

48. 細胞老化誘導による新たながん治療法の確立

中西 真

*名古屋市立大学 大学院医学研究科 基礎医科学講座 細胞生化学

Key words : 細胞老化, 発がん防御, p53, F-box たんぱく質, 炎症性サイトカイン

緒言

真核細胞は様々な変異原ストレスや DNA 複製ストレスに晒されており、これらストレスに適切に対応することで自己の染色体を安定に維持しながら増殖している。細胞は変異原ストレス等を受けると DNA 損傷応答シグナルを活性化させる。DNA 損傷応答シグナルは、多細胞生物体においては DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、あるいは早期細胞老化等を誘導して異常染色体 DNA 構造を持った細胞の蓄積を防いでいる。これらの細胞応答が個体レベルでの発がん防御に中心的な役割を果たしていると考えられている。この内、早期細胞老化は最も重要な発がん防御機構と考えられるが、その誘導にはがん抑制遺伝子である p53 や pRb が中心的な役割を果たしている以外にはほとんど分かっていなかった。しかしながら、がん細胞や前がん細胞に老化形質を安定的かつ長期的に誘導する事が可能になれば新たながん治療あるいは予防戦略の確立に繋がると期待できる。一方、がん細胞は様々な炎症性サイトカインや増殖因子を特異的に分泌し (Senescence Associated Secretory Phenotypes: SASP)、周囲の微小環境に影響を与えることで、非細胞自律的にがん化を促進する可能性も示唆されている。本研究では、新たながん治療法開発に役立てるため、老化細胞による SASP 抑制技術を確立することを目標に、SASP 誘導機構を制御する因子群を同定し、その分子基盤を解析した。

方法および結果

我々はこれまで、老化細胞誘導が G2 期での p53 の特異的活性化により生じる、細胞分裂期制御たんぱく質の消失による細胞分裂期回避の結果起こることを明らかにしてきた¹⁾。本研究では、これまでの研究成果に立脚して、最も単純かつ解析の容易な細胞老化誘導法を用いた。

1. 老化細胞における SASP 誘導制御因子の同定

これまで、老化細胞における SASP の誘導に、p53 が抑制的に機能していることが知られていた。このことは、細胞老化維持過程においては、誘導過程で活性化された p53 が不活性化される必要があることを示している。我々は、老化細胞特異的に発現する因子が、老化細胞維持、とりわけ SASP 誘導に対して p53 を負に制御していると考え、この因子の同定を試みた²⁾。具体的には、老化細胞が扁平で肥大化していることを利用して FACS ソーターにより細胞を選別し、遺伝子発現解析を行うことで、老化細胞特異的に発現している遺伝子群を同定した (図 1)。このうち、F-box たんぱく質である Fbxo22 に着目して解析を進めた。

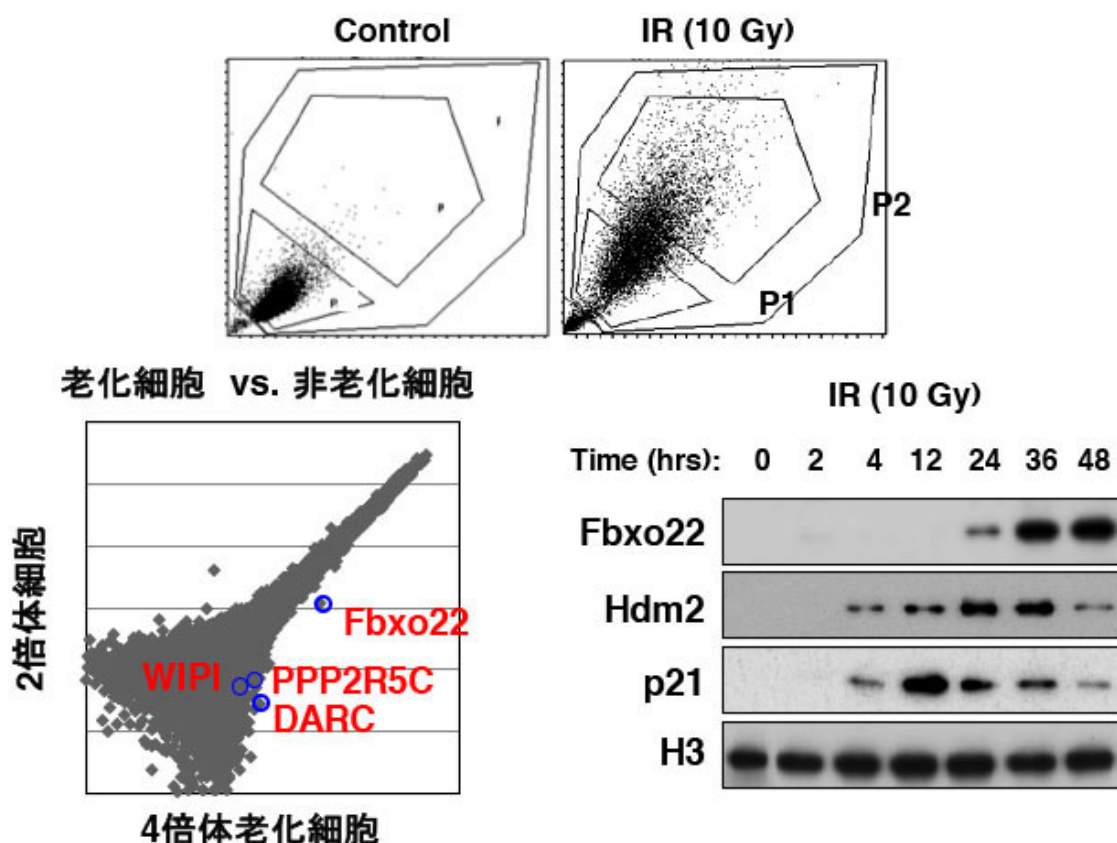


図1. 老化細胞特異的発現遺伝子の同定

正常ヒト線維芽細胞に IR (10 Gy) を照射し、FACS ソーターを用いて老化細胞画分と、非老化細胞画分を分離した (上図)。分離した細胞群を用いて遺伝子発現解析を行い、老化細胞特異的に発現する遺伝子群を同定した (下左図)。このうち Fbxo22 たんぱく質は、Hdm2 や p21 と比較して老化誘導刺激後遅れて発現誘導されることが分かった (下右図)。

2. Fbxo22 による p53CTD のユビキチン化と分解誘導

Fbxo22 は F-box、FIST-N、及び FIST-C ドメインから構成されるたんぱく質で、F-box ドメインで SCF 複合体と、FIST-N ドメインで p53 と、FIST-C ドメインで KDM4A と結合することが分かった。また SCF-Fbxo22 複合体は試験管内で p53 をユビキチン化することが分かった (図2)。実際、ヒト正常細胞から Fbxo22 をノックダウンすると、p53 が蓄積して細胞増殖が強く抑制され、逆に Fbxo22 を過剰発現すると、p53 が減少して増殖が促進された。興味深いことに、SCF-Fbxo22-KDM4A 複合体はメチル化された p53 を好んで標的にすることも分かった。

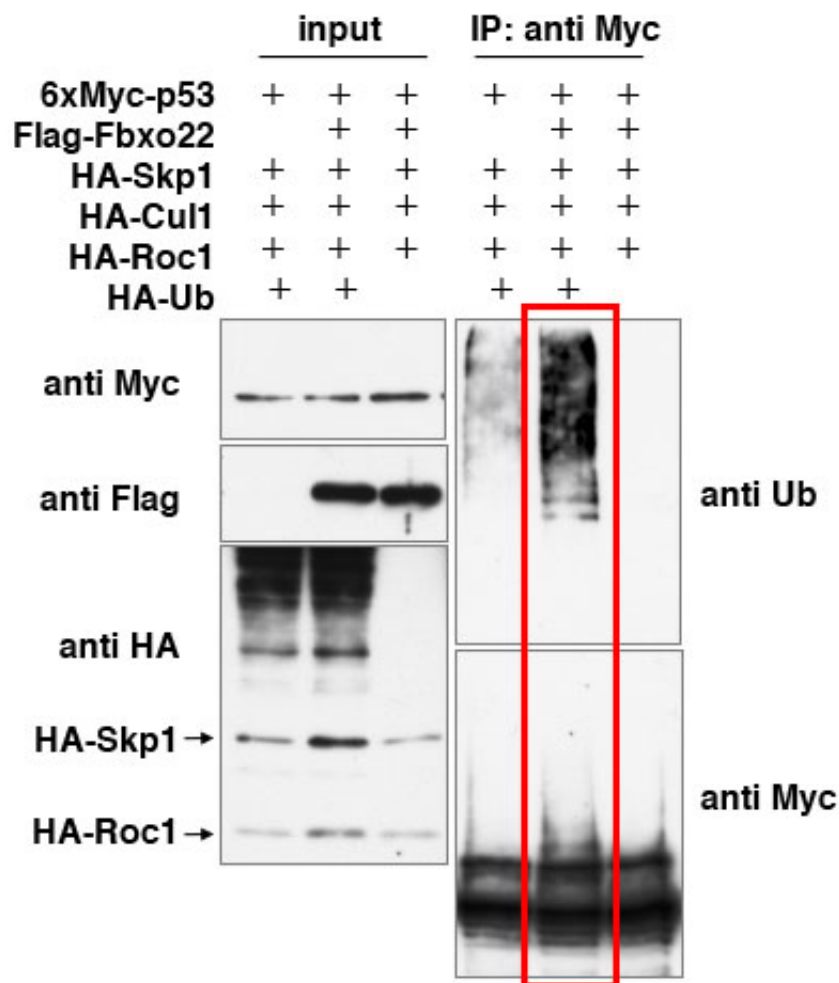


図2. SCF-Fbxo22 は試験管内で p53 をユビキチン化する

細胞抽出液から免疫精製した各たんぱく質を試験管内でインキュベートし、p53 たんぱく質のユビキチン化を解析した。

3. *Fbxo22* ノックアウトマウスの解析

Fbxo22 の個体における役割を明らかにする目的で、CRISPR/Cas9 システムを利用して *Fbxo22* 欠損マウス (*Fbxo22*^{-/-}) を作製した。作製した *Fbxo22*^{-/-} マウスは、*Fbxo22*^{+/-} マウスや *Fbxo22*^{+/+} マウスと比較して、大きさが約半分 (体重 1/2) であった (図3)。*Fbxo22*^{-/-} 由来の様々な臓器・組織を解析したところ、解析したすべての臓器において、*Fbxo22*^{+/-} マウスや *Fbxo22*^{+/+} マウスと比較して顕著な p53、及びその下流分子である p21 の発現増加を認めた。また *Fbxo22*^{-/-} 由来の胎児線維芽細胞を用いた解析から、*Fbxo22* 欠損によりメチル化 p53 が特異的に蓄積することが分かった。

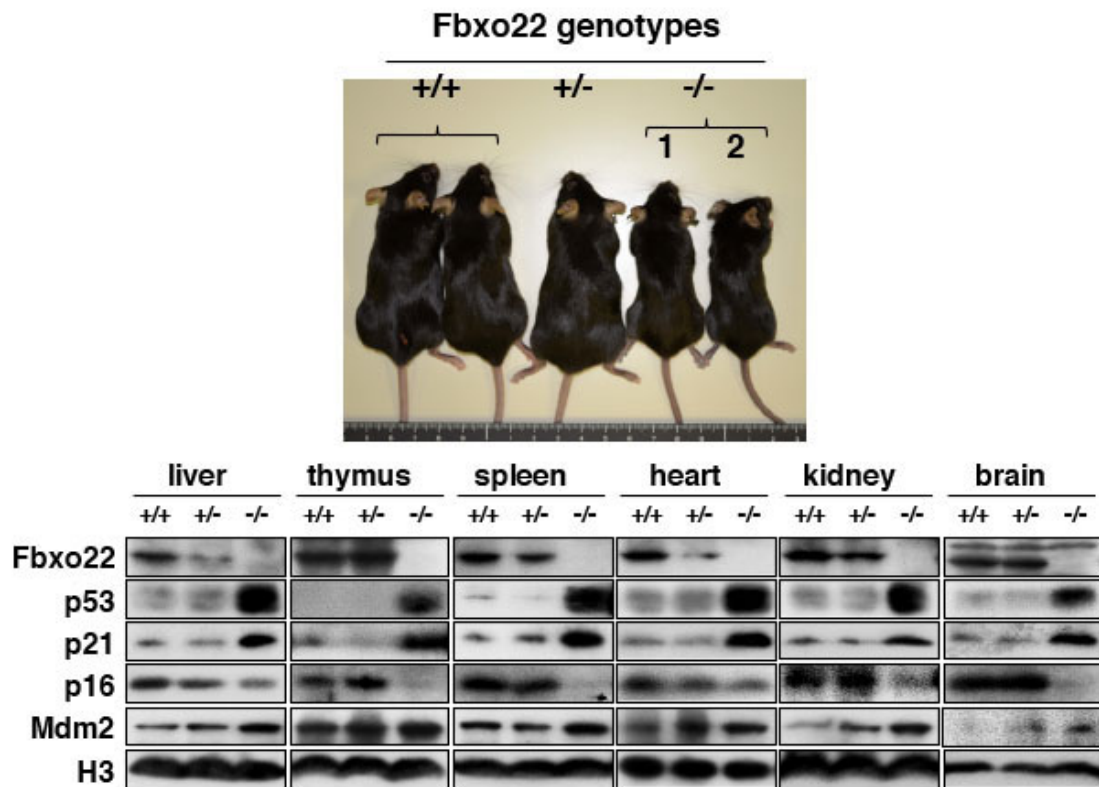


図3. Fbxo22 ノックアウトマウスは、野生型と比較して約半分の大きさで、様々な臓器・組織に p53 たんぱく質の蓄積が認められる

CRISPR-Cas9 システムを用いて、*Fbxo22* ノックアウトマウスを作製した。*Fbxo22* ノックアウトマウスは、野生型あるいはヘテロマウスを比較して、ほぼ半分の大きさであった（上図）。またノックアウトマウス由来の臓器・組織においては、p53 及びその標的である p21 たんぱく質の蓄積が顕著に認められた。

4. Fbxo22 及び KDM4A による SASP 制御

老化細胞の SASP 誘導における Fbxo22 や KDM4A の役割を明らかにするために、老化細胞から Fbxo22、あるいは KDM4A を除去した時の、SASP 誘導について解析を行った。その結果、SCF-Fbxo22-KDM4A によるメチル化 p53 のユビキチン化・分解が SASP 誘導に必須の役割を果たしていることが分かった。またこの時、KDM4A の脱メチル化酵素活性が必要不可欠であることも明らかになった。

考 察

老化細胞の SASP は、周囲の細胞に対して非細胞自律的ながん化を促進すると考えられている。今回の研究から、SCF-Fbxo22-KDM4A 複合体によるメチル化 p53 のユビキチン化・分解制御が、SASP 誘導に必須の役割を果たしていることが分かった。これまでの研究から、p53 の G2 期での活性化は細胞分裂期回避を介した細胞老化誘導に重要な役割を果たしていることが分かっている¹⁾。従って、p53 活性化は細胞老化過程で二相性の制御を受けていると考えられる。老化刺激直後の p53 活性化は主に p53-Mdm2 ループにより制御されている。今回の研究成果は、老化刺激後期の p53 不活性化が p53-Fbxo22 ループにより制御されていることを示している。実際、Fbxo22 プロモーター領域には、p53 結合領域が存在し、ChIP-Seq 解析から DNA 損傷にตอบสนองして Fbxo22 プロモーター領域に p53 がリクルートされることも示された。今後、SCF-Fbxo22-KDM4A を標的とした老化細胞における SASP 誘導阻害剤を開発し、新たなコンセプトによるがん予防法・治療法の開発に進めていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生化学講座の城村由和、浜松医科大学分子生物学北川雅敏、北川恭子、及び東京大学先端科学技術研究センター油谷浩幸である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S, Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell*. 2014 Jul 3; 55(1):73-84. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.003. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24910096
- 2) Johmura Y, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto T, Okabe A, Aburatani H, Li S, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, Nakanishi M. SCF(Fbxo22)-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence. *Nature Communications* 2016 Feb 12; 7:10574. doi: 10.1038/ncomms10574. PMID: 26868148