

研究報告書

「細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型(5年型)

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 大谷 直子

1. 研究のねらい

正常細胞に癌遺伝子の活性化や酸化的ストレスなどによる DNA 損傷が加わると、不可逆的増殖停止である「細胞老化」が誘導される。細胞老化はアポトーシスとならぶ重要な発癌防御機構であり、申請者はこれまで細胞老化の誘導機構の詳細を明らかにしてきた(Ohtani et al. Nature 2001, Takahashi, Ohtani et al. Nature Cell Biol 2006)。またさらに細胞老化反応を生体内で検出できるイメージングマウスを開発し(Ohtani et al PNAS 2007, Yamakoshi et al. J Cell Biol. 2009)、細胞老化の生体における役割を明らかにしてきた。

しかしアポトーシスとは異なり、細胞老化をおこしても細胞が死滅せず長期間生存し続けることから、細胞老化は、初期には癌抑制機構として働くが、長期的には生体になんらかの不利益な影響を及ぼす可能性があると考えられる。最近、細胞老化をおこすと、様々な炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素等が大量に分泌されることが明らかになり、この現象は SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれている。これらの SASP 因子が、炎症の慢性化や癌の進展を引き起こしている可能性が考えられるが、SASP 因子の分泌維持機構や、SASP が引き起こす病態については、十分には明らかになっていない。

そこで本研究では、これまで考えられていなかった細胞老化や SASP の維持機構から慢性炎症を解析し、慢性炎症や慢性炎症を素地とするがん進展の新たなメカニズムの解明を目指す。特に本研究では慢性炎症を素地とする病態として、肥満や加齢という病態に着目した。肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示唆されているが、なぜ肥満によりがんが促進されるのか、そのメカニズムは十分にはわかっていない。肥満によるがん促進に細胞老化や SASP が関与しているのではないかと考え、解析を行い、肥満により SASP を介した肝がん促進的ながん微小環境を形成することが肝がん発症の一因であることを中間報告までに明らかにした(Yoshimoto et al. Nature 2013)。さらに残りの研究期間を使って、SASP 因子誘導の分子機構と SASP 因子によるがん進展の分子機構について研究を進めている。同時に個体老化と SASP の関連について早老症マウス klotho を用いた解析を試みていたが、細胞老化誘導因子 p16 により、SASP 誘導とは別経路の、klotho の発現抑制を介した、新しい個体老化の誘導機構を明らかにすることができた(Sato et al. Nature Commun 2015)。また、共同研究で皮膚の組織修復時における SASP の生理作用を明らかにした(Demaria et al. Dev Cell 2014)。

2. 研究成果

(1) 概要

肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示されているが、その分子メカニズムは十分には明らかになっていない。今回我々は、化学発癌物質 DMBA を塗布する全身性の発癌モデルマウスを用いて、30 週後には肥満により肝臓の発症が著しく増加することを見出した。肝臓促進のメカニズムとして、肥満で増加したグラム陽性腸内細菌代謝物のデオキシコール酸が、腸肝循環により門脈を通じて肝臓に到達し、肝臓の間質に存在する筋線維芽細胞である肝星細胞に作用して細胞老化を誘導することがわかった。その結果 SASP 因子と呼ばれる様々な炎症性サイトカインやプロテアーゼ等が持続的に分泌され、腫瘍促進性の高いがん微小環境を形成することが肝がん進展の原因であることが明らかになった。特に IL-1beta がサイトカイン産生の上流因子として重要であることが明らかになった。さらに肥満マウス糞便中の腸内細菌の 16SrRNA 遺伝子の配列を次世代シーケンサーで調べたところ、既知の 2 次胆汁酸産生菌の類縁菌が、肥満マウスで著しく増加していることが明らかになり、この菌がデオキシコール酸を産生している可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても、脂肪肝をベースに発症する NASH(non-alcoholic steatohepatitis)肝炎に伴う肝臓症例において、肝星細胞の細胞老化と SASP が検出され、同様の機構がヒトの肝臓においても働いている可能性が示唆され、中間報告までに論文を発表することができた(Yoshimoto et al. Nature 2013)。この論文はサイエンス誌の選ぶ Breakthrough of the Year 2013 で内容が紹介され、高い評価を得た。研究期間の後半では、同じ肥満誘導性肝臓のモデルシステムを用いて、SASP 因子の誘導機構と SASP 因子によるがん進展の分子機構について研究を進めている。研究期間の初期から上述した肥満とがんの研究と同時に、個体老化と SASP の関連について、早老症マウス klotho を用いた解析を試みていたが、細胞老化誘導因子 p16 により、細胞老化や SASP 誘導とは別経路の、klotho の発現抑制を介した、新しい個体老化の誘導機構を明らかにすることができた(Sato et al. Nature Commun 2015)。また、共同研究で皮膚の組織修復時における SASP の生理作用を明らかにした(Demaria et al. Dev Cell 2014)。

