

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 石川冬木（京都大学大学院生命科学研究科）

平成15年（2003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	1~4
石川冬木		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	5
III. 研究成果の刊行物・別刷り	6~66

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 京都大学大学院生命科学研究科 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の細胞分裂の後に、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。今年度においては、マイクロアレイ解析を用いて、p38 が活性化されたときに誘導される遺伝子を網羅的に同定すると共に、細胞内に起こる変化を細胞生物学的に検討した。

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、たびかさ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。

p38 を活性化し細胞老化を誘導する系については、前年度の報告書に記載したとおりの方法を用いた。

パピローマウイルス E6 および E7 蛋白質を発現するベクターは、京大ウイルス研酒井博幸博士より供与を受けた。

p38 活性化後の遺伝子発現プロファイルの解析は、東大医科研中村祐輔教授との共同研究により行った。

(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. p38 活性化による細胞老化誘導の下流における p53 および pRb の役割の解析

既に我々は、ヒトおよびマウス正常線維芽細胞において p38 の活性化が細胞老化誘導をもたらし、その阻害が少なくとも部分的には細胞老化誘導を回避することを明らかにした (Genes to Cells, 8: 131-144, 2003)。すなわち、p38 は細胞老化誘導機構のボトルネックにあたる分子で

あるといえる。本年度の本研究では、p38 の下流に存在して細胞老化誘導に関わる因子の同定を行った。

既に、がん抑制遺伝子 p53 および pRb が細胞老化に重要な役割を果たしていることが知られている。これらの因子が p38 の下流に存在するか否かを検討するため、以下の実験を行った。パピローマウイルス E6 および E7 は、それぞれ p53 および pRb に結合し、その分解を促進することでそれらの機能を失活させることが知られている。そこで、正常ヒト線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて E6 単独、E7 単独あるいは E6 と E7 両方を発現している細胞を得た (それぞれ、E6, E7, E6+E7 細胞と呼ぶ)。これらに、さらに p38 の上位キナーゼである MKK6 の構成的活性化型 MKK6EE をレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、p38 を活性化させた。DNA 含量とプロモデオキシウリジンを用いた細胞周期解析によって、E6 に MKK6EE を遺伝子導入したものは増殖停止を示したが、E7 あるいは E6+E7 に MKK6EE を遺伝子導入したものは増殖停止を示さなかった。このことは、p38 活性化による細胞老化に伴う増殖停止に p53 は必須ではなく、pRb が必須であることを示している。

次に、それぞれの細胞の増殖曲線を求めると、E7 に MKK6EE を遺伝子導入したものは、細胞周期回転は行うものの、増殖をほとんど示さずアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。一方、E6+E7 に MKK6EE を発現させたものは、MKK6EE 非発現対照と比較すると遅いものの、増殖を回復することが分かった。このことより、pRb を失活させると、p38 活性化による細胞周期停止は起こらなくなるものの、アポトーシスが誘導されるために細胞増殖は起こらず、さらに p53 を失活させることで初めて有意な増殖が起こることが分かった。

さらに、これらの細胞における細胞老化マーカーである細胞老化特異的 β ガラクトシダーゼ

活性を検討したところ、E6, E7, E6+E7 のいずれの細胞に MKK6EE を発現させた場合でも活性が認められることが分かった。このことは、細胞周期に対する効果とは異なり、 β ガラクトシダーゼ活性誘導には、p53 や pRb は必要なことを意味している。

以上のことから、p38 の下流においては、pRb 依存的経路（細胞周期停止）と非依存的経路（ β ガラクトシダーゼ活性誘導）に分岐することが明らかとなった。

2. マイクロアレイを用いた p38 活性化による細胞老化誘導の下流に存在する因子の探索

p53 と pRb 以外の p38 下流因子を同定することを目的に、東大医科研中村祐輔教授との共同研究により p38 活性化時に発現誘導される遺伝子をマイクロアレイを用いて同定した。

正常ヒト細胞に MKK6EE を遺伝子導入し、得られた細胞の mRNA から対照細胞 mRNA とともに cDNA を作成、マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせて、MKK6EE 発現細胞で特異的に発現が上昇している遺伝子と特異的に低下している遺伝子を同定した。現在、それらの遺伝子解析を行っている。

