

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11749

研究課題名（和文）Anisomycinによる細胞老化誘導に関する基礎研究

研究課題名（英文）Fundamental research on the molecular mechanisms of cellular senescence induced by anisomycin treatment

研究代表者

牛島 弘雅（Ushijima, Hironori）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：90509043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：大腸癌細胞株を所定の濃度のAnisomycinを含む培地で培養し、それらの細胞からmiRNA及びmRNAをそれぞれ調製し、マイクロアレイ及びRNAシーケンシングを行った。miRNA発現解析の結果からは、既報のmiRNAを含む6種類のmiRNAを新たに特定することができた。RNAシーケンシングの解析結果からは、Laminin関連遺伝子及びNFKB2の発現低下、ATF3などの癌抑制遺伝子の発現量増加が、増殖抑制作用・老化誘導に関係していることが示唆された。公共データベースとの照合により、これら遺伝子の発現変動を調節する可能性のある8種類の転写因子を新規に同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出されたLaminin関連遺伝子、NFKB2、およびATF3などの遺伝子は、癌細胞において細胞老化を誘導する際のターゲットとして創薬分野での応用が期待できる。また、老化を検出する際の新しいマーカーとして使用できる可能性がある。これらの遺伝子の転写因子は、老化シグナル（老化ストレス）に対する初期センサーとして機能している可能性があり、その代謝回転の研究が進むことで癌細胞における老化誘導を効率的に行える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Colon cancer cell lines were cultured in medium containing a pre-determined concentration of anisomycin, miRNAs and mRNAs were prepared from these cells, and microarray and RNA sequencing were performed. The microarray analysis of miRNAs showed that six types of miRNAs including previously reported miRNAs were newly identified. The RNA sequencing analysis suggested that decreased expression of laminin-related genes and NFKB2 and increased expression of tumor suppressor genes such as ATF3 were associated with growth suppression and induction of cellular senescence. By searching with public databases, we were able to identify eight new transcription factors that may regulate these genes expression.

研究分野：薬学、分子生物学、生化学

キーワード：アニソマイシン 細胞老化 RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA-6 は、細胞分化に必須の因子であり、近年では内胚葉系幹細胞（内胚葉は消化管や肺、肝臓、膵臓に分化する）の分子マーカーとしてもよく知られている。その発現量は、分化や細胞増殖が盛んな時期に一過的に増加し、分化の進行とともに速やかに減少する。一方、胃癌や大腸癌、膵臓癌などの臨床サンプルでは、GATA-6 が正常組織に比べて著しく高発現した状態が維持されており、腫瘍の肥大やアポトーシス抑制に寄与していることも報告されている。

本研究代表者は、GATA-6 の代謝回転、特にその分解機構に関して解析を進めてきた。これまでに、GATA-6 分解を促進する薬物の探索を行い、JNK 活性化剤の 1 つである Anisomycin という薬剤を独自に見出した。また大腸癌細胞(GATA-6 高発現)の増殖を Anisomycin が効果的に抑えることを三次元培養の実験系で確認し、既存の抗癌剤との比較解析を進めてきた。JNK シグナルの活性化はアポトーシスを誘導することがよく知られているが、Anisomycin による大腸癌の増殖抑制の際、アポトーシスは起きておらず、細胞老化が起きていることが分かった。本研究ではこの老化誘導を担う因子の探索およびその分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

細胞老化を、癌に対する防御・除去の面から捉え、Anisomycin を使って、細胞老化を積極的に誘導するための新規分子機構の探索及び老化細胞の分子生物学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

濃度の異なる Anisomycin を作用させた大腸癌細胞から RNA を抽出し、それぞれをコントロールの細胞と比較し、発現量を解析した。解析に使用した RNA は、miRNA 及び mRNA である (mRNA 自体の存在量は miRNA によって調節される機構が存在し、miRNA の配列からそれが結合する mRNA の配列も分かるので、より得られる情報が多い)。また、miRNA の発現量解析は、Affymetrix GeneChip によるマイクロアレイを、mRNA の発現量解析は RNA シーケンシングをそれぞれ行った。

次に miRNA 及び mRNA 配列をデータベース上で照会し、既存の知見を調査した。miRNA が結合するターゲット mRNA の予測にはデータベース:NetAffx(アフィメトリクス社)を、mRNA の発現量比較解析には、iDEP platform ((integrated Differential Expression and Pathway analysis, ver.0.91)を使用した。

また、大腸癌細胞以外の細胞での増殖抑制・老化誘導の再現性を確認するために、メラノーマ細胞を用いて Anisomycin による細胞増殖抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1) Anisomycin を作用させた際の細胞内 miRNA の発現変動

大腸癌細胞に対して、0.5 μ M の Anisomycin を作用させると顕著な細胞増殖抑制効果を示すことが分かった。この状態の細胞から、miRNA を抽出しマイクロアレイ解析 (total 6632 spots) した結果、miR-27a を始めとする 6 種類の miRNA の発現量に有意な変動が見られた。このうち、miR-27a については、大腸癌の培養細胞に発現させることで細胞増殖が抑制されること、その標的タンパク質の候補として SGPP1 および Smad2 が考えられることなどが既に報告されていた。我々の実験結果においても、miR-27a を単独で発現させることによる細胞増殖抑制効果を確認できたが、-gal 染色による細胞老化現象は確認することができなかった。また、我々が見出した 6 種類の miRNA のうち、miR-132 についても単独で細胞内に導入することで、細胞増殖抑制効果を確認できた。残りの 4 種類の miRNA は、Anisomycin を作用させた際に発現量が 0.5 倍以下になった miRNA であるが、これらについては、細胞内でのノックダウンを誘導しても細胞増殖抑制および老化誘導は認められなかった。

(2) RNA sequencing (RNA-seq)による mRNA 発現変動の網羅的解析

Anisomycin を作用させた大腸癌細胞から total RNA を抽出し mRNA を調製し、RNA-seq を行った。Anisomycin を 24 時間作用させると細胞増殖抑制および老化誘導が確認できることを確認しており、この時点における mRNA 発現変動において、対照群に比べて 2 倍以上に増加した mRNA 及び 0.5 倍以下に減少した mRNA を表 1 に示す。

表 1. Anisomycin を作用させた際の mRNA 発現変動

	Genes	Fold change
Up-regulated genes	HSPA8	28.4
	HSP90AA1	5.4
	TFRC	5.4
	FOS	23.3
	EGR1	4.5
Down-regulated genes	LAMB3	0.11
	LAMA3	0.28
	TXNIP	0.070
	SQSTM1	0.17
	NFKB2	0.22

対照群と比べ、発現量が2倍以上に増加した mRNA のうち、HSPA8, HSP90AA1 はともに分子シャペロンであり、癌細胞の増殖を促進する働きが報告されている。また、TFRC は癌細胞の浸潤を増加させ、FOS, EGR1 はそれぞれ癌細胞の増殖を促進することが知られている。一方、発現量が0.5倍以下に減少

した mRNA のうち、LAMB3 は、予後不良の大腸癌のマーカーとして知られており、LAMA3 とともに Lamnin332 (基底膜の構成因子、細胞外マトリクス、可溶性増殖因子としても機能する) の構成因子でもある。LAMB3, LAMA3 とともに発現量が減少していたことは、Laminin332 の機能が抑制されたことを示唆している。また SQSTM1 (p62) は、腫瘍の進行を促進する因子として知られる NFKB2 の活性化に必要であり、この両者の発現量がともに減少していたことが増殖抑制作用に寄与している可能性がある。これら結果から、Anisomycin を24時間作用させた際に、細胞増殖を促進する因子の発現量の増加と、増殖抑制に寄与する因子の発現量減少がともに起きていることが明らかになった。前者は Anisomycin の増殖抑制、老化誘導作用に対する代償的な反応、後者の因子は増殖停止や老化に関連するものと考えられる。さらに、これらの遺伝子発現を調節している転写因子の探索を行い、TEAD4 を始めとする新たに8つの転写因子を同定することができた。

また、NFKB2 の働きを負に制御することが知られている ATF3 は、腫瘍抑制因子として知られおり、Anisomycin はそのプロモーターを活性化することが過去に報告されている。図1は、Anisomycin を所定の時間作用させた大腸癌細胞における ATF3 の mRNA 発現量を表している。増殖抑制作用が観察されるよりも早い作用時間で、その発現量は亢進していることが明らかになった。

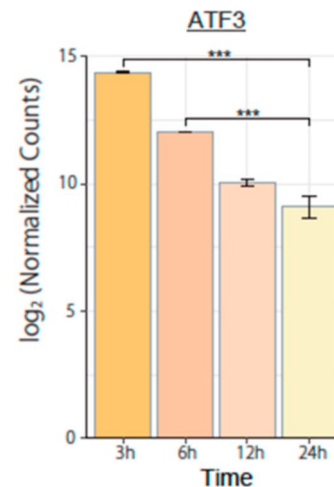


図 1. Anisomycin の作用時間による ATF3 の発現量変化

(3) メラノーマ細胞に対する Anisomycin による細胞増殖抑制効果

マウスメラノーマ細胞株に対する Anisomycin の細胞増殖抑制・老化誘導を検討した結果、大腸癌細胞よりも低濃度 (0.05 μ M) でその効果を示すことが分かった。また、この効果は、三次元培養条件下でも観察することができた (図2)。細胞老化マーカーの発現量解析では、p21 及び p53 が対照群に比べて2~2.5倍に増加していた。

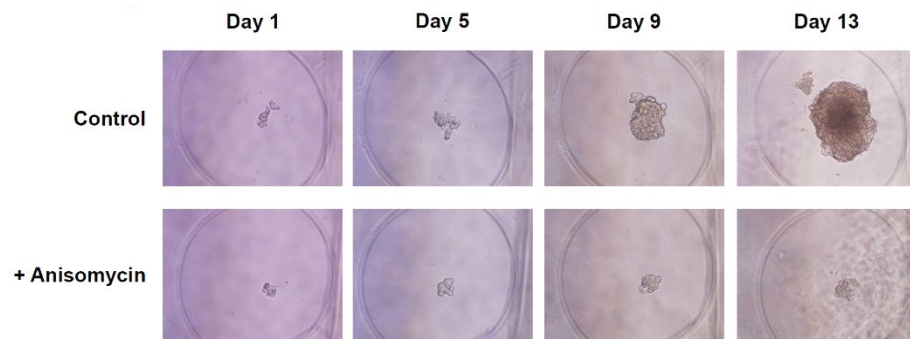


図 2. 三次元培養における Anisomycin の増殖抑制効果

細胞老化に特徴的な細胞内 NAD 量の減少について検証した結果、図 3 に示すように、対照群に比べて 58%減少していることが確認された。一方、細胞内 NADH 量には変動は見られなかった。また、培地中のグルコース消費量をモニターしたところ、Anisomycin を作用させた群では消費量が減少していることを確認した。解糖系の代謝産物である乳酸の生成量も減少していたことから、エネルギー代謝が抑制されている可能性が示唆された。

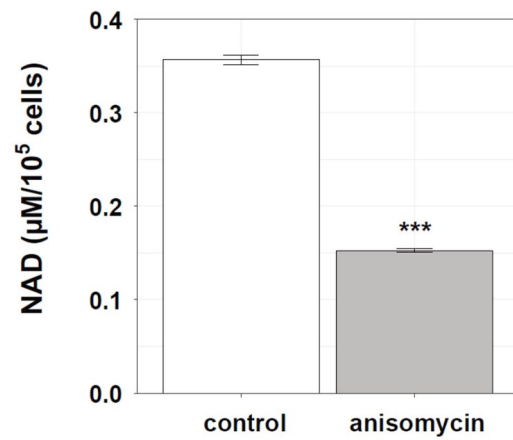


図 3. 細胞内 NAD 量の定量結果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1 . 著者名 Ushijima Hironori、Monzaki Rina、Funakoshi Mika	4 . 巻 27
2 . 論文標題 Analysis of differentially expressed genes responsible for the suppressive effect of anisomycin on cell proliferation of DLD-1?cells	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6 . 最初と最後の頁 101038 ~ 101038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1 . 著者名 USHIJIMA HIRONORI、MONZAKI RINA、ONODERA ARISA	4 . 巻 41
2 . 論文標題 Suppressive Effects of Anisomycin on the Proliferation of B16 Mouse Melanoma Cells <i>In Vitro</i>	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Anticancer Research	6 . 最初と最後の頁 6113 ~ 6121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15431	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Hionori Ushijima, Mika Funakoshi, Rina Monzaki
2 . 発表標題 Analysis for expression pattern of cell senescence associated genes on DLD-1 cells treated with Anisomycin
3 . 学会等名 ASCB/EMBO meeting, Cell Bio Virtual 2020（国際学会）
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 牛島弘雅、船越美佳
2 . 発表標題 Anisomycinによる大腸癌細胞の増殖抑制機構
3 . 学会等名 日本薬学会東北支部大会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 門崎莉奈、牛島弘雅
2. 発表標題 ハイドロキノン及びトラネキサム酸によるメラニン産生減少機構
3. 学会等名 日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学薬学部ホームページ https://www.imu-pharm.jp/
--

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

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
---------	---------