

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

Ras 依存性の細胞老化機構の解明

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田道行

平成 14 (2002) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	1
Ras 依存性の細胞老化機構の解明	
II. 分担研究報告	
1. 老細胞での Ras 活性化に関する研究	3
松 田 道 行	
2. 細胞老化におけるクロマチンリモデリング機構に関する研究	5
田 中 伸 哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	7

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

総括研究報告書

Ras依存性の細胞老化機構の解明

主任研究者 松田道行 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 初代ヒト線維芽細胞に活性化型のRas癌遺伝子産物を発現させると細胞が老化することが知られている。老化とRasの関係をより詳細に解析するために、われわれが開発したRas活性化の分子モニターRaichu-Rasを用いて、肺線維芽細胞における上皮細胞増殖因子受容体によるRas活性化を解析した。不死化した細胞と比較すると、老化した初代線維芽細胞においては、上皮細胞増殖因子受容体はRasの活性化をほとんど引き起こさず、むしろ、増殖因子の刺激はRasの活性を低下させることがわかった。さらに、本Rasによって発現が制御されているSWI/SNF型リモデリング因子の1つであるhBRMが細胞老化を促進することを、内因性の β ガラクトシダーゼ活性を指標に明らかにした。

分担研究者 田中伸哉 北海道大学医学部講師

A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを明らかにすることにより、老化に起因する多くの疾病に対する新規の治療標的分子を発見することにある。しかし、老化にかかわる細胞内情報伝達系に関する研究は始まったばかりである。手がかりとして有名な現象は、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型は、初代線維芽細胞においては癌化の誘導は行わずむしろ、細胞の老化を誘導するという現象である。このRasによる細胞の老化は p16INK4aおよびp53に依存する細胞周期の停止を介しているらしい。しかし、不死化した細胞と初代細胞において、なぜRasがこのような異なった反応を引き起こすのかは不明である。本研究では、Rasがいつ、どこで活性化され、そのシグナルが核へ伝播されるのかについて、不死化した細胞と初代培養細胞とを用いて比較する。

B. 研究方法

プラスミド： pRaichu-RasとpRaichu-Rap1については既に報告した。このプラスミドがコードする蛋白Raichuは、YFP、スパーサー、Ras、RafのRas結合領域、スパーサー、Rac1、スパーサー、CFP、スパーサー、Ki-RasのCAAXボックスから成る。Raichu-Rap1は上記のRasの部位がRap1に置換されている。

細胞： WI38細胞、WI38-VA12細胞、TIG-1細胞、

TIG-3細胞は、ヒューマンサイエンス財団より購入した。細胞は、10%ウシ胎児血清を加えたDMEMにて培養した。WI38-VA12細胞以外の細胞は、1週間に1回継代を続けながら、3ヶ月培養し、増殖を停止したものを用いた。

ヒト線維芽細胞を用いた細胞運動時のイメージング： 細胞には以前に報告された方法を用いて組み換えアデノウイルスを感染させるか、もしくはLipofectAMINE 2000 (GIBCO BRL) を用いてプラスミドをトランスフェクションした。感染させた細胞またはトランスフェクションした細胞を48時間後に、直径35 mmのコラーゲンコートしたガラス底の培養皿 (Asahi Techno Glass Co., Tokyo) に播き直した。播き直してから1時間後に、細胞の画像を撮影し始めた。

hBRMの老化に対する影響： ヒト腫瘍細胞にhBRMを発現するプラスミドDNAをtransfectionさせ、経時的に内因性ベータガラクトシダーゼ活性を測定する。Transfectした蛋白の発現は、蛍光染色法およびウエスタンブロット法にて確認する。hBRMと同時にhBRM結合蛋白であるSYT-SSXを発現させて、老化誘導能に変化があるか否かを検討する。hBRMとともにwild typeのSYT、SSX遺伝子を発現させて、SYT-SSXキメラ癌遺伝子と同様の効果がでるか否かを検討する。

倫理面への配慮： 本研究は細胞バンクに登録されている腫瘍細胞株とプラスミドに挿入されたcDNAを用いるものであり、人体から採取した臨床検体は用いていない。したがって倫理面での問題は生じないと考えられる。

C. 研究結果

老化したヒト線維芽細胞への分子プローブ導入法:

まず、ヒト肺初代線維芽細胞への遺伝子導入法を検討した。通常のリポフェクション法では遺伝子導入効率が低いことがわかったので、組替えアデノウイルスを用いることとした。クローンテック社のアデノXの系を用いて組替えウイルスを作成し、老化したTIG-1、TIG-3、WI-38細胞へ感染させた。高力価のウイルスを用いることにより、数%の細胞にRaichu-RasおよびRaichu-Rap1を発現させることに成功した。

ヒト線維芽細胞を用いた細胞運動時のイメージング:

2ヶ月間培養し、完全に増殖の停止したTIG-1細胞およびTIG-3細胞に、Raichu-RasおよびRaichu-Rap1ウイルスを感染させ、48時間後に血清とフェノールレッドを含まないMEMに培地を交換した。タイムラプス蛍光顕微鏡で430 nmの励起光を用いて観察すると、老化した細胞に特異的に核周囲に顆粒状の強い緑色蛍光を発する蛋白が認められた。この構造物と老化特異的βガラクトシダーゼとの関連については今後解析する必要がある。

次に、上皮細胞増殖因子を25 ng/mlに添加したときのRasおよびRap1の活性化を観察した。不死化した線維芽細胞では10分をピークにRasの活性化が認められたが、老化し増殖を停止したTIG-1、TIG-3、WI-38細胞は、いずれもRasの活性化は非常に弱かった。しかし、10分以後、Rasの活性が著明に低下していくのが観察された。Rasの活性化は非常に低下していたが、細胞膜のラップリングは、不死化した線維芽細胞と同様に上皮細胞増殖因子依存性に顕著に観察された。

hBRMによる細胞老化誘導の検討: SW13細胞にHA-hBRMを発現させたところ4日目でコントロールと比較してβ-Gal活性の上昇が確認された。この現象はトランスフェクション後6日でも同様であった。蛋白発現はウェスタンブロット法および蛍光染色法にて確認している。SW13細胞にまずFlag-SYT-SSXを単独で発現させたところβ-Gal活性の明らかな変化は起こらなかった。次に、hBRMとSYT-SSXを共発現させたところhBRM単独で認められたβ-Gal活性の上昇は認めなかった。

D. 考察

細胞の老化は現在、細胞増殖の停止という現象により捉えられているが、本研究は、増殖以外の機能にも老化が捕らえられるのではないかとこの観点から研究した。その結果、不死化した細胞と比較すると、上皮細胞増殖因子によるRasの活性化は抑制されており、それに対して、刺激後10分以後のRasの不活化が顕著に認められた。上皮細胞増殖因子にはまずRas活性化因

子であるSosが結合し、ついでRas不活化因子であるp120GAPが結合すると考えられている。したがって、ここで得られた結果は、老化した細胞では上皮細胞増殖因子受容体からSosへのシグナルが抑制されているのに対し、GAPへのシグナルは正常細胞と同等あるいはそれ以上に保たれていると解釈される。老化した細胞においては、外界からの強い増殖刺激は、細胞死を誘導する可能性あり、そのためにRasの活性化があまり起きないようにしている可能性がある。

今年度の研究においてクロマチンリモデリング因子hBRMが、蛋白質一過性発現系を用いた短期間の観察においては細胞老化を促進し、その作用をヒト滑膜肉腫キメラ癌遺伝子SYT-SSX1が抑制することを明らかにした。hBRMはセリンスレオニンキナーゼLKBを介して細胞老化を制御することが報告されているが(Marignani, P. A. et al., J.Biol.Chem., 276, 32415-32418, 2001)、本研究により、hBRMも細胞老化に関与することが明らかとなった。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

老化した細胞においては上皮細胞増殖因子刺激によるRasの活性化が抑制されていることを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Distinct localization of the activated Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in a motile HT1080 cell. Submitted.

2. 学会発表

伊藤玲奈、黒川量雄、大場雄介、吉崎尚良、松田道行: Racの生細胞モニター 第47回日本分子生物学会総会 横浜 平成13年12月

田中伸哉他: 第91回日本病理学会総会ワークショップ (平成14年3月26-28日 於横浜パシフィコ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

分担研究者 松田道行 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 初代ヒト線維芽細胞に活性化型のRas癌遺伝子産物を発現させると細胞が老化することが知られている。老化とRasの関係をより詳細に解析するために、われわれが開発したRas活性化の分子モニターRaichu-Rasを用いて、肺線維芽細胞における上皮細胞増殖因子受容体によるRas活性化を解析した。不死化した細胞と比較すると、老化した初代線維芽細胞においては、上皮細胞増殖因子受容体はRasの活性化をほとんど引き起こさず、むしろ、増殖因子の刺激はRasの活性を低下させることがわかった。

A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを明らかにすることにより、老化に起因する多くの疾病に対する新規の治療標的分子を発見することにある。しかし、老化にかかわる細胞内情報伝達系に関する研究は始まったばかりである。手がかりとして有名な現象は、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型は、初代線維芽細胞においては癌化の誘導は行わずむしろ、細胞の老化を誘導するという現象である。このRasによる細胞の老化は p16INK4aおよびp53に依存する細胞周期の停止を介しているらしい。しかし、不死化した細胞と初代細胞において、なぜRasがこのように異なった反応を引き起こすのかは不明である。本研究では、Rasがいつ、どこで活性化され、そのシグナルが核へ伝播されるのかについて、不死化した細胞と初代培養細胞とを用いて比較する。

B. 研究方法

プラスミド： pRaichu-RasとpRaichu-Rap1については既に報告した。このプラスミドがコードする蛋白Raichuは、YFP、スペーサー、Ras、RafのRas結合領域、スペーサー、Rac1、スペーサー、CFP、スペーサー、Ki-RasのCAAXボックスから成る。

Raichu-Rap1は上記のRasの部位がRap1に置換されている。

組み換えアデノウイルス： Raichu-Ras、Raichu-Rap1、をコードした発現する組み換えアデノウイルスは、Adeno-X expression system (Clontech) を利用して、製品取扱説明書に基づいて作成した。まず、制限酵素切断と連結反応を用いて、プローブのコード翻訳領域をpShuttleにサブクローニングした。次に、プローブの

コード翻訳領域を含む発現ユニットをpShuttle-derived vectorからPI-Sce I とI-Ceu I の制限酵素切断部位で切り出し、同様に制限酵素で切断したpAdeno-Xと連結させた。このpAdeno-X-derived vectorからPac I (New England Biolab) で組み換えアデノウイルスの遺伝子を切り出し、HEK293細胞に遺伝子導入した。増殖した組み換えアデノウイルスを増やすために、HEK293細胞から感染後は10日から14日後に回収した。

細胞： WI38細胞、WI38-VA12細胞、TIG-1細胞、TIG-3細胞は、ヒューマンサイエンス財団より購入した。細胞は、10%ウシ胎児血清を加えたDMEMにて培養した。WI38-VA12細胞以外の細胞は、1週間に1回継代を続けながら、3ヶ月培養し、増殖が停止した時点で使用した。

ヒト線維芽細胞を用いた細胞運動時のイメージング： 細胞に組み換えアデノウイルスを感染させるか、もしくはLipofectAMINE 2000 (GIBCO BRL) を用いてプラスミドをトランスフェクションした。48時間後に、直径35 mmのコラーゲンコートしたガラス底の培養皿播き直し、さらに1時間後に、細胞の画像を撮影し始めた。この際、冷却CCDカメラとCoolSNAP HQ (Roper Scientific, Trenton, NJ) を備えたOlympus IX70倒立顕微鏡をMetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) で制御して、2分毎に2時間撮影した。Raichu-Rasのレシオ画像を取得するため、440AF21励起フィルター、455DRLPダイクロイックミラー、そしてCFPとYFPに対する蛍光フィルター480AF30と535AF25 (Omega Optical Inc.) を使用した。細胞は10% NDフィルターと60倍対物レンズを通した75 Wキセノンランプからの光を照射した。ピンニングは3 x 3に設定し、0.5 秒間露光した。撮影後、画像のバックグラウンドを引き、MetaMorph softwareを用いてYFP/CFプレシオ画像を作成し、これをFRET効率として表示した。

倫理面への配慮: 本研究は細胞バンクに登録されている腫瘍細胞株とプラスミドに挿入されたcDNAを用いるものであり、人体から採取した臨床検体は用いていない。したがって倫理面での問題は生じないと考えられる。

C. 研究結果

老化したヒト線維芽細胞への分子プローブ導入法:

まず、ヒト肺初代線維芽細胞への遺伝子導入法を検討した。通常のリポフェクション法では遺伝子導入効率が低いことがわかったので、組替えアデノウイルスを用いることとした。クローンテック社のアデノXを用いて組替えウイルスを作成し、老化したTIG-1、TIG-3、WI-38細胞へ感染させた。高力価のウイルスを用いることにより、数%の細胞にRaichu-RasおよびRaichu-Rap1を発現させることに成功した。

ヒト線維芽細胞を用いた細胞運動時のイメージング:

2ヶ月間培養し、完全に増殖の停止したTIG-1細胞およびTIG-3細胞に、Raichu-RasおよびRaichu-Rap1ウイルスを感染させ、48時間後に血清とフェノールレッドを含まないMEMに培地を交換した。タイムラプス蛍光顕微鏡で430 nmの励起光を用いて観察すると、老化した細胞に特異的に核周囲に顆粒状の強い緑色蛍光を発する蛋白が認められた。この構造物と老化特異的βガラクトシダーゼとの関連については今後解析する必要がある。

次に、上皮細胞増殖因子を25 ng/mlに添加したときのRasおよびRap1の活性化を観察した。不死化した線維芽細胞では10分をピークにRasの活性化が認められたが、老化し増殖を停止したTIG-1、TIG-3、WI-38細胞は、いずれもRasの活性化は非常に弱かった。しかし、10分以後、Rasの活性が著名に低下していくのが観察された。

Rasの活性化は非常に低下していたが、細胞膜のラップリングは、不死化した線維芽細胞と同様に上皮細胞増殖因子依存性に顕著に観察された。

一方、Rasのアンタゴニストとして知られるRap1は、上皮細胞増殖因子依存性に核周囲で活性が上昇することが知られている。しかし、上述のように、老化した細胞では、核周囲に非常に強い自家蛍光を有する構造物が認められたため、Rap1の活性変化を捉えられなかった。

D. 考察

細胞の老化は現在、細胞増殖の停止という現象により捉えられているが、本研究は、増殖以外の機能にも老化が捕らえられるのではないかという観点から研究した。その結果、不死化した細胞と比較すると、上皮細胞

増殖因子によるRasの活性化は抑制されており、それに対して、刺激後10分以後のRasの不活化が顕著に認められた。上皮細胞増殖因子にはまずRas活性化因子であるSosが結合し、ついでRas不活化因子であるp120GAPが結合すると考えられている。したがって、ここで得られた結果は、老化した細胞では上皮細胞増殖因子受容体からSosへのシグナルが抑制されているのに対し、GAPへのシグナルは正常細胞と同等あるいはそれ以上に保たれていると解釈される。老化した細胞においては、外界からの強い増殖刺激は、細胞死を誘導する可能性あり、そのためにRasの活性化があまり起きないようにしている可能性ある。

今回は、RasファミリーG蛋白のうち、RasとRap1についてのみ研究を行ったが、今後、チロシンキナーゼや、ほかのG蛋白についても解析を進め、今回の発見がどの程度、一般化できるかを調べる必要がある。

一方、核周囲の強い自家蛍光を有する構造物が老化した細胞に特異的に認められたが、これについては今後、その同定を進めるとともに、イメージングの障害となるので、それを除くような手段を考える必要がある。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

老化した細胞においては上皮細胞増殖因子刺激によるRasの活性化が抑制されていることを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Distinct localization of the activated Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in a motile HT1080 cell. Submitted.

2. 学会発表

伊藤玲奈、黒川量雄、大場雄介、吉崎尚良、松田道行: Racの生細胞モニター 第47回日本分子生物学会総会 横浜 平成13年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

細胞老化におけるクロマチンリモデリング機構に関する研究

分担研究者 田中 伸哉 北海道大学医学部分子細胞病理学

研究要旨：クロマチンリモデリング因子は ATP 依存的にクロマチン構造を変換し、転写を制御するものであるが、近年生体の様々な現象を制御することが明らかとなってきた。本研究では Ras によって発現が制御されている SWI/SNF 型リモデリング因子の1つである hBRM が細胞老化を促進することを、内因性の β ガラクトシダーゼ活性を指標に明らかにした。さらに hBRM 結合因子であるヒト滑膜肉腫由来癌遺伝子 SYT-SSX 1 を共発現させることによってこの作用が抑制されることが判明した。

A. 研究目的

クロマチンリモデリング因子は最近様々な生命現象に関与することが知られているが、本研究では細胞老化におけるクロマチンリモデリング因子の役割を明らかにする。具体的には SWI/SNF 型クロマチンリモデリング因子である hBRM の役割を検討する。特に Ras で癌化した細胞では hBRM の発現が低下することが報告されておりまた、hBRM の関連遺伝子である hBRG が LKB を介して細胞老化を制御することが報告されており、Ras による細胞癌化に hBRM の細胞老化機構が関与する可能性もある。

また、本研究では hBRM 結合分子であるヒト滑膜肉腫由来キメラ癌遺伝子産物である SYT-SSX を用いて老化誘導能への影響を検討することで、細胞老化と癌化との関連を解析する。最終的には細胞老化のメカニズムを用いて滑膜肉腫に対する癌治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

1. 様々なヒト腫瘍細胞を様々な濃度の BrdU 存在下に培養し、経時的に内因性の β Gal 活性を測定して、細胞老化誘導能に差があるか否かを検討し、アッセイに適した細胞を選択する。

2. ヒト腫瘍細胞に hBRM を発現するプラスミド DNA を transfection させ、経時的に内因性 β ガラクトシダーゼ活性を測定する。Transfect した蛋白の発現は、蛍光染色法およびウエスタンブロット法にて確認する。

3. hBRM と同時に hBRM 結合蛋白である SYT-SSX を発現させて、老化誘導能に変化があるか否かを検討する。

4. hBRM とともに wild type の SYT、SSX 遺伝子を発現させて、SYT-SSX キメラ癌遺伝子と同様の効果がでるか否かを検討する。

倫理面への配慮：本研究は細胞バンクに登録されている腫瘍細胞株とプラスミドに挿入された cDNA を用いるものであり、人体から採取した臨床検体は用いていない。したがって倫理面での問題は生じないと考えられる。

C. 研究結果

1) β -Gal アッセイ法：ヒト腫瘍細胞 293T、SW13、MCF7、HCT116 において 50-100 μ M の BrdU によって細胞老化が誘導されることを確認した。SW13 細胞では β -Gal 活性は核周囲に強く、293T 細胞では細胞質に瀰漫性に認められた。2) 細胞間の BrdU 感受性の検討：hBRM 欠損株である

SW13 細胞では 10 μ M、293T 細胞では 200 μ M の BrdU 処理後 10 日で十分な β -Gal 活性が検出された。3) hBRM による細胞老化誘導の検討：SW13 細胞に HA-hBRM を発現させたところ 4 日目でコントロールに比較して β -Gal 活性の上昇が確認された。この現象はトランスフェクション後 6 日でも同様であった。蛋白発現はウエスタンブロット法および蛍光染色法にて確認している。4) hBRM 誘導細胞老化能の SYT-SSX による制御：SW13 細胞にまず Flag-SYT-SSX を単独で発現させたところ β -Gal 活性の明らかな変化は起こらなかった。次に、hBRM と SYT-SSX1 を共発現させたところ hBRM 単独で認められた β -Gal 活性の上昇は認めなかった。5) 293T 細胞を用いて 3、4) と同様の実験を行ったところ、293T 細胞においても hBRM によって β -Gal が上昇し、SYT-SSX1 を共発現させることによってその上昇が抑制されるという、同様の結果を得た。

D. 考察

今年度の研究においてクロマチンリモデリング因子 hBRM が、蛋白質一過性発現系を用いた短期間の観察においては細胞老化を促進し、その作用をヒト滑膜肉腫キメラ癌遺伝子 SYT-SSX1 が抑制することを明らかにした。hBRM はセリンスレオニンキナーゼ LKB を介して細胞老化を制御することが報告されているが (Marignani, P. A. et al., J. Biol. Chem., 276, 32415-32418, 2001)、本研究により、hBRM も細胞老化に関与することが明らかとなった。

今後は SYT-SSX1 による細胞癌化と老化との関連を明らかにしていきたいと考えている。具体的には hBRM と SYT-SSX の共発現によって発現が制御される遺伝子を検索する。また、野生型の SYT および SSX を用いて細胞老化との関連を調べることで、まだ生理的機能の不明なこれらの蛋白の役割の一部を明らかにしていく予定である。現在 SYT-SSX トランスジェニックマウスの作成中であり、今後はこれらマウスの初代培養織

維芽細胞を用いて hBRM と細胞老化との関連を明らかにしていく。

また、hBRM の発現が Ras によって癌化した細胞で低下していることから (Muchardt, C., et al., EMBO J, 223-231, 1998)、Ras による発癌機構にも hBRM は関与することが考えられる。今後は Ras によって癌化した細胞株に hBRM を戻してやることによって癌化能を抑制するか否かを検討することで Ras による発癌と hBRM との関連を明らかにしていく予定である。また、Ras の変異が高頻度に認められるヒト膀胱癌細胞の増殖を hBRM が抑制するかを検討する。hBRM は細胞老化を促進するが、既存の抗癌剤に比較すると、はるかに副作用が少ないことが予想され、大量のレトロウイルスなどによる遺伝子治療を行うことが可能であると考えられる。

E. 結論

クロマチンリモデリング因子は SW13 細胞の老化を促進し、その現象は SYT-SSX 分子によって抑制された。本研究によって細胞老化とキメラ癌遺伝子との関連が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特別に健康面に関与する情報は得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田中伸哉他：第 91 回日本病理学会総会ワークショップ (平成 14 年 3 月 26-28 日 於横浜パシフィコ)

H. 知的財産権の登録・出願状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

別紙 5

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M.	Distinct localization of the activated Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in a motile HT1080 cell.	Submitted.			