

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390504

研究課題名（和文）紫外線照射後の発癌機序における FEN1 の役割について

研究課題名（英文） FEN1-related senescence

研究代表者

中村 卓（NAKAMURA TAKASHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30172406

研究成果の概要（和文）：

FEN1 蛋白の発現を siRNA を使って細胞内で枯渇させることで細胞の成長にどのような影響があるかを検証した。その結果、正常な p53 を欠損した T24 細胞では、FEN1 欠乏によって老化が著明に促進された。しかしながら、この細胞に正常な p53 をトランスフェクションしてやると FEN1 欠乏による老化が抑制された。一方、正常の p53 遺伝子をもつ HT116 細胞をつかって同じように FEN1 を欠乏させると老化促進は認められず、細胞はアポトーシスをおこした。しかしながら、p53 を欠損した HT116 細胞では FEN1 を細胞から枯渇させても老化もアポトーシスも起こさなかったが、電離放射線により DNA 障害を誘導すると、老化が著明に促進された。これらの結果は、FEN1 欠損による老化の促進は p53 依存性に生じていることが示唆された。したがって、今回の研究によって示された事実が紫外線照射による腫瘍発生に大きく関与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Here we investigated the effects of FEN1 ablation on growth of different cell types with or without intact p53 by using RNA interference. We found that the FEN1 ablation triggers senescence in p53-mutated T24 cells. However, transfection of the wild-type p53 into these T24 cells inhibited the senescence. On the other hand, HT116 cells with the wild-type p53 were not introduced to senescence by interfering FEN1 expression; instead, the cells underwent apoptosis. Contrary in HT116 cells defective of p53 did not exhibit senescence or apoptosis after FEN1 siRNA treatment. Interestingly, ionizing irradiation (5Gy) caused senescence in p53-defective HT116 cells that were treated with FEN1 siRNA. These results suggest that FEN1-induced senescence is p53-dependent and imply that this mechanism may be involved in UV-induced tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
平成 22 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
平成 23 年度	3,600,000	1,800,000	5,400,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,920,000	18,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：FEN1 マウスモデル 紫外線 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは、皮膚の老化に DNA 修復因子の一つである Flap endo/exonuclease 1 (FEN-1) が関与しているのではないかという仮説を実証するために、FEN-1 変異マウスに紫外線を照射したあとの修復過程を長期に観察した。

(2) その結果紫外線を照射した部位に変異マウスの 3 匹中 2 匹に腫瘍の活性が認められたが野生型 FEN-1 を発現しているマウスには認められなかった。

(3) この結果は FEN-1 が紫外線による発癌に対し、照射による障害からの修復過程において抑制的に働いているという可能性を示唆している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、FEN-1 nuclease 活性を失った場合に紫外線や電離放射線によって発症する癌化の生化学的ならびに分子生物学的メカニズムを個体および細胞レベルにおいて解明することを当初の目的とした。

(2) 実際の研究では老化と発癌の関係を解明する目的で FEN1 の欠損によって引き起こされる老化の分子生物学的メカニズムを主として培養細胞を用いて研究をすることとした。

3. 研究の方法

(1) FEN 欠損 T24 細胞の作成

ヒト FEN1 siRNA を 2 種類作成し、これを培養中の T24 細胞にトランスフェクションすることで、FEN1 の発現を抑制した。抑制効果はトランスフェクション後 24 時間から明瞭となり、トランスフェクション後 48 時間で FEN1 蛋白の発現はほとんど検出できなくなった。

(2) 細胞老化の確認

細胞老化の確認には以下の項目を検討した。

① SA-β-galactosidase 発現解析

Senescence β-galactosidase Staining Kit (Cell Signaling) を用いた。

β-galactosidase の pH6 での酵素活性は老化した細胞のみで認められる。この性質を利用して、細胞の老化を検出することができる。この実験では、約 1000 個のさいぼうを観察し、β-galactosidase 陽性細胞をカウントし、パーセンテージで表した。

② 細胞周期関連蛋白の検出

老化にともなって起こる細胞周期の抑制と細胞分裂の抑制を観察した。老化の場合の細胞周期抑制には p21 および p16 の活性化が緊密に関係していると言われている。この 2 つの蛋白の発現を Western blotting にて解析した。また、p38 蛋白はリン酸化されることで活性化されると考えられている。p38 蛋白のリン酸化の抑制はすなわち細胞周期の抑制に関与していると考えられる。これは、リン酸化 p38 に対する抗体を用いて解析した。

