

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15065

研究課題名(和文) 生体内に蓄積した老化細胞除去とその加齢性疾患発症予防への応用

研究課題名(英文) Approach toward age-related diseases with the use of a new senolytic drugs

研究代表者

脇田 将裕 (Wakita, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：70794668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、セノリティックドラッグの候補薬剤であるARV825による細胞死誘導のメカニズムについて解析したところ、ARV825は老化細胞で主に働くDNA二本鎖切断の修復機構である非同末端結合の抑制と同時にオートファジー関連遺伝子の発現を上昇させることでアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。さらに、加齢性疾患であるがんにおけるARV825の効果について、肥満マウスに肝がんを形成促進させる実験モデルや皮下移植したがん細胞に抗がん剤処理後、がんが再増殖する実験モデルにてそれぞれ検証し、老化細胞を除去できるとともに、肝がんの進展やがんの再増殖を抑制できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発がんストレスを受けた細胞はがん抑制機構として働く細胞老化を起こすが、近年、この細胞がさまざまな炎症性物質を分泌することにより、がんや神経変性疾患などの加齢性疾患の症状を進行させる慢性炎症に關与することが明らかになりつつある。そこで、老化細胞除去作用を持つセノリティックドラッグの実用化が期待されている。本研究課題では、ARV825がセノリティックドラッグとして作用することで、がん治療へアプローチできる可能性を示した。さらに、老化細胞を細胞死へと誘導する分子メカニズムを明らかにしたことにより、今後さらに安全かつ効果的なセノリティックドラッグの開発へ発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although cellular senescence acts primarily as a tumor suppression mechanism, the accumulation of senescent cells in vivo eventually exerts deleterious side effects due to inflammatory and/or tumor-promoting factor secretion. Thus, the development of new drugs that specifically eliminate senescent cells, termed senolysis, is anticipated. In this study, I found that ARV825, which was identified as a promising senolytic drugs in my lab, provokes senolysis due to two independent but integrated pathways: (i) attenuation of non-homologous end joining repair, and (ii) up-regulation of autophagic gene expression. Notably, the elimination of chemotherapy-induced senescent cells by a ARV825 substantially increased the efficacy of chemotherapy against xenograft tumor in immunocompromised mice. These results reveal the vulnerability of senescent cells and open up the possibilities for its control.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞老化 セノリティックドラッグ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国では高齢化に伴い発がんや神経変性疾患などの加齢性疾患が増加しており、大きな社会問題となっている。そのため効果的な予防や治療法の確立は急務とされている。加齢性疾患の進行に慢性炎症の強い関与が示唆されており、近年細胞老化が炎症環境構築の一因となり、がんの進展を促進するなど加齢性疾患へ関与することが明らかになってきた (Yoshimoto et al., *Nature* 2013)。細胞老化とは、正常な細胞が修復不可能な DNA 損傷を生じた際に起こる細胞周期の不可逆的な停止と定義されており、がん抑制機構として機能する。しかし、この細胞老化を起こした細胞 (以下老化細胞と呼ぶ) は、細胞死を起こしづらく、加齢とともに生体内に蓄積する (Yamakoshi et al., *J Cell Biol.* 2009)。さらに老化細胞は炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性物質を産生する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象を介して、炎症を惹起する。実際に遺伝子改変マウスを用いて p16 を高発現する老化細胞を選択的に死滅させたところ、加齢に伴う発がん率の低下や臓器機能低下の緩和により健康寿命の延伸が明らかとなっている (Baker D, et al., *Nature*, 2011, Baker D, et al., *Nature*, 2016)。そこで現在さまざまなグループが老化細胞を選択的に死滅させる薬剤 (セノリティックドラッグ) の開発を行っているが、未だ実用的な薬剤の報告はない (Kim EC, and Kim JR, *BMB Rep.*, 2019)。申請者の研究室では、武田薬品工業 (株) のオープンイノベーションプラットフォーム (RINGO-T) を利用し、大規模な低分子化合物ライブラリー (47,000 個) を用いたハイスループットスクリーニングを細胞増殖および細胞死 (アポトーシス) を指標に実施し、薬剤の絞り込みを行った。その結果、15 個の候補薬剤を同定し、そのうち上位 4 つの薬剤が BET (Bromodomain and extra-terminal domain) 阻害剤であることがわかった。そこで、いくつかの BET 阻害剤とともに既報のセノリティックドラッグ候補薬剤と活性を比較したところ、最近開発された BET 阻害剤である ARV825 (従来 BET 阻害剤に E3 コピキチンリガーゼを付加することで BET ファミリー蛋白質を選択的かつ効率良く分解する) が最も強い活性を有することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究課題は、RINGO-T を利用したハイスループットスクリーニングを元に絞り込んだ ARV825 の作用機序を明らかにすることで、老化細胞の細胞死抵抗性の分子基盤を解明する。また、ARV825 を用いて加齢性疾患に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) ARV825 による老化細胞の細胞死誘導のメカニズム解析

まずは ARV825 が老化細胞を効率良く死滅させることを、さまざまな老化誘導条件 (継代による分裂寿命、活性型 Ras の過剰発現、あるいは DNA 障害誘導薬処理) や細胞種 (ヒト正常線維芽細胞 TIG-3、ヒト正常上皮細胞株 RPE、マウス正常線維芽細胞 MEF、マウス肝星細胞) で確認し、セノリティックドラッグとしての汎用性を確認する。また、非老化状態である正常細胞に対する影響を検証する。次にセノリティックドラッグとして作用する際の ARV825 の標的分子を明らかにし、標的分子の機能を元にアポトーシスに至る経路を明らかにする。

(2) ARV825 による加齢性疾患への影響の解析

ARV825 が生体内で老化細胞を除去できるか検討するため、2 つのモデルで検証する。発がんストレスを与え、高脂肪食で肥満にさせたマウスは、肝臓内で肝星細胞が細胞老化を引き起こし、SASP を通じて肝がんの形成を促進させる事が知られている。もう 1 つのモデルは、がん細胞を移植したマウスにドキシソルピシンを投与すると、がんの退縮が見られるが、一部の生き残ったがん細胞に細胞老化様の性質が生じ、SASP 因子を通じてがんが再増殖する。そこでそれぞれのモデルにて ARV825 を投与することで、老化細胞が減少するか、また、その際のがん形成への影響について解析する。

4. 研究成果

(1) ARV825 がセノリティックドラッグとして汎用性があるのかを確認するため、さまざまな老化誘導条件 (継代による分裂寿命、活性型 Ras の過剰発現、あるいは DNA 障害誘導薬処理) や細胞種 (ヒト正常線維芽細胞 TIG-3、ヒト正常上皮細胞株 RPE、マウス正常線維芽細胞 MEF、マウス肝星細胞) にて検討したところ、各条件において ARV825 が老化細胞を効率良く死滅させる事が明らかとなった。

次に、ARV825 による老化細胞の細胞死誘導のメカニズムを明らかにするため、まずは標的分子について検討した。TIG-3 において、ARV825 は BRD3 と BRD4 を分解することがわかった。また、siRNA でそれぞれの BRD タンパク質をノックダウンしたところ、BRD4 が効率良く老化細胞を死滅させたことから、BRD4 が標的分子である事が示唆された。BRD4 はがん遺伝子をはじめとするさまざまな遺伝子の発現制御を担う事が知られているため、RNA-seq 解析を行い、老化細胞に ARV825 を処理した際に発現が低下する遺伝子を調べた。その結果、驚いたことにがん遺伝子やアポトーシス関連遺伝子に影響がなかった一方、DNA 二本鎖切断の修復機構である非同末端結合 (NHEJ) に必要な XRCC4 の遺伝子発現が低下する事がわかった。このことから、老化細胞に ARV825 を処理すると DNA 損傷が修復されないため、細胞死が誘導された可能性がある。そこで、H2AX の foci 形成および中性コメットアッセイを行なった。その結果、ARV825 を老化細胞に処理した際に、foci の増加およびコメットテールの伸長が確認された (図 1a)。ま

