

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590369

研究課題名(和文) 老化・代謝制御因子 SIRT1 による細胞老化制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of SIRT1 on regulation of senescence-associated secretory phenotype during senescence

研究代表者

本山 昇 (MOTOYAMA, NOBORU)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・加齢健康脳科学研究部・室長

研究者番号：50277282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：老化細胞は、加齢とともに増加することから、個体老化を誘導すると考えられてきた。老化細胞は細胞老化関連分泌表現型(SASP)といわれる炎症性サイトカインなどの液性生理活性因子の分泌が増強する特徴を有している。SIRT1は、NAD⁺依存性タンパク質脱アセチル化酵素で、種々の老年性疾患に対して保護作用があることが報告されている。本研究では、SIRT1が、SASP因子のプロモーター領域の脱アセチル化を介してSASP因子の発現を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Senescent cells develop a pro-inflammatory response termed the senescence-associated secretory phenotype (SASP). It has been thought that SASP may be a key phenomenon in linking cellular senescence with individual aging. SIRT1 is an NAD⁺-dependent protein deacetylase, which regulates a diverse set of biological processes. We showed that SIRT1 suppressed the expression of SASP factors. SIRT1 bound to the promoter regions of SASP components, but dissociated from them during cellular senescence. In SIRT1-depleted cells, the acetylation levels of these regions were already higher than those in control cells in the pre-senescent stage. Moreover, these acetylation levels in SIRT1-depleted cells were significantly higher than those in control cells during cellular senescence. These results suggest that SIRT1 repressed the expression of SASP factors through the deacetylation of histones in their promoter regions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 SIRT1 エピジェネティクス アセチル化

1. 研究開始当初の背景

一般的にヒトなどの細胞は有限な分裂回数を持ち、いずれ細胞周期を停止してしまう。この現象は、細胞老化(Cellular Senescence)と呼ばれる。細胞老化は、細胞分裂に伴う染色体末端のテロメアの短縮による分裂寿命(Replicative Senescence)に加えて、がん遺伝子の活性化・がん抑制遺伝子の不活性化(Oncogene-induced Senescence:OIS)、酸化ストレス(Stress-induced Senescence:SIS)など、様々な刺激により誘導される永久的な細胞周期の停止である。細胞老化の過程では、p53-p21 経路及び p16-pRb 経路の活性化が重要なシグナル経路であり、細胞の扁平化・巨大化、Senescence-associated β -galactosidase (SA- β Gal) 活性、Senescence-associated heterochromatic foci(SAHF)が誘導される。また近年、老化した細胞から炎症性サイトカインを含む種々の液性因子が分泌される SASP という現象が見出され、さらに Autophagy との関連も示唆され、細胞周期停止のみならず、多様な生理現象に関与していることが示唆されてきた。このような細胞老化において、DNA 損傷応答がそのシグナルにおいて重要な機能を果たしている。SIRT1 は、酵母から哺乳類まで保存されている NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素である。ヒストン以外にも p53 や FOXO などの転写因子や他のタンパク質も脱アセチル化することが示され、老化・代謝制御因子として重要な機能を果たしている。

マウス SirT1 を欠損した胚性繊維芽細胞(MEF)は、通常の培養下で細胞老化が誘導されないことが示されている。また、SirT1 KO マウスにおいては、DNA 損傷応答・修復の遅延が認められ、発がん率の上昇が報告されている。一方、SIRT1 の過剰発現は、p53 の脱アセチル化を介して OIS 誘導が抑制されることが示されている。しかしながら、SirT1 過剰発現マウスにおいて、リンパ腫の発症が遅延することが報告されている。このような点から、細胞老化と SIRT1 との関連が示唆されるが、詳細は明らかになっていない。また、SIRT1 はクロマチンに結合し、脱アセチル化を介して特定の遺伝子の発現制御を行っているが、DNA 損傷に応答して DNA 損傷部位へ局在を移動することによって、発現抑制していた遺伝子の発現が上昇することが報告されている。細胞老化では、SASP が誘導され IL-8、IL-1 β 、GRO α 、IL-6 等のサイトカインの遺伝子発現が上昇するが、SIRT1 との関連が考えられた。このような観点より、SIRT1 が細胞老化誘導の過程で関与していると考えられた。

2. 研究の目的

細胞老化(Cellular Senescence)は、がん化の抑制、動脈硬化症など種々の老年性疾患や個体老化との関連が示唆されているが、その制御メカニズムについては不明な点が多く残されている。一方、老化および代謝制御因子である SIRT1 もがん化・老年性疾患や生活習慣病の制御に重要な役割を果たしている。SIRT1 と細胞老化に関するこれまでの報告に加えて申請者は、SIRT1 が細胞老化に伴い発現が減少すること、p53-p21 経路・Senescence-associated secretory phenotype (SASP)および Autophagy に関する知見を見出してきた。そこで本研究では、上記の点に着目して、SIRT1 による細胞老化の制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

主にヒト胎児肺由来繊維芽細胞 MRC-5、hTERT 導入不死化 MRC-5 細胞株(MRC-5/TERT 細胞)及び不死化ヒト皮膚由来繊維芽細胞(BJ/TERT 細胞)を用いて、解析を行う。また申請者によって樹立した Ataxia-Telangiectasia (A-T)患者由来の不死化繊維芽細胞(ATKY/TERT)や Chk2 KO マウス由来 MEF 細胞を用いる。これらの細胞に X 線照射を行い細胞老化を誘導し、この過程で SASP 因子の mRNA の発現を RT-qPCR、タンパク質の発現を SDS-PAGE・ウエスタンブロット解析、クロマチンのアセチル化・メチル化を Chromatin-IP 解析により行った。

