

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月4日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：分子イメージングによる組織幹細胞可視化法の開発と応用

研究代表者：公益財団法人がん研究会がん研究所 部長 原 英二

研究成果の概要：

幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが知られているBmi-1とその標的分子であり、細胞老化の重要な誘導因子であるp16^{INK4a}の関係解明を通して細胞老化と個体老化および発癌との関係解明を目指した。p16^{INK4a}遺伝子の発現をインビボ・イメージング出来るマウスとBmi-1ノックアウトマウスとを交配させることにより、Bmi-1非存在下でのp16^{INK4a}遺伝子の発現動態を調べた。その結果、Bmi-1非存在下では生後間もない時期から体の殆ど全ての組織においてp16^{INK4a}の発現が著しく上昇していたが、加齢に伴いp16^{INK4a}の発現が更に上昇することが分かった。このため、加齢の過程で起こるp16^{INK4a}の発現とそれに伴う細胞老化の誘導にはBmi-1はあまり関与していないものと考えられる。また、細胞老化に伴いSASPと呼ばれる発癌促進作用が有る様々な分泌性蛋白質を高発現する現象が如何にして起こるかについて解析を行った。その結果、DNAダメージシグナルのよりDNAメチル化酵素 (DNMT1) 及びヒストンメチル化酵素 (G9a/GLP) の発現レベルが低下することによりクロマチンリモデリングが起きることでSASPが起こることを見出した。今後、加齢に伴って起こるSASPの誘導機構を特異的に阻害できる方法の開発へとつながることが期待される。

研究分野：がん生物学

キーワード：細胞老化、インビボ・イメージング、DNAダメージ

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞にテロメアの短小化や癌遺伝子の活性化など、発癌の危険性がある異常が生じるとp16^{INK4a}などのサイクリン依存性キナーゼ(CDK) 阻害因子が発現し、不可逆的な増殖停止状態である細胞老化が誘導されることが知られている。細胞老化は異常細胞の増殖を防ぐ重要な癌抑制機構として働く一方で、組織幹細胞を枯渇させ個体老化を進行させる原因になっていることも明らかになりつつある。また、最近では細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素など炎症や発癌を促進する様々な分泌性蛋白質を高発現するSenescence Associated Secretory Phenotypes (SASP) と呼ばれる現象を引き起こすことも明らかに成り、細胞老化には生体のホメオスタシスを維持する作用と破綻させる作用の両方が存在していると考えられるようになってきた。

我々はこれまで発癌過程における細胞老化と組織幹細胞の関係解明を目指して金沢大学がん進展制御研究所の平尾教授との共同研究を行い、細胞老化誘導遺伝子である

p16^{INK4a}の発現を発光シグナルとしてマウスの生体内でリアルタイムに可視化・計測(イメージング)出来るトランスジェニックマウスの開発を行ってきた(Yamakoshi *et al.* **J. Cell Biol.** 2009)。更にこのマウスを用いて、加齢の過程で細胞老化を起こす組織を特定することに成功し、加齢の過程で起こる細胞老化の作用機序とその役割の解明に努めてきた。

2. 研究の目的

本研究では生体内で起こる細胞老化の誘導と組織幹細胞の枯渇がどのように関係しているのかを明らかにすることを通して個体老化と発癌との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p16^{INK4a}発現イメージングマウスと組織幹細胞の未分化性の維持に係わるBmi-1遺伝子を欠損したBmi-1ノックアウトマウスを交配させることでBmi-1遺伝子を欠損した状態でのp16^{INK4a}遺伝子の発現動態を加齢の過程で解析することにより、生体内での幹細胞性の維持と細胞

胞老化の誘導がどのような関係になっているのかを明らかにすることを試みた。

(2) 細胞老化の負の側面である SASP が起こる分子機構を明らかにするために、細胞老化の原因である DNA 損傷ストレスにより発現が変化する転写調節因子を DNA マイクロアレイを用いた解析によって絞り込んだ。更に RNAi によるノックダウンとクロマチン免疫沈降法を組み合わせることで SASP の制御に係わる転写因子の同定を試みた。

