

【総説】

呼吸器の老化・疾患と細胞老化

川口 耕一郎¹⁾、杉本 昌隆^{1,2)}

¹⁾ 国立長寿医療研究センター研究所

²⁾ 名古屋大学大学院 医学研究科

要約

古くから細胞老化は、がん抑制機構として機能することが知られていたが、近年の研究結果から、細胞老化が個体の発生から老化に至るまで、広範囲に及ぶ生命現象・疾患に関与することが明らかになりつつある。特に最近、多くの研究者によって行われた遺伝子改変マウスやセノリティック薬を用いた老化細胞除去実験からは、細胞老化が組織の老化や加齢性疾患の発症・増悪化に関与することが示されている。

慢性閉塞性肺疾患は、世界で死因の上位を占める難治性の疾患である。同疾患には老化細胞の蓄積が関与することが示唆されており、老化細胞を標的とした創薬・治療法の開発が期待されている。本稿では特に、肺組織の老化と呼吸器疾患における細胞老化の役割について近年の研究成果をもとに概説し、細胞老化を標的とした将来的な創薬・治療の可能性に言及する。

キーワード：細胞老化、Senolysis、肺組織、COPD、肺気腫

1. はじめに

ヒトを含む哺乳動物の細胞は、DNA ダメージなど過度のストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。細胞老化に伴う細胞周期の停止には複数のがん抑制機構が関与しており、1990年代に行われた多くの分子遺伝学的解析から、細胞老化は極めて重要ながん抑制機構として機能することが明らかになった[1]。現在では細胞老化は哺乳動物だけでなく、無脊椎動物においても同様に観察され、生体の恒常性を保つ役割を持つことが明らかになりつつある（井垣らの項を参照）。

細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は増殖を停止するだけでなく、様々な生理活性物質を分泌し、周辺の細胞機能に影響を与える[2]。このような老化細胞特異的な分泌表現型はSASP（senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれ、SASPを介した老化細胞の細胞非自律的機能が、組織老化や加齢性疾患の発症に重要な役割を持つと考えられている。SASPを含め

た細胞老化の詳細な分子機構に関しては、これまでに本誌でも度々紹介されているので、本稿では割愛する[3,4]。

近年の細胞老化研究では、特に組織老化・加齢性疾患との関連が注目を集めている。本稿では最近の筆者らの研究成果を中心に、肺組織の老化・疾患と細胞老化の関連について概説する。

2. 組織老化と細胞老化

細胞老化が個体（組織）の老化に関わっている可能性については、細胞老化という現象が発見された当初から指摘されていた。早期老化症患者由来の細胞は、健常者由来のものと比較して著しく分裂寿命が短く[5]、また細胞の分裂寿命は、多くの場合において細胞が由来する生物種の最大寿命と相関を示す[6]。さらに、加齢とともに生体内でのターンオーバーが低下するため[7]、老齢個体では様々な組織において老化細胞の蓄積が認められる[8,9]。これらの相関関係をもとに、細胞老化が個体（組織）老化の原因ではないかと考えられてきたが、実際に細胞老化と組織老化の因果関係が実験的に証明されたのは、ごく最近である。

筆者らを含む複数のグループは、生体から老化細胞を任意の時期に排除可能なマウスを樹立し、老化細胞の排除により白内障、脊椎湾曲、腎糸球体硬化、呼吸機能低

連絡先：杉本昌隆

〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430

TEL：0562-46-2311

E-mail：msugimot@ncgg.go.jp

下など、加齢に伴って生じる現象が回復可能であることを報告した [10,11]。また多くの加齢性疾患モデルにおいて、老化細胞の排除が病態を改善したことから、老化細胞依存的な組織内の環境変化が疾患の発症・進行に影響を与えていることが強く示唆された [3]。これらの知見をもとに、様々な疾患に対して、老化細胞が創薬・治療標的として有望視されている。現在では、多くの研究者・製薬企業が老化細胞を標的とした薬剤の開発を進めており、そのうちのいくつかについては、既に臨床試験が行われている（渡邊・原の項を参照）。

3. 肺組織の老化

前述したように、老化細胞は加齢と共に様々な組織に蓄積する。細胞老化マーカー遺伝子 (*Cdkn2a* 遺伝子座にコードされる *Ink4a* や *Arf*) の発現解析からは、肺組織では他の組織と比べて発現が高い傾向にあることが示唆されている [9]。その理由については不明であるが、細胞老化の誘導には酸素によるストレスが関与していることから [12]、肺組織では他の内臓組織よりも酸素分圧が高いことが原因であるかもしれない。

筆者らは、独自に樹立した老化細胞可視化・除去マウス (ARF-DTR マウス) を用い、肺組織において *Arf* 遺伝子の発現は、比較的早期から上昇することを報告した [11]。 *Arf* 遺伝子は、*Ink4a* 遺伝子と第2エクソン以降をシェアし、ヒトの細胞老化には関与しないと考えられているが、げっ歯類においては細胞老化に伴う細胞周期停止に不可欠な遺伝子である [13]。ARF-DTR マウスは、*Cdkn2a* 遺伝子座を広範囲に含む人工染色体を外来遺伝子として保持するトランスジェニックマウスである。人工染色体の *Arf* 遺伝子の第一エクソンは、ジフテリア毒素受容体とルシフェラーゼ遺伝子の発現ユニットに置換してあるため、老化細胞の動態をルシフェラーゼイメージングによって可視化し、さらにジフテリア毒素を投与することにより、生体から任意の時期に特異的に排除可能である。肺組織における $p19^{Arf}$ の局在は、 $p16^{Ink4a}$ や他の細胞老化マーカーとオーバーラップすることから [11,14,15]、 $p19^{Arf}$ を発現している肺組織の細胞は、老

化細胞であると考えて差し支えない。肺組織の老化は、弾性線維の減少に起因する組織コンプライアンス値の増加 (= 組織弾性の低下) に特徴づけられ、ヒトにおいて呼吸機能 (1秒量) は20代をピークに低下することが調査によって明らかになっている [16]。マウスでは、性成熟後に肺組織コンプライアンス値はリニアに上昇する。しかしながら、1年齢または2年齢の ARF-DTR マウスにおいて老化細胞を肺組織から排除すると、1ヶ月以内に肺組織コンプライアンス値は再び低下 (= 組織弾性の回復) する [11]。以上のことから、細胞老化が肺組織の老化の一因であること、さらに老化細胞を排除することにより加齢によって低下した呼吸機能を回復可能であることが考えられる (図1)。

さらに筆者らは、肺組織の加齢性変化と細胞老化の関連について包括的に理解することを目指し、肺組織の遺伝子発現プロファイリングを行い、肺組織において加齢性変化を示す数百の遺伝子の半数以上が、老化細胞依存的な変化であることを示す結果を得た [11]。SPF 環境下で飼育した加齢マウスの肺組織において老化細胞は間葉系細胞の1-2%程度であることから [11]、SASP を介した老化細胞の細胞非自律的機能が肺組織全体の加齢性変化に極めて大きなインパクトを持つと考えられる。事実、加齢性変化を示した遺伝子の多くは免疫系シグナルに関わるものであり、肺組織がSASPの影響を強く受けていることが示唆される。また興味深いことに、最も強い加齢性変動を示した遺伝子群は、概日周期制御に関連するものであった。肺組織の概日周期制御の生理的意義については不明であるが、一部の呼吸器疾患においては概日周期に依存した現象 (症状の変化など) が見られており [17,18]、加齢が疾患の発症や病態に概日周期制御の変化を介して影響を与える可能性も考えられる。細胞老化の概日周期制御への関与については今後の検討課題である。

