

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590368

研究課題名(和文) RNA制御を介した細胞分裂寿命の調節 - メカニズムと生体機能の解明

研究課題名(英文) Role of post-transcriptional regulation in cellular senescence

研究代表者

杉本 昌隆 (Sugimoto, Masataka)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・老化細胞研究プロジェクトチーム・プロジェクトリーダー

研究者番号：50426491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む哺乳動物の細胞は、過度のストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。細胞老化は、生体内で極めて重要な癌抑制機構として機能することが多くの研究によって明らかになっているが、近年ではさらに細胞老化が癌以外の様々な疾患に関与することが指摘されている。

細胞老化には癌抑制タンパク質を中心としたチェックポイント機構の働きが不可欠である。本研究ではRNA制御タンパク質HuRが転写後遺伝子発現制御機構を介して、細胞の分裂寿命や、細胞老化に伴う表現型を制御することを見出した。またモデルマウスの解析から、HuRによる細胞老化制御が、疾患にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Upon stress, cells undergo irreversible growth arrest called cellular senescence. Cellular senescence acts as potent anti-tumor barrier, and recent observations suggest it is also involved in aging-associated disorders. Numerous studies have been performed to elucidate the mechanisms regulating senescence, but little is known about how post-transcriptional regulation contributes to it. In this study, we focused on the role of HuR in cellular senescence.

HuR level declined during cellular senescence. HuR knockdown induced senescence with concomitant expression of ARF protein. In addition, these cells show several senescence-associated features including the induction of cytokine induction. Moreover, adipose-specific deletion of HuR gene induced senescence in early age, which is accompanied by reduced insulin sensitivity. Together, these findings demonstrate HuR-mediated post-transcriptional regulation plays essential roles in the induction and maintenance of senescence phenotypes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 RNA結合タンパク質 HuR

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞を試験管内で培養すると、ある一定の回数分裂を繰り返した後に恒久的な増殖停止状態に陥る。このような不可逆的な増殖停止状態は細胞老化と呼ばれ、50年前に発見された現象である (Heyflick and Moorhead, 1961)。細胞老化を起こすまでの分裂回数 (分裂寿命) はドナーとなる個体・種の寿命と相関を持つことから、個体の老化 (aging) に細胞老化 (senescence) が関与すると考えられていたが、これまでに解析に使用されたモデル動物において細胞老化が個体の老化の原因となる決定的な証拠は得られていなかった。しかしながら近年、細胞老化が加齢に伴って生じる疾患 (2型糖尿病など) の原因となる可能性が示され、改めて個体老化との関わりが重要視され始めている。

一方これまでの研究から、細胞老化は生体において極めて重要な癌抑制機構として機能していることが明らかになっている。正常細胞に RasV12 などの癌遺伝子を導入しても細胞は癌化せず、逆に分裂寿命を迎える前に老化する。このような分裂寿命非依存的細胞老化 (premature senescence) は、生体において癌細胞へと形質転換する高いリスクを持つ細胞を排除する働きを持つと考えられる。これまでに行われた様々な遺伝学的・分子生物学的解析から、細胞老化においては複数の癌抑制タンパク質が不可欠な役割を持つことが示されている。中でも癌抑制タンパク質 p53 は、哺乳動物の癌抑制機構において中心的な役割を担っており、ヒト・マウス細胞の老化においてもその活性が不可欠である。p53 タンパク質は、ストレスがない状態においては常に E3 コピキチンリガーゼである Mdm2 を介して分解されている。しかし細胞がストレスを受けると ARF タンパク質の発現 (癌遺伝子の活性化など) や ATM/ATR の活性化 (DNA 損傷) を介して p53 タンパク質は安定化され、活性化される。

近年、miRNA や RNA 結合タンパク質を介した転写後遺伝子発現調節機構が細胞老化や個体老化に関与することが報告されている。我々が着目する RNA 結合タンパク質 HuR は、mRNA 上の特定の配列に結合してその局在・安定性・翻訳を制御する因子であり、多くのヒト癌細胞においてその活性に異常が認められている。HuR のターゲットとなる RNA の機能は多岐に亘ることから、HuR を介した RNA 制御機構が様々な生命現象に関与することが考えられる。事実、HuR ノックアウト (KO) マウスは胎盤不全により胎生致死の表現型を示すが、胎盤形成をレスキューした場合でも、多臓器不全により生後まもなく死亡する (Katsanou *et al.* 2009)。さらに HuR の発現量は培養系の細胞老化とともに低下し、またヒト老齢個体の組織においても減少する傾向にあることから、細胞・個体老化に関与することが示唆されていた

