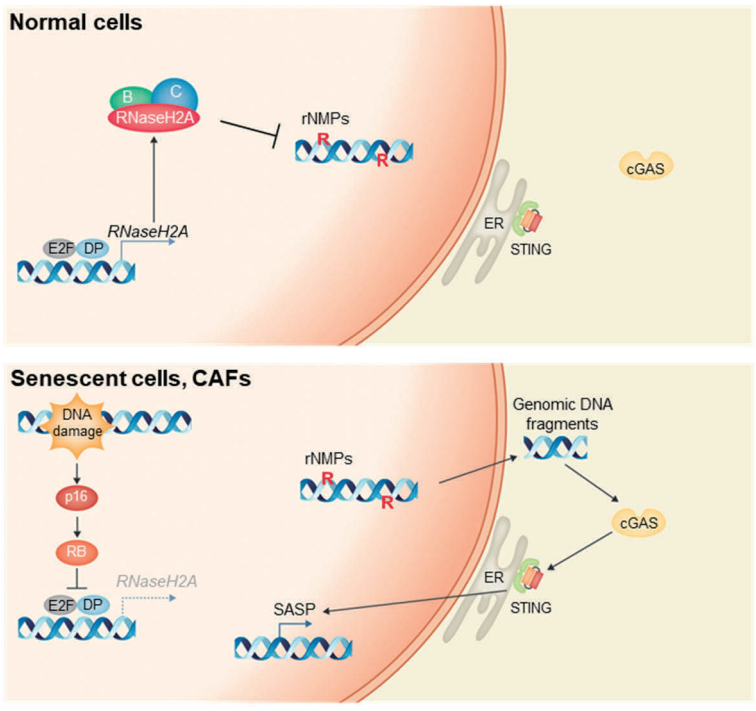
35　SASP誘導に関わる新規核酸センサーの解析	高橋　暁子

【目的】加齢に伴うがんの罹患率の上昇と体内に蓄積してゆく老化細胞の数には正の相関関係が認められ、老化細胞が炎症性蛋白質を分泌する SASP（Senescence-associated secretory phenotype）を介して、発がんやがんの進展に関与していることが明らかになりつつある。老化細胞では、細胞質のゲノム DNA の断片が細胞質核酸センサー経路を活性化することが SASP の誘導に重要であり、DNA/RNA ハイブリッドの過剰産生も自然免疫応答の活性化と SASP を誘導するという知見を得ていたが、なぜ老化細胞ではゲノム DNA 断片や DNA/RNA ハイブリッドのような核酸リガンドが産生されるのか、その分子メカニズムは不明であった。そこで、SASP 誘導の引き金となる核酸リガンドの産生機構と新規核酸センサーの活性化メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】ヒト正常線維芽細胞（TIG-3）に継代培養もしくは活性化型 Ras 誘導性の細胞老化を誘導する前後の細胞の RNA シークエンス解析から、ゲノム DNA の不安定性と断片化に関わる因子の探索を行った。

【結果】染色体の不安定性と RNA/DNA ハイブリッドの産生に関わる因子として、老化細胞では RNA 分解酵素である RNaseH2 の触媒サブユニットの RNaseH2a の発現が低下していることを見出した。ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター解析から、細胞老化で転写活性化が低下する E2F 転写因子複合体が結合する配列が複数存在し、E2F 転写因子複合体が *RNaseH2a* 遺伝子の発現誘導に機能していることを見出した。老化細胞では RNaseH2 活性が有意に低かったので、細胞老化誘導前後の細胞のゲノム DNA をアルカリ条件下でアガロース泳動を行うと、老化細胞では DNA 断片の長さが有意に低下しており、多くのリボヌクレオチドがゲノム DNA 中に残存していることが示された。TIG-3 細胞で RNaseH2A のノックダウンを行ったところ、SA-β-Gal 活性の増加と細胞質におけるゲノム DNA 断片蓄積と、各種老化マーカーが確認された。さらに、細胞質核酸センサーである cGAS もしくは STING のノックダウンにより SASP 因子の発現が抑制されたことから、RNaseH2A の発現低下によって核酸リガンドが産生されることが、細胞質核酸センサーの活性化を介して SASP 遺伝子の発現を誘導することが示された。最後に、TCGA データベース解析によって、大腸がん・子宮頸がん・卵巣がんの患者組織において RNaseH2a と E2F1 の発現には強い相関があること、また RNaseH2A の低発現が患者の予後不良に関わることを見出した。