4. 研究成果

(1) SASP 発現に伴う SIRT1 の発現低下

ヒト繊維芽細胞 MRC-5 に X-線照射を行うことで細胞老化を誘導し、SASP 因子 IL-8、IL-6 の発現変化および代謝・老化関連因子の発現変化を検討した。RT-qPCR およびウエスタンブロット解析によって SASP 因子の発現を解析した結果、細胞老化誘導によって SASP 因子の mRNA およびタンパク質とも発現が増強されることを見出した。一方で SASP 因子の発現変化と相反的に SIRT1 のタンパク質発現が低下することを発見した。

(2) SIRT1 による SASP 因子の発現抑制

SIRT1 の発現低下は、SASP 因子の発現に先行することから、SIRT1 の発現低下が SASP 因子の発現に与える影響を検討した。SIRT1 に対する shRNA を発現するレトロウイルスを用いて SIRT1 発現抑制 MRC-5 細胞株を樹立した。SIRT1 発現抑制細胞と

control 細胞に Fig.1 と同様の手法で細胞老化を誘導し、SASP 因子の発現を検討した。ウェスタンブロット解析により、SIRT1 発現抑制細胞では control 細胞と比較して、細胞老化誘導後早い時期から SASP 因子 IL-8、IL-6 タンパク質の発現が認められ、また発現量の著しい増加が見られた。RT-qPCR法により4種の SASP 因子 (IL-8、IL-6、IL-1 β 、Gro- α) mRNA の発現解析を行った結果、タンパクと同様に SIRT1 発現抑制細胞では control と比較して、早期より SASP 因子 mRNA の発現上昇が認められ、また発現量の著しい増加が見られた。これらの結果から SIRT1 の欠失は、SASP 因子の発現を転写レベルで加速・増加させることが示唆された。一方で SIRT1 の過剰発現は SASP 因子の発現に影響を与えなかった。

(3) SIRT1 による SASP 因子遺伝子プロモーター領域のアセチル化制御

SIRT1 はクロマチンに結合しヒストンの脱アセチル化を介したクロマチン構造の制御により遺伝子発現を調節している。SIRT1 は、DNA ダメージに応答して DNA ダメージ部位へ動員されることで、定常状態でサイレンシングしていたクロマチン領域が活性化され、抑制されていた遺伝子が発現することが報告されている。そこで、細胞老化誘導時における SASP 因子プロモーター領域への SIRT1 の結合やヒストンのアセチル化の変化を ChIP 解析により検討した。Control 細胞において、SIRT1 は SASP 因子 IL-8 および IL-6 遺伝子のプロモーター領域に結合していた。しかし細胞老化誘導後、SIRT1 は、それらのプロモーター領域から解離した (Fig3A)。SIRT1 の解離と一致して、プロモーター領域のヒストンのアセチル化が亢進することが認められた。SIRT1 発現抑制細胞株では細胞老化誘導前から SIRT1 のプロモーターへの結合は control より低く、また細胞老化誘導後でも control と同程度のレベルを示した。またプロモーター領域のヒストンのアセチル化は細胞老化誘導前から control 細胞と比較して亢進しており、細胞老化誘導後更に高いレベルを示した。これらの結果から、SIRT1 は SASP 因子のプロモーター領域に結合しヒストンの脱アセチル化を介して SASP 因子の発現を抑制しているが、細胞老化に伴いプロモーター領域から解離することで SASP 因子の発現を引き起こすことが示唆された。

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 4 件)

Demidov ON, Zhu Y, Kek C, Goloudina AR, Motoyama N, Bulavin DV. Role of Gadd45a in Wip1-dependent regulation of intestinal tumorigenesis. Cell Death Diff 19: 1761-1768, 2012. [査有]

Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJ, Motoyama N, Cao L, Finkel T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. Science 336: 225-228, 2012. [査有]

Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. PLOS ONE 10: e0116480, 2015. [査有]

Jomura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi H, Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitotic skip in senescence induction. Mol Cell 55: 73-84, 2014. [査有]

[学会発表](計 5 件)

本山 昇. DNA 損傷応答機構(DDR)による老化・がん化の制御. 第 34 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡
Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 regulates DNA damage-mediated pro-inflammatory response. The 7th Symposium Mechanisms and Models of Cancer. 2013 年 8 月 8 日~11 日、La Jolla, USA

早川智久、岩井美佳、青木哲、丸山和佳子、本山昇. SIRT1 によるヒストン脱アセチル化を介した SASP のエピジェネティックな制御機構. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸
Motoyama N, Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Maruyama W. SIRT1 epigenetically regulates DNA damage-initiated pro-inflammatory response. Molecular Biology of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2014 年 10 月 1 日、Cold Spring Harbor, NY, USA

Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 epigenetically regulates senescence-associated secretory phenotype during cellular senescence. 第 37 回日本基礎老化学会大会、2014 年 6 月 26 日~27 日、大府

〔図書〕(計 1 件)

本山 昇 . DNA と老化、老化の分子生物学、s
の分子メカニズムから寿命延長まで、化学同人、
p115-133、2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本山昇 (MOTOYAMA, Noboru)

国立長寿医療研究センター・研究所・加齢

健康脳科学研究部・室長

研究者番号 : 50277282