

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390094

研究課題名(和文) 細胞老化シグナルの生体内ダイナミクスとその役割の解明

研究課題名(英文) Visualizing the dynamics of senescence response *in vivo*

研究代表者

原 英二 (HARA EIJI)

財団法人癌研究会・癌研究所がん生物部・部長

研究者番号：80263268

研究成果の概要(和文)：古くから細胞老化は、癌抑制機構や個体老化の基礎機構であると考えられてきた。しかし、細胞老化の研究はこれまで主に培養細胞を用いて行われてきたため、細胞老化の生体内での役割については殆ど明らかになっていなかった。そこで本研究では、細胞老化反応をマウスの生体内で時空間的に解析し、細胞老化反応の生体内ダイナミクスを明らかにした。また、これらのデータと様々な細胞老化関連遺伝子のノックアウトマウスの表現系を比較検討することにより、細胞老化の生体内での役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence has long been considered as an important mechanism controlling tumor suppression and aging. However because cellular senescence had been studied mainly *in vitro*, it was unclear whether cellular senescence indeed occurs *in vivo*. To circumvent this problem, here we developed a system to visualize the dynamics of senescence response *in vivo*, especially in the context of living animal. This approach, in conjunction with the knockout mice studies, unveils biological roles of cellular senescence *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病理医化学

キーワード：癌、老化、イメージング、シグナル伝達、ストレス

1. 研究開始当初の背景
正常なヒトの体細胞を *in vitro* で培養すると一定の回数細胞分裂を繰り返した後に分裂

寿命を迎え細胞分裂を不可逆的に停止する(Hayflick & Moorhead, Exp. Cell Res. 1961)。この現象は細胞老化と呼ばれ、古くから癌抑制

や個体老化の基礎機構として働いている可能性が示唆されてきた。近年、分裂寿命のみならず癌遺伝子の発現、酸化的ストレス、DNA ダメージなど様々な発癌の危険性のあるストレス（発癌ストレス）によっても細胞老化と類似の増殖停止が誘導されることが明らかになり(Serrano *et al.*, *Cell*, 1997)、細胞老化は発癌の危険性を排除するために働く安全装置（癌抑制機構）である可能性が指摘されてきた。我々はこれまで、細胞老化の誘導に癌抑制遺伝子である p16^{INK4a} 遺伝子が重要な役割を果たしており、発癌ストレスに反応して発現し細胞老化を誘導することで異常細胞の増殖を防いでいることを明らかにしてきた (Hara *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1996; Sugimoto *et al.*, *Genes & Dev.*, 1999; Ohtani *et al.*, *Nature*, 2001)。しかし、一方で、p16^{INK4a} 遺伝子発現及びそれに伴う細胞老化の誘導は培養条件に大きく影響を受けることから、細胞老化の生体内での役割については懐疑的な意見が多くこれまであまり注目されてこなかった(Sherr & DePinho, *Cell*, 2000)。

2. 研究の目的

本研究では、バイオルミネッセンス・イメージングにより細胞老化のシグナル伝達反応をマウスの生体内で時空間的に解析し、細胞老化の生体内ダイナミクスを解明することを目的としている。また、これらのデータを基に野生型マウスと様々な細胞老化関連遺伝子を欠失したマウスの表現系を比較検討することにより、細胞老化の生体内での役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞老化が生体内のどの組織で？いつ？どの程度？起こるのかを明らかにするために、細胞老化に伴い発現が変化する遺伝子の発現をマウスの生体内においてバイオ

ルミネッセンス・イメージングにより可視化する。更に加齢の過程や様々なストレス環境下で飼育し、継続的にイメージングすることにより、生体内における細胞老化誘導シグナルの時空間的な変化を解析した。

(2) イメージングした遺伝子を欠失したノックアウトマウスに同じストレスを与えた場合に、野生型マウスと比較してどのような変化が見られるかを解析し、細胞老化の生体内での役割を解明した。

(3) 細胞老化可視化マウスを様々な条件（食物や運動のコントロールなど）で飼育したり、細胞培養条件下で細胞老化の誘導に影響を及ぼすことが知られている薬剤（酸化剤、抗酸化剤、DNA ダメージ誘発剤等）を投与することにより、生体内での細胞老化の誘導を調節できないかどうかについて検討を行った。

4. 研究成果

細胞老化反応の生体内ダイナミクスを解明することを目的として、細胞老化の誘導に中心的な役割を担っている p16^{INK4a} 遺伝子や p21^{Waf1} 遺伝子の発現をマウスの生体内でインビボ・イメージングすることを試みた。p16^{INK4a} 及び p21^{Waf1} の発現を蛍光酵素であるルシフェラーゼを用いてリアルタイムにインビボ・イメージングすることを可能にするシステムの構築を行った。このシステムを用いて、①マウスを通常に老化させた場合、②高脂肪食を与えて飼育することで肥満させた場合、③特定の遺伝子をノックアウトして早老症にした場合、の各々の条件下で p16^{INK4a} 及び p21^{Waf1} 遺伝子の発現の体内動態を解析した。その結果、p16^{INK4a} 遺伝子は、通常に加齢の場合、様々な臓器（特に、リンパ節、脾臓、小腸、膵臓 等）で発現が著しく上昇し、それらの臓器では DNA ダメージの蓄積と DNMT1 の発現レベルの低下が認めら

れた。しかし、 $p21^{Waf1}$ 遺伝子の発現については腎臓以外の臓器では加齢に伴う発現レベルの上昇が認められなかった。高脂肪食を与えて肥満させた場合には、腹部や精巣周囲の脂肪組織と肝臓において $p16^{INK4a}$ と $p21^{Waf1}$ 遺伝子の両方の発現レベルが顕著に増加していた。これらの組織においては複数の DNA ダメージマーカーが確認できたことから、DNA ダメージの蓄積が細胞老化反応の引き金になっている可能性が示唆された。

