

【総説】

## ショウジョウバエにおける細胞老化と SASP

芥 真弓、井垣 達吏

京都大学大学院 生命科学研究所 システム機能学分野

### 要約

細胞老化現象は、がん抑制的およびがん促進的な相反する2つの性質をもち、後者の作用は老化関連分泌表現型 (SASP) を介した周辺細胞への様々な影響によって引き起こされると考えられる。細胞老化や SASP の誘導メカニズムはこれまで哺乳類において研究されてきたが、我々はこれらの現象がショウジョウバエにおいても進化的に保存されていることを見いだした。また、ショウジョウバエの老化細胞における細胞周期停止や SASP 誘導には、JNK シグナルが重要な役割を果たし、これにより細胞間コミュニケーションを介した腫瘍増殖や悪性化が引き起こされることも明らかになってきた。今後、ショウジョウバエ遺伝学を駆使した研究により、細胞老化を介したがん制御や個体老化制御の分子メカニズムが明らかになっていくと期待される。

キーワード : Cellular senescence, *Drosophila*, SASP, JNK, Aging

### 1. はじめに

細胞老化は、細胞周期が不可逆的に停止する現象として定義される。これは、1961年、Hayflickらによるヒト胎児線維芽細胞の長期培養実験で、分裂限界に達した細胞が引き起こす現象として最初に見出された。以降、ヒトやマウスといった哺乳類細胞を中心に細胞老化の研究が行われてきた。近年、細胞老化を起こした細胞 (老化細胞) が種々の分泌因子を高発現して炎症反応や発がんを誘導する Senescence-associated secretory phenotype (SASP) が見出されて以降、がん抑制的に働くと考えられていた細胞老化現象はがん促進的にも働きうると考えられるようになった。哺乳類の系で細胞老化についての知見が蓄積されてきた一方で、無脊椎動物で細胞老化現象が保存されているのかは長らく不明であった。我々は以前、ショウジョウバエにおいて細胞老化および SASP 現象を初めて捉えることに成功した

[1,2]。さらに、老化細胞での細胞周期停止と SASP 誘発に c-Jun N-terminal kinase (JNK) が深く関わることを見出した [2]。最近、哺乳類の系において細胞老化が個体老化を促進するという報告が蓄積し、我々もショウジョウバエにおける細胞老化と個体老化の分子リンクを示唆するデータを得ている。本稿では、我々が明らかにしたショウジョウバエにおける細胞老化と SASP の誘発メカニズムを中心に概説するとともに、細胞老化の個体老化への関与について議論する。

### 2. ショウジョウバエにおける細胞老化現象と SASP

Hayflickらが見出した細胞老化は複製老化 (replicative senescence) と呼ばれ、細胞が DNA 複製を繰り返したことによるテロメアの短小に起因するとされている [3,4]。一方、その後のマウス細胞を用いた研究で、DNA 損傷や活性酸素種 (ROS)、特定のがん遺伝子活性化等の様々な細胞ストレスによって、テロメアの短小無しに細胞老化 (不可逆的な細胞周期停止) が誘導されることが明らかになった。これらは現在、早期細胞老化 (premature senescence) と呼ばれ、がん遺伝子誘導性細胞老化 (OIS: oncogene-induced senescence) やストレス誘導性細胞老化 (SIS: stress-induced senescence) と位置付けられている [5]。いずれの細胞老化現象も段階的に成熟するプロセスと捉えられており、一部の細胞

連絡先 : 芥真弓、井垣達吏

〒 606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29

TEL : 075-753-7684

FAX : 075-753-7686

E-mail : igaki.tatsushi.4s@kyoto-u.ac.jp

akuta.mayumi.73z@st.kyoto-u.ac.jp

老化表現型を示す初期老化 (early senescence) から全ての細胞老化表現型を示す完全老化 (full senescence) へと移行する [6]。初期老化細胞では、Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) の活性上昇、cyclin-dependent kinase (CDK) 阻害因子 p16 や p21 の発現上昇、細胞の肥大化、ヘテロクロマチン形成といった表現型が見られる。また、初期老化細胞は人為的に p38 阻害や p16<sup>INK4a</sup> 不活性化を起こすと細胞周期の進行を再開できるため、細胞周期停止は潜在的に可逆である。一方、完全老化細胞は SA- $\beta$ -gal 活性上昇を始めとする上記の表現型を呈する上、細胞周期停止は不可逆である。加えて、SASP を呈する点は完全老化細胞の特徴である。SASP は、老化細胞が炎症性サイトカインや増殖因子、プロテアーゼ等の分泌因子を高発現し、周辺細胞に対して様々な影響を及ぼす現象である。これにより、SASP は組織修復に寄与したり、炎症反応や発がんを促進したりすると考えられている。これらの細胞老化の知見はいずれも脊椎動物を用いた実験から得られたもので、無脊椎動物にも同様に細胞老化現象が保存されているかは不明であった。我々は以前、ショウジョウバエにおいても SASP をはじめとする細胞老化現象が存在することを世界に先駆けて示した [1,2]。具体的には、ショウジョウバエ成虫原基において、ヒトのがん組織で高頻度に認められるがん遺伝子 Ras の活性化 (Ras<sup>V12</sup>) とミトコンドリア機能障害 (*mito*<sup>-/-</sup>) を同時に起こした変異細胞 (以降、Ras<sup>V12</sup>/*mito*<sup>-/-</sup>細胞と表記) のクローンを、モザイク状に誘導した。すると、Ras<sup>V12</sup>/*mito*<sup>-/-</sup>細胞クローンは SA- $\beta$ -gal 活性の上昇、CDK 阻害因子 Dacapo (p21/p27 ホモログ) の発現上昇、細胞の肥大化、ヘテロクロマチ

ン形成、細胞周期停止、SASP といった細胞老化表現型を呈した (図 1)。また興味深いことに、ミトコンドリア機能障害のない Ras<sup>V12</sup> 細胞クローンでは SA- $\beta$ -gal の活性上昇、Dacapo の発現上昇、ヘテロクロマチン形成、細胞肥大化は起こるが、細胞周期停止と SASP は見られない [2]。これらのことから、ショウジョウバエ上皮では Ras の活性化で初期老化が誘導され、そこにミトコンドリア機能障害が加わることで完全老化へと成熟すると考えられる。なお、細胞周期停止が不可逆であるかについては、今後更なる検証が必要である。Ras<sup>V12</sup>/*mito*<sup>-/-</sup>細胞はショウジョウバエ SASP 因子とされる炎症性サイトカイン Unpaired (Upd ; IL-6 ホモログ) を高発現し、周辺細胞の増殖を促進する。Upd は Hippo 経路の下流で発現誘導され、その受容体 Domeless を介して周辺細胞の JAK/STAT 経路を活性化する。周辺細胞が正常細胞ならば増殖を促進するのみだが、周辺細胞が良性腫瘍細胞である Ras<sup>V12</sup> 細胞の場合は浸潤・転移能という悪性の形質を獲得した (図 1) [1,2]。これらのことから、ショウジョウバエにおいても細胞老化現象はがん抑制的な性質と SASP を介したがん促進的な性質を有することが示された。

### 3. ショウジョウバエ細胞老化における JNK の役割

細胞周期停止は細胞老化の特徴の 1 つであり、DNA 損傷によって誘導される。DNA 損傷応答としては、p53-p21-Rb 経路や p16-Rb 経路の活性化が挙げられる。CDK2 阻害因子 p21 および CDK4/6 阻害因子 p16 は、いずれも Rb を活性化して細胞周期停止を負に制御する。がん細胞における DNA 損傷は、がん遺伝子活性化

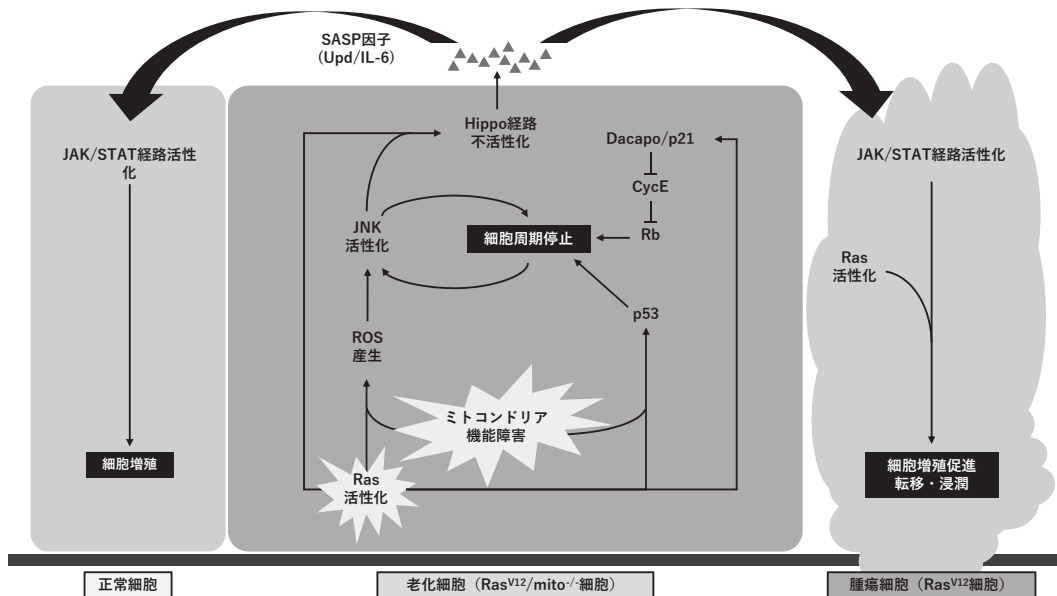


図 1. ショウジョウバエの細胞老化シグナルと周辺細胞への影響

Ras 活性化 (Ras<sup>V12</sup>) とミトコンドリア機能障害 (*mito*<sup>-/-</sup>) を同時にもち変異細胞 (Ras<sup>V12</sup>/*mito*<sup>-/-</sup>細胞) では顕著な JNK 活性化が引き起こされる [1,2]。さらに、Ras<sup>V12</sup>/*mito*<sup>-/-</sup>細胞からショウジョウバエ SASP 因子である Upd (IL-6 ホモログ) が分泌され、周辺細胞の増殖が促進される。周辺細胞が Ras を活性化させた良性腫瘍細胞 (Ras<sup>V12</sup>細胞) の場合、悪性が引き起こされる。

に伴う酸化ストレスによってもたらされると考えられており、ショウジョウバエ  $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞でも酸化ストレスの原因となる活性酸素種 (ROS) 産生と DNA 損傷が誘導されることが分かっている [1,2]。ここで、 $Ras$  活性化のみの細胞 (以降、 $Ras^{V12}$  細胞と表記) やミトコンドリア機能障害のみの細胞 (以降、 $mito^{-/-}$  細胞と表記) では、ROS 産生や DNA 損傷は見られない。したがって両変異の協調が ROS 産生に重要であると考えられる。また、老化した哺乳類細胞で発現上昇する p21 は、CDK2 による Cyclin E (CycE) のリン酸化を抑制することで、G1 期での細胞周期停止を引き起こす。ショウジョウバエ  $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞においても、p21 ホモログである Dacapo の発現上昇を介した細胞周期停止が見られた。すなわち、ショウジョウバエにも Dacapo/CycE/Rb 経路が保存されていることが分かった。ここで、ショウジョウバエの細胞周期停止には dJNK (JNK ホモログ) の活性が必須であることが明らかになった。 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞では dJNK が顕著に活性化しており、この現象は  $Ras^{V12}$  細胞や  $mito^{-/-}$  細胞には見られなかった。dJNK を直接活性化する Hep (JNK キナーゼ MKK7 ホモログ) の恒常活性型を過剰発現させたところ、細胞周期停止が引き起こされた。一方で、 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞での dJNK 活性化には細胞周期停止が重要な役割を果たすことも分かった。 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞で CycE を強制発現させると、ROS 産生に影響を与えることなく dJNK 活性化が抑制された。また、ROS 産生と dJNK 活性が低レベルで見られる  $Ras^{V12}$  細胞に CycE 機能欠失変異を導入すると、顕著に dJNK が活性化した。以上のことから、dJNK 活性化と細胞周期停止は互いに促進しあう、ポジティブフィードバックループを形成していると考えられる (図 1) [2]。dJNK がいかにして細胞周期を停止するかは不明だが、ヒト大腸がん細胞において JNK1 がリン酸化を介し p21 を安定化させるという報告があり [7]、ショウジョウバエでも dJNK が Dacapo の安定化によって細胞周期を停止している可能性がある。

