

令和元年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15599

研究課題名(和文)細胞老化における小胞体膜貫通型タンパク質OASISの役割

研究課題名(英文)The role of ER-resident transmembrane protein OASIS in cellular senescence

研究代表者

浅田 梨絵 (Asada, Rie)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：70751882

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)：本研究課題では、細胞老化における小胞体局在転写因子OASISの役割を明らかにすることを目的として研究を遂行した。マウス初代培養アストロサイトにDNA損傷を与えて解析した結果、DNA損傷シグナルの下流でOASISの発現が誘導され、活性化した。次に、OASIS欠損細胞にDNA損傷を与えると、野生型と比較して細胞周期の停止や細胞老化への移行が抑制された。また、細胞周期だけでなく細胞老化関連分泌形質に関わる一連の遺伝子群の増加が抑制されていた。以上より、OASISはDNA損傷依存的に発現・活性化が誘導され、細胞周期抑制因子やSASP関連遺伝子の転写を誘導し、細胞老化を促進する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化とは、DNA損傷などによってゲノム不安定性を持った細胞が増殖するのを防ぐための癌抑制機構である。本研究課題により、OASISが細胞老化を促進する役割がある事が明らかとなった。過去の解析から、複数種の癌細胞においてOASISの発現が低下していることが明らかとなっている。今後、細胞老化におけるOASISの機能をさらに詳細に解析するとともに、癌化との関連性を明らかにしていく事で、新たな視点からの癌治療法開発へと繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed a role of ER-resident transcription factor OASIS in cellular senescence. The expression and activation of OASIS are induced by DNA damage in murine primary astrocyte. Investigation of OASIS KO astrocyte revealed that cell cycle arrest and the transition to cellular senescence after DNA damage are repressed compared to WT. Additionally, the expression of a series of senescence-associated secretory phenotype (SASP) related genes is decreased in KO. Collectively, DNA damage induces OASIS expression and activation, and OASIS promotes cellular senescence through transcription of cell cycle and SASP related genes.

研究分野：生化学

キーワード：細胞老化 小胞体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が不可逆的に増殖を停止することを細胞老化という。これは、DNA 損傷などによってゲノム不安定性を持った細胞が増殖するのを防ぐための癌抑制機構である。細胞老化に至る分子メカニズムについては、核タンパク質による DNA 修復と細胞周期制御の観点からの研究が精力的に行われており、DNA 損傷時に発信される DNA 損傷応答 (DNA damage response; DDR) シグナルが持続的に発信され続けると細胞老化に至ることが明らかにされている。しかし近年の研究により、老化細胞は炎症性サイトカインや細胞外基質分解酵素の発現・分泌が亢進しており積極的に周辺環境に悪影響を及ぼしていることがわかってきた。この現象は Senescence-Associated Secretory Phenotype; SASP と定義され、加齢に伴う組織機能の低下や、アルツハイマー病をはじめとした加齢に伴って発症リスクが増加する加齢性疾患発症の一因となることが指摘されている。このように細胞老化は単に増殖を停止するだけでなく、老化細胞特異的な表現型を示す。

タンパク質分泌の中心的役割を担っているのが小胞体である。細胞内小器官の一つである小胞体は、タンパク質の折りたたみと修飾を行う場として機能している。また、小胞体局在分子を起点に発信されるシグナルが分泌機構関連因子の発現と深く関わっている。このような知見を踏まえると、細胞老化における細胞の性質変化と小胞体機能や小胞体から発信されるシグナルが関連する可能性が考えられる。しかしながら、小胞体の視点からの細胞老化研究は非常に少なく、細胞老化における小胞体の重要性についても不明であった。

小胞体ストレスセンサーの一つである OASIS は老化したアストロサイトに高発現する遺伝子としてクローニングされた。これまでの解析から、OASIS は小胞体ストレスなどの細胞内外からの刺激に反応して膜内切断を受け、切断された N 末端断片が核内へ移行して転写因子として働く事が明らかとなっている。しかし、細胞老化における OASIS の役割は未だ明らかになっていない事から、OASIS の解析を通して細胞老化における小胞体機能や小胞体から発信されるシグナルの役割を明らかにするという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題は細胞老化における OASIS の役割を明らかにすることを目的とする。具体的に、以下のサブテーマを設けた。

- (1) DNA 損傷による OASIS の発現・活性化誘導機構の解明
- (2) 細胞老化における OASIS の機能解析

3. 研究の方法

- ・中枢神経系アストロサイトの単離・培養

新生仔マウスの大脳を摘出し、PBS 中에서도膜を除去した。大脳組織をピペッティング操作によってホモジナイズした後、Papain および Dispase を含む消化酵素液を加え、37°C で 30 分間インキュベーションした。DMEM (10% FBS) を加えて中和した後、スピンドウンして集めた細胞を播種し、DMEM 中で増殖させた。

4. 研究成果

- (1) DNA 損傷による OASIS の発現・活性化誘導機構の解明

① OASIS は DNA 損傷依存的に転写誘導され活性化する

マウス初代培養アストロサイトに DNA 損傷誘発剤である 5-フルオロウラシル (5FU, 300mM) やドキシソルビシン (DOXO, 1ug/ml)、エトポシド (Etop, 100mM) 処理や X 線照射を行い、12 時間後に OASIS や小胞体ストレスマーカーである BiP の mRNA 量および XBP1 mRNA のスプライシングを RT-PCR、OASIS タンパク質の全長型および N 末端断片の量をウエスタンブロットにより解析した。薬剤処理および X 線照射のいずれの方法でも DNA 損傷を与えた場合でも小胞体ストレスマーカーが上昇していないにもかかわらず OASIS の mRNA 量およびタンパク質量が増加しており、また OASIS タンパク質は切断を受けて活性化していた。

② OASIS は ATM 経路下流で誘導される

DNA 損傷時の OASIS の誘導経路を明らかにするため、DDR シグナルに着目して解析した。DNA 損傷が発生するとキナーゼである ATM、ATR が活性化し、各下流分子 (CHK1, CHK2) のリン酸化を通して DDR シグナルが誘導され、最終的には細胞周期が停止する。アストロサイトに各種阻害剤 VE821 (ATR inhibitor) 1uM, KU55933 (ATM inhibitor) 10uM, CHIR124 (CHK1 inhibitor) 10pM, CHK2 inhibitor 20 pM を 1 時間処理した後に DOXO または Etop を各種阻害剤と同時に処理して 12

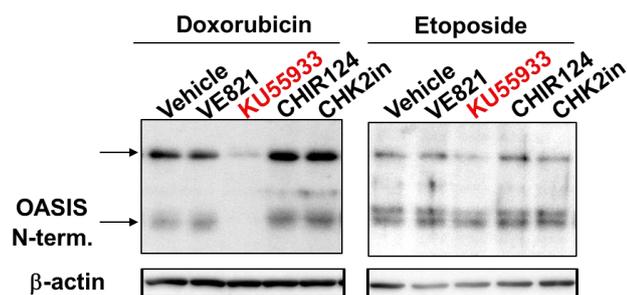


図 1. 各種阻害剤処理による OASIS タンパク質量の変化

時間後の OASIS mRNA 量およびタンパク質量を調べた。その結果、ATM 阻害剤である KU55933 を処理により OASIS の発現誘導・活性化がキャンセルされ、OASIS は ATM 経路下流で誘導されることが明らかとなった(図 1)。

③ OASIS は p53 を介さずに p21 を転写誘導する

これまでの研究から細胞周期抑制因子 p21 が OASIS の標的遺伝子の一つである事が報告されている (Denard B et al., Cell Host Microbe, 2011)。また、ATM 下流では細胞周期やアポトーシス関連遺伝子の転写において中心的な役割を担う転写因子 p53 のタンパク質が安定化・活性化する。そこで、DNA 損傷による OASIS の活性化と p53 の関係を調べた。(2) と同様に KU5593 および DOXO をアストロサイトに処理すると、本来 DNA 損傷によって増加する p21 タンパク質が未処理群と比較して減少した。次に OASIS KO マウスから単離したアストロサイトに DOXO を処理すると、WT では時間依存的に p21 のタンパク質量が増加するのに対し、KO では変化がなかった。興味深いことに、この時 p53 のタンパク質量は減少しておらず、OASIS による p21 の発現誘導は p53 とは独立していることが明らかとなった(図 2)。

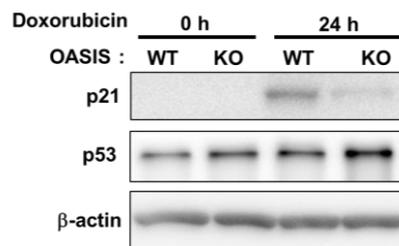


図 2. OASIS KO アストロサイトににおける p21 及び p53 のタンパク質量

(2) 細胞老化における OASIS の機能解析

① OASIS を欠損すると細胞老化が抑制される

OASIS に DNA 損傷によって OASIS の発現・活性化が誘導されることから、次に OASIS と細胞老化の関連性を調べた。アストロサイトに DOXO 処理後、BrdU 染色を行うと BrdU 陽性細胞が著しく減少する。これに対し、KO 細胞ではこのような現象が見られず DNA 損傷による細胞周期の停止が抑制されていた。また、細胞老化マーカーとして使用される細胞周期抑制因子 p16 の発現量が DOXO 処理後に増加するが、KO 細胞では発現増加が抑制されていた。次に、アストロサイトに DOXO を 1 時間処理した 3 日後に老化細胞を検出する SA-β-gal 染色を行った。WT では多くの細胞が陽性を示したのに対し、KO 細胞では陽性細胞がほとんど見られなかった(図 3)。以上より、OASIS を欠損すると DNA 損傷による細胞周期の停止及び、これに伴う細胞老化が抑制される事が明らかとなった。

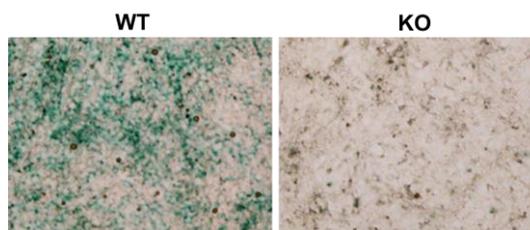


図 3. WT および OASIS KO アストロサイトににおける SA-β-gal 染色

② OASIS は SASP 関連遺伝子の転写誘導に重要である

細胞老化における OASIS の機能を明らかにするため、WT 及び OASIS KO アストロサイトに DOXO 処理した細胞から RNA を回収し、RNA-sequence を行った。その結果、WT 細胞で DOXO 処理により発現が増加かつ KO 細胞でその増加が軽減された遺伝子には細胞周期抑制因子、小胞体-ゴルジ体間輸送、SASP に関連する遺伝子が多く含まれていた。これらの結果から、OASIS は細胞増殖の抑制だけでなく SASP にも関わる事が示唆された。

Cell cycle arrest				SASP			
gene	WT 0 h	WT 12 h	KO 12 h	gene	WT 0 h	WT 12 h	KO 12 h
p21	1	1.6294	1.2905	IL5	1	3.6072	1
p16	1	1.3556	1.0115	IL1β	1	3.0831	0.4945
				IL13	1	2.6089	1
ER-Golgi transport				NT4	1	1.9793	1.2697
gene	WT 0 h	WT 12 h	KO 12 h	IL1α	1	1.8684	1.4452
Sec16b	1	1.2456	0.4876	ICAM1	1	1.8159	1.3804
Sec16a	1	1.1682	1.0313	MIP1β	1	1.7777	0.6957
Sec31a	1	1.1084	0.6985	MCP2	1	1.3978	0.3987
Sec23a	1	1.0542	0.8250	FGF6	1	1.3848	1
				TNFβ	1	1.3325	1.1161
				SCF	1	1.2813	0.9053
				IL16	1	1.2795	0.5778
				MCP3	1	1.1797	0.0633
				BMP4	1	1.0985	0.0699
				IL7	1	1.0520	0.5938

図 4. WT 細胞で DOXO 処理により発現が増加かつ KO 細胞でその増加が軽減された遺伝子

(3) 今後の展望

本研究課題により、OASIS が DNA 損傷依存的に発現・活性化が誘導され、細胞周期抑制因子や SASP 関連遺伝子の転写を誘導し、細胞老化を促進する事が明らかとなった。

過去の解析から、複数種の癌細胞において OASIS のプロモーター領域がメチル化を受けており、その発現が低下していることが明らかとなっている。今後、細胞老化における OASIS の機能をさらに詳細に解析するとともに、癌化との関連性を明らかにしていく事で、新たな視点からの癌治療法開発へと繋がる可能性が期待される。

<引用文献>

Denard B, Seemann J, Chen Q, Gay A, Huang H, Chen Y, Ye J.: The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells. Cell Host & Microbe, 2011, 10(1):65-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Maeoka Y, Wu Y, Okamoto T, Kanemoto S, Guo XP, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Masaki T, Imaizumi K, Kaneko M: NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells. *Journal of Biological Chemistry*. 4;294(1):101-115. 2019. 査読有, DOI: 10.1074/jbc.RA118.002896
2. Osaki Y, Saito A, Kanemoto S, Kaneko M, Matsuhisa K, Asada R, Masaki T, Orii K, Fukao T, Tomatsu S, Imaizumi K: Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II. *Cell Death & Disease*. 24;9(8):808. 2018 査読有, DOI: 10.1038/s41419-018-0871-8
3. Ohtake Y, Matsuhisa K, Kaneko M, Kanemoto S, Asada R, Imaizumi K, Saito A: Axonal Activation of the Unfolded Protein Response Promotes Axonal Regeneration Following Peripheral Nerve Injury. *Neuroscience*. 1;375:34-48. 2018 査読有, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.003
4. Wu Y, Guo XP, Kanemoto S, Maeoka Y, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y, Imaizumi K, Kaneko M. Sec16A, a key protein in COPII vesicle formation, regulates the stability and localization of the novel ubiquitin ligase RNF183. *PLoS One*. 4;13(1):e0190407. 2018. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0190407
5. Saito A, Cai L, Matsuhisa K, Ohtake Y, Kaneko M, Kanemoto S, Asada R, Imaizumi K. Neuronal activity-dependent local activation of dendritic unfolded protein response promotes expression of brain-derived neurotrophic factor in cell soma. *Journal of Neurochemistry*. 144(1):35-49. 2018. 査読有, DOI: 10.1111/jnc.14221
6. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y. ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 40(9):1337-1343. 2018. 査読有, DOI: 10.1248/bpb.b17-00342

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 松久幸司、金子雅幸、齋藤敦、浅田梨絵、今泉和則: アストロサイトの核膜ストレスを制御する小胞体膜タンパク質. 『広島神経医学研究会』第3回学生・若手研究者のポスター発表会. (2019)
2. 松久幸司、浅田梨絵、金子雅幸、今泉和則: 小胞体局在膜貫通型転写因子 OASIS の核ブレブ集積機構. 新学術領域「オルガネラ・ゾーン」第1回若手の会. (2019)
3. Matsuhisa K, Asada R, Kaneko M, Imaizumi K.: ER-resident transmembrane transcription factor OASIS accumulates in the nuclear bleb in response to the disruption of the nuclear lamina. ASCB | EMBO 2018 Meeting. (2018)
4. 松久幸司、浅田梨絵、金子雅幸、今泉和則: 小胞体ストレストランスデュサーOASIS の核膜 bleb における特徴的な局在と機能について. 第19回 ORIGIN 神経科学研究会 2018. (2018)
5. 今泉和則、松久幸司、浅田梨絵、金子雅幸: DNA 品質管理を担う核-小胞体連携ゾーンの解析. 第1回新学術領域「オルガネラ・ゾーン」全体班会議 (2018)
6. 浅田梨絵、金子雅幸、今泉和則: 小胞体膜タンパク質 OASIS の核膜への局所的集積とその生理的意義. 生命科学系学会合同年次大会. (2017)

※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、研究者個人に帰属されます。