

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17806

研究課題名（和文）皮膚老化ホルモンの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of skin aging hormones

研究代表者

野島 伊世里 (Nojima, Iyori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10827398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス線維芽細胞において、DNAマイクロアレイ解析で細胞老化に関係するIGF1結合蛋白（IGFBP）が老化によって変動する分子として同定されたため、細胞老化への関与を調べた。老化によりIGFBPファミリーの中でIGFBP5が最も変化し、老化に伴い減少すること、ERK2の活性化を介して細胞老化を誘導すること、細胞外に分泌されたIGFBP5に細胞老化抑制作用がある可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、細胞老化にたいする分泌ホルモン分子IGFBP5の役割の一端を明らかにでき、IGFBP5の分子機能の解明につながるだけでなく、本研究が細胞老化研究の発展につながることを期待される。また、IGFBP5の発現変化が細胞老化を調節することが示されたことから、IGFBP5の補充による加齢疾患治療・予防薬の開発、ひいては個体老化の予防につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, since we have identified Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) as molecule involved in cellular senescence in mouse fibroblast (MEFs) by DNA microarray analysis, we investigated the role of IGFBPs in replicative senescence in MEFs. We found that IGFBP5 is the largest change and decreased among the IGFBP family by cellular senescence, that it induces cellular senescence via activation of ERK2, and that extracellularly secreted IGFBP5 may inhibit cellular senescence.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞老化 IGFBP5 MEF ERK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質脱アセチル化酵素である SIRT1 は酵母寿命を延ばすことから長寿遺伝子と呼ばれる。しかし、高等動物での SIRT1 と寿命・老化との関連は明らかになっていない。マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) において継代培養により細胞老化を誘導すると、SIRT1 蛋白の発現が低下した。そこで SIRT1 ノックダウンにより発現が増加して、かつ老化細胞で増加する遺伝子を DNA microarray 法により網羅的に探索し、SIRT1 によって発現調節を受ける細胞老化誘導因子の候補として Prl2c3 を同定した。Prl2c3 はプロラクチンに弱いホモロジーを示し、その発現量は老齢マウスの皮膚で著増し、マウスでは皮膚の基底細胞と毛母細胞、腺細胞に局限した発現が見られた。興味深いことに Prl2c3 抗体によるヒト皮膚の免疫組織染色でもマウスと同じ部位の染色が確認され、若年者と比較して高齢者の方が Prl2c3 の発現が有意に高いことが判明した。また Prl2c3 は線維芽細胞に細胞老化を引き起こし、皮膚特異的に Prl2c3 を発現するトランスジェニックマウスでは皮膚の菲薄化と皮下脂肪組織の増加が観察された。ヒトではマウス Prl2c3 に一致する遺伝子は存在しないが、ヒトでも Prl2c3 に相当する分子が存在する可能性がある。このためヒトの Prl2c3 に相当する分子を同定し、その分子の老化への作用と作用機序を調べることとした。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では申請者が見出した Prl2c3 を手がかりとし、Prl2c3 と相同性の高いヒトのホモログタンパク質を同定し、そのタンパク質が細胞老化に与える影響を明らかとしてヒト皮膚の老化を分子レベルで解明することを目的とする。
- (2) 他の細胞老化関連遺伝子の候補として IGF1 結合蛋白 (IGFBP) に着目し、細胞老化に対する役割を明らかにする。

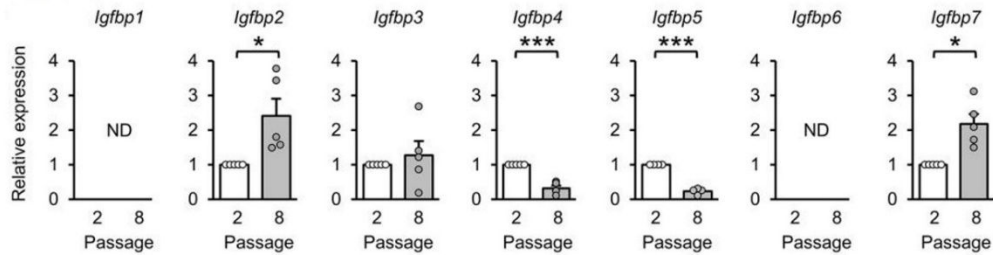
3. 研究の方法

- (1) Prl2c3 と相同性の高いヒトのホモログタンパク質を同定する
Prl2c3 はプロラクチンスーパーファミリーの 1 つであるため、プロラクチンが産生される臓器の一つである子宮のヒト由来培養細胞株 (Hela 細胞) を使用して、Prl2c3 抗体が認識するタンパク質を免疫沈降法で分離回収し、Q ExactivePlus 四重極 Orbitrap/ハイブリッド質量分析装置で解析を行った (IP-MS)。
- (2) DNA microarray 法で細胞老化に関連する分子として同定された IGFBP の細胞老化への影響を評価する
下記で示すようにヒトにおける細胞老化誘導因子の同定には至らなかったため、DNA microarray で細胞老化抑制因子の候補として同定されていた IGFBP に関する検討を行った。
MEF を 3T3 法で継代して複製老化を誘導し、細胞老化関連因子と IGFBP ファミリーの発現を定量的 PCR、ウエスタンブロット法で評価した。また細胞老化の指標として細胞サイズ及び老化関連酸性ガラクトシダーゼ (SA-β-Gal; senescence associated β-galactosidase) 染色陽性細胞数を評価した。最も発現が変化した IGFBP5 の細胞老化への影響を、IGFBP5 をノックダウン及び過剰発現させた MEF を作製して評価した。
- (3) IGFBP5 による細胞老化制御に関与する細胞内シグナル伝達経路を調べる。
IGFBP5 の結合パートナーである IGF1 の受容体下流シグナルとして、AKT のリン酸化、ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロット法で評価し、これらシグナルの役割を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) Prl2c3 と相同性の高いヒトのホモログタンパク質の同定と細胞老化への作用
IP-MS で抗 Prl2c3 抗体が認識するヒト候補タンパク質を 173 個同定した。これら候補タンパクを Prl2c3 と同じ分泌型タンパク質であること、皮膚での局在が一致していること、機能が類似していること (老化で発現が増加すること) を基準にデータベースで照合した結果、4 つが Prl2c3 と機能が類似するヒトタンパク質の候補として残った。このうち 1 つのタンパク質を MEF に処置したが、老化の指標である細胞分裂抑制作用、SA-β-Gal 染色陽性細胞数の増加、細胞の肥大化は見られなかった。以上の検討からは、ヒトにおける細胞老化誘導タンパクの同定には至らなかった。
- (2) 細胞老化抑制因子の候補として同定された IGFBP の MEF での発現
若い P2 MEF (継代数 2) と老化した P8 MEF (継代数 8) で、IGFBP ファミリーの遺伝子発現を定量 PCR 法で調べた。IGFBP5 の遺伝子発現量は P2 MEF と比較して P8 MEF で 77% 減少しており、IGFBP ファミリーの中で老化により最も大きく変化していた (図 1)。

(図1)

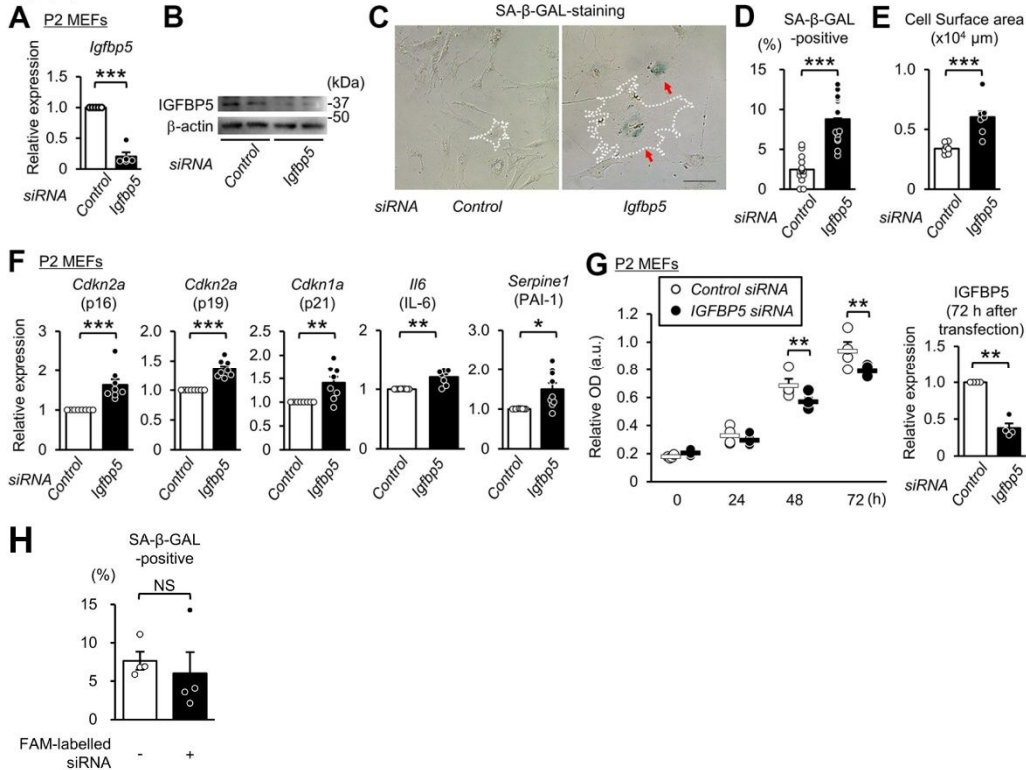


(2)- IGFBP5 ノックダウンの細胞老化への影響

P2 MEF で IGFBP5 をノックダウンした (図 2A 及び B)。コントロール群に比べ IGFBP5 ノックダウン細胞で、SA-β-GAL 染色陽性細胞数の増加 (図 2C 及び D)、細胞サイズの増加 (図 2E)、細胞老化関連因子 (p16, p19, p21) 及び SASP 遺伝子 (IL-6, PAI-1) の発現量増加 (図 2F) が確認された。細胞増殖も IGFBP5 ノックダウンにより有意に抑制された (図 2G)。

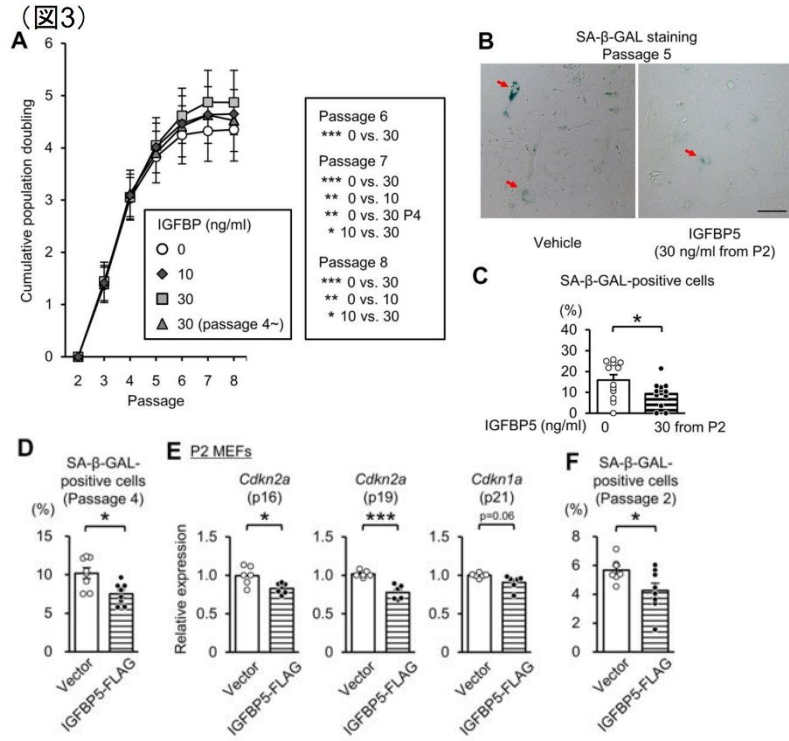
IGFBP5 は分泌タンパク質のため、細胞内と細胞外どちらで老化に関与しているか調べた。6-FAM で蛍光標識した siRNA を P2 MEF に遺伝子導入し、IGFBP5 がノックダウンされた細胞が老化するか調べた。FAM 陰性細胞と陽性細胞の間で SA-β-GAL 染色陽性細胞の割合に有意差はなかった (図 2H)。従って、IGFBP5 は細胞内では老化制御に関与しないことが示唆された。

(図2)



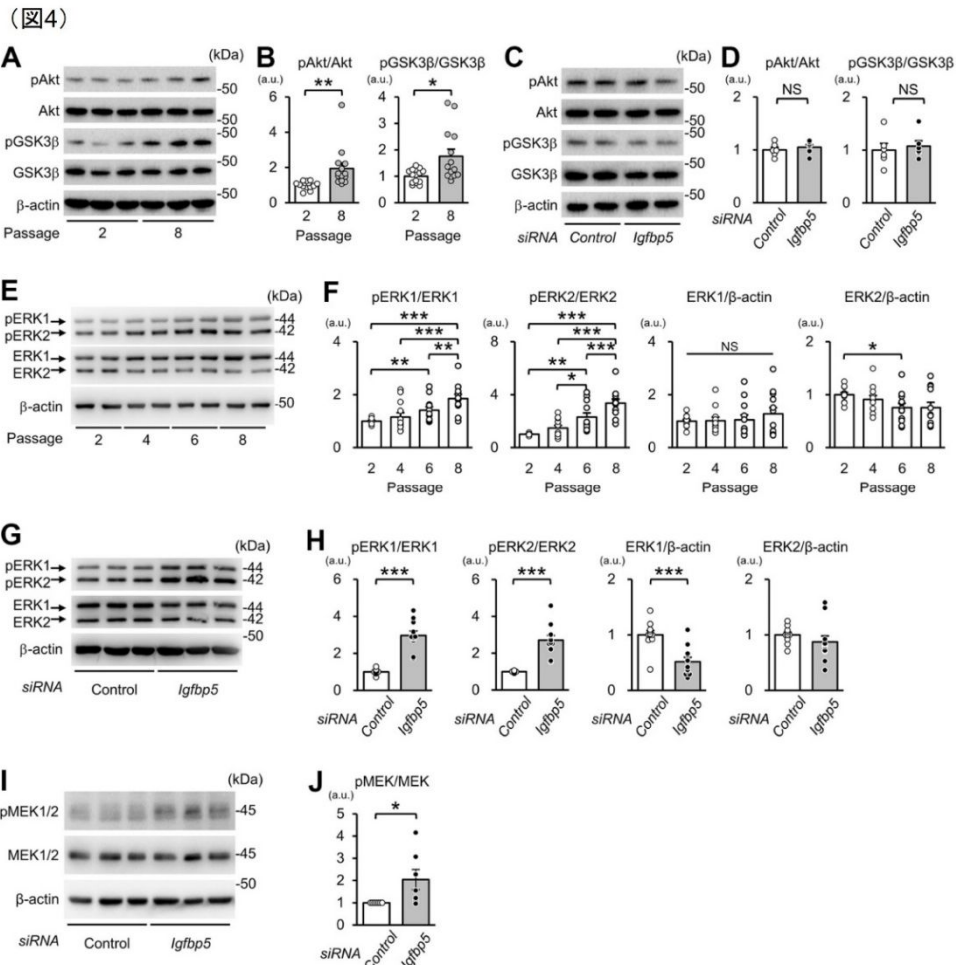
(2)- IGFBP5 の培地への補充または過剰発現による MEF の老化への影響

IGFBP5 を培地に添加し MEF を培養及び継代していくと細胞老化への到達が遅れ (図 3A)、継代数 2 から 5 まで IGFBP5 を処置した細胞では SA-β-GAL 染色陽性細胞数が減少した (図 3B 及び C)。P4 MEF に IGFBP5 を過剰発現すると SA-β-GAL 染色陽性細胞数が減少した (図 3D 及び F)。P2 MEF では IGFBP5 の過剰発現により細胞老化関連因子 (p16, p19, p21) の遺伝子発現量が減少した (図 3E)。



(3)- IGFBP5 の細胞老化制御に関するシグナル伝達経路の評価

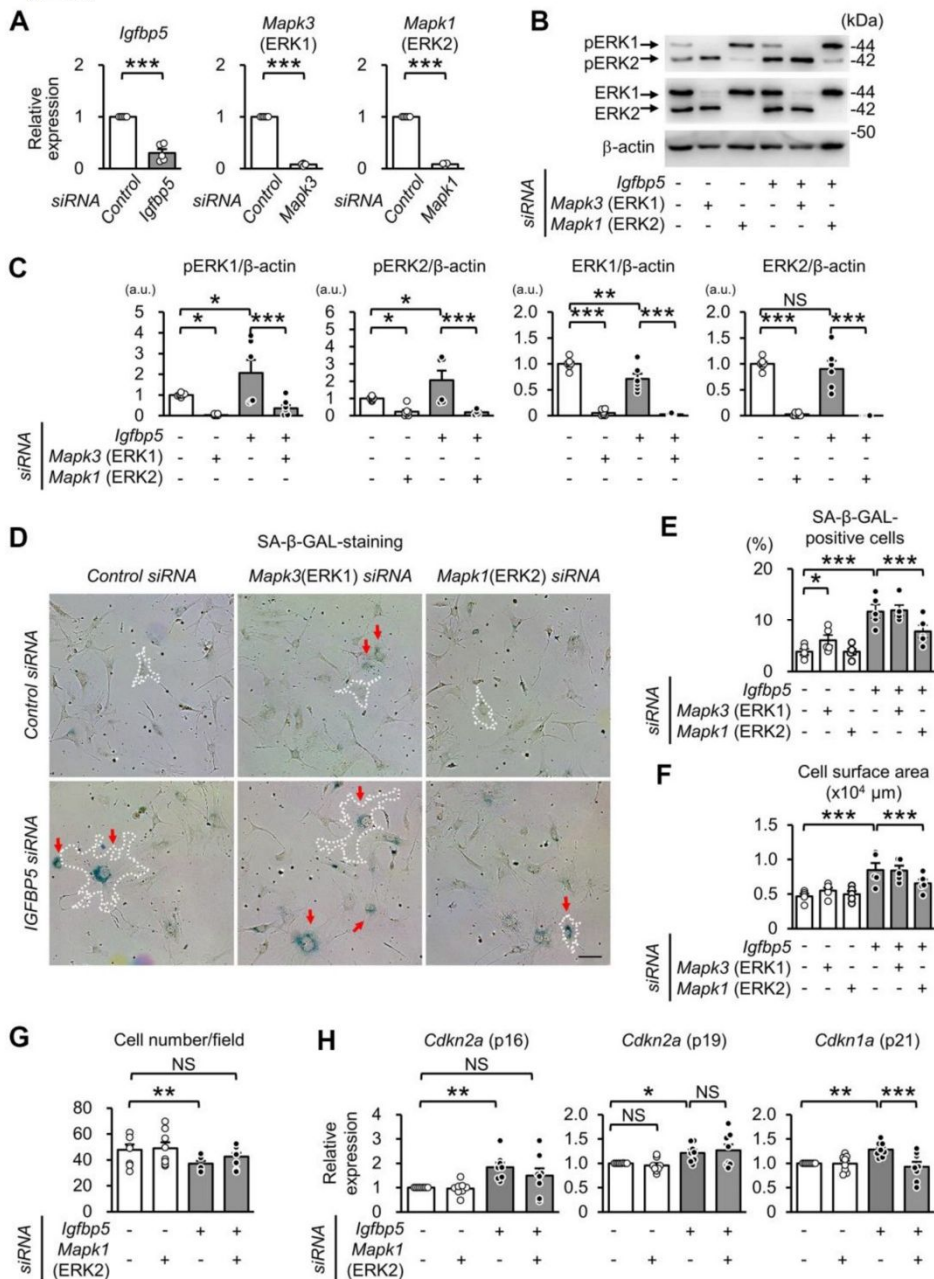
P8 MEF では AKT 及び GSK3 のリン酸化レベルが増加していたが、IGFBP5 をノックダウンした MEF ではそれらシグナルは変化していなかった (図 4A-D)。一方、P8 MEF 及び IGFBP5 をノックダウンした MEF で ERK1/2 のリン酸化レベルが増加した (図 4E-H)。ERK1/2 をリン酸化する MEK1 のリン酸化レベルも IGFBP5 ノックダウンにより増加した (図 4I-J)。



(3)- IGFBP5 ノックダウンで生じる細胞老化における ERK1 及び ERK2 の関与

IGFBP5 単独または IGFBP5 と ERK1 (Mapk3) または ERK2 (Mapk1) をダブルノックダウンした MEF を作製した (図 5A-C)。IGFBP5 を単独でノックダウンした MEF に比べ、IGFBP5 と ERK2 をダブルノックダウンした MEF で SA-β-GAL 染色陽性細胞数及び細胞サイズの増加が抑制された (図 5D-F)。一方、IGFBP5 と ERK1 をダブルノックダウンした MEF ではこれら指標には影響はなかった (図 5D-F)。IGFBP5 の単独ノックダウンによる一定面積当たりの細胞数の減少や老化関連因子 (p16, p21) の発現量増加は、ERK2 とのダブルノックダウンにより消失した (図 5G-H)。

(図5)



本研究の結果から、MEFにおいて、細胞老化に伴い IGFBP ファミリーの中で IGFBP5 の発現量が最も大きく変化し老化に伴い減少すること、IGFBP5 の発現低下は ERK2 の活性化を介して細胞老化を誘導すること、そして細胞外に分泌された IGFBP5 に細胞老化抑制作用がある可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nojima Iyori, Hosoda Ryusuke, Toda Yuki, Saito Yoshiki, Ueda Naohiro, Horimoto Kouhei, Iwahara Naotoshi, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of IGFBP5 contributes to replicative senescence via ERK2 activation in mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 2966 ~ 2988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203999	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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