

細胞老化と慢性炎症

Cellular senescence and chronic inflammation

山越 貴水

要約

ヒトの正常な体細胞には分裂可能回数に限界がある。1961年にHayflickらはヒトの体細胞を継代培養することでこの分裂限界の存在を発見した。この分裂限界に向かって進行する細胞の変化は「細胞老化」と呼ばれ、古くから個体老化やがん抑制の基礎機構として働いている可能性が指摘されてきた。しかし、アポトーシスとは異なり、細胞老化を起こしても細胞が死滅するわけではないので、細胞老化を起こした老化細胞が長期に渡り生体内に存在し続けることが予想される。近年、細胞老化を起こした細胞から、炎症作用や発がん促進作用を有する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などの様々な因子が分泌されSenescence-associated secretory phenotype (SASP)と呼ばれる現象を起こすことが明らかになった。このため、加齢とともに生体内に老化細胞が増えると、老化細胞から分泌されるSASP因子を介して周囲の組織に慢性炎症や発がんが引き起こされていると考えられる。細胞老化はがん抑制と発がん促進の両方に働いていると考えられる。

Key words 細胞老化, SASP, がん

(日老医誌 2016; 53: 88-94)

細胞老化

哺乳類の正常な組織から体細胞を取り出し培養皿へ移して培養すると、はじめのうちは良く増殖するが、ある一定の回数、細胞分裂を繰り返した後に分裂限界(分裂寿命)を迎えて細胞分裂を不可逆的に停止する(図1)¹⁾²⁾。この現象は細胞老化と呼ばれ³⁾、現在からおよそ50年前にHayflickによって発見された。細胞老化は、正常細胞が必要以上に細胞分裂を繰り返して癌細胞へと形質転換することを防ぐ、癌抑制機構として働いているのではないかと古くから考えられてきた。細胞老化が起こる原因の一つは、ヒトの場合、生殖細胞を除く体細胞の多くで、染色体末端を保護するテロメアDNAを複製する酵素(テロメラーゼ)が殆ど発現していないことにある⁴⁾。テロメラーゼを発現していない細胞が細胞分裂を繰り返すと、テロメアの

短小化が起き、染色体末端を保護できなくなることでDNAダメージ応答(DDR)が引き起こされ、これによりp53-p21経路やp16-RB経路の増殖抑制因子群が活性化されることで細胞分裂が不可逆的に停止すると考えられる(図2)⁵⁾⁶⁾。

しかし近年、分裂限界をまだ迎えていない細胞においても、*in vitro*での不適切な培養環境による培養ストレスや癌遺伝子の活性化による過剰増殖のような様々な状況において、DNAダメージシグナルを発生させる刺激により、急速に細胞老化様の増殖停止が起こることも示され、細胞老化はテロメアの短小化以外の原因でも誘導されることが明らかになってきた(図1)⁷⁾。興味深いことに、マウスなどげっ歯類の体細胞では、もともとテロメアが非常に長いうえテロメラーゼ活性も有するため、細胞分裂を繰り返してもテロメアの短小化は起こらない。しかし、それにも拘らず継

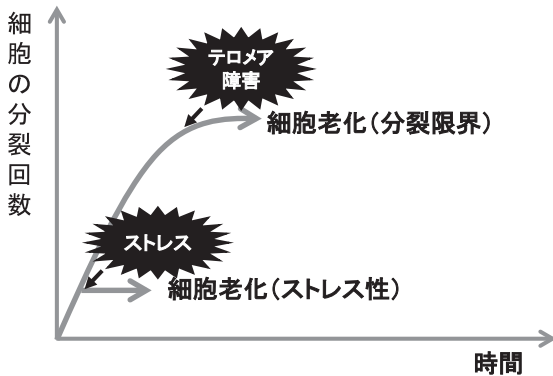


図1 分裂限界による細胞老化とストレス性細胞老化

ヒトの正常な体細胞は無限に増殖できるわけではなく、一定の回数分裂を繰り返した後分裂寿命を迎えて細胞増殖を不可逆的に停止する(テロメア長の短小化による細胞老化)。また、様々な発癌ストレスが生じると細胞分裂を繰り返さなくても速やかに細胞老化と類似の不可逆的な増殖停止が起こる(発癌ストレスによる細胞老化)。