4. 肺疾患と細胞老化

一般的に、老化は様々な疾患のリスク因子になると考えられている。肺組織においても同様であり、慢性

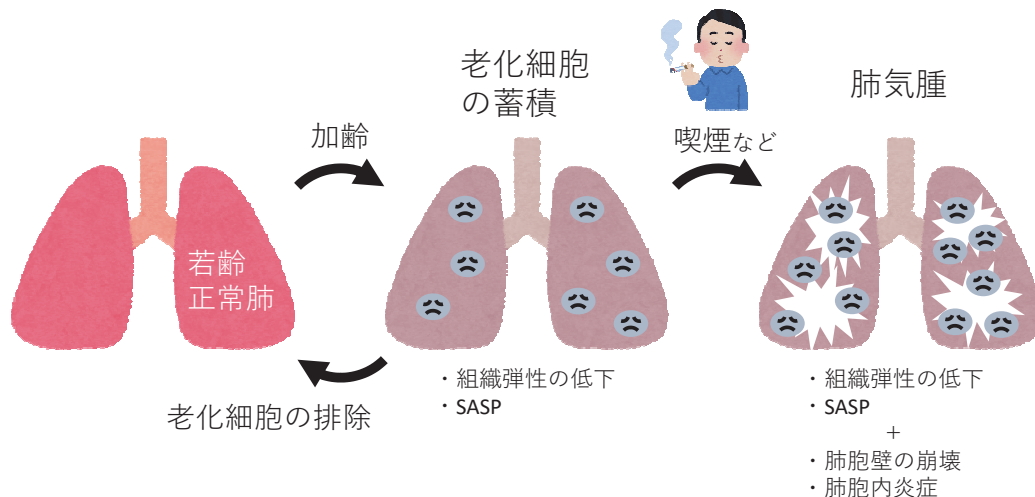


図1. 肺組織の細胞老化

閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) や肺線維症のような呼吸器疾患の罹患率は、加齢とともに上昇する [19,20]。年を取るとなぜ罹患率が上昇するのか、その根本的な原因について明確に答えるのは難しいが、加齢とともに肺組織内に蓄積する老化細胞が少なくとも部分的に肺の老化の原因となること [11]、また COPD 患者の肺組織では細胞老化が亢進することから [21]、老化細胞依存的な肺組織内の環境変化が、病態に影響を与える可能性が考えられる。本節では COPD の主要病態である肺気腫モデルを利用し、老化細胞の排除が病態に与える影響について、筆者らが行った実験を中心に紹介する。

マウスにエラスターゼを投与すると、高い再現性を持って重篤な肺気腫を誘導することができる。しかしながら、予め老化細胞を排除したマウスでは、肺胞腔の増大や組織コンプライアンス値の上昇など、エラスターゼによって誘導される肺気腫病態は顕著に緩和される [14]。エラスターゼ誘導性肺気腫においては、エラスターゼ投与後一過的に生じる肺胞内の炎症が病態の発症に不可欠であるが [22]、老化細胞を排除すると、エラスターゼ投与によって誘導される炎症性細胞の増加は顕著に抑制される。一方、健康肺においては肺胞内炎症性細胞の動態に殆ど影響を与えないことから [14]、肺組織内の老化細胞はそれ自身が顕著な炎症を惹起するものではないが、炎症が生じたときにそれを促進することにより、病態を増悪化させる働きを持つことが考えられる。

エラスターゼ誘導性肺気腫モデルは簡便で非常に高い再現性を持つ系であるが、ヒトにおいて希少な遺伝性疾患である汎小葉性肺気腫に近く [23]、一般的な小葉中心性肺気腫とは乖離した病態を示す。ヒト小葉中心性肺気腫の原因の殆どは喫煙であると考えられており、実験用マウスにおいても喫煙刺激を繰り返すことにより、ヒトの小葉中心性肺気腫と似た症状を誘導可能である

[24]。恒常的に喫煙刺激を行ったマウスの肺組織では、ヒトと同様に上皮細胞に細胞老化が誘導され、同時に肺胞腔の増大と組織コンプライアンス値の増加が認められるが、エラスターゼモデルと同様に、老化細胞を排除すると喫煙刺激による肺組織内炎症と呼吸機能障害が緩和されることから、老化細胞が肺気腫の進行に極めて重要な因子であることが示唆される [15]。

筆者らは肺気腫と細胞老化の関連について解析を行ってきたが、米国 Mayo Clinic・LeBrasseur のグループは別の重要な呼吸器疾患である特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) と老化細胞の関連について報告している [25]。IPF は特発性間質性肺炎の大部分を占める難治性の疾患であり、COPD と同様に加齢とともにその罹患率は上昇する [26]。マウスに抗がん剤であるプレオマイシンを投与すると、IPF に酷似した肺線維症を誘発可能であり、IPF モデルとして頻用される。ヒト IPF 患者の肺組織では、細胞老化が病変部位に誘導されており、プレオマイシン投与による IPF モデルマウスにおいても同様に細胞老化が亢進する。INK-ATTAC マウス [27] を用いて老化細胞除去をプレオマイシン投与マウスで行うと、肺組織の線維化は顕著に抑制されることから、少なくとも部分的に、細胞老化が線維症を媒介する因子であることが考えられる。

一方、マウスの肺高血圧症モデルにおいては、p53 を介した細胞老化の誘導が、血管平滑筋細胞の増殖による血管リモデリングを抑え、病態を抑制・回復可能であることが報告されていることから [28,29]、細胞老化は必ずしも呼吸器病態を増悪化するだけではなく、有益な側面を持つことが示唆される。

