

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300352

研究課題名(和文)細胞老化による発癌促進機構の解明

研究課題名(英文)Study on senescence-associated tumor promotion

研究代表者

原 英二(Hara, Eiji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所がん生物部・部長

研究者番号：80263268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円、(間接経費) 5,070,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化を起こした細胞では発がんの原因となるDNA損傷を引き起こす活性酸素種(ROS)のレベルが恒常的に高くなることが知られているが、そのメカニズムについては不明なままであった。今回我々は、細胞老化が起きると、p16がRB-E2F経路を介してFoxM1の発現を抑制すると同時に、AKTによりFoxO3aが失活することでROSの産生を抑制するSOD2の発現レベルが低下するためにROSレベルが恒常的に上昇することを明らかにした。更にこのメカニズムが培養細胞のみならずマウスの肝臓でも働いていることを確認しており、生体内で起こりうる発がん促進機構の一つである可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence was known to be associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS), carcinogen known to cause DNA damage. However, molecular mechanisms underlying the increased ROS production has remained unclear. Here, we show that the cross-talk between the p16-RB-pathway and AKT-pathway determines ROS level by controlling the overlapping functions of FoxM1 and FoxO3a, transcription factors known to regulate ROS scavenger expression. We also demonstrate here that this pathway operates not only in cultured fibroblasts but also in mouse liver, indicating that this machinery may contribute broadly to tumorigenesis in vivo.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：細胞老化 発癌 細胞周期 ROS

1. 研究開始当初の背景

細胞老化はがん化の危険性がある異常細胞の増殖を抑制する重要ながん抑制機構として働いていると考えられている。我々はこれまで細胞老化の誘導に関わる分子機構の解明を目指した研究を行い、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子として知られる $p16^{INK4a}$ が細胞老化の重要な誘導因子であることを見出し、更にその作用機序を解明してきた。この過程で我々は $p16^{INK4a}$ の発現は細胞周期の G1 期から S 期への移行を抑制するだけでなく、活性酸素種 (ROS) の産生を促進することで WARTS/LATS1 のタンパク質の分解を促進し、細胞質分裂の進行を抑制することを見出した。一方 WARTS/LATS1 はがん抑制遺伝子としても知られており、 $p16^{INK4a}$ が高発現した老化細胞ではがん化の危険性が高くなっているのではないかと心配される。事実、老化細胞を観察すると、悪性腫瘍細胞に多くみられる多核・多倍体の細胞が多くみられ、発がんの引き金となる染色体の不安定性が亢進していることが分かった。つまり、細胞老化は短期的にはがん抑制機構として働くが、長期的には発がんを促進してしまう諸刃の剣として働いている可能性が考えられるが、その詳細については不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では細胞老化の副作用である発がん促進作用の原因と考えられる $p16^{INK4a}$ により ROS レベルが亢進する分子メカニズムを解明することにより、発がん機構のより完全な理解と、細胞老化の発がん促進作用のみを阻害する方法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

$p16^{INK4a}$ の発現により如何にして細胞内 ROS レベルが不可逆的に上昇するのかを明らかにするために、(1) 先ず薬剤投与により $p16^{INK4a}$ の発現を誘導することが可能な細胞を樹立し、その細胞に化合物ライブラリーや

RNAi ライブラリー等を投与することで $p16^{INK4a}$ が ROS レベルを亢進するのに必要な細胞内シグナル経路を絞り込む。(2)次に、細胞内 ROS レベルの上昇がどのような遺伝子の発現を変化させるのかについて DNA マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングによって解析する。(3)更に上記(1)(2)のメカニズムが生体内のどこで、いつ、どの程度働くのかを我々が開発した細胞老化反応を可視化できるマウスを用いて明らかにする。

4. 研究成果

これまでの研究により細胞老化を起こした細胞(老化細胞)では細胞内の活性酸素種(ROS)レベルが著しく上昇するために DNA 損傷が起こり、発がんに必要な遺伝子異常が起こりやすくなることを見出してきた。更に我々はこれが $p16^{INK4a}$ によって引き起こされることを見出していた。そこで本研究ではがん抑制遺伝子である $p16^{INK4a}$ が発現すると、一体なぜ発がん促進作用がある ROS レベルが上昇するのか?そして ROS レベルの上昇はどのようなメカニズムで維持されるのかについて解析を行い、以下の研究結果を得た。(1)化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、ヒトの正常な線維芽細胞においては $p16^{INK4a}$ により RB が活性化されることで E2F によって転写が維持されていたフォークヘッド転写因子の一つである FoxM1 の発現が低下することを明らかにした。FoxM1 は ROS の産生を減らす SOD2 遺伝子の発現を誘導するため、FoxM1 の発現低下は ROS レベルを亢進させる。しかし、細胞が細胞周期の休止期の状態にある場合は、別のフォークヘッド転写因子である FoxO3a が活性型であり FoxM1 の機能を補っているために SOD2 の発現が維持され、ROS レベルも低く抑えられていることを見出した。一方、増殖期にある場合は AKT により FoxO3a がリン酸化され

失活しているため、その状態で p16^{INK4a}-RB 経路が活性化して FoxM1 の発現レベルが低下すると、SOD2 レベルが低下し、ROS レベルが上昇することを明らかにした。

(2) ROS レベルが高くなることで、修復不可能なほど大きな DNA ダメージが蓄積し、ATM キナーゼが活性化される。このことが細胞周期チェックポイント機構を恒常的に活性化させ、細胞周期が不可逆的に停止するようになることを明らかにした。

(3) 上記のメカニズムは培養した線維芽細胞だけでなくマウスの肝臓の肝実質細胞でも起こっていることが明らかとなり、単なる細胞培養のアーティファクトではなく生体内でも働いているメカニズムであることが確認された。このため、今後上記の細胞内シグナル経路を調節することで発がん、特に細胞老化が関与する可能性が高い加齢に伴う発がんの予防法や診断法の開発につながる可能性が期待される。

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9件)

1. Imai, Y., Takahashi, A., Hanyu, A., Sato, S., Naka, K., Hirao, A., Ohtani, N., *Hara, E. Crosstalk between the Rb pathway and AKT signaling forms a quiescence-senescence switch. **Cell Reports**, 7: 194-1207 (2014)
2. Ohtani, N., Yoshimoto, S., *Hara, E. Obesity and cancer: gut microbial connection. **Cancer Research**, 74: 1885-1889 (2014)
3. Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Ishikawa, Y., *Hara, E., Ohtani, N., Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. **Nature**, 499: 97-101. (2013)

4. Ohtani, N., Hara, E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis **Cancer Sci.** 104: 525-530. (2013)
5. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K., Nakayama, K.I. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 427: 285-292. (2012)
6. Ohtani, N., Takahashi, A. Mann, D.J. and *Hara, E. Cellular senescence: a double-edged sword in the fight against cancer **Exp. Dermatol.**, 21: S1-S4. (2012)
7. Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H. and *Hara E. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. **Mol. Cell**, 45: 123-131. (2012)
8. Yamamizu, K., Fujihara, M., Tachibana, M., Katayama, S., Takahashi, A., Hara, E., Imai, H., Shinkai, Y., and Yamashita, J. K. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. **Cell Stem Cell**, 10: 759-770. (2012)
9. Fukuyo, Y., Takahashi, A., Hara, E., Horikoshi, N., Pandita, T.K., Nakajima, T. E2FBP1 antagonizes the p16(INK4A)-Rb tumor suppressor machinery for growth suppression and cellular senescence by regulating promyelocytic leukemia protein stability. **Int J Oral Sci.**, 3:200-208 (2011)

〔学会発表〕(計6件)

1. 原 英二
細胞老化のがん化と老化における役割
日本生化学会 シンポジウム

2013年9月12-14日(横浜)

2. Hara, E.
DNA damage response and cellular senescence in cancer and aging.
International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, (South Korea)2013年10月9-11日
3. Hara, E.
Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretom.
US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection.
Gaithersburg (USA) 2014年2月10-11日
4. Hara, E.
Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretom.
17th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid.
Osaka (Japan) 2013年9月24-25日
5. Hara, E.
Cellular senescence: a double-edged sword in the fight against cancer..
International Symposium on Clinical & Translational Cancer Research.
Kaoshun (Taiwan) 2012年5月17-18日
6. 原 英二
細胞老化とがん
日本女性医学会
2012年10月13-14日(山形)

〔図書〕(計 0件)

〔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 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〕
ホームページ等
<http://www.jfcr.or.jp/tci/canbio/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
原 英二 (HARA Eiji)

研究者番号：80263268