(3) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで加齢の過程で細胞老化を起こす組織を特定し、その組織で SASP が起こっているかどうかを調べると同時に(2)で解析した SASP 誘導機構が働いているかどうかについても検討を行った。

4. 研究成果

1) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで Bmi-1 遺伝子を欠損した状態での p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態を加齢の過程で解析した。その結果、生後直後から体の殆ど全ての部位で p16^{INK4a} の発現が 10 倍以上高くなることが明らかに成り、Bmi-1 は殆ど全て組織で p16^{INK4a} 遺伝子の発現が高くなり過ぎないようにすることで組織幹細胞が細胞老化を起こさないように働いていることが示唆された。また興味深いことに、Bmi-1 遺伝子を欠損した状態でも加齢に伴い、p16^{INK4a} の発現が更に上昇したことから、Bmi-1 は p16^{INK4a} 遺伝子の発現を抑制する重要な遺伝子であることに間違いはないが、加齢の過程で起こる p16^{INK4a} 遺伝子の発現誘導にはあまり関与しておらず、Bmi-1 の機能低下以外のメカニズムで p16^{INK4a} 遺伝子の発現レベルが上昇する可能性が示唆された。

2) DNA 損傷ストレスにより発現が変化する転写調節因子を DNA マイクロアレイにより探索した結果、遺伝子発現を負に制御することが知られている DNA メチル化酵素の一つである DNMT1 の発現レベルが顕著に低下していることを見出した。更に増殖中の細胞で DNMT1 の発現を RNAi によりノックダウンするとそれだけで SASP 因子の発現レベルが上昇したことから DNA ダメージにより DNMT1 の発現レベルが低下することが SASP の誘導を引き起こすことを見出した。興味深いことに DNMT1 の発現低下は DNA 損傷シグナルを更に活性化させることでヒストンメチル化酵素である G9a/GLP の発現低下を引き起こし、このためにクロマチンリモデリングが起こり SASP 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。

3) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで加齢の過程で肺、脾臓、小腸などの組織が細胞老化を起こすことを見出した。それら

の組織では DNA ダメージシグナルの亢進、G9a/GLP 発現レベルの低下と SASP 遺伝子の発現レベルの亢進が認められ、2) で見出した SASP 誘導機構が生体内でも働いていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

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. *Mol. Cell*, 45: 123-131. (2012)

Fukuyo, Y., Takahashi, A., Hara, E., Horikoshi, N., Pandita, T.K. and Nakajima, T.

E2FBP1 antagonizes the p16^{INK4A}-Rb tumor suppressor machinery for growth suppression and cellular senescence by regulating promyelocytic leukemia protein stability.

Int. J. Oral Sci. 4: 200-208. (2011)

[学会発表] (計 4 件)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

日本分子生物学会春季シンポジウム
2011 年 5 月 25~26 日 (金沢)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

国際癌治療増感研究会
2011 年 6 月 24~25 日 (仙台)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

光老化研究会
2011 年 7 月 22 日 (大阪)

Takahashi, A and Hara, E.

The roles and mechanisms regulating cellular senescence in aging and cancer.

日本分子生物学会シンポジウム
2011 年 12 月 13~16 日 (横浜)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

公益財団法人がん研究会がん研究所・部長
原 英二

(2) 研究分担者

公益財団法人がん研究会がん研究所・主任研
究員 大谷直子

公益財団法人がん研究会がん研究所・主任研
究員 高橋暁子

公益財団法人がん研究会がん研究所・嘱託研
究員 山越貴水（現：国立長寿医療研究セン
ター・室長）

公益財団法人がん研究会がん研究所・嘱託研
究員 吉本 真

公益財団法人がん研究会がん研究所・研究生
佐藤正大

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