代培養を繰り返すと細胞老化を起こすことが知られている。このことは細胞老化がテロメアの短小化以外のストレスによっても誘導されることを裏付けており、このような様々な細胞内外のストレスにより生じる細胞老化は、stress-induced senescence (SIS) または Oncogene-induced senescence (OIS) と呼ばれている。以上のことから、細胞老化は様々な原因により正常細胞に修復不可能な DNA ダメージが生じることで細胞周期チェックポイント機構が恒常的に活性化されるために起こる現象であり、アポトーシス同様、危険な細胞の増殖を阻止する生体防御機構として機能していると考えられる(図2)。

細胞老化のバイオマーカーと誘導・維持機構

分裂限界と SIS または OIS のふたつの細胞老化が

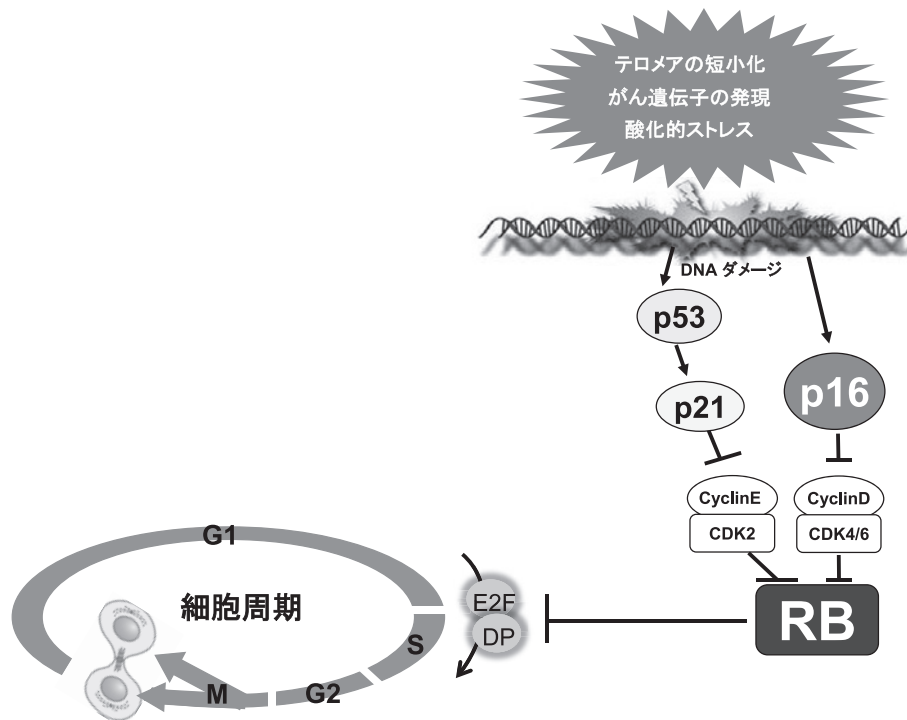


図2 細胞老化の誘導機構

テロメアの短小化やがん遺伝子の活性化、過度な酸化ストレスなど発がんの危険性がある修復不可能な DNA ダメージが生じると CDK インヒビターである p16 と p21 の発現レベルが上昇し、RB 蛋白質を恒常的に活性化することにより、細胞周期の G1 期から S 期への進行を阻害する。

