

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15238

研究課題名(和文) 老化細胞クリアランス機構の解明による「古い」の分子基盤の構築

研究課題名(英文) Understanding of the mechanism for clearance of senescent cells

研究代表者

城村 由和 (Johmura, Yoshikazu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40616322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化細胞では、マクロファージによる貪食に重要なホスファチジルセリンのフリッパーゼ遺伝子であるATP11Cの発現減少が認められた。しかし、ATP11C、および関連遺伝子ATP11A・Bの過剰発現・発現抑制でも、老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出には大きな影響を認められなかった。さらに、フリッパーゼの機能に必須であるカルシウムシグナルの阻害では老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出は抑制できなかった。これらの結果は老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出にはこれまでに報告とは全く異なるメカニズムが存在する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は、恒久的増殖停止を特徴とする細胞表現で、抗腫瘍機構として作用する。最近、早老症モデルマウスから老化細胞を人工的に除去すると、「古い」の進行が遅延することが報告され、細胞老化が個体老化の主な原因であることが示された。しかし、加齢に伴い老化細胞が蓄積する機構は不明である。本研究では、貪食シグナルとなるホスファチジルセリンが老化細胞の膜表面に露出する事を見出したが、未知のメカニズムにより制御されることが分かった。今後、その詳細なメカニズムを解明することで、老化細胞の貪食が個体老化や加齢性疾病発症に与える影響を明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of senescent cells has been proposed to be involved in various age-associated pathologies, but molecular basis underlying the accumulation has remained unknown. In the present study, we found that ATP11C, a flippase for phosphatidylserine, is down-regulated in senescent cells. However, overexpression and down-regulation of ATP11-related genes do not affect the expression of phosphatidylserine on senescent cell surface. Furthermore, inhibition of calcium signaling, an essential component for ATP11 flippase, also does not affect the expression of phosphatidylserine on senescent cell surface. These results strongly suggest that there is a unique mechanism for clearance of senescent cells.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：老化 細胞周期 脂質 がん

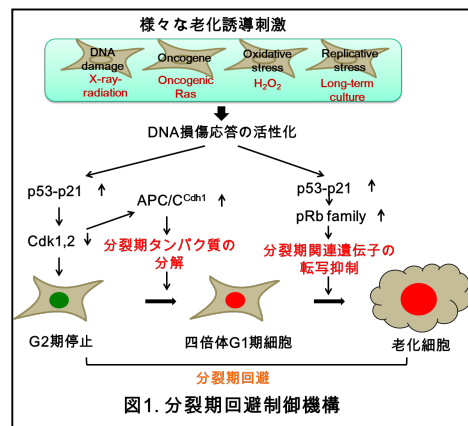
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトはなぜ老いるのか？この疑問に答えるために、老化に関する研究は古くから活発になされているが、はっきりとした結論に至っていないのが現状である。老化の原因としてこれまで多くの仮説が提唱されているが、未だ老化の本質に迫るものではない。しかし、1. テロメア短小化が寿命の決定に役割を果たしている事、2. 紫外線等の DNA 損傷が組織・臓器の老化を促進する事、等から DNA 損傷応答が個体老化の原因であることが強く示唆されている。

最近になって、早老症モデルマウスから老化細胞を除去すると、老化の進行やそれに伴う加齢性疾患の発症を遅らせることができることが報告された (Nature 2011)。この結果は、細胞老化が「老い」の重要な要因の一つであることを示している。しかし、加齢に伴い老化細胞が蓄積する機構は全くもって不明である。

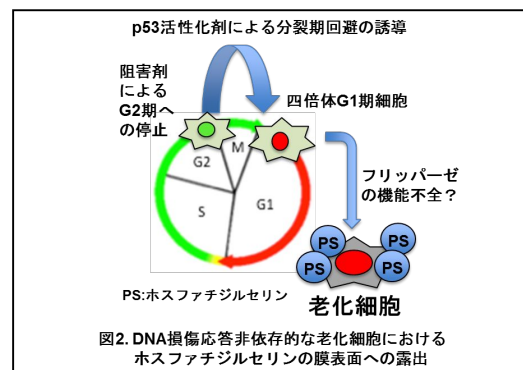
細胞老化は、がん遺伝子の活性化や加齢に伴い生じる DNA 損傷応答によって誘導される恒久的な増殖停止を特徴とする細胞形質であり、発ガン防御メカニズムとしても機能する。申請者は細胞老化制御機構について解析を行った結果、細胞老化誘導には細胞周期 G2 期における p53 活性化による細胞分裂期の回避が重要であることを見出した (Y. Johmura et al. Molecular Cell 2014、図 1)。



### 2. 研究の目的

以前に肝前がん病変では老化細胞が血球系細胞によりクリアランスされる事が示唆されていたが、そのメカニズムについては全く分かっていない。さらに、生理的条件下では老化細胞が血球系細胞によりクリアランスされるという報告はこれまでに無い。加齢に伴い免疫力が低下することはよく知られている。

研究代表者は本研究の予備的検討として、これまでの知見により確立した DNA 損傷非依存的な老化誘導法を用いて、「老化細胞がホスファチジルセリンを膜表面に露出する」という結果が得られたことから、若齢期には免疫機能により活発に老化細胞がクリアランスされるために老化が進行しないという仮説が考えられる。アポトーシスにおいて、ホスファチジルセリンの膜表面への露出は、フリッパーゼとよばれるアミノリン脂質を細胞質に輸送する酵素の機能不全によりおこり、マクロファージによる貪食シグナルとして働く。本研究では、14種類あるフリッパーゼ候補分子の老化細胞における発現・局在・ホスファチジルセリン輸送能を解析し、細胞老化に伴い機能低下するフリッパーゼを同定する。さらにフリッパーゼ過剰発現マウスを作製して、老化細胞クリアランスの「老い」における役割を明らかにすることを目的とした (図 2)。



### 3. 研究の方法

#### (A). 老化細胞特異的に発現が減少するフリッパーゼの同定

ヒトでは14種類あるP4型ATPaseと呼ばれる大きなファミリーを形成する10回膜貫通タンパク質が、アミノリン脂質を細胞質に輸送する酵素であるフリッパーゼの候補であると考えられている。そこでまず、ヒトで存在が確認されているP4型ATPase分子すべての老化誘導過程における発現変化を定量PCR法で解析した。さらに、翻訳後修飾などによりタンパク質分解をつける可能性も考えられることから、ウエスタンブロット法によるタンパク質レベルでの解析を行った。

#### (B). 老化細胞特異的に局在が変化するフリッパーゼの同定

フリッパーゼは細胞膜に局在し、その輸送機能を発揮することから、局在の変化による機能抑制のメカニズムも考えられる。そこで、EGFP-ATP11Cを発現するヒト正常繊維芽細胞を樹立し、局在の解析を行った。また、免疫染色法により内在性の局在の解析も試みた。

#### (C). ATP11関連遺伝子の発現抑制・過剰発現が老化細胞におけるホスファチジルセリンの露出に及ぼす影響の解析

レンチウイルスシステムを用いて、ATP11C、および関連遺伝子であるATP11A・1Bの発現抑制・過剰発現株を樹立し、老化細胞膜表面におけるホスファチジルセリンの露出を解析した。さらに、ATP11の機能発現には、カルシウムシグナルが重要であることから、カルシウムキレート剤であるBAPTAを用いた解析も併せて行った。

#### 4. 研究成果

##### (A). 老化細胞特異的に発現が減少するフリッパーゼの同定

定量PCRの結果、フリッパーゼ遺伝子ファミリーの中で、ATP11Cが特異的に老化細胞で発現減少することが分かった。そこで、市販の複数の抗ATP11C抗体を用いてウエスタンブロット法により解析したが、特異的なシグナルを検出することができなかった。そこで、バキュロウイルスシステムによりリコンビナントATP11Cタンパク質を精製し、抗体の作製を行った。しかし、作製した抗体も特異的なシグナルを検出することができなかった。

##### (B). 老化細胞特異的に局在が変化するフリッパーゼの同定

(A)の検討結果より、老化細胞で発現低下が認められたATP11Cに関して、EGFP-ATP11C過剰発現したヒト線維芽細胞を用いて、共焦点顕微鏡による蛍光観察を行った。その結果、正常細胞・老化細胞ともに主に膜表面に局在することが分かった。この結果は、ATP11Cは主にRNAレベルでの発現制御を受けていることを示唆している。また、抗ATP11C抗体を用いて免疫染色法を行ったが、特異的なシグナルは認められなかった。

##### (C). ATP11関連遺伝子の発現抑制・過剰発現が老化細胞におけるホスファチジルセリンの露出に及ぼす影響の解析

老化細胞で発現減少が認められたホスファチジルセリンのフリッパーゼ遺伝子であるATP11Cに加えて、同様の機能を有することが知られているATP11A・Bに関して、過剰発現・発現抑制による検討を行った。その結果、どの遺伝子の過剰発現・発現抑制でも、老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出には大きな影響を認められなかった。さらに、フリッパーゼの機能にはカルシウムシグナル重要であることが知られているが、カルシウムシグナルの阻害では老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出は抑制できなかった。これらの結果は老化細胞におけるホスファチジルセリンの膜表面への露出にはこれまでに報告とは全く異なるメカニズムが存在する可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 12 件)

1. Nishimura K (equally contributed), **Johmura Y** (equally contributed), Deguchi K, Jiang Z, Uchida KSK, Suzuki N, Shimada M, Chiba Y, Hirota T, Yoshimura SH, Kono K, Nakanishi M, Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase, *Nature commun.*, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08957-w、査読あり
2. **Johmura Y**, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, Maruyama R, Inoue JI, Furukawa Y, Ohta T, Nakanishi M. Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128, 5603-19, doi: 10.1172/JCI1121679、査読あり
3. **Johmura Y**, and Nakanishi M. Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance, *Cancer Science*, 2016, 107, 1550-1555, doi: 10.1111/cas.13060、査読あり
4. **Johmura Y**, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto Y, Okabe A, Aburatani H, Li S, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, and Nakanishi M. SCF<sup>Fbxo22</sup>-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence, *Nature commun.*, 2016, doi: 10.1038/ncomms12059、査読あり
5. **Johmura Y**, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi, K., and Nakanishi M. Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation, *Scientific reports*, 2016, doi: 10.1038/srep31194、査読あり
6. Shimada M, Goshima T, Matsuo H, **Johmura Y**, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, and Nakanishi M. Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis, *Nature commun.*, 2016, 査読あり, doi: 10.1038/ncomms12059.

##### [学会発表](計 4 件)

〔図書〕(計 4 件)

1. **城村由和**、大森徳貴、中西真. 細胞老化維持機構と創薬、**実験医学**、2019年7月号
2. **城村由和**、中西真. DNA 損傷応答と細胞老化、個体老化. **アンチ・エイジング医学**、14(5). 664-671.2018
3. **城村由和**、中西真. 予想外な p53 の細胞老化における機能、**実験医学**、2017年9月号
4. **Johmura Y** and Nakanishi M. Molecular insights into the regulation of apoptosis and cellular senescence, and the implications in cancer. **DNA replication, Recombination and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology** (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：個体から老化細胞を除去する方法、および老化細胞の調製方法

発明者：中西真/城村由和

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特願

番号：2018-210300

出願年：2018年

国内外の別：国内

名称：がんの予後判定方法

発明者：中西真/城村由和/太田智彦

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特願

番号：2018-177864

出願年：2018年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cancer-cell-biology/hp2018/01index.html>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。