

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830074

研究課題名(和文) NAD+代謝制御による細胞老化/がん化機構の解明

研究課題名(英文) Effects of NAD+ metabolism on cellular senescence/tumorigenesis

研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50390810

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)：マウス胎仔由来線維芽細胞をモデル細胞としてNAD+代謝環境が「細胞老化」と「がん化」のふたつの細胞機能に関わることを知見を得ることができた。NAD+再利用経路の律速酵素NAMPTを安定的に高発現するマウス胎仔由来線維芽細胞は、細胞老化の遅延を引き起こすことが明らかになり、また、遺伝子導入によりがん化させた細胞は、がん化の程度が低くなることを示唆する知見が得られた。これらの結果は、マウス胎仔由来線維芽細胞ではNAMPTの高発現、すなわち細胞内NAD+量を高く維持することが老化やがん化などの細胞機能の異常に対して負に働く可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We revealed that NAD+ metabolism in mouse embryonic fibroblasts affects “cellular senescence” and “tumorigenesis”. Fibroblasts derived from the mice having enforced overexpression of NAMPT, the rate-limiting enzyme in NAD+ salvage pathway delay the onset of cellular senescence and Ras-induced transformed MEF cells derived from Tg mice demonstrate less potential against anchorage-independent growth. These results suggest that in mice fibroblast to keep NAD+ level high works negative for processes of cellular senescence and tumorigenesis.

研究分野：時間生物学

キーワード：細胞老化 NAD+代謝

1. 研究開始当初の背景

われわれは、概日時計がNAD⁺再利用経路の律速酵素NAMPTの遺伝子発現を制御することで細胞内NAD⁺代謝環境を制御し、その結果、NAD⁺依存性脱アセチル化酵素SIRT1の時間依存的活性変動を介して概日時計転写システムを調節していることを発見した。

細胞内NAD⁺代謝環境の日内(短期)変動に加え、加齢による細胞内NAD⁺の減少(長期的変動)がマウス臓器やヒト細胞で報告されていた。また、NAD⁺前駆体ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN; 図1)を投与された老齢マウスは種々の代謝機能の回復が観察されたことから、細胞内NAD⁺の減少が老化を促進するひとつの因子であると提唱されていた。ヒト初代細胞を用いた研究より、NAMPT高発現が細胞老化を遅延させることが報告され、細胞レベルでも細胞内NAD⁺減少が老化を惹起する可能性が示された。一方で、ヒトがん細胞におけるNAMPT発現量とがん進行度に正の相関があること報告されており、生体の健康維持に細胞内NAD⁺維持がどのように働くかは不明な点が多かった。

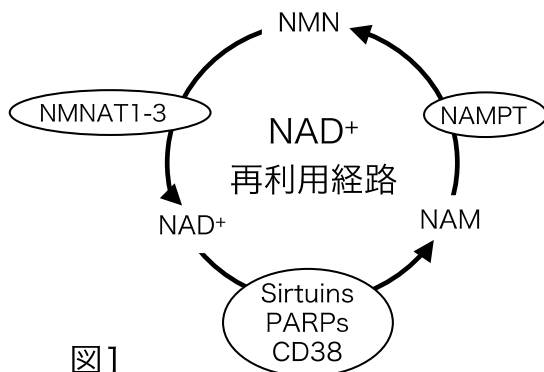


図1

2. 研究の目的

われわれはマウス線維芽細胞をモデル細胞としてNAD⁺代謝環境の変化が「細胞老化」と「がん化」のふたつの現象(細胞機能)にどのような影響を与えるか、さらにその分子基盤の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞老化に対する影響

Nampt 強制発現トランスジェニック(Nampt-Tg)および対照野生型マウスより初代マウス胚由来線維芽(MEF)細胞を樹立し、細胞老化への影響を細胞増殖能や老化マーカーの検出により検証した。

(2) がん化に対する影響

Nampt 強制発現トランスジェニック(Nampt-Tg)および対照野生型マウスより樹立した不死化 MEF 細胞を用いて、がん化の指標である足場非依存性増殖能を検証することでNAMPT/NAD⁺によるがん化への影響を調べた。活性型 Ras などを発現させ、がん化を誘導した時の影響も同様の方法にて検証した。

4. 研究成果

(1) 細胞老化に対する影響

研究開始時点でわれわれは、細胞内NAD⁺濃度が恒常的に上昇しているマウス、すなわち、NAD⁺再利用経路の律速酵素であるNampt 遺伝子を全身性で恒常的に高発現するNampt-Tg マウスを複数ライン樹立していた。これらのうち4種類の独立した Tg マウス胎仔由来線維芽(MEF)細胞を用いて細胞老化への影響を調べた。まず各初代 MEF 細胞で発現する総 NAMPT タンパク質量を調べたところ、対照野生型 MEF 細胞と比して約 1.3 倍から 5 倍程度増加していることが明らかになった。また、細胞内 NAD⁺量も総 NAMPT タンパク質量に比例し、1.2 倍から 2.6 倍程度上昇していることが確認できた。これら初代 MEF 細胞を用いて細胞増殖能を検証したところ、NAMPT/NAD⁺の増加が最も少なかった MEF ラインでは野生型 MEF 細胞と同じ継代回数で細胞老化が開始したが、他の NAMPT/NAD⁺増加が見られた MEF ラインでは細胞老化開始の遅延が観察された(図2)。さらに遅延の程度は NAMPT/NAD⁺増加量依存的事であることがわかった。また、他の細胞老化マーカーを調べた結果からも同様に NAMPT/NAD⁺増加量依存的に細胞老化の開始が遅延することが示唆された。

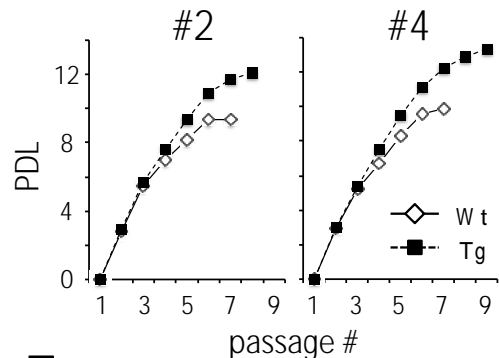


図2

次に、細胞老化遅延の原因を検証した。細胞老化の主要な原因のひとつとして酸化ストレスが知られている。Nampt-Tg MEF 細胞および対照野生型 MEF 細胞内の活性酸素種量を定量した結果、Tg-MEF 細胞は野生型 MEF 細胞の約 25%程度であった。抗酸化ストレス関連遺伝子の発現量を比較したところ、幾つかの遺伝子の発現量が Tg-MEF 細胞で優位に上昇していた。これらの結果は、Tg-MEF 細胞は活性酸素種の産生量が少ないのではなく、分解能力が高いことを示唆している。さらに、酸化ストレス抵抗性を検証するため、酸化ストレスの一種である過酸化水素(H₂O₂)処理を行い、細胞増殖能および生存率を比較した。その結果、Tg-MEF 細胞は細胞増殖能と生存率の両方の実験で H₂O₂ に対して抵抗性を示した。以上より、Tg-MEF 細胞内 NAD⁺代謝環境は、酸化ストレス抵抗性を強めるために細胞老化が遅延した可能性が考えられる。

薬理的に細胞内 NAD⁺ 上昇を惹起することで Tg-MEF 細胞と同様に細胞老化が遅延するかを次に検証した。細胞培養液に NAD⁺ の前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を添加することで細胞内 NAD⁺ 量をほぼ Tg-MEF 細胞と同程度まで上昇させることができた。この条件下で細胞老化遅延の有無を検証した結果、細胞老化の遅延は観察されなかった (図 3)。NAMPT は、ニコチンアミド (NAM) を NMN に変換する酵素であるため、細胞内 NAM 量を Tg-MEF 細胞と NMN 処理細胞で比較した。Tg-MEF 細胞内 NAM は対照野生型 MEF 細胞と比較して非常に減少していることを示す知見を得ている。しかし、NMN 処理 MEF 細胞内 NAM は非処理 MEF 細胞と同程度であった。NAM は Sirtuin など NAD⁺ を消費する酵素の阻害剤として働くため、NAMPT による細胞内 NAM 減少が Sirtuin などの酵素活性を上昇させるために必須ではないかという作業仮定のもと現在鋭意検証中である。

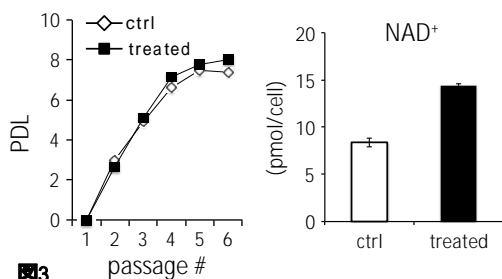


図3

(2) がん化に対する影響

不死化した MEF 細胞を用いてがん化に対する影響を足場非依存性増殖を指標に検証した。不死化した Tg-MEF 細胞は Wt-MEF 細胞と同様に足場非依存的なコロニー形成は示さなかった。足場非依存性増殖を促進することが知られている活性型 Ras や c-myc を強制発現させた Wt-MEF 細胞は、過去の報告同様に多くのコロニーを形成し、細胞のがん化が確認できた。しかし、Tg-MEF 細胞は、コロニー形成は観察できたが、それぞれのコロニーは小さく、コロニー数も Wt-MEF 細胞に比べ少なかった。これらの結果は、細胞内 NAD⁺ 量が細胞のがん化に対して負に作用している可能性を示唆している。

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 4 件)

Tamaru T, Hattori M, Honda K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GT, Ozawa T, Takamatsu K. “CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock” 査読有 PLoS Biol. 2015 Nov

12;13(11):e1002293.

doi:

10.1371/journal.pbio.1002293.

Tsujimura K, Irie K, Nakashima H, Egashira Y, Fukao Y, Fujiwara M, Itoh M, Uesaka M, Imamura T, Nakahata Y, Yamashita Y, Abe T, Takamori S, Nakashima K. “miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes” 査読有 Cell Rep. 2015 Sep 22;12(11):1887-901. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.028.

Fujimuro T, Matsui T, Nitanda Y, Matta T, Sakumura Y, Saito M, Kohno K, Nakahata Y, Bessho Y. “Hes7 3'UTR is required for somite segmentation function” 査読有 Sci Rep. 2014 Sep 24;4:6462. doi: 10.1038/srep06462.

Nitanda Y, Matsui T, Matta T, Higami A, Kohno K, Nakahata Y, Bessho Y. “3'-UTR-dependent regulation of mRNA turnover is critical for differential distribution patterns of cyclic gene mRNAs” 査読有 FEBS J. 2014 Jan;281(1):146-56. doi: 10.1111/febs.12582.

[学会発表](計 7 件)

Tamaru T, Hattori M, Kawamura G, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GT, Ozawa T, Takamatsu K. “CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock” 2016 SRBR meeting, 2016.5.23. Palm Harbor (アメリカ)

中畑泰和, 芦森温茂, 松井貴輝, 別所康全. “概日時計機構および細胞老化における NAD⁺/NAMPT の影響” BMB2015, 2015.12.1. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

芦森温茂, 中畑泰和, 松井貴輝, 別所康全. “NAD⁺ の減少は、概日時計遺伝子発現周期の延長を惹起する” BMB2015, 2015.12.1. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

田丸輝也, 服部満, 中畑泰和, 小澤岳昌, 高松研. “CRY-driven circadian oscillation of mammalian clock protein kinase activity” 日本時間生物学会学術大会, 2015.11.21. 東京大学 (東京都文京区)

芦森温茂, 中畑泰和, 松井貴輝, 別所康全. “Reduction of intracellular NAD⁺ promotes the extension of periods of circadian clock genes” 日本時間生物学会学術大会, 2015.11.21. 東京大学 (東京都文京区)

中畑 泰和. “概日時計～その破綻と疾病の関連性～” 2014年度研究大学シンポジウム「地方創成のためのけいはんなにおける新たな産学官ネットワークの展開」, 2015.3.30. リーガロイヤルホテル京都(京都府京都市)

Nitanda Y, Kim W, Matsui T, Nakahata Y, Sakumura Y, Bessho Y, “A negative feedback loop of Nrarp provides robustness to the somite segmentation clock” The 62nd NIBB Conference Force in Development, 2014.11.17 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://bsw3.naist.jp/bessho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号: 50390810

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: