

論文の内容の要旨

論文題目 老化細胞特異的な生存維持因子の網羅的探索

氏名 周 翔宇

【序論】

細胞老化とは、度重なる細胞分裂によるテロメアの短縮や、DNA 傷害などの様々なストレス、がん遺伝子の活性化などによって、細胞周期が不可逆的に停止する現象である。細胞老化は、ストレスに応答して細胞分裂を停止させる細胞自律的な腫瘍抑制機構としての役割を持つと考えられてきたが、近年は老化細胞が炎症性サイトカインを含む様々な分泌因子を高発現する現象である「細胞老化随伴分泌現象」を介して様々な生理的役割を持つことも明らかになっている。これまでに、生体において細胞老化を起こした細胞（老化細胞）が加齢に伴い増加することや、加齢性疾患の病変部位において老化細胞が観察されることなどから、細胞老化が個体老化に関与することが示唆されてきた。近年、成体マウスにおいて、細胞老化マーカーである p16 を発現する細胞に細胞死を誘導することや、老化細胞選択的に細胞死を引き起こす化合物を投与することによって、加齢に伴う機能低下が緩和し、健康寿命が延伸することが報告され、老化細胞が個体老化に対して促進的に働くことが示された。そのため、老化細胞選択的な細胞死の誘導（“senolysis”と呼ばれる）が加齢関連疾患に対する治療戦略として有力視されており、その手法の探索が盛んに行われている。しかし、senolysis を引き起こす上で重要な標的となる、老化細胞特異的な生存維持機構はほとんど明らかになっていない。そこで私は本研究において、老化細胞特異的な生存維持因子を新たに同定することを目的としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った。

【方法・結果】

1. 老化細胞特異的な生存維持因子を同定するための siRNA スクリーニング系の構築

本研究では、正常なヒト線維芽細胞（正常細胞）および DNA 傷害性の薬剤であるドキソルビシンによって細胞老化を誘導した同細胞（老化細胞）のそれぞれに対して、約 18,000 個のヒト遺伝子に対する siRNA を個別に処置し、発現抑制により老化細胞選択的に生存度が低下する遺伝子を陽性とするゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことにした。

ゲノムワイド siRNA スクリーニングでは、多数の実験条件におけるデータを high-throughput かつ高精度に得る実験系を構築することが重要である。私は、予めゲノムワイド siRNA ライブラリーを分注した 384 ウェルプレートにおいて、正常細胞または老化細胞の各遺伝子を発現抑

制し、細胞の生存への影響を評価する実験系を構築した。細胞の生存度は、細胞内の脱水素酵素群の活性に比例して吸光物質を生じる試薬を培地に添加し、吸光度を測定することで定量した。本実験系は、細胞の播種からデータの取得に至るまでの操作を自動分注機およびプレートリーダーにより自動化した high-throughput な系である。また、正常細胞および老化細胞の両方において、生存に必要な既知の遺伝子の発現抑制による生存度の低下を十分な精度 ($Z' > 0.5$) で検出可能な系であることも確認された。以上より、スクリーニングに適用可能な high-throughput かつ高精度な実験系を構築できたと判断した。

2. 老化細胞特異的な生存維持因子のゲノムワイド siRNA スクリーニング

前述のスクリーニング系を用いて、1 遺伝子あたり 4 種類の pooled siRNA からなるゲノムワイド siRNA ライブラリーによる 1 次スクリーニングを実行した。測定した吸光度の値は robust Z-score に変換し、プレート間の比較を可能にした。1 次スクリーニングの結果、発現抑制によって顕著に細胞の生存度が低下した (robust Z-score < -2.5) 遺伝子を生存に必要な遺伝子としたところ、正常細胞では 670 個、老化細胞では 232 個の遺伝子がこれに該当した。これらの遺伝子に対して gene ontology 解析を行った結果、正常細胞ではリボソームタンパク質をコードする遺伝子が生存に必要な遺伝子の中に集中していた一方、老化細胞の生存に必要な遺伝子の中に特定の gene ontology を持つ遺伝子の集中は見られなかった。また、老化細胞の生存に必要な遺伝子の半数近くは正常細胞では生存に必要でない遺伝子であった。これらの結果から、正常細胞と老化細胞は少なくとも部分的には異なる生存維持機構を持つことが示唆された。次に、両細胞のスクリーニングにおける robust Z-score をもとに、発現抑制により老化細胞選択的に細胞の生存度が低下した 184 個の遺伝子を 1 次スクリーニングの陽性遺伝子として選出した。また、陽性遺伝子の選出基準となる閾値付近の陰性遺伝子のうち、陽性遺伝子や細胞老化、細胞死との関連が報告されている遺伝子が 21 個存在し、陽性遺伝子とともに 2 次スクリーニングの対象遺伝子とした。2 次スクリーニングでは、1 次スクリーニングと同様の実験系を用いて、1 遺伝子あたり 4 種類の individual siRNA によるスクリーニングを行うことで、偽陽性の排除を行った。その結果、4 種類中 2 種類以上の siRNA において老化細胞選択的に細胞の生存度が低下し、かつ再現性が確認される陽性遺伝子を 10 個同定した。

3. 老化細胞特異的な生存維持因子としての *CHMP2A* 遺伝子の同定

スクリーニングにより得られた陽性遺伝子が、通常スケールの実験条件でも老化細胞における生存に必要であるか否かを追証した。その結果、少なくとも 5 個の陽性遺伝子については、発現抑制によって老化細胞の生存度が正常細胞の生存度と比較して有意に低下した。さらに、細胞に HRAS の恒常活性化型変異体を過剰発現させることにより細胞老化を誘導するがん遺伝子誘導

性細胞老化モデルにおいても、これら 5 個の遺伝子の発現抑制実験を行った結果、*CHMP2A* 遺伝子でのみ複数の siRNA において老化細胞の生存度が正常細胞の生存度と比較して有意に低下した。これらの結果から、スクリーニングにおいて陽性遺伝子として同定された *CHMP2A* 遺伝子が老化細胞特異的な生存維持因子であると判断した。

4. 細胞老化による *CHMP2A* の細胞内局在変化

CHMP2A の遺伝子産物がどのようにして老化細胞特異的な生存維持機能を持つのかを知るために、まず細胞老化によって *CHMP2A* が発現上昇するか否かを検証したところ、*CHMP2A* のタンパク質発現量は細胞老化によって上昇しないことが分かった。そこで私は、*CHMP2A* の細胞内局在や翻訳後修飾などに変化が生じている可能性を考え、正常細胞および老化細胞における *CHMP2A* の細胞内局在を蛍光免疫染色法を用いて調べた。その結果、正常細胞においては *CHMP2A* が細胞内にほぼ一様に検出された一方で、老化細胞においては *CHMP2A* が核内的一部分に集積することが判明した。老化細胞における *CHMP2A* の集積部位は核小体マーカーと共局在を示したことから、*CHMP2A* が細胞老化によって核小体へ集積するようになることが明らかになった。

【考察・展望】

私は本研究において、老化細胞特異的な生存維持因子を同定するためのゲノムワイド siRNA スクリーニング系を構築した。そして、構築したスクリーニング系を用いて、約 18,000 個のヒト遺伝子から 10 個の陽性遺伝子を同定し、陽性遺伝子の中から複数の細胞老化誘導モデルにおいて老化細胞特異的に生存維持に必要である因子として *CHMP2A* 遺伝子を同定した。さらに、老化細胞において *CHMP2A* が核小体に集積することを見出した。*CHMP2A* は、細胞内の様々な生体膜のリモデリングを行うタンパク質複合体である ESCRT-III の構成因子であるが、これまでに *CHMP2A* を含め ESCRT-III が膜を持たない核内構造体である核小体において機能を持つかどうかは知られておらず、今回見出した *CHMP2A* の局在変化は、老化細胞において *CHMP2A* が新規機能を介して生存維持に寄与することを示唆する点で興味深いものである。今後、*CHMP2A* がどのような機構で老化細胞の生存に寄与するかを解析することにより、生体において老化細胞選択的に細胞死を誘導する上での新たな標的を提示することが可能になると期待される。