

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06234

研究課題名(和文) 養殖環境のストレスはDNA脱メチル化を介して魚類細胞の老化を引き起こすか？

研究課題名(英文) Can external stresses in the aquaculture environment cause cellular senescence in fish via DNA demethylation?

研究代表者

二見 邦彦 (FUTAMI, KUNIHICO)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：00513459

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)：魚類のウイルス病の診断などに広く用いられている魚類由来培養細胞株の多くは、癌化や形質転換の形跡がないにも関わらず、分裂寿命や老化の兆候が見られない。これまでに、ゲノムDNAを脱メチル化させると、魚類由来培養細胞株EPCがSASPを伴う完全老化に成熟することを明らかにした。しかしながら、養殖環境中の様々な外的ストレスが、DNAのメチル化異常をはじめとするエピジェネティック変化を誘導して細胞老化を誘発するかは不明である。本研究では、ゲノムDNAの脱メチル化がどのようにして細胞老化を誘導するのか、また、養殖場で起こりうるストレスが細胞老化を引き起こすかについて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいて細胞老化は、ストレスなどにより障害を受けた細胞の増殖を不可逆的に停止することで発癌を抑制する一方、老化細胞の蓄積は恒常性の破綻を引き起こす。ストレスによる細胞影響としてアポトーシスやネクローシスなどの細胞死があるが、これらの死細胞は食細胞により貪食されるため、影響は局所的であり、魚の直接的な死因となることは少ないと考えられる。一方、老化細胞は貪食されることはなく、炎症性サイトカインなどSASP因子の分泌により周辺の細胞に慢性炎症を引き起こす。本研究は、DNAのメチル化や細胞老化に着目し、魚の死因を「細胞老化を起因とした恒常性の破綻」といった切り口から説明しようとするものである。

研究成果の概要(英文)：Fish cell lines originally established from a variety of tissues for the purpose of virus isolation, propagation and diagnostic assays in understanding fish pathology, can easily become immortal without any apparent sign of cancerous growth and appear to have unlimited proliferative capacity. We have previously shown that demethylation of chromosomal DNA with 5-Aza-dC induces premature senescence in the fish cell line EPC; the cells begin to express senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors. However, it is unclear whether various external stresses in the aquaculture environment cause epigenetic changes, such as DNA methylation abnormalities, that induce premature senescence. In this study, we clarified (1) how demethylation of chromosomal DNA induces cellular senescence and (2) whether possible stresses in aquaculture can induce premature senescence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 Ras p16INK4a SASP SA-βgal活性 初期老化 完全老化 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類由来培養細胞は、現在までに 150 種類ほど樹立されており、水産養殖においては、ウイルス病の診断を行う際の原因ウイルスの分離・同定、性状検査などに不可欠となっている。

一般に、ヒトの正常組織由来の細胞は、培養を続けるうちに老化して分裂を停止し、最終的には死滅してしまう。そのため、株化したヒト由来培養細胞の多くは、癌組織由来か、もしくは化学的手法などにより初代培養細胞を形質転換して構築されたものである。一方、魚類由来培養細胞の多くは、癌化や形質転換の形跡がないにも関わらず容易に株化し、また分裂寿命や細胞老化の兆候が見られないという、特異な性質を持っている。

(2) ヒトにおいて細胞老化は、ストレスなどにより障害を受けた細胞の増殖を不可逆的に停止することで発癌を抑制する一方、老化細胞の蓄積は恒常性の破綻を引き起こす。魚類ではこれまで、ストレスによる細胞影響としてアポトーシスやネクローシスなどの細胞死に着目した研究が多かった。これらの死細胞は食細胞により貪食されるため、影響は局所的であり、組織全体に影響を及ぼすことは少ない。一方、老化細胞は貪食されることはなく、炎症性サイトカインなど細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) とよばれる液性因子の分泌により周辺の細胞に慢性炎症を引き起こす。

(3) 研究代表者らは近年、DNA 脱メチル化剤 5-Aza-dC によるゲノム DNA の脱メチル化が、魚類由来培養細胞においてテロメア非依存性細胞老化を誘発し、さらに SASP を引き起こすことを見出した (引用文献)。一方で、環境中の様々な外的ストレスは、DNA のメチル化異常をはじめとするエピジェネティック変化を誘導することが知られているが、養殖場で見られるような低酸素や感染症などの外的ストレスが、ゲノム DNA の脱メチル化を介して細胞老化を誘発するかといったことは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、細胞老化が見られないとされている魚類由来培養細胞が、試験管内でどのような老化耐性機構を持っているのか、そのメカニズムを解明するとともに、養殖魚で起こりうる細胞老化のリスクについて明らかにすることを目的とした。そのために、癌遺伝子誘導性細胞老化 (oncogene-induced senescence, OIS) の中心的な役割を担うとされる Ras 癌遺伝子が、魚類由来培養細胞の老化制御においてどのような役割を担っているか、環境ストレスや感染症はゲノム DNA の脱メチル化および細胞老化を引き起こすか、について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ファットヘッドミノール *Pimephales promelas* 上皮由来の培養細胞株である EPC (引用文献) を使用した。細胞は、2 mM L-グルタミンおよび 5% ウシ胎児血清を添加した HEPES 含有イーグル MEM (Sigma-Aldrich) により 25℃ で培養した。

(2) ファットヘッドミノール H-Ras、ヒト p16^{INK4a}、および p16^{INK4a} の代替リーディングフレームであるマウス ARF のコード領域を mCherry 蛍光タンパク質融合ベクター pmCherry-N1 (Clontech) にサブクローニングし、発現コンストラクトを作製した。また、QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent Technologies) を用いた site-directed mutagenesis により、H-Ras の活性化型変異体である H-Ras^{V12}-mCherry 融合タンパク質を発現するコンストラクトも作製した。H-Ras^{V12} の活性は、EPC 細胞を用いたツーハイブリッドアッセイにより、Raf1b タンパク質の Ras 結合ドメインとの相互作用で確認した。さらに、GenBank から得た NF- κ B 応答エレメントの DNA 配列 (JQ513377) を、pGL3-Promoter Vector (Promega) にサブクローニングし、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製した。

作製したコンストラクトを TransIT-LT1 (Takara) を用いてファットヘッドミノール上皮由来不死化細胞株 EPC にトランスフェクションし、G-418 含有 MEM-HEPES で 2-3 週間培養した。細胞の形態を蛍光顕微鏡 IX73 (オリンパス) により観察し、顕微鏡用デジタルカメラ DP72 で撮影したのち、ImageJ を用いて画像解析を行った。

ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) およびルミノメーター Gene Light 55 (Microtech) を用いたレポータージーンアッセイにより測定した。

(3) 細胞増殖の測定は、コロニーフォーメーションアッセイおよび MTT アッセイにより行った。また、細胞老化マーカーである SA- β -gal の染色 (引用文献) により老化細胞を検出し、ImageJ を用いて SA- β -gal 陽性領域を定量化した。

(4) qRT-PCRによる細胞老化随伴分泌現象(初期老化の指標である TGF- β SASP および完全老化の指標である proinflammatory SASP)因子の発現定量, およびレポーター遺伝子アッセイによる NF- κ B 活性の測定を行った。

(5) 統計処理にあたっては, R 用のグラフィカルユーザインターフェースである EZR を用いた(引用文献)

4. 研究成果

(1) EPC 細胞を 5-Aza-dC で処理したところ, 3 種の *ras* (*hras*, *kras*, *nras*) 遺伝子の発現が有意に上昇した。そこで, mCherry 融合 H-Ras およびその活性化型変異体 H-Ras^{V12} を過剰発現させた EPC 細胞においてコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ, 癌抑制遺伝子 p53 依存性の細胞老化様増殖停止が見られた(図 1A)。これらの細胞は, 細胞老化に特徴的な大型で平坦な形態(図 1B)かつ SA- β -gal 活性を示した(図 1C)。一方, proinflammatory SASP 因子の発現は見られなかった。これらことから, 魚類由来培養細胞株では, Ras は細胞老化の一部の表現型を示す初期老化を誘導するのみで, 成熟した完全老化への移行には関与しない可能性が示唆された。すなわち, Ras の限定的な老化誘導機構が, 魚類由来培養細胞株の老化耐性の一翼を担っていると考えられた。

(2) 哺乳類では, Ras は p53-p21 経路と p16-Rb 経路の両方を活性化することで細胞老化を誘導する。特に p16^{INK4a} は, 細胞老化誘導の中心的な役割を担っている。哺乳類の p16^{INK4a} は, 脊椎動物の進化の後期に起こった局所的な遺伝子重複の産物であり, 魚類は p16^{INK4a} を欠如している。このことは, 魚類細胞においては, Ras 単独の活性化のみで完全老化には成熟しないことを意味する。そこで哺乳類 p16^{INK4a} 遺伝子を EPC 細胞に導入した安定発現株を作製し, コロニーフォーメーションアッセイおよび MTT アッセイ, 細胞老化マーカーである SA- β -gal 活性の測定, および qRT-PCR による SASP 因子の発現定量を行った。その結果, p16^{INK4a} 導入 EPC 細胞は, p53-p21 経路非依存的な細胞老化様増殖停止と SA- β -gal 活性を示し(図 2A および 2B), 細胞老化に特徴的な大型で扁平な形態を呈した(図 2C)。さらに, 初期老化の指標である TGF- β SASP の mRNA レベルの上昇が見られなかった一方, 完全老化の指標である proinflammatory SASP 因子の mRNA レベルと, それを調節する転写因子 NF- κ B の活性の上昇が認められた(図 3)。同様に, proinflammatory SASP 因子の発現を誘導する別の転写因子 C/EBP の mRNA レベルも有意に上昇した。

一方, ARF の一過性過剰発現では, DNA 切断や核の断片化を伴わない細胞死が引き起こされ, また p16^{INK4a} と p15 の共通祖先であるファットヘッドミノール Cdkn2ab の導入では細胞老化は誘導されなかった(図 2C)。これらのことから, p16^{INK4a} のみが細胞老化に関与しており, 魚類のゲノムに p16^{INK4a} が存在しないことが, 魚類の細胞株が完全老化に対して耐性をもつことの重要な決定要因の一つであると考えられた。

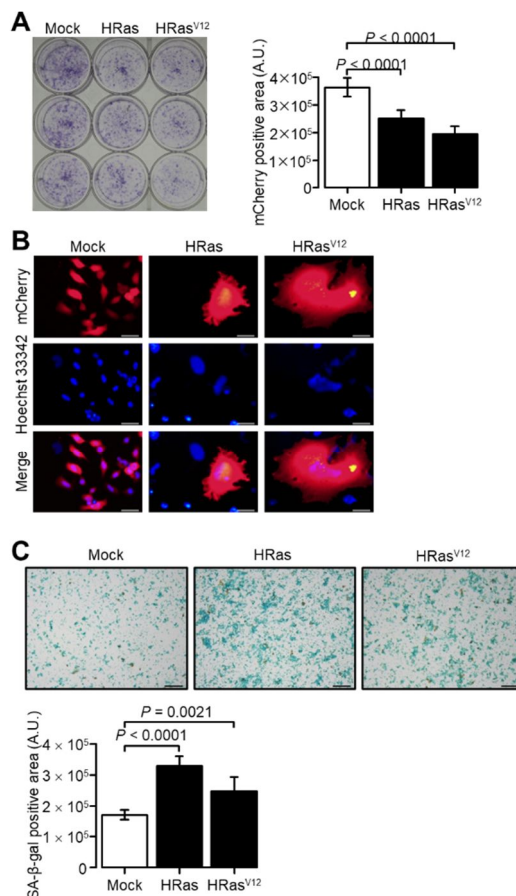


図 1. H-Ras または H-Ras^{V12} を過剰発現した EPC 細胞における細胞老化。(A) コロニーフォーメーションアッセイ。(B) H-Ras を過剰発現した EPC 細胞の形態的变化。(C) SA- β -gal 染色。

では完全老化には成熟しないことを意味する。

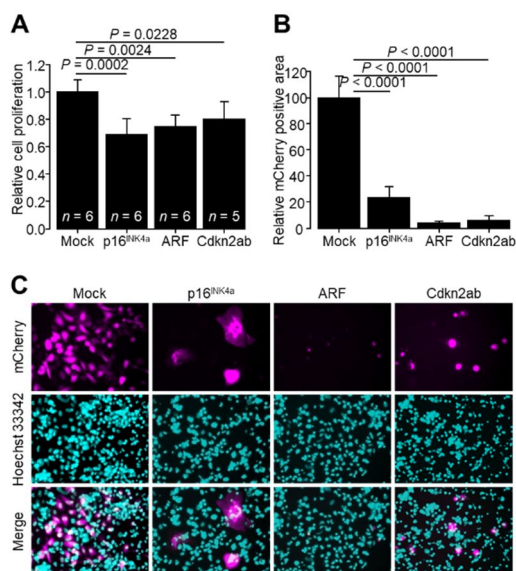


図 2. ヒト p16^{INK4a}, マウス ARF, またはファットヘッドミノール Cdkn2ab (p16^{INK4a} と p15 の共通祖先) を過剰発現した EPC 細胞における細胞老化様増殖停止と形態変化。(A) MTT アッセイ。(B) mCherry 陽性領域の定量化。(C) p16^{INK4a}, ARF, または Cdkn2ab を過剰発現した EPC 細胞の形態変化。

(3) 養殖場で起こりうる環境ストレスを想定し、酸化ストレスとして過酸化水素, 低酸素ストレスのミミックとして塩化コバルトをそれぞれ培地に添加し, これらが細胞老化を誘導するかどうかを調べた。その結果, 過酸化水素を添加した細胞でのみ SA-β-gal 活性が有意に上昇し, 細胞増殖停止が確認されたものの, proinflammatory SASP 因子の有意な発現上昇は認められなかった。また, メチル化感受性制限酵素 *HpyCH4IV* 切断によるグローバルな DNA メチル化変化も確認できなかった。これらのことから, 魚類の細胞では, 酸化ストレス下においては DNA 損傷などによって初期老化のみが誘導されると考えられた。

初期老化は可逆的な細胞増殖停止を意味しており, 完全老化に成熟しにくいことは, 魚類組織が高い再生能力や創傷治癒能力を持っていることと関連しているかもしれない。一方で, qRT-PCR に供したサンプルの *n* 数の少なさが原因であった可能性も否定できず (*n* = 3), 今後は *n* 数を増やした追試と, レポーター遺伝子アッセイによる NF- κ B の活性の測定が必要となる。

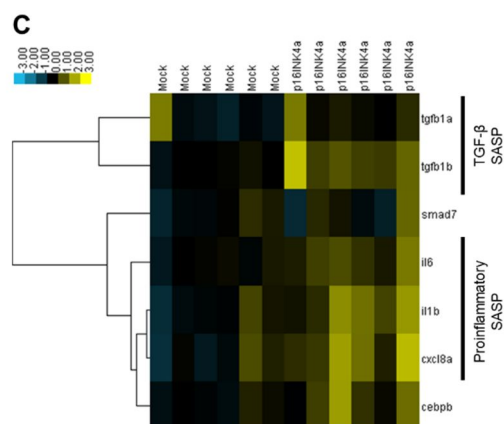


図 3. ヒト p16^{INK4a} を過剰発現した EPC 細胞における SASP 因子および関連遺伝子の発現プロファイルの階層的クラスタリング。

< 引用文献 >

- Futami K, Maita M, Katagiri T, 2019. DNA demethylation with 5-aza-2'-deoxycytidine induces the senescence-associated secretory phenotype in the immortal fish cell line, EPC. *Gene* 697, 194-200.
- Fijan, N., Sulimanović, D., Bearzotti, M., Muzinić, D., Zwillenberg, L. O., Chilmoczyk, S., Vautherot, J.F., de Kinkelin, P., 1983. Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie* 134 (2), 207-220.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J, 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20), 9363-9367.
- Kanda Y (2013) Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452-458.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Futami Kunihiko, Aoyama Kako, Fukuda Kazuki, Maita Masashi, Katagiri Takayuki	4. 巻 765
2. 論文標題 Increased expression of hras induces early, but not full, senescence in the immortal fish cell line, EPC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145116 ~ 145116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.145116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Futami Kunihiko, Sato Shunichi, Maita Masashi, Katagiri Takayuki	4. 巻 133
2. 論文標題 Lack of a p16/ARF locus in fish genome may underlie senescence resistance in the fish cell line, EPC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 104420 ~ 104420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2022.104420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二見邦彦・青山華子・福田一輝・伊藤颯希・舞田正志・片桐孝之
2. 発表標題 魚類由来培養細胞株EPCの老化耐性機構におけるras遺伝子の役割
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二見邦彦・佐藤俊一・舞田正志・片桐孝之
2. 発表標題 魚類のゲノムにおけるp16INK4a/Arf遺伝子座の欠如は魚類不死化細胞株EPCの老化耐性機構の一翼を担う
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	片桐 孝之 (KATAGIRI TAKAYUKI) (50361811)	東京海洋大学・学術研究院・准教授 (12614)	
研究 分担者	舞田 正志 (MAITA MASASHI) (60238839)	東京海洋大学・学術研究院・教授 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------