

研究終了報告書

「遊離核酸断片の生体機能の解明と制御法の開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：高橋 暁子

1. 研究のねらい

細胞老化を起こした細胞は加齢と共に体内に蓄積し、様々な炎症性蛋白質を分泌する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) をおこすことで周囲の細胞に炎症を誘発することから、がんや心血管疾患などの加齢性疾患の発症や個体老化の誘導に関与することが知られている。高齢化社会の到来を迎えた現在、SASP を制御する方法の開発は重要な課題である。研究者はこれまでに、SASP 因子のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにし (Takahashi *et al.*, Molecular Cell, 2012)、近年は老化細胞で分泌が亢進している細胞外小胞の解析を行い、細胞外小胞に内包される分子を選択するメカニズムや (Takasugi *et al.*, Nature Commun., 2017)、正常な細胞が細胞質の有害なゲノム DNA 断片やウイルス DNA を細胞外小胞によって細胞外へと分泌する生体防御機構が存在することを明らかにしてきた (Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2017)。さらに研究者は、老化細胞ではゲノム DNA 断片だけではなく、non-coding RNA や RNA/DNA ハイブリッドなどの遊離核酸断片が細胞質に多く蓄積していることから、これらの有害な遊離核酸断片が細胞質 RNA/DNA センサーを介して自然免疫応答を活性化し、SASP を誘導することで加齢性疾患の発症に関与しているのではないかと考えた。さらに細胞外へ分泌された遊離核酸断片を含む細胞外小胞は、他の組織細胞に取り込まれて炎症や細胞老化を誘発することから、遊離核酸断片が全身性に慢性炎症を起因とする加齢性疾患や個体老化の病態を引き起こす危険性があると考えられる。

本研究課題は、(1)遊離核酸断片が産生され細胞質に蓄積する分子メカニズムと(2)細胞内での役割や(3)細胞外へ分泌された際の体内動態と生体機能を解明し、それらが加齢性疾患の発症や個体老化の病態に与える影響を解析することで内因性微粒子の新規生体機能を明らかにし、健康寿命延長のためにその制御を目指すものである。

2. 研究成果

(1) 概要

遊離核酸断片が産生され細胞質に蓄積する分子メカニズムを明らかにするために、まず細胞質のゲノム DNA 断片に着目して解析を行ったところ、老化細胞においては細胞質の DNA 分解酵素である DNase2 と TREX1 (DNase3) の発現レベルが低下することを見出した。そして、細胞質に蓄積したゲノム DNA 断片は、DNA センサー (cGAS-STING) 経路の活性化を介して SASP を誘導する機構が存在することを明らかにした。次にその生体機能を明らかにするために、STING ノックアウトマウスを用いて肥満誘導性の肝がんモデルで実験を行ったところ、肝がんの発症には、DNA 分解酵素の発現低下と DNA センサー経路の活性化による SASP 誘導機構が重要であることを報告した (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2018)。

また、老化細胞で遊離核酸断片を含む細胞外小胞の分泌が亢進する分子メカニズムを明らかにするために、細胞外小胞の生合成に関わる経路の解析を行った。その結果、細胞老化を誘

導するような DNA 損傷応答の継続的な活性化によって、スフィンゴミエリン合成酵素 2 (sphingomyelin synthase 2: SMS2) の発現が低下し、中性スフィンゴミエリナーゼ (neutral sphingomyelinase 2: nSMase2) の発現が上昇することで、老化細胞ではセラミド合成経路が活性化し細胞外小胞の産生と分泌が亢進していることや、細胞外小胞経路によって遊離核酸断片を細胞外へと分泌することで細菌感染による炎症反応や細胞死を抑制し細胞の恒常性維持に働いていることを明らかにした (Hitomi *et al.*, Int. J. Mol. Sci., 2020)。

