

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500852

研究課題名(和文)細胞増殖・移動と栄養制御ストレスに対する細胞防御におけるGADD34の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of GADD34 in cell growth, migration and starvation-stress response

研究代表者

伊藤 佐知子 (Ito, Sachiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70447845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養飢餓ストレスに対する細胞防御におけるGADD34の機能について解析を行った。その結果、骨髄由来マクロファージ系細胞において特定のアミノ酸欠乏下で細菌感染を模倣するLPS刺激によりGADD34の強い発現増加がみられた。また、これらの刺激により細胞の活性化とアポトーシスの亢進がみられたが、GADD34はmTORシグナルを抑制することでオートファジーを促進し、その結果、アポトーシスを抑制し細胞防御に作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the function of GADD34 on nutrition starvation-stress responses in macrophages. The deprivation of tyrosine and cysteine (Tyr/Cys) induced the expression of GADD34 in macrophages. LPS stimulation combined with Tyr/Cys-deprivation activated macrophages, then shifted to cell death in late phase of stimulation. A deficiency of GADD34 enhanced cell activation signaling and apoptosis more than that in wild-type macrophages. Further we found that mTOR-S6K signaling was higher in GADD34-deficient macrophages than in wild-type cells. Defective GADD34 reduced LC3-II and autophagosome formation induced by LPS-stimulation and Tyr/Cys-deprivation compared with that in wild-type macrophages. These results indicate that GADD34 enhances autophagy and suppresses apoptosis stimulated by LPS combined with amino acid deprivation through regulation of mTOR signaling pathway in macrophages.

研究分野：免疫学

キーワード：GADD34 マクロファージ オートファジー アポトーシス 栄養欠乏 創傷治癒 シグナル伝達 炎症

1. 研究開始当初の背景

細胞のストレス応答のメカニズム解明は老化やがん治療など医学生物学分野において重要な課題の一つであると考えられる。代表者の所属する研究室では、ストレス応答遺伝子の1つである GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) と老化、ストレス応答に関する研究を行ってきた。これまでに、GADD34 は ER ストレスにより活性化される eIF2 α の脱リン酸化を促進し、一時的な蛋白質合成の停止からの回復に関与することを明らかにしている。また、GADD34 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた創傷治癒実験において、GADD34KO マウスは正常 (WT) マウスより早く治癒し、マクロファージ等の遊走能が GADD34KO マウスで高くなっていることを見いだした。さらに、マウスの絶食ストレス実験により、肝臓で GADD34 の発現が上昇し、栄養制御ストレスに対する細胞防御に寄与する可能性を示した。これらのことから、GADD34 は様々な生体ストレス応答に重要な役割を果たしていると考えられるが、その作用機序については未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

GADD34 のストレス応答の分子メカニズム解明において、近年、GADD34 が炎症を活性化する NF- κ B シグナル伝達系の蛋白質 IKK の脱リン酸化に関与しているという報告がなされ、eIF2 α の脱リン酸化だけでなく、様々なシグナル伝達系の脱リン酸化に関与している可能性が示唆される。本研究では、栄養飢餓ストレスにおける GADD34 の発現上昇とストレス防御機構のメカニズム、また、創傷治癒や炎症誘導における様々なシグナル伝達系の活性化への GADD34 の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 栄養飢餓ストレス下での細菌感染によるマクロファージ活性化における GADD34 の機能解析

栄養飢餓により GADD34 の発現が上昇することが明らかとなっているが、GADD34 の発現が上昇する詳細な栄養飢餓ストレス条件を明らかにするために、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、および、骨髄由来樹状細胞を用いて様々なアミノ酸欠乏培地を作成し GADD34 の発現について解析した。さらに、アミノ酸欠乏下で細菌感染刺激を模倣する LPS を添加し GADD34 の発現について解析した。また、アミノ酸欠乏下での LPS 刺激による細胞内のシグナル伝達系の活性化、アポトーシスについて解析した。次に、GADD34KO マウスおよび WT マウス骨髄由来樹状細胞、ウイルスベクターを用いた shRNA により GADD34 を発現抑制した RAW264.7 細胞を用いて、シグナル伝達系の活性化の比較、アポトーシス、電子顕微鏡によるオートファジーの比較解

析を行った。

(2) 創傷治癒における GADD34 の機能解析

GADD34KO マウスおよび WT マウスの背に 3mm のパンチバイオプシーを行い、創の治癒、創周辺部位の細胞について免疫蛍光染色により解析した。また、創治癒に関与する分子の発現について real-time PCR およびウェスタンブロッティングにより解析を行った。

(3) アクロレイン投与による肺の炎症誘導における GADD34 の機能解析

アクロレインはタバコ煙の主成分であり慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 誘引の一つと考えられており、肺の炎症を引き起こす。GADD34KO マウスおよび WT マウスにアクロレインを経鼻投与し、肺の炎症について組織染色、活性酸素 (ROS) 産生、炎症性サイトカイン産生、シグナル伝達系の活性化について比較解析を行った。また、shRNA により GADD34 を発現抑制させた肺がん由来細胞株 LLC 細胞を用いてタンパク合成および ROS 産生、アポトーシスの比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 栄養飢餓ストレス下での細菌感染によるマクロファージ活性化における GADD34 の機能解析

栄養飢餓ストレスによる GADD34 の発現上昇について、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、および、骨髄由来樹状細胞を用いて、様々なアミノ酸欠乏培地を作成し GADD34 の発現について解析した結果、tyrosine/cysteine (Tyr/Cys) 欠乏により GADD34 の発現が有意に誘導されることが明らかとなった (図 1)。

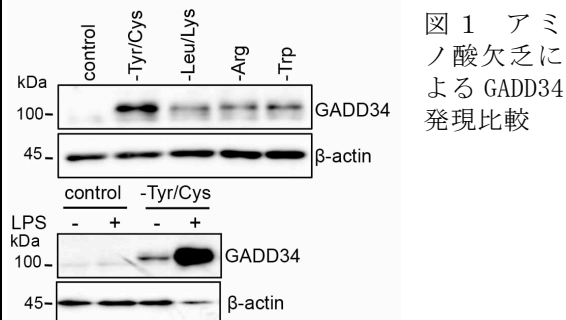


図 1 アミノ酸欠乏による GADD34 発現比較

また、Tyr/Cys 欠乏下での LPS 刺激により GADD34 の発現がより強く誘導され (図 1)、ERK, p38, Akt, mTOR のシグナル伝達経路の活性化とアポトーシスの亢進が見られた。shRNA により GADD34 の発現を抑制した RAW264.7 細胞 (shGADD34-RAW) を用いて Tyr/Cys 欠乏下で LPS 刺激した結果、正常 RAW264.7 細胞 (shControl-RAW) に比べ shGADD34-RAW では、Src, ERK, p38, Akt, mTOR シグナル伝達経路のより強い活性化、アポトーシスの有意な促進が見られた (図 2)。これらのことから、GADD34 はアミノ酸欠乏下での LPS 刺激による細胞の活性化とアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

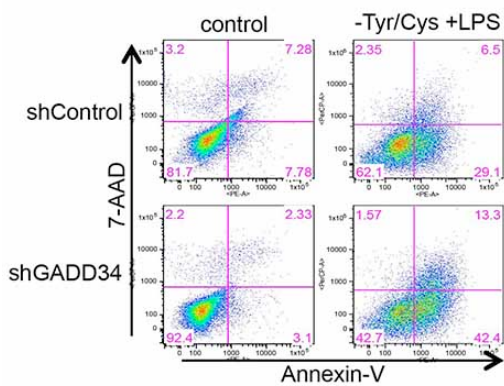


図2 GADD34 発現抑制によるアポトーシスの増加

次に、アミノ酸欠乏下での LPS 刺激によるアポトーシス誘導における GADD34 の作用を明らかにするためにオートファジー機構への関与について解析した。オートファジーは栄養環境が悪化した際に、タンパク質のリサイクルを行うなど生体の恒常性維持に関与する機構であり、オートファジーのマーカーの一つである LC3 は細胞質型 LP3-I から膜結合型 LC3-II へと変換されることが知られている。Tyr/Cys 欠乏下での LPS 刺激による LC3 の変化について解析した結果、shControl-RAW では shGADD34-RAW に比べ、より強い LC3II の増加が見られた (図3)。

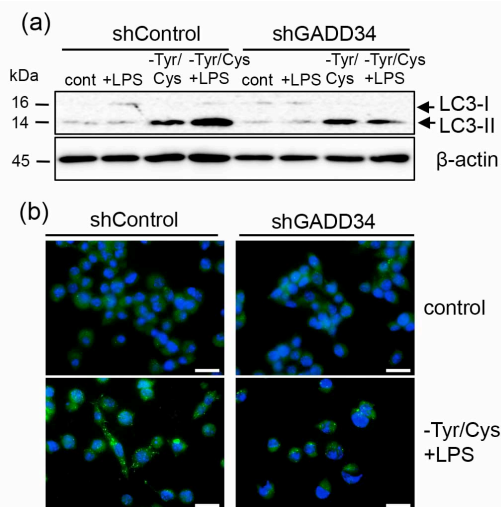


図3 GADD34 発現抑制による LC3-II の発現比較

さらに、細胞内のオートファゴゾームについて電子顕微鏡により解析した結果、shControl-RAW では shGADD34-RAW に比べ有意なオートファゴゾームの増加が見られ (図4)、GADD34 がオートファジー機構を促進することが明らかとなった。

次に、GADD34 のオートファジー誘導経路における分子メカニズムの解析を行った。mTOR は細胞増殖を促進する一方で、アミノ酸欠乏など栄養飢餓ストレスなどによりタンパク合成を抑制するなど生体の恒常性維持に重要な因子であり、オートファジーを抑制し、リソソームの生合成を阻害することが報告

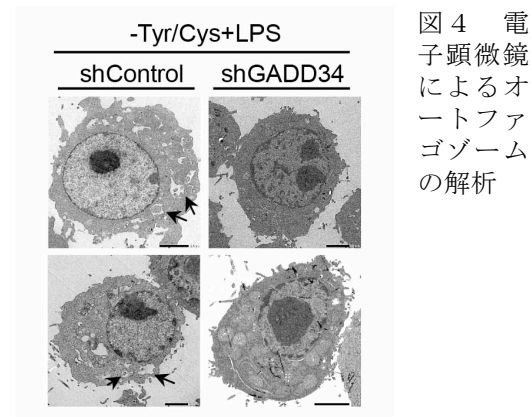


図4 電子顕微鏡によるオートファゴゾームの解析

されている。また、mTOR の活性化を調節する重要な分子として TSC1/2 があり、TSC2 のリン酸化が mTOR の活性化に関与している。そこで、アミノ酸欠乏下での LPS 刺激による mTOR シグナル経路の活性化について比較した結果、shGADD34-RAW では shControl-RAW に比べ TSC2 の有意なリン酸化の上昇が見られた。さらに免疫沈降による解析から GADD34 が TSC2 と結合することが確認され、GADD34 が TSC2 の脱リン酸化に関与している可能性が示唆された。また、mTOR 阻害剤である rapamycin を用いて、shGADD34-RAW でのオートファジーの誘導、アポトーシスについて解析した結果、rapamycin 処理により、オートファジーが促進し、アポトーシスは抑制されることが確認された (図5)。

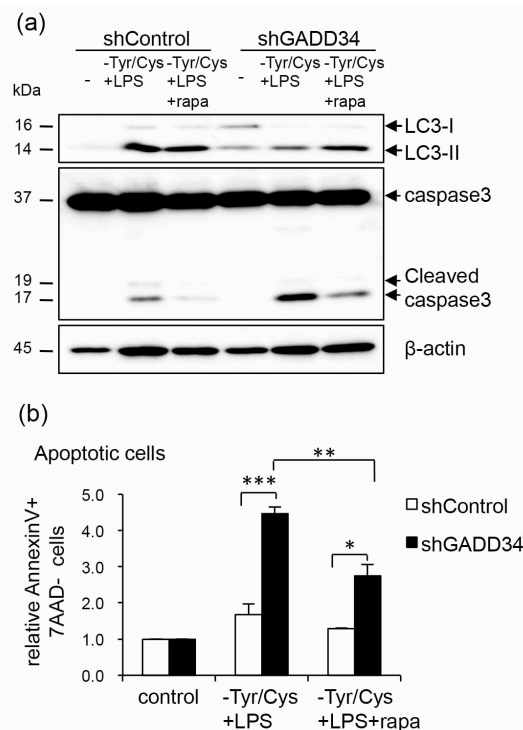


図5 ラパマイシン投与によるオートファジー機構とアポトーシスの変化

以上の結果から、Tyr/Cys 欠乏下での LPS 刺激により GADD34 は発現が増加し、TSC2 に結合してリン酸化を抑制し mTOR 活性を抑制

することで、オートファジーを誘導し、アポトーシスを抑えるというメカニズムが明らかとなった。

(2) 創傷治癒における GADD34 の機能解析
GADD34KO マウスおよび WT マウス背部に 3mm パンチバイオプシーを施し、経時的に創面積を比較した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、有意に早く創が治癒されることが明らかとなった (図 6)。

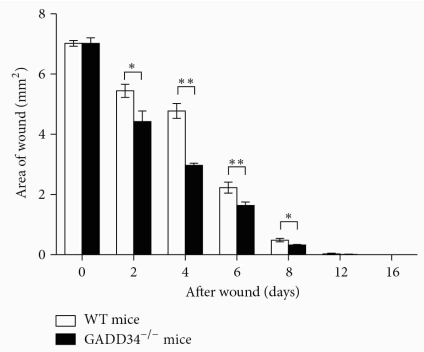


図 6 創傷部位面積の経時変化

創周辺部位の皮膚組織について解析を行った結果、GADD34KO マウスでは WT に比べ、創傷治癒に重要な α SMA を発現する筋線維芽細胞の増加、typeI, typeIII collagen の強い発現上昇が見られた。次に、筋線維芽細胞の分化に関与する TGF- β -Smad のシグナル伝達経路について経時的に解析した結果、GADD34KO では WT に比べ、より持続的な Smad2, Smad3 のリン酸化が見られた (図 7)。

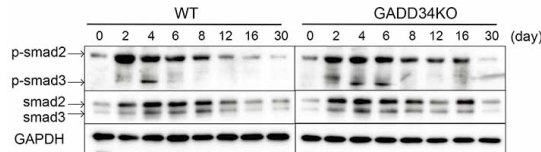


図 7 創治癒過程での Smad シグナルの活性化

また、治癒過程において、WT では GADD34KO マウスに比べ筋線維芽細胞の TUNEL 陽性細胞の増加と caspase3 の活性化が見られ、アポトーシスが促進されることが明らかとなった。以上の結果から、創傷治癒過程において GADD34 は TGF- β による smad3 活性化を抑制することで筋線維芽細胞の増殖を抑え、また caspase3 の活性化による筋線維細胞のアポトーシスの促進し創傷治癒の遅延を引き起こすことが明らかとなった。

(3) アクロレイン投与による肺の炎症誘導における GADD34 の機能解析

GADD34KO マウスおよび WT マウスにアクロレインを経鼻投与し肺組織の変化について解析した。その結果、GADD34KO マウスでは WT に比べアクロレイン投与による肺胞構造の損傷が抑制されていた (図 8)。また、WT マウスではアクロレイン投与により肺組織で GADD34 の発現が上昇することが確認された。GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、アクロレインによる肺組織での F4/80+CD11b+マクロファージ細胞の浸潤が

抑制されることが示された。また、アクロレインによる炎症性サイトカイン IL-6 産生の誘導、NF- κ B の活性化が GADD34KO マウスでは抑制されていることが明らかとなった (図 8)。

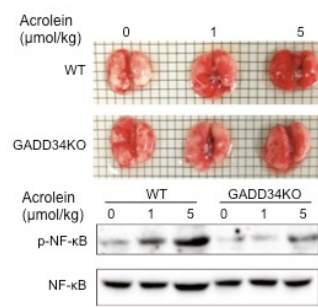


図 8 アクロレイン投与による肺組織変化と NK- κ B シグナルの活性化

さらに、アクロレイン投与により肺組織において ER ストレスによる p-eIF2 α の上昇、ROS 産生の上昇、アポトーシスの促進が見られたが、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べこれらの上昇が抑制されることが明らかとなった。次に、*in vitro*において、shRNA により GADD34 を発現抑制した LLC 細胞株 (shGADD34-LLC) を作成しコントロール細胞 (shControl-LLC) と比較解析した。アクロレイン添加により shControl-LLC では shGADD34-LLC に比べ ROS 産生の増加、アポトーシスを示す caspase-3 のより強い活性化が見られた。また、アポトーシスは ROS 産生阻害剤 NAC の添加により抑制されることが明らかとなった (図 9)。

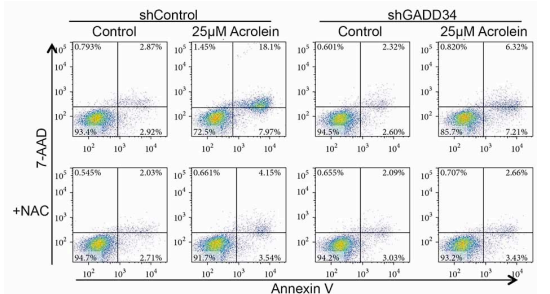


図 9 アクロレインおよび NAC 投与によるアポトーシス変化

GADD34 は ER ストレスによる一時的なタンパク合成の停止からの回復に関与していることから、アクロレイン投与後のタンパク合成について解析した。その結果、shGADD34-LLC ではアクロレイン投与によるタンパク合成の停止からの回復の遅延が見られ、タンパク合成が長期に抑制されることが明らかとなった (図 10)。

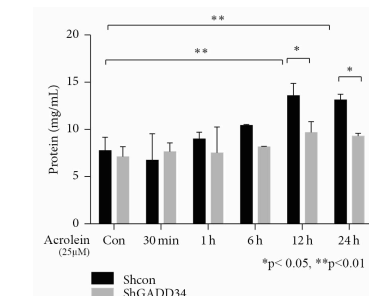


図 10 アクロレインによるタンパク合成変化

タンパク合成と ROS 産生との関与について明らかにするために、アクロレイン投与時にタンパク合成阻害剤 cycloheximide (CHX) を投与した結果、CHX 投与により ROS 産生およびアポトーシスが抑制されることが示された。以上の結果から、アクロレイン投与による肺炎症において、GADD34 の発現抑制をすることで、ER ストレスによるタンパク合成の停止が持続し ROS 産生が抑制されることで、細胞死が抑制されるというメカニズムが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Liu L, Ito S, Nishio N, Sun Y, Chen N, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 Facilitates Cell Death Resulting from Proteasome Inhibition. *Anticancer Res.* 35(10):5317-24. (2015) 査読有

2. Tanaka Y, Ito S, Oshino R, Chen N, Nishio N, Isobe K. Effects of growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34) on inflammation-induced colon cancer in mice. *Br J Cancer.* 113(4):669-79. (2015) doi: 10.1038/bjc.2015.263. 査読有

3. Chen N, Nishio N, Ito S, Tanaka Y, Sun Y, Isobe K. Growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) enhanced liver inflammation and tumorigenesis in a diethylnitrosamine (DEN)-treated murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 64(6):777-89. (2015) doi: 10.1007/s00262-015-1690-8. 査読有

4. Sun Y, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Chen N, Liu L, Isobe K. Enhancement of the acrolein-induced production of reactive oxygen species and lung injury by GADD34. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:170309. (2015) doi: 10.1155/2015/170309. 査読有

5. Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Aiba K, Thanasegaran S, Nishio N, Isobe K. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Sci Rep.* 5:8327. (2015) doi: 10.1038/srep08327. 査読有

6. Thanasegaran S, Ito S, Nishio N, Uddin MN, Sun Y, Isobe KI. Recruitment of Gr1+CD11b +F4/80 + Population in the Bone Marrow and Spleen by Irradiation -Induced Pulmonary Damage. *Inflammation.* 38(2):465-75. (2015) doi: 10.1007/s10753-014-9952-8. 査読有

7. Liu L, Nishio N, Ito S, Tanaka Y, Isobe K. Negative regulation of GADD34 on myofibroblasts during cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014:137049. (2014) doi: 10.1155/2014/137049. 査読有

8. Sun Y, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Chen N, Isobe K. Acrolein induced both pulmonary inflammation and the death of lung epithelial cells. *Toxicol Lett.* 229(2):384-92. (2014) doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.021. 査読有

9. Isobe KI, Cheng Z, Nishio N, Suganya T, Tanaka Y, Ito S. iPSCs, aging and age-related diseases. *N Biotechnol.* 31(5):411-421. (2014) doi: 10.1016/j.nbt.2014.04.004. review

10. Nishio N, Ito S, Isobe K. Loss of GADD34 induces early age-dependent deviation to the myeloid lineage. *Immunol Cell Biol.* 92(2):170-80. (2014) doi: 10.1038/icb.2013.78. 査読有

11. Ito S, Tanaka Y, Nishio N, Thanasegaran S, Isobe K. Establishment of self-renewable GM-CSF-dependent immature macrophages in vitro from murine bone marrow. *PLoS One.* ;8(10):e76943. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0076943. 査読有

12. Cheng Z, Ito S, Nishio N, Thanasegaran S, Fang H, Isobe K. Characteristics of cardiac aging in C57BL/6 mice. *Exp Gerontol.* 48(3):341-8. (2013) doi: 10.1016/j.exger.2013.01.005. 査読有

[学会発表] (計 26 件)

1. Ito S, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 promotes colon carcinogenesis through upregulating IL-6-STAT3 signaling 第 44 回日本免疫学会学術総会 2015 年 11 月 18-20 日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

2. Ito S, Oshino R Tanaka Y, Nishio N Isobe K. Establishment of macrophage stem-like cells from murine yolk sac 第 43 回日本免疫学会学術総会 2014 年 12 月 10-12 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)

3. Ito S, Tanaka Y, Thanasegaran S Oshino R, Nishio N, Isobe K. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. 日本基礎老化学会第 37 回大会 2014 年 6 月 26-27 日 あいち健康プラザ (愛知

県大府市)

4. Ito S, Tanaka Y, Nishio N, Oshino R, Isobe K, Establishment of macrophage stem-like cells from murine bone marrow. 第 42 回日本免疫学会学術総会 2013 年 12 月 11-13 日 幕張メッセ (千葉県千葉市)

5. 伊藤佐知子、西尾尚美、田中ゆりこ、磯部 健一 The expression of GADD34 is induced by various TLR ligands and affects the cytokine productions via TLR signaling 第 41 回日本免疫学会学術総会、2012 年 12 月 5-7 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 佐知子 (ITO, Sachiko)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70447845