

令和元年6月12日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00878

研究課題名(和文) 老化関連分泌表現型(SASP)メカニズム解明とSASP抑制性食品由来分子の同定

研究課題名(英文) Identificaiton of nutritional factors which suppress SASP

研究代表者

本山 昇(MOTOYAMA, NOBORU)

椋山女学園大学・生活科学部・教授

研究者番号：50277282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化、とりわけ炎症性サイトカインなどの液性因子を分泌する細胞老化付随分泌現象(SASP)は、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。このような観点からSASPの制御は老年性疾患の予防・治療のターゲットとなる。そこで本研究では、SASP因子発現を制御する食品・天然物由来生理活性分子の探索を行うことを目的として進め、スイカなどに豊富に含まれるカロテノイドは、細胞老化誘導時に添加すると細胞老化誘導には影響しないが、SASP因子の発現を抑制することを明らかにした。また、ゴシュユに含まれるアルカロイドは、老化細胞に添加することでSASP因子の発現を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化および老年性疾患の発症に関与する細胞老化付随分泌現象(SASP)を抑制する天然物・食品由来の成分の同定を行った。これらの研究成果から薬ではなく「食の面から健康を支える」ことのできる予防効果が期待される食品・天然物を示すことができる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence, especially senescence-associated secretory phenotype (SASP), have been implicated in the development of several age-related diseases and aging. Thus, the regulation of SASP is a potent target for preventive and clinical treatment of age-related diseases. In this study, I have identified the components derived from food and natural product which suppress SASP. Carotenoid in water melon and alkaroid in Evodia rutaecarpa suppressed the expression of SASP components without inhibiting cellular senescence induction.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 老化 SASP 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

細胞老化 (Cellular Senescence) とりわけ、炎症性サイトカインなどの液性因子を分泌する細胞老化付随分泌現象 (Senescence-associated secretory phenotype : SASP) は、がん化、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。SASP 因子の発現を制御することによって老年性疾患の発症や個体老化の遅延が可能であると考えられるが、薬などによる極端な阻害は時に生体にとって有害である。食品による介入は生体の恒常性を維持しつつ老年性疾患などの発症を遅延させ健康寿命を延長させる有効な手段の一つと考えられる。

## 2. 研究の目的

SASP 獲得の分子メカニズムを明らかにするとともに、SASP 因子発現を抑制する食品・天然物由来生理活性分子の探索を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト皮膚由来線維芽細胞 BJ 細胞に、ヒトテロメラーゼ触媒ユニット hTERT を導入して不死化した BJ/TERT 細胞および細胞周期制御因子 p21 に対する shRNA を導入し p21 を knockdown した BJ/TERT-shp21 細胞を用いた。細胞老化は、Doxorubicin による DNA 損傷、過酸化水素水による酸化ストレス、Sodium Butyrate およびによるクロマチン構造の破綻を引き起こすことにより誘導した。経時的に細胞形態の観察と細胞老化のマーカーの一つである Senescence-associated  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 活性を SA- $\beta$ -Gal 染色によって検討した。また、細胞老化関連たんぱく質の発現変化を SDS-PAGE-ウェスタンブロット解析、SASP 因子である IL-1、IL-6、IL-8 mRNA の発現変化をリアルタイム PCR 法により検討した。また、食品由来因子および天然物因子を細胞老化誘導前から誘導時、または細胞老化誘導後に添加し、細胞老化誘導および SASP 因子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

ヒトテロメラーゼ触媒ユニット hTERT を導入することによって不死化したヒト線維芽細胞 BJ/TERT を用いて、DNA 損傷、酸化ストレス、クロマチン構造の破綻による細胞老化誘導条件の検討を行った。DNA 損傷は抗がん剤である Doxorubicin、酸化ストレスは過酸化水素水、クロマチン構造の破綻は Sodium Butyrate を用い、刺激後細胞の変化、SA- $\beta$ -Gal 活性、SIRT1、p53、p21、GATA-4 タンパク質の発現変化、SASP 因子である IL-1、IL-6、IL-8 mRNA の発現変化を検討して適正な細胞老化誘導条件を確立した。

細胞周期制御因子 p21 (CDKN1A) は、細胞老化誘導因子として知られている。そこで細胞老化誘導における p21 の機能を明らかにするために、レンチウイルスベクターを用いて p21 mRNA に対する shRNA を導入し p21 の発現を抑制した BJ/TERT-shp21 細胞を用いて検討した。BJ/TERT 細胞および BJ/TERT-shp21 細胞に Sodium Butyrate 処理により細胞老化を誘導した。BJ/TERT 細胞においては、p21 タンパク質の発現が著しく上昇した。一方、BJ/TERT-shp21 細胞においては p21 タンパク質の発現がほとんど認められず、p21 タンパク質の発現抑制が確認された。細胞老化を誘導後経時的に細胞の形態および SA- $\beta$ -Gal 活性を SA- $\beta$ -Gal 染色により検討した。BJ/TERT 細胞および BJ/TERT-shp21 細胞ともに、細胞老化誘導により細胞分裂の停止、細胞の扁平化・巨大化が認められた。細胞老化のマーカーの一つである SA- $\beta$ -Gal 染色を行った結果、BJ/TERT 細胞及び BJ/TERT-shp21 細胞と

もに SA-βGal 陽性細胞が検出され、p21 は細胞老化誘導には必須ではないことを明らかにした。さらに、BJ/TERT 細胞及び BJ/TERT-shp21 細胞において細胞老化誘導後の SASP 因子の発現を検討した。その結果、BJ/TERT 細胞と比較して、BJ/TERT-shp21 細胞においては著しい SASP 因子の発現増加が認められた。まとめると、p21 は細胞老化誘導に必須ではないが、SASP 因子の発現に抑制的に作用することを明らかにした。

細胞老化および SASP 発現を抑制する食品由来因子および天然物因子を探索した。ポリフェノールを豊富に含むローズ花びら抽出物について検討した。細胞老化誘導と同時にローズ抽出物で 4 日間処理し無添加培地に置換し、10 日後に SASP 因子である IL-1、IL-6 および IL-8 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、ローズ抽出物の添加により SASP 因子の発現上昇が認められた。また、大豆、ゴシュユ、およびスイカなどに含まれる活性因子について検討した。Doxorubicin による細胞老化誘導と同時に食品・天然物由来因子で 3 日間処理し無添加培地に置換し、10 日後に SASP 因子である IL-1、IL-6 および IL-8 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、SASP 因子の発現を制御する因子を同定した。中でも、トマトに含まれるカロテノイドの一種およびゴシュユの含まれる因子が SASP 因子の発現を抑制することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Barabino A, Plamondon V, Abdouh M, Chatoo W, Flamier A, Hanna R, Zhou S, Motoyama N, Hebert M, Lavoie J, Bernier G. Loss of Bmi1 causes anomalies in retinal development and degeneration of cone photoreceptors. *Development* 143: 1571-1584, 2016.
- 2) Gokare P, Navaraj A, Zhang S, Motoyama N, Sung SS, Finnberg NK. Targeting of Chk2 as a countermeasure to dose-limiting toxicity triggered by topoisomerase-II (TOP2) poisons. *Oncotarget* 7: 29520-29530, 2016.
- 3) Choo DW, Goh SH, Cho YW, Baek HJ, Park EJ, Motoyama N, Kim TH, Kim JY, Kim SS. CHK2 is involved in the p53-independent radiosensitizing effects of valproic acid. *Oncol Lett* 13: 2591-2598, 2017.
- 4) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential Roles of Rad18 and Chk2 in Genome Maintenance and Skin Carcinogenesis Following UV Exposure. *J Invest Dermatol* 138: 2550-2557, 2018.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Hayakawa T, Kimura Y, Nagasaki M, Nagata M, Morimoto R, Maruyama M, Motoyama N. p21 negatively regulates DNA damage-induced pro-inflammatory response during senescence. “Aging, Inflammation and Immunity”, Keystone Symposia, February 25-March 2, 2018, Austin, TX, USA.
- 2) 本山 昇. がん化と老化を制御する細胞老化と SASP. 第 40 回日本基礎老化学会大会, アフタヌーンセミナー, 2017 年 6 月 16 日, 名古屋

3 ) Hayakawa T, Morimoto R, Kimura Y, Nagasaki M, Nagata M, Maruyama M,  
**Motoyama N**. SIRT1 regulates the expression of p21 during cellular senescence.  
Aging and Metabolism, Cell Symposia, Sep 23-25, 2018, Sitges, Spain