

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650120

研究課題名(和文)超長寿マウス作製の試み

研究課題名(英文)An attempt to produce longer lifespan mouse

研究代表者

名田 茂之(NADA, SHIGEYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50291448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：FoxO3aはフォークヘッドボックスOファミリーの転写因子の一つであり、細胞増殖の調節、ストレス耐性やアポトーシスに関わる遺伝子の発現を制御している。また線虫DAF-16のホモログであり、線虫では寿命の制御にも関わる。マウスでFoxO3aが寿命の制御を行う可能性を検証するために、活性化型FoxO3aを発現するマウスを作製した。このマウスではFoxO3aの発現が確認され、細胞レベルではFoxO3aの下流因子のシグナル変動が見られた。組織の発生や機能には異常は認められず、この活性化型FoxO3aが長寿命化能を持つ可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：FoxO3a is a member of Forkhead box O family transcription factor, and regulates gene expression related to cell-cycle progression, stress-resistance, and apoptosis. In addition, it is well known that nematode homologue of FoxO3a, DAF-16, is a critical factor for lifespan elongation. In order to investigate the ability of FoxO3a to regulate mouse lifespan, we produced a mouse line carrying active form of FoxO3a gene. First trial to evaluate its function in epidermis, we detected active FoxO3a in epidermis and cultured keratinocytes. The analysis from cultured cells it was revealed that the active FoxO3a expression has strong effect to suppress cell growth, while epidermal expression did not affect cell growth and tissue homeostasis. These results indicated the potential lifespan elongation ability of activated FoxO3a in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：長寿 老化

1. 研究開始当初の背景

線虫 (*C.elegans*) の寿命はインスリンシグナルとその下流の転写因子によって強い影響を受けることが実験的に示されている。また、断続的な栄養飢餓が明確に寿命を延長させることも示されている。これらに関わるシグナル経路 (インスリン受容体-mTOR-FoxO ファミリー転写因子) は哺乳類など高等動物細胞にも存在するが、これまでのところこのシグナル経路がこれら高等動物個体の寿命を伸ばす効果は明確には示されていない。

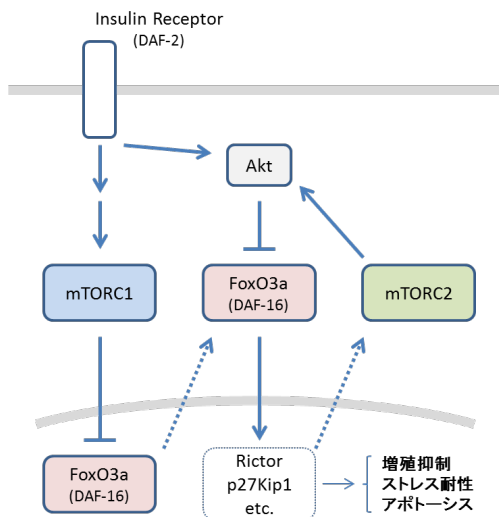


図 FoxO3aの制御と機能

一方、我々はこれまでに mTORC1 活性化に必須な Ragulator の構成因子である p18 のノックアウトマウス (p18KO) 細胞を使った研究から、p18 欠損時の細胞増殖低下が FoxO3a の活性上昇によるものであることを見出した。さらに長寿で知られるハダカデバネズミの細胞で FoxO3a が活性化状態にあることや、ハダカデバネズミ細胞においても FoxO3a が細胞増殖の抑制効果を持つことを発見した。これらから、高等動物細胞の増殖調節と個体の寿命制御において FoxO3a が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、哺乳動物個体ではその機能はまだ検証されていなかった。

2. 研究の目的

個体レベルの寿命制御における FoxO3a の機能を検証するための活性化型 FoxO3a ノックインマウスを作製し、FoxO3a の活性化による個体・細胞レベルでの動態変化、特に寿命や老化に関わる現象についての細胞機能変化を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

FoxO3a の局在・活性調節には図に示す 3 か所の部位のリン酸化が重要である。FoxO3a は通常細胞質に存在し、Akt や Sgk1 によりリン酸化を受けている。核内に存在す

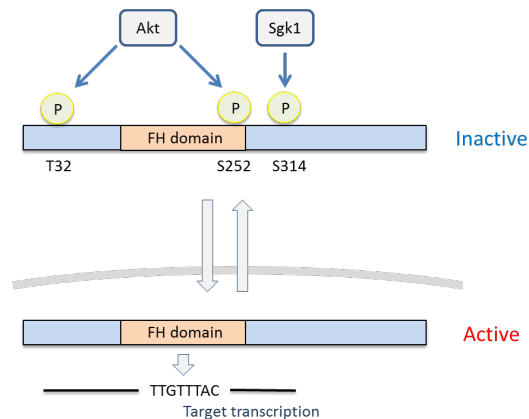


図 FoxO3aのリン酸化による機能調節

る分子はこれら部位が脱リン酸化されたものであり、特に Ser314 の脱リン酸化が p18KO 細胞における FoxO3a 活性化の原因であった。人工的にこれら 3 か所のリン酸化部位を Ala に置換した変異体 (3A) は核に高効率で局在化し、非常に強い細胞増殖抑制効果をもたらす。一方、S314 のみを Ala に置換した変異体 (S314A) では部分的な核局在とマイルドな細胞増殖抑制効果を示した。活性化型の FoxO3a の生体内での発現においては 3A では効果が強すぎることが懸念される。そこで、S314A を遺伝子導入することとした。

S314A 変異体には HA タグを融合し、ROSA26 遺伝子座にノックインを行う。ノックインベクターには FoxO3a-S314A の ORF 上流に loxP 配列で前後を挟んだ neo 遺伝子を挿入しておき、ES 細胞導入時の薬剤マーカーとするとともに、マウス個体内では Cre 依存的な発現誘導を行えるシステムとした。

ES 細胞にノックインベクターを導入し、得られた G418 耐性クローンより PCR にて相同組換え体を選別し、マウス初期胚に注入してキメラマウスを作製した。キメラマウスの子孫から FoxO3a-S314A 遺伝子を持つものを表皮特異的に Cre を発現するトランスジェニック (K14-CreERT) マウスと交配し、表皮特異的な FoxO3a-S314A 発現マウスとして解析を行った。

また FoxO3a-S314A 発現マウスより培養線維芽細胞株を樹立して、細胞レベルの解析を行った。

4. 研究成果

(1) FoxO3a-S314A 表皮発現マウスの作製と解析

K14-CreERT と FoxO3a-S314A を持つマウスの背中に 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を塗布し FoxO3a-S314A の発現誘導を行った。発現誘導後に表皮の表現型に明らかな変化は見られなかった。一か月後に表皮切片を作製し、表皮内での FoxO3a の発現と、細胞増殖マーカーについて免疫組織化学的に調べた。その結果、4-OHT 特異的な FoxO3a 発現を HA タグ抗体により検出した。

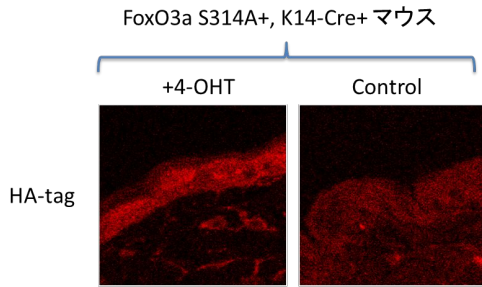


図 マウス表皮でのFoxO3a-S314A発現

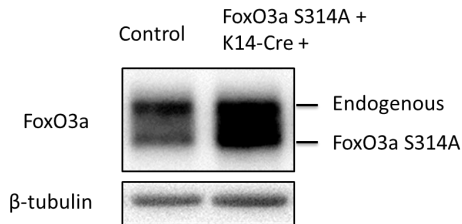


図 ケラチノサイトでのFoxO3a-S314A発現

FoxO3a-S314A マウスのケラチノサイトを初代培養し、*in vitro*での4-OHTによる発現誘導でもFoxO3a-S314Aの発現が確認できた。また、その発現によりRictorやSgk1の発現上昇、Akt活性化等のFoxO3a活性化に起因する細胞内シグナルの変化も検出され、FoxO3a-S314Aが表皮細胞内で確かな効果を持つことが示された。

細胞増殖については表皮組織内でのKi67の染色頻度に有意な差は見られず、*in vivo*ではFoxO3a-S314Aが表皮基底細胞の増殖に大きな影響を与えないことが示された。これらのことから、FoxO3a-S314Aが組織の発生や機能に損傷を与えない性質を持つ可能性が示された。これは今後、この分子をマウス長寿化因子として利用する場合に必要な性質であり、本研究での一つの成果と言えるだろう。

今後、表皮の老化を紫外線照射により誘導するなどの方法で、FoxO3a-S314Aの老化に対する効果を調べる必要がある。

(2)FoxO3a-S314A 発現細胞での解析

FoxO3a-S314A マウスの初代培養皮膚線維芽細胞を作製した。この細胞にSV40 T抗原を導入し不死化した細胞株を樹立した。さらに培養条件下でCreを一過性に発現させてFoxO3a-S314A 発現細胞株の作製に成功した。コントロールとしては、Creを導入する前の親株を利用した。これら細胞株間での細胞増殖と細胞内シグナル動態の変化を観察した。

まずFoxO3a-S314Aについて免疫染色とウェスタンブロットの両者にて発現量の上昇を確認した。免疫染色では核内に存在するFoxO3aも検出できた。

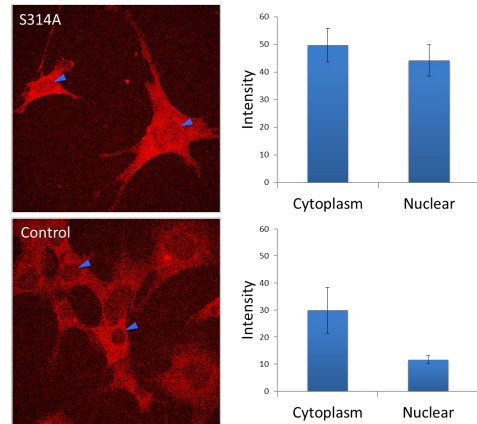


図 FoxO3aの細胞内分布

細胞増殖については、FoxO3a-S314A 発現細胞で有意な増殖速度の低下とともに、コントロール時の細胞密度の低下も観察された。これはハダカデバネズミの細胞に見られる早期接触阻害の表現型と同様なものであると考えられる。

細胞内シグナルについてはウェスタンブロット解析の結果、Rictorの発現上昇とAktの活性化、p27Kip1の発現増加が認められた。これらはいずれも予想されるFoxO3a活性化による効果と一致する。

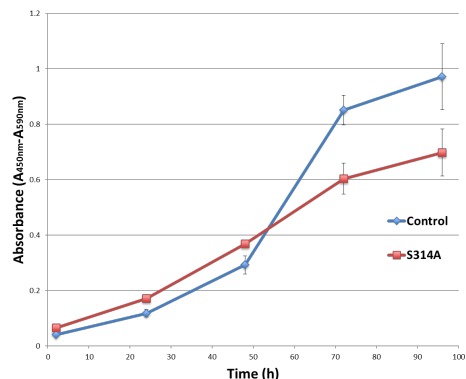


図 細胞増殖曲線

以上の結果から、FoxO3a-S314Aは細胞レベルでも予想される増殖調節機能を発揮し、さらにマウス細胞にハダカデバネズミ細胞が持つ性質を付与する機能も示された。ストレス耐性や細胞がん化への抵抗性など、細胞レベルでの長寿化に関連する表現型についてもFoxO3a-S314Aは今後の展開が期待できる分子であると考えられる。

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 1 件)

Yao Y, Wang J, Yoshida S, Nada S,

Okada M, Inoki K. Role of Ragulator in the Regulation of Mechanistic Target of Rapamycin Signaling in Podocytes and Glomerular Function. J Am Soc Nephrol. 2016 (印刷中) 査読有り
pii: ASN.2015010032.

[学会発表](計 9件)

Junhyeong Kim, 森俊介, 名田茂之、三浦恭子、岡野栄之、岡田雅人 「老化と寿命におけるマウスおよびハダカデバネズミの FOXO3a の役割」第 38 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

北野圭介, 名田茂之、岡田雅人 「Src によって誘導される細胞競合の in vivo 解析」第 38 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

名田茂之、名田真理、長江(相馬)多恵子、北川真理、森俊介、高橋佑介、岡田雅人 「マウス表皮における mTORC1 シグナルの機能」第 38 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

小宮優、呑村優、小野寺康人、黒岩美穂、名田茂之、岡田雅人 「Arhgef5 is upregulated during TGF- induced epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor progression」第 38 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

田中健太郎、梶原健太郎、名田茂之、岡田雅人 「ユビキチン化を介する Src がん遺伝子産物の選別機構」第 38 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

中井智和、名田茂之、中津海洋一、中山敬一、岡田雅人 「mTORC1 シグナルを制御する Ragulator の機能の分子基盤」第 38 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1 日~4 日

名田真理、名田茂之、長江(相馬)多恵子、森俊介、岡田雅人 「マウス表皮の正常な発達はリソソーム膜アダプタータンパク質 p18 に依存している」第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日~27 日

小宮優、呑村優、名田茂之、小根山千歳、岡田雅人 「がん進展における Ephexin family Rho GEF の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日~27 日

Masato Okada, Ayaka Kitamura, Shunsuke Mori, Shigeyuki Nada, Hirokazu Nakatsumi, Keiichi I. Nakayama 「Function and molecular architecture of the lysosomal mTORC1 anchor: Ragulator」第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日~27 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/oncogene/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

名田 茂之 (NADA SHIGEYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50291448