

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化細胞で見られるストレス反応に基づいた細胞老化の

テーラーメイド的診断・治療技術の開発に関する研究

(H13-長寿-019)

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 石川冬木（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

平成14年（2002年）3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
老化細胞で見られるストレス反応に基づいた細胞老化のテーラーメイド的 診断・治療技術の開発に関する研究	.....	1~5
石川冬木		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....	6
III. 研究成果の刊行物・別刷り	.....	7~68

老化細胞で見られるストレス反応に基づいた細胞老化の  
テーラーメイド的診断・治療技術の開発に関する研究

主任研究者 石川 冬木 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授

細胞老化は、再生組織の新陳代謝に必要な分裂細胞が有限回数 of 細胞分裂の後に、分裂能を失う現象である。再生組織を構成する細胞に細胞老化が出現すると、再生組織は新陳代謝をすることができなくなり、組織を構成する総細胞数の減少と個々の細胞機能が低下がおり、それは組織機能の廃絶を介して個体老化につながりうる。従って、細胞老化の誘導機構を知ることは臨床医学上非常に重要であるが、これまでにその詳細は知られていなかった。本研究および、これまでの我々の研究によって、ストレス反応性 MAPK のひとつである p38 が細胞老化誘導に重要な役割を果たしていることを見出した。p38 は、テロメア短小化による分裂寿命以外に、マウス胎児由来線維芽細胞の細胞老化、活性化 Ras による細胞老化など、異なる生物種や細胞種において異なる細胞老化刺激に反応して共通して活性化され、細胞老化を誘導する。さらに、p38 は、何らかのストレスが量的閾値に達したときに活性化されるらしいことを示した。以上の結果は、p38 およびその信号伝達系路が細胞老化の診断・治療のために有用な分子標的となりうることを示唆している。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名  
なし

A. 研究目的

再生組織では、細胞分裂可能回数が有限であることから生じる細胞老化（細胞が増殖刺激に反応することができず分裂停止してしまう状態）が老化の原因の一つとして重要である。細胞老化を来す原因は、度重なる細胞分裂に伴うテロメア長の短小化、細胞外環境の変化、過度の増殖刺激等、再生組織の種類によって異なる。従って、細胞老化の進行の程度は、個人の生活習慣、遺伝学的背景、基礎疾患の有無によって大きく異なり、また、同一個人であっても臓器、部位によっても異な

ると考えられ、単なる暦年齢に頼ることなく、分子基盤に基づいた「テーラーメイド」的な診断法の確立が求められる。しかし、現在のところ、そのような有効な方法は知られていない。一方、細胞老化において、増殖停止を引き起こす機構としては、p16, p21, p53 の蓄積が知られている。しかし、これらの複数の細胞老化原因と細胞周期制御因子を結びつける信号伝達経路はこれまで不明であった。我々は、これまでに、ストレス反応性 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) の一つである p38 が複数の原因にもとづく細胞老化において、直接的な信号伝達因子であることを発見した。本研究は、今回発見された p38 の細胞老化における中心的役割を用いて、細胞老化の程度を個人別・臓器別に細胞レベル

で診断し、治療する技術を開発することを目標とする。

老化現象は、個体差が著しいことから、単純な暦年齢で「高齢者」「老化した臓器、個人」を判定することはできない。一方、単純な機能テストで老化を判定することは、潜在的な能力を見落とす結果につながる可能性がある。以上のことから、「老化」を分子レベルでの証拠にもとづいて判定する技術の開発が高齢社会では必須になる。本研究は、特に再生組織の細胞老化に絞って、この目標を到達しようとするものである。

## B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞として、WI38 および市販されている新鮮ヒト正常線維芽細胞を用いた。通常の方法により継代を行い、集団細胞数が2倍に増えるのに要する時間を集団倍加時間とし、集団倍化数を PDL (population doubling level) で表した。

