

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K21598

研究課題名（和文）細胞膜の損傷修復により誘起される細胞老化のWhole body解析

研究課題名（英文）Whole body analysis of plasma membrane damage induced cellular senescence

研究代表者

森山 陽介（Moriyama, Yohsuke）

沖縄科学技術大学院大学・サイエンステクノロジーグループ・サイエンス・テクノロジーアソシエイト

研究者番号：00452532

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）：健康寿命の延伸のために老化の抑制が求められている。個体や器官を構成する細胞の“細胞老化”により、細胞分裂が抑制され個体や器官の機能低下が生じることなどから、細胞老化のメカニズムの理解に基づいた老化細胞の除去の研究が世界で注目を集めている。一般に、老化細胞が生じる際にはDNA損傷応答の亢進に由来すると考えられていたが、我々は細胞膜が傷つき修復されるとDNA損傷を伴わないにも関わらず細胞老化が誘導されることを見出した。その要因の一つに細胞内カルシウムの一過的な上昇が関与とオルガネラを介した複数段階の細胞老化状態の深化、またDNA損傷に依らない細胞老化の引き金となる最上流遺伝子の特定を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化の抑制は健康寿命および寿命の延長に寄与すると考えられている。そのため的手段として老化細胞の除去が注目を集めているが、細胞の老化機構の理解に基づく細胞老化の抑制は侵襲性が低く健康に資すると考えられる。

本研究では新たに見出した細胞老化の引き金である細胞膜損傷に着目し、生体内で頻繁に生じる膜損傷がいかにか細胞老化を引き起こすかを明らかにしつつある。細胞老化の最上流遺伝子を同定し、また膜損傷から細胞老化にかけての遺伝子発現と細胞内イベントの時系列変化の解析から重要な介入点を複数見出しており、今後の研究の発展により細胞膜損傷に起因する細胞老化を抑制する薬剤を選抜できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The prevention of aging is required to extend healthy life expectancy. Since "cellular senescence" causes suppression of cell division and functional decline of organs, research on elimination of senescent cells based on understanding of the mechanism of cellular senescence has been attracting attention around the world.

In general, senescent cells were thought to be induced by an enhanced DNA damage response, but we have found that plasma membrane damage and repair induces cellular senescence even without DNA damage. We have identified a transient increase in intracellular calcium as one of the factors involved in this process, the deepening of multiple stages of cellular senescence via organellar changes, and the identification of upstream genes that trigger cellular senescence independent of DNA damage.

研究分野：細胞老化

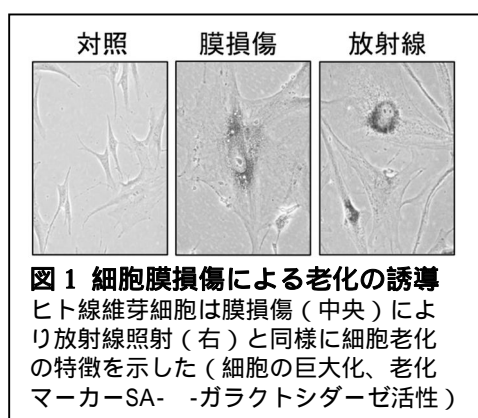
キーワード：細胞膜損傷 PDL 細胞周期 細胞老化 ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

我が国の人口の1/4が65歳以上となる超高齢社会を迎えるに当たり、日常生活を健康上の問題で制限されない「健康寿命」の期間を延伸できることが求められている。すなわち、老化の抑制である。

個体の老化には臓器や器官を構成する細胞の細胞老化が大きく影響し、機能低下を引き起こす。細胞老化とは、細胞が分裂・増殖を停止し再び再開することがない状態であり、通常の細胞と異なる代謝様式や遺伝子発現、細胞外分泌物を伴う。細胞老化の原因は染色体末端のテロメアの短縮やDNA損傷といったDNA損傷応答の活性化が原因と考えられていて、この増殖のみを停止するという特性ががん抑制や組織維持などに寄与する一方で、これらの老化細胞を一部の臓器で除去すると個体は機能低下から回復する(健康寿命の延長)とともに生命寿命が延長する(Zhu et al. Aging cell 2014, Xu et al. Nat med 2018)ことから、老化細胞の存在は全身の老化に影響することが明らかとなりつつある。

本研究を開始するに当たり、我々は細胞膜の損傷が細胞老化を引き起こすことを新規に見出していた(図1)。細胞膜損傷自体はDNAの損傷を伴わず、また細胞分裂の停止につながるDNA損傷応答を引き起こさないにもかかわらず、筋収縮や体液や消化液、界面活性剤などの化学的刺激、分泌や細胞分裂と言った膜の切断、物理的傷害などのすべての細胞膜の損傷が細胞老化につながるという知見である。これらを完全に避けることはできないが、いかに細胞膜損傷を抑制するか、あるいは細胞膜の損傷が修復されて以降、細胞老化の表現型が8-16日間かけて現れるまでの細胞応答を詳細に理解し、膜損傷に誘起される細胞老化のメカニズムを明らかにすることが老化の抑制の鍵と考えられる。この時点では、細胞膜の損傷部位に特異的なタンパク質の蓄積などが生じることを想定し、その“細胞膜損傷メモリー”が細胞老化のシグナル伝達の起点となると考えていた。



2. 研究の目的

本申請の当初の研究目的として

- (1) 細胞膜の損傷と修復を経ることで細胞老化が誘起されることを複数の指標により明確に証明する
 - (2) 細胞膜損傷部位が老化シグナルを誘起する起点となることを想定しており、損傷部位に蓄積するキーとなるタンパク質を明らかにするとともに、細胞膜損傷が細胞老化を誘起するメカニズムを明らかにする。
 - (3) マウスの Whole body にわたる各臓器・器官を観察して膜損傷による老化のホットスポット組織を見出す。
 - (4) 細胞と個体の老化をコントロールする手法を探索する。
- の4点を掲げていた。

3. 研究の方法

細胞膜損傷により誘起される細胞老化機構の研究において、基盤的な部分はヒト線維芽細胞を用いて行い、器官、個体での解析はマウスを用いる。

細胞膜損傷により細胞老化が誘起されることを示すため、膜損傷を与える処理方法と条件を比

較検討し、それらについて既知の細胞老化マーカーおよび DNA 複製能、細胞増殖能の低下を含め示す。その後、膜損傷に起因する細胞老化のキー遺伝子の同定のため老化やがん化、膜修復応答に関わる遺伝子の局在や発現、そして細胞膜の形態変化を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて行う。マウス個体においては、膜損傷に起因する老化細胞を複数の器官で探索するために、膜損傷の際に細胞表面に露出するホスファチジルセリンなどを膜損傷マーカーとして検出を試みる。ここまでの解析から、細胞と個体の老化をコントロールする手法を探索するためには、膜損傷部位に注目するだけでは不十分であり、膜損傷に伴う細胞内環境や遺伝子発現の変化を明らかにする必要性が生じた。そこで、膜損傷から細胞老化に至る 16 日間において、細胞の経時的な遺伝子発現の変化を次世代シーケンスを用いて解析し、いつ、どの遺伝子群がどのような機序で細胞老化を深化させていくかを明らかにし、既知の DNA 損傷や分裂寿命により老化した細胞と比較したうえで、細胞老化の抑制のための介入点を探索する。

4 . 研究成果

(1) ヒト線維芽細胞を用い、細胞膜に均一に損傷を与えるための非常に希薄な界面活性剤処理により、細胞周期の停止、および各種細胞老化マーカーの発現が確認できた。ここで、損傷した細胞膜の修復には細胞外カルシウムの流入が必要であり、この流入したカルシウムが細胞老化に関わる可能性を考え、薬剤処理により膜損傷を伴わずカルシウムを細胞内に流入させたところ、同様に細胞老化が誘導できた。ただし、細胞老化の進行過程は膜損傷によるものと完全に同一ではなかった。

(2) 上記の結果より、細胞老化を引き起こす要因として膜損傷とカルシウム流入を切り分けることができた。いずれにしても DNA 損傷は伴わず、8-16 日間かけて細胞老化の表現型を獲得していった。共通する遺伝子発現の変動を明らかにするために、DNA 損傷や分裂寿命により老化する細胞を対照に複数のタイムポイントで遺伝子発現の比較を行い、細胞老化を決定する最上流遺伝子の候補を得た。また、プロテオミクス解析も行い、膜損傷による細胞老化に特徴的な発現を示すタンパク質をいくつも同定している。

(3) 膜損傷特異的な遺伝子発現パターン、および上記の細胞老化に関わる最上流遺伝子について、公共データベースにあるマウス個体の遺伝子発現データとの比較により、加齢に伴って膜損傷により誘起された老化細胞と似た発現を示す臓器を同定した。老化細胞の局所的な蓄積は全身の老化状態にも影響を与えることが知られている。この器官および全身の他の器官について、老化の過程での遺伝子発現変動と細胞膜損傷について経時的に解析を行っており、老化の始原細胞を明らかにできると期待している。

(4) 膜損傷による老化細胞において、遺伝子発現データの比較から、膜損傷処理から 3 日めに急激に細胞老化関連遺伝子群の変動が見られることがわかった。この時点でのオルガネラの挙動を観察することで、膜損傷処理後から一定の時間を経て細胞老化の引き金を引く現象を見いだせた。分子基盤は今後詳細に解析することになるが、細胞老化の抑制のための介入点を見いだせたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Razali Nurhanani, Moriyama Yohsuke, Chiu Yatzu, Suda Kojiro, Kono Keiko	4. 巻 2022
2. 論文標題 Time-resolved transcriptomic profiling of senescence-associated secretory phenotype (SASP) in multiple senescent cell subtypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.06.27.497690	査読の有無 無
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 Urakawa Naoki, Nakamura Satoru, Kishimoto Mariko, Moriyama Yohsuke, Kawano Shigeyuki, Higashiyama Tetsuya, Sasaki Narie	4. 巻 12
2. 論文標題 Semi-in vitro detection of Mg ²⁺ -dependent DNase that specifically digest mitochondrial nucleoids in the zygote of Physarum polycephalum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06920-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suda Kojiro, Moriyama Yohsuke, Masukagami Yumiko, Razali Nurhanani Binti, Chiu Yatzu, Nishimura Koutarou, Barbee Hunter, Takase Hiroshi, Sugiyama Shinju, Sato Yoshikatsu, Higashiyama Tetsuya, Johmura Yoshikazu, Nakanishi Makoto, Kono Keiko	4. 巻 2021
2. 論文標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and human fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.26.437120	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Razali N, Moriyama Y, Chiu Y, Suda K, Turkki T and Kono K
2. 発表標題 Time-resolved transcriptomic profiling of senescence-associated secretory phenotype (SASP) in multiple senescent cell subtypes
3. 学会等名 EMBO Workshop 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suda K, Moriyama Y, Razali N, Chiu Y, and Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts
3. 学会等名 EMBO Workshop 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Barbee H, Moriyama Y, and Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage-induced senescent cells accelerate wound healing via extracellular vesicles and soluble molecules
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Moriyama Y and Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage, immune response, and cellular senescence
3. 学会等名 The 28th East Asia Joint Symposium on biomedical Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nurhanani Razali, Yohsuke Moriyama, Yatzu Chiu and Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage induces wound-healing SASPs in normal human fibroblasts
3. 学会等名 The 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yatzu Chiu, Yohsuke Moriyama, Nurhanani Binti Razali and Keiko Kono
2. 発表標題 The miRNA Signature Associated with Plasma Membrane Damage-dependent Senescence
3. 学会等名 The 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Kono and Yohsuke Moriyama
2. 発表標題 Fate determination by the cellular surface wound in the budding yeast
3. 学会等名 Japanese Society for Biotechnology annual meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	河野 恵子 (Kono Keiko) (30632723)	沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・准教授 (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------