

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640078

研究課題名(和文)ハダカデバネズミに学ぶ老化・がん化防御戦略

研究課題名(英文)Defense mechanisms against aging and cancer: lessons from the naked mole rats

研究代表者

岡田 雅人 (Okada, Masato)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ハダカデバネズミ(NMR)という齧歯類が、長寿命でかつがんに対する抵抗性を示すことで注目されている。本研究は、この特性を分子レベルで解明することを目的として行った。まず、老化・がん化との関連が示唆されているmTORシグナルを解析した結果、NMR細胞では転写因子FoxO3aが恒常的に細胞核内で活性化していることが見出された。また、NMR細胞のFoxO3aをノックダウンすると細胞増殖の接触阻害現象が抑制されること、一方、マウス細胞に核移行型のFoxO3aを導入すると細胞増殖が抑制されることから、NMRではFoxO3aの活性化機構に特徴があることが示された。

研究成果の概要(英文)：The naked mole rat (NMR) has recently attracted attention for its longevity and resistance to cancer. This study aimed to elucidate the molecular basis for these remarkable features. We first analyzed the mTOR signaling pathway, which had been implicated in aging and cancer, and found that the transcription factor FoxO3a is constitutively activated and localized to the nucleus in NMR cells. We also observed that knockdown of FoxO3a suppressed the contact inhibition of cell growth in NMR cells, while the expression of active form of FoxO3a inhibited cell growth in mouse cells. These findings demonstrate that NMR has a unique system for the regulation of FoxO3a and shed new lights on the role of FoxO3a as a regulatory point of longevity and resistance to cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 老化 ハダカデバネズミ mTOR

1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ (the naked mole rat: *Heterocephalus glaber*, 以下ハダカデバと略) は、西アフリカのサバンナ地帯の地中に営巣して生活する哺乳動物である。その名の通り体毛はほとんどなく、著しく突出した前歯を持つマウスより少し大きめの齧歯類である。地中での過酷な環境に適応するために、呼吸や代謝の速度を低下させ、痛覚をも失うなど、特殊な進化を遂げている。また、ハチやアリのような真社会性の行動様式をとる点も哺乳動物としてきわめてユニークである。ハダカデバの最大の特徴は、長寿 (30 年程度)、老化しない、そしてがんをほとんど発症しないことにある。そのメカニズムを解明することにより、老化やがん化に対する新たな防御戦略が見いだせるのではないかと期待され、ハダカデバがモデル生物として確立されつつある。これまでに、ハダカデバ由来の培養細胞系が樹立され、細胞においても、老化しない (replicative senescence を起こさない)、増殖速度が遅い、接触阻害 (contact inhibition) に高感受性、Ras などがん遺伝子導入によってもがん化しない等の性質が認められ、ハダカデバの特性が細胞レベルで成立していることが明らかとなっている。これらの特性発現のメカニズムとして、ハダカデバ細胞同士の接触によりがん抑制遺伝子 p16 が速やかに誘導されることや (Sedivy, PNAS 2009)、高分子量のヒアルロン酸を分泌することによってがん化抵抗性となっていること (Tian, Nature 2013) などが報告されてきているが、まだそのほとんどが未解明のままである。

一方で申請者らは、細胞の成長や恒常性維持において重要な役割を担う mTORC1 (the mechanistic target of rapamycin complex 1) の活性化に必須のアンカー分子 p18 を見だし (EMBO 2009)、mTORC1 シグナルを介する恒常性維持や増殖制御機構に関する研究を進めている (J. Cell Sci. 2013)。その過程で、p18 欠損により mTORC1 が不活化した細胞が、増殖速度が遅い、アポトーシスに耐性、Src や Ras などのがん遺伝子導入によってもがん化しないなど、上述したハダカデバ細胞と良く似た性質を示すことを見いだした。また、mTORC1 シグナルは細胞の成長やエネルギー代謝の制御を介して老化とがん化を共に制御することで注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、ハダカデバの特性と mTOR シグナルとの関連性に着目して解析を行い、彼らの老化・がん化抵抗性の鍵を握る分子の同定を試みる。興味深い挙動を示す分子が同定された場合には、その機能をマウスやヒトの初代培養細胞やがん細胞などにおいて検証し、彼らが獲得した老化・がん化防御戦略を解読する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養系の確立

ハダカデバネズミの皮膚由来の初代培養線維芽細胞 (NSF pri) は、慶応大学医学部岡野栄之教授より恵与されたものを使用する。その細胞に SV40 large T antigen を導入した細胞 (NSF SV40) を作製し、初代培養が困難なため SV40 large T antigen で不死化したマウス皮膚由来線維芽細胞 (MSF SV40) との比較に用いる。NSF の培養は、32°C、5% CO₂、5% O₂ 行う。

(2) シグナル分子の挙動解析

NSF pri、NSF SV40、MSF SV40、の3種類の細胞を培養し、その可溶化サンプルについて mTOR シグナルの関連タンパク質 (インスリンなどの成長因子受容体から、PI3K-AKT 経路、mTOR 複合体、下流転写因子など) をウェスタンブロッティング法で検出する。タンパク質発現量の差異、及びリン酸化などの翻訳後修飾の差異によるバンドシフト等にも注目してハダカデバ特有の挙動を示す分子を同定する。また、当研究室で実績のある他のがん化シグナル経路 (Src や Ras) の分子についても検討する。

(3) シグナル分子の機能解析

ハダカデバにおいて発現が著しく低下している、あるいは発現が全くない分子については、それらの cDNA をクローニングし、ハダカデバ細胞及びがん遺伝子 (Src や Ras) を導入した細胞に強制発現することによってその増殖能や老化・がん化抵抗性に対する効果を調べる。一方、発現亢進が認められた分子については、siRNA あるいは shRNA によるノックダウン実験を行い同様のアッセイ系によりその意義を確認する。

(4) シグナル分子の制御機構解析

発現や修飾に差異が認められた分子については、その差異が生じるメカニズムを解析する。転写レベルでの制御を受ける分子については、その上流シグナルや転写因子を解析する。タンパク質レベルで差異を示す分子であれば、分解系に注目した解析を行う。また、発現が顕著に低下している分子については、エピジェネティックな発現抑制の可能性をも検討する。こうした個々の分子の制御機構の解析から、ハダカデバ細胞特有の発現制御メカニズムを明らかにする。

(5) マウス及びヒト細胞における解析

ハダカデバ細胞の解析から同定された分子の意義をマウスやヒトの細胞で検証する。まず、初代培養した正常細胞を用いて、ハダカデバ細胞で発現低下している分子はノックダウン、発現亢進している分子は強制発現することにより、細胞老化への影響を観察する。また、がん細胞についても同様の実験を行い、がん増殖への影響を評価する。以上の結果より、ハダカデバ特有のシステムがマウスやヒト細胞の老化やがん化においても適用できるか否か検証する。

4. 研究成果

(1) ハダカデバ細胞におけるFoxO3a

ハダカデバの皮膚から調製した線維芽細胞について、mTORシグナル関連分子のタンパク質およびmRNAの発現量、リン酸化などの翻訳後修飾を解析した。その結果、ハダカデバ細胞では転写因子FoxO3aの挙動がマウス細胞と大きく異なり、リン酸化が低下しているとともに(図1A)恒常的に細胞核内に局在することが見出され(図1B)、FoxO3aが活性化状態にあることが示唆された。

