

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012～2013

課題番号：23701040

研究課題名（和文） 肥満による発癌ストレス発生機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of oncogenic stress evolution caused by obesity

研究代表者

山越 貴水（YAMAKOSHI KIMI）

独立行政法人 国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・室長

研究者番号：50423398

研究成果の概要（和文）：

肥満による発癌ストレス発生機構を解明するアプローチとして、肥満と同様、p53 の不活性化により発癌ストレスが発生することを利用して、発癌ストレスセンサーとして知られる p16^{INK4a} の発現が p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織において誘導されることに着目して研究を進めた。我々は、肥満や p53 遺伝子欠損が脂肪組織の前駆細胞において発癌ストレスを発生させることを見出した。また、p53 遺伝子欠損により脂肪組織前駆細胞において DNA ダメージや ROS 産生が増加する。脂肪組織前駆細胞における DNA ダメージや ROS 産生の増加が肥満による発癌ストレス発生メカニズムに深く関与している。

研究成果の概要（英文）：

Using a bioluminescence imaging system for p16^{INK4a} expression in living mice, we show that oncogenic insults such as obesity and p53 inactivation provoke de-repression of p16^{INK4a} expression in progenitors of adipose tissue. p53 inactivation increases DNA damage and reactive oxygen species (ROS) in progenitors of adipose tissues, indicating that obesity generates oncogenic stress in these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：肥満、発癌ストレス、癌抑制遺伝子、p16^{INK4a}、p53

1. 研究開始当初の背景

（1）近年の日本人の食生活の急激な変化により、高カロリー食品の摂取量が増加し、代表的な生活習慣病である肥満が増加傾向にある。肥満は癌の発症リスクを増加させることが指摘されているが、未だ、肥満による癌

発生促進メカニズムの全貌については明らかになっていない。

（2）正常細胞に発癌の危険性のあるストレスが生じると、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子をコードする p16^{INK4a} 遺伝子の発現が誘導され RB 蛋白質を活性化させる

ことにより、細胞老化が誘導され発癌が抑制されることが知られている。このため、p16^{INK4a} 遺伝子の発現は発癌ストレスを受けたことの指標になると考えられる。

我々のグループは、マウスの生体内でヒト p16^{INK4a} 遺伝子の発現を発光シグナルとしてリアルタイムに測定できるインビボ・イメージングマウスの開発に成功して以来、様々な発癌ストレスに対する p16^{INK4a} 遺伝子の生体内での発現動態について解析を続けてきた。この過程で、*ras* の癌変異に対し、発光シグナルが著しい上昇を示すなど、このマウスが発癌ストレスを検出するための良いツールとなることを示してきた。肥満と我々が開発したシステムを組み合わせることで、肥満による発癌ストレス発生の機序が包括的に理解されると考える。

2. 研究の目的

代表的な生活習慣病である肥満は癌の発症率を増加させる。しかし、その分子機序についてはあまりよく理解されていない。そこで、我々は、インビボ・イメージング技術を用いて、発癌ストレスのセンサーとして知られる癌抑制遺伝子 p16^{INK4a} の発現を誘導するメカニズムを明らかにすることにより、肥満によって生じる発癌ストレスの実態を解明する。

インビボ・イメージングシステムを用いた解析から、高脂肪食を与え肥満させた p16^{INK4a} イメージングマウスは、脂肪組織において発光シグナルが増強する。このことは肥満によって脂肪組織に発癌ストレスが生じた可能性を示唆している。一方、重要な癌抑制遺伝子として知られる p53 の不活性化は強い発癌ストレスとなり、p53 遺伝子欠損マウスは若齢から高頻度に腫瘍を形成することが知られている。我々は、高脂肪給餌により肥満させなくても p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織において p16^{INK4a} の発現が強く誘導されることを見出している。また、p53 遺伝子欠損マウスに高脂肪食を与え肥満させても脂肪組織において p16^{INK4a} の発現レベルが更に上昇するわけではなかったことから、p53 が欠損した場合に脂肪組織において生じる発癌ストレスと肥満した脂肪組織で発生する発癌ストレスは同じ作用機序で働いている可能性が考えられる。

本研究では、p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} の発現誘導メカニズムと肥満マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} の発現誘導メカニズムを対比させながら詳細に解析することにより、肥満による発癌ストレス発生機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} 遺伝子発現上昇細胞の特定と p16^{INK4a} 遺伝子発現誘導メカニズムの解明

我々が開発した p16^{INK4a} イメージングマウス p53 遺伝子欠損マウスを交配させ p53 を欠損した p16^{INK4a} イメージングマウスを作製したところ、p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織において発光シグナルが増強することを認めている。脂肪組織は脂肪細胞や脂肪前駆細胞、繊維芽細胞やマクロファージ、リンパ球など様々な細胞から構成されることが知られている。そこで、p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織において p16^{INK4a} 遺伝子の発現が上昇している細胞を特定するため、フローサイトメトリー (FACS) を用いて様々な細胞集団に分画し、各細胞集団における p16^{INK4a} 発現レベルを解析した。また、我々は、p53 の不活性化による発癌ストレスが胸腺のような増殖性の高い組織において DNA ダメージを引き起こし、ROS の産生を介して DNA メチルトランスフェラーゼである DNMT1 の発現を低下させることを見出している。更に、このため、p16^{INK4a} 遺伝子プロモーター周囲のヒストン修飾状態が変化し、p16^{INK4a} の発現が誘導されるようになることも見出している

(Yamakoshi *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 2009)。そこで、p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織中に存在する p16^{INK4a} 発現上昇細胞においても同じ作用機序で p16^{INK4a} の発現が誘導されているかどうかを調べるために、p16^{INK4a} 発現上昇細胞を特定することが出来たら、次にその細胞で DNA ダメージ及び DNA ダメージ応答の有無や ROS 産生レベル、p16^{INK4a} 遺伝子プロモーター周囲のヒストン修飾状態 (H3K9me2, H3K27me3 レベル) 等を調べることで p16^{INK4a} 発現が誘導されるメカニズムを明らかにする。

(2) 肥満マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} 遺伝子発現上昇細胞の特定と p16^{INK4a} 遺伝子発現誘導メカニズムの解明

高脂肪給餌により肥満した野生型マウスの脂肪組織を用いて (1) と同様の解析を行う。p16^{INK4a} の発現が上昇している細胞を特定し、次にその細胞における p16^{INK4a} 発現誘導メカニズムを明らかにする。(1) と (2) の解析結果を比較検討することにより、p53 の不活性化により生じる発癌ストレスと肥満により発生する発癌ストレスが脂肪組織中の p16^{INK4a} 発現上昇細胞において同じ作用機序で働いているかどうかを明らかにする。

(3) 肥満により脂肪組織で発癌ストレスを引き起こす因子の同定

肥満によって動脈硬化症の一因である可能性も指摘されている酸化ストレスが増加

することが報告されている。酸化ストレスは発癌ストレスの原因の一つとしても知られ、生体に酸化ストレスが加わると生体成分（脂質、核酸など）が酸化損傷を受けることが知られている。肥満による酸化ストレスの増加が発癌ストレスを引き起こしている可能性を探るため、肥満マウス脂肪組織中の p16^{INK4a} 発現上昇細胞において酸化ストレスが増加しているかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} 遺伝子発現上昇細胞の特定と p16^{INK4a} 遺伝子発現誘導メカニズムの解明

p53 遺伝子欠損マウスの脂肪組織において p16^{INK4a} が上昇する細胞を特定するため、フローサイトメトリーを用いて様々な細胞集団に分画し、各細胞集団における p16^{INK4a} レベルの解析を行った結果、p16^{INK4a} の発現は脂肪組織の脂肪前駆細胞において著しく高くなっていることを見出した。

(2) 肥満マウスの脂肪組織における p16^{INK4a} 遺伝子発現上昇細胞の特定と p16^{INK4a} 遺伝子発現誘導メカニズムの解明

野生型の肥満マウスについて同様の解析を行った結果、p53 遺伝子欠損マウスと比べて上昇レベルは低いものの、脂肪前駆細胞において p16^{INK4a} レベルが高くなっていた。以上の結果から、肥満や p53 遺伝子欠損は脂肪組織の脂肪前駆細胞において発癌ストレスを発生させることが示唆される。

(3) 肥満により脂肪組織で発癌ストレスを引き起こす因子の同定

脂肪前駆細胞において p53 遺伝子欠損が DNA ダメージや ROS を発生させるかどうかについて検討を行った結果、p53 遺伝子欠損は脂肪前駆細胞において DNA ダメージのマーカである γ H2AX と ROS の検出に用いられる Dihydroethidium のレベルが高くなった。以上の結果から、p53 遺伝子欠損は DNA ダメージを引き起こし、更に ROS の産生も上昇させることが示された。これらの結果から、脂肪前駆細胞における DNA ダメージや ROS 産生の増加が肥満による発癌ストレス発生のメカニズムに深く関与している可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K.,

Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H., Hara, E.

DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/CCdh1 in senescent cells.

Molecular Cell, 45(1), 123-131, 2012, 査読有

②Yamakoshi, K. & Hara, E.

Visualizing the dynamics of senescence stress response in living animals.

Inflammation and Regeneration, 32(1), 32-38, 2012, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①Satoshi Katano, Hiromi Kimura, Naoko Ohtani, Eiji Hara, Mitsuo Maruyama, Kimi Yamakoshi

p16^{INK4a} contributes to the age-dependent fate of stem/progenitor cells in the submandibular gland.

Gordon Research Conferences Salivary Glands & Exocrine Biology ポスター発表
2013年2月4-5日 (米国テキサス州ガルベ斯顿市)

②Kimi Yamakoshi

Role of p16^{INK4a} in the age-related functional decline of the submandibular gland.

KEYSTONE SYMPOSIA Aging and Diseases of Aging ポスター発表

2012年10月25日 (東京)

[図書] (計 2 件)

①山越貴水, 原英二.

細胞周期制御遺伝子-1 (*p16^{INK4a}* および *p53*) ががん疾患モデルの作製と利用, 株式会社エル・アイ・シー, 181-187, 2012

②山越貴水, 高橋暁子, 原英二.

がん幹細胞-ステムネス, ニッチ, 標的治療への理解

細胞老化: 老化とがん化の接点

実験医学, 羊土社, Vol. 29 No. 20(増刊), 3295-3301, 2011

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山越 貴水 (YAMAKOSHI KIMI)
独立行政法人 国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・室長
研究者番号：50423398

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし