みにれびゅう

オートファジーによる細胞老化制御機構

井本　ひとみ[1]，中村　修平[1,2,3]，吉森　保[1,2]

1.　はじめに

オートファジーは，オートファゴソームと呼ばれる膜構造が細胞内の高分子や構造物を取り囲んで分解する細胞内システムであり，分解で生じたアミノ酸などは再利用される．この機構は飢餓時の栄養源確保に加え，細胞成分の代謝回転や有害物の隔離除去といった機能を担い，細胞の恒常性を保つために重要である（**図1**）．オートファジーは加齢に伴って低下し[1]，オートファジー関連遺伝子群（autophagy-related genes：Atgs）の一つであるAtg5のマウスにおける過剰発現は，オートファジーの活性化を介して加齢による運動機能の低下やインスリン抵抗性を改善する[2]．また，マウスでのbeclin 1の活性化は，健康寿命を延長する[3]．しかしながら，老化に伴ってどのような機構でオートファジーが低下するのかは不明である．我々が同定したオートファジー抑制因子Rubiconを機能阻害するとオートファジーを活性化して線虫，ショウジョウバエおよびマウスの老化表現型が改善し，またRubiconは年とともにこれらモデル生物で増加することから[1]，Rubiconの増加がオートファジー低下の一因である可能性が示唆されている．一方，ヒト体細胞を継代培養するとやがて分裂の限界を迎え，形態学的変化とともに炎症性物質の分泌などが観察される．こういった細胞レベルでの老化現象を細胞老化と呼び，さまざまな研究から細胞老化が個体老化の誘因となることが示唆されてきた[4]．本稿では，オートファジーによる細胞老化制御機構について，Rubiconを交えた筆者らの最近の研究成果を概説する．

2.　オートファジーによる細胞老化制御

正常二倍体細胞の分裂回数には限りがあり，もはや分裂できなくなった細胞は細胞老化という状態を迎える．これはテロメアの短縮化に起因することが明らかとなっているが，これ以外にも細胞老化はDNA損傷やミトコンドリア機能異常などさまざまなストレスによって引き起こされる．老化細胞の特徴として，$p53/p21^{CIP/WAF1}$や$p16^{INK4a}/Rb$経路の活性化による不可逆的な細胞周期の停止，ならびに炎症性サイトカイン，ケモカインや成長因子などを分泌する細胞老化随伴分泌現象（senescence-associated secretory phenotype：SASP）を伴うことなどが知られている[4]．老化細胞は加齢に伴ってさまざまな組織で蓄積してゆくが，遺伝子改変マウスにおいてこれらを人為的に除去すると寿命の延長や加齢性病態の軽減がみられる[5]．つまり，老化細胞はただ沈静化しているのではなく，多種多様なタンパク質の合成・分解ならびに分泌などを緻密に制御することで，慢性炎症を基盤とした加齢性疾患の発症を促進するなど個体老化の要因となることが示されている．

細胞老化におけるオートファジーの役割については諸説ある．細胞老化が進むと転写因子GATA4のオートファジーによる分解が低下し，NF-κB経路を介したSASP因子の分泌が促進する[6]．また，オートファジーの低下がp53活性化や活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）産生を介して細胞老化を促進する．さらに，老化細胞を除去する薬剤（セノリティック薬）のメカニズムの一つとしてもオートファジーの活性化があげられている[7]．つまり，オートファジーは細胞老化の抑制に働くことが示唆されている．一方で，がん遺伝子活性化による細胞老化誘導時には，オートファジーはSASP因子の代謝回転に貢献し，また核膜の裏打ちタンパク質であるラミンの分解を介して細胞老化を促進することも報告されている[8]．このようなさまざまな見解のなかで，我々はDNA損傷ならびに複製による細胞老化を誘導し，これらの老化細胞ではオートファジーが低下すること，またオートファジーの正の制御

[1] 大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座遺伝学教室（〒565–0871　大阪府吹田市山田丘2–2）
[2] 大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座細胞内膜動態研究室（〒565–0871　大阪府吹田市山田丘2–2）
[3] 奈良県立医科大学生化学講座（〒634–8521　奈良県橿原市四条町840番地）
MondoA decelerates cellular senescence by retaining autophagy and mitochondrial homeostasis
Hitomi Imoto[1], Shuhei Nakamura[1,2,3] and Tamotsu Yoshimori[1,2]
([1]Department of Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2–2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan, [2]Laboratory of Intracellular Membrane Dynamics, Graduate School of Frontier Biosciences, 2–2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan, [3]Department of Biochemistry, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634–8521, Japan)
本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載．
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950609
© 2023 公益社団法人日本生化学会

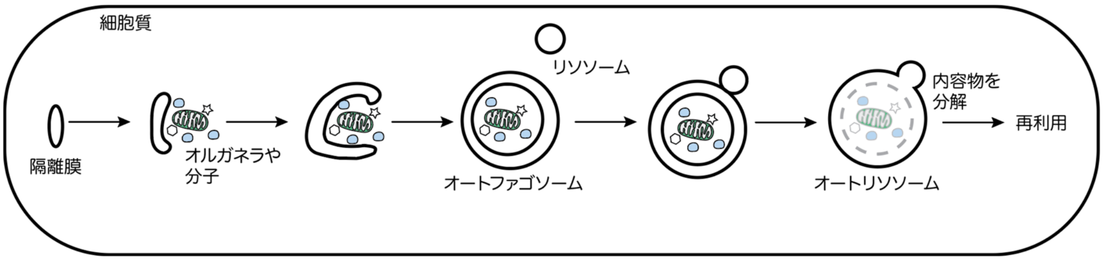

図1　オートファジーの過程
オートファジーは，扁平な隔離膜が細胞内のオルガネラや高分子を取り囲んで分解する細胞内システムである．二重膜で形成されたオートファゴソームはリソソームと融合し，オートリソソームとなって内容物を分解する．そして，分解で生じたアミノ酸などは再利用される．この機構は飢餓時の栄養源確保に加え，細胞成分の代謝回転や有害物の隔離除去といった機能を担い，細胞の恒常性を保つために重要である．

因子Atg7やAtg13をノックダウンすると細胞老化が促進することを見いだした．一方，オートファジーの抑制因子Rubiconは細胞老化に伴って発現が増加し，Rubiconノックダウン細胞や老齢のRubiconノックアウトマウスの腎臓で，老化関連β-ガラクトシダーゼ（senescence-associated β-galactosidase：SA-β-gal）やp21陽性細胞数が低下することを見いだしている．つまり少なくとも我々の実験条件では，オートファジーの低下が細胞老化を促進することが明らかとなった[9]．

3.　転写因子MondoAによる細胞老化制御

では，細胞はどのようにしてオートファジー活性を低下させ，細胞老化を促進するのか．MondoAはミトコンドリア外膜に局在する塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型の転写因子で，グルコースやミトコンドリアのエネルギー状態を感知して核内に移行し，Mlxとヘテロ二量体を形成して代謝系酵素などの発現調節に関わることが知られている．我々は，これまでにMondoAあるいはMlxの線虫ホモログである*mml-1*ならびに*mxl-2*が，生殖細胞除去やカロリー制限などによる寿命延長にオートファジー活性化を介して寄与することを明らかにしてきた[10]．そこで，MondoAの哺乳類での老化制御やオートファジーにおける役割を明らかにすることを目的とし，培養細胞でMondoAをノックダウンしたところ，p16, p21レベルならびにSA-β-gal陽性細胞数などが増加し，DNA損傷による細胞老化時のIL-6やIFN-βといったSASP因子の産生をさらに促進することを明らかにした[9]．また，MondoAのノックダウンはオートファジー活性を低下させることを見いだした．このときAtg7の発現減少が観察されたことから，MondoAはオートファジー制御因子の転写レベルを維持することによってオートファジーを保ち細胞老化を防いでいると考えられた．一方，MondoAの結合パートナーであるMlxをノックダウンしても，細胞老化時のオートファジー活性やSASP因子産生に影響を与えないことから，MondoAによる細胞老化抑制作用の一部はMlx非依存的であると考えられる．

4.　細胞老化制御に関わるMondoA下流因子の探索

MondoAがDNA損傷による細胞老化を防ぐメカニズムを明らかにするため，MondoA依存的なトランスクリプトーム解析で有意に変動のあった因子のsiRNAスクリーニングを行った．p21やリン酸化Rbなど細胞老化マーカーを指標として解析したところ，MondoAの下流で細胞老化を抑制する因子としてペルオキシレドキシン3（peroxiredoxin 3：Prdx3）を同定した．ペルオキシレドキシンは，チオレドキシンを電子供与体として利用し，細胞内のROSを消去する抗酸化酵素である．一方，MondoAノックダウン時に発現が増加する因子の一つとしてRubiconを見いだした．ChIP-Atlasによる解析では，Prdx3やRubiconのプロモーター／エンハンサー領域にMondoAの結合部位を確認しており，これはMondoAがPrdx3やRubiconの転写制御に関わる可能性を支持する．

5.　MondoAによるミトコンドリア機能維持を介した細胞老化抑制経路

ミトコンドリアは融合と分裂をバランスよく繰り返し，正常な機能を維持している．Prdx3はミトコンドリアに存在するため，MondoAはPrdx3を介してミトコンドリアの機能を維持し，細胞老化を防ぐのではないかと予想した．実際に，MondoAあるいはPrdx3ノックダウン細胞では，酸素消費速度や予備呼吸能の低下，ミトコンドリアの異常な管状化，分裂に必要なダイナミン様タンパク質Drp-1のリン酸化の低下がみられた．また，Prdx3ノックダウンによって増加した管状化ミトコンドリアを薬剤処理で断片化させると細胞老化が抑制された．以上のことから，

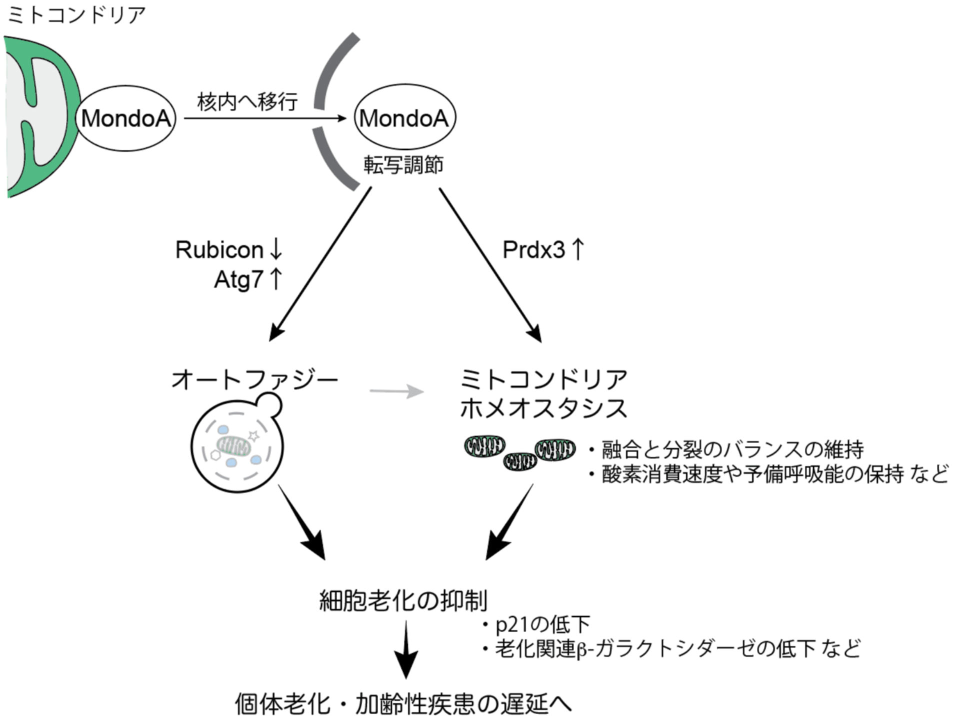

図2　MondoAによる細胞老化抑制経路
転写因子MondoAは，オートファジーの抑制因子Rubiconを抑制することなどによってオートファジー活性を維持し，細胞老化を抑制する．また，これとは独立して，抗酸化酵素Prdx3を維持することによりミトコンドリアのホメオスタシスを保ち，細胞老化を抑制する．これらMondoAによる細胞老化抑制機構は，個体老化ならびに加齢性疾患の遅延につながると考えられる．

