

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659137

研究課題名(和文) 定量的DNA損傷による細胞老化誘導系の確立と加齢病態解明への応用

研究課題名(英文) Establishment of damage dose-dependent senescence inducible system and its application for understanding molecular basis underlying geriatric diseases

研究代表者

中西 真 (NAKANISHI, Makoto)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40217774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断の数が細胞老化誘導を決定していると予想し、細胞内にゲノムDNA上に存在しない制限酵素部位I-SceIサイトを複数箇所導入して細胞運命を解析した。しかしながら、一カ所のDNA二重鎖切断であっても細胞周期のG2期におこった場合、p53依存的な細胞分裂期回避がおこり、4倍体G1期細胞が生じて細胞老化が誘導される事が分かった。この細胞分裂期回避の分子機構として、p53-p21の発現誘導による早期APC-C/Cdh1の活性化と、p53-pRb経路による転写抑制による細胞分裂期タンパク質の著減が重要な役割を果たしている事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Since induction of cellular senescence might be dependent on a number of DNA double strand breaks, we introduced various I-SceI restriction sites in normal human fibroblasts, which is not normally observed in normal human cells, and analysed whether these cells undergo senescence or not. However, during our experimental course, we found that only single DNA double strand break was sufficient for the induction of senescence when the break occurred during G2 phase. p53 activation during G2 resulted in a mitosis skip, leading to a generation of tetraploid G1 cells. This mitosis skip was collaboratively regulated by premature activation of APC-C/Cdh1 through Cdk1 and Cdk2 inhibition by induced p21 and pRb-family pocket protein dependent transcriptional repression of mitotic regulators.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：老化 シグナル伝達 発現抑制

1. 研究開始当初の背景

早期細胞老化は、DNA 損傷あるいは酸化ストレス等により誘導され、個体レベルでの発ガン防御に重要な役割を果たしている。しかしながら、老化細胞が個体レベルで如何なる機能を果たしているのか？ また実際老化細胞の蓄積が臓器機能の不全を誘導するのかについては全く分かっていない。これらを明らかにするには、個体内において定量的にコントロール可能な老化細胞誘導系を樹立することが必要不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

DNA 損傷、とりわけ DNA 二重鎖切断の数が細胞運命、すなわち一過性細胞周期停止、アポトーシスあるいは細胞老化誘導を決定していると予想し、細胞内にゲノム DNA 上に存在しない制限酵素部位 I-SceI サイトを複数箇所導入して細胞運命を解析した。これにより、定量的に細胞老化誘導が可能となり、個体レベルでの老化細胞蓄積の病態解析が可能となると考えられた。

3. 研究の方法

哺乳動物細胞内に I-SceI エンドヌクレアーゼ切断箇所を複数導入し、DNA 二重鎖切断を定量的に誘導する細胞系を確立する。この系を用いて、特定の遺伝子異常を伴わずにマウス個体内において細胞老化を誘導し、個体内における老化細胞の蓄積による臓器・組織機能に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

研究を進める過程で DNA 損傷量 (DNA 二重鎖切断数) により細胞運命が決まるのではなく、DNA 損傷が生じた細胞周期に依存して細胞老化が誘導されるか、一過性 G1 期停止がおこるかが決まる事が明らかとなった。このことは、DNA 二重鎖切断部位の数的制御が細胞老化誘導をコントロールするには不向きであることを示している。

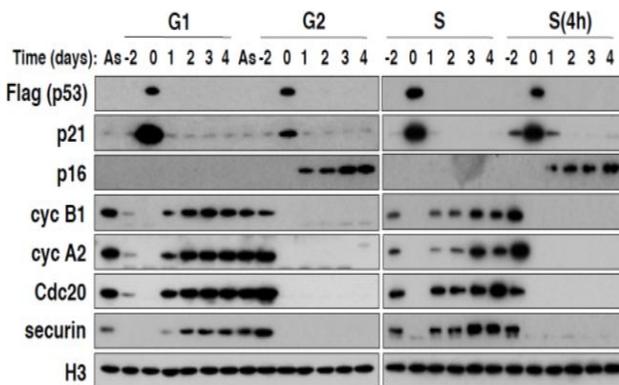


図1 G2期に一過性にp53を活性化させると分裂期タンパク質のほぼ完全な消失がみられる。

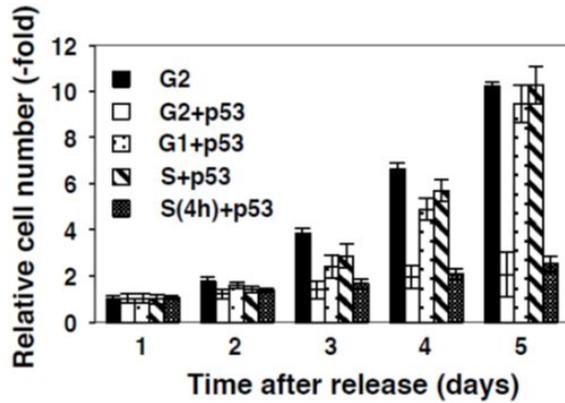


図2 G2期に一過性にp53を活性化させた細胞は、その後p53を不活化しても増殖が回復せず老化細胞となる。

すなわち、一カ所のDNA二重鎖切断であっても細胞周期のG2期におこった場合、p53依存性細胞分裂期回避がおこり、4倍体G1期細胞が生じて細胞老化が誘導される事が分かった (図1, 2)。

