

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15974

研究課題名(和文)肝障害下で惹起される肝細胞倍数性変化と細胞老化の関連解明

研究課題名(英文) Investigation of the relationship between ploidy alterations and senescence of hepatocytes in liver injuries

研究代表者

松本 知訓 (Matsumoto, Tomonori)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40886610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加齢や臓器障害で蓄積する多倍体化と細胞老化という2つの細胞変化に着目し、その相互関連の解明を目指した。ヒト肝癌細胞株Huh7と正常2倍体上皮細胞株RPE1を用いた検討により、細胞老化の誘導過程ではしばしば多倍体化を伴う一方、多倍体化は必須ではなく2倍体のまま細胞老化に至りうる事が明らかとなった。独自に樹立した安定多倍体細胞株を用いた検討により、多倍体細胞ではDNA傷害が多く蓄積しており、多倍体化はDNA傷害の惹起につながることも分かった。多倍体化および多倍体であることは細胞老化の惹起に必須ではないが、DNA傷害の蓄積と関連することで細胞老化の誘導に密接に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や臓器障害において多倍体化と細胞老化という2つの細胞変化がともに亢進・蓄積しており、特に細胞老化は様々な加齢性疾患の病態に関与していることがこれまで明らかとなってきたが、特に多倍体化の意義についてはほとんど明らかとなっていない。本研究により多倍体化と細胞老化惹起との相互関連が明らかになったことにより、未だ謎が多い、細胞障害における多倍体化が持つ意義の一側面が解明された。今後さらに検討を進めることで、臓器障害における多倍体化の意義の解明にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on two cellular changes, polyploidization and cell senescence, which accumulate with aging and organ damage, and aimed to elucidate their relationship. Using the human hepatoma cell line Huh7 and the normal diploid epithelial cell line RPE1, we found that the process of cellular senescence induction was often accompanied by polyploidization, but that polyploidization was not essential for cellular senescence. Using stably polyploid cell lines, we also revealed that high levels of DNA damage were accumulated in polyploid cells, and that polyploidization could induce DNA damage. Our results suggest that polyploidization and polyploidy are not essential for induction of cellular senescence but are closely related to the induction of cellular senescence in association with the accumulation of DNA damage.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：多倍体 細胞老化 DNA傷害 細胞障害

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体細胞は原則として各染色体を2セットもつ2倍体細胞であるが、我々の体内には多数の染色体セットを持つ多倍体細胞も様々な臓器に存在することが知られている。その代表例である筋細胞・巨核球などでは、多倍体化は細胞の分化と同時に認められ、さらに多倍体化すると細胞増殖も停止することから、一般に多倍体化は細胞の最終分化と分裂停止を誘導すると考えられてきた。しかし我々は最近、マウスを用いた肝多倍体細胞の細胞系譜解析により、多倍体肝細胞は豊富な増殖能を持ち慢性障害肝の再生を担っていること、さらに肝発癌の起源ともなりうることを明らかとした (Matsumoto et al., Cell Stem Cell 2020; Matsumoto et al., Nature Communications 2021)。これらの結果は、生理的および障害環境下で生じる肝細胞の多倍体化は、従来考えられてきた様な細胞増殖の停止の直接の誘因とはならないことを示している。一方、不可逆的な細胞周期の停止状態である細胞老化の誘導過程では、しばしば多倍体化を伴うことも知られている。細胞老化はDNA傷害など様々な細胞ストレスが生じた際に、細胞増殖を不可逆的に停止させることで癌化を防ぐ生体の防御機構と考えられており、加齢や組織障害において生体内の様々な臓器に老化細胞が蓄積することが知られている。多倍体細胞についても同様に、例えば肝臓において加齢や慢性肝障害とともに多倍体肝細胞が増加することが知られており、また *in vitro* において細胞老化の誘導とともにしばしば一核多倍体細胞、あるいは多核多倍体細胞が出現することから、細胞老化誘導と多倍体化には密接な関連があることが示唆されている。しかし、細胞老化誘導と多倍体化の直接的な関わりの実態については未だ謎が多く、両者間の連関を詳細に明らかにすることにより、組織障害における多倍体化および細胞老化の新たな意義が見出されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の多倍体化とDNA傷害の蓄積、および細胞老化誘導との関連を調べることで、多倍体化が細胞老化の惹起にどのような意義を持つのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常2倍体上皮細胞であるRPE1細胞と、肝癌細胞株Huh7にDNA障害性薬剤であるドキソルビシンおよびシスプラチンを処理することにより細胞老化を誘導した。そして細胞老化誘導過程での倍数性変化を検討した。

(2) Huh7細胞を起源とし、2倍体細胞株と多倍体細胞株をペアで樹立した。樹立した倍数性の異なる細胞株間において、定常状態および細胞ストレス環境下におけるDNA傷害の蓄積状況を比較検討した。

(3) 倍数性の異なる細胞株間における、細胞老化の誘導過程の違いを比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞内DNA量は細胞周期の進行に伴い変動するため、細胞周期を可視化することができるFluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci)をRPE1細胞とHuh7細胞に導入し、DNA染色も行うことでG1期2倍体とG1期多倍体をフローサイトメトリーで評価できる実験系を構築した。それぞれの細胞にドキソルビシン、シスプラチンを添加し、経時的に細胞周期状態の変化を検討したところ、いずれの細胞、薬剤においてもS期で一過性に停滞する細胞割合が増加した後にG1 arrestに至る細胞が徐々に増加した。特にこのG1 arrestは薬剤添加を終了しても解除されることはなく、細胞老化が誘導されたと考えられた。細胞老化誘導時の倍数性を評価したところ、いずれの細胞においても多倍体細胞の割合が増加しており、細胞老化誘導には多倍体化をしばしば伴うことが確認されたが、必ずしも全ての老化細胞が多倍体しているわけではなく、細胞老化の誘導に多倍体化は必須ではないことも明らかとなった。

(2) Huh7細胞を起源とし、2倍体細胞株と多倍体細胞株をペアで樹立した。樹立した倍数性の異なる細胞株間において、DNA傷害の蓄積状況をH2AX染色によるDNA damage fociの検出や comet assayにより評価したところ、特別な細胞障害を加えなくても多倍体細胞株は2倍体細胞株に比べて有意にDNA傷害を多く含有していることが明らかとなった。さらにこれらの細胞株をシスプラチンで処理したところ、多倍体細胞株では2倍体細胞株に比べ、より多くのDNA傷害の蓄積が認められた。すなわち、多倍体であることはDNA傷害の蓄積を促進することが示唆された。

(3) 2倍体のHuh7-Fucci細胞と多倍体のHuh7-Fucci細胞にシスプラチンによる薬剤誘導性の細胞老化を惹起した。その結果、いずれの細胞においても細胞老化誘導の過程で多倍体化が亢進することが確認された。一過性のS期での停滞の後にG1 arrestに移行するという(1)と同様の所見は、細胞の倍数性に限らず多倍体細胞でも認められた。2倍体細胞と多倍体細胞のどちら

が細胞老化に至りやすいのか、タイムラプス解析などを用いて今後さらに詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okumura Shintaro, Konishi Yusuke, Narukawa Megumi, Matsumoto Tomonori, et al.	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 Shunya, Minami Shohei, Hashimoto Rina, Matsumoto Tomonori, et al.	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 Matsumoto Tomonori	4. 巻 23
2. 論文標題 Implications of Polyploidy and Ploidy Alterations in Hepatocytes in Liver Injuries and Cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9409 ~ 9409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23169409	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 知訓, 林 計企, 上田 佳秀, 原 英二
2. 発表標題 化学療法に伴う肝癌細胞の倍数性変動と細胞老化誘導の解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀坂 季更, 松本 知訓, 林 計企, 脇田 将裕, 原 英二
2. 発表標題 倍数性変化と細胞老化惹起の相互作用の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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