さらに我々は、dJNK 活性が SASP 誘発に必須であることも明らかにした [1,2]。 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞において dJNK 活性を抑制すると、Hippo 経路の抑制が起こらず、SASP 因子 Upd の発現上昇が抑制された [1] (図 1)。Hippo 経路はがん抑制経路であり、ショウジョウバエ及び哺乳類において Hippo 経路が Upd/IL-6 の産生を負に制御することが報告されている [8,9]。また、ショウジョウバエにおいて JNK シグナルと Ras シグナルの協調が細胞内 F-アクチンの集積を介して Hippo 経路を抑制することを我々は見出した [1,10]。 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  細胞で ROS 産生を抑制すると dJNK 活性が抑制され、それと同時に周辺細胞の増殖促進も抑制された [2]。以上をまとめると、 $Ras$  活性化変異とミトコンドリア機能障害が協調すると、ROS 産生及び細胞周期停止のポジティブフィードバックループを介して dJNK の顕著な活性化が起こる。その結果、Hippo 経路が不活性化することで SASP を呈するようになると考えられる。すなわ

ち、JNK はショウジョウバエの細胞老化において非常に重要な役割を担っており、細胞周期停止メカニズムと SASP 誘発メカニズムの双方に関わっている。

#### 4. ショウジョウバエにおける細胞老化と個体老化の関連

最近我々はショウジョウバエにおける細胞老化と個体老化の関連について着目しており、その存在を示唆する知見をいくつか紹介する。哺乳類細胞における細胞老化誘導には、p53-p21-Rb 経路と p16-Rb 経路の 2 種類が存在することは先述の通りである。p16<sup>INK4a</sup> 腫瘍抑制タンパク質は、CDK4 や CDK6 といったサイクリン依存性キナーゼに対する阻害タンパク質として機能する。p16<sup>INK4a</sup> は正常細胞では殆ど発現していないが、細胞が複製限界に達したり発がんストレスを生じたりすると顕著に発現上昇し、G1 期で細胞周期を停止させる。このように、p16<sup>INK4a</sup> は哺乳類細胞において細胞老化、特に複製老化を引き起こす [11,12]。この p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現は、Ras-Raf-MEK キナーゼカスケードに応答し、E-twenty-six 転写因子 Ets1/2 とその抑制因子 Id1 により調節される [13]。一方で、哺乳類の個体老化に関わる代表的な分子は Forkhead box O (FOXO) と呼ばれる転写因子である。FOXO は、Insulin/IGF-1 signaling (IIS) が活性化すると、PI3K/Akt シグナル経路を介して機能が抑制されることが古くから知られている。とりわけアイソフォームの 1 つである FOXO3 は、長寿表現型と関連すると考えられている [14,15]。マウスでは、加齢に伴う FOXO3 タンパク質の減少が、マクロファージの抗炎症反応の低下に関与するという報告がある [16]。また、FOXO3 欠損マウスでは、加齢依存的な腸ニューロンでの JAK-STAT シグナルの活性化、アポトーシス、および腸ニューロン密度の低下が見られ、腸神経系が早期老化様の表現型を呈するとも述べられている [16]。ショウジョウバエでも、インスリン様受容体 (*InR*) やその基質 *chico* の変異等により IIS が低下すると老化が遅延するとされており、このメカニズムに dFOXO (FOXO ホモログ) が関与している [17-19]。加えて、FOXO は他の転写因子と相互作用することが知られており、哺乳類、線虫、ショウジョウバエといった幅広い生物種で FOXO 結合領域には ETS ファミリー転写因子結合領域が広く保存されている [20]。ここで、ショウジョウバエ ETS ファミリー転写因子 Pointed (Pnt) が、個体老化に関わることを示した報告がある [21,22]。具体的には、ショウジョウバエ雌の腸特異的に Pnt の発現を抑制すると、野生型より寿命が延伸した [22]。ここで我々は最近、 $Ras$  誘導性腫瘍の悪性化を駆動する遺伝子変異の網羅的探索により、 $Ras$  シグナル経路の下流で Dacapo の発現を制御する転写因子として Pnt を同定した (投稿中)。Pnt を過剰発現した細胞は Dacapo の発現上昇を示すだけでなく、SA- $\beta$ -gal の活性化や細胞周期停止を含むあらゆる細胞老化の表現型を呈した。ここで、哺乳類細胞の細胞周期制御で重要な p16 は、ショウジョウバエでは保存されていない。したがって、ショウジョウバエの細胞周期制御においては、Pnt を介した

Dacapo の発現制御が重要である可能性が高い。加えて我々は、Pnt が dFOXO による間接的な転写制御を受けていることを見出した (投稿中)。このことから、Pnt は dFOXO の制御下で細胞老化を制御することにより個体寿命を制御している可能性がある。すなわち、Ras/MAPK シグナル経路を介する細胞老化と PI3K/Akt シグナル経路を介する個体老化が Pnt を中心にクロストークしている可能性が考えられる。細胞老化と個体老化の関係性は哺乳類で研究が進んでいる。p16<sup>INK4a</sup> プロモーター制御下でアポトーシスを誘導するトランスジェニックマウスを作製して老化細胞を除去すると、様々な老化関連表現型が遅延し、各臓器の機能も維持されたと報告されている [23,24]。これらのことは、加齢に伴った老化細胞の蓄積が健康寿命に悪影響を及ぼすことを示唆している。ただ、p16<sup>INK4a</sup> 陽性細胞の除去は万能ではなく、たばこの煙 (CS) による慢性閉塞性肺疾患 (COPD) における CS 誘発性のストレス誘発性早期老化 (SIPS) や SASP には p16<sup>INK4a</sup> 陽性細胞除去は効果がないことが示されている [25]。このことから、肺における細胞老化誘導は p16 だけでなく他の因子も複雑に関連して引き起こされる可能性が考えられる。

## 5. おわりに

本稿では、ショウジョウバエにおける細胞老化と SASP の機序、それらによる腫瘍悪性化機構、さらには細胞老化が個体老化に及ぼす影響について概説した。近年の細胞老化研究により細胞老化のメカニズム解析はかなり進展したが、その生理的意義や個体老化との関連性、さらにはその分子機序についてはいまだコンセンサスはない。細胞老化の生理的意義に関しては、正常な個体発生過程でプログラム化された細胞老化が生じ、これがマウスの組織形態形成に必須であることが報告されている [26,27]。最近我々は、ショウジョウバエにおいても同様の現象が存在することを発見した (投稿中)。シグナル伝達機構の遺伝学的解析や寿命解析の容易さなど、ショウジョウバエの利点を最大限に活かすことで、今後の細胞老化研究に新たなコンセプトがもたらされることが期待される。

## 参考文献

- Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, *et al.* Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression via Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*. **490**: 547-551, 2012.
- Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T. Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nature Communications*. **27** (5) : S264, 2014.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. **25**: 585-621, 1961.
- Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in

cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*. **6**: 849-51, 2000.

- Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer Sci*. **104**: 525- 530, 2013.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, *et al.* Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. **21** (12) : 1424-1435, 2015.
- Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, *et al.* The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21 (Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem*. **277** (33) : 29792-29802, 2002.
- Li LF, Ouyang B, Choukroun G, *et al.* Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**: 1437-1442, 2010.
- Ren F, Wang B, Yue T, *et al.* Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107** (49) : 21064-21069, 2010.
- Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T. JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity. *Dev Biol*. **403** (2) :162-171. 2015.
- Hara E, Smith R, Parry D, *et al.* Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*. **16** (3) : 859-867, 1996.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, *et al.* Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell*. **88** (5) : 593-602, 1997.
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16<sup>INK4a</sup> expression during cellular senescence. *Nature*. **409** (6823) : 1067-1070, 2001.
- Willcox BJ, Donlon TA, He Q, *et al.* FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** (37) : 13987-13992, 2008.
- Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, *et al.* Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106** (8) : 2700-2705, 2009.
- Becker L, Nguyen L, Gill J, *et al.* Age-dependent shift in macrophage polarisation causes inflammation-mediated degeneration of enteric nervous system. *Gut*. **67** (5) : 827-836, 2018.
- Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, *et al.* Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein.

- Science. **292** (5514) : 104-106, 2001.
18. Tu MP, Yin CM, Tatar M. Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging Cell*. **1** (2) : 158-160, 2002.
  19. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, *et al.* A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*. **292**: 107-110, 2001.
  20. Webb AE, Kundaje A, Brunet A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging Cell*. **15** (4) : 673-685. 2016
  21. Alic N, Giannakou ME, Papatheodorou I, *et al.* Interplay of dFOXO and Two ETS-Family Transcription Factors Determines Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics*. **10** (9) , 2014.
  22. Dobson AJ, Boulton-McDonald R, Houchou L, *et al.* Longevity is determined by ETS transcription factors in multiple tissues and diverse species. *PLoS Genet*. **15** (7) , 2019.
  23. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, *et al.* Clearance of p16<sup>Ink4a</sup>-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. **479**: 232-236, 2011.
  24. Baker DJ, Childs BG, Durik M, *et al.* Naturally occurring p16 (Ink4a) -positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. **530** (7589) : 184-189, 2016.
  25. Sundar IK, Rashid K, Gerloff J, *et al.* Genetic Ablation of p16<sup>INK4a</sup> Does Not Protect against Cellular Senescence in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **59** (2) : 189-199, 2018.
  26. Muñoz-Espin D, Cañamero M, Maraver A, *et al.* Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* **155**: 1104-1118, 2013.
  27. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**: 1119-1130, 2013.

## Cellular senescence and SASP in *Drosophila*

Mayumi Akuta, Tatsushi Igaki

Laboratory of Genetics, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

### Abstract

Cellular senescence can act as both tumor-suppressor and tumor promoter, the latter of which is mediated by a phenomenon called Senescence-associated secretory phenotype (SASP) . The roles and mechanisms of cellular senescence and SASP have been studied in mammalian systems. Recent studies in *Drosophila* have found that cellular senescence and SASP are also conserved in invertebrates. c-Jun N-terminal kinase (JNK) plays critical roles in cell-cycle arrest and SASP induction in senescent cells in *Drosophila*, regulating tumor growth and progression via cell-cell communication. In addition, the correlation between cellular senescence and aging found in mammals may also be studied in *Drosophila*. Future studies using the powerful genetics of *Drosophila* would provide new insights into the roles and mechanisms of cellular senescence in cancer regulation and animal aging.

**Keywords** : Cellular senescence, *Drosophila*, SASP, JNK, Aging