

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16156

研究課題名(和文) 老化細胞と加齢性疾患の相互関係の理解と老化細胞除去法への展開

研究課題名(英文) Understanding the interrelationship between senescent cells and age-related diseases and the elucidation of the mechanisms for the killing of senescent cells by senolytic drugs

研究代表者

脇田 将裕 (Wakita, Masahiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(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、老化細胞を優先的に死滅させる低分子化合物(セノリティックドラッグ)として見出したARV825が抗がん剤治療の併用薬として、老化細胞の除去を通じてがん形成を抑えることを見出すことができた。また、ARV825が老化細胞を死滅させる作用機序について詳細に解析したところ、オートファジーが正常に進行しないことから、損傷したミトコンドリアが分解されず蓄積し、活性酸素種(ROS)濃度が上昇することで細胞死に至ることを見出した。さらにいくつかの既報のセノリティックドラッグでも同メカニズムを通じて細胞死を誘導していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は修復困難なDNA障害を受けた細胞が過増殖することを防ぐため、不可逆的に細胞周期が停止する機構であるが、この細胞は実は炎症性物質をはじめとする様々な液性因子を分泌することで加齢性の疾患を悪化させることが明らかになってきた。本研究では老化細胞を除去する効果を有する既報のセノリティックドラッグをがんの化学療法と併用することでがん治療に対する効果を高めることを見出した。さらに、セノリティックドラッグが共通の分子メカニズムを通じて老化細胞を死滅させていることを見出した。今後は本知見を元に、副作用が少なく老化細胞に対する選択性および高い有効性を示す薬剤開発へと発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence is a stable cell cycle arrest that act as a defense mechanism against tumor development. However, the accumulation of senescent cells in the age process provokes inflammation, leading to the increase of risk of age-related diseases including dementia, arthritis, and cancer. The depletion of senescent cells, termed senotherapy, might be anticipated to alleviate and prevents the progression of age-related diseases. I found that ARV825, which was identified as a specific killing agent for senescent cells, could increase the efficiency of chemotherapy for xenograft tumor development, concomitant with the depletion of senescent cells. As I analyze the mechanism of ARV825-induced cell death, damaged mitochondria were accumulated due to the impaired autophagy flux, leading to the cell death mediated by the increase of ROS production. This mechanism is a common pathway in the cell death process of senescent cells induced by several previously reported senolytic drugs.

研究分野：がん、細胞老化

キーワード：細胞老化 セノリティックドラッグ

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国では平均寿命が伸びたことでがんや神経変性疾患などさまざまな病気に対する発症リスクの増加が明らかとなってきた。そのため高齢化に伴う病気をいかに予防、治療するのが課題の1つとなっている。炎症の慢性化がこれらの病気の症状を悪化させる要因として明らかにされ、近年細胞老化がその炎症環境構築の一因として注目されている。細胞老化とは、正常な細胞が発がんストレスを受けた際に起こる細胞周期の不可逆的な停止反応であり、がん抑制機構の1つとして機能している。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、死ににくいいため、加齢とともに生体内に蓄積する(Yamakoshi et al., *J Cell Biol.* 2009)。さらに老化細胞から炎症性物質を産生する SASP (Senescence-associated secretory phenotype)と呼ばれる現象により炎症を惹起させる。実際に老化細胞が SASP を通じてがんの悪性進展を促進するなど加齢性疾患への関与が報告されている(Yoshimoto et al., *Nature* 2013)。この老化細胞を選択的に除去することを目的に、p16 を高発現する老化細胞を選択的に死滅させた遺伝子改変マウスの結果によると、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が延伸した(Baker D, et al., *Nature*, 2011, Baker D, et al., *Nature*, 2016)。そこで老化細胞を優先的に除去するセノセラピーという概念が提唱され、さまざまなグループからその方法が報告されている。老化細胞を選択的に除去する効果を持つ薬剤(セノリティックドラッグ)の開発が現在最も盛んに行われており、当研究室においても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元に ARV825(従来の 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)がセノリティックドラッグの候補薬であることを報告した(Wakita et al., *Nature commun.*, 2020)。ARV825 による細胞死誘導の分子メカニズムとして、老化細胞で働く唯一の DNA 損傷修復機構である非同相末端結合(NHEJ)を抑制することで、DNA 損傷が増大し、細胞死へ至ることを明らかにした。しかし、NHEJ 阻害剤だけでは老化細胞を除去できなかったため、ARV825 による老化細胞の細胞死誘導には他のメカニズムの関与が予想される。そこで、本研究では、ARV825 による老化細胞除去機構の完全な理解を通じて、老化細胞の生存維持機構を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究課題は、ARV825 による老化細胞の細胞死誘導メカニズムをより詳細に理解することで、老化細胞の弱点を明らかにする。さらに、加齢性疾患モデルを通じて、老化細胞がもたらす生体への影響の理解およびセノリティックドラッグの有効性について検証していく。

