

老化細胞研究プロジェクトチーム

(1) 構成員

プロジェクトリーダー

杉本 昌隆

流動研究員

橋本 理尋

研究補助者

浅井あづさ

矢田 智子

(2) 平成26年度研究活動の概要

老化細胞研究プロジェクトチームでは、分子生物学・細胞生物学的見地から、生命の基本単位である細胞レベルでの老化現象について研究を行っている。

ヒトを含む哺乳動物の殆どの体細胞は、ストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な細胞増殖停止状態に陥る。細胞老化には、p53 や RB を始めとする複数の癌抑制タンパク質が関与しており、生体において細胞老化は極めて重要な癌抑制機構として機能することが明らかになっている。一方で、個体の老化現象に細胞老化がどのように関与するのかについては不明な点が多く残されている。しかしながら近年、細胞老化が加齢に伴って生じる生体機能の変化に関与する可能性が指摘され、改めて細胞老化と個体老化との関連が注目を浴びている。

本プロジェクトチームでは、①細胞老化のメカニズム、および②細胞老化の生体における役割（特に加齢に伴って生じる変化における役割）の2点について解析を行っている。

① 細胞老化のメカニズムに関する研究

細胞老化の際には不可逆的な細胞増殖の停止が起こることが古くから知られていた。しかしながら近年、細胞老化を起こした細胞は単に増殖を停止しているだけでなく、様々な生理活性物質を分泌し、周辺の細胞の機能に影響を与えることが明らかになった。このような老化細胞特異的な分泌表現型は SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれ、加齢に伴う生体機能の変化に寄与することが示唆されている。

前年度に本プロジェクトチームは、細胞の分裂寿命の制御に HuR と呼ばれる RNA 結合タンパク質が、細胞老化をコントロールする上で重要な役割を持つことを報告した(参考文献)。HuR の発現は、細胞老化時に低下するが、分裂寿命を迎える前の細胞において HuR の発現を阻害すると、ARF-p53 経路依存的な細胞増殖の停止が見られた。この時、増殖を停止した細胞では、SA- β Gal 活性の上昇や形態の変化、また細胞老化遺伝子マーカーの上昇など、様々な細胞老化表現型が認められた。従って HuR は細胞の分裂寿命を維持するのに必要な因子であると考えられた。

HuR の発現を sh-RNA で阻害した細胞では、上に記した細胞老化表現型とともに、SASP 類似の様々なサイトカインの発現上昇が見られた(図1)。SASP の発現は、細胞老化時に細胞周

期の停止を担う経路とは異なる制御を受けていることが知られている。そこで本年度は、HuR が SASP 様の表現型を調節する機構について解析を行った。

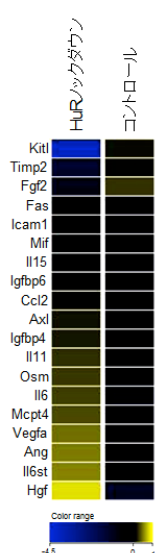


図1. HuR ノックダウン細胞におけるサイトカイン遺伝子発現の変化。コントロールおよびHuR ノックダウンマウス胚性繊維芽細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。アレイデータから変動が見られたSASP遺伝子を抽出し、ヒートマップを作成した。

HuR を阻害した細胞では、様々なサイトカインの発現上昇が見られるが、これらサイトカインの発現は、p53 ノックアウト細胞でも同様に見られることから、細胞増殖制御経路とは異なるメカニズムで調節されていることが考えられた。転写因子 NF- κ B は、様々な炎症性サイトカインの発現を制御し、SASP の調節においても中心的な役割を持つことが知られている。そこで HuR ノックダウン細胞における NF- κ B の活性をルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン IP で調べたところ、HuR をノックダウンすることにより NF- κ B は p53 非依存的に活性が上昇し、また IL-6 などのサイトカイン遺伝子上にリクルー

トされることが明らかになった。

次に HuR 阻害時の NF- κ B 活性化機構について解析を行った。細胞老化時には慢性的に DNA ダメージの蓄積が認められ、これがトリガーとなって NF- κ B を活性化させることが既に報告されている。そこで HuR ノックダウン細胞で DNA ダメージが蓄積しているかをコメットアッセイによって調べたところ、興味深いことに一本鎖 DNA 切断の蓄積が認められた (図2)。

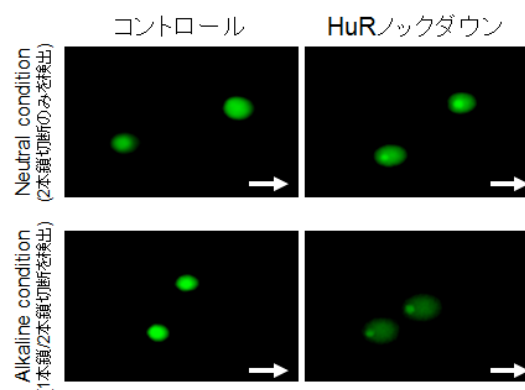


図2. HuR ノックダウン細胞では、一本鎖 DNA 切断が蓄積する。参考文献 Hashimoto *et al.*より改変。

以上の結果から、HuR を阻害することにより DNA 一本鎖切断が蓄積し、これが NF- κ B の活性化へと繋がることが示唆された。HuR ノックダウン細胞で一本鎖 DNA 切断が蓄積する原因について調べたところ、この細胞では一本鎖 DNA 切断を起こす刺激に対してより高い感受性を示すことが明らかになった (図3)。DNA の一本鎖障害は、細胞増殖の過程において DNA

が複製される際に必ず生じる。通常この障害は速やかに処理されるが、HuR をノックダウンした細胞ではこの修復機構に何らかの異常があると考えられる。事実、マイクロアレイの結果から、複数の DNA 修復に関わる遺伝子の発現が低下していることが示されている。

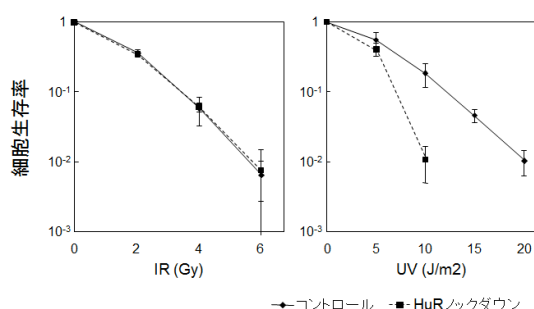


図3. HuR ノックダウン細胞では一本鎖 DNA ダメージに対する感受性が上昇している。参考文献 Hashimoto *et al.* より改変。

以上の結果から、HuR の発現が低下した細胞では、一本鎖切断が蓄積し、DNA ダメージシグナルが慢性的に活性を持ち、細胞老化が誘導されるのではないかと考えられた。ヒトにおいても、HuR の発現は加齢とともに低下する傾向にあることから、本年度我々が報告したこれらのメカニズムは、ヒトの加齢現象にも関与する可能性が考えられた。

②生体における細胞老化の役割

生体において細胞老化は癌抑制機構として機能していることは知られているが、個体の老化現象にどのよう

な寄与をなすかについては不明である。しかしながら、ヒトにおいても老齢個体の組織では老化細胞の蓄積が認められており、加齢に伴う組織機能の低下に細胞老化が関与する可能性が指摘されている。

我々は、老化細胞が加齢現象にどのような役割を持つのか明らかにすることを目的とし、前年度までに作製した生体から老化細胞を検出・排除可能なモデルマウスの解析を行っている。

肺組織は他の組織と比較して早期から老化細胞が蓄積する。肺の老化は、弾性繊維の減少に起因する弾性力の低下（コンプライアンスの上昇）を特徴とする。これらの特徴を示す肺は、「老人肺」と呼ばれ、COPD（慢性閉塞性肺疾患）のリスク要因となることが知られている。モデルとして我々が使用するマウスにおいても、生後1年以内に肺のコンプライアンスの上昇が見られた。このマウスから老化細胞を排除すると、弾性繊維の回復とともに弾性の回復が認められた。これらの結果から、少なくとも部分的には、肺の老化に細胞の老化が積極的に関与することが示唆された。

当該年度は、老化細胞を排除することにより肺組織の弾性が回復するメカニズムについて解析を行った。加齢に伴う肺組織の弾性の低下は、エラスチンを主成分とする弾性繊維量の低下に起因すると考えられている。COPD 患者の肺組織においても、エラスチン線維の顕著な低下が認められ、病態の発症に強く関与すると考えら

れている。マウスにおいてもヒトと同様に加齢に伴ってエラスチン量の低下とともに肺胞壁の厚さが顕著に減少した。しかしながら老化した細胞を排除した肺組織では、有意なエラスチン線維の回復が認められた。細胞老化に伴う SASP には、サイトカインのほかに様々なエラスチン分解活性を持つ細胞外プロテアーゼが分泌される。我々のモデルマウスにおいて、これらのエラスターゼの発現量を調べた結果、細胞老化の更新に伴い増加したエラスターゼは、老化細胞を排除することにより、若齢期と同程度まで減少することが示された。

以上の結果から、少なくとも肺組織の老化には細胞老化が極めて重要な役割を持つことが示唆された。また老化した細胞を排除することにより、肺

組織の弾性は可逆的に回復することから、呼吸器の機能を回復させる上で老化細胞は有効な創薬標的となり得ることが示された。

次年度は、これらの研究成果をまとめ国際誌への掲載を目指すとともに、肺気腫モデルを作製し、疾患と細胞老化の因果関係について明らかにする。

参考文献

Kawagishi H. *et al.*, HuR maintains replicative lifespan by suppressing ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 33. 1886-1900. 2013.

Hashimoto M. *et al.*, Loss of HuR leads to senescence-like cytokine induction in rodent fibroblasts by activating NF- κ B. *Biochim Biophys Acta.* 1840. 3079-3087. 2014

研究業績（老化細胞研究プロジェクトチーム）

I. 論文発表

1. 原著

Takagi M., Uno M., Nishii R., Sugimoto M., Hasegawa S., Piao J., Ihara N., Kanai S., Kakei S., Tamura Y., Suganami T., Kamei Y., Shimizu T., Yasuda A., Ogawa Y., and Mizutani S.

ATM regulates adipocyte differentiation and contributes to glucose homeostasis.

Cell Rep. 10. 957-967. 2015

Hashimoto M, Tsugawa T, Kawagishi H, Asai A, Sugimoto M.

Loss of HuR leads to senescence-like cytokine induction in rodent fibroblasts by activating NF- κ B.

Biochim Biophys Acta. 1840. 3079-3087. 2014

2. 総説

杉本昌隆

若返りは可能か？.

実験医学 Vol. 32 No. 14, 2248-2249, 2014

3. 著書、Chapters

該当無し

4. その他

該当無し

5. 新聞・報道,等

「DNA 修復のたんぱく質 糖尿病発症に関与」日経産業新聞, 2015 年 2 月 25 日

5. 特許申請、取得状況

中村英亮、杉本昌隆

ハイブリドーマ（特許第 5671669 号），2015 年 1 月 9 日登録

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

該当なし

2. 国際学会発表

Sugimoto, M.

Restoration of pulmonary function in aged animal by enminating senescent cells.

The 2015 Aging Summit, London (UK), February 11, 2015

3. 国内学会発表

杉本昌隆、橋本理尋、浅井あづさ

Ablation of senescent cells ameliorates age-associated pulmonary hypofunction

日本基礎老化学会第 37 回大会, 愛知, 2014 年 6 月 27 日

橋本理尋、浅井あづさ、杉本昌隆

老化細胞除去による呼吸機能の回復

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

4. その他、セミナー等

該当無し

III. 公的研究費

1. 厚生労働省

該当なし

2. 文部科学省

杉本昌隆, (代表) 80 万円 (総額 410 万円)

文部科学省科研費 基盤研究 (C)

RNA 制御を介した細胞分裂寿命の調節メカニズムと生体機能の解明

橋本理尋, (代表) 190 万円 (総額 310 万円)

文部科学省科研費 若手研究 (B)

老化細胞を標的とした 2 型糖尿病落ち量の可能性

3. 財団、その他
該当なし