基礎老化研究 46（1）; 47－49, 2022

【奨励賞受賞者研究トピックス】

老化細胞の空胞形成を司る分子メカニズムと生理的意義

長野　太輝、鎌田　真司
神戸大学バイオシグナル総合研究センター

1．はじめに

超高齢社会へと向かう先進諸国において抗加齢医療の発展は重要な課題である。近年、老化関連疾患の治療標的として細胞老化が注目されている[1]。細胞老化は加齢に伴うテロメアの短縮やDNA損傷などのストレスにより細胞分裂が不可逆的に停止する細胞応答を指す。細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は、炎症性サイトカインなどの生理活性物質を分泌することにより、周囲の細胞や組織に慢性的な炎症や機能低下を引き起こすことで老化関連疾患の発症や増悪の原因となると考えられている。マウスで老化細胞を体内から除去する遺伝子改変により心血管疾患や認知症といった様々な老化関連症状の改善や寿命の延長が見られたという研究を端緒に、老化細胞の蓄積を抑えることが老化関連疾患の有効な治療法となりうることが実証されてきている[2]。これらの知見を抗加齢医療に活かすべく、ヒト体内の老化細胞に細胞死を誘導することで除去する薬剤が盛んに開発されているが、正常細胞にも非特異的に細胞死を誘導してしまう副作用が課題となっている[3]。老化細胞に特異的な生存メカニズムを標的とすれば安全性の高い老化細胞除去薬が実現できると考えられるが、そのような生存メカニズムは未発見であった。本稿では老化細胞で発現変化する遺伝子の網羅的探索から、老化細胞の特徴的な形態変化である空胞形成の責任因子の同定、さらに老化細胞の生存における意義について筆者らの研究成果を紹介する。

2．老化細胞特異的に発現変化する遺伝子の同定

細胞老化に伴って発現変化する遺伝子の網羅的解析は多数報告がある[4]が、いずれも複数の細胞種や細胞老化誘導法を組み合わせて解析を行うことで、特定の細胞種や老化誘導法に限らない発現変化の検出を試みている。これらとは対照的に、筆者らは単一のストレスにより誘導された老化細胞とアポトーシス細胞とで遺伝子発現を比較することにより細胞老化特異的な遺伝子の同定を試みた。具体的には細胞老化に重要な*p53*遺伝子を野生型で持つHepG2細胞にDNA損傷剤であるエトポシドを異なる濃度で処理した際に、低濃度（10 μM）では細胞老化、高濃度（100 μM）ではアポトーシスが選択的に誘導されることを利用し、細胞老化とアポトーシスでの遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイによって解析した。その結果、正常細胞に比べて老化細胞で3倍以上の発現上昇を示した遺伝子が126種得られた。この中には細胞老化とは無関係にDNA損傷に応答して副次的に発現した遺伝子も含まれると考えられるため、さらにアポトーシスとの発現比較を行った。その結果、25種の遺伝子がアポトーシスよりも細胞老化で2倍以上の発現を示したため、これらをDNA損傷による副次的な影響の除外された老化細胞特異的な遺伝子候補とした[5]。最終的にこれら遺伝子の中から発現上昇がp53に依存していた6遺伝子に絞って機能解析を行い、現在までにプロリン脱水素酵素（PRODH）及びDアミノ酸酸化酵素（DAO）が活性酸素の産生を介して細胞老化を促進すること[6, 7]や、リボフラビン（ビタミンB_2）トランスポーターであるSLC52A1がミトコンドリア活性化を介して細胞老化の抑制に働くことを見出している[8]。

3．LY6D誘導性マクロピノサイトーシスによる老化細胞の空胞形成

上記で得られたp53依存的に老化細胞で発現上昇する遺伝子のうち、lymphocyte antigen 6 complex, locus D（LY6D）はLY6/uPARファミリー[*1]に属するGPIアンカー型[*2]の膜局在タンパク質であり、その生理的機能は不明であった。クロマチン免疫沈降実験の結果、LY6D遺伝子領域へのp53の有意な結合は検出されなかったため、細胞老化時のLY6D発現誘導はp53の下流で働く因子により制御されている可能性が考えられるが、詳細な機構は依然不明である。LY6Dと細胞老化との関連を探究するため、LY6Dを細胞に過剰発現させた結果、細胞質に多数の空胞様の膜構造が形成されることが観察された。空胞形成は細胞老化が報告された最初期から観察されていた老化細胞の形態的特徴である[9]が、その分子メカニズム及び老化細胞に与える生理的意義は明らかでなかった。そこで老化細胞の空胞形成におけるLY6Dの役割を明らかにするためノックダウン実験を行った結果、LY6Dノックダウンにより老化細胞の空胞形成が抑制されたことから、LY6Dは老化細胞の空胞形成の責任因子である可能性が示唆された。

次に、この空胞がどのような細胞機能によって形成さ

連絡先：長野　太輝
〒657-8501　兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1
TEL：078-803-5952
FAX：078-803-5951
E-mail：tnagano@amethyst.kobe-u.ac.jp

れるかを探究するため膜構造の大規模な変化を伴うマクロピノサイトーシスに着目した。マクロピノサイトーシスはクラスリン[*3]やダイナミン[*4]に依存しない型のエンドサイトーシスであり、細胞膜同士の融合によりその間隙に存在する細胞外液を含んだ膜が細胞内に取り込まれ空胞となる過程である[10]。マクロピノサイトーシスの誘導には原がん遺伝子のRasが重要な役割を担っており、成長因子などの刺激によって活性化したRasがアクチン重合を促進し、葉状仮足や波打ち膜が形成され、膜同士の融合によりマクロピノサイトーシスが誘導される。LY6D誘導性の空胞形成がRas阻害により抑制されたことに加え、マクロピノサイトーシスの特徴である高分子量デキストランの取り込みやマクロピノサイトーシス阻害剤であるEIPA処理による空胞の消失が見られたことからも、LY6Dはマクロピノサイトーシスを誘導することにより老化細胞の空胞を形成することが明らかとなった。

ではLY6Dはどのような機構でマクロピノサイトーシスを誘導するのか。LY6DのようなGPIアンカー型タンパク質は、細胞内へのシグナル伝達に重要なタンパク質が集積する脂質ラフト（マイクロドメイン）に集積することがよく知られている。脂質ラフトへのLY6Dの集積の有無を密度勾配遠心法による分画実験により調べた結果、LY6Dは細胞老化誘導刺激に応答して老化細胞のラフト画分に集積することが明らかとなった。さらに、ラフト画分にはマクロピノサイトーシス誘導に重要なRas及びRas活性化に関与するSrc family kinase（SFK）の集積も見られた。SFKの活性阻害剤によりLY6Dによる空胞形成が抑制されたことから、LY6Dはラフトに集積し、細胞内のシグナル伝達因子を活性化することでマクロピノサイトーシスを誘導することが明らかとなった（図1）。

*1 LY6/uPARファミリー：リンパ球の表面抗原となるLY6群やプラスミノーゲン活性化因子受容体であるuPARを含むタンパク質スーパーファミリーであり、三つ指構造を取るLY6/uPAR（LU）ドメインを持つことを共通の特徴とする。

*2 GPIアンカー型：糖脂質であるGPI（グリコシルホスファチジルイノシトール）によって細胞膜外葉に係留されることで細胞外に露出した状態で存在するタンパク質を指す。

*3 クラスリン：細胞膜から出芽した小胞により細胞外物質や細胞膜タンパク質を細胞内に取り込む経路であるエンドサイトーシスは、小胞の形成機構に応じて様々に分類されている。最も一般的とされているのは重合したクラスリンタンパク質によって小胞が形成されるクラスリン介在性エンドサイトーシスである。

*4 ダイナミン：ダイナミンはエンドサイトーシスの際に形成される小胞を細胞膜から切り離す際に働くGTP加水分解酵素である。小胞の切り離しがダイナミンに依存するか否かもエンドサイトーシスの分類基準として用いられる。

4．老化細胞の生存維持機構としてのマクロピノサイトーシス

空胞形成は老化細胞で広く見られる形態的変化であるが、その生理的意義は明らかではなかった。筆者らは老化細胞における空胞がマクロピノサイトーシス由来であるという結果を得たが、マクロピノサイトーシスはRas変異によりがん化した細胞において細胞外の物質を取り込んで栄養源として供給することで低栄養状態での生存維持に働いているという報告がある[11]。老化細胞とがん細胞は生存に多量のエネルギーを必要とするという共通点に注目し、老化細胞においてもマクロピノサイトーシスが低栄養時の生存維持に寄与しているかを調べた。老化細胞は低グルタミン培地での培養により生存率が低

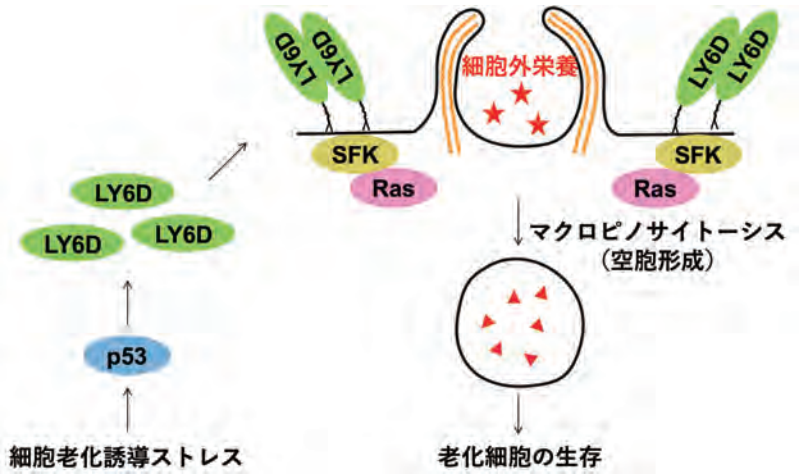

図1　LY6D誘導性のマクロピノサイトーシスが老化細胞の生存維持に寄与する
DNA損傷などの細胞老化誘導ストレスに応答してLY6Dはp53依存的に発現誘導される。発現上昇したLY6Dは脂質ラフトに集積し、細胞内のSFK-Ras経路を活性化する。これがアクチン重合を促進し、マクロピノサイトーシスが誘導されて細胞内に空胞が形成される。マクロピノサイトーシスは細胞外液に含まれる栄養分を取り込むことで、低栄養下における老化細胞の生存維持に寄与している。

下するが、これが培地へのアルブミン添加で回復することが観察された。しかしLY6Dノックダウンによりアルブミン添加による生存率の回復が消失したことから、老化細胞においてLY6D誘導性のマクロピノサイトーシスが細胞外栄養の取込みに働くことで生存維持に寄与していることが明らかとなった（図１）[12]。

５．おわりに

本研究により、老化細胞の発見から50年以上不明であった空胞形成のメカニズムが明らかとなった。また老化細胞における空胞形成の意義として細胞外物質の供給による生存促進機能が示された。LY6Dは老化細胞特異的に発現する因子であることから、本経路は老化細胞に特異的な生存システムである可能性が考えられる。今後、細胞外に存在するLY6Dがどのような因子を介して細胞内にシグナルを伝達するのかを明らかにすることでLY6Dによる老化細胞のマクロピノサイトーシス誘導メカニズムの全容を解明するとともに老化細胞特異的な生存システムを標的とした老化治療法開発の一助としたい。

引用文献

1. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. Nat Rev Mol Cell Biol 22: 75-95, 2021.
2. van Deursen JM. Senolytic therapies for healthy longevity. Science 364: 636-637, 2019.
3. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonia T, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. EBioMedicine 40: 554-563, 2019.
4. Aging Atlas Consortium. Aging Atlas: a multi-omics database for aging biology. Nucleic Acids Res 49: D825-D830, 2021.
5. Nagano T, Nakano M, Nakashima A, et al. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. Sci Rep 6: 31758, 2016.
6. Nagano T, Nakashima A, Onishi K, et al. Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species. J Cell Sci 130: 1413-1420, 2017.
7. Nagano T, Yamao S, Terachi A, et al. d-amino acid oxidase promotes cellular senescence via the production of reactive oxygen species. Life Sci Alliance 2: e201800045, 2019.
8. Nagano T, Awai Y, Kuwaba S, et al. Riboflavin transporter SLC52A1, a target of p53, suppresses cellular senescence by activating mitochondrial complex II. Mol Biol Cell 32: br10, 2021.
9. Lipetz J, Cristofalo VJ. Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture. J Ultrastruct Res 39: 43-56, 1972.
10. Buckley CM, King JS. Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. FEBS J 284: 3778-3790, 2017.
11. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. Nature 497: 633-637, 2013.
12. Nagano T, Iwasaki T, Onishi K, et al. LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells. J Biol Chem 296: 100049, 2021.