

## 主論文の要旨

# **SIRT1 Suppresses the Senescence-Associated Secretory Phenotype through Epigenetic Gene Regulation**

〔 SIRT1 はエピジェネティックな制御機構により  
細胞老化性炎症反応 (SASP) を制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
老化基礎科学講座 老化基礎科学分野

(指導 : 丸山 光生 教授)

早川 智久

## 【緒言】

細胞老化は、細胞に不可逆な細胞周期の停止が生じる現象である。細胞老化を起こした老化細胞の phenotype のひとつに炎症性因子を含む生理活性因子の分泌が増強される現象、senescence associated secretory phenotype (SASP)、がある。SASP は autocrine および paracrine に作用し、細胞老化の促進を始め微小環境に影響を与える。加齢に伴い老化細胞の数が増加することから、SASP は細胞老化と個体老化および老年性疾患とを結びつける鍵になると考えられている。SIRT1 は NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素であり、重要な代謝・老化制御因子である。SIRT1 は、転写因子およびヒストンの脱アセチル化を介した遺伝子発現制御により個体老化及び複数の老年性疾患の制御に関与しているとされているが、SASP との機能的関連性については明らかになっていない。そこで本研究では個体老化、老年性疾患に関与すると考えられる SASP の発現制御における SIRT1 の機能を検討した。

## 【手法及び結果】

### ・ SASP 発現に伴う SIRT1 の発現低下

ヒト繊維芽細胞 MRC-5 に X-線照射を行うことで細胞老化を誘導し、SASP 因子 IL-8、IL-6 の発現変化および代謝・老化関連因子の発現変化を検討した。RT-qPCR およびウェスタンブロット解析によって SASP 因子の発現を解析した結果、細胞老化誘導によって SASP 因子の mRNA およびタンパク質とも発現が増強されることを見出した (Fig.1A,B)。一方で SASP 因子の発現変化と相反的に SIRT1 のタンパク質発現が低下することを発見した (Fig.1B)。

### ・ SIRT1 による SASP 因子の発現抑制

SIRT1 の発現低下は、SASP 因子の発現に先行することから、SIRT1 の発現低下が SASP 因子の発現に与える影響を検討した。SIRT1 に対する shRNA を発現するレトロウイルスを用いて SIRT1 発現抑制 MRC-5 細胞株を樹立した (Fig.2A)。SIRT1 発現抑制細胞と control 細胞に Fig.1 と同様の手法で細胞老化を誘導し、SASP 因子の発現を検討した。ウェスタンブロット解析により、SIRT1 発現抑制細胞では control 細胞と比較して、細胞老化誘導後早い時期から SASP 因子 IL-8、IL-6 タンパク質の発現が認められ、また発現量の著しい増加が見られた。(Fig.2B)。

RT-qPCR 法により 4 種の SASP 因子 (IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$ 、Gro- $\alpha$ ) mRNA の発現解析を行った結果、タンパクと同様に SIRT1 発現抑制細胞では control と比較して、早期より SASP 因子 mRNA の発現上昇が認められ、また発現量の著しい増加が見られた (Fig.2C)。

これらの結果から SIRT1 の欠失は、SASP 因子の発現を転写レベルで加速・増加させることが示唆された。一方で SIRT1 の過剰発現は SASP 因子の発現に影響を与えなかった (Date not shown)。

### ・ SIRT1 による SASP 因子遺伝子プロモーター領域のアセチル化制御

SIRT1 はクロマチンに結合しヒストンの脱アセチル化を介したクロマチン構造の制

御により遺伝子発現を調節している。SIRT1 は、DNA ダメージに反応して DNA ダメージ部位へ動員されることで、定常状態でサイレンシングしていたクロマチン領域が活性化され、抑制されていた遺伝子が発現することが報告されている。そこで、細胞老化誘導時における SASP 因子プロモーター領域への SIRT1 の結合やヒストンのアセチル化の変化を ChIP 解析により検討した。

Control 細胞において、SIRT1 は SASP 因子 IL-8 および IL-6 遺伝子のプロモーター領域に結合していた。しかし細胞老化誘導後、SIRT1 は、それらのプロモーター領域から解離した (Fig.3A)。SIRT1 の解離と一致して、プロモーター領域のヒストンのアセチル化が亢進することが認められた (Fig.3B,C)。SIRT1 発現抑制細胞株では細胞老化誘導前から SIRT1 のプロモーターへの結合は control より低く、また細胞老化誘導後も control と同程度のレベルを示した。またプロモーター領域のヒストンのアセチル化は細胞老化誘導前から control 細胞と比較して亢進しており、細胞老化誘導後更に高いレベルを示した (Fig.3A,B,C)。これらの結果から、SIRT1 は SASP 因子のプロモーター領域に結合しヒストンの脱アセチル化を介して SASP 因子の発現を抑制しているが、細胞老化に伴いプロモーター領域から解離することで SASP 因子の発現を引き起こすことが示唆された。

#### 【考察】

本研究により細胞老化が誘導する過程で生じる DNA ダメージによって SASP 因子の遺伝子プロモーター領域からの SIRT1 の解離を介したエピジェネティックな制御が SASP 因子の発現制御に関与していることが示された。また、これまでも DNA ダメージがメチルトランスフェラーゼの分解を刺激し SASP 因子遺伝子のプロモーター領域のヒストンのメチル化を抑制することでエピジェネティックに SASP 因子の発現を制御するという報告がある。従って、DNA ダメージに伴う SIRT1 の解離とメチルトランスフェラーゼの分解といったエピジェネティックな制御が SASP 因子の発現制御において主要な制御を行っていると考えられる。

加齢に伴い DNA ダメージが蓄積することで DNA 修復因子 PARP の活性化により NAD<sup>+</sup>濃度の低下が起こり、SIRT1 の酵素活性が低下することが示唆されている。加齢に伴う SIRT1 の活性低下、および DNA ダメージに伴う細胞老化が炎症性因子の分泌を促進し、高齢者に認められる慢性炎症応答を引き起こす結果、老化、老年性疾患を促進させる可能性がある。したがって、SIRT1 はエピジェネティックな制御機構により SASP 因子の発現と生体中の炎症性因子を抑制し老化、老年性疾患を抑制している可能性が考えられる。

#### 【結論】

SIRT1 が SASP 因子の発現を転写レベルで抑制していることを示した。またその制御は、SIRT1 による SASP 因子遺伝子のプロモーター領域のヒストンの脱アセチル化を介したエピジェネティックな制御機構により制御されていることを示した。