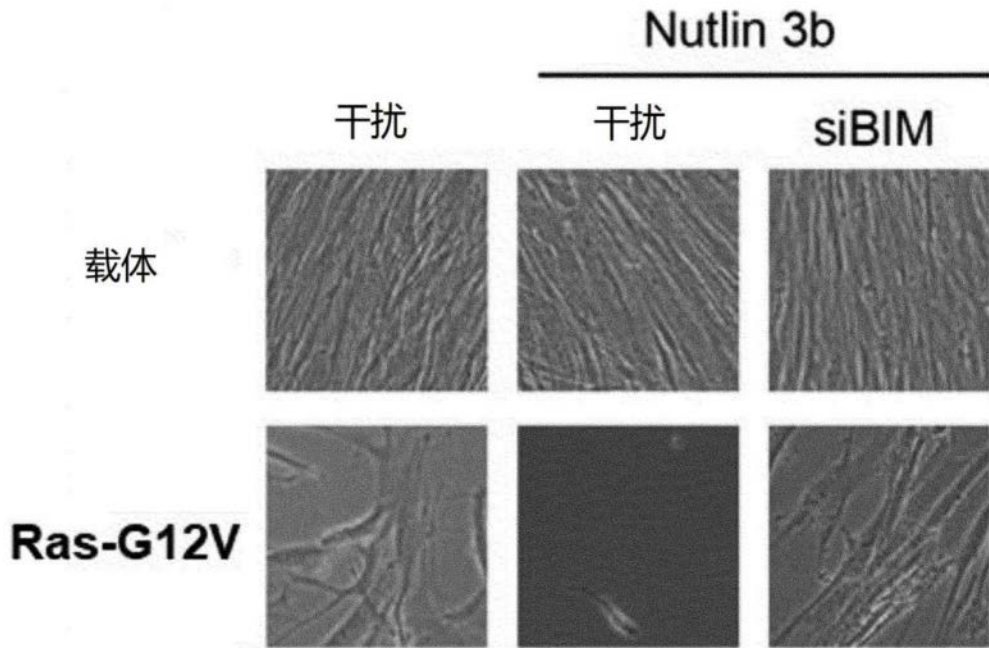


图27

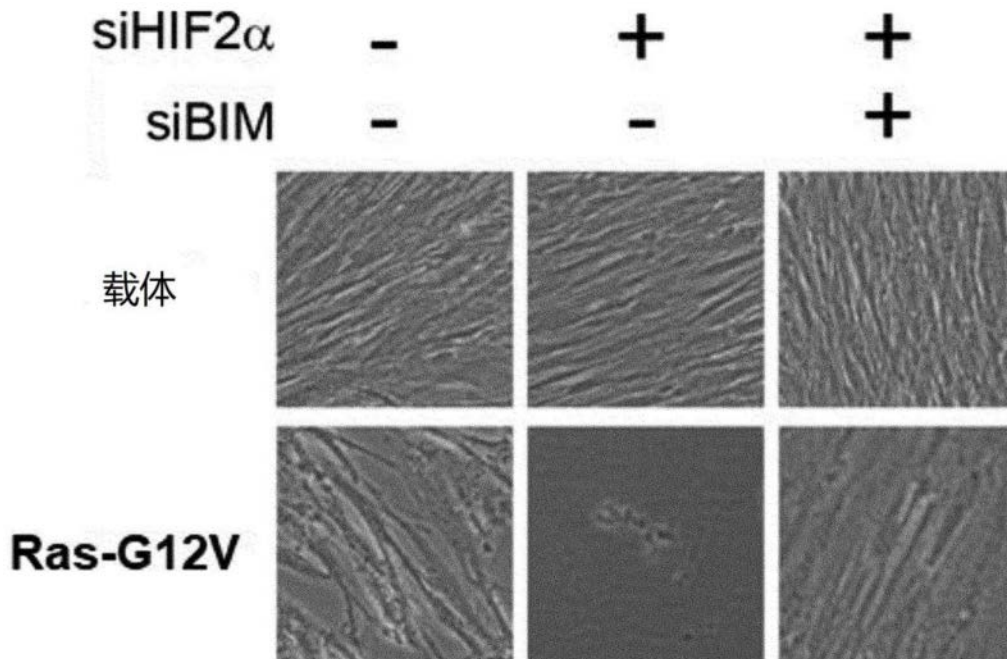


图28

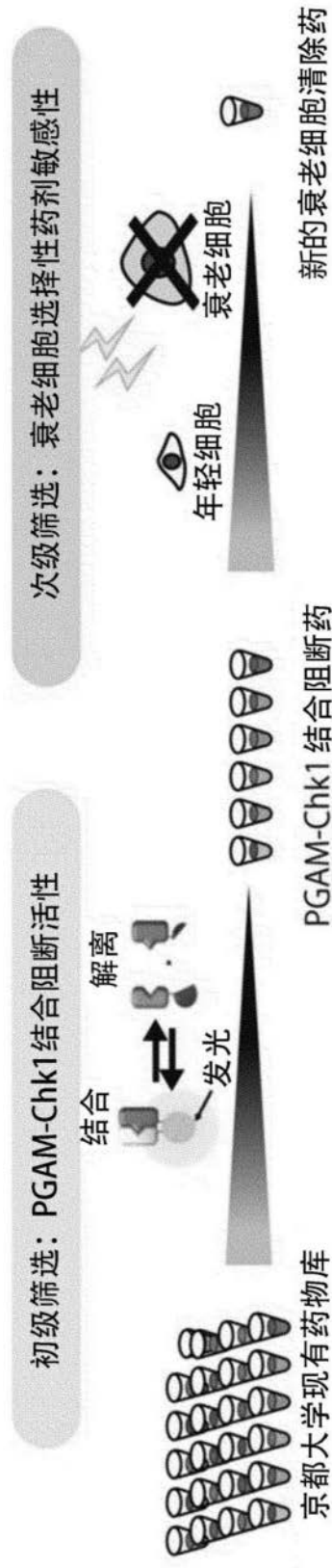


图29

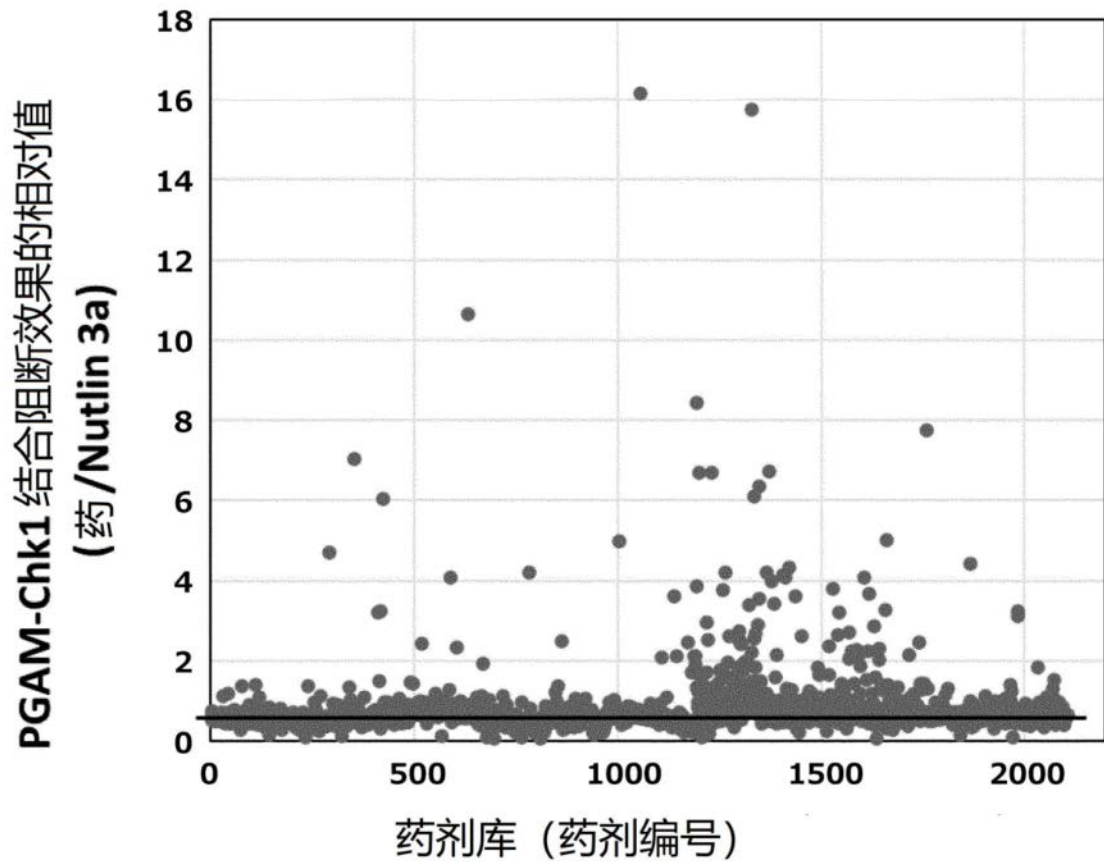


图30

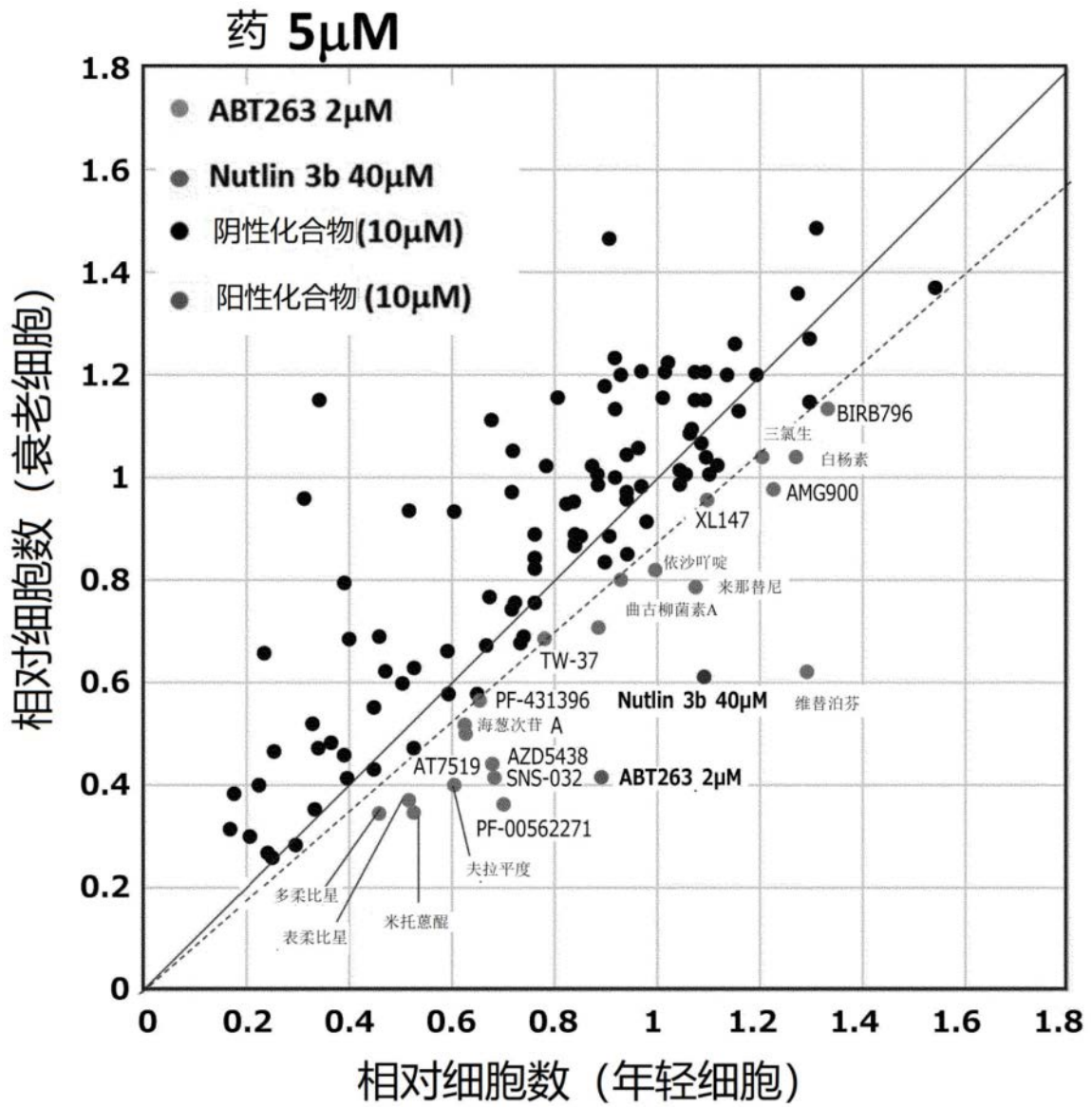


图31-2

衰老细胞清除药候补药

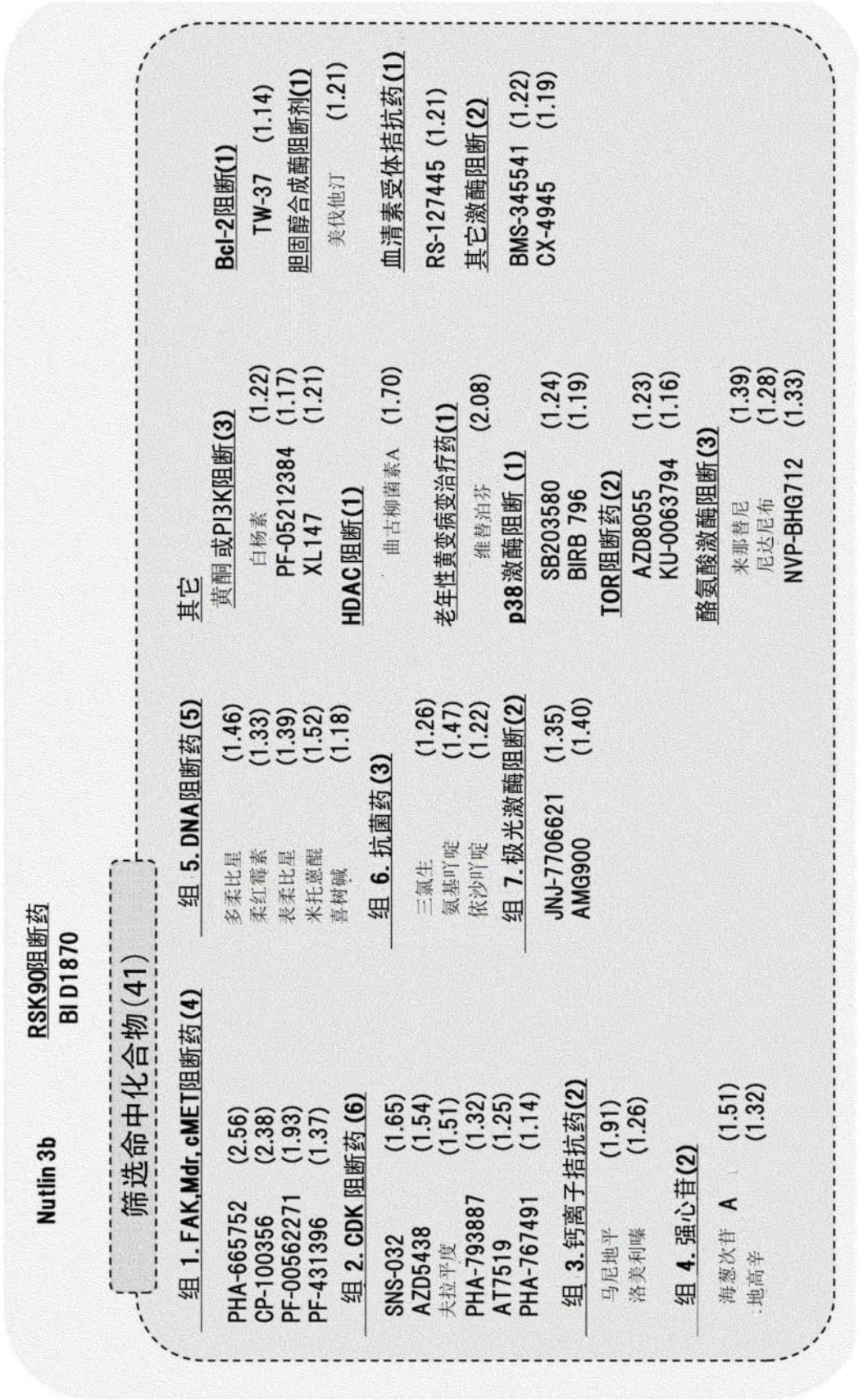


图32

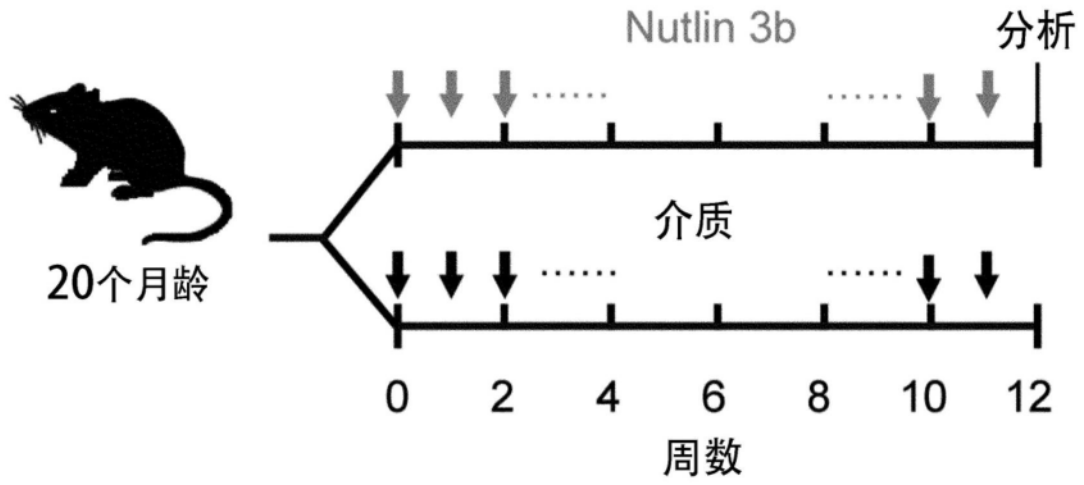


图33

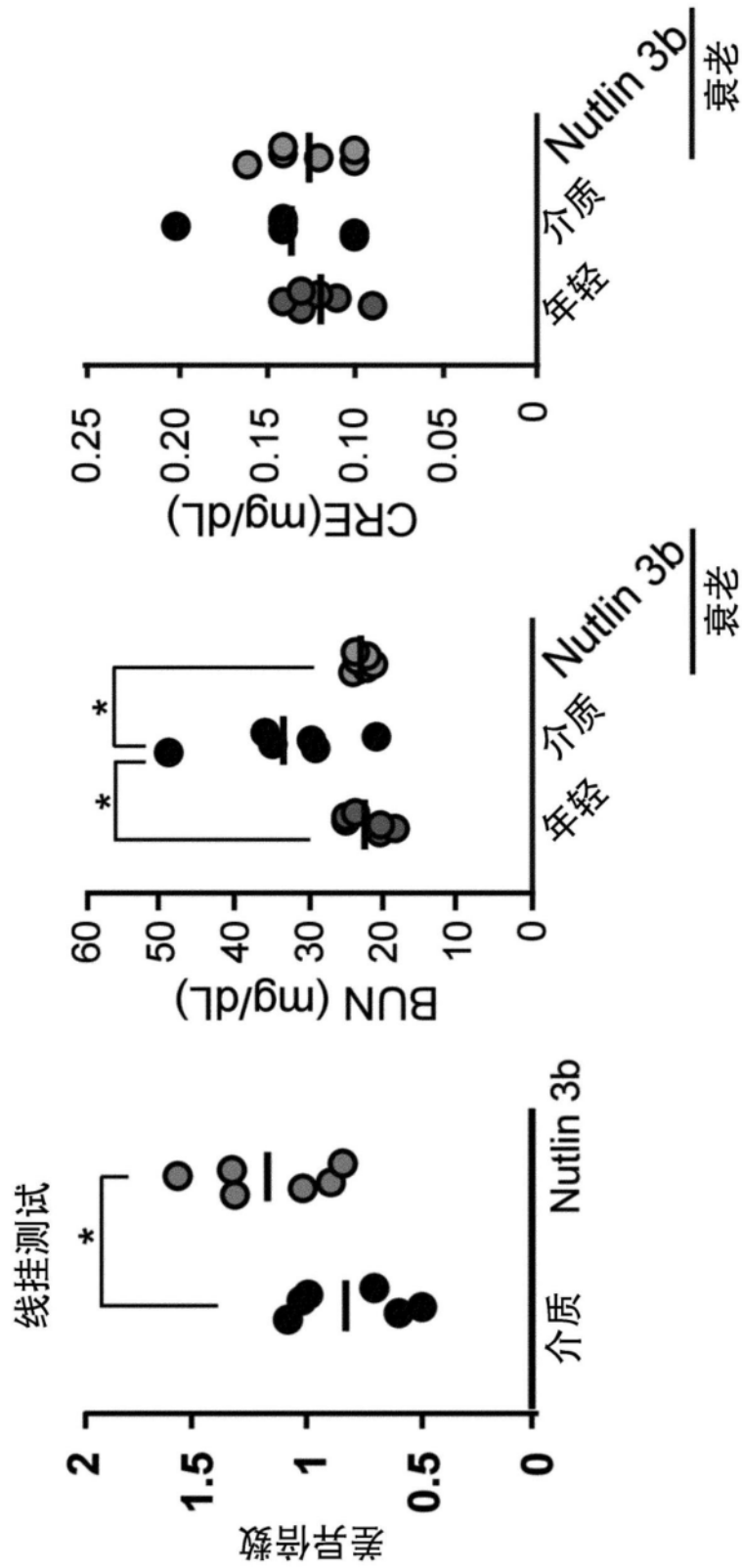


图34

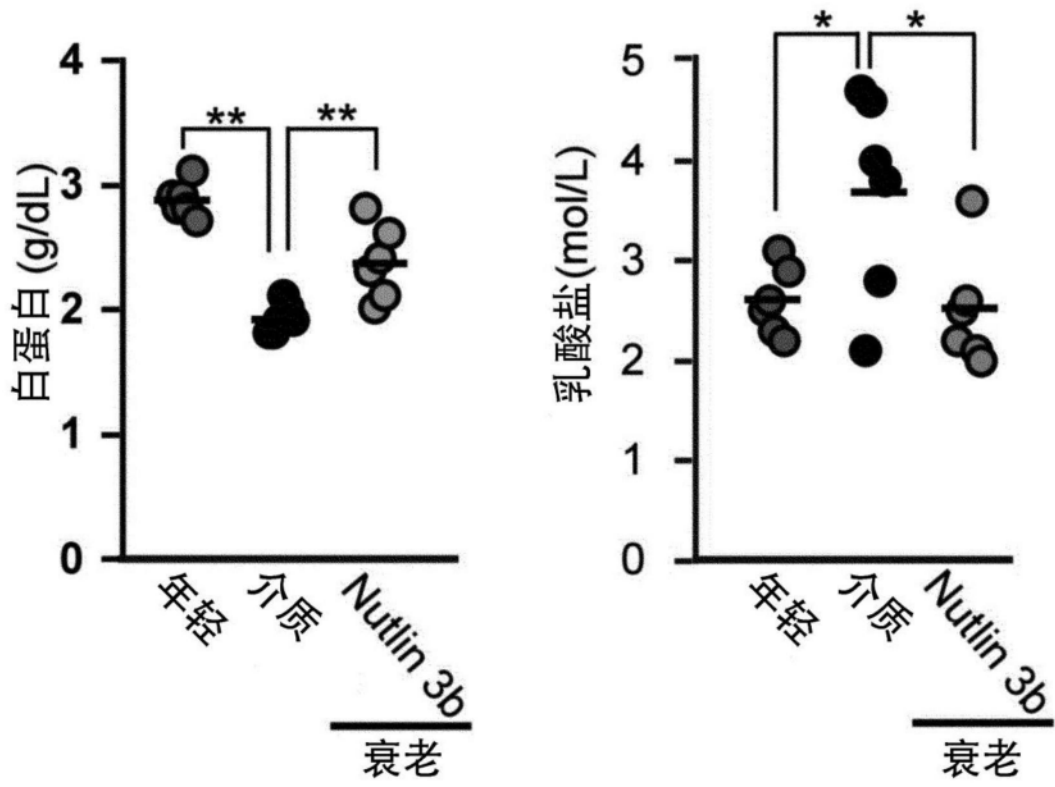


图35

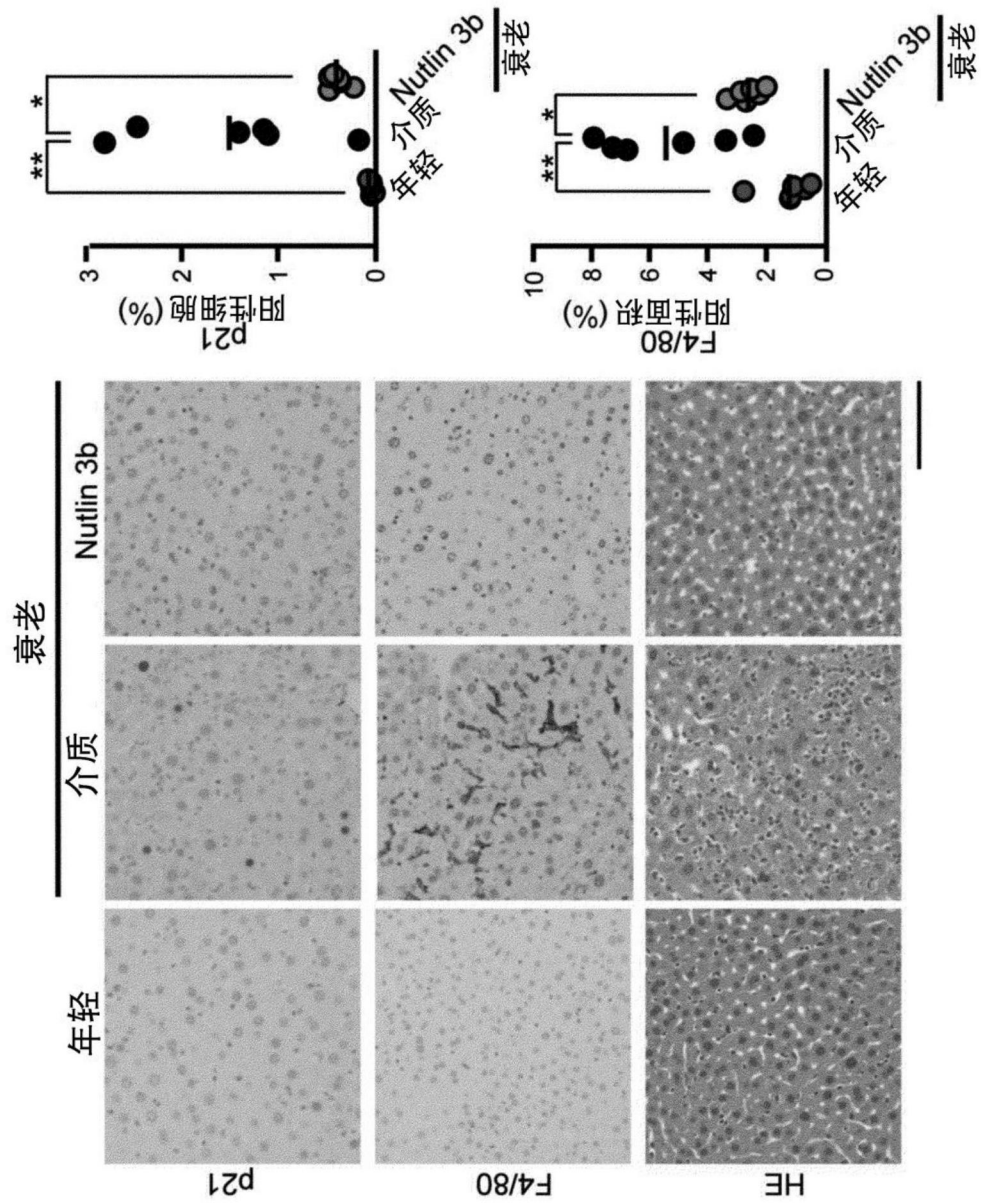


图36A

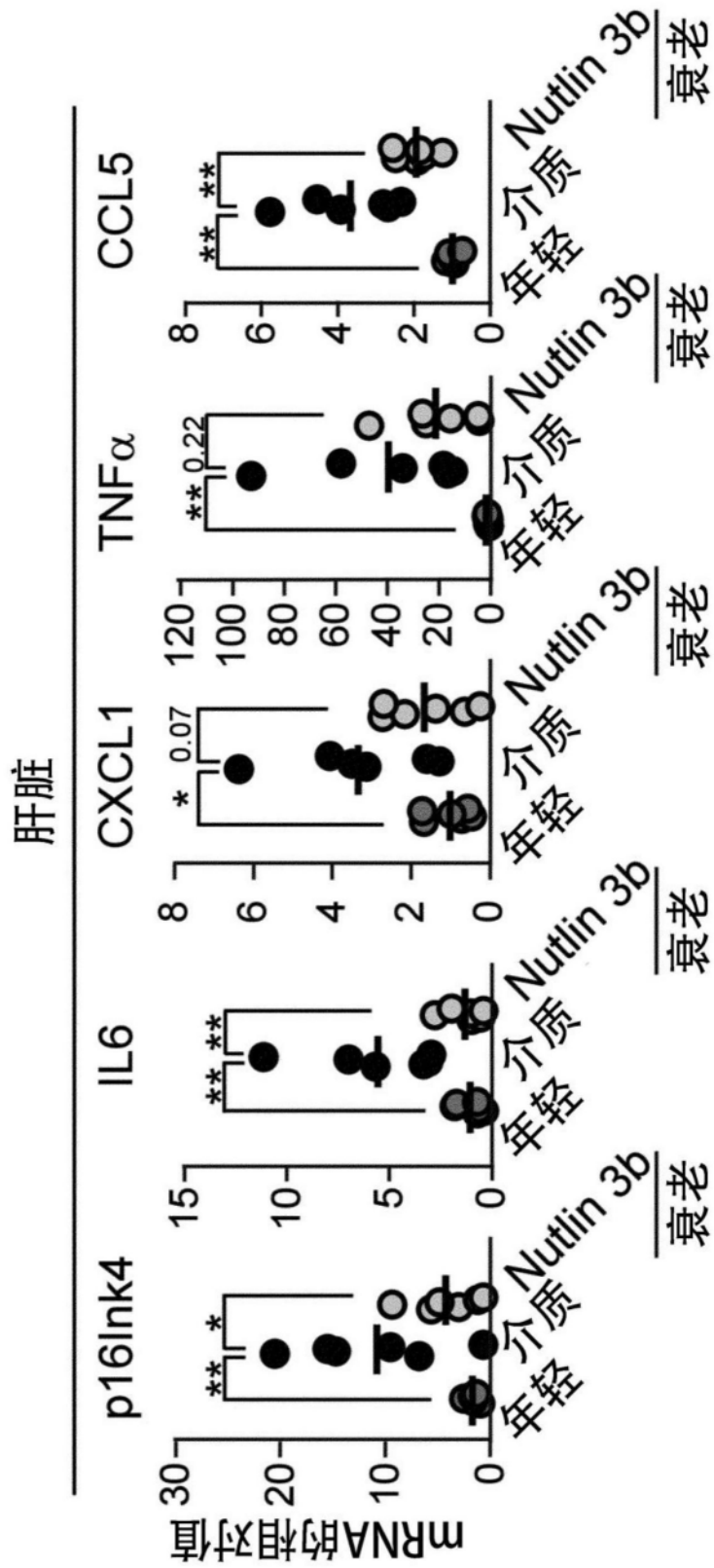


图36B

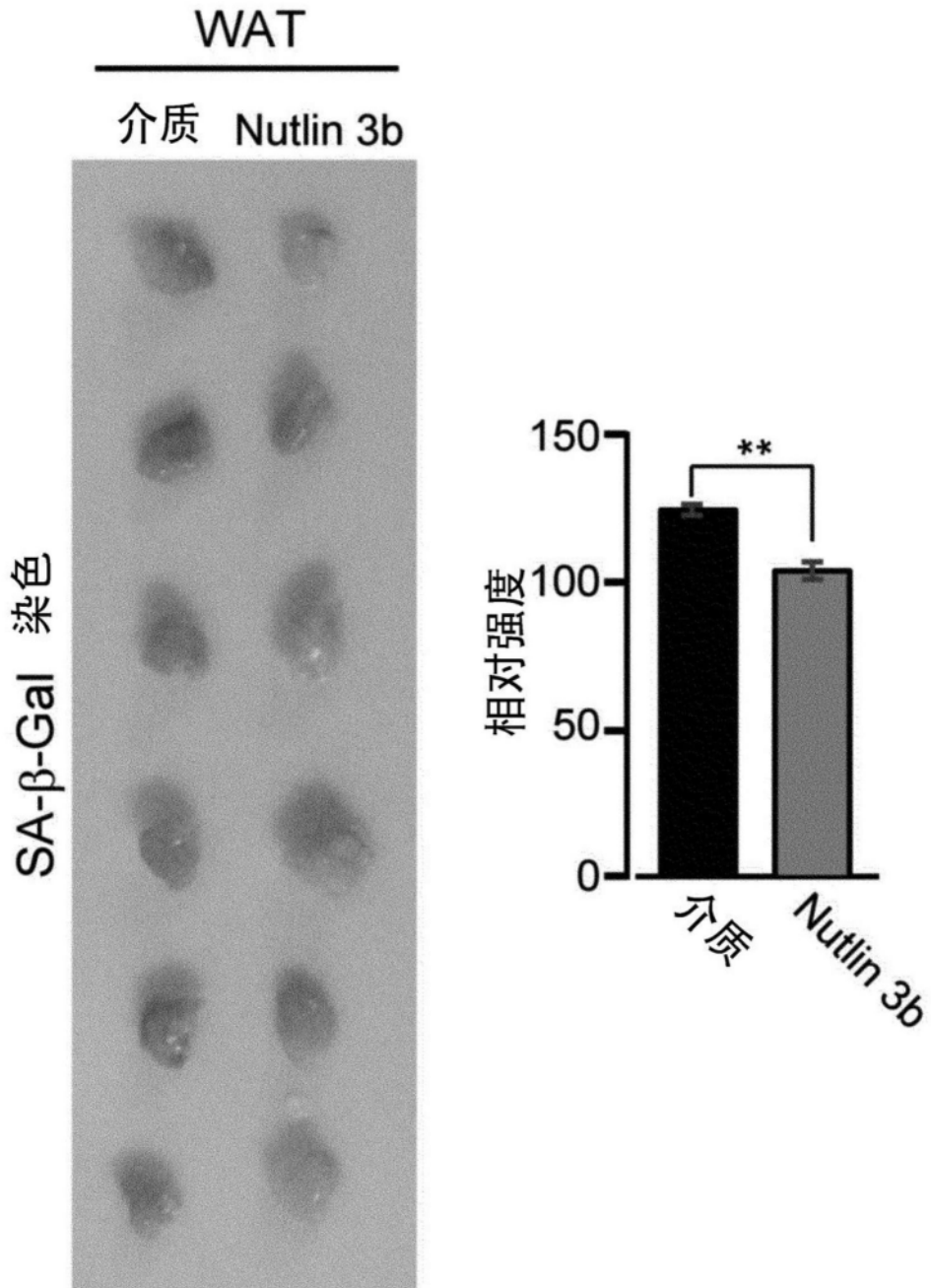


图37

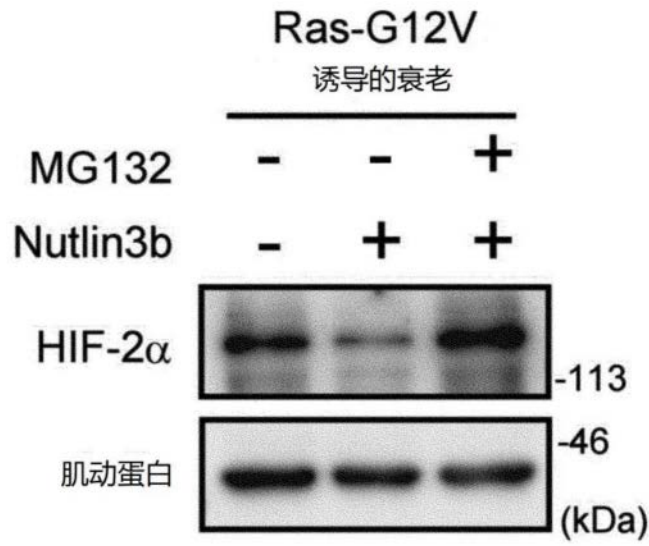


图38

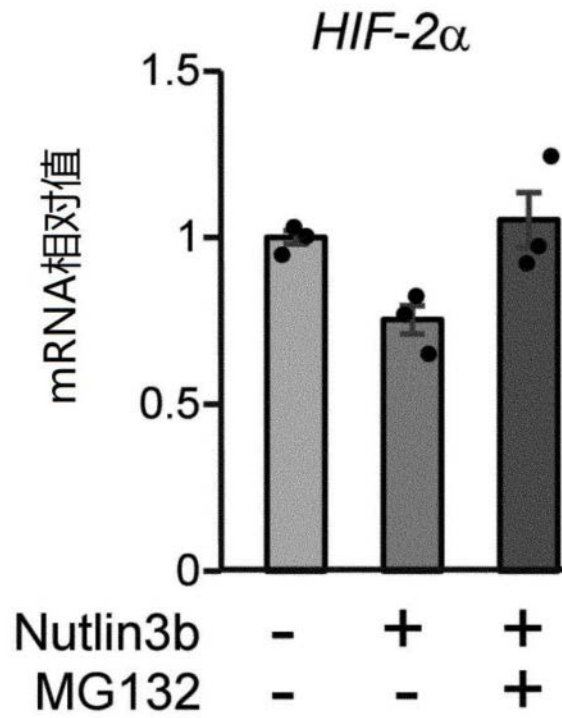


图39

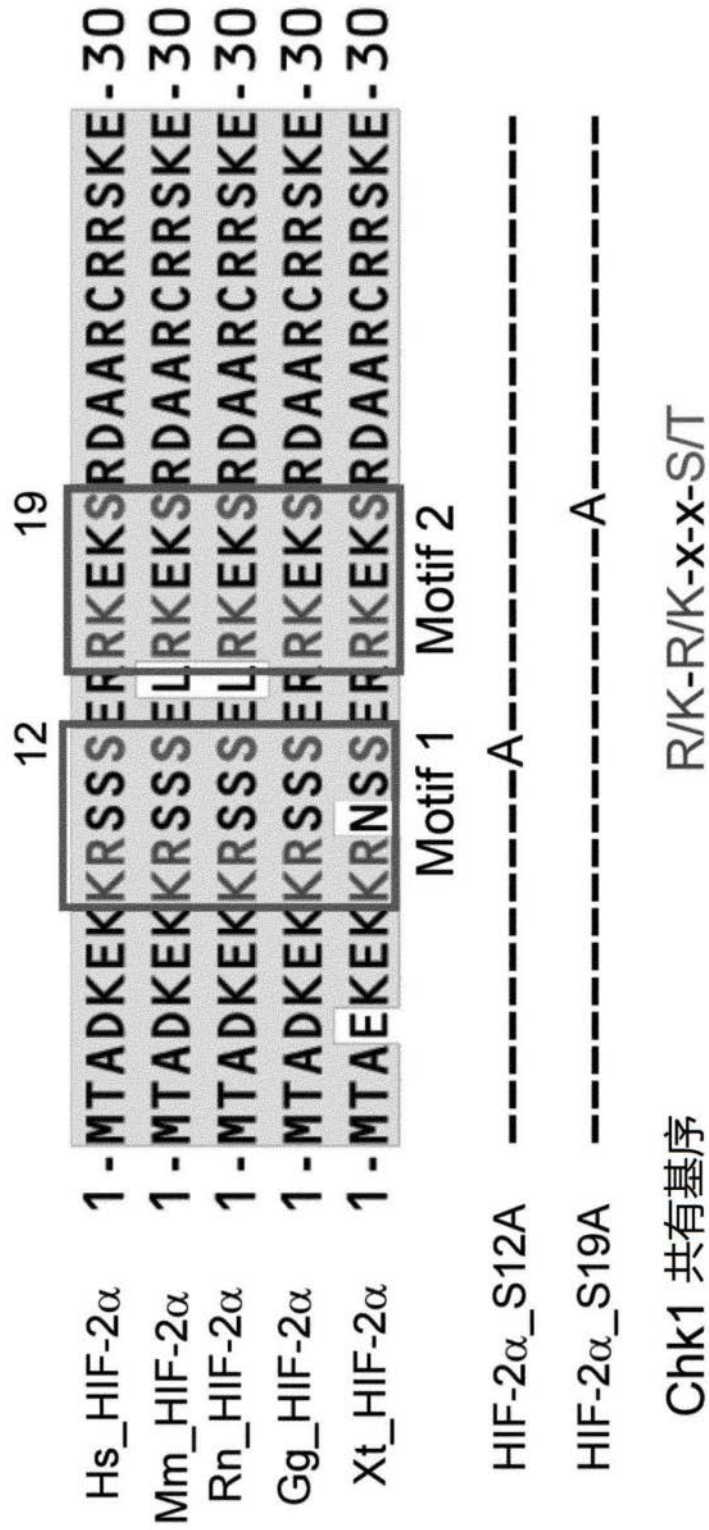