さらに、老化細胞に選択的に細胞死を誘導することのできる Senolytic Drug のハイスループットスクリーニングを行い、BET ファミリー蛋白の阻害剤がその有望な候補の一つであることを見出し (Wakita *et al.*, Nature Communications, 2020)、Senolytic drug を適切に投与するための診断マーカーとして、老化細胞が分泌する細胞外小胞に含まれる蛋白質の MS 解析を行い複数の候補蛋白質を同定した。

(2) 詳細

遊離核酸断片が産生され細胞質に蓄積する分子メカニズムを明らかにするために、まず若い細胞と老化細胞を用いて抗二本鎖 DNA 抗体 (double stranded DNA: dsDNA) と核膜の LaminB1 の抗体で免疫染色を行ったところ、老化細胞では微小核や出芽核など核の形態異常が観察され、細胞質にゲノム由来の DNA 断片が多く検出された (図1)。細胞質 DNA センサーである cGAS は微小核や出芽核に集積し、DNA と結合することでセカンドメッセンジャーである cGAMP を産生し下流の STING ヘシグナルを伝えることが報告されているので、老化細胞においては細胞質核酸センサー経路が SASP 因子の遺伝子発現に関与しているのではないかと考え、細胞老化を誘導した後に、siRNA を用いて STING もしくは cGAS をノックダウンしたところ、老化細胞で発現が亢進している IL-1 α 、IL-1 β などのさまざまな炎症性蛋白質の遺伝子発現が抑制された。これらの結果は、老化細胞における細胞質核酸センサー経路の活性化が、SASP 誘導に重要な役割を果たすことを示している。

しかし、老化細胞においてはなぜゲノム由来の二本鎖 DNA が細胞質に蓄積しているのか、その分子機構は未知であった。正常な細胞においては、余剰な DNA を分解する酵素群が細胞の恒常性維持に機能していることが知られている。特に細胞質における DNA 分解には、リソソームに局在する DNase2 と細胞質に存在する TREX1 (DNase3) が重要であることが知られている。そこで、これらの DNA 分解酵素に着目して解析を行った。その結果、老化細胞においては DNase2 と TREX1 の両方の蛋白質の発現が著しく低下していることを見出した。さらに、若い細胞において DNase2 と TREX1 をノックダウンすると、細胞質に DNA 断片が蓄積し自然免疫応答がおこり、SASP 因子である IFN- β や CXCL10 の発現が誘導された (図2)。これらの結果をまとめると、正常な細胞においては DNase2 と TREX1 が細胞質に存在するゲノム由来の DNA

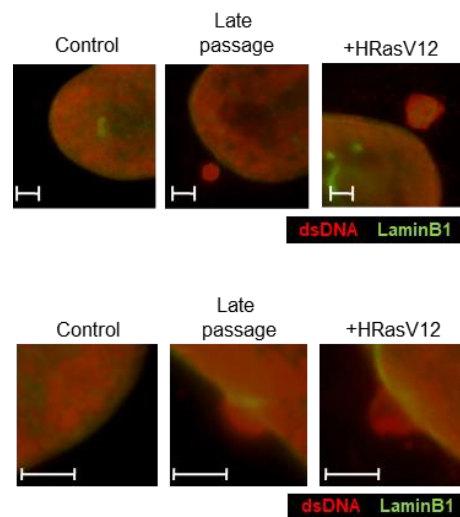


図1. 老化細胞の核形態の観察写真
上段は、micronucleus(微小核)、
下段は Bud(出芽核)を拡大している

を分解し細胞質核酸センサー経路の活性化を防いでいるが、老化細胞においては DNase2 および TREX1 の発現が低下しているためにゲノム由来 DNA が細胞質に蓄積し、cGAS-STING 経路を活性化することで SASP 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

次に、上記の研究結果を *in vivo* で検証するために、SASP が発がんに関わることが証明されている肥満誘導性の肝がんマウスモデルで解析を行った (Yoshimoto *et al.*, Nature, 2013; Loo *et al.*, Cancer Discovery, 2018)。高脂肪食を与えられた肥満マウスでは通常の食餌を与えたマウスと比較して、細胞老化が誘導された肝臓の肝星細胞 (HSC: Hepatic Stellate Cell) における DNase2 と TREX1 の発現レベルが低下し SASP 因子の遺伝子発現が上昇して

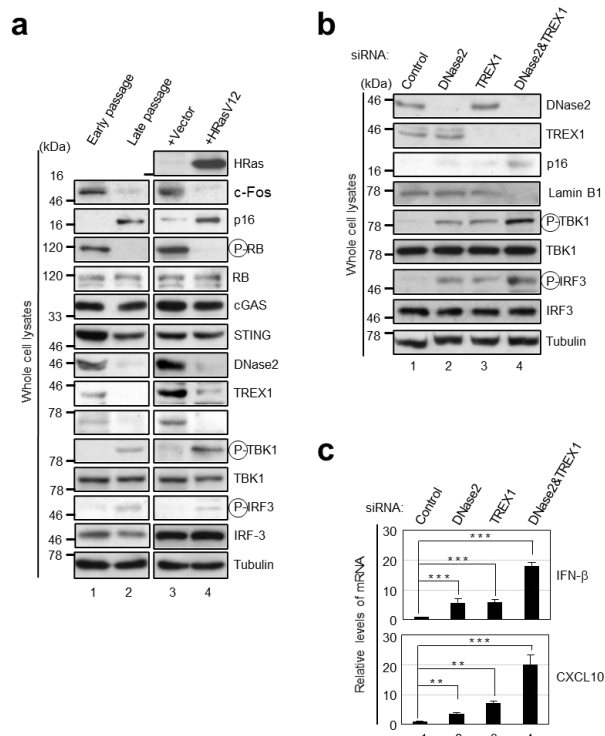


図2. 老化細胞では DNA 分解酵素の発現が低下し自然免疫応答が活性化している

いることを見出した。しかし、DNA センサーである *STING* 遺伝子を欠損したマウスに肥満を誘導した場合には、HSC における SASP 因子の遺伝子発現が大幅に低下し、肝がんの発症頻度も減少することを観察した。これらの結果は、肥満という生体に加わるストレスによって生体内で細胞老化が誘導された場合にも、DNase2 および TREX1 の発現低下により細胞質に遊離核酸断片が蓄積し、cGAS-STING 経路の活性化を介して SASP 因子の遺伝子発現と発がん重要な役割を果たしていることが強く示唆された (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2018) (図3)。

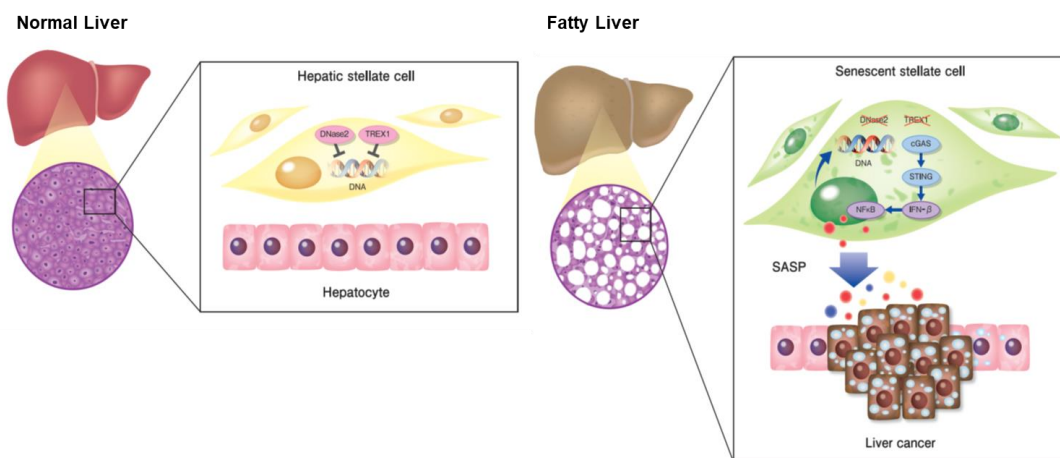


図3. 肥満した肝臓では DNA 分解酵素の発現低下により遊離核酸断片が細胞質に蓄積し cGAS-STING 経路が活性化することで SASP が誘導され肝がんの発症に寄与する