老化細胞における RNaseH2a の発現低下と SASP 誘導のメカニズム



35. SASP 誘導に関わる新規核酸センサーの解析

高橋　暁子

*がん研究会 がん研究所 細胞老化プロジェクト

Key words：細胞老化，SASP，核酸センサー，RNaseH2a，がん

緒　言

正常な体細胞が発がんの危険性のあるストレスを受けると、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、異常な細胞の増殖を停止する重要ながん抑制機構としてはたらくことが知られている［1］。しかしその一方で、加齢に伴うがんの罹患率の上昇と体内に蓄積してゆく老化細胞の数には正の相関関係が認められる［2］。これらの研究から、細胞老化にはがん抑制だけではなく、むしろがんの発症を促進する作用もある可能性が示唆されてきた。そのメカニズムの一つとして、老化細胞が様々な炎症性蛋白質を高発現し周囲に分泌する SASP（Senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれる現象の関与が明らかとなっている［3，4］。研究代表者はこれまで、老化細胞で SASP が起こる分子メカニズムの解析を行い、SASP 因子のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構［5］や、老化細胞で染色体構造変化がおこり SASP が誘導される分子機構を明らかにしてきた［6］。また、老化細胞では炎症性蛋白質だけでなく、細胞外分泌膜小胞の一種であるエクソソームの分泌も亢進しており、SASP 因子の一つとしてがんの進展に寄与していることや［7，8］、老化細胞では微小核や出芽核とよばれる核の異形が観察される頻度が高く、核から細胞質へと流出したゲノム DNA の断片が細胞質核酸センサーである cGAS（cyclic GMP-AMP synthase）/STING（stimulator of interferon genes）経路を活性化することが SASP の誘導に重要であることを報告してきた［9］。さらに、DNA の修復経路の副産物である DNA/RNA ハイブリッドの過剰産生も、自然免疫応答の活性化と SASP を誘導するという知見を得ていたが、なぜ老化細胞ではゲノム DNA 断片や DNA/RNA ハイブリッドのような核酸リガンドが産生されるのか、その分子メカニズムは不明であった。そこで、SASP 誘導の引き金となる核酸リガンドの産生機構と核酸センサーの新規活性化メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

方法および結果

1. 老化細胞で染色体の不安定性と RNA/DNA ハイブリッドの産生に寄与する因子の探索

ヒト正常線維芽細胞（TIG-3）に継代培養もしくは活性化型 Ras 誘導性の細胞老化を誘導する前後の細胞から RNA を回収しシークエンス解析を行った。その結果、染色体の不安定性と RNA/DNA ハイブリッドの産生に関わる因子として RNA 分解酵素である RNaseH2 の触媒サブユニットの RNaseH2a の発現が、mRNA レベルとタンパク質レベルで低下していることを見出した（図 1a～c）。さらに、老化細胞では RNaseH2 酵素活性も低下していた（図 1d）。

2. RNaseH2a の遺伝子発現は E2F 転写因子複合体に制御されている

ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター領域の転写因子結合配列を調べたところ、細胞老化で転写活性化が低下する E2F 転写因子複合体が結合する配列が複数存在することがわかった（図 2a）。増殖中の TIG-3 細胞のライセートで抗 E2F1 もしくは E2F3 抗体を用いた免疫沈降を行い、*RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター領域のプライマーを用いて定量的 PCR を行ったところ、これらの転写因子がプロモーター領域に結合していることが示された（図 2b）。E2F 転写因子とヘテロダイマーを形成し転写の活性化に必要な DP1 のノックダウンを行ったところ、RNaseH2a の発現が抑制され（図 2c、d）、また *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター上の E2F 結合サイトを欠失もしくは変異させた場合にルシ