(2) 詳細

中間報告以降の研究成果

1. SASP 因子の発現誘導機構:TLR を介する炎症シグナルの関与

他グループからの過去の報告では、グラム陰性菌の外膜成分、リポポリサッカライド(LPS)をリガンドとする TLR4 のノックアウトマウスで、四塩化炭素による肝臓形成が抑制されるという報告があった(Dapito et al. Cancer Cell 2012)。そのため、我々も SASP 因子の誘導機構として、以前から TLR を介する経路に着目し解析を行っていた。この報告と同様に TLR4 ノックアウトマウスを用いて肥満誘導性肝臓誘発実験を行ったところ、逆に TLR4 ノックアウトマウスにおいてはむしろ、肝臓腫瘍形成数が増加することが明らかになった。しかし、我々の肥満誘導性肝臓誘発実験では、グラム陽性腸内細菌が著しく増加していることから、グラム陽性菌の細胞壁成分のリポタイコ酸(LTA)をリガンドとする TLR2 を介する炎症シグナルが、SASP 因子の誘導に関与する可能性を考え、TLR2 ノックアウトマウスを用いて現在研究を進めている。

2. 皮膚損傷治癒過程における SASP 因子の生理作用の解明 (米国 Judith Campisi らのグループとの共同研究)

細胞老化反応をイメージングするツールとして、マウス p16 遺伝子座に、ルシフェラーゼと赤色蛍光タンパク RFP、および単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-TK) の3つの遺伝子産物を融合させたトリプルフュージョンタンパクの cDNA を挿入した組み換え BAC を作製してマウスの p16 遺伝子座に導入し、p16 の発現時にこのトリプルフュージョンタンパクが発現するマウスモデルシステムを、米国の Judith Campisi らのグループが開発した。このマウスを用いると、生体で細胞老化が誘導されている部位を発光と蛍光でイメージングすることが可能であり、かつ、抗ヘルペスウイルス剤である GCV の投与により、HSV-TK を発現する老化細胞を死滅させることができる。つまり、生体内で細胞老化を起こした細胞を同定し、かつ、その老化細胞を除去できるシステムである。このマウスを用いると、皮膚の損傷部位で細胞老化が検出され、皮膚線維芽細胞が細胞老化を起こすと筋線維芽細胞に変化し、この細胞が一時的に SASP 因子を産生することが明らかになった。さらに興味深いことに、損傷部における細胞老化を起こした細胞の除去によって、皮膚の損傷治癒が遅延することもわかった。詳細を調べると、細胞老化を起こした筋線維芽細胞が分泌する SASP 因子のひとつ、PDGF-AA が損傷治癒に重要な因子であることが示された。細胞老化が起こりにくい p16 と p21 のダブルノックアウトマウスを用いて損傷治癒を解析する実験を大谷が担当し、p16 と p21 のダブルノックアウトマウスにおいても皮膚の損傷治癒が遅延することがわかり、その場合も PDGF-AA を投与すると、治癒が促進されることが明らかになった。以上の実験から、皮膚の損傷時には皮膚の筋線維芽細胞において一時的に SASP が生じ、増殖因子の分泌によって組織再生を促す生理作用があることが明らかになった (Demaria, Ohtani et al. Dev Cell 2014)。

