

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22700691

研究課題名（和文）

老化と栄養制御、創傷治癒におけるGADD34の遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

研究課題名（英文）

Analysis of GADD34 function in aging, nutrient control and wound healing

研究代表者

伊藤 佐知子 (SACHIKO ITO)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70447845

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞老化、絶食などの栄養欠乏ストレス、また、創傷治癒における GADD34 の関与を明らかにする為に、GADD34 ノックアウト(KO)マウスを用いて解析を行った。その結果、絶食ストレスにより GADD34 は TSC2 の脱リン酸化を促進することにより、mTOR 活性を抑制し、細胞防御に関与するオートファジーを促進することが明らかとなった。また、創傷治癒において、GADD34KO マウスでは、細胞移動を制御する MyosinIIA の発現が抑制されることにより、細胞移動が促進され、創傷治癒が早まることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the function of Growth arrest and DNA damage protein 34 (GADD34) in aging, nutrient deficient-stress and wound healing by using GADD34 Knock out(KO)mice. Starvation induced the expression of GADD34 in the liver. GADD34 bound to and dephosphorylated pTSC2. The dephosphorylation of pTSC2 leads to the suppression of mTOR, which is a potent inhibitor of autophagy. The starvation-induced GADD34 suppressed mTOR and induced autophagy.

In wound healing, the rate of wound closure was faster in GADD34 KO MEFs (mouse embryonic fibroblasts) than in wild type (WT) MEFs. WT mice expressed higher amounts of myosin IIA in migrating macrophages and myofibroblasts than in GADD34 KO mice. These results indicate that GADD34 negatively regulates cell migration in wound healing via expression of Myosin IIA.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：応用健康科学 加齢・老化

キーワード：GADD34、mTOR シグナル、絶食ストレス、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

細胞のストレス応答や細胞の増殖、移動は医学生物学分野で最も重要な現象の一つである。これまでに、代表者の所属する研究室では、ストレス応答遺伝子の一つである

GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) が、紫外線照射による DNA 傷害性ストレスにより発現が増加し、p53 のリン酸化を促進して細胞増殖を抑制することを明らかにした。また、ER ストレスに

より eIF2 α がリン酸化され一時的な蛋白質の合成停止がおきるが、この時、GADD34 は protein phosphatase 1 (PP1) と複合体を形成して、eIF2 α を脱リン酸化し、蛋白質合成の停止から回復させる機能をもつことを報告してきた。さらに、GADD34 の発現がウイルス感染により誘導され、細胞の増殖に関する mTOR (mammalian Target of Rapamycin) のシグナルを抑制し、一時的に感染細胞の増殖を止めることを共同研究により明らかにした。

一方、近年、老化の研究において、TOR は発芽酵母の老化を促進する最も重要な蛋白質の 1 つで、TOR の変異株が長寿になることが示されている。また、最近、酵母のみならず、マウスにおいて TOR を抑制するラパマイシン投与により寿命が延長することが明らかとなった。さらに、老化と栄養摂取において、マウスやヒトにおいてはカロリー制限が寿命を延長すること、また、線虫で絶食を繰り返すと長寿になり、そのシグナルに TOR が関与することが報告され、TOR の重要性が注目されている。

これまでの研究から、GADD34 が TOR シグナル伝達経路に関与していることが示唆されたこと、また GADD34 の発現が栄養制御にも関与していることが示されていることから、GADD34 は個体、細胞の老化、栄養制御、細胞の増殖において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、GADD34 KO マウスにおける寿命短縮のメカニズム、アミノ酸欠乏による GADD34 の役割を解析することは、栄養制限と寿命延長の関係を解明する上で重要であり、また、GADD34 と細胞の増殖、移動の関係を明らかにすることは、老化における創傷治癒の遅延の解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

代表者の属する研究室では、GADD34 遺伝子欠損 (KO) マウスを維持しており、これまでの予備的な研究から GADD34 KO マウスでは正常マウスに比べ寿命が短いことが示唆されている。このことから、GADD34 が個体老化、寿命に関与していると考えられ、そのメカニズムを解明することは、老化の研究においても重要であると考えられる。また、これまで、老化と栄養摂取に関して、カロリー制限がマウスの寿命を延長することが報告されているが、その分子メカニズムに関しては依然として不明である。