5. セノリティック薬と肺疾患

筆者らおよび米国のグループの研究結果は、肺気腫や肺線維症などの呼吸器疾患において、老化細胞が創薬標

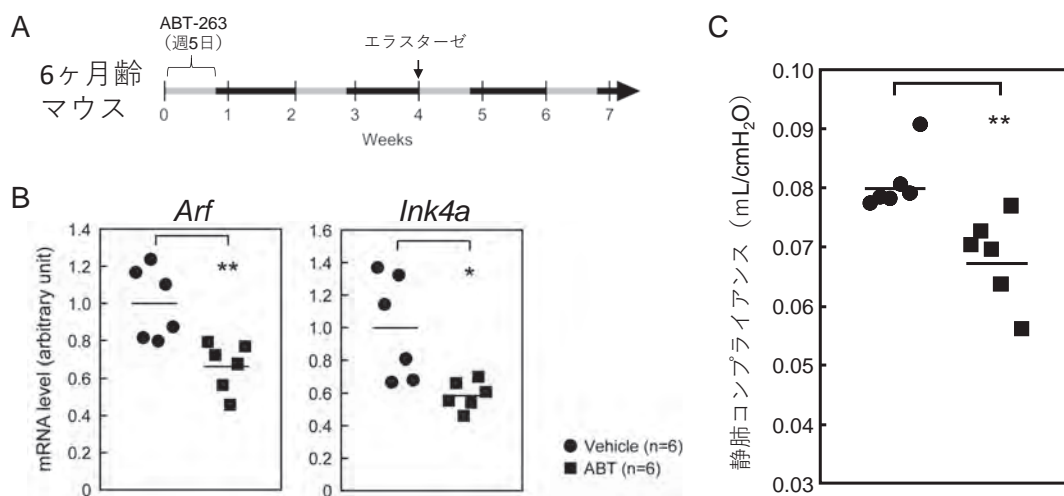


図2. エラスターゼ誘導性肺気腫モデルにおけるセノリティック薬の効果
(A) 6ヶ月齢のマウスに7週間のスケジュールでABT-263を経口投与した。エラスターゼはABT-263投与開始4週間後に経鼻投与した。(B) 肺組織における細胞老化マーカー *Arf* および *Ink4a* 遺伝子の発現を、内部標準として *Gapdh* を使用し、リアルタイムPCRにより定量した。(C) スパイロメトリーにより肺組織コンプライアンス値を測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t検定)。文献 [13]より改変引用。

的として有望であることを示唆している。実際に筆者らはセノリティック活性を持つ ABT-263 (Navitoclax) をエラスターゼ誘導性肺気腫モデルに前投与し、肺組織の細胞老化マーカーが減少すること、気腫病態が緩和されることを確認している [14] (図 2)。したがってセノリティック薬を用いた薬学的な老化細胞のターゲティングが、ヒト疾患においても有効なアプローチであることが期待される。IPF に関しては、米国 Mayo Clinic のグループがダサチニブとケルセチンの併用が有効であることを [25]、また別のグループは ABT-263 が有効であることを報告している [30]。

セノリティック薬のいくつかは、既に臨床試験を開始されており (渡邊・原の項を参照)、ダサチニブ+ケルセチンは IPF 患者に対して投与されている。現時点で公開されているデータでは、血中の SASP 関連因子の低下傾向が認められているが、呼吸機能の改善はみられていない [31]。また、FOXO4-DRI ペプチドは COPD に対して前臨床試験が行われているという情報があるが、詳細については公開されていない。

6. 展望

世界保健機構の調査では、COPD による死亡数は毎年増加する傾向にあり、2016 年の時点では死因の第 3 位であることが報告されている [32]。未曾有の超高齢化社会を迎えつつある我が国においても、この問題は今後益々肥大化することが予測される。しかしながら、その主要病態である肺気腫に関しては、現時点で治療法は存在せず、対症療法に頼るのみであり、新たな創薬・治療標的の発見が待たれていた。

筆者らの行った実験では、動物モデルにおいてセノリティック薬が肺気腫病態を緩和したが [14]、既に重篤な病態に陥ったモデル動物では、老化細胞を排除しても殆ど効果が認められなかった (未発表)。したがって、老化細胞の排除は肺気腫病態の進行を抑えることはできても、組織の機能的再生には不十分である可能性があり、同疾患に対するセノリティック薬の適用については慎重になるべきかも知れない。しかしながら、老化細胞の排除というアプローチは、様々な加齢性疾患に対して有効な手段となることが期待されており、今後の疾患モデル動物を用いた新たな治療モデルの確立と、ヒト疾患治療への適用を期待したい。

7. 謝辞

共同研究者の順天堂大学佐藤匡先生にお礼申し上げます。本稿で紹介した研究は、公益財団法人喫煙科学研究財団の助成を受けて行われました。

8. 参考文献

1. Ben-Porath I and Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961-976, 2005.
2. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, *et al.* The senescence-associated secretory phenotype: the

- dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99-118, 2010.
3. 三河隆太, 杉本昌隆 細胞老化研究の新展開—老化細胞は新たな創薬標的となるか—. *基礎老化研究* 41: 31-37, 2017.
4. 早川智久, 本山 昇 SASP: 細胞老化と個体老化の接点. *基礎老化研究* 35: 29-31, 2011.
5. Goldstein S. Lifespan of cultured cells in progeria. *Lancet* 1: 424, 1969.
6. Rohme D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5009-5013, 1981.
7. Karin O, Agrawal A, Porat Z, *et al.* Senescent cell turnover slows with age providing an explanation for the Gompertz law. *Nat Commun* 10: 5495, 2019.
8. Dimri GP, Le, X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367, 1995.
9. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114: 1299-1307, 2004.
10. Baker DJ, Childs BG, Durik M, *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530: 184-189, 2016.
11. Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, *et al.* Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight* 1: e87732, 2016.
12. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741-747, 2003.
13. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91: 649-659, 1997.
14. Mikawa R, Suzuki Y, Baskoro H, *et al.* Elimination of p19(ARF) -expressing cells protects against pulmonary emphysema in mice. *Aging Cell* 17: e12827, 2018.
15. Mikawa R, Sato T, Suzuki Y, *et al.* p19(Arf) Exacerbates Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Dysfunction. *Biomolecules* 10: 2020.
16. Canadian Health Measures Survey 2007 to 2009. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-625-x/2010001/article/11088-eng.htm>
17. Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, *et al.* The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev* 28: 548-560, 2014.
18. Haspel JA, Chettimada S, Shaik RS, *et al.*

- Circadian rhythm reprogramming during lung inflammation. *Nat Commun* 5: 4753, 2014.
19. Tsuji T, Aoshiha K, and Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 886-893, 2006.
 20. Karrasch S, Holz O and Jorres RA. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 102: 1215-1230, 2008.
 21. Tsuji T, Aoshiha K and Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 643-649, 2004.
 22. Ueno M, Maeno T, Nishimura S, *et al.* Alendronate inhalation ameliorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice by induction of apoptosis of alveolar macrophages. *Nat Commun* 6: 6332, 2015.
 23. Antunes MA and Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc* 83: 1385-1396, 2011.
 24. Sato T, Seyama K, Sato Y, *et al.* Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 530-537, 2006.
 25. Schafer MJ, White TA, Iijima K, *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8: 14532, 2017.
 26. King TE Jr, Pardo A and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378: 1949-1961, 2011.
 27. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-236, 2011.
 28. Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, *et al.* p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *American journal of physiology. Lung Cell Mol Physiol* 300: L753-761, 2011.
 29. Mouraret N, Marcos E, Abid S, *et al.* Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation* 127: 1664-1676, 2013.
 30. Wiley CD, Brumwell AN, Davis SS, *et al.* Secretion of leukotrienes by senescent lung fibroblasts promotes pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 4: e130056, 2019.
 31. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonina T, *et al.* Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* 40: 554-563, 2019.
 32. World Health Organization Global Health Estimates 2016, https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/

Roles of cellular senescence in pulmonary aging and diseases

Koichiro Kawaguchi¹⁾, Masataka Sugimoto^{1,2)}

¹⁾ Research Institute, National Center for Geriatrics and Gerontology

²⁾ Nagoya University Graduate School of Medicine

Abstract

Upon irreparable damages, most of mammalian somatic cells undergo irreversible cell cycle arrest called cellular senescence. It has been long known that cellular senescence acts as a potent tumor suppressor, and increasing amount of evidences suggests that it is also involved in a wide range of biological processes, from development to aging.

Senescent cells accumulate in tissues during aging, and are considered to underlie tissue aging. Recent studies in this research area focused on the pathophysiological roles of cellular senescence in tissue aging and diseases. Semi-genetic or pharmacological ablation of senescent cells has been shown to ameliorate many aging-associated features. Furthermore, cellular senescence also appears to contribute to the onset and progression of several aging-associated diseases.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of death worldwide, and there is currently no cure for this disease. Cellular senescence is likely involved in COPD, and the efficacy of senescent cell-targeting in this disease is being tested. In this review, we focus on and discuss the roles of cellular senescence in pulmonary aging and diseases.

Keywords : Senescence, Senolysis, Lung, COPD, Emphysema