

論文内容の要旨

論文題目 Study on *in vitro* cellular aging among macaques

マカク細胞の加齢に関する研究

清水裕子

ヒト正常線維芽細胞、ヒト正常上皮細胞は *in vitro* において無限に分裂するわけではなく、一定回数の分裂を行った後、分裂を停止する。この分裂限界は細胞老化あるいはM1期 (mortality stage 1) と呼ばれている。様々な研究により、*in vivo* における個体老化と *in vitro* における細胞老化の相関が示唆されており、現在では細胞分裂ごとに短小化する染色体末端部のテロメアが、細胞の分裂回数を数える分裂時計であると考えられている。腫瘍細胞は、テロメアを延長させるテロメラゼの発現、あるいはALT (alternative lengthening of telomeres) と呼ばれる相同組換えをおこないテロメアを維持することにより、無限増殖能を獲得していることが判明している。また、腫瘍細胞は、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの遺伝子上に変異を蓄積することにより形質転換を起こし、後成的な性質を獲得していることが知られている。しかし、ヒト細胞は *in vitro* では細胞老化により分裂を停止し、自然発生的に無限増殖、形質転換に至ることは非常にまれである。これに対し、げっ歯類 (マウス、ラット) の細胞は *in vitro* において高頻度に無限増殖、また形質転換に至るといわれている。ヒトとげっ歯類においては、細胞加齢において異なる点が多々あることから、細胞加齢を制御する機構が異なるとの指摘もある。このため、細胞加齢研究におけるヒトのモデル動物として、げっ歯類は適当ではなく、よりヒトに近縁な動物がモデルとして必要とされている。また、ヒトに至る加齢メカニズムの系統進化を明らかにするために、この2種の差を補完する種の細胞加齢に関する研究が求められている。本研究はヒトに近縁なマカクを材料とし、細胞加齢における細胞変化を明らかにし、マカクのヒトに対するモデル

動物としての適正を検討し、細胞寿命とそのメカニズムを進化の観点から論じることを目的とした。

さまざまな年齢群のマカク（ニホンザル、カニクイザル、ボンネットザル、アカゲザル）から、肺、腎臓、皮膚を採取、材料とし、あわせて35の付着系細胞系列を分裂停止に至るまで培養した。35細胞系列のうち31細胞系列は41代までに、ヒト細胞同様に細胞老化を示し分裂を停止した。31細胞系列全てにおいて、加齢に伴い、細胞の増大、一定面積における細胞数の減少、分裂間隔の伸長、テロメア長の減少がみられた。また、明らかなテロメラーゼ活性は検出されなかった。これらの系列は、M1期で分裂を停止するヒト正常線維芽細胞が示す加齢変化に類似した細胞変化を示した。35細胞系列のうち3系列は、培養途中でいったん細胞老化の様相を示したものの分裂停止には至らず、さらに数十代ほど分裂を続け、最終的に79代から106代で分裂を停止した。これら3系列では加齢に伴うテロメア長の減少がみられ、明らかなテロメラーゼ活性は検出されなかった。これらは、癌遺伝子としての機能を持つ simian virus 40 (SV40) のT抗原によりM1期を超え分裂を続け、crisisあるいはM2期 (mortality stage 2) まで延命するヒト細胞が示す加齢変化に類似していた。この延命ヒト細胞との類似性により、3つのマカク細胞系列はM1期を超えM2期まで至ったと考えられる。1細胞系列 (J3K) は足場依存性の消失、接触性成長阻止の消失など形質転換の様子がみられ、また150代を超え分裂を続けた。この細胞系列は102代以降、明らかなテロメラーゼ活性を示し、それに伴うテロメアの維持が観察された。これらはげっ歯類細胞とヒト腫瘍細胞でみられる特徴に類似していた。

以上のように、培養した35の付着系細胞系列はさまざまな長さの分裂寿命を示したが、培養過程でみられた細胞学的・分子生物学的変化により3種類のグループに分類された。すなわち、ヒト細胞に類似した加齢変化を示したグループ、SV40による延命ヒト細胞に類似した加齢変化を示したグループ、げっ歯類細胞・ヒト腫瘍細胞に類似した特徴を示したグループである。マカク細胞は、2つの分裂限界 (M1期、M2期) を示したことから、ヒト細胞に類似した特性を持つことが示唆されるが、一方でヒト細胞に比べ分裂限界を超えやすくまた形質転換を示すものが得られたことから、げっ歯類細胞に類似した特性をもつことが示唆された。この研究により、マカク細胞は総体としてヒト細胞とげっ歯類細胞の中間的性質を有することが判明した。

次にM1期を超え延命したマカク細胞系列に注目し、M1期を超えるための分子背景について検索した。ヒトの線維芽細胞では、M1期における分裂停止にはp53タンパク質が関係していると考えられている。ほとんどのヒトの腫瘍ではp53遺伝子上に異常がみつかり、またp53遺伝子は腫瘍細胞でもっとも頻繁に異常がみつかる遺伝子でもある。p53タンパク質の本来の機能は、異常がおきた細胞を細胞周期の主にG1期で停止させ、細胞修復、あるいは細胞死へ向かわせることである。2つのマカクの延命細胞系列 (EM2L、F21S) でp53遺伝子について解析した。EM2Lでは、p53 cDNAのコード領域に1塩基置換によるストップコドンの導入がみつかった。この1塩基置換は、DNA上でも確認された。RFLP解析により、このストップコドンは、培養過程で細胞に導入されたものであることがわかった。野生型の遺伝子は培養途中から検出されず、このことからヘテロ接合性の消失が予想された。培養初期にはヘ

テロ接合性で検出される p 5 3 遺伝子内の 1 塩基多型が、培養後期には一方の塩基は検出されないことから、ヘテロ接合性の消失は確認された。これにより、EM 2 L 細胞では、培養途中で 1 塩基置換によるストップコドン導入とヘテロ接合性の消失を起こし、p 5 3 機能を喪失したことが示唆された。もう一方の F 2 1 S 系列では、p 5 3 c DNA のコード領域に 1 2 塩基欠失がみつかった。この欠失は培養過程で導入されたものであった。DNA 上で確認したところ、1 2 塩基欠失はみつからず、1 塩基置換が明らかとなった。この c DNA 上と DNA 上でみつかった異常の不一致は、DNA 上の本来のスプライスドナーサイトであるイントロン 7 の開始位置より 1 2 塩基上流に、1 塩基置換により新たなスプライスドナーサイトが創出され、スプライス異常が起き、c DNA 上では 1 2 塩基欠失が起きたと考えることで説明できる。さらに、培養後期において、DNA 上では変異型と野生型のヘテロ接合性として検出されるのに対し、c DNA 上では野生型が検出されないことから一方の対立遺伝子ではサイレンシングが起きている可能性が示唆された。DNA 上ではヘテロ接合性で検出される p 5 3 遺伝子内の 1 塩基多型が、c DNA 上においては一方の塩基は検出されないことから、一方の対立遺伝子のサイレンシングは確認された。F 2 1 S 細胞系列では、4 アミノ酸欠失とサイレンシングにより、p 5 3 機能を喪失したと考えられる。

M 1 期を超え M 2 期まで至った 2 つの細胞系列において、培養過程での p 5 3 機能喪失の導入がみつかったということは、マカクにおいても、ヒト同様、p 5 3 が M 1 機構へ強く関与していることが示唆された。あるげっ歯類細胞は p 5 3 機能喪失により無限増殖能を獲得するが、ヒト細胞は p 5 3 機能喪失により M 1 期を超えるが M 2 期で分裂限界を迎えるということがわかっており、マカク細胞にはヒト細胞に類似した性質を有するものが存在することが明らかとなった。

他の 3 4 系列とは異なる様相を示す細胞系列、J 3 K、の性質について詳細に検索した。この細胞系列は、接触性成長阻止、足場依存性といった付着系細胞にみられる本来の性質を失っており、形質転換の様相を示した。また、現在でも分裂を続けており（4 5 0 代以上）、不死化細胞であるとみなされる。これまでに報告されている旧世界ザルの樹立細胞株は、SV 4 0、または SV 4 0 の T 抗原が関与したものであるが、J 3 K に SV 4 0 の T 抗原の存在は確認されなかったため、この系列は SV 4 0 とは無関係に不死化したと考えられる。ヒト細胞の場合、細胞の種類により分裂限界が異なるといわれている。ヒト正常線維芽細胞では、自然発生的に M 1 期を超えることはないが、ヒト正常上皮細胞では自然発生的に後成的な変化を起こし M 1 期を超えることがある。マカクにおいても、細胞の種類により分裂限界が異なるのかどうかを明らかにするために J 3 K 細胞の種類を同定した。J 3 K 細胞では、線維芽細胞のマーカーであるプロリン水酸化酵素は検出されなかったが、上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン 1 8 が検出された。よってこの細胞系列は上皮細胞の特徴を有していることが明らかとなった。マカク細胞においてもヒト細胞同様に、上皮細胞は後成的な変化により分裂限界を超えることが示唆された。

以上より、マカク細胞はヒト細胞より分裂限界を超えやすいが、げっ歯類細胞より分裂限界における制御が厳しいことが明らかとなった。一方で、個体寿命が長い動物細胞ほど、分裂を厳しく制御していると考えられ、げっ歯類細胞と異なり、ヒト同様に 2 つの分裂限界（M 1 期、M 2

期)を示したマカク細胞は、ヒトのモデル動物としてより適当であることが示唆された。また、自然発生的に分裂限界を超え、異なる分裂寿命を示す細胞系列が得られるということから、マカク細胞は同一生物を用いた分裂限界の比較研究を可能とし、研究材料として適しているといえる。マカク細胞は加齢研究、さらには癌研究のよい材料となることが示された。