

老化を制御する液性因子

Humoral factors regulating aging process

新村 健

要約

1950年代後半から1960年代にかけて、parabiosis（並体結合）といった実験が盛んに行われた。これは異なった個体を皮下レベルで手術的に縫合することで、両個体の循環体液を混合して、共有させるといった手技である。老齢ラットと若齢ラットのheterochronic parabiosis研究から、若齢ラットの血中には老齢ラットを若返らせ、寿命を延長させうる因子が存在することが推測された。さらに抗老化療法であるカロリー制限を実施したラットと食事自由摂取のラットとのparabiosis実験から、カロリー制限の好ましい効果が液性因子によって仲介されることも推測された。parabiosisによる加齢臓器の若返り効果は、骨格筋、軟骨、肝臓、中枢神経系、心臓と、さまざまな臓器で確認されてきた。さらに動物実験では、輸血や血液成分交換による若返り効果も数多く報告されている。このような事実から、血液に含まれる何らかの成分が、個体老化に大きな影響をおよぼしていることは、ほぼ確実と考えられている。

近年、このような老化を促進あるいは抑制する液性因子として、補体C1q, Growth differentiation factor 11, chemokine ligand 11, β 2-microglobulinなどが相次いで報告された。はたして我々は、“Fountain of youth”をついに見つけたのであろうか？本稿ではこれらの液性因子の働きと、他の候補として、アンドロゲン, Klothoタンパク, 分泌型nicotinamide phosphoribosyltransferase, non-coding RNAについて紹介したい。

Key words 液性因子, 骨格筋再生, 心肥大, 個体老化, parabiosis

(日老医誌 2016; 53: 10-17)

老化を制御する液性因子

分子生物学の発展とともに老化に関わるさまざまな細胞内シグナルやそれらにかかわる因子の同定が試みられてきた。細胞内シグナルの解明といった視点であるが故に、これまでの老化メカニズムに関する研究では、主に細胞老化や臓器老化に焦点を当てたものが多かった。さらに近年では細胞老化と臓器老化とをつなぐ重要な概念として、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) が提唱され、non-cell autonomousな機序が着目されるようになった。

それでは細胞老化や臓器老化と個体老化とを結び付

けているものは何かというと、以前より神経系ネットワークと循環因子がその候補として挙げられてきた。そして、いくつかの実験的エビデンスから、なんらかの液性因子が全身の老化の進展または促進を仲介していると推測されていた。しかし具体的にはどのような因子が存在し、どのような役割を担うのかまでは明らかにされていなかった。ところが、2012年のNaitoらによる老化促進因子、C1qの同定¹⁾、2013年の老化抑制因子、Growth differentiation factor (GDF) 11の発見²⁾は、老化を仲介する液性因子をめぐる研究にparadigm shiftを起し、医学会のみならず社会的なセンセーションを引き起こした。ついに我々は“Foun-

