

博士論文

細胞老化に伴うインターフェロン誘導遺伝子の発現制御機構

山上 まり

## 目次

1. 要旨
2. 序文
3. 方法
  - 1) 細胞
  - 2) SA- $\beta$ -gal 染色
  - 3) 試薬
  - 4) Western blotting 法
  - 5) RNA 抽出 cDNA マイクロアレイ RT-PCR 定量
  - 6) 免疫細胞染色
  - 7) 細胞分画タンパク抽出
  - 8) Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の解析
  - 9) レンチウイルストランスダクション
  - 10) プラスミドトランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ
  - 11) 免疫組織染色
  - 12) 免疫沈降
  - 13) ChIP アッセイ
  - 14) 統計解析
  - 15) プライマー

#### 4. 結果

- 1) 複製老化させた NHDF における老化マーカーの発現
- 2) 老化細胞と非老化細胞の遺伝子発現比較
- 3) 老化細胞における ISGF3 のリン酸化の有無の検討
- 4) Werner 症候群での検討
- 5) JAK ノックダウンでの検討
- 6) 肝組織アレイでの検討

#### 5. 考察

#### 6. 結語

#### 7. 引用文献

#### 8. 謝辞

## 略語一覽

IFI27	Interferon alpha-inducible protein 27
IFIT3	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFN	Interferon
IFNR	Interferon receptor
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL6	Interleukin 6
IRF9	Interferon regulatory factor 9
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
ISGs	Interferon-stimulated genes
ISRE	IFN-stimulated response element
JAK1	Janus kinase 1
Mx1	MX dynamin like GTPase 1
Mx2	MX dynamin like GTPase 2
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
OASL	2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction

SA- $\beta$ -gal	Senescence-associated beta-galactosidase
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
shRNA	Short hairpin RNA
SIRT1	Sirtuin 1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
TYK2	Tyrosine kinase 2

## 1. 要旨

インターフェロン誘導遺伝子(Interferon-stimulated genes; ISGs) はウイルス感染などを契機にインターフェロン(IFN) により誘導され、生体の防御反応を惹起する。ヒト皮膚線維芽細胞を用いた本研究で、老化細胞では IFN 非依存的に ISGs が高発現しており、その機序として非リン酸化 STAT1、STAT2 および IRF9 からなる転写因子 ISGF3 が核内に移行し、ISGs の発現を誘導していることを見出した。老化細胞での非リン酸化 STATs による ISGs 高発現は、慢性炎症によってもたらされる老化関連疾患のさらなる病態生理の解明、疾病予防の標的となる可能性がある。

## 2. 序文

我が国は現在、超高齢社会に突入しており、65歳以上の高齢者の割合(高齢化率)は28.1%を占めている。少子高齢化に伴い、高齢者の割合は、今後もしばらく増加し続け、2040年には、高齢化率は35%になると見込まれている。日本に限らず、衛生状況の改善のため、今後世界中で高齢化が進むことが予想されている[1]。

しかし平均寿命が延びても、死ぬまで健康でいられるとは限らない。人を含め、すべての生物にとって老化は避けられない現象である。老化はがんをはじめ、脳血管疾患、循環器疾患、2型糖尿病、認知症など、様々な病態に関与しており、それらは老化関連疾患と呼ばれている(図1)[2,3]。

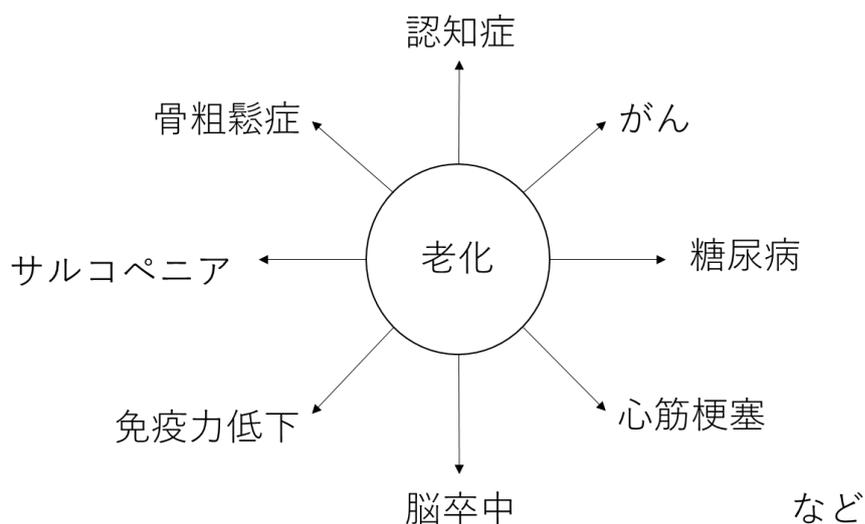


図1 老化は様々な疾患の重大なリスクファクターである

日本の平均寿命は男性が 80.98 歳、女性が 87.14 歳であるが、「健康上の問題で日常生活に影響がない」とされる健康寿命については、男性 72.14 歳、女性 74.79 歳と、平均寿命と約 10 年の乖離がある。高齢化に伴い介護を受ける割合も増加しており、高齢社会において、医療費、介護費の増加は日本経済の観点からも重要な問題となっている。このような状況下で、老化や老化関連疾患の生理的メカニズムを解明し、健康長寿を見据えた新たな治療戦略を開発することは今まさに求められている。

ヒトの正常な組織から取り出した体細胞は、培養皿で培養すると、はじめのうちはよく増殖するが、ある一定回数細胞分裂を繰り返したのち、増殖を停止する。この現象は、細胞老化と呼ばれ、60 年ほど前にヘイフリックによって報告された[4]。老化した細胞は形態が巨大化・扁平化し、SA-β-Gal 活性の亢進が観察される[5]。ヒトの体細胞の多くは、染色体末端を保護するテロメア DNA を複製する酵素（テロメラゼ）の活性が非常に低いため、細胞分裂を繰り返すと、テロメアの短小化が起き、その構造変化が DNA ダメージとして認識される。その結果、サイクリン依存性キナーゼインヒビターの p21 や p16<sup>INK4A</sup> の発現が誘導され、細胞周期を停止させる Rb タンパク質の恒常的活性化が引き起こされ、細胞分裂が不可逆的に停止すると考えられている。このテロメアの短小化による細胞老化は複製老化と呼ばれている[6]。

複製老化に加えて、がん遺伝子の活性化や、活性酸素の蓄積による酸化ス

トレス、抗がん剤の暴露など、DNA ダメージを発生させる様々な刺激により、不可逆的な細胞増殖停止が起こることが報告されており、このような細胞内外のストレスにより生じる細胞老化は、ストレス誘導性細胞老化と呼ばれている (図 2) [7-9]。

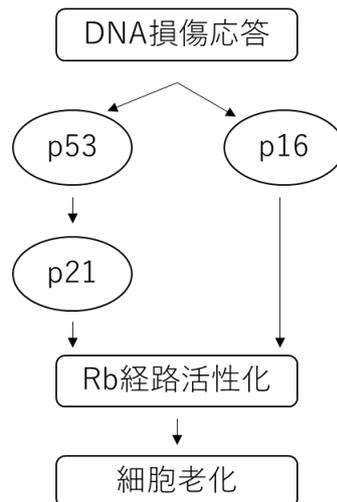


図 2 細胞老化誘導機構

修復不可能な DNA 損傷が生じた場合、細胞は、p53/p21 もしくは p16<sup>INK4A</sup> 経路を活性化させ Rb 経路を活性化し細胞増殖を停止する。

老化細胞は、加齢とともに生体内に蓄積していくと考えられている。

Yamakoshi らの報告では、細胞老化に特異性の高いマーカーである p16<sup>INK4A</sup> に、蛍光蛋白であるルシフェラーゼを融合した遺伝子改変マウスで、加齢とともにマウスの体内の様々な部位にルシフェラーゼの発現が増加することが確認されている。これは加齢とともに p16<sup>INK4A</sup> 陽性細胞、つまり老化細胞が蓄積していくことを示唆している [10]。

細胞老化は、正常細胞が DNA ダメージを受けた際に、細胞分裂を停止する

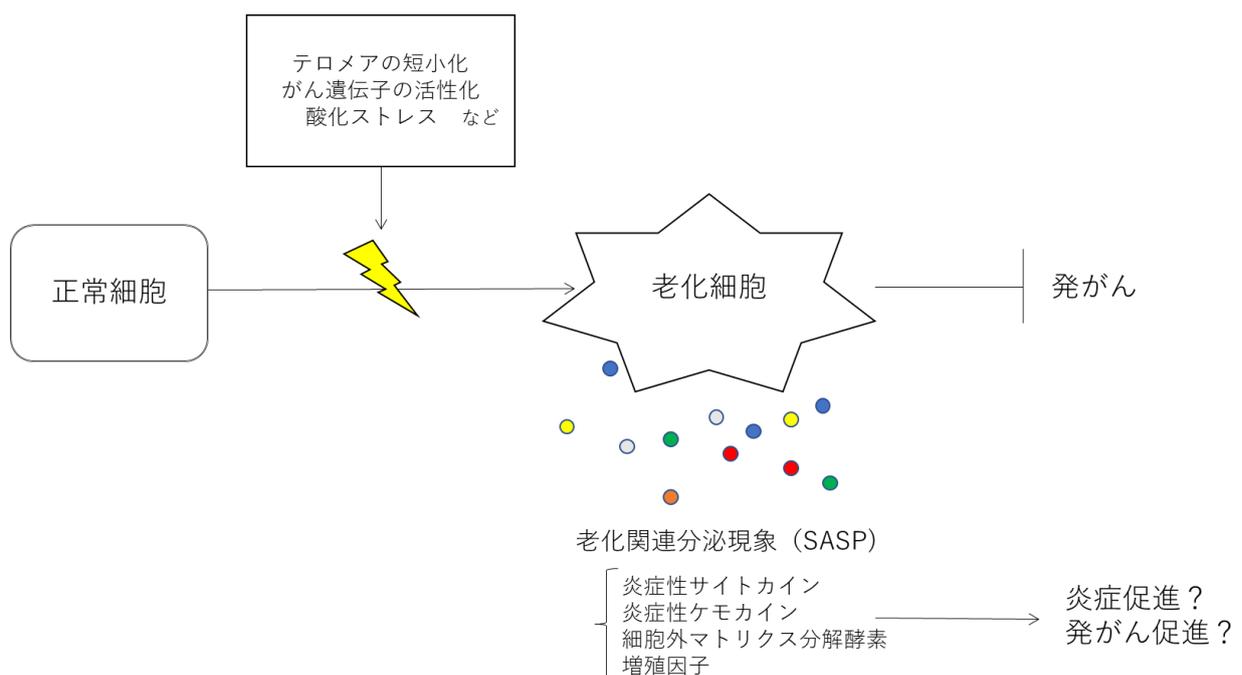
ことで危険な細胞増殖を阻止するため、生来体内に備わったがん抑制機構であると  
考えられている。がん細胞ではテロメラーゼ活性が亢進しているものが多く、永久  
に分裂増殖可能であることや、がんの半数近くで p16<sup>INK4A</sup> が失活しているという事  
実は、細胞老化ががん抑制機構であることを裏付けている[10-12]。

一方で、細胞老化は、アポトーシスとは異なり、ダメージを受けたのちも  
体内に蓄積し、長時間存在することで、個体に悪影響を及ぼしている可能性が示唆  
されている。Baker らは、マウスの p16<sup>INK4A</sup> 陽性細胞を除去することで、マウスの  
寿命が延長し、心臓や腎臓における加齢性変化が抑制されることを報告している  
[13,14]。

老化細胞は、単に細胞増殖を停止しているだけではなく、炎症性サイトカ  
インや、ケモカイン、増殖因子などの分泌因子を高発現し、周囲の細胞に様々な影  
響を及ぼしている可能性がある。これらの分泌現象は、細胞老化随伴分泌現象  
(senescence-associated secretory phenotype: SASP) と呼ばれ近年注目を集めている  
[3,15]。SASP 因子には、細胞増殖や、組織のリモデリングを促進する因子が多く含  
まれているため、老化細胞が SASP を介して組織の修復を促進するなど、有益な機  
能も報告されている[16]。その一方で、SASP 因子が炎症反応や発がんを促進し、  
生体にとって好ましくない微小環境を形成していることも明らかになってきてい  
る。がん細胞と老化線維芽細胞との共培養によってがん細胞の浸潤能が亢進するこ  
とや、腫瘍の成長が促進されること、さらに SASP 因子を阻害すると腫瘍形成や細

胞増殖が抑制されることなどが報告されており、SASP ががんの進展に寄与していることが示唆されている[17,18]。

さらに Yoshimoto らの肥満誘導性肝がんのモデルマウスを使用した報告では、高脂肪食により肝星細胞が老化し SASP を引き起こしているが、*IL1 $\beta$*  をノックアウトし SASP を抑制すると、発がんが抑制されることから、老化肝星細胞が引き起こす SASP が発癌に促進的に働いていることが示唆されている[19]。がん以外にも、動脈硬化やインスリン抵抗性など、SASP に関連した炎症反応は老化に伴う病態の根底になっていると考えられている (図 3) [3,20,21]。



### 図 3 細胞老化と細胞老化随伴性分泌現象

老化細胞はがん抑制機構と考えられる一方で SASP を介して生体に悪影響を及ぼしている可能性がある。

一般に、ウイルスなどの侵入を受けると、細胞は IFN を産生する。IFN $\alpha$  及び  $\beta$  に代表される I 型 IFN は、細胞表面にある I 型 IFN 受容体に結合し、JAK-STAT 経路を介して様々な ISGs の転写を活性化させる。ISGs は抗ウイルス作用やマクロファージの活性化、抗腫瘍作用など、多岐にわたる免疫応答に関与している[22]。

IFN が細胞膜上の受容体である IFNR1/IFNR2 二量体に結合すると、そこに結合しているリン酸化酵素の JAK1、TYK2 がリン酸化される。活性化した JAK1、TYK2 が IFN 受容体をリン酸化し、細胞内の signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) および STAT2 が受容体に引き寄せられリン酸化を受ける。リン酸化した STAT1、STAT2 は二量体を形成し、さらに IFN regulatory factor 9 (IRF9) と結合し ISG factor 3 (ISGF3) と呼ばれる複合体を形成する。ISGF3 は核内に移行し、ISGs のプロモーター内に存在する IFN 応答配列 (IFN-stimulated response element; ISRE) に結合し、数百に及ぶ ISGs の転写を誘導する (図 4)[23,24]。

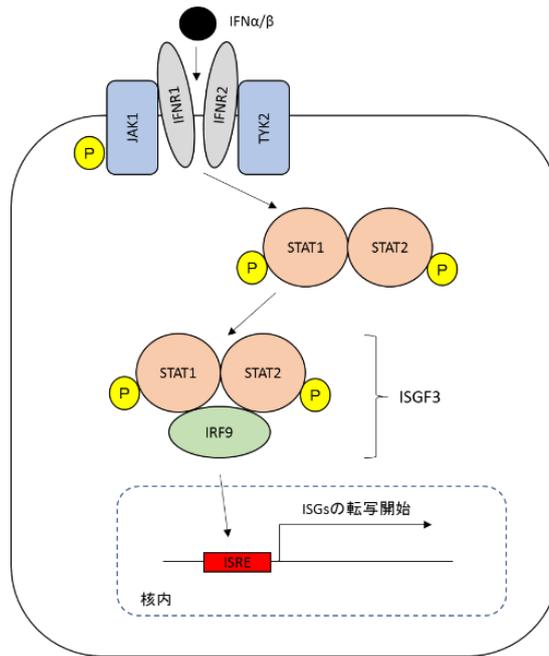


図4 典型的な JAK-STAT 経路

IFN が IFN 受容体に結合すると、JAK1 がリン酸化され、STAT1、STAT2 をリン酸化する。リン酸化された STAT1、STAT2 は IRF9 と結合し ISGF3 となり核内に移行し ISGs の転写を促進する。

この典型的な JAK-STAT 経路に加えて最近、非リン酸化 STATs の機能が報告されている。Cheon らは、低用量の IFN で細胞を一定期間刺激すると、非リン酸化 STAT1、STAT2 からなる非リン酸化 ISGF3 が増加し、ISGs を高発現させ、DNA ダメージに対して抵抗性を示すことを報告している[25]。Wang らは、一部のマウスやヒトオルガノイドで、IFN 刺激を伴わない生理的条件下での ISGs の恒常的発現が、非リン酸化 ISGF3 によって制御されており、抗ウイルス免疫に重要であることを報告している[26]。このように、恒常的な ISGs の発現は、細胞にウイルスが侵入した際の迅速な免疫応答に必要であると考えられる[27,28]。一方で、ISGs の異常高発現を伴う C 型肝炎ウイルス(HCV) 感染患者が IFN による抗ウイルス治療に

対して治療抵抗性を示すことや、ISGs 高発現を伴う担癌患者で腫瘍形成が促進され、治療抵抗性を示すことなどが報告されており、ISGs の異常高発現は負の効果をもたらすことも示唆されている[29-32]。

本研究において、複製老化させた老化線維芽細胞では非老化線維芽細胞に比べ、ISGs が高発現していた。しかしながら IFN の発現は増加しておらず、老化細胞における ISGs の高発現は非リン酸化 ISGF3 によって制御されているのではないかという仮説を立てて検証を行った。あわせて、早老症のひとつである Werner 症候群の線維芽細胞でも検討を行った。さらに、若年患者と老齢患者の肝組織の免疫組織染色を比較し、老化細胞における ISGs の発現制御機構について検討した。

### 3. 方法

#### ① 細胞

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) は passage 2 のものを Promocell より購入した。donor は白色人種の 30 歳男性であった。推奨に基づき 2%胎児ウシ血清及び線維芽細胞成長因子、インスリンを添加した Fibroblast basal medium を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

複製老化による老化細胞を作成するために、増殖が停止するまで培養を継続した。細胞が、80%コンフルエンスに達した時点で、1:3 に薄めて継代した。継代数が少ない内は約 3 日ごとに継代を行ったが、継代数が 20 を超えると、徐々に継代までの間隔は長くなり、継代するまで 2-3 週間を要した。この時点では細胞は 1:2 に希釈した。細胞の剥離には TrypLE を使用した。継代数が 10 未満のものを非老化細胞、継代数が 20 以上のものを老化細胞として比較検討した。

Werner 症候群の患者由来のヒト皮膚線維芽細胞は Passage 8 のものを医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、20%胎児ウシ血清を添加した RAMPI1640 培地を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

ヒト肝細胞の Huh7 細胞は American type culture collection (ATCC) より購入し、10%胎児ウシ血清及び penicillin、streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

## ② SA-β-gal 染色

Cellular senescence assay kit (Chemicon international)を用い、推奨方法に従って行った。染色前日に細胞を 4 well スライドチャンバー (IWAKI)に播種し、翌日 Phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、固定液を用いて室温で 10 分固定した。PBS で洗浄後、SA-β-gal 染色液を浸して 37℃で 4 時間染色ののち、Olympus AX80microscope を用いて観察した。

## ③ 試薬

pIpC は Miltenyi Biotec より購入し、Huh7 に 10μg/ml の濃度で添加し 24 時間後に回収した。ヒト組み換え IFNα は R&D systems から購入し、Huh7 に 100U/ml の濃度で添加し、12 時間培養したのち回収した。

## ④ Western blotting

12well プレートに播種した細胞を PBS で洗浄し、溶解用バッファー (Protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche)、50 mM Tris-HCl、1% Triton-X、5 mM EDTA、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、50 mM NaF) を添加し、セルスクレイパーで剥離し、細胞ライセートとした。このライセートを遠心分離し、上清回収し、95℃のヒートボックスで 5 分間熱変性させたものをサンプルとした。10-20%ポリアクリルアミ

ドゲルを用いて SDS-PAGE で泳動分離を行い、PVDF メンブレン (Amersham Bioscience) に転写した。一次抗体は Immunoshot reagent1 (コスモバイオ)で希釈しメンブレンを 4°Cで一晩反応させた。翌日、Horse radish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 二次抗体と室温で 1 時間反応させ、イムノスター®LD (Wako) で発色を行い、LuminoGraphI (Atto 社) でシグナルを観察した。

一次抗体は、抗 STAT1 抗体、抗 STAT2 抗体、抗リン酸化 STAT1(Tyr701)抗体、抗リン酸化 STAT2(Tyr690)抗体、抗 IRF9 抗体、抗 Mx1 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 p21 抗体、抗 SIRT1 抗体、抗 HSP70 抗体、抗ヒストン H3 抗体、抗 JAK1 抗体、抗 HRP-conjugated  $\beta$ -actin 抗体を、Cell Signaling Technology より購入した。抗 GAPDH 抗体は Abnova より購入した。抗 p16<sup>INK4A</sup> 抗体は Proteintech より購入した。

二次抗体は ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) 、ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep) を GE Healthcare Life Science より購入した。抗 GAPDH 抗体と抗 HRP-conjugated  $\beta$ -actin 抗体を除く 1 次抗体は、1 : 1000 に希釈して使用した。抗 GAPDH 抗体、抗 HRP-conjugated  $\beta$ -actin 抗体と 2 次抗体は、1:10000 に希釈して使用した。

#### ⑤ RNA 抽出 cDNA マイクロアレイ RT-PCR 定量

RNA は Isogen II (ニッポンジーン)を使用し、推奨プロトコールに従って抽出を行った。

cDNA マイクロアレイは cDNA oligo chip (Toray Industries) を用いて施行した。(GEO accession number: #GSE107483)

RT-PCR は、抽出した RNA より SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて cDNA を作成し、FastStart Universal SYBR Green Master Mix with rox (Roche Applied Science) を用いて、StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で増幅した。内部コントロールとして *β-actin* を使用し、 $\Delta\Delta$ CT 法で相対的な mRNA 発現量を算出した。

#### ⑥ 免疫細胞染色

染色前日にコラーゲンコートされた 4 well スライドチャンバー (IWAKI) に細胞を播種した。細胞は 4% パラホルムアルデヒド (Wako) で室温 15 分固定後、0.1% Triton-X in PBS 室温 20 分で透過処理を行った。PBS で洗浄後、一次抗体を Can Get Signal Immunostaining Solution A (東洋紡) で 1:100 に希釈し、チャンバーに加え、4°C で一晩反応させた。翌日 PBS で洗浄し、二次抗体を Can Get Signal Immunostaining Solution A (東洋紡) に 1:500 で希釈し、室温で 1 時間反応を行った。PBS で洗浄後、DAPI (Vector) で核染色し、観察した。

一次抗体は、抗 STAT1 抗体、抗 STAT2 抗体、抗 IRF9 抗体を Cell Signaling より購入した。抗 8-OHdG 抗体は JaICA より購入した。2 次抗体 Alexa Fluor 488 コンジュゲートは Molecular Probes より購入した。

⑦ 細胞分画タンパク抽出

細胞質および核の分画別のタンパク抽出は、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Merck)を使用し、推奨プロトコールに従って行った。

⑧ Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の解析

泳動に  $Mn^{2+}$ -Phos-tag SDS-PAGE gel (WAKO)を使用し、その他の方法は Western blotting 法と同様の手順で行った。各バンド強度は ImageJ を用いて定量解析した。

⑨ レンチウイルストランスダクション

JAK1-shRNA、STAT1-shRNA、STAT2-shRNA Lentiviral Particles を Santa Cruz より購入した。ウイルス液を 0.1%ポリブレン (Millipore) と共にメディウムに添加し NHDF に感染させた。翌日にメディウムを交換し、翌々日より puromycin 3.0  $\mu\text{g/ml}$  を添加し、感染細胞のセレクションを行った。

⑩ プラスミドトランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

細胞を 12well プレートに撒き 24 時間培養した後、ISRE によってルシフェラーゼが誘導される pISRE-luc plasmid (Clontech)と、トランスフェクション効率を

補正するための seapansy ルシフェラーゼを発現する pGL4-TK plasmid (プロメガ) をともにトランスフェクションした。48 時間後に Luciferase lysis buffer (ピッカジーン) で細胞を溶解し、ルミノメーターでルシフェラーゼ活性値を測定した。得られた数値を Seapansy ルシフェラーゼ活性値にて補正し、相対強度で表示した。

トランスフェクションは FugeneHD Transfection Reagent (プロメガ) を使用し、推奨方法に従って行った。

#### ⑪ 免疫組織染色

ヒト肝組織アレイは、Biomax 社より購入した。ヒストクリア (NDS) を用いて脱パラフィン化の後、3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼ抑制処理を行った。その後、10mM クエン酸バッファー (pH6.0) を用いて 89°C30 分加熱し、抗原賦活化を行った。5%ヤギ血清 (Wako) でブロッキングを行ったのち、4°Cで一晩一次抗体反応を行った。翌日 HRP conjugated の二次抗体と室温で 30 分で反応させ、3,3'-Diaminobenzidine で発色した。最後にヘマトキシリンで核染色を行い、脱色処理ののち Mount-Quick (大道産業) で封入し、観察を行った。

#### ⑫ 免疫沈降

細胞ライセートに抗 IRF9 抗体と immunoprecipitation buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA),

pH 8.0, 0.25% gelatin, and 0.02% sodium azide)で前洗浄した Protein A magnetic FG beads (多摩川精機)を添加し、ローテーターを用いて 4°Cで一晩インキュベートした。翌日、磁気分離ラックを使用してビーズを分離し 2× SDS に再懸濁し、95°C に熱したヒートボックスで 3 分間加熱し、サンプルとした。得られたサンプルで Western blotting を行った。二次抗体は Trueblot anti-rabbit IgG HRP (Rockland) を使用し 1:1000 に希釈して使用した。

### ⑬ ChIP アッセイ

Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP キットを用いて推奨方法に従って行った。1%ホルムアルデヒドで NHDF のクロスリンクを行い、超音波処理でクロマチンを断片化させたのち、抗 IRF9 抗体でクロマチン免疫沈降を行った。ポジティブコントロールとして抗ヒストン H3 抗体、ネガティブコントロールとして、ウサギ IgG を使用した。

リアルタイム PCR は、*IFI27* と *Mx1* の、プロモーター内の ISRE をまたがるプライマーで増幅した。増幅された DNA の量は、2%インプットクロマチン DNA と比較した免疫沈降サンプル中の DNA の割合 (%)を示した。

### ⑭ 統計解析

得られた数値は各群の平均値±標準誤差として示した。2群間の比較検定には分散が等しい場合は Student の t 検定を、分散が等しくない場合は Welch の t 検定を用いた。得られた p 値は 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

### ⑮ プライマー

#### RT-PCR 用プライマー

<i>IL6</i>	Fw	5'-ACCCCTGACCCAACCACAAAT-3'
	Rv	5'-AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTT-3'
<i>IFNA1</i>	Fw	5'-GACTCCATCTTGGCTGTGA-3'
	Rv	5'-TGATTTCTGCTCTGACAACCT-3'
<i>IFNB1</i>	Fw	5'-GTCACTGTGCCTGGACCATAG-3'
	Rv	5'-GTTTCGGAGGTAACCTGTAAGTC-3'
<i>IFIT3</i>	Fw	5'-AGAAAAGGTGACCTAGACAAAGC-3'
	Rv	5'-CCTTGTAGCAGCACCCAATCT-3'
<i>OASL</i>	Fw	5'-CCATTGTGCCTGCCTACAGAG-3'
	Rv	5'-CTTCAGCTTAGTTGGCCGATG-3'
<i>ISG15</i>	Fw	5'-CTCTGAGCATCCTGGTGAGGAA-3'
	Rv	5'-AAGGTCAGCCAGAACAGGTCGT-3'

<i>Mx2</i>	Fw	5'- CAGAGGCAGCAGACGATCAAC -3'
	Rv	5'-TTGGTCAGGATACCGATGGTC-3'
<i>IFI27</i>	Fw	5'- TGCTCTCACCTCATCAGCAGT-3'
	Rv	5'- CACAACCTCCTCCAATCACAAC-3'
<i>ACTB</i>	Fw	5'- CTGTGCTACGTCGCCCTGG-3'
	Rv	5'- GCCACAGGACTCCATGCCC-3'

ChIP 用プライマー

<i>IFI27</i>	Fw	5'-CTTCTGGACTGCGCATGAGG-3'
	Rv	5'-CCACCCCGACTGAAGCACTG-3'
<i>Mx1</i>	Fw	5'-GGGACAGGCATCAACAAAGCC-3'
	Rv	5'-GCCCTCTTCTTCCAGGCAAC-3'

## 4. 結果

### ① 複製老化させた NHDF における老化マーカー発現

はじめに、複製を繰り返した NHDF が、細胞老化の特徴を有しているかどうか検証するために、passage 3 と passage 21 の NHDF に対して、SA- $\beta$ -gal 染色を行った。老化マーカーとして重要な p16<sup>INK4A</sup> の発現は Western blotting 法で観察した。また DNA ダメージマーカーとして知られる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を免疫細胞染色で観察した[33]。

SA- $\beta$ -gal 染色で、passage 21 の細胞は passage 3 の細胞と比較し、SA- $\beta$ -gal 活性が明らかに上昇し、さらに形態が巨大化していた (図 5a)。Western blotting では、p16<sup>INK4A</sup> の発現が増加していた (図 5b)。老化とともに低下するといわれている SIRT1 の発現は passage 21 の細胞で減少しており、既報と合致する結果であった (図 5b)[34]。8-OHdG の免疫細胞染色では passage 21 の NHDF は passage 3 に比べて明らかに濃染しており、継代の進んだ線維芽細胞で DNA ダメージが蓄積していることが示唆された (図 5c)。

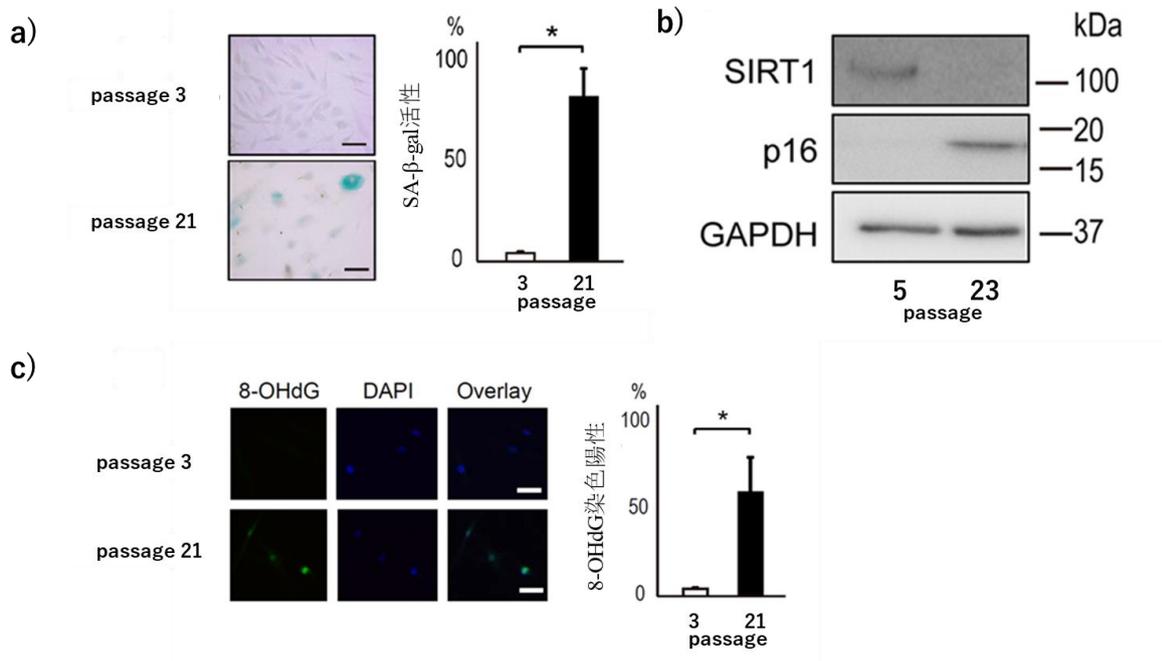


図5 継代の進んだNHDFは老化マーカーを発現している

- a) passage 3 と passage 21 の NHDF に対して SA-β-gal 染色を行った。passage 21 の NHDF は passage 3 に比べ SA-β-gal 活性が上昇していた。また細胞形態が巨大化していた。バーの長さは 10 μm。一視野ごとに 20 個の細胞をカウントし 5 視野における陽性率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。
- b) passage 5 と passage 23 の NHDF からタンパク質を抽出し Western blotting を行った。passage 23 の細胞で代表的な老化マーカーである p16<sup>INK4A</sup> の発現が増加し、また老化とともに低下する SIRT1 の発現は低下していた。
- c) passage 3 と passage 21 の 8-OHdG の免疫染色では、passage 21 で 8-OHdG の発現が増加していた。バーの長さは 10 μm を示す。一視野ごとに 20 個の細胞をカウントし 5 視野における陽性率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。各実験は 3 回の独立した検討により再現性を確認した。

老化細胞はひとつで代表できるマーカーが存在しないため、複数の老化マーカーを組み合わせる必要があるが、今回使用した NHDF は継代が進むに連れ、形態が変化し、SA-β-gal 活性や p16<sup>INK4A</sup> の発現が増加しており、老化細胞として既報と比較しても矛盾しないことが確認された。

## ② 老化細胞と非老化細胞の遺伝子発現比較

次に老化細胞と非老化細胞の mRNA の網羅的発現を比較するため、passage 5 と passage 23 の NHDF の RNA を抽出し、cDNA アレイに提出した。アレイの結果、老化細胞では非老化細胞に比べ *IL6* の発現が 76 倍に増加しており、SASP を引き起こしているという既報に合致する結果であった。また *ISG15*、*Mx1*、*OASL*、*IFITs* などの ISGs が老化細胞で発現が著明に増加していた。しかしながら、驚くべきことに *IFNA1*、*IFNB1* の発現は増加していなかった (表 1)。

遺伝子名	正式名称	比率 (passage23/passage5)
<i>IL6</i>	interleukin 6	75.85
<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine ligand 2	52.35
<i>EFEMP1</i>	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	65.51
<i>CCL8</i>	C-C motif chemokine ligand 8	31.88
<i>IGFBP4</i>	insulin like growth factor binding protein 4	6.10
<i>IL32</i>	interleukin 32	5.23
<i>CXCL2</i>	C-X-C motif chemokine ligand 2	5.08
<i>IFI44L</i>	interferon induced protein 44 like	48.63
<i>ITM1</i>	interferon induced transmembrane protein 1	41.54
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	29.62
<i>MX2</i>	MX dynamin like GTPase 2	22.86
<i>OAS1</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	22.44
<i>ITIH5</i>	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5	21.19
<i>MX1</i>	MX dynamin like GTPase 1	19.30
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	17.88
<i>IFI6</i>	interferon, alpha-inducible protein 6	16.11
<i>IFIT3</i>	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	15.57
<i>ITIH5</i>	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5	14.26
<i>IFIT1</i>	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	14.05
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	14.00
<i>IFI27</i>	interferon alpha-inducible protein 27	11.94
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1	5.83
<i>STAT2</i>	signal transducer and activator of transcription 2	2.90
<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	1.13
<i>IFNA1</i>	interferon alpha 1	1.12
<i>IFNB1</i>	interferon beta 1	1.22
<i>IFNG</i>	interferon gamma	0.78

**表1 NHDF passage 5 と passage 23 の cDNA アレイによる遺伝子発現の比較**  
cDNA アレイの結果の抜粋を示す。比率は passage 5 と比較した NHDF passage 23 の遺伝子発現量の倍率を表している。SASP 因子は老化細胞で 5 倍以上に増加していたもの、ISGs は老化細胞で 10 倍以上に増加していたものを記載した。SASP 因子と ISGs は老化細胞で発現が著増していた。*STAT1*、*STAT2* も発現が 2 倍以上に増加していた。一方、IFN ファミリーは老化細胞で明らかな発現増加はなかった。

アレイの結果を確認するために、定量 PCR を行った。定量 PCR でも、老化細胞では *IL6* や ISGs の発現が著明に増加していた。一方で、*IFNA1*、*IFNB1* の明らかな発現増加はなく、アレイの結果と合致していた (図 6a、b)。*IFNA1*、*IFNB1* のプライマーが有効であることを確認するため、pIpC で刺激した Huh7 で RT-PCR を施行し、*IFNA1*、*IFNB1* の発現が著増することを確認した (図 7)。

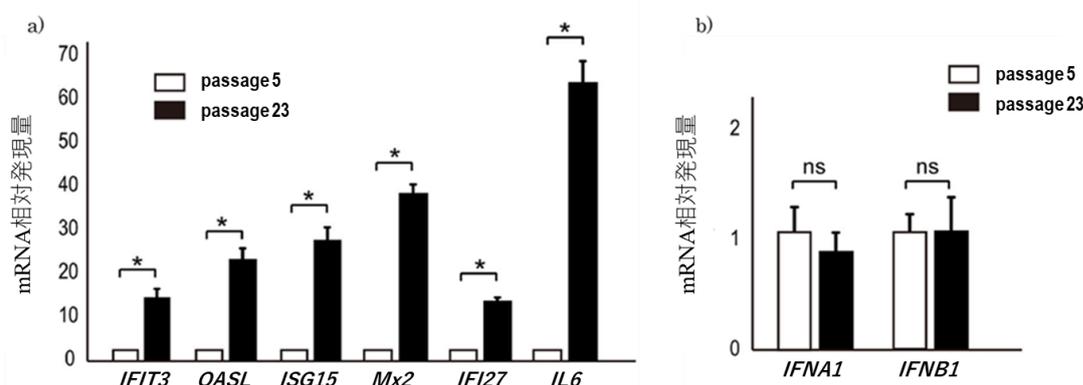


図 6 老化細胞では IFN の発現増加がないにも関わらず ISGs が高発現している

- a) NHDF passage 5 と passage 23 の定量 PCR を行い、mRNA の発現量を比較した。passage 23 では passage 5 に比し、*IL6* と ISGs が著増していた。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。
- b) 一方、*IFNA1*、*IFNB1* は passage 23 で明らかな発現増加を認めなかった。エラーバーは標準誤差を示す。各実験は 3 回の独立した検討により再現性を確認した。

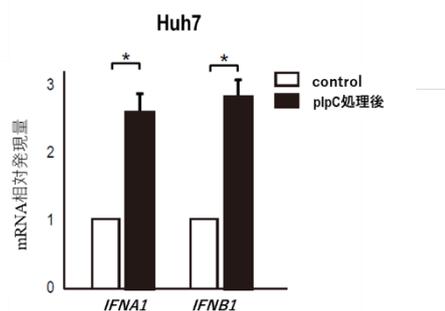
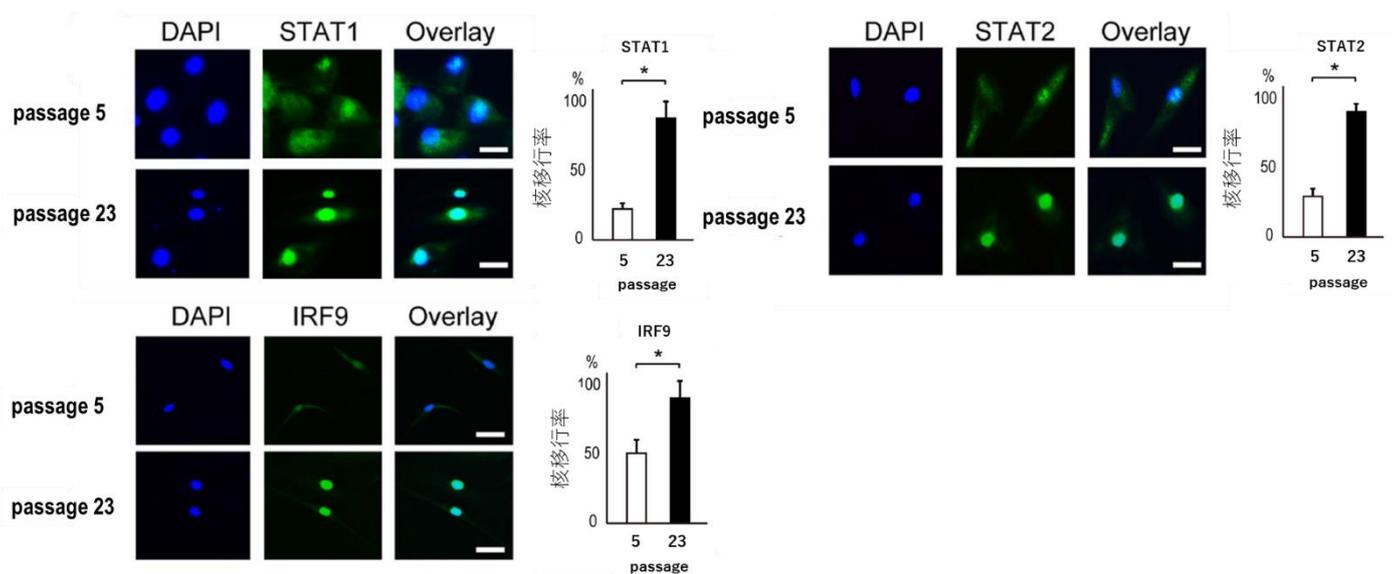


図 7 *IFNA1*、*IFNB1* のプライマーの有効性の確認

pIpC で刺激した Huh7 で RT-PCR を施行すると、*IFNA1*、*IFNB1* の発現が著増しており、プライマーが有効であることが示された。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

ISGs の発現は一般的に、IFN が IFN 受容体に結合し、STAT1、STAT2 がリン酸化され IRF9 と結合し ISGF3 を形成し、核内に移行することで誘導されると考えられている。したがって、老化細胞での ISGs 増加が ISGF3 により引き起こされているか検証するため、STAT1、STAT2、IRF9 の細胞内局在を免疫細胞染色で検討した。STAT1、STAT2、IRF9 はいずれも細胞質と核の両方に存在していたが、passage 23 の線維芽細胞では、passage 5 のものに比べ、核内に顕著に移行していた (図 8)。



**図 8 老化細胞では STAT1、STAT2、IRF9 が核内に移行している**

STAT1、STAT2、IRF9 の細胞内局在を検討するため、NHDF passage 5 と passage 23 で免疫細胞染色を行った。passage 23 の NHDF では passage 5 に比べ、ISGF3 の構成成分である STAT1、STAT2、IRF9 が核内に移行していた。

バーの長さは 10  $\mu\text{m}$ 。一視野ごとに 20 個の細胞をカウントし 5 視野における ISGF3 の核内移行率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。各実験は 3 回の独立した検討により再現性を確認した。

### ③ 老化細胞における ISGF3 のリン酸化の有無の検討

続いて、老化細胞での STAT1、STAT2 のリン酸化の有無を検討するため、Western blotting 法で観察を行った。アレイの結果とも合致するように、タンパク質レベルでも STAT1、STAT2 は老化細胞で発現が増加していた。しかしながら、代表的なチロシン残基である STAT1 (Tyr701) と STAT2 (Tyr690) のリン酸化体抗体では老化細胞における明らかな発現増加は観察されなかった。一方ポジティブコントロールとして使用した IFN 処置後の Huh7 ではリン酸化 STAT1、STAT2 が増加していた (図 9)。代表的な ISGs の 1 つである Mx1 は老化細胞と IFN 処置後の Huh7 の両方で発現が増加していた。IL6 経路にかかわるとされる、STAT3 については、老化細胞と非老化細胞でタンパク発現に有意差は認めなかった (図 9)。

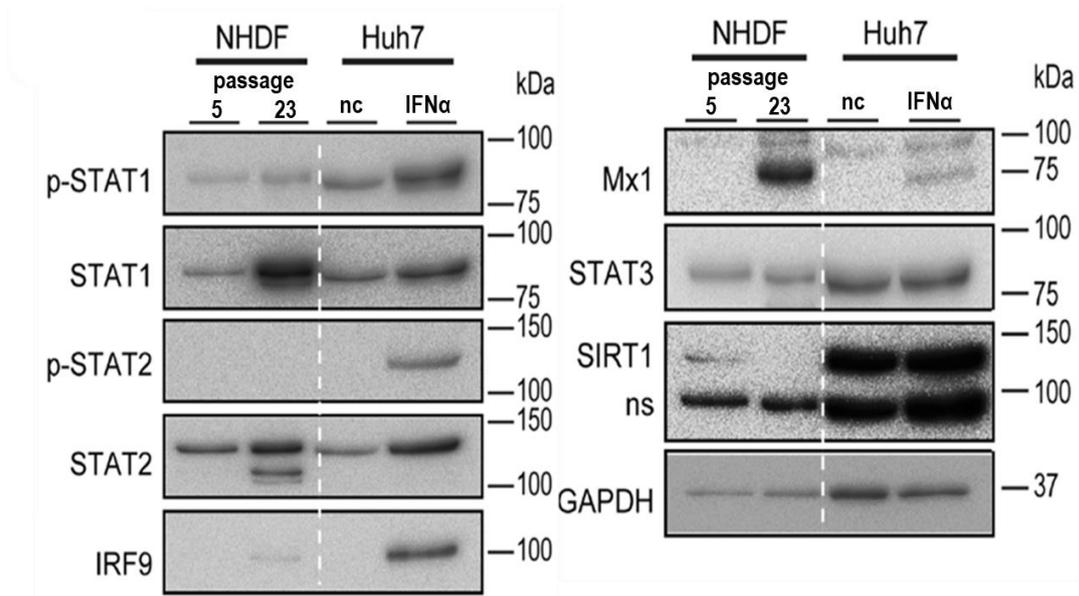


図9 老化細胞では非リン酸化 STAT1、STAT2 が増加している

Western blotting で STAT1、STAT2 のリン酸化の有無を検討した。NHDF passage 23 では passage 5 と比較し、STAT1、STAT2 の発現が増加していたが、代表的なチロシン残基である STAT1 (Tyr701) と STAT2 (Tyr690) のリン酸化体はいずれも増加していなかった。ISGs の一つである Mx1 は老化細胞で発現が増加していた。STAT3 は有意差なく、SIRT1 は老化細胞で発現が減弱していた。

Huh7 に IFN を 12 時間添加したのち回収したものを positive control、無処置のものを negative control とした。ns は非特異的バンドを示している。

免疫細胞染色で、老化細胞では STAT1、STAT2 が核内に移行していたため、NHDF passage 5 と passage 23 の核と細胞質の蛋白を分離し、分画ごとに STATs のリン酸化について Western blotting 法で検討した。すると、老化細胞の核内で STAT1、STAT2 の発現が増加していた。一方で、リン酸化 STAT1、STAT2 は検出されなかった (図 10)。

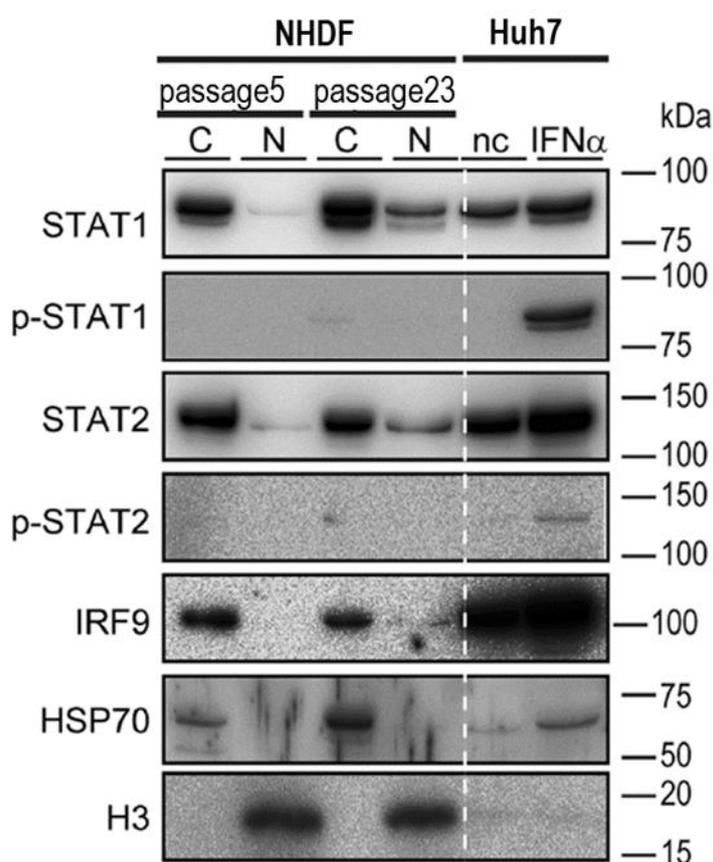
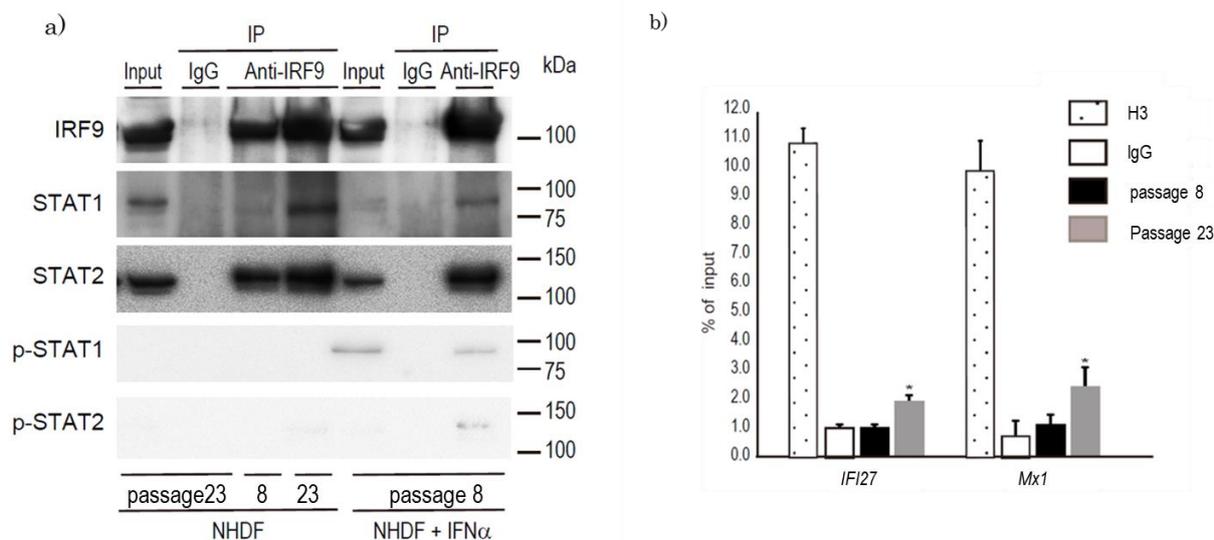


図 10 老化細胞の核内で STATs が増加しているが、リン酸化体は検出されない  
NHDF passage 5 と passage 23 を核(N)と細胞質(C)に分離し、Western blotting を行っ  
た。passage 23 の核で STAT1、STAT2 の発現が増加していたが、リン酸化 STAT1、  
STAT2 は検出されなかった。  
HSP70 は細胞質、HistonH3 は核のマーカーとして使用した。  
Huh7 に IFN を 12 時間添加したのち回収したものを positive control、無処置のもの  
を negative control とした。

次に老化細胞で発現が増加している非リン酸化 STAT1、STAT2 が ISGF3 を形成しているかどうかを調べるため、免疫沈降を行った。老化細胞と、非老化細胞、IFN 処理した非老化細胞で、抗 IRF9 抗体を用いて免疫沈降を行い、IRF9 と結合しているタンパク質を抽出し、Western blotting を行った。すると、老化細胞では非老化細胞に比し、より多くの STAT1、STAT2 が検出された。さらに、IFN 処理した非老化細胞では、リン酸化 STATs が検出されるのに対し、老化細胞ではリン酸化 STATs は検出されなかった (図 11a)。

つぎに老化細胞の ISGF3 が実際に ISGs 発現を誘導しているかを検証するために、抗 IRF9 抗体を用いたクロマチン免疫沈降で、ISGF3 に結合している DNA を精製し、定量 PCR を行った。ISGs のうち、*IFI27*、*Mx1* の ISRE 領域を測定した結果、老化細胞ではいずれも発現が増加していた (図 11b)。抗ヒストン H3 抗体を positive control、ウサギ IgG を negative control として使用した。

これらの結果から、老化細胞では、STAT1、STAT2、IRF9 が ISGF3 を形成し、ISGs のプロモーター領域に結合していることが示唆された。



**図 11** 老化細胞では非リン酸化 STATs が ISGF3 を形成し、ISRE に結合している

- a) 抗 IRF9 抗体を用いて免疫沈降を行い、老化細胞で増加している STAT1、STAT2 が ISGF3 を形成しているか検証した。抗 IRF9 抗体で落としたタンパク質で Western blotting を行うと passage 23 の老化細胞では STAT1、STAT2 が検出された。リン酸化 STATs は検出されなかった。IFN 処理した passage 8 の NHDF を positive control とした。
- b) 抗 IRF9 抗体を用いてクロマチン免疫沈降で落とした DNA の定量 PCR を行った。老化細胞において *IFI27* と *Mx1* の ISRE 領域が増幅された。エラーバーは標準誤差を示す。\*p < 0.05。

次に STAT1 の Tyr701 と STAT2 の Tyr690 以外のリン酸化について検証するため、Phos-tag アッセイを行った。Phos-tag はチロシン残基に加えセリン、スレオニン残基などのリン酸化体を捕捉できる機能分子であり、Phos-tag が添加されたゲルで泳動を行うと、リン酸化タンパク質は、ゲルに固定された Phos-tag と可逆的な結合を繰り返しながら泳動するため、非リン酸化タンパク質よりも移動が遅れ、リン酸化タンパク質はシフトアップしたバンドとして検出することができる[35]。

Phos-tag が添加されたゲルで、Western blotting を行うと、NHDF passage 5 と passage 23 の両方で、抗 STAT1 (Tyr701)抗体と抗 STAT2 (Tyr690)抗体では認識できない STAT1、STAT2 のリン酸化体が検出された。しかしこれらは NHDF passage 5 と passage 23 で発現量は同等であった。一方で非リン酸化体は、passage 5 に比べ passage 23 で発現が増加していた (図 12)。

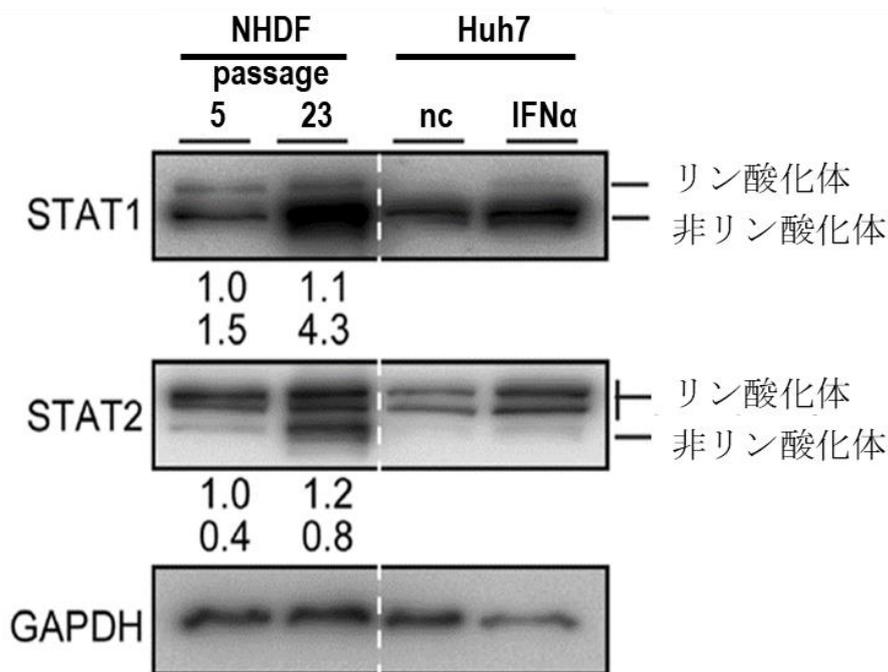


図 12 Phos-tag アッセイにおいても老化細胞特異的なリン酸化 STATs の増加は認めない

Phos-tag アッセイで NHDF passage 5 と passage 23 の STATs のリン酸化を検討した。passage 5 と passage 23 の両方で、抗 STAT1 (Tyr701)抗体と抗 STAT2 (Tyr690)抗体では認識できない STAT1、STAT2 のリン酸化体が検出された。しかしこれらは passage 5 と passage 23 で発現量は同等であった。一方で非リン酸化 STATs は、passage 5 に比べ passage 23 で増加していた。

Huh7 に IFN を 12 時間添加したのち回収したものを positive control、無処置のものを negative control とした。

バンドの下の数値は ImageJ で定量した比率を示す。(上段がリン酸化、下段が非リン酸化の値。)

これらの結果から老化細胞における ISGs 発現は、JAK-STAT 経路とは独立して、非リン酸化 STATs が増加し、非リン酸化 ISGF3 を形成し核内に移行することで引き起こされていることが示唆された。

#### ④ Werner 症候群での検討

上記の複製老化させた NHDF での結果の再現性を検証するために、早老症の一つである Werner 症候群から抽出した線維芽細胞で同様の実験をおこなうこととした。

Werner 症候群は 8 番染色体にある WRN 遺伝子の変異で生じる常染色体劣性遺伝の早老症の 1 つで、思春期までは正常に発達するが、白髪、嗄声、皮膚硬化が 20 歳頃から出現し、その後、白内障、動脈硬化性疾患、骨粗鬆症、糖尿病、悪性腫瘍などを発症し、多くは 50 代で死に至る疾患である。原因遺伝子の WRN 遺伝子は RecQ 型 DNA ヘリカーゼで、DNA の修復、複製、組み換えなど、細胞機能の維持に重要な働きを持ち、テロメアの維持にも関与していることが報告されている。そのため Werner 症候群の患者由来の線維芽細胞では、テロメアの短縮が起き、複製老化を早期にきたしやすいと考えられている[36-38]。

Werner 症候群由来の passage 8 の線維芽細胞と、健常者の passage 13 のいずれも増殖段階の線維芽細胞を比較すると、SA- $\beta$ -gal 活性が Werner 症候群で上昇しており (図 13a)、Western blotting では p16<sup>INK4A</sup>、p21 などの老化マーカーが高発現

していた (図 13b)。

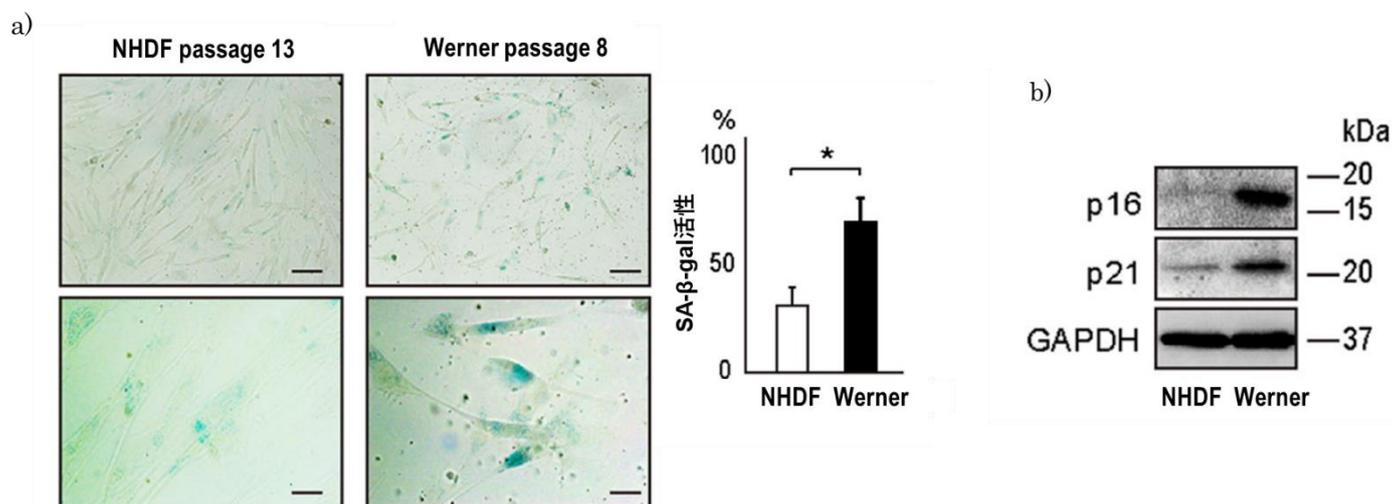


図 13 Werner 症候群由来の線維芽細胞は細胞老化をきたしている

- a) Werner 症候群由来の passage 8 の線維芽細胞と passage 13 の NHDF の SA-β-gal 染色を比較した。Werner 症候群の線維芽細胞で SA-β-gal 活性が上昇していた。上段の図のバーの長さは 50μm、下段のバーは 10μm。一視野ごとに 20 個の細胞をカウントし 5 視野における陽性率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。
- b) Werner 症候群由来の passage 8 の線維芽細胞と passage 13 の NHDF で Western blotting を行い老化マーカーの発現を比較した。Werner 症候群では、p16<sup>INK4A</sup> や p21 の発現が増加していた。