*現在の所属：がん研究会 がん研究所 細胞老化研究部

フェラーゼ活性が低下することから、E2F 転写因子複合体が *RNaseH2a* 遺伝子の発現誘導に機能していることが明らかとなった（図 2e、f）。

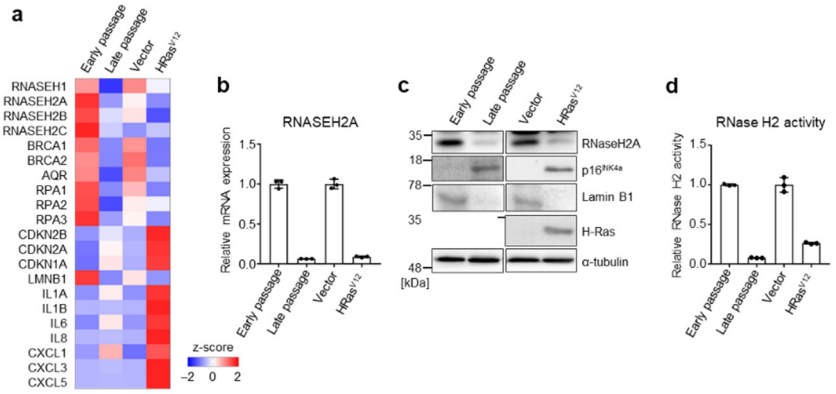


図 1. RNaseH2 活性は老化細胞で低下している

TIG-3 細胞に継代培養もしくは活性化型 Ras を過剰発現して細胞老化を誘導する。

a） 前後の RNA シークエンスデータのヒートマップ。

b） 定量的 PCR による RNaseH2a の発現レベル。

c） Western blot データ。

d） RNaseH2 活性。

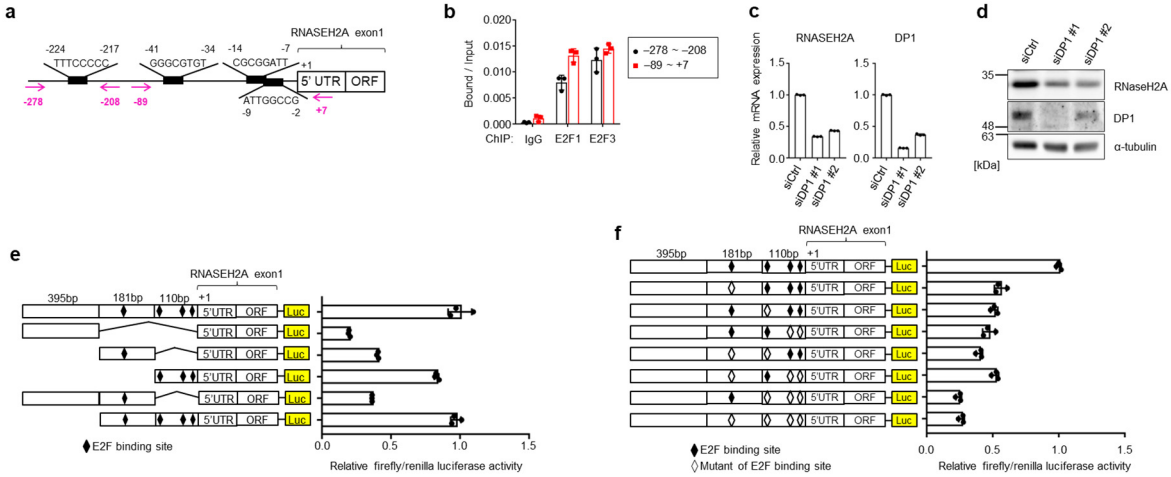


図 2. RNaseH2 の遺伝子発現は E2F 転写因子に制御されている

a） ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター領域の模式図。ピンク色の矢印がプライマー設計部位。

b） 増殖中の TIG-3 細胞における ChIP 解析。

c） TIG-3 細胞に DP1 のノックダウンを行った際の RNA の発現レベル。

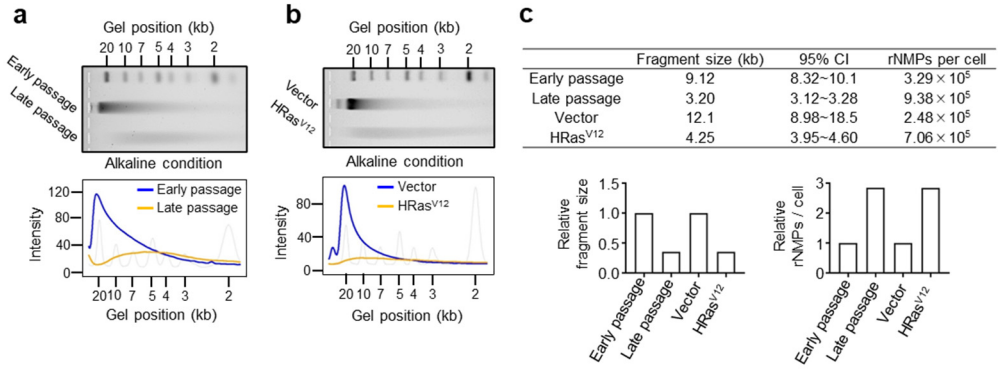
d） Western blot データ。

e, f） ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモータールシフェラーゼの構成を左側に示す。右はルシフェラーゼ解析の結果。