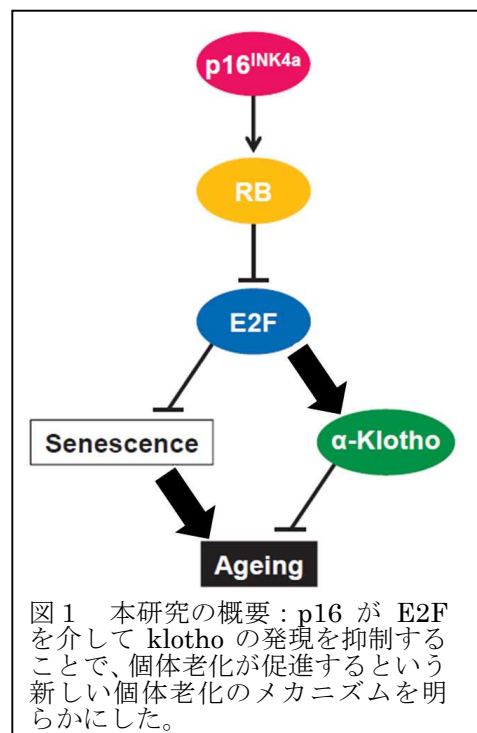
3. 細胞老化誘導因子 p16 は転写因子 E2F を介して抗老化因子 klotho の発現を抑制し個体老化を促進する

我々は以前開発した細胞老化誘導因子 p16 の発現イメージングマウスを用いた実験で、加齢個体においては細胞老化を起こした細胞が蓄積することを明らかにしていた。また、加齢個体の組織では様々な炎症性サイトカインの発現が上昇しているため、加齢個体では老化細胞蓄積と SASP の亢進が生じており、それが加齢における慢性炎症の原因であるかもしれないと考え、本さきがけ研究でその解明を目指すことを課題として挙げていた。この目的のため、細胞老化や SASP を生じにくい条件にするために、p16 を欠失させた背景としたマウスで、マウスを加齢させたいところであるが、p16 は同時に重要ながん抑制因子であるため、p16 ノックアウトマウスはがんを生じ、寿命を全うしないまま死亡する。そこで、早老症マウスである klotho マウスを用いて p16 が欠失した背景のマウスを作製し、個体老化と慢性炎症の関連について調べることとした。klotho マウスは gene trap 法により、 α -klotho 遺伝子の発現制御領域に DNA 断片が挿入されており、そのため抗老化因子である α -Klotho の発現が著しく低下した hypomorphic mutant で、平均寿命が 12 週程度という短命の早老症モデルマウスである。このマウスを用いて、p16 を欠失させた背景にしたところ、klotho マウスに通常みられる骨粗しょう症や肺気腫、皮下脂肪の菲薄化などの老化表現型が著しく回復しただけでなく、寿命も klotho マウスに比べ、著しく延長した。解析の結果、驚くべきことに、この老

化表現型の回復は、細胞老化を起こした細胞の数が減ったためではなく、もともと著しく低下していた α -Klotho 遺伝子の発現が、p16の欠失によって回復したことに起因することがわかった。つまり p16 が α -Klotho 遺伝子の転写制御を担っていることが示唆された。p16 は RB を介して E2F 転写因子を負に制御することが知られている。生体において α -Klotho を発現するのは腎臓の尿細管細胞であることがわかっているが、この細胞を使って α -Klotho 遺伝子のプロモーター領域の解析を進めたところ、ヒト、マウスとも、 α -Klotho 遺伝子プロモーターにおいて、転写因子 E2F ファミリーの結合部位が存在していた。クロマチン免疫沈降やプロモーターアッセイの結果、p16 は E2F の転写活性を抑制することで α -Klotho 発現を制御していることが判明した。さらに興味深いことに、ヒトの α -Klotho 遺伝子のプロモーター領域には SNPs (1塩基多型) 部位があり、ちょうど E2F 結合部位に一致していた。この SNPs をもつ人は骨粗しょう症の傾向があることが示されていたが、この SNPs 変異により、 α -Klotho 遺伝子のプロモーター活性は有意に抑制された。よってこの SNPs 部位の変異をもつ人は、 α -klotho の発現が低くなる可能性が示唆された。

以上の klotho マウスを用いた解析結果から、がん抑制遺伝子産物 p16 は、細胞老化を誘導するだけでなく、転写因子 E2F を介して抗老化遺伝子 α -Klotho の発現を抑制的に制御することで、個体の老化を制御するという、新たな個体老化の分子メカニズムが示唆された (Sato et al. Nature Commun. 2015) (図1)。

加齢個体における慢性炎症のメカニズムを探る目的で開始した研究であったが、klotho マウスを用いたことで、意外な方向に研究が展開した。副次的に得られた成果であるが重要なさきがけ研究の成果と考えている。今後、本来の目的である SASP に着目した加齢個体における慢性炎症のメカニズムについては、 α -klotho に依存しない別の早老症マウス、例えば DNA 修復異常マウスや p53 過剰発現マウス等を用いて、解明を目指したい。



3. 今後の展開

1 SASP 因子の発現誘導機構 —TLR2を介する炎症シグナルの関与に着目して—

研究成果の詳細1で記載したように、TLR2 を介するシグナルが肥満誘導性肝がんの形成に促進的に働く可能性を考え研究を進めている。今後、TLR2を活性化し腫瘍を促進するリガンドやその活性化機構、また、TLR2 経路を介してどのような下流遺伝子が発現誘導され、腫瘍形成に作用するのか、解明を目指したい。さらに TLR2 のシグナルと抑制するアンタゴニストを見出すことで、がん予防にもつなげたい。

2 肥満誘導性肝癌発症に対する運動負荷の効果

肥満により肝がんの発症が促進されることが明らかとなったが、この発症を予防する策の可能性として、運動負荷をマウスに与える試みを行っている。運動負荷により、生体でどのような遺伝子発現動態や代謝物に変化するのか、分子レベルまで解明していきたい。

3 SASP因子による肥満誘導性肝癌の促進機構の解明

肥満誘導性肝がんの腫瘍部において、肝星細胞の細胞老化やSASPが生じるが、SASP因子がいったいどのようなメカニズムでがんを進展させるのか、その機構はわかっていない。そこで腫瘍部の肝星細胞で高発現するサイトカインに注目し、がん細胞の増殖やがん進展に関わるかどうかを検討する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

1) 研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

[研究目的の達成状況]

研究課題申請時には以下の3つの課題に取り組むことを挙げていた。

- 1 生体において、細胞老化による炎症性サイトカイン分泌が発癌を促進するのか？
- 2 細胞老化による炎症性サイトカイン分泌(SASP)がどのようなメカニズムで起こるのか？
- 3 加齢による慢性炎症にSASPが関与するのか？

1～3では達成できたのは1と、2のメカニズムのひとつ(腸内細菌代謝物による)を明らかにできたと考えている。2について、さらなる解析を現在続けている状況である(TLR2を介する経路)。3については研究成果の3で述べたように、早老症マウスで試みたが、研究が別の方向に発展した。これ以外にもSASP因子がどのようなメカニズムで癌を進展させるのかという重要な点について現在、研究を進めている。この実験系で様々なことが明らかになりつつあるが、同時に解明すべき課題も増えている。

[研究の進め方]

さきがけに採択されてから、半独立態勢でグループを組み、自由に研究を行うことができた。研究費のおかげで、効率的に研究を進めていくことができた。昨年度から東京理科大学に異動し完全に研究室を主宰できるようになったが、さきがけ採択後の半独立態勢は、PIとしてのよいトレーニングになった。また、異動時もさきがけ研究費のおかげで、研究継続に支障がなかった。

2) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

ウイルス性肝がんの減少にかわって、肥満誘導性肝がんは現在、増加の一途をたどっているがんであり、予防法や治療法の確立が急務である。今後本研究を通じて明らかにできたことを、将来、予防法や治療法の実現に役立てたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞老化は重要な発癌防御機構であるが、老化細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象(SASP)を随伴することから、細胞老化から見た慢性炎症とがんの進展に焦点を合わせ研究を推進している。化学発癌剤 DMBA を塗布されたマウスに高脂肪食を摂餌すると肝がんが高率に発症する系を駆使して、さきがけ研究期間の前半で、高脂肪食摂取や遺伝的な肥満により腸内で増殖した特定のグラム陽性細菌が一次胆汁酸から多量のデオキシコール酸を生成し、それが腸肝循環により肝臓に到達して肝星細胞の細胞老化を誘導し、その肝星細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象(SASP)を引き起こし、結果として肝星細胞の近くの肝細胞で肝がんの発症を促進することを明らかにして論文発表した。その後、SASP因子の発現が、肥満で増加するグラム陽性腸内細菌の細胞壁成分のリポタイコ酸(LTA)によるTLR2 経路の活性化を伴う炎症誘導機構(COX2 の誘導とプロスタグランジンの産生)により亢進することを見いだしている。肥満誘導性肝がんのモデルではグラム陽性菌が著明に増えること、それを標的とするバンコマイシンを投与したマウスでは肥満誘導性肝がんの発生が抑制されることを示している。その他、本研究の過程で副次的ではあるが、皮膚損傷時の組織再生における皮膚筋線維芽細胞の一時的な SASP 現象(増殖因子の分泌)の関与や、新たな個体老化の分子メカニズムとしてがん抑制遺伝子産物p16が細胞老化を誘導するだけでなく抗老化遺伝子 α -Klotho の発現を抑制的に制御することを明らかにして発表している。