定量 PCR で mRNA の発現量を比較すると、老化線維芽細胞と同様に、

Werner 症候群由来の線維芽細胞では、NHDF に比べ、*IFNA1*、*IFNB1* の明らかな

発現増加がないにもかかわらず、ISGs が高発現していた (図 14)。

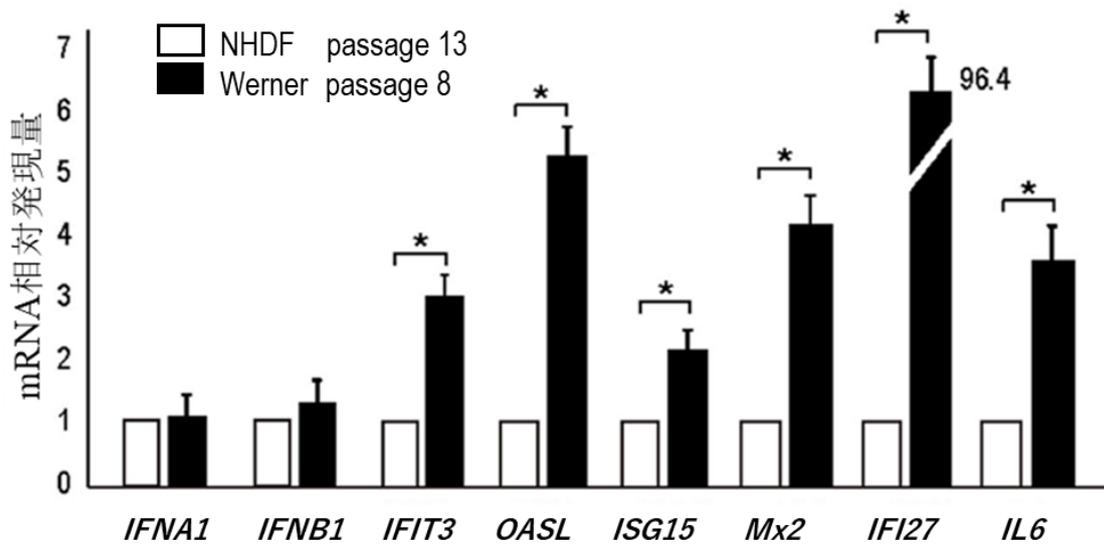


図 14 Werner 症候群の線維芽細胞においても IFN と独立して ISGs が高発現している

Werner 症候群由来の passage 8 の皮膚線維芽細胞と NHDF passage 13 の mRNA 発現を定量 PCR で比較した。Werner 症候群では、IFN の発現増加を認めないにもかかわらず、ISGs が高発現していた。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

さらに Western blotting で STATs のリン酸化の有無を検討した。すると、複製老化させた NHDF での検討と同様に、Werner 症候群の線維芽細胞でも、STAT1、STAT2 の発現が増加していたが、STATs のリン酸化体については明らかな増加はなかった (図 15a)。

免疫細胞染色で STAT1、STAT2、IRF9 の細胞内局在を比較すると、Werner 症候群由来の線維芽細胞は NHDF に比し、いずれも有意に核内に移行していた (図 15b)。これらのことは Werner 症候群においても複製老化させた NHDF と同様に、IFN とは独立して非リン酸化 ISGF3 が ISGs の発現を誘導している可能性を示唆している。

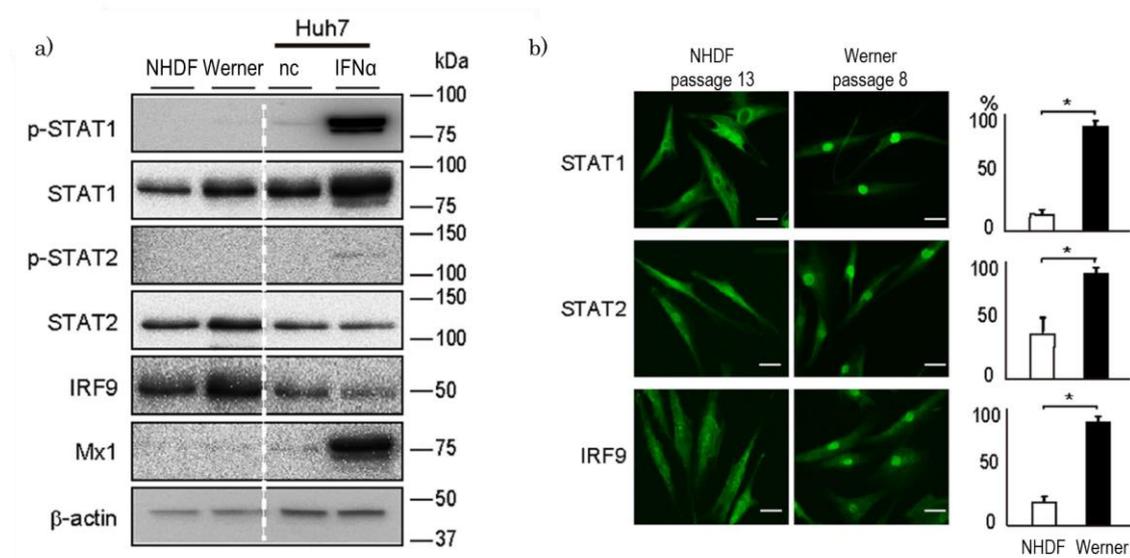


図 15 Werner 症候群においても非リン酸化 STATs が増加し核内に移行している

- a) Werner 症候群由来の線維芽細胞 passage 10 と NHDF passage 13 のタンパク発現を Western blotting で比較した。Werner 症候群由来の線維芽細胞では NHDF に比べ、STAT1、STAT2 の発現が増加していた。しかし明らかなリン酸化 STATs の増加はなかった。Huh7 に IFN $\alpha$  を 12 時間添加し回収したものを positive control、無処置のものを negative control とした。
- b) STAT1、STAT2、IRF9 の細胞免疫染色では、passage 8 の Werner 症候群の線維芽細胞では passage 13 の NHDF に比べ、STAT1、STAT2、IRF9 は明らかに核内に移行していた。

バーの長さは 10 $\mu$ m。一視野ごとに 20 個の細胞をカウントし 5 視野における核内移行性率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

## ⑤ JAK ノックダウンでの検討

これまでの検討で、老化細胞における ISGs 発現は、STAT1、STAT2 のリン酸化には依存しないことが示唆された。したがって、STAT1、STAT2 伝達経路の上流の主要キナーゼである、JAK1 の関与について検討することとした。ISGF3 の ISRE への結合能を定量化するため、複数の ISRE により luciferase 発現が誘導されるプラスミド (ISRE-luc) を用いてレポーターアッセイを行った (図 16)。



図 16 ISRE-luc のシェーマ

このプラスミドは ISRE 配列を 5 コピー、その後にホタルルシフェラーゼ遺伝子が挿入されており、ISRE の活性化によりルシフェラーゼ遺伝子の転写が誘導される。

passage 23 の老化線維芽細胞と、passage 6 の非老化細胞に ISRE-luc を発現させ、ルシフェラーゼ活性を比較すると、老化細胞でルシフェラーゼ活性が増加していた (図 17a)。これは老化細胞では ISRE が活性化していることを示唆している。

次に、遺伝子特異的ショートヘアピン RNA (shRNA) レンチウイルスベクターを用いて NHDF passage 24 の *JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をそれぞれノックダウンしたのち、ISRE-luc をトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。すると、*JAK1* をノックダウンした老化細胞では、明らかなルシフェラーゼ活性の低下を示さないのに対し、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンした群では、ルシフェラー

ゼ活性が顕著に低下した。(図 17b)。

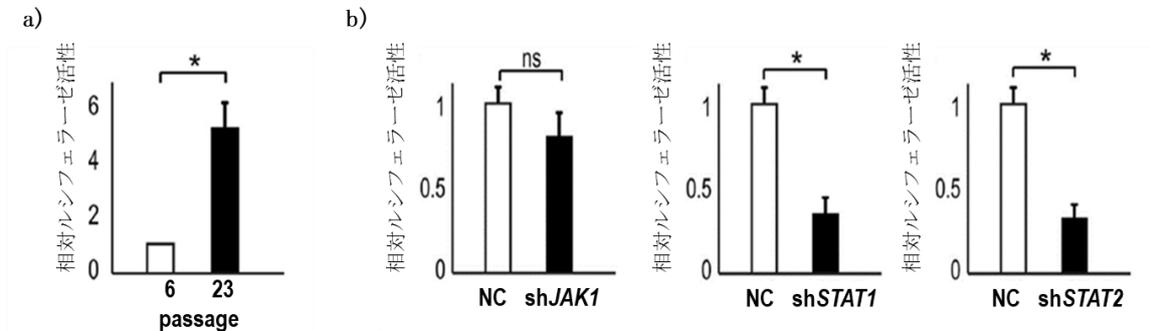


図 17 老化細胞において JAK1 は ISRE 活性に関与しない

- a) NHDF passage 6 と passage 23 に ISRE-luc レポーターコンストラクトをそれぞれトランスフェクションし、ルシフェラーゼ発現量を測定した。NHDF passage 23 では passage 6 に比しルシフェラーゼ活性が増加していた。
- b) shRNA レンチウイルスベクターで NHDF passage 24 の *JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をそれぞれノックダウンしたのち(sh*JAK1*、sh*STAT1*、sh*STAT2*)、ISRE-luc をトランスフェクションしレポーターアッセイを行った。*STAT1*、*STAT2* のノックダウンではルシフェラーゼ活性が低下するのに対し *JAK1* のノックダウンではルシフェラーゼ活性が低下しなかった。各実験は 3 回の独立した計測により再現性を確認した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

実際の ISGs の発現変化を検証するため、*JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンした passage 24 の老化細胞で、Western blotting を行った。すると予想通り、sh*JAK1* では Mx1 の発現に変化はみられないが、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンすると Mx1 の発現が抑制された (図 18a、b、c)。その他の ISGs については定量 PCR を行った。すると *STAT1*、*STAT2* のノックダウン群では *IFIT3*、*OASL*、*ISG15*、*IFI27* の発現が低下していた。一方で、*JAK1* をノックダウンした群では、明らかな ISGs の発現低下はなかった (図 18d)。

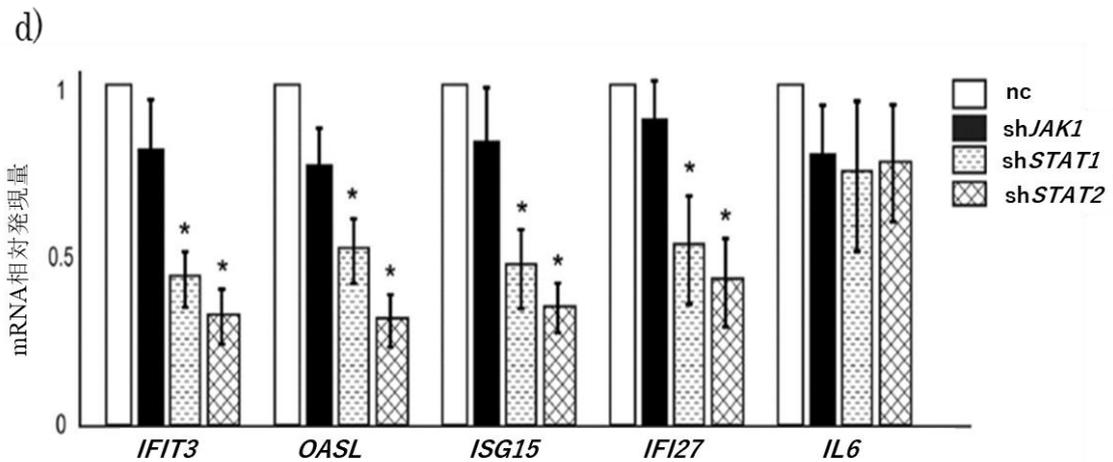
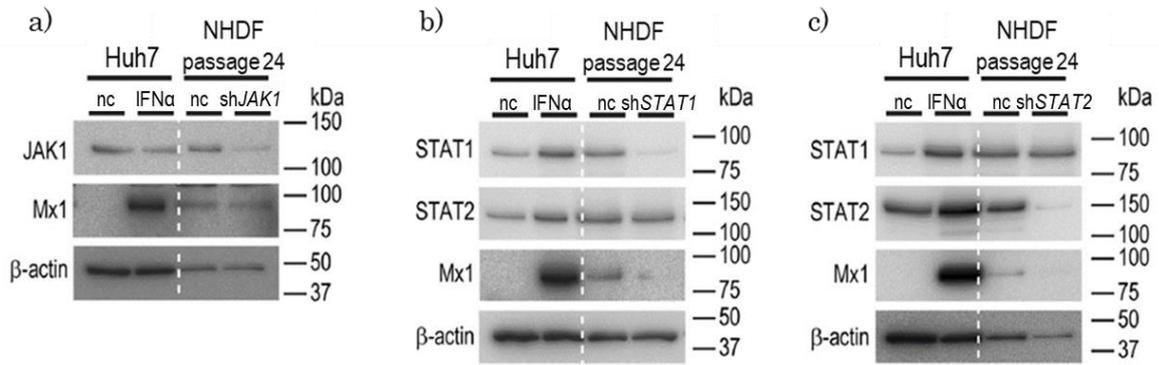


図 18 JAK1 は老化細胞における ISGs の発現に関与しない

- a) b) c) NHDF passage 24 で *JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をそれぞれノックダウンし Western blotting を行った。*JAK1* のノックダウンでは Mx1 の発現が低下しないのに対し、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンした老化細胞では Mx1 の発現が低下した。Huh7 に IFN を 12 時間添加したのち回収したものを positive control、無処置のものを negative control とした。
- d) 上記の *JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンした NHDF passage 24 で ISGs の mRNA を定量 PCR で測定したところ、*STAT1*、*STAT2* のノックダウン群でのみ ISGs の発現が低下した。各実験は 3 回の独立した計測により再現性を確認した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

以上の結果から、老化細胞での ISGs の発現は、*STAT1*、*STAT2* は関与しているが、*JAK1* とは独立しており、IFN の刺激に依存しないことが示唆された。

## ⑥ 肝組織アレイでの検討

ここまで *in vitro* で得られた知見が、*in vivo* でも起きているか検証するため、肝組織アレイで免疫組織染色を行い、STAT1、STAT2 の発現が年齢に応じて変化するか検討した。すると、STAT1 は肝実質細胞では明らかな違いを認めなかったが、肝星細胞では 50 歳以上の高齢患者において、30 歳代までの若年患者と比し、細胞質と核のいずれにおいても発現が増加していた。STAT2 は、肝実質細胞と肝星細胞の両方で、高齢患者で濃染を認めた (図 19a、b)。

これらの結果は、生体内でもヒトの特定の細胞内において、加齢とともに STAT1、STAT2 の発現が増加していることを示唆しており、本研究で示した ISGs の発現に関与しているかもしれない。

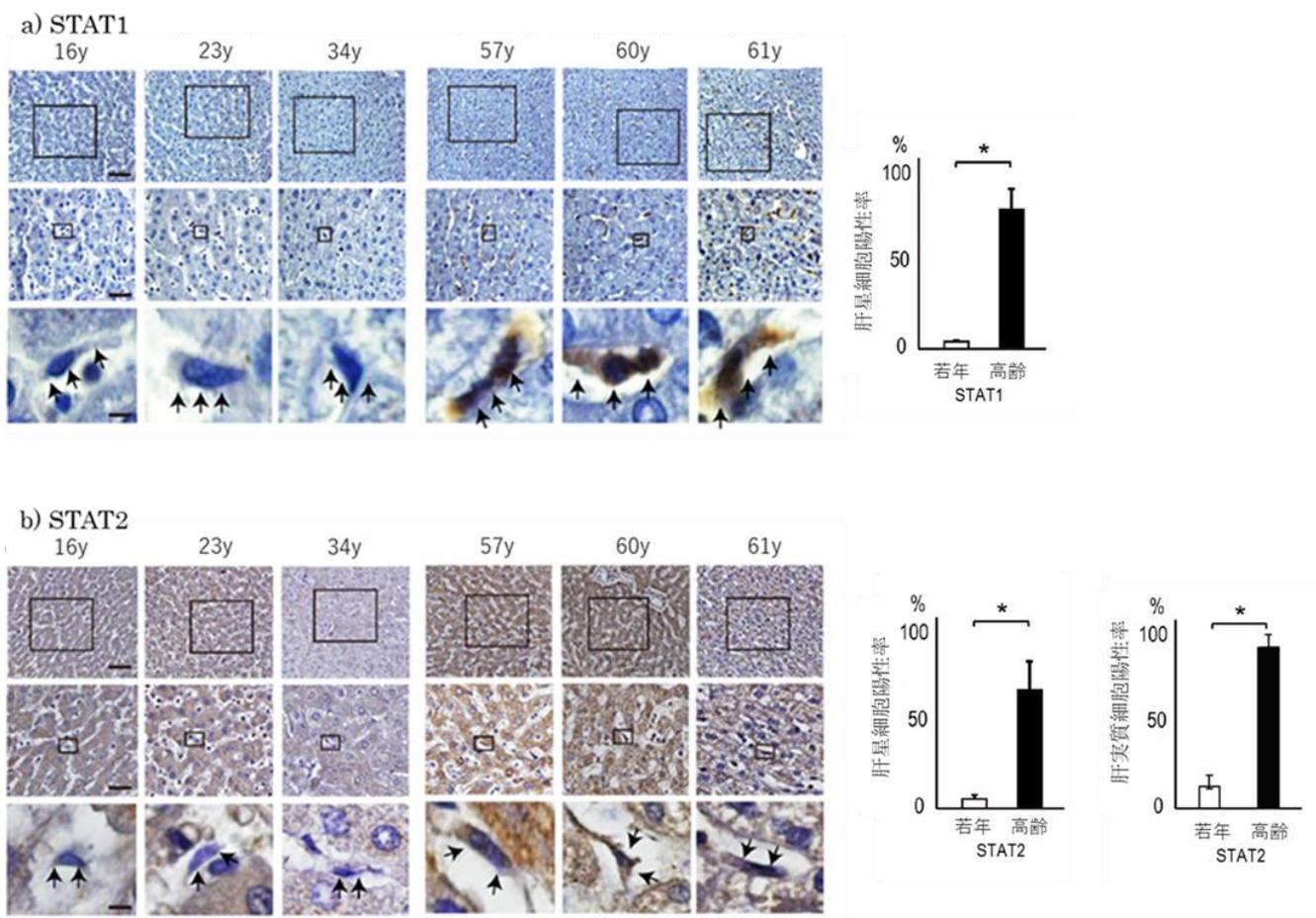


図 19 高齢患者の肝星細胞では STAT1、STAT2 の発現が増加している

a) 肝組織アレイを用いて STAT1 の免疫組織染色を行った。すると 50 歳以上の高齢患者で肝星細胞の細胞質と核の両方で STAT1 の発現が増加していた。矢印は肝星細胞を示す。バーの長さは上段 1mm、中段 100 $\mu$ m、下段 10 $\mu$ m。

b) STAT2 の免疫組織染色では、肝実質細胞と肝星細胞の両方で高齢患者での発現が増加していた。矢印は肝星細胞を示す。バーの長さは上段 1mm、中段 100 $\mu$ m、下段 10 $\mu$ m。一視野ごとに 20 個の肝星細胞をカウントし 5 視野における陽性率を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ 。

## 4. 考察

老化は、がんをはじめとする様々な疾患の重大なリスクファクターである[2]。しかし老化に伴い疾患が増える分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多く残されている。

老化細胞は、DNA ダメージを生じさせる様々な刺激により増殖を停止した細胞で、加齢にともない体内に蓄積していくことが報告されている[10]。細胞老化は強力ながん抑制機構と考えられている一方、静止状態の細胞や最終分化した細胞とは違い、SASP を引き起こし炎症や腫瘍形成に促進的に働くことが報告されている[7,8,12,13,19,39-41]。

加齢に伴い体内では、持続的な低レベルの炎症が起きており、老化関連疾患の根底になっていると考えられている。感染や外傷などによらない老化に伴う無菌性の慢性炎症は、inflammaging とよばれ、老化細胞がもたらす SASP は inflammaging を引き起こす原因の 1 つとして考えられている[3,21,42-44]。

ISGs の発現は、典型的には IFN の刺激によりリン酸化された STAT1 と STAT2 が、IRF9 と 3 量体 (ISGF3) を形成し、核内に移行することで誘導される。一方で、IFN とは独立して、非リン酸化 STAT1、STAT2 による非リン酸化 ISGF3 が、恒常的な ISGs の発現を引き起こしていることが一部の細胞で報告されている。生理的条件下の恒常的な ISGs の発現はウイルス感染時の迅速な免疫応答において重

要な役割を担っていると考えられている[26-28]。しかし、ISGs の恒常的異常高発現は、一部のウイルスに対する治療抵抗性に関与していることや、腫瘍形成を促進することなどが報告されている[29-32]。

本研究では複製老化させた NHDF において、ISGs の高発現が起きており、それが、通常の IFN による JAK-STAT 経路とは異なり、非リン酸化 STAT1、STAT2 を伴う非リン酸化 ISGF3 による経路で誘導されることを示した。

ISGs は免疫応答に重要な役割を担っているが、ISGs の老化細胞特異的な作用についてはこれまで報告がなく、ISGs が SASP や老化に伴う慢性炎症にどの程度寄与しているかについては、現時点では不明である。しかし、ISGs が高発現している細胞では IFN への反応性が低下していることや、腫瘍の場合には治療抵抗性を示すことなどから、老化細胞における ISGs の高発現は、老化関連疾患の病態に関与している可能性がある。

また、今回は主に STATs のリン酸化について検討したが、例えばメチル化やアセチル化などのタンパク質の変化がリン酸化 STAT 非依存性の ISGs 発現に関与している可能性も否定はできない[45,46]。このような STAT1、STAT2 の翻訳後修飾や、非リン酸化 STAT が増加するメカニズム、またそれらがどのようにして核へ移行するかについても、今後検証が必要である。

非リン酸化 STAT の増加が、一部の細胞や組織で DNA ダメージに抵抗性を示すことが報告されており[25,30,47]、もしかすると、非リン酸化 STAT の増加は、

今回の老化細胞での検討のように、細胞に DNA ダメージが加わった結果を反映しているのかもしれない。いずれにせよ、老化細胞では、どのような経路で非リン酸化 ISGF3 が増えるのかというメカニズムは今後の解明すべき課題といえる。

さらに最近、老化細胞が慢性炎症を引き起こす機序として、老化細胞内に蓄積する断片化した核や DNA 断片が、DNA センサーの 1 つである cGAS-STING 経路のリガンドとして作用していることが報告されている[48]。cGAS-STING 経路は細胞質に侵入したウイルスや細菌関連の DNA を認識する自然免疫レセプターで、環状ヌクレオチドの合成を触媒し、小胞体にある STING というタンパク質を活性化し、I型インターフェロンの発現を誘導する。また、核から生じた DNA 断片だけでなく、老化細胞ではレトロトランスポゾンの 1 つである LINE1 (L1)由来の cDNA も同様の経路で IFN の発現を誘導し炎症を惹起していることが報告されている[49]。レトロトランスポゾンはゲノム上を自由に動き回れる活性を持つ 1kb 程度の繰り返し DNA 配列で、転移因子と呼ばれている。レトロトランスポゾンが重要な遺伝子上に挿入されると重大な遺伝子変異が生じる可能性があるため、通常は、小分子 RNA などにより抑制機構が働いている。しかし、老化細胞では抑制機構が破綻し、レトロトランスポゾンが再活性化する結果、L1 由来の cDNA が細胞質で増加し、cGAS-STING 経路で IFN 発現が誘導されると考えられている。これらの報告では、IFN の発現が増えている点で、本研究結果とは異なる。しかし近年、老化細胞は細胞増殖を停止してから静止状態にあるわけではなく、多段階のステップで多様化し

ていくことが明らかになってきており、本研究は IFN の産生をきたす前の初期の細胞老化の変化を見ている可能性もある[50]。

さらに、本研究の中では、老化細胞として複製老化させた正常ヒト皮膚線維芽細胞と、Werner 症候群の皮膚線維芽細胞を使用した。細胞老化の特徴は細胞や臓器、また DNA ダメージの種類によって違ってくる可能性がある。実際に、肝臓組織アレイで、STAT1 の発現は肝星細胞と、肝実質細胞で違っていた。したがって今後、組織や細胞ごとに、様々な状況下で非リン酸化 STAT がどのように変化するかを検証することが必要であると考えられる。

個体における老化細胞の蓄積ががんをはじめとする様々な加齢性疾患の発症にかかわっていることが、数多く報告され、さらにそれらの老化細胞を除去することで動脈硬化やアルツハイマー病などの加齢性疾患の発症が顕著に抑制されることも報告されるようになった[13,51]。その結果、老化細胞を除去する薬 (senolytic 薬) や、老化細胞の機能を抑制する薬物の開発が進められている[41,52-55]。しかしながら、老化細胞には創傷治癒の促進や発がんの抑制など、有益な機能もあること、そして何より老化細胞の詳細な生理機能はいまだ完全に理解されていないことから、抗加齢薬としてのヒトへの応用は困難な状況であると言わざるを得ない。今後、老化細胞の生理機能がより深く解明されれば、副作用が少なく、老化細胞の有害な機能のみを除外する抗加齢薬の開発が可能となるかもしれない。

個体の老化は、今回検討した細胞老化以外にも幹細胞老化や エピジェネテ

ニックな変化など、非常に複雑な分子機構により引き起こされており[56]、いまだ未解明の機序も多数残されていると考えられる。本研究の中で、我々が見出した、老化線維芽細胞における非リン酸化 STATs による ISGs の発現も老化細胞が慢性炎症を引き起こしている新規の炎症惹起機構の可能性がある[57]。非リン酸化 STATs のさらなる機能解明が、老化や老化関連疾患を予防する新たな治療法の発展の一助となることを期待したい。

## 6. 結語

老化細胞では、IFN 非依存的に ISGs の発現が誘導されており、その機序として、非リン酸化 ISGF3 が核内に移行し、ISGs の発現を誘導していることを見出した。これは、老化細胞における新規の ISGs 発現制御機構の可能性がある。さらなる STAT1、STAT2 の機能の解明は、老化や老化関連疾患を予防する新たな治療法の発展を可能にするかもしれない。

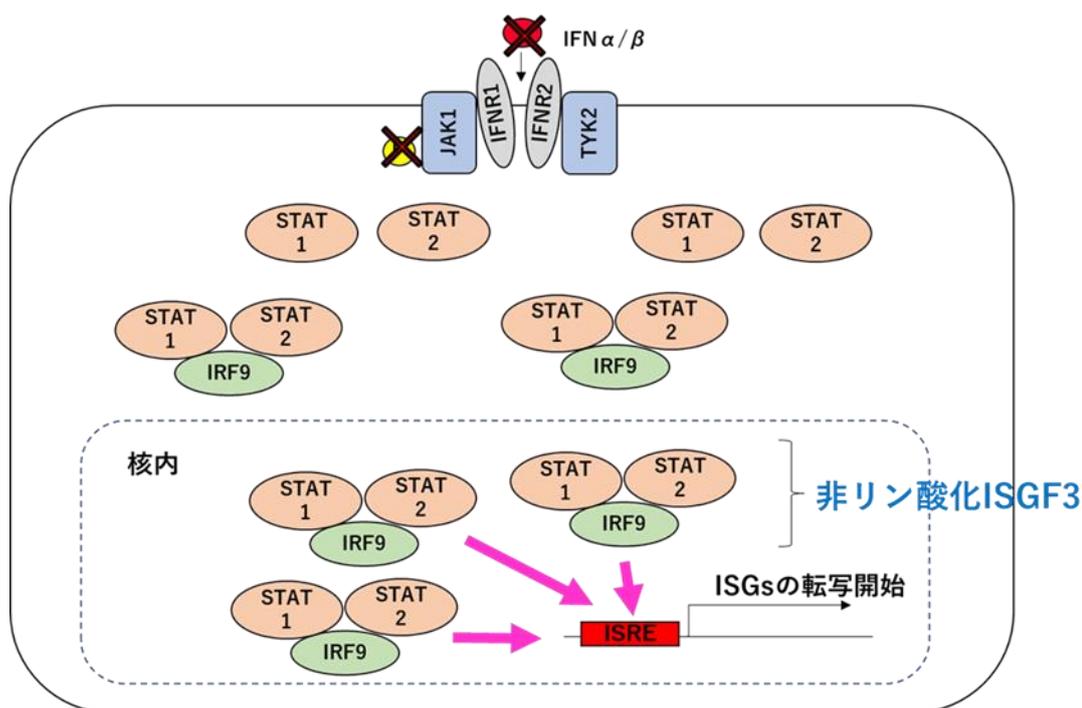


図 20 老化細胞における ISGs 発現誘導のイメージ図

老化細胞では IFN 非依存的に ISGs が高発現している。その機序として、老化細胞では非リン酸化 STATs が増加し、非リン酸化 ISGF3 を形成することで、ISGs の発現を誘導している。

## 7. 引用文献

1. 内閣府 令和元年度高齢社会白書
2. Niccoli, T. & L. Partridge Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*, 22, R741-52, 2012.
3. Tchkonina, T., Y. Zhu, J. van Deursen, J. Campisi & J. L. Kirkland Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 123, 966-72, 2013.
4. Hayflick, L. & P. S. Moorhead The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621, 1961.
5. Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, M. Peacocke & J. Campisi A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7, 1995.
6. Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner & W. E. Wright Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349-52, 1998.

7. Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach & S. W. Lowe Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602, 1997.
8. Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci & F. d'Adda di Fagagna Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444, 638-42, 2006.
9. Campisi, J. & F. d'Adda di Fagagna Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40, 2007.
10. Yamakoshi, K., A. Takahashi, F. Hirota, R. Nakayama, N. Ishimaru, Y. Kubo, D. J. Mann, M. Ohmura, A. Hirao, H. Saya, S. Arase, Y. Hayashi, K. Nakao, M. Matsumoto, N. Ohtani & E. Hara Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol*, 186, 393-407, 2009.
11. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120, 513-22, 2005.
12. Mooi, W. J. & D. S. Peeper Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med*, 355, 1037-46, 2006.

13. Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland & J. M. van Deursen Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479, 232-6, 2011.
14. Baker, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. C. Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D. Miller & J. M. van Deursen Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530, 184-9 2016.
15. Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos & J. Campisi Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11, 973-9, 2009.
16. Demaria, M., N. Ohtani, S. A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J. R. Mitchell, R. M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M. E. Dolle, J. H. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara & J. Campisi An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31, 722-33, 2014.
17. Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez & J. Campisi Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68, 2008.

18. Liu, D. & P. J. Hornsby Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*, 67, 3117-26, 2007.
19. Yoshimoto, S., T. M. Loo, K. Atarashi, H. Kanda, S. Sato, S. Oyadomari, Y. Iwakura, K. Oshima, H. Morita, M. Hattori, K. Honda, Y. Ishikawa, E. Hara & N. Ohtani Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499, 97-101, 2013.
20. Minamino, T., M. Orimo, I. Shimizu, T. Kunieda, M. Yokoyama, T. Ito, A. Nojima, A. Nabetani, Y. Oike, H. Matsubara, F. Ishikawa & I. Komuro A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*, 15, 1082-7, 2009.
21. Ferrucci, L. & E. Fabbri Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*, 15, 505-522, 2018.
22. Schneider, W. M., M. D. Chevillotte & C. M. Rice Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, 32, 513-45, 2014.
23. Stark, G. R. & J. E. Darnell, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36, 503-14, 2012.
24. Kiu, H. & S. E. Nicholson Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*, 30, 88-106, 2012.
25. Cheon, H., E. G. Holvey-Bates, J. W. Schoggins, S. Forster, P. Hertzog, N. Imanaka, C. M. Rice, M. W. Jackson, D. J. Junk & G. R. Stark IFNbeta-dependent

increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage.

*Embo j*, 32, 2751-63, 2013.

26. Wang, W., Y. Yin, L. Xu, J. Su, F. Huang, Y. Wang, P. P. C. Boor, K. Chen, W.

Cao, X. Zhou, P. Liu, L. J. W. van der Laan, J. Kwekkeboom, M. P. Peppelenbosch & Q.

Pan Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections. *Sci Signal*, 10, 2017.

27. Zurney, J., K. E. Howard & B. Sherry Basal expression levels of IFNAR and Jak-

STAT components are determinants of cell-type-specific differences in cardiac antiviral responses. *J Virol*, 81, 13668-80, 2007.

28. Seng, L. G., J. Daly, K. C. Chang & S. V. Kuchipudi High basal expression of

interferon-stimulated genes in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells contributes to influenza A virus resistance. *PLoS One*, 9, e109023, 2014.

29. Sarasin-Filipowicz, M., E. J. Oakeley, F. H. Duong, V. Christen, L. Terracciano,

W. Filipowicz & M. H. Heim Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7034-9, 2008.

30. Dill, M. T., F. H. Duong, J. E. Vogt, S. Bibert, P. Y. Bochud, L. Terracciano, A.

Papassotiropoulos, V. Roth & M. H. Heim Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C.

*Gastroenterology*, 140, 1021-31, 2011.

31. Luszczyk, W., V. Cheriya, T. M. Mekhail & E. C. Borden Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol Cancer Ther*, 9, 2309-21, 2010.
32. Khodarev, N. N., B. Roizman & R. R. Weichselbaum Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res*, 18, 3015-21, 2012.
33. Lee, Y. A., E. J. Cho & T. Yokozawa Protective effect of persimmon (*Diospyros kaki*) peel proanthocyanidin against oxidative damage under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular senescence. *Biol Pharm Bull*, 31, 1265-9, 2008.
34. Imai, S. I. & L. Guarente It takes two to tango: NAD(+) and sirtuins in aging/longevity control. *NPJ Aging Mech Dis*, 2, 16017, 2016.
35. Horinouchi, T., K. Terada, T. Higashi & S. Miwa Using Phos-Tag in Western Blotting Analysis to Evaluate Protein Phosphorylation. *Methods Mol Biol*, 1397, 267-277, 2016.
36. Epstein, C. J., G. M. Martin, A. L. Schultz & A. G. Motulsky Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)*, 45, 177-221, 1966.

37. Furuichi, Y. Premature aging and predisposition to cancers caused by mutations in RecQ family helicases. *Ann N Y Acad Sci*, 928, 121-31, 2001.
38. Opresko, P. L. Telomere ResQue and preservation--roles for the Werner syndrome protein and other RecQ helicases. *Mech Ageing Dev*, 129, 79-90, 2008.
39. Campisi, J., J. K. Andersen, P. Kapahi & S. Melov Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*, 21, 354-9, 2011.
40. Childs, B. G., D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi & J. M. van Deursen Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, 15, 1139-53, 2014.
41. Tchkonina, T. & J. L. Kirkland Aging, Cell Senescence, and Chronic Disease: Emerging Therapeutic Strategies. *Jama*, 320, 1319-1320, 2018.
42. Franceschi, C. & J. Campisi Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S4-9, 2014.
43. Franceschi, C., M. Capri, D. Monti, S. Giunta, F. Olivieri, F. Sevini, M. P. Panourgia, L. Invidia, L. Celani, M. Scurti, E. Cevenini, G. C. Castellani & S. Salvioli Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, 128, 92-105, 2007

44. Campisi, J., P. Kapahi, G. J. Lithgow, S. Melov, J. C. Newman & E. Verdin From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*, 571, 183-192, 2019.
45. Zhuang, S. Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell Signal*, 25, 1924-31, 2013.
46. Chen, K., J. Liu, S. Liu, M. Xia, X. Zhang, D. Han, Y. Jiang, C. Wang & X. Cao Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity. *Cell*, 170, 492-506.e14, 2017.
47. Yan, S. J., S. J. Lim, S. Shi, P. Dutta & W. X. Li Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability. *Faseb j*, 25, 232-41, 2011
48. Takahashi, A., T. M. Loo, R. Okada, F. Kamachi, Y. Watanabe, M. Wakita, S. Watanabe, S. Kawamoto, K. Miyata, G. N. Barber, N. Ohtani & E. Hara Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun*, 9, 1249, 2018.
49. De Cecco, M., T. Ito, A. P. Petrashen, A. E. Elias, N. J. Skvir, S. W. Criscione, A. Caligiana, G. Broccoli, E. M. Adney, J. D. Boeke, O. Le, C. Beausejour, J. Ambati, K. Ambati, M. Simon, A. Seluanov, V. Gorbunova, P. E. Slagboom, S. L. Helfand, N. Neretti & J. M. Sedivy L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, 566, 73-78, 2019.

50. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509, 439-46, 2014.
51. Mikawa, R., Y. Suzuki, H. Baskoro, K. Kanayama, K. Sugimoto, T. Sato & M. Sugimoto Elimination of p19(ARF) -expressing cells protects against pulmonary emphysema in mice. *Aging Cell*, 17, e12827, 2018.
52. Yosef, R., N. Pilpel, R. Tokarsky-Amiel, A. Biran, Y. Ovadya, S. Cohen, E. Vadai, L. Dassa, E. Shahar, R. Condiotti, I. Ben-Porath & V. Krizhanovsky Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*, 7, 11190, 2016.
53. Schafer, M. J., T. A. White, K. Iijima, A. J. Haak, G. Ligresti, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, J. Birch, H. Salmonowicz, Y. Zhu, D. L. Mazula, R. W. Brooks, H. Fuhrmann-Stroissnigg, T. Pirtskhalava, Y. S. Prakash, T. Tchkonja, P. D. Robbins, M. C. Aubry, J. F. Passos, J. L. Kirkland, D. J. Tschumperlin, H. Kita & N. K. LeBrasseur Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*, 8, 14532, 2017.
54. Justice, J. N., A. M. Nambiar, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, R. Pascual, S. K. Hashmi, L. Prata, M. M. Masternak, S. B. Kritchevsky, N. Musi & J. L. Kirkland Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 40, 554-563, 2019.
55. Kirkland, J. L., T. Tchkonja, Y. Zhu, L. J. Niedernhofer & P. D. Robbins The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc*, 65, 2297-2301, 2017.

56. Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano & G. Kroemer The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-217, 2013.
57. Yamagami, M., M. Otsuka, T. Kishikawa, K. Sekiba, T. Seimiya, E. Tanaka, T. Suzuki, R. Ishibashi, M. Ohno & K. Koike ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *NPJ Aging Mech Dis*, 4, 11, 2018.

## 8. 謝辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりまして東京大学消化器内科大塚基之先生に特に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

その他、様々な点で御協力いただいた東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。