

細胞老化が生体機能に及ぼす影響とその機構に関する研究（25-18）

主任研究者 杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 老化細胞研究プロジェクトチーム
(プロジェクトリーダー)

研究要旨

哺乳動物の細胞は過度のストレス（DNAダメージなど）を受けると、細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。このようなストレスに対する感受性は、細胞の由来となる生物種の平均寿命と逆相関を示すことから、細胞老化が個体の寿命を規定する一因子ではないかと考えられてきた。細胞老化は、複数の癌抑制タンパク質を介した細胞周期チェックポイント機構の活性化により引き起こされ、生体において極めて重要な癌抑制機構として機能していることが明らかになっている。しかしながら現在までに細胞老化と個体の老化現象を結びつける決定的な証拠は見つかっておらず、老化現象に対する細胞老化の役割については疑問視されてきた。

細胞老化を起こした細胞（ここでは老化細胞と定義する）は、生体内においても様々な組織で加齢に伴い蓄積が認められている。しかしながらその頻度はきわめて低く、加齢に伴って見られる組織機能の低下に老化細胞が貢献しているかについては疑問視されてきた。しかし近年、老化細胞は単に増殖を停止しているだけでなく、様々な生理活性物質を分泌することにより積極的に老化細胞の周辺環境に影響を及ぼすことが示された。この様な老化細胞特異的な分泌表現型はSASP (**S**enescence-**a**ssociated **s**ecreting **p**henotype) と呼ばれ、加齢に伴う組織機能の低下に関与する可能性が指摘されている。これまでに少なくとも、SASPを介した老化細胞の非細胞自立的機能により、癌細胞の増殖や幹細胞の異所的分化などを誘発し得ることが報告されている。しかしながら、老化細胞が加齢に伴う生体機能の変化にどのような役割を持つのか、またSASPなどの細胞老化特異的な表現型を維持するメカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。

本研究では、これまでに我々が作製したモデル動物を用いて老化に伴う生体機能の変化や疾患において老化細胞の役割について解析を行い、これまでに呼吸器の加齢性変化に細胞老化が関与することを見出した。本年度はその機構について、詳細な解析を行った。

主任研究者

杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 老化細胞研究プロジェクトチーム
(プロジェクトリーダー)

A. 研究目的

本研究では細胞生物学的視点から加齢現象に迫り、モデル生物を利用して個体老化における細胞老化の役割について明らかにすること、また分子細胞生物学的手法を用いて細胞老化の表現型を発揮・維持するメカニズムについて明らかにすることを目的とする。最終的には、加齢性疾患に対して老化細胞が有効な創薬標的となるかについて知見を得ることを目的とする。

前年度までに、呼吸器の加齢性変化に細胞老化が重要な役割を持つことを見出している。本年度は細胞老化が呼吸機能に影響を与えるメカニズムについて詳細な解析を行う。

B. 研究方法

申請者の研究室ではこれまでに、生体から老化細胞を検出し、排除可能なモデルマウスの構築を行った。このモデルマウスでは、老化細胞に特異的にルシフェラーゼ及びヒト **HB-EGF** (ジフテリア毒素受容体) 遺伝子を発現させるために、**CDKN2A** 遺伝子座にこれら遺伝子の発現ユニットを組み込んだ。このモデルマウスを用いて、生体において老化細胞の動態と生理機能について検討した。

(倫理面への配慮)

実験上必要とされる遺伝子サンプル、動物の取り扱い「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守した。動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果

本研究計画で使用するマウスは、**CDKN2A** 遺伝子座からルシフェラーゼ遺伝子とジフテリア毒素受容体として機能するヒト **HB-EGF** 遺伝子を発現する。**CDKN2A** 遺伝子は細胞老化とともに発現が上昇し、生体においても細胞老化マーカーとして使用されている。またマウスには、ジフテリア毒素受容体として機能する分子が心材しないため、細胞はジフ