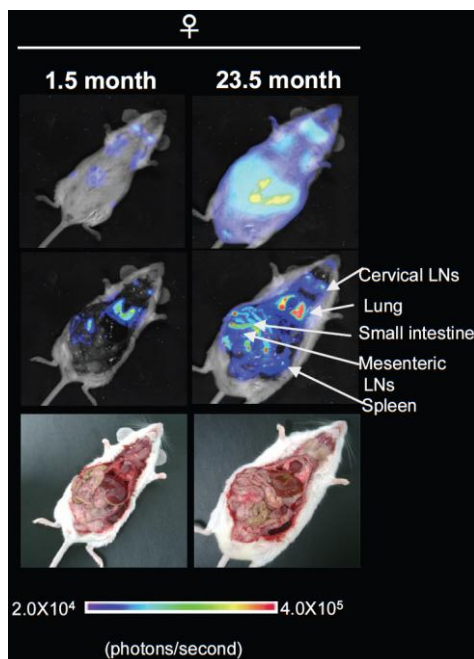


図 1：個体老化における細胞老化シグナル

また、*Klotho* マウスや *Bmi-1* ノックアウトマウスなどの早老症マウスと $p16^{INK4a}$ イメージングマウスや $p21^{Waf1}$ イメージングマウスを交配させたマウスを用いた解析を進行中である。現在までのところ、上記早老症マウスでは様々な臓器において $p16^{INK4a}$ 遺伝子の発現は著しく上昇するが $p21^{Waf1}$ 遺伝子に付いてはあまり変化がない。これらの結果から、 $p21^{Waf1}$ 遺伝子より $p16^{INK4a}$ 遺伝子の方が、少なくともマウスにおいてはより個体老化に密接に係わっていることが示唆された。

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 5 件)

1. Kitajima, S., Miki, T., Takegami, Y., Kido, Y., Noda, M., Hara, E., Shamma, A. & Takahashi, C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interferes with epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. **Oncogene** 30, 737-750 (2011)

2. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between $p16^{INK4a}$ and $p21^{Waf1/Cip1}$ in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. **Cancer Res.** 70, 9381-9390 (2010)

3. Fernandez-Marcos, P.J., Pantoja, C., Gonzalez-Rodriguez, A., Martin, N., Flores, J.M., Valverde, A.M., Hara, E. & Serrano, M. Normal proliferation and tumorigenesis but impaired pancreatic function in mice lacking the cell cycle regulator *sei1*. **PLoS One.** 18: e8744 (2010).

4. Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N. & Hara, E. Real-time in vivo imaging of $p16^{INK4a}$ reveals cross-talk with p53. **J. Cell Biol.** 186, 393-407 (2009)

5. Inomata, K., Aoto, T., Binh, N.T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H. & Nishimura, E.K. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. **Cell** 137, 1088-1099 (2009)

[学会発表] (計 1 1 件)

1. 田島丈子、杉田千鶴、近江谷克祐、中尾和貴、柳茂、深見希代子、原 英二、大谷直子 蛍光・発光融合プローブを用いた Oct4 遺伝子

イメージングシステムの開発
日本分子生物学会・日本生化学会合同年会
(神戸) 2010年12月7日～10日

2. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Ohtani, N., & Hara, E.

Backup tumor suppressor role for p16^{INK4a} in the event of p53 inactivation

日本分子生物学会・日本生化学会合同年会
(神戸) 2010年12月7日～10日

3. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Imai, Y., Ohtani, N. & Hara, E.

DNA damage dependent degradation of histone methyltransferase in cellular senescence.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting:
Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.)
2010年9月28日-10月2日

4. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N.
Intrinsic cooperation between p16^{INK4a} and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting:
Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.)
2010年9月28日-10月2日

5. 今井良紀、高橋暁子、八尾良司、大谷直子、広田 亨、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、原 英二

細胞老化において発癌を促進する因子の探索
日本癌学会 (大阪) 2010年9月22日～24日

6. Eiji Hara

Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging

Asian aging core for longevity research (Jeju, Korea) 2010年8月22日～24日

7. 原 英二

細胞老化の分子メカニズムとその役割

日本炎症・再生医学会 (東京)

2010年8月5日～6日

8. Hara, E.:

Real-time in vivo imaging of p16^{INK4a} reveals cross-talk with p53.

IMCB symposium on cell cycle regulation and tumorigenesis. (Singapore, Singapore)

2009年9月7-8日

9. Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N., & Hara, E.:

Real-time in vivo imaging of p16^{INK4a} expression unveils a cross-talk between p53 and p16^{INK4a}

The Salk Institute Meeting /Mechanisms & Models of Cancer (La Jolla, U.S.A.)

2009年8月12-16日

10. Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. Visualizing the dynamics of oncogenic stress response in living mice.

AACR Conference on Mouse model of Cancer (San Francisco, U.S.A.) January 12-15, 2009

11. Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N. & Hara, E. Real-time imaging of p16^{INK4a}

expression visualizes the dynamics of senescence signalling in living animals.

日本分子生物学会 (神戸) 2008年12月9日～12日

[図書] (計1件)

1. 高橋暁子、原 英二

細胞周期アッセイ法

がん分子標的治療研究マニュアル

(鶴尾 隆/曾根三郎編) 金芳堂 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 英二 (HARA EIJI)

財団法人癌研究会・

癌研究所がん生物部・部長

研究者番号: 80263268

(2) 研究分担者

()

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号: