

細胞老化における時計遺伝子の機能と病態学的意義 の解析

橋川, 健一

<https://hdl.handle.net/2324/7157319>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

細胞老化における時計遺伝子の機能と病態学的意義の解析

薬剤学分野 3PS19003T 橋川 健一

【序論】

地球上の多くの生物には、地球の自転に伴う周期的な外部環境の変化に順応するため、生体機能を変動させる「体内時計」の機能が備わっている。体内時計の本体は「時計遺伝子」と呼ばれる一連の遺伝子群が約 24 時間周期で発現の変動を繰り返す「転写・翻訳フィードバックループ機構」であり、ホルモン分泌、免疫機能、睡眠・覚醒サイクルなどの生体機能の概日リズムを分子レベルで制御している。体内時計は生物の健康を保持・増進させる上でも重要な役割を担っており、その機能低下や慢性的な変調は、がん、心血管系疾患、糖尿病、精神疾患などの発症リスクを上昇させることが指摘されている。

一方、先進国を中心にヒトの平均寿命は延び続けているが、老化に伴い神経変性疾患、心血管疾患、がん、免疫系疾患、筋骨格系疾患などの発症率も増加することから、健康寿命の延伸への取り組みが盛んに行われている。ヒトおよび実験動物を用いた検討において、体内時計の機能も老化に伴い低下することが明らかになっており、時計遺伝子を標的として「がん細胞」や「老化細胞」を排除することを指向した研究も行われている。しかしながら、老化に伴う体内時計の機能低下と疾患発症との関連性については不明な点も多い。本研究では、老化と体内時計との関連性について、細胞老化における時計遺伝子の機能および病態学的意義を明らかにすることを目的に、「発がん」と「加齢黄斑変性」に焦点を当てて検討を行った。

第一章：化学物質誘発性の原発がん発症における時計遺伝子 *Clock* の機能解析

【方法】

実験動物

ICR をバックグラウンドとする *Clock* 遺伝子の機能不全 (*Clk/Clk*) マウスおよび同系統の野生型マウスを温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、明暗周期 (明期: 7:00~19:00)、自由摂食・摂水の条件下で飼育した。

化学物質誘発性皮膚がんモデルの作成

実験には *Clk/Clk* およびその野生型の 7-9 週齢の雌性マウスを使用した。マウスの背部を剃毛し、その 1 日後から 200 μL の Acetone に溶解した 100 μg の 7,12-dimethylbenz [α] anthracene (DMBA) を週に 2 回塗布した。DMBA の塗布は 8 週間行った。週に 1 度、電子ノギスを用いて発生した腫瘍の腫瘍径を測定し、長径が 1 mm 以上となった腫瘍については個数を計数した。

DMBA-DNA 付加体の生成量の測定

マウスの背部を剃毛して 1 日後、200 μL の Acetone に溶解した DMBA 300 μg を 8 時間間隔で 2 回塗布した。2 度目の DMBA の塗布から 0 時間もしくは 24 時間後に皮膚組織をサンプリングし、DNA を抽出した。抽出した DNA は滅菌水で再溶解し、DMBA-DNA 付加体の蛍光を測定した (励起波長: 390 nm、検出波長: 445 nm)。

活性化型 Ras の発現量の測定

マウスの背部を剃毛し、100 μg の DMBA または Vehicle (Acetone; 200 μL) を週に 2 回、2 週間塗布した。100 μg の EGFR 選択的阻害剤 AG1478 および Vehicle (Acetone; 200 μL) はサンプリングの 3 時間前にマウスの背部に塗布した。活性化型 Ras の発現量は 96-Well Ras Activation ELISA Kit を用いて測定した。

TUNEL アッセイ

皮膚切片について、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) を用いて、皮膚組織中のアポトーシスを引き起こした細胞 (TUNEL 陽性細胞) を染色し、蛍光顕微鏡により検出した。

【結果・考察】

野生型マウスおよび *Clock* の機能不全 (*Clk/Clk*) マウスの背部皮膚に発がん物質として DMBA (100 μg) を週 2 回塗布し続けたところ、DMBA 塗布開始から 8 週目の時点における腫瘍の平均発生数は野生型マウスが 10.8 個、*Clk/Clk* マウスが 5.5 個であった。野生型と *Clk/Clk* マウスの腫瘍発生数の差異は 9 週から 10 週目にかけて減少したものの、実験期間全体で *Clk/Clk* マウスの腫瘍発生数は野生型マウスと比較して抑制される傾向が認められた。一般的に、細胞のがん化はイニシエーション、プロモーション、プログレッションと多段階に進行すると考えられている。DMBA は多環芳香族炭化水素の 1 つであり、哺乳類細胞においては強力なイニシエーターとして働くだけでなく、炎症を介して細胞の異常増殖を引き起こすプロモーターとしての機能も担うことも報告されている。そこで、発がん物質によって生じるイニシエーションおよびプロモーション過程に対して *Clock* 遺伝子の機能不全がどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。その結果、*Clk/Clk* マウスにおいては、発がん物質の代謝・活性化に関わる酵素の発現および発がん物質による DNA 傷害の程度には変化が認められなかったが、細胞の異常増殖を引き起こす中心シグナルである Epidermal growth factor receptor (EGFR) を介した Ras 活性の顕著な抑制が観察された。発がん物質を塗布した *Clk/Clk* マウスの皮膚では、細胞老化因子のひとつである p16INK4a および炎症性サイトカインの発現量が増大し、細胞老化の特徴を示すとともに、アポトーシスが抑制されていた。老化した細胞は増殖刺激に対して不応答になることから、*Clk/Clk* マウスにおいて腫瘍の形成が抑制されたのは、細胞老化が誘発され易いことが原因のひとつと考えられた。これらの結果から、時計遺伝子 *Clock* は原発がんの発症に対して促進的に機能することが示唆された。

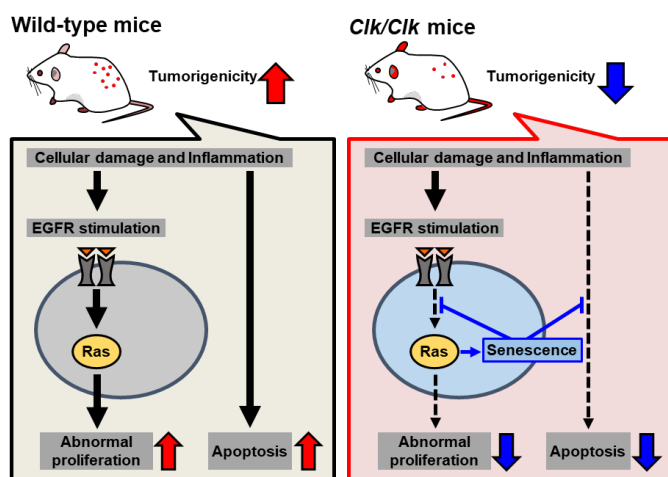


図 1 *Clock* の機能不全による化学物質誘発性の原発がん発症への抵抗メカニズム 野生型マウスでは発がん物質の塗布により、細胞傷害と炎症が引き起こされる。その後、更に傷害を受けた細胞のアポトーシスおよび EGFR に関する増殖因子の放出が起き、下流の Ras の活性化を介して、異常な細胞増殖が誘発される。*Clock* 遺伝子の機能不全マウスにおいては、発がん物質の塗布により、細胞老化が惹起され、増殖およびアポトーシスシグナル両方に対して不応答となり、結果的に発がんが抑制される。

第二章：ヒト網膜色素上皮細胞における食食活性の概日リズムに及ぼす細胞老化の影響解析

【方法】

細胞培養と各薬剤による処理

自然発生ヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS) および 1% penicillin-streptomycin を含む DMEM/F-12 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で継代・培養した。細胞老化を誘導するために、300 μM または 400 μM の過酸化水素 (H₂O₂) の存在下で細胞を 24 時間インキュベートした (1 日目)。再度細胞を H₂O₂ で処理 (2 日目) し、さらに 3 日後に培地交換を行った (5 日目)。H₂O₂ 処理前、H₂O₂ 処理開始後 6 日目または 9 日目の細胞を各実験に用いた。概日時計を同調させるために、正常および老化した ARPE-19 細胞を 10 nM の Dexamethasone (DEX) で 2 時間処理し、新鮮培地に交換後、所定の時点で食食活性の測定および RNA の抽出を行った。また、正常な ARPE-19 細胞を、REV-ERBα アゴニストである SR9009 および RORα アゴニストである Nobiletin でそれぞれ 24 時間処理した。対照群には、0.1% (v/v) DMSO で細胞を 24 時間処理したものをを用いた。

食食活性の測定

細胞の食食活性は、緑色蛍光標識した直径 1.0 μm のポリスチレンラテックスナノ粒子 (Fluoresbrite Carboxylate Microspheres 0.2 μm YG) の細胞への取り込み量を測定することにより評価した。具体的には、蛍光ナノ粒子 (1×10¹⁰) を培地中に添加し、2 時間インキュベートした。その後、蛍光ナノ粒子を取り込んだ細胞の数をフローサイトメーター (FACS) で測定し、それら細胞数の割合を算出した。

遺伝子導入

REV-ERBα および RORα を強制発現する各プラスミド (500 ng) を作製し、24 ウェル培養プレートに播種した正常な ARPE-19 細胞 (1×10⁵/ウェル) にトランスフェクトした。24 時間インキュベート後、食食活性およびファゴサイトーシス関連遺伝子の発現量を測定した。

【結果・考察】

ARPE-19 細胞に対して H₂O₂ を 300 ~ 400 μM の濃度で 5 日間暴露することにより、β-ガラクトシダーゼの活性上昇を含めた細胞老化の特徴を示す形態学的変化が誘導されたことから、これを網膜色素上皮細胞の老化モデルとして以降の検討に用いた。次に、ARPE-19 細胞における食食活性の概日リズムに対する細胞老化の影響を明らかにするため、正常および老化 ARPE-19 細胞を Dexamethasone (DEX) 処理により時計遺伝子の発現リズムを同調させ、蛍光ナノ粒子の食食活性を測定した。その結果、正常な ARPE-19 細胞の食食活性は約 24 時間周期の有意な概日リズムを示したが、老化した ARPE-19 細胞の食食活性は 24 時間を通して高いレベルで維持され、概日リズムの振幅が減少した。また、この食食活性の変化は、時計遺伝子および食食関連遺伝子の発現変化を伴っており、老化した ARPE-19 細胞では、概日時計の構成因子の 1 つである REV-ERBα の発現レベルの恒常的な上昇が認められた。

REV-ERBα は核内受容体として機能するが、その人工的アゴニストである SR9009 を正常 ARPE-19 細胞に曝露した場合および同細胞に REV-ERBα を強制発現させた場合のいずれにおいても、食食活性の上昇と食食関連遺伝子の発現増加が観察された。これらの結果から、加齢に伴う ARPE-19 細胞の食食活性リズムの変容に概日時計の機能的な変化が関与していることが示唆され

た。また、老化による ARPE-19 細胞の貪食活性の恒常的な亢進は、加齢黄斑変性の発症や病態維持にも繋がっている可能性が考えられた。

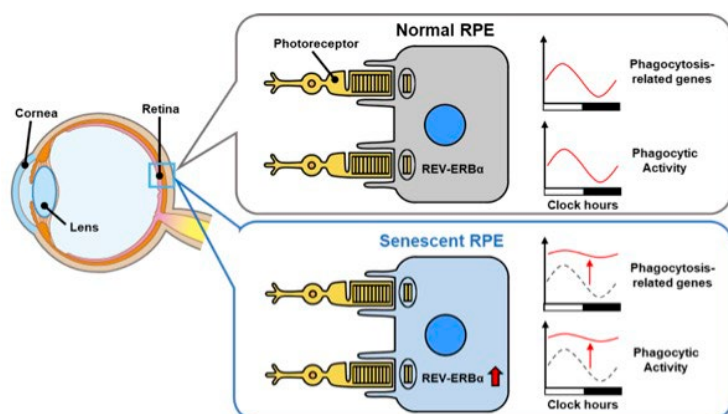


図 2 老化した網膜色素上皮細胞における貪食活性の概日リズムの変化 正常な網膜色素上皮細胞(RPE)では、時計遺伝子 REV-ERB α および貪食関連遺伝子の発現が概日リズムを示し、貪食活性は時刻依存的に変動する。一方、老化した網膜色素上皮細胞では、REV-ERB α の発現量が恒常的に上昇し、貪食関連遺伝子および貪食活性の概日リズムは消失または減弱する。

【結論】

本研究では、がんや加齢黄斑変性の各病態に着目し、それら疾患に関連した細胞の老化状態における時計遺伝子の機能的な役割を明らかにした。交代制勤務労働者を対象にした疫学調査において、慢性的な体内時計の機能不全は発がんリスクを増大させることが指摘されている。第 1 章において、時計遺伝子 *Clock* の機能不全は生体リズムの異常につながるものの、化学物質誘発性の発がんに対しては抵抗性を示した。このことは、体内時計の変容がどのような原因で生じているかによって、生体機能への影響も異なることを示唆している。また、本研究の結果は時計遺伝子 *Clock* の機能が老化の制御にも関わることを示しており、体内時計の機能不全が個体レベルにおける老化にも影響していることが示唆された。一方、加齢黄斑変性については、網膜色素上皮細胞の機能が低下あるいは消失することにより生じる。本研究の第 2 章では、老化によって時計遺伝子 REV-ERB α の発現が上昇し、それに伴い網膜色素上皮細胞の貪食能が 24 時間を通して高い活性を維持した状態になることを見出した。網膜色素上皮細胞の貪食能の概日リズムは正常な視覚の維持において重要な役割を担っていることが指摘されている。そのため、恒常的な貪食能の亢進は、結果的に視覚異常のリスクを上昇させる可能性が示唆された。

以上の結果から、時計遺伝子の機能低下や発現リズムの変調は、老化に伴う様々な疾患の発症や病態にも深く関わることが明らかになった。少子高齢化を迎えた先進諸国では、健康寿命の延伸が社会的課題となっている。本研究を通じて得られた成果や方法論が体内時計の変調を伴う加齢性疾患の病態の理解とその予防・治療法構築の一助となることを期待する。

【発表論文】

1. Hashikawa KI, Katamune C, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Dysfunction of the circadian transcriptional factor CLOCK in mice resists chemical carcinogen-induced tumorigenesis. *Sci Rep.* 7:9995, 2017.
2. Hashikawa KI, Tsuruta A, Yamakawa W, Yasukochi S, Koyanagi S, Ohdo S. Senescence-induced alteration of circadian phagocytic activity of retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Biochem Biophys Res Commun.* 658:88-96, 2023.