3. 老化細胞における RNaseH2 活性の低下はゲノム DNA の断片化を促進する

過去の研究から、*RNaseH2a* ノックアウト酵母やマウスのゲノムには、誤って取り込まれたリボヌクレオチドや DNA/RNA ハイブリッドが残存しゲノム DNA が脆弱化することが報告されている。老化細胞では RNaseH2 活性が有意に低かったので、細胞老化誘導前後の細胞のゲノム DNA をアルカリ条件下でアガロース電気泳動を行うと、老化細胞由来のゲノム DNA は移動度が増していた（図 3a、b）。そこで、ゲノム DNA の断片サイズの分布と細胞あたりに取り込まれた rNMPs（ribonucleotide monophosphates） の数を試算したところ、老化細胞では DNA 断片の長さが

有意に低下しており、多くのリボヌクレオチドがゲノム DNA 中に残存していることが示された（図 3c）。



	Fragment size (kb)	95% CI	rNMPs per cell
Early passage	9.12	8.32~10.1	3.29×10^5
Late passage	3.20	3.12~3.28	9.38×10^5
Vector	12.1	8.98~18.5	2.48×10^5
$HRas^{V12}$	4.25	3.95~4.60	7.06×10^5

図 3. 老化細胞のゲノム DNA には rNMPs が多く残り断片化しやすい

a) 継代培養初期および後期の TIG-3 細胞ゲノム DNA のアルカリ電気泳動像（上段）および泳動画像の定量化データ（下段）。

b) 活性化型 Ras の過剰発現による老化負荷有無の TIG-3 細胞ゲノム DNA のアルカリ電気泳動像（上段）および泳動画像の定量化データ（下段）。

c) 泳動画像から算出された DNA 断片の長さと rNMPs が含まれる数。

4. RNaseH2a のノックダウンは細胞老化を誘導する

細胞老化における RNaseH2A の重要性を探る目的で、TIG-3 細胞に RNaseH2A のノックダウンを行ったところ、SA-β-Gal 活性と細胞質ゲノム DNA 断片の増加、各種老化マーカーの陽性（LMNB1 の発現低下と CDK インヒビターと SASP 遺伝子の発現上昇）を観察した（図 4a～d）。

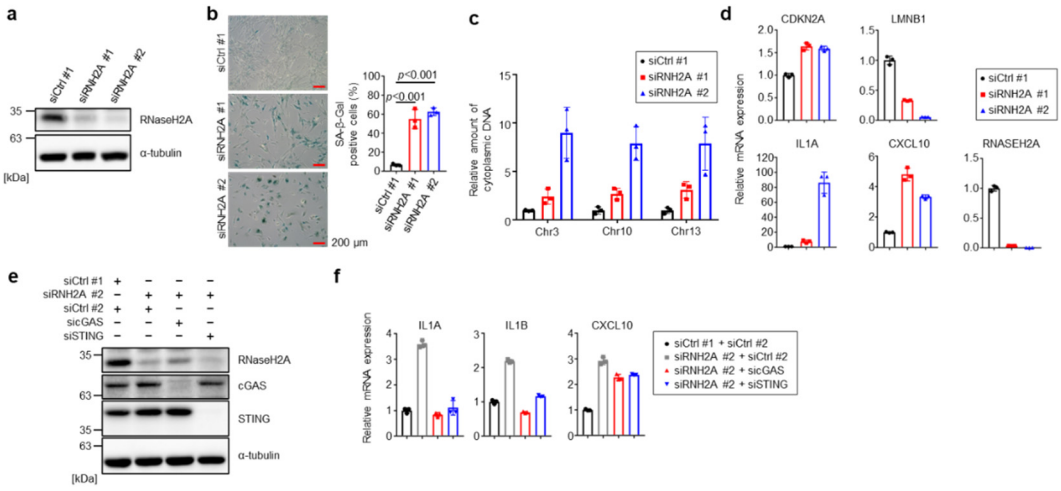


図 4. RNaseH2 のノックダウンは細胞質核酸センサーを介して SASP を誘導する

a) TIG-3 細胞に RNaseH2a ノックダウンを行った Western blot データ。

b) a の細胞の SA-β-Gal 染色像（スケールバー：200μm）と陽性細胞のグラフ。統計処理は One-way ANOVA coupled with Dunnett's multiple comparisons test で行った。

c) 細胞質に存在するゲノム DNA の定量的 PCR のグラフ。

d) a の細胞の遺伝子発現の定量的 PCR。

e) TIG-3 細胞に RNaseH2a と cGAS もしくは STING のノックダウンを行った Western blot データ。

f) e の細胞の遺伝子発現の定量的 PCR。

加えて、細胞質核酸センサーである cGAS もしくは STING のノックダウンにより SASP 因子の発現が抑制されたことから、RNaseH2A の発現低下によって核酸リガンドが産生されることが、細胞質核酸センサーの活性化を介して SASP 遺伝子の発現を誘導することが示された。

