

令和元年6月12日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19618

研究課題名(和文)自己ゲノムDNA断片化と分泌の分子メカニズム解明への挑戦

研究課題名(英文)Molecular mechanism of genomic DNA fragmentation and secretion

研究代表者

高橋 暁子(Takahashi, Akiko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞老化プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60380052

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): 正常な細胞に活性化型Rasの過剰発現などの発がんストレスが負荷され細胞老化が誘導されると、さまざまな炎症性蛋白質(SASP因子)や細胞外遊離DNA断片(cell free DNA; cfDNA)の分泌が亢進する。正常な細胞においては、細胞質へ移行したゲノムDNAは細胞質DNA分解酵素によって分解されるはずであるが、老化細胞においてはDNase2やTREX1といった細胞質DNA分解酵素の発現が低下し、ゲノムDNAが細胞質に蓄積してcfDNAの起源となることを見出した。さらに、細胞質のゲノムDNA断片は核酸センサーを活性化し、SASPの誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は重要ながん抑制機構であるが、老化した細胞がSASP因子を分泌することでさまざまな加齢性疾患を引き起こしてしまう副作用があることが明らかとなっている。私たちは本研究から、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞では核の構造的異常が高頻度で観察されること、また細胞質DNA分解酵素の発現低下により細胞質にDNA断片が蓄積し自然免疫応答を引き起こすことでSASPを誘導することを見出した。さらにこれらのゲノム断片はcfDNAとして細胞外へ分泌しており、このcfDNAが周囲の組織や遠隔臓器に取り込まれることで加齢に伴う慢性炎症や自己免疫疾患の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Cellular senescence is the state of essentially irreversible cell cycle arrest that can be induced by a variety of potentially oncogenic stimuli. On the other hand, cellular senescence also causes secretion of various inflammatory factors. This phenotype is senescence-associated secretory phenotype (SASP), which contributes to many aspects of physiology and disease. Here, we show that cytoplasmic accumulation of nuclear DNA plays key roles in the onset of SASP. Although both DNase2 and TREX1 rapidly remove the cytoplasmic DNA fragments emanating from the nucleus in pre-senescent cells, the expression of these DNases is downregulated in senescent cells, resulting in the cytoplasmic accumulation of nuclear DNA. This causes the aberrant activation of cytoplasmic DNA sensors, provoking SASP through activation of the innate immune response. Here we demonstrated that cytoplasmic DNA accumulation causes the secretion of cfDNA from senescent cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞老化 DNA分解酵素 核酸センサー 自然免疫応答 SASP

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞に発がんの危険性のある DNA 損傷ストレスが生じると、アポトーシスまたは細胞老化が誘導され重要ながん抑制機構として働くことが知られている。しかし近年、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞が炎症性サイトカインやケモカイン等の分泌性蛋白質を高発現する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象を起こし、慢性炎症・動脈硬化・発がん等のさまざまな加齢性疾患の発症に関与していることが明らかとなってきた。私たちはこれまで、細胞老化で SASP がおこるエピジェネティックな分子メカニズムを解明してきた (Takahashi *et al.*, Molecular Cell, 2012)。さらに SASP 因子の解析を行う過程で、老化細胞が炎症性蛋白質だけではなく細胞外遊離 DNA 断片 (cell free DNA; cfDNA) を大量に分泌し、周囲の細胞に自然免疫応答を引き起こすことを見出した。驚いたことに老化細胞が分泌する cfDNA は死細胞に由来するものではなく、生細胞のゲノム DNA であることが判明したが、生きた細胞が自己のゲノム DNA を積極的に切断して分泌するという知見はこれまでになく、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、生細胞における「自己ゲノム DNA の断片化と分泌」というこれまでに報告のない未知の生命現象の分子メカニズムとその生物学的意義の解明を目指し、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞が分泌する cfDNA が周囲の組織もしくは遠隔臓器に取り込まれることで自然免疫応答を誘発し、加齢に伴う慢性炎症を引き起こす可能性について検討することを目的として研究をおこなった。

