

【総説】

複製老化プロセスにおけるミトコンドリアの変遷

藤田 泰典、大澤 郁朗

東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 生体調節機能研究

要約

細胞老化とは細胞の不可逆的分裂停止状態であり、長期培養で誘導される複製老化、がん遺伝子導入やストレス暴露で誘発される早期細胞老化が知られる。複製老化では細く長くなったミトコンドリアが観察される。これにはミトコンドリア分裂関連因子の発現抑制が関与するが、短軸方向に退縮する機序は不明である。一方、クリステを指標とするミトコンドリア内部構造には大きな変化は見られない。ミトコンドリア由来の活性酸素種の増加は老化を進行させるが、複製老化では分裂停止後に呼吸鎖機能低下や活性酸素種の増大といったミトコンドリア機能異常が観察される。複製老化の進行に対するミトコンドリア機能異常の関与については更なる研究が必要である。また、ミトコンドリア機能障害で誘導される細胞老化は複製老化と類似点があり、早期細胞老化とは相違点が多い。ミトコンドリアの関与は細胞老化の種類によって異なるものと推察される。

キーワード：細胞老化、複製老化、ミトコンドリア

1. はじめに

細胞老化は分裂能を有する細胞が不可逆的に増殖を停止した状態であり、1960年代に Hayflick によりはじめて報告された^[1, 2]。その報告では、胎児から摘出した細胞を培養し続けると、やがて細胞は特徴的な形態を示しながら増殖を停止することが観察され、細胞の分裂回数に限界があることが示された。この長期間の継代培養によって生ずる細胞老化は「複製老化 (replicative senescence)」と呼ばれ、繰り返される DNA 複製に伴うテロメアの短小化が原因のひとつだと考えられている。その後、がん遺伝子変異の導入や、DNA ダメージ、酸化ストレス等によっても細胞老化が引き起こされることが明らかとなり、がん遺伝子誘導性細胞老化 (oncogene-induced senescence) やストレス誘導性細胞老化 (stress-induced senescence) と呼ばれている。これらは、複製老化と比較して短期間で細胞老化に至り、「早期細胞老化 (premature senescence)」と称されるこ

ともある。また、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるロテノン、アンチマイシン A の処理や、ミトコンドリアサーチュイン SIRT3 遺伝子のノックダウンにより、細胞老化様の表現型を呈することが報告され、ミトコンドリア機能障害が異なるタイプの細胞老化 (mitochondrial dysfunction-associated senescence) を引き起こす可能性が示されている^[3]。

細胞老化とミトコンドリアの関係について、これまで多くの知見が蓄積されているが、必ずしも一致した報告がなされているわけではない。細胞老化のタイプによる相違もあり、複製老化や早期細胞老化など、タイプ毎に整理・解釈することが重要である。本総説では、細胞老化に伴うミトコンドリアの形態的・機能的変化に着目し、我々の最近の知見を紹介しながら、主に複製老化とミトコンドリアの関係について議論したい。また、ミトコンドリア機能障害誘導性細胞老化と他の細胞老化との相違についても紹介する。

2. 複製老化とミトコンドリアダイナミクス

ミトコンドリアは、種々の刺激やストレスにตอบสนองして分裂・融合を行い、その形態をダイナミックに変化させる。例えば、電子伝達系と ATP 合成酵素の共役を阻害するカルボニルシアニド 3-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) などの脱共役剤を細胞に投与すると、チュー

連絡先：藤田泰典

〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

TEL：03-3964-3241

FAX：03-3579-4776

E-mail：yfujita@tmig.or.jp

ブ状のミトコンドリアが短時間で断片化され、球状に近い形態に変容する。一方、細胞を栄養飢餓状態にすると、より伸長したチューブ状のミトコンドリアが観察されるようになる^[4]。このようなミトコンドリアの分裂・融合の基盤にある分子メカニズムについては既に多くの知見があり、主要な役割を担う分子も同定されている。ミトコンドリア分裂時には、細胞質の dynamin-related protein 1 (DRP1) がミトコンドリア外膜に局在する fission protein-1 (FIS1)、mitochondrial fission factor (MFF)、mitochondrial dynamics protein-49 (MiD49)、mitochondrial dynamics protein-51 (MiD51) に結合し、分裂部位を取り囲むようにリング状に配置され、その GTPase 活性により締め付けるようにして分断すると考えられている^[5]。一方、ミトコンドリア同士が融合する際には、ミトコンドリアの外膜に局在する mitofusin 1 (MFN1)、mitofusin 2 (MFN2) と、内膜に存在する optic atrophy 1 (OPA1) が、異なるミトコンドリアの膜間でオリゴマーを形成し、それぞれの膜の融合に関与している^[5]。

複製老化に至った細胞では、増殖中の細胞と比較して、より細長い形態のミトコンドリアが観察される (図 1 A)。なぜ、複製老化に伴いミトコンドリアは伸長化するのだろうか。第一にミトコンドリアの分裂阻害が考えられる。栄養飢餓が原因でミトコンドリアが伸長する場合、ミトコンドリアの分裂に必要な DRP1 のリン酸化が減少することが示されている。一方、複製老化の場合も、増殖低下に伴う DRP1 と分裂関連因子 FIS1 の発現低下により、ミトコンドリアの分裂が抑制され、伸長化することが報告されている^[6]。FIS1 をノックダウ

ンした細胞では、ミトコンドリアの伸長化後、速やかに senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) 染色陽性などの細胞老化表現型を示し、それらが融合関連因子 OPA1 の欠失で抑制されることが報告されている^[7]。しかしながら、複製老化は長い時間をかけて起こる現象であり、FIS1 の発現低下もノックダウンほど顕著でないことから^[6]、複製老化におけるミトコンドリアの伸長化では別の因子が関与しているのかもしれない。第二にミトコンドリアの融合促進が考えられる。一般的に、代謝が活発な細胞では、互いに融合しネットワークを形成したミトコンドリアが観察される。これにより、効率的な代謝物の交換、離れた領域に存在するミトコンドリアへの膜電位の伝達、ATP 産生の促進などが可能になる。実際に、融合関連因子である mitofusin や OPA1 をノックダウンし、ミトコンドリアを断片化させると、酸素消費速度が低下する^[8, 9]。また、融合によりミトコンドリアの ATP 産生が増加し、細胞死が抑制される^[10]。後述のように、早期細胞老化では酸素消費速度の上昇が報告されており、ミトコンドリア代謝を活性化させるため、積極的にミトコンドリアが伸長化しているのかも知れない。一方、複製老化に至った細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖機能が低下している可能性が考えられ、ミトコンドリアの長さとは必ずしも正の相関を示すわけではない。

我々は、超解像イメージングや電子顕微鏡観察により、複製老化した細胞のミトコンドリアが短軸方向に縮小していることを観察している (図 1 B)。つまり、ミトコンドリアが分裂阻害や融合により長軸方向へ長くなっただけでなく、文字通り「細長い」形態に変化していた。

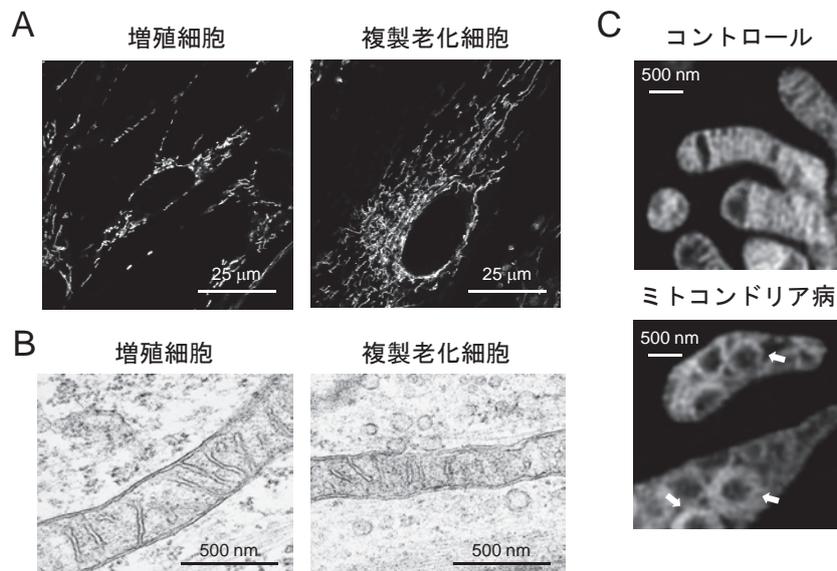


図 1. ミトコンドリアの形態・内部構造

A, B. ヒト胎児由来線維芽細胞 TIG-1 のミトコンドリア蛍光イメージング画像 (A) と電子顕微鏡で観察したミトコンドリア (B)。継代数の少ない増殖細胞と長期継代培養で増殖が停止した複製老化細胞を MitoBright LT Deep Red (DOJINDO) で染色。C. ミトコンドリア病モデル細胞で見られる異常クリステ。コントロール細胞では、短軸方向に伸びた線状のクリステが観察される。一方、ミトコンドリア病モデル細胞では、ミトコンドリアの内部にドーナツ状のクリステが観察される。MitoBright LT Deep Red で染色し、超解像 STED 顕微鏡 (Leica) で観察。

一方、細胞老化に伴うミトコンドリア量の増加が知られており、融合ではなく、ミトコンドリアの生合成が長軸方向に促進された可能性も考えられる。実際、DNA ダメージ応答 (DDR) による、Akt、mTOR、PGC-1 β を介したミトコンドリア生合成経路の活性化が、細胞老化に伴うミトコンドリアの増加に関与することが示唆されている^[11, 12]。しかしながら、なぜミトコンドリアが短軸方向に肥大しないのか、さらには短軸方向へ退縮するのかは不明である。細胞骨格や mitochondria-associated ER membrane (MAM) を含むミトコンドリア周囲の環境変化が要因として考えられる。

ミトコンドリアの細長化には内部構造の関与も考えられる。ミトコンドリア内部には内膜から形成されるクリステが存在し、電子伝達系による効率的 ATP 産生に寄与している。細胞老化に伴うミトコンドリアの内部構造変化を明確に示した報告は限られており、また近年まで生きた状態でミトコンドリアの内部を観察する技術が無かったため、実際にどのような変化が起きているかについては不明であった。我々は、超解像顕微鏡を用いたライブイメージングにより、複製老化に伴うミトコンドリアの内部構造変化を明らかにしようとしている。ここで、ミトコンドリア機能障害に伴う内部構造変化の例を示す (図 1 C)。ミトコンドリア DNA (mtDNA) の A3243G 変異を有するミトコンドリア病モデル細胞では異常なクリステ構造が観察された。mtDNA 特異的複製阻害剤の 2',3'-ジデオキシシチジンで処理した細胞でも同様な異常構造が観察されている^[13]。今のところ、複製老化した細胞ではミトコンドリア内部での顕著な異常構造は観察されていないが、より詳細な観察・解析を進めている。

3. 複製老化とミトコンドリア機能障害

早期細胞老化を中心に種々の細胞老化で活性酸素種 (ROS) の増加が観察されており、ミトコンドリア由来の ROS がタンパク質、脂質、核酸などに障害を与え、さらにはテロメアの障害・短小化を促進し、細胞老化の進行に寄与するものと考えられている^[14, 15]。実際、低濃度の脱共役剤で ROS の産生を抑制すると、テロメアの短小化が遅れ、複製老化の進行も遅延する^[14]。低酸素下での ROS 産生低下が複製老化を遅延させることも根拠となっているが^[16]、反対に低酸素下の培養によって ROS が増加し、hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) 依存的に細胞老化を遅らせるという報告もある^[17]。また、高酸素下ではミトコンドリア特異的な抗酸化剤による複製老化の遅延が示されているが^[18]、通常の酸素濃度下で効果があるかは不明である。このように、ミトコンドリア ROS が複製老化の進行にも寄与するののかは太りに議論の余地がある。

我々は、複製老化とミトコンドリア機能障害の関係を明らかにするためには、細胞分裂が完全に停止する前の、複製老化プロセスが進行している細胞を評価することが重要だと考え、複製老化進行期の解析を進めている (図 2)。興味深いことに、進行期の細胞では、既に DNA ダメージ応答は誘導されているが、ミトコンドリア ROS の顕著な増加は観察されず、複製老化の進行にミトコンドリア由来の ROS が関与する可能性は低いものと考えている。細胞分裂が停止した終末期については、現在詳細な解析を進めている。

細胞老化を起こした細胞ではミトコンドリア膜電位の低下が報告されている^[14, 19, 20]。我々の研究においても、複製老化終末期で膜電位の低下が認められたが、進行期

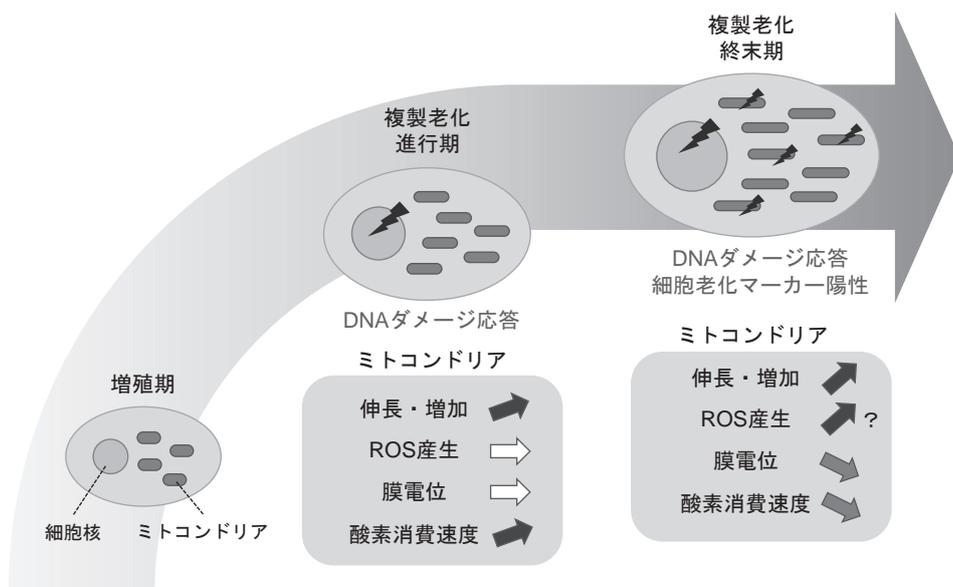


図 2. 複製老化過程のミトコンドリア変化

DNA ダメージ応答が生じる複製老化進行期では、ミトコンドリアが伸長・増加し、細胞あたりの酸素消費速度が上昇する。ミトコンドリアからの ROS 産生はほとんど変化しない。分裂が完全に停止し、細胞老化マーカー陽性となる複製老化終末期では、ミトコンドリアがさらに細く伸長・増加し、膜電位、酸素消費速度の低下が観察され、呼吸鎖機能の低下が認められる。

には膜電位の低下は観察されていない。さらに、進行期の段階では呼吸鎖複合体タンパク質の減少や酸素消費速度の低下なども認められず、複製老化の進行におけるミトコンドリア呼吸鎖機能障害の関与は低いと考えている。

複製老化後の細胞では、ミトコンドリアにおける ROS 産生の増加、膜電位の低下が報告されている。ミトコンドリア内で ROS が産生される主な箇所は呼吸鎖複合体 I と III である^[21]。がん遺伝子誘導性の早期細胞老化では、解糖系及び TCA 回路の活性化と、酸素消費速度の上昇が報告されており、代謝活性化に伴う電子伝達系亢進が ROS 産生の増加に寄与している可能性が示されている^[22, 23]。また、細胞老化に伴う senescence-associated secretory phenotype (SASP) 関連因子の分泌に解糖系およびミトコンドリア代謝が重要であることも報告されている^[24]。呼吸鎖複合体に異常がある場合、細胞内の NADH/NAD⁺ 比が増加するが、がん遺伝子誘導性およびストレス誘導性の早期細胞老化では、NADH/NAD⁺ 比が低下することが報告されている^[25]。これらの知見は、早期細胞老化では呼吸鎖機能が維持されることを示しているが、これは複製老化において膜電位が低下するという結果とは一致しない。複製老化では、ROS 産生の増加に応答して脱共役タンパク質 uncoupling protein 2 (UCP2) の発現が誘導され、その働きで膜電位が低下している可能性が示唆されている^[14]。早期細胞老化における UCP の関与は不明である。

複製老化では、早期細胞老化と同様に細胞あたりの酸素消費速度が上昇する^[23, 26]。しかし、細胞あたりのミトコンドリア量も増加していることから、ミトコンドリアあたりの酸素消費速度には変化がないことが報告されている^[26]。一方、我々は、複製老化の進行期では細胞あたりの酸素消費速度が上昇し、終末期にかけて低下することを観察している。進行期から終末期にかけて細胞あたりのミトコンドリア量は増加しているため、ミトコンドリアあたりの酸素消費は低下することになる。終末期には呼吸鎖機能障害が生じ、膜電位の低下と ROS 産生の増加が引き起こされているものと考えている。