本研究では、GADD34 KO マウスと正常マウスを用いて、絶食ストレスによる組織の変化を調べ、また、各臓器での GADD34 の発現、TOR シグナル等の変化を分子生物学的に解析し、GADD34 と絶食ストレスの個体老化、寿命への影響を明らかにする。また、in vitro の系で、GADD34 KO マウスと正常マウスからマ

ウス骨髄由来樹状細胞を作製し、細胞老化、また栄養ストレスにおける GADD34 の発現、また TOR シグナル、細胞防御機構であるオートファジーの誘導と GADD34 の関係を明らかにすることを目的とする。

さらに、老化に伴う創傷治癒の遅延は、高齢化社会における褥瘡の問題にも関与しており、そのメカニズムを解明することは重要であると考えられ、本研究では GADD34 と創傷治癒における役割について解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 絶食ストレスによる GADD34 の機能解析

実験には、GADD34 KO マウス、wild type (WT) マウスを用い、名古屋大学実験動物指針に従って、実験を行った。

GADD34 KO マウス、WT マウスに、48 時間まで絶食ストレスを加え、経時的な臓器の形態変化を、ヘマトキシリン&エオジン染色により解析した。また、絶食ストレスによる細胞防御に寄与するオートファジーの誘導の変化を、電子顕微鏡、蛍光免疫染色により観察した。さらに、WT、GADD34 KO マウスの絶食ストレス下での臓器のオートファジーのマーカーである LC3 II/I 比、また細胞増殖、老化に関与する mTOR シグナルについて、ウェスタンブロッティングにより解析を行った。

(2) 細胞老化における GADD34 の機能解析

8 週齢もしくは 15 ヶ月齢の GADD34 KO マウス、WT マウスから骨髄細胞を採取し、Granulocyte Macrophage- Colony stimulating factor (GM-CSF) 存在下で長期に培養しマクロファージ様の細胞を作製した。これらの細胞を細胞老化の指標として使われる、senescence associated (SA)- β -galactosidase (gal) 染色により細胞老化を調べた。

(3) 創傷治癒における GADD34 の機能解析

GADD34 KO、WT マウス背部皮膚にパンチバイオプシーを行い、創周辺部位の細胞について、免疫蛍光染色により解析した。また、GADD34 KO、WT マウス胎児より胎児由来繊維芽細胞 (MEF) を作製し、細胞移動について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 絶食ストレスによる GADD34 の機能解析

GADD34 KO、WT マウスに 48 時間まで絶食ストレスを行い、組織学的解析した結果、12 時間後から肝臓において細胞質間の隙間、細胞浮腫、細胞内空胞の増加といった組織の変化が見られ始め、36 時間以降では、GADD34 KO マウスに比べ、WT マウスで、より組織の変化

が見られた。

次に、絶食ストレスの防御機構に GADD34 がどのように関与しているかを調べる為に、絶食ストレス下での GADD34 の発現とオートファジーについて比較検討した。その結果、絶食ストレスにより肝臓での GADD34 の発現が増加することが明らかとなった。オートファジーは栄養環境が悪化した際などにタンパク質のリサイクルを行うなど、生体の恒常性維持に関与している機構であり、オートファジーのマーカーの一つである LC3 は細胞質型 LC3-I から膜結合型 LC3-II へと変換することが知られている。そこで、この LC3 について GADD34 KO、WT マウスで絶食ストレス下での 48 時間までの経時的な LC3 の II/I 比についてウェスタンブロットングで調べたところ、WT では経時的に 48 時間まで LC3-II が強く発現し、LC3 II/I 比が増加していた。一方で、GADD34 KO では絶食による LC3II の増加は見られなかった。さらに、絶食ストレス 48 時間後の肝臓における LC3-II の発現を蛍光免疫染色の結果、絶食後に GADD34 KO に比べて、WT では LC3 の発現が有意に増加していることが明らかとなった(図 1)。

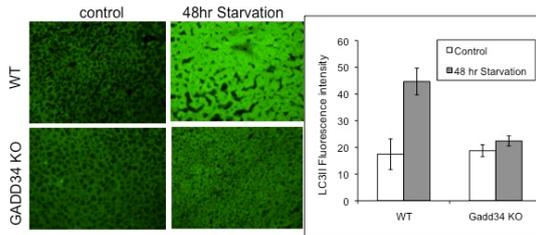
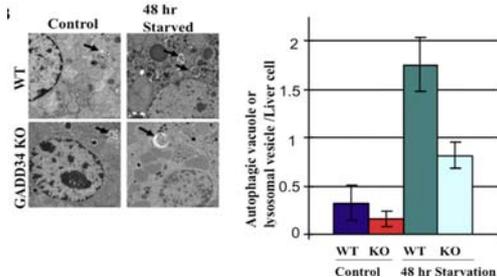


図 1 肝臓での免疫蛍光染色による LC3-II の発現

さらに、48 時間後の絶食ストレスによる肝臓におけるオートファジーの誘導を電子顕微鏡により解析した。その結果、WT では GADD34 KO マウスの肝臓に比べ、オートファゴソーム、リソソーム-液胞の増加が見られた。(図 2)。

図 2 肝臓組織の電子顕微鏡によるオート



ファジーの解析

以上の結果から、GADD34 がオートファジーの誘導に関与していることが示唆された。

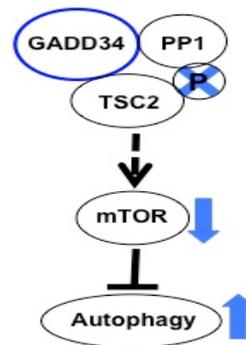
次に、GADD34 がオートファジー誘導経路にどのように関与しているかについて分子メカニズムの解析を行った。

mTOR は絶食やアミノ酸欠乏などの栄養制御ストレスなどにより抑制されるタンパク合成の重要な調節因子であり、オートファジーを抑制し、リソソームの生合成を阻害することが報告されている。

また、mTOR の活性を調節する重要な分子のひとつとして TSC1/2 があり、TSC2 のリン酸化が、mTOR の活性化に関与している。これまでの共同研究により、細胞へのウイルス感染において、GADD34 が TSC1/2 と結合し、TSC2 を脱リン酸化することが報告されている。

これらのことから、まず、絶食ストレス下での肝臓での経時的な、TSC2 のリン酸化についてウェスタンブロットングにより調べた。その結果、GADD34 KO に比べ、WT では TSC2 のリン酸化が抑制されていることが明らかとなった。また、mTOR のリン酸化についても WT で抑制されていることが示された。

図 3 オートファジー誘導のメカニズム



以上の結果から、GADD34 は絶食ストレス下において発現が増加し、TSC2 と結合してリン酸化を抑制し、mTOR 活性を抑えることにより、オートファジーをより誘導させているというメカニズムが明らかとなった(図 3)。

かとなった(図 3)。

(2) 細胞老化における GADD34 の機能解析

8 週齢、15 週齢 GADD34 KO、WT マウスから採取した骨髄細胞を GM-CSF 存在下で長期に培養し SA-β-gal 染色したところ、8 週齢、15 週齢ともに、WT に比べ、GADD34 KO 由来細胞でより SA-β-gal 活性が高いことが明らかとなった。絶食ストレス実験の結果と合わせ、GADD34 は mTOR シグナル経路を抑制することにより細胞増殖抑制、ストレス応答に働き、GADD34 KO マウスでは TOR の抑制機能が外れることが寿命短縮に寄与しているのではないかと考えられた。

(3) 創傷治癒における GADD34 の機能解析

WT、GADD34KO マウスの背部皮膚に 3 mm パンチバイオプシーを施し、経時的な創面積を測定した結果、WT に比べ GADD34 KO マウスではより早く創部位が治癒されることが明らかとなった(図 4)。

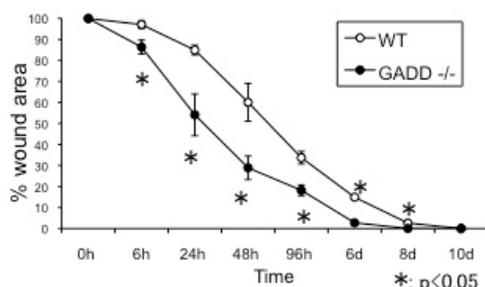


図4 創傷部位面積の経時的変化

そこで、WT, GADD34 マウス由来 MEF を用いて、スクラッチアッセイを行い、細胞の移動状態を確認したところ、WT に比べ、GADD34 KO MEF ではより早い移動が見られることが明らかとなった。次に、移動能における GADD34 の関与を調べる為に、マウス皮膚のパンチバイオプシー創の周辺部位の皮膚組織について解析を行った。その結果、GADD34 KO に比べ、WT では、創周辺で細胞移動の抑制に関与している Myosin IIA がより強く発現していることが明らかとなった。また、CD11b 抗体を用いた蛍光免疫染色により、WT に比べ GADD34 KO では、より早い時間に創周辺にマクロファージの移動が見られることが明らかとなった。

これらの結果から、GADD34KO では細胞移動を抑制する Myosin IIA の発現が抑制されることにより、創傷治癒の初期段階で重要な役割をするマクロファージなどの細胞移動が促進されることにより、より早く創傷の治癒が起きることが明らかとなった。

今回、GADD34 が絶食ストレスによるオートファジーの誘導、老化の抑制、また、創傷治癒に関与していることが明らかとなり、様々な老化に伴う現象に関与する重要な因子であることが明らかとなった。今後、GADD34 の更なる詳細なメカニズムを解析することにより、高齢者の褥瘡治癒遅延の解明、また治療薬の開発にもつながると考えられる。

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. Uddin MN, Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K. Autophagic activity in thymus and liver during aging. *Age (Dordr)* 34(1): 75-85. (2012) doi:10.1007/s11357-011-9221-9. 査読有

2. Uddin MN, Ito S, Nishio N, Suganya T, Isobe K. Gadd34 induces autophagy through

the suppression of the mTOR pathway during starvation. *Biochem Biophys Res Commun.* 407(4):692-8. (2011) doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.077. 査読有

3. Tanaka C, Ito S, Nishio N, Kodera Y, Sakurai H, Suzuki H, Nakao A, Isobe K. GADD34 suppresses wound healing by upregulating expression of myosin IIA. *Transgenic Res.* 19(4):637-45. (2010) doi:10.1007/s11248-009-9347-z. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 伊藤佐知子、西尾尚美、鈴木治彦、磯部健一 GADD34 regulates the LPS-induced cytokine production via TSC-mTOR signaling pathway. 第 40 回 日本免疫学会総会、千葉、2011 年 11 月 27 日

2. 西尾尚美、伊藤佐知子、鈴木治彦、磯部健一 The loss of GAD34 gene induced the abnormal expansion of neutrophil. 第 40 回 日本免疫学会総会、千葉、2011 年 11 月 27 日

3. 西尾尚美、伊藤佐知子、磯部健一 GADD34 遺伝子欠損マウスは老化に伴いミエロ系細胞が異常増殖する 第 34 回日本基礎老化学会、東京、2011 年 6 月 15 日

4. 伊藤佐知子、西尾尚美、磯部健一 マウス骨髄由来樹状細胞における GADD34 の役割と老化との関連 第 33 回日本基礎老化学会、名古屋、2010 年 6 月 17 日

5. 西尾尚美、伊藤佐知子、磯部健一 GADD34 の生体内機能と老化への関与 第 33 回日本基礎老化学会、名古屋、2010 年 6 月 17 日

6. Mohammad Nizam Uddin, 伊藤佐知子、西尾尚美、Zhao Cheng、Zhang Rong、磯部健一 胸腺の老化と胸腺上皮細胞の変化 第 33 回日本基礎老化学会、名古屋、2010 年 6 月 17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 佐知子 (ITO SACHIKO)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 70447845

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし