

令和 6 年 9 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07144

研究課題名（和文）不可逆的に増殖停止したはずの老化細胞が再増殖するための分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms for re-proliferation of senescent cells that should have irreversibly ceased to proliferate

研究代表者

南嶋 洋司（Minamishima, Yoji Andrew）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20593966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞老化は「不可逆的な細胞増殖の停止」と定義され、テロメアの短縮・DNA傷害・酸化ストレスなどの各種ストレスによって誘導される。細胞老化とは細胞のがん化を防ぐシステムではないかと考えられてきたが、実際には加齢と共に生体内には老化細胞が蓄積し、がんの発生率も増加するため、変異が蓄積した老化細胞からがんが発生すると考えるのもまた理である。そこで本研究では、細胞老化とは不可逆的なのか否か？という永年の問いの解決に挑み、老化細胞ががん化するメカニズムの解明とその回避策、さらには老化細胞の若返り(rejuvenation)の可能性についても検討し、興味深い知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「不可逆的な細胞増殖の停止」と定義される細胞老化だが、実際にはがんのように「増殖停止した老化細胞が老化から脱出したと考えると説明しやすい病理現象」も存在するため、細胞老化の可逆性については未だに議論の余地がある。本研究は「細胞老化とは不可逆的な増殖停止である」という永年のドグマを再検討するものであり、本研究の成果から、細胞老化の概念が再定義され、老化細胞のがん化メカニズムが解明され、細胞のがん化の回避策や細胞や個体の若返り(rejuvenation)へのヒントが得られることが十分に期待できるため、本邦の直面する超高齢化社会問題を考える上でも非常に重要かつ興味深い研究であると考え

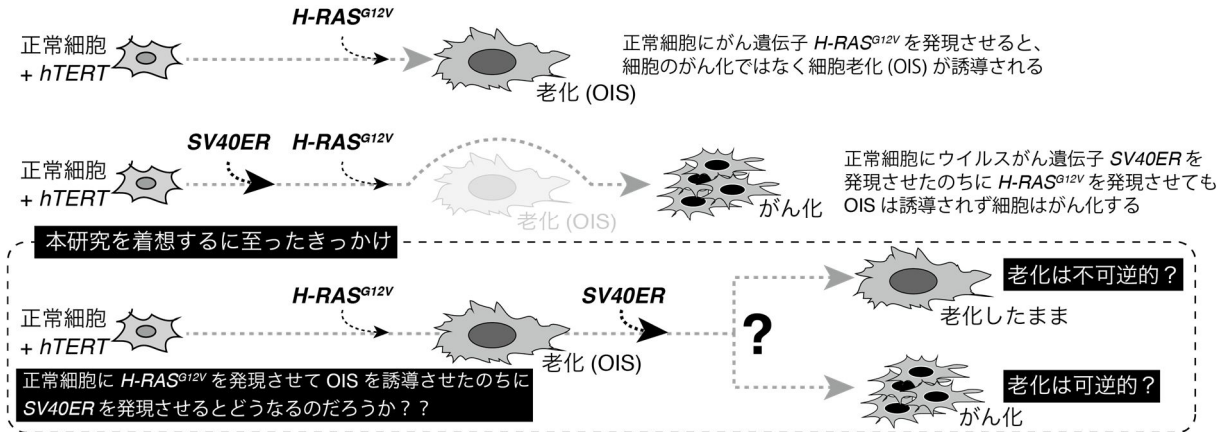
研究成果の概要（英文）：Cellular senescence is defined as the "irreversible arrest of cell proliferation" induced by various stresses such as telomere shortening, DNA damage, and oxidative stress. Cellular senescence has been thought to be a system that prevents cells from turning cancerous. However, since senescent cells accumulate in vivo with aging and cancer incidence also increases, it is reasonable to assume that cancer develops from senescent cells in which mutations have accumulated. Therefore, it is logical to assume that cancer develops from senescent cells with accumulated mutations. We have obtained exciting findings by (1) elucidating the mechanism by which senescent cells become cancerous and how to avoid this mechanism and (2) examining the possibility of rejuvenation of senescent cells.

研究分野：代謝

キーワード：低酸素応答 代謝 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

細胞老化は不可逆的な増殖停止状態と定義され、がん遺伝子の強制発現、テロメアの短縮や各種ストレスに応じて引き起こされる。正常細胞にがん遺伝子 *H-RAS^{G12V}* を発現させても、OIS (oncogene-induced senescence) と呼ばれるタイプの細胞老化が誘導されて細胞ががん化することはない。ところが、予め細胞にがんウイルス遺伝子 *SV40ER* を導入しておく、*H-RAS^{G12V}* による老化は誘導されず、細胞は激しく増殖する。ここで申請者は、「では逆に、*H-RAS^{G12V}* によって老化を誘導したあとの細胞に *SV40ER* を発現させるとどうなるのであろうか？ 老化細胞は再び増殖しないのであろうか？」との素朴な疑問を抱くに至った【下図】。



2. 研究の目的

本研究においては、「細胞老化とは不可逆的な増殖停止である」という永年のドグマの再検討に留まらず、「がんとは老化した細胞から発生するのではないのか？」「老化細胞を再増殖させる分子メカニズムとはなにか？」「細胞の若返りは可能なのか？」という永年の疑問への答えを導き出すことを目的とした。また、最終的に、細胞のがん化の回避策や細胞や個体の若返り (rejuvenation) へのヒントを得ることも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では下記 3 つの実験モデルの構築を元に進める。

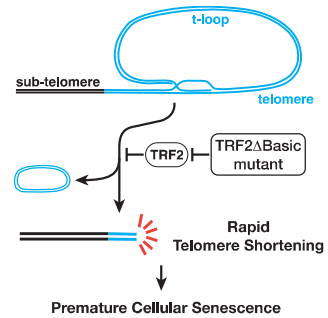
(1) 細胞老化モデルの構築

(OIS モデル)

Retrovirus を用いて *H-RAS^{G12V}* を過剰発現させ、正常細胞に OIS を誘導するモデルを樹立する。

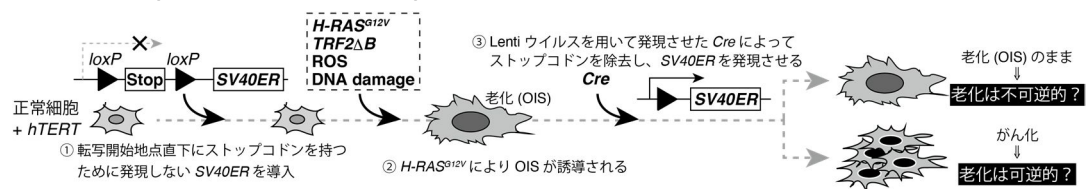
(テロメア短縮モデル)

テロメア保護タンパク質 TRF2 の変異体 (TRF2 Δ B) を、テトラサイクリン投与によって発現誘導することで、一気にテロメアを短縮させ、正常細胞が短期間に効率よく高い再現性も持って老化させるシステムを樹立する【右図】。

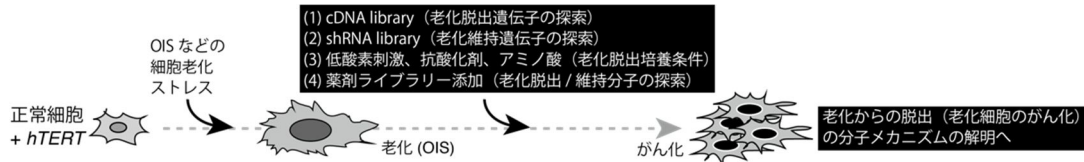


(2) がん遺伝子 *SV40ER* による細胞老化脱出モデルの構築

老化誘導モデル細胞に、*loxP* 配列で挟まれたストップコドン (LSL) を除去しない限りがん遺伝子 *SV40ER* が発現しないシステム (*LSL-SV40ER*) を導入し、その細胞に *Cre* リコンビナーゼを強制発現したときにのみ *SV40ER* の Large T 抗原が発現するシステムを構築する。*H-RAS^{G12V}* の過剰発現あるいはテロメア短縮によって細胞老化を誘導した後に、*Cre* リコンビナーゼによってストップコドンを除去して *SV40ER* を発現させ、細胞が老化を脱出し、細胞増殖が再開 (老化細胞のがん化) するかどうかを検証する。



- (3) 細胞老化脱出/細胞老化維持のメカニズムを探索するスクリーニングシステムの構築。
下記のごとく、老化細胞脱出/細胞老化維持に関する分子の探索を試みる

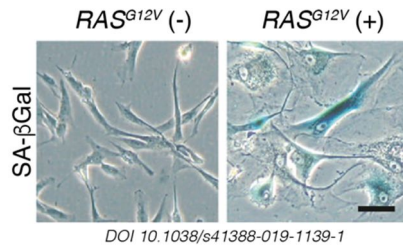


その後、*H-RAS^{G12V}* による OIS を誘導した後に、Cre リコンビナーゼによってストップコドン除去して SV40ER を発現させ、OIS 誘導後に SV40ER を発現させることによって細胞が老化を脱出し、細胞増殖が再開 (老化細胞のがん化) するかどうかを検証した【下図】。

4. 研究成果

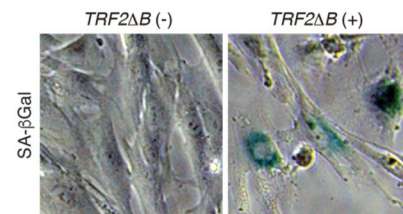
- (1) 細胞老化モデルの構築
(OIS モデル)

hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) を発現させて不死化させたヒト正常線維芽細胞 TIG-3 に、retrovirus を用いてがん遺伝子 *H-RAS^{G12V}* を発現させ、効率よく細胞老化を誘導する系を確立させた。細胞増殖の停止や SA-βGal 染色陽性細胞の増加【右図】などの細胞老化マーカーによって細胞老化の誘導を確認した。



(テロメア短縮モデル)

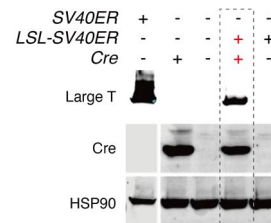
同じく、hTERT によって不死化させたヒト正常線維芽細胞に、テロメア保護蛋白 TRF2 の dominant negative mutant (TRF2ΔB) をテトラサイクリン添加によって発現誘導させる系を樹立。細胞増殖の停止や SA-βGal 染色陽性細胞の増加【右図】などの細胞老化マーカーによって細胞老化の誘導を確認した。



- (2) がん遺伝子 *SV40ER* による細胞老化脱出モデルの構築

loxP 配列に挟まれた stop コドンの下流に *SV40ER* 遺伝子を組み込み、retrovirus を用いて各細胞に安定的に導入。

これらの細胞に *H-RAS^{G12V}* を強制発現させ (OIS モデル) あるいはテロメア保護蛋白の変異体 TRF2ΔB をテトラサイクリン誘導的に発現 (テロメア短縮モデル) させて、それぞれ細胞老化を誘導する。これらの細胞に Cre リコンビナーゼを外来的に発現させた場合においてのみ、SV40ER 蛋白が発現する系を確立させた【右図】。



【結果】

- ✓ *SV40ER* によって形質転換した細胞は *H-RAS^{G12V}* によって老化しないが、*H-RAS^{G12V}* によって老化が誘導された細胞の、*SV40ER* 発現による再増殖 (老化からの脱出) については、現時点ではまだ確認できていない。
- ✓ 9 日間以上 TRF2ΔB を発現させてテロメアを短縮させて細胞老化を誘導させると、その後 TRF2ΔB 発現を off にしても老化した細胞の再増殖 (老化からの脱出) は確認出来ず。

【現状と今後の計画】

- *SV40ER* 以外の既知のがん遺伝子 proto oncogene による細胞増殖の回復が可能か否かの確認
- 山中 4 因子の導入による老化細胞の増殖回復が可能か否かの確認 (山中 4 因子の強制発現によってマウス個体の若返りの可能性についての既報 DOI: 10.1038/s43587-022-00183-2 あり)
- 老化細胞のエピジェネティクス変化を網羅的に測定

- (3) 細胞老化脱出/細胞老化維持のメカニズムを探索するスクリーニングシステムの構築

早期に効率よく安定的に細胞老化を誘導出来るテロメア短縮モデルを用いた、細胞老化からの脱出/細胞老化の維持を可能にする分子の探索。

【現状と今後の計画】

- 先ず、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) のご協力の下、各種化合物ライブラリーを用いて、OIS モデルあるいはテロメア短縮モデルにおいて老化が誘導された細胞を再増殖させるコンパウンドを探索中。
- 次いで、cDNA ライブラリー、shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを準備中。

- (4) その他、本研究の過程で得られた新しい知見と研究成果

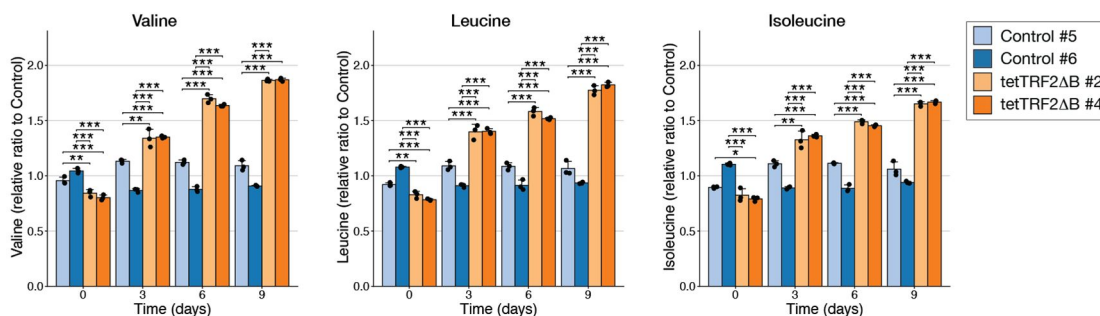
本研究の過程で分岐鎖アミノ酸(BCAA)の代謝異常が細胞老化を誘導することが判明したため、BCAA 代謝による細胞老化メカニズムの解明を試みた (Aramaki Y, Irie K, ..., Minamishima YA, and Konishi A, *Nature Cell Biology* under review)。

【結果】

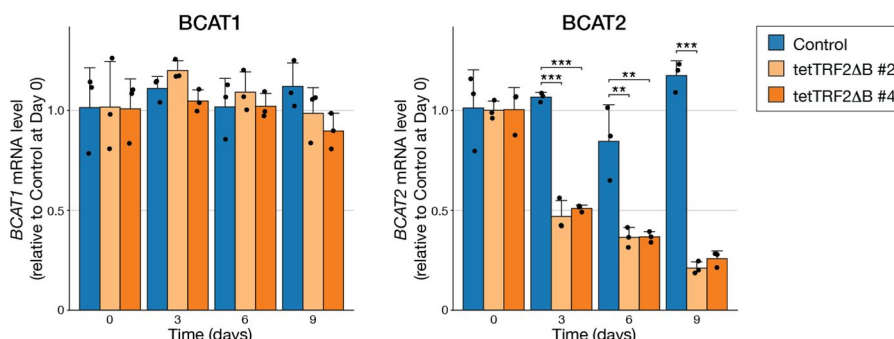
- ✓ テロメア短縮により老化した細胞においては BCAA 代謝系遺伝子群の発現低下が認められた【下表】。

KEGG Pathway	Total	Expected	Hits	FDR
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	2.46	10	0.00124
Purine Metabolism	74	3.04	11	0.0013
Butyrate Metabolism	19	0.779	4	0.0441

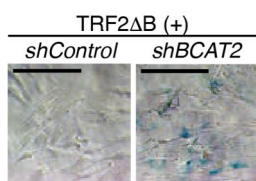
- ✓ テロメア短縮により老化した細胞内には BCAA が蓄積していた【下図】。



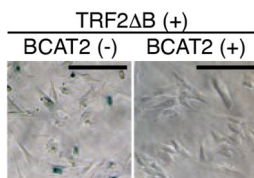
- ✓ テロメア短縮により老化した細胞においては、BCAA 代謝の律速酵素 BCAT1/2、BCKDH のうち BCAT2 の発現が低下していた【下図】。



- ✓ テロメア短縮による細胞老化モデルにおいて BCAT2 の発現をノックダウンすると細胞老化が促進された【下図右】。



- ✓ テロメア短縮による細胞老化モデルにおいて BCAT2 を過剰発現すると細胞老化が抑制された【下図右】。



【現状と今後の計画】

今後は、

- ✓ 老化細胞における BCAA 下流代謝産物の定量
- ✓ 老化細胞への BCAA そのものの補充や、BCAT の下流の代謝産物の補充
- ✓ BCAA 代謝の異常が細胞老化を引き起こすメカニズムの解明

- ✓ 臓器特異的 BCAT2 過剰発現/ノックアウト/ノックダウンマウスの作製とその表現型の解析により、BCAA 代謝の異常による細胞老化が個体老化の原因になり得るかの解析等の実験を経て、
 - 細胞老化・個体老化の関係性
 - 細胞や個体の老化予防法の探索
 - BCAA 代謝を標的とした、老化した細胞や個体の若返り (rejuvenation) 法の探索などへと研究を展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小西 昭充、南嶋 洋司
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と細胞・個体老化
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西 昭充、南嶋 洋司
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調と細胞・個体老化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土田 愛子, 入江 和樹, 荒牧 佑磨, 南嶋 洋司, 小西 昭充
2. 発表標題 テロメア短縮による細胞老化の過程で変化する細胞内タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西昭充、荒牧祐磨、大日方英、本田真也、和泉孝志、清水重臣、南嶋洋司
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝の変調による細胞老化制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大日方英, 荒牧佑磨, 入江和樹, 南嶋洋司, 小西昭充
2. 発表標題 細胞老化過程における分岐鎖アミノ酸代謝の変調
3. 学会等名 日本質量分析学会 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 入江和樹, 荒牧佑磨, 土田愛子, 大日方英, 和泉孝志, 南嶋洋司, 南嶋洋司, 小西昭充
2. 発表標題 テロメア短縮系を用いた効率的な複製老化系の樹立および分岐鎖アミノ酸代謝の細胞老化における役割の解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院医学系研究科生化学講座 http://biochemistry.med.gunma-u.ac.jp/senescence.html#dnarepair

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
研究協力者	小西 昭充 (Konishi Akimitsu) (50381877)	群馬大学・大学院医学系研究科生化学講座・講師 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	入江 和樹 (Irie Kazuki) (40888153)	群馬大学・大学院医学系研究科生化学講座・助教 (12301)	
研究協力者	大日方 英 (Obinata Hideru) (50332557)	群馬大学・大学院医学系研究科 教育研究支援センター・准教授 (12301)	

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