

【総説】

細胞老化の過去、現在、未来

近藤 祥司

京都大学医学部附属病院 高齢者医療ユニット・地域ネットワーク医療部

要約

細胞老化研究の変遷の歴史は、老化研究の歴史でもある。ヘイフリックによる複製老化の発見が、テロメア・テロメララーゼ研究に発展した。さらにテロメア非依存性細胞老化としてストレス老化が提唱され、テロメア以外の様々な老化マーカーも見出された。細胞周期制御因子である p16Ink4a もその一つである。さらに、ストレス細胞老化は、「発癌に対する生体バリアー」という正の側面と、「慢性炎症惹起」という負の効果を備えることが判明し、個体老化における細胞老化の重要性が再認識された。その成果の臨床応用として、今後、ヒト加齢性疾患でのテロメア計測の意義や、老化細胞除去の可能性が注目されている。本稿では細胞老化に関して概説する。

キーワード：Telomere, Stress-induced senescence, SASP, Cell cycle, Senolysis

1. 歴史のはじまりとテロメア

最古の個体老化仮説として、1882年、ドイツの生物学者 August Weismann (オーギュスト・ワイスマン) の提唱した「消耗仮説 (Wear and Tear theory)」がある。食品や環境、それ以外に体の酷使などの身体的、精神的ストレスによって、内臓や細胞が損傷・消耗することが個体老化の原因であるという仮説である。若いうちはそのような損傷・消耗から回復する力があるが、年を取るとその能力が低下し、最終的に老化すると彼は考えた。彼は、生殖細胞の不死性を実験的に初めて証明したことで有名である。当時 Darwin (ダーウィン) の没後 (1882年) も、多くの科学者は、体細胞の特性や変異が、次の世代に遺伝伝承されて進化につながると信じていた。その頃ワイスマンは、次の様な実験を準備した。繁殖期前の若いマウスの尻尾を切って、その交配後、生まれてきた子供を観察したが、その尻尾に異常は無かった。次にこの子供の世代でも、同様に繁殖期前に尻尾を切って、交配し、その子供を観察し、再び尻尾に異常がないことを確認した。この単純なサイクルを、彼は22回繰り返した。

結局尻尾の異常は一度も遺伝しない事を明らかにした。ワイスマンのこの実験により、史上初めて、体細胞と生殖細胞の区別が明確となった。以上より、ワイスマンは、我々の体の構成成分である体細胞は有限寿命である一方で、生殖細胞は不死であるという概念を打ち立てた。ほとんどの動物の生殖細胞は胚の分化初期に体細胞と分離されて独立する。体細胞が体の構成部分として様々な分化し、最終的に老化していく一方、生殖細胞は世代から世代へと受け継がれることにより潜在的不死となる。

これらの知見をもとに、1891年、ワイスマンは、「細胞を個体から解放すれば、細胞は増殖能力を再獲得し、老化しなくなる」という仮説を提唱した。より詳細に言うと、細胞を分化状態から解放すれば、細胞は老化しない、という事である。後に、細胞培養室での実験が技術的に可能となり、Carrel (カレル) と Ebeling (エベリング) は、ニワトリの胎児心臓から得た線維芽細胞が、ある条件では実験ガラス容器内で少なくとも34年間増殖し続けることを報告した [1]。「細胞は老化しない」というワイスマンの仮説が信じられた時期だった。しかし、カレルとエベリングの実験は再現不可能であることが後に判明した。彼らの実験方法では、週1回の培地交換のときに新しい細胞が混入し、何十年という細胞培養を可能としていた。

再び、細胞は老化するのか? という疑問に対して、今も知られる「Hayflick (ヘイフリック) の成長限界」が

連絡先：近藤祥司

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

TEL：075-751-4513

E-mail：hkondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

見出された。彼は、ヒト線維芽細胞を培養すると、一定回数だけ分裂した後、分裂停止することを発見し、「複製老化」と名づけた [2]。細胞老化が普遍的現象として、初めて認められた。一方、ヘイフリックの発見から間もない 1970 年代、DNA 二重螺旋構造の発見者 Watson (ワトソン) がある予言をした。彼は DNA 二重螺旋の「逆並行構造」に注目していた。DNA 複製は 5' から 3' 方向のみなので片側の DNA 末端が複製できない、つまり細胞分裂のたびに DNA は短くなると指摘した。この予言は、染色体末端構造の問題として「テロメア」という概念を生むことになる。

1986 年、Howard Cooke (ハワード・クック) らにより、ヒト細胞の性染色体の末端 DNA が老化した体細胞では短くなっていることが初めて報告された。ワトソンの予言は現実のものとなりつつあった。クックらのテロメア短縮の最初の報告とほぼ同時期、Elizabeth Blackburn (エリザベス・ブラックバーン) は、テロメア構造が DNA 配列一次構造 TTAGGG の繰り返しで構成されていることを見出した。細胞が老化するとこのテロメア配列が短くなることが確認され、ヘイフリックの成長限界の原因は、テロメア長短縮と判明した。更に、ブラックバーンは、テロメア長維持機構として、テロメアに特異的 DNA 配列を付加できる酵素テロメラーゼを発見した [3]。そして 1998 年、Shay (シェイ) と Wright (ライト) はヒトのテロメラーゼ遺伝子を強制発現すれば、細胞は老化しなくなることを報告する [4]。彼らの発見は、ヘイフリックの報告以来、長年の論争的であった「テロメアは細胞老化の原因か結果か」という課題に決着をつけた。テロメアが、「老化時計」あるいは「老化の回数券」と呼ばれるようになった所以である。

2. ストレス細胞老化

しかし、一つの答えは、新たな疑問を生む。生物種によりテロメア長は大きく異なる (例えば、マウスは約 6kb、ヒトは約 1kb)。テロメア以外による細胞老化機構の存在が想定された、そして、stress-induced senescence (SIS、ストレス細胞老化) が見出された。テロメア長の十分な若い細胞でも、様々な外的ストレス (DNA 傷害、酸化ストレス、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤など) により、細胞老化誘導されることが確認された。これらテロメア非依存性細胞老化を、ストレス老化と呼ぶ [5]。

ストレス老化の中でも、有害物質や環境因子、培養ストレスとは一線を画するストレス、それは Oncogene-induced senescence (OIS、発癌遺伝子ストレス) と呼ばれるものである。米国コールド・スプリング・ハーバー CSH 研究所の Manuel Serrano (マニュエル・セラノ) と David Beach (デビッド・ビーチ) らは、通常細胞に発ガン遺伝子である ras-val12 遺伝子を導入するという単純な実験を行っていた。Ras-val12 は、癌細胞で良く観察される ras 遺伝子の点突然変異型であり、古典的な発癌遺伝子のひとつである。彼らは、発癌遺伝子導入により、通常細胞の増殖能力が亢進し、人工的に癌細

胞が作れるのではないかと、予想していた。ところが結果は予想に反して、発癌遺伝子 ras-val12 遺伝子を導入すると、通常細胞の細胞増殖が停止することが観察された。この意外なデータを前にして、彼らはその解釈に戸惑っていた。同じ研究所の Scott Lowe (スコット・ロエ) の助力により、若い通常細胞と異なり、発ガン遺伝子 ras-val12 遺伝子を導入した通常細胞は、細胞質と核の両方が巨大・拡大し、あたかも「目玉焼き」のような巨大細胞に変形しており、老化細胞に似ている事に気付いた。その後、Ras-val12 発現細胞で他の老化マーカーを詳細に計測したところ、老化が促進されていることが確認された [6]。

生物の体の中では、日々さまざまな理由により、遺伝子の突然変異が起こっては修復されているが、それら遺伝子変異がつねに発ガンへと発展するわけではない。Ras-val12 遺伝子変異は非常に頻度の高い癌遺伝子変異である事は事実であるが、実際の固形腫瘍は複数の癌変異の蓄積の結果であり、Ras-val12 遺伝子変異一個だけではガンは発生しない。しかし、もし Ras-val12 遺伝子変異が発生した場合には、その細胞が後に癌化する可能性は否定できない。セラノ、ビーチ、ロエ博士らは、このような Ras-val12 遺伝子のような発ガン変異が起こってしまった細胞は、個体にとっては危険であるので、ガン細胞に発展しないようにむしろ老化を誘導し封じ込める何らかの防御メカニズムが働いたのではないかと考えた。

そのような仮説を実証するためには、癌に対する生体防御機構の実態の解明が必要であった。彼らは、それは癌遺伝子の対極に位置する癌抑制遺伝子であろうと推測した。実際、ガン抑制遺伝子と呼ばれる p53 遺伝子を通常細胞で破壊した上で、再び ras-val12 遺伝子を導入する実験が行われた。その結果今度は、細胞は老化せず、逆に活発に増殖しガン細胞のような挙動を示した。「ストレス細胞老化は発癌抑制の生体防御機構」という新概念が生まれた。

テロメアがそうであったように、ストレス老化も当初、培養細胞実験での何らかの人為的な産物ではないかと疑問視された。細胞を様々なストレスでいじめれば、老化したりアポトーシスするのは、当然ではないかと言う議論もあった。実際、Jacks (ジャックス) らによる Ras-val12 遺伝子を発現するノックインマウスでは、癌ができやすいことが確認された [7]。セラノらの知見は、培養細胞のみで適応できるアーチファクトだったのだろうか。混迷する大論争に決着をつけたのは、セラノら自身であった。彼らは、Ras-val12 遺伝子発現ノックインマウスを、もう一度独自の視点で解析した。もともと、このノックインマウスでは、良性和悪性の 2 種類の腫瘍が混在することに彼らは注目した。この良性和悪性両方の腫瘍に関し、老化のマーカーを詳細に比較した結果、前者では細胞老化の兆候が確認され、後者ではそれが消えていた [8]。通常培養細胞で観察された老化バリアーによる癌化阻止効果が、マウス個体の良性腫瘍でも同様に確認できたことを意味する。その後、Ras-val12 以外に

50近い癌遺伝子でも、同様にストレス老化現象が誘導される事が確認されている[9]。今では、「癌と老化仮説: Cancer-ageing hypothesis」として、語られるケースもある。

3. 様々な老化マーカー

細胞老化の特徴の一つは、細胞は生きているが細胞分裂（細胞増殖）が停止した状態にあることである。細胞分裂の一サイクルを細胞周期（Cell Cycle）と呼ぶ。細胞周期では、まずDNAが複製され（S期と呼ぶ）、続いて、複製された遺伝子情報は姉妹染色体として娘細胞に分配される（M期と呼ぶ）。そして、S期とM期の間は、G1期、G2期という、細胞サイズが成長する成長期である。細胞周期のエンジンとは、cyclin-dependent kinase（CDK）サイクリン依存性キナーゼというシグナル伝達分子であった。細胞周期の中で、このキナーゼ活性が周期的変動を示し、G1、S、G2、M期の順番やタイミングを決定している[10]。

細胞老化とは、細胞周期の永久停止とも解釈できる。従来は、細胞老化時計とはテロメアであると想定されていた。しかし、後に、ストレス細胞老化というテロメアとは無関係な細胞老化現象が報告され、細胞周期エンジンの何らかの関与が疑われた。老化細胞では、通常の細胞周期停止細胞と同様に、CDK活性が非常に低下している。よって、エンジンであるCDKの活性を阻害するブレーキの存在が疑われた。若い細胞と老化細胞における蛋白プロファイルを比較して、後者で異常に蓄積されるタンパク質として、p21やp16 Ink4aと呼ばれるタンパク質が見出された。p21やp16 Ink4aの主な役割は、エンジンであるCDKキナーゼに直接結合しその活性を阻害することであった。つまり老化細胞では、エンジ

ンであるCDKに対してブレーキとも呼べるp21やp16 Ink4aの蓄積が、細胞周期永久停止を引き起こしている。今では、p21やp16 Ink4aは、有効な細胞老化マーカーとなっている（図1）。

ストレス細胞老化研究の進展とともに、テロメア以外にも数々の老化マーカーが見出された。老化した細胞は、特徴的な形態（巨大な核と大きく広がる細胞質、「目玉焼き」とも呼ばれる）と同時に、senescence-associated beta-galactosidase（SA-β-gal、SA-βガラクトシダーゼ）染色陽性となる[11]。その核内では、DNA傷害を反映するphosphorylated histone 2AX variant（H2AX_γ）foci陽性や、Senescence-associated heterochromatin foci（SAHF、老化関連ヘテロクロマチン形成）が観察される。細胞質では、ユビキチン化蛋白の凝集と想定されるリポフスチンも見られる。

最近、細胞老化と慢性炎症の密接な関係が見出された。Campisi（カンピジ）らは、老化細胞は若い細胞と比較して、IL-1やIL-6などの炎症サイトカインを分泌しやすくなることを見出し、Senescence associated secretory phenotype（SASP、老化関連分泌因子）と名付けて、報告した[12]。老化細胞由来のSASPは、周囲の細胞の老化や癌化促進に寄与すると考えられており、細胞老化が「慢性炎症」を通じて、個体老化を誘導する一因と考えられる。これら炎症性サイトカインも、老化マーカーになりうる。と同時に、細胞老化には、「がん抑制のバリアー」という正の側面と「慢性炎症促進」という負の側面の「両面性」があることが判明した。

これらの細胞老化マーカーの発見は、細胞老化研究を推進する上で有効な道具となる一方で、課題も残る。個体・臓器内部では、増殖性細胞（骨髄、腸管上皮、皮膚など）以外に、非増殖性細胞も多数存在する。複製老化

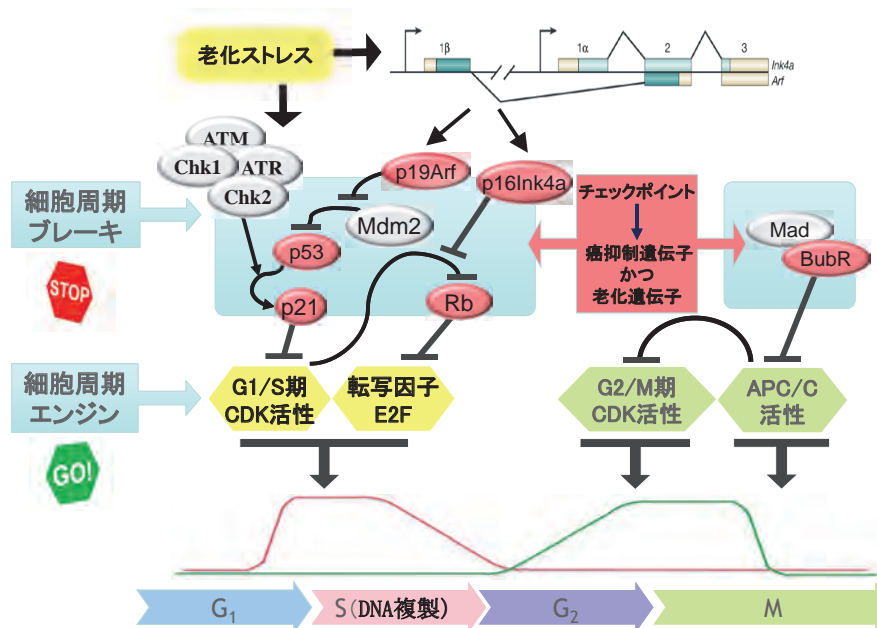


図1. 細胞周期因子と細胞老化

細胞周期において、CDKとCDK阻害因子は、エンジンとブレーキの関係にある。p21やp16 Ink4aは、老化細胞でも蓄積し、老化マーカーとなることが判明した。詳細は本文参照。

は主に細胞増殖を指標とした老化の定義であるが、後者の非増殖性細胞の老化を如何に評価するかは、まだ未確定な部分が多い。各内臓機能老化を反映した細胞機能低下を、その細胞老化の指標とすることも可能であろう(例えば、神経伝達物質輸送能の低下、心筋細胞拍動の低下など)。しかしその多くは、複雑な評価系が必要となり、今後の課題である。

4. 細胞老化研究の臨床応用

これら細胞老化研究の成果を、個体老化やヒト疾病理解に如何に役立てるかが近年の関心事である。例えば、最近採血サンプルで、ヒト血液細胞(主にリンパ球)のテロメアの長さの計測が可能となった。

高齢者ほど癌になりやすく、老化は癌の危険因子であるという疫学結果はすでに知られていたが、実際癌になった人では、テロメアが短くなって老化が体内で進んでいるかどうかという疑問が、興味の対象であった。結果は、予想を上回るほどであった。多くの癌(膀胱癌、肺癌、たばこ関連癌、消化管関連癌、泌尿器系癌など)に関して、テロメア長が短い人ほどそれら癌に罹患しやすいという結論であった[13]。さらに、癌にとどまらず、加齢とともに増加する他の生活習慣病に関し、解析が進められた。24件の試験のシステマティックレビューとメタ解析で検証がなされ、テロメア最短群の冠動脈性心疾患と脳血管疾患の相対リスクはともに1.42と判明し、統計学的な有意差があることが確認された[14]。他の報告でも、動脈硬化性疾患そのものや糖尿病、心不全などでもテロメア長の短縮が病状悪化要因であるとの報告

が相次いだ[15]。さらに興味深い事に、生活習慣病以外にも、テロメア短縮は、感染症罹患率や、鬱病患者における鬱期間の長さ、酸化ストレス、炎症マーカー(IL-6)と相関することが判明し[16]、老化以外に体内の酸化ストレス蓄積と相関してテロメア長短縮している可能性が示唆され始めている。このように、テロメアは少なくともヒトにおいては、細胞老化だけではなく、個体老化や加齢性疾患のマーカーとなることが、確立されつつある。

さらに病気のみならず、漠然としたストレスを含めた健康度にもテロメア長やテロメラーゼ活性の変化が観察されている。ある臨床研究では、テロメラーゼ活性は、若年・中年ともに運動群で高く、テロメア長は中年では運動群の方が非運動群より長い傾向があった[17]。さらに別の臨床研究では、適度な運動やリラックス療法を含む包括的ライフスタイル改善により、研究開始前と3カ月後に血中テロメラーゼ活性を計測し、3カ月後に29%の増加を認めたという[18]。これらは、老化度改善の取り組みと言える(ブラックバーンは、これらをテロメアエフェクトと呼んでいる、図2)。なお、アメリカでは、テロメアを活性化するサプリが販売されているが、発癌性の危険が指摘されている。

さらに近年、細胞老化と慢性炎症の密接な関係が注目され、慢性炎症除去や老化細胞除去(Senolysis、セノリシス)の可能性も探索されている。本特集の他稿を参照されたい。細胞老化研究の成果である老化マーカーを指標にして、今後さらに臨床応用探索への発展が期待される。

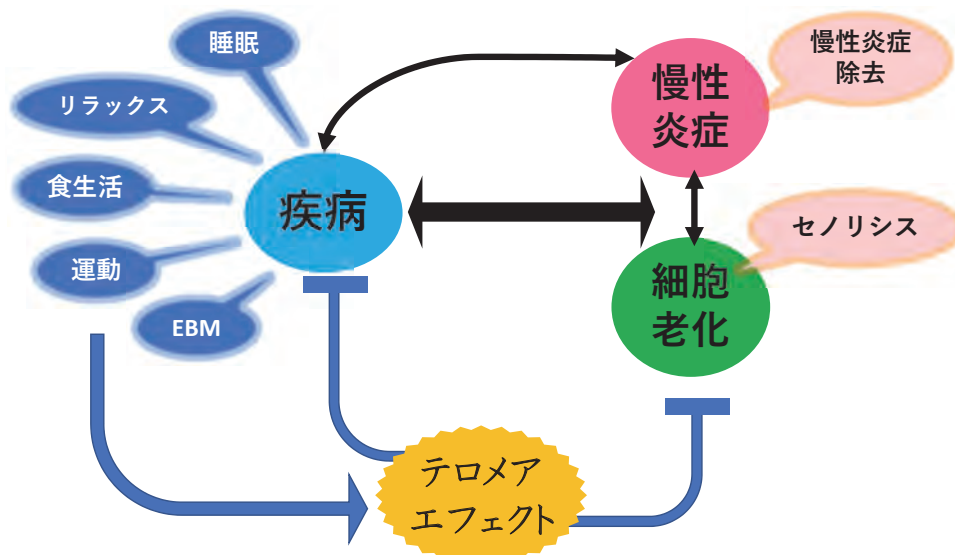


図2. 細胞老化研究の臨床応用

複製老化やストレス老化の研究により、ヒト疾病においてテロメアや慢性炎症の重要性が確認された。慢性炎症除去やセノリシス以外に、生活習慣改善によりテロメア回復も観察される。詳細は本文参照。

参考文献

1. Carrel A, Ebeling AH The Multiplication of Fibroblasts in Vitro. *J Exp Med* 34: 317-337. 1921.
2. Hayflick L The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636. 1965.
3. Greider CW, Blackburn EH Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43: 405-413. 1985.
4. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352. 1998.
5. Serrano M, Blasco MA Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13: 748-753. 2001.
6. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602. 1997.
7. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410: 1111-1116. 2001.
8. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642. 2005.
9. Gorgoulis VG, Halazonetis TD Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 22: 816-827. 2010.
10. Nasmyth K A prize for proliferation. *Cell* 107: 689-701. 2001.
11. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367. 1995.
12. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6: 2853-2868. 2008.
13. Ma H, Zhou Z, Wei S, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 6: e20466. 2011.
14. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, et al. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 349: g4227. 2014.
15. Salpea KD, Humphries SE Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 209: 35-38. 2010.
16. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, et al. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One* 6: e17837. 2011.
17. Werner C, Furster T, Widmann T, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation* 120: 2438-2447. 2009.
18. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 9: 1048-1057. 2008.

The past, present and future of cellular senescence

Hiroshi Kondoh

Geriatric unit, Graduate School of Medicine, Kyoto university

Abstract

Historically, the findings on cellular life span greatly impacts on ageing research. Hayflick limits identified telomere and telomerase. Stress-induced senescence (SIS) is known as telomere-independent event. Among several biomarkers for cellular senescence, cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor p16 Ink4a is also involved. SIS serves as a physiological barrier against oncogenesis *in vivo*, while it activates senescence-associated secretory phenotype (SASP). Telomere lengths in human leukocytes well correlate with the events of ageing-related lifestyle diseases. Such the development of senescence research would be significant for future clinical application, e.g. senolysis.

Keywords : Telomere, Stress-induced senescence, SASP, Cell cycle, Senolysis