

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07446

研究課題名(和文)細胞老化を介した皮膚細菌による皮膚腫瘍悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Impact of skin bacteria and cellular senescence on cutaneous tumor malignant conversion

研究代表者

河本 新平 (Kawamoto, Shimpei)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40612081

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)：これまで検出が困難であった老化細胞の新規検出方法を確立することで、皮膚腫瘍部位において皮膚線維芽細胞に細胞老化が誘導されていることを見出した。さらに、皮膚細菌が分泌する代謝産物を介して皮膚線維芽細胞に細胞老化が誘導され、表皮細胞の異常増殖につながることで、皮膚腫瘍の悪性化が促進されていることを明らかにした。以上により、皮膚細菌による細胞老化誘導を介した皮膚がん促進機構の一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化や様々な疾患発症の原因となることが知られるものの、検出が困難であった老化細胞の新規検出法の確立により、老化細胞を対象とした研究のさらなる発展に貢献できる。さらに、生体内の細胞老化誘導に関わる因子として皮膚細菌の重要性が明らかとなった。細胞の誘導因子また、皮膚腫瘍の悪性化に関与することが明らかとなった皮膚細菌や老化細胞を標的とすることで、皮膚腫瘍の新規治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：By establishing a new detection method for senescent cells, we found that cellular senescence is induced in dermal fibroblasts at the site of skin tumors. Furthermore, we found that cellular senescence is induced in dermal fibroblasts via metabolites secreted by skin bacteria. The induction of cellular senescence in dermal fibroblast leads to abnormal proliferation of epidermal cells and accelerates the malignant transformation of skin tumors. These findings provide a partial picture of the mechanism of skin cancer promotion via the induction of cellular senescence by skin bacteria.

研究分野：免疫学、細菌学、細胞生物学

キーワード：皮膚細菌 細胞老化 線維芽細胞 皮膚腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体を持つがん抑制機構の一つとして「細胞老化」が知られている。細胞老化は、がん化につながる修復不可能な DNA 損傷を受けた細胞に誘導される不可逆的な細胞増殖の停止を特徴とした現象である。近年、細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は、ただ単に細胞増殖を停止させているだけでなく、炎症性サイトカインなどの炎症因子を分泌することで、慢性的な炎症反応を惹起し周辺細胞のがん化を促進する作用を持つことが知られる。従って、老化細胞の蓄積ががん化につながる危険性があるものの、どのような因子が老化細胞の誘導や蓄積に影響を及ぼしているのかは明らかとなっていない。

一方で、我々の皮膚、口腔や腸管には多種多様な細菌で構成される常在細菌叢が存在する。近年、常在細菌叢が宿主に様々な影響を与え、宿主の健康維持や疾病発症に関与していることが報告されている。以前、我々の研究室では、常在細菌叢の中でも腸内細菌叢が老化細胞の誘導を介して肝がん発症に関与していることを見出した。すなわち、肥満に伴い増加した腸内細菌が代謝産物を介して肝臓における細胞老化を誘導し炎症反応を惹起することで肝がんを促進することを明らかにした (Yoshimoto et al., *Nature* 2013)。興味深いことに、我々は同様の肥満モデルマウスにおいて、肝がんのみならず皮膚腫瘍の発症も亢進することを見出した。形成された皮膚腫瘍においても、老化細胞の蓄積が観察されたため老化細胞の病態への関与が考えられた。また、肥満マウスに抗生物質を塗布すると皮膚腫瘍の形成が抑制されたことから、肥満に伴う皮膚腫瘍の発症において皮膚細菌叢の関与が推察された。興味深いことに、皮膚腫瘍部において *Staphylococcus* 属の菌の新たな亜種 (*Staphylococcus-x*) が優勢に増加していた。以上の結果から、肥満に伴い増加した皮膚細菌 (*Staphylococcus-x*) が細胞老化を誘導し皮膚腫瘍の悪性化を促進しているという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究は、我々が単離した肥満マウスの皮膚腫瘍部から単離した皮膚細菌 (*Staphylococcus-x*) による細胞老化誘導機構を明らかにすると同時に、細胞老化誘導される細胞種の特定及び機能変化を検討することで皮膚腫瘍の病態における細胞老化の役割を明らかにし、*Staphylococcus-x*による細胞老化を介した皮膚腫瘍の悪性化機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 皮膚腫瘍モデルマウスの作成

8週齢マウスの背部皮膚に DMBA (7, 12-dimethylbenz(a)anthracene) を塗布した後、1週間に2回の頻度で TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を塗布し続けた。週に1回、パピロームの数及び大きさの計測を行った。

(2) 皮膚細菌の培養と菌体上清の準備

単離した皮膚細菌は Tryptic soy broth を用いて好気性環境下で 37°C 6-8 時間培養した。菌体上清は、菌体培養液から遠心分離により菌体を沈殿させ、上清部分を 0.22µm のフィルターを用いて濾過滅菌したものをを用いた。

(3) 細胞老化マーカー p16^{INK4a} の免疫組織化学

ブアン固定液を用いて2時間室温で固定した皮膚組織をパラフィン包埋し、5 µm の薄切切片を用いて組織染色を行った。一次抗体として、anti-Cdkn2a/p16INK4a 抗体 (Abcam 社、Cat# ab211542)、二次交代として Biotin-conjugated anti-Rabbit IgG (Vector 社、Cat# BA-1000) を用い、ABC キットを用いたシグナル増強の後、DAB 発色を行った。

(4) 線維芽細胞及び表皮細胞を用いた 3D 培養

皮膚より単離した線維芽細胞をコラーゲンゲル培地内に混合し、線維芽細胞が包埋されたコラーゲンゲルを作成した。その後、ゲル表面上に皮膚より単離した表皮細胞を接着させ、コラーゲンゲルを培養液内から引き上げて表皮細胞が接着したゲル表面を乾燥させることで表皮細胞の増殖を誘導した。

4. 研究成果

(1) 皮膚腫瘍部で増加する *Staphylococcus-x* が皮膚腫瘍の病態に与える影響の検討

皮膚腫瘍部で増加する *Staphylococcus-x* が皮膚腫瘍の病態にどのような影響を与えるのかを検討するため、皮膚腫瘍モデルマウスに *Staphylococcus-x* の菌体もしくはコントロールとして菌体培養に用いた Tryptic soy broth を塗布した。同時に、皮膚細菌が皮膚腫瘍の病態に与える影響を検討するため、抗生剤の塗布も行った。その結果、コントロール群では8匹中2匹において、皮膚腫瘍の悪性化が確認されたのに対し、*Staphylococcus-x* を塗布した群においては9匹中4匹において皮膚腫瘍の悪性化が確認された (図1)。一方で、抗生剤を塗布した群においては皮膚腫瘍の悪性化が抑制された (1匹/8匹) (図1)。従って、皮膚腫瘍の悪性化が皮膚細菌

依存的に引き起こされ、皮膚細菌の中でも *Staphylococcus-x* は皮膚腫瘍の悪性を促進する機能を有することが明らかとなった。次に、*Staphylococcus-x* の代謝産物が悪性化に関与している可能性を考え、皮膚腫瘍モデルマウスに *Staphylococcus-x* の菌体上清を塗布したところ、*Staphylococcus-x* の菌体を塗布した時と同様に高頻度の皮膚腫瘍の悪性化が観察された（4匹/9匹）（図1）。以上の結果から、*Staphylococcus-x* の代謝産物に皮膚腫瘍の悪性を促進する機能を有することが明らかとなった。

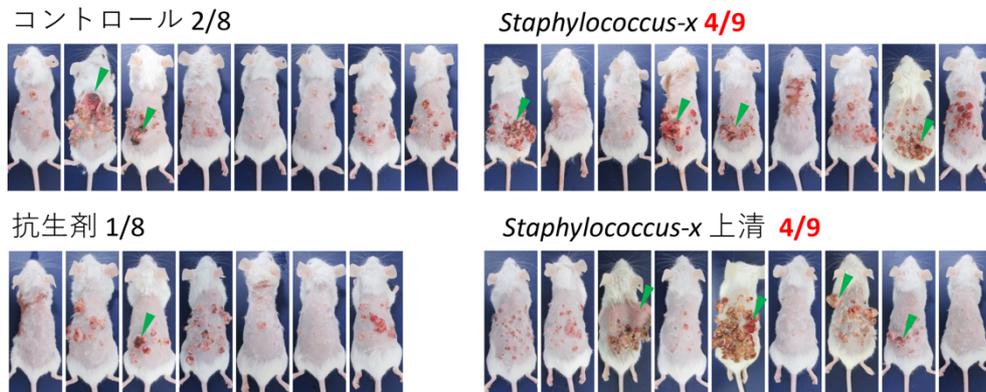


図1 *Staphylococcus-x*による皮膚腫瘍悪性化

(2) 老化細胞マーカーp16^{INK4a}の新規組織染色法の確立と皮膚腫瘍部において細胞老化を誘導する細胞の特定

皮膚腫瘍モデルマウスの皮膚腫瘍部位においては細胞老化が誘導されていることが知られ、皮膚細菌による細胞老化誘導の促進が、皮膚腫瘍悪性化の原因となっていることが考えられた。しかしながら、老化細胞のマーカーとして知られる p16^{INK4a} は組織染色が難しく、組織内の老化細胞を高感度に検出することが困難であった。そこで、我々は様々な固定条件で作成した組織切片を準備し、市販されている様々な p16^{INK4a} 抗体を用いて染色条件の検討を行うことで、p16^{INK4a} の新規組織染色法の確立を試みた。その結果、ブアン固定及び p16^{INK4a} 抗体 (clone: EPR20418) の組み合わせにより、高感度に p16^{INK4a} を検出することができることを見出した。そこで、我々が樹立した新規染色法を用いて、*Staphylococcus-x* の塗布により悪性化した皮膚腫瘍の詳細な組織学的解析を行ったところ、皮膚腫瘍部において p16^{INK4a} を発現していることがすでに知られている表皮細胞だけでなく、線維芽細胞も p16^{INK4a} を発現していることが明らかとなった（図2）。従って、*Staphylococcus-x* の塗布により表皮細胞だけでなく線維芽細胞に細胞老化が誘導され、皮膚腫瘍の悪性化につながっている可能性が考えられた。

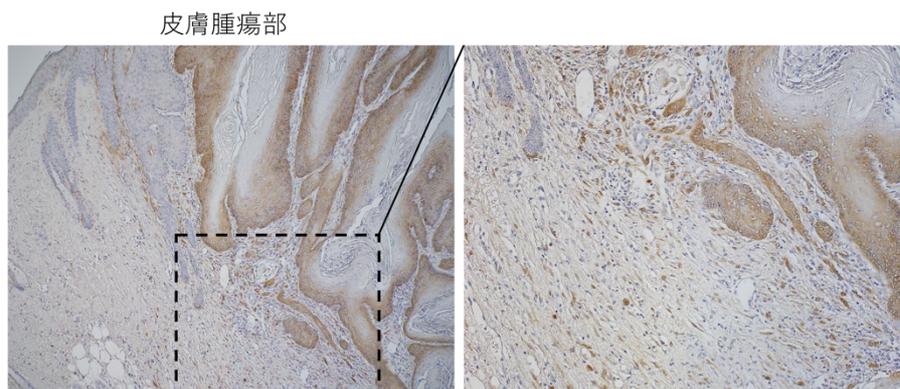


図2 皮膚腫瘍部におけるp16^{INK4a}染色画像

皮膚腫瘍モデルマウスの皮膚腫瘍を用いたp16^{INK4a}のDAB染色画像。p16^{INK4a}は茶色で染色されており、がん化した表皮細胞だけでなく、線維芽細胞においてもp16^{INK4a}の発現が観察された。

(3) 老化線維芽細胞による表皮細胞の異常増殖の誘導

次に、細胞老化を起こした線維芽細胞が皮膚腫瘍の病態にどのように関与しているのか3D培養を用いて検討した。3D培養は表皮細胞とコラーゲンゲルに包埋した線維芽細胞を三次元的に培養することで線維芽細胞が表皮細胞に与える影響を検討することができる（図3）。そこで、正常マウスもしくは皮膚腫瘍モデルマウスの皮膚から単離した線維芽細胞と正常マウスより単離した表皮細胞を3D培養し、表皮細胞の挙動を検討したところ、皮膚腫瘍モデルマウスより単

離した線維芽細胞が表皮細胞の異常増殖を誘導することが明らかとなった（図3）。さらに、培養線維芽細胞に *Staphylococcus-x* の菌体上清を加え、線維芽細胞の遺伝子発現変化を確認したところ、*Staphylococcus-x* の菌体上清の添加によりがん化を促進する因子として知られる MMP-3 や IL-6 などの発現が上昇することが明らかとなった。

以上の結果から、*Staphylococcus-x* の代謝産物が皮膚線維芽細胞に細胞老化を誘導することで表皮細胞の異常増殖を促し、皮膚腫瘍の悪性化の促進に寄与していることが明らかとなった。

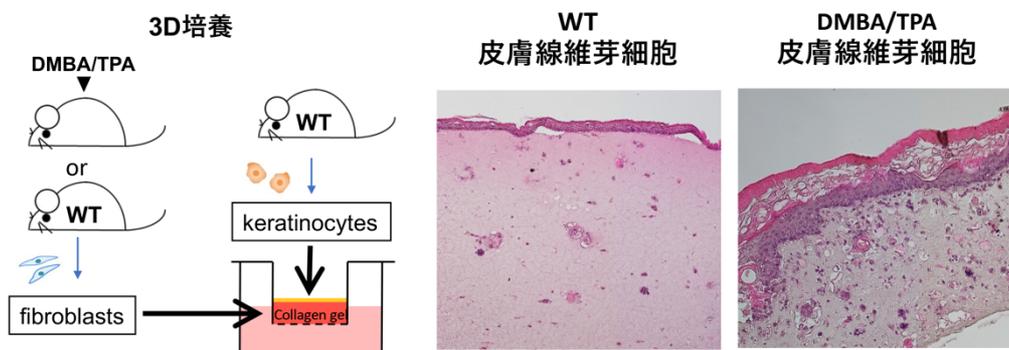


図3 細胞老化を起こした細胞による表皮細胞の異常増殖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, Sugiura Y, Yoshimoto S, Arai Y, Sato S, Yoshida Y, Tsuji S, Uemura K, Wakita M, Matsudaira T, Matsumoto T, Kawamoto S, Takahashi A, Itatani Y, Miki H, Takamatsu M, Obama K, Takeuchi K, Suematsu M, Ohtani N, Fukunaga Y, Ueno M, Sakai Y, Nagayama S, Hara E.	4. 巻 12
2. 論文標題 Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumorigenesis via butyrate secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25965-x.	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 Tsuji S, Minami S, Hashimoto R, Konishi Y, Suzuki T, Kondo T, Sasai M, Torii S, Ono C, Shichinohe S, Sato S, Wakita M, Okumura S, Nakano S, Matsudaira T, Matsumoto T, Kawamoto S, Yamamoto M, Watanabe T, Matsuura Y, Takayama K, Kobayashi T, Okamoto T, Hara E.	4. 巻 2
2. 論文標題 SARS-CoV-2 infection triggers paracrine senescence and leads to a sustained senescence-associated inflammatory response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 115-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-022-00170-7	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 Tanabe Yamato, Kawamoto Shimpei, Takaku Tomoiku, Morishita Soji, Hirao Atsushi, Komatsu Norio, Hara Eiji, Mukaida Naofumi, Baba Tomohisa	4. 巻 4
2. 論文標題 Expansion of senescent megakaryocyte-lineage cells maintains CML cell leukemogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 6175 ~ 6188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020003117	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 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 1935
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 Shimpei Kawamoto, Tomonori Matsumoto, Masaki Takasugi, Eiji Hara	4. 巻 8
2. 論文標題 The 6th international cell senescence association conference	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 517-525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12970.	査読の有無 無
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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ken Uemura, Olivia MIsaki Kyama, Shimpei Kawamoto, Masahiro Wakita, Eiji Hara
2. 発表標題 Identification and characterization of skin bacteria involved in obesity-induced skin carcinogenesis in mice
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Uemura, Shimpei Kawamoto, Masahiro Wakita, Eiji Hara
2. 発表標題 Identification and characterization of skin bacteria involved in skin carcinogenesis in mice
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------