この細胞分裂期回避の分子機構として、p53-p21の発現誘導による早期APC-C/Cdh1の活性化による分裂期制御タンパク質の分解と、p53-pRb経路による分裂期制御タンパク質の転写抑制による細胞分裂期タンパク質絶対量の著減が重要な役割を果たしている事が分かった (図3)。これらの細胞老化誘導に係る知見が、培養細胞のみならず個体内においても見られるかどうか検討したところ、個体内における代表的な老化細胞である母斑細胞性母斑の解析結果から、母斑細胞は4倍体G1期細胞であることがわかり、培養細胞でみられる分裂期回避による細胞老化誘導は、個体内においても見られることが示唆された。

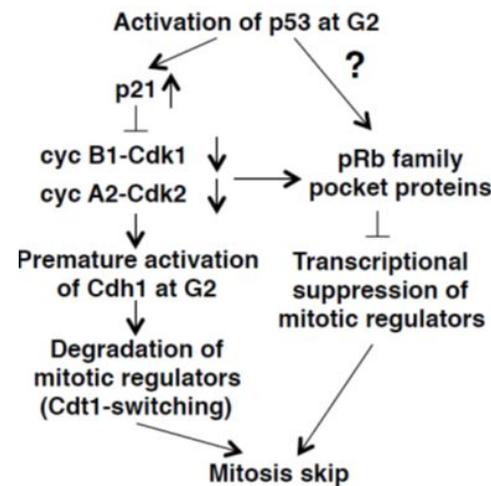


図3 老化誘導を制御する2つの経路 p53はp21およびpRbファミリーのタンパク質を制御して分裂期回避を引き起こし、細胞老化を誘導する。

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10件)

Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S, Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. Mol.Cell in press 査読有 2014

Goshima T1, Shimada M, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, Nakanishi M. Mammalian-specific H2A variant, H2ABbd, is Involved in Apoptotic Induction via Activation of NF- B Signaling Pathway. J Biol Chem. 査読有 2014 doi: 10.1074/jbc.M113.541664.

Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. Nature.502(7470):249-53. 査読有 2013 doi: 10.1038/nature12488.

Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, Nakanishi M, Saitoh S. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGe syndrome. PLoS One. 8(9):e75137 査読有 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0075137

Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. Int J Oncol. 42(6)査読有 2013 doi: 10.3892/ijo.2013.1899

Nishigaki M, Kawada Y, Misaki T, Murata K, Goshima T, Hirokawa T, Yamada C, Shimada M, Nakanishi M. Mitotic phosphorylation of MPP8 by cyclin-dependent kinases regulates chromatin dissociation. Biochem Biophys Res Commun. 432(4) 654-9 査読有 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.027.

Shimada M, Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? Front Oncol.3.8 査読有 2013 doi: 10.3389/fonc.2013.00008

Liu N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, Nakanishi M, Niida H, Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. EMBO J. 31(10) 2365-77 査読有 2012 doi: 10.1038/emboj.2012.88.

Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Nakanishi M, Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T. Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines. Pathol Int. 62(2) 84-92 査読有 2012 doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02755.x.

Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin M, Nakanishi M. TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(4) E177-86 査読有 2012 doi:10.1073/pnas.1119296109.

〔学会発表〕(計6件)

2013年10月17日
The 10th Nikko International Symposium
2013 Translational Epigenomics
栃木県自治医科大学
中西 真

2013年11月20日~23日
第3回日仏がんワークショップ
Ubiquitylation/deubiquitylation circuit of histone H3 at K23 couples maintenance DNA methylation with DNA
フランドールーズ
中西 真

2012年4月26日~28日
Hallym-NCGG-ExtendedSymposium
Role of DNA damage responses in induction of premature senescence. Anyang 市(韓国)
中西 真

2012年9月18日~21日第71回日本癌学会学術総会
Maintaining the integrity of genomic information by cell cycle checkpoints.
札幌市 中西 真

2012年11月25日~28日3Rシンポジウム
Role of DNA damage responses in induction of premature senescence.
鳴門市 淡路島 中西 真

2012年11月29日~30日日仏がん学会
Novel histone modifications couple maintenance DNA methylation with DNA replication.鳴門市淡路島 中西 真

〔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

中西 真 (NAKANISHI, Makoto)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
教授
研究者番号：40217774