(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112996541 B
(45)授权公告日 2024.08.06

(21)申请号 201980073708.0
(22)申请日 2019.11.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112996541 A
(43)申请公布日 2021.06.18
(30)优先权数据
2018-210300 2018.11.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/043570 2019.11.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/095971 JA 2020.05.14
(73)专利权人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都
(72)发明人 中西真 城村由和
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 金世煜 李书慧
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C12N 5/071(2006.01)
(56)对比文件
CN 106029659 A,2016.10.12
Hermann Unterluggauer等.Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase.《Biogerontology》.2008,(第9期),247-259.
Hermann Unterluggauer等.Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase.《Biogerontology》.2008,(第9期),247-259.
(续)
审查员 耿胜燕

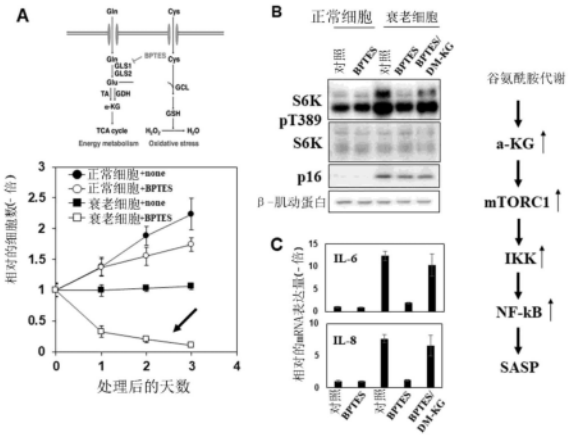
权利要求书1页 说明书15页
序列表4页 附图9页

(54)发明名称

去除衰老细胞的方法和衰老细胞的制备方法

(57)摘要

本发明的解决课题在于选择性地杀死或去除衰老细胞的方法和物质的鉴定以及纯化衰老细胞的方法。具体而言,本发明提供一种衰老细胞去除剂和包含该去除剂的医药组合物,所述衰老细胞去除剂是用于去除生物体内的衰老细胞的药剂,其含有谷氨酰胺酶抑制剂作为有效成分。进而,本发明提供一种制备衰老细胞的方法,包括以下的工序(a)~(c)。(a)使细胞同步到G2期的工序,(b)将同步到G2期的细胞内的p53蛋白进行活化的工序,以及(c)抑制进行了工序(b)的处理的细胞内的PLK1(保罗样激酶1,polo-like kinase 1)活性的工序。



CN 112996541 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Pachiyappan Kamarajan等.Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Metabolism Draws on Glutaminolysis, and Stemness Is Specifically Regulated by Glutaminolysis via Aldehyde Dehydrogenase.《J Proteome Res》.2017,第16卷(第3期),1315-1326.

Hideyuki Takeuchi等.Tumor Necrosis Factor-InducesNeurotoxicity via Glutamate Release from Hemichannels of Activated Microglia in an Autocrine Manner.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2006,第281卷(第30期),21362-21368.

Kuo Du等.Hedgehog-YAP Signaling Pathway Regulates Glutaminolysis to Control Hepatic Stellate Cell Activation.《Gastroenterology》.2018,第154卷(第5期),1465-1479.

Hee-Jin Kim等.Downregulation of Polo-Like Kinase 1 Induces Cellular Senescence in Human Primary Cells Through a p53-Dependent Pathway.《Journals of Gerontology》.2013,第68卷(第10期),1145-1156.

Yoshikazu Johmura等.Necessary and Sufficient Role for a Mitosis Skip in Senescence Induction.《Molecular Cell》.2017,(第55期),73-84.

Hermann Unterluggauer等.Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase.《Biogerontology》.2008,(第9期),247-259.

Hermann Unterluggauer等.Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase.《Biogerontology》.2008,(第9期),247-259.

1.一种谷氨酰胺酶抑制剂的用途,用于制造用于去除生物体内的衰老细胞的药剂,该药剂对衰老细胞选择性地诱导细胞死亡,所述衰老细胞为p16蛋白、即CDKN2A蛋白的表达上升的细胞。

2.根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述谷氨酰胺酶为KGA即肾型谷氨酰胺酶。

3.一种谷氨酰胺酶抑制剂的用途,用于制造用于随着年龄增长而发病的疾病的预防或治疗的医药组合物,

所述医药组合物将体内的衰老细胞选择性地杀死或去除,所述衰老细胞为p16蛋白、即CDKN2A蛋白的表达上升的细胞,其中,

所述疾病为动脉硬化症、肺纤维症、慢性阻塞性肺疾病、慢性肾衰竭或心脏肥大。

去除衰老细胞的方法和衰老细胞的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从个体去除衰老细胞的方法。进而,本发明涉及纯化的衰老细胞的制备方法。

背景技术

[0002] 对迎来超高龄的现代社会而言,延长健康寿命是现代科学应解决的最重要课题之一。为了延长健康寿命,显然医疗系统的改革、生活习惯病、饮食习惯等的改善是有效的手段。但是,为了根本性应对健康寿命,从俯瞰的角度理解衰老控制机制,以及预防随着衰老的年龄增长性疾病、脏器·组织的功能降低的技术的开发是必要不可或缺的。

[0003] 迄今为止,认为细胞衰老是细胞增殖的不可逆的停止,并被定位为癌症防御机制之一,但另一方面,开始认为细胞衰老在个体层面的衰老、与衰老相关联的疾病中发挥着某种作用。显示衰老细胞分泌炎性细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶和生长因子等,该现象被称为衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype:SASP),表明与衰老相关疾病的发病相关联(非专利文献1~非专利文献3)。

[0004] 近年来,对衰老控制机制的阐明产生了重大的结构思想的改变。Baker等报告了根据使用早老性模型小鼠的遗传学解析,如果从老龄个体中人工去除衰老细胞,则动脉硬化、肾功能障碍等老年病的发病明显延迟,甚至寿命本身也延长(非专利文献4)。进而,在非早老性小鼠中,调查了衰老细胞对健康寿命造成的影响,结果表明,如果作为衰老细胞的生物标志物之一的p16阳性细胞在体内蓄积,则寿命趋于变短,如果去除p16阳性细胞,则个体的健康寿命有可能延长等(非专利文献5)。因此,能够将存在于生物体内的衰老细胞选择性地杀死或去除的药剂的开发关系到健康寿命的延长、针对随着年龄增长的疾病(动脉硬化症、骨质疏松症)的治疗的新的方法论的建立。

[0005] 但是,细胞的衰老由于由各种基因组压力诱导,因此,依赖于诱导刺激的种类而特异性的信号通路被活化。因此,为了明确所有与衰老细胞共通的转录物组、代谢物组状态,没有外部刺激且100%纯化的衰老细胞制备技术的开发是必要不可或缺的。

[0006] 迄今为止,发明人等明确了在G2期中p53被活化对细胞衰老的诱导而言是充分必要的(非专利文献6)。然而,目前还没有建立稳定地制备纯化的衰老细胞的技术。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Campisi等,Annu.Rev.Physiol.75:685-705 2013

[0010] 非专利文献2:Shapless等,nature Rev.Cancer 15:397-408 2015

[0011] 非专利文献3:van Deursen,Nature 509:439-446 2014

[0012] 非专利文献4:Baker等,Nature 479:232-236 2011

[0013] 非专利文献5:Baker等,Nature 530:184-189 2016

[0014] 非专利文献6:Johmura等,Mol Cell 55:73-84 2014

发明内容

[0015] 鉴于上述情况,本发明人等以建立纯化衰老细胞的方法为目标,并且以选择性地杀死或去除衰老细胞的方法和物质的鉴定为解决课题。

[0016] 发明人等首先尝试了衰老细胞的纯化。迄今为止,已表明在将细胞同步到G2期的状态下将肿瘤抑制蛋白的p53进行活化对细胞衰老的诱导而言是充分必要的(非专利文献6)。发明者人等在基于该见解诱导了细胞衰老的基础上,对制备纯化的衰老细胞群体(仅衰老细胞的细胞群体)的方法进行了研究,结果发现,如果将G2期细胞的p53活化,并进一步抑制PLK1(保罗样激酶1,polo-like kinase 1)的活性,则能够进行衰老细胞的纯化。

[0017] 进而,发明人等使用上述的纯化衰老细胞的培养系统并通过气相色谱法进行了衰老细胞的代谢物组解析。其结果表明,在衰老细胞中,由于活性氧量的上升而从柠檬酸向异柠檬酸的转化反应被抑制,α酮戊二酸的产生和其以后的柠檬酸循环的旋转有可能依赖于谷氨酰胺代谢途径(Glutaminolysis)。因此,利用药剂抑制衰老细胞的谷氨酰胺代谢,结果明确对衰老细胞诱导了选择性的细胞死亡。

[0018] 本发明是基于以上的见解而完成的。

[0019] 即,本发明为以下的(1)~(8)。

[0020] (1)一种衰老细胞去除剂,是用于去除生物体内的衰老细胞的药剂,含有谷氨酰胺酶抑制剂作为有效成分。

[0021] (2)根据上述(1)所述的衰老细胞去除剂,其特征在于,所述谷氨酰胺酶为KGA(肾型谷氨酰胺酶,Kidney-type glutaminase)。

[0022] (3)一种用于随着年龄增长而发病的疾病的预防或治疗的医药组合物,包含上述(1)或(2)所述的衰老细胞去除剂。

[0023] (4)根据上述(3)所述的医药组合物,其中,所述疾病为动脉硬化症、骨质疏松症、白内障、青光眼、痴呆症、帕金森氏病、肺纤维症、慢性阻塞性肺疾病、癌、2型糖尿病、慢性肾衰竭、心脏肥大、肝硬化、肌肉衰减症或消瘦。

[0024] (5)一种方法,是制备衰老细胞的方法,包括以下的工序(a)~(c)。

[0025] (a)使细胞同步到G2期的工序,

[0026] (b)将同步到G2期的细胞内的p53蛋白进行活化的工序,以及

[0027] (c)抑制进行了工序(b)的处理的细胞内的PLK1(保罗样激酶1,polo-like kinase 1)活性的工序。

[0028] (6)根据上述(5)所述的方法,其中,所述(a)为使CDK1(周期蛋白依赖性激酶1,Cyclin-dependent kinase 1)活性抑制剂与所述细胞接触的工序。

[0029] (7)根据上述(5)所述的方法,其中,所述(b)为使Mdm2蛋白抑制剂与所述细胞接触的工序。

[0030] (8)根据上述(5)所述的方法,其中,所述(c)为使PLK1活性抑制剂与所述细胞接触的工序。

[0031] 根据本发明,能够有效地制备纯化的衰老细胞群体。

[0032] 根据本发明,能够去除存在于生物体内的衰老细胞。其结果,可期待个体的健康寿命的延长,并且能够开发随着年龄增长的疾病的预防和治疗法、治疗剂。

附图说明

[0033] 图1是衰老细胞的制备。A表示100％纯化衰老细胞的制备时间表的一个例子。另外,表示从制备开始起第21天的细胞中的SA-β-gal阳性细胞的比例(B)和p16 mRNA的表达量。

[0034] 图2是衰老细胞中的谷氨酰胺酶的表达量的研究。A表示使用来自衰老诱导后的细胞(衰老细胞)和衰老诱导前的细胞(正常细胞)的细胞提取液并利用针对KGA和GAC的抗体进行蛋白质印迹而得的结果。B表示通过qPCR测定衰老细胞和正常细胞中的KGA和GAC的mRNA表达量而得的结果。C表示通过荧光素酶报告基因检测来调查衰老细胞和正常细胞中的各谷氨酰胺酶mRNA的稳定性而得的结果。

[0035] 图3是衰老细胞中的谷氨酰胺代谢的作用的研究。A是示意性地表示谷氨酰胺代谢的图(上图)以及调查谷氨酰胺酶抑制剂(BPTES)对衰老细胞和正常细胞的影响的结果(下图)。B表示使用来自衰老细胞和正常细胞的细胞提取液并利用抗体检测BPTES或BPTES+DM-KG(跨膜型α-酮戊二酸)的存在下或非存在下的S6K蛋白T389的磷酸化、S6K蛋白、p16蛋白量而得的结果。C是测定衰老细胞和正常细胞中的BPTES或BPTE+DM-KG(跨膜型α-酮戊二酸)的存在下或非存在下的IL-6和IL-8的mRNA表达量而得的结果。

[0036] 图4是衰老细胞内的pH控制下的谷氨酰胺代谢的作用。A是测定BPTES存在下或非存在下的衰老细胞和正常细胞的细胞内氨浓度而得的结果。B是测定BPTES存在下或非存在下的衰老细胞和正常细胞的细胞内pH而得的结果。C是对BPTES非存在下、BPTES存在下、BPTES+DUB存在或BPTES+CsA存在下的衰老细胞数进行计数而得的结果。D是对BPTES非存在下、BPTES存在下、BPTES+DUB存在或BPTES+CsA存在下的衰老细胞数进行计数而得的结果。

[0037] 图5是通过利用谷氨酰胺酶抑制剂抑制谷氨酰胺代谢来去除衰老细胞。表示测定给予了BPTES(12.5mg/kg体重)的小鼠的心脏、脑、肾脏和肝脏中的p16基因(衰老标志物)的表达量而得的结果。

[0038] 图6是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的肾小球硬化的效果。A是对从年轻小鼠(Young)(8周龄、n＝8)、经媒介物处理的高龄小鼠(Aged、Mock)(76周龄、n＝12)或经BPTES处理的高龄小鼠(Aged、BPTES)(76周龄、n＝12)采取的肾小球进行PAS染色而得的结果。比例尺为250μm。B、C和D各自表示肾小球硬化的程度(B)、血清尿素浓度(C)和血清肌酐浓度(D)。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。数据在利用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行解析后,利用Tukey's多重比较Post-Hoc测试(multiple comparisons post hoc test)进行多重比较研究。*P<0.05、***P<0.001。

[0039] 图7是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的肺纤维症的效果。A是对从年轻小鼠(Young)(8周龄、n＝8)、经媒介物处理的高龄小鼠(Aged、Mock)(76周龄、n＝12)或经B PTES处理的高龄小鼠(Aged、BPTES)(76周龄、n＝12)采取的肺组织进行MT染色而得的结果。比例尺为100μm。B表示MT染色阳性的区域的面积。值以将Young的数值的平均值设为1时的相对值表示。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。**P<0.01、****P<0.0001。

[0040] 图8是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的心肌纤维化和心脏肥大的效果。A是对从年轻小鼠(Young)(8周龄、n＝8)、经媒介物处理的高龄小鼠(Aged、Mock)(76周龄、n＝12)或经B PTES处理的高龄小鼠(Aged、BPTES)(76周龄、n＝12)采取的心脏组织进行MT染色

而得的结果。比例尺为100μm。B、C和D各自表示MT染色阳性的区域的面积(B)、心肌细胞的尺寸(C)和心脏重量(D)。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。B的值以将Young的数值的平均值设为1时的相对值表示。统计处理与图6相同。*P<0.05、**P<0.01、****P<0.0001。

[0041] 图9是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的巨噬细胞向肝脏浸润的效果。A是利用抗F4/80抗体对从年轻小鼠(Young)(8周龄、n=8)、经媒介物处理的高龄小鼠(Aged、Mock)(76周龄、n=12)或经B PTES处理的高龄小鼠(Aged、BPTES)(76周龄、n=12)采取的肝脏组织进行免疫染色而得的结果。比例尺为50μm。B以将Young的数值的平均值设为1时的相对值来表示利用抗F4/80抗体染色的面积。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。***P<0.001、****P<0.0001。

[0042] 图10是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的衰老细胞向白色脂肪组织蓄积的效果。表示从年轻小鼠(Young)(8周龄、n=8)、经媒介物处理的高龄小鼠(Aged、Mock)(76周龄、n=12)或经BPTES处理的高龄小鼠(Aged、BPTES)(76周龄、n=12)采取的脂肪组织的原位(in site)SA-βGal染色的结果(A)以及SA-βGal阳性细胞的比例(B)。比例尺为0.5cm。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。****P<0.0001。

[0043] 图11是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着肥胖的白色脂肪组织中的衰老细胞的蓄积、巨噬细胞浸润和肥大的效果。A表示从给予了常规食物(ND)的小鼠(Mock)(8周龄、n=4)、给予高脂肪食物(HFD)并进行了媒介物处理(Mock)(8周龄、n=8)或BPTES处理(BPTES)(8周龄、n=8)的小鼠采取脂肪组织,进行原位SA-βGal染色而得的结果(A上)以及利用抗F4/80抗体进行免疫染色而得的结果(A下)。B、C、D和E各自表示SA-βGal阳性的区域的面积(B)、脂肪组织的重量(C)、脂肪细胞的直径的平均值(D)和利用抗F4/80抗体进行了染色的面积(E)。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

[0044] 图12是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着肥胖的动脉硬化的效果。A表示利用Sudan IV对给予了常规食物的野生型小鼠(Wt-ND)(8周龄、n=5)、给予高脂肪食物并进行了媒介物处理(Mock)(8周龄、n=5)或BPTES处理(BPTES)(8周龄、n=5)的ApoE敲除小鼠的大动脉进行染色而得的结果。B和C各自表示大动脉的斑块数(B)和大动脉的受伤区域的比例(C)。比例尺为500μm。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

[0045] 图13是谷氨酰胺代谢抑制剂对随着非酒精性脂肪肝炎的肝功能恶化的效果。表示对野生型小鼠(8周龄)给予8周含有胆碱缺乏L氨基酸的高脂肪食物后,进行媒介物处理(Mock)(n=5)或BPTES处理(BPTES)(n=5),对肝脏中的羟脯氨酸量(OH-Pro)(A)、血清AST量(B)以及肝脏中的IL-6(C)、KGA(D)和p16(E)的mRNA表达量进行测定而得的结果。数据以平均值±标准偏差表示,箱线图表示中位数、四分位数范围。统计处理与图6相同。*P<0.05、**P<0.01、****P<0.0001。

具体实施方式

[0046] 本发明的第1实施方式是一种衰老细胞去除剂(以下也记载为“本发明的衰老细胞

去除剂”),是用于去除生物体内的衰老细胞的药剂,含有谷氨酰胺代谢(谷氨酰胺代谢途径)的抑制剂、例如谷氨酰胺酶抑制剂作为有效成分。

[0047] 这里,“衰老细胞去除剂”是指在体内(in vivo)或体外(in vitro)对衰老细胞诱导细胞死亡,从包含衰老细胞的细胞群体中选择性地去除衰老细胞的药剂。

[0048] 本发明的实施方式中,“衰老细胞”是指细胞增殖或细胞周期不可逆地停止的细胞。细胞是否为衰老细胞可以以细胞衰老的特征为指标来进行评价。根据许多先前研究,报告了细胞衰老的特征,例如可举出p16(CDKN2A)蛋白的表达上升、细胞衰老特异性β-半乳糖苷酶(senescence-associatedβ-galactosidase:SA-β-gal)的活化、p21(CDKN1A)蛋白的表达上升、p19蛋白的表达上升、细胞衰老特异性异染色质形成(Senescence-associated heterochromatic foci:SAHF)、DNA损伤应答(DDR)和衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype:SASP)等(对于有关细胞衰老的特征的详细内容,参照例如Kuilman等,Genes Dev 24:2463-2479,2010等)。

[0049] 发明人等如上所述明确了如果抑制衰老细胞的谷氨酰胺代谢,则可对衰老细胞诱导选择性的细胞死亡。谷氨酰胺代谢由几个反应阶段构成,其中,通过抑制由谷氨酰胺生成谷氨酸的反应阶段,能够有效地诱导衰老细胞特异性的细胞死亡。由谷氨酰胺生成谷氨酸的反应由谷氨酰胺酶(EC 13.5.1.2)催化。哺乳类存在由GLS1基因编码的肾型KGA(肾型谷氨酰胺酶,kidney-type glutaminase)和由GLS2基因编码的肝型LGA(肝型谷氨酰胺酶,liver-type glutaminase)这2种。KGA广泛分布于全身,与此相对,LGA主要存在于肝脏。另外,KGA以仅C末端区域不同的2个剪接变异体的形式存在,将长型直接称为KGA,将短型称为GAC(谷氨酰胺酶C,glutaminase C)。

[0050] 本发明的实施方式中使用的谷氨酰胺酶抑制剂只要至少抑制KGA的活性,则可以为任何谷氨酰胺酶抑制剂,这样的抑制剂可以由本领域技术人员容易地选择。作为该谷氨酰胺酶抑制剂,没有特别限定,例如可举出BPTES(双-2-(5-苯基乙酰胺-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚:Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide)(CAS No:314045-39-1)、DON(6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸:6-Diazo-5-oxo-L-norleucine)(CAS No:51481-10-8)、化合物968(CAS No:311795-38-7)和CB-839(CAS No:1439399-58-2)等。另外,除这些以外,还可以使用针对KGA的中和抗体或其片段等蛋白质或肽、用于将编码KGA的基因(GLS1)敲除的siRNA、miRNA等核酸作为谷氨酰胺酶抑制剂。

[0051] 本发明的第2实施方式为一种医药组合物(以下也记载为“本发明的医药组合物”),包含本发明的衰老细胞去除剂。本发明的医药组合物由于包含本发明的衰老细胞去除剂作为有效成分,因此,如果将其对生物体进行给予,则能够将体内的衰老细胞选择性地杀死或去除(参照实施例)。因此,可以期待本发明的医药组合物对健康寿命的延长和随着年龄增长而发病的疾病、例如动脉硬化症、骨质疏松症、白内障、青光眼、痴呆症、帕金森氏病、肺纤维症、慢性阻塞性肺疾病、癌、2型糖尿病、慢性肾衰竭、心脏肥大、肝硬化、肌肉衰减症或消瘦等的预防或治疗发挥效果。应予说明,在此举出的疾病仅为例示,对于由衰老细胞的蓄积引起的年龄增长或衰老相关疾病,除这些以外的疾病当然也作为本发明的对象。

[0052] 本发明的医药组合物可以以除有效成分(衰老细胞去除剂)以外还包含1种或2种以上的制剂用添加物的医药组合物的形态给予。另外,在该实施方式的医药组合物中,可以同时配合公知的其它药剂。

[0053] 本发明的医药组合物可以为口服或非口服用的剂型,没有特别限定,例如可举出片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、糖浆剂、悬浮剂、栓剂、软膏、乳膏剂、凝胶剂、贴剂、吸入剂或注射剂等。这些制剂可依照常规方法制备。应予说明,在液体制剂时,可以为在使用时溶解或悬浮于水或其它适当的溶剂的形式。另外,片剂、颗粒剂可以利用周知的方法进行包衣。在注射剂的氢下,使有效成分溶解于水而制备,但也可以根据需要溶解于生理盐水或葡萄糖溶液,另外,也可以添加缓冲剂、保存剂。

[0054] 本发明的医药组合物的制造中使用的制剂用添加物的种类、制剂用添加物相对于有效成分的比例或医药组合物的制造方法可以根据其形态由本领域技术人员适当地选择。作为制剂用添加物,可以使用无机或有机物质或者固体或液体的物质,一般而言,可以以相对于有效成分重量例如为0.1重量%~99.9重量%、1重量%~95.0重量%或1重量%~90.0重量%之间配合。具体而言,作为制剂用添加物的例子,可举出乳糖、葡萄糖、甘露醇、糊精、环糊精、淀粉、蔗糖、偏硅酸铝酸镁、合成硅酸铝、羧甲基纤维素钠、羟丙基淀粉、羧甲基纤维素钙、离子交换树脂、甲基纤维素、明胶、阿拉伯胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、轻质无水硅酸、硬脂酸镁、滑石、黄蓍胶、膨润土、蜂胶、氧化钛、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、月桂基硫酸钠、甘油、脂肪酸甘油酯、纯化羊毛脂、甘油明胶、聚山梨酸酯、聚乙二醇、植物油、蜡、液体石蜡、白色凡士林、碳氟化合物、非离子性表面活性剂、丙二醇或水等。

[0055] 为了制造口服给予用的固体制剂,将有效成分和赋形剂成分、例如乳糖、淀粉、结晶纤维素、乳酸钙或无水硅酸等进行混合而制成散剂,或者进一步根据需要添加白糖、羟丙基纤维素或聚乙烯基吡咯烷酮等粘合剂、羧甲基纤维素或羧甲基纤维素钙等崩解剂等进行湿式或干式造粒而制成颗粒剂。为了制造片剂,只要将这些散剂和颗粒剂直接或加入硬脂酸镁或滑石等润滑剂进行压片即可。这些颗粒或片剂也可以用羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸—甲基丙烯酸甲酯聚合物等肠溶剂基剂被覆而制成肠溶剂制剂,或者用乙基纤维素、巴西棕榈蜡或硬化油等被覆而制成持续性制剂。另外,为了制造胶囊剂,可以将散剂或颗粒剂填充于硬胶囊,或者将有效成分直接或溶解于甘油、聚乙二醇、芝麻油、橄榄油等后用明胶被覆而制成软胶囊。

[0056] 为了制造注射剂,可以将有效成分根据需要与盐酸、氢氧化钠、乳糖、乳酸、钠、磷酸一氢钠或磷酸二氢钠等pH调节剂、氯化钠或葡萄糖等等渗剂一起溶解于注射用蒸馏水,进行无菌过滤并填充于安瓿中,或者进一步加入甘露醇、糊精、环糊精或明胶等进行真空冷冻干燥,制成使用时溶解型的注射剂。另外,也可以在有效成分中加入卵磷脂、聚山梨酸酯80或聚氧乙烯氢化蓖麻油等使其在水中乳化而制成注射剂用乳剂。

[0057] 为了制造直肠给予剂,可以将有效成分与可可脂、脂肪酸的三、二和单甘油酯或聚乙二醇等栓剂用基材一起加湿而溶解并浇注到模具中进行冷却,或者将有效成分溶解于聚乙二醇或大豆油等后,用凝胶膜等进行被覆。

[0058] 本发明的医药组合物的给予量和给予次数没有特别限定,可以根据治疗对象疾病的恶化·发展的防止和/或治疗的目的、疾病的种类、患者的体重、年龄等条件而由医生或药剂师的判断而适当地选择。

[0059] 一般而言,口服给予时成人每天的给予量为0.01~1000mg(有效成分重量)左右,可以一天1次或一天几次,或者每隔几天进行给予。作为注射剂使用时,优选将一天量0.001

～100mg(有效成分重量)对成人进行连续给予或间歇给予。

[0060] 本发明的第3实施方式为一种对衰老细胞诱导细胞死亡的方法,包括在体外或体内抑制衰老细胞内的谷氨酰胺酶活性。

[0061] 衰老细胞内的谷氨酰胺酶活性的抑制例如也可以通过使上述的谷氨酰胺酶抑制剂与衰老细胞接触,形成使其侵入到细胞内的状态来实施。例如,在对生物体内的衰老细胞诱导细胞死亡的情况下,可以将谷氨酰胺酶抑制剂与药学上允许的载体等一起对生物体进行给予。此时,也可以以上述第2实施方式中记载的医药组合物的形态给予谷氨酰胺酶抑制剂。

[0062] 本发明的第4实施方式是一种随着年龄增长而发病的疾病的预防或治疗方法,包括对患者给予本发明的医药组合物或本发明的衰老细胞去除剂。

[0063] 这里“治疗”是指在已患有随着年龄增长而发病的疾病的患者中,阻止或缓和其病态的进展和恶化,由此是以阻止或缓和该疾病的进展和恶化为目的的处置。

[0064] 另外,“预防”是指预先阻止随着年龄增长而发病的疾病的发病,由此是以预先阻止该疾病的发病为目的的处置。

[0065] 另外,治疗和预防的对象并不限定于人,可以为除人以外的哺乳动物、例如小鼠、大鼠、狗、猫,此外,也可以为牛、马、羊等家畜,猴子、黑猩猩、大猩猩等灵长类等,特别优选为人。

[0066] 本发明的第5实施方式是一种方法,是制备衰老细胞的方法,包括以下的工序(a)～(c)。

[0067] (a)使细胞同步到G2期的工序,

[0068] (b)将同步到G2期的细胞内的p53蛋白进行活化的工序,以及

[0069] (c)抑制进行了工序(b)的处理的细胞内的PLK1(保罗样激酶1,polo-like kinase 1)活性的工序。

[0070] 是否为衰老细胞例如可以以细胞内的p16蛋白、p21蛋白或p19蛋白的表达与正常细胞相比显著上升;细胞衰老特异性β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)的活性与正常细胞相比显著上升;炎性细胞因子(例如,IL-6、IL-8等)、增殖因子(例如,IGFBP7等)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases:MMPs)等SASP特征性的分子的分泌的显著增加等为指标来进行评价。

[0071] 诱导衰老的细胞只要是来自哺乳类的细胞就可以来自任何动物,另外,也可以为来自任何组织的细胞。用于制备衰老细胞的细胞培养中作为基本的培养基只要是适于培养的细胞的培养基,就可以为任何培养基,也可以根据需要添加抗生素、蛋白酶抑制剂等而使用。另外,对于培养条件,也可以采用适于所使用的细胞的CO_2浓度、培养温度。

[0072] 第5实施方式的工序(a)是进行使衰老诱导的细胞群体的细胞周期同步到G2(gap2)期的处理的工序。将细胞同步到G2期的方法只要是本领域技术人员就可以容易地选择适当的方法,例如可举出将细胞利用CDK1(周期蛋白依赖性激酶1,Cyclin-dependent kinase 1)抑制剂进行处理(例如,使CDK1抑制剂与细胞接触),抑制该细胞内的CDK1活性的方法,此外,还可举出添加抗癌剂、照射放射线和照射紫外线等。为了抑制CDK1活性,可以使用市售的CDK抑制剂,作为CDK1抑制剂,例如可举出RO3306(CAS No:872573-93-8)、Roscovitine(CAS No:186692-46-6)和BMI-1026(CAS No:477726-77-5)等。CDK1抑制剂可

以添加于细胞的培养液等而使用,使用浓度可以通过参考购买方的使用说明书等并进行初步实验而容易地决定。没有特别限定,例如,在使用RO3306作为CDK1抑制剂的情况下,作为培养液中的浓度,例如为1～20μM,优选为5～10μM,更优选为9μM左右。另外,在使用RO3306的情况下,对细胞进行处理的时间没有特别限定,例如为10小时～30小时,优选为15小时～25小时,更优选为24小时左右。

[0073] 第5实施方式的工序(b)是进行用于将工序(a)中同步到G2期的细胞(群体)内的p53蛋白进行活化的处理的工序。将细胞内的p53蛋白进行活化的方法只要是本领域技术人员就可以容易地选择,例如可举出抑制Mdm2蛋白(与p53蛋白相互作用而抑制性地调节p53蛋白活性)的活性的方法,此外,还可举出添加抗癌剂、照射放射线、照射紫外线、氧化应激负荷和养分耗竭等。为了抑制Mdm2蛋白的活性,可以使用市售的抑制剂,作为这样的抑制剂,例如可举出Nutlin-3a(CAS No:675576-98-4)、HLI373(CAS No:502137-98-6)、RG7388(CAS No:1229705-06-9)、AMG-232(CAS No:1352066-68-2)和(MI-773CAS No:1303607-07-9)等。Mdm2抑制剂可以添加于细胞的培养液等而使用,使用浓度可以通过参考购买方的使用说明书等并进行初步实验而容易地决定。没有特别限定,例如,在使用Nutlin-3a作为Mdm2抑制剂的情况下,作为培养液中的浓度,例如为1～20μM,优选为5～15μM,更优选为10μM左右。另外,在使用Nutlin-3a的情况下,对细胞进行处理的时间没有特别限定,例如为10小时～70小时,优选为30小时～60小时,更优选为50小时左右。

[0074] 第5实施方式的工序(c)是进行用于抑制工序(a)和(b)中G2期和将p53蛋白进行了活化的细胞内的PLK1(保罗样激酶1,polo-like kinase 1)活性的处理的工序。为了抑制细胞内的PLK1活化,例如可以使用市售的PLK1活性抑制剂,作为这样的抑制剂,例如可举出BI2536(CAS No:755038-02-9)、GSK461364(CAS No:929095-18-1)、PCM-075(CAS No:1263293-37-3)和BI-6727(CAS:755038-65-4)等。PLK1活性抑制剂可以添加于细胞的培养液等而使用,使用浓度可以通过参考购买方的使用说明书等并进行初步实验而容易地决定。没有特别限定,例如,在使用BI2536作为PLK1活性抑制剂的情况下,作为培养液中的浓度,例如为50～150nM,优选为75～120nM,更优选为100nM程度。另外,在使用BI2536的情况下,对细胞进行处理的时间没有特别限定,例如可举出7天～15天,优选为8天～12天,更优选为9天左右。

[0075] 将本说明书翻译成英语而包含单数形式的“a”、“an”和“the”这样的单词的情况下,只要上下文并未明确示出并非如此,则不仅包含单数,还包含复数。

[0076] 以下示出实施例进一步进行本发明的说明,但本实施例仅为本发明的实施方式的例示,并不限定本发明的范围。

[0077] 实施例

[0078] 1.衰老细胞的制备方法

[0079] 细胞衰老诱导通过各种基因组压力诱导,因此,依赖于诱导刺激的种类而特异性的信号通路被活化。因此,为了明确所有与衰老细胞共通的转录物组、代谢物组状态,没有外部刺激且100％纯化的衰老细胞制备技术的开发是必要不可或缺的。以下,对没有外部刺激且能够将100％纯化衰老细胞稳定地长期培养的培养系统进行详述。

[0080] 向正常人成纤维细胞(HCA2)添加RO3306(SIGMA-ALDRICH)(最终浓度9μM),在37℃、5％CO_2下培养16小时。接着,在添加了RO3306(最终浓度9μM)和Nutlin-3a(SIGMA-

ALDRICH)(最终浓度10μM)的培养液中,在37℃、5％CO_2下培养8小时后,在添加了Nutlin-3a(最终浓度10μM)的培养液中,在37℃、5％CO_2下培养48小时。一边每3天更换为添加了BI2536(SIGMA-ALDRICH)(最终浓度100nM)的培养基一边在37℃、5％CO_2下培养9天。然后,一边每3天更换为常规的培养基一边在37℃、5％CO_2下培养9天,由此进行衰老诱导(图1A)。

[0081] 使用细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒(Senescenceβ-Galactosidase Staining kit)(CST),依照所附方案将衰老诱导前(培养0天)和诱导后(培养21天)的细胞染色。

[0082] 对每个培养有细胞的板计数随机200个细胞的染色的有无。其结果,在培养第21天,在所计数的几乎全部细胞中都确认到SA-β-gal的染色(图1B)。

[0083] 另外,使用RNeasy mini kit(Qiagen)并依照所附方案由进行了同样的处理的培养第21天的细胞制备总RNA。以所制备的总RNA为模板,使用ReverTra Ace qPCR RT kit(Takara),依据所附方案逆转录为cDNA。接着,以cDNA为模板,使用Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)进行qPCR解析以测定p16 mRNA的表达量。将用于检测p16mRNA表达量的引物示于以下。

[0084] 正向引物:5’-CCCAACGCACCGAATAGTTA-3’(序列号1)

