

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15239

研究課題名(和文)細胞老化促進マウスを用いた加齢制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanisms of aging using senescence-acceleration mice

研究代表者

中西 真(Nakanishi, Makoto)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40217774

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)：細胞老化誘導が加速したマウスにおいて、加齢性変化促進し寿命が短くなるかどうかを明らかにする目的で、非分解型Claspinを発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウス由来の線維芽細胞は低レベルの細胞老化誘導ストレスにおいても有意に老化誘導が亢進していることを確認した。このマウスを1年半程度飼育していると、野生型マウスは羸瘦や脊柱彎曲、行動遅延といった加齢性変化を認めないが、細胞老化促進マウスにおいてはこれらの加齢性変化が認められた。以上の結果は、細胞老化促進マウスでは個体の加齢が促進するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify whether acceleration of cellular senescence enhances age-related changes in vivo and shorten the lifespan, we generated senescence acceleration mice using non-degradation mutant of Claspin. Mouse embryonic fibroblasts from transgenic mice harboring non-degradation mutant of Claspin (Senescence acceleration mice) showed a significant higher sensitivity to senescence upon low level of genome stresses than those from wild-type mice. Interestingly, the senescence acceleration mice exhibited acceleration of some age-associated phenotypes such as emaciation, lordokyphosis, and inactive. These results thus suggest that high senescence sensitivity accelerates aging phenotypes in vivo.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞老化

1. 研究開始当初の背景

ヒトはなぜ老いるのか？この疑問は人類にとり最も大きな命題の一つである。これまで多くのプログラム説、あるいはエラー蓄積説等、多くの仮説が老化の原因として提唱されているが、未だ老化の明確な原因は全く不明である。最近、マウス早老症モデル個体から老化細胞を除去すると、老化・老年病の発症が有意に遅延する事が報告され、細胞老化が個体老化の主原因である事が示唆された (Nature, 2011)。細胞老化は正常細胞の分裂寿命により生じる恒久的増殖停止を主徴とする細胞表現で、分裂寿命の他、がん遺伝子活性化、DNA 損傷等によっても誘導され、個体における抗腫瘍機構として作用すると考えられている。申請者らはごく最近、細胞老化誘導機構を世界に先駆け明らかにし (Mol Cell, 2014)、その誘導が ATM-p53-p21 経路と ATR-Chk1-Cdk1 経路活性化の時間差により制御される事を見出した。すなわち、細胞老化は p53 が G2 期に活性化される事で誘導されるため、Chk1 活性化時間が延長して G2 期の細胞集団が増えることが、老化誘導を促進すると考えられる。申請者らは ATR を活性化する TopBP1 活性化ドメイン、あるいは非分解型 Claspin を細胞に発現すると、低レベルの DNA 損傷や複製ストレスで有意に G2 期停止が延長することを見出し、細胞老化誘導が促進される事を明らかにした (Johmura et al. Sci. Rep 2016)。

2. 研究の目的

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している。最近、マウス個体から老化細胞を除去すると、老化・老年病の発症が有意に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事が示された。しかしながら、個体老化の原因として老化細胞の蓄積が重要か、組織幹細胞の細胞老化に伴う幹細胞再生能力の低下が重要か全く分かっていない。申請者らは細胞老化の原因が、G2 期で p53 が活性化され、細胞分裂期を回避する事であることを明らかにし、人工的 G2 期チェックポイント延長により細胞老化を促進する系を確立した。本研究ではこの系を、体細胞および組織幹細胞特異的に導入し、個体老化の原因が、老化細胞の蓄積か、細胞老化に伴う幹細胞の機能不全によるものかを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、申請者らの確立した細胞レベルでの老化誘導促進系を個体レベルに応用し、個体老化における細胞老化の役割を明確にすることを目的としている。具体的な計画は以下の通りである。

1. CAG プロモーターの下流に非分解型 Claspin 変異体を挿入したカセット遺伝子を用いて、トランスジェニックマウスを作製する。
2. 作製したトランスジェニックマウスから、

それぞれ線維芽細胞、神経幹細胞、造血幹細胞を樹立し、低レベルの DNA 損傷、あるいは複製ストレス存在下で細胞老化が促進する事を確認する。

3. 作製したトランスジェニックマウスを用いて、通常状態、低ゲノムストレス、高ストレス状態での各臓器への老化細胞の蓄積、臓器機能の解析、発がん程度、および寿命について解析する。

4. 研究成果

非分解型 Claspin 遺伝子を CAG プロモーター下流に挿入したカセット遺伝子を用いてトランスジェニックマウス (Claspin TG マウス) を作製した。作製したマウスは見かけ上全く正常であり、メンデルの法則に従って生まれてくることがわかった。

この Claspin TG マウス由来の胎児線維芽細胞は野生型マウス由来の線維芽細胞に比較して低レベルの DNA 障害に対して細胞老化誘導に高感受性を示した (図 1)。このことから Claspin TG マウスは細胞老化促進マウスであることが証明された。

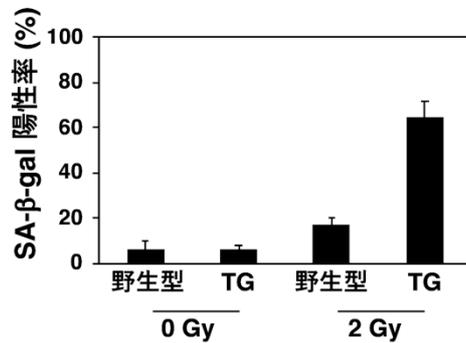


図1 野生型および非分解型ClaspinTGマウス(TG)由来のMEFsに2Gy投与した後の細胞老化誘導をSA-beta gal染色で評価した。

このマウスを長期間にわたり飼育したところ、加齢に伴う羸瘦が促進していることが分かった (図 2)。このことから細胞老化蓄積は個体の加齢性変化を促進することが示唆された。現在、他の加齢性変化の促進について解析を進めている。

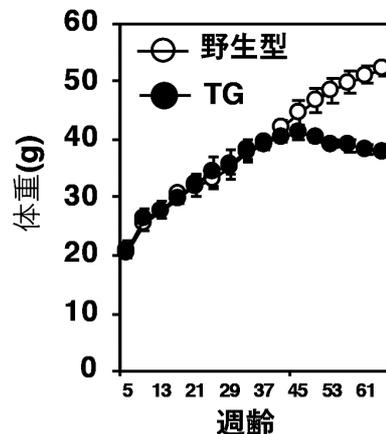


図2 野生型およびTGマウスの体重変動

細胞老化は恒久的な増殖停止を主徴とする細胞形質であるため、個体におけるがん化を抑制する分子機構であると

示唆されていた。この点を実験的に証明するために、Claspin TG マウスを用いて AOM/DSS による大腸化学発がん実験を実施した。その結果、Claspin TG マウスでは野生型マウスと比較して大腸化学発がんが有意に抑制されていることが分かった (図3)。

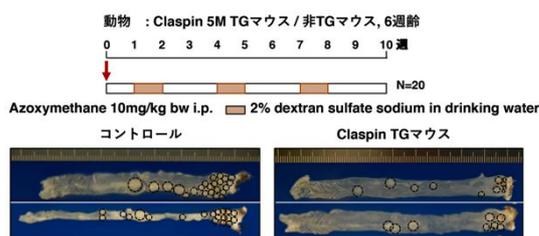


図3 AOM/DSS投与後の野生型およびTGマウスの大腸腫瘍

興味深いことに Claspin TG マウスでの発がん抑制は、がんのイニシエーションの抑制であり、プロモーションにはまったく影響を与えなかった。このことは細胞老化誘導が発がん発症のイニシエーションを抑制するというコンセプトによく一致する結果であると考えている。

#### 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 5件)

1. Yamaguchi, L., Nishiyama, A., Misaki, T., Johmura, Y., Ueda, J., Arita, K., Nagao, K., Obuse, C. and Nakanishi, M.  
Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Sci Rep* 7(1):55.(2017)  
doi:10.1038/s41598-017-00136-5. 査読 有
2. Ishiyama, S., Nishiyama, A., Saeki, Y., Moritsugu, K., Morimoto, D., Yamaguchi, L., Arai, N., Matsumura, R., Kawakami, T., Mishima, Y., Hojo, H., Shimamura, S., Ishikawa, F., Tajima, S., Tanaka, K., Ariyoshi, M., Shirakawa, M., Ikeguchi, M., Kidera, A., Suetake, I., Arita, K. and Nakanishi, M.  
Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Mol Cell* 68(2):350-360.(2017)  
doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.037. 査読 有
3. Suzuki, A., Okuda, K., Yano, M., Oda, R., Sakane, T., Kawano, O., Haneda, H., Moriyama, S., Nakanishi, M. and Nakanishi, R.  
Exon 7 splicing variant of estrogen receptor  $\alpha$  is associated with pathological invasiveness in smoking-independent lung adenocarcinoma.

*Oncol Lett* 14(1):891-898.(2017)

doi: 10.3892/ol.2017.6216. Epub 2017 May 19. 査読 有

4. Iwata, T., Uchino, T., Koyama, A., Joumura, Y., Koyama, K., Saito, T., Ishiguro, S., Arikawa, T., Komatsu, S., Miyachi, M., Sano, Y., Nakanishi, M. and Shimada, M.  
The G2 checkpoint inhibitor CBP-93872 increases the sensitivity of colorectal and pancreatic cancer cells to chemotherapy. *PLoS One* 12(5).(2017)  
doi:10.1371/journal.pone.0178221.  
eCollection 2017. 査読 有
  5. Negishi, Y., Miya, F., Hattori, A., Johmura, Y., Nakagawa, M., Ando, N., Hori, I., Togawa, T., Aoyama, K., Ohashi, K., Fukumura, S., Mizuno, S., Umemura, A., Kishimoto, Y., Okamoto, N., Kato, M., Tsunoda, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Kosaki, K., Nakanishi, M. and Saitoh, S.  
A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of P13K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. *BMC Med Genet* 18(1):4.(2017)  
doi:10.1186/s12881-016-0363-6. 査読 有
- [学会発表](計 5件)
1. Makoto Nakanishi.  
Molecular coupling between DNA methylation maintenance and DNA replication. *L'Institut Curie*. 2017
  2. Makoto Nakanishi.  
Molecular coupling between DNA methylation maintenance and DNA replication. *University of Copenhagen*. 2017
  3. Makoto Nakanishi.  
Mechanism of senescence induction and maintenance and their role in aging. *東北大学研究推進・支援基地の創出センター/Aging Science: from Molecules to Society*. 2017
  4. 中西 真  
エピゲノム修飾を介したオートファジー制御とがん  
がんシリーズ第6回 エピゲノム情報に基づくがんの制御. 2017
  5. 中西 真  
細胞老化と前立腺疾患  
第20回 UPT シンポジウム. 2017
- [図書](計 1件)
1. 城村 由和、中西 真  
羊土社

実験医学 2017年9月号  
2017年、6ページ  
〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中西 真 ( Makoto Nakanishi )  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：40217774

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )