

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01862

研究課題名（和文）細胞老化に伴うストレス抵抗性変化機構の解明に基づく積極的な老化細胞防御法の探索

研究課題名（英文）Study on active intervention for protecting senescent cells based on the mechanism of changes in stress resistance accompanying cellular senescence

研究代表者

齋藤 靖和 (Saitoh, Yasukazu)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：90405514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々の体を構成する多くの細胞は加齢に伴い老化する。細胞老化により細胞の形態や機能は変化するが、ストレスなどの外的因子に対する細胞の感受性が変化するかどうか、ストレスから細胞を防御する化合物の有効性が変わるかどうかは不明であった。そこで今回我々は、細胞老化が酸化ストレス感受性に及ぼす影響と老化細胞に有効なストレス防御物質の探索を行った。その結果、ヒト線維芽細胞は老化細胞に伴い細胞内酸化ストレスレベルが増強されることを明らかにし、一部のスチルベノイド類が非老化細胞だけでなく老化細胞に対して優れた細胞傷害抑制効果を示すことを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢と共に体内に蓄積される老化細胞の性質の究明により、病気の発症原因やその予防への介入を可能とする様々な証拠が得られることが期待される。今回の研究により、細胞老化によりストレス抵抗性が高まることが分かり、体内に蓄積される老化細胞は非老化細胞とは異なる性質を有していることが明らかとなった。また、スチルベノイド類が細胞の老化度に関わらず優れた細胞傷害抑制効果を示す化合物であることを新たに見出した。老化細胞については、除去・沈静化といったアプローチが試みられ始めているが、今回得られた知見は、将来の老化細胞制御に向けた学術的な貢献につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Many cells, which are composed human body, become senescent over time. Although cellular senescence induces morphological changes and cellular functions, it has been unclear whether cellular susceptibilities for exogenous stimuli such as stress and efficacies of chemical compounds on suppression of cellular injury are affected by cellular senescence. In the present study, we investigated the effects of cellular senescence on cellular susceptibility to oxidative stress, and tried to discover the efficient protective biomolecules against oxidative stress-induced injury in human senescent fibroblasts. As a result, we found that senescent cells enhanced the oxidative stress resistance, and some of stilbenoids were effective against oxidative stress-induced cellular injury in senescent cells as well as non-senescent cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 酸化ストレス SASP 活性酸素 紫外線 ストレス防御 線維芽細胞 スチルベノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は老化する。ヒトにおいても加齢に伴い体内で老化細胞の出現・蓄積が起こることが知られている。加齢に伴う老化細胞の蓄積やその死滅による細胞数減少は、細胞機能の変化(異常)を介して組織や器官の機能に影響を与え、疾病発症やその進展、発がんなどに関与していると考えられている。

細胞老化は細胞機能に様々な変化をもたらす。細胞老化に伴い細胞の増殖速度は低下し、細胞サイズの増大、細胞の肥大・扁平化、テロメアの短小化が起こるだけでなく、遺伝子の発現プロファイルも大きく変化していることを我々はDNAマイクロアレイ等により、これまでに見出してきた(1)。また、近年、細胞老化を起こした細胞はサイトカインやケモカインなど炎症や発がんを促進する様々な因子を分泌していることが分かってきた。この現象は細胞老化関連分泌現象(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)と呼ばれており、分泌細胞自身や周囲の細胞に対して様々な影響を与える。我々はこれまでに細胞老化に伴い、ヒト線維芽細胞において炎症性サイトカイン等の発現が大きく増加していることをGene ChipやリアルタイムPCR解析から見出しており、さらに、老化細胞では細胞内酸化ストレスの増大が起こるなど、細胞内外の環境に大きな変化が生じていることを明らかにしてきた(2)。

これらの細胞老化に伴う変化に加え、最近、我々は細胞老化が薬剤に対する応答性やその影響に違いを生み出す可能性を見出していた。例えば、代表的な水溶性抗酸化物質の一つであるビタミンC(VC)を若い細胞(累積分裂回数が少ない)と老化した細胞(累積分裂回数が多く、ほとんど分裂しない)に与えた場合、老化細胞の方が約2倍VCを細胞内に多く取り込む(2, 3)。また、細胞内酸化ストレスに対するVCの影響も老若細胞間で異なっており、VCを細胞に与えた場合、老化細胞では、VCは細胞内酸化ストレス軽減に大きな効果を発揮するが、若い細胞ではほとんど影響がないという応答性の違いがあることも報告している(2)。この結果は、若い細胞は、細胞内酸化ストレスのコントロールには自前の抗酸化機構で十分対応可能だが、老化細胞は、その機構の減弱等によりコントロール不足に陥っており、老化細胞が若い細胞と同様の細胞内環境を維持するためには抗酸化物質の補給などのサポートが必要なこと示唆している。

