

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01537

研究課題名(和文) 長寿変異マウスを用いた老化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of aging using mice with extended longevity

研究代表者

秋山 徹 (Akiyama, Tetsu)

東京大学・定量生命科学研究所・特任教授

研究者番号：70150745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、RNA結合蛋白質Mex3Bの欠損マウスが野生型と比較して寿命が優位に延長し、さらに細胞老化も阻害されていることを見出した。近年、細胞老化(senescence)と個体の老化を結びつける現象としてSASP(老化した細胞がサイトカイン、成長因子、細胞外基質など多種の蛋白質を細胞外に放出する現象)が注目されている。本研究において、我々はMex3BがSASPにおいて細胞外放出されるタンパク質群のmRNAに結合して発現を調節していることを見出した。さらに我々は、新規の分泌タンパク質SIF-2を同定し、Mex3Bの下流において細胞老化に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、老化細胞を除去したマウスの寿命が延長することが示され、細胞老化が個体老化の原因の一つであることが明らかとなったが、細胞老化が個体老化を誘導する分子機構には不明な点が多い。本研究により同定された細胞老化に重要な役割を果たす新規細胞外分泌タンパク質SIF-2の機能が明らかになることにより、細胞老化ならびに個体老化の分子機構の解明に新たな進展が期待される。さらに、本研究で得られた知見をもとに、SIF-2やその受容体に対する抗体や低分子化合物による老化制御、リコンビナントSIF-2によるがん細胞の老化誘導など社会的インパクトの高い応用が可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that mice deficient for the RNA-binding protein Mex3B has a significantly prolonged lifespan with decreased cellular senescence compared to wild-type mice. Recently, SASP (a phenomenon in which senescent cells release a variety of proteins such as cytokines, growth factors and extracellular matrix proteins) has attracted attention as a phenomenon that links cellular senescence and individual aging. In the present study, we found that Mex3B binds to mRNAs of extracellularly released proteins in SASP and regulates their expression. Furthermore, we identified a novel secretory protein, SIF-2, that plays an important role in cellular senescence downstream of Mex3B.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：老化 SASP RNA結合タンパク質 転写後調節

## 1. 研究開始当初の背景

個体老化への細胞老化の関与については長年議論されてきたが、近年、老化細胞を除去したマウスの寿命が延長することが示され、細胞老化が個体老化の原因の一つであることが明らかとなった。一方で、細胞老化が個体老化を誘導する分子機構には不明な点が多いが、最近になって SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotypes) と呼ばれる「細胞老化に至った細胞がサイトカインや成長因子、細胞外基質など多量の蛋白質を細胞外に放出する現象」が細胞老化と個体老化を結びつける現象として注目されるようになった。SASP は、細胞老化や炎症を誘導することにより組織の機能不全を引き起こしたり、がん細胞の増殖を促進する。SASP 因子の発現制御機構についてはオートファジーや転写因子 NF- $\kappa$ B が関与していることが明らかになってきているが、詳細は明らかでない。例えば、オートファジーの阻害による SASP 因子の発現抑制は RNA 量よりタンパク量の方が顕著である。したがって、SASP 因子の発現制御には転写後調節も関与していると考えられるが、その分子機構は明らかになっていない。

Mex3B は KH (K-homology) domain をもつ RNA 結合タンパク質である。本研究室で作成した Mex3B の欠損マウスは寿命が延長し、細胞老化が抑制されている。さらに、CLIP-seq、RNA-seq を用いた Mex3B 結合 RNA の網羅的解析によって、Mex3B 結合 RNA 群の中には既知の SASP 因子 mRNA が統計的に優位に含まれていた。実際に、Mex3B を欠損もしくは抑制した細胞では細胞老化に伴う既知の SASP 因子の発現誘導が抑制されていた。我々がこれまでに得てきたこれらの研究成果は、Mex3B が広範囲に渡る SASP 因子を包括的に転写後制御し、個体老化制御全般に重要な役割を担っている可能性を示唆している。

さらに、我々は CLIP-seq、RNA-seq、Ribosomal profiling 解析により、Mex3B が直接結合して発現制御に関与している可能性のある遺伝子を多数同定し、これらの遺伝子のコードするタンパク質の中には多くの分泌タンパク質が含まれていることを見出した。これまで SASP 因子の同定は抗体アレイなどの限定された手法を用いて行われており、未知の SASP 因子が多数存在することが予測される。したがって、我々の同定した分泌タンパク質の中には新規の SASP 因子が多数含まれていると考えられる。本研究では、CLIP-seq、RNA-seq、Ribosomal profiling など網羅的な情報を活用すると共に siRNA ライブラリーを用いて細胞老化に関与する新規 SASP 因子の同定及び機能解析を目指す。

## 2. 研究の目的

我々は、RNA 結合蛋白質 Mex3B の欠損マウスが野生型と比較して寿命が優位に延長し、さらに細胞老化も阻害されていることを見出した。近年、細胞老化(senescence)と個体の老化を結びつける現象として SASP が注目されている。我々はこれまでの研究により、Mex3B が SASP において細胞外放出されるタンパク質群の mRNA に結合していることを見出している。本研究では、(1) Mex3B の下流において細胞老化に重要な役割を担う遺伝子を次世代シーケンサーと siRNA ライブラリーを用いた全ゲノム的な探索により網羅的に同定し、(2) 同定因子の機能解析を行うことで、個体老化と細胞老化の新たな分子制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Mex3B の下流において細胞老化に重要な役割を担う遺伝子の次世代シーケンサーと siRNA ライブラリーを用いた網羅的探索と同定

我々はこれまでに、ヒト線維芽細胞 IMR90 の Ras 誘導型の senescence が Mex3B の発現抑制により抑制されることを明らかにしている。さらに、この時発現変動している遺伝子を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により網羅的に同定してきた。また、CLIP-seq により、Mex3B タンパク質と結合する RNA の同定にも成功している。そこで、まず Mex3B タンパク質に結合し、かつ Mex3B による senescence 誘導時に発現の変動を生じている遺伝子を網羅的に抽出した。さらに、抽出した遺伝子を、senescence を制御するものみに絞り込むため、siRNA ライブラリーを用いて各因子を個別にノックダウンし、senescence の変動を senescence マーカー遺伝子の一つである p15 の発現変動により確認した。得られた遺伝子の中で、N 末領域に分泌タンパク質のシグナルペプチドをもつタンパク質をコードする遺伝子 SIF-2 (senescence-inducing factor-2) に着目し、その生物学的機能の解析を行った。

(2) 同定因子 SIF-2 の機能解析

先に行ったスクリーニングの結果を確認するため、SIF-2 の発現が senescence 及び Mex3B の発現抑制により変動することを Real-time RT-PCR にて p15、及び IL6 の発現を検討することにより確認した。続いて、SIF-2 自身が senescence を制御していることを確認するために SIF-2 をノックダウンして senescence の変動を検討した。

さらに、SIF-2 が SASP 様に機能するか否かの検討を試みた。まず、SIF-2 が細胞外に放出されることを確認するため、Ras の発現により senescence を誘導した IMR90 細胞の培養上清を回収し、質量分析に供した。また、Mex3B 依存的な SIF-2 存在量の変化を、Mex3B をノックダウンした細胞を用いて同様の実験を行うことにより確認した。続いて、分泌された SIF-2 が他の細胞に受容されて senescence を誘導できるかどうかを、SIF-2 を強制発現した HeLa 細胞と共培養した時の IMR90 細胞の senescence の変動を検討した。さらに、リコンビナントの SIF-2 を産生・精製し、IMR90 細胞に添加した時に生じる

senescence の変化を検討した。

加えて、Mex3B による SIF-2 の発現制御機構の検討を行った。これまでに、Mex3B は標的遺伝子の 3'UTR に結合して miRNA の機能を制御することによりその発現を調節することを見出している。Mex3B も CLIP-seq の結果から SIF-2 の 3'UTR 領域に結合することが示されていることから、3'UTR を介した発現制御機構があると考え、その解明を試みた。具体的には、SIF-2 の 3'UTR 領域を用いた Luciferase assay を行った。

