

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 山上 まり

日本をはじめ世界中で高齢化が深刻な問題となっている。加齢は、様々な疾患の重大なリスクファクターであり、高齢社会においていかに健康長寿を目指すかは社会全体の課題といえる。そしてそのために老化や老化関連疾患の生理的メカニズムを解明することが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、ある一定回数細胞分裂を繰り返すと、増殖を停止する。この現象は細胞老化と呼ばれている。継代培養による複製老化のほか、がん遺伝子の活性化や酸化ストレスなど、様々な DNA ダメージによっても細胞は増殖を停止することが報告されており、これらはストレス誘導性細胞老化と呼ばれている。細胞老化は DNA ダメージを受けた細胞が危険な細胞増殖にいたるのを防いでいるため、重要ながん抑制機構であると考えられている。一方で、老化細胞が細胞老化随伴分泌現象 (SASP) を引き起こし、炎症や腫瘍形成を促進することで、生体の機能低下や老化関連疾患の発症に関与している可能性が示唆されている。老化細胞の機能は徐々に明らかになりつつあるが、いまだ不明な点も多く残されている。

今回我々は継代培養によりヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を複製老化させ、cDNA マイクロアレイで老化細胞と非老化細胞の網羅的 mRNA 発現の比較を行った。すると、老化細胞では多数の IFN 誘導遺伝子 (ISGs) の発現が増加していた。しかし驚くべきことに IFN ファミリー自体の発現は増加していなかった。定量 PCR でも検証したが、結果は同様で、老化細胞では *IL6* や ISGs の著明な発現増加を認める一方、*IFNA1*、*IFNB1* の明らかな増加はなかった。

ISGs は、細胞がウイルスなどの侵入を受けた際に、インターフェロン (IFN) により誘導される遺伝子群で、様々な免疫応答に関与している。IFN が細胞膜上の受容体である IFN 受容体に結合すると、そこに結合している JAK1、TYK2 がリン酸化され、細胞内の signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) および STAT2 をリン酸化する。リン酸化した STAT1、STAT2 は二量体を形成し、IFN regulatory factor 9 (IRF9) と結合して ISG factor 3 (ISGF3) と呼ばれる複合体を形成し核内に移行する。ISGF3 は ISGs のプロモーター領域に存在する IFN 応答配列 (ISRE) に結合し ISGs の転写を誘導する。上記が典型的な IFN 刺激を伴う JAK-STAT 経路であるが、近年 IFN 非依存的に発現している ISGs の機能が報告されている。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重要であるという報告や、その一方で、異常高発現は腫瘍形成促進や抗ウイルス療法への抵抗性など、負の効果をもたらすことも示唆されている。IFN 非存在下に ISGs の恒常的発現が引き起こされる機序として、非リン酸化 STATs を伴う非リン酸化 ISGF3 によって誘導されることが一部のオルガノイドやがん細胞において報告されている。

本研究では、複製老化させた老化線維芽細胞では非老化細胞に比べ、ISGs の発現が増加して

いた。その一方で、IFN の発現は増加していないことに気づいたことから、老化細胞における ISGs の発現も IFN 非依存的に非リン酸化 ISGF3 により誘導されているのではないかという仮説を立てて検討を行った。

ISGs は通常、リン酸化 ISGF3 が核内に移行することで誘導されるため、免疫細胞染色で、STAT1、STAT2、IRF9 の細胞内局在を検証した。すると、老化細胞ではいずれも有意に核内に移行していた。Western blotting で STATs のリン酸化について検討すると、老化細胞では STAT1、STAT2 の発現が増加していたが、リン酸化 STATs は検出されなかった。リン酸化抗体では検出できないチロシン残基以外のリン酸化の有無を検証するため Phos-tag アッセイを行ったがやはり老化細胞特異的なリン酸化 STATs の増加はなかった。

次に老化細胞において、非リン酸化 STAT1、STAT2 が ISGF3 を形成し、ISGs の発現を誘導しているか検証するため、免疫沈降と ChIP アッセイを行った。抗 IRF9 抗体を用いた免疫沈降で、老化細胞では IRF9 が STAT1、STAT2 と複合体を形成していることが示された。ChIP アッセイでは、抗 IRF9 抗体で落とした DNA で定量 PCR を行うと、老化細胞において ISGs である *IFI27*、*Mx1* のプロモーター領域が増幅された。以上より、老化細胞では非リン酸化 ISGF3 が ISGs を誘導していることが示された。

続いて、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った。Werner 症候群は *WRN* 遺伝子の変異で生じる常染色体劣性遺伝の早老症の一つで、*WRN* 遺伝子が DNA の修復や複製などに関与していることから、Werner 症候群の線維芽細胞は、早期に細胞老化をきたすと考えられている。実際に、Werner 症候群の線維芽細胞では SA- β -gal 活性や p16^{INK4A} などの発現が増加しており、細胞老化をきたしていた。STAT1、STAT2、IRF9 の免疫細胞染色を行うと、Werner 症候群ではそれらが核内に移行していた。定量 PCR では老化 NHDF と同様に、*IFNA1*、*IFNB1* の明らかな発現増加はないにもかかわらず、ISGs が高発現していた。Western blotting で STATs のリン酸化を検証すると STAT1、STAT2 ともに発現が増加している一方で、リン酸化体は検出されなかった。以上より Werner 症候群においても、非リン酸化 ISGF3 により ISGs の発現が誘導されていることが示唆された。

次に、老化細胞における ISGs 発現が JAK-STAT 経路とは独立しているかどうかを検証するため、STATs 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。shRNA を用いて老化 NHDF の *JAK1*、*STAT1*、*STAT2* をそれぞれノックダウンし、ISRE によりルシフェラーゼ発現が誘導されるレポーターコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った。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の低下を認めた、これは、老化細胞での ISRE 活性に STATs のリン酸化は関与しないことを示しており、老化細胞での ISGs 誘導が JAK-STAT 経路から独立していることが示唆された。またそれぞれのノックダウン群で Western blotting と定量 PCR を行うと、予想通り、*STAT1*、*STAT2* のノックダウン群では ISGs の発現が減少しているのに対し、*JAK1* のノックダウンでは有意な ISGs の発現低下はな

かった。これらの結果から、老化細胞での ISGs の発現は、STAT1、STAT2 は関与しているが、JAK1 とは独立していることが示された。

上記の *in vitro* で観察されたことの *in vivo* での検討として、肝組織アレイを用いて STAT1、STAT2 の免疫組織染色を行い、年齢によって STATs の発現に違いがあるか検証した。30 歳代までの若年患者と、55 歳以上の高齢患者を比較すると、STAT1 は肝実質細胞では有意差を認めなかったが、肝星細胞では高齢患者で発現が有意に増加していた。STAT2 は、高齢患者の肝実質細胞と肝星細胞の両方で、発現が増加していた。これらの結果は、ヒトの特定の細胞内で、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、本研究で示したような ISGs の発現に関与している可能性がある。

一方で最近、老化細胞において、核 DNA やレトロトランスポゾン由来の cDNA が細胞質内で増加し、cGAS-STING 経路を介して、IFN の発現を誘導していることが報告されている。これらの結果は IFN 発現が増加している点で本研究の結果とは異なっている。しかし、老化細胞は細胞増殖を停止してから多段階のステップで多様化していくことが報告されており、本実験で使用した老化細胞は比較的早期の老化現象を見ている可能性がある。したがって、今回見出した細胞老化に伴う ISGs の誘導機構は細胞や臓器ごと、また DNA ダメージの種類ごとに、詳細な検討が必要と考える。さらに本研究では主にリン酸化 STAT について検討したが、リン酸化以外の STAT の変化の有無や、非リン酸化 STAT が増えるメカニズム、さらに非リン酸化 ISGF3 がどのように核へ移行するかについても、今後解明すべき課題といえる。

上述したように、本研究では、老化細胞において IFN 非依存的に ISGs の発現が増加しており、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 発現誘導機構である。非リン酸化 STATs のさらなる機能解明は、老化や老化関連疾患を理解するうえでの一助となるかもしれない。