

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590346

研究課題名(和文) 老化組織におけるヘテロクロマチン構造の解析と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Analysis of chromatin remodeling in cellular senescence and organismal aging

## 研究代表者

安達 三美 (Adachi, Mimi)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：10323693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)平成23年度には、蛍光色素NanoOrangeを用いてsingle cellレベルで蛍光顕微鏡観察により「老化したヒト線維芽細胞では核タンパク質の総量が増えていること」を報告した。そこで平成25年度までに、培養細胞系とマウスの系においてプロテオーム解析を行ったが、明らかな老化関連因子を同定できなかった。(2)平成26年度では、血清の解析を行い、糖質コルチコイドが高齢マウスで高いこと、鉱質コルチコイドが低いことを見出した。さらに、ヒト副腎皮質腫瘍細胞株(H295R細胞)を用いて細胞老化を惹起させると、糖質コルチコイド産生が亢進し、鉱質コルチコイド産生が低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：(1)We reported that protein content and density in nuclei of senescent human and mouse fibroblasts in vitro, and in liver nuclei of aged mice in vivo by using NanoOrange staining and high resolution fluorescence microscopy. Thus we have identified some proteins increasing in cultured human diploid fibroblast as they approach replicative senescence using 2D-DIGE and MALDI-TOFMS. Some proteins including Aldolase A in those expressed higher in the lung and liver of old mice (25-31 months) than of young mice (3-5 months). However there was no relationship between those proteins and aging. (2)We found that the amount of glucocorticoid in serum is higher in old mice, and that serum mineral corticoid is lower. Further, in human adrenocortical tumor cell line, H295R cells, which were induced to replicative or drug-induced senescence, glucocorticoid production and most of steroidogenic factors gene expression were increased.

研究分野：分子生物学

キーワード：老化 細胞老化 クロマチン プロテオーム 糖質コルチコイド

1. 研究開始当初の背景

老化の研究は臨床研究・特定の長寿遺伝子を標的としたマウスの研究、培養細胞系を用いた分子生物学的研究など、近年、多岐にわたって進められており、医学研究において最も注目を集めている分野の一つである。老化して増殖能を失った細胞と若い細胞の間には、600 種以上の遺伝子に発現の大きな違いがみられ、これらの遺伝子や蛋白発現の変化によって老化細胞に特異的な phenotype が現れてくると考えられる。そして、この遺伝子発現の変化は、老化に伴うクロマチン構造の変化によって起こることが判明してきた。

2. 研究の目的

種を超えて、臓器組織の種類を超えて、老化制御因子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞から核タンパク質を抽出し、プロテオーム解析により、老化に伴うヒストンやヒストンバリエーションの発現・修飾の変化、非ヒストンタンパク質のプロファイリングを行い、老化に伴うクロマチン構造の変化の解析、同時に新しい老化バイオマーカーの探索を行う。

(2)で同定した因子について、種を超えて、組織特異性を超えて老化特異的に変化を来すか解析を行う。そしてこれらが培養細胞や組織における老化の成因になるか、もしくは老化の phenotype との関連性がどの程度あるかについて解析する。

4. 研究成果

- (1) 平成 23 年度には、蛍光色素 NanoOrange を用いて single cell レベルで蛍光顕微鏡観察により「老化したヒト線維芽細胞では核タンパク質の総量が増えていること」を報告した。
- (2) 平成 25 年度までに、2 種類のヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC5 細胞、LF1 細胞) を用いて replicative senescence を誘導した細胞と、継代数の少ない細胞 (若い細胞) からそれぞれ蛋白抽出液、細胞質分画、核分画、クロマチン分画を抽出し、2D-DIGE 法でタンパク質を分離した。MRC5 細胞、LF1 細胞の両方で、老化細胞に強く発現しているタンパク質のスポットを切り抜き、MALDI-TOF MASS にて解析し、タンパク質の同定を行った。アルドラーゼ A など多くのタンパク質が同定された。抗体を用いて、Western blot および蛍光免疫染色法を用いて、明らかに老化細胞に多く発現し、肝臓や肺等の複数の臓器で、高齢マウスの方が、若いマウスより

強く発現しているタンパク質を探索し、解析を行った。しかし、明らかな老化との関連性は認められなかったため、各臓器について、本手法で解析することについて困難であると判断した。

- (3) マウスの並行結合手術 (parabiosis) によって、高齢マウスと若いマウスの血流を共有させると、高齢マウスの老化現象が抑制され、若返ることが報告され、注目されている。血液中に老化を制御する物質が存在することが考えられる。平成 26 年度では、血清の解析を行い、高齢マウスと若いマウスで明らかに違いがある因子を探索したところ、糖質コルチコイドが高齢マウスで高いこと、鉱質コルチコイド (アルドステロン) が低いことを見出した。さらに、ヒト副腎皮質腫瘍細胞株 (H295R 細胞) を用い、replicative senescence、薬剤誘導性細胞老化において、糖質コルチコイド産生が亢進し、アルドステロン産生が低下することが明らかになった。
- (4) ヒト副腎皮質腫瘍細胞株 H295R 細胞に、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド受容体 (GIPR) を発現させ、GIP 刺激により活性化すると、糖質コルチコイドの分泌が促進されるが、そのメカニズムに H295R 細胞由来の内因性 ACTH が関与することを報告した。

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 9 件)

1. Susa T, Ikaga R, Kajitani T, Iizuka M, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T: Wild-type and Specific Mutant Androgen Receptor Mediates Transcription via 17 $\beta$ -Estradiol in Sex Hormone-sensitive Cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 230: 1594-1606, 2015 Doi: 10.1002/jcp.24906. Epub 2014 Dec 23. 査読有
2. Fujii H, Tamamori-Adachi M, Uchida K, Susa T, Nakakura T, Hagiwara H, Iizuka M, Okinaga H, Tanaka Y, Okazaki T: Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which the GIP receptor was exogenously

- introduced. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110543. doi: 10.1371/journal.pone.0110543. Epub 2014 Oct 21. (corresponding author) 査読有
3. Iizuka M, Susa T, Takahashi Y, Tamamori-Adachi M, Kajitani T, Okinaga H, Fukusato T, Okazaki T: Histone acetyltransferase Hbo1 destabilizes estrogen receptor  $\alpha$  by ubiquitination and modulates proliferation of breast cancers. *Cancer Sci*. 104: 1647-1655, 2013 査読有
  4. Hisaki H, Matsuda J, Tadano-Aritomi K, Uchida S, Okinaga H, Miyagawa M, Tamamori-Adachi M, Iizuka M, Okazaki T: Primary polydipsia, but not accumulated ceramide, causes lethal renal damage in saposin D-deficient mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303: F1049-1059, 2012 査読有
  5. Yamada K, Tamamori-Adachi M, Goto I, Iizuka M, Yasukawa T, Aso T, Okazaki T, Kitajima S: Degradation of p21Cip1 through APC/Cdc20 mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin dependent kinase 2 in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 296: 44057-66, 2011 (corresponding author) 査読有
  6. Tanaka Y, Nakamura A, Morioka MS, Inoue S, Tamamori-Adachi M, Yamada K, Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Tanaka H, Kitajima S: Systems analysis of ATF3 in stress response and cancer reveals opposing effects on pro-apoptotic genes in p53 pathway. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26848. doi: 10.1371/journal.pone.0026848. Epub 2011 Oct 26. 査読有
  7. De Cecco M, Jayapalan J, Zhao X, Tamamori-Adachi M, Sedivy JM: Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging (Albany NY)* 10, 955-67, 2011 (corresponding author) 査読有
  8. Kreiling JA, Tamamori-Adachi M, Sexton A, Jayapalan JC, Munoz-Najar U, Peterson A, Manivannan J, Rogers E, Pchelintsev NA, Adam PD, Sedivy JM: Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. *Aging Cell* 10: 292-304 2011 査読有
  9. Kajitani T, Tamamori-Adachi M, Okinaga H, Chikamori M, Iizuka M, Okazaki T: Negative regulation of parathyroid hormone-related protein expression by steroid hormones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407: 472-8, 2011 査読有
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 安達(玉盛)三美他 GIPR を発現させたヒト副腎皮質腫瘍細胞株 (H295R) におけるステロイドホルモン合成メカニズムの解析。第 37 回分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2014 年 11 月
  2. 諏佐 崇生、安達(玉盛)三美他 いくつかの男性/女性ホルモン感受性培養癌細胞では、17 $\beta$ -estradiol は、DHT と同様に、外来生に導入した非変異型 AR の生理的アゴニストとして機能する。第 37 回分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2014 年 11 月
  3. 飯塚 真由、安達(玉盛)三美他 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 によるエストロゲン受容体タンパク質のユビキチン化部位の同定。第 37 回分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2014年11月

4. 安達(玉盛)三美他

ヒト培養細胞およびマウス組織における老化細胞のAldolaseA発現の増加。第36回分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、2013年12月

5. 安達(玉盛)三美他

培養系と個体組織の老化細胞の核の蛋白含有量が増加する。第35回分子生物学会年会、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)、2012年12月

6. 諏佐 崇生、安達(玉盛)三美他

ヒト前立腺癌由来株化細胞LNCaPにおいて種々のステロイドホルモンはARを介して副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)の発現を抑制する。第35回分子生物学会年会、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)、2012年12月

7. 飯塚 真由、安達(玉盛)三美他

ヒストンアセチルトランスフェラーゼHbo1タンパク質複合体によるエストロゲン受容体タンパク質のユビキチン化を介した不安定化。第35回分子生物学会年会、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)、2012年12月

8. 藤井 博子、安達(玉盛)三美他

摂食同期性クッシング症候群(CS)に関する分子群の探索。第35回分子生物学会年会、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)、2012年12月

9. 安達(玉盛)三美他

CDK2が心筋細胞におけるAPC/CCdc20ユビキチンリガーゼを介するp21のユビキチン化を制御する。第34回分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2011年12月

10. 梶谷 宇、安達(玉盛)三美他

副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)の発現制御機構におけるDHT/E2シグナルの互換性。第34回分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2011年12月

〔図書〕(計1件)

1. 安達(玉盛)三美、岡崎 具樹、Kleiling JA、Sedivy JM: 個体でみられる細胞老化「実験医学2013年12月増刊号 老化・寿命研究の最前線」羊土社 p155-162, 2013

〔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：  
出願年月日：  
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

安達 三美(ADACHI, Mimi)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：10323693

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし