

細胞老化と細胞老化随伴分泌現象 SASP : その誘導機構と生体における役割

大谷 直子

Citation	大阪市医学会雑誌.
Issue Date	2017-12-25
Type	Journal Article
Textversion	Publisher
Right	© 大阪市医学会. © Osaka City Medical Association. Osaka City Medical Association. https://osakashi-igakukai.com/ .

Placed on: Osaka City University Repository

細胞老化と細胞老化随伴分泌現象 SASP

—その誘導機構と生体における役割—

大 谷 直 子

大阪市立大学大学院医学研究科 病態生理学

Cellular Senescence and Senescence-associated Secretory Phenotype (SASP): The Induction Mechanism and Its Role *In Vivo*

Naoko Ohtani

(Department of Pathophysiology, Osaka City University Graduate School of Medicine)

要 約

細胞老化とは強い DNA 損傷を被った細胞で生体防御機構として作動する不可逆的細胞増殖停止状態である。しかし、細胞老化を起こしても、細胞の代謝自体は活発であり、長く生存し続ける場合がある。そのような老化細胞から多くの分泌タンパク質が産生される現象が発見され、細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype; SASP) と呼ばれている。生体においては、SASP 因子が組織修復などの生理作用に関係する一方で、組織微小環境では、がんの進展などの様々な不利益な病態を引き起こすこともわかってきた。また、自然免疫のマシナリーを介する SASP の誘導機構も近年明らかになりつつある。今後、SASP の分子機構の詳細を明らかにし、制御することで、がんや老化関連疾患の予防、ひいては健康長寿の実現につながる可能性がある。

Key Word: 細胞老化, 細胞老化随伴分泌現象, 自然免疫

1. はじめに

細胞老化とはどのような現象なのであろうか。「細胞が老化する」と記載されるが、現象としては「不可逆的細胞増殖停止」状態である。しかし細胞の代謝自体は活発であり、細胞種によっては、老化細胞はなかなか死滅せず長く生存し続けるものがある。細胞老化という現象はもともと 60 年ほど前にアメリカ人研究者、ヘイフリックにより提唱された¹⁾。ヒトの皮膚などに由来する体細胞を培養容器のなかで継代培養していくと、はじめのうちは良く増殖するが、ある一定の回数分裂増殖を繰り返したのちは、細胞は増殖を止め、それ以降はどのような増殖刺激を与えても、決して増殖しなくなる。この状態を細胞老化と呼ぶ。近年、この細胞老化にともなって、炎症性サイトカインや増殖因子など、様々な分泌タンパク質が産生される「細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype; SASP)」と呼ばれる現象が起こることがわかってきた²⁾。細胞老化は個体老化に関係し、SASP は様々な病態にも関係することから、近年、細胞老化という現象

が注目されている。

2. 細胞老化の誘導機構

ヒトの体細胞を用いて継代を繰り返したのち誘導される不可逆的増殖停止状態を細胞老化と呼ぶ。それ以上決して細胞分裂できないことから、このようにして誘導された細胞老化は分裂寿命と呼ばれることもある。この分裂寿命により細胞老化が生じるメカニズムは、ヒトの体細胞におけるテロメラーゼ活性の低さに起因すると考えられている。ヒトの細胞の場合、テロメラーゼ活性が低いために、細胞分裂ごとに染色体末端に存在するテロメア領域が短小化していく。テロメア領域が短くなりすぎると、DNA 損傷シグナルが活性化し、細胞増殖を止めると考えられている。一方、がん細胞はこのような細胞老化を示すことなく、永久に分裂増殖可能であるから、細胞老化は本来細胞に備わったがん抑制機構と考えることができる。興味深いことに、テロメラーゼ活性が高く、テロメアの長さもヒトの 4 倍ほどであるマウスの胎仔性線維芽細胞 (mouse embryonic

fibroblast; MEF) においても、継代により細胞老化が誘導される。MEF を通常の 20% O₂ 下で継代すると、ヒトの線維芽細胞を継代した場合と同様に、数回継代した後に細胞の増殖が停止し、細胞老化が誘導される。この現象は、培養条件が 20% O₂ の条件で培養すると生じるが、生体内の環境に近い 3% ~ 5% O₂ の条件下で培養するとほとんど増殖停止は起こらない^{3,4)}。すなわちマウスの線維芽細胞の場合、酸化ストレスにより、不可逆的細胞増殖停止、細胞老化が誘導されたことになる。実はヒトの細胞においても、細胞分裂によりテロメアが短くならなくても、酸化ストレスやがん遺伝子の活性化による過剰複製など、強い DNA 損傷が生じる状況下では、細胞は急速に分裂増殖を止め、細胞老化が誘導される。つまり、言い換えると、細胞老化は発がんの危険性のある強い DNA 損傷が加わった場合に、細胞周期チェックポイント機構が強く活性化され、誘導される発がん防御機構と考えることができる。

筆者らのグループは細胞老化の誘導因子 p16 や p21 の発現変化をマウスの生体で可視化できるルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたインビボ・イメージングマウスを開発した^{5,6)}。生体内でも DNA 損傷にともない p21 の発現は上昇し、p16 の発現は加齢にともない顕著に上昇することがわかった。このことから加齢個体では細胞老化をおこした細胞が増えており、p16 の発現上昇が顕著であった臓器では、DNA 損傷マーカーが多く蓄積し、やはり細胞老化が DNA 損傷にともなう現象であることが確認できた⁶⁾。加齢に伴い p16 が高発現する細胞は、間質細胞、上皮細胞ともに認められ、今後それらの及ぼす影響について詳細な解析が待たれる。近年、p16 や p21 と遺伝子座を共有する ARF 遺伝子の高発現細胞を指標に老化細胞を除去できる遺伝子改変マウスが複数報告された⁷⁻⁹⁾。老化細胞を除去したマウスはいずれも、老化表現型が軽減されていた。最近では、老化細胞除去 (senolysis) に関する研究がさかんに行われている。また SASP を軽減する化合物のひとつも報告され、それはクロマチンのリモデリングに関する BRD4 の阻害剤であることが示された¹⁰⁾。

細胞老化の誘導の分子機構として、重要な働きをするのが、サイクリン依存性キナーゼインヒビター、p16 と p21 である。強い DNA 損傷シグナルが活性化すると、まず、転写因子 p53 が安定化し、その標的遺伝子である p21 が発現誘導される。DNA 損傷シグナルがさらに強く持続すると、p53 とは異なる経路で Ets ファミリー転写因子等により p16 が発現誘導される。このようにして、発現誘導された p16 と p21 は協調して、細胞周期のストッパーである RB タンパク質を強く活性化し、その結果、不可逆的細胞増殖停止状態である細胞老化が誘導される。p53 や p16 などはヒトのがんの半数以上で失活しており、細胞老化を誘導する経路が、ヒトのがん抑制に重要であることが

わかる。

3. 細胞老化随伴分泌現象 (SASP) とは

このように重要ながん抑制機構として作動する細胞老化であるが、アポトーシスと違って、DNA 損傷を被った異常な細胞が細胞死し、排除されるわけではなく、増殖はしないものの老化細胞は長く生き続けることがわかっている。実は最近、細胞老化した細胞から、様々な分泌タンパク質が産生されることが明らかになり、その現象は細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype; SASP) と呼ばれる (図 1)。その分泌タンパク質は、IL6 (Interleukin 6) などの炎症性サイトカイン、GRO α (growth-regulated alpha protein) などのケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素 (matrix metalloproteinases; MMPs) やエラスターゼなどのプロテアーゼ類、VEGF (vascular endothelial growth factor) や PDGF (platelet-derived growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) などの増殖因子などが知られており、多岐にわたっている^{11,12)}。SASP 因子はパラクライン的に自己以外の細胞に作用して、周囲の細胞の細胞老化を誘導したり、オートクライン的に働き、自己の細胞老化をより強化することも示されている¹³⁾。

4. SASP の誘導機構

では、なぜ細胞老化を起こすと、このように多くの分泌タンパク質が産生されるようになるのであろうか? 転写因子 NF κ B¹⁴⁾ や C/EBP¹⁵⁾, GATA4¹⁶⁾ 等の転写因子が SASP の誘導に関わっていることが示されたが、我々は SASP 因子の発現誘導は、エピジェネティックに制御されていることを見出した。細胞老化を起こすと、ヒストン H3 のジメチル化酵素である, G9a, GLP が APC/cdh1 という E3 リガーゼによりタンパク分解を受けるが、これにより、ヒストン H3 のジメチル化レベルが著しく減少し、クロマチンが開くことによって、多くの SASP 因子の発現が一度に誘導されることが明らかになった¹⁷⁾。

また、SASP 現象において、一度に多くの炎症性物質が産生される機構として、自然免疫レセプターの関与が示されている。細胞老化は多くの場合、DNA 損傷に伴い誘導されるが、DNA センサーのひとつとして同定された cGAS-STING 経路が、細胞老化に伴うサイトカイン産生を促す主要な経路であることが、最近、複数の論文で示された¹⁸⁻²⁰⁾。もともと cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) は、ウイルスなど細胞質内に侵入した DNA を認識する自然免疫レセプターとして発見された。興味深いことに cGAS は、GMP と AMP または同一の核酸で構成される環状ジヌクレオチドの合成を触媒し、この環状ジヌクレオチドが STING (stimulator of interferon genes) と呼ばれるタ

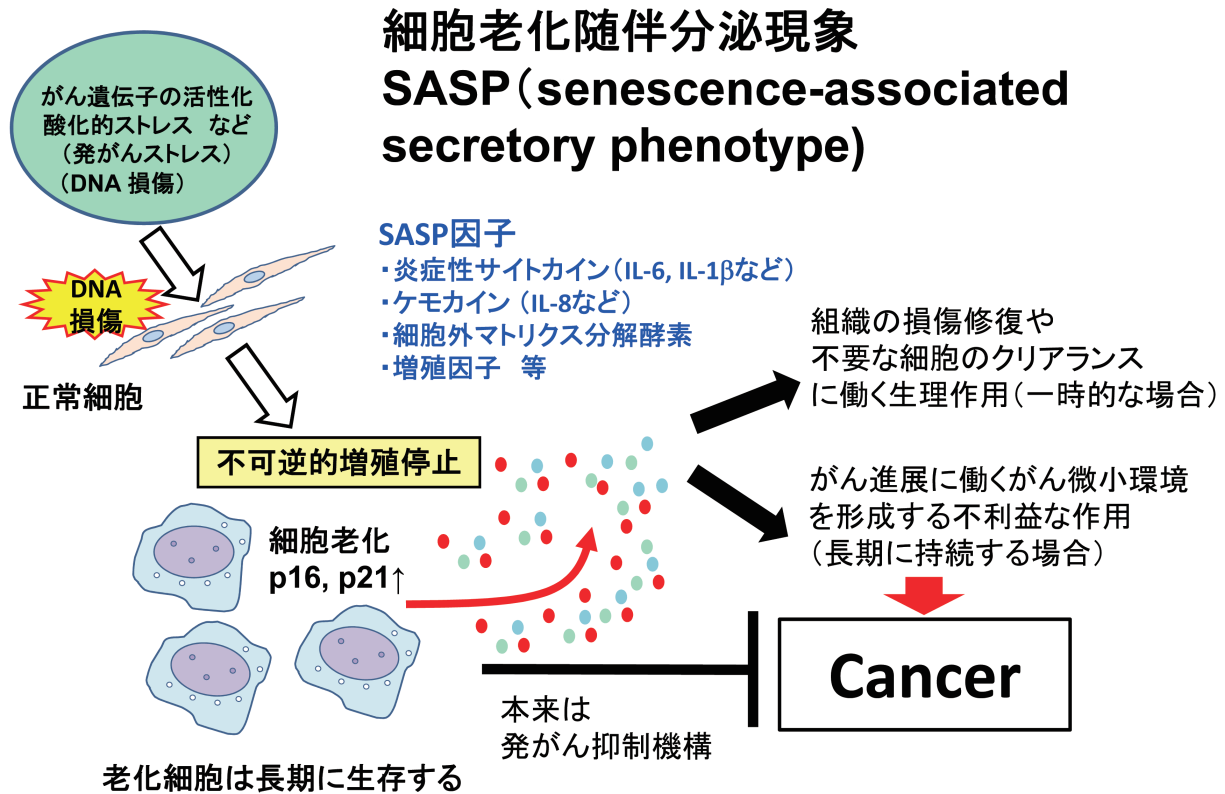


図1 細胞老化随伴分泌現象 SASP (senescence-associated secretory phenotype). 正常細胞が強い DNA 損傷を受けると、アポトーシスにより細胞は自ら死滅するか、細胞老化が誘導され不可逆的細胞増殖停止が起こる。これらは DNA 損傷を被った異常細胞が増えないようにするための生体防御機構である。しかし、長く生き残った老化細胞から、炎症性サイトカインなど様々な分泌因子が放出されることが最近明らかになり、この現象は細胞老化随伴分泌現象、SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) と呼ばれている。SASP 因子は損傷組織の修復等に働く一方で、SASP が長期に続く場合、発がんに促進的に働く場合があることが知られている (図は筆者作成)。

ンパク質に認識され、STING が活性化し、I 型インターフェロンの産生シグナルを活性化する (図2)。細胞老化が生じると、細胞老化にともない増加する DNA 断片により cGAS が活性化するが、最近その機構が報告された。細胞老化に伴い、核膜の裏打ちタンパク質のひとつ、ラミン B1 の発現が減少することが知られている。そのため、核内からクロマチンが細胞質に流出し、その DNA 断片が cGAS に認識され、I 型インターフェロンが産生されることが示された²⁰⁾。また、DNA 損傷を伴う分裂期に生じる核からちぎれたような micro nuclei も cGAS によって認識され、cGAS-STING 経路が活性化されることが示された^{18,19)}。こうして、分泌されるサイトカインはパラクライン的に作用し、免疫監視機構を活性化することが報告された^{18,19)}。また、筆者らは高脂肪食摂取マウスに発生する肝がん微小環境では、肥満により増加するグラム陽性腸内細菌の細胞壁成分、リポタイコ酸が、肝臓に運ばれ、肝星細胞に発現する自然免疫レセプター、TLR2 (toll-like receptor 2) を介して SASP 因子の産生を促進することを見出した²¹⁾。このように多くのサイトカイン産生を含む SASP 現象は、自然免疫レセプターを介する作用である可

能性が示唆されている。しかし、サイトカインやケモカイン以外の増殖因子やプロテアーゼなどが、どのような機構で過剰産生されるのかについては、十分にわかっておらず、今後の研究成果が待たれるところである。

5. SASP の生体における役割① -有益な作用-

では、SASP はどのような作用を生体に及ぼすのであろうか。SASP 現象は生体でも生じることが知られており、生体にとって有益な作用があるからこそ生じると考えられる。そのひとつは、DNA 損傷により細胞老化した細胞を除去するために、免疫細胞を遊走させ、免疫監視機構を活性化するのに有効であると考えられる^{22,23)}。また、Campisi らのグループは損傷皮膚組織の修復時に、一時的に皮下に存在する線維芽細胞で SASP が生じることを示した²⁴⁾。SASP 因子には炎症性サイトカインやケモカインが含まれる。それにより皮膚損傷時には免疫細胞が集まり、傷害を受けた組織の細胞のクリアランスを行う。同時に、老化した線維芽細胞は増殖因子を産生し、皮膚前駆細胞を増殖分化させ、新しい皮膚が作られる。組織修復が完了するころには、SASP を起こしていた老化細胞はクリアランスされ