MondoA-Prdx3経路は形態変化をはじめとするミトコンドリアの恒常性を維持することによって細胞老化を抑制することが示された．さらに，線虫でも*prdx-3*が加齢とともに低下し，*mml-1*のノックダウンでは*prdx-3*の減少ならびにROS産生増加が観察された．つまり，個体老化においてもMondoAによるPrdx3制御は保存されたシステムであると考えられる．

一方，ミトコンドリアの恒常性維持システムとして，ミトコンドリア選択的オートファジー（マイトファジー）がある．MondoAノックダウンのトランスクリプトーム解析で，マイトファジーに関わる因子BNIP3やPINK1の低下がみられ，またこれらのノックダウンで酸素消費速度が低下して細胞老化が促進することから，MondoAはマイトファジーを維持することによってもミトコンドリア機能維持を介した細胞老化抑制に関わることが示唆された．

6.　MondoAによるオートファジー活性化を介した細胞老化抑制経路

次に，MondoAの下流経路であるオートファジー制御とミトコンドリア制御の関係性について調べた．発現解析では，Rubiconノックダウンは Prdx3の発現量に影響せず，その逆も同様であった．また，Atg13やPrdx3のダブルノックダウンは，これら単独ノックダウンに比べ，SASP因子であるIL-6の産生をさらに増強したことから，MondoA-オートファジー経路とMondoA-ミトコンドリア経路はそれぞれ独立した経路であると考えられた．

MondoAの転写活性化が細胞老化を抑制するかを確認するため既報に従い2-デオキシ-D-グルコースで処理したところ，MondoAの核内濃度の上昇とともにRubicon減少ならびに細胞老化の低下が観察された．また，MondoAとRubiconのダブルノックダウン細胞ではオートファジー活性が一部回復し，細胞老化を抑制した．つまり，MondoA活性化あるいはRubicon抑制によるオートファジー活性化は，細胞老化を抑制することが明らかとなった．以上，我々はMondoAによる細胞老化抑制機構として，Rubicon抑制を介したオートファジー活性化機構と，Prdx3を介したミトコンドリア機能維持機構といった二つの経路を明らかにした（**図2**）．個体レベルでみても，老齢マウスの腎臓でPrdx3が減少し，Rubicon[1] ならびにp21が増加する[9]．また，腎尿細管細胞特異的MondoAノックアウトマウスでは腎虚血再灌流障害後のp21陽性細胞数が増加することから，MondoAが急性腎障害後の慢性腎臓病への進展に抑制的に働く可能性がある．ヒトでも高齢者や急性腎障害後の

腎臓で老化細胞の増加とともにMondoAが減少しており，MondoAが個体老化や加齢性疾患の遅延に深く関わることが示唆された．

7. おわりに

老化細胞を除去するセノリティック薬は，動物モデルでさまざまな加齢性病態を減弱させることが示されているだけでなく，ヒトでも精力的に臨床試験が進んでいる．なかでもポリフェノールであるケルセチンとチロシンキナーゼ阻害剤であるダサチニブとの併用は多くの疾患を対象として臨床試験が行われており[11]，注目すべきことにこれら薬剤はいずれもオートファジーを活性化することが知られている[12,13]．同様に，BET（bromodomain and extra-terminal domain）ファミリータンパク質阻害剤の老化細胞除去機構の一つとしてもオートファジー活性化があげられている[7]．さらに，オートファジーの進行に重要なオルガネラであるリソソームの恒常性破綻も老化細胞除去の指標として有効である[14]．つまり，オートファジーをスムーズに遂行させることは細胞老化の予防的観点だけではなく，老化細胞の除去にも貢献できる戦略と予想される．しかしながら，老化細胞は器官形成や創傷治癒などに対しては有益であるため[15]，組織特異的にあるいは組織に存在する老化細胞特異的にオートファジーを制御する方法を見いだし，さらにそれが加齢性の病態を改善するかを検証することは今後の重要な課題である．また，多種多様な細胞老化マーカーを利用して各老化病態を分類し，各細胞のオートファジーあるいは各オルガネラに対する選択的オートファジー活性を根気強く調べることも必要であろう．

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は，大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学の猪阪善隆教授ならびに大阪大学微生物病研究所の原英二教授のご指導の下で行われたものです．吉森研究室をはじめ，ご指導ご支援いただきましたすべての皆様に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Nakamura, S., Oba, M., Suzuki, M., Takahashi, A., Yamamuro, T., Fujiwara, M., Ikenaka, K., Minami, S., Tabata, N., Yamamoto, K., et al. (2019) Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nat. Commun.*, **10**, 847.
2) Pyo, J.O., Yoo, S.M., Ahn, H.H., Nah, J., Hong, S.H., Kam, T.I., Jung, S., & Jung, Y.K. (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun.*, **4**, 2300.
3) Fernández, Á.F., Sebti, S., Wei, Y., Zou, Z., Shi, M., McMillan, K.L., He, C., Ting, T., Liu, Y., Chiang, W.C., et al. (2018) Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*, **558**, 136–140.
4) Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, **186**, 243–278.
5) Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, **530**, 184–189.
6) Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., & Elledge, S.J. (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, **349**, aaa5612.
7) Wakita, M., Takahashi, A., Sano, O., Loo, T.M., Imai, Y., Narukawa, M., Iwata, H., Matsudaira, T., Kawamoto, S., Ohtani, N., et al. (2020) A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells. *Nat. Commun.*, **11**, 1935.
8) Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B.C., Drake, A.M., Shah, P.P., et al. (2015) Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, **527**, 105–109.
9) Yamamoto-Imoto, H., Minami, S., Shioda, T., Yamashita, Y., Sakai, S., Maeda, S., Yamamoto, T., Oki, S., Takashima, M., Yamamuro, T., et al. (2022) Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis. *Cell Rep.*, **38**, 110444.
10) Nakamura, S., Karalay, O., Jager, P.S., Horikawa, M., Klein, C., Nakamura, K., Latza, C., Templer, S.E., Dieterich, C., & Antebi, A. (2016) Mondo complexes regulate TFEB via TOR inhibition to promote longevity in response to gonadal signals. *Nat. Commun.*, **7**, 10944.
11) Raffaele, M. & Vinciguerra, M. (2022) The costs and benefits of senotherapeutics for human health. *Lancet Healthy Longev.*, **3**, e67–e77.
12) Hegedus, L., Szucs, K.D., Kudla, M., Heidenreich, J., Jendrossek, V., Pena-Llopis, S., Garay, T., Czirok, A., Aigner, C., Plones, T., et al. (2022) Nintedanib and dasatinib treatments induce protective autophagy as a potential resistance mechanism in MPM cells. *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 852812.
13) Yang, H., Xu, S., Tang, L., Gong, J., Fang, H., Wei, J., & Su, D. (2022) Targeting of non-apoptotic cancer cell death mechanisms by quercetin: Implications in cancer therapy. *Front. Pharmacol.*, **13**, 1043056.
14) Johmura, Y., Yamanaka, T., Omori, S., Wang, T.W., Sugiura, Y., Matsumoto, M., Suzuki, N., Kumamoto, S., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., et al. (2021) Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science*, **371**, 265–270.
15) Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M.E., et al. (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell*, **31**, 722–733.

著者寸描

●井本　ひとみ（いもと　ひとみ）
大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座遺伝学教室 特任助教．博士（医学）．
■略歴　2008年博士号取得（香川大），国立循環器病研究センター（流動／非常勤研究員／RPD），ロックフェラー大学（Post-doctoral Fellow），大阪大学大学院医学系研究科（特任研究員）を経て，19年より現職．
■研究テーマと抱負　オートファジーによる老化制御メカニズムを理解したい．
■ウェブサイト　https://yoshimori-lab.com
■趣味　美術館・博物館巡り，バレーボール．

●吉森　保（よしもり　たもつ）
大阪大学大学院生命機能研究科／医学系研究科 教授．大阪大学栄誉教授．博士（医学）．
■略歴　1986年博士号取得（大阪大），関西医科大学（助手），ヨーロッパ分子生物学研究所（博士研究員），国立基礎生物学研究所（助教授），国立遺伝学研究所（教授），大阪大学微生物病研究所（教授）を経て2010年より現職．
■研究テーマと抱負　まだまだ謎の多いオートファジーの分子機構と疾患・老化における役割をさらに追求していきたい．研究成果の社会実装も進めたい．
■ウェブサイト　https://yoshimori-lab.com
■趣味　世界のラバーダック収集，世界の美術館巡り，マラソン／トレイルランニング，焚き火，靴磨き，Perfume，Black-Pink，他多数．