た同様の結果が、XRCC4 を siRNA でノックダウンした際も確認された。そこで、NHEJ 阻害剤で老化細胞を死滅できるか確認したところ、コメットテールの伸長は見られたものの、細胞死を誘導できなかった。そこで別のメカニズムの関与を考え、上記実験や RNA-seq 解析のデータを見直したところ、オートファジーの関与が疑われた。実は、BRD4 がいくつかのオートファジー関連遺伝子の発現を負に制御する事が知られており、本研究課題においても ARV825 を処理することでいくつかのオートファジー関連遺伝子の発現が上昇していた。そこで、オートファジーの関与を LC3B 染色で評価をしたところ、ARV825 の処理で LC3B の蓄積を確認する事ができた (図 1 b)。また、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシン A1 で処理をすると、ARV825 による細胞死を抑制できた (図 1 c)。つまり、ARV825 は老化細胞において、NHEJ の阻害と同時に、オートファジーを活性化させることで、アポトーシスによる細胞死を引き起こすことがわかった (図 1 d)。

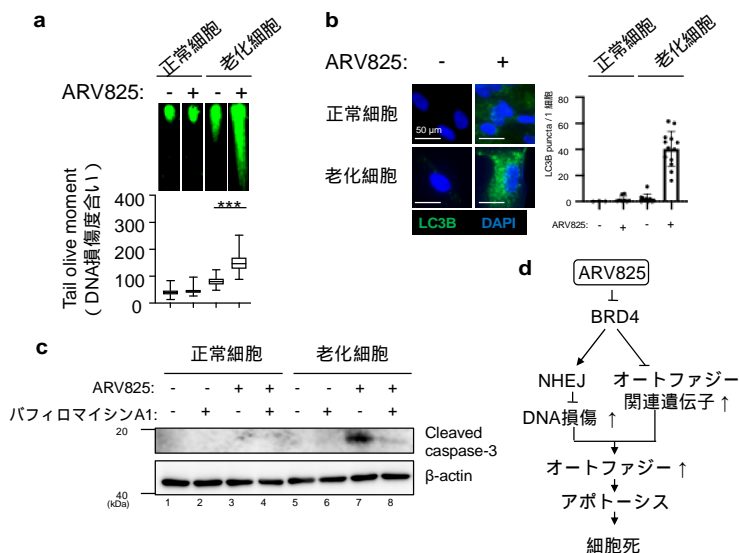


図1：ARV825による老化細胞の細胞死誘導のメカニズム

(2) 肥満したマウスに ARV825 を投与したところ、肝臓内で細胞老化を起こす肝星細胞の数が有意に減少し、肝がんの形成促進が著しく抑制された (図 2 a,b)。さらに、がん細胞を移植したマウスにドキシソルピシンを処理後、ARV825 を投与したところ、ドキシソルピシン単剤投与で生じるがん組織内の老化細胞の数が減少し、がん形成の抑制効果がドキシソルピシン単剤投与よりも顕著に亢進することがわかった (図 2 c,d)。

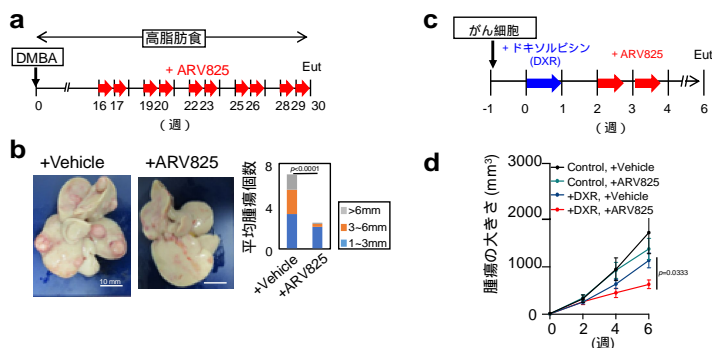


図2：ARV825によるがんへの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakita Masahiro, Takahashi Akiko, Sano Osamu, Loo Tze Mun, Imai Yoshinori, Narukawa Megumi, Iwata Hidehisa, Matsudaira Tatsuyuki, Kawamoto Shimpei, Ohtani Naoko, Yoshimori Tamotsu, Hara Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15719-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Akiko, Loo Tze Mun, Okada Ryo, Kamachi Fumitaka, Watanabe Yoshihiro, Wakita Masahiro, Watanabe Sugiko, Kawamoto Shimpei, Miyata Kenichi, Barber Glen N., Ohtani Naoko, Hara Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03555-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脇田将裕
2. 発表標題 High-throughput screening of senolysis drug uncovers cellular vulnerability of senescent cells
3. 学会等名 2019年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 BET阻害剤及びその作用機序を利用した老化細胞除去	発明者 原英二、脇田将裕、高橋暁子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2019-232148	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----