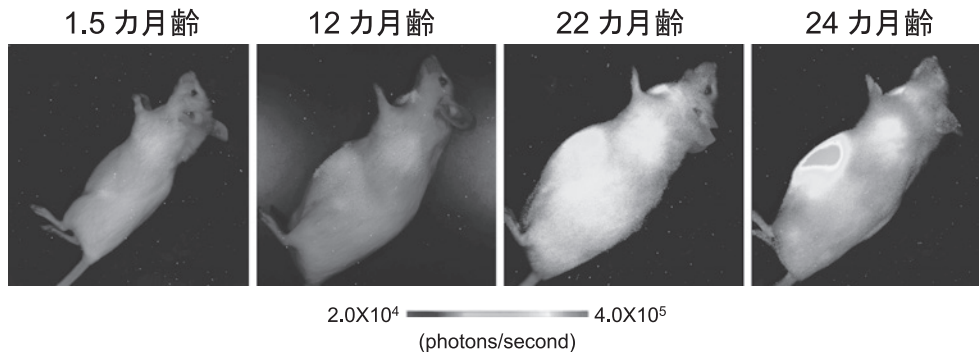
p16遺伝子発現の*in vivo*イメージング

図3 加齢の過程での p16 遺伝子発現動態
加齢の過程での p16 遺伝子発現のバイオルミネッセンス *in vivo* イメージング。

誘導される際の共通した現象として、不可逆的な細胞周期停止、SA- β -gal 活性の亢進、細胞の巨大化・扁平化及び空胞変性が観察されるだけでなく、DNAダメージシグナルや p53-p21 経路、p16-RB 経路の活性化が生じる。つまり、細胞老化の不可逆的増殖停止は、増殖中の細胞において生じた DNA ダメージに反応し、サイクリン依存性キナーゼ (CDKs) である p16 や p21 の発現レベルが上昇することにある。これらの CDK インヒビターにより RB 蛋白が恒常的に活性化されることにより、細胞周期の G1 期から S 期への進行に必須の転写因子である E2F の転写活性が阻害され細胞周期進行が阻害され停止するために細胞老化が生じると考えられている (図 2)⁸⁾。p16 と p21 は標的とする CDK が異なるため、それぞれ単独では RB 蛋白を活性化させる能力は弱いですが、二つが同時に働くことで、RB 蛋白を恒常的に活性化させ細胞周期の進行を停止させると考えられる。特に p16 は通常、正常細胞では発現レベルが極めて低く殆ど機能していないが、老化細胞では発現レベルが著しく高くなるため、老化細胞を特定するためのマーカーとしても有用である⁶⁾。事実、マウスモデル又はヒトの臨床サンプルを用いた解析から、前癌病変部に p16 を含む幾つかの細胞老化特異的なマーカーが検出されることが報告されている⁹⁾。

細胞老化反応の生体内イメージング

細胞老化の生理機能を解明するには、まず、細胞老化が生体内のどこでいつ起こっているかを明らかにする必要がある。このためには細胞老化特異的なマーカーが必要とされる。現在、細胞老化のマーカーとして最も広く使われているのは SA- β -gal 活性¹⁰⁾であるが、SA- β -gal 活性は休止期の細胞でも上昇するため、必ずしも細胞老化特異的とは言えない¹¹⁾。従って、細胞老化の証明には他の細胞老化マーカーとの併用が必要とされる。

著者らは、細胞老化との関連性が明らかで、より細胞老化に特異性の高いマーカーである p16 遺伝子の発現上昇に着目し、p16 の発現レベルの上昇を指標に生体内で起こる細胞老化反応を可視化 (イメージング) することを試みた¹²⁾。p16 遺伝子の蛋白質コード領域の末端にホタルの発光酵素であるルシフェラーゼをコードする遺伝子を挿入し、p16 とルシフェラーゼの融合蛋白質を発現する遺伝子改変マウスを作製した¹²⁾。このマウスを用いて、p16 遺伝子発現をマウスの生体内でリアルタイムにイメージングすることで、加齢とともに老化細胞が体の様々な部位に蓄積していくことが分かった (図 3)¹²⁾。また、*ras* 遺伝子にがん変異を導入した場合に起こる p16 遺伝子の発現動態及びその誘導機構を解析したところ、活性化型 *ras* の