3. 研究の方法

(1) ARV825 による加齢性疾患への影響の解析

ARV825 が加齢性疾患にもたらす影響を解析する。以前の若手研究期間において老化細胞による腫瘍形成促進モデルとして、担がんマウスに抗がん剤としてドキソルビシンを投与し、その後 ARV825 を処理することで単剤投与と比較してがん形成の促進を有為に抑制することを明らかにしてきた。本方法は抗がん剤治療の補助薬としてセノリティックドラッグが有用である可能性を示す結果であった。そこで実際にドキソルビシン処理後に生じる老化細胞を ARV825 処理で除去できたのかを確認する。

(2) ARV825 による老化細胞の細胞死誘導機構の解明

研究開始当初、ARV825 は BRD4 を標的とすることで、二本鎖 DNA 損傷修復機構の1つ non-homologous end-joining に必須の XRCC4 の発現を抑制し、それに伴い DNA 損傷が進行するため老化細胞を死滅されることを明らかにした。しかし、NHEJ 阻害剤単剤処理では老化細胞が死滅しないことから、ARV825 による細胞死誘導には NHEJ 阻害以外のメカニズムの関与が示唆されていた。そこで、ヒト正常線維芽細胞 TIG-3 を用いて、BRD4 により発現制御を受ける遺伝子について再解析を行い、細胞死誘導のメカニズムをより詳細に明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) 以前までの研究期間において、ARV825 を抗がん剤療法と併用することでがん形成の促進を有為に抑制できることを担がんマウスモデルにて示してきた。そこで、ARV825 が実際に抗がん剤処理後に生じる老化細胞を死滅させたのかについて、免疫染色により確認した。老化マーカーである p21 や 53BP1 などがドキソルビシン処理後のがん領域内にて確認できた一方、ARV825 を併用したがん領域内ではこれら老化マーカーの著しい低下を確認することができた(図1)。

つまりがん治療の1つの選択肢として、抗がん剤療法にセノリティックドラッグを併用する方法の有用性を示すことができた。

(2) ARV825 が NHEJ 活性に重要な役割を持つ XRCC4 の遺伝子発現を抑制することで老化細胞を死滅させることを見出し、さらに、siRNA で XRCC4 をノックダウンすることで老化細胞が死滅することを確認してきた。しかし、NHEJ 阻害剤だけでは老化細胞が死なないことから、ARV825 による老化細胞の細胞死誘導には NHEJ 以外のメカニズムの関与が示唆されていた。そこで、ARV825 の直接の標的である BRD4 がさまざまな遺伝子発現の制御に関与することから、RNA-seq 解析を行ったところ、オートファジー関連遺伝子の発現が ARV825 の処理で増加していることがわかった。そこで、オートファジーの関与について検討するため、オートファゴソームマーカーの LC3B- を確認したところ、ARV825 処理後に LC3B- が蓄積しており、オートファジーの誘導が明らかとなった(図3)。また、XRCC4 を siRNA でノックダウンする際に用いる Cation lipid にはオートファジーを誘導する作用を持つことが報告されており、実際にオートファジー誘導を確認できた。そこで、NHEJ 阻害剤に Cation lipid を添加したところ、老化細胞が死滅することを見出した(図2)。そこで次に、オートファジーがもたらす細胞死誘導のメカニズムをより詳細に明らかにするため、オートファジープロセス一連の流れについて調べた。コントロール細胞にオートファジーインドゥーサーである Rapamycin を処理すると、オートファゴソームマーカー LC3B- の蓄積が確認され、オートファジー阻害剤である BafilomycinA1 (BafA1) を加えると LC3B- がさらに蓄積したことから、コントロール細胞ではオートファゴソームはオートファジーの過程を経て分解されていることが示唆された。一方、老化細胞に ARV825 処理すると LC3B- は蓄積するものの、BafA1 処理した場合と同程度の LC3B- の蓄積が見られたためオートファゴソームが分解されず蓄積している可能性が示唆された(図3)。一般的にオートファジーは不要なオルガネラや損傷したミトコンドリアなどをオートファゴソーム膜で包み、オートリソソームと膜融合することでアミノ酸まで分解することが知られている。実際にオートファゴソーム内の内容物にはミトコンドリアが含まれていることが電子顕微鏡および免疫染色にて確認できた(図4)。さらにミトコンドリアは膜電位が低下しており、活性酸素種(ROS)を過剰産生していることが明らかとなった。そこで、ROS スカベンジャーである NAC を処理したところ、ARV825 による細胞死を抑制したことから、ROS の過剰産生が ARV825 による細胞死誘導に関与していることが明らかとなった(図5)。最近 XRCC4 は核だけでなくミトコンドリアにも局在しており、ミトコンドリアの DNA 損傷の回復に寄与している可能性が他のグループから報告されており、ARV825 を添加することでミトコンドリアが損傷したと推測される。老化細胞ではオートファジー機構が正常ではないことから、損傷ミトコンドリアが蓄積し ROS が過剰産生したと考えられる。さらに損傷ミトコンドリアの蓄積に伴う ROS 依存的な細胞死の誘導は ARV825 以外の既報のセノリティックドラッグにも一部該当することを見出した(図5)。つまり、Senolytic drug による老化細胞の細胞死誘導メカニズムとして、損傷ミトコンドリア蓄積に伴う ROS の高産生が一因となっていることが明らかとなった。

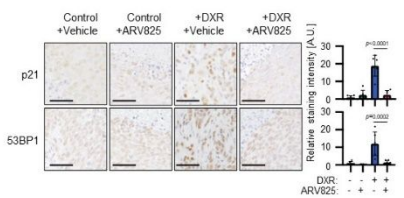


図1: Doxorubicin処理で生じるがん組織内の老化細胞をARV825を併用することで除去できる

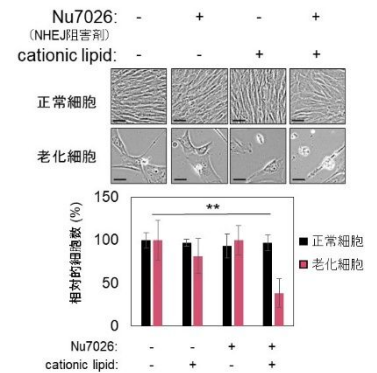


図2: NHEJ阻害とオートファジー活性化が老化細胞を死滅させる

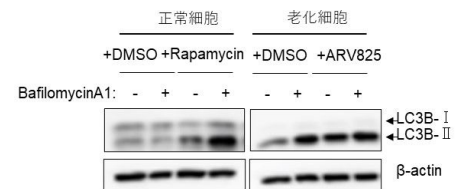


図3: 正常細胞と老化細胞におけるオートファジー-fluxの違い

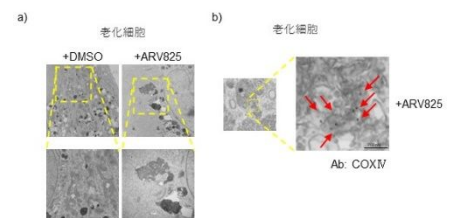


図4: ARV825処理後にミトコンドリアがオートファゴソーム内に蓄積する
a)電子顕微鏡観察 b)ミトコンドリアマーカー-COXIVによる免疫電子顕微鏡観察

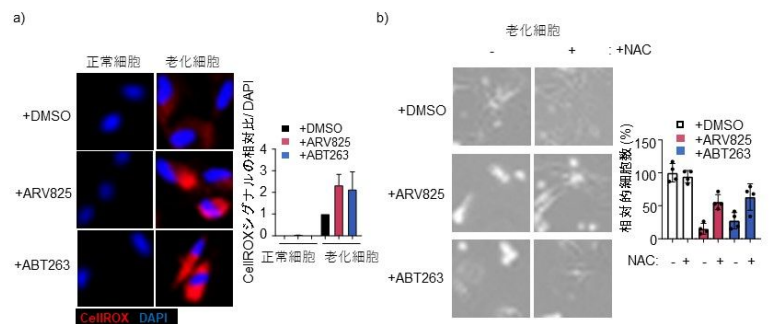


図5: Senolytic drugによる共通の細胞死誘導のメカニズム
a) CellROXによるROS検出 b) N-acetylcysteine (NAC)がSenolytic drugによる老化細胞の細胞死に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Wakita, M., Takahashi, A., Sano, O., Loo, T. M., Imai, Y., Narukawa, M., Iwata, H., Matsudaira, T., Kawamoto, S., Ohtani, N., Yoshimori, T., Hara, E.	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 Commun.	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, 2020.	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脇田 将裕, 高橋 暁子, 大谷 直子, 原 英二
2. 発表標題 新規老化細胞除去薬によるがん治療への可能性
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 脇田将裕
2. 発表標題 Clearance of senescent cells by BET-family protein degrader and their potential for cancer therapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇田将裕
2. 発表標題 Impact of BET-family protein degrader in the killing of senescent cells and its potential for cancer treatment
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 南野 徹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長	

1. 著者名 脇田 将裕, 原 英二	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 371-376
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 脇田 将裕, 原 英二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 221-227
3. 書名 炎症と免疫	

〔産業財産権〕

〔その他〕

老化細胞を選択的に死滅させる薬剤候補を同定
<https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20200805.html>

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
---------	---------