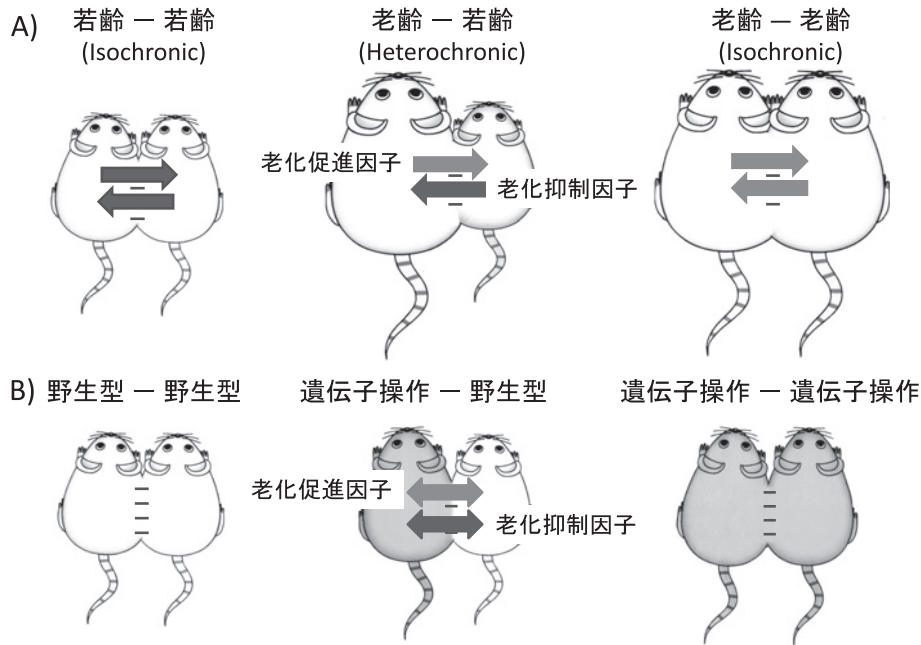


図1 Parabiosis 実験の実際

A) 若齢マウスと老齢マウスの parabiosis 実験

B) 野生型マウスと遺伝子操作マウスでの parabiosis 実験

tain of youth” を見つけたのであろうか？

歴史的背景

紀元前の古代ローマの詩人、オウィディウスによる「変身物語」では魔女 Medea が老人の血液を入れ替えて若がえさせる場面があり、これを由来に輸血は Cura Medeana と呼ばれるようになった。中世ヨーロッパでは若返りを目的に輸血を行ったという報告が散見されるが、当然ながら失敗に終わり、輸血学の黒歴史となった。その後長い時間をかけて、そして2つの世界大戦を経て、輸血学は医学的治療として発展していったのは周知のとおりである。現時点で若返り目的の輸血は有害以外何物でもないことは確立している。

1950年代後半から1960年代にかけて、parabiosis (並体結合) といった実験が盛んに行われた(図1)^{3)~8)}。これは異なった個体を皮下レベルで手術的に縫合することで、両個体の循環体液を混合して、共有させるといった手技である。放射線照射による致死率を調べた

parabiosis 実験では、非照射個体の血液幹細胞が照射個体に供給されることにより、照射個体も救命されることを明らかにした³⁾⁴⁾。コーネル大学の McCay は老齢ラットと若齢ラットの heterochronic parabiosis 研究を行い、若齢ラットの血中には老齢ラットを若返らせ、寿命を延長させる因子が存在することを推測した⁶⁾⁸⁾。Chronological aging のみならず、抗加齢効果が確認されているカロリー制限 (CR) を実施したラットと食事自由摂取 (AL) のラットの parabiosis 実験でも、CR の効果が AL 動物にももたらされることが報告された⁵⁾。

21世紀に入って、老化における幹細胞の役割がより注目されるようになった。老化した個体の組織においても幹細胞数自体には大きな変化が見られないことから、幹細胞の機能を調節する環境因子が重要と考えられた。実際 parabiosis 実験により、老齢マウスの幹細胞は活性化し、逆に若齢マウスの幹細胞は不活化することを Conboy らは2005年に見出した⁹⁾。老齢ラットと若齢ラットの parabiosis による加齢臓器の若返り効果は、骨格筋、軟骨、肝臓、中枢神経系、心臓と、

miotic な細胞, postmiotic な細胞を問わずに認められた^{2)9)~12)}. 細胞レベルでは, parabiosis による影響は, 環境の影響を排除してもしばらくは継続することも明らかにされた. このことは, 環境因子により老化過程のリプログラミングが起き, エピジェネティックな記憶が細胞に付加されることを示唆している¹³⁾.

このような事実から, 血液に含まれる何らかの成分が, 老化に大きな影響をおよぼしていることは, ほぼ確実と考えられている. 動物実験では, 遺伝的素因の違いが少ない同血統系での研究であり免疫応答反応は少ないこと, 寿命の短さより chronic virus infection の寿命に及ぼす影響が少ないことから, 輸血, 血液成分交換による若返りの有効性はこれまでに数多く確認されている. またヒトを含め若齢動物, 老齢動物から採取した血液を用いて *in vitro* で培養細胞を用いて検討した細胞老化の促進, 抑制効果も多く報告されている. CR の効果も, 輸血や血漿成分により仲介されることが報告されている. 問題は, それがどのような因子により仲介され, どのように細胞のエピジェニック修飾をもたらしているか, という点であろう³⁾.

Wnt シグナル活性化因子としての C1q

Stanford 大学の Conboy, Rando らのグループは, parabiosis を用いて骨格筋再生に関与する液性因子の同定を試みた¹⁰⁾¹²⁾. 老齢マウスの血中に存在する老化促進因子は Wnt タンパクの受容体 Frizzled (Fz) に結合し, Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させる因子であることを見出した¹⁰⁾. Wnt シグナルは発生において主要な役割を担うが, 老化との関連性も示唆されている. ヒト老化と同じ表現型を呈する Klotho マウスでは各臓器で Wnt シグナルの活性化が見られた¹⁴⁾. 繊維芽細胞を用いた研究では, Wnt シグナルの抑制が細胞老化を引き起こすという報告¹⁵⁾, 逆に Wnt シグナルの刺激が細胞老化を引き起こすという報告¹⁶⁾がある.

Naito らは心不全マウスの血清は老齢マウス以上に高い Wnt 活性化能を有することをヒントに, Fz 結合能を有する血液中タンパクの同定に取り組み, 補体成分 C1q がそれであることを見出した¹⁾. C1q は古典的

補体活性経路を介さずに Fz と結合し, C1q-C1r-C1s 複合体内の C1s が Wnt 共受容体である LRP6 を切断することで Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させることを発見した. また C1q が Wnt シグナル活性化を介し筋組織幹細胞の増殖を抑制するとともに繊維芽細胞の増殖を促進し, 加齢に伴う骨格筋再生能低下を引き起こすことを明らかにした¹⁾.

老化における Wnt シグナルの役割に関しては必ずしも統一した見解は得られていないが, 少なくともいくつかの局面で Wnt シグナルの活性化が細胞老化, 個体老化を促進させていることは間違いない. ヒトにおいても加齢にともない血清 C1q は上昇し, 血清 C1q は骨格筋量と負の相関を示すことから, C1q はサルコペニアのバイオマーカーとして極めて有望との報告もある¹⁷⁾.

GDF11 は, 老化抑制因子?それとも老化促進因子?

ハーバード大学グループの Loffredo らは, parabiosis を用いて加齢性心肥大に関与する液性因子の同定を試みた²⁾. 加齢心では parabiosis 施行後 4 週間で心肥大が劇的に改善し, その効果は parabiosis による血行動態の変化や運動量の変化によるものではないと結論された. そこでプロテオミクス解析により同定した液性因子が, transforming growth factor (TGF)- β superfamily の一つである GDF11 である. GDF11 は *in vitro* で TGF- β シグナルの smad2/3 を活性化し, Forkhead box O transcription factor (FoxO) 2/3a を抑制することで, phenylephrine による心肥大反応を抑制した. *In vivo* では GDF11 は加齢により減少し, GDF11 の投与は加齢に伴う心肥大を改善したが, 大動脈縮窄症 (TAC) モデルでの圧負荷心肥大には効果を認めなかった²⁾.

骨格筋においても GDF11 投与は加齢による骨格筋幹細胞 (サテライト細胞) の機能低下を改善し, ゲノム安定性を回復させた¹⁸⁾. さらに老齢マウスへの GDF11 投与は筋力や運動耐容能の改善をもたらした.

Parabiosis の効果は脳神経系でも顕著に認められている¹¹⁾¹²⁾. Villeda らは, 若齢マウスとの parabiosis に

より老齢マウスの認知機能や神経細胞の可塑性が回復すると報告した¹²⁾。この効果は若齢マウスの血漿投与によっても確認された。カリフォルニア大学サンフランシスコ校グループは液性因子の同定までは至らなかった¹²⁾が、先のハーバード大学グループは、若齢マウスとの parabiosis は老齢マウスの神経幹細胞の機能やその niche を改善すること、その責任因子はやはり GDF11 であると報告した¹⁹⁾。これらの報告は GDF11 は老化抑制因子であり、その不足が老化を促進するという仮説を支持するものであった。

ところが 2015 年になって、これまでの報告を真っ向から否定する報告が発表された^{20)~22)}。Egerman らは、GDF11 の過剰発現は、サテライト細胞の機能を障害し、筋肉の再生を減じたと報告した²⁰⁾。さらに老齢マウスへの GDF11 投与は全く効果がなく、若齢マウスへの投与は、サテライト細胞の展開や分化を減ずることで筋肉再生に対して抑制的に働くと報告した。Loffredo らによる研究との相違は、GDF11 と myostatin との高い相同性に由来する。両者は 89% アミノ酸配列上の相同性を有する。そのため、通常のプロテオミクス解析では GDF11 と myostatin を分別できない。さらに Loffredo らがこれまで用いてきた抗体も両者を正確に認識することはできないと指摘した。

加齢により減少するのは myostatin で、GDF11 単独ではむしろ加齢に伴い増加するのが真実という²⁰⁾。さらに両者は共通の受容体を介して細胞内シグナルを伝達している。それは smad2/3 と Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルである。Myostatin が強力な骨格筋増殖抑制因子であるように、GDF11 投与による smad2/3 活性化は、FoxO 抑制による好ましい効果を Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 系抑止による望ましくない効果で相殺し、MAPK 活性化の分だけ骨格筋に対しては負の効果を示すと考察した²⁰⁾。

さらに GDF11 の加齢心への若返り効果を否定した論文が最近発表された²²⁾。また Rodgers らは myostatin null マウスの検討から、GDF11 濃度は myostatin 濃度の 500 分の 1 に過ぎないと報告した²¹⁾。

投与量や投与のタイミングによって、GDF11 が競合的に myostatin を阻害する可能性、GDF11 単独の

細胞内シグナル経路が存在する可能性は完全に否定できないものの、GDF11 が我々の探していた“Fountain of youth”である確率はかなり低下した。

β2-microglobulin は中枢神経系老化を促進する液性因子である

2011 年に Villeda らは、heterochronic parabiosis 実験の結果を踏まえ、老齢マウスの血中で増加する chemokine ligand (CCL) 11 が加齢に伴って生じる中枢神経の再生能低下の原因因子と報告した¹²⁾。その論文で彼らは老化を促進する液性因子の候補として、他に CCL2, CCL12, CCL19, hepatoglobin, β2-microglobulin を挙げていた。

最近彼らは、β2-microglobulin こそが加齢に伴う認知機能の低下や神経再生能低下に寄与する老化促進液性因子であると発表した²³⁾。β2-microglobulin はマウスにおいて加齢に伴い血中のみならず海馬で増加している。ヒトでも加齢に伴い血液中と髄液中での増加が確認された。β2-microglobulin は major histocompatibility (MHC) class I complex の主要な成分であり、Tap1 というトランスポーターにより細胞表面に輸送され、細胞傷害性 T 細胞への抗原提示に用いられている。β2-microglobulin は *in vitro* では直接的に海馬由来神経幹細胞の増殖と分化を妨げた。*In vivo* では β2-microglobulin の眼窩または海馬への投与がマウスの認知機能を低下させること、β2-microglobulin 欠損マウスでは加齢に伴う認知機能低下が軽減されること、Tap1 欠損マウスでは β2-microglobulin 投与による認知機能低下が見られないこと (MHC I の細胞表面への輸送が細胞傷害に必須なこと) を明らかにした。興味深い結果の一つは *in vivo* における β2-microglobulin 投与の効果は一過性で、β2-microglobulin による細胞傷害性は可逆的であるという事実である。β2-microglobulin は海馬における chronic low-grade inflammation の key molecule かもしれない。

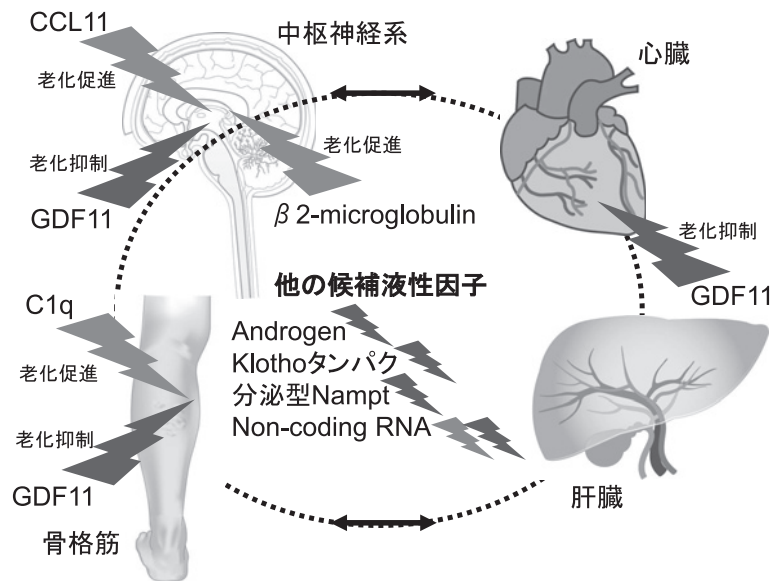


図2 老化を制御する液性因子の候補分子

CCL11 : chemokine ligand 11, GDF11 : Growth differentiation factor 11, Namp : nicotinamide phosphoribosyltransferase

無視できない多くの候補因子

上記4因子に加え、これまでも老化を抑制または促進する液性因子候補は数多く提案されてきた(図2)。それらの多くは追試験で再現性が認められず脱落していったが、まだ可能性が残されているものも多い。その最も古典的な候補の一つは、アンドロゲンであろう。アンドロゲンとは男性ホルモンの総称で、テストステロン、ジヒドロテストステロン、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)などを含む。DHEAは男性女性ともに副腎で合成され、女性ではアンドロステンジオンとともに主要なアンドロゲンである。DHEAとその硫酸塩DHEA-Sはヒトにおいて特異な加齢変化を示し、長寿マーカー、抗老化ホルモンとして注目されてきた²⁴⁾。最近のheterochronic parabiosis実験でも老齢雄マウスの骨格筋再生能回復に寄与する老化抑制因子としてテストステロンが挙げられている²⁵⁾。

Klotho遺伝子の欠損マウスはヒトでみられる老化の表現型を呈し、若年死に至る一方、Klotho過剰発現はマウスの寿命を延長させた²⁶⁾。Klotho遺伝子は腎臓での発現が高くカルシウム代謝調節にかかわっている。Klotho蛋白には膜型と分泌型があり分泌型の役

割は充分解明されていないが、1998年にSaitoらはparabiosis実験によりKlotho遺伝子欠損マウスにみられる血管内皮障害は野生型マウスの液性因子により回復しうることを証明した²⁷⁾。ヒトにおける血漿Klotho濃度と心血管イベント、死亡率との関連も報告されている²⁸⁾²⁹⁾。

サーチュインとはnicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 依存的に基質タンパクの脱アセチル化(脱アシル化)を行う酵素群の総称である。長年哺乳類においてもサーチュインが長寿をもたらし得るかは議論されてきたが、近年、SIRT6過剰発現マウスでは雄、脳特異的SIRT1過剰発現マウスでは雄雌ともに寿命が延長することが確認された³⁰⁾。Imaiらはサーチュインの活性を制御している生体のNAD⁺合成系に着目した。nicotinamide mononucleotideからnicotinamide phosphoribosyltransferase (Namp)によりNAD⁺が合成される反応は、NAD⁺合成系の律速段階である。Nampには細胞内型と細胞外型(分泌型)があり、細胞内型Nampの発現が少ない隣細胞や神経細胞では、細胞外型NampによるNAD⁺供給に依存している³¹⁾。加齢に伴うNAD⁺合成低下は、NAD⁺合成において脆弱性を有するこれらの臓器でサーチュイ

ン活性低下を引き起こし、老化が促進されるという仮説である。細胞外型 Nampt とは、内臓脂肪組織の脂肪細胞とマクロファージで主に合成されているアディポカインの一種で、visfatin, pre-B cell colony enhancing factor と呼ばれている³¹⁾。近年ヒト血漿 Nampt 濃度は加齢により低下すると報告された³²⁾。Imai らの仮説が正しければ、細胞外型 Nampt は老化抑制型の液性因子かもしれない。

non-coding RNA とはタンパクに翻訳されずに機能する RNA の総称であり、さまざまな構造や細胞内局在性を有する分子ファミリーからなる。これまでの研究から、主に small non-coding RNA である microRNA のメンバーが、細胞、臓器における老化、炎症、増殖などの制御において極めて重要な役割を担うことが明らかにされた³³⁾。さらに最近の研究から細胞はこれらの microRNA を分泌し、分泌された microRNA は循環中も安定した状態で存在し、さらに遠隔部位の細胞に取り込まれ、その細胞に情報を伝達する可能性が高いことが明らかにされた³⁴⁾。すでに疾患特異的な循環血中の microRNA パターンが数多く報告されている³⁴⁾。老化関連疾患に特異的な non-coding RNA パターンが発表されるのも時間の問題だろう。

終わりに

ヒトの老化は、マウス、ラットなどげっ歯類ほど単純なものではない。Parabiosis は優れた実験系であるが、この実験結果を安易にヒトへ応用できないことは自明である。ただしこの考えは動物実験の意義を否定するものではなく、我々がそこから得られる結果をいかに適切に医療へと応用していくかが問われる時代になったからこそその戒めを込めたものである。ヒトでの老化は、多様性(diversity)、不均一性(heterogeneity)、複合性(complexity)から特徴づけられるように、遺伝子の不均一性や環境要因の影響を基盤に生じる現象である。そこで基礎研究から得られた知見は、時間をかけて慎重に臨床的な吟味を行う必要がある。ある種の液性因子が老化のある側面を促進、抑制する可能性があったとしても、ヒトの生体内では、2重3重に張り巡らされた恒常性維持システムのネットワークの中

で、意義を完全に失う事もあるだろう。またげっ歯類では老化を制御する液性因子が、ヒトでは予期せぬ疾患・症候の key molecule であることもありうると思える。時に悲観論が渦巻く超高齢社会の中で、我々が夢を持って科学に取り組む上で、これからも“Fountain of youth” はあまりに魅力に満ちたテーマであり続けるであろう。あたかも miracle drug を発見したかのような、誇張した発表を繰り返す昨今の風潮は、老化制御研究においては諸刃の刃であり、我々はそれに踊らされることなく常にヒトの老化と基礎研究での老化との適切な距離感を保ち続けなければならない。

著者の COI (Conflict of Interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, et al.: Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 2012; 149: 1298-1313.
- 2) Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, et al.: Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 2013; 153: 828-839.
- 3) Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA: Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging cell* 2013; 12: 525-530.
- 4) Finerty JC, Binhammer R, Schneider M: Protection of irradiated rats by parabiosis. *Texas reports on biology and medicine* 1952; 10: 496-500.
- 5) Lunsford WR, Mc CC, Lupien PJ, Pope FE, Sperling G: Parabiosis as a method for studying factors which affect aging in rats. *Gerontologia* 1963; 7: 1-8.
- 6) McCay CM, Pope F, Lunsford W, Sperling G, Sambhavaphol P: Parabiosis between old and young rats. *Gerontologia* 1957; 1: 7-17.
- 7) Nisbet NW: Parabiosis in immunobiology. *Transplantation reviews* 1973; 15: 123-161.
- 8) Pope F, Lunsford W, McCay CM: Experimental prolongation of the life span. *Journal of chronic diseases* 1956; 4: 153-158.
- 9) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA: Rejuvenation of aged pro-

- genitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760–764.
- 10) Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, et al.: Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007; 317: 807–810.
 - 11) Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Rao TN, Wagers AJ, et al.: Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell stem cell* 2012; 10: 96–103.
 - 12) Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al.: The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; 477: 90–94.
 - 13) Rando TA, Chang HY: Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 2012; 148: 46–57.
 - 14) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al.: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45–51.
 - 15) Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD: Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Molecular cell* 2007; 27: 183–196.
 - 16) Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al.: Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007; 317: 803–806.
 - 17) Watanabe S, Sato K, Hasegawa N, Kurihara T, Matsutani K, Sanada K, et al.: Serum C1q as a novel biomarker of sarcopenia in older adults. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2015; 29: 1003–1010.
 - 18) Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al.: Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 2014; 344: 649–652.
 - 19) Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, et al.: Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 2014; 344: 630–634.
 - 20) Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al.: GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell metabolism* 2015; 22: 164–174.
 - 21) Rodgers BD, Eldridge JA: Reduced Circulating GDF11 Is Unlikely Responsible for Age-dependent Changes in Mouse Heart, Muscle, and Brain. *Endocrinology* 2015; en20151628.
 - 22) Smith SC, Zhang X, Zhang X, Gross P, Starosta T, Mohsin S, et al.: GDF11 Does Not Rescue Aging-Related Pathological Hypertrophy. *Circulation research* 2015; 117: 926–932.
 - 23) Smith LK, He Y, Park JS, Bieri G, Snethlage CE, Lin K, et al.: beta2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nature medicine* 2015; 21: 932–937.
 - 24) Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R: Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs* 2014; 74: 1195–1207.
 - 25) Sinha I, Sinha-Hikim AP, Wagers AJ, Sinha-Hikim I: Testosterone is essential for skeletal muscle growth in aged mice in a heterochronic parabiosis model. *Cell and tissue research* 2014; 357: 815–821.
 - 26) Kuro-o M: *Klotho* in health and disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2012; 21: 362–368.
 - 27) Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, et al.: *Klotho* protein protects against endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 248: 324–329.
 - 28) Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al.: Plasma *klotho* and cardiovascular disease in adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 2011; 59: 1596–1601.
 - 29) Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al.: Plasma *klotho* and mortality risk in older community-dwelling adults. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2011; 66: 794–800.
 - 30) Giblin W, Skinner ME, Lombard DB: Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends in genetics*: TIG 2014; 30: 271–286.
 - 31) Revollo JR, Korner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al.: Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism* 2007; 6: 363–375.
 - 32) Kocelak P, Olszanecka-Glinianowicz M, Owczarek A, Bozentowicz-Wikarek M, Brzozowska A, Mossakowska M, et al.: Plasma visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase levels in hypertensive elderly - results from the PolSenior substudy. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 2015; 9: 1–8.

- 33) Garg D, Cohen SM: miRNAs and aging: a genetic perspective. *Ageing research reviews* 2014; 17: 3-8.
- 34) Greco S, Gorospe M, Martelli F: Noncoding RNA in age-related cardiovascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2015; 83: 142-155.
-