3. 活性化 p38 特異的モノクローナル抗体の作成

これまでの研究で示してきたように、p38 活性化は種々の外的内的ストレスによって誘導される細胞老化の共通マーカーとなりうると考えられる。活性化 p38 は、上位キナーゼによって Thr-Gly-Tyr の Tyr と Tyr がリン酸化されることにより起こる。現在、このリン酸化 p38 を特異的に認識する抗体が市販されているが、それは免疫組織学的な用途には用いることができない。活性化 p38 が組織内のどの領域で起きているかを明らかにすれば、その組織で細胞老化が進行しつつある場所を同定することができると考

えられ、細胞老化の個別診断に大きな役割を果たすであろうと期待される。そこで活性化 p38 に対するモノクローナル抗体を名古屋大学医学部浦野 健助教授と共同研究で開発しつつある。

D. 考察

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。しかし、その下流には種々の細胞老化表現型を誘導するために少なくとも2種類以上の経路が存在しており、その意味で、p38 は細胞老化誘導経路のボトルネックに相当するユニークな立場を占める。

この知見を臨床的に応用するにあたって以下の二つの可能性が存在する。

第一に、p38 が様々なストレス誘導性細胞老化の共通経路に相当することから、活性化 p38 を同定することによって、様々な原因によって細胞老化を起こしつつある細胞を全て同定できる可能性である。細胞老化は、ストレスによって誘導されることが知られているので、個体においては、解剖学的位置、生理学的条件が異なるために、同一組織を構成する細胞群のあいだでも部位によって受けるストレス量が異なり、従って細胞老化の起こりやすさも異なるであろうと予想される。また、異なる個人においては細胞老化が起こりやすい臓器・組織が異なるであろう。細胞老化部位を個人別に正確に決定することはテーラーメイド診断の第一歩である。現在、作成を進めている活性化 p38 に対する新規モノクローナル抗体が実用化されれば、その臨床的価値は大きいと期待される。

第二に、治療面から考えると、p38 のノックアウトマウスは致死であることが知られているので、p38 を分子標的とした抗細胞老化治療は考えにくい。しかし、本年度の本研究により、p38 の下流には異なる経路が存在することが明らかとなったので、その中の特定の経路に標的を絞る

ことによって細胞老化のある特定の表現型のみを回復させるような治療薬の開発が可能であると期待される。その意味で、現在解析を進めているマイクロアレイによる p38 誘導遺伝子の同定が期待される。

E. 結論

今年度の本研究により、p38 誘導性細胞老化経路を分子標的とした臨床的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. Kim, M., X. Yuan, S. Okumura and E. Ishikawa. Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 296:1372-1377 (2002)
2. Saito, M. and E. Ishikawa. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. **J. Biol. Chem.**, 277: 35434-35439 (2002).
3. Hoque, Md. T. and E. Ishikawa. Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction and spindle-assembly checkpoint activation. **J. Biol. Chem.**, 277:42306-42314 (2002)
4. Sakai, H., T. Urano, K. Ookata, M.-H. Kim, Y. Hirai, M. Saito, Y. Nojima, and E. Ishikawa. MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. **J. Biol. Chem.**, 277:48714-48723 (2002)

5. Miyoshi, T., M. Sadaie, J. Kanoh and E. Ishikawa. Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. **J. Biol. Chem.**, 278:1924-1931 (2003)
6. Iwasa, H., J. Han and E. Ishikawa. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. **Genes to Cells**, 8: 131-144 (2003).
7. Takata, T. and E. Ishikawa. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 301: 250-257 (2003).
8. Sadaie, M., T. Naito and E. Ishikawa. Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. **Genes Dev.**, in press (2003).

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)					
Kim, M., X. Yuan, S. Okumura and F. Ishikawa.	Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	296	1372 - 1377	2002
Saito, M. and F. Ishikawa.	The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2.	J. Biol. Chem.	277	35434 - 35439	2002
Hoque, Md. T. and F. Ishikawa.	Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction and spindle-assembly checkpoint activation.	J. Biol. Chem.	277	42306 - 42314	2002
Sakai, H., T. Urano, K. Ookata, M.-H. Kim, Y. Hirai, M. Saito, Y. Nojima, and F. Ishikawa.	MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase.	J. Biol. Chem.	277	48714 - 48723	2002
Miyoshi, T., M. Sadaie, J. Kanoh and F. Ishikawa.	Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast.	J. Biol. Chem.	278	1924 - 1931	2003
Iwasa, H., J. Han and F. Ishikawa.	Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.	Genes to Cells	8	131 - 144	2003
Takata, T. and F. Ishikawa.	Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	301	250 - 257	2003

20020229

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.5別紙 5 の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。