(Wang *et al.* 2001)。

申請者は、マウス線維芽細胞において HuR の発現をノックダウンにより阻害すると急速に細胞老化が起こることを見出していた。この細胞老化は ARF もしくは p53 遺伝子 KO マウスの細胞では見られない。また HuR をノックダウンすると ARF の発現は増加するが、p16 は増加しないことから、p16-Rb 経路非依存的・ARF-p53 依存的な細胞老化が誘導されていると考えられた。さらに、HuR ノックダウン細胞では Campisi らによって発見された、細胞老化を起こした細胞に特有の IL-6 などのサイトカインの産生 (SASP: senescence-associated secretory phenotype) が亢進していた。SASP の発現には p53 は非依存的に、ATM-Chk2 を介した DNA 損傷シグナル経路の活性が必要とされることから、HuR は ARF 以外の因子を介して、SASP の発現を制御することが示唆される。以上、HuR は老化と共に減少し、また HuR を阻害すると急速に細胞老化が誘導されることから、HuR を介した RNA 制御機構は細胞の分裂寿命を制御する重要な因子であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究計画では、HuR を介した RNA 制御機構が細胞の分裂寿命を維持する分子機構、およびその生体における役割について明らかにすることを目的とし、以下の3点について解析を行った。

- (1) HuR による ARF 発現制御機構
- (2) 生体における HuR の役割
- (3) HuR による SASP 様表現型の制御機構

3. 研究の方法

(1) HuR による ARF 発現制御機構
HuR 阻害時に、ARF タンパク質が上昇する原因について、分子生物学的手法を用いて解析を行った。

(2) 生体における HuR の役割
脂肪細胞における細胞老化は、加齢に伴うインスリン抵抗性に寄与することが報告されている (Minamino *et al.* 2009)。本研究では、脂肪特異的に HuR ノックアウトマウスを作製し、解析を行った。

(3) HuR による SASP 様表現型の制御機構
培養細胞を用い、HuR 阻害時の SASP 関連遺伝子の発現を網羅的に解析し、その制御機構について解析を行った。

4. 研究成果

(1) HuR による ARF 発現制御機構
野生型マウス胚性線維芽細胞 (MEF) において HuR をノックダウンすると、細胞の分裂寿命が著しく低下する (図 1A)。このとき、

p16 タンパク質の発現は増加しないが、ARF タンパク質の発現は顕著に上昇が認められた (図 1B)。ARF-p53 ダブルノックアウト MEF では、分裂寿命に変化が認められないことから、HuR ノックダウン MEF の分裂寿命の低下は、ARF-p53 経路に依存すると考えられた。

HuR は多くの遺伝子の転写後遺伝子発現調節に関わることが知られている。ARF および *Ink4a* mRNA の定量を行ったところ、両遺伝子ともに HuR ノックダウンによる増減は見られなかった (図 1C)。このことから、HuR は ARF の発現についても転写後調節により調節 (抑制) しているものと考えられた。

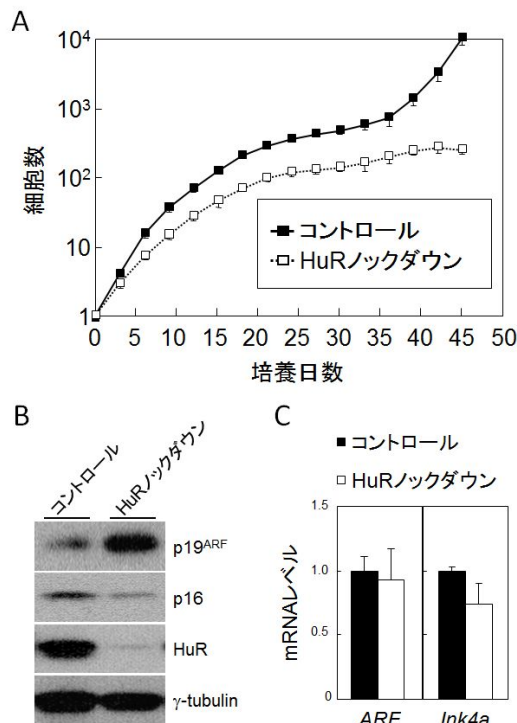


図 1 .HuR ノックダウン細胞における分裂寿命と ARF 発現変化 (発表論文 より改変して引用)。A .野生型 MEF において HuR をノックダウンし、3T3 プロトコルで培養した。B .ARF タンパク質の発現をイムノプロットにより評価した。C .細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR で定量した。

