

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650625

研究課題名(和文)細胞老化におけるアポトーシス抵抗性の分子基盤の解明とその阻害方法の探索

研究課題名(英文)Understanding of the anti-apoptotic mechanisms in senescent cells

研究代表者

原 英二(Hara, Eiji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所がん生物部・部長

研究者番号：80263268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化特異的にアポトーシスを誘導できる低分子化合物を探索した結果、ある特定の分子に対する阻害剤が複数ヒットした。そこで、様々な方法で細胞老化を誘導したヒト線維芽細胞においてこれら阻害剤に共通の標的分子(ヒストン修飾酵素)をRNA干渉法を用いてノックダウンしたところ、効率よくアポトーシスを誘導できることが確認された。更に網膜色素上皮細胞など、線維芽細胞以外の細胞においても同様の結果が得られたため、このヒストン修飾酵素が細胞老化に共通してアポトーシス抵抗性を示す原因分子の一つである可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have tried to identify a promising molecular target that can be used to design interventions to promote apoptosis in senescent cells. By screening of a low molecular weight compound library, we found that a series of chemical inhibitors against the same histone modifying enzyme can provoke apoptosis in senescent, but not in non-senescent, human diploid fibroblasts. Similar results were also observed when we used several other human cell types, suggesting that this histone modifying enzyme plays a key role in preventing apoptosis in senescent human cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌 遺伝子 シグナル伝達 老化 発現制御

#### 1. 研究開始当初の背景

古くから細胞老化は癌抑制機構として働いていると考えられてきたが、その分子メカニズムについては長らく不明なままであった。我々は癌抑制遺伝子である  $p16^{INK4a}$  が細胞老化の誘導に重要な働きをしていることを世界に先駆けて報告し、細胞老化の作用機序解明に貢献してきた。また、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は、アポトーシスを起こしにくく、加齢とともに、体内に蓄積して行くことを  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現をマウスの生体内でリアルタイムにイメージングすることで明らかにしてきた。一方、最近の研究により老化細胞は単に増殖を停止して大人しくしているだけではなく、発癌促進作用のある様々な炎症性物質を分泌する Senescence associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる現象を起こすことが報告され、細胞老化は初期には癌抑制機構として働くが、次第に発癌を促進してしまう副作用を伴うことが明らかになってきた。我々はこの細胞老化が持つ発癌制御における二面性が加齢に伴い癌の発症率が増加する一因になっていると考えた。そこで、体内に蓄積した老化細胞を選択的に除去すれば加齢に伴い上昇する癌の発症率を抑えることが出来るのではないかと考えるに至った。

#### 2. 研究の目的

本研究では、老化細胞がアポトーシス抵抗性を示す分子メカニズムを解明し、体内に存在する老化細胞を安全かつ効果的に除去するための方法の開発に必要な基盤を整えることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1) 様々な種類のヒト培養細胞に細胞老化を誘導した場合に共通して発現レベルが変化する遺伝子群をマイクロアレイ解析により絞り込む。

(2) それら遺伝子群のうち生体内で細胞老化を起こした場合にも同様の発現変動を示すものをマウスやヒト臨床サンプルを用いた解析により絞り込む。

(3) 次に、パスウェイ解析等によりそれら遺伝子群のうちアポトーシス抵抗性に関与している可能性がある遺伝子群を絞り込み、その RNA 干渉もしくは過剰発現により老化細胞に効率よくアポトーシスを起こさせる遺伝子群を同定する。

(4) 同定した遺伝子群の機能を阻害する低分子化合物、又は siRNA を化合物ライブラリー及び siRNA ライブラリーをスクリーニングすることで同定し、動物実験によりその有効性を検証することで体内の老化細胞を特異的に除去する方法の開発に道筋をつける。

#### 4. 研究成果

(1) 複数の異なる培養細胞を用いた実験により細胞老化の誘導により共通して発現レベルが上昇する遺伝子群を絞り込んだ。これらの遺伝子群について、老化細胞が蓄積する個体老化の過程でも発現レベルが増加するかについてマウスの組織を用いて検討した結果、個体老化においても発現レベルが上昇する遺伝子が複数存在することが分かった。これらの遺伝子群のうち、アポトーシスに関与している遺伝子を探索するために老化細胞において、それらの遺伝子の発現を RNA 干渉法によりノックダウンした場合、又は過剰発現させた場合にアポトーシスを起こすものを探索した。その結果、老化細胞で発現レベルが亢進しており、RNA 干渉法によりノックダウンすることで老化細胞にアポトーシスを誘導する遺伝子を複数単離することに成功した。以上の結果は老化細胞がアポトーシスに対して抵抗性を示す原因の一つとしてアポトーシス抑制能を有する遺伝子が高発現していることにあることを強く示唆しており、この遺伝子の機能を阻害することで老化細胞を選択的に死滅させることが出来る可能性が期待された。しかし、その一方で、この遺伝子は発現レベルは低いが、細胞老化を起こしていない正常細胞においてもある程度発現しているため、老化細胞を選択的に除去するための分子標的には適さないことが予測された。事実、様々な正常細胞においてこの遺伝子をノックダウンすると、非老化細胞においてもアポトーシスの誘導が認められたので、この遺伝子を分子標的とした薬剤の開発はあきらめるに至った。