発現により生じる皮膚の良性パピローマでは、p16 遺伝子の発現レベルが著しく高くなっているために細胞老化が起こっていることが分かった¹²⁾。p16 遺伝子ノックアウトマウスに同様の DMBA/TPA 処理を行うと、パピローマの形成頻度には変化がないが、パピローマから悪性腫瘍へ形質転換する頻度が顕著に増加することから、細胞老化は確かに生体内でがん抑制機構として働いていると考えられる。これらの実験結果は細胞老化が個体老化やがん抑制に深く関わっていることを示している。

更に、著者らは最近、p16 イメージングマウスと p16 の発現を負に制御している Bmi-1 遺伝子を欠損したマウスとを組み合わせた解析により、ポリコム蛋白質 Bmi-1 が唾液腺の一つである顎下腺で機能しており、加齢過程では Bmi-1/p16 制御経路が崩れ顎下腺の恒常性が破綻することを見出した¹³⁾。老化に伴う Bmi-1 機能の低下は組織幹細胞のホメオスタシスの崩壊や組織修復機能の破綻、老化関連疾患の発症に関する可能性のあることから、Bmi-1 経路の下流で働く p16 や細胞老化について理解を深めることが老化関連疾患の予防や治療のための戦略に必要であると考えられる。

細胞老化と慢性炎症

前述のように、著者らは加齢とともにマウスの生体内に老化細胞が蓄積していく様子をインビボイメージングすることに成功した¹²⁾。また、高齢のヒヒの皮膚より採取した細胞は若いヒヒの細胞に比べ p16 の発現及び DNA ダメージシグナルが亢進していることも報告されている¹⁴⁾。これらのことからマウスだけでなく霊長類においても加齢とともに、生体内に老化細胞が蓄積していくと考えられる。では加齢にともない老化細胞が蓄積している高齢者では、なぜ発癌のリスクが高くなるのであろうか？老化細胞は、同様のがん抑制機構であるアポトーシスと異なり、すぐには死滅せず、長期間生存し続ける可能性がある。このため、老化細胞の蓄積と発がんは相関しているかのようにも考えられる。その原因を示唆する老化細胞の性質が近年明らかになってきた。

古くから細胞老化を起こした細胞は、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など炎症や発がん促進作用のある種々の分泌蛋白質を発現することが知られていた。近年、これらの分泌蛋白質はまとめて Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれており (図 4)¹⁵⁾、主に、NF- κ B が活性化されることにより SASP 因子が分泌されることが分かっている¹⁶⁾、著者らは、SASP 因子を誘導する新たなメカニズムを明らかにした。著者らは、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 E3 リガーゼである APC/cdh1 により分解を受けてヒストン 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 因子の発現が誘導されるようになることを見出した¹⁷⁾。

SASP の作用

SASP 因子は多面的な作用を有し、老化を促進したり、がん化を阻害または促進することがこれまでに示されている。例えば、SASP 因子はオートクライン的に働き、CXCR2 やそのリガンド因子により自分自身の細胞老化を強化することが知られている¹⁸⁾。一方で、パラクライン的に周囲の細胞へ作用することも示されている (図 5)。Ras の活性化により OIS を起こした培養細胞は、少なくとも幾つかの IL-1 α 、IL-6、IL-8 や TGF- β のような SASP 因子を分泌し、隣接する周囲の細胞に作用し、細胞老化を誘導することが報告されている。事実、正常細胞を老化細胞と一緒に培養すると、正常細胞において p16 や p21、サイトカイン、ケモカインの発現が上昇し、酸化ストレスや DNA ダメージが誘導される。これらのことは、細胞老化がパラクラインに拡散できることを示唆している¹⁹⁾。

また、SASP は DNA 損傷を受けた細胞で生じることが知られている。その知見に合致するように、組織レベルでも障害を受けた皮膚や肝臓が治癒する過程で繊維芽細胞に一時的に細胞老化が起こり、老化細胞から分泌された SASP 因子が組織内への免疫細胞の遊走を促すことで組織の治癒に役立っていることが示唆された (図 5)²⁰⁾²¹⁾。

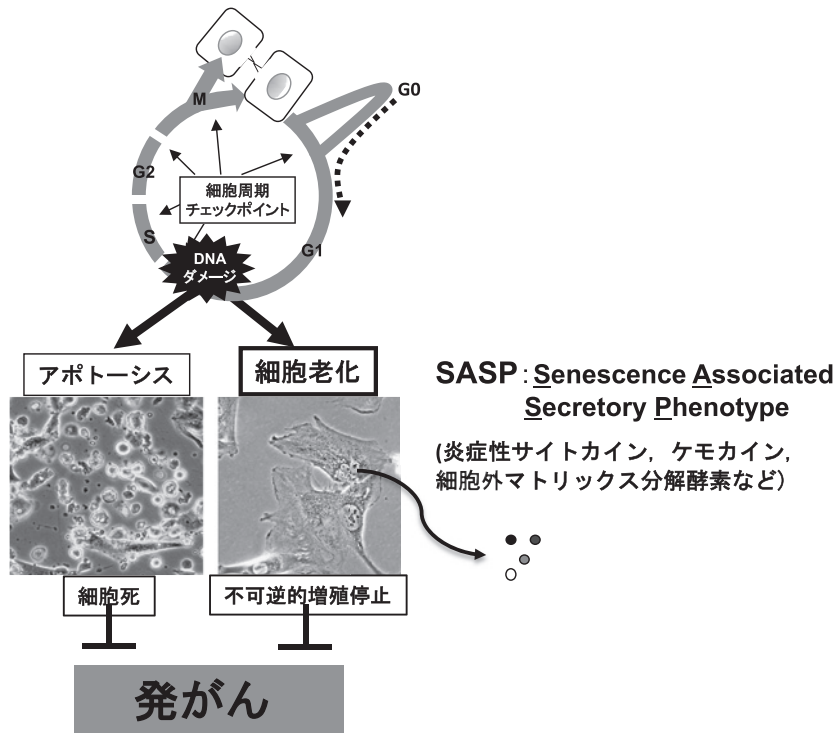


図4 細胞老化とSASP

正常細胞にDNAダメージが生じ細胞老化を起こすと、老化細胞から炎症性サイトカインなどの様々な分泌因子が放出される。この現象はSASPと呼ばれている。

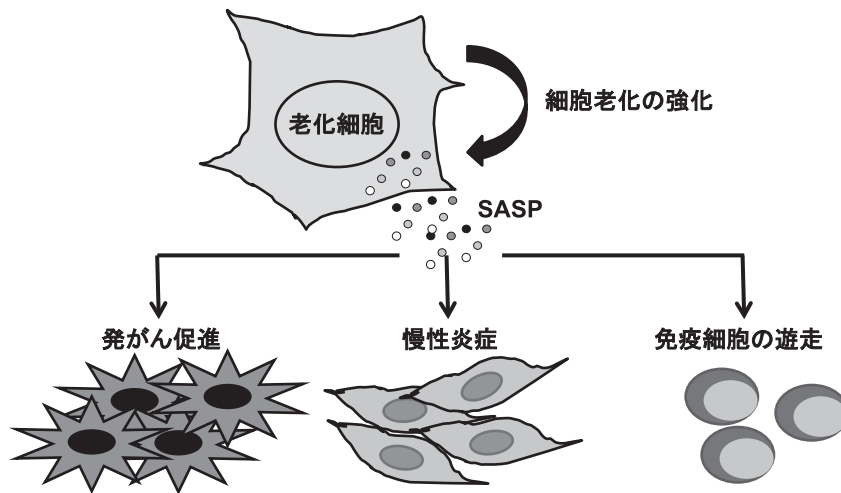


図5 SASPの作用

SASP因子は、パラクライン的に働き周囲の細胞に炎症反応や発がんを引き起こす一方で、免疫細胞の遊走にも関与する。また、オートクライン的に自己細胞に働き、細胞老化を強化する。

しかしながら、パラクラインによるSASPの作用は、細胞老化の促進だけでなく、多くは発がんや炎症

など、生体にとって好ましくない作用のある負の側面をもつ²²⁾。生体で細胞老化が生じそのまま長期に渡り

生体内に生存し蓄積すると、老化細胞から分泌される SASP 因子は周辺組織に炎症や発がんを促進する生体にとっては好ましくない微小環境を提供する因子となる可能性がある (図5)。最近、肥満に伴い肝がんが発症するマウスモデルを用いた研究から、肥満により肝臓の間質細胞の一つである肝星細胞が細胞老化を起こし、その肝星細胞から分泌される SASP 因子を介して周囲に存在する肝実質細胞のがん化が促進されることが明らかになった²³⁾。また、肥満に伴う non-alcoholic steatohepatitis (NASH) を素地とする肝がん患者の約3割において、上記のマウスモデルと同様、がん微小環境における SASP が肝がん促進に重要な役割を担っていることも分かり²³⁾、この報告から明らかにされた発がん促進機構はマウスだけでなくヒトにおいても起こりうる可能性があると考えられる。

おわりに

近年の分子生物学研究の進展により、老化の分子メカニズムが次第に解明されつつある。しかしながら、老化の原因が多岐にわたることや、細胞や組織など環境によって働く因子も大きく異なるなどの理由から老化に共通する原因の特定は非常に困難を極める。しかしながら、細胞老化の発見から50年以上が経ち、細胞老化の分子機構とともに細胞老化の不利益な側面も明らかになってきた。本稿で述べたように、細胞老化はアポトーシスとは異なりすぐに死滅するわけではないため、短期的にはがん抑制機構として機能しているが、長期的には老化細胞が分泌する炎症性サイトカインや細胞外マトリクス分解酵素などの SASP 因子により老化細胞周囲の組織に炎症や発がんを促進する作用も有する。それでは、生体にとって有害と考えられる SASP を取り除く方法はあるのだろうか？最近、老化促進マウスモデルを用いた研究において、老化細胞を除去すると生体機能が向上することが報告された。今後は SASP の制御が、がんの発症を抑制し、高齢化社会における健康寿命の延長に貢献する鍵を握っていくものと考えられる。

著者の COI (Conflict of Interest) 開示：本論文発表内

容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Haff RF, Swim HE: Serial propagation of 3 strains of rabbit fibroblasts; their susceptibility to infection with vaccinia virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 93 (2): 200-204.
- 2) Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- 3) Hayflick L: THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
- 4) Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345 (6274): 458-460.
- 5) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211 (1): 90-98.
- 6) Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G: Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; 16 (3): 859-867.
- 7) Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* 1997; 88 (5): 593-602.
- 8) Gil J, Peters G: Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7 (9): 667-677.
- 9) Sharpless NE, DePinho RA: Cancer: crime and punishment. *Nature* 2005; 436 (7051): 636-637.
- 10) Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (20): 9363-9367.
- 11) Yang NC, Hu ML: The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol* 2005; 40 (10): 813-819.
- 12) Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, et al.: Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol* 2009; 186 (3): 393-407.
- 13) Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, et al.: Dysregulation of the Bmi-1/

- p16 (Ink 4) a pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. *Aging Cell* 2015; 14 (4): 616–624.
- 14) Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM: Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006; 311 (5765): 1257.
 - 15) Rodier F, Campisi J: Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192 (4): 547–556.
 - 16) Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al.: Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 2011; 25 (20): 2125–2136.
 - 17) Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, et al.: DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C (Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell* 2012; 45 (1): 123–131.
 - 18) Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Gujjarro MV, Augert A, Raguz S, et al.: Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 2008; 133 (6): 1006–1018.
 - 19) Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al.: A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013; 15 (8): 978–990.
 - 20) Jun JI, Lau LF: The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* 2010; 12 (7): 676–685.
 - 21) Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al.: Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134 (4): 657–667.
 - 22) Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al.: Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6 (12): 2853–2868.
 - 23) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al.: Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013; 499 (7456): 97–101.