

## 加齢性疾患制御を目指した創薬研究

公益財団法人がん研究会がん研究所細胞老化研究部

高橋 暁子

細胞老化は加齢・肥満などの内因性ストレスや放射線・化学療法などの外因性ストレスによって誘導され、遺伝子変異をもった細胞の増殖を抑制する重要ながん抑制機構として機能する (Takahashi *et al.*, Nature Cell Biol., 2006; Qian *et al.*, DNA Repair, 2023)。しかしその一方で、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞が、炎症性蛋白質などを高発現し周囲に分泌するSASP (Senescence-associated secretory phenotype) を介して、さまざまな加齢性疾患の発症や病態の悪化に関与することが明らかとなってきた (Loo *et al.*, Cancer Sci., 2020; Ebata *et al.*, Cells, 2022)。私たちはこれまでに、ヒストン修飾や核酸センサーの活性化を介したSASPの誘導メカニズムや (Takahashi *et al.*, Mol. Cell, 2012; Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2018)、老化細胞が分泌するSASP因子の生体機能の解析を行ってきた (Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2017; Yasuda *et al.*, Cell Rep., 2021; Igarashi *et al.*, Nature Commun., 2022)。そして、老化細胞がSASPをおこすには、ゲノム上のペリセントロメアの反復配列領域 (サテライトII領域) におけるクロマチンの構造変化とその領域から転写されるnon-coding RNA (サテライトII RNA) の発現が重要であることを報告した (Miyata *et al.*, PNAS, 2021; Miyata *et al.*, Nucleus, 2022)。サテライトII RNAは染色体構造維持に重要なCTCF (CCCTC-binding factor) と結合し、そのDNA結合能を阻害することで炎症性遺伝子座の染色体相互作用を変化させる。この染色体構造の異常とサテライトII RNAの高発現は、加齢性疾患の発症を促す炎症性遺伝子群の発現と染色体不安定性を誘導することから、加齢性疾患制御の標的としての可能性を探るために、細胞老化が誘導される過程におけるエピゲノム変化の解析を行った。

まず、ヒトの正常線維芽細胞 (TIG-3) に継代培養による細胞老化を誘導する過程でゲノムDNAのサテライトII領域の形態変化を可視化するために、DNA-FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法を用いて経時的に解析を行った。その結果、細胞老化に伴いサテライトII領域の形が膨張していく様子が観察された (図1上)。続いて、サテライトII領域の膨張に伴い相互作用が変化したゲノム領域を明らかにするために4C-seq (circularized chromosome conformation capture sequencing) 解析を行った結果、正常な細胞では見られない7,522箇所 of ゲノム領域と新たに相互作用していることを発見し、これらの領域をDRISR (Distinctive Regions Interacted with Satellite II in Replicative Senescent Fibroblasts) と命名した (図1下)。このDRISR領域のDNA配列解析から、STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)、NFkB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) やCTCFなどの細胞老化や炎症に関連のある遺伝子群を制御している転写因子の結合領域が集積していることが明らかとなった。次に、これらのサテライトII領域のエピゲノム異常が、腫瘍を構成する細胞集団でも起きている可能性を検証するために、肺がん、大腸がん、胃がん、乳がん、膵がんの22種類のがん細胞株におけるサテライトII RNAの発現レベルを調べたところ、老化細胞

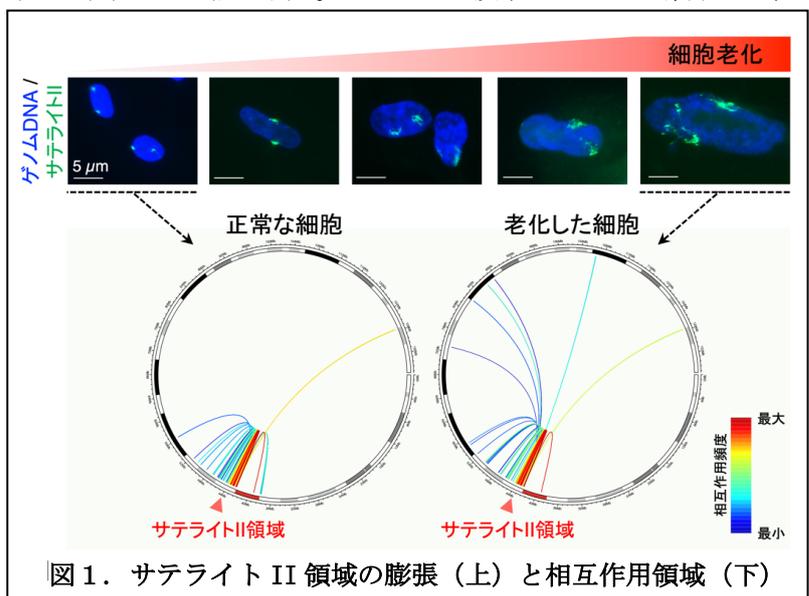
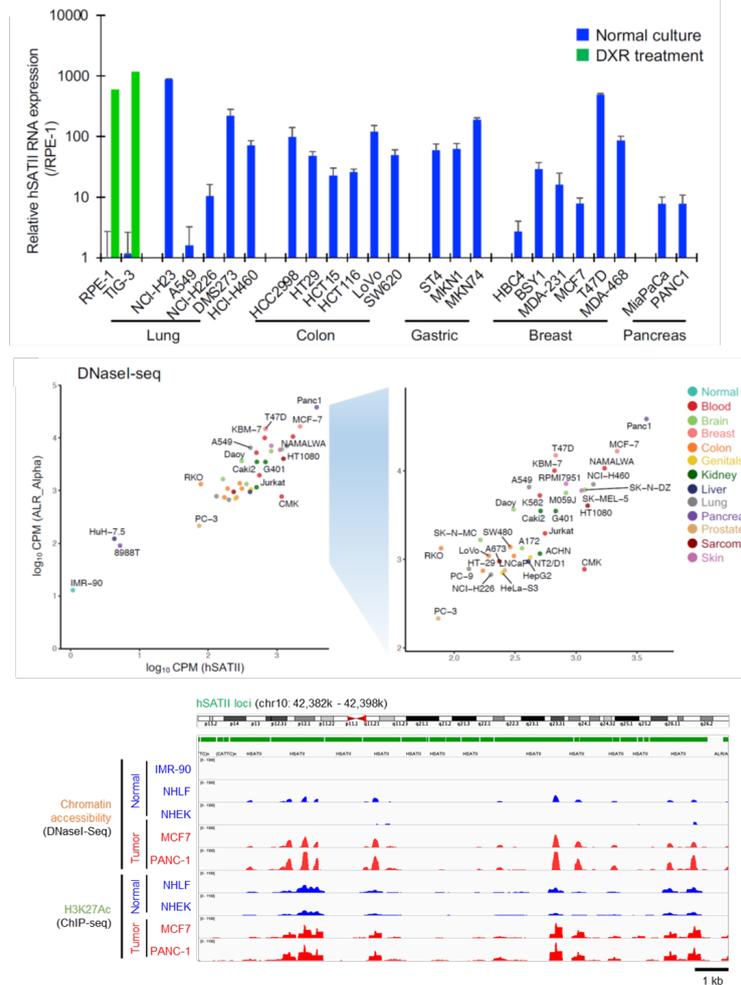


図2. がん細胞株におけるサテライト II RNA の発現 (上) と DNA 解析 (中) ChIP 解析 (下)



と同様に高発現していることを検出した (図2上)。加えて、これらの細胞株でサテライトII領域の開き具合をDNaseI-seq解析によって比較したところ、正常細胞に比べて、全てのがん細胞においてはサテライトII領域が膨張していることが明らかとなった (図2中)。特に、乳がんと膵がんにおいてはサテライトII領域の形の変化が顕著であったことから、ATAC (Assay for transposase-accessible chromatin) -seqとChIP (Chromatin Immunoprecipitation) -seqの公共データを再解析したところ、乳がんと膵がん細胞株においてはゲノムDNAのサテライトII領域の活性化型ヒストンマークであるヒストン3リジン27アセチル化のレベルが高いことが検出された (図2下)。そこで、乳がんの患者検体を用いてサテライトII領域のDNA-FISH解析を行ったところ、正常な乳腺上皮に比べて乳がん細胞では優位にサテライトII領域が膨張しており、間質のがん関連線維芽細胞 CAFs (Cancer-associated fibroblasts) においても、正常な線維芽細胞に比較してサテライトII領域が開いていることが明らかとなった。これらの知見から、サテライトII領域の凝縮状態に基づいて細胞の特徴を解析できる RepATACR (Repeat-integrated scATAC-seq Reanalysis) 法を開発し、乳がんの針生検サンプルの single cell ATAC-seqデータを解析することで、乳がん患者毎にサテライトII領域の膨張レベルにバラツキがあることを見出した。Triple negative型の乳がん細胞ではサテライトII領域は膨潤傾向にあり、また、Luminal型の乳がん細胞ではサテライトII領域の膨張レベルは患者さんの年齢と相関し、細胞増殖マーカーとは逆相関す

