

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15791

研究課題名（和文）老化細胞特異的に発現する膜タンパク質を標的とした老化細胞除去法の開発

研究課題名（英文）Senescent cell elimination by targeting senescence-specific membrane proteins

研究代表者

長野 太輝（Nagano, Taiki）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助手

研究者番号：00759988

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）：本研究では申請者が独自に同定したLY6Dによる老化細胞特異的な生存メカニズムを標的とした老化細胞除去法を開発することを目指し、正常細胞と老化細胞の共培養系において老化細胞選択的な細胞死誘導を検出するためのタイムラプス観察系を確立した。また、細胞外に存在するLY6Dが細胞内にシグナルを伝達する際に相互作用する膜貫通タンパク質としてIntegrin 1を同定し、Integrin 1阻害により老化細胞選択的な細胞死が誘導され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

本研究により老化細胞特異的に働く生存因子であるLY6DがIntegrin 1との相互作用を介して生存シグナルを細胞内に伝達することが明らかとなった。近年、生体内に蓄積した老化細胞を除去することにより個体の老化や老化関連疾患を緩和できることが示されてきているため、今後、LY6DやIntegrin 1の機能を阻害する低分子化合物や抗体を用いた老化関連疾患の治療法や予防法の開発が可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a novel approach to eliminate senescent cells by targeting proteins preferentially required for survival and maintenance of senescent cells. We developed a time-lapse imaging system to monitor senescent cell death in a co-culture of normal and senescent cells. Furthermore, we identified that Integrin 1 interacted with LY6D, and inhibition of Integrin 1 induced preferential senescent cell death.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 マクロピノサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴って体内に蓄積する老化細胞を除去することで、老化関連疾患の治療が可能であることを示す知見が集積されており、老化治療薬としてヒト体内から老化細胞を除去する薬剤の開発や臨床試験が盛んに行われている。しかしながら、現状では薬剤を老化細胞のみに作用させるための分子標的が発見されておらず、その結果生じる副作用が課題となっている。この問題の解決には老化細胞特異的な生存メカニズムを同定し、その阻害による老化細胞除去法の確立が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は老化細胞で特異的に機能している因子を標的とした細胞死誘導法を確立することである。既存の老化細胞除去薬が正常細胞に対しても作用して細胞死を誘導するという課題を解決するため、本研究では老化細胞特異的に発現するタンパク質を標的とした老化細胞除去法を開発を目的とした研究を行う。本研究では、従来から老化細胞除去薬の標的とされてきた Bcl-2 ファミリーではなく、申請者が独自に同定した老化細胞特異的な GPI アンカー型膜タンパク質である Lymphocyte Antigen 6 family member D (LY6D) を標的として老化細胞の除去を試みる。

3. 研究の方法

LY6D 阻害による老化細胞の除去を解析するため、正常細胞と老化細胞の混合培養系から老化細胞選択的な細胞死を検出する実験系を確立した。また、LY6D による老化細胞の生存維持にはエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスが関わることを既に明らかにしているため、細胞膜の外側に存在する LY6D が細胞内にマクロピノサイトーシスシグナルを伝達する際に働く膜貫通タンパク質の探索を行った。さらに、LY6D と同様に老化細胞で選択的な発現上昇を示すリポフラビントランスポーターである SLC52A1 が細胞老化に与える影響についても解析も行った。

4. 研究成果

研究方法に挙げた3点について下記の成果を得た。

(1) LY6D によるマクロピノサイトーシスシグナルを伝達する膜貫通タンパク質の同定

細胞膜の表面に局在する LY6D が細胞内にマクロピノサイトーシスシグナルを伝達する分子メカニズムを明らかにするために、LY6D と相互作用する膜貫通タンパク質を質量分析法により探索した結果、細胞間接着に関わる Integrin 1 が相互作用因子の候補として同定された。Integrin 1 の中和抗体及び siRNA により機能阻害を行った結果、LY6D によるマクロピノサイトーシスの誘導が阻害されたことから、Integrin 1 が LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導に必要な因子であることが明らかとなった。また、Integrin 1 の下流で働く Focal adhesion kinase (FAK) もマクロピノサイトーシスに必要なことを見出した。FAK は本研究で先に LY6D 誘導性のマクロピノサイトーシスに重要であることを見出した Src family kinase (SFK) (*J Biol Chem.* 2021; 296: 100049. doi: 10.1074/jbc.RA120.013500.) の活性化に関わることから、LY6D-Integrin 1-FAK-SFK 経路によりマクロピノサイトーシスが誘導されることが明らかとなった(図1)。

(2) LY6D による生存経路阻害による細胞死誘導

LY6D によるマクロピノサイトーシス経路の阻害による細胞死誘導法の確立を目指した。老化細胞と正常細胞を蛍光色素によって区別した状態で共培養し、マクロピノサイトーシス阻害による生存率の変化をタイムラプス観察によりモニターする実験系を確立した。また、(1)でマクロピノサイトーシス誘導に必要なことが明らかとなった Integrin 1 の阻害により老化細胞選択的に細胞死が誘導されることも見出したため、Integrin 1 阻害による老化細胞の選択的除去法についても開発を進める(図2)。

(3) リポフラビントランスポーター SLC52A1 による細胞老化抑制メカニズムの解析

LY6D と同様に、老化細胞で選択的な発現上昇が見られるリポフラビントランスポーターである SLC52A1 に関する解析を行い、SLC52A1 がリポフラビンの取り込みによりミトコンドリア呼吸

鎖複合体 II を活性化させることで細胞老化を抑制することを明らかにした。またリボフラビンによる細胞老化の抑制には AMPK-p53 経路の活性抑制が必要であることも見出した (図 3) (*Mol Biol Cell*. 2021; 32: br10. doi: 10.1091/mbc.E21-05-0262.)。細胞老化時の LY6D 発現誘導は p53 に依存して起こるため、今後、SLC52A1 と LY6D との関連も解析を進めていく。

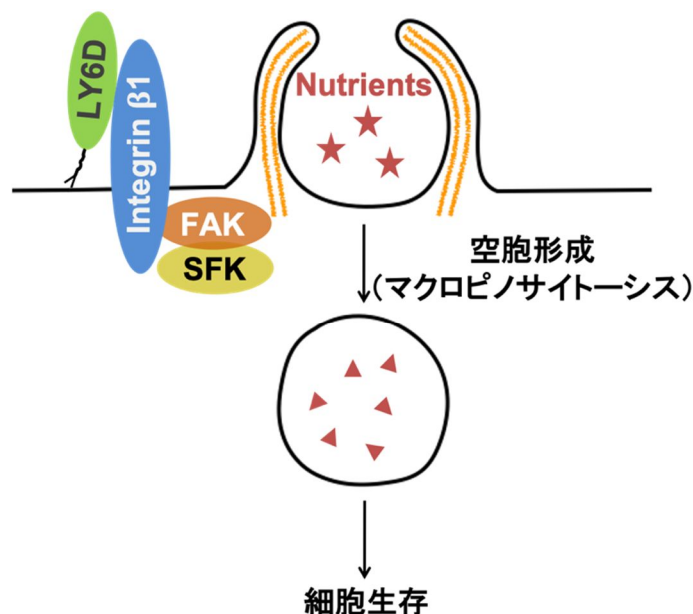


図 1. LY6D-Integrin β 1-FAK-SFK 経路による老化細胞の生存促進

細胞老化ストレスにより発現上昇した LY6D は膜貫通タンパク質である Integrin β 1 と相互作用することにより細胞内にマクロピノサイトーシスシグナルを伝達する。Integrin β 1 は FAK を介してマクロピノサイトーシス誘導に重要な SFK を活性化する。マクロピノサイトーシスは細胞外液を非特異的に細胞内に取り込むプロセスであり、細胞外の栄養物質を取り込むことで老化細胞の生存維持に寄与する。

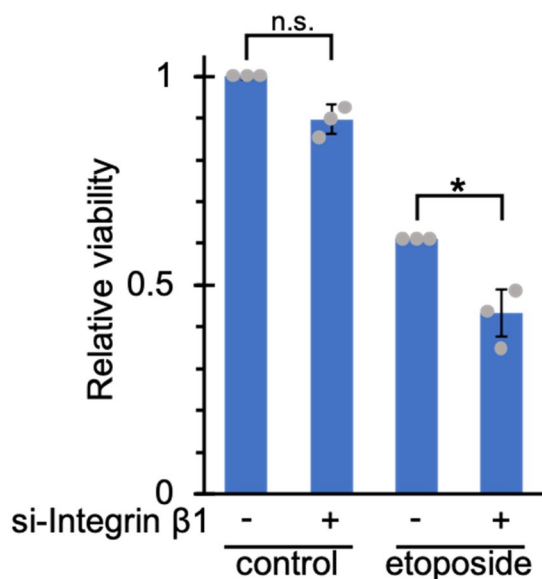


図 2. Integrin β 1 ノックダウンによる老化細胞選択的な生存阻害

U2OS 細胞に DNA 損傷を誘導する抗がん剤である etoposide で細胞老化を誘導後、Integrin β 1 ノックダウンによる生存の変化を解析した。老化細胞において Integrin β 1 ノックダウンによる生存率の有意な低下が観察された (*: $p < 0.05$)。

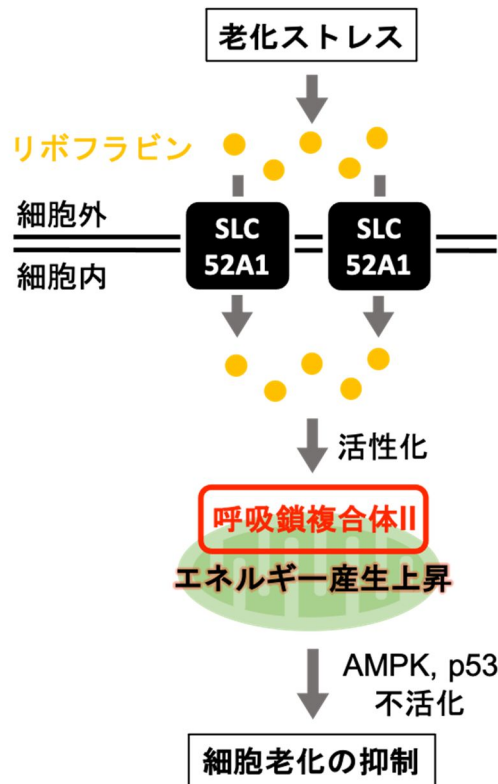


図3. リボフラビントランスポーター-SLC52A1による細胞老化抑制メカニズム

SLC52A1はLY6Dと同様、細胞老化ストレス下でp53によって発現誘導されることが申請者らによって既に見出されている。SLC52A1発現上昇によって細胞内へのリボフラビンの取込みが増加することでミトコンドリアが活性化され、老化誘導に働くAMPK-p53経路が不活性化されることで細胞老化が抑制される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagano Taiki, Iwasaki Tetsushi, Onishi Kengo, Awai Yuto, Terachi Anju, Kuwaba Shione, Asano Shota, Katasho Ryoko, Nagai Kiyoko, Nakashima Akio, Kikkawa Ushio, Kamada Shinji	4. 巻 296
2. 論文標題 LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100049 ~ 100049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013500	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 Nagano Taiki, Awai Yuto, Kuwaba Shione, Osumi Taiichi, Mio Kentaro, Iwasaki Tetsushi, Kamada Shinji	4. 巻 32
2. 論文標題 Riboflavin transporter SLC52A1, a target of p53, suppresses cellular senescence by activating mitochondrial complex II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 br10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-05-0262	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 長野太輝	4. 巻 35
2. 論文標題 老化細胞の生存機構阻害による老化細胞除去法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 上原記念生命科学財団研究報告集	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 長野 太輝、鎌田 真司	4. 巻 46
2. 論文標題 老化細胞の空胞形成を司る分子メカニズムと生理的意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Gerontology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 長野 太輝、中川 桂太郎、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片所 諒子、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 Nectin-4 is responsible for cellular senescence-associated enlargement of cell size
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 泰一、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 リポフラビントランスポーターSLC52A1による細胞老化抑制機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野 太輝、中川 桂太郎、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6DはIntegrin 1-FAK経路を介してマクロピノサイトーシスを誘導することで老化細胞の生存を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池垣幸宏、長野太輝、寺地杏樹、岩崎哲史、宮戸健二、鎌田真司
2. 発表標題 老化細胞が分泌するエクソソームを介したDNA損傷誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片所 諒子、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 Nectin-4は老化細胞の巨大化に関与し、細胞生存を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiki Nagano、Keitaro Nakagawa、Tetsushi Iwasaki、Shinji Kamada
2. 発表標題 Molecular mechanism and function of senescence-associated vacuole formation
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoko Katasho、Taiki Nagano、Tetsushi Iwasaki、Shinji Kamada
2. 発表標題 Nectin-4-induced cell size enlargement enhance senescent cell survival
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井 梨那、板井 彩乃、赤松 優希、市原 祐希、長野 太輝、吉原 静恵、徳本 勇人、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 自発老化メラノーマ細胞の形成機構と関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤松 優希、大西 真実、村井 梨那、市原 祐希、長野 太輝、岡 昌宏、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 TPAによる転移性メラノーマ増殖抑制におけるTC-PTP/PTPN2およびSH-PTP2/PTPN11の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 泰一、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 リボフラビントランスポーターSLC52A1による細胞老化抑制機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川 桂太郎、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 老化細胞の生存を維持するシグナル伝達経路の探索
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 泰一、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 ビタミンB2による細胞老化抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井 梨那、板井 彩乃、赤松 優希、市原 祐希、長野 太輝、吉原 静恵、徳本 勇人、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 自発老化メラノーマ細胞の形成機構と関連遺伝子の解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池垣 幸宏、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 老化細胞由来小胞によるDNA損傷誘導機構の解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森澤 研允、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 老化関連遺伝子LY6Dによる空胞形成機構の解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤松 優希、大西 真実、村井 梨那、市原 祐希、長野 太輝、岡 昌宏、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 転移性メラノーマ特異的な増殖抑制機構の解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市原 祐希、村井 梨那、赤松 優希、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 メラノーマ細胞における亜鉛イオンの機能解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 麻野 翔太、岩崎 哲史、井口 将、李 智博、古野 伸明、Tokmakov Alexander、佐藤 賢一、長野 太輝、鎌田 真司
2. 発表標題 STAT3はアフリカツメガエル卵母細胞を安定化させる
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ビタミンB2の新たな機能 老化の原因となるミトコンドリア機能低下を改善するメカニズム解明 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2021_11_02_01.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------