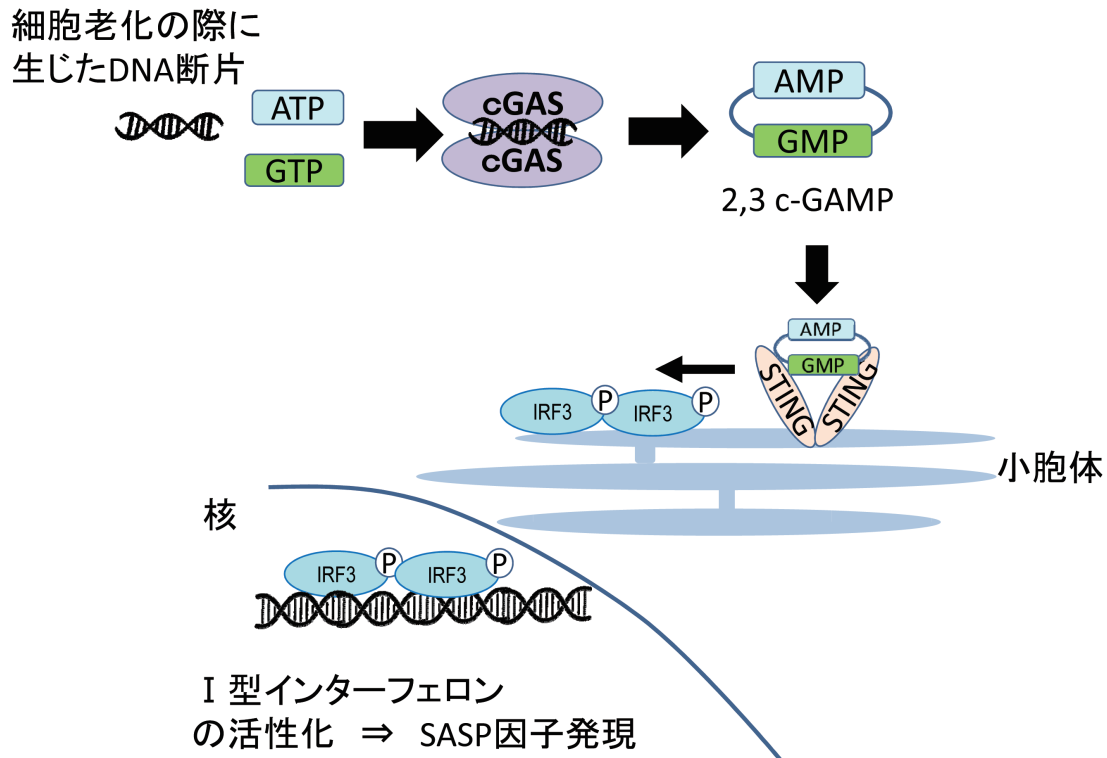


図2 SASP (senescence-associated secretory phenotype) の誘導機構。細胞老化の誘因となる DNA 損傷の際に生じる DNA 断片が cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) に認識され、c-GAMP を形成する。c-GAMP は STING に認識され、IRF3 経路を活性化し、I 型インターフェロンの誘導を介して、SASP 因子を誘導する。

消失する。このようにして、皮膚の損傷治癒過程に SASP が重要であることが示された。また、最近、Serrano らのグループは老化細胞由来の SASP 因子が、周囲の細胞のリプログラミングを促し、細胞を脱分化させる可能性を示した²⁵⁾。

6. SASP の生体における役割② -不利益な作用-

一方、生体に対する SASP の悪い作用についてはどうであろうか？ SASP が有害な作用を起こす場合、SASP は一時的に起こるのではなく持続的である傾向がある。卵巣がん²⁶⁾や前立腺がん²⁷⁾のがん微小環境におけるがん細胞の育成を助長する作用がある線維芽細胞、いわゆる CAF (cancer-associated fibroblast) で、がんに促進的にはたらく SASP が生じているという報告がある。筆者らは高脂肪食摂取に伴い生じる肥満関連肝がんのがん微小環境における肝星細胞において、SASP が生じていることを見出した²⁸⁾。さらに肝星細胞が細胞老化を生じる原因を調べたところ、興味深いことに、高脂肪食により増加する腸内細菌による代謝産物である二次胆汁酸の一種デオキシコール酸が、腸から吸収され肝臓に運ばれて、肝星細胞の DNA 損傷を誘発し細胞老化を起こすことがわかった。一方、グラム陽性菌を標的とする抗生剤、バンコマイシンを予備的に投与しておくと、肝がんの発症が予防できる。逆に、抗

生剤を投与し、肝がんの発症を抑制できる条件下で、デオキシコール酸を経口投与すると、著しく肝がんが発生することがわかり、デオキシコール酸が肝癌発症のリスク因子のひとつであることが明らかになった²⁸⁾。筆者らは肥満関連肝がんの進展に関わる肝星細胞から分泌される SASP 因子として、IL-1 β を同定した²⁸⁾。また、前述したように筆者らは SASP 因子の発現誘導メカニズムとして、肝星細胞では高脂肪食摂取により増加するグラム陽性菌の細胞壁成分、リポタイコ酸が TLR2 を介して SASP 因子としての炎症シグナルを惹起することを示した²¹⁾。リポタイコ酸-TLR2 の経路を介して、SASP 因子だけでなく、シクロオキシゲナーゼ 2 (cyclooxygenase-2; COX-2) も著しく発現誘導されており、肥満関連肝がん微小環境では COX 経路によるアラキドン酸の代謝物、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) が過剰産生されていることが明らかになった。プロスタグランジン E₂ は、EP4 レセプターを介して免疫細胞に作用して抗腫瘍免疫を抑制し、その結果、肝がんが進展していくことが示された。興味深いことに、COX-2 と PGE₂ の過剰産生はヒトの非アルコール性脂肪性肝炎に伴う肝癌の一部でも認められた²¹⁾。このように、SASP 因子として、脂質メディエーターが産生され、がん微小環境の形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。

7. おわりに

これまで述べてきたように、細胞老化はがん抑制機構として重要であるのは間違いない事実であるが、アポトーシス細胞と違って細胞老化した細胞はすぐには死滅せず、長く生き残るものがある。クリアランスされず生き残った老化細胞は、SASP現象を生じ、生体にとって不利益な様々な副作用をもたらす。SASP因子として、多くの分泌タンパク質が産生されるが、今回筆者らは脂質メディエーターの一種も細胞老化にともない、SASP因子として、産生されることを見出した²¹⁾。最近の研究では、細胞老化に伴い、エクソソーム（細胞外小胞）が多く分泌されることも報告されている。その小胞内にはマイクロRNAやDNA、タンパク質などが存在し、それがパラクライン的に細胞外に分配される。多くの細胞でエクソソームが分泌されるが、特に老化細胞由来のエクソソームには二本鎖DNAが多く含まれることが示された²⁹⁾。DNA損傷が細胞老化の誘因であるが、その際に生じた不要なDNAがエクソソームにより排出されるものと考えられ、それが、cGAS-STING経路を活性化する可能性がある²⁹⁾。筆者らはがん微小環境における線維芽細胞を中心とした細胞老化とSASPに着目しているが、SASP因子により、組織微小環境でどのような細胞間ネットワークの変化が生じるのか、今後、組織全体を見据えて調べていく必要がある。SASPの分子機構の詳細を明らかにし、それを制御することで、将来、がんや老化関連疾患の予防、ひいては健康長寿の実現につながる可能性がある。

文 献

- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
- Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer Sci* 2013;104:525-530.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003;5:741-747.
- Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res* 2010;70:9381-9390.
- Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, et al. Visualizing the dynamics of p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15034-15039.
- Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, et al. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol* 2009;186:393-407.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011;479:232-236.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016;530:184-189.
- Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, et al. Elimination of p19^{ARF}-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight* 2016;1:e87732.
- Tasdemir N, Banito A, Roe JS, et al. BRD4 connects enhancer remodeling to senescence immune surveillance. *Cancer Discov* 2016;6:612-629.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011;192:547-556.
- Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:482-496.
- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013;15:978-990.
- Chien Y, Scuoppo C, Wang X, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 2011;25:2125-2136.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008;133:1019-1031.
- Kang C, Xu Q, Martin TD, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 2015;349:aaa5612.
- Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, et al. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. *Mol Cell* 2012;45:123-131.
- Harding SM, Benci JL, Irianto J, et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* 2017;548:466-470.
- Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* 2017;548:461-465.
- Glück S, Guey B, Gulen MF, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* 2017;19:1061-1070.
- Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through PGE₂-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov* 2017;7:522-538.
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008;134:657-667.
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer

- development. *Nature* 2011;479:547-551.
- 24) Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 2014;31:722-733.
- 25) Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 2016;354:aaf4445.
- 26) Yang G, Rosen DG, Zhang Z, et al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16472-16477.
- 27) Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* 2015;17:1049-1061.
- 28) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013;499:97-101.
- 29) Takahashi A, Okada R, Nagao K, et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 2017;8:15287.