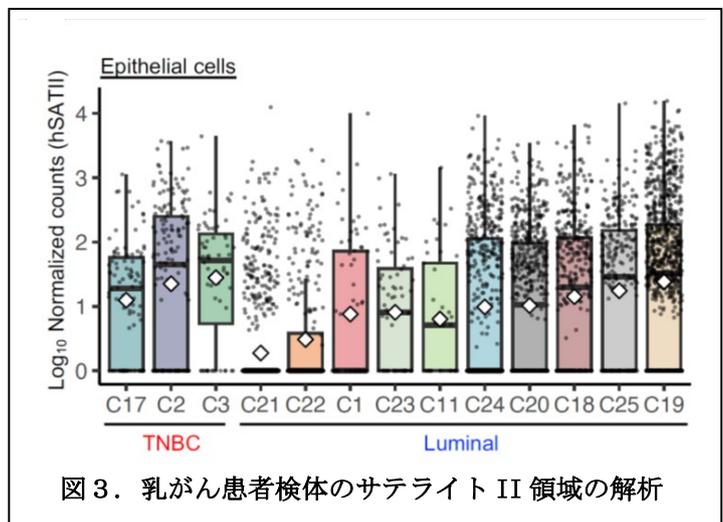


図3. 乳がん患者検体のサテライト II 領域の解析

ることが分かった (図3)。さらに、乳がん腫瘍を構成するCAFsの中には、サテライトII領域が凝集している細胞と膨張している細胞が含まれていることを見出し、後者では、炎症性遺伝子群の遺伝子活性レベルが高いことを発見した。これらの結果は、サテライトII領域の染色体構造が膨張している細胞では、細胞老化様の変化が起きており、炎症性遺伝子群の発現を介したがんの悪性化に寄与している可能性を示唆しており、今後このメカニズムを標的とした新しいがんの予防法・治療法の開発が期待される (Miyata *et al.*, PNAS, 2023)。

また、私たちはサテライトII RNAがエクソソームなどの細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV) に取り込まれて周囲の細胞に炎症形質や染色体不安定性を伝搬することを報告していたが (Miyata *et al.*, PNAS, 2021)、サテライトII RNAがどのようにして選択的に細胞外小胞へ取り込まれるのか、その分子機構は不明であった。そこで、サテライトII RNAと結合するタンパク質の質量分析を行い、責任因子としてRNA結合蛋白質であり、細胞外小胞に含まれていることが知られているYBX1 (Y-box binding protein 1) を同定した。YBX1をノックダウンした老化細胞から回収した細胞外小胞には、サテライトII RNAの含有量が顕著に低下していた (図4)。老化細胞由来の細胞外小胞は正常細胞に取り込まれると細胞老化を誘導し炎症性SASP遺伝子の発現が亢進するが、YBX1をノックダウンした老化細胞由来の細胞外小胞は受容細胞において細胞老化とSASP遺伝子発現誘導効果が顕著に減弱していた。これは、細胞外小胞に含まれるサテライトII RNAの量が減少したために細胞老化誘導機能が弱まったと考えられる。さらに、YBX1は乳がんと卵巣がんのCAF s で高発現しており、患者の予後不良と相関することから (図5)、YBX1によるサテライトII RNAの伝搬が、がんの悪性化に寄与していることが示唆された (Chiba *et al.*, IJMS, 2023)。このようなエピゲノム異常とhSATII RNAの高発現は老化細胞や多くのがん組織でも認められたことから、がんをはじめとする加齢性疾患の治療標的候補として特許を出願した。