图40

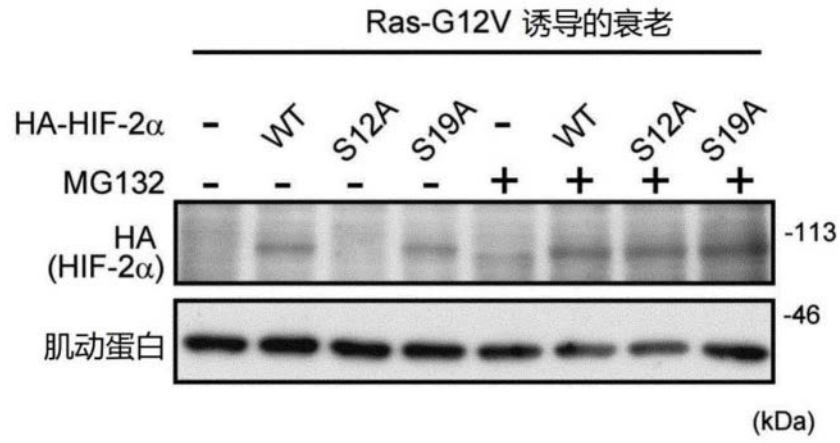


图41

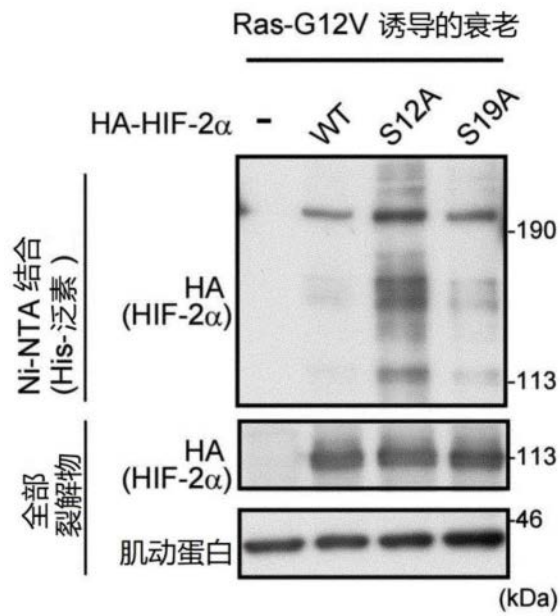


图42

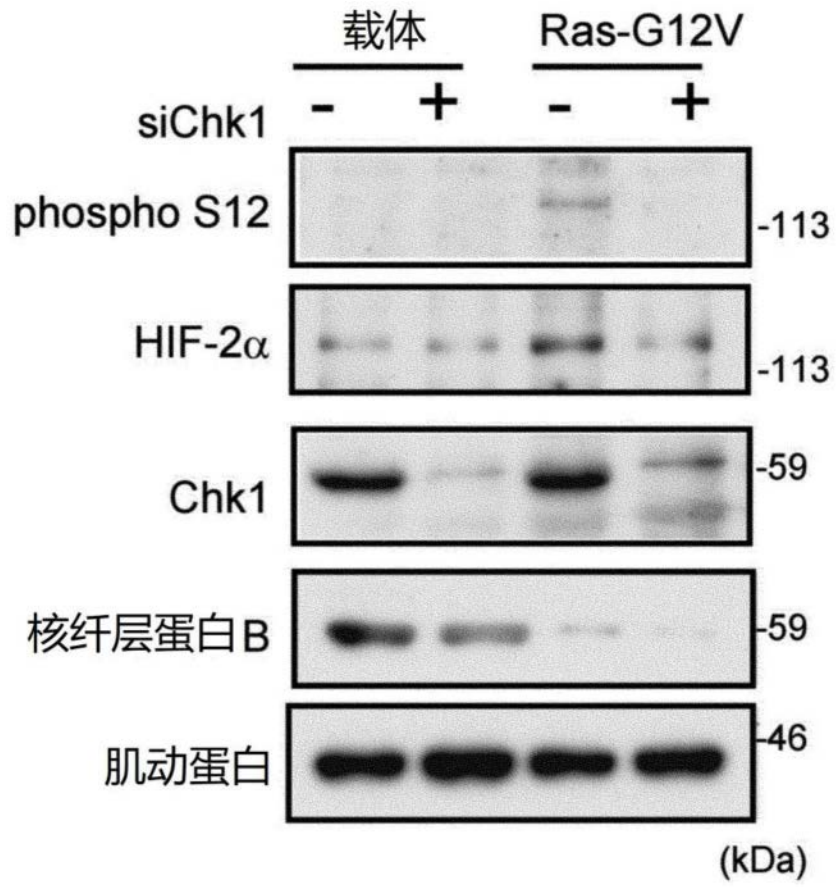


图43

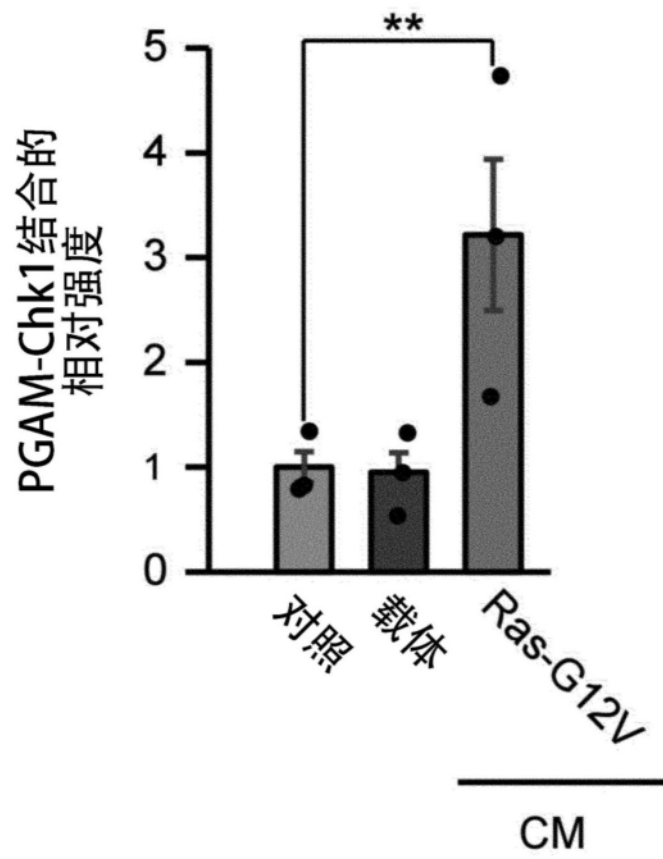
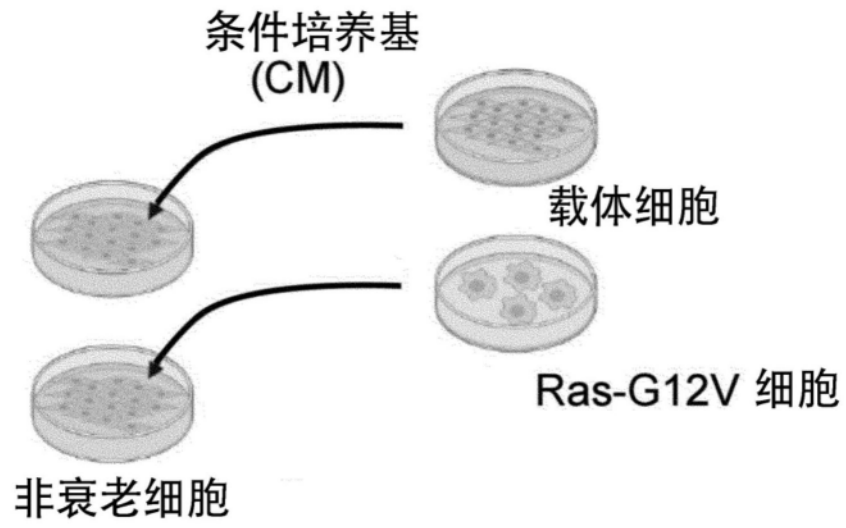


图44

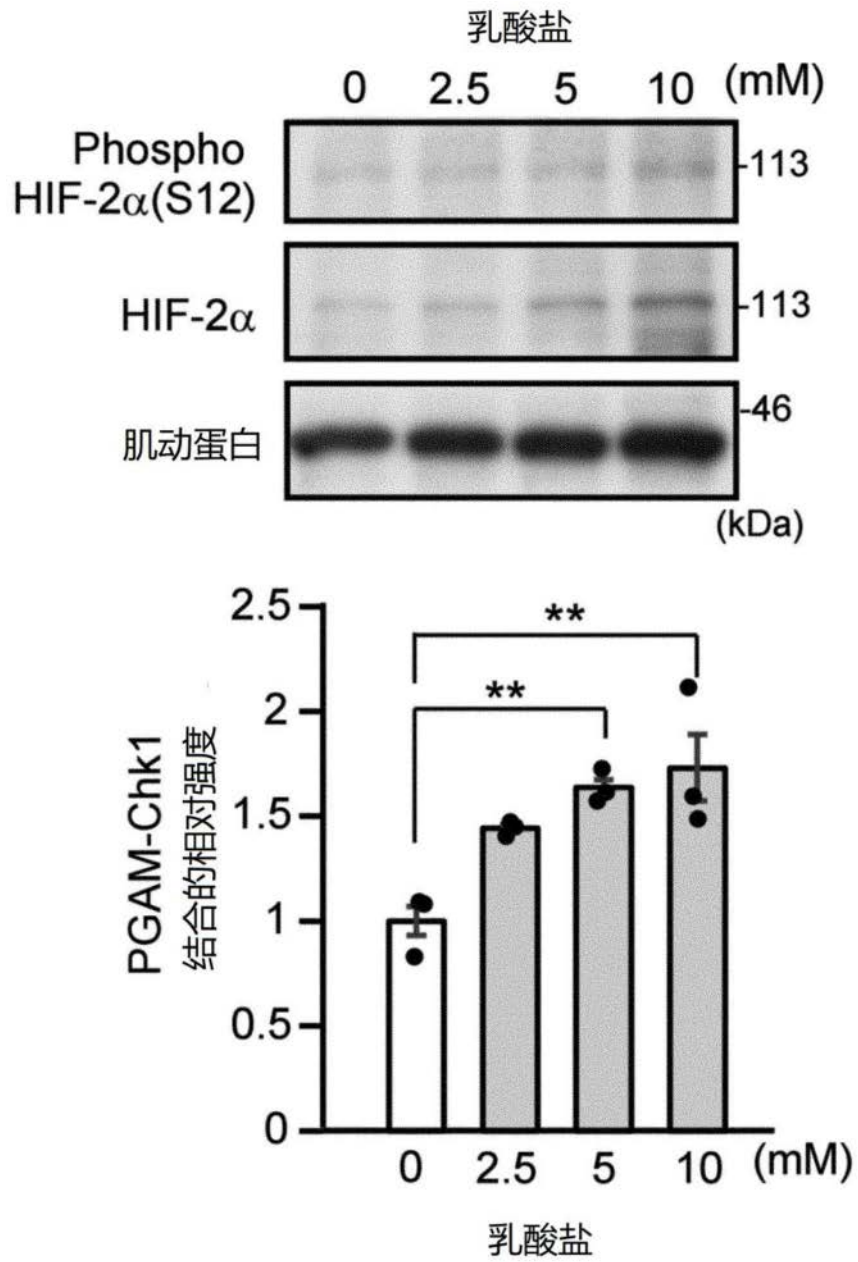


图45

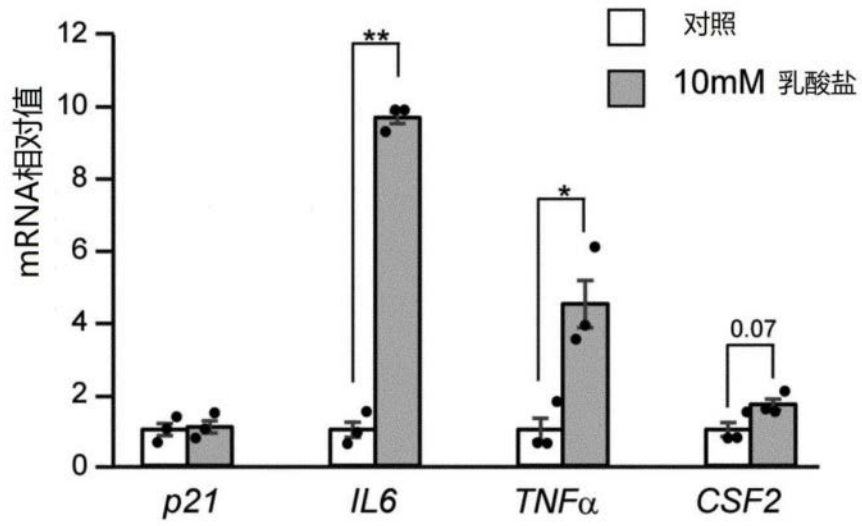


图46

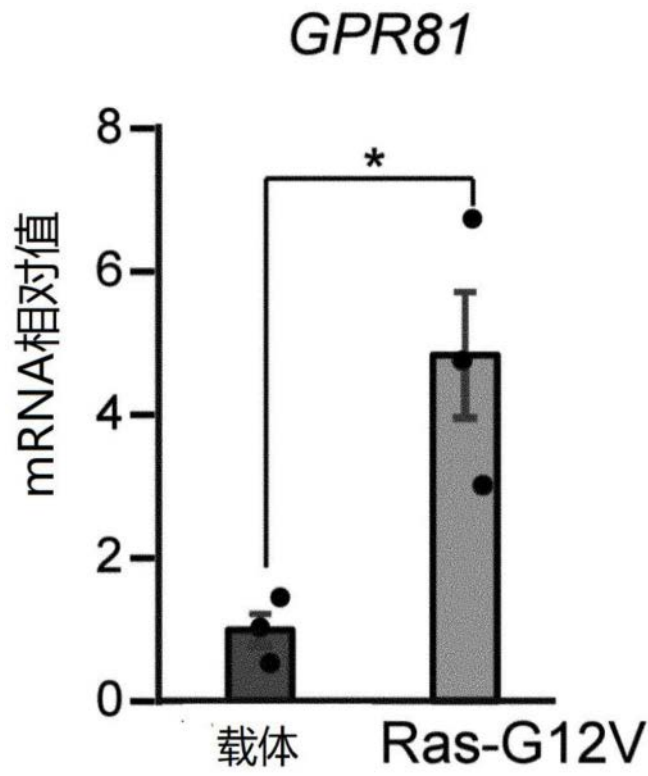


图47

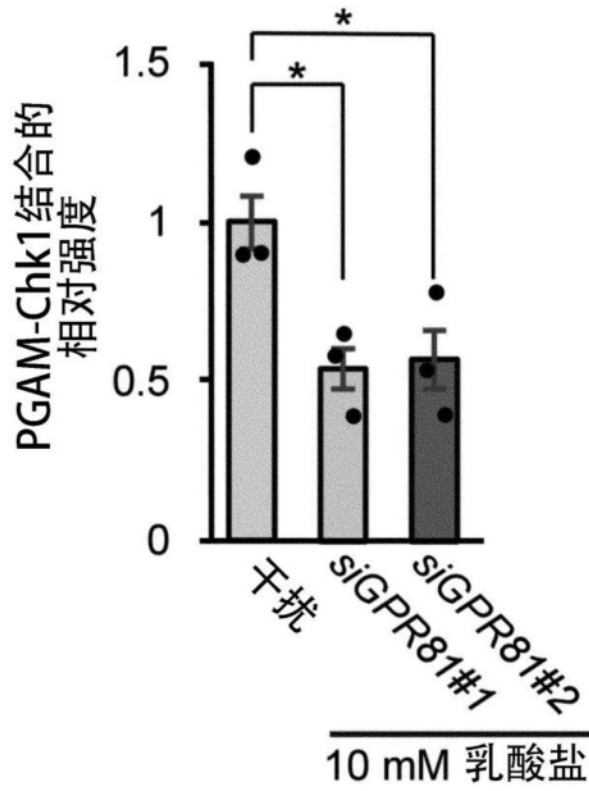


图48

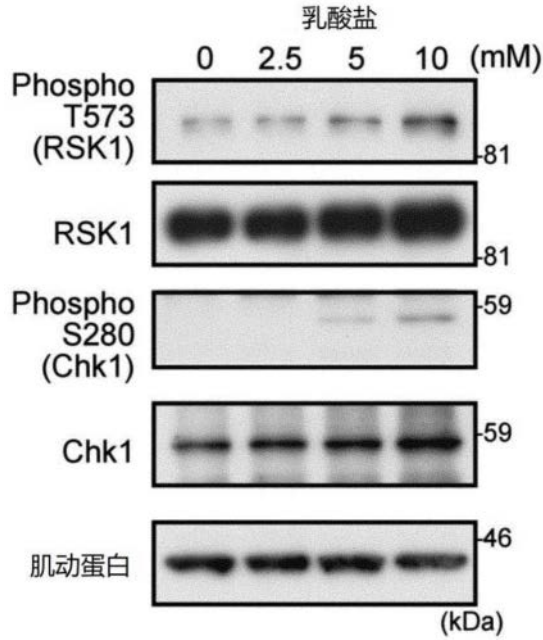


