

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15785

研究課題名（和文）細胞競合による老化細胞の排除機構の解析

研究課題名（英文）Mechanisms of the elimination of senescent cells through cell competition

研究代表者

谷村 信行（Tanimura, Nobuyuki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00844557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：上皮組織中に細胞老化を起こした細胞が出現した場合、老化細胞が周囲の正常な上皮細胞からどのような影響を受けるかはよくわかっていない。本研究では、p21過剰発現による老化細胞が正常上皮細胞層から排除されることを示した。老化細胞の排除に関わる分子機構を解明するために薬剤スクリーニングを行った結果、正常上皮細胞層からの老化細胞の排除を促進する候補薬剤を絞り込むことができた。また、PI3K経路及びタンパク質のグリコシル化が老化細胞の排除を正に制御する可能性を示した。さらに、老化細胞で上昇する活性酸素種が老化細胞を排除する現象に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞などの機能低下細胞が上皮組織中に蓄積することにより、組織の恒常性が破綻し、臓器の機能低下が引き起こされる可能性が考えられる。さらに、蓄積した老化細胞に新たな変異が加わることにより、細胞ががん化することも考えられる。本研究により、老化細胞を上皮組織から排除する分子機構の一端が解明されたが、それを標的とすることにより、正常上皮細胞層からの老化細胞の排除を促進する新規治療法の発見に繋がることが期待される。したがって、臓器の正常な機能維持を促進する新規治療法の開発が期待され、この治療方法は健康寿命の延伸に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Whether the behavior of senescent cells that arise in epithelial tissues is affected by neighboring normal cells is incompletely understood. We demonstrated that senescent cells induced by p21 overexpression were extruded from the epithelial cell layer. We performed the drug screening to identify the mechanisms underlying the elimination of senescent cells. This screening identified several drugs which promote the removal of senescent cells. We also showed that PI3K pathway or protein glycosylation might promote the deletion of these cells, and that ROS (reactive oxygen species) levels elevated in the p21-overexpressing cells might be involved in the elimination of senescent cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞競合 細胞老化 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

多細胞から成る組織中において、機能が低下した細胞や変異が生じた異常な細胞が出現した場合、異常な細胞と周囲の正常な細胞が互いに生存を競い合う「細胞競合」という現象が起こることが知られている。この過程において、周囲に存在する正常細胞は異常細胞を認識し、細胞競合によって異常細胞を積極的に組織から排除することがわかっている。

細胞競合という現象は、ショウジョウバエにおいて、リボソームタンパク質の機能欠失変異をヘテロに持つ細胞と野生型の上皮細胞が混在した場合、野生型細胞に接した変異細胞が細胞死によって排除され、野生型細胞のみから構成される組織が形成されるという報告によって初めて提唱された。さらに、ショウジョウバエにおいては、Myc, Src, Scribble などに変異を持つがん原性変異上皮細胞や、増殖率が低下した Mahjong 変異上皮細胞も、細胞競合によって正常上皮細胞層から排除されることが示されている。

このような細胞競合現象が、ショウジョウバエと同様に哺乳類においても起こることが本研究室によって明らかにされた。哺乳類培養細胞系を用いて、がん遺伝子 Ras や Src が異常に活性化した上皮細胞が、周囲の正常上皮細胞によって管腔側へと押し出されるようにして排除されることが示された (Hogan et al., Nat. Cell Biol. 2009; Kajita et al., J. Cell Sci. 2010)。さらに、腸上皮・膵臓・肺などの上皮組織に活性型 Ras 変異をモザイク状に誘導することができるマウスを作製し、細胞競合による変異細胞の排除が生体内においても起こることを示した (Kon et al., Nat. Cell Biol. 2017; Sasaki et al., Cell Rep. 2018)。以上の結果は、正常上皮細胞が免疫細胞を利用することなく、がん細胞を組織中から排除する機能を持つことを示唆しており、この機能は EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と命名されている (Kajita et al., Nat. Commun. 2014)。

一方、生体中の組織においては、がん原性の変異細胞だけでなく、ストレスに曝されることなどにより損傷を受けた細胞が蓄積すると考えられてきた。さらに、損傷を受けることによって機能が低下した細胞の組織中における割合が閾値を超えてしまうと、組織自身の機能低下が引き起こされると考えられる。したがって、組織の恒常性を維持するために、機能低下細胞の排除を促進する機構が存在することが考えられるが、その機構については未解明な点が多い。さらに、機能低下細胞の排除を促進する機構が、ストレスなどの外的要因により抑制されるか、逆に、その機構を活性化するメカニズムが存在するかについても不明である。

2. 研究の目的

本研究では、正常上皮細胞ががん細胞を組織中から排除する機能である細胞競合現象が、機能低下細胞の上皮細胞層からの排除に関わっているか、さらに、それを制御する分子機構を解明することを目的とする。機能低下細胞として、不可逆的な細胞増殖の停止が特徴として挙げられる細胞老化に着目した。すなわち、細胞老化を起こした細胞が周囲の正常上皮細胞によって細胞競合を介して上皮細胞層中から除去されるか、さらに、除去を誘導する分子メカニズムを解明し、除去を促進する薬剤を開発することを目指す (図 1)。

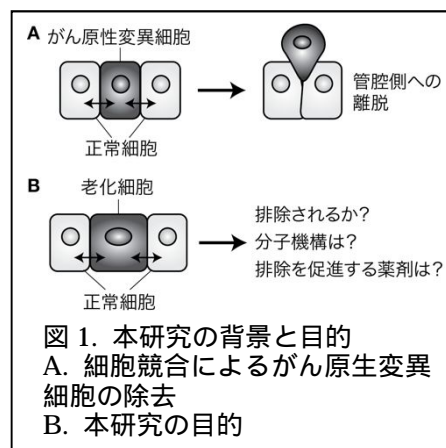
3. 研究の方法

(1) 老化細胞と正常上皮細胞の共培養による解析

細胞周期を停止させることによって細胞老化を誘導する p21 をテトラサイクリン誘導的に過剰発現するイヌ腎尿管上皮由来の MDCK 細胞株を作製する。p21 過剰発現により細胞老化が誘導された細胞と正常上皮細胞を共培養することにより、細胞競合を介して p21 過剰発現老化細胞が周囲の正常上皮細胞によって排除されるかを検討する。排除されるかどうかは、蛍光免疫染色を行った共培養サンプルの共焦点顕微鏡を用いた観察、または共培養サンプルの生細胞タイムラプスイメージングによって評価する。

(2) 阻害剤が与える影響についての検討と薬剤スクリーニング

種々の阻害剤を添加した条件で p21 過剰発現老化細胞と正常上皮細胞を共培養することにより、阻害剤が老化細胞の排除効率に影響を与えるかを検討する。さらに、京都大学大学院医学研究科医学研究支援センタードラッグディスカバリーセンターが保有する機能既知化合物ライブラリーを用いて、p21 過剰発現老化細胞の排除を促進する薬剤を探索する薬剤スクリーニングを行う。スクリーニングには 96 ウェルプレートを用いたプラットフォームを使用し、同センター所有の Opera Phenix ハイスループット・ハイコンテンツイメージングシステム (PerkinElmer) によって解析する。



(3) 老化細胞の排除における活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の関与の検討

p21 過剰発現老化細胞で活性酸素種 (ROS) の産生量が増加するかを検討する。さらに、抗酸化物質である Trolox を添加した条件で p21 過剰発現老化細胞と正常上皮細胞を共培養することにより、p21 過剰発現老化細胞の排除効率が変化するかを検証する。

4. 研究成果

(1) p21 をテトラサイクリン誘導的に過剰発現するイヌ腎尿管上皮由来の MDCK 細胞株を作製した結果、p21 の過剰発現により MDCK 細胞は細胞増殖の停止・細胞の肥大化・SA-β-gal 活性の増加・リン酸化ヒストン H2A.X の蓄積などの老化表現型を示した。そこで、細胞老化が誘導された p21 過剰発現 MDCK 細胞と正常 MDCK 細胞を共培養すると、p21 過剰発現による老化細胞が周囲の正常上皮細胞によって排除されることが示唆された (図 2)。さらに、生細胞タイムラプスイメージングを行うことにより、p21 過剰発現老化細胞が周囲の正常上皮細胞に押し出されるように排除される様子が観察された。したがって、上皮細胞層中に老化細胞が出現した場合、老化細胞が細胞競合を介して上皮細胞層から排除されることが示唆された。

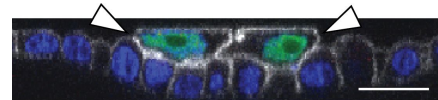


図 2. p21 過剰発現 MDCK 細胞 (緑色、矢印) は上皮細胞層から排除される (スケールバー: 20 μm)

(2) p21 過剰発現老化細胞と正常上皮細胞を共培養し、その培地中に種々の阻害剤を添加することにより阻害剤の効果を検証した。その結果、正常上皮細胞層からの老化細胞の排除を抑制する薬剤として、PI3K 経路の阻害剤である LY294002 およびグリコシル化阻害剤 tunicamycin が同定された。このことから、PI3K 経路及びタンパク質のグリコシル化が老化細胞の排除を正に制御する可能性が示唆された。

さらに、p21 過剰発現老化細胞の排除を促進する薬剤を探索するためのスクリーニング系を構築した。96 ウェルプレートを用いて p21 過剰発現細胞と正常上皮細胞を共培養し、p21 に融合された EGFP を検出することにより、総細胞中の p21 過剰発現細胞の割合をそれぞれのウェルで定量した。まず薬剤を添加しない条件で系の評価を行った結果、この系は、スクリーニング系としての精度基準 (CV 値が 10%以下であること、Z'-factor が 0.5 以上であること) を満たすことが確認できた。そこで、京都大学大学院医学研究科医学研究支援センタードラッグディスカバリーセンターが保有する、約 2500 種類の機能既知化合物が含まれる薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。EGFP 陽性細胞の割合が減少する薬剤をリストアップすることにより、これまでに正常上皮細胞層からの p21 過剰発現老化細胞の排除を促進する候補薬剤を絞り込むことができ、現在それらの薬剤の標的因子の機能について解析中である。

(3) 過酸化脂質分解物である 4-hydroxynonenal (4-HNE) 修飾を受けたタンパク質を認識する抗体を用いた免疫染色により、p21 過剰発現細胞では活性酸素種 (ROS) の産生量が増加することが示唆された。さらに、p21 過剰発現 MDCK 細胞と正常 MDCK 細胞を共培養することにより、p21 過剰発現細胞での ROS 量が減少することを示した (図 3)。また、抗酸化物質である Trolox を処理することにより、p21 過剰発現細胞の排除効率が減少したことから (図 4) 老化細胞で上昇する ROS 量が老化細胞を排除する現象に関与することが示唆された。

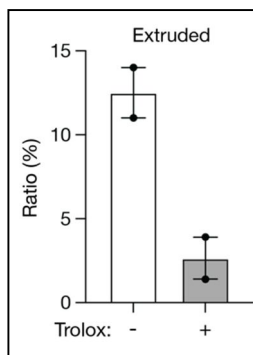


図 4. 抗酸化物質 Trolox の処理により p21 過剰発現細胞の排除効率が減少した。排除された細胞の割合は、p21 過剰発現細胞と正常 MDCK 細胞の共培養サンプルの生細胞タイムラプスイメージングによって定量した。

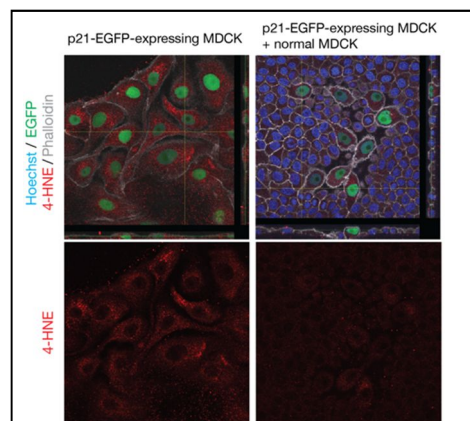


図 3. p21 過剰発現細胞 (緑色) では ROS 量の増加が観察されるが、正常 MDCK 細胞との共培養によって ROS 量が減少する

以上の結果から、老化細胞がその周囲の正常上皮細胞により細胞競合を介して排除される可能性が示され、老化細胞の排除に関わる分子機構についての知見を得る

ことができた。この分子機構を標的とすることにより、正常上皮細胞層からの老化細胞の排除を促進する新規治療法の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Kuromiya Keisuke, Aoki Kana, Ishibashi Kojiro, Yotabun Moe, Sekai Miho, Tanimura Nobuyuki, Iijima Sayuri, Ishikawa Susumu, Kamasaki Tomoko, Akieda Yuki, Ishitani Tohru, Hayashi Takashi, Toda Satoshi, Yokoyama Koji, Lee Chol Gyu, Usami Ippei, Inoue Haruki, (他3名)、Hino Naoya, Fujita Yasuyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Calcium sparks enhance the tissue fluidity within epithelial layers and promote apical extrusion of transformed cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111078 ~ 111078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111078	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 Shirai Takanobu, Sekai Miho, Kozawa Kei, Sato Nanami, Tanimura Nobuyuki, Kon Shunsuke, Matsumoto Tomohiro, Murakami Takeru, Ito Shoko, Tilston Lunel Andrew, Varelas Xaralabos, Fujita Yasuyuki	4. 巻 113
2. 論文標題 Basal extrusion of single oncogenic mutant cells induces dome like structures with altered microenvironments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3710 ~ 3721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15483	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 Mori Yusuke, Shiratsuchi Naoka, Sato Nanami, Chaya Azusa, Tanimura Nobuyuki, Ishikawa Susumu, Kato Mugihiko, Kameda Ikumi, Kon Shunsuke, Haraoka Yukinari, Ishitani Tohru, Fujita Yasuyuki	4. 巻 32
2. 論文標題 Extracellular ATP facilitates cell extrusion from epithelial layers mediated by cell competition or apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2144 ~ 2159.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.03.057	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 Kamasaki Tomoko, Miyazaki Yumi, Ishikawa Susumu, Hoshiba Kazuya, Kuromiya Keisuke, Tanimura Nobuyuki, Mori Yusuke, Tsutsumi Motosuke, Nemoto Tomomi, Uehara Ryota, Suetsugu Shiro, Itoh Toshiki, Fujita Yasuyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 FBP17-mediated finger-like membrane protrusions in cell competition between normal and RasV12-transformed cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102994 ~ 102994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102994	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 Kozawa K, Sekai M, Ohba K, Ito S, Sako H, Maruyama T, Kakeno M, Shirai T, Kuromiya K, Kamasaki T, Kohashi K, Tanaka S, Ishikawa S, Sato N, Asano S, Suzuki H, Tanimura N, Mukai Y, Gotoh N, Tanino M, Tanaka S, Natsuga K, Soga T, Nakamura T, Yabuta Y, Saitou M, Ito T, Matsuura K, (7 members), and Fujita Y	4. 巻 -
2. 論文標題 The CD44/COL17A1 Pathway Promotes the Formation of Multilayered, Transformed Epithelia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 -
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 -

1. 著者名 Liao Ruiqi, Zheng Ye, Liu Xin, Zhang Yuanyu, Seim Gretchen, Tanimura Nobuyuki, Wilson Gary M., Hematti Peiman, Coon Joshua J., Fan Jing, Xu Jian, Keles Sunduz, Bresnick Emery H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Discovering How Heme Controls Genome Function Through Heme-omics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107832 ~ 107832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107832	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷村信行、田辺英紀、増谷涼香、奥野友紀子、藤田恭之
2. 発表標題 細胞競合による老化細胞排除機構
3. 学会等名 第2回医薬系研究交流サロン
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------