

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07589

研究課題名（和文）細胞老化に伴う細胞質クロマチン断片蓄積の分子機構と発がんとの関係解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of accumulation of cytoplasmic chromatin in senescent cells, related to carcinogenesis

研究代表者

渡邊 すぎ子 (Watanabe, Sugiko)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：10433012

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）：細胞は過剰なストレスを受けると分裂を止め、細胞老化が誘導される。そのとき細胞質内にクロマチン断片の増加が観察されている。本研究ではその断片を次世代シーケンス解析することによって、ゲノム不安定性や発がんとの関係を明らかにすることを目的とする。分析により、老化細胞の細胞質にみられるDNA配列は、核や健常の細胞の細胞質に存在するDNAとは明らかに異なるクラスターを呈することが明らかになった。さらに老化細胞の細胞質で特異的に増加するゲノム領域の中には、実際のがん組織で高率に増幅や欠失を呈する領域が含まれており、ゲノム不安定性との関連が示唆された。今後本研究を基盤としたさらなる応用研究が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化の誘導に伴って細胞質に増加するDNA配列を解析し、実際のがん組織で認められているゲノム不安定性との関連を見出した。細胞老化を起こした細胞は加齢により体内に蓄積することが知られており、加齢性発がんとの関連が示唆されているが、その分子メカニズムは不明である。本研究成果は、加齢に伴って増加する発がんの分子メカニズムの一端を細胞質のゲノム解析から明らかにするものである。加齢性発がんの理解を深めることに加え、今後の応用解析によって、発がんやがん治療効果のモニター、さらには新たな治療戦略創出に役立つであろうことが期待できる。

研究成果の概要（英文）： Persistent cellular stresses induce senescence, in which accumulation of cytoplasmic chromatin fractions (CCFs) is observed. The purpose of this study is to clarify the relationship between senescence and genome instability leading to carcinogenesis by next-generation sequencing (NGS) of CCFs. Analysis revealed that the DNA sequences found in the cytoplasmic fraction of senescent cells show a specific clustering that is clearly different from that of DNA present in the nucleus and cytoplasm of healthy cells. Furthermore, some genomic regions specifically increasing in the cytoplasm of senescent cells exhibit structural variants in clinical cancer tissues. These data suggests that cellular senescence is associated with genomic instability leading to carcinogenesis. Based on this data, further applied research is expected in the future.

研究分野：がん

キーワード：がん 細胞老化 ゲノム不安定性 全ゲノム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴いがんの発生率が増加する我が国において、その有効な予防法と新規治療法の開発が急務であり、加齢性発がんに関わる分子メカニズムの解明が喫緊の課題である。加齢性発がんは、紫外線、喫煙等の環境因子や、炎症や肥満といった生活習慣に起因した内在性ストレスによってゲノムおよびエピゲノム異常が生じ、その蓄積によって引き起こされると予想されているが、その分子メカニズムの詳細はほとんど明らかにされていない。

これまでの研究により、正常な細胞に発がんの原因となるストレスが生じると、まずは細胞周期チェックポイント機構が働き、必要に応じて細胞老化やアポトーシスが誘導され、異常細胞の増殖が抑制されることが明らかになっている。しかしアポトーシスとは異なり、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は死滅するわけではないため、加齢に伴い体内の様々な部位に老化細胞が蓄積する。一方、近年の研究により、老化細胞では炎症性サイトカインや増殖因子等、様々な分泌因子を高発現する SASP と呼ばれる現象がみられ (Coppe JP et al. *PloS Biol.* 2008)、この SASP 因子ががんを進展させることを所属研究室では見出している (Yoshimoto S et al. *Nature* 2013)。また最近遺伝子改変マウスを用いた実験で、老化細胞を体内から除去すると、がんを含む加齢性疾患の発症が抑えられることが報告され (Baker DJ et al. *Nature* 2016)、老化細胞自身が新たな予防・治療法確立のための標的として注目されている。

老化細胞の興味深い特徴として、細胞質内にクロマチン断片が見出されており、その増加が細胞老化を促進するとの報告がある (Ivanov A et al. *J Cell Biol.* 2013, Gluck S et al. *Nature Cell Biol.* 2017)。いずれの報告でも、老化細胞の核膜に budding が観察されていることから、核外に増加したクロマチン断片は核膜脆弱性に起因しているのではないかと考えられている。一方、老化細胞では DNA 損傷応答 (DNA-damage response; DDR) が恒常的に活性化しており、SASP の誘導に必須であることが解っている。老化細胞にみられる細胞質のクロマチン断片には DDR の活性化の指標である γ -H2AX が陽性であることが示されているが (Ivanov A et al. *J Cell Biol.* 2013)、実際にゲノム DNA が切り出されているかは不明である。

2. 研究の目的

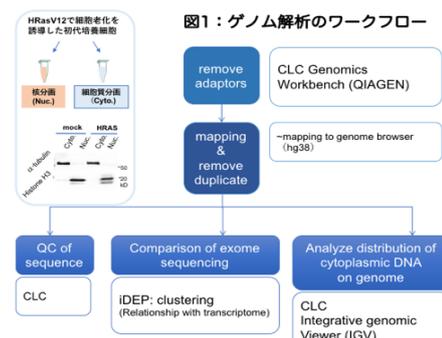
前がん病変やがん細胞で増加する細胞質内のクロマチン断片と、それによって誘導されるゲノム不安定性とその細胞応答機構に着目している。この解析を通して、加齢性発がんの発生と制御の分子メカニズムを導き出し、がんの早期診断・治療を可能とする分子標的の同定へと発展させることを目的とする。具体的には、以下の3項目について研究を進めている。

- 1) 細胞老化誘導性のゲノムストレスにより細胞質に特異的に増加するゲノム領域を同定する。
- 2) 増加するゲノム領域を、シングル細胞のターゲットシーケンスで解析し、不均一な細胞集団の中から発がんや治療抵抗性に繋がるゲノム構造変異を見出す。
- 3) ゲノム異常を基盤として、重要な DNA 損傷修復等の細胞応答を検証する。

3. 研究の方法

1) 核・細胞質分画のバルクのゲノム解析 :

老化細胞の核外に漏れ出すクロマチン断片を質的に解明するために、15cm 培養皿にヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 TIG-3 細胞を培養し、がん原性因子 RASV12 で



誘発した老化細胞群から低張バッファーを用いて核と細胞質を分離する。ゲノムを抽出してライブラリーを作成の後、全ゲノムシーケンスを行い、データ解析を進める (図 1)。

2) シングル細胞の分離と次世代シーケンス解析:

ターゲットゲノムシーケンスに向けて、単一細胞分離とライブラリー作成およびデータ取得の再現性と安定性を確認する。老化細胞は内部構造が複雑で細胞の形態も不整なため、セルソーターの FSC と SSC のみによる選別では生細胞単離の確率が極めて低くなる。それを改善するために、DNA を DRAQ5 で、死細胞を PI で染色し、生細胞を選択的に回収する。単離した細胞を 2 群に分け、それぞれ次世代シーケンス用にライブラリーを作成し、トランスクリプトームおよびゲノムの解析を行う (図 2)。得られたデータを用い、各老化細胞誘導群における細胞質内核酸の配列情報の精査を行う。

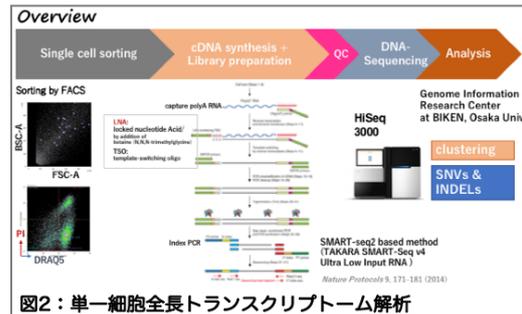


図2: 単一細胞全長トランスクリプトーム解析

得られたデータを用い、各老化細胞誘導群における細胞質内核酸の配列情報の精査を行う。

図3: 細胞質分画のDNAシーケンス解析

4. 研究成果

1) 核・細胞質分画の全ゲノムシーケンス:

細胞老化を誘導した細胞群の細胞質内 DNA 配列は、核分画や誘導前の細胞質分画とは明らかに異なる特異的増減パターンを示した (図 3)。さらにそれらのゲノム上の分布について解析を進めると、繰り返し配列に挟まれる領域が特異的に増加している例が認められ、ゲノム切り出しとその後の DNA 損傷修復を介したゲノム不安定性の発生の可能性が示唆されている。このゲノム領域が実際のがんで変異しているかを検証するために、TCGA のがんサンプルを解析したところ、図 4 の青色やピンクのラインで示されるように、文節的な遺伝子領域の増幅や欠失が高率に認められた (人類遺伝学会発表 2020)。

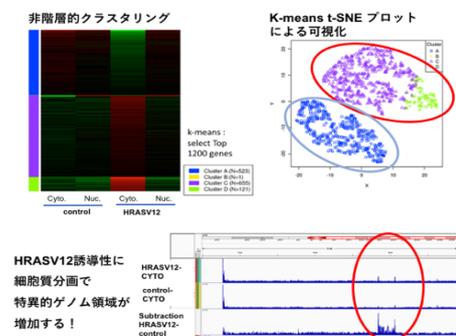
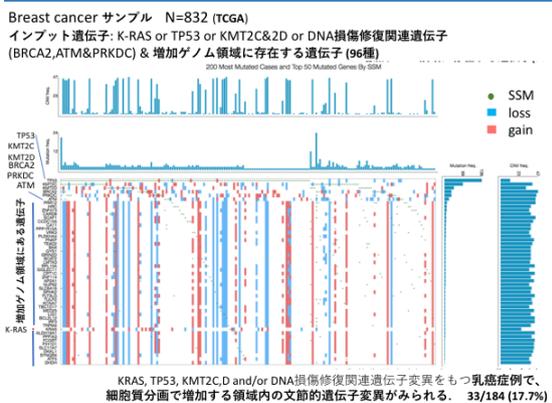


図4: 細胞老化の細胞質分画で増加する領域とがんのゲノム不安定性



2) シングル細胞解析:

老化細胞から生じるトランスフォームや治療抵抗性を示す少数の細胞を捉えるために、シングル細胞解析を行った。これまでに、全ゲノムシーケンスによって、単一細胞レベルのゲノムのコピー数多型検出に成功した(図 5 ; 左)。また全長トランスクリプトーム解析においても、細胞周期が回っている細胞と、分裂限界に到達した老化細胞を、それらの遺伝子発現パターンで分類し、比較可能であった (図 5 ; 右)。現在そのデータをゲノム配列ヘフィードバックして解析を進めている。さらに細胞質に増加するゲノム領域を重点的に、ターゲットゲノムシーケンスのデザイン検討中であり、シーケンス効率の上昇とコスト削減が期待される。

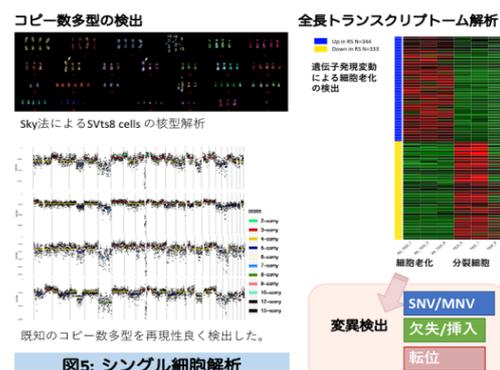


図5: シングル細胞解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 渡邊すぎ子、原英二	4. 巻 44
2. 論文標題 細胞老化と加齢性疾患—予防・治療標的研究の最前線—	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡邊すぎ子、原英二	4. 巻 2
2. 論文標題 細胞老化の分子メカニズムとその創薬応用の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 老年内科	6. 最初と最後の頁 601-609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件）

1. 発表者名 渡邊すぎ子、佐々木瑠美、柊中智恵子、後藤理沙、山本豊、大場 隆
2. 発表標題 術前遺伝学的検査の現状と展望~複数の乳がん関連遺伝子変異を疑った症例から学ぶ~
3. 学会等名 第28回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊すぎ子、山本拓也、原英二
2. 発表標題 細胞老化に伴うゲノム不安定性検出を目指した核外ゲノム次世代シーケンスと、そのがんゲノムへのフィードバック解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
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
---------	---------