3. 研究の方法

細胞外遊離 DNA 断片 (cell free DNA; cfDNA) が産生される分子機構を明らかにするために、まずヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90) ヒト正常上皮細胞株 (HRPE, NHEK, NHEM, HTEK) ヒト単球由来細胞株 (THP-1) マウス正常線維芽細胞株 (MEF) に継代培養 (Replicative senescence) もしくは発がんストレス (Ras-induced senescence) による細胞老化を誘導する。その後、抗 dsDNA 抗体と核膜のマーカーである Lamin B1 の免疫染色を行い、核の形態を観察する。同時に細胞老誘導前後の細胞を回収し、核と細胞質に分画を行った後に DNA を精製し、その量を定量した後に、ゲノム DNA のどの領域がクロマチン断片に含まれるかを明らかにする。また、細胞外へと分泌された DNA 断片を解析するために、上記の方法で細胞老化を誘導する前後の細胞を 48 時間培養した上清を回収し、培養上清中に含まれる cfDNA の量を定量し、シーケンスすることでそのプロファイルを明らかにする。さらに、細胞老化の誘導前後の細胞で細胞質 DNA の産生や分解に関わる因子をスクリーニングし、細胞質に DNA 断片が蓄積する分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

ヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90) ヒト正常上皮細胞株 (HRPE, NHEK, NHEM, HTEK) ヒト単球由来細胞株 (THP-1) マウス正常線維芽細胞株 (MEF) を用いて分裂寿命による細胞老化 (Replicative senescence) と活性化型がん遺伝子 (RasV12) による細胞老化 (Oncogene-induced senescence) を誘導し、抗 dsDNA 抗体と核膜のマーカーである Lamin B1 の免疫染色を行い、核の形態を観察したところ、老化細胞では核膜の裏打ち蛋白である Lamin B1 の発現レベルが低下するだけでなく、微小核 (Micronucleus) や出芽核 (Bud) といった異常な核形態が観察される頻度が顕著に増加していることを見出した。そこで、細胞質を分画後に dsDNA を定量したところ、老化細胞では細胞質に存在するゲノム DNA の量が増加することを見出した (図 1)。

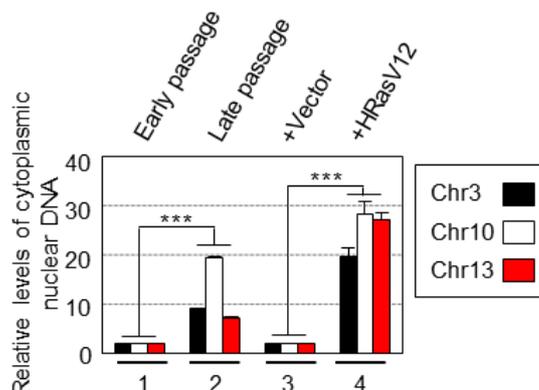


図 1：細胞老化誘導前後の細胞質 DNA 量の変化

継代回数の少ない若い細胞 (Early passage) と分裂寿命を迎えた細胞 (Late passage) もしくは TIG-3 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Vector と HRasV12 を感染させ細胞老化を誘導する前後の細胞を回収し細胞質を分画後に DNA を精製し、染色体 3・10・13 を検出するプライマーで qPCR を行った。

さらに、上記の細胞から培養上清を回収し、超遠心後に細胞が分泌するエクソソームの量を NTA 法 (Nanoparticle Tracking Analysis) で計測したところ、老化細胞ではエクソソームの分泌量が若い細胞の約 30 倍亢進していることが明らかとなった。そこで、老化細胞でエクソソームの生合成と分泌に重要な Alix と Rab27a をそれぞれノックダウンしエクソソーム経路を阻害したところ、アポトーシス様の細胞死が誘導された。驚くべきことに、老化細胞だけではなく若い増殖中の正常細胞においても、エクソソーム経路の阻害は DNA 損傷応答の活性化と細胞死を誘導したことから、正常な細胞はエクソソーム経路によって何か有害な物質を細胞外へと分泌している可能性が示唆された。そこで、エクソソームに含まれて分泌され正常細胞に DNA 損傷を誘発する分子を探索したところ、それが細胞質のゲノム DNA 断片であることを見出した。細胞質に存在する DNA 断片は細胞に免疫応答を引き起こしてしまうので、それを防ぐために正常な細胞は細胞質 DNA 断片をエクソソームに格納して細胞外へと分泌していることが示唆された。さらに、エクソソームはアデノウイルスなどの外来性の DNA に対してもウイルス感染のバリアとして働いていることから、エクソソーム経路は細胞の恒常性を維持するための重要な生体防御機構の一つであることが示された (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2017)。

また、細胞質に存在する DNA 断片は細胞質 DNA センサー (cGAS-STING 経路) によって感知され、自然免疫応答を引き起こすことが知られている。しかし、正常な細胞では、細胞質に存在する DNA 断片は DNase2a や TREX1 のような DNA 分解酵素によって速やかに除去されることが知られているが、私たちは老化細胞では CDK インヒビターの p16^{INK4a} や p21^{WAF1/CIP1} の活性化により転写因子 E2F ファミリーの機能が低下することから、E2F ファミリー転写因子によって遺伝子発現が制御されている DNA 分解酵素の発現レベルが低下することを見出した (図 2)。

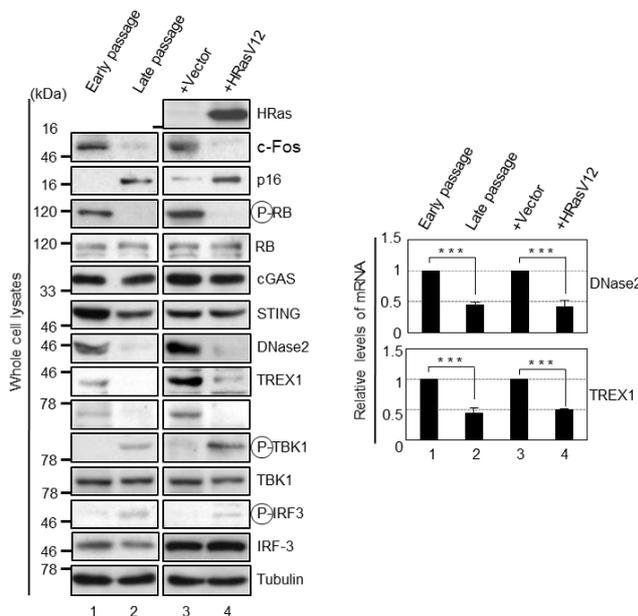


図 2 : 細胞老化誘導前後の蛋白と mRNA

図 1 の条件で細胞老化を誘導する前後の細胞を回収し蛋白質と RNA を抽出し、Western blotting 法によって蛋白 (左) と mRNA (右) の発現量を解析した。

また、細胞質 DNA 分解酵素の発現量の低下は細胞質にゲノム DNA 断片を蓄積される原因となり、ゲノム DNA 断片が細胞質 DNA センサー経路の活性化を介して自然免疫応答を引き起こし、SASP を誘導することを明らかにした。そこで SASP によって肝がんが発症することが確立しているモデルである高脂肪食負荷実験を野生型マウスと STING ノックアウトマウスに対して行った結果、STING ノックアウトマウスの肝臓では脂肪肝になる頻度は変わらないものの SASP の誘導とがんの発症率が顕著に低下していることを見出した (図 3) (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2018)。

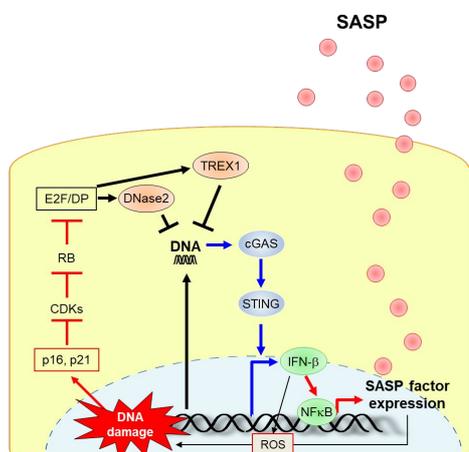


図 3 : 細胞老化で細胞質 DNA が SASP 誘導に働く分子機構

正常な細胞では細胞質の DNA 断片は細胞質 DNA 分解酵素 (DNase2、TREX1) によって分解されるが、老化細胞ではこれらの発現が抑制されているために細胞質に DNA 断片が蓄積し、細胞質核酸センサーの活性化を介して SASP 因子の遺伝子発現を誘導する。

このように、細胞老化によって細胞質にゲノム DNA 断片が蓄積する細胞内環境下では、細胞が恒常性を維持するためには有害な細胞質 DNA を細胞外へと分泌する必要性が生じる。そこで、細胞外へ分泌されたゲノム DNA の断片は cfDNA となり体内に排出されることが示唆された。細胞外に存在する cfDNA は周囲の組織に自然免疫応答を誘発する危険性があり、これが加齢に伴う慢性炎症の一因とも考えられる。本研究では cfDNA の起源となる細胞質 DNA が蓄積してしまうメカニズムを明らかにすることができたが、老化細胞でゲノムが切断される分子機構についてはまだ完全には明らかとなっていない。今後、その切断メカニズムをより深く追求することで cfDNA が産生される生命現象の解明に迫ることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Takahashi, A., Loo, T.M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G.N., Ohtani, N. and Hara, E.
Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells.

Nature Communications, 9, 1249 doi:10.1038/s41467-018-03555-8 (2018).

Furuya, S., Endo, K., **Takahashi, A.**, Miyazawa, K., Saito, M.
Snail suppresses cellular senescence and promotes fibroblast-led cancer cell invasion.

FEBS Open Bio, 7, 1586-1597 (2017).

Takasugi, M., Okada, R., **Takahashi, A.**, Chen, D., Watanabe, S., Hara, E.
Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2.

Nature Communications, 8, 15729 doi:10.1038/ncomms15728 (2017).

Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C. and Hara, E.

Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.

Nature Communications, 8: 15287 doi: 10.1038/ncomms15287 (2017).

[学会発表](計10件)

Akiko Takahashi 第18回 American Association for Cancer Research AACR/JCA Joint Session: Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer 「The biological function of exosomes secreted from senescent cells in the cancer microenvironment」 2019

Akiko Takahashi 第66回 Japanese Association for Dental Research Keynote Lecture 「The roles of cellular senescence in aging and cancer」 2018

Akiko Takahashi, Ryo Okada, Tze Mun Loo, Kenichi Miyata 第77回日本癌学会学術総会 シンポジウム 「Exosome from senescent cells promotes tumorigenesis」 2018

高橋暁子, 岡田 遼, 宮田憲一, 羅 智文 第91回日本生化学会総会シンポジウム 「老化細胞が分泌する SASP 因子の解析」 2018

Akiko Takahashi, Ryo Okada, Kazuhiro Hitomi, Tze Mun Loo, Kenichi Miyata 第5回日本細胞外小胞学会 JSEV シンポジウム 「Exosomes secreted from senescent cells act as one of SASP factors」 2018

高橋暁子 第18回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム 免疫老化の最前線 「細胞老化と自然免疫応答」 2018

高橋暁子 第12回日本エピジェネティクス研究会年会 講演 「細胞老化における SASP の分子メカニズム」 2018

高橋暁子 第40回生命科学系学会合同年次大会 ワークショップ 「生老病死」の分子生物学 「老化分泌因子の分子生物学」 2017

高橋暁子 第49回日本動脈硬化総会 学術集会 シンポジウム1ゲノム損傷と動脈硬化・老化関連疾患 「ゲノム損傷と細胞老化」 2017

高橋暁子, 今井良紀, 原 英二 第35回日本分子生物学会年会 シンポジウム 発生・老化・疾患をつかさどるクロマチンイベント 「細胞老化のクロマチンイベント」 2016

〔図書〕(計3件)

岡田 遼、高橋暁子 老化におけるエクソソーム **最新医学** 73: 1177-1183 (2018)
岡田 遼、高橋暁子 細胞老化とエクソソーム **和光純薬時報** 86 (2018)
宮田憲一、高橋暁子 細胞老化とがん化 **腫瘍内科** 21: 206-211 (2018)

〔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

<https://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/senescence/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：羅 智文

ローマ字氏名：(LOO, tze mun)

研究協力者氏名：岡田 遼

ローマ字氏名：(OKADA, ryo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。