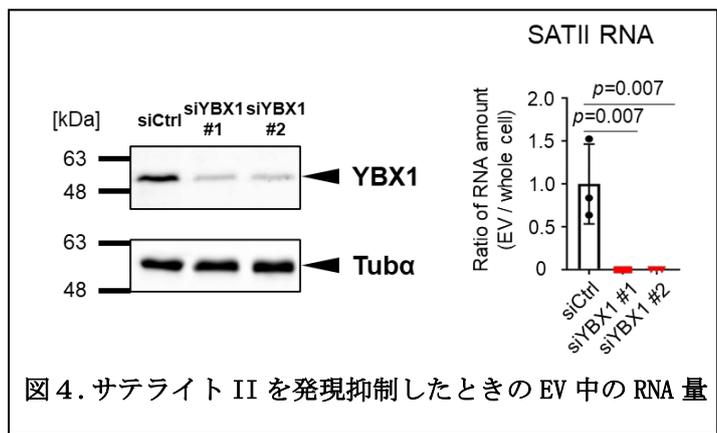


図4. サテライト II を発現抑制したときの EV 中の RNA 量

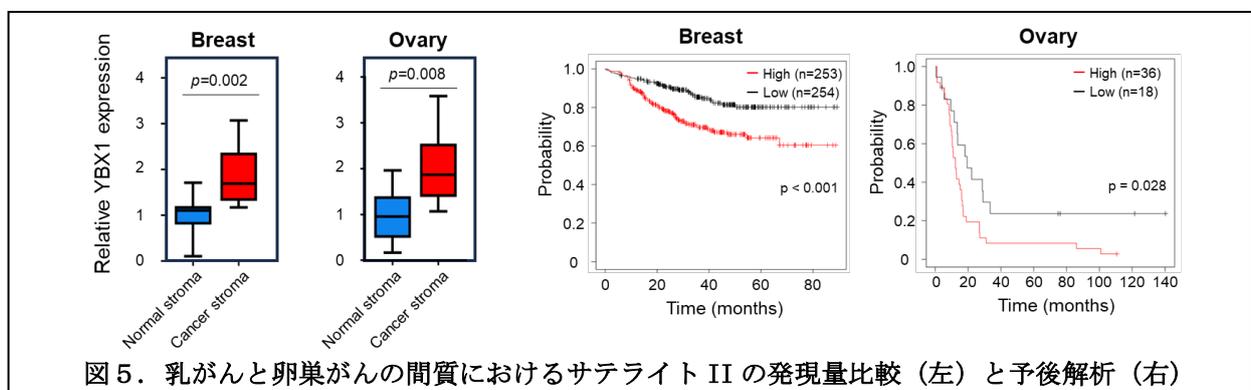


図5. 乳がんと卵巣がんの間質におけるサテライト II の発現量比較 (左) と予後解析 (右)

最後に、私たちは老化細胞を標的とした加齢性疾患治療法を開発する中で、生体で老化細胞を検出する科学技術の開発が必要であると考え、老化細胞で選択的に活性化されるプローブのスクリーニングを行い、DPP4 (Dipeptidyl peptidase 4) によって切断されて活性化するXP-HMRG (Hydroxymethylrhodamine green) プローブを同定した。DPP4は老化細胞で発現量が増加しており、その酵素活性の上昇が検出された。高脂肪食で肥満を誘導したマウスにXP-HMRGプローブを投与したところ、肝臓や腎臓などの臓器で強い蛍光シグナルを検出し生体において老化細胞の可視化を実現した (Tanaka *et al.*, Cancer Sci., 2024)。

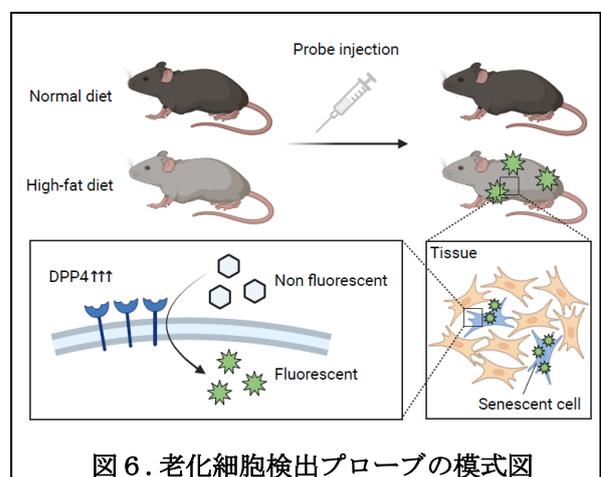


図6. 老化細胞検出プローブの模式図