

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2014

課題番号：23112101

研究課題名（和文）がん微小環境における細胞老化の役割とその制御機構の解明

研究課題名（英文）Roles and mechanisms of cellular senescence in cancer microenvironment

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） 33,500,000 円

研究成果の概要（和文）：がん微小環境における細胞老化の役割の解明を目指した研究を行い、以下の3つの研究成果を得た。(1) 細胞老化を起こすと、ヒストンメチル化酵素であるG9aおよびGLPがタンパク分解を起こすことでエピジェネティックなサイレンシング機構が破綻し、SASP因子が発現する。(2) マウスを用いた実験により肥満に伴う肝がんの発症に細胞老化を起こした間質細胞が分泌するSASP因子が促進的に働いていることを見出した。(3) SASP因子の発現は本来、損傷治癒を促進するために重要な役割を担っているが、過度に作用すると発がんを促進する副作用を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have tried to understand the roles and mechanisms of senescent stromal cells in cancer microenvironment, and following findings are obtained: (1) In senescent cells, DNA damage response provokes degradation of G9a/GLP histone methyltransferases and thereby causing epigenetic de-repression of SASP factor genes. (2) Senescent hepatic stromal cells promote hepatocellular tumorigenesis through secreting SASP factors. (3) SASP primarily promotes tissue repair, contributing to maintenance of homeostasis. Excess amount and/or duration of SASP, however, provokes tumorigenesis.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：発がん 細胞老化 がん微小環境 液性因子

1. 研究開始当初の背景

正常な細胞に癌遺伝子の活性化や過度な DNA 傷害など発癌の危険性がある修復不可能な異常が生じると、細胞周期チェックポイント機構が活性化され、不可逆的な増殖停止である「細胞老化」を起こすか、又は「アポトーシス」を起こして細胞が死滅する。これらの現象は発癌の危険性がある異常細胞の増殖を防ぐ重要な癌抑制機構として働いていると古くから考えられてきた。しかし、アポトーシスとは異なり、細胞老化を起こしても細胞が死滅するわけではないので、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)が生体内に長期間存在し続けることを我々および複数のグループが報告してきた。

一方、最近の研究により、老化細胞は単に増殖を停止しているだけではなく、炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素など、炎症や発癌促進作用を有する様々な分泌蛋白質を発現する Senescence-associated secretory phenotype (SASP)と呼ばれる現象を起こしていることが明らかになってきた。このため、老化細胞は SASP を介して周囲の組織に慢性炎症や発癌を起こすことで生体のホメオスタシスを破綻させている可能性が考えられる。しかし、細胞老化が起こると何故 SASP が起こるのか? また、SASP は周囲の組織、特に癌の進展に必要と考えられている癌微小環境にどのような影響を与えるかについては殆ど明らかになっていなかった。

我々はこれまで細胞老化の誘導機構を解明すると同時に細胞老化反応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に成功するなど、細胞老化の分子メカニズムとその生体内における役割を解明するための研究基盤を整備してきた。そしてこれらの研究基盤を活用することで老化細胞が様々な良性腫瘍組織に存在し SASP を起こしていることを見出した。また、良性腫瘍が悪性腫瘍へと形質転換を起した後も悪性腫瘍組織の間質に SASP を起こした老化細胞が存在していることを見出していた。これらの研究結果から、細胞老化は初期には癌抑制機構として働くが、長期的には SASP 等を介して発癌を促進してしまう作用を併せ持っているのではないかと考えることが出来る。特に、癌微小環境の形成並びにその維持に SASP を介して老化細胞が重要な役割を果たしている可能性が考えられ、細胞老化の癌微小環境に与える役割を解明することは発癌及び癌の進展メカニズムの解明とその制御にとって重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では癌微小環境における細胞老化の役割を解明するために SASP の誘導機構並びにその生理作用を明らかにすることを目的とし、特に以下の点の解明を目指した。

- (1) 細胞老化を起こすと何故 SASP が起こるのか?
- (2) SASP 因子が癌微小環境の形成及び維持にどのような役割を果たしているのか?
- (3) 生体内で老化細胞を選択的に除去すると癌微小環境がどのように変化するのか?

3. 研究の方法

(1) 我々は SASP 因子をコードする遺伝子群のプロモーター領域の解析から SASP 因子の発現にはヒストン修飾状態の変化が重要な役割を果たしている可能性を見出していた。そこで、細胞老化の誘導前後で発現や活性が変化するヒストン修飾酵素群を探索し、それらの発現または活性制御と SASP との関係について培養細胞および遺伝子改変マウス等を用いて解析を行った。

(2) 我々はマウスの皮膚に発癌物質である DMBA 及び TPA を塗布することにより良性腫瘍であるパピローマが形成され、更にその後の悪性腫瘍形成過程での細胞老化反応の体内動態を継時的に観察できるインビボ・イメージングシステムの構築に成功していた。また、同様のイメージングマウスを用いて、肥満により発症する肝癌に細胞老化が関与していることも見出していた。そこで、これらのイメージングマウスを IL-6 を含む SASP の主要な構成因子をコードする遺伝子を欠失したノックアウトマウスと交配させ、主要な SASP 因子を欠失した状態で DMBA/TPA 処理を施したり、肥満による肝癌発症を促進した場合における、細胞老化反応の体内動態と癌の進展状態を詳細に解析した。更に癌微小環境に変化がないかどうかを癌幹細胞のマーカーや腫瘍関連線維芽細胞のマーカー等を指標にして検討した。また、逆に recombinant IL-6 等の SASP 因子を投与した場合に癌微小環境に変化がないかどうかについても検討を行った。

(3) 癌微小環境における細胞老化の役割をより直接的に調べるために、薬剤投与によりマウスの生体内に存在する老化細胞を死滅させることができる遺伝子改変マウスの作成を行なった。我々は、様々な老化細胞に共通して発現レベルが上昇する遺伝子をマイクロアレイを用いた解析から絞り込んだが、その中で最も共通性が高く、悪性腫瘍組織の間質でも高発現している遺伝子が p16^{INK4a} 遺伝子であることを見出した。そこで、p16^{INK4a} 遺伝子をジフテリアトキシンのレセプター遺伝子で置き換えたノックインマウスの作成を試みた。一方、ノックインマウスの場合、導入した遺伝子がエピジェネティックな機

構によりサイレンシングされて発現しない可能性もあるので、念のため、完全長の p16^{INK4a} 遺伝子座を含む BAC ベクターを用いたトランスジェニックマウスの作成も行った。これらのマウスの中でうまく機能したマウスラインを用いて SASP の生体内での機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞老化が起こると、何故 SASP が起こるようになるのか? を明らかにすべく解析を試みた結果、主に次のことを明らかにした。

細胞老化を誘導するような修復不可能な DNA 損傷が生じると、DNA 損傷応答により ATM が活性化され、ATM により活性化型のユビキチンリガーゼである APC/C^{Cdh1} 複合体の形成が促進される。通常、SASP 遺伝子の多くは転写制御領域のヒストン 3 リジン 9 が G9a/GLP により高度にジメチル化 (H3K9me2) されているために発現が低く抑えられている。しかし、ATM により APC/C^{Cdh1} が活性化されると、G9a/GLP がポリユビキチン化されてプロテアソーム依存的にタンパク分解を起こす。このために H3K9me2 レベルが維持されなくなり、その結果、SASP 因子をコードする多くの遺伝子の発現レベルが上昇することを培養したヒトの線維芽細胞を用いた実験により明らかにした。さらに同様のメカニズムが老化したマウス個体の様々な組織においても起こっていることを示唆する結果を得た。つまり細胞老化の原因とされる DNA 損傷応答によって H3K9me2 レベルが低下することで SASP が起こることを明らかにした (Takahashi *et al.*, *Molecular Cell*, 2012 に発表)。

(2) SASP 因子が癌微小環境の形成及び維持にどのような役割を果たしているのか? を明らかにすべく研究を行い、以下の研究結果を得た。

肥満により肝臓癌の発症を促進するマウスモデルの作成に成功し、更にそのマウスの肝臓部位に老化細胞が蓄積していることを見出した。そこで、次に代表的な SASP 遺伝子である IL-6 遺伝子を欠失したノックアウトマウスを用いて解析を試みたが、このノックアウトマウスは依然として他の複数の SASP 因子を発現しているために IL-6 を欠失させただけでは SASP 因子の機能を阻害することが困難であることがわかった。一方、先行研究により IL-1 α の活性化が IL-6 を含む他の多くの SASP 因子の発現に必要であることが報告されていた。そこで肝臓細胞に発現している IL-1 α のホモログである IL-1 β を欠失したノックアウトマウスを用いて一連の肥満実験を行ったところ、SASP が起こらな

くなると同時に肝臓の発症率も著しく低下することが明らかとなった。さらに、この影響が肥満マウスで細胞老化を起こしている肝臓細胞に由来していることを確認するためにマウスの尾静脈から HSP47 に対する siRNA オリゴを注射することで SASP 因子を発現している肝臓細胞を特異的に死滅させることを試みた。その結果、約 80% の老化細胞を死滅させることに成功し、更にこの処置により肝臓癌の発症及び進展が著しく抑制されることを見出した。これらの結果は老化細胞が分泌する SASP 因子が肥満に伴う肝臓癌の発症および進展に促進的な役割を果たしており、癌微小環境の進展・維持に重要な働きをしていることを示している (Yoshimoto *et al.*, *Nature*, 2013 に発表)。

(3) 生体内で老化細胞を選択的に除去すると癌微小環境がどのように変化するか? を明らかにすべく解析を試みた結果以下の研究結果を得た。

マウスに薬剤を投与することにより p16^{INK4a} 遺伝子を高発現している老化細胞を選択的に死滅させることができる遺伝子改変マウス (ノックインマウスおよびトランスジェニックマウス) の作成を試みた。残念ながらノックインマウスの方は細胞死を誘導するのに十分なほど挿入した遺伝子が発現しなかったため、解析には使えなかったが、トランスジェニックマウスの方は老化細胞を選択的に死滅させることができることが確認された。そこで、このトランスジェニックマウスを用いて、癌微小環境における細胞老化および SASP の影響を解析すべく実験を試みたが、ノックインマウスからトランスジェニックマウスにシフトするのに時間がかかったため、まだ結果が出ていない。一方、癌化は組織の損傷治癒の過程と類似しているため、このトランスジェニックマウスを用いて、もっと短期間に結果が出る損傷治癒の過程での細胞老化および SASP の役割についても先行して解析を行った。その結果、マウスの皮膚に傷をつけると線維芽細胞が細胞老化を起こして SASP 因子を分泌することで損傷治癒を促進していることが明らかとなった。この結果は損傷治癒と類似のステップが多い癌の進展過程にも SASP が促進的な役割を果たしている可能性が高いことを示唆している (Demaria *et al.*, *Developmental Cell*, 2014 に発表)。

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 14 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^{INK4a} 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^{Ink4a} 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. *Ohtani N, and Hara E.
Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. **Cancer Science** (2013) 104:525-530. doi: 10.1111/cas.12118. (査読有)
 11. 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)
 12. Takahashi, 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. and *Hara, E.
DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. **Molecular Cell** (2012) 45: 123-131. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018. (査読有)
 13. Tateishi Y, Matsumoto A, Kanie T, Hara E., Nakayama K, and* Nakayama KI.
Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun.** (2012) 427:285-292. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.041. (査読有)
 14. Ohtani N, Takahashi A, Mann DJ, and *Hara E.

Cellular senescence: a double-edged sword
Experimental Dermatology (2012) 21
Suppl 1:1-4. doi:
10.1111/j.1600-0625.2012.01493.x. in the
fight against cancer. (査読有)

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Eiji Hara, “Gut microbiota and fatty liver disease” Gut microbiota for health world summit 2015, (Barcelona, Spain) March 14-15, 2015
2. 原 英二, 「肥満と肝がん:腸内細菌の関与について」第 24 回泌尿器科分子細胞研究会(東京)2015 年 2 月 27 日
3. 原 英二, 「肥満と肝がん:腸内細菌の関与について」第 11 回酸化ストレスと肝研究会(福岡)2015 年 2 月 14-15 日
4. 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
5. Eiji Hara, “Cellular senescence and cancer: a gut microbial connection” Joint International Symposium on **TGF- β family and Cancer** Signal Network in Tumor Microenvironment (つくば市) 2015 年 1 月 12-13 日
6. 原 英二, 「肥満とがん:細胞老化の関与について」第 4 回 Metabolism Scientific Forum(東京) 2014 年 12 月 20 日
7. 原 英二, 「肥満と肝癌:細胞老化と腸内細菌の関与について」第 28 回肝臓洞壁細胞研究会(岡山) 2014 年 12 月 13 日
8. Eiji Hara, “Obesity and cancer: a gut microbial connection” 日本免疫学会シンポジウム(京都)2014 年 12 月 12 日
9. 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
10. 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
11. 原 英二, 「細胞老化と発癌:腸内細菌の関与について」第 35 回日本肥満学会シンポジウム(宮崎)2014 年 10 月 24 日
12. 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
13. Eiji Hara, “Relationship between obesity, gut microbiome and HCC development”Falk Gastro-Conference, (Freiburg, Germany) October 8-11, 2014
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. Eiji Hara, “Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer via senescence secretome” Cold Spring Harbor Asia Conference (Suzhou, China) May 19-23, 2014
20. 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
21. 原 英二, 「肥満と癌:細胞老化の関与について」第 10 回肝免疫・ウイルスフロンティア(東京)2014 年 4 月 5 日
22. Eiji Hara, “Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome.” US-Japan joint meeting on biomarkers for early cancer detection. (Gaithersburg, USA). February 10-11, 2014.
23. Eiji Hara, “ DNA damage response and cellular senescence in cancer and aging.” Korean Society for Molecular and Cellular Biology. (Seoul, South Korea) October 9-11, 2013.
24. 原 英二, 「細胞老化のがん化と老化における役割」日本生化学会(横浜)2013 年 9 月 12-14 日

25. Eiji Hara, “DNA damage response and cellular senescence.” 9th AACR-JCA joint conference. (Maui, USA). February 21-25, 2013.
26. Eiji Hara, “The role of cellular senescence in cancer and aging.” 日本分子生物学会 (福岡)2012年12月11-14日
27. Naoko Ohtani and Eiji Hara, “Senescence-associated Secretory Phenotype (SASP) promotes obesity-associated hepatocarcinogenesis.” Keystone Symposium (Tokyo) October 22-26, 2012.
28. Eiji Hara, “The roles and mechanisms regulating cellular senescence.” 日本癌学会(札幌)2012年9月19日 21日
29. Eiji Hara, “Cellular senescence: a double edged sword in the fight against cancer.” International Symposium on Clinical and Translational Cancer Research. (Kaoshun, Taiwan) May 17-18, 2012.
30. 原 英二 「細胞老化の分子機構とその役割」日本血管生物学会(東京) 2011年12月14日
31. 原 英二 「The roles and mechanisms regulating cellular senescence in aging and cancer」日本分子生物学会(横浜) 2011年12月10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)

研究者番号：80263268