テリア毒素 (DT) に対して耐性を持つ。しかしながらヒトジフテリア毒素受容体をマウス細胞に発現させると、ヒト細胞同様にマウスの細胞も感受性を持つようになる。従って本研究計画で使用するモデルマウスの細胞は、細胞老化を起こした時のみジフテリア毒素に感受性を持つ。この性質を利用して、マウスにジフテリア毒素を投与すると、生体内から老化細胞だけを排除できることが期待される。

このモデルマウスを利用してこれまでに、呼吸器 (肺組織) において老化細胞が加齢とともに蓄積すること、ジフテリア毒素を腹腔内投与することにより肺組織から老化細胞を排除可能であること、さらに老化細胞を排除することにより加齢に伴って低下した呼吸機能が回復することを見出している (未発表データ)。

これまでの結果を踏まえ、本年度は細胞老化が呼吸機能の変化に及ぼす影響についてより詳細な解析を行った。

最初に、上記マウスから肺組織を採取し、定圧で肺を膨らませながら固定し、組織像の解析を行った。肺組織は加齢とともに個々の肺胞の径が大きくなる。これは弾性繊維が失われることにより収縮が不完全になることに起因しており、いわゆる「老人肺」の特徴のひとつである。モデルマウスにおいて肺胞径の測定を行ったところ、2ヶ月齢と比較して12ヶ月齢のマウス肺組織では、肺胞径の顕著な増大が認められた (未発表データ)。しかしながら DT 処理を行ったマウスの肺組織では、肺胞径の有意な減少が認められた。これらの結果は、前年度までに行ったスパイロメトリー解析の結果 (老化細胞を排除することにより弾性が回復する) と一致している。

次に、肺組織から RNA を抽出し、遺伝子発現の変化について解析を行った。老化した細胞の特徴である SASP に関連した遺伝子群について、リアルタイム PCR で定量を行ったところ、いくつかの遺伝子の変動については老化細胞の動態と強い相関関係が認められた。

さらに老化細胞の動態に関連した遺伝子発現の変化について網羅的に解析するために、抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った (未発表データ)。マイクロアレイの結果、加齢により変動があった遺伝子群のうち、約 60% の遺伝子が、若い状態へと近づくことが明らかになった。また Gene Ontology 解析の結果、免疫や炎症反応に関わる遺伝子の多くが、老化細胞の動態と相関した変動を示した。従って生理機能だけでなく、遺伝子発現の観点からも老化細胞を排除した肺組織は“若返って”いることが示唆された。

肺組織の弾性の低下は、加齢に伴って生じるエラスチンを主成分とする弾性繊維の低下に起因する。そこで次にこれらマウスの肺組織におけるエラスチン量の変化について、解析を行った。肺組織切片を同一条件下で、エラスチン抗体で染色し、視野あたりの総シグナル強度について、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて定量した。その結果、12ヶ月齢マウスの肺組織では、2ヶ月齢マウスに比べて顕著なエラスチン量の低下が確認された。しかしながら DT 処理を行った 12ヶ月齢マウスの肺組織では、コントロール処理群と比較して、エラスチン量の回復が見られた (未発表データ)。野生型マウス組織ではこの様な効果は見られないことから、12ヶ月齢マウス肺組織におけるエラスチン量の回復は、老化細胞の排

除に起因するものと思われる。

前年度までに得られた結果を含め、以上の結果を統合的に考えると、呼吸器の加齢性変化の特徴のひとつである組織弾性の低下は、老化細胞の蓄積によって肺組織内のエラスチン繊維量が低下することに起因することが強く示唆される。また、肺組織内に老化細胞が出現すると、老化していない細胞を含め、肺組織全体の遺伝子発現プロファイルに大きな変化が現れる。このような変化が組織全体のエラスチン量に影響を与えている可能性が考えられる。