肥満、腸内細菌、細胞老化と発癌とのダイナミックな関係を示した成果と論文は、広範な研究領域の研究者に対してばかりでなく、国内外においても社会的に大きなインパクトがあった。本研究課題である肥満-細胞老化-がん進展の新たな発症メカニズムの解明の骨子となる成果を示すことができたと高く評価する。今後、研究成果の発表に対しても科学的・社会的な反響を呼ぶものと大いに期待できる。他のさきがけ研究者との共同研究を含む交流が研究進展に重要な要素となったこと、また本研究の成果を通じて研究者として大いに成長したことは、本領域にとっても誇らしい成果でもある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome..

Nature 499,97-101 (2013)

2. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge R-M, Jan Vijg J, Van Steeg H, Dollé MET, Hoeijmakers JHJ, de Bruin A, Hara E, Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA.

Dev Cell 31,722-33.(2014)

3. Imai Y, Takahashi A, Hanyuu A, Hori S, Sato S, Naka K, Hirao A, Ohtani N, Hara E. Crosstalk between the RB-pathway and AKT signaling forms a Quiescence-Senescence switch. **Cell**

Reports 7:194–207, (2014)

4. Sato S, Kawamata Y, Takahashi A, Imai Y, Hanyu A, Okuma A, Takasugi M, Yamakoshi K, Sorimachi H, Kanda H, Ishikawa Y, Sone S, Nishioka Y, Ohtani N (co-corresponding), Hara E. Ablation of the p16^{INK4a} tumour suppressor reverses ageing phenotypes of *klotho* mice. **Nature Commun** 6, 7035. doi: 10.1038/ncomms8035 (2015)

5.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

1.

発 明 者:原 英二、大谷直子、吉本 真、羅 智文

発 明 の 名 称: 食品成分及び食品組成物のスクリーニング方法

出 願 人: 公益財団法人 がん研究会

出 願 日: 2013.2.12

出 願 番 号: PCT/JP2014/053047

公開番号:WO 2014126043 A1

2.

発 明 者:原 英二、大谷直子、吉本 真、羅 智文

発 明 の 名 称: 発がんリスクの検査方法

出 願 人: 公益財団法人 がん研究会

出 願 日: 2013.2.12

出 願 番 号: PCT/JP2014/053048

公開番号:WO2014126044 A1

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表:

1. Ohtani N, Hara E. Obesity-induced Gut Microbial Metabolite, DCA, Promotes Liver Cancer Through Senescence Secretome. *Keystone Symposia: Gut Microbiota Modulation of Host Physiology: The Search for Mechanism*. March 2, 2015 Keystone USA (招待講演)

2. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Eiji Hara. The role of gut microbiota in obesity-associated hepatic carcinogenesis. *The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Symposium : Gut Microbiota on the Host Physiology and Pathology*, November 25, 2014 Yokohama, Japan (招待講演)

3. Naoko Ohtani. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence-associated secretome. *The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014*, October 21, 2014. Tokyo, Japan(招待講演)

4. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Hiroaki Kanda, Seidai Sato, Yuichi Ishikawa & Eiji Hara. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer via senescence secretome. Welcome Trust scientific conference. Cell Senescence in Cancer and Aging, July 22, 2013, Cambridge, UK (一般演題、口頭発表に選出)

5. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Hiroaki Kanda, Seidai Sato, Yuichi Ishikawa & Eiji Hara. Senescence-Associated Secretory Phenotypes (SASPs) Promote Obesity Associated Hepatocarcinogenesis. Keystone Symposia Aging and Diseases of Aging, October 25, 2012 Tokyo, Japan (一般演題、口頭発表に選出)

受賞:

第 19 回 日本女性科学者の会 奨励賞 受賞 (2014.6.22)

プレスリリース:

肥満に伴う腸内細菌の変化が肝がんの発症を促進する(2013.6.27)

公益財団法人がん研究会, 科学技術振興 (JST) 共同発表

論文名: Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer via senescence secretome. Nature 499, 97-101 (2013)