

細胞老化の生理学的・病理学的役割に関するプロジェクト（22-19）

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

ヒトを含む哺乳動物の殆どの体細胞は限られた分裂寿命を持ち、やがて細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。この10年あまりの研究成果から、細胞老化には複数の癌抑制タンパク質が関与していることが示され、生体内においても細胞老化が癌防御機構として機能することが明らかになっている。しかし現在においても、細胞老化が個体の老化においてどのような役割を持つかについては不明である。本研究では細胞老化に着目し、細胞老化が個体老化においてどのような役割を持つのか、また加齢に伴って見られる組織機能の低下にどのような寄与をするのかを解明するためのモデル動物を作製し、細胞老化が加齢性疾患や老化に伴う組織機能低下に対する有効な創薬ターゲットとなり得るか判断することを目的とする。

細胞老化を起こした細胞（Senescent cell）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、Senescent cell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Senescent cellの周辺の環境に影響を及ぼすことが示された。この様なSenescent cell特異的な分泌表現型（SASP）が、加齢に伴う組織機能の低下に関与する可能性が考えられる。これまでに少なくとも、SASPによって非細胞自立的な癌細胞の増殖や、幹細胞の異所的分化などを誘発することが報告されている。

本研究では新たなモデルマウスを作製し、細胞老化の生体における役割について、加齢に伴う表現型との関連に焦点を当てて検討を行い、将来的に Senescent cell が加齢性疾患や老化に伴う組織機能低下に対する有効な創薬ターゲットとなり得るか判断することを目的とする。

また、近年ストレスが細胞老化を誘導することにより2型糖尿病などの代謝系疾患に関与することが指摘されている。脂肪細胞特異的にストレス・細胞老化誘導が可能なマウスを作製し、脂肪細胞のストレスが生体に及ぼす影響について解析を行った。

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

本研究では細胞レベルからエイジングを理解することを目標とし、個体老化における細胞老化の役割について追求可能なモデル動物の樹立を目的とする。

細胞老化は40年以上も前に培養細胞において発見されたが、その生理学的役割については永らく不明であった。**Senescent cell**は生体においても観察されるが、生体と試験管内で見られる細胞老化が同じ性質を持つかについては未だ議論の余地がある。細胞老化には複数の癌抑制タンパク質 (**ARF**、**p16**、**p53**、**RB** など) が関わるということが知られており、生体内において実際に癌抑制機構として機能することが示されている。発見当初から示唆されていたようなエイジングとの関わりについては不明であったが、近年の報告では加齢に伴い **Senescent cell** の出現頻度が高くなることが認められている。

Serrano のグループから、細胞老化には生体内でダメージを受けた細胞の増殖を速やかに停止させ、生体に対するダメージを軽減する役割があることが報告された。しかし一方で、**Senescent cell** は様々な生理活性物質を分泌し、非細胞自立的な癌細胞の増殖や幹細胞の異所的分化など周辺環境に悪影響を与えることが報告されており、これらの現象が加齢に伴う組織機能の低下に関与する可能性が考えられる。

本研究における特色・独創的な点は、老化を克服するにあたり **Senescent cell** が有効な標的となり得るかを評価することにある。具体的には生体内で **Senescent cell** を任意の時期に特異的に検出・排除可能なモデル動物を樹立し、細胞老化が生体に及ぼす影響について解析ができる系を構築する。

また、近年脂肪組織等の細胞老化が代謝系疾患の原因になる可能性が指摘されている。申請者は培養系において **HuR** と呼ばれるストレス応答に関わるタンパク質が細胞老化を制御する因子であることを見出した。そこで生体におけるストレス応答・細胞老化の役割について明らかにすることを目的とし、脂肪特異的に **HuR KO** マウスを作製し、ストレス応答機構が細胞老化を介して生体機能に影響を与えるかについて検討を行う。

B. 研究方法

①生体から **Senescent cell** を特異的に排除可能なモデルマウスを作製し、これらの細胞を排除したときに組織機能に改善が認められるか検証を行う。

Senescent cell を生体から任意の時期に、かつ特異的に排除可能なマウスを作製するために、マウスの細胞がジフテリア毒素に耐性を持つ性質を利用する。ジフテリア毒素耐性を

持つマウス細胞においても、ヒトのジフテリア毒素受容体として機能する HB-EGF を発現させることにより、感受性を持つようになる。この系を利用し、Senescent cell 特異的に HB-EGF を発現可能なシステムを作製する。

②現在保持している脂肪特異的 CRE マウスと HuR コンディショナルノックアウトマウスを交配し、脂肪特異的 HuR ノックアウトマウスを樹立する。このマウスを用いて糖代謝能など脂肪組織機能に関連した表現型について解析を行う。また培養細胞において HuR を介したストレス応答機構がどのように細胞老化を制御するか調べる。

(倫理面への配慮)

必要とされた遺伝子サンプル、動物の取り扱いは「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」に則り、また動物実験に関しては動物愛護上の配慮を踏まえ、本研究所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

①Senescent cell を排除可能なトランスジェニックマウスの作製

前年度から引き続き Senescent cell 特異的にジフテリア毒素受容体を発現させるためのトランスジェニックベクターの構築を行なった。作製したベクターをサザンブロット、およびダイレクトシーケンシングにより目的の遺伝子が挿入されていることを確認した。このベクターをリニアライズ後、パルスフィールド電気泳動により精製し、マウス受精卵にマイクロインジェクションを行なった。得られたマウスをサザンブロットにより解析した結果、複数のトランスジーンを持つマウスが存在することを確認した (図 1)。

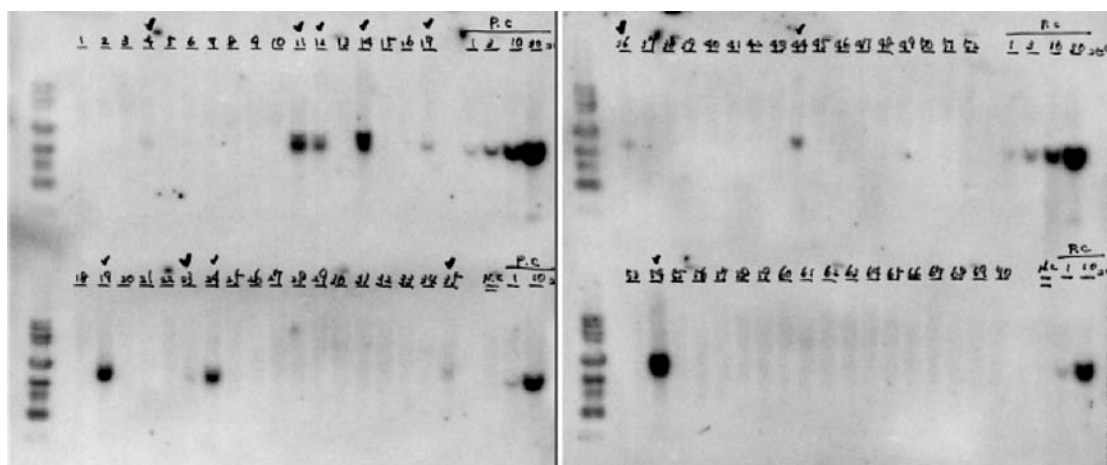


図 1. サザンブロットによるファウンダーマウスのスクリーニング

②ストレス応答因子のひとつである **HuR** は、ヒトにおいて加齢とともにその発現が低下することが知られている。そこで老化表現型における **HuR** の役割を調べるために、脂肪組織特異的ノックアウトマウスの作製を行った。このマウスでは加齢とともに脂肪組織の細胞老化が亢進することが明らかになった。さらに野生型マウスでは加齢と共にインスリン抵抗性が惹起されるが、**HuR** ノックアウトマウスではこの表現型の進行が認められた（投稿準備中）。

D. 考察と結論

①本年度は、前年度から継続していたトランスジェニックベクターの作製を完了し、このベクターを用いてトランスジェニックマウスの作製を開始した。これまでに複数のトランスジーンを持つファウンダーマウスを得た。今後これらのマウス系統から細胞を調整し、トランスジーンが細胞老化と共に発現して機能するかについて検討を行う。培養レベルで期待した動きを見せた系統については新動物棟の完成後に動物を搬入し、生体内でトランスジーンが老化と共に発現・機能するか調べ、目的に合致したラインの選定を行なう。

②**HuR** はストレス応答に重要な役割を持つタンパク質であり、細胞老化の誘導に関与することが知られている。脂肪組織特異的 **HuR** ノックアウトマウスにおいては加齢依存的な細胞老化の亢進が脂肪組織において認められた。このマウスは加齢に伴うインスリン感受性の低下がコントロール群と比較して早期から観察された。脂肪細胞における細胞老化は、インスリン抵抗性を惹起する原因となり得ることが既に報告されている。従って **HuR** 欠損がストレス応答異常を介して細胞老化を引き起こし、その結果インスリン抵抗性が惹起された物と考えられる。今後は **HuR** 欠損が細胞老化を引き起こすメカニズムについて解析する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura, H., Kawagishi, H., Watanabe, A., Sugimoto, K., Maruyama, M., and **Sugimoto, M.** Cooperative role of RNA-binding proteins, Hzf and HuR in p53 activation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1997-2009, 2011.

2. 学会発表

- 1) Kawagishi, H., Nakamura, H., Tsugawa, T. and **Sugimoto, M.** HuR maintains

replicative lifespan by repressing ARF tumor suppressor. 第34回大会 日本分子生物学会年会 横浜, 2011年12月14日

- 2) Kawagishi,H. and **Sugimoto,M.** RNA-binding protein HuR suppresses cellular lifespan by repressing the translation of *ARF* mRNA. Mechanism and Model of Cancer, SALK symposia, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし