

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06148

研究課題名(和文)ゲノムワイドスクリーニングによる新規老化形質制御分子の同定と機能解析

研究課題名(英文)Identification and functional analysis of regulators of senescence

研究代表者

城村 由和 (Johmura, Yoshikazu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40616322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイドな遺伝子発現抑制スクリーニングにより、老化細胞の生存・機能維持に関わる遺伝子群の単離に成功した。その中でも、グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素であるグルタミナーゼ遺伝子に着目して詳細な解析を行った。その結果、グルタミナーゼの機能抑制は、老化細胞選択的に細胞死を誘導できることを見出した。また、そのメカニズムとして、細胞内pHホメオスタシスの制御が深く関与することも明らかになった。さらに、老齢マウスにグルタミナーゼ阻害剤を投与した結果、加齢に伴う腎障害が改善された。これらの結果は、グルタミン代謝酵素を標的とした薬剤が老化の予防や加齢性疾病の治療に有効であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究により、加齢に伴う老化細胞の蓄積が老化・老年病発症の大きな要因の一つであることも分かりつつあり、老化細胞除去薬の開発が世界的に注目されている。本研究により、グルタミナーゼ阻害剤により老化細胞を選択的に除去することが可能となった。今後、より臨床に即した形でグルタミナーゼ阻害剤の研究を進めることで、動脈硬化症、腎障害、さらにはがんなどの加齢性疾病の治療・予防の新たな方法論の開発に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Senolytic removal of senescent cells (senolysis) has been proposed to be beneficial for improving various age-associated pathologies, but effective compounds as well as the molecular pathways for their senolytic activity have not yet emerged. In the present study, genome-wide shRNA screening identified GLS1 as an essential gene for survival of senescent cells. The intracellular pH in senescent cells was lowered by excess protein synthesis-mediated lysosomal membrane damage, and this lowered intracellular pH induced KGA-type GLS1 expression. Enhanced glutaminolysis then caused the production of ammonia which neutralized the lowered pH and improved survival of the senescent cells. GLS1 inhibitor treatment of aged mice eliminated senescent cells and ameliorated age-associated kidney dysfunction. Our results suggest that cells in a senescent state require glutaminolysis, and its inhibition offers a promising strategy for inducing senolysis in vivo.

研究分野：細胞分子生物学

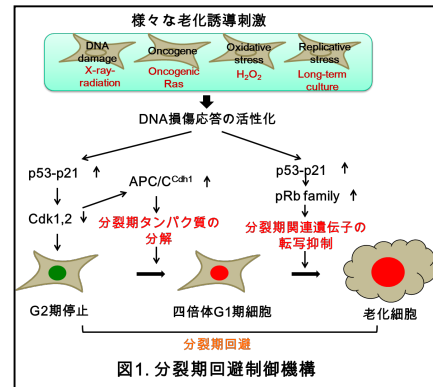
キーワード：老化 細胞周期 代謝 がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞は変異原ストレス等を受けると DNA 損傷応答シグナルを活性化させる。DNA 損傷応答シグナルは、多細胞生物体においては DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、あるいは早期細胞老化等を誘導して異常染色体 DNA 構造を持った細胞の蓄積を防いでいる。この中でも、細胞老化はもっとも重要な抗腫瘍化機構の一つであると考えられている。しかし最近になって、早老症モデルマウスから老化細胞を除去すると、老化の進行やそれに伴う加齢性疾患の発症を遅らせることができることが報告された (Nature 2011)。この結果は、細胞老化は発がん防御機構として働くだけでなく、個体老化やそれに伴う疾病発症の重要な要因の一つであることを示している。

老化細胞は、恒久的な増殖停止や SASP と呼ばれる生理活性因子の発現・分泌を特徴とする細胞形質を獲得する。しかし、細胞老化誘導や老化形質制御の機構は不明な点が多い。研究代表者は細胞老化誘導機構について解析を行ったところ、細胞老化誘導には、G2 期における p53 活性化を介した細胞分裂期の回避が重要であることを見出した (Y. Johmura et al. Molecular Cell 2014, Y., 図 1)。この知見から、人工的 G2 期チェックポイント延長により分裂回避、および細胞老化の誘導を促進できる系を確立し、この系を応用して新規細胞老化促進マウスを作製・解析した。その結果、新規細胞老化促進マウスは、非常に低レベルの放射線や紫外線照射においても細胞老化が誘導される事や、化学発がん抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、申請者はこれまでの固定概念を打ち破り、老化形質制御には必ずしも恒常的な DNA 損傷応答の活性化を必要としないことも見出しており、老化形質を制御する未知の分子・シグナル伝達が存在する事を示している。このように研究代表者は細胞・個体レベルで細胞老化誘導機構について解明できたものの、老化細胞の形質制御のメカニズムに関しては手つかずなままであった。本研究では、これまでの研究代表者の研究を進展させて、DNA 損傷応答非依存的に誘導した老化細胞の安定的な培養法を確立し、恒久的な増殖の停止・SASP などの老化細胞の形質に特化したゲノムワイドな発現プロファイリング・機能スクリーニングを行うことにより、新規老化制御分子を同定する。さらに、同定した分子の機能を細胞・個体レベルで解析し、老化形質制御の普遍的な原理や発がん・個体老化における役割を明らかにすることを旨とした。



### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでの解析により、老化形質の制御には恒常的な DNA 損傷応答は必須ではなく、未知の分子・シグナル伝達が関与することを明らかにしている。DNA 損傷応答は細胞老化誘導だけではなく、一時的な細胞周期の停止やアポトーシスを含めた多様な生命現象を制御するために遺伝子発現やシグナル伝達を大きく変動させる。それゆえに老化細胞の形質に特化したゲノムワイドな遺伝子発現プロファイリング・機能スクリーニングを行う上で、DNA 損傷非依存的に誘導した老化細胞が必要不可欠な解析ツールとなる。そこで、研究代表者の研究より得た知見を応用して DNA 損傷非依存的に誘導した老化細胞の安定的な培養法を確立する。次に、この老化細胞を用いて RNA-seq により老化細胞特異的な遺伝子発現変化を示す分子を同定する。また、レンチウイルスベクターをベースにしたゲノムワイド RNAi ライブラリーによる機能スクリーニングを行い、老化細胞の重要な形質として知られる恒久的な増殖の停止および生存維持に関わる遺伝子群の同定を行う。上記の解析により同定された分子の過剰発現・発現抑制細胞を樹立して、老化細胞の再増殖能獲得や生存維持のメカニズムを解明するとともに、マウスモデルを用いて、同定された分子の個体老化・老年病発症に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (A). DNA 損傷非依存的に誘導した老化細胞の安定的な培養法の確立

研究代表者のこれまでの研究成果から、老化細胞の誘導には細胞周期 G2 期における p53 活性化が必要十分であることが分かっている。そこで、ヒト由来の正常線維芽細胞を用いて、CDK1 阻害剤である R03306 (終濃度 9  $\mu\text{M}$ ) を添加し、37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>、16 時間培養し、G2 期に同調した。次に、R03306 (終濃度 9  $\mu\text{M}$ ) および p53 活性化剤である Nutlin-3a (終濃度 10  $\mu\text{M}$ ) を添加した培養液中で、37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>、8 時間培養した後、Nutlin-3a (終濃度 10  $\mu\text{M}$ ) を添加した培養液中で、37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>、48 時間培養した。3 日おきに BI2536 (終濃度 100 nM) を添加した培地に交換しながら、37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>、9 日間培養することで、老化していない増殖細胞を除去した。その後、3 日おきに通常の培地に交換しながら、37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>、9 日間培養することで、老化誘導を行った。また、この方法で単離した細胞が DNA 損傷非依存的に老化が誘導されているかを確認するために、細胞老化や DNA 損傷のマーカーの発現変化を解析した。

#### (B). RNA-seq によるゲノムワイドな遺伝子発現プロファイリング

老化細胞特異的な発現変化を示す分子を同定するために、正常細胞と上記の(A)で示したDNA損傷非依存的に誘導した老化細胞より抽出したRNAを用いて、未知の転写産物を含めたゲノムワイドな遺伝子発現プロファイリングができるRNA-seqにより解析した。

(C). ゲノムワイドshRNAスクリーニングによる老化細胞の恒久的な増殖の停止および生存維持に関わる遺伝子群の同定と機能解析

Celllecta社のボーコード型shRNAレンチウイルスライブラリを上記の(A)で示したDNA損傷非依存的に誘導した老化細胞に導入し、37°、5%CO<sub>2</sub>、14日間培養し、細胞よりゲノムDNAを回収し、次世代型シーケンサーによりバーコードの定量を行うことで、老化細胞の生存維持・再増殖に関わる遺伝子群を単離した(図2)。また、同定された遺伝子に関して、発現抑制細胞株・阻害剤を用いて、その詳細な制御メカニズムや生体内における役割を解析した。

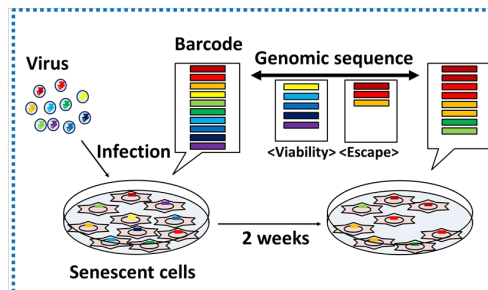


図2.ゲノムワイドshRNAスクリーニングの概略

#### 4. 研究成果

(A). DNA損傷非依存的に誘導した老化細胞の安定的な培養法の確立

この方法で単離した細胞がDNA損傷非依存的に老化誘導されているかを確認するために、細胞老化やDNA損傷のマーカーの発現変化を解析した結果、DNA損傷は認められず、老化細胞のマーカーであるp16の発現上昇やSA-beta-Gal染色陽性であることが確認できた。さらに、数カ月以内にわたり培養を続けたところ、全く細胞数に変化が認められなかったことから、老化細胞の安定的な培養法を確立することができたと判断した。

(B). RNA-seqによるゲノムワイドな遺伝子発現プロファイリング

これまでに報告がない多くの遺伝子が(A)で示したDNA損傷非依存的に誘導した老化細胞で発現変動することが明らかになった。特に、ミトコンドリア代謝に関わる遺伝子群に大きな変動が認められ、(C)にも関連するグルタミンをグルタミン酸に変換する酵素であるグルタミナーゼ遺伝子の発現が顕著に増加することを見出した。

(C). ゲノムワイドshRNAスクリーニングによる老化細胞の恒久的な増殖の停止および生存維持に関わる遺伝子群の同定と機能解析

スクリーニングの結果、老化細胞の恒久的な増殖の停止および生存維持に関わる遺伝子群の同定に成功した。興味深いことに、(B)の解析で老化細胞で発現上昇するグルタミナーゼ遺伝子を生存維持に関わる遺伝子として単離することができたため、この遺伝子に着目して詳細な解析を進めた。

老化細胞においてグルタミノリシスの各反応を担う代謝酵素のタンパク質発現量を解析したところ、老化細胞ではグルタミンからグルタミン酸への変換反応を担うグルタミナーゼのアイソフォームの一つであるKGAの発現量が顕著に上昇していることが明らかになった。また、老化細胞におけるグルタミナーゼの発現上昇メカニズムを解明する目的で、グルタミナーゼ遺伝子の3' UTRをルシフェラーゼ遺伝子の下流につないだリポーターアッセイを行った。その結果、mRNAの翻訳後制御に関わることが知られているKGA遺伝子のlong 3' UTR (KGA-L)を有するリポーター遺伝子の活性は、正常細胞において他のリポーターよりも活性が低下している一方、老化細胞ではむしろ増加することが分かった。この結果より、老化細胞グルタミナーゼ遺伝子の3' UTR領域を介したKGA mRNAの安定性が上昇していることが明らかになった。

次に、老化細胞の生存がグルタミノリシスに依存している可能性を調べるために、グルタミナーゼの阻害剤の効果を検討した。グルタミナーゼ阻害剤であるBPTES (10 μM)の3日間投与により、正常細胞では細胞数の増加が認められる一方、老化細胞では細胞数が90%以上減少したことから、老化細胞に選択的に細胞死を誘導できることが明らかになった。また、老化細胞の生存にほとんど影響を与えないBPTES (2.5 μM)の投与では、老化細胞のもっとも重要な形質の一つである、炎症性サイトカインや細胞外基質分解酵素を大量に分泌する表現型「SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)」の主要因子IL-6、およびIL-8のmRNA発現が阻害されることが分かった。さらに、SASP阻害に関する分子メカニズムについて解析を行ったところ、BPTES処理によりSASPの主要な制御因子であるmTOR活性化の指標となるS6Kタンパク質T389のリン酸化が阻害されることが分かった。この阻害効果は膜透過型 ケトグルタル酸の投与によりレスキューされることも明らかになった。阻害剤の検討に加えて、RNAi法を用いたグルタミナーゼの発現抑制によっても、同様の老化細胞に選択的な細胞死やSASPの抑制が確認された。これらの結果から、グルタミノリシスの活性化が老化細胞の生存・機能発現に必須になっていることが明らかになった。

一方、BPTES処理による老化細胞選択的な細胞死の誘導は、膜透過型 ケトグルタル酸の投与によりほとんどレスキューできなかったことから、グルタミノリシスによる他の代謝産物が重要である可能性が考えられた。KGA mRNAの安定化にはアシドーシスが深く関与しており、KGAを含めたグルタミナーゼはグルタミンからグルタミン酸に変換する際にアンモニア産生を行う

ことで、細胞内 pH のホメオスタシスを制御している可能性が考えられた。そこで、アンモニア産生量・細胞内 pH を解析した結果、正常細胞と比較して、老化細胞においてアンモニア産生量が約 4 倍に上昇すること、BPTES 処理により老化細胞で上昇していたアンモニア産生量が正常細胞と同程度まで抑制されることが分かった。また、BPTES 処理により老化細胞では細胞内 pH が通常の約 7.4 から約 6.0 に低下することも明らかになった。以前の報告で、細胞内 pH の低下は、BNIP3 タンパク質によるミトコンドリア膜透過遷移孔 (mPTP) の開口を介したアポトーシス非依存的な細胞死を引き起こすことが知られている。実際、老化細胞に BPTES (10  $\mu$ M) とともに mPTP 阻害剤である DUB (10  $\mu$ M) や CsA (5  $\mu$ M) を 3 日間処理すると、BPTES 処理で見られた 90%以上の細胞死が 20%程度まで減少することが分かった。さらに、培地の pH を弱塩基性である pH 8.5 に調整し培養を行った結果、BPTES 処理で見られた 90%以上の細胞死が 30%程度まで減少することが分かった。また、RNAi 法を用いた BNIP3 の発現抑制によっても、同様の老化細胞に選択的な細胞死の抑制が確認された。以上の結果により、グルタミンリシスは、アンモニアの産生を介して、老化細胞の pH のホメオスタシスを制御することで、その生存を維持していると考えられた。

最後に、BPTES 処理により生体における老化細胞を除去できるか検討した。96 週齢の C57BL/6/N 系統の雄マウスに BPTES (12.5 mg/kg body weight) を週に一度投与を、一カ月の間行った。その後、マウスを解剖し、主要臓器・組織をホモジナイズして、RNA を抽出し、老化細胞のマーカーである p16 遺伝子の発現量を qPCR により解析した。その結果、解析した臓器・組織において、BPTES 処理により p16 の発現の低下が認められた。この結果は、グルタミンリシス阻害剤により、生体内における老化細胞を除去できることを示唆している。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Nishimura K (equally contributed), **Johmura Y** (equally contributed), Deguchi K, Jiang Z, Uchida KSK, Suzuki N, Shimada M, Chiba Y, Hirota T, Yoshimura SH, Kono K, Nakanishi M, Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase, *Nature commun.*, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08957-w、査読あり
2. **Johmura Y**, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, Maruyama R, Inoue JI, Furukawa Y, Ohta T, Nakanishi M. Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128, 5603-19, doi: 10.1172/JCI121679、査読あり
3. **Johmura Y**, and Nakanishi M. Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance, *Cancer Science*, 2016, 107, 1550-1555, doi: 10.1111/cas.13060、査読あり
4. **Johmura Y**, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto Y, Okabe A, Aburatani H, Li S, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, and Nakanishi M. SCF<sup>Fbxo22</sup>-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence, *Nature commun.*, 2016, doi: 10.1038/ncomms12059、査読あり
5. **Johmura Y**, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi, K., and Nakanishi M. Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation, *Scientific reports*, 2016, doi: 10.1038/srep31194、査読あり
6. Shimada M, Goshima T, Matsuo H, **Johmura Y**, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, and Nakanishi M. Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis, *Nature commun.*, 2016、査読あり、doi: 10.1038/ncomms12059.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

### 〔図書〕(計 4 件)

1. **城村由和**、大森徳貴、中西真. 細胞老化維持機構と創薬、*実験医学*、2019年7月号
2. **城村由和**、中西真. DNA 損傷応答と細胞老化、個体老化。 *アンチ・エイジング医学*、14(5). 664-671.2018
3. **城村由和**、中西真. 予想外な p53 の細胞老化における機能、*実験医学*、2017年9月号
4. **Johmura Y** and Nakanishi M. Molecular insights into the regulation of apoptosis and cellular senescence, and the implications in cancer. *DNA replication, Recombination and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology* (2016).

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：個体から老化細胞を除去する方法、および老化細胞の調製方法

発明者：中西真/城村由和

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特願

番号：2018-210300

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

名称：がんの予後判定方法

発明者：中西真/城村由和/太田智彦

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特願

番号：2018-177864

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cancer-cell-biology/hp2018/01index.html>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。