图49

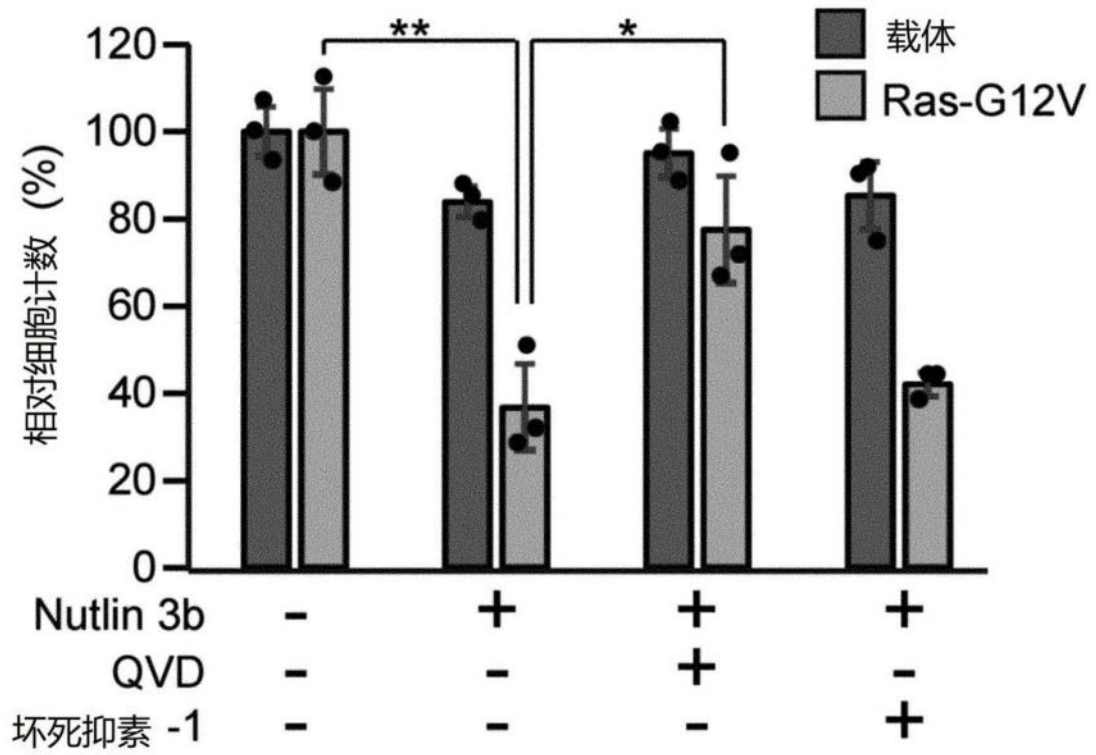


图50

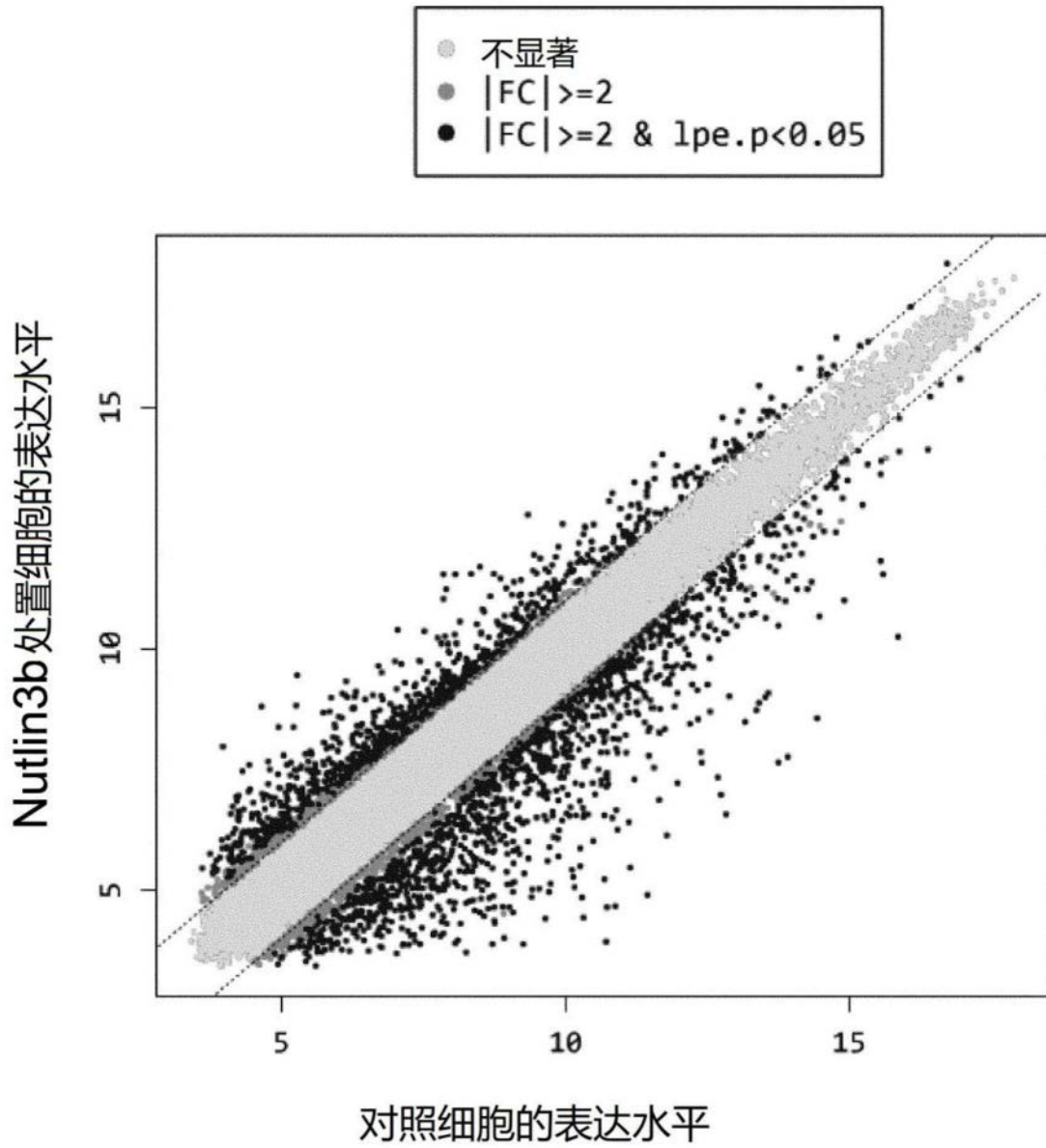


图51

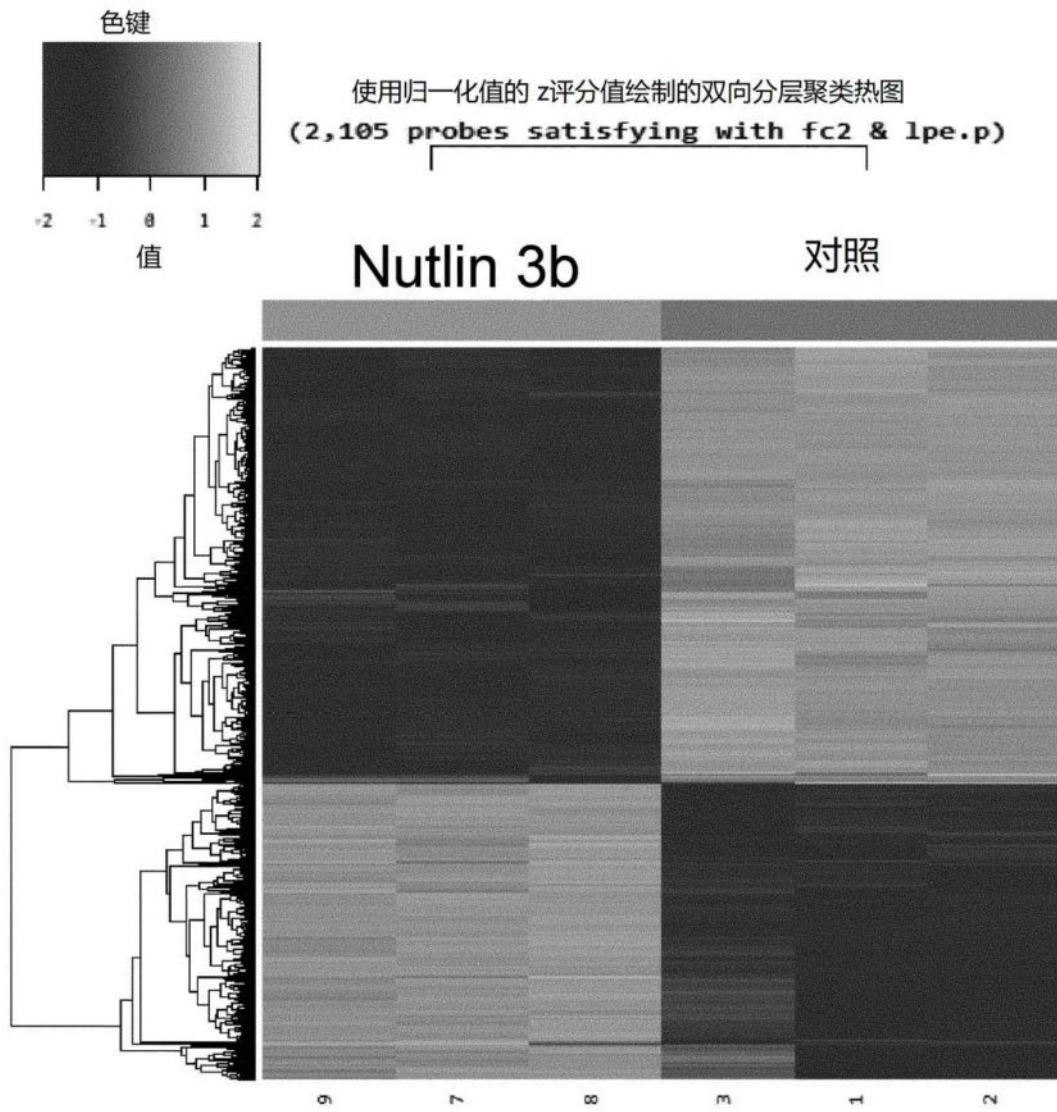


图52

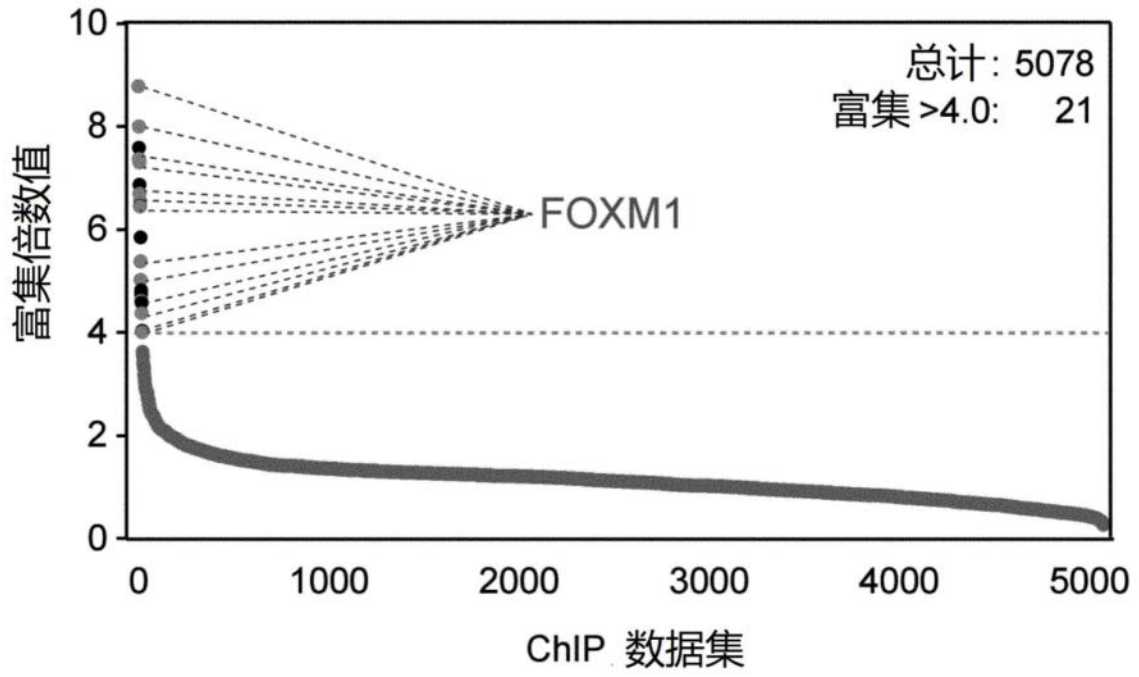


图53

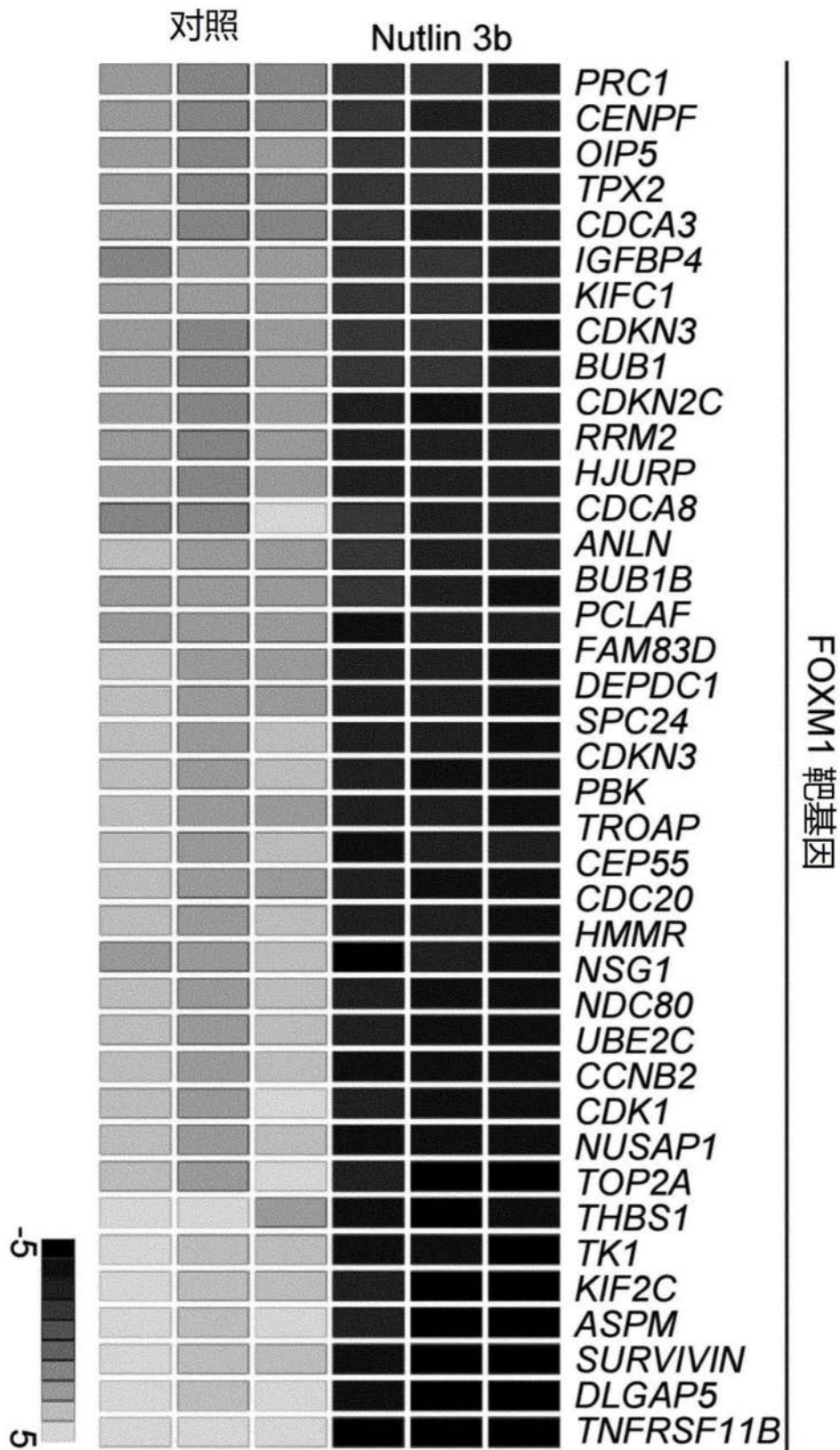


图54

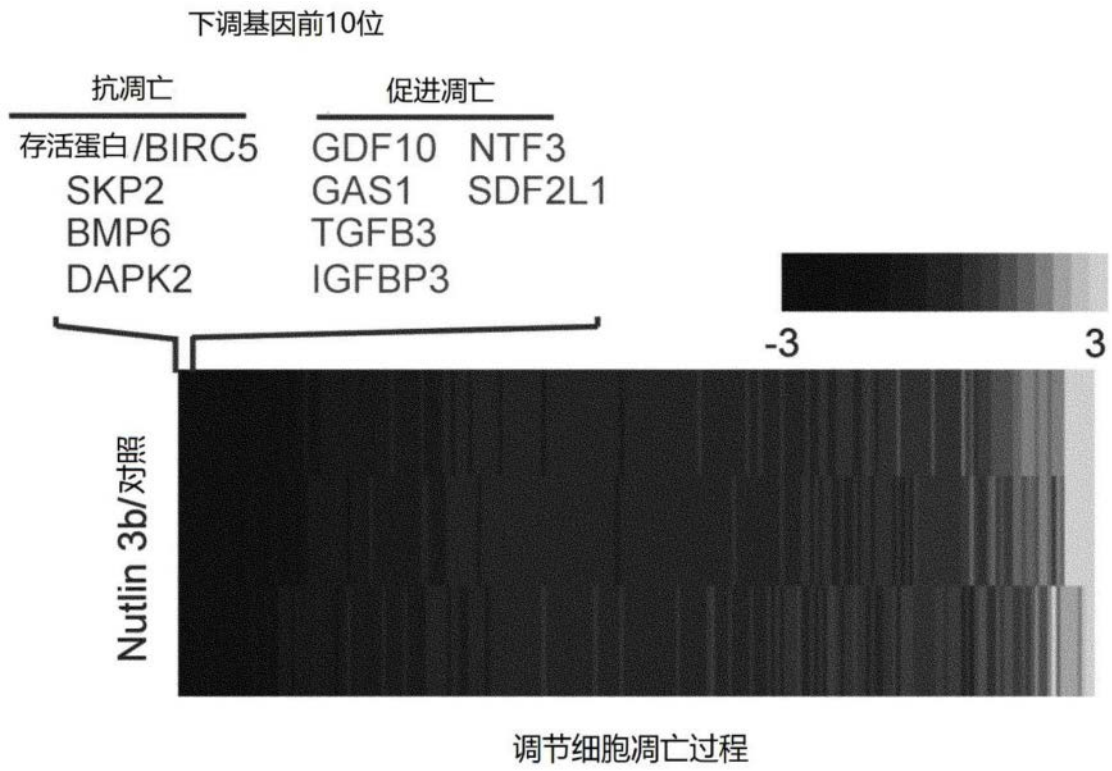


图55

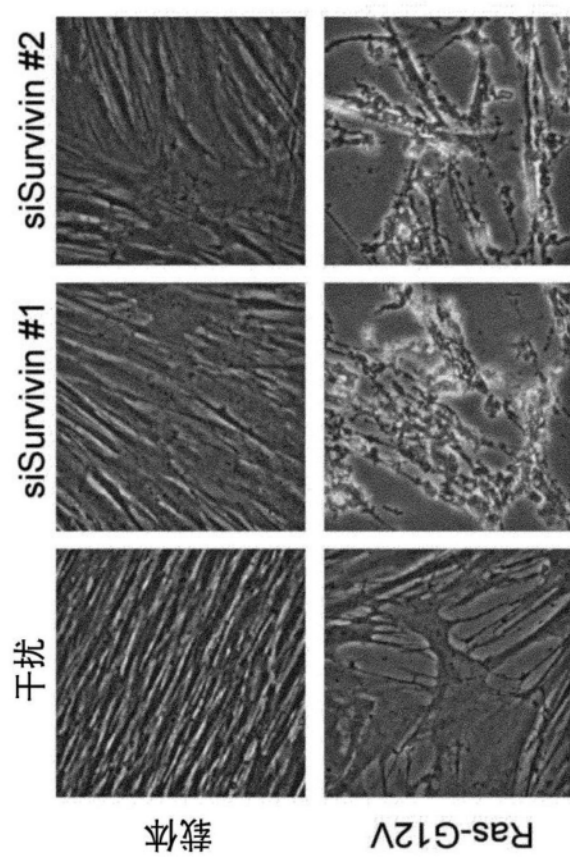
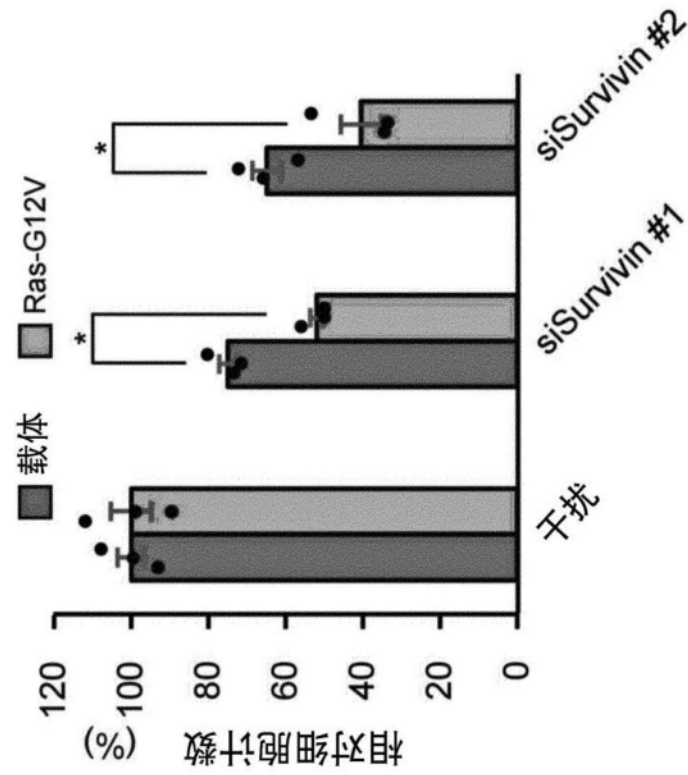


图56

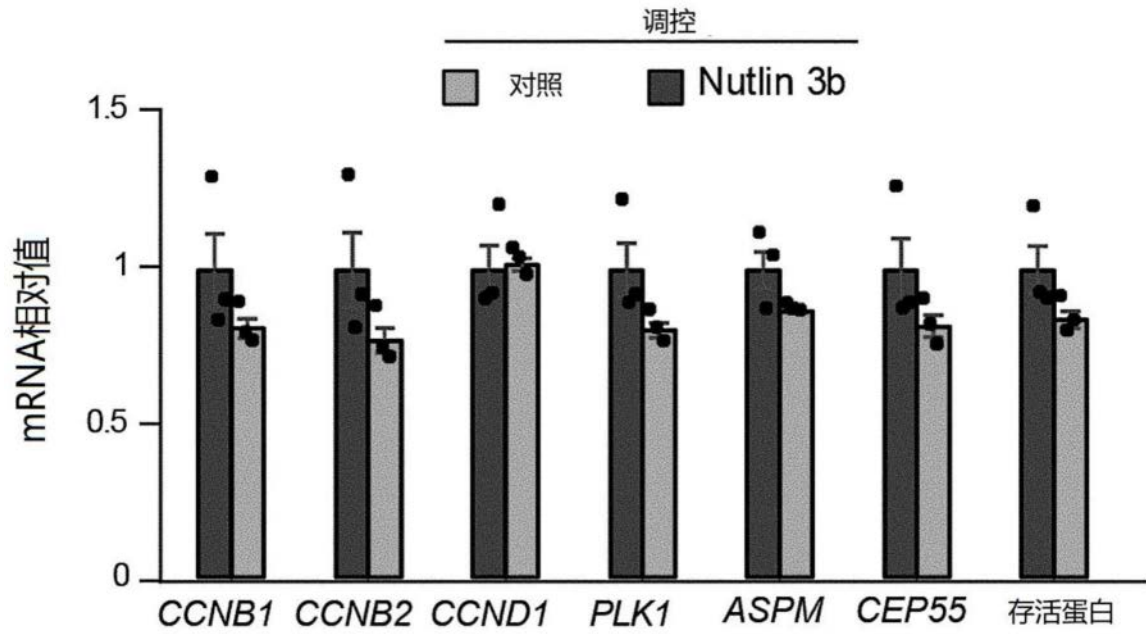
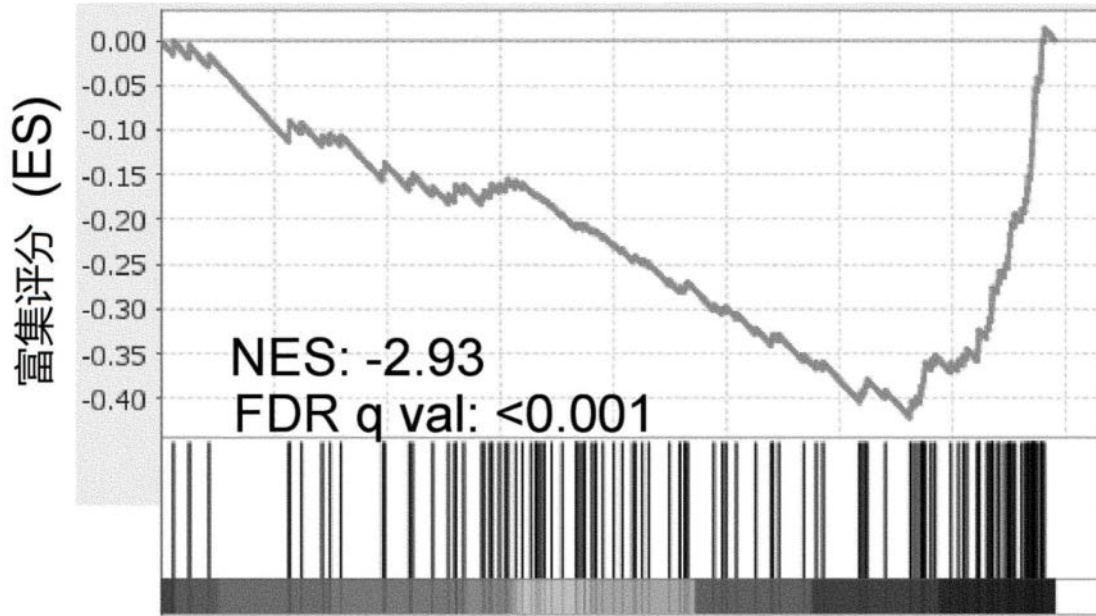


图57

Ras-G12V 诱导衰老

Nutlin 3b/ 对照

富集图: FOXM1 TARGET

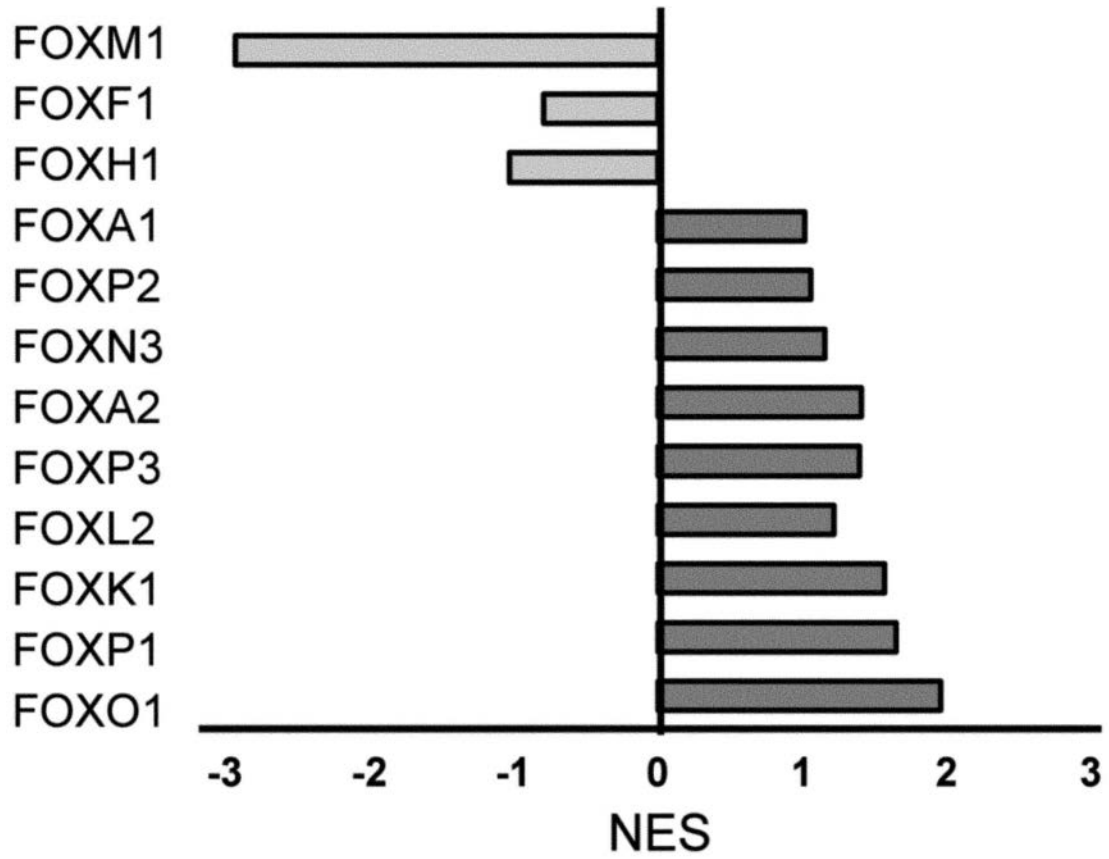


富集图: FOXA1 TARGET

图58

Ras-G12V 诱导衰老

Nutlin 3b/对照



基因组富集分析

图59

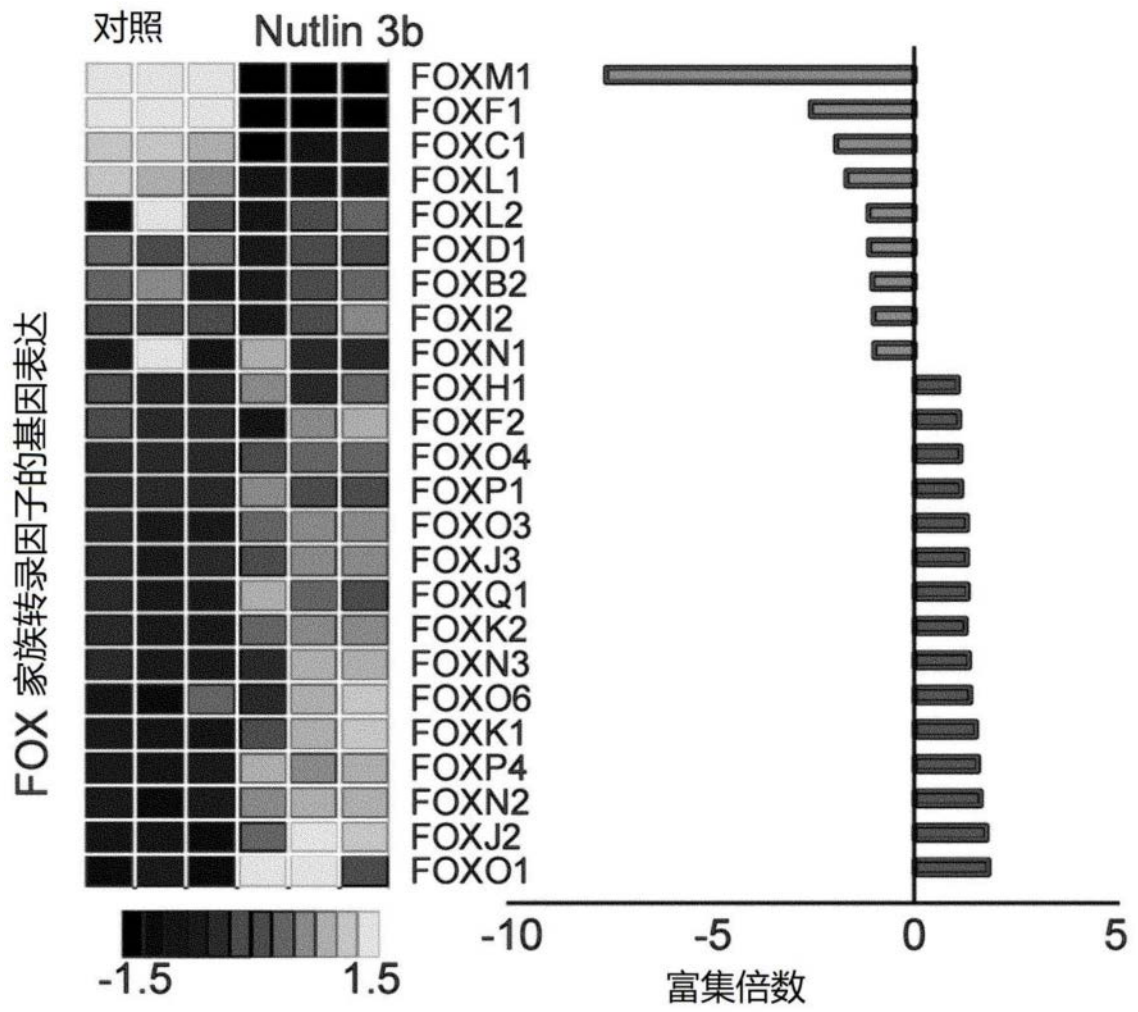


图60

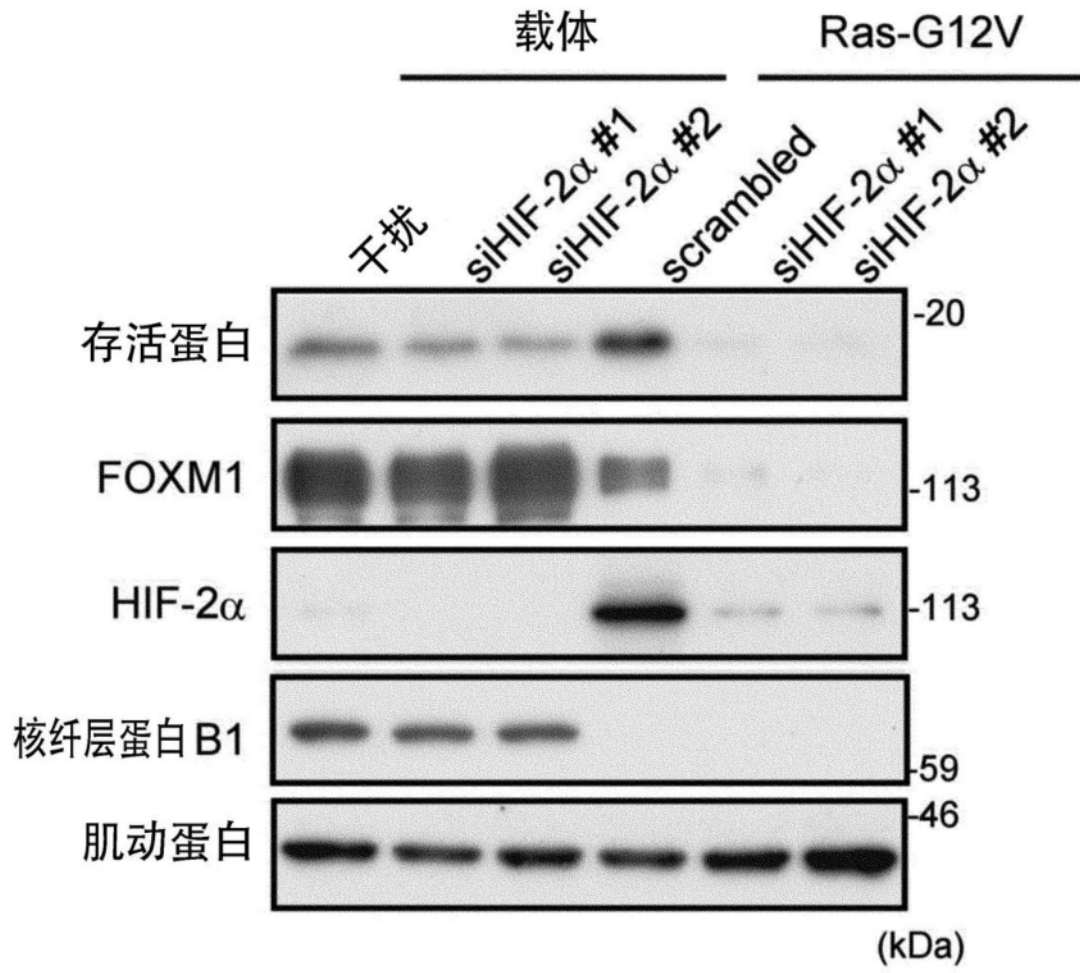


图61