

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 1 5 日現在

機関番号：3 7 1 1 4

研究種目：若手研究

研究期間：2020 ~ 2022

課題番号：2 0 K 1 8 6 5 5

研究課題名（和文）細胞老化におけるマイトファジーの役割

研究課題名（英文）Role of mitophagy in cellular senescence

研究代表者

山口 真広（YAMAGUCHI, MASAHIRO）

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：8 0 8 2 4 2 6 8

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）： 上皮細胞における細胞老化とオートファジーおよびマイトファジーの相互作用を主体に検討を行った。上皮細胞についてはin vivoにおいては細胞診法を応用して、ボランティアからの擦過上皮細胞を用いた免疫細胞学的検索を実施した。細胞老化マーカーであるSA-beta-Gal発現については、若年者と比較して老齢グループからの擦過上皮細胞に陽性所見を多く認めた。陽性上皮細胞は、錯角化細胞で発現することが明らかとなった。また、陽性細胞においては位相差所見として細胞内蓄積物を認め、SA-beta-Gal発現と併せこれらの形態変化が細胞老化の判定基準になり得ることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化の誘導へのオートファジーおよびマイトファジーがどのように関与するかを検討する予備段階として、上皮細胞における細胞老化とオートファジーのマーカー発現とその意義を主体として検討した。検討材料としては、in vivo検索としての各年齢層からの擦過上皮細胞およびin vitro検索としてヒト・ケラチノサイトであるHaCaT培養細胞を用いて各種マーカーの染色を行った。その結果、細胞免疫化学的検索ではあるが、上皮細胞への細胞老化誘導はオートファジーにより制御を受けている可能性を示唆する結論が得られた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the interaction between cellular senescence and autophagy and mitophagy in epithelial cells. For epithelial cells, in vivo cytology was applied to immunocytological examination using epithelial cell scrapings from volunteers. SA-beta-Gal expression, a senescence marker, was found to be more positive in scraped epithelial cells from the aged group than from the young group. Positive epithelial cells were found to be expressed in parakeratotic cells. In addition, in the positive cells, intracellular accumulation was observed as a phase-contrast finding, and it was confirmed that these morphological changes together with SA-beta-Gal expression could serve as criteria for cell senescence.

研究分野：高齢者歯科学

キーワード：細胞老化 オートファゴソーム オートファジー マイトファジー SA-beta-Gal 擦過上皮細胞 LC3 Beclin1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

研究成果の概要

上皮細胞における細胞老化とオートファジーおよびミトファジーの相互作用を主体に検討を行った。上皮細胞については *in vivo* においては細胞診法を応用して、ボランティアからの擦過上皮細胞を用いた免疫細胞学的検索を実施した。細胞老化マーカーである SA-beta-Gal 発現については、若年者と比較して老齡グループからの擦過上皮細胞に陽性所見を多く認めた。陽性上皮細胞は、錯角化細胞で発現することが明らかとなった。また、陽性細胞においては位相差所見として細胞内蓄積物を認め、SA-beta-Gal 発現と併せこれらの形態変化が細胞老化の判定基準になり得ることを確認した。オートファジー・マーカーである LC3 と beclin1 (BECN1)の発現検索については、SA-beta-Gal 発現細胞に一致してこれらのマーカーが発現する傾向を認めた。また、LC3 陽性オートファゴゾームの局在は、細胞内老化沈着物と一致する傾向が得られた。しかしながら、細胞免疫学的オートファゴゾームの検出は、細胞老化マーカーが陰性である若年グループにおける一部の擦過上皮細胞にも発現した。この結果は、若年グループでの陽性細胞は環境刺激によりオートファジーが誘導されている可能性を示唆したものと考えた。次に、*in vitro* における培養ケラチノサイト (KC) の HaCaT 細胞における細胞老化の誘導実験を行った。細胞老化の誘導には、H₂O₂ 刺激により細胞内 ROS 蓄積による細胞老化誘導法 (ROS 誘導細胞老化) と抗がん剤である Etoposide (ETO) による DNA ダメージ反応 (DDR) による誘導法 (DDR 誘導細胞老化) の二つを試みた。両誘導法により HaCaT 細胞では SA-beta-Gal 発現が亢進し、細胞老化が誘導されることを確認し、実験で用いる誘導法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化の誘導へのオートファジーおよびミトファジーがどのように関与するかを検討する予備段階として、上皮細胞における細胞老化とオートファジーのマーカー発現とその意義を主体として検討した。検討材料としては、*in vivo* 検索としての各年齢層殻の擦過上皮細胞および *in vitro* 検索としてヒト・ケラチノサイトである HaCaT 培養細胞を用いて各種マーカーの染色を行った。その結果、細胞免疫化学的検索ではあるが、上皮細胞への細胞老化誘導はオートファジーにより制御を受けている可能性を示唆する結論が得られた。また、培養細胞への細胞老化法として ROS 誘導法および DDR 誘導法を確立することが出来た。これらの結果は、細胞老化へのオートファジーおよびミトファジーの役割を検索するために重要な基礎データであると考ええる。

研究成果の概要 (英文)

As a preliminary step to investigate how autophagy and mitophagy are involved in the induction of cellular senescence, we focused on the expression and significance of cellular senescence and autophagy markers in epithelial cells. As investigation materials, scraping epithelial cells of each age-layer shell for *in vivo* examination and cultured human

keratinocytes, HaCaT cells, for in vitro examination, were stained with various markers. As a result, although it was a cellular immunochemical study, we obtained the conclusion that the induction of senescence in epithelial cells may be regulated by autophagy. In addition, ROS induction method and DDR induction method were established as cell senescence methods for cultured cells. We consider these results to be important basic data for exploring the role of autophagy and mitophagy in cellular senescence.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 SA-beta-Gal 擦過上皮細胞 LC3 Beclin1 オートファゴソーム
オートファジー ミトファジー

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 2件）

1. 著者名 Hiroki Nakashima, Madoka Yasunaga, Mizuki Yoshida, Masahiro Yamaguchi, Saki Takahashi, Hiroshi kajiya, Sachio Tamaoki, Jun Ohno	4. 巻 4
2. 論文標題 Low Concentration of Etoposide Induces Enhanced Osteogenesis in MG63 Cells via Pin 1 Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 175-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhpb.30.175	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 Hiroki Nakashima, Madoka Yasunaga, Mizuki Yoshida, Masahiro Yamaguchi, Saki Takahashi, Hiroshi kajiya, Sachio Tamaoki, Jun Ohno	4. 巻 30
2. 論文標題 Low Concentration of Etoposide Induces Enhanced Osteogenesis in MG63 Cells via Pin 1 Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 175-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhpb.30.175	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1件

1. 著者名 Madoka Yasunaga, Masahiro Yamaguchi, Kei Seno, Mizuki Yoshida, Jun Ohno.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ACADEMIC PRESS(London)	5. 総ページ数 25
3. 書名 Role of autophagy in dysregulation of oral mucosal homeostasis. INFLAMMATION AND ORAL CANCER From Bench to Bedside.	

〔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
---------	---------