

研 究 報 告 書
令和3年度：A課題

2023 年 2 月 13 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研 究 施 設 公益財団法人がん研究会がん研究所

住 所 東京都江東区有明 3-8-31

研究者氏名 高橋 暁子

(研究課題)

がんの悪性化に関わる老化C A F s の解析

令和4年 3月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究の背景と目的】

近年、加齢・肥満などの内因性ストレスや放射線・抗がん剤療法などの外因性ストレスによってがん微小環境中の間質細胞に細胞老化が誘導されると、炎症性タンパク質を分泌する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) をおこし、がん関連線維芽細胞 CAFs (Cancer-associated fibroblasts) として機能することが明らかになっている。がん微小環境においては、CAFs の存在ががんの発症や進展、治療抵抗性に関与することや、老化した CAFs が分泌する SASP 因子が予後不良に繋がることが報告されている。そのため、老化した CAFs で炎症性遺伝子群の発現が誘導される分子機構や CAFs から分泌される SASP 因子のプロファイル、また CAFs が細胞死に抵抗性を獲得する分子機構を解明することが必要とされている。

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で、がんの予防や治療を目指した Senolytic Drug の開発が盛んに行われており、抗がん剤との併用療法が奏功することが期待されている。本研究は、がんの発症や進展に関わるがん微小環境中の老化 CAFs を研究対象として、SASP がおこる分子メカニズムや分泌された SASP 因子のプロファイル解析、CAFs の細胞死耐性機構の研究を介して、がん微小環境における CAFs を標的とした新規がん治療法の開発に繋げることを目的として行った。

【研究の方法】

研究代表者は以前、老化した細胞においては細胞質にゲノム DNA 由来の核酸断片が蓄積し細胞質核酸センサーを活性化することで、炎症性 SASP 遺伝子の転写が誘導されることを報告している (Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2018)。そこで、ヒト正常線維芽細胞 (TIG-3, IMR90) に継代培養もしくは活性化型 Ras の過剰発現により細胞老化を誘導する前後で RNA シークエンス解析を行い、SASP 誘導の引き金となる染色体断片化機構の原因因子の探索と、老化 CAFs の細胞死耐性メカニズムの解析を行った。また、ヒト正常線維芽細胞に継代培養もしくは X 線照射によって細胞老化が誘導される前後の細胞培養上清から、細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) を 3 種類の方法 (サイズ排除クロマトグラフィー法、ホスファチジルセリン A フィニティーカラム法、テトラスパニンに対する免疫沈降法) で回収しプロテオーム解析を行い、EVs に含まれる老化マーカーの探索を行った。

【結果】

細胞老化誘導前後のヒト正常線維芽細胞の遺伝子発現解析から、継代培養と活性化型 Ras の過剰発現によって誘導された老化細胞の両方において、ゲノムの安定性の維持に関わる RNA 分解酵素の酵素ユニット RNaseH2a の発現が低下していることを見出した。ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター解析から、RNaseH2a の遺伝子発現制御領域に細胞老化で転写活性が低下する転写因子である E2F ファミリーの結合配列が存在することが明らかとなった。そこで、E2F 結合サイトの欠失・変異体を用いてルシフェラーゼ解析を行い、RNaseH2a の発現誘導に E2F 転写因子結合部位が重要であること、ChIP 解析で E2F1 と E2F3 がこの配列に結合していること、E2F 転写因子の過剰発現で RNaseH2a が発現誘導されることを確認した。これらの結果から、RNaseH2a の遺伝子発現は E2F 転写因子複合体に制御されていることが明らかとなった。RNaseH2 は、ゲノム DNA 中に誤って織り込まれたリボヌクレオチドを分解・除去することで、染色体の安定性を維持することが知られている。老化 CAFs における RNaseH2 活性の低下は、染色体の不安定化とゲノム DNA の断片化を引き起こすことが予測された。そこで、細胞老化を誘導する前後の細胞のゲノム DNA を用いてアルカリ電気泳動を行ったところ、老化細胞のゲノム DNA は顕著に断片化されており、より多くのリボヌクレオチドがゲノム DNA 中に残存していることが示された。RNaseH2a のノックダウンでは染色体の断片化と炎症性 SASP 遺伝子の発現が誘導され、RNaseH2a の過剰発現によって細胞老化を誘導しても細胞質核酸断片の蓄積と SASP 遺伝子誘導が抑制されたことから、RNaseH2a の発現低下が、老化 CAFs における細胞質核酸断片の産生と核酸センサーを介した SASP の誘導に重要であることが明らかとなった。また、大腸がん細胞を用いた実験によって、RNaseH2a の発現低下はマトリクス分解酵素などの SASP 因子の発現上昇を引き起こし、がん細胞の運動能亢進に寄与してしていることが示唆された。大腸がんモデルマウスのオルガノイドを用いた解析からも、がん遺伝子変異の蓄積によるがん細胞の転移能亢進と RNaseH2a の発現低下に

は、逆相関の関係があり、さらに、大腸がん・子宮頸がん・卵巣がんの TCGA データベース解析の結果から、これらのがん組織において E2F1 の発現と RNaseH2a の発現に正の相関があること、RNaseH2a の発現が低い患者群では予後が悪いことが明らかとなった（文献 1）。

細胞老化誘導前後で分泌される細胞外小胞のプロテオミクス解析の主成分分析により、3 種類の回収方法の全てで、正常細胞及び老化細胞から分泌される EVs の主成分が大きく異なることが観察された。また、老化細胞由来 EVs と早老症として知られている Werner 症候群の患者細胞由来の EVs に共通して高発現するタンパク質として ATP6V0D1 と RTN4 を同定した。これら 2 つのタンパク質は、高齢マウスの血清中の EVs にも有意に濃縮されていたことから、新たな老化マーカーとして体内の老化細胞の存在を検出できる可能性が示唆された（文献 2）。

【考察とまとめ】

本研究から、老化 CAFs において細胞質核酸センサーのリガンドとなる核酸断片が産生される分子機構として、RNaseH2a の発現低下が重要であること、さらに RNaseH2a の発現誘導には E2F 転写因子複合体が機能していることが明らかとなった（図）。また本研究から、老化細胞が分泌する SASP 因子の一つである EVs に含まれる ATP6V0D1 と RTN4 が、新しい老化マーカーとして有用である可能性が示された。近年、生体内から老化細胞のみを選択的に除去する Senolytic drug の開発が進められているが、正確に Senolytic drug を投与する時期を判断する方法や、体内の老化細胞除去効果を評価する方法は未だ確立されていない。今後、ヒトの血清中の EVs からこれらの老化マーカーを検出することで、Senolytic drug の適切な投与が可能になることが期待される。さらに、本研究から老化 CAFs の細胞死耐性機構に関しても興味深い知見が得られているので、今後研究を進めることで、老化 CAFs を標的とした新しい治療法の開発へと繋げることを目指している。

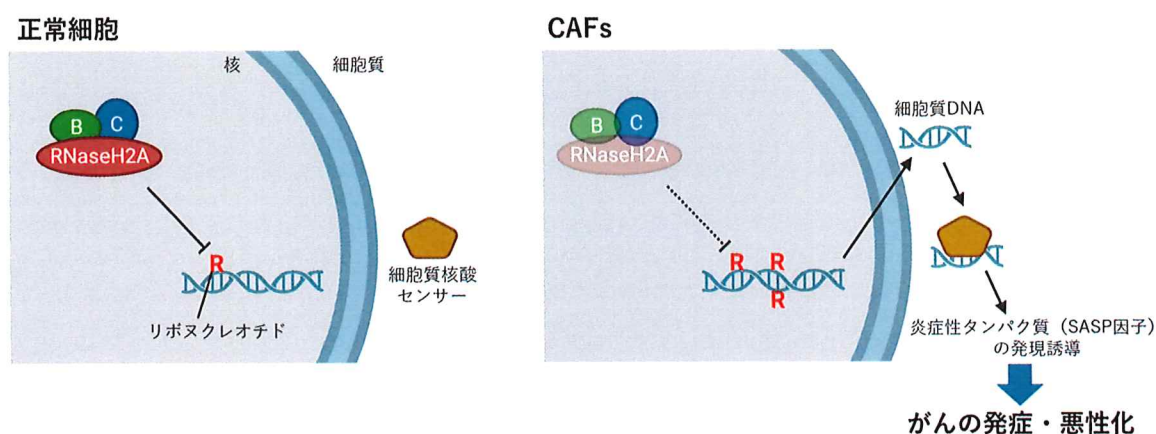


図 RNaseH2a の発現低下による核酸断片産生と SASP 誘導機構の模式図

【発表論文】

1. Sugawara, S., Okada, R., Loo, T.M., Tanaka, H., Miyata, K., Chiba, M., Kawasaki, H., Katoh, K., Kaji, S., Maezawa, Y., Yokote, K., Nakayama, M., Oshima, M., Nagao, K., Obuse, C., Nagayama, S., Nakanishi, A., Kanemaki, MT., Hara, E. & *Takahashi, A.
RNaseH2A downregulation drives chromosomal DNA fragmentation and accumulation of RNA-DNA hybrids in senescent cells.
Communications Biology, 5, 1420, 2022
2. Misawa, T., Hitomi, K., Miyata, K., Tanaka, Y., Fujii, R., Chiba, M., Loo, T.M., Hanyu, A., Kawasaki, H., Kato, H., Maezawa, Y., Yokote, K., Nakamura, A.J., Ueda, K., Yaegashi, N. & *Takahashi, A.
Identification of novel senescent markers in small extracellular vesicles.
International Journal of Molecular Sciences, 24 (3), 2421, 2023