5. がん患者組織における RNaseH2a の発現解析

最後に、The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースを用いて、大腸がん・子宮頸がん・卵巣がんの患者組織において RNaseH2a と E2F1 の発現には強い相関があること、また RNaseH2A の低発現が患者の予後不良に関わることを見出した（図 5a、b）。

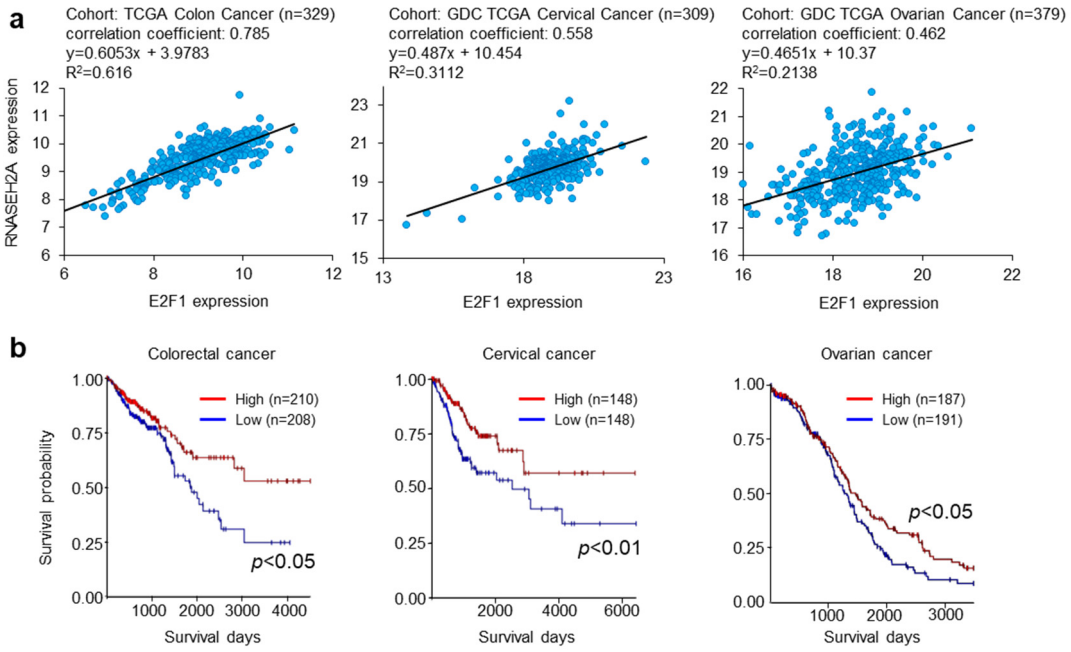


図 5. RNaseH2 と E2F1 の発現は相関している

a）TCGA データベースから、大腸がん・子宮頸がん・卵巣がんの患者組織における RNaseH2a と E2F1 の発現の Pearson の相関係数解析。

b）RNaseH2A 低発現（青）と高発現（赤）の患者の全生存期間のログランク検定。統計解析は Kaplan Meier は Log-rank test で行った。

考　察

近年、細胞老化を起こした細胞を選択的に体内から除去し SASP を阻害することで、白内障、骨粗鬆症、腎臓・心臓の機能不全などの個体老化の表現型が遅延するだけではなく、がんの発症が抑制されマウスの寿命が延長することが報告されている。最近では、転写や DNA 修復の副産物として産生される R-Loop 構造（DNA/RNA ハイブリッド）が腫瘍細胞の悪性化や発がんに関わることが報告され注目を集めているが、DNA/RNA ハイブリッドやゲノム DNA 断片が産生される詳細な分子機構や生体機能、細胞老化との関りは未だ解明されていなかった。本研究によって、老化細胞における RNaseH2 活性の低下が、ゲノムの不安定化を促し DNA/RNA ハイブリッドとゲノム DNA 断片の産生に寄与するという新規核酸センサーの活性化メカニズムが明らかとなった［10］。RNaseH2a の遺伝子発現が E2F 転写因子に制御されていること、また RNaseH2 活性の低下が炎症性遺伝子の発現とがんの予後不良に関わることから、将来的に本経路を標的とした新たな治療方法の開発が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、以下の通りです。ご協力に深く感謝の意を表します。本研究は、国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の加藤薫、九州大学マス・フォア・インダストリ研究所の鍛冶静雄、千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学講座の横手幸太郎、前澤喜朗、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野の大島正伸、中山瑞穂、大阪大学大学院理学研究科染色体構造機能学研究室の小布施力史、長尾恒治、宇治徳洲会病院消化器外科の長山聡、国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクトの田久保圭誉、東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門の中西啓、国立遺伝学研究所遺伝メカニズム研究系分子細胞工学研究室の鐘巻将人、大阪大学微生物病研究所遺伝子生物学分野の原英二と公益財団法人がん研究会がん研究所細胞老化研究部のメンバーで行った。

文　献

1) Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H. and Hara, E. Mitogenic signalling and the p16INK4a/Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence. Nature Cell Biology, 8, 1291-1297, 2006 PMID: 17028578 DOI: 10.1038/ncb1491.

2) Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirose, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N. and Hara, E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals crosstalk with p53. J. Cell Biol., 186, 393-407, 2009 PMID: DOI:

3) Loo, T.M., Miyata, K., Tanaka, Y., and Takahashi, A. Cellular senescence and senescence‐associated secretory phenotype via the cGAS‐STING signaling pathway in cancer. Cancer Science, 111, 304-311, 2020 PMID: 31799772 DOI: 10.1111/cas.14266.

4) Igarashi, N., Miyata, K., Loo, T.M., Chiba, M., Hanyu, A., Nishio, M., Kawasaki, H., Zheng, H., Toyokuni, S., Kon, S., Moriyama, K., Fujita, Y. & Takahashi, A. Hepatocyte growth factor derived from senescent cells attenuates cell competition-induced apical elimination of oncogenic cells. Nature Communications, 13, 4157, 2022 PMID: 35851277 DOI: 10.1038/s41467-022-31642-4.

5) 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. and Hara, E. DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/C(Cdh1) in Senescent Cells. Molecular Cell. 45, 123-131, 2012 PMID: 22178396 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.10.018.

6) Miyata, K., Imai, Y., Hori, S., Nishio, M., Loo, T.M., Okada, R., Yang, L., Nakadai, T., Maruyama, R., Fujii, R., Ueda, K., Jiang, Li., Zheng, H., Toyokuni, S., Sakata, T., Shirahige, K., Kojima, R., Nakayama, M., Oshima, M., Nagayama, S., Seimiya, H., Hirota, T., Saya, H., Hara, E. & Takahashi, A. Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 118(35), e2025647118, 2021 PMID: 34426493 DOI: 10.1073/pnas.2025647118.

7) Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C. and Hara, E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. Nature Communications, 8, 15287, 2017 PMID: 28508895 DOI: 10.1038/ncomms15287.

8) Misawa, T., Hitomi, K., Miyata, K., Tanaka, Y., Fujii, R., Chiba, M., Loo, T.M., Hanyu, A., Kawasaki, H., Kato, H., Maezawa, Y., Yokote, K., Nakamura, A.J., Ueda, K., Yaegashi, N. & Takahashi, A. Identification of novel senescent markers in small extracellular vesicles. International Journal of Molecular Sciences, 24 (3), 2421, 2023 https://doi.org/10.3390/ijms24032421.

9) Takahashi, A., Loo, T.M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G.N., Ohtani, N. and Hara, E. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. Nature Communications, 9, 1249, 2018 PMID: 29593264 DOI: 10.1038/s41467-018-03555-8.

10) Sugawara, S., Okada, R., Loo, T.M., Tanaka, H., Miyata, K., Chiba, M., Kawasaki, H., Katoh, K., Kaji, S., Maezawa, Y., Yokote, K., Nakayama, M., Oshima, M., Nagao, K., Obuse, C., Nagayama, S., Nakanishi, A., Kanemaki, MT., Hara, E. & Takahashi, A. RNaseH2A downregulation drives chromosomal DNA fragmentation and accumulation of RNA-DNA hybrids in senescent cells. Communications Biology, 5, 1420, 2022 PMID: 36577784 DOI: 10.1038/s42003-022-04369-7.