活性化型 (コドン 12 の突然変異型) ヒト H-ras をレトロウイルスにより WI38 細胞に遺伝子導入し、ベクターがコードするピューロマイシン抵抗性遺伝子によって、遺伝子導入されている細胞を薬剤選択した。典型的な例では、全細胞数の約 50%程度が遺伝子導入された。

より簡便に活性化 Raf を誘導し細胞老化表現型を同期して起こさせるために既に知られている以下の方法を用いた (Mol. Cell. Biol. 13: 6241, 1993)。Raf キナーゼの 340 および 341 番目のチロシンをアスパラギン酸に置換したキナーゼ領域のみを含む変異型 Raf ( $\Delta$ Raf1[EE])は構成的に強いキナーゼ活性を持つことが知られている。このような変異型 Raf とエストロゲン受容体蛋白質とのあいだのキメラ蛋白質 ( $\Delta$ Raf1[EE]:ER)は、エストロゲンあるいはその

類自体タモキシフェンの非存在下では、Raf は、非活性化型として存在するが、これらの薬剤の存在下では、ただちに既に存在する蛋白質が活性化を受ける。本実験では、ヒト正常線維芽細胞 WI38 にレトロウイルスベクターを用いて  $\Delta$ Raf1[EE]:ER を遺伝子導入したもの (WI38- $\Delta$ Raf1[EE]:ER)を用いた。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、学内研究指針に則り行われた。

## C. 研究結果

### 1. マウス胎児由来線維芽細胞の細胞老化における p38 の役割

継代培養を続けたヒト正常線維芽細胞は、やがてテロメアの短小化により非可逆的な細胞増殖停止、細胞老化をきたす。我々はすでに、この分裂寿命に基づく細胞老化状態においてストレス反応性 MAPK p38 が活性化していること、また、ヒト正常線維芽細胞に人為的に p38 の活性化をもたらすと、分裂寿命による細胞老化と区別が付かない状態を急速に誘導できることを明らかにした。さらに、ヒト正常線維芽細胞における p38 の活性化を阻害するために、その上位キナーゼである MKK6 のドミナント・ネガティブ体を発現させると、対照群に比べて有意に分裂寿命が延長をすることを明らかにした。そこで、今年度の本研究において、ヒト以外の生物種においても同様のことが成り立ちうるか否かを検討するために、マウス胎児由来線維芽細胞 MEF (mouse embryonal fibroblast)を用いて検討を行った。

MEF 細胞は、胎児より採取後、約 10-30 回の細胞分裂の後に、細胞老化状態に陥る。一般に、マウスのテロメア長はヒトに比べて長く、約 50-100 kb の長さを持っているので、マウスがヒト

に比べて少ない回数細胞分裂の後に示す細胞老化は、テロメア短小化以外の原因に基づくものと信じられている。我々は、老化した MEF 細胞で、p38 が特異的に活性化を受けていること、また、p38 阻害剤である SB203580 を培養系に添加し続け、p38 の活性化を抑制することで、細胞老化の出現を遅延させることができることを見いだした。以上の研究成果は、p38 活性化による細胞老化誘導が、種を越えて保存された現象であることを示している。

## 2. 活性化 Ras がん遺伝子によりもたらされるヒト正常線維芽細胞細胞老化における p38 の役割

WI38-ΔRaf1[EE]:ER 細胞にタモキシフェンを 10-1000 nM 添加して培養すると、報告されているように、72 時間のあいだに細胞増殖の停止、細胞質の拡大と扁平化、老化細胞特異的βガラクトシダーゼ活性 (senescence-associated β-galactosidase; SA-β-gal) の誘導、サイクリン・Cdk 阻害蛋白質 p16, p21 の誘導、主として G1 期の細胞周期の停止が認められた。これらの形質は老化細胞に特徴的なものである。

すでに、S. Lowe らによって、Ras-Raf-Mek-Erk のいわゆる古典的 MAPK 経路が Ras あるいは Raf による細胞老化誘導に必要であることが示されている。実際、Mek キナーゼの特異的阻害剤である PD98059 を添加すると、活性化 Raf による細胞老化誘導が認められなくなった。