これまで、老化細胞で細胞外小胞の分泌が亢進する分子メカニズムは不明であったので、老化細胞で細胞外小胞の生合成に関わる経路の解析を行った。その結果、細胞老化の誘導に働くDNA損傷応答の継続的な活性化によって、スフィンゴミエリン合成酵素2 (sphingomyelin synthase 2: SMS2)の発現が低下し、中性スフィンゴミエリナーゼ (neutral sphingomyelinase 2: nSMase2)の発現が上昇することで、セラミド合成経路が活性化し細胞外小胞の産生と分泌が亢進していることを見出した。また、DNA損傷応答経路の活性化によってセラミド経路が活性化するとオートファジーによる分解経路も抑制されることから、細胞外小胞経路による細胞質核酸の除去が重要であることが示唆された。研究者は以前、細胞外小胞経路によって遊離核酸

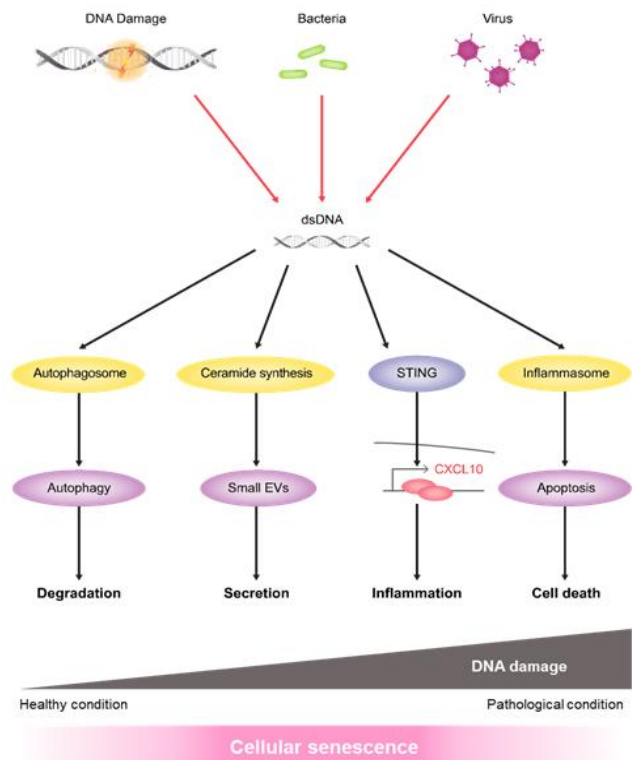


図4. 正常細胞における遊離核酸断片の代謝機構

断片を細胞外へと分泌することが、ウイルス感染に対して抑制的に機能することを報告していたが(Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2017)、細菌感染による炎症反応やインフラマソームの活性化による細胞死誘導に関しても、細胞外小胞経路が遊離核酸断片の細胞外への除去を促すことで細胞の恒常性維持に機能することを明らかにし、正常細胞における遊離核酸断片の代謝機構を報告した(Hitomi *et al.*, Int. J. Mol. Sci., 2020) (図4)。

近年、老化細胞に選択的に細胞死を誘導し生体から除去することを目的とした Senolytic Drug の開発が盛んに進められている。本研究においても阻害剤ライブラリーを用いて老化細胞に特異的に細胞死をもたらす薬剤のハイスループットスクリーニングを行ったところ、BET ファミリー蛋白の阻害剤がその有望な候補の一つであることを見出した(Wakita *et al.*, Nature Commun., 2020)。しかし、Senolytic drug を適切に投与する時期を正確に把握するためには、生体内で老化細胞の存在を正確に診断する必要がある。そこで老化細胞が分泌する細胞外小胞に含まれる蛋白質の MS 解析を行い、老化マーカーとして重要な候補因子を得たので現在解析を進めている。このように本研究から、遊離核酸断片であるゲノムDNA断片が産生され細胞質に蓄積する分子メカニズムを明らかにし、遊離核酸断片による核酸センサー (cGAS-STING 経路)の活性化が生体において炎症とがんの促進に働くことを報告した。さらに老化細胞で細胞外小胞の分泌が亢進する分子機構を明らかにし、細胞外小胞経路が細菌感染に対する防御機構として機能することを報告した。そこで、これらの細胞外微粒子に関する研究から得られた知見をまとめて総説を執筆し発表した(Loo *et al.*, Cancer Science, 2020; Misawa *et al.*, Geriatr. Gerontol. Int., 2020; Tanaka *et al.*, J. Biochem., in press)。

3. 今後の展開

現在、ゲノム DNA 断片以外にも、老化細胞で RNA-DNA ハイブリッドや non-coding RNA が産生される分子機構を明らかにし、論文を投稿中である。また、遊離核酸断片が細胞外小胞へ積み込まれる分子機構や遊離核酸断片を含む細胞外微粒子の生体機能と体内動態を明らかにするために、解析を進めデータを得ているので、近い将来にはそれらの成果を発表する予定である。また、細胞外小胞に含まれる蛋白質の MS 解析から、細胞老化マーカーとなる新規の候補蛋白質を得たので、血液などの生体サンプルから細胞外小胞を回収することで Senolytic Drug を適切に投与する時期を知る診断マーカーの確立を目指す。さらに、本研究の成果から老化細胞が分泌する遊離核酸断片を含む細胞外小胞が、がんの悪性形質を促進させる SASP 因子として機能することを見出したので、将来的に内因性の細胞外微粒子を標的として加齢性疾患の発症や個体老化の表現型を制御できる方策の開発へと繋げたい。

4. 自己評価

これまで、老化細胞でゲノム DNA 断片が蓄積する分子機構は不明であったが、本研究から細胞質 DNA 分解酵素の発現低下がその引き金になることを明らかにし Nature Communications 誌に発表した。さらに、ゲノム DNA が断片化する分子機構や老化細胞特異的な non-coding RNA が細胞外小胞に含まれて働く生体機能等を明らかにして現在論文投稿中であり、遊離核酸断片の産生と蓄積のメカニズム解明という研究目標は達成することができた。さらに、老化細胞で細胞外小胞の分泌が亢進する分子機構を明らかにして論文発表し、残りの研究目標である遊離核酸断片が細胞外小胞に取り込まれる分子メカニズムや、遊離核酸断片を含む細胞外小胞の生体機能と体内動態の解析についても現在までに新しい知見が得られている。COVID-19 による WET 実験と動物実験の停止により、当初計画していた遺伝子改変マウスの解析は断念せざるを得なかったものの、実験計画を変更して目標達成を目指し実験を行った。研究計画全体に大幅な遅れが生じたために、研究期間内に全ての研究成果を論文発表することはできなかったが、引き続き研究を遂行し近い将来に全てのさきがけ研究成果を論文化する予定である。本研究から、正常細胞や老化細胞由来の内在性微粒子の産生機構や生体機能の新たな知見を提供することができた。さらに、本研究の成果により遊離核酸断片が細胞外小胞に積み込まれるメカニズムやその体内動態を知ることにより、今後細胞外微粒子をナノキャリアとして Drug delivery system 等に応用するために有用な情報を提供することが可能である。さらに、細胞外微粒子による細胞老化診断マーカーなど、加齢性疾患の診断や治療法の開発への発展と社会実装が期待される。

本研究期間を通して微粒子領域内のさきがけや CREST の研究者、他の領域のさきがけ研究者など多くの研究者と共同研究を行い、研究分野のネットワークを構築することができた。自分の研究室をスタートしたばかりで五里霧中だった時期に、これまでの研究生活では接点のなかった工学や数理学の研究者と、さきがけ研究を通して出会い交流できたことは、今後の研究生活を続けてゆく上で貴重な財産となった。また、本研究課題以外にもアイデアを出し合ってさきがけ研究者と新たな共同研究を展開しており、異分野融合研究を実現できる機会を得たことは大変に大きな成果である。本さきがけ研究で享受した恩恵を領域にお返すために、細胞外小胞サンプルの領域研究者への提供や、国内外の学会・研究会での招待講演、3報の英文総説と11報の和文総説執筆など、微粒子領域の研究発展と情報発信に努力し、よい人生経験となった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. **Takahashi, A.**, Loo, T.M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G.N., Hara, E. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nature Communications*, 2018, 9, 1249.

正常な細胞では、細胞質に存在する DNA 断片は、DNA 分解酵素によって速やかに除去される生体防御機構が働くが、老化した細胞では DNase2 や TREX1 といった DNA 分解酵素の発現レベルが下がるために細胞質にゲノム DNA 断片が蓄積し、DNA センサー経路(cGAS-STING)の活性化を介して SASP を誘導する新たなメカニズムが存在することを明らかにした。さらに、肥満誘導性の肝がんの発症には、細胞老化による DNA 分解酵素の発現低下と DNA センサー経路の活性化による SASP 誘導機構が重要であることを報告した。

2. Wakita, M., **Takahashi, A.**, Sano, O., Loo, T.M., Imai, Y., Narukawa, M., Iwata, H., Matsudaira, T., Kawamoto, K., Ohtani, N. Hara, E. A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells. *Nature Communications*, 2020, 11, 193.

発がんストレスによって誘導され加齢と共に体内に蓄積する老化細胞に選択的に細胞死を誘導できる薬剤(Senolytic drug)のスクリーニングを行い、BET 阻害剤を同定した。BET ファミリー蛋白を標的とすることでマウスの体内から老化細胞を排除し、がんの発症を予防できることを示した。

3. Hitomi, K., Okada, R., Loo, T.M., Miyata, K. and **Takahashi, A.** DNA damage regulates senescence-associated extracellular vesicle release via the ceramide pathway to prevent excessive inflammatory responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(10), 3720.

老化細胞においては若い正常な細胞に比べて、細胞外小胞の分泌が亢進しているが、その分子機構は不明であった。本研究では老化細胞において DNA 損傷応答によりセラミド合成酵素の遺伝子発現が上昇し、分解酵素の発現が低下することで合成が活性化していること、また細胞外小胞が細菌感染に対するバリアとして機能することを報告した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(特許公開前のもも含む)

(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)

英文総説:

1. Loo, T.M., Miyata, K., Tanaka, Y., and **Takahashi, A.**

Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer.

Cancer Science, 111, 304-311, 2020

2. Misawa, T., Tanaka, Y., Okada, R. and **Takahashi, A.**
Function of small extracellular vesicles secreted from senescent cells as SASP factors.
Geriatrics & Gerontology International., 20(6), 539–546, 2020
3. Tanaka, Y. and **Takahashi, A.**
Senescence-associated extracellular vesicle release plays a role in
Senescence-associated secretory phenotype in age-associated diseases.
J. Biochem. in press

招待講演(国際学会) :

1. **Akiko Takahashi**
American Association for Cancer Research AACR/JCA Joint Session: Exosomes in
Diagnosis and Treatment of Cancer
「The biological function of exosomes secreted from senescent cells in the cancer
microenvironment」
2. **Akiko Takahashi**
Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology International Conference
Symposium: Understanding of Cellular Senescence for Clinical Application
「The biological function of SASP factors in cancer」
3. **Akiko Takahashi**
UKEV FORUM 2020
「Analysis of small extracellular vesicles in aging and cancer」