(3) テロメアの長さの解析

Telo TAGGG Telomere Length Assay Kit (Roche) を用いた。細胞から genomic DNA を精製し、制限酵素 (HinI および RsaI) にて処理した後、1%アガロースゲル上にて展開し、ナイロンメンブレンに転写した。Southern blotting はテロメア特異プローブをつかってテロメアの短縮があるか否かを解析した。短縮していれば、テロメアを示す信号が全体として泳動上早く進むので検出できる。

(4) テロメア DNA と FEN1 蛋白の共存・結合について

① FEN1 がテロメア DNA 上で働いているかどうかについてはまだ結論が出ていない。本研究では、この点についても検討を加える。この目的のために、Telomeric chromatin immunoprecipitation assay を利用した。この方法は、Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay) と Dot-blot assay とを合わせたものである。ChIP assay では Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling) を用いた。この assay では、テロメア DNA に結合している蛋白質とテロメア DNA を 37% formaldehyde を使ってクロスリンクさせた後、micrococcal nuclease で処理し 100 bp 程度の大きさのクロマチン断片にする。DNA にクロスリンクしているタンパク質（この場合は FEN1）に対する抗体を用いて、免疫沈降をおこなって (ChIP)、目的とする蛋白質が結合した DNA を回収する。回収し、精製した DNA をナイロンメンブレン上に Dot-Blot し、テロメア特異配列に対するプローブ（この場合 TRF1 に対するプローブ）を使って、Southern blotting をおこなった。

②テロメア DNA に FEN1 が結合して働いているかどうかについてはさらに共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。使用した抗体は、FEN1、TRF1、および γ H2AX である。TRF1 はテロメアに特異的に結合し、テロメア断片を DNA 修復機構への暴露から防ぐ際に働いていると考えられている機構 (shelterin) 関連蛋白の一つである。また、 γ H2AX は DNA 2 重鎖断裂の存在を示す指標となるクロマチンタンパク質である。FEN1 が欠損したことによるテロメア構造の変化を捉える指標として用いた。

(5) p53 タンパク質の関与について p53 は発がん制御のみならず、老化にも深く関わっていると考えられている。本研究では、FEN1 発現抑制により誘導される老化における p53 の役割についてもその手がかりを求めた。このために本研究では、p53 の働きを保っている細胞株 (BJ 細胞) と DNA 配列に変異が入ったことにより p53 タンパク質が作られなくなった細胞株 (T24 細胞) を用いた。さらに、BJ 細胞株において、p53 を siRNA を使って発現抑制をするか、あるいは T24 細胞株に野生型もしくは変異型 p53 をトランスフェクションすることで FEN1 欠損により誘導された老化の p53 依存度を解析した。

4. 研究成果

(1) 研究成果は、in vitro の実験にその大部分を割いたものとなった。したがって、マウス個体レベルでの評価は実施出来なかつ

た。これは、使用した FEN1 欠損マウスでは、FEN1 の抑制が不十分であったことが研究の経過中に明らかになったためである。しかしながら、in vitro 実験を充実させることで、データの獲得には予想していたほどの支障は生じなかった。該当年度にて、得られた結果は以下のとおりである。

(2) FEN1 siRNA により 48 時間以内に T24 細胞の FEN1 を枯渇させることができた。この FEN1 欠損細胞は 48 時間後には老化が起こっていることを示唆する形態を呈していた。これを確かめるため、SA- β -galactosidase の発現レベルを解析したところ、FEN1 が枯渇して 72 時間後までにはほぼ 100% の細胞で SA- β -galactosidase が発現していた。更に細胞周期を調べると、FEN1 を欠損させた T24 細胞では、p21 の発現が増加し、p38 のリン酸化が抑制されていた。一方、p16 の発現レベルには影響は認められなかった。さらに、老化促進の際、テロメアの長さに変化は起こっていないことを確認した。したがって、これらの結果は、FEN1 を knockdown させると、T24 細胞では老化が促進されることが確かめられた。

つぎに、FEN1 がテロメアにおいてどのような働きをしているかを確かめた。テロメアに特有のタンパク質である TRF1 に対する抗体をつかってテロメア DNA を分離した後、FEN1 抗体を用いて Dot Blot 解析を行い、テロメア構造に FEN1 が含まれていること、さらには共焦点顕微鏡をつかって、FEN1 蛋白が TRF1 と存在していることを確認した。さらに、FEN1 を枯渇させた際にテロメア DNA では H2AX のリン酸化が起こっていることがわかった。これらの結果、テロメアから FEN1 が働かなくなることで、テロメアでは DNA 二重鎖の切断が起こっていることが示唆された。

(3) FEN1 欠損により誘導される老化促進現象が p53 に依存しているかどうかの検討を行った。この目的でわれわれは p53 機能が失われていない BJ 細胞をつかって、T24 細胞の場合と同様の解析を行った。その結果、p53 の機能が保たれている環境においても、FEN1 を欠損させることで老化を誘導することが可能であることがわかった。siRNA を使って FEN1 を枯渇させると、p53 の発現レベルが増加した。P53 機能をもともと欠損している T24 における場合と同様に、BJ 細胞においても、FEN1 はテロメア DNA 上にも局在していた。FEN1 を欠損させた BJ 細胞においても β -galactosidase の発現が時間の経過と共に増加し、老化が促進されていることが確認できた。この細胞の場合もテロメアの長さの短縮は認められなかった。更に重要なことは、FEN1 の発現を枯渇させることで BJ 細胞にお

いて誘導された老化は、p53 依存性であることがわかった点である。これは、FEN1 の発現を抑制した BJ 細胞の p53 蛋白発現を p53 siRNA を使って同時に抑えてやると、FEN1 siRNA により誘導された老化促進をほとんどベースラインレベルにまで抑制できたことにより示唆された。しかしながら、BJ 細胞での老化促進はテロメア DNA の 2 重差切断を伴っていないなど、p53 依存性で起こる FEN1 欠損による老化促進と p53 非依存性で起こるそれとの間には機構上明らかな違いがあると考えられた。

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)

①佐々木美穂、角 美佐、榮田 智、市川 陽子、角 忠輝、山田敏朗、中村 卓
Multiparametric MR imaging of sinonasal diseases: time-signal intensity curve- and apparent diffusion coefficient-based differentiation between benign and malignant lesions.
AJNR Am J Neuroradiol
32(11),2154-2159,2011 査読有り

②榮田 智、角 美佐、中村 卓
Multiparametric MR imaging for the differentiation between benign And malignant salivary gland tumors.
J Magn Reson Imaging 31(3),673-679,2010
査読有り

③佛坂由可、van leyen K、Lo EH、Beatrix B、片山郁夫、Jin G、中村 卓
αNAC depletion as an initiation of ER stress-induced apoptosis in Hypoxia.
Cell Death Differ 16 (11) ,1505-1514,2009
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

①榮田 智、佛坂由可、片山郁夫、山田敏朗、中村 卓 : In vitro measurement of diffusion coefficient
第 52 回日本歯科放射線学会総会・学術大会
第 18 回 国際歯顎顔面放射線学会併催(広島)
2011 年 5 月 25 日

②佛坂由可、片山郁夫、中村 卓 : 細胞ストレス応答における g-taxilin の関与
日本歯科放射線学会 第 31 回関西・九州合同地方会 (名古屋) 2011 年 12 月 10 日

③片山 郁夫、佛坂 由可、中村 卓 : FEN1

活性抑制による細胞老化について。

第 51 回日本歯科放射線学会総会・学術大会
(横浜) 2010 年 4 月 24 日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 30172406

(2) 研究分担者

角 美佐 (SUMI MISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 90284702

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号 : 10244089

木村 泰男 (KIMURA YASUO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 30253686

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 20300882

角 忠輝(SUMI TADATERU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80284701

高木 幸則(TAKAGI YUKINORI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30295084

榮田 智(EIDA SATO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80325662

片山 郁夫(KATAYAMA IKUO)
長崎大学・大学病院・助教
研究者番号：80295089

佐々木 美穂(SASAKI MIHO)
長崎大学・大学病院・助教
研究者番号：1043874

市川 陽子(ICHIKAWA YOUKO)
長崎大学・大学病院・助教
研究者番号：90380857

(3)連携研究者
()

研究者番号：