

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19029

研究課題名(和文) ストレス顆粒の生理的意義の解明と皮膚老化への関与

研究課題名(英文) Physiological meaning of stress granule formation and its relation to skin aging

研究代表者

松崎 京子(有本京子)(MATSUZAKI, Kyoko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90568932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は特定のストレス刺激にตอบสนองしてストレス顆粒と呼ばれる一過性の構造体を形成し、ストレス存在下での生存を図る。本研究では低分子化合物ライブラリーを用いて、ストレス顆粒形成を制御する新規分子の探索を行い、HeLa細胞においてストレス顆粒形成を抑制する三種類の化合物を同定した。また、これらの化合物によるストレス顆粒形成抑制が、細胞の抗がん剤感受性を高めることを明らかにした。一方、皮膚HaCaT細胞を老化させるとストレス顆粒形成能が低下することを見出した。さらに、HaCaT細胞においてストレス顆粒形成を促進する化合物も数種類同定した。今後、これらの化合物による皮膚細胞の細胞老化への影響を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形癌の内部では、腫瘍血管の還流不全により低酸素状態に晒される領域が存在する。そのような領域内のがん細胞はストレス顆粒を形成し抗がん剤に抵抗性を示すため、がん治療の大きな障壁となっている。本研究で同定された三種類の化合物は、低酸素環境下でのストレス顆粒の形成を抑制し、抗がん剤への感受性を高めたことから、がん治療への応用が期待される。また、高齢化が進む日本において、細胞老化とアンチエイジングは重要な研究課題であるが、本研究では老化細胞におけるストレス顆粒形成能の低下が示唆された。したがって、ストレス顆粒がアンチエイジングの新しい標的となることが期待され、学術的にも社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cells form transient aggregates of proteins and mRNA, which is called stress granules in response to certain types of stress. Cells can survive under stressful conditions by forming this stress granules and stop protein synthesis. In this research, I searched for novel compounds that regulate stress granule formation by using small compound library and identified three kinds of compounds that suppress stress granule formation in HeLa cells. I also found that suppression of stress granule formation increased the sensitivity of HeLa cells against anti-cancer agents. On the other hand, I found that senescent skin HaCaT cells lost their ability to form stress granules. What is more, I identified some compounds that promote stress granule formation in HaCaT cells. Thus I'm trying to find out the effect of these compounds on senescence.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス顆粒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞はストレスに曝露されると一過性に蛋白翻訳を停止し、ストレスから解放されるまで待機状態を保つ。このとき、蛋白翻訳を継続する mRNA、停止する mRNA、分解廃棄される mRNA を分別する triage の場として形成されるのがストレス顆粒である (右図) (Buchan and Parker. *Mol Cell* 36, 932-941 (2009); Kedersha et al. *Trends Biochem Sci* 38, 494-506 (2013))。ストレス顆粒形成は酵母からヒトまで保存され、生物個体が厳しい環境を生き抜くための戦術の一つと理解される。

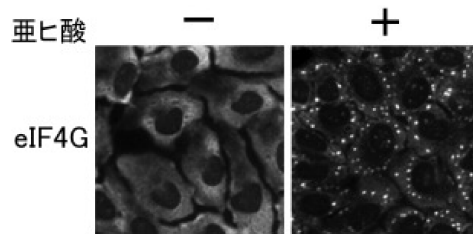


図 亜ヒ酸刺激によるストレス顆粒形成

しかし、酵母では低栄養という一般的な環境ストレスでストレス顆粒が観察されるのに対し、多くの哺乳動物細胞では、亜ヒ酸などの特殊な試薬を使用しなければストレス顆粒が観察されにくい。そのため、哺乳動物細胞におけるストレス顆粒の生理的意義は必ずしも明解でない。

申請者はこれまでに、神経変性疾患において神経細胞でストレス顆粒形成が阻害されると、細胞死が促進され、ストレス顆粒形成不全が神経変性疾患の病態に關与する可能性を見出した (Arimoto-Matsuzaki K, et al: *Nat Commun*, 2016)。そこで、哺乳動物細胞においてストレス顆粒は細胞保護的に働くと考え、ストレス顆粒形成の保全が細胞、個体の恒常性維持に有利に働くと予測している。これらの予測を検証するためには、哺乳動物細胞における感度が高く簡便なストレス顆粒観察法の開発、ストレス顆粒形成を誘導する生理的 (特殊な試薬処理ではなく哺乳動物細胞が曝露される一般的) なストレスの発見、ストレス顆粒形成を促進、抑制する研究試薬の開発が必要とされる。

### 2. 研究の目的

本研究では、高感度のストレス顆粒形成アッセイ系を構築し、ストレス顆粒形成を促進、抑制する低分子化合物を探索する。得られた化合物を用いて、皮膚細胞におけるストレス顆粒形成の生理的意義を明らかにするとともに、老化とストレス顆粒形成能の関係を解析し、老化により低下した皮膚細胞のストレス顆粒形成能の回復が治療的に有用かを検証する。

また、がん細胞の低酸素曝露によるストレス顆粒形成に着目し、スクリーニングによって同定されたストレス顆粒形成抑制化合物を用いて、ストレス顆粒形成を抑制することががん細胞の抗がん剤感受性を高め治療的に有利かを検証する。

以上の検証を通して、ストレス顆粒が哺乳動物において果たしている生理的意義について洞察を得る。

### 3. 研究の方法

(1) HaCaT 細胞において Split-GFP の系 (GFP1-10 に TIA1 を、GFP11 に G3BP を融合させ、ストレス顆粒形成が誘導され両者が会合した時にのみ緑色蛍光が観察される系) を用いて、ストレス顆粒形成を高感度、定量的、簡便に評価するアッセイ系を樹立する。

(2) HaCaT 細胞、および HeLa 細胞に東京医科歯科大学が所有する化合物ライブラリーの低分子化合物を投与し、ストレス顆粒形成を誘導する候補化合物、抑制する候補分子をそれぞれ同定する。

(3) (2) で同定されたストレス顆粒形成を制御する候補化合物に関して、HaCaT 細胞ではストレス顆粒形成を促進することで細胞老化にどのような影響が見られるかを検証する。

(4) HeLa 細胞では、化合物を用いてストレス顆粒形成を抑制することで抗がん剤抵抗性にどのような影響が見られるかを検証する。

(5) 老化によるストレス顆粒形成能への影響と化合物の効果を個体レベルで検証するため、ヒト早老症を模倣したモデルノックインマウスを樹立する。

### 4. 研究成果

(1) HaCaT 細胞において Split-GFP の系 (GFP1-10 に TIA1 を、GFP11 に G3BP を融合させ、ストレス顆粒形成が誘導され両者が会合した時にのみ緑色蛍光が観察される系) を用いて、ストレス顆粒形成を高感度、定量的、簡便に評価するアッセイ系の樹立を試みた。しかしながら、樹立した細胞株では細胞を刺激しなくてもストレス顆粒形成が誘導されてしまった。これは、TIA1 及び G3BP の細胞内発現量が過剰であるためと考えられるため、安定発現細胞株のシングルセルクローニングを行い、最適な蛋白質量を発現している細胞の選択を行った。

(2) HaCaT 細胞および HeLa 細胞を用いて、ストレス顆粒形成を制御する新規化合物の探索を行った。具体的には、東京医科歯科大学が所有する化合物ライブラリーの低分子化合物を細胞に投

与し、HaCaT細胞に関してはストレス顆粒形成を誘導する化合物、HeLa細胞に関しては抑制する化合物の探索を行った。その結果、それぞれについて候補化合物を数種類得ることに成功した。

(3) HeLa細胞を用いたスクリーニングからは、ストレス顆粒形成を強く抑制する化合物が3種類( エストラジオール、プロゲステロン、スタノロン)同定された。そこでこれら3種類の化合物によるストレス顆粒形成抑制の分子機構を解析した。その結果、これらの化合物はprotein kinase R (PKR)を抑制することがわかった。一方、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)は抑制しなかった。

HeLa細胞を低酸素環境下で培養すると、ストレス顆粒が形成される。このとき、これら3種類の化合物を細胞に添加すると、ストレス顆粒の形成が強く抑制され、結果として細胞の抗がん剤への感受性が上昇することがわかった。

(4) はじめにストレス顆粒形成能が加齢性に变化するかを検証した結果、老化させたHaCaT細胞では、ヒ素や小胞体ストレスによるストレス顆粒の形成能が低下する傾向が見られた。そこで、HaCaT細胞を用いた化合物スクリーニングによって得られたストレス顆粒形成を促進する化合物で、人工的に老化細胞にストレス顆粒形成を誘導すると、細胞老化が抑制されるかどうかを現在検証中である。

(5)老化によるストレス顆粒形成能への影響を個体レベルで検証するため、ヒト早老症のモデルマウスの作製を行った。CRISPRの手法を用いて、ヒトの代表的な早老症として知られるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(右図)、およびウェルナー症候群を模倣したマウスをそれぞれ作製し、前者においてはその皮膚において顕著な老化が見られることを確認した。



図 HGPS モデルマウス(右)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Qiu Wenzhe, Kyoko Arimoto-Matsuzaki, Masami Kitamura, and Yutaka Hata  
Human keratinocyte HaCaT cells form aggregates containing Ras-GAP SH3 domain-binding proteins in the cytoplasm in response to a low dose of teniposide  
J2 3Med Dent Sci 2019 ; 66 : 23 - 30

Timalsina S, Arimoto-Matsuzaki K\*, Kitamura M, Xu X, Wenzhe Q, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Hata Y. Chemical compounds that suppress hypoxia-induced stress granule formation enhance cancer drug sensitivity of human cervical cancer HeLa cells.  
J Biochem. 2018 Nov 1;164(5):381-391

〔学会発表〕(計 2 件)

長島 俊太、丸山 順一、岩佐 宏晃、有本-松崎 京子、本田 香織、近藤 恭光、長田 裕之、名和 眞希子、石上-湯浅 磨里、影近 弘之、中浜 健一、仁科 博史、畑 裕  
ケミカルバイオロジーからアプローチした TAZ の新しい制御機構の解析

松崎-有本 京子、畑 裕  
Chemical compounds that suppress stress granule formation enhance the cancer drug sensitivity of HeLa cells.  
第 76 回日本癌学会学術総会  
2017/9/30 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/mbc/42\\_4c55c78f9f498/index.html](http://www.tmd.ac.jp/mbc/42_4c55c78f9f498/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。