4. ミトコンドリア機能障害誘導性細胞老化

以前より、mtDNA の欠失やミトコンドリアタンパク質合成阻害剤の処理により、がん細胞の増殖が停止し、p21 の発現増加や SA- β -gal 染色陽性など、細胞老化と同様の表現型を示すことが報告されていた^[27, 28]。その後、呼吸鎖阻害剤や SIRT3 遺伝子のノックダウンにより、正常線維芽細胞においても細胞老化様の表現型が観察され、ミトコンドリア機能障害により細胞老化が誘導される可能性が示唆された^[3]。このミトコンドリア機能障害モデルでは、細胞核における DNA 障害マーカーの増加は認められず、抗酸化剤が増殖停止に対して効果を示さないことから、DNA 障害および ROS 非依存的に細胞老化が誘導されることと考えられている。また、他の細胞老化と異なり、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現誘導が認められず、SASP が観察されない点もこの細胞老化の特徴の一つである。これについては、SASP 関

連因子の誘導にミトコンドリア代謝が重要であるという知見と一致する。ミトコンドリア機能障害誘導性細胞老化の分子機序としては、NADH/NAD⁺ 比の上昇による AMP/ATP 比の増加が、AMPK 及び p53 を活性化し、細胞増殖を停止させるというメカニズムが提唱されている^[3, 29]。つまり、呼吸鎖障害による細胞内エネルギー代謝の異常が細胞老化を誘導していると考えられ、複製老化の終末期に類似する。一方、がん遺伝子誘導性細胞老化やストレス誘導性細胞老化では NADH/NAD⁺ 比が減少することから、これらの早期細胞老化とミトコンドリア機能障害誘導性細胞老化との間では、細胞老化に至る分子機序は異なるものと考えられる。

5. おわりに

これまで、細胞老化とミトコンドリア機能障害の関係について多くの議論がなされてきた。ミトコンドリアの機能障害は細胞老化を促進するが、ミトコンドリアの除去は細胞老化を遅らせる^[12]。なぜ細胞老化の進行にミトコンドリア機能が必要なのか、その分子メカニズムには未だ多くの疑問が残されている。今回紹介した細胞老化は、恒久的な細胞分裂停止が主要な表現型であり、個体レベルでは分裂能を有する細胞のモデルとして想定される。一方、心筋細胞などの分裂終了細胞においても、加齢に伴って p21 や p16 などの細胞老化マーカーの出現が観察されるが^[30]、その原因や分子機序が分裂細胞に類似するののか、ミトコンドリアの関与はあるののか、さらなる検証が必要である。分裂細胞においても、個体レベルでは環境や細胞種などの違いにより、複製老化と早期細胞老化で見られるような異なった細胞老化プロセスが混在しているものと考えられる。培養系で見出された細胞老化とミトコンドリアの関係を個体レベルで観察・検証するには、組織内における個別の細胞でミトコンドリア機能を如何に評価するかが鍵となろう。今後、*in vivo* でミトコンドリアの形態・機能を高精度に評価する技術やマーカー等が開発されることを期待する。細胞老化におけるミトコンドリアの関与は、細胞老化の種類によって異なっている。それらの機序を解明することは、ミトコンドリアを標的とした老化制御法を開発する上で重要である。また、それぞれの細胞老化におけるミトコンドリアの役割・障害が明確になることで、これまで議論がなされてきた細胞老化とミトコンドリア機能障害の関係が整理され、老化におけるミトコンドリアの意義の理解も進むものと考えられる。

参考文献

1. L. Hayflick, P.S. Moorhead. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.
2. L. Hayflick. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636, 1965.
3. C.D. Wiley, M.C. Velarde, P. Lecot, *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence

- with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* 23: 303-314, 2016.
4. A.S. Rambold, B. Kostelecky, N. Elia, *et al.* Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10190-10195, 2011.
 5. A. Sharma, H.J. Smith, P. Yao, *et al.* Causal roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging. *EMBO Rep* 20: e48395, 2019.
 6. S. Mai, M. Klinkenberg, G. Auburger, *et al.* Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci* 123: 917-926, 2010.
 7. S. Lee, S.Y. Jeong, W.C. Lim, *et al.* Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 282: 22977-22983, 2007.
 8. H. Chen, A. Chomyn, D.C. Chan. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185-26192, 2005.
 9. C.H. Yao, R. Wang, Y. Wang, *et al.* Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife* 8: e41351, 2019.
 10. D. Tondera, S. Grandemange, A. Jourdain, *et al.* SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28: 1589-1600, 2009.
 11. N. Herranz, J. Gil. Mitochondria and senescence: new actors for an old play. *EMBO J* 35: 701-702, 2016.
 12. C. Correia-Melo, F.D. Marques, R. Anderson, *et al.* Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J* 35: 724-742, 2016.
 13. C. Wang, M. Taki, Y. Sato, *et al.* A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 15817-15822, 2019.
 14. J.F. Passos, G. Saretzki, S. Ahmed, *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5: e110, 2007.
 15. W. Qian, N. Kumar, V. Roginskaya, *et al.* Chemoptogenetic damage to mitochondria causes rapid telomere dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 18435-18444, 2019.
 16. L. Packer, K. Fuehr. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267: 423-425, 1977.
 17. E.L. Bell, T.A. Klimova, J. Eisenbart, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol Cell Biol* 27: 5737-5745, 2007.
 18. G. Saretzki, M.P. Murphy, T. von Zglinicki. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell* 2: 141-143, 2003.
 19. J.F. Passos, G. Nelson, C. Wang, *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6: 347, 2010.
 20. O. Moiseeva, V. Bourdeau, A. Roux, *et al.* Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* 29: 4495-4507, 2009.
 21. H.S. Wong, P.A. Dighe, V. Mezera, *et al.* Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem* 292: 16804-16809, 2017.
 22. J. Kaplon, L. Zheng, K. Meissl, *et al.* A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498: 109-112, 2013.
 23. S. Takebayashi, H. Tanaka, S. Hino, *et al.* Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. *Aging Cell* 14: 689-697, 2015.
 24. J.R. Dorr, Y. Yu, M. Milanovic, *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501: 421-425, 2013.
 25. T. Nacarelli, L. Lau, T. Fukumoto, *et al.* NAD (+) metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat Cell Biol* 21: 397-407, 2019.
 26. E. Hutter, K. Renner, G. Pfister, *et al.* Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 380: 919-928, 2004.
 27. S.Y. Park, B. Choi, H. Cheon, *et al.* Cellular aging of mitochondrial DNA-depleted cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1399-1405, 2004.
 28. C.H. Li, S.L. Tzeng, Y.W. Cheng, *et al.* Chloramphenicol-induced mitochondrial stress increases p21 expression and prevents cell apoptosis through a p21-dependent pathway. *J Biol Chem* 280: 26193-26199, 2005.
 29. C.D. Wiley, J. Campisi. From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab* 23: 1013-1021, 2016.
 30. T. von Zglinicki, T. Wan, S. Miwa. Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? *Antioxid Redox Signal* 2020. in press.

Changes in mitochondrial dynamics and function in replicative senescence

Yasunori Fujita, Ikuroh Ohsawa

Biological Process of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Abstract

Cellular senescence, a cell state characterized by an irreversible cell-cycle arrest, is classified into two types, replicative senescence and premature senescence. Replicative senescence is induced by a long-term cultivation, whereas premature senescence is triggered by various stressors such as oncogene activation and genotoxic agents. Mitochondria in replicative senescence are thinner and more elongated than those in proliferating cells. Down-regulation of the mitochondrial fission machinery contributes to the elongation of mitochondria in replicative senescence. However, an abnormal cristae structure is not observed in replicative senescence. After cell-cycle arrest in replicative senescence, mitochondrial dysfunction including a respiratory dysfunction and an increase in reactive oxygen species occurs, whereas mitochondria-derived reactive oxygen species enhances the progression of senescence. It should be further elucidated whether mitochondrial dysfunction is involved in replicative senescence. Several studies reported that mitochondrial dysfunction induces cellular senescence, whose phenotypes are partially consistent with those in replicative senescence, whereas almost not in premature senescence. We assume that the role and significance of mitochondria in cellular senescence are different among its types.

Keywords : Cellular senescence, Replicative senescence, Mitochondria