[0085] 反向引物:5’-ACCAGCGTGTCCAGGAAG-3’(序列号2)

[0086] mRNA的表达量用GAPDH mRNA的量进行校正。其结果,在培养第21天的细胞中,p16的表达显著增大。

[0087] 根据以上的结果,确认了通过本发明的衰老细胞制备方法,能够对几乎全部的细胞进行衰老诱导。

[0088] 2.衰老细胞特异性的细胞死亡的诱导

[0089] 使用上述1.的方法中制备的衰老细胞,通过RNA测序进行衰老细胞的转录物组解析。其结果表明,在衰老细胞中,代谢相关基因的表达大幅变化。进而,为了明确衰老细胞的代谢特性,进行使用GC-MS的代谢物组解析。其结果可知,衰老细胞与正常细胞不同,具有如下所述的特征。

[0090] (i)柠檬酸显著蓄积。

[0091] (ii)异柠檬酸的量显著减少。

[0092] (iii)α酮戊二酸以后的柠檬酸循环的各代谢物的量几乎不变。

[0093] 与上述的结果一致,明确了在衰老细胞中负责从柠檬酸向异柠檬酸的转化反应的乌头酸酶的活性显著降低。已知乌头酸酶被活性氧氧化,从而其活性被抑制。实际上,发现在衰老细胞中活性氧的量显著上升,并且通过对衰老细胞给予活性氧的抑制剂,乌头酸酶活性在很大程度上恢复。

[0094] 根据这些结果表明,在衰老细胞中,由于活性氧量的上升而从柠檬酸向异柠檬酸的转化反应被抑制,α酮戊二酸的产生和其以后的柠檬酸循环的旋转有可能依赖于谷氨酰胺代谢途径(谷氨酰胺代谢)。因此,对谷氨酰胺代谢抑制剂对衰老细胞的存活和功能控制造成的影响进行解析。

[0095] 2—1.衰老细胞中的谷氨酰胺酶

[0096] 使用Laemmli缓冲液(2％SDS、10％甘油、5％2-巯基乙醇、0.002％溴酚蓝和62.5mM Tris HCl at pH 6.8),由衰老诱导前的细胞(正常细胞)和衰老诱导后的细胞(衰老细胞)制备细胞提取液。通过SDS-PAGE法将细胞提取液(20-50μg)分离,转移到PVDF膜后,使用抗

KGA抗体、抗GAC抗体和抗GLS抗体(以上的抗体从Proteintech获得)进行蛋白质印迹,通过ECL法进行检测。其结果明确,在衰老细胞中,作为负责从谷氨酰胺向谷氨酸的转化反应的谷氨酰胺酶的同型之一的KGA的表达量显著上升(图2A)。

[0097] 接着,以由正常细胞和衰老细胞制备的总RNA为模板,利用ReverTra Ace qPCR RT kit逆转录为cDNA后,使用Power SYBR Green PCR Master Mix,通过qPCR对KGA和GAC的mRNA的表达量进行解析。各mRNA的值用GAPDH mRNA的表达量进行校正。其结果明确了KGA mRNA的表达量在衰老细胞中上升(图2B)。

[0098] 另外,出于阐明衰老细胞中的谷氨酰胺酶的表达上升机制的目的,进行将谷氨酰胺酶基因的3'UTR连接到荧光素酶基因的下游的报告基因检测。

[0099] 将在海肾荧光素酶(Renilla luciferase)基因的下游插入了随机序列的对照、插入了GAC基因的3'UTR的2427bp的GAC、插入了KGA基因的3'UTR的2556bp的KGA-L以及插入了KGA基因的3'UTR的325bp的KGA-S的各自的质粒使用4D-Nulecofector(Lonza)导入到衰老细胞和正常细胞。使用导入后48小时的细胞并使用双荧光素酶检测系统(Dual-Glo Luciferase Assay System)(Promega),依照所附方案测定报告基因活性。其结果可知,具有已知与mRNA的翻译后控制有关的KGA基因的长3'UTR(KGA-L)的报告基因的活性在正常细胞中与其它报告基因相比,活性降低,另一方面,在衰老细胞中反而增加。根据结果明确了介由衰老细胞谷氨酰胺酶基因的3'UTR区域的KGA mRNA的稳定性上升(图2C)。

[0100] 2—2.衰老细胞中的谷氨酰胺代谢的作用

[0101] 为了调查衰老细胞的存活依赖于谷氨酰胺代谢的可能性,对谷氨酰胺酶的抑制剂的效果进行研究。

[0102] 以衰老细胞和正常细胞成为约10000个细胞的方式接种于6cm培养皿。第二天(0day)更换为添加了作为谷氨酰胺酶抑制剂的BPTES(最终浓度10μM)的培养基或常规的培养基,每24小时对细胞进行台盼蓝染色,使用血细胞计数板测量活细胞数。其结果,通过给予3天BPTES,在正常细胞中,确认到细胞数的增加,另一方面,在衰老细胞中,细胞数减少90%以上。因此,明确了谷氨酰胺酶抑制剂的BPTES能够对衰老细胞选择性地诱导细胞死亡(图3A)。

[0103] 接着,调查BPTES对作为衰老细胞的最重要的形质之一的大量分泌炎性细胞因子、细胞外基质分解酶的表型SASP的主要因子IL-6和IL-8的表达量的影响。将衰老细胞和正常细胞在添加了BPTES(最终浓度2.5μM)的培养基或常规的培养基中在37℃、5%CO_2下培养24小时,使用ISOGEN II(Wako)由各细胞制备总RNA。使用SuperScript II cDNA synthesis kit(Invitrogen)由总RNA逆转录为cDNA后,使用Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)进行qPCR解析以测定IL-6和IL-8表达量。将用于检测IL-6和IL-8mRNA表达量的引物示于以下。

[0104] IL-6

[0105] 正向引物:5'-CCAGGAGCCCAGCTATGAAC-3'(序列号3)

[0106] 反向引物:5'-CCCAGGGAGAAGGCACTG-3'(序列号4)

[0107] IL-8

[0108] 正向引物:5'-AAGGAAAACTGGGTGCAGAG-3'(序列号5)

[0109] 反向引物:5'-ATTGCATCTGGCAACCCTAC-3'(序列号6)

[0110] 可知通过给予对衰老细胞的存活几乎不造成影响的最终浓度2.5μM的BPTES,SASP的主要因子IL-6和IL-8的mRNA表达被抑制(图3C)。

[0111] 进而,对有关SASP抑制的分子机制进行解析。将衰老细胞和正常细胞在添加了BPTES(最终浓度2.5μM)的培养基或常规的培养基中在37℃、5%CO_2下培养24小时。使用Laemmli缓冲液(2%SDS、10%甘油、5%2-巯基乙醇、0.002%溴酚蓝和62.5mM Tris HCl at pH 6.8)由培养的细胞制备细胞提取液。通过SDS-PAGE法将细胞提取液(20-50μg)分离,转移到PVDF膜后,使用针对S67K蛋白的T389磷酸化部位的抗体(CST)、针对S6K蛋白的抗体(CST)和针对p16蛋白的抗体(abcam)进行蛋白质印迹,通过ECL法进行检测。其结果可知,通过BPTES处理,作为SASP的主要的控制因子即mTOR活化的指标的S6K蛋白T389的磷酸化被抑制(参照图3B、S6KpT389、衰老细胞的BPTES的泳道)。还明确了该抑制效果可通过给予跨膜型α酮戊二酸(DM-KG)来补救(参照图3B、S6KpT389、衰老细胞的DM-KG的泳道)。

[0112] 除抑制剂的研究以外,通过使用RNAi法的谷氨酰胺酶的表达抑制,也确认了对同样的衰老细胞有选择性的细胞死亡、SASP的抑制。

[0113] 根据以上的结果可知,谷氨酰胺代谢的活化是衰老细胞的存活和功能表达所必需的。

[0114] 2—3.衰老细胞内的pH控制下的谷氨酰胺代谢的作用

[0115] 基于BPTES(10μM)处理的衰老细胞选择性的细胞死亡的诱导通过给予跨膜型α酮戊二酸几乎无法补救,因此,考虑到基于谷氨酰胺代谢的其它代谢产物有可能很重要。而且,酸中毒与KGA mRNA的稳定化密切相关,考虑到包含KGA在内的谷氨酰胺酶有可能通过在由谷氨酰胺转化为谷氨酸时产生氨来控制细胞内pH的稳态。因此,对氨产生量和细胞内pH进行解析。

[0116] 将衰老细胞和正常细胞各自以成为约50000细胞的方式接种于10cm培养皿。第二天,更换为添加了BPTES(最终浓度10μM)的培养基或常规的培养基,在37℃、5%CO_2下培养24小时后,使用氨检测试剂盒(Ammonia assay kit)(abcam)对细胞中的氨量进行定量。其结果可知,与正常细胞相比,在衰老细胞中,氨产生量上升了约4倍,通过BPTES处理,衰老细胞中上升了的氨产生量被抑制到与正常细胞相同程度(图4A)。

[0117] 接着,将衰老细胞和正常细胞各自以成为约50000细胞的方式接种于6孔板。第二天,更换为添加了BPTES(最终浓度10μM)的培养基或常规的培养基,在37℃、5%CO_2下培养24小时。去除培养基、在添加了最终浓度3μM的DCECF-AM(同仁化学)的HEPES溶液中,在37℃、5%CO_2下培养10分钟,用HEPES溶液清洗3次后,利用读板仪测定发光。为了确定pH值,以利用添加了最终浓度10μM的尼日利亚菌素(Nigericin)的HEPES溶液(pH6.0～7.6)进行了处理的细胞的发光量进行校正。其结果也明确了,通过BPTES处理,在衰老细胞中,细胞内pH从通常的约7.4降低到约6.0(图4B)。

[0118] 先前的报告中已知细胞内pH的降低会引起介由基于BNIP3蛋白质的线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore:mPTP)的开口的细胞凋亡非依赖性的细胞死亡。因此,调查mPTP抑制剂(DUB和CsA)对BPTES处理细胞的影响。

[0119] 将衰老细胞和正常细胞各自以成为约10000细胞的方式接种于6cm培养皿。第二天,更换为添加了BPTES(最终浓度10μM)的培养基、添加了BPTES(最终浓度10μM)和DUB(最终浓度10μM)的培养基、添加了BPTES(最终浓度10μM)和CsA(最终浓度10μM)的培养基或常

规的培养基,在37℃、5％CO_2下培养24小时后,每24小时将细胞进行台盼蓝染色,使用血细胞计数板测量活细胞数。其结果可知,如果用mPTP抑制剂对细胞进行处理,则BPTES处理中可见的90％以上的细胞死亡减少至20％左右(图4C)。

[0120] 接着,使BPTES处理细胞的培养基的pH为弱碱性(pH8.0或pH8.5)来调查细胞的存活率。

[0121] 将衰老细胞和正常细胞各自以成为约10000细胞的方式接种于6cm培养皿。第二天,更换为添加BPTES(最终浓度10μM)且pH7.4、pH8.0或pH8.5的培养基,在37℃、5％CO_2下培养24小时后,每24小时将细胞进行台盼蓝染色,使用血细胞计数板测量活细胞数。其结果可知,BPTES处理中可见的90％以上的细胞死亡在弱碱性的pH条件下减少至30％左右(图4D)。

[0122] 另外,通过使用RNAi法的BNIP3的表达抑制,也确认了对同样的衰老细胞抑制选择性的细胞死亡。

[0123] 根据以上的结果,认为谷氨酰胺代谢介由氨的产生来控制衰老细胞的pH的稳态,从而维持其存活。

[0124] 2—4.通过阻碍谷氨酰胺代谢而进行的衰老细胞的去除

[0125] 对通过BPTES处理是否能除去生物体中的衰老细胞进行研究。

[0126] 对96周龄的C57BL6/N系统的雄小鼠每周1次给予1个月BPTES(12.5mg/kg体重)。然后,将小鼠解剖,将心脏、脑、肾脏和肝脏均质化,提取RNA,使用RNeasy mini kit(Qiagen),依照所附方案制备总RNA,使用ReverTra Ace qPCR RT kit(Takara)逆转录为cDNA。使用得到的cDNA并使用Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems),通过qPCR对作为衰老细胞的标志物的p16 mRNA的表达量进行解析。p16mRNA的表达量通过GAPDH的值来校正。将用于检测p16 mRNA表达量的引物示于以下。

[0127] 正向引物:5'-CCGCTGCAGACAGACTGG-3'(序列号7)

[0128] 反向引物:5'-CCATCATCATCACCTGAATCG-3'(序列号8)

[0129] 所有小鼠在无特定病原体的环境下饲养,依照东京大学医科学研究所动物实验指南进行处理(2—5.的实验也同样)。

[0130] 解析的结果,在心脏、脑、肾脏和肝脏中,确认到通过BPTES处理而p16 mRNA的表达降低(图5)。该结果表明,通过谷氨酰胺酶抑制剂,能够去除生物体内的衰老细胞。

[0131] 2—5.对年龄增长或衰老相关脏器功能障碍的谷氨酰胺代谢抑制效果

[0132] 对通过阻碍谷氨酰胺代谢而进行的衰老细胞的去除是否能够改善年龄增长或衰老相关脏器功能障碍进行研究。对C57BL/6N雄小鼠(8周龄(年轻小鼠)、76周龄(高龄小鼠))1个月腹腔内给予2或3次BPTES(0.25mg/20g/200μl)或媒介物(10％DMSO(玉米油中)/200μ),采取脏器和血液。

[0133] 2—5—1.谷氨酰胺代谢抑制剂对肾脏、肺、心脏和肝脏的随着年龄增长的障碍的效果

[0134] 肾脏、肺、肝脏、心脏用OCT化合物包埋,制作冷冻切片后,进行利用苏木精/伊红(H&E)的组织染色、使用马森三色(Masson Trichrome:MT)试剂、高碘酸希夫(Periodic Acid Schiff:PAS)试剂(Fisher Scientific)的组织染色或者使用抗F4-80抗体(CST)以DAB(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐,3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)(DAKO)

使其显色的免疫染色。染色后,利用显微镜观察组织切片。

[0135] 关于肾脏的肾小球硬化,基于PAS阳性的强度和范围对每1个体40个肾小球进行评价。另外,血清尿素浓度和肌酐浓度各自使用尿素检测试剂盒(Urea Assay kit)(Abcam)或肌酐检测试剂盒(Creatinine Assay kit)(Abcam)测定。

[0136] 图6A示出年轻小鼠(Young)、给予了媒介物(Mock)或BPTES(BPTES)的高龄小鼠(Aged)的肾小球的PAS染色结果。对照小鼠的肾小球与年轻小鼠的肾小球相比,硬化发展,但在给予了BPTES的小鼠中,肾小球硬化的程度得到改善(图6B)。另外,可知血清中的尿素和肌酐浓度也通过BPTES给予而降低(图6C和D)。

[0137] 肺的纤维化程度通过MT染色进行评价。图7A示出年轻小鼠(Young)、给予了媒介物或BPTES的高龄小鼠(Aged)的肺组织的MT染色结果。另外,利用BZ-X分析仪(Keyence)对经MT染色的区域进行定量,结果与对照小鼠的肺相比,在给予了BPTES的小鼠的肺中,纤维化的程度得到改善(图7B上)。

[0138] 对于心脏,将心脏的组织切片进行MT染色,评价纤维化的程度(图8A)。另外,计算心脏重量,心肌细胞的尺寸利用BZ-X分析仪(Keyence)进行测定。关于心脏,与对照小鼠相比,给予了BPTES的小鼠的心脏中的纤维化的程度也得到改善(图8B)。BPTES给予小鼠的心肌细胞的尺寸比对照小鼠小,心脏重量也是BPTES给予小鼠轻,与年轻小鼠的心脏重量为相同程度(图8C和D)。

[0139] 对BPTES对随着年龄增长的巨噬细胞向肝脏浸润的效果进行研究。将肝脏的组织切片利用抗F4/80抗体进行免疫染色(图9A),评价巨噬细胞浸润的程度。与对照小鼠相比,给予了BPTES的小鼠的肝脏中的巨噬细胞浸润的程度得到改善(图9B)。

[0140] 根据以上的结果明确了肾脏、肺、心脏和肝脏的随着年龄增长的障碍通过谷氨酰胺代谢抑制剂而得到改善。

[0141] 2—5—2.谷氨酰胺代谢抑制剂对随着年龄增长的衰老细胞向白色脂肪组织蓄积的效果

[0142] 存在于白色脂肪细胞组织的衰老细胞利用SA-βgal(细胞衰老特异性β-半乳糖苷酶,senescence-associated beta-galactosidase)进行染色,算出经染色的细胞的比例。

[0143] 白色脂肪组织的原位染色如下进行。将脂肪组织的小片回收到PBS中,利用2%甲酰胺/0.2%戊二醛固定15分钟,清洗后,利用新制备的SA-βgal染色液(1mg X-gal/ml、40mM柠檬酸/磷酸钠pH 6.0、5mM亚铁氰化钾、5mM铁氰化钾、150mM NaCl、2mM $MgCl_2$)在37℃下孵育12小时。接着,将组织小片用PBS清洗,按压在载玻片间,进行显微镜观察。

[0144] SA-βgal阳性细胞的存在比例以核作为指标,以阳性细胞的核数相对于全细胞的核数的比的形式算出。

[0145] 图10A示出白色脂肪组织的SA-βgal染色结果,图10B示出SA-βgal阳性细胞的比例。根据该结果表明,用SA-βgal染色的衰老细胞的蓄积通过谷氨酰胺代谢抑制剂而改善。

[0146] 2—5—3.谷氨酰胺代谢抑制剂对随着肥胖的向白色脂肪组织的衰老细胞蓄积、巨噬细胞浸润、白色脂肪组织的肥大的效果

[0147] 将8周龄的雄性小鼠(C57BL/6N)以高脂肪食物(HFD32、CLEA Japan)或常规食物饲养8周。8周的饲养期间中的后半4周,一周3次腹腔内给予BPTES(0.25mg/20g/200μl)或媒介物(10%DMSO(玉米油中)/200μ)。然后,从小鼠采取白色脂肪组织,将衰老细胞的蓄积通过

SA-βgal染色进行研究,将巨噬细胞浸润通过利用抗F4/80抗体的免疫染色进行研究。利用SA-βgal的原位染色和SA-βgal阳性细胞的存在比例如上述2－5－2.中记载那样进行。另外,巨噬细胞浸润的程度如上述2－5－1.中记载那样进行。脂肪细胞的尺寸通过BZ-X分析仪(Keyence)进行测定。

[0148] 通过给予BPTES,随着肥胖的衰老细胞的蓄积(图11A上和B)和巨噬细胞浸润的程度(图11A下和E)得到减轻。另外,随着肥胖的脂肪细胞的尺寸缩小(图11D),白色脂肪组织的重量也减轻(图11E)。

[0149] 根据以上的结果表明,随着肥胖的向白色脂肪组织的衰老细胞蓄积、巨噬细胞浸润、白色脂肪组织的肥大通过谷氨酰胺代谢抑制剂而得到改善。

[0150] 2－5－4.谷氨酰胺代谢抑制剂对随着肥胖的动脉硬化的效果

[0151] 将C57BL/6J ApoE敲除小鼠(8周龄)以致动脉粥样硬化的食物(D12108C、Research Diets Inc.)饲养8周。在8周的饲养期间中的后半4周,一周3次腹腔内给予BPTES(0.25mg/20g/200μl)或媒介物(10％DMSO(玉米油中)/200μ)。另外,将C57BL/6J野生型雄小鼠(8周龄)作为对照以常规食物饲养。动脉弓以外的所有大动脉将外膜脂肪干净地去除,切开,在4％多聚甲酰胺中,在25℃,以12小时平整固定。将大动脉用70％乙醇清洗5分钟,在0.5％Sudan IV(1:1的丙酮/乙醇中)中孵育5分钟后,用80％乙醇清洗1分钟,清洗3次。在大动脉产生的斑块用Sudan IV染色,利用ImageJ进行Sudan IV阳性区域的定量,在显微镜下对斑块数进行计数。

[0152] 其结果,通过给予BPTES,确认了斑块区域和斑块数的减少(图12A、B和C)。

[0153] 根据以上的结果表明,随着肥胖的动脉硬化通过谷氨酰胺代谢抑制剂而得到改善。

[0154] 2－5－5.谷氨酰胺代谢抑制剂对随着非酒精性脂肪肝炎的肝功能恶化的效果

[0155] 将8周龄的雄性小鼠(C57BL/6N)用胆碱缺乏L-氨基酸高脂肪食物(A06071302、Research Diets Inc.)饲养8周。在8周的饲养期间中的后半4周,一周3次腹腔内给予BPTES(0.25mg/20g/200μl)或媒介物(10％DMSO(玉米油中)/200μ)。血清AST量和肝脏中的羟脯氨酸量(OH-Pro)各自利用AST检测试剂盒(AST assay kit)(Abcam)和羟脯氨酸检测试剂盒(Hydroxyproline assay kit)(Abcam)进行测定。另外,通过qPCR测定p16、KGA和IL-6的表达量。将qPCR的引物示于以下。

[0156] p16

[0157] 正向引物:5'-CGCAGGTTCTTGGTCACTGT-3'(序列号9)

[0158] 反向引物:5'-TGTTCACGAAAGCCAGAGCG-3'(序列号10)

[0159] KAG

[0160] 正向引物:5'-ACTGGAGATGTGTCTGCCCTCCGAAG-3'(序列号11)

[0161] 反向引物:5'-CCAAAGTGTAGTGCTTCATCCATGGGG-3'(序列号12)

[0162] IL-6

[0163] 正向引物:5'-CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC-3'(序列号13)

[0164] 反向引物:5'-CTGTTGTTCAGACTCTCTCCCT-3'(序列号14)

[0165] 确认了通过给予BPTES,血清AST水平和肝脏中的羟脯氨酸水平(图13A和B)降低,p16、KGA和IL-6的表达量也降低(图13C、D和E)。

[0166] 根据以上的结果表明,随着非酒精性脂肪肝炎的肝功能损伤通过谷氨酰胺代谢抑制剂而得到改善。

[0167] 综合使用上述小鼠的试验结果,表明通过阻碍谷氨酰胺代谢而进行的衰老细胞的去除会改善各种年龄增长和衰老相关脏器功能障碍。

[0168] 产业上的可利用性

[0169] 本发明提供有效地制备纯化的衰老细胞的方法以及衰老细胞去除剂和随着年龄增长而发病的疾病的预防或治疗剂等。因此,可期待本发明在医疗领域中的应用。

[0001] 序列表

[0002] <110> 国立大学法人东京大学

[0003] <120> 去除衰老细胞的方法和衰老细胞的制备方法

[0004] <130> TPC0299UVT

[0005] <150> JP2018-210300

[0006] <151> 2018-11-08

[0007] <160> 14

[0008] <170> PatentIn第3.5版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 20

