

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19418

研究課題名(和文)心不全における核小体を介した細胞老化誘導機構の生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism and Biological Significance of Nucleolus-mediated Cell Fate Determination in Heart Failure

研究代表者

熊澤 拓也 (Kumazawa, Takuya)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10745441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：解析の結果、大動脈狭窄術(TAC)を施したマウスの心臓において老化細胞が蓄積されることが分かった。それらの老化細胞では核小体の肥大化も認められた。さらに、NACという抗酸化剤を用いた実験の結果、ROSの生産量が増加しrRNA転写が亢進することが明らかとなった。また、マウス心臓より単離した初代培養細胞を用いて核小体制御化合物スクリーニングを行った。得られた化合物を心不全モデルマウスに投与したところ心臓組織中の老化細胞を除去できることが明らかとなった。心不全患者の心筋生検サンプルを用いて核小体の状態を検討した。その結果心不全患者の心臓組織において核小体の肥大とROSの増加が認められた。

研究成果の概要(英文)：Recently, the contribution of p53 to many undesirable aspects of age-associated diseases, such as cardiovascular disorders, has been recognized. p53 induced-cellular senescence have been implicated heart failure. Therefore, we examined the role of nucleolus mediated-cellular senescence in heart failure. Transverse aortic constriction (TAC), model of pressure overload-induced heart failure, increased transcription of rRNA, expression of SASP factors and SA-B-gal positive senescent cells in failing heart. Moreover coculture experiments demonstrated that senescent cardiac fibroblasts induced by increasing nucleolar RNA content promoted hypertrophy of cardiomyocytes. Hypertrophy of cardiomyocytes is associated with heart failure. These results implied that nucleolus mediated-cellular senescence contribute to exacerbation of heart failure. Thus, modulation of the nucleolus may represent a novel approach for treatment of heart disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：心不全 細胞老化 SASP 核小体 p53 rRNA

## 1. 研究開始当初の背景

核小体とは、膜を持たない核内構造体であり、教科書的にはリボソーム合成の場として知られている。核小体では、リボソーム DNA (rDNA) から未成熟なリボソーム RNA (pre-rRNA) が転写され、プロセッシングを受けて成熟したリボソーム RNA (rRNA) になり、リボソームに組み込まれる。できたりボソームは細胞質へ運ばれ、機能する。

しかしながら、申請者達の研究から、核小体は、リボソーム合成の場であるだけでなく、様々なストレスを統合して細胞の運命決定を行う器官である可能性が強くなってきた。具体的には、申請者が所属していた研究室では、核小体の新規機能として以下の2つを明らかにしていた。

**【背景1】新規核小体因子 NML は栄養飢餓時に rRNA 転写を抑制する** (Murayama et al., *Cell* 2008)

申請者らは、栄養飢餓時に rRNA 転写を抑制する因子 NML 複合体を見出した。NML 複合体は rDNA 領域のヘテロクロマチン化を誘導し、エピジェネティックな制御機構により rRNA 転写を抑制する。

**【背景2】核小体因子 MYBBP1A は DNA 障害時の p53 活性化に働く** (Kuroda et al., *EMBO J.* 2011)

申請者達は、DNA 傷害時には rRNA 転写が抑制され、核小体中の RNA 含有量が減少することによって、「核小体が縮小」することを明らかにした。その結果、核小体因子 MYBBP1A が核小体から核質へ移行し、p53 をアセチル化することで、その転写活性を上昇させることを見出した。MYBBP1A は核小体中で多数の RNA 結合タンパク質と結合していることから、MYBBP1A の核質移行は核小体中の RNA 含有量の減少が引き金となっていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

心疾患は我が国の死亡原因の第二位であり、欧米や世界では一番の死亡原因となっている。心疾患研究は進んできてはいるが、発症の分子メカニズムなどまだ不明な点も多く、決定的な治療法が確立されているとは言い難い。心疾患の中でも最も死亡数が多いのが心不全であるため、心不全発症の新たな分子メカニズムを解明し、新規治療法を開発することが期待されている。最近、心不全の増悪に癌抑制因子 p53 が関わっていることが示唆されつつある。心不全を発症するようなストレス負荷時には p53 が活性化し、細胞老化が誘導される。老化細胞には Senescence associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる特徴が観察されており、炎症性サイトカインや増殖因子、マトリックスメタプロテアーゼなどの生理活性物質を分泌していることが知られている。体内に蓄積した老化細胞は SASP によって炎症反応を亢進し、心不全や動脈硬化の悪性化に寄与する。(Sano

et al., *Nature* 2007, Minamino et al., *Nat. Med.* 2009, Minamino et al., *Circ Res* 2007, Shimizu et al., *Cell Metab* 2012) 本来、体内の老化細胞は免疫系によって除去されるが、加齢に伴う免疫機能の低下が老化細胞の蓄積を促すことが報告されている。(Kang et al., *Nature* 2011) つまり、加齢や生活習慣に伴うストレスが心臓組織内の老化細胞を増加させ心不全を引き起こす、もしくは悪性化させていると考えられる。申請者はこれまでに、核内構造体である核小体がストレスの種類に応じて自身の大きさを変えることによってアポトーシスや細胞老化といった細胞の運命決定を行っていることを明らかにしている。本研究では、心不全においてもこの核小体を介した細胞老化機構が働いていることを証明し、核小体機能の制御方法を確立することによって新たな心不全治療法への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 心不全における核小体を介した細胞老化誘導機構の意義

老化した高齢マウス心臓組織において、細胞老化のマーカーとして用いられている (SA-B-gal や p16 の免疫染色を行った。また高齢マウスの心臓組織サンプルを用いたウェスタンブロットを行った。

心不全モデルマウスを作製し核小体機能と細胞老化について解析を行った。

#### 1-1) 心不全モデルマウスを用いた解析

心不全を作成する方法としては、圧負荷モデルとして知られる大動脈狭窄術 (transverse aortic constriction: TAC) と、急性心筋梗塞モデルとして知られる冠動脈結紮を用いた。圧負荷モデル、急性心筋梗塞モデル、それぞれの心臓において SA- $\square$ -gal や p16 の免疫染色、p16 のウェスタンブロットを行い、老化細胞の蓄積を検討した。それぞれのモデルの心臓組織中の核小体サイズを核小体因子の抗体を用いた免疫染色によって評価した。さらに、それぞれのモデルマウスの心臓組織中の rRNA の転写やプロセッシングの状態を検討した。転写については pre-rRNA のリアルタイム PCR とノーザンブロット、プロセッシングについてはノーザンブロットにより検討した。さらに、rRNA の転写因子である TIF-1A や UBF、POLR1A、POLR1B の翻訳後修飾の状態や発現量を検討しどのようなシグナル経路が個体老化の上流にあるのかを調べた。

#### 1-2) 心不全患者の心筋生検サンプルを用いた解析

申請者の研究室では心不全患者の心筋生検サンプルを多数保有している。それらのサンプルを用いて、老化細胞の蓄積や核小体のサイズ、rRNA の転写・プロセッシングの状態を解析した。さらに、rRNA の転写・プロセッシングが変化する上流のシグナルについても解析した。加えて、これらの心不

全患者の心機能や予後のデータも記録してあるので、老化細胞や核小体サイズとの相関関係についても検討した。

## 2. 核小体機能の人為的制御と心不全治療への応用

申請者は、核小体機能を人為的に制御し老化細胞を特異的にアポトーシスに導くために、老化細胞の持つ一つの特徴に注目した。老化細胞では SA-β-gal と呼ばれる酵素の活性が上昇していることが知られている。この酵素は Xgal という化合物のガラクトース部分を認識し、糖と側鎖の結合を切断する。Xgal から切り出された側鎖部分が代謝され青色を呈する化合物に変換されることで SA-β-gal の活性を表す指標となるため、この実験が細胞老化を解析する手法として用いられている。申請者はこの Xgal の側鎖部分を rRNA の転写を抑制する化合物に変えることによって、老化細胞特異的にアポトーシスを誘導する化合物を設計した。ドッキングシミュレーションを用いた in silico スクリーニングから、ガラクトースの側鎖になり得る rRNA の転写阻害剤を五つ同定し、ガラクトースと結合した化合物を合成した。それらの五つの化合物を、ヒトの正常線維芽細胞 WI-38 の分裂回数の少ない若い細胞と分裂回数を重ねた老いた細胞を用いて比較し、効果を検討した。

### 2-1) 初代心筋細胞、初代心臓線維芽細胞を用いた化合物スクリーニング

胎児マウスの心臓から心筋細胞と線維芽細胞を取得した。WI-38 細胞に効果があった化合物を、取得したそれぞれの初代培養細胞の若い細胞と老化細胞に用いてアポトーシス誘導効果を検討した。アポトーシスを評価する方法としては、TUNEL assay、FACS による sub G1 期細胞・Annexin V 陽性細胞の検出、ウェスタンブロットによる切断 PARP・切断カスパーゼの検出などを用いた。

### 2-2) 心不全モデルマウスの心臓における化合物効果の検討

圧負荷モデル、急性心筋梗塞モデルのマウスに化合物を投与し、心臓における老化細胞の蓄積状況や核小体サイズ、アポトーシス誘導効果を検討した。また、化合物の rRNA 転写・プロセッシングに与える影響についても解析した。さらに、化合物投与による心臓機能や予後への効果を調べた。

## 4. 研究成果

解析の結果、大動脈狭窄術(TAC)を施したマウスの心臓において老化細胞が蓄積されることが分かった。それらの老化細胞では核小体の肥大化も認められた。さらに、NAC という抗酸化剤を用いた実験の結果、ROS の生産量が増加し rRNA 転写が亢進することが明らかとなった。また、マウス心臓より単離した初代培養細胞を用いて核

小体制御化合物スクリーニングを行った。スクリーニングにより得られた化合物を心不全モデルマウスに投与したところ心臓組織中の老化細胞を除去できることが明らかとなった。現在はこの化合物が心不全モデルマウスの心機能を改善できるかを検討しているほか、老化マウスでも同様に老化細胞を除去できるか検討している。

心不全患者の心筋生検サンプルを用いて核小体の状態を検討した。その結果心不全患者の心臓組織において核小体の肥大と ROS の増加が認められた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計6件)

### 国際学会

1. Takuya Kumazawa, Kazuho Nishimura, Keiji Kimura, and Yoshihiko Saito "Nucleolar RNA content discriminates between apoptosis and cellular senescence and is involved in exacerbation of heart failure" Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics, Banff (Canada) February, 2017 (ポスター発表)

2. Takuya Kumazawa, Kazuho Nishimura, Keiji Kimura, and Yoshihiko Saito "Fluctuations of Nucleolar RNA Content Discriminate between Apoptosis and Cellular Senescence" RNA2016 The 21<sup>st</sup> Annual Meetings of The RNA Society, Kyoto (JAPAN) June, 2016 (ポスター発表) Travel Grant Award 受賞

3. Takuya Kumazawa, Kazuho Nishimura, Yoshihiko Saito, and Keiji Kimura "Nucleolar RNA content discriminates between apoptosis and cellular senescence by modulating p53 activity" Keystone Symposia, Non-coding RNAs in Health and Disease, Santa Fe (USA) February, 2016 (ポスター発表)

### 国内学会

1. 熊澤拓也、西村和帆、木村圭志、斎藤能彦 「Nucleolus senses various types of stress and regulates cell fate decision」第 33 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (東京) 2016 年 12 月 (口頭発表)

2. 熊澤拓也、西村和帆、木村圭志、斎藤能彦 「The nucleolus discriminates between apoptosis and cellular senescence and is involved in exacerbation of heart failure」BMB2016(第 39 回日本分子生物学会年会)(横浜) 2016 年 11 月 (口頭発表)

3. 熊澤拓也、西村和帆、木村圭志、斎藤能彦 「核小体を介した細胞老化シグナルは心筋細胞肥大を引き起こす」第 7 回 MCC (Molecular Cardiovascular Conference) (東京) 2016 年 9 月 (口頭発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~1int/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

熊澤拓也 (Kumazawa Takuya)

奈良県立医科大学 第1内科学教室 助教

研究者番号：10745441