こういった背景から、細胞老化に伴いストレスなどの外的因子に対する細胞の感受性は変化しており、ストレスから細胞を防御する化合物の有効性も細胞が若い頃とは異なっているのではないかと、そして、老化細胞へのストレス傷害を積極的に緩和することで疾病予防や健康増進につながるのではないかと考えた。生体内では、組織における細胞傷害・細胞死が起こるとその修復のため、周辺細胞が分裂を繰り返して欠損部分を補うが、その繰り返しにより細胞老化は広がっていく。老化してなお残存している細胞はいわば替えがほとんど効かない細胞の可能性があり、その死滅の亢進は組織機能の低下へと直結するため、老化細胞を維持・存続させる意義もあるはずではないかと考えた。

2. 研究の目的

細胞老化に伴うストレス抵抗性変化を含む老化細胞の特徴を明らかにしていくと共に、老化細胞のストレス防御に適した化合物を探索することを目的に、(1)ヒト線維芽細胞の細胞老化に伴うストレス応答性の変化および他細胞への影響、(2)老化細胞に有効なストレス防御物質の探索について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞老化に伴うストレス応答性の変化

ヒト由来の線維芽細胞2種(TIG-1細胞、NB1RGB細胞)について、継代培養を繰り返すことにより細胞を老化させた老化細胞を取得し、検討に用いた。細胞老化については顕微鏡観察および粒度分析装置による細胞老化に伴う形態異常および細胞サイズの変化や老化マーカーの一つである senescence-associated galactosidase(SA-β-gal)活性の評価により確認を行った。得られた老化細胞を用いて以下の検討した。

細胞老化に伴うストレス抵抗性の変化

TIG-1細胞の非老化細胞および老化細胞を用い、酸化ストレスおよび光ストレスをストレスーとして選択し、過酸化水素、*tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BuOOH)、Cumene hydroperoxide 曝露および紫外線 A 波(UVA)、紫外線 B 波(UVB)照射に対する細胞傷害抵抗性を調べた。また、非老化細胞および老化細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、リアルタイム PCR により抗酸化関連やストレス応答関連遺伝子などの発現変化を調べた。

細胞老化に伴う細胞内酸化ストレスレベルの変化

TIG-1細胞の非老化細胞および老化細胞を用い、6-carboxy-2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (CDCFH-DA)法および Nitro Blue Tetrazolium(NBT)色により細胞老化に伴う細胞内酸化ストレスレベルの変化を評価した。

細胞老化に伴う紫外線照射に対する応答性の変容

光老化に関わるストレスとして皮膚線維芽細胞へ到達可能な波長領域である UVA に着目し、細胞老化がヒト線維芽細胞 NB1RGB の UVA 照射後の細胞応答に与える影響についてリアルタイム PCR により解析した。

細胞老化に伴う SASP が周囲の非老化細胞に与える影響

TIG-1細胞の非老化細胞および老化細胞の培養上清を回収し(SASP が含有していると想定)それぞれ非老化細胞に24時間(短時間)あるいは5日間(長時間)曝露した後の細胞内酸化ストレスレベルを CDCFH-DA 法及び NBT 法で、遺伝子発現への影響をリアルタイム PCR により解析した。

(2) 老化細胞に有効なストレス防御物質の探索

酸化ストレスによる細胞傷害を抑制する化合物については、既に多くの報告があり、我々もビタミン C など様々な物質の有効性をこれまでに報告してきたが、細胞老化とその防御効果の関連性については分かっていない。そこで、非老化、老化細胞間で感受性に違いの見られた *t*-BuOOH を指標ストレスーとして用い、TIG-1細胞への細胞傷害防御効果についてスチルベノイドを中心に非老化・老化細胞における防御効果の違いについて検討した。

4. 研究成果

まず、ヒト由来の線維芽細胞2種(TIG-1細胞、NB1RGB細胞)について、継代培養を繰り返すことにより細胞の肥大・扁平化、SA-β-gal 陽性率の顕著な増加が認められ、細胞老化を確認した。得られた老化細胞を検討に用いた。

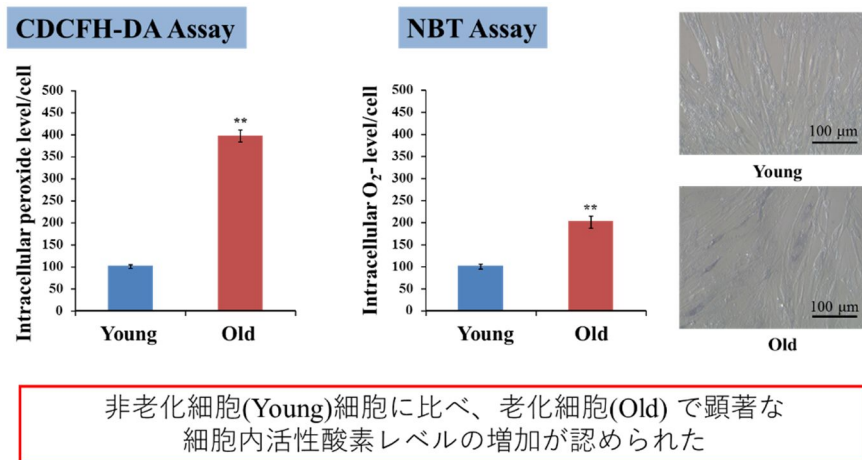
(1) 細胞老化に伴うストレス抵抗性の変化

細胞老化に伴うストレス抵抗性の変化

TIG-1 細胞の細胞老化に伴う各種ストレスに対する抵抗性への影響について検討を行ったところ、いずれのストレス曝露に対しても、老化細胞の方が有意に高い細胞傷害抵抗性を示した。特に、UVA および *t*-BuOOH 曝露における抵抗性が増強されていた。細胞老化によりストレス抵抗性が高まること、ストレスの種類によりその程度に違いがあることを確認された。また、リアルタイム PCR の結果から老化細胞において、複数の抗酸化系遺伝子の発現上昇が認められ、細胞老化に伴う酸化ストレス抵抗性増強への関与が推察された。

細胞老化に伴う細胞内酸化ストレスレベルの変化

老化細胞に伴い細胞内酸化ストレスレベルが増加することも CDCDH-DA フルオロメトリーおよび NBT 法により確認され、細胞老化に伴い、細胞内酸化ストレスレベルが増大することが明らかとなった(下図)。



細胞老化に伴う紫外線照射に対する応答性の変容

非老化細胞では UVA による細胞増殖能の変化は見られず、老化細胞では UVA による増殖抑制傾向が見られた。一方、細胞老化により、コラーゲンおよびエラスチン遺伝子が有意に減少し、それらの分解酵素である複数の matrix metalloproteinase 遺伝子の発現が有意に増加した。さらに、複数の SASP 関連遺伝子の有意な増加も確認された。UVA 照射により、非老化細胞、老化細胞ともに、それぞれ異なる複数の遺伝子で発現の増減が見られた。しかし、細胞老化による遺伝子発現の変化と比べると弱い変化であった。これらの結果より、皮膚線維芽細胞の細胞老化に伴う細胞増殖能の低下、皮膚の機械的強度や弾力に関わる遺伝子発現の減少、それらの分解酵素の遺伝子発現の上昇が、シワやたるみといった皮膚老化に特徴的な表現型の主たる要因になっていると示唆された。

細胞老化に伴う SASP が周囲の非老化細胞に与える影響

非老化細胞への短時間の老化細胞上清曝露により細胞内酸化ストレスレベルの変化が確認されると共に、IL-6、IL-8 等の発現上昇が確認された。また、長時間の老化細胞上清曝露により、老化細胞の特徴である細胞増殖能の低下、SA-β-gal 陽性率の上昇が確認され、SASP は非老化細胞に細胞老化を引き起こしている可能性が示唆された。また、細胞内 ROS レベルの変化、IL-1β、IL-6、IL-8、MCP-1 等の顕著な発現上昇が認められた。このことから、組織内で局所的に発生し

た老化細胞が、細胞内レドックス状態の変化や炎症性サイトカイン等の発現変化を介して周囲の非老化細胞の細胞老化を誘発し、老化をさらに進展させるという負の連鎖を生み出している可能性が示された。

(2) 老化細胞に有効なストレス防御物質の探索

非老化・老化細胞における *t*-BuOOH 誘導性細胞傷害に対し、レスベラトロールやプテロステルベンおよびそれらの配糖体は有意な細胞防御効果を示した。また、非老化・老化細胞間における上記化合物の防御効果は同程度であったことから、レスベラトロールおよびその類縁体は細胞の老化度に関わらず優れた脂質過酸化傷害防御効果を発揮する化合物であると考えられた。

まとめ

老化は病気ではないが、病気のリスクを上昇させる因子となりうる。今回の研究により、細胞老化によりストレス応答性が変化すること、ストレス抵抗性が高まることが分かり、体内に蓄積される老化細胞は非老化細胞とは異なる性質を有していることが明らかとなった。また、スチルベノイド類が細胞の老化度に関わらず優れた細胞傷害抑制効果を示す化合物であることを新たに見出した。近年、老化細胞に対して除去・沈静化といった積極的な人為的介入が検討され始めているが、加齢と共に体内に蓄積される老化細胞の性質やその分子的基盤の究明により、これまでにない視点から老化に伴う疾患の発症予防や健康増進への貢献が期待される。

<引用文献>

[1] Administration with telomeric DNA telomere-like oligonucleotides induces enhancement of telomerase activity and resistance against oxidative stress in telomere reverse transcriptase gene-transfected human fibroblasts. Watanabe S, Saitoh Y, Namba M, Miwa N. Watanabe S, et al. Among authors: Saitoh Y. *Biomed Pharmacother.* 2010 64(8):565-71.

[2] Senescence-induced increases in intracellular oxidative stress and enhancement of the need for ascorbic acid in human fibroblasts. Saitoh Y, Morishita A, Mito S, Tsujiya T, Miwa N. Saitoh Y, et al. *Mol Cell Biochem.* 2013 380(1-2):129-41.

[3] ヒト線維芽細胞の老化に伴う細胞内酸化ストレスの増加とアスコルビン酸必要性の亢進 齊藤 靖和, 森下 愛子, 水戸 智美, 辻屋 翼, 三羽 信比古 *ビタミン* 88(5-6) 287 - 288 2014 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saitoh Y, Umezaki T, Yonekura N, Nakawa A	4. 巻 467(1-2)
2. 論文標題 Resveratrol potentiates intracellular ascorbic acid enrichment through dehydroascorbic acid transport and/or its intracellular reduction in HaCaT cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-020-03700-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Y, Nakawa A, Tanabe T, Akiyama T	4. 巻 446(1-2)
2. 論文標題 The influence of cellular senescence on intracellular vitamin C transport, accumulation, and function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 209-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-018-3287-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada H, Shimoda K, Saitoh Y, Doi S, Fujitaka Y, Ono T, Hamada H, Araki M	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Resveratrol oligosaccharides induces mRNA expression for SIRT.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural product communications	6. 最初と最後の頁 455-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 靖和, 福田 大智, 今本 早紀, 田邊 朝弓, 秋山 岳生, 濱田 博喜
2. 発表標題 レスベラトロールおよびその類縁体による酸化ストレス性細胞傷害防御効果～その有効性と細胞老化の関係～
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 靖和, 山口 諒子, 金輪 静夏, 脇田 有瑳, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト皮膚表皮細胞HaCaTの脂質過酸化傷害に対するスチルベン誘導体の防御効果
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 大智, 齋藤 靖和, 濱田 博喜
2. 発表標題 ヒト線維芽細胞TIG-1における酸化ストレス傷害防御効果に対する細胞老化の影響
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤靖和, 福田大智, 今本早紀, 田邊朝弓, 秋山岳生
2. 発表標題 細胞老化随伴分泌現象(SASP)が非老化細胞の細胞機能へ与える影響
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 靖和, 今本 早紀, 田邊 朝弓, 福田 大智, 水島 ひかる, 秋山 岳生
2. 発表標題 ヒト線維芽細胞の細胞老化に伴う酸化ストレス抵抗性の変化
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 靖和, 渡辺 祥子, 江川 彩子, 上月 信之介
2. 発表標題 線維芽細胞由来senescence-associated secretory phenotype(SASP)がメラニン産生に与える影響
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

県立広島大学 生物資源科学部 生命環境学科 齋藤靖和研究室のホームページ https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/ysaito/index.html 県立広島大学のホームページ http://www.pu-hiroshima.ac.jp/site/syoubara-campus/saito2018-1.html https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/kenhirosdgs/efforts/e10.html https://www.pu-hiroshima.ac.jp/site/bioresourcesciencesf/saitoh-mcb2020.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考