(2) ヒト正常 2 倍体線維芽細胞を用いて活性化型 Ras により細胞老化を誘導させる前後でアポトーシス誘導能に大きな変化が見られる低分子化合物を化合物ライブラリーを用いてスクリーニングした。その結果、ある特定のヒストン修飾に関わる酵素に対する阻害剤がヒットした。更にスクリーニングを続けた結果、同じ酵素に対する別の阻害剤がヒットしたため、これら阻害剤の共通の標的分子を(ヒストン修飾酵素)を活性化型 Ras により細胞老化を誘導したヒト線維芽細胞においてノックダウンしてみたところ、効率よくアポトーシスを誘導できることが確認された。また、活性化型 Ras 以外にも放射線、DNA 損傷性薬剤、または分裂寿命により細胞老化を誘導した場合にも同様の結果が得られた。更にヒト線維芽細胞以外にもヒト網膜色素上皮細胞においても同様の結果が得られたため、このヒストン修飾酵素が細胞老化に共通してアポトーシス抵抗性を示す原因分子の一つと考えられた。現在、老化細胞可視化マウス ( $p16^{INK4a}$  発現イメージングマウス) にこの酵素に対する阻害剤を投与することで、通常、加齢に伴い体内の様々な部位に増加する老化細胞の蓄積が抑制され、加齢に

伴う発癌頻度の上昇が抑制されるかどうかについて検討を行っている最中である。

(3) 上記ヒストン修飾酵素を阻害することで発現レベルが変化する遺伝子群を RNA シークエンス法により複数同定した。今後、これらの遺伝子産物の解析を通して老化細胞がアポトーシス抵抗性を示すメカニズムの解明と老化細胞を増やさないようにするための分子標的の発見につながることを期待される。

#### 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 10 件)

1. Sato, S., Kawamata, Y., Takahashi, A., Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., Yamakoshi, K., Sorimachi, H., Kanda, H., Ishikawa, Y., Sone, S., Nishioka, Y., Ohtani, N. and \*Hara, E.  
Ablation of the p16<sup>INK4a</sup> tumour suppressor reverses ageing phenotypes of *klotho* mice. **Nature Communications** (2015) doi:10.1038/ncomms8035 (査読有)
  2. \*Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, and Maruyama M.  
Dysregulation of the Bmi-1/p16<sup>Ink4a</sup> pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. **Aging Cell**. (2015) doi:10.1111/accel.12337. (査読有)
  3. Brookes S, Gargica S, Sanij E, Rowe J, Gregory FJ, Hara E, and \*Peters G.  
Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence. **Cell Cycle**. (2015) 14:1164-1173. doi: 10.1080/15384101.2015.1010866. (査読有)
  4. Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, and \*Yano S.  
In vivo imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line. **Cancer Science** (2015) 106:244-252. doi: 10.1111/cas.12600. (査読有)
  5. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., Hoeijmakers, J.H.J., de Bruin, A., Hara, E. and \*Campisi, J.  
An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. **Developmental Cell** (2014) 31, 722-733. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012. (査読有)
  6. Johmura, Y., Shimada, M., Misaka, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., Ohtani, N., Hara, E., Nakamura, M., Takahashi, S. and \*Nakanishi, M.  
Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction **Molecular Cell** (2014) 55: 73-84. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.003. (査読有)
  7. Imai, Y., Takahashi, A., Hanyu, A., Hori, S., Sato, S., Naka, K., Hirao, A., Ohtani, N. and \*Hara, E.  
Crosstalk between the RB-pathway and AKT signalling forms a quiescence-senescence switch. **Cell Reports** (2014) 7: 194-207. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.006. (査読有)
  8. Ohtani N, Yoshimoto S, and \*Hara E.  
Obesity and cancer: a gut microbial connection. **Cancer Research** (2014) 74:1885-1889. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3501.(査読有)
  9. Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., \*Hara, E. and Ohtani, N.  
Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. **Nature** (2013) 499: 97-101. doi: 10.1038/nature12347. (査読有)
  10. Yamamizu, K., Fujihara, M., Tachibana, M., Katayama, S., Takahashi, A., Hara, E., Imai, H., Shinkai, Y., and \*Yamashita, J. K.  
Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. **Cell Stem Cell** (2012) 10: 759-770. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.022.(査読有)
- [学会発表](計 10 件)
1. 原 英二、「細胞老化の発がん制御における役割」ヒューマンサイエンス総合研究セミナー(東京)2015年1月13日

2. Akiko Takahashi & Eiji Hara, “The roles of cellular senescence in aging and cancer” 日本分子生物学会シンポジウム(横浜)2014年11月25日
3. 原 英二、「細胞老化による発がん制御」肺リモデリング研究会(東京)2014年11月8日
4. Eiji Hara, “Crosstalk between the Rb-pathway and AKT signaling forms a Quiescence-Senescence switch” 日本癌学会コアシンポジウム(横浜)2014年9月27日
5. 大熊敦史、大谷直子、山越貴水、原 英二、「細胞老化反応の生体内イメージング」日本生化学会シンポジウム(京都)2014年10月15日
6. 原 英二、「細胞老化と癌:細胞老化の功罪」高遠・分子細胞生物学シンポジウム(伊那)2014年8月28日
7. 原 英二、「細胞老化と炎症」日本動脈硬化学会(東京)2014年7月11日
8. 原 英二、「細胞老化と炎症」炎症・再生医学会シンポジウム(名護)2014年7月2日
9. 原 英二、「The roles and mechanisms of cellular senescence」日本基礎老化学会国際シンポジウム(大府)2014年6月26日
10. 原 英二、「細胞老化と発癌」日本臨床分子医学会 シンポジウム(東京)2014年4月12日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/tci/canbio/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

原 英二 (Hara, Eiji)

公益財団法人がん研究会がん研究所

がん生物部・部長

研究者番号：80263268