次に、HuR が ARF 遺伝子の転写後発現調節を行うメカニズムについて解析を行った。HuR は標的 RNA に直接結合し、多くの場合、安定性を制御する。RIP (RNA immunoprecipitation) を行ったところ、既知の HuR 標的 RNA に比べて、HuR は ARF mRNA に極めて弱い結合を示した。また ARF mRNA の HuR 結合領域は、既知の多くの標的とは異なり、5'非翻訳領域 (UTR) であった。

MEF において ARF mRNA の安定性は HuR によって影響を受けなかったが、RIP によって HuR 非存在下ではより多くのリボ

ソームが結合していることが明らかになった。さらに細胞質成分の分画を行ったところ、HuR 非存在下ではポリソーム画分により多くの ARF mRNA が存在した。これらの結果から、HuR ノックダウン細胞では、ARF mRNA の翻訳が亢進していることが強く示唆された。

さらに詳細な解析を行ったところ、興味深いことに通常 ARF mRNA の大部分は各室内に存在するのに対し、HuR ノックダウン細胞では大部分が核小体に移行していた。核小体には多くの RNA 結合タンパク質が存在するが、このとき ARF mRNA は核小体内で別の RNA 結合タンパク質 NCL と結合することが示された。NCL は mRNA に結合すると、その翻訳効率を変化させることが知られている。本研究結果からは、通常 HuR は ARF mRNA に結合してその翻訳を抑制するが、HuR の発現量が低下すると ARF mRNA は核小体に移行し、NCL との結合を介して翻訳が亢進し、細胞老化が誘導されると考えられる (図 2)。興味深いことに、*p53* mRNA もストレス時に核小体に移行し、翻訳が亢進することが報告されており (Gajjar et al. 2012)、核小体を介した mRNA 翻訳制御は、細胞のストレス応答に重要な役割を持つ可能性が考えられる。

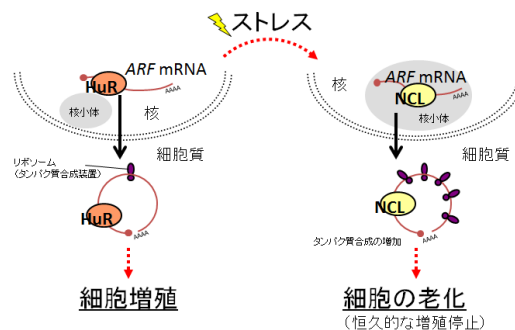


図 2 .本研究結果から予測されるモデル (発表論文 より改変して引用)。

(2) 生体における HuR の役割

脂肪細胞の細胞老化は、末梢組織にオケルインスリン抵抗性を惹起することが知られている。HuR による細胞老化制御の生理的役割について調べるために、HuR コンディショナルノックアウトマウス (Katsanou et al. 2009) と脂肪組織特異的 CRE 発現マウス (AP2-CRE) を交配し、脂肪組織特異的 HuR ノックアウトマウスを作製した。このマウスの脂肪組織における ARF の発現を調べたところ、コントロールマウスと比較して mRNA 量に変化は見られなかったが、ARF タンパク質の増加が認められた。従って生体内においても、HuR は ARF 遺伝子の翻訳を抑制していることが示唆された。またこのマウスでは、若齢期から脂肪組織において細胞老化マーカー遺伝子の発現が亢進していることから、

培養細胞系の結果と同様に、HuR を欠失することにより ARF 依存的な細胞老化が誘導されていることが考えられた。

次にこのマウスにおけるインスリン感受性の変化についてインスリン負荷試験により評価を行った。若齢期（1-3 ヶ月齢）においては、コントロールマウスとの差は認められなかった。しかしながら、6-9 ヶ月齢のマウスでは、コントロールマウスと比較して有意にインスリン感受性の低下が観察された（図3）。以上の結果から、生体内においても HuR は細胞の恒常性の維持に必要な因子であり、組織内で細胞老化が生じるのを防ぐ役割を持つことが強く示唆された。

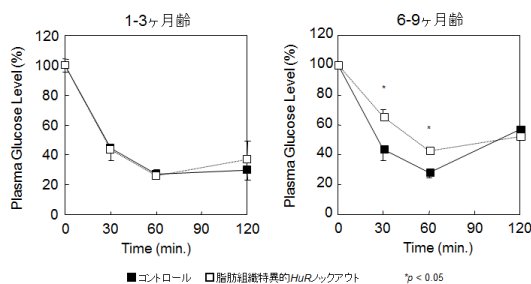


図3 . 脂肪組織特異的 HuR ノックアウトマウスにおけるインスリン感受性の変化。インスリンを腹腔内投与後、示された時間に末梢欠を採取し、血中グルコース濃度を測定した。

(3) HuR による SASP 様表現型の制御機構

さらに本研究では、細胞老化の重要な表現型のひとつである SASP と HuR の関係について解析を行った。HuR をノックダウンした MEF では、上述の ARF-p53 依存的な細胞周期停止とともに、IL-6 を含む様々なサイトカイン遺伝子の発現が亢進していた。SASP 関連遺伝子の発現の変化について、より詳細なデータを得るために、これらの細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った（図4）。その結果、HuR ノックダウン MEF では、多くの SASP 関連遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。

SASP の発現は、細胞老化時に細胞周期の停止を担う経路とは異なる制御を受けていることが知られている。HuR を阻害した細胞では、様々なサイトカインの発現上昇が見られるが、これらサイトカインの発現は、p53 ノックアウト細胞でも同様に見られたことから、細胞増殖制御経路とは異なるメカニズムで調節されていることが考えられた。転写因子 NF- κ B は、様々な炎症性サイトカインの発現を制御し、SASP の調節においても中心的な役割を持つことが知られている。そこで HuR ノックダウン細胞における NF- κ B の活性をルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン IP で調べたところ、HuR をノックダウンすることにより NF- κ B

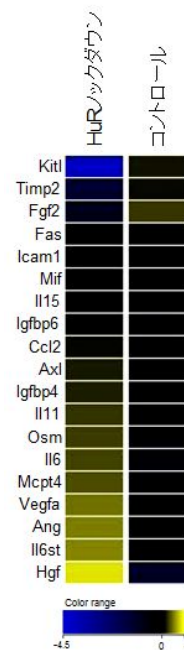


図4 .HuR ノックダウン細胞におけるサイトカイン遺伝子発現の変化。コントロールおよび HuR ノックダウンマウス胚性繊維芽細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。アレイデータから変動が見られた SASP 遺伝子を抽出し、ヒートマップを作成した。

は p53 非依存的に活性が上昇し、また IL-6 などのサイトカイン遺伝子上にリクルートされることが明らかになった。次に HuR 阻害時の NF- κ B 活性化機構について解析を行った。細胞老化時には慢性的に DNA ダメージの蓄積が認められ、これがトリガーとなって NF- κ B を活性化させることが既に報告されている。そこで HuR ノックダウン細胞で DNA ダメージが蓄積しているかをコメントアッセイによって調べたところ、興味深いことに一本鎖 DNA 切断の蓄積が認められた。

以上の結果から、HuR を阻害することにより DNA 一本鎖切断が蓄積し、これが NF- κ B の活性化へと繋がることが示唆された。HuR ノックダウン細胞で一本鎖 DNA 切断が蓄積する原因について調べたところ、この細胞では一本鎖 DNA 切断を起こす刺激に対してより高い感受性を示すことが明らかになった（図5）。DNA の一本鎖障害は、細胞増殖の過程において DNA が複製される際に必ず生じる。通常この障害は速やかに処理されるが、HuR をノックダウンした細胞ではこの修復機構に何らかの異常があると考えられる。事実、マイクロアレイの結果から、複数の DNA 修復に関わる遺伝子の発現が低下していることが示されている。以上の結果から、HuR の発現が低下した細胞では、一本鎖切断が蓄積し、DNA ダメージシグナルが慢性的に活性を持ち、細胞老化が誘導されることが考えられた。

近年、SASP は生体の加齢現象する可能性が指摘されている。またヒトにおいて、高齢者の組織では HuR の発現量は低下する傾向にあることが報告されている (Wang *et al.* 2001)。本研究計画から得られた結果を統合して考えると、HuR は細胞の分裂寿命を規定する極めて重要な因子であり、細胞老化表現型を介して生体の加齢現象に深く関与することが示唆される。加齢に伴う組織機能の低下は、様々な加齢性疾患のリスクとなることから、HuR を介した RNA 制御系は、疾患の予防や治療を行う上で有効な標的となり得るであろう。

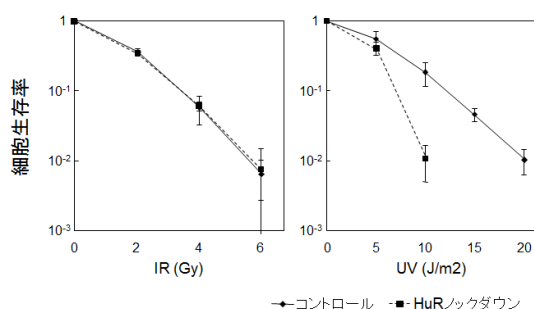


図 5 . HuR ノックダウン細胞では一本鎖 DNA ダメージに対する感受性が上昇している。(発表論文 より改変して引用)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Takagi M., Uno M., Nishii R., Sugimoto M., Hasegawa S., Piao J., Ihara N., Kanai S., Kakei S., Tamura Y., Suganami T., Kamei Y., Shimizu T., Yasuda A., Ogawa Y., and Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation and contributes to glucose homeostasis. *Cell Rep.* **10**. 957-967. 2015. (査読有)
doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.027.

Hashimoto M, Tsugawa T, Kawagishi H, Asai A, Sugimoto M. Loss of HuR leads to senescence-like cytokine induction in rodent fibroblasts by activating NF- κ B. *Biochim Biophys Acta.* **1840**. 3079-3087. 2014. (査読有)
doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.005.

Kawagishi, H., Hashimoto, M., Nakamura, H., Tsugawa, T., Watanabe, A., Kontoyiannis, D. L., and Sugimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by suppressing ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **33**. 1886-1900. 2013. (査読有)
doi: 10.1128/MCB.01277-12.

Takagi, M., Piao, J., Kawagishi, H., Imai, C., Ogawa, A., Watanabe, A., Akiyama, K., Kobayashi, C., Mori, M., Ko, K., Sugimoto, M., and Mizutani, S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous repression of JMML. *Leukemia* **27**. 1926-1928 2013. (査読有)
doi: 10.1038/leu.2013.82.

Unno, J., Takagi, M., Piao, J., Sugimoto, M., Honda, F., Maeda, D., Masutani, M., Kiyono, T., Watanabe, F., Morio, T., Teraoka, H., and Mizutani, S. Artemis-dependent DNA double strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Science* **104**. 703-710. 2013. (査読有)
doi: 10.1111/cas.12144.

〔学会発表〕(計 8 件)

Sugimoto, M. Restoration of pulmonary function in aged animal by enminating senescent cells. The 2015 Aging Summit, London (UK), February 11, 2015

橋本理尋、浅井あづさ、杉本昌隆 老化細胞除去による呼吸機能の回復 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

杉本昌隆、橋本理尋、浅井あづさ Ablation of senescent cells ameliorates age-associated pulmonary hypofunction 日本基礎老化学会第 37 回大会, 愛知, 2014 年 6 月 27 日

Tsugawa, T., Hashimoto, M., Kawagishi, H., and Sugimoto, M. Regulation of senescence-associated phenotypes by RNA-binding protein HuR. Salk Symposia Mechanisms and Models of Cancer, La Jolla (USA), August 9, 2013

橋本理尋、川岸裕幸、杉本昌隆 転写後発現調節機構を介した細胞老化の制御 日本基礎老化学会第 35 回大会, 大阪, 2013 年 6 月 5 日

Tsugawa, T., Michihiro, H., Kawagishi, H., and Sugimoto, M. HuR regulates senescence-associated secretory phenotype through DNA damage response pathway. 第 35 回大会 日本分子生物学会年会(ワークショップ) 福岡, 2012 年 12 月 11 日

Sugimoto,M., Kawagishi,H.,
Tsugawa,T., and Hashimoto,M. HuR
maintains replicative lifespan by
repressing ARF tumor suppressor.
Keystone Symposia Aging and
Diseases of Aging, Tokyo, Oct 25, 2012

杉本昌隆、川岸裕幸、津川貴行、中村英
亮 RNA 結合タンパク質 HuR は癌抑制
タンパク質 ARF を抑制することにより
細胞の分裂寿命を維持する 日本基礎
老化学会第 35 回大会，千葉，2012 年 7
月 26 日

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：ハイブリドーム
発明者：杉本昌隆、中村英亮
権利者：ヒューマンサイエンス振興財団
種類：特許
番号：特許第 5671669 号
出願年月日：平成 21 年 12 月 25 日
取得年月日：平成 27 年 1 月 9 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO, Masataka)
国立長寿医療研究センター・老化細胞研究
プロジェクトチーム・プロジェクトリーダ
ー

研究者番号：50426491