MAPK 経路は、MAPKKK-MAPKK-MAPK の三者の蛋白質キナーゼカスケードを特徴とし、古典的 MAPK 経路は、Raf-Mek-Erk からなり、主として増殖因子などの細胞外増殖刺激に受容体、Ras が反応することで活性化される。一方、この古典的な MAPK 経路のほかに、独立した MAPK 経路が存在するこ

とが知られている。その中の一つは、ストレス誘導性 MAPK 経路と呼ばれ、MAPK に相当するキナーゼとして JNK および p38 が関わる。MAPK が活性化されているかどうかは、そのリン酸化 MAPK 特異的な抗体によって解析することが可能である。そこで、WI38-ΔRaf1[EE]:ER 細胞にタモキシフェンを作用させた後、3 種類の MAPK、すなわち、Erk, JNK, p38 の活性化状態について、それぞれのリン酸化型特異的な抗体を用いて解析した。その結果、予想通り、Erk については、タモキシフェン投与後、ただちにリン酸化型が出現し、Raf の下流分子として活性化されることが確認された。JNK は活性化型は検出されなかった。興味深いことに、Erk の活性化のキネティクスとは遅れて、p38 の活性化型が検出された。このことは、Raf による細胞老化誘導に、p38 が何らかの形で関与することを示唆している。

p38 は、紫外線、電離放射線、細胞外液浸透圧の変化、など、種々のストレスによって活性化を受けることが知られている。古典的 MAPK 経路を強く刺激することで、p38 が送られて活性化を受けることは、古典的 MAPK 経路の持続的な強い刺激が細胞に何らかのストレスを与え、これがある閾値に達したときに、p38 が活性化されて細胞老化が二次的に誘導されることを示唆している。この仮説が正しいとすれば、古典的 MAPK 経路の刺激の強さによって、ストレスが閾値に達するのに必要な時間が変わりうることが予想される。そこで、WI38-ΔRaf1[EE]:ER 細胞に 10 nM と 1000 nM の二種類の異なるタモキシフェンを投与し、p38 がいつ活性化を受けるかを比較検討すると、10 nM では、3 日間で最大の活性化を受けたのに対して、1000 nM では、24 時間で最大の活性化を受けた。以上のことは、p38 の活性化につながるストレスが、時間にわたって蓄積することのできる量的なものであり、p38 は、このストレス

量がある閾値以上にたまらないと活性化を受けないことを示唆している。

#### D. 考察

我々のこれまでの研究、および平成 13 年度に行われた本研究により以下のことが明らかとなった。

1. ストレス反応性 MAPK p38 は、種々の細胞種における細胞老化発現のための共通経路である。

これまでに、ヒト正常線維芽細胞における分裂寿命、MEF 細胞における（おそらくは培養環境ストレスによる）細胞老化、ヒト正常線維芽細胞における活性化 Ras 誘導性細胞老化の三種類の異なる細胞老化誘導系で、共通して p38 が細胞老化誘導シグナルとして重要な役割を果たしていることを見出した。現在、ヒト皮膚ケラチノサイト、乳腺上皮細胞などの上皮系の細胞でも検討を試みており、ほぼ同様の結果を得ている。以上のことから、p38 は種々の細胞老化刺激に反応して共通に活性化され細胞老化をもたらす信号伝達系路であると考えられる。

2. p38 は種々のストレスが量的閾値に達したときに活性化され細胞老化を誘導する

誘導性 Raf を用いた実験により、細胞に与えるストレスの時間あたりの量を強くすると、弱い場合に比べて短い時間で p38 が活性化され、細胞老化に至ることが示された。p38 は、種々の細胞ストレスに反応することが知られているので、この事実は以下のような興味深い可能性を示唆する。すなわち、ストレス A とストレス B が別々に感知されるのではなく、ストレス A とストレス B の総量が感知されて p38 が活性化される可能性である。例えば、加齢によりテロメアが短小化しつつある細胞は、若くてテロメアが長い細胞に比べて「テロメアストレス」が蓄

積していると考えられる。このテロメアの短小化自身では直ちに細胞老化が引き起こされない場合でも、酸化ストレスなどの第二のストレスが作用した場合、加齢細胞では若い細胞に比べて早くストレス総量が閾値に達するため、より少ない酸化ストレスによって簡単に細胞老化に至ってしまう可能性がある。

#### 3. 臨床医学的な応用

p38 が細胞老化の共通信号伝達系路を担う可能性が出てきたため、p38 の活性化の程度をみることで、細胞老化の原因によらず、その程度を単一の手法で検討できる可能性がある。また、p38 の活性化は比較的少量の献体で観察できるので、非侵襲的な方法で種々の臓器の細胞老化を検討する手法の開発が望まれる。そのような方法が開発されれば、個々の症例において、臓器別にテーラーメイド的治療方法を計画することが可能となるであろう。

p38 を阻害することで、細胞老化の発生を阻止できることは、p38 阻害剤、または、その上位あるいは下位信号伝達経路分子を標的にして細胞老化に基づく疾患を治療する薬剤の開発が可能であることを示唆している。

#### E. 結論

今年度の本研究により、テロメア依存性・非依存性の細胞老化現象に共通して関与する信号伝達分子を明らかにすることができ、また、将来の臨床的な応用を開拓する端緒が得られた。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoque, T., and E. Ishikawa. Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres. *J. Biol. Chem.*, 276:5059-5067 (2001).
2. Ohno, J., Y. Horio, Y. Sekido, Y. Hasegawa, M. Takahashi, J. Nishizawa, H. Saito, E. Ishikawa and K. Shimokata. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis*, 22:751-756 (2001).
3. Ohki, R., T. Tsurimoto, and E. Ishikawa. *In vitro* reconstitution of the end-replication problem. *Mol. Cell. Biol.*, 21:5753-5766 (2001).
4. Kuramoto, M., K. Ohsumi., T. Kishimoto, and E. Ishikawa. Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase. *Gene*, 277:101-110 (2001).
5. Kanoh, J., and E. Ishikawa. SpRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr. Biol.*, 11:1624-1630 (2001).
6. Katahira, M., Y. Miyanoiri, Y. Enokizono, G. Matsuda, T. Nagata, E. Ishikawa, and S. Uesugi. Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA. *J. Mol. Biol.*, 311:973-988 (2001).

7. Yago, M., R. Ohki, S. Hatakeyama, T. Fujita, and F. Ishikawa. Variant forms of upstream stimulatory factors (USFs) control the promoter activity of *hTERT*, the human gene encoding the catalytic subunit of telomerase. *FEBS Letters*, in press (2002)

2. 学会発表

多数につき略

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
(石川冬木)					
Hoque, T., and F. Ishikawa.	Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres.	J. Biol. Chem	276	5059 - 5067	2001
Ohno, J., Y. Horio, Y. Sekido, Y. Hasegawa, M. Takahashi, J. Nishizawa, H. Saito, F. Ishikawa and K. Shimokata.	Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development.	Carcinogenesis	22	751 - 756	2001
Ohki, R., T. Tsurimoto, and F. Ishikawa.	In vitro reconstitution of the end-replication problem.	Mol. Cell. Biol.	21	5753 - 5766	2001
Kuramoto, M., K. Ohsumi., T. Kishimoto, and F. Ishikawa.	Identification and analyses of the Xenopus TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase.	Gene	277	101 - 110	2001
Kanoh, J., and F. Ishikawa.	SpRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast.	Curr. Biol.	11	1624 - 1630	2001
Katahira, M., Y. Miyanoiri, Y. Enokizono, G. Matsuda, T. Nagata, F. Ishikawa, and S. Uesugi.	Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA.	J. Mol. Biol.	311	973 - 988	2001



20010284

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。