

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290046

研究課題名(和文) 老化細胞が分泌する発癌促進因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of tumor promotion factors secreted from senescent cells

研究代表者

高橋 暁子 (Takahashi, Akiko)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：60380052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化は細胞の増殖を不可逆的に停止する重要ながん抑制機構である一方で、加齢と伴に体内に蓄積した老化細胞が炎症性蛋白質を分泌するSASP(Senescence associated secretory phenotype)をおこすことで発がんを促す微小環境を作りだしている可能性が示唆されている。申請者は、老化細胞が分泌する発がん促進因子に着目し解析を行い、老化細胞ではエクソソームの分泌量が亢進しており、老化細胞が分泌するエクソソームには正常な細胞にDNA損傷応答を誘導する因子を含んでいることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence is the state of essentially irreversible cell cycle arrest that can be induced by a variety of potentially oncogenic stimuli and is therefore considered to act as an important tumor suppression mechanism. However, the imposition of cellular senescence is also associated with the increasing expression and secretion of inflammatory and pro-proliferative factors. This phenotype, termed the senescence-associated secretory phenotype (SASP), contributes positively and negatively to cancer development depending on the biological context. To understand the tumour promotion effect of secretory factors from senescent cells, we tried to identify various secretory factors and found that exosome secretion is significantly increased in senescent cells. We also discovered that exosome from senescent cells plays as tumour promotion factors, which activates DNA damage signalling in normal human cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞老化 がん抑制機構 SASP

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞に発がんの危険性のある DNA 損傷ストレスが生じると、アポトーシスまたは細胞老化が誘導され、ストレスを受けた細胞の増殖が阻止される。これらは、ストレスにより遺伝子に変異した細胞がそのまま増殖してがん化することを防ぐ、重要ながん抑制機構と考えられている (Takahashi *et al.*, Nat. Cell Biol., 2006)。これらのがん抑制機構のうち、アポトーシスをおこした細胞は死滅し後に消失するが、細胞老化を起こした老化細胞は長期間生存し、加齢に伴って体内に蓄積することが知られている (Yamakoshi & Takahashi *et al.*, J. Cell Biol., 2009)。しかし一方で、加齢と共に体内に蓄積した老化細胞が、様々な分泌性蛋白質を高発現する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) という現象をおこすことが最近報告され、老化細胞から分泌される炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素などの SASP 因子が、周囲の組織にさまざまな病態を引き起こす可能性が示唆されている。申請者はこれまで、SASP がおこる分子メカニズムの解析を行い、細胞老化を誘導するような DNA 損傷シグナルがクロマチンにエピジェネティックな変化をもたらし、SASP 因子の遺伝子発現が誘導されることを報告してきた (Takahashi *et al.*, Mol. Cell, 2012)。しかし、老化細胞は既知の SASP 因子以外にも様々な物質を分泌することで発がんを促す微小環境を作り出している可能性が示唆されている。申請者は、老化細胞が分泌するエクソソームが加齢に伴う慢性炎症やがんの発症率の増加に関与する可能性に着目して研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、老化細胞が分泌するエクソソームに含まれる発がん促進因子を特定し、加

齢に伴うがんの発症率増加の分子機構を説明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 老化細胞から分泌されるエクソソーム中の蛋白、核酸のプロファイルを明らかにする。

ヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90)、ヒト正常上皮細胞株 (RPE, NHEK, NHEM)、マウス正常線維芽細胞株 (MEF) を継代培養するか、もしくは活性化型 Ras の過剰発現や DNA 傷害誘導薬剤処理によって細胞老化を誘導し、あらかじめエクソソームを除去した血清を添加した培地で 48 時間培養後に上清を回収し、超遠心法にて培地中のエクソソームを回収した。その後 NanoSight を用いてサンプルの粒子径を測定すると同時に、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて CD63 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行ってエクソソームが回収されていることを検証し、老化細胞から分泌されるエクソソームに含まれる分子のプロファイルを明らかにした。

エクソソームに含まれる蛋白を MS 解析により同定。

細胞老化の誘導前後でエクソソームに含まれる核酸のプロファイルの変化を解析。

(2) 老化細胞でエクソソームの分泌が亢進しているメカニズムを明らかにする。

細胞老化の誘導前後でエクソソームの生合成や分泌に関わる因子のスクリーニングを行い、老化細胞でエクソソームの分泌量が亢進するメカニズムを明らかにすることを目指して解析を行った。また、個体老化の過程や、発癌ストレスによってマウスの体液や分泌液中に老化細胞由来のエクソソームが増加する可能性を検討した。

(3) 老化細胞が分泌するエクソソームに含まれる発がん促進因子を特定する。

細胞老化の誘導前後で培養液中に分泌されたエクソソームを回収し、正常細胞やがん細胞に加えることで細胞におこる変化を観察した。そして、正常な細胞に DNA 損傷応答を誘導する因子やがん細胞の増殖能や運動能を変化させる因子のスクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90)、ヒト正常上皮細胞株 (RPE, NHEK, NHEM)、マウス正常線維芽細胞株 (MEF) を継代培養し細胞老化を誘導した細胞から超遠心法を用いて回収した分泌膜小胞の粒子径を NanoSight で測定したところ、これまでの報告と同様に平均直径が 100nm 前後の粒子が主に回収されていた。さらにこの分泌膜小胞の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、CD63 抗体に反応するエクソソームが回収されていることが確かめられた。この時、細胞老化をおこした細胞では 1 細胞あたりのエクソソームの分泌量が大幅に亢進していることが明らかとなった。

次に上記の方法で回収したエクソソームサンプルの MS 解析を行い、細胞老化の誘導前後でエクソソームに含まれる蛋白成分が大きく変化することを明らかにした。さらに、mirVana miRNA Isolation kit (Applied Biosystems) を用いてエクソソーム RNA を調整し、qRT-PCR 法にて細胞老化特異的に分泌量が変化しているエクソソーム RNA を明らかにした。

(2) 老化細胞でエクソソームの分泌が亢進しているメカニズムを明らかにするために、細胞老化の誘導前後の細胞を用いてエクソソームの生合成や分泌に関わる因子のスクリーニングを行った。その結果、エクソソームの生合成に重要なセラミド合成経路に関わる因子の遺伝子発現が細胞老化で変化する

ことを見出した。

そこで、セラミド合成経路の阻害剤をマウスに投与したところ、血中のエクソソーム量が減少する傾向にあることを見出した。一方で、マウスに DNA 傷害誘導薬剤を投与したところ、血中のエクソソーム量が増加することを見出した。

(3) 細胞老化の誘導前後で回収したエクソソームを正常細胞の培養液中に添加すると、エクソソームの濃度依存性に細胞に DNA 損傷応答がおこることが明らかになった。エクソソームに含まれる成分の中で細胞に DNA 損傷を引き起こす物質を探索し、その分子メカニズムを明らかにするために解析を行い、エクソソームに含まれて細胞外へ分泌される新規の炎症誘導因子を見出した。そしてその結果をまとめて論文を執筆し、現在国際誌に投稿中である。本研究結果から、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞から分泌されたエクソソーム中の炎症促進因子が周囲の組織に取り込まれることで、加齢による慢性炎症そして発がん率の増加に關与する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

\*Sato, S., \*Kawamata, Y., \***Takahashi, A.**, \*Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., Yamakoshi, K, Sorimachi, H., Sone, S., Nishioka, Y, Ohtani, N. and Hara, E.

Reversing the ageing phenotypes of klotho mice by ablating the p16<sup>INK4a</sup> tumour suppressor.

**Nature Communications**, 6: 7035 DOI: 10.1038/ncomms8035 (2015).

(\*Sato, Kawamata, Takahashi and Imai contributed equally to this paper.)

<http://www.nature.com/ncomms/2015/15042>

9/ncomms8035/full/ncomms8035.html

査読有

Imai, Y., **Takahashi, A.**, Hanyu, A., Hori, S., Sato, S., Naka, K., Hirao, A., Ohtani, N. and Hara, E.

Crosstalk between the Rb Pathway and AKT Signaling Forms a Quiescence-Senescence Switch.

**Cell Rep.**, 7, 194-207 (2014)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714001685>

査読有

[学会発表](計 10 件)

**Akiko Takahashi**

ASTAR-AMED Joint Workshop

「Epigenetic dysregulation of satellite RNAs expression in senescent cells」

2016 年 3 月 15 日

ASTAR (Singapore)

**Akiko Takahashi**, Eiji Hara

第 10 回 AACR-JCA Joint conference

「Senescence-associated non-coding RNAs expression promotes chromosomal instability」

2016 年 2 月 17 日

ハイアットリージェンシーマウイ (USA)

**高橋 暁子**, 原 英二

第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「放射線生物影響の課題に挑む分子生物学研究の力」

「DNA 損傷応答と細胞老化」

2015 年 12 月 3 日

神戸国際展示場 (兵庫)

**高橋 暁子**

東北エイジングサミットー加齢制御研究か

ら臨床までー

「細胞老化におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構」 2015 年 9 月 27 日

仙台国際センター (宮城)

Yoshinori Imai, **Akiko Takahashi**, Eiji Hara

第 1 回 ICSA

「Epigenetic dysregulation of satellite RNAs expression in senescent cells」

2015 年 7 月 20 日

Santiago de Compostela (Spain)

**高橋 暁子**, 原 英二

第 15 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム エピジェネティクスと老化

「DNA 傷害とエピゲノム」

2015 年 5 月 29 日

福岡国際会議場 (福岡)

**高橋 暁子**, 原 英二

第 33 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 「Molecular Biology of Aging and Age-Related Disorders」

「The roles of cellular senescence in aging and cancer」

2014 年 11 月 25 日

パシフィコ横浜 (神奈川)

今井良紀, **高橋 暁子**, 原 英二

第 73 回日本癌学会学術大会

「細胞老化に伴い発現上昇するレトロエレメントの染色体不安定性への関与」

2014 年 9 月 27 日

パシフィコ横浜 (神奈川)

**高橋 暁子**, 原 英二

第 7 回シンフォニー

「細胞老化による発癌促進機構について」

2014 年 9 月 14 日

エドモントホテル飯田橋 (東京)

今井良紀、**高橋暁子**、原 英二  
第2回がん代謝研究会  
「フォークヘッド転写因子による細胞運命  
決定機構」  
2014年7月10日  
東京理科大学葛飾キャンパス（東京）

〔図書〕(計5件)

**高橋暁子**  
細胞老化研究が巡礼の地から世界へ  
**実験医学** 34: 118-121 (2016)

**高橋暁子**、岡田 遼、原 英二  
細胞老化と炎症  
**炎症と免疫** 23: 487-491 (2015)

**高橋暁子**、原 英二  
SASP誘導に関わる分子メカニズム  
**細胞工学** 34: 1125-1129 (2015)

**高橋暁子**  
細胞老化と発がん制御  
**最新医学** 132: 1216-1219 (2014)

**高橋暁子**、今井良紀、原 英二  
細胞老化の分子機構と発がん制御における  
役割  
**がん分子標的治療** (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer\\_biology/index.html](http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer_biology/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 暁子 (TAKAHASHI, Akiko)

(公財)がん研究会・がん研究所がん生物  
部・主任研究員

研究者番号: 60380052

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

岡田 遼 (OKADA, Ryo)