老化細胞の蓄積とともに肺組織では MMP-10、MMP-12 などのエラスチン分解活性を持つプロテアーゼの発現量が増加する。これらの因子は、老化細胞を排除することにより、再び発現が低下し、同時にエラスチン量の回復が始まる。そこで次に、これら MMP が細胞老化時にみられるエラスチン量の変化を起こしているかについて検証を行った。

野生型マウス胚性繊維芽細胞 (MEF) において、これら MMP の発現を RNAi により抑制、もしくは MMP 活性を化合物によって阻害した。これら MEF で細胞老化を誘導するために、放射線照射を行い、3%酸素条件下で培養を行った。MMP-10 もしくは MMP-12 を阻害した老化細胞では、エラスチン量が上昇する傾向が見られた (未発表データ)。また MMP 阻害化合物 (NNGH) 存在下においても同様の傾向が認められた。したがって老化細胞において変動する MMP は、エラスチン量に大きく影響を及ぼし得ることが示唆され、加齢肺組織におけるエラスチン量の変化についても、老化細胞によって誘導された MMP の増加が原因となり得る可能性が考えられる。

D. 考察と結論

ヒトやマウスにおいて老化細胞は、加齢とともに様々な組織に蓄積することが知られている。しかし老化細胞が組織の加齢性変化にどのような影響を及ぼすのかについては、殆どわかっていない。本研究では、独自に樹立したモデルマウスを用いて、呼吸器の加齢性変化における老化細胞の役割について解析を行った。

呼吸器の老化は、弾性繊維の低下による収縮力の低下に特徴づけられる。このような機能が低下した呼吸器は老人肺とも呼ばれ、肺気腫のリスクになると考えられている。本研究からは、肺組織内の老化細胞を排除することにより、呼吸器の生理機能が回復することを示す結果が得られた。組織学的解析から、老化細胞を排除した肺組織では、エラスチン量の回復が認められた。肺組織における遺伝子発現変化を調べたところ、老化細胞の動態と強い相関を示して MMP などのエラスチン分解活性を持つ因子の増減が見られた。培養細胞系の細胞老化モデルでは、MMP の活性を阻害することにより、細胞老化時にエラスチン量の回復がみられた。肺組織内においても、同様の機構を介してエラスチン量の変化が変化するのではないかと考えられる。

以上の結果から老化細胞は、加齢によって低下した呼吸機能を回復させる上で有効な標

的であることが強く示唆された。またエラスチン量の低下は呼気時に肺の収縮が不完全になるだけでなく、気腫の原因である肺胞壁破壊が起こりやすくなる。最終年度では、呼吸器疾患と細胞老化との関わりについて解析を進めたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takagi M., Uno M., Nishii R., Sugimoto M., Hasegawa S., Piao J., Ihara N., Kanai S., Kakei S., Tamura Y., Suganami T., Kamei Y., Shimizu T., Yasuda A., Ogawa Y., and Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation and contributes to glucose homeostasis. *Cell Rep.* *10*. 957-967. 2015
- 2) Hashimoto M, Tsugawa T, Kawagishi H, Asai A, Sugimoto M. Loss of HuR leads to senescence-like cytokine induction in rodent fibroblasts by activating NF- κ B. *Biochim Biophys Acta.* *1840*. 3079-3087. 2014

2. 学会発表

- 1) Sugimoto, M. Restoration of pulmonary function in aged animal by eliminating senescent cells. The 2015 Aging Summit, London (UK), February 11, 2015
- 2) 橋本理尋、浅井あづさ、杉本昌隆 老化細胞除去による呼吸機能の回復 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月25日
- 3) 杉本昌隆、橋本理尋、浅井あづさ Ablation of senescent cells ameliorates age-associated pulmonary hypofunction 日本基礎老化学会第37回大会, 愛知, 2014年6月27日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：ハイブリドーマ

発明者：杉本昌隆、中村英亮

権利者：ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：特許第 5671669 号

出願年月日：平成 21 年 12 月 25 日

取得年月日：平成 27 年 1 月 9 日

国内外の別： 国内

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし