

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 15 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 16 年 (2004 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

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、p38 が活性化される機構と、活性化された結果生じる諸現象について分子生物学的な検討を加えた。

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指とする。

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、WI-38 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、前年度までの報告書に記載したとおりの方法を用いた。

(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. テロメア短小化による分裂寿命における p38 の役割の検討

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 が、培養環境、過度の増殖刺激、酸化ストレス、テロメア短小化などの様々な刺激に反応して活性化され、細胞老化表現型をもたらすことを明らかにした (Genes to Cells, 8: 131-144, 2003)。

本研究項目では、特にテロメア機能異常により p38 が活性化される過程を検討した。テロメア短小化による細胞老化誘導は、単純なテロメア DNA の長さの短小化によるのではなく、実際にテロメアに結合しているテロメア DNA 結合蛋白質の量が減ることが重要であることが知られている。ヒト細胞においては、テロメア DNA 結

合蛋白質 TRF2 が重要な役割を果たしている。TRF2 は、テロメア末端をキャップするが、そのドミナント・ネガティブ変異体である TRF2 Δ BAM を異所的に発現した細胞は、内因的な TRF2 がテロメアに結合しなくなり、テロメアキャッピング機能が失われるために、細胞老化やアポトーシスが誘導される。本実験では、この系を用いて、キャッピング機能を失ったテロメアによる細胞老化誘導に p38 が関与するか否かを検討した。

正常ヒト線維芽細胞 WI-38 に TRF2 Δ BAM をレトロウイルスを用いて強制発現すると、報告通り、細胞老化が誘導されたが、このとき、リン酸化 p38 が増加した。このとき、p38 の阻害剤である SB203580 を添加すると TRF2 Δ BAM による細胞老化が回避された。p38 活性化に関わる上流分子を明らかにする目的で、ATM/ATR の阻害剤である caffeine を添加した時、ATM/ATR 依存的に起こることが知られている p53Ser15 のリン酸化は予想通り減少したのに対して、p38 の活性化は減少しなかった。このことより、TRF2 Δ BAM による p38 の活性化は、ATM/ATR 非依存的に起こることが明らかとなった。以上より、TRF2 失活によるテロメアキャッピング機能低下がもたらす細胞老化においても、p38 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. アポトーシス関連因子が細胞老化に果たす役割

すでに、p38 や JNK などのようなストレス反応性 MAPK は、アポトーシス誘導を行うことが広く示されている。我々は、JNK ではなく p38 のみが、ヒト正常線維芽細胞において老化を誘導できることを示してきた。そこで、p38 がどのようにして、アポトーシスと細胞老化という全く異なる生物学的結果をもたらすのかを明らかにするために、ストレス反応性 MAPK が制御することが知られているミトコンドリア関連アポトーシス制御因子の細胞老化への関与を検討した。

pro-apoptosis に機能することが知られている Bax や Bak を正常線維芽細胞に過剰発現させると、細胞老化を誘導することができた。一方、いまだ予備的段階ではあるが、anti-apoptosis に機能する Bcl-XL を過剰発現すると、分裂寿命を延長することができた。以上のことから、ミトコンドリア機能がよく知られているアポトーシス以外に、細胞老化にも関与していることが明らかとなった。

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思われる。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の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。昨年度より、名古屋大学医学部浦野健助教授と共同研究で活性化 p38 に対するモノクローナル抗体の作成を試みてきた。しかし、残念ながら、最初に用いたオリゴペプチドでは良好な結果が得られなかったため、現在、ペプチド配列に工夫を加えて再度免疫を行っている。

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。

本年度の本研究により、ドミナント・ネガティブ変異体である TRF2 Δ BAM による細胞老化誘導系についても、p38 が重要な役割を果たしている

ことが明らかとなった、このことは、p38 が分裂寿命も含めたさまざまな細胞老化誘導系で機能していることをさらに確実にするものである。

一方、p38 はアポトーシスを誘導することがよく知られているので、同じ分子がどのようにしてアポトーシスと細胞老化の異なった生物学的帰結をもたらすのかは非常に重要な問題である。本年度の研究により、老化シグナルとアポトーシスシグナルはともにミトコンドリアの pro-および anti-apoptosis Bcl ファミリー蛋白質に作用している可能性が示唆された。今後、この制御機構を明らかにすることが非常に重要である。

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. Kanoh, J., S. Francesconi, A. Collura, V. Schramke, E. Ishikawa, G. Baldacci and V. Geli. The Fission yeast spSet1p is a histone H3-K4 methyltransferase that functions in telomere maintenance and DNA repair in an ATM kinase Rad3-dependent pathway. *J. Mol. Biol.*, 326: 1081-1094 (2003).
2. Sadaie, M., T. Naito and E. Ishikawa. Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. *Genes Dev.*, 17: 2271-2282 (2003).
3. Kanoh, J. and E. Ishikawa. Composition and conservation of the telomeric complex. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 2295-2302 (2003).
4. Ishikawa, E. Cellular senescence, an unpopular

yet trustworthy tumor suppressor mechanism.

Cancer Sci., 94: 944-947 (2003).

5. Yoshimura, S.H., H. Maruyama, F. Ishikawa, R.

Ohki and K. Takeyasu. Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. **Genes to Cells**, 9:205-218 (2004).

6. Ohki, R. and F. Ishikawa. Telomere-bound TRF1

and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. **Nucl. Acids Res.**, 32: 1627-1637 (2004).

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)					
Kanoh, J., S. Francesconi, A. Collura, V. Schramke, F. Ishikawa, G. Baldacci and V. Geli.	The Fission yeast spSet1p is a histone H3-K4 methyltransferase that functions in telomere maintenance and DNA repair in an ATM kinase Rad3-dependent pathway.	J. Mol. Biol.	326	1081 - 1094	2003
Sadaie, M., T. Naito and F. Ishikawa.	Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats.	Genes Dev.	17	2271 - 2282	2003
Kanoh, J. and F. Ishikawa.	Composition and conservation of the telomeric complex.	Cell. Mol. Life Sci.	60	2295 - 2302	2003
Ishikawa, F.	Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism.	Cancer Sci.	94	944 - 947	2003
Yoshimura, S.H., H. Maruyama, F. Ishikawa, R. Ohki and K. Takeyasu.	Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2.	Genes to Cells	9	205 - 218	2004
Ohki, R. and F. Ishikawa.	Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats.	Nucl. Acids Res.	32	1627 - 1637	2004