

178. 細胞老化における染色体不安定性誘導メカニズムの解明

高橋 暁子

*がん研究会 がん研究所 がん生物部

Key words : 細胞老化, SASP, 炎症, インターフェロン

緒言

正常な体細胞が発がんの危険性のあるストレス（テロメアの短小化、酸化的ストレス、がん遺伝子の活性化など）を受けると、アポトーシス（細胞死）または細胞老化（不可逆的増殖停止）が誘導され、ストレスを受けた細胞の増殖が阻止される¹⁾。近年、ヒトやマウスの前がん病変部や良性腫瘍部には細胞老化をおこした細胞（老化細胞）が存在することが示され、細胞老化が生体内で悪性腫瘍の発生を抑制していることが明らかになってきた²⁾。しかし、アポトーシスとは異なり老化細胞はすぐに死滅するわけではないので、細胞増殖を停止したまま長期間体内に存在していることが予測される。事実、私たちは細胞老化誘導因子である p16^{INK4a} を *in vivo* で可視化できるマウスを作製し継時的に観察したところ、加齢とともに老化細胞が体内に蓄積してゆくことを報告している³⁾。一方、加齢に伴ってがんの発症率は顕著に増加することから、体内に蓄積した老化細胞と発がん頻度の上昇には正の相関関係が認められる。つまり、細胞老化にはがん抑制だけではなく、発がんを促進する作用もある可能性が考えられる。そのメカニズムの一つとして、老化細胞が炎症性サイトカインやケモカインを高発現する SASP（Senescence associated secretory phenotype）と呼ばれる現象があげられる。老化細胞では DNA メチル化酵素（DNMT1）やヒストンメチル化酵素（G9a/GLP）の発現低下によってエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が破綻し、様々な SASP 因子が高発現することで炎症やがんが誘導されることを私たちは明らかにしてきた⁴⁾。さらに、加齢に伴い発がん頻度が上昇する分子メカニズムの一つとして、染色体不安定性を誘導し発がんを促すような新規の SASP 因子が存在しているのではないかと考えて解析を行った。

方法および結果

1. 老化細胞ではエクソソームの分泌が亢進している

ヒト正常線維芽細胞（TIG-3）に継代培養による細胞老化（Replicative senescence）もしくは H-RasV12 をレトロウイルスにより遺伝子導入しがん遺伝子誘導性の細胞老化（Ras-induced senescence）を誘導後に、超遠心法で分泌膜小胞を取り除いた血清培地で 48 時間培養した。その後、培養上清から超遠心法で回収したナノ粒子の数を、NanoSight を用いた NTA（Nano Tracking Analysis）法により計測した結果、細胞老化を誘導した細胞では若い細胞に比べて 30 倍以上の数のナノ粒子を分泌していることが明らかとなった（図 1A 上段）。さらに、細胞が分泌したナノ粒子を Western blotting 法で解析したところ、細胞分泌膜小胞の一つであるエクソソームのマーカー蛋白（CD63、CD81、Tsg101）が検出された（図 1A 下段）。また免疫電子顕微鏡観察において、回収したナノ粒子が CD63 陽性であり、その直径が 50~150 nm であったことから、エクソソームであることが示された（図 1B）。これらの結果から、老化細胞は若い細胞よりも多くのエクソソームを分泌していることが明らかとなった。一方、エクソソームには細胞内の蛋白や脂質、RNA や DNA などの核酸などが含まれることが知られており、様々な細胞間シグナル伝達に働くことが近年注目されている。そこで、私たちも老化細胞が分泌するエクソソームに含まれる様々な因子について解析を行ったところ、二本鎖 DNA 断片がエクソソームに含まれて細胞外へと分泌していることを見出した（図 1C、D）⁵⁾。

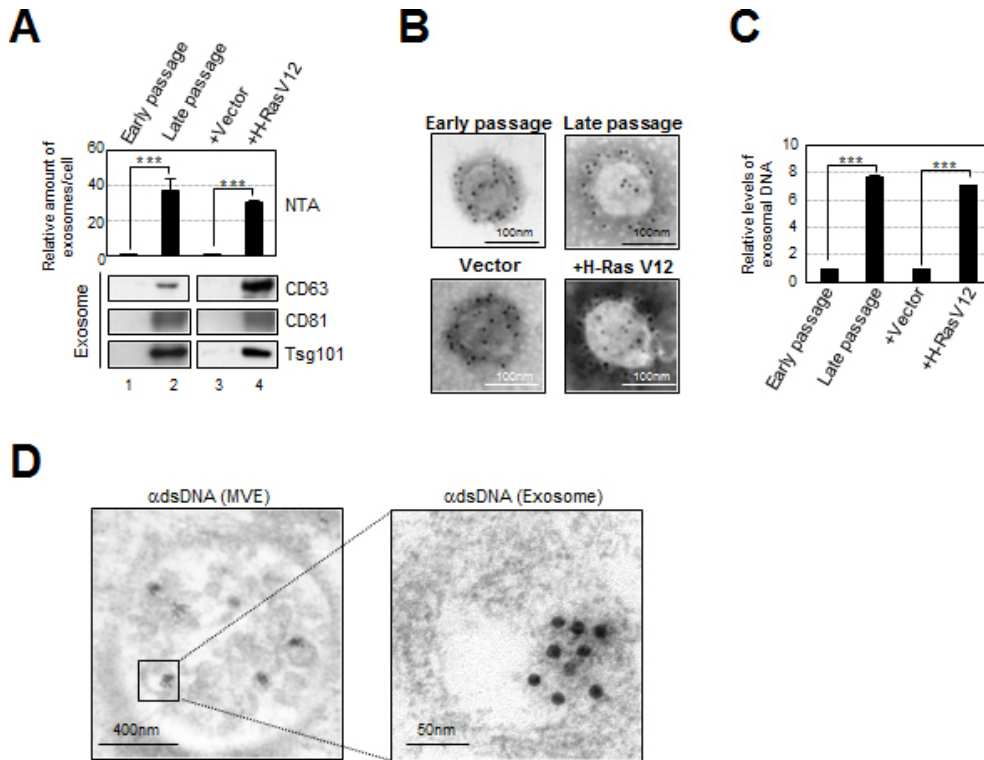


図1. 老化細胞では二本鎖 DNA 断片を含むエクソソームの分泌が亢進している

(A) 分裂回数の少ないヒト正常線維芽細胞 (Early passage) に継代培養法で細胞老化を誘導するか (Late passage)、ベクターコントロール (+Vector) もしくはがん遺伝子を発現するレトロウイルス (+H-RasV12) を感染させて細胞老化を誘導し、NTA 法により細胞あたりが分泌するナノ粒子の数を計測した (上段)。回収したナノ粒子をエクソソームマーカー蛋白の抗体で Western blotting を行った結果 (下段)。(B) 回収したナノ粒子に対して CD63 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った写真。(C) A の条件で回収したエクソソーム中に含まれる二本鎖 DNA の量を定量した結果を示す。(D) TIG-3 細胞を抗二本鎖 DNA 抗体で標識し、金コロイド二次抗体で可視化した電子顕微鏡写真。細胞質中の MVE (multi-vesicular endosomes) (左) とその中に含まれるエクソソームの拡大写真 (右)。直径 100 nm ほどのエクソソームの内部に抗二本鎖 DNA 抗体が反応していることが観察される。統計解析には、Student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた (***) $P < 0.001$ 。

2. 老化細胞でエクソソーム経路を阻害すると細胞死が誘導される

老化細胞におけるエクソソーム分泌の意義を明らかにするために、ヒト正常線維芽細胞 (TIG-3) に図 1 と同様の条件で細胞老化を誘導後に、エクソソームの合成に働く Alix とエクソソームの分泌に関わる Rab27a のノックダウンを行った。その結果、Alix と Rab27a がノックダウンされた細胞では分泌するエクソソームの量が顕著に減少し (図 2A、B)、驚いたことに老化細胞にアポトーシスが誘導された (図 2C~F)。つまり、老化細胞ではエクソソームの分泌が亢進しており、その分泌を阻害すると細胞死が誘導されることから、老化細胞がエクソソームを介して細胞に有害な物質を細胞外へと排出している可能性が示唆された。

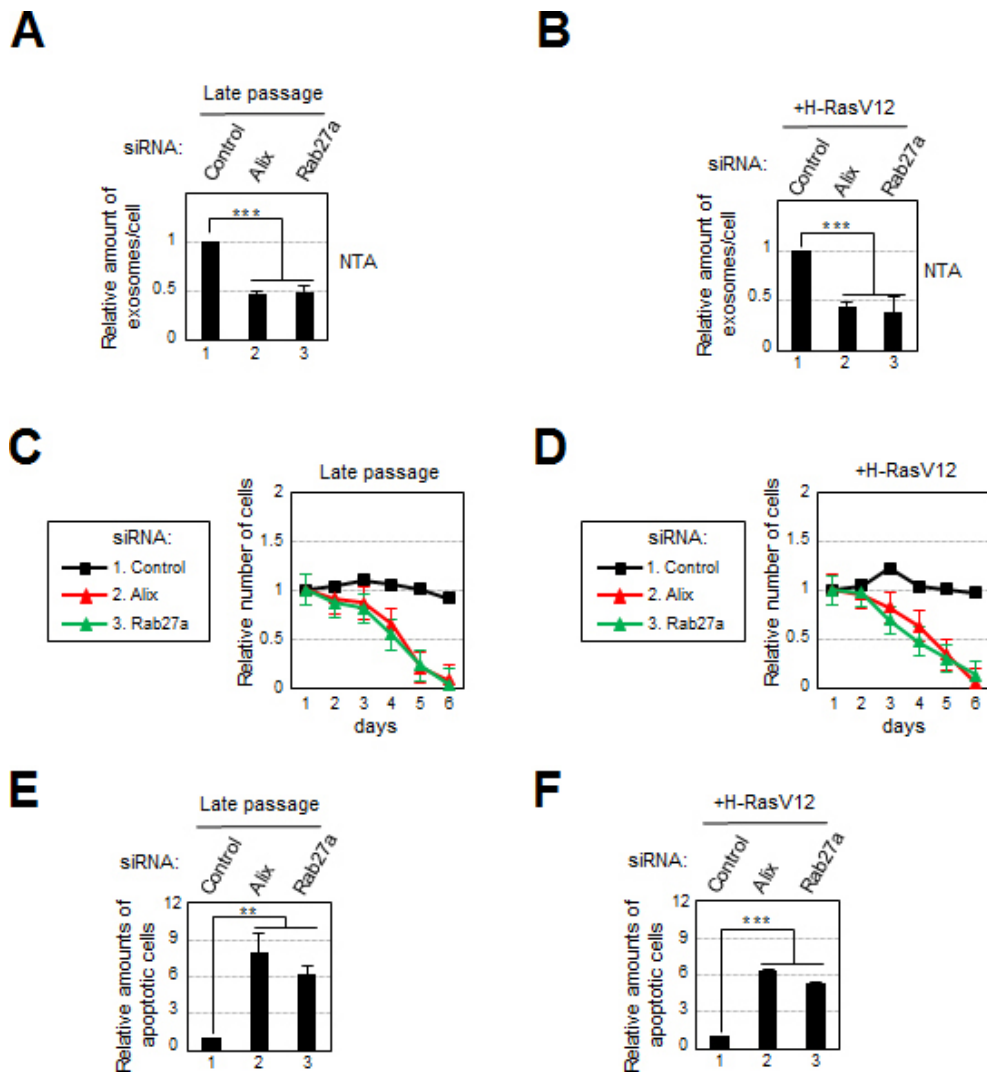


図2. 老化細胞でエクソソーム経路を阻害すると細胞死が誘導される

(A、B) 図1と同じ条件で分裂寿命による細胞老化 (A: Late passage) もしくはがん遺伝子誘導性の細胞老化 (B: +H-RasV12) を誘導した細胞に Alix、Rab27a のノックダウンを行った。48時間培養した後に、培養上清中のエクソソームを回収し、NanoSightによりNTA解析を行った結果。(C、D) 老化細胞の数を毎日計測した増殖曲線。(E、F) (A、B) の条件下でアポトーシス解析を行い、コントロール細胞を1とした相対数で示した。統計解析には、Student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた (**P < 0.01, ***P < 0.001)。

3. エクソソームに含まれる dsDNA 断片は DNA ダメージを誘発する

老化細胞が分泌したエクソソームの機能を明らかにするために、同じ数のコントロール細胞 (Vector) と老化細胞 (H-RasV12) から回収したエクソソームを若い正常な細胞 (TIG-3) の培養上清に添加した。その結果、老化細胞のエクソソームを添加した細胞では DNA 損傷応答が誘導されたことが、DNA 損傷のマーカである γ -H2AX と、ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) /ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein) の基質 (pST/Q) が共染色された DNA 損傷応答陽性細胞の割合が増加したことで示された (図3A)。このとき、老化細胞のエクソソームによって細胞にインターフェロン応答 (IFN- β) が誘導された (図3B)。さらに、エクソソームに含まれる DNA 断片が DNA 損傷応答を引き起こす原因かどうかを明らかにするために、細胞質 DNA 分解酵素である DNase2 を恒常的に発現する TIG-3 細胞を作製した (図3C)。そして、(A) の実験と同様に老化細胞が分泌したエクソソームを添加したと

ころ、DNase2 過剰発現細胞ではエクソソームによる DNA 損傷応答の誘導が軽減した (図 3D)。これらの結果から、老化細胞が分泌したエクソソームの中の DNA 断片が、細胞に DNA 損傷を引き起こすことが明らかとなった。

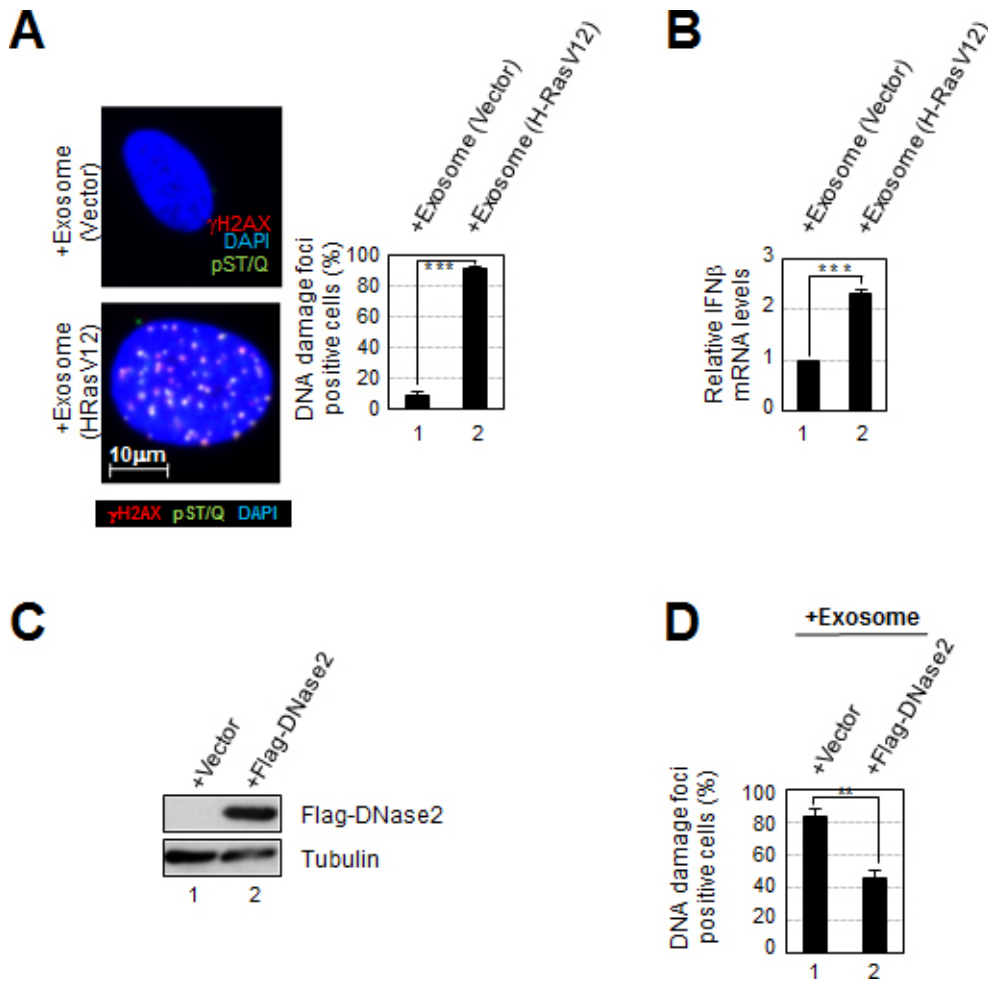


図 3. エクソソームに含まれた DNA 断片が DNA 損傷応答を誘導する

(A) 若い増殖中の TIG-3 細胞の培養液に、コントロール細胞 (Vector) と老化細胞 (H-RasV12) から回収したエクソソームを添加した。 γ -H2AX (赤) と pST/Q (緑) 抗体で免疫染色し、DNA は DAPI で染色した写真 (左)、DNA 損傷応答がおこっている細胞の割合を両抗体で共染色された Foci (黄) が観察された細胞の割合で表したグラフ (右)。(B) (A) の条件下の IFN- β の mRNA のレベルを Realtime PCR 法で解析した。(C) TIG-3 細胞にレトロウイルスを感染させ、Flag-DNase2 を恒常的に発現する細胞株を作製した。その細胞抽出液の Western blotting の結果。Tubulin 抗体は蛋白量のコントロールとして用いた。(D) Flag-DNase2 過剰発現細胞とコントロール細胞に老化細胞から回収したエクソソームを等量添加した際の DNA 損傷応答が陽性細胞の割合を (A) と同様の方法で解析した。統計解析には、Student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた (**P < 0.01, ***P < 0.001)。

考 察

本研究から、老化細胞は若い細胞に比べて多くのエクソソームを分泌し、そのエクソソームの内部には二本鎖 DNA が含まれることが明らかとなった。細胞質に存在する二本鎖 DNA は細胞に DNA 損傷応答や細胞死を引き起こす可能性があるため、エクソソームを介してそれらを細胞外へと分泌する生体防御機構が存在していると考えられる。さらに老化細胞から分泌されたエクソソームは周囲の細胞に取り込まれて DNA 損傷応答やインターフェロン応答を誘導

することで、炎症や染色体不安定性を引き起こす可能性があることが示唆された。すなわち、二本鎖 DNA を含むエクソソームは老化細胞が分泌する新たな SASP 因子の一つであることが示された。また、老化細胞では染色体 DNA が断片化して分泌していることから、老化細胞自身の染色体も変化していることが推察される。今後は、老化細胞における染色体断片化の分子機構を解析することで、加齢に伴う染色体不安定性誘導の詳細なメカニズムを明らかにしてゆきたい。最後に、本研究を遂行するために多大なるご支援をいただきました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(11): 1291-1297. doi: 10.1038/ncb1491. PMID: 17028578.
- 2) Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, Hirao A, Yanagi S, Fukami K, Ishikawa Y, Sone S, Hara E, Ohtani N. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.* 2010; 70(22): 9381-9390. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0801. PMID: 21062974.
- 3) Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol.* 2009; 186(3): 393-407. doi: 10.1083/jcb.200904105. PMID: 19667129.
- 4) Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, Hori S, Tachibana M, Anderton E, Takeuchi T, Shinkai Y, Peters G, Saya H, Hara E. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell.* 2012; 45(1): 123-131. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018. PMID: 22178396.
- 5) Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki M, Obuse C, Hara E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nature Commun.* 2017; 8, 15287. doi: 10.1038/NCOMMS15287. PMID: 28508895.