

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25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592089

研究課題名（和文） FEN1 抑制による老化促進機序の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the aging promotion mechanism by FEN1 control

研究代表者

片山 郁夫（KATAYAMA IKUO）

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：80295089

研究成果の概要（和文）：ヒト腎がん細胞株 T24 およびヒト線維芽細胞株 BJ において、FEN1 遺伝子を抑制すると、細胞老化が起こることを確認した。この際、細胞の核内では細胞周期停止関連の遺伝子の発現および DNA 損傷応答が起こり、DNA が不安定となることがわかった。また、FEN1 遺伝子は、これまで細胞老化の中心的役割を果たすことが知られていたテロメアと結合し、テロメアの不安定化に関与していることが示唆された。さらに FEN1 遺伝子抑制による細胞老化の際、T24 でみられる p53 非依存的な経路と BJ でみられる p53 依存的な経路があるのではないかと示唆された。

研究成果の概要（英文）：We identified that FEN1 inhibition lead to senescence in human bladder cancer cell line T24 and human fibroblast cell line BJ. On this occasion, expression of cell cycle related genes, DNA damage response, and unstable condition of DNA was caused. On the other hand, we recognized that FEN1 is binding to telomere involved in senescence, and related to telomere damage response. Furthermore, it was suggested that on senescence by FEN1 inhibition, there are p53-dependent and p53-independent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：細胞老化

1. 研究開始当初の背景

（1）FEN1 は DNA の複製や修復に関与する重要な酵素の1つであるが、この酵素は DNA 配列ではなく特定の DNA 高次構造（single flap 構造や double flap 構造）を特異的に認識し flap 鎖を切断する機能を有するエンド/エク

ソヌクレアーゼである。我々の研究室においても、FEN1 は紫外線による DNA 損傷の際の塩基除去修復に必須であることを示した（J Biol Chem 277:746-754;2002）。また、FEN1 はヒト早期老化の遺伝病ウエルナー症候群の原因遺伝子 WRN と結合していることが報告されており（EMBO J 20:5791-5801;2001）、

FEN1 が単なる DNA 修復酵素として働くだけでなく老化へ何らかの関与をしていることが示唆される。

(2) 平成 18-20 年度文部科学研究費補助金基盤研究 (B) 「FEN1 はアンチエイジングに関与しているのか？」(課題番号 18390500) において、我々は FEN1tg マウスを作製し解析した結果 FEN1 の変異遺伝子を選択的に発現させた部位 (皮膚、脾臓、肝臓、腎臓) において、老化の phenotype が正常マウスと比べて明らかに強く出現していることを確認した。しかしながら FEN1 がどのようにして老化を抑制しているのかについては結論に達しないままであった。そこでわれわれは、培養細胞において FEN1 の発現を siRNA で抑制する実験を行った。するとこの培養細胞は形態的に細胞老化を呈し、さらに老化した細胞に特徴的な β -ガラクトシダーゼの活性化がみられた。この結果は FEN1 活性と老化が密接に結びついている可能性を示唆している。

(3) 一本の染色体は二重鎖 DNA がヒストンコアにらせん状に巻き付きこれが複雑に折りたたまれた構造をしている。この染色体に安定性を与えている最も重要なものの 1 つにテロメアがある。テロメアはテロメア DNA とテロメア結合タンパク質の複合体で構成されており染色体の末端を覆い保護している。ヒトのテロメア DNA は細胞分裂のたびに約 100 塩基対が失われ、正常な体細胞では約 50 回細胞分裂しテロメアが短縮すると不可逆的に増殖を止め細胞老化の状態になる。ところが一方、テロメアは短縮しなくてもテロメアの機能障害は結果として DNA を不安定にし、細胞のガン化やその進行を促進し (Int J Biochem Cell Biol 37:977-990;2005)、また細胞老化やアポトーシスを誘導すること (Cell 92:401-413;1998, Science 295:2446-2449;2002) が報告されている。このテロメアを正常に機能させるために重要な働きをしているのが様々なテロメア結合タンパク質であるが、最近このテロメア結合タンパク質の中の 1 つと FEN1 が結合していることが報告された (Cancer Res 66:113-124;2006)

2. 研究の目的

われわれは、FEN1 がテロメア結合タンパク質とともにテロメアの機能制御を行っている可能性、すなわちテロメアを正常に機能させることを介してテロメアを安定化し細胞老化を抑制しているのではないかと推測した。よって本研究では FEN1 の老化における直接的な関与を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎がん細胞株 T24 を用い、siRNA によって FEN1 遺伝子の抑制を行い、以下の項目について検討を行った。

- ① 細胞の形態的变化、および細胞老化の指標となる SA- β -galactosidase の活性。
- ② 細胞老化関連の遺伝子として、p21 およびリン酸化型 p38 の発現。
- ③ DNA 損傷応答についての遺伝子として、Chk2 のリン酸化。
- ④ クロマチンの変化についての遺伝子として、ヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2AX の発現)。
- ⑤ FEN1 抗体・テロメア DNA のプローブを用いた Chip Assay、FEN1 抗体・TRF1 抗体による蛍光免疫染色法を用いた FEN1 タンパク質のテロメアへの結合。
- ⑥ γ H2AX 抗体・テロメア DNA のプローブを用いた Chip Assay、 γ H2AX 抗体・TRF1 抗体による蛍光免疫染色法を用いた、テロメア DNA での H2AX のリン酸化。

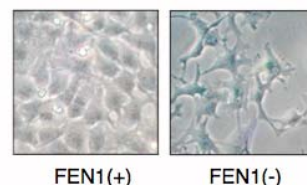
(2) ヒト線維芽細胞株 BJ を用い、(1) と同様に siRNA による FEN1 遺伝子の抑制の実験を行い以下の項目について検討を行った。T24 は p53 遺伝子に変異しており、その機能を喪失しているが、BJ は p53 遺伝子が正常に機能している細胞である。

- ① 細胞の形態的变化、SA- β -galactosidase の活性。
- ② p53 の発現。
- ③ p53 を抑制した際の細胞形態の変化・SA- β -galactosidase の活性。

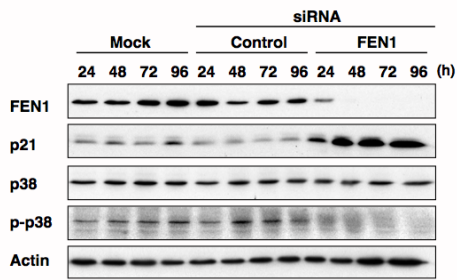
4. 研究成果

(1) ヒト腎がん細胞株 T24 を用い、siRNA による FEN1 遺伝子の抑制の実験から以下のような結果を得た。

- ① 細胞が突起を伸ばした老化様の形態を示した。このとき、SA- β -galactosidase の活性が上昇していた。

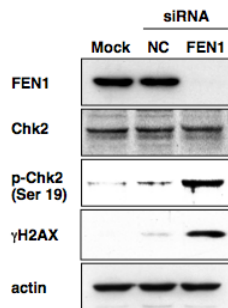


- ② 細胞老化関連の遺伝子としては、p21 の上昇、リン酸化型 p38 の減少が認められた。

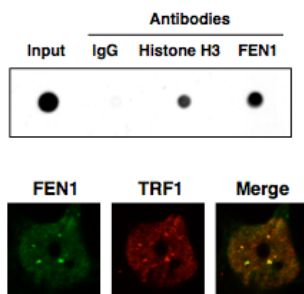


③ Chk2 のリン酸化が認められ、DNA 損傷応答が示唆された。

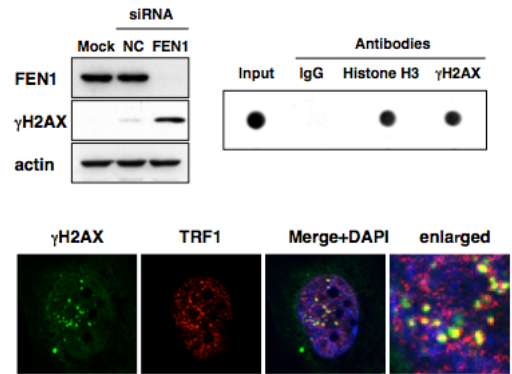
④ さらにはヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2AX の発現) が認められ、クロマチンの変化が示唆された。



⑤ FEN1 抗体・テロメア DNA のプローブを用いた Chip Assay、FEN1 抗体・TRF1 抗体による蛍光免疫染色により、FEN1 タンパク質がテロメアに結合していることが確認され、FEN1 はテロメア近傍でも機能していることが推測された。

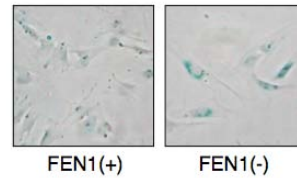


⑥ γ H2AX 抗体・テロメア DNA のプローブを用いた Chip Assay、 γ H2AX 抗体・TRF1 抗体による蛍光免疫染色により、H2AX のリン酸化がテロメアでも起こっていることを確認した。



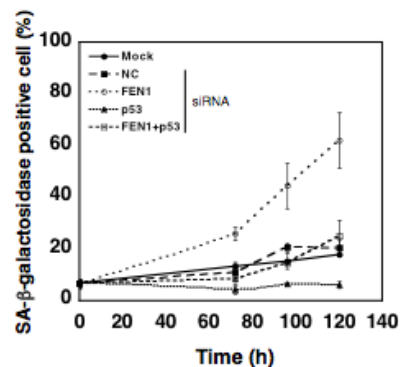
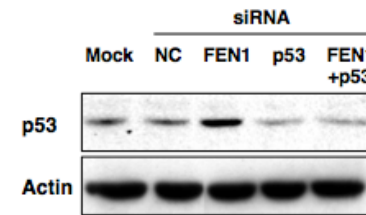
(2) ヒト線維芽細胞株 BJ を使い、(1) と同様に siRNA による FEN1 遺伝子の抑制の実験を行い以下のような結果を得た。

① 細胞が突起を伸ばした老化様の形態を示し、さらに SA- β -galactosidase の活性が上昇した。



② p53 の発現が上昇した。

③ この p53 の発現を抑制することで、細胞形態の変化・SA- β -galactosidase の活性の上昇を抑制した。



以上のことから、BJにおいても T24 と同様に FEN1 遺伝子を抑制した際に細胞老化が起こったが、BJ 細胞の場合は p53 遺伝子の関与が示唆された。

(1) (2) の結果より、FEN1 遺伝子抑制による細胞老化の促進機序には、T24 でみられる p53 非依存的な経路と BJ でみられる p53 依存的な経路があるのではないかということが示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①片山郁夫、FEN1 活性抑制による細胞老化について、日本歯科放射線学会第 51 回学術大会、2010 年 4 月 25 日、鶴見大学記念館 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・大学病院・講師
研究者番号：10244089

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

(3) 連携研究者

該当なし