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 合成引物

[0015] <400> 1

[0016] cccaacgcac cgaatagtta 20

[0017] <210> 2

[0018] <211> 18

[0019] <212> DNA

[0020] <213> 人工序列

[0021] <220>

[0022] <223> 合成引物

[0023] <400> 2

[0024] accagcgtgt ccaggaag 18

[0025] <210> 3

[0026] <211> 20

[0027] <212> DNA

[0028] <213> 人工序列

[0029] <220>

[0030] <223> 合成引物

[0031] <400> 3

[0032] ccaggagccc agctatgaac 20

[0033] <210> 4

[0034] <211> 18

[0035] <212> DNA

[0036] <213> 人工序列

[0037] <220>

[0038] <223> 合成引物

[0039] <400> 4

[0040] cccagggaga aggcactg 18

[0041] <210> 5

[0042] <211> 20

[0043] <212> DNA

[0044] <213> 人工序列

[0045] <220>

[0046] <223> 合成引物

[0047] <400> 5

[0048] aaggaaaact gggtgcagag 20

[0049] <210> 6

[0050] <211> 20

[0051] <212> DNA

[0052] <213> 人工序列

[0053] <220>

[0054] <223> 合成引物

[0055] <400> 6

[0056] attgcatctg gcaaccctac 20

[0057] <210> 7

[0058] <211> 18

[0059] <212> DNA

[0060] <213> 人工序列

[0061] <220>

[0062] <223> 合成引物

[0063] <400> 7

[0064] ccgctgcaga cagactgg 18

[0065] <210> 8

[0066] <211> 21

[0067] <212> DNA

[0068] <213> 人工序列

[0069] <220>

[0070] <223> 合成引物

[0071] <400> 8

[0072] ccatcatcat cacctgaatc g 21

[0073] <210> 9

[0074] <211> 20

[0075] <212> DNA

[0076] <213> 人工序列

[0077] <220>

[0078] <223> 合成引物

[0079] <400> 9

[0080] cgcaggttct tggtcactgt 20

[0081] <210> 10

[0082] <211> 20

[0083] <212> DNA

[0084] <213> 人工序列

[0085] <220>

[0086] <223> 合成引物

[0087] <400> 10

[0088] tgttcacgaa agccagagcg 20

[0089] <210> 11

[0090] <211> 26

[0091] <212> DNA

[0092] <213> 人工序列

[0093] <220>

[0094] <223> 合成引物

[0095] <400> 11

[0096] actggagatg tgtctgccct ccgaag 26

[0097] <210> 12

[0098] <211> 27

[0099] <212> DNA

[0100] <213> 人工序列

[0101] <220>

[0102] <223> 合成引物

[0103] <400> 12

[0104] ccaaagtgta gtgcttcatc catgggg 27

[0105] <210> 13

[0106] <211> 20

[0107] <212> DNA

[0108] <213> 人工序列

[0109] <220>

[0110] <223> 合成引物

[0111] <400> 13

[0112] ccaagaggtg agtgcttccc 20

[0113] <210> 14

[0114] <211> 22

[0115] <212> DNA

[0116] <213> 人工序列

[0117] <220>

[0118] <223> 合成引物

[0119] <400> 14

[0120] ctgttgttca gactctctcc ct 22

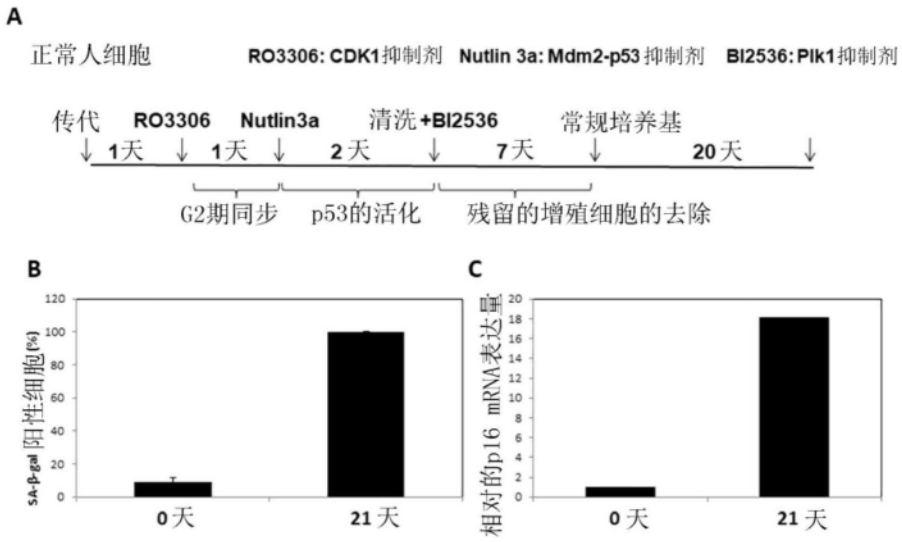

A
正常人细胞
RO3306: CDK1抑制剂 Nutlin 3a: Mdm2-p53抑制剂 BI2536: Plk1抑制剂
传代 RO3306 Nutlin3a 清洗+BI2536 常规培养基
1天 1天 2天 7天 20天
G2期同步 p53的活化 残留的增殖细胞的去除
B
SA-β-gal 阳性细胞(%)
0天 21天
C
相对的p16 mRNA表达量
0天 21天

图1

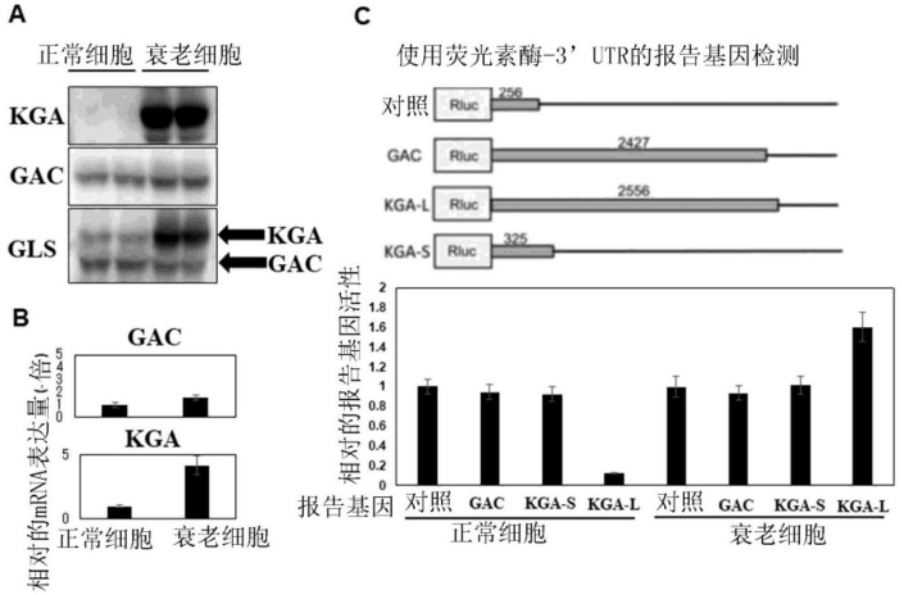

A
正常细胞 衰老细胞
KGA
GAC
GLS
KGA
GAC
B
GAC
KGA
相对的mRNA表达量(-倍)
正常细胞 衰老细胞
C
使用荧光素酶-3'UTR的报告基因检测
对照 Rluc 256
GAC Rluc 2427
KGA-L Rluc 2556
KGA-S Rluc 325
相对的报告基因活性
报告基因 对照 GAC KGA-S KGA-L 对照 GAC KGA-S KGA-L
正常细胞
衰老细胞

图2

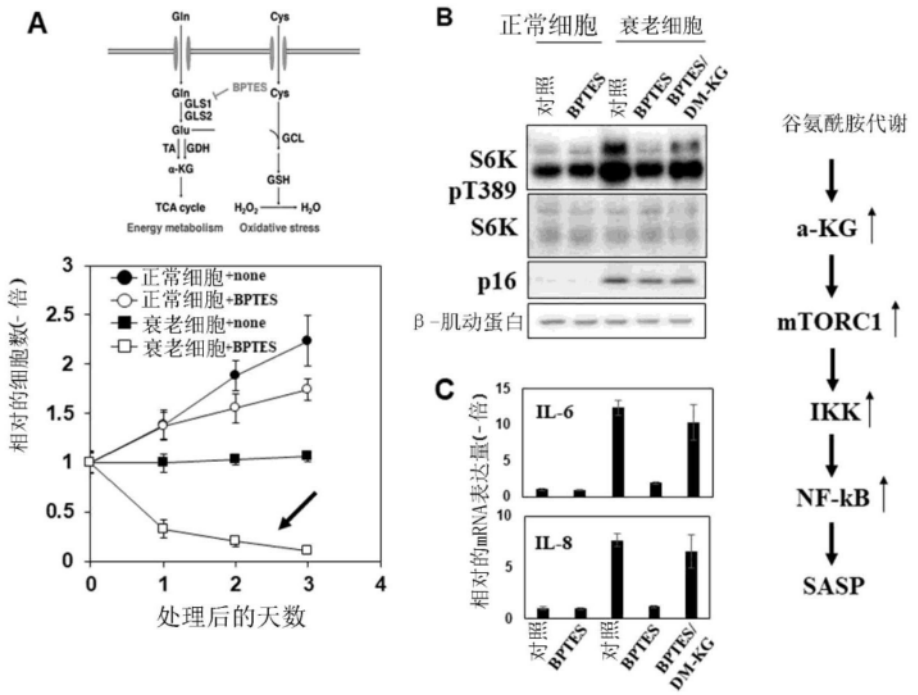

A
Gln
Cys
BPTES
GLS1
GLS2
Glu
TA
GDH
α-KG
GCL
GSH
TCA cycle
Energy metabolism
Oxidative stress
正常细胞+none
正常细胞+BPTES
衰老细胞+none
衰老细胞+BPTES
相对的细胞数(-倍)
处理后的天数
B
正常细胞
衰老细胞
对照
BPTES
BPTES/DM-KG
S6K pT389
S6K
p16
β-肌动蛋白
谷氨酰胺代谢
a-KG
mTORC1
IKK
NF-kB
SASP
C
IL-6
IL-8
相对的mRNA表达量(-倍)

图3

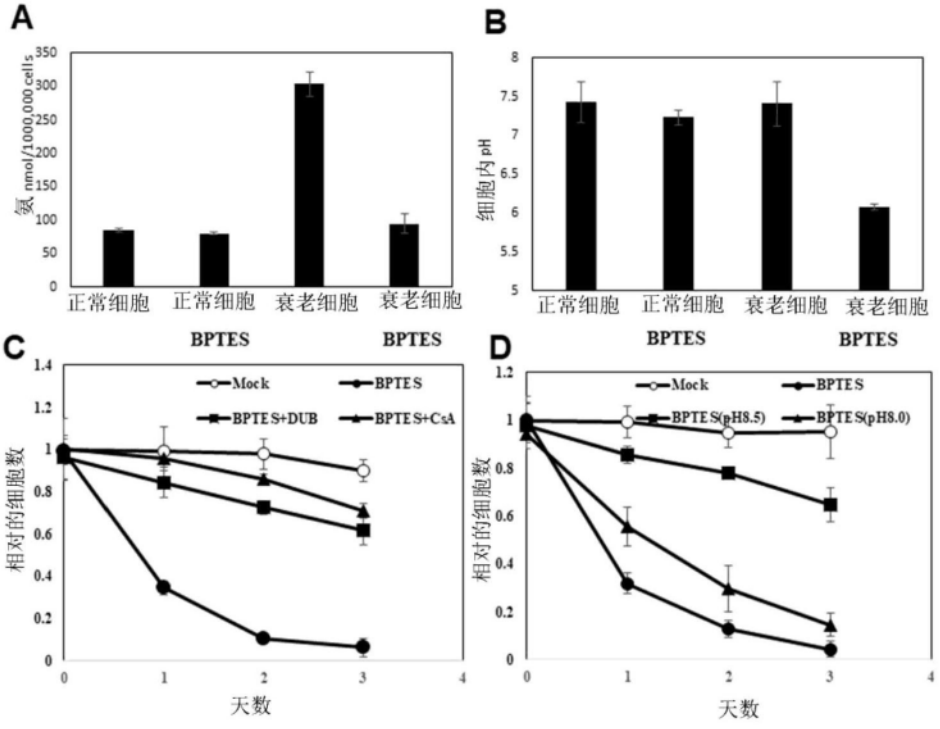

A
氨 nmol/1000,000 cells
正常细胞
衰老细胞
BPTES
B
细胞内 pH
C
Mock
BPTES
BPTES+DUB
BPTES+CsA
相对的细胞数
天数
D
BPTES(pH8.5)
BPTES(pH8.0)

