

長寿医療研究開発費 平成24年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

期間全体（2年5ヶ月）について

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。一方で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。しかし近年、細胞老化が2型糖尿病などの代謝系疾患に関与することなどが報告されるなど、生体機能の変化に細胞老化が関与する可能性が指摘されている。

老化のメカニズムは、ヒトを含む高等哺乳動物においては殆ど解明されていない。本研究では細胞老化に着目し、細胞老化の生体における役割、さらに加齢に伴う組織機能の変化との関連を探ることを目的として、生体から細胞老化を起こした細胞（老化細胞）の検出と排除が可能なモデル動物の作製を行う。平成22年度から23年度にかけて、トランスジェニックマウス作製のためのベクターを構築し、これを用いてトランスジェニックマウスの作製を進め、多くのファンダーマウスを得た。

平成24年度について

平成24年度は、昨年度に誕生したファウンダーマウスを選別し、老化細胞特異的にトランスジェンが発現するラインを得た。

主任研究者

杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 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

分担研究者

なし

研究期間 平成22年11月1日～平成25年3月31日

A. 研究目的

本研究では細胞生物学的な視点から老化現象に着目し、老化現象における細胞老化の役割、および細胞老化の分子メカニズムの解明を目指す。

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現象であるが、その生理学的役割については長い間不明であった。この10年余りの研究から、細胞老化には、ARF、INK4a、p53、RBなど、様々な癌抑制タンパク質が関与していること、さらにモデル動物を用いた遺伝学的な解析から、細胞老化が生体内で極めて重要な癌抑制機構として機能することが明らかになった。一方で発見当初から考えられていたような、老化現象との関わりについては、不明である。しかしながら近年の研究から、加齢に伴い様々な組織において老化細胞の出現頻度が高くなること、また細胞老化が心血管系疾患や代謝系疾患などの疾病に関与することが明らかになるなど、改めて老化現象と細胞老化の関連が指摘されている。

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明らかになった。このような老化細胞特異的な分泌表現型は SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれ、SASP によって非細胞自立的な癌細胞の増殖や、幹細胞の異所性分化を誘発するなど、周辺環境に悪影響を与えることが報告されている。このような老化細胞の非細胞自律的な機能が、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。

本研究では、老化細胞が生体で持つ役割、特に加齢に伴う生体機能の変化にどのような影響を持つのかを明らかにすることを目的とし、生体から任意の時期に老化細胞を特異的に検出・排除可能なモデル動物 (マウス) の樹立を行う。

B. 研究方法

期間全体（2年5ヶ月）について

老化細胞特異的に DTR-2A-ルシフェラーゼ発現トランスジェニックベクターを作製する。このベクターを用いてトランスジェニックマウスを樹立する。

初年度は老化細胞特異的にトランスジーンを発現させるために、どの遺伝子の発現制御領域を用いるか検討をおこなった。このために、培養細胞、および生体内で細胞老化とともに発現する遺伝子の動態を解析した。

次年度にかけてはこの遺伝子の発現制御領域を含む人工染色体を入手し、トランスジェニックベクターの作製を行った。ベクターの作製には Red/ET 相同組換えシステムを利用した。

得られたベクターをマウス受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスの作製を行った。生まれてきたマウス尾部からゲノム DNA を抽出し、サザンブロットにより外来遺伝子の有無を確認した。

平成24年度について

当該年度は、昨年度得られたファウンダーマウスの選別を以下の基準に従って行った。

- ・トランスジーンが複数コピー、染色体の一ヶ所に挿入されている。
- ・試験管内で胚性線維芽細胞（MEF）を継代培養、および癌遺伝子導入により細胞老化を誘導したときにトランスジーンが発現が誘導される。
- ・加齢に伴い、内在性細胞老化マーカーの発現とともにトランスジーンが組織で発現する。トランスジーンが発現は生体イメージング装置を用いてルシフェラーゼの発光で評価する。
- ・生体で老化細胞のみが DT 投与により排除される。

（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

期間全体（2年5ヶ月）について

- ・トランスジーン（DTR-2A-ルシフェラーゼ）発現ユニットの選定
マウスの細胞老化においては、ARF-p53 癌抑制経路が不可欠な役割を持っている。ARF

遺伝子の発現は、細胞老化を起こすようなストレスによって誘導される。生体において加齢とともに内在的 ARF 遺伝子の発現が誘導されるかについて確認したところ ARF 遺伝子の発現は加齢に伴い精巣、脳、心臓を除く様々な組織で著しい誘導が認められたため、ARF 遺伝子の発現制御システムを用いて老化細胞特異的にトランスジーンを発現させることにした。

生体内で ARF 同様にトランスジーンを発現させるために、ARF 遺伝子の発現制御領域を含む約 70kb の人工染色体を用い、ARF 遺伝子のエクソン部分を Red/ET システムを用いた相同組換えによりトランスジーンへと置換えたトランスジェニックベクターを構築した (図 1)。構築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。

