

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07591

研究課題名（和文）がん治療により誘導される老化細胞を標的とした新規抗がん剤開発に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of novel anticancer drugs targeting senescent cells induced by cancer treatment

研究代表者

鎌田 真司（Kamada, Shinji）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：20243214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、申請者らが同定した老化細胞特異的に発現上昇する遺伝子であるLY6Dについて、その生理機能を明らかにするとともに、LY6Dを標的とした新規抗がん剤開発に向けた分子基盤を確立することを目的として解析を行なった。LY6DはGPIアンカー型の細胞膜タンパク質であり、高発現によって老化細胞に特徴的な巨大な空胞を形成することを見出し、さらに、LY6Dによって誘導される空胞は、細胞外液の取り込みに関与し老化細胞の生存に寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LY6Dは老化細胞特異的に高発現する細胞膜タンパク質であり、細胞外液の取り込みに関与し老化細胞の生存に寄与することから、分子標的薬開発のターゲット分子として極めて有用であると考えられる。今後、LY6Dを標的として、抗がん剤や放射線治療によって誘導された老化細胞を除去するための抗体医薬品や低分子化合物の開発が進むことを期待したい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the physiological functions of LY6D, a gene that is specifically upregulated in senescent cells, and also clarify the molecular basis for the development of novel anticancer drugs targeting LY6D. We found that LY6D, a GPI-anchored plasma membrane protein, is responsible for senescence-associated vacuole formation, and contributes to the survival of senescent cells through the incorporation of extracellular nutrients.

研究分野：腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：細胞老化 LY6D GPIアンカー 空胞形成 マクロピノサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

日本における死亡原因第一位であるがんに対して、多大な基礎研究、臨床応用研究が総合的な計画に基づき推進されてきたにもかかわらず、死因の第一位を占め続けている。がん対策として、革新的な診断、治療法の開発が求められていたが、外科的治療以外で重要な地位を占めていたのが、抗がん剤治療と放射線治療であった。ほとんどの抗がん剤と放射線は、がん細胞の増殖を阻止し、アポトーシスへ導くことによってがん組織の縮小、消失を目指しているが、一方で正常細胞に非特異的に作用する副作用が大きな問題となっており、問題視されつつあったのが、抗がん剤や放射線によって誘導される細胞老化という現象であった。細胞老化はがん遺伝子の強制発現や様々なストレス（酸化ストレス、DNA 損傷ストレス等）によって誘導され、老化細胞の特徴として永続的な細胞増殖の停止が挙げられることから、老化細胞の生理的意義としてがん抑制機能が指摘されていた。一方、老化細胞の特徴の一つとして SASP(Senescence-Associated Secretory Phenotype)因子が発見され、SASP 因子には増殖因子、炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素などが含まれ、がんの促進と悪性化に関与する可能性も示唆されていた。実際、老化細胞が共存することによってがん細胞の増殖や悪性化が促進され (Krtolica et al., *PNAS* 98, 12072, 2001; Ruhland et al., *Nat. Commun.* 7, 11762, 2016)、また、抗がん剤治療によって誘導された老化細胞が、抗がん剤の副作用の原因となることも示唆されていた (Demaria et al., *Cancer Discov.* 7, 165, 2017)。つまり、がん治療の際に出現する老化細胞を特異的に除去できる分子標的薬は、極めて有用な抗がん剤となる可能性を持っており、本研究プロジェクトの将来的な最終目標を、老化細胞を特異的に除去するための分子標的薬を開発することとした。

2. 研究の目的

従来、分子標的薬開発のターゲット分子として、細胞膜タンパク質の有用性が高いことが明らかとなっていた。その理由は、細胞内に取り込まれる必要がないため薬剤のデリバリーが簡単であること、並びに抗体医薬品の開発を目指すためには細胞外にエピトープが存在することが必須であるためである。そこで、本研究課題の核心をなす学術的な「問い」を「老化細胞をターゲットにした薬剤開発のために最適な標的分子とは何か?」として、申請者が同定した老化細胞特異的に高発現する細胞膜タンパク質である LY6D について解析を行うこととした。

3. 研究の方法

LY6D は GPI アンカー型の細胞膜タンパク質であり、高発現によって老化細胞に特徴的な巨大な空胞を形成することを見出していた。そこで本研究では、当初次に示す実験を計画した。(1) LY6D が空胞形成を誘導するシグナル伝達経路の解明、として、① LY6D の機能領域の解析、② 細胞外から細胞内へとシグナルを伝えるタンパク質の同定、③ LY6D の下流で働く Ras の機能解析、④ Ras の下流で働きアクチンの重合を促進する分子の同定、⑤ オートファジーとの関連について、である。また、(2) LY6D が生体から老化細胞を除去するための標的分子となる可能性の検証、としては、① siRNA 導入細胞を用いた解析、② 抗 LY6D 抗体を用いた抗体依存性細胞傷害活性の検出、である。

4. 研究成果

(1) LY6D が空胞形成を誘導するシグナル伝達経路の解明

① LY6D の機能領域の解析

LY6D の S-S 結合形成に関与することが予想されるシステイン残基をセリン残基に置換したところ、空胞が形成されなかったことから S-S 結合の重要性を検証できた。LY6D は、分子間相互作用に必須である LU ドメインと、細胞膜外葉への繫留に重要な GPI アンカーの修飾部位を有する。これらドメインに変異を導入したところ、GPI アンカーが付加されず細胞外に分泌される LY6D は空胞形成能を保持し、細胞内にとどまる内在型の LY6D では空胞形成率が低下することが明らかとなった。さらに、野生型及び細胞外に分泌される LY6D を過剰発現させた細胞培養上清を他の細胞に添加すると空胞形成率が優位に上昇することから、LY6D の空胞形成において、LY6D 自身は細胞膜外葉に繫留されなくとも、細胞外からマクロピノサイトーシスを誘導する分子群に相互作用することで空胞形成能を持つことが示唆された。

LU ドメインに関して LY6D が属する LY6/uPAR ファミリーのタンパク質間では LU ドメインの一次構造の相同性は低いものの、システイン残基の位置が保存されており、このシステイン残基を基底として三本指構造を形成することが大きな特徴となっている。その LY6/uPAR ファミリーの中で空胞形成能を持たない遺伝子である LY6G6D と LY6D を比較したところ、第一指領域

内のシステイン残基やプロリン残基の位置が異なっていたため、LY6G6D の第一指領域を LY6D の第一指領域と置換する変異体を作成し、空胞形成能を検証した。その結果、キメラ分子は空胞形成能を獲得することがわかった。さらにその第一指領域の中でシステイン残基の前後でβシート構造の形成に重要な役割を持つプロリン残基、スレオニン残基に相違点が見られたため、LY6G6D に対して LY6D と同じアミノ酸になるよう点変異の導入を行なった。その結果、プロリン残基及びスレオニン残基の点変異のみで LY6G6D が空胞形成能を獲得することがわかった。以上のことから、LY6D の空胞形成において、三本指構造の第一指領域の構造が必要であることがわかった。

② 細胞外から細胞内へとシグナルを伝えるタンパク質の同定

LY6D は細胞膜ラフトに存在し、Src family kinase (SFK) と多量体を形成することが明らかとなった。また、LY6D が細胞外から細胞内へとシグナルを伝えるタンパク質を同定するため、タンデム質量分析法を用いて LY6D と相互作用する膜タンパク質の網羅的な探索を行い、膜貫通型タンパク質である Integrin β1 を含む 5 種類のタンパク質を同定した。Integrin β1 について詳細な解析を行ったところ、Integrin β1 の活性を阻害する中和抗体が LY6D の発現に伴う空胞構造の形成を抑制し、さらに、RNA 干渉法による Integrin β1 の発現抑制によって LY6D 誘導性のマクロピノサイトーシスが抑制されることが明らかとなった。また、Integrin β1 のサイレンシングは細胞老化に伴い惹起されるマクロピノサイトーシスに対しても同様の抑制効果を示した。これらの結果から、LY6D 誘導性マクロピノサイトーシスを惹起するシグナルは Integrin β1 を介して細胞内に伝達されることが示された。Focal adhesion kinase (FAK) は Integrin β1 の下流因子であり、インテグリンシグナルの受容に伴い自己リン酸化を亢進してマクロピノサイトーシス制御因子として知られる Src family kinase (SFK) の活性化を誘導する非受容体型チロシンキナーゼである。本実験では、LY6D の発現に伴い FAK の自己リン酸化が亢進すること、また、FAK-SFK 経路の遮断が LY6D 誘導性マクロピノサイトーシスを抑制することが示された。以上の結果から、細胞老化関連タンパク質 LY6D は Integrin β1 との相互作用を介してマクロピノサイトーシスシグナルを細胞内に伝達していること、また LY6D は FAK-SFK 経路の活性化を介してマクロピノサイトーシスを惹起していることが明らかとなった (図 1)。

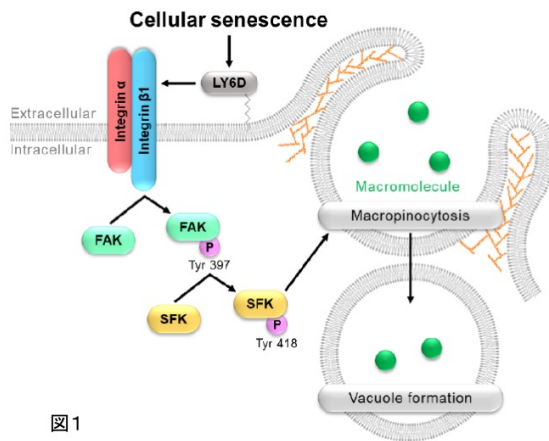


図 1

③ LY6D の下流で働く Ras の機能解析

LY6D の下流では Ras が機能する可能性が示唆されていたため、Ras の活性に重要な Gly12、及び、PI3K、Raf、Ral-GEF、それぞれの情報伝達に重要な Tyr40、Thr35、Glu37 の変異体を作製し細胞に高発現させたところ、LY6D 誘導性空胞形成には PI3K が重要な働きをすることが明らかとなった。

④ Ras の下流で働きアクチンの重合を促進する分子の同定

本研究期間内には実施できず、今後課題であると考えている。

⑤ オートファジーとの関連について

細胞内に空胞を形成する機構の一つとしてオートファジーの関与が示唆されているが、オートファゴソームのマーカーである LC3 の発現や、オートリソソームなどの酸性オルガネラマーカーである LysoTracker を用いて LY6D で誘導される空胞と局在が一致するかどうか調べたところ、LY6D によって誘導される空胞はオートファジーによるのではなくマクロピノサイトーシス (エンドサイトーシスの一種) によって形成されることがわかった。そして、LY6D によって誘導される空胞は、細胞外液の取り込みに関与し老化細胞の生存に寄与することが明らかとなった。

(2) LY6D が生体から老化細胞を除去するための標的分子となる可能性の検証

本研究計画では、当初、① siRNA 導入細胞を用いた解析、② 抗 LY6D 抗体を用いた抗体依存性細胞傷害活性の検出、を予定していた。具体的には、LY6D をノックダウンした老化細胞とノックダウンしない老化細胞の混合培養系で、LY6D をノックダウンした老化細胞だけが特異的に除去されるかどうか調べ、また、LY6D に対する siRNA とコントロール siRNA をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し細胞に導入後、血清アルブミンを添加した低栄養培地で培養した細胞に細胞老化を誘導し、LY6D に対する siRNA を導入した細胞のみが除去できることを確認する予定

であった。しかしながら、本研究計画実施期間内に完結させることができなかつたため、今後の重要課題であると考えている。

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 3件）

1. 著者名 Nagano Taiki, Awai Yuto, Kuwaba Shione, Osumi Taiichi, Mio Kentaro, Iwasaki Tetsushi, Kamada Shinji	4. 巻 32:br10
2. 論文標題 Riboflavin transporter SLC52A1, a target of p53, suppresses cellular senescence by activating mitochondrial complex II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-05-0262	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 Nagano Taiki, Iwasaki Tetsushi, Onishi Kengo, Awai Yuto, Terachi Anju, Kuwaba Shione, Asano Shota, Katasho Ryoko, Nagai Kiyoko, Nakashima Akio, Kikkawa Ushio, Kamada Shinji	4. 巻 296
2. 論文標題 LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100049 ~ 100049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013500	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 Nakagawa Keitaro, Nagano Taiki, Katasho Ryoko, Iwasaki Tetsushi, Kamada Shinji	4. 巻 596
2. 論文標題 Integrin 1 transduces the signal for<sc>LY6D</sc> induced macropinocytosis and mediates senescence inducing stress evoked vacuole formation via<sc>FAK</sc>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2768 ~ 2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14477	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19件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taiki Nagano, Keitaro Nakagawa, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoko Katasho, Taiki Nagano, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 Nectin-4 is responsible for cellular senescence-associated enlargement of cell size
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 泰一、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 リボフラビントランスポーター-SLC52A1による細胞老化抑制機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片所 諒子、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 Nectin-4 は老化細胞の巨大化に関与し、細胞生存を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野 太輝、中川 桂太郎、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6DはIntegrin 1-FAK経路を介してマクロピノサイトーシスを誘導することで老化細胞の生存を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池垣 幸宏、長野 太輝、寺地 杏樹、岩崎 哲史、宮戸 健二、鎌田 真司
2. 発表標題 老化細胞が分泌するエクソソームを介したDNA損傷誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 泰一、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 リボフラビントランスポーター-SLC52A1による細胞老化抑制機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤松 優希、大西 真実、村井 梨那、市原 祐希、長野 太輝、岡 昌宏、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 TPAによる転移性メラノーマ増殖抑制におけるTC-PTPおよびSH-PTP2の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井 梨那、板井 彩乃、赤松 優希、市原 祐希、長野 太輝、吉原 静恵、徳本 勇人、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 自発老化メラノーマ細胞の形成機構と関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoko Katasho, Taiki Nagano, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 Nectin-4-induced cell size enlargement enhance senescent cell survival
3. 学会等名 The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiki Nagano, Keitaro Nakagawa, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 Molecular mechanism and function of senescence-associated vacuole formation
3. 学会等名 The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 麻野 翔太、岩崎 哲史、井口 将、李 智博、古野 伸明、Tokmakov Alexander、佐藤 賢一、長野 太輝、鎌田 真司
2. 発表標題 STAT3はアフリカツメガエル卵母細胞を安定化させる
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野太輝, 鎌田真司
2. 発表標題 細胞老化におけるビタミンB2トランスポーターSLC52A1の機能
3. 学会等名 第16回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukihiro Ikegaki, Taiki Nagano, Tetsushi Iwasaki, Kenji Miyado, Shinji Kamada
2. 発表標題 Induction of DNA damage by exosome derived from senescent cells
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiichi Osumi, Taiki Nagano, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 Riboflavin suppresses cellular senescence through LSD1-mediated downregulation of Sirtuin-4
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Ichihara, Yuki Akamatsu, Yuya Mihara, Taiki Nagano, Norizo Saito, Hayato Tokumoto, Tetsushi Iwasaki, Shinji Kamada
2. 発表標題 Zinc promotes cell proliferation through Akt activation in benign melanoma
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Akamatsu, Mami Onishi, Yuki Ichihara, Miwa Yamauchi, Taiki Nagano, Masahiro Oka, Shinji Kamada, Tetsushi Iwasaki
2. 発表標題 Phorbol ester TPA inhibits the proliferation of metastatic melanoma via tyrosine phosphatases, TC-PTP and SH-PTP2
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森澤 研允, 長野 太輝, 岩崎 哲史, 鎌田 真司
2. 発表標題 老化細胞における空胞形成に及ぼすLY6Dのタンパク質構造
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片所 諒子, 長野 太輝, 岩崎 哲史, 鎌田 真司
2. 発表標題 Nectin-4は老化細胞の細胞面積増大を引き起こすことで細胞の生存を促進する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ビタミンB2の新たな機能 老化の原因となるミトコンドリア機能低下を改善するメカニズム解明 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2021_11_02_01.html</p>
--

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	岩崎 哲史 (Iwasaki Tetsushi) (40379483)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教 (14501)	

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