图4

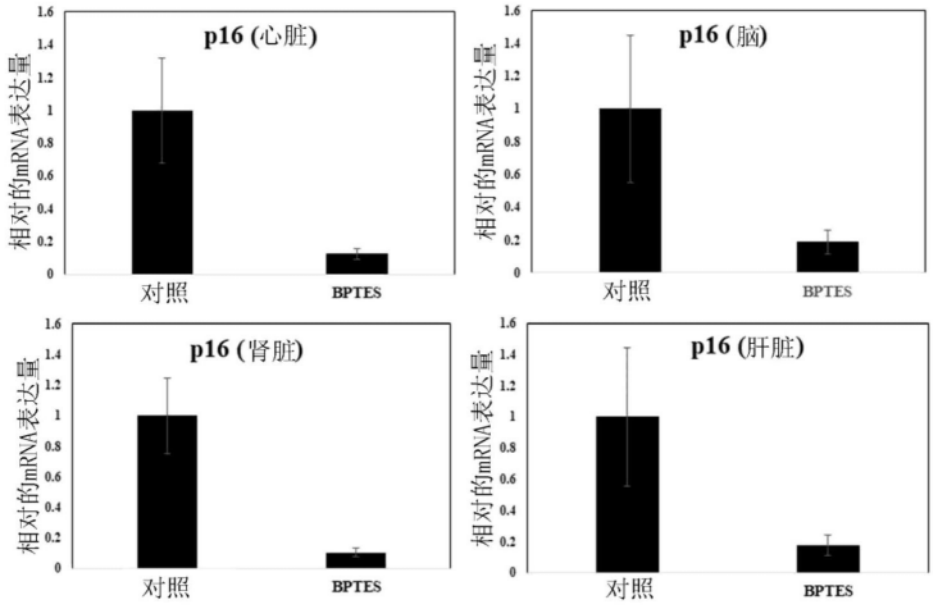

p16 (心脏)
p16 (脑)
p16 (肾脏)
p16 (肝脏)
相对的mRNA表达量
对照
BPTES

图5

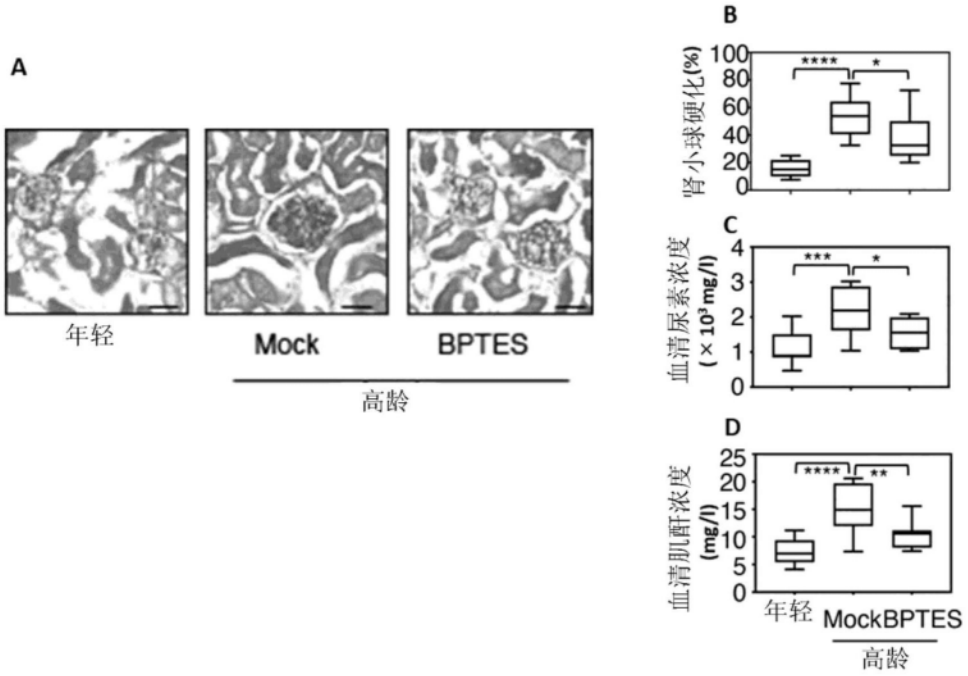

A
年轻
Mock
BPTES
高龄
B
肾小球硬化(%)
C
血清尿素浓度
(×10³mg/l)
D
血清肌酐浓度
(mg/l)
年轻
MockBPTES
高龄

图6

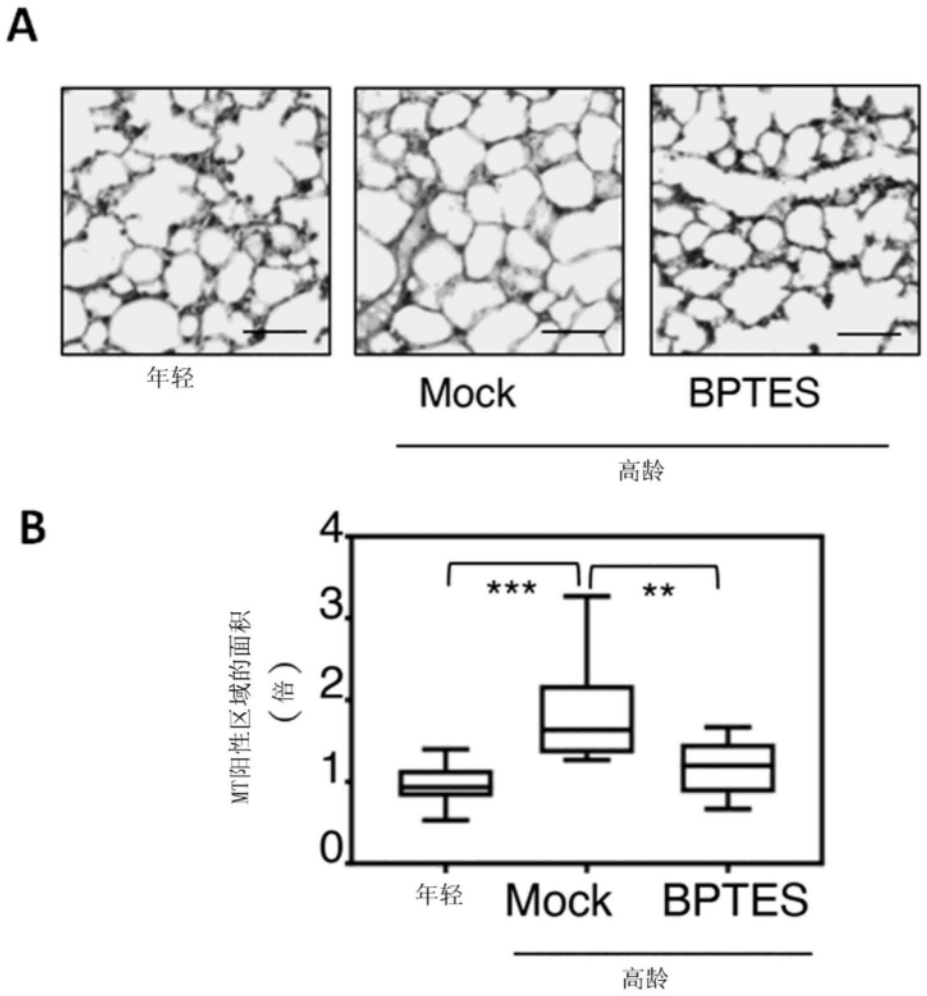


图7

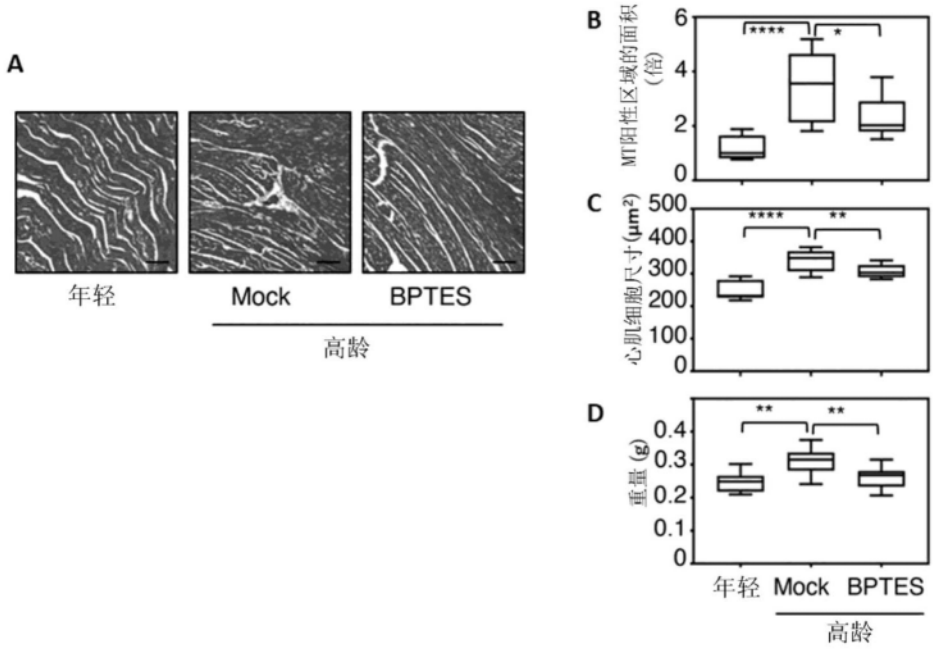

A
年轻
Mock
BPTES
高龄
B
MT阳性区域的面积（倍）
****
*
C
心肌细胞尺寸（μm²）
****
**
D
重量（g）
**
**
年轻
Mock
BPTES
高龄

图8

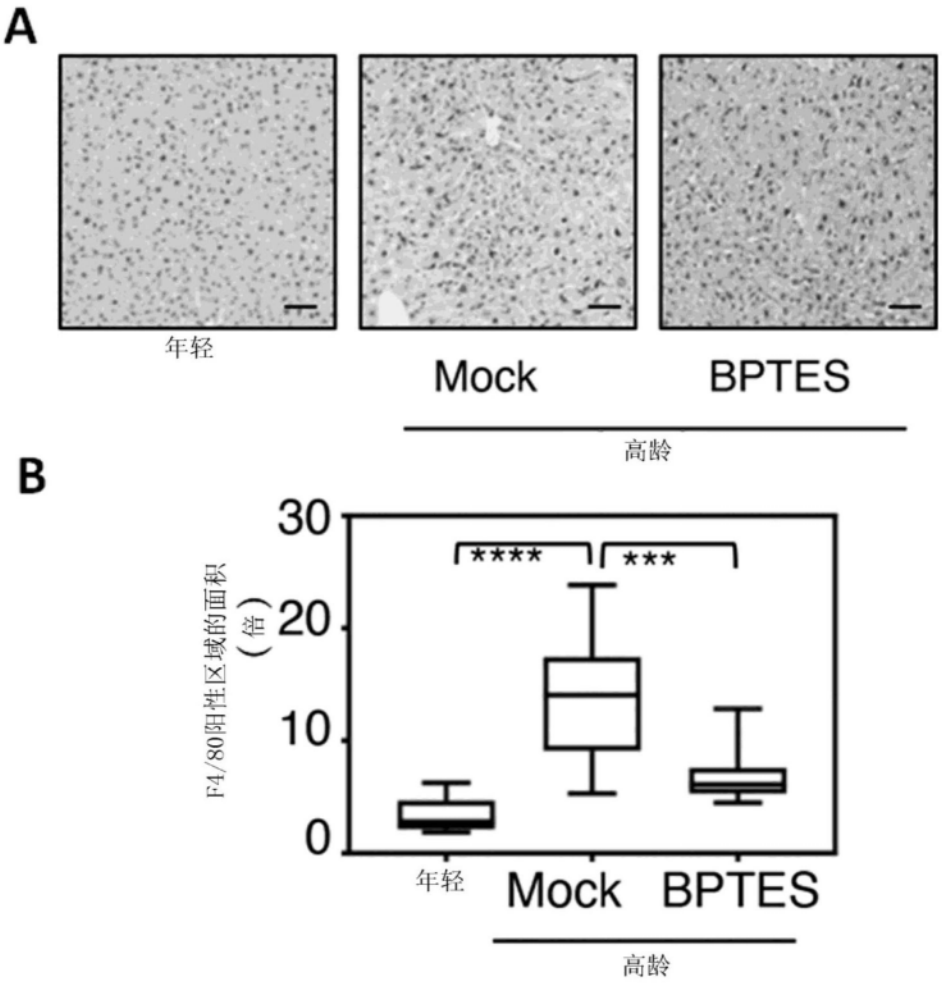


图9

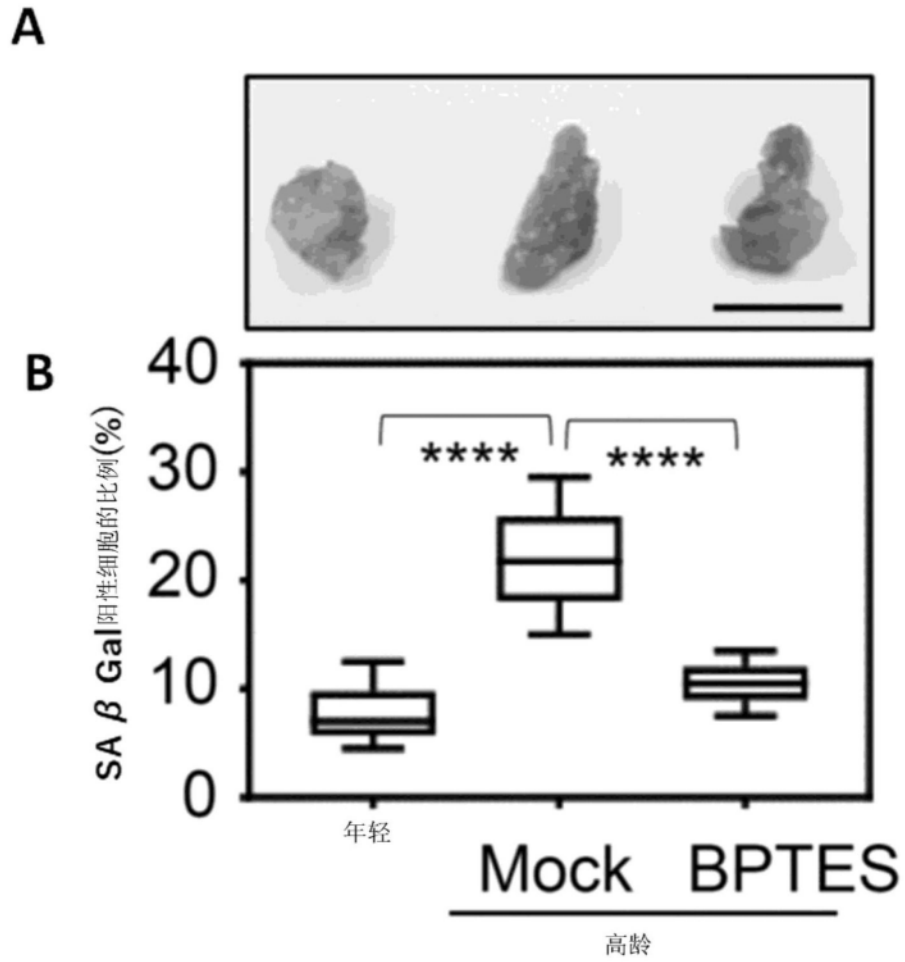


图10

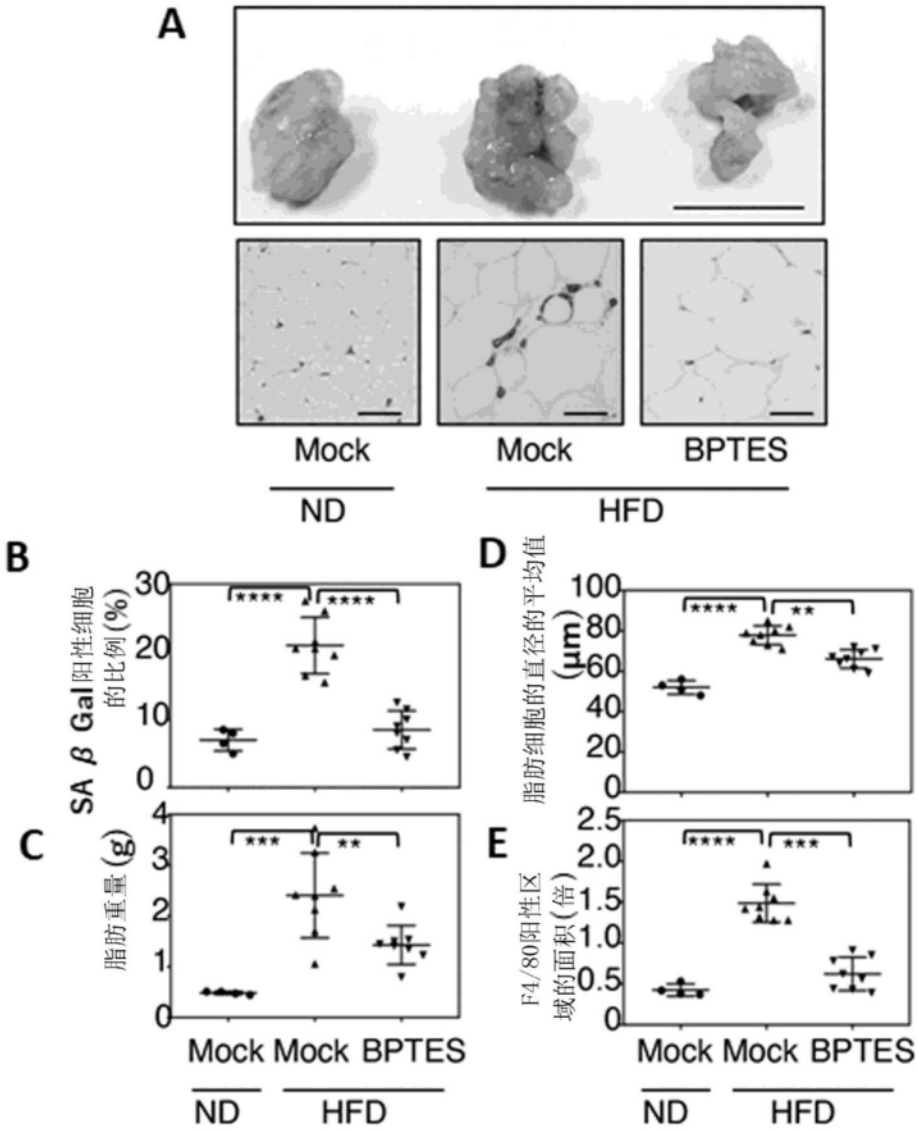

A
Mock
Mock
BPTES
ND
HFD
B
SA β Gal阳性细胞的比例(%)
D
脂肪细胞的直径的平均值(μm)
C
脂肪重量(g)
E
F4/80阳性区域的面积(倍)
Mock Mock BPTES
ND HFD

图11

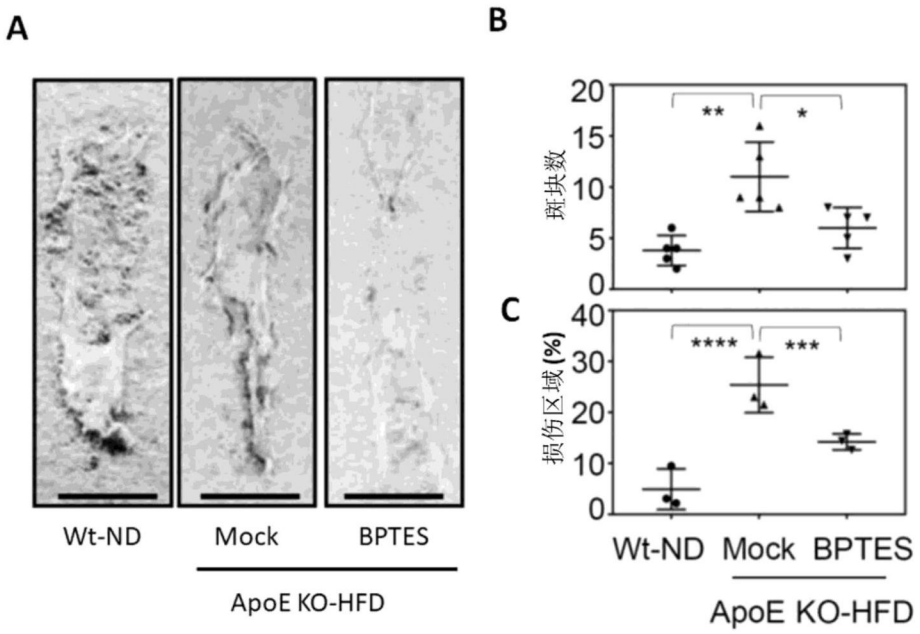

A
B
C
斑块数
损伤区域(%)
Wt-ND
Mock
BPTES
ApoE KO-HFD

图12

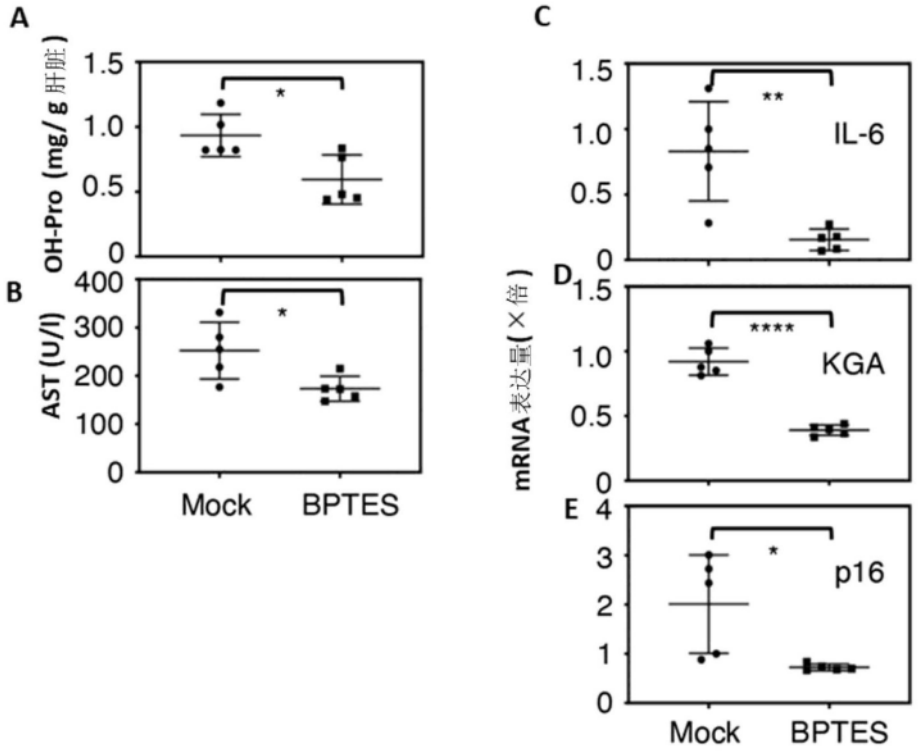

A
B
C
D
E
OH-Pro (mg/g 肝脏)
AST (U/l)
mRNA表达量(×倍)
IL-6
KGA
p16
Mock
BPTES

图13