

機関番号：72602
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20689035
 研究課題名（和文）口腔前癌病変における細胞老化の誘導メカニズムとその発癌防御機構としての役割の解析
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of cellular senescence in oral precancerous lesion.
 研究代表者
 今井（高橋）暁子（IMAI AKIKO）
 財団法人癌研究会・癌研究所がん生物部・研究員
 研究者番号：60380052

研究成果の概要（和文）：不可逆的な増殖停止状態としてしられる細胞老化は、癌抑制機構として機能していることが知られている。しかし、老化細胞では増殖停止状態が一体どのようにして維持されているかについては殆ど明らかにされていなかった。本研究では、細胞老化における増殖停止状態の維持には活性酸素種(ROS)が恒常的に産生されることが重要であることを見出し、更に ROS 産生に関わる候補分子を同定することに成功した。また、ROS によって活性化されるユビキチンリガーゼにより一連のタンパク質の分解が起こることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cellular senescence, an irreversible form of cell cycle arrest, is known to be acting as an important safeguard against neoplasia. However, it remains largely unclear how irreversibility of cell cycle arrest is established in cellular senescence. Here, we discovered that continuous production of reactive oxygen species (ROS) is essential for irreversibility of cellular senescence and that several genes are involved in this mechanism. Furthermore, we identified a series of proteins controlled by a proteasomal-dependent protein degradation pathway activated by ROS. These results unveil a novel pathway regulating the irreversibility of cellular senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2009年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2010年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 18,700,000 | 5,610,000 | 24,310,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学、細胞老化、癌、p16^{INK4a}

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜に発生する前癌病変として白板

症や紅板症（上皮内癌）が臨床的に観察されるが、これらの前癌病変が悪性化し、顎口腔領域の悪性腫瘍の約 90%を占める扁平上皮癌へと進展してしまうケースが少なくない。特に口腔領域では食事による温度や pH の変化、機械的な刺激などの様々なストレスによって、前癌病変部の細胞が悪性腫瘍化するような遺伝子の変異が誘発される危険がある。しかしこのような前癌病変や、乳頭腫のような良性腫瘍の中には、生体のもつ癌抑制機構によって安定的に増殖を停止している細胞も多く存在する。これは、癌抑制機構の一つである細胞老化が誘導され細胞増殖が不可逆的に停止しているためであると考えられる。細胞老化は、培養中の正常細胞にテロメアの短小化、DNA ダメージや癌遺伝子の活性化など、発癌の危険性のあるストレス（発癌ストレス）が生じた場合に、異常細胞の増殖を阻止するために発動する癌抑制機構として機能していると考えられてきた (Cell, 130, 223-233, 2007)。しかし、これまで細胞老化が培養細胞だけではなく本当に生体内でも起こるのか不明であったため、細胞老化は単に培養条件の不備のためにおこるアーティファクトであるという可能性も議論されてきた。しかし最近、細胞老化の形態的特徴がヒトやマウスの前癌病変部や良性腫瘍部に認められ、細胞老化が生体内で悪性腫瘍の発生を抑える重要な役割を果たしている可能性が示唆されるようになってきた (Nature 436, 636-637, 2005; Nature 445, 656-660, 2007)。このような経緯から、現在、細胞老化の誘導を癌治療に応用しようという試みが盛んに検討されている。しかしアポトーシスの場合とは異なり細胞老化をおこしても、細胞が死滅するわけではないの

で、増殖を停止したまま長期間生存を続けることが知られている。このため一旦細胞老化を起こしても、その後さらに何らかの異常が生じると増殖を再開してしまうのではないかと心配される。このため、細胞老化における増殖停止機構の詳細を明らかにし、細胞老化の不可逆性の実態を解明することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

最近の研究から細胞老化はアポトーシスと並ぶ重要な癌抑制機構であることが明らかになってきている。しかし細胞老化の作用機序並びにその生体内での役割に関しては、未だ不明な点が多い。本研究では細胞老化の不可逆性に焦点を当てその分子メカニズムを解明することを目的としている。さらに、その成果を口腔領域の癌の診断、予防及び治療に応用するための礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞老化の不可逆的増殖停止機構の解明

①増殖刺激によって如何にして ROS の産生が誘導されるのか?

温度感受性型 SV40 large-T 抗原 (LT) により不死化させたヒト細胞株 (SVts8) を非許容温度 (38.5 °C) で 5 日間以上培養し、LT を失活させ p16^{INK4a}-RB 経路を復活させると、ROS の産生が不可逆的に促進され、もはやその後許容温度 (34 °C) に戻しても細胞質分裂が抑制されたままになる (Takahashi *et al.*, Nature Cell Biol. 8, 1291-1297, 2006)。しかし、SVts8 細胞を非許容温度で培養する際に、低血清 (0.2% FBS) 培地で培養すると、不可逆的な ROS の産生は起こらず、許容温度に戻

し通常の血清濃度で培養すると増殖を再開する。このことは p16^{INK4a}-RB 経路と増殖因子が協調的に作用し、不可逆的な ROS の産生を引き起こしていることを示している。そこで、ここでは 2 種類の方法から ROS 産生のメカニズムの解明を試みる。まず、SVts8 細胞を非許容温度で培養する際に 10%の血清培地と 0.2%の血清培地で培養した場合の両方の細胞から、それぞれ蛋白質抽出液を調整する。調整した蛋白質抽出液を用いて抗体アレイまたは蛋白質の 2 次元電気泳動と質量分析計による解析を併用することにより蛋白質の発現プロファイルを調べる。このアプローチを通して不可逆的な ROS の産生に関連する蛋白質の同定を試みる。また、低血清 (0.2% FBS) 培地で培養するときに活性化型 ras 遺伝子を発現しておくことと不可逆的な細胞老化が誘導されることから (未発表データ)、血清刺激の下流で ras シグナルが ROS の産生に寄与している可能性が示唆された。そこで ras の下流で活性化される様々なシグナル分子に着目し解析を行ったところ、PI3 キナーゼを阻害することによって ROS の産生が完全に阻害され、細胞質分裂の停止も起こらなくなった (未発表データ)。そこで、RNA 干渉法 (RNAi) を利用することにより PI3 キナーゼの下流で働くどの分子が不可逆的な ROS の産生を引き起こしているのかを特定することにより、細胞老化の不可逆性を規定する細胞内シグナル伝達経路の解明を試みる。

②E2F/DP 転写因子複合体がどのように ROS の産生を抑制するのか?

DP1 の発現を RNAi により抑制すると ROS の産生が促進されることから、p16^{INK4a}-RB 経路の下流で E2F/DP 転写因子

複合体が ROS の生成を抑制していることが示唆された (Takahashi *et al.*, *Nature Cell Biol.* 8, 1291-1297, 2006)。そこでレトロウイルスベクターを用いた RNAi ライブラリーを利用して ROS の産生に関与する E2F/DP 転写因子複合体の標的遺伝子の同定を試みる。さらに、同定した遺伝子を過剰発現させた SVts8 細胞株やヒト正常線維芽細胞株を作製し、細胞老化を誘導する様々な発癌ストレス (H₂O₂ を用いた酸化的ストレス、活性化型 ras の過剰発現、DNA 損傷誘発剤など) を加えた場合に、ROS の産生が抑制され不可逆的な増殖停止が起こらないかどうかを検証する。

③PKC δ により細胞質分裂が抑制される分子メカニズムを明らかにする

細胞老化を起こし細胞内の ROS のレベルが恒常的に高くなると PKC δ の活性化と細胞質分裂の阻害がおこる。その際に活性化された PKC δ の標的の 1 つとして細胞質分裂の進行に必要なリン酸化酵素である Warts/Lats1 が分解されることを明らかにした (Takahashi *et al.*, *Nature Cell Biol.* 8, 1291-1297, 2006)。しかし、その分子機構は全く明らかになっていない。そこで先ず、PKC δ により Warts がリン酸化されるかどうかを様々な Warts の変異体を用いることにより検討し、そのリン酸化によって蛋白分解が促進されるかどうかについても調べる。次に薬剤 (テトラサイクリン) 投与により活性化型の PKC δ の発現を誘導出来る細胞株を樹立し、PKC δ の活性化により Warts リン酸化及び分解を確認すると同時に老化細胞で見られるような細胞質分裂停止を起こすかどうか調べる。更にこの細胞株に非分解型の Warts を過剰発現させることにより、PKC δ の活性化により誘導される細胞老化様の細胞質分裂阻害が回避される

かどうかについて調べ、細胞老化における Warts の分解のメカニズムを明らかにする。また、同時にこの PKC δ の発現誘導細胞を用いて①で同定した ROS 産生に重要な分子もまた PKC δ により調節されているかどうかについても調べる。もし、PKC δ 発現誘導細胞株の樹立が困難な場合には上記の実験は活性化型の PKC δ を発現するレンチウイルスもしくはアデノウイルスを用いて行う。更に、線維芽細胞を用いて①～③で明らかにしたことを、上皮由来の細胞で検証する。

4. 研究成果

本研究の成果は主に以下の2つにまとめることが出来る。

① 増殖刺激によって如何にして ROS の産生が誘導され細胞老化の不可逆的増殖停止状態を維持されるのかを明らかにするために、温度感受性型 SV40 large-T 抗原 (LT) により不死化させたヒト細胞株 (SVts8) を用いて RB と p53 を活性化することで細胞老化を誘導した細胞と、その後 RB と p53 を失活させて細胞質分裂が阻害されている細胞から total RNA を抽出しマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。さらにヒト正常線維芽細胞を用いて活性化型 Ras もしくは分裂寿命による細胞老化を誘導する前後、また分裂寿命によって不可逆的に増殖を停止した細胞を無血清条件下で一定期間培養した後細胞の mRNA を回収し同様にマイクロアレイ解析を行った。以上の DNA マイクロアレイのデータを統合し、さらに E2F/DP 転写因子複合体によって発現が制御される遺伝子に着目して解析を行った結果、増殖刺激による活性酸素 (ROS) の産生シグナルと E2F/DP 転写因子によって誘導される ROS の蓄積を抑制するシグナルのバランスによって細胞老化の不可逆的増殖停止が規定されている

可能性を見出した。

② WARTS/LATS1 のように細胞老化で特異的に分解される蛋白質群に着目し、それらの結合蛋白を解析することによって細胞老化で活性化するユビキチンリガーゼ (E3) の探索を行った。その結果、ROS の蓄積に起因する DNA 損傷シグナルによって活性化される E3 の同定に成功した。更にその E3 が細胞老化で発現レベルが低下することが知られている標的蛋白質をユビキチン化によって分解することで、細胞老化の重要な表現形の一つである Senescence-associated secretory phenotype (SASP) の発現を制御していることを明らかにした。また、細胞老化が起こっていることが知られている DMBA+TPA 処理により形成されたマウスのパピローマ組織や、老化したマウスの肺や小腸などの組織を用いて解析を行った結果、本研究で明らかにした細胞老化特異的な蛋白分解機構が生体組織においても SASP 因子の発現制御に関与していることが示された。

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4件)

- ① Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Tajima, T., Yamakoshi, K., Yoshimoto, S., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S. & Hara, E., Intrinsic cooperation between p16^{INK4a} and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression *in vivo*. **Cancer Res.** 70, 9381-9390, 2010 査読有

②Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., & Hara, E.

Real-time *in vivo* imaging of p16 gene expression: a new approach to study senescence stress signaling in living animals.

Cell Div. 14;5:1, 2010 査読有

③*Yamakoshi, K., *Takahashi, A., Hirose, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D. J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N. & Hara, E., Real-time *in vivo* imaging of p16^{Ink4a} reveals crosstalk with p53, **J. Cell Biol.**, 186, 393-407, 2009 査読有

(*Yamakoshi and Takahashi contributed equally to this paper.)

④高橋暁子、大谷直子、原 英二
細胞老化の生体モデル
細胞工学 27, 880-885, 2008 査読無

[学会発表] (計 10 件)

①Takahashi, A., Yamakoshi, K., Ohtani, N., & Hara, E.
Backup tumor suppressor role for p16^{INK4a} in the event of p53 inactivation
日本分子生物学会・日本生化学会合同年会
(神戸) 2010年12月7日~10日

②Takahashi, A., Yamakoshi, K., Imai, Y., Ohtani, N. & Hara, E.
DNA damage dependent degradation of histone methyltransferase in cellular senescence.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York,

U. S. A.)

2010年9月28日-10月2日

③Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N.

Intrinsic cooperation between p16^{INK4a} and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression *in vivo*.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York, U. S. A.)

2010年9月28日-10月2日

④今井良紀、高橋暁子、八尾良司、大谷直子、広田 亨、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、原 英二

細胞老化において発癌を促進する因子の探索
日本癌学会 (大阪) 2010年9月22日~24日

⑤Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N., & Hara, E. :

Real-time *in vivo* imaging of p16^{Ink4a} expression unveils a cross-talk between p53 and p16^{Ink4a}

The Salk Institute Meeting /Mechanisms & Models of Cancer (La Jolla, U. S. A.)
2009年8月12-16日

⑥Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. Visualizing the dynamics of oncogenic stress response in living mice.
AACR Conference on Mouse model of Cancer (San Francisco, U. S. A.) January 12-15, 2009

⑦高橋暁子、今井良紀、八尾良司、広田 亨、

大谷直子、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、
原 英二

細胞老化の発癌促進における役割

日本癌学会（横浜）2009年10月1日～3日

⑧竹内伸司、高橋暁子、元井紀子、山越貴水、
石川雄一、曾根三郎、原 英二、大谷直子

細胞老化の発癌促進における役割

日本癌学会（横浜）2009年10月1日～3日

⑨今井良紀、高橋暁子、広田 亨、八尾良司、
大谷直子、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、
原 英二

細胞老化におけるゲノムの不安定性が発癌を
促進する

日本分子生物学会（横浜）2009年12月9日
～12日

⑩Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N.
& Hara, E. Real-time imaging of p16^{INK4a}
expression visualizes the dynamics of
senescence signalling in living animals.

日本分子生物学会（神戸）2008年12月9日～
12日

〔図書〕（計1件）

高橋暁子、原 英二

細胞周期アッセイ法

がん分子標的治療研究 実践マニュアル 金
芳堂 84-91（2009）

〔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

<http://www.jfcr.or.jp/tci/canbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井(高橋)暁子 (IMAI AKIKO)

(財)癌研究会癌研究所がん生物部・研究員

研究者番号：60380052

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：