

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14606

研究課題名(和文) プログラム細胞老化の遺伝学的解析とそのがん制御への応用

研究課題名(英文) Genetic dissection of programmed cell senescence and its application for cancer regulation

研究代表者

井垣 達史 (Igaki, Tatsushi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00467648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエ翅原基の発生過程で見いだしたプログラム細胞老化の誘発機構とその生理的役割の解明を目指した。このプログラム細胞老化をWgシグナル活性化あるいは転写因子zfh-2のノックダウンにより抑制したところ、成虫翅Hinge領域の感覚器官campaniform sensillaの形態形成異常が起こることがわかった。さらなる解析により、Rasの下流で機能する転写因子pointedが細胞老化誘導を介してachaete-scute complexを活性化し、これによりcampaniform sensillaが正常に形成されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Despite the extensive studies on the mechanism of cellular senescence, its physiological role has still been elusive. In this study, we discovered that developmentally programmed cellular senescence occurs in *Drosophila* imaginal epithelium. Intriguingly, we found that these senescent cells co-localized with proneural clusters, which develop into the sensory organ ‘campaniform sensilla’ in the dorsal radius of adult wing. To understand the role of programmed cell senescence in wing development, we searched for cellular signaling that can block cellular senescence. Interestingly, we found that forced activation of wingless (Wg) signaling strongly suppressed SA-β-gal activity as well as cell cycle arrest in the senescent cell cluster. This suppression of programmed cell senescence resulted in morphological defects in the campaniform sensilla. Our data indicate that developmentally induced cellular senescence facilitates proper development of sensory organs in *Drosophila* wing.

研究分野：細胞生物学、発生遺伝学

キーワード：細胞老化 器官発生

1. 研究開始当初の背景

細胞老化現象は、細胞が分裂限界に達した際だけでなく、種々の発がん性ストレスにตอบสนองして細胞周期を不可逆的に停止させるよう働くことから、がん抑制機構の一つと考えられてきた。しかし近年、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)が、がんの発生・進展に促進的に働く様々な分泌性タンパク質を高発現する Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) と呼ばれる表現型を呈することが明らかとなり、がん促進因子としても機能することが示されつつある。すなわち、細胞老化現象はがんの発生・進展を正にも負にも制御しうる、がん制御の鍵因子の一つと考えられている。申請者のグループはこれまで、ショウジョウバエをモデル生物として用い、無脊椎動物においても細胞老化現象が存在することを世界で初めて見いだすとともに、ヒトのがんで高頻度に認められる2種類の変異(がん遺伝子 Ras の活性化とミトコンドリア機能障害)を同時に起こした細胞が細胞老化とそれに伴う SASP を介して周辺組織のがん化を促進することを明らかにしてきた (Ohsawa *et al.*, *Nature*, 2012; Nakamura *et al.*, *Nat Commun*, 2014)。これらの事実は、細胞老化および SASP が進化的に保存された普遍的ながん制御因子として機能することを示している。

一方、細胞老化現象が SASP を介して様々な生体機能を発揮しうるようになってきたことで、細胞老化の生理的役割にも注目が集まりつつある。実際に、マウスの正常発生過程においてウォルフ管や外胚葉性頂堤において「プログラム細胞老化」が起こり、これが組織の正常な形態形成に必須であることが2つのグループにより示されている (Munoz-Espin *et al.*, *Cell*, 2013; Storer *et al.*, *Cell*, 2013)。しかし、プログラム細胞老化の普遍性や生理的意義、またその分子基盤についてはいまだほとんど不明である。研究代表者らは、ショウジョウバエ正常発生過程においてもプログラム細胞老化が存在する可能性を見だし、その解析を開始することとした。

2. 研究の目的

上記背景と研究代表者らの予備的知見を踏まえ、本研究では研究代表者らが独自に見いだしたショウジョウバエ正常発生過程におけるプログラム細胞老化の生理的役割とその分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに、これらの解析により見いだされた細胞老化制御分子群に着目し、細胞老化制御という観点から新たながん制御法の構築を目指す。これらの目的を達成するため、翅原基でのプログラム細胞老化を阻害した際の形態形成に及ぼす影響とその分子基盤、Ras シグナルおよび酸化ストレスの上昇に着目したプログラム細胞老化の誘発機構、およびこれらの解析により得られたデ

ータを基にした細胞老化の人為的制御法を、**in vivo RNAi** スクリーニングと遺伝学的解析を中心としたアプローチにより明らかにする。以上の解析により得られた知見を統合・解析し、細胞老化に着目した新たながん制御法の開発を目指すとともに、哺乳類培養細胞を用いた細胞老化誘導系に適用してその普遍性の検証へと展開する。

3. 研究の方法

研究代表者らの予備的解析において、ショウジョウバエ翅原基のHinge領域でプログラム細胞老化が起こること、また、このプログラム細胞老化がHippo経路の標的転写共役因子Ykiの活性化により阻害されることがわかった(図1、2)。

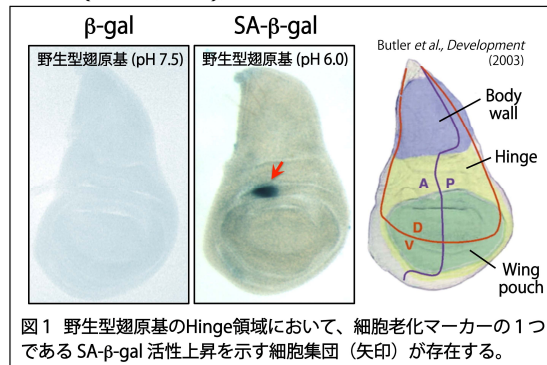


図1 野生型翅原基のHinge領域において、細胞老化マーカーの1つであるSA-β-gal活性上昇を示す細胞集団(矢印)が存在する。

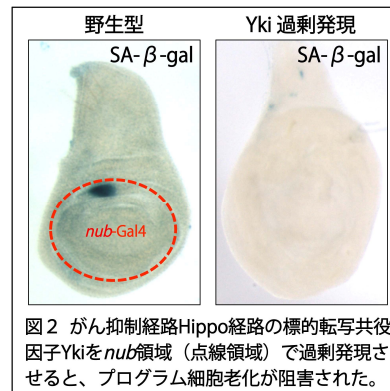


図2 がん抑制経路Hippo経路の標的転写共役因子Ykiをnub領域(点線領域)で過剰発現させると、プログラム細胞老化が阻害された。

そこで本研究では、プログラム細胞老化の役割とその分子基盤、および細胞老化に着目した新たながん制御法の開発を目的として、以下の3点を明らかにする。

- 【1】ショウジョウバエ翅原基におけるプログラム細胞老化の生理的役割
- 【2】ショウジョウバエ翅原基のプログラム細胞老化の誘導メカニズム
- 【3】プログラム細胞老化の人為的制御法とそのがん制御への応用手段の開発

これら3つの課題は互いに独立したものではなく、密接に関連して相互の進捗に依存している。したがって、これらの解析を同時進行させ、得られたデータを互いにフィードバックしながら研究を進めていく。具体的な研究計画を以下に記す。

- 【1】ショウジョウバエ翅原基におけるプロ

グラム細胞老化の生理的役割

プログラム細胞老化の生理的役割を明らかにするためには、この細胞老化を特異的に阻害した上でこれらの細胞集団の運命とその翅形成への影響を解析する必要がある。Yki による細胞老化の阻害現象は、プログラム老化細胞が出現した後の発生ステージで Yki を発現させても起こることから、Yki は細胞老化誘導時あるいは誘導後に何らかのメカニズムにより細胞老化現象を阻害していると考えられた。ここで Yki は様々な細胞増殖促進因子の発現を誘導する転写共役因子であり、その過剰発現は異常な細胞増殖を引き起こすことから、Yki を過剰発現させた状態でプログラム細胞老化の生理的役割を解析することはきわめて困難である。そこで本研究ではまず、数多くの Yki の転写標的遺伝子の中から細胞老化を阻害する役割を果たす遺伝子を *in vivo* RNAi スクリーニングにより探索する。具体的には、野生型翅原基に *nub-Gal4* ドライバーを用いて Yki を過剰発現させてプログラム細胞老化を阻害した条件下で、Yki 活性化によって発現誘導されることが報告/予想されている遺伝子(約 30 種類)の RNAi をそれぞれ発現させ、プログラム細胞老化阻害がキャンセルされる RNAi を SA-b-gal 活性を指標に探索する。同定された Yki 標的遺伝子が転写因子であった場合には、さらにその標的遺伝子を同定するための *in vivo* RNAi スクリーニングを行い、最終的なエフェクター遺伝子/遺伝子群を同定する。

一方、プログラム細胞老化の生理的役割を明らかにするためには、プログラム細胞老化が起きている細胞集団においてのみ特異的に RNAi を発現させることが理想である。そこで、プログラム老化細胞集団で特異的に遺伝子発現誘導できる Gal4 ドライバーを得るため、様々な Gal4 ドライバーライブラリー系統(世界の複数のストックセンターから入手可能;各ドライバー系統の遺伝子発現領域に関する予備データはデータベースにて検索可能)を用いて GFP を発現させてスクリーニングを行う。これらの解析により、幼虫期翅原基におけるプログラム細胞老化を特異的に阻害するシステムを構築する。

【2】ショウジョウバエ翅原基のプログラム細胞老化の誘導メカニズム

研究代表者らの予備的解析により、翅原基においてプログラム老化細胞集団が出現する領域で Ras シグナル活性が特異的に上昇していることを見いだしている(図3; Ras シグナルにより特異的に発現が抑制される転写因子 Capicua を指標に解析)。また、グルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子の発現誘導を指標にして酸化ストレス誘導を解析したところ、プログラム老化細胞集団の出現領域において酸化ストレスが上昇していることもわかった。

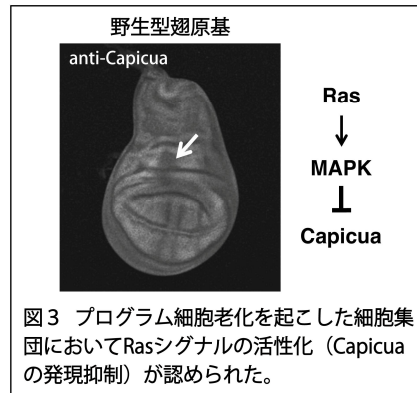


図3 プログラム細胞老化を起こした細胞集団においてRasシグナルの活性化(Capicuaの発現抑制)が認められた。

これら Ras シグナルおよび酸化ストレスは、いずれも哺乳類において細胞老化を誘導する鍵因子である。そこで、これらの予備的データを手がかりに、翅原基においてプログラム細胞老化が誘導される分子メカニズムを遺伝学的に解析する。

【3】プログラム細胞老化の人為的制御法とそのがん制御への応用手段の開発

上記【1】【2】の解析によって見いだされてくる細胞老化制御因子に着目して、申請者らがこれまでに確立してきたショウジョウバエがんモデル(Igaki *et al.*, *Curr Biol*, 2006; Xu, Pagliarini, Igaki, 国際特許, 2005、米国特許, 2006)を用い、がんの発生・進展過程における細胞老化の役割とその分子基盤を遺伝学的に解析する。

4. 研究成果

本研究ではまず、ショウジョウバエ翅原基 Hinge 領域で起こるプログラム細胞老化の誘発機構を遺伝学的に解析した。その結果、3 齢幼虫後期の Hinge 領域において酸化ストレスおよび Ras シグナルの活性化が起こり、これにより SA-b-gal 活性上昇、細胞周期停止、DNA 損傷応答、および細胞肥大化を伴う細胞老化が引き起こされることがわかった。

次に、ショウジョウバエ翅原基 Hinge 領域で起こるプログラム細胞老化の生理的役割の解明を目指した。まず、このプログラム細胞老化が転写共役因子 Yki の活性化により完全に抑制されたことから、細胞老化を抑制しうる Yki の標的分子を探索した。その結果、Yki の下流で細胞老化を抑制する責任標的遺伝子として Wg (Wnt ホモログ分子) およびさらにその下流因子 dTCF (TCF ホモログ分子) を同定した。一方、Yki-Wg-dTCF 経路以外でプログラム細胞老化を阻害するシグナル経路を RNAi スクリーニングにより探索した結果、Hinge 領域で高発現する転写因子 *zfh-2* をノックダウンするとプログラム細胞老化が抑制されることを見いだした。そこで、これら Wg シグナル活性化あるいは *zfh-2* ノックダウンを発生中の翅原基で行いプログラム細胞老化を抑制したところ、いずれの場合も成虫翅 Hinge 領域の形態形成に異常が生じることを見いだした。この Hinge 領域の形態

形成異常を詳細に解析した結果、感覚器官 campaniform sensilla の形成異常が起こっていることがわかった。さらなる遺伝学的解析により、Wg シグナル活性化あるいは zfh-2 ノックダウンはいずれも Ras シグナルの下流で機能する転写因子 pointed を抑制することでプログラム細胞老化を抑制することがわかった。また、pointed を翅原基 Hinge 領域でノックダウンすることによっても成虫翅 Hinge 領域で campaniform sensilla の形成異常が起こることがわかった。さらに、pointed の活性化により誘導される細胞老化現象は、achaete-scute complex の活性化を介して campaniform sensilla の正常な形成を実現することがわかった。以上の解析から、ショウジョウバエ翅原基 Hinge 領域で起こるプログラム細胞老化は感覚器官 campaniform sensilla の形態形成に必須であることが示唆された(図4)。

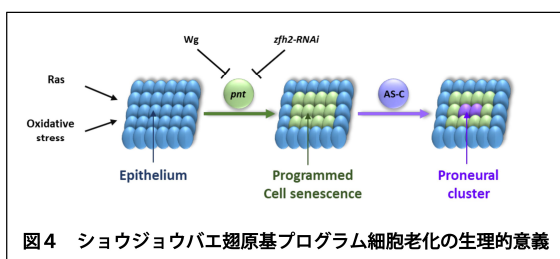


図4 ショウジョウバエ翅原基プログラム細胞老化の生理的意義

現在、本研究で新たに見いだされた細胞老化制御因子群に着目しつつ、これらを介したがん制御メカニズムについても解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ito T and Igaki T:
Dissecting cellular senescence and SASP in *Drosophila*, ***Inflammation and Regeneration***, 査読有、2016年、
doi: 10.1186/s41232-016-0031-4.
2. Nakamura M and Igaki T:
Induction and Detection of
Oncogene-Induced Cellular Senescence in
Drosophila, ***Methods in Molecular
Biology***, 査読有、2017年、 pp211-218
3. Ohsawa S and Igaki T:
Non-autonomous Tumor Progression by
Oncogenic Inflammation,
Chronic Inflammation, 査読有、2016年、
pp211-222
4. 井藤喬夫、井垣達史：ハエからみた細胞老化、アンチエイジング医学、査読無、2017年、13巻、pp43-49

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Ito T, Enomoto M, Igaki T: Genetic identification of Pointed/ETS transcriptional factor as a regulator of senescence-mediated tumor progression in *Drosophila*, 第 41 回内藤コンファレンス、2016年7月7日、札幌(北海道)
2. Ito T, Enomoto M, Igaki T: Pointed/ETS acts as a novel tumor suppressor that regulates Ras-mediated cellular senescence, The Allied Genetics Conference, 2016年7月13日~17日、オーランド(アメリカ)
3. Ito T, Enomoto M, Igaki T: Genetic identification of Pointed/ETS transcriptional factor as a regulator of senescence-mediated tumor progression in *Drosophila*, 第 12 回日本ショウジョウバエ研究会、2016年9月9日~11日、立教大学(東京)
4. Zang Y, Yoshimoto M, Igaki T: Genetic Analysis of Programmed Cell Senescence in *Drosophila*, 第 12 回日本ショウジョウバエ研究会、2016年9月9日~11日、立教大学(東京)
5. Ito T, Enomoto M, Igaki T: Yorkie drives tumorigenesis by antagonizing Pointed/ETS-mediated cellular senescence in *Drosophila*, 第 6 回細胞競合コロキウム、2017年3月16日~17日、北海道大学(札幌)
6. Ito T, Enomoto M, Igaki T: Yorkie drives tumorigenesis by antagonizing Pointed/ETS-mediated cellular senescence in *Drosophila*, 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017年5月8日~11日、大阪大学(吹田)
7. 井藤喬夫、榎本将人、井垣達史：細胞老化シグナルを介した新たながん制御の遺伝的基盤、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017年6月13日~15日、仙台
8. 井藤喬夫、榎本将人、井垣達史：細胞老化シグナルを介した新規がん制御メカニズムの遺伝学的解明、第 5 回がん代謝研究会、2017年7月13日~14日、北海道大学(札幌)
9. 井藤喬夫、榎本将人、井垣達史：Hippo 経路による細胞老化シグナル制御を介した新たながん増殖・進展メカニズムの遺伝学的解明、第 76 回日本癌学会学術総会、

2017年9月28日～30日、パシフィコ横浜

10. 井藤喬夫、榎本将人、井垣達吏：細胞老化シグナルを介した新規がん制御メカニズム、新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」、2018年2月2日～3日、KKR ホテル熱海
11. Ito T, Enomoto M, Igaki T: The Yorkie/YAP and Ras-driven tumorigenesis via cellular senescence inhibition、16th International Student seminar、2018年2月28日～3月1日、京都大学
12. 山下弘輝、井藤喬夫、井垣達吏：ショウジョウバエ老齢個体における Pointed 発現の解析、16th International Student seminar、2018年2月28日～3月1日、京都大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井垣達吏 (IGAKI TATSUSHI)

京都大学大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00467648