

## がん細胞から生じる老化細胞の形成機構とその除去方法の確立

神戸大学 バイオシグナル総合研究センター

岩崎 哲史

## 1 研究の背景と目的

ヒトやマウスなどの哺乳類動物は老化に伴い、加齢性疾患の発症や身体機能の低下が顕著に現れる。これは特定の臓器や組織に老化細胞が蓄積することが一因と考えられている。実際に老化マウスから老化細胞を人工的に除去すると健康寿命が延伸することが示された (1,2)。最近、このような老化研究の成果を受けて、老化細胞を殺傷するセノリティック薬の開発が急速に進められている。これまでに抗アポトーシス因子 Bcl-2 ファミリー阻害剤と細胞増殖と生存に関わるチロシンキナーゼ阻害剤の併用投与 (3)、シャペロン分子 HSP70 阻害剤 (4)、グルタミン代謝酵素 GLS1 の阻害剤 (5) が有効であることが報告された。また老化細胞を標的とした椎間板変性や糖尿病性腎症に対する臨床薬の開発も進んでいる (6,7)。このようにセノリティック薬は抗老化薬としてだけでなく、老化細胞と関連する疾病に対しても有効である。しかし、老化細胞と癌の関係についてはまだ殆ど明らかになっていない。近年、腫瘍組織にも老化細胞が出現すること (8)、老化細胞が腫瘍組織の悪性化を助長することが示されている (9)。しかし腫瘍組織における老化細胞の形成メカニズム、生存維持機構、がん組織に生じた老化細胞が周辺の正常組織へどのような影響があるかは未解明である。最近、申請者らは悪性黒色腫メラノーマ株化細胞の中から高頻度に自発的に細胞が老化し、自発老化細胞が生じることを見出した。これまでの解析から、自発老化細胞は腫瘍組織に生じる老化細胞のモデル系として利用できている (図 1)。

そこで本研究は、腫瘍組織における老化細胞の特性や周辺組織への影響を分子・細胞レベルで解明することを目的として、以下の三点に着目して研究を実施した。最初に老化細胞の形成、性質、寿命を明らかにすることを目指した【1. 自発老化細胞の特性解析】。この特性に基づき、腫瘍組織に生じた老化細胞が周辺細胞とどのように相互作用し、どのような影響を及ぼしているのか解明を試みた【2. 老化細胞と周辺細胞・組織との相互作用解析】。さらに自発老化細胞の遺伝子発現プロファイルに基づいて薬剤標的の候補分子を選抜し、その低分子阻害剤や中和抗体を探索するための基盤技術を確立した【3. 抗老化薬探索ツールの構築】。

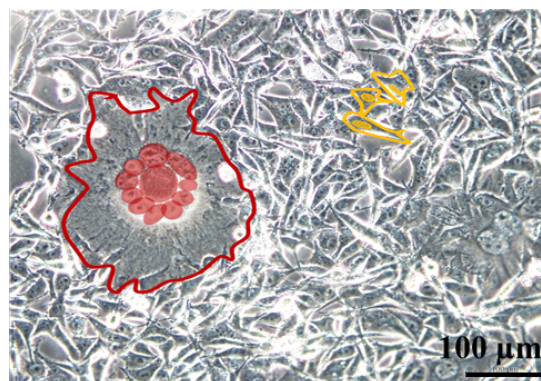


図 1. メラノーマ細胞株から出現する自発老化細胞: 培養シャーレがコンフルエント状態になるまで培養したメラノーマ細胞株の写真。通常サイズのメラノーマ細胞 (黄) と大型の自発老化細胞 (赤) が観察される。細胞内の円は細胞核を示す。通常サイズのメラノーマ細胞の培養容器との接地面積は平均  $2,500 \mu\text{m}^2$  であるのに対して、自発老化細胞はその 5 倍の  $12,500 \mu\text{m}^2$  以上を有する。自発老化細胞は大型で扁平な形態をもち多核化する。図には示していないが、自発老化細胞は一般の老化細胞と同様に senescence-associated  $\beta$ -galactosidase 活性上昇や顕著な空胞形成が観察される。

## 2 研究方法・研究内容

1. 自発老化細胞の特性解析: 腫瘍組織に見られる老化細胞はがん細胞に由来するが、そもそも何が原因でがん細胞が老化するのか分かっていない。そこで自発老化細胞の形成、維持、細胞死の様子をタイムラプス観察で追跡した。一般に細胞老化の外的要因として紫外線、活性酸素種、DNA 損傷剤、最近では乳酸などの代謝物や増殖因子等が原因と考え

られている。そこで本研究では自発老化細胞が高頻度で形成される 2 種類のメラノーマ細胞株を用いて解析した。これらの細胞株はいずれも増殖シグナル伝達に重要な Ras-Erk シグナル伝達経路が恒常的に活性化されている。そこで Ras-Erk 経路の活性化剤や阻害剤、並びに、細胞サイズを制御する PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達の阻害剤の効果についても検討した (10)。【研究成果 i, ii】

2. **老化細胞と周辺細胞・組織との相互作用解析**：自発老化細胞が周辺細胞とどのように相互作用しているか解析を行なった。これまでの私たちの研究から、interleukin (IL) や matrix metalloproteinase (MMP) などの senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子が自発老化細胞で発現上昇していることが分かっている。そこで自発老化細胞から分泌されたこれらの SASP 因子が周辺細胞にどのような影響を与えているのか解析した。腫瘍細胞に対する影響としては特に上皮間葉転換 epithelial mesenchymal transition (EMT) の誘導が疑われるので、関連遺伝子や遺伝子発現産物を qPCR 法、ウエスタンブロッティング法、免疫染色法により定量した。この解析には実験モデルとしてヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞を用いた。【研究成果 iii, iv】

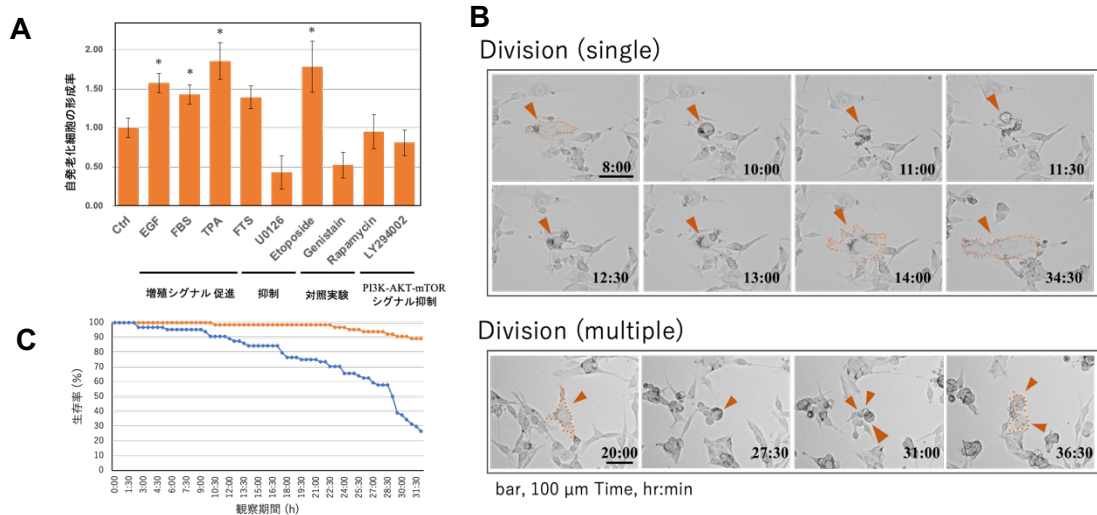
3. **抗老化薬探索ツールの構築**：自発老化細胞を除去する低分子化合物や特異抗体を選抜するためには、スクリーニング実験に適した細胞培養法や自発老化細胞形成の定量法を確立することが不可欠である。そこでまずメラノーマ細胞株の培養条件、特に血清濃度、継代のタイミング、培養時間等の条件を検討し至適化した。続いて自発老化細胞が形成される様子をタイムラプス観察および経時解析を行うことで、効率よく自発老化細胞の形成率を定量する実験スキームを確立した。

我々はこれまでに lymphocyte antigen 6 family D (LY6D) が正常細胞の老化時に発現が上昇することを示した (11)。LY6D は細胞膜の外葉に glycosylphosphatidylinositol (GPI) によって係留された膜タンパク質であり、老化細胞の空胞形成と生存に必要な分子である (12)。このことから LY6D は有力な分子標的の候補となりうるが、自発老化細胞における発現や機能は未だ検証されていない。そこで上述で至適化した条件下で培養した自発老化細胞を fluorescent activated cell sorter (FACS) で分取し、qPCR 法とウエスタンブロッティング法で発現解析を行なった。さらに LY6D 以外の薬剤標的の候補分子を選抜するために、RNA-seq 解析の結果から、自発老化細胞で発現上昇している遺伝子群について遺伝子オントロジー解析を行なった。絞り込んだ分子標的の候補について、qPCR 法と文献調査により薬剤標的の候補としての可能性を検討した。【研究成果 v, vi, vii】

### 3 研究成果

(i) **自発老化細胞の形成**：種々の生理活性物質を用いて Ras-Erk 経路を活性化すると自発老化細胞の形成率が有意に高まった。反対に同経路の阻害剤では形成率が低下した (図 2 A)。このことから Ras-Erk 経路の活性化が自発老化細胞の形成に必要であると考えられる。自発老化細胞が形成されるメラノーマ細胞株は、Ras-Erk 経路で機能しているセリン／トレオニンキナーゼ B-Raf に活性化変異が生じていることが知られており、本研究の解析結果とも符合する。

(ii) **自発老化細胞の分裂様挙動とアポトーシス**：自発老化細胞の分裂様式をタイムラプス解析により解析した結果、自発老化細胞が分裂細胞様の挙動を示すことが今回初めて明らかになった (図 2 B)。PI3K 阻害剤や mTOR 阻害剤を用いた解析では自発老化細胞の形成能に明確な変化が現れなかったことから (図 2 A)、PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達は自発老化細胞の形成には関与しないと考えられる。従って自発老化は、メラノーマ細胞株が内



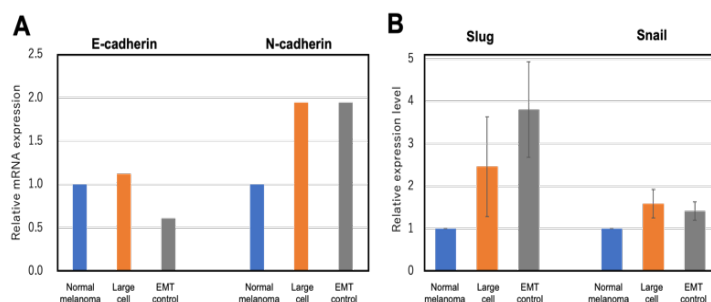
**図 2. 自発老化細胞の特性解析:** **A.** メラノーマ細胞株の播種 1 日後に種々の薬剤等を添加し、さらに 3 日後の自発老化細胞の形成率を測定した。Tukey-Kramer 法により統計的に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたものに \* を付した。本実験では以下の生理活性物質や低分子化合物を用いて自発老化細胞の形成率を検証した: 増殖シグナル促進する物質 epidermal growth factor (EGF)、fetal bovine serum (FBS)、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)、増殖シグナルを抑制する化学物質 farnesylthiogalicyclic acid, Ras 阻害剤 (FTS)、MEK 阻害剤 (U0126)、老化誘導物質 (Etoposide)、チロシンキナーゼ阻害剤 (Genistain)、細胞サイズに関わるシグナル伝達経路の阻害物質 mTOR 阻害剤 (Rapamycin)、PI3K 阻害剤 (LY294002)。 **B.** 自発老化細胞の細胞分裂過程は 2 つの様式、細胞質分裂が起きず細胞サイズが大きくなる (Single, 上) と、3 つ以上の細胞に分裂する (multiple, 下) に大別される。写真右下には観察開始からの時間経過、サイズバーは 100 μm を示す。 **C.** メラノーマ細胞から形成された自発老化細胞 (橙) と、自発老化細胞の形成能を有するメラノーマ細胞 (青) を各 64 個を任意に選んで 31 時間タイムラプス観察を行ない、それらの細胞の生存曲線を示した。

外の刺激によって増殖シグナルが過剰に活性化されたこと、分裂過程に異常が生じたことが主要な原因であると推定された。またタイムラプス解析により、通常サイズのメラノーマ細胞は高い頻度でアポトーシスを起こす一方で、自発老化細胞はアポトーシスが起こりにくいことが示された (図 2C)。以上の結果から、不安定なメラノーマ細胞は急速に分裂して自発老化し、アポトーシス耐性を獲得したものが自発老化細胞であると考えられる。

(iii) **自発老化細胞による EMT 誘導:** 近年、癌細胞では染色体全域に渡る大規模な遺伝子変異が起こることが報告されており Chromothripsis (13) や Tyfonas (14) と呼ばれている。この細胞は腫瘍悪性化に寄与することが示されている。また自発老化細胞の RNA-Seq 法を用いた網羅的解析の結果から、自発老化細胞は細胞外へサイトカインをはじめとする SASP 因子を分泌している可能性が高い。SASP 因子は周辺細胞に EMT を引き起こすことが示されている。そこで本研究では、自発老化細胞から分泌された物質が周辺細胞に EMT を誘導する可能性を検証した。自発老化細胞を FACS を用いて 10-20 倍に濃縮して培養し、その培養上清を MCF7 細胞の培養上清に添加した。その結果、EMT 関連遺伝子の発現が有意に上昇することが分かった (図 3A, B)。

(iv) **EMT 誘導に関わる転写因子の活性化:** さらに自発老化細胞と通常サイズの細胞を免疫染色法により解析したところ、EMT 誘導を促進する転写因子である signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が自発老化細胞の近傍の細胞では活性化されているのに対して、自発老化細胞から離れた場所にいる細胞では活性化程度が低い傾向があることが分かった (資料未掲載)。以上の結果から、自発老化細胞は周辺の癌細胞に EMT を引き起こし、癌の浸潤や転移に寄与すると考えられる。