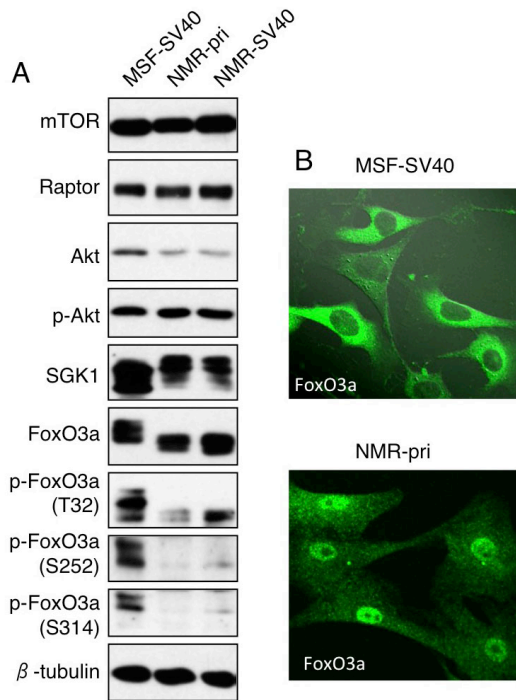


図1. ハダカデバ細胞におけるmTORシグナル分子の挙動 (A) とFoxO3aの細胞内局在 (B).

次に、FoxO3a活性化の意義を確認するために、ハダカデバ細胞のFoxO3aのノックアウト(KD)実験を行った(図2A)。その結果、FoxO3a KDにより細胞増殖速度自体には大きな変化は認められなかったが、増殖の接触阻害が抑制され高密度な状況においても細胞が増殖を続けることが見出された(図2B)。このことから、ハダカデバではFoxO3aが活性化状態にあるために接触阻害が早期に誘導されることから、がん細胞の特性である接触阻害の回避が遅れる可能性が示唆された。

(2) ハダカデバ細胞におけるFoxO3aの活性化機構

FoxO3aの活性化機構を解析するために、まず、核移行の制御に関わるリン酸化について、その責任キナーゼであるAktとSGK1について解析した。その結果、Aktには特に有意な差異は認められなかったが、SGK1については、複数のアイソザイムの中で、核で機能するとされている低分子量型アイソザイムの発現がハダカデバ細胞で減少していることが見出された(図1A)。その意義を明らかにするために、

低分子量型SGK1を高発現するハダカデバ細胞を作製して、細胞機能への影響を観察したが特に目立った効果は認められなかった。そこで、他の翻訳後修飾(アセチル化、メチル化、ユビキチン化など)の可能性を今後検討することとした。

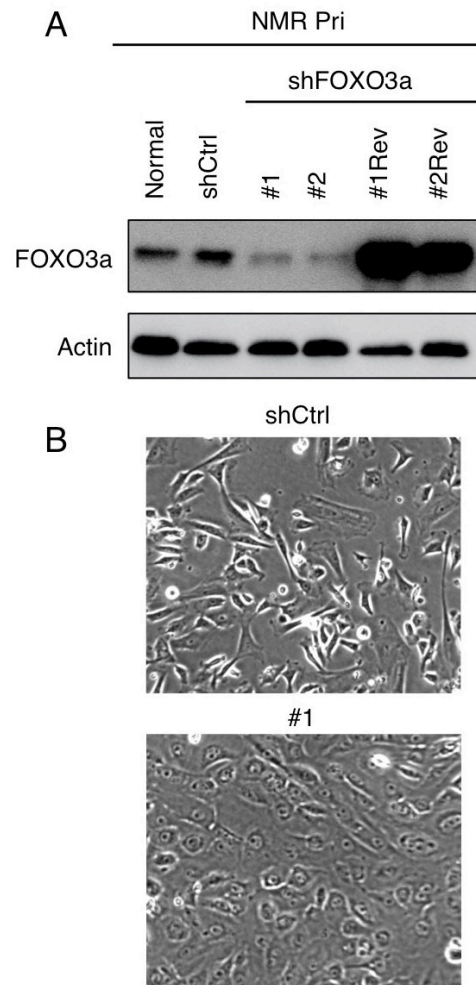


図2. ハダカデバ細胞におけるFoxO3aのノックアウト(A)とその細胞増殖接触阻害への影響(B).

(3) マウス細胞でのFoxO3aの解析

FoxO3aの重要性をさらに検証するために、正常のマウス細胞に核移行型のFoxO3a(SGK1によるリン酸化部位Ser314をAlaに置換したもの:S314A)を誘導的に強制発現する実験系を作製して解析を行った。その結果、S314Aは核にも局在化し(図3A)、Aktの活性化と細胞周期阻害因子p27の発現を誘導することが観察された(図3B)。また、S314Aの発現により、細胞増殖が早期に停滞することが確認された。さらに培養を継続すると、コントロールのマウス細胞の方がより高密度に培養されることが認められた(図3Cと3D)。この結果は、ハダカデバ細胞のFoxO3aをノックダウンすると細胞増殖接触阻害が抑制されるのと逆の効果を示しており、それと合わせて考えると、FoxO3aが細胞増殖のコントロールにおいて重要な役割を担い、ハダカデバでは、それが恒常的に活性化しているために、早期に細

胞増殖の停止が誘導されることが示唆された。さらに、実際の老化やがん抵抗性に対するFoxO3aの意義を検証するために、S314Aを表皮細胞特異的に発現するマウスを作製し、現在その表現型の解析を進めている。

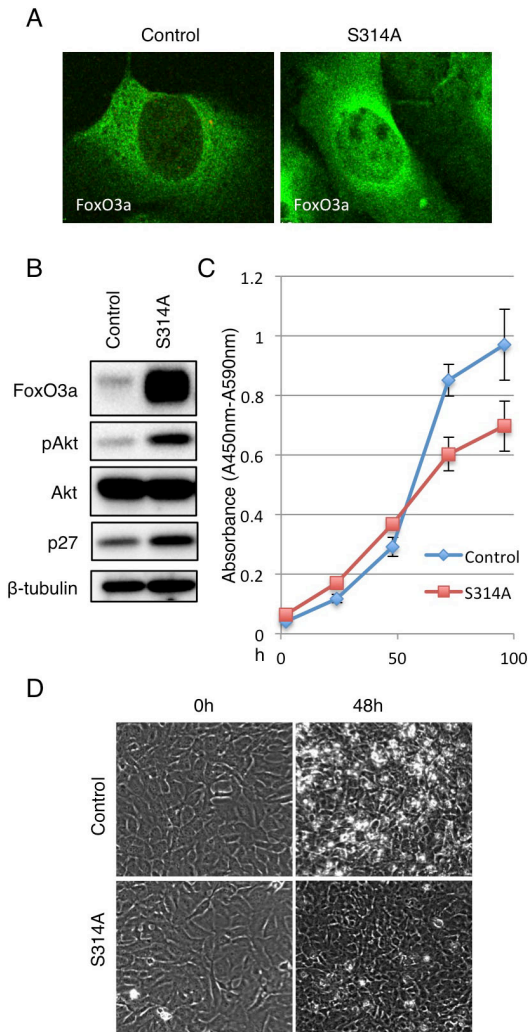


図3. 核移行型FoxO3a (S314A) のマウス繊維芽細胞への導入 (A) とその細胞増殖への影響 (B-D)

(4) p18-mTORC1 経路との関連性の解析

これまでに、p18を欠損することによりmTORC1が不活性化したマウス細胞が、ハダカデバ細胞と同様に増殖速度の低下およびがん化に対する抵抗性を示すことを見出している。また、FoxO3aもリン酸化が低下して核内に移行している点でもハダカデバ細胞と同様の特徴を獲得していることを確認している。その分子機序を解析した結果、マウスにおいては低分子量型のSGK1の発現低下が寄与することが明らかとなった。

(5) チロシンキナーゼシグナルの解析

一方で、mTOR以外のシグナル系の寄与を検討するために、細胞の接着や生存維持の制御に関わるチロシンキナーゼシグナルの代表的な分子であるFAK (focal adhesion kinase)、Src、およびSrcの負の制御因子であるCskにつ

いて解析を行った (図4)。その結果、FAKについては、ハダカデバでは特有のアイソザイムが発現していること、また、特にprimaryのハダカデバ細胞において、SrcおよびCskが非常に高いレベルで発現していることが見出された。Cskについては、SV40細胞においてもマウス細胞に比して有意に高い発現が認められた (図4A)。こうした主要なキナーゼ群の発現の差異を反映して、細胞内タンパク質全般のチロシンリン酸化レベルにも有意な差異が認められた (図4A)。そこで、Cskの高発現の意義を検討するために、Cskをノックダウンしたprimaryのハダカデバ細胞を作製し、Rasがん遺伝子導入による細胞がん化への影響を観察した。その結果、Cskのノックダウンにより、Rasによってわずかながら誘導される足場非依存性増殖能が、有意に促進されることを見出された (図4Bと4C)。このことは、ハダカデバ細胞においては、Cskが高発現していることによりRasシグナルと協調してがん進展に機能するSrcの機能が抑制されているために、がん化に対して強い抵抗性を示すことが示唆された。

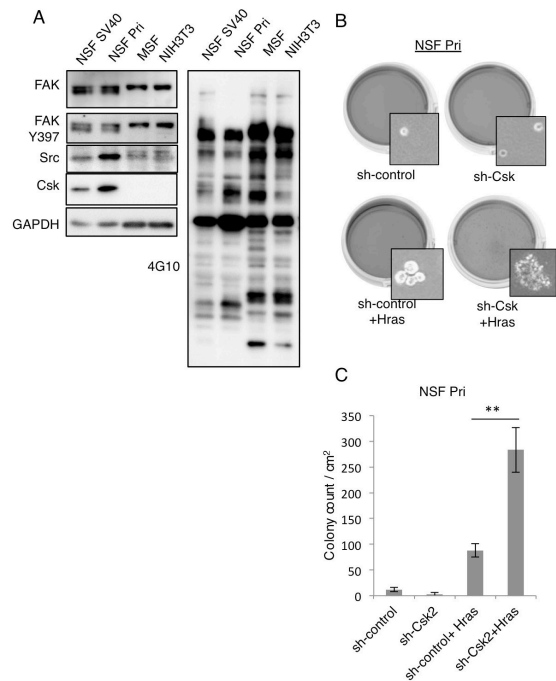


図4. ハダカデバ細胞におけるFAK-Src-Cskシグナル (A) とCsk KDによるハダカデバ細胞のRas依存性の足場非依存性増殖の促進 (B)

(6) まとめと今後の展望

本研究により、ハダカデバ細胞とp18-mTORC1経路の異常を伴うp18欠損細胞と対比して解析することにより、mTOR-FoxO3a経路が、細胞の増殖速度や老化、がん化の制御において重要な役割を担うことが改めて示された。今後は、その制御機構の全容を明らかにすることにより、新たな抗老化・がん化医薬の開発を目指した応用研究へと発展させたいと考えている。

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3件) 全て査読あり

1. Kakumoto K, Ikeda J, Okada M, Morii E, Oneyama C. mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PLoS One*. 2015, 10:e0119015. doi:10.1371/journal.pone.0119015.
2. Nada S, Mori S, Takahashi Y, Okada M. p18/LAMTOR1: a late endosome/lysosome-specific anchor protein for the mTORC1/MAPK signaling pathway. *Methods Enzymol*. 535: 249-263, 2014 doi: 10.1016/B978-0-12-397925-4.00015-8
3. Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*. 9: e88891, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0088891

[学会発表] (計4件)

1. 名田茂之、名田真理、長江(相馬)多恵子、北川真理、森俊介、高橋佑介、岡田雅人 「マウス表皮におけるmTORC1シグナルの機能」第38回日本分子生物学会、2015年12月4日、神戸ポートアイランド
2. Junhyeong Kim、森俊介、名田茂之、三浦恭子、岡野栄之、岡田雅人 「老化と寿命におけるマウスおよびハダカデバネズミのFOXO3aの役割」第38回日本分子生物学会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド
3. 名田真理、名田茂之、長江(相馬)多恵子、森俊介、岡田雅人 「マウス表皮の正常な発達はリソソーム膜アダプタータンパク質p18に依存している」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜
4. Masato Okada, Ayaka Kitamura, Shunsuke Mori, Shigeyuki Nada, Hirokazu Nakatsumi, Keiichi I. Nakayama 「Function and molecular architecture of the lysosomal mTORC1 anchor: Ragulator」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/cogene/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田雅人 (OKADA, Masato)
大阪大学、微生物病研究所・教授
研究者番号：10177058