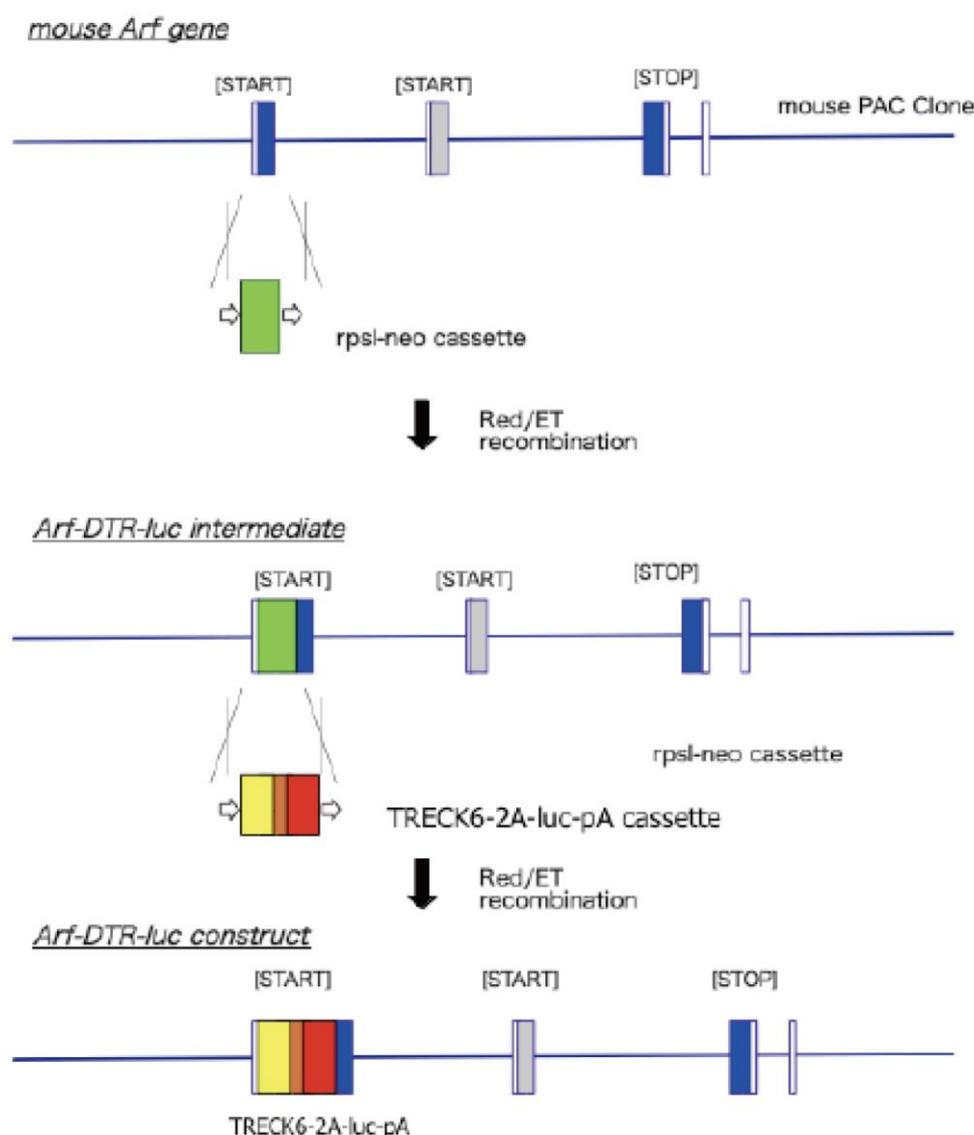


図1. トランスジェニックベクターの構築。ARF 遺伝子を含む約 70kb のファージ人工染色体(PAC)を用い、ARF 遺伝子のエクソン1に Red/ET 相同組換えシステムを用いて DTR-2A-ルシフェラーゼ融合タンパク質発現ユニットを導入した。

トランスジェニックベクターを制限酵素処理によりリニアライズし、パルスフィールド電気泳動により精製を行い、マウス受精卵にマイクロインジェクションを行なった。生まれたマウス尾部からゲノム DNA を抽出し、サザンブロットにより解析した結果、トランスジーンを持つファウンダーマウスが複数ライン得られたことを確認した(図2)。

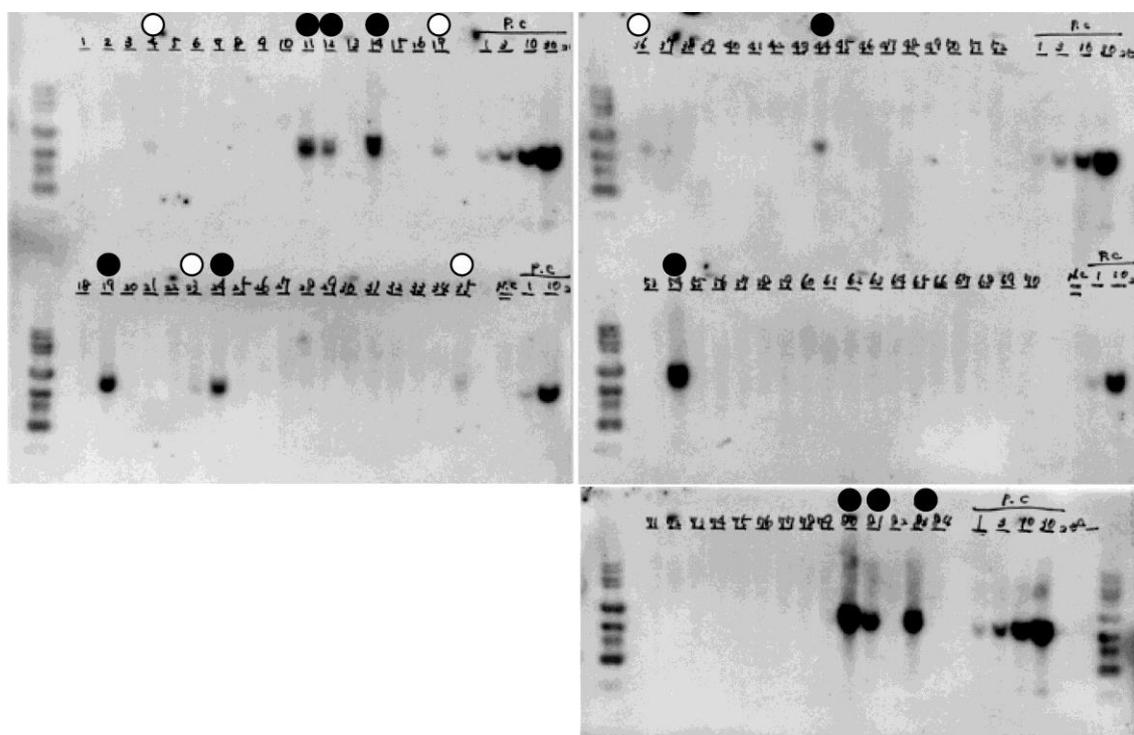


図2. サザンブロットによるファウンダーマウスのスクリーニング。○は1コピー、●は複数コピーのトランスジーンがゲノム DNA に挿入されているマウスを示す。

平成24年度について

当該年度は前年度までに得られたファウンダーマウスの選別を行った。図3のサザンブロットから一細胞あたり複数コピー数のトランスジーンを持つラインのみを選別し、交配を行った。得られた仔マウスからそれぞれゲノム DNA を調製し、同様にサザンブロットを行った(図3に例を示す)。この結果、トランスジーンがメンデルの法則に従って次世代に受け継がれ、かつコピー数に変化がないラインについて、ゲノムの一箇所にタンデムに複数コピーのトランスジーンが挿入されていると判断した。



図3. 仔マウスゲノム DNA のサザンブロット解析例。ファンダーマウスを野生型マウスと交配し、得られた仔マウス尾部からゲノム DNA を抽出し、トランスジーンをサザンブロットにより解析した。

次にこれらのファンダーマウスからそれぞれ MEF を調製した。得られた MEF を継代培養または活性化型変異 Ras (RasV12) の導入により細胞老化を誘導し、このときのルシフェラーゼ活性を評価した。これらのアッセイにより、細胞老化とともに外来ルシフェラーゼ遺伝子を発現するもラインが得られたことを確認した。

次にこのラインの MEF の DT 感受性を評価した。継代培養、もしくは RasV12 により細胞老化を誘導し、DT を培地に添加し 24 時間後のルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、細胞老化を起こしていない状態では DT に対する感受性は殆ど認められなかったが、継代培養、RasV12 で細胞老化を誘導したサンプルではともに著しい DT 感受性が認められた。

このトランスジェニックマウスを用い、生体イメージングシステムを用いて、生体内の老化細胞の検出が可能であるか調べた。2 ヶ月齢マウスにおいては、ルシフェラーゼ活性は検出されなかったが、12 ヶ月齢マウスからは複数の組織において顕著なルシフェラーゼ活性が確認された。次に DT をこのマウスに投与し、ルシフェラーゼ活性にどのような影響を与えるか調べたところ、ルシフェラーゼ活性に著しい減少が認められた。以上の結果から、このトランスジェニックマウスは生体から老化細胞の検出、DT 投与により排除が可能であることが示された。

D. 考察と結論

複数のファンダーマウスを選別した結果、1 ラインのみであったが、目的であった生体から老化細胞を任意の時期に特異的に検出・排除可能なモデルマウスの樹立が完了した。多数のファンダーマウスを得たにも関わらず、その殆どはトランスジーンを発現しない、もしくは細胞老化を起こしたときに誘導されないものであった。ARF/INK4a 遺伝子の発現制御は極めて複雑であり、転写制御には染色体レベルの大規模な構造変化を伴うことが知られている。その制御にはポリコーム群を介したクロマチンリモデリングが重要な役割を果たすが、ARF/INK4a 遺伝子制御を行うためのポリコーム応答領域は、ARF 遺伝子座を

中心として数十 kb の範囲に分散していることが報告されている。近年、約 2kb の INK4a 遺伝子プロモーターを使用して同様の目的のモデルマウスが作製されたが、やはりこの領域だけでは完全に内在性遺伝子の発現を模倣しきれないことが報告されている。我々のモデルマウスを作製する際に使用した人工染色体は、ARF 遺伝子座を中心に約 70kb の領域を含み、報告されているポリコム応答領域も全て含まれている。従って本研究で樹立されたマウスはより正確に老化細胞のみをマークすることが可能であると考えられる。

老化細胞は生体の多くの組織において加齢とともに出現が認められるが、特に肺や脂肪組織では早期（12 ヶ月）から蓄積していることが示された。本研究で樹立したモデルマウスを生体イメージング解析した結果、12 ヶ月齢において複数の組織でルシフェラーゼ活性の上昇が見られている。今後、このルシフェラーゼ活性が見られた組織が図 1 の結果と相關するのか調べる必要がある。またさらにこのマウスを老化させたときに、より多くの組織でルシフェラーゼ活性が見られるのかについても検討しなければならない。また、DT 処理によりルシフェラーゼ活性を低下させることが出来たが、これら条件下で生体から老化細胞が排除されているのか、慎重に調べる必要がある。老化細胞だけが排除されていることが確認されたならば、本来の目標である、加齢に伴う生体機能の変化における老化細胞の役割を明らかにする上で、このマウスは極めて有用なモデルとなることが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 22 年度

- 1) Kawagishi, H., Nakamura, H., Maruyama, M., Mizutani, S., Sugimoto, K., Takagi, M., and Sugimoto, M. ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res.* 70, 4749-4758, 2010.
- 2) 川岸裕幸、丸山光生、高木正稔、杉本昌隆 癌抑制・細胞老化因子 ARF が引き起こす血管新生抑制及び疾患との関わり 基礎老化研究 34, 19-21, 2010
- 3) Nakamura, H., Azusa, A., Maruyama, M., and Sugimoto, M. Production of Rat Monoclonal Antibodies Against RNA-binding Protein, Hzf. *Hybridoma* 29, 7-11, 2010.

平成 23 年度

- 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.

平成 24 年度

- 1) Kawagishi, H., Hashimoto, M., Nakamura, H., Tsugawa, T., Watanabe, A., Kontoyiannis, D. L., and Sugimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by suppressing ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* *In press.*
- 2) Takagi, M., Piao, J., Kawagishi, H., Imai, C., Ogawa, A., Watanabe, A., Akiyama, K., Kobayashi, C., Mori, M., Ko, K., Sugimoto, M., and Mizutani, S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous repression of JMML. Leukemia *In press.*
- 3) Unno, J., Takagi, M., Piao, J., Sugimoto, M., Honda, F., Maeda, D., Masutani, M., Kiyono, T., Watanabe, F., Morio, T., Teraoka, H., and Mizutani, S. Artemis-dependent DNA double strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Science* *In press.*

2. 学会発表

平成 22 年度

- 1) Nakamura, H., Kawagishi, H., Watanabe, A., Maruyama, M., Sugimoto, M. Post-transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor. Molecular Genetics of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2010
- 2) Sugimoto, M. Post-transcriptional regulation of the p53 pathway.
日本基礎老化学会第 33 回大会 シンポジウム 2010 年

平成 23 年度

- 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

平成 24 年度

- 1) Tsugawa, T., Michihiro, H., Kawagishi, H., and Sugimoto, M. HuR regulates senescence-associated secretory phenotype through DNA damage response pathway. 第 35 回大会 日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 福岡, 2012 年 12 月 11 日
- 2) Sugimoto, M., Kawagishi, H., Tsugawa, T., and Hashimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by repressing ARF tumor suppressor. Keystone Symposia Aging and Diseases of Aging, 2012

- 3) 杉本昌隆、川岸裕幸、津川貴行、中村英亮 RNA 結合タンパク質 HuR は癌抑制タンパク質 ARF を抑制することにより細胞の分裂寿命を維持する 日本基礎老化学会第 35 回大会, 2012 年 7 月 26 日

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