(v) **自発老化細胞の培養条件の至適化と自発老化定量法の確立:** 自発老化細胞を除去する薬剤や抗体を効率よく選抜するために、スクリーニング実験に適した細胞培養方法と自発老化細胞形成の定量法を確立した。至適条件下でタイムラプス観察を行なった結果、自発



**図3. 自発老化細胞による EMT 誘導:** A. 自発老化細胞を FACS により分取して培養し、その培養上清を乳がん細胞株 MCF7 細胞に添加した。24 時間時間後に MCF7 細胞を回収し、EMT 関連遺伝子の発現変化を qPCR 法 (A) およびウエスタンブロッティング法 (B) で解析し定量した。分取前の細胞の培養上清 (Normal melanoma)、分取した自発老化細胞の培養上清 (Large cell)、MCF7 細胞に EMT を誘導することができる成長因子 TGF $\beta$  を添加した対照実験 (EMT control) をそれぞれ比較した。EMT が起こると E-cadherin は発現減少、N-cadherin、Slug、Snail は発現増加することが知られている。

glycosylphosphatidylinositol (GPI) で係留された膜タンパク質であり、老化細胞の生存に必要な分子である(11, 12)。解析の結果、LY6D は一般の老化細胞では発現が有意に上昇するが、自発老化細胞においては顕著な発現変化は見られなかった。

**(vii) 自発老化細胞を殺傷するための標的分子の探索:** 自発老化細胞の RNA-seq 解析データから新たな分子標的の選抜を試みた。自発老化細胞で発現上昇が見られた分子のうち、細胞膜表面に表出しており、その分子特性から表面抗原になりうる分子を文献やデータベースを検索し、最終的に 9 つの分子を選抜した。qPCR 法により遺伝子発現を検証したところ、自発老化細胞においていずれも発現上昇が認められた (分子詳細は非公開)。それぞれの分子の特性に応じて多様な薬剤選抜が可能であり、今後、これらの分子を標的として、抗老化薬や加齢性疾患に対する薬剤開発を進める予定である。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の実施により、自発老化細胞の形成過程や安定性などの特性が明らかになった【研究成果 i, ii】。また自発老化細胞は IL や MMP などの SASP 因子の分泌を介して周辺細胞に EMT を誘導し、癌細胞の浸潤・転移を促進することが示された【研究成果 iii, iv】。さらに自発老化細胞に特異的に高発現している 9 種類の細胞表面タンパク質を薬剤の標的候補として選抜することができた【研究成果 vi, vii】。また自発老化細胞を用いたスクリーニング実験に適したシステムを構築することができた【研究成果 v】。本研究により自発老化細胞を殺傷するための薬剤開発の基盤が構築できたので、今後速やかに薬剤スクリーニングや動物実験、実用化試験に移行する予定である。本研究成果は加齢性疾患の早期発見や治療に直結するものであり、健康寿命促進と高齢者 QOL の向上に大いに貢献できる。

#### 参考文献

- (1) Baker, *Nature* 2011, **479**, 232-236, (2) Baker, *Nature* 2016, **530**, 184-189, (3) Xu, *Nat. Med.*, 2018, **24**, 1246-1256, (4) Zhu, *Aging Cell* 2015, **14**, 644-658, (5) Johmura, *Science* 2021, **371**, 265-270, (6) Novais, *Nature Commun.*, 2021, **12**, 5213, (7) Yousefzadeh, *E Bio Med.*, 2018, **36**, 18-28, (8) Collado, *Nature* 2005, **436**, 642, (9) Nakamura, *Nature Commun.*, 2014, **5**, 5264, (10) Jorgensen and Tyers: *Curr. Biol.*, 2004, **14**, R1014, (11) Nagano, *J. Biol. Chem.*, 2021, **296**, 100049, (12) Nakagawa, *FEBS letter*, 596, 2768-2780, (13) Maher, *Cell* 2012, **148**, 29-32, (14) Hadi, Yao, and Behr, *Cell* 2020, **18e**, 197-210

老化細胞の形成率は初速度に着目すること、特に播種後 3 日目の細胞数を計数することが適切であった。

**(vi) LY6D の標的分子候補としての妥当性:** 上述の結果に基づき、自発老化細胞に高発現している膜タンパク質に焦点を絞り、自発老化細胞を殺傷するための標的分子の特定を試みた。まず正常細胞の老化時に発現が上昇する **Lymphocyte antigen 6 family D (LY6D)** に着目した。LY6D は細胞膜の外葉に