#### 4. 研究成果

RNA-seq、CLIP-seq 及び siRNA screening という3つの手法を用いた全ゲノム的な探索の結果、Mex3B の下流で senescence を制御する因子の同定に成功した。本研究では、その中で N 末に分泌タンパク質としてのシグナルペプチド配列を有する SIF-2 に着目し、更なる生物学的機能の解析を行った。

まず、IMR90 細胞の senescence を誘導すると SIF-2 mRNA の発現が増加すること、さらにこの増加は Mex3B のノックダウンにより緩和することが見出された。また、SIF-2 をノックダウンすると Ras 誘導型の senescence が抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、SIF-2 は Mex3B の下流に位置すること、ならびに senescence を誘導する機能を有する可能性が示された。

続いて、SIF-2 が SASP 様に機能するか否かの検討を試みた。まず、SIF-2 が細胞外に放出されることを確認するため、Ras の発現により senescence を誘導した IMR90 細胞の培養上清を回収し、質量分析に供した。その結果、細胞培養上清中に SIF-2 が存在すること、かつその存在量は senescence により増加することが示された。さらに、この培地中の SIF-2 存在量は、Mex3B のノックダウンにより減少することも明らかになった。続いて、IMR90 細胞を SIF-2 を強制発現させた HeLa 細胞と共培養したところ、IMR90 細胞の senescence が誘導されることが明らかとなった。さらに、IMR90 細胞にリコンビナント SIF-2 を添加すると senescence が誘導されることを見出した。これらの結果より、SIF-2 は SASP 様の機能を有すると考えられた。

次に、SIF-2 の 3'UTR 領域を用いた Luciferase assay を行い、Mex3B による SIF-2 の発現制御機構の検討を行った。その結果、Mex3B をノックダウンすると SIF-2 の発現が 3'UTR を介して抑制されることが明らかとなった。Mex3B をノックダウンすると SIF-2 の発現が mRNA レベルで抑制されることから、SIF-2 mRNA は Mex3B によって安定化される可能性があると考えられた。

以上の結果より、SASP 様に働く新規因子として SIF-2 を同定することに成功したと考えられる。現在、SIF-2 欠損マウスの解析を試みている。今後 SIF-2 の生体内における機能を解析することにより、細胞老化ならびに個体老化の分子機構解明の新たな進展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Funato Kosuke, Hayashi Tomoatsu, Echizen Kanae, Negishi Lumi, Shimizu Naomi, Koyama Nasu Ryo, Nasu Nishimura Yukiko, Morishita Yasuyuki, Tabar Viviane, Todo Tomoki, Ino Yasushi, Mukasa Akitake, Saito Nobuhito, Akiyama Tetsu	4. 巻 19
2. 論文標題 SIRT2 mediated inactivation of p73 is required for glioblastoma tumorigenicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e45587-e45587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201745587	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 Nakamura Tsutomu, Sakaue Fumika, Nasu-Nishimura Yukiko, Takeda Yasuko, Matsuura Ken, Akiyama	4. 巻 34
2. 論文標題 The Autism-Related Protein PX-RICS Mediates GABAergic Synaptic Plasticity in Hippocampal Neurons and Emotional Learning in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 189-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2018.07.011	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 Oda Takeaki, Yamazumi Yusuke, Hiroko Takatoshi, Kamiya Atsushi, Kiriya Saori, Suyama Saki, Shiozaki-Sato Yumi, Akiyama Tetsu	4. 巻 37
2. 論文標題 Mex-3B induces apoptosis by inhibiting miR-92a access to the Bim-3 UTR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5233-5247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0336-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morikawa Asuka, Hayashi Tomoatsu, Kobayashi Mana, Kato Yuki, Shirahige Katsuhiko, Itoh Takehiko, Urashima Mitsuyoshi, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 40
2. 論文標題 Somatic copy number alterations have prognostic impact in patients with ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 309-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3892/or.2018.6419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morikawa Asuka, Hayashi Tomoatsu, Shimizu Naomi, Kobayashi Mana, Taniue Kenzui, Takahashi Akiko, Tachibana Kota, Saito Misato, Kawabata Ayako, Iida Yasushi, Ueda Kazu, Saito Motoaki, Yanaihara Nozomu, Tanabe Hiroshi, Yamada Kyosuke, Takano Hirokuni, Nureki Osamu, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 9
2. 論文標題 PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 15266-15274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.18632/oncotarget.24555	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 Miyamoto Masaya, Hayashi Tomoatsu, Kawasaki Yoshihiro, Akiyama Tetsu	4. 巻 15
2. 論文標題 Sp5 negatively regulates the proliferation of HCT116 cells by upregulating the transcription of p27	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4005-4009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3892/ol.2018.7793	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 Oda Takeaki, Yamazumi Yusuke, Hiroko Takatoshi, Kamiya Atsushi, Kiriya Saori, Suyama Saki, Shiozaki-Sato Yumi, Akiyama Tetsu	4. 巻 37
2. 論文標題 Mex-3B induces apoptosis by inhibiting miR-92a access to the Bim-3 UTR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5233-5247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0336-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 4.Kawasaki Y, Miyamoto M, Oda T, Matsumura K, Negishi L, Nakato R, Suda S, Yokota N, Shirahige K, Akiyama T.	4. 巻 20
2. 論文標題 The novel lncRNA CALIC upregulates AXL to promote colon cancer metastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 e47052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201847052	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 3.Yamazumi Y, Sasaki O, Suyama-Fuchino S, Kohu K, Kamoshida Y, Harada H, Fujio K, Oda T, Akiyama T.	4. 巻 519
2. 論文標題 The RNA-binding protein Mex-3B plays critical roles in the development of steroid-resistant neutrophilic airway inflammation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2.Taniue K, Hayashi T, Kamoshida Y, Kurimoto A, Takeda Y, Negishi L, Iwasaki K, Kawamura Y, Goshima N, Akiyama T.	4. 巻 39
2. 論文標題 UHRF1-KAT7-mediated regulation of TUSC3 expression via histone methylation/acetylation is critical for the proliferation of colon cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1018-1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1032-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1.Shibata N, Ohoka N, Tsuji G, Demizu Y, Miyawaza K, Ui-Tei K, Akiyama T, Naito M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Deubiquitylase USP25 prevents degradation of BCR-ABL protein and ensures proliferation of Ph-positive leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1253-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋山 徹、林 寛敦、川崎 秀二、仲嶋 なつ、中戸 隆一郎
2. 発表標題 数理科学的手法を取り入れた1細胞RNA-seqデータの統合的解析への取り組み
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山 徹、林 寛敦
2. 発表標題 がん幹細胞を標的とした分子標的薬の開発
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム「新たなステージに入ったがん幹細胞研究」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋山 徹、林 寛敦
2. 発表標題 がん組織とがん幹細胞の分化モデルを用いた1細胞RNA-seq解析
3. 学会等名 新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティーの統合的解明と制御」 若手ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山 徹、林 寛敦
2. 発表標題 がん組織とがん幹細胞の分化モデルを用いた1細胞RNA-seq解析
3. 学会等名 新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティーの統合的解明と制御」 第一回公開シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山 徹、川崎 善博、宮本 昌弥、須田 咲希子
2. 発表標題 新規 lncRNA : CASCA はAXL の発現を誘導して大腸がん細胞の運動や薬剤耐性を促進する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 寛敦、秋山 徹
2. 発表標題 がん幹細胞を標的としたSIRT2阻害剤の開発
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 寛敦、秋山 徹
2. 発表標題 1細胞シーケンス解析による腫瘍内不均一性の理解に向けた取り組み
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 林 寛敦、秋山 徹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219
3. 書名 シングルセルゲノミクス	

1. 著者名 秋山 徹、河府和義	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 648
3. 書名 阻害剤・活性化剤ハンドブック	

〔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
研究分担者	山角 祐介  (Yamazumi Yusuke)  (40773768)	東京大学・定量生命科学研究所・特任助教    (12601)	
研究分担者	小田 健昭  (Oda Takeaki)  (00608523)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員    (12601)	削除：2018年6月22日