

201009023A

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業(政策創薬総合研究事業))

p16INK4a蛋白の細胞内局在の解析と老化制御の分子基盤の解明：
生活習慣病に伴う血管障害および癌に対する新規治療開発に向けて

LION FILE

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 五香 麻衣子

総括研究報告書

p16INK4a 蛋白の細胞内局在の解析と老化制御の分子基盤の解明： 生活習慣病に伴う血管障害および癌に対する新規治療開発に向けて

研究代表者 五香 麻衣子 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所流動研究員

研究要旨

ヒト初代培養血管内皮細胞やヒトES細胞やヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞において、細胞の継代に伴う老化と平行してp16^{INK4a}蛋白の合成と共に核移行が観察された。その動態は細胞の種類によって異なっていた。また、ヒトがん細胞株（HeLa細胞）においても抗がん添加と共に細胞老化のマーカーが陽性となりp16^{INK4a}蛋白の核内移行が観察された。HeLa細胞を用いた免疫沈降を主体とする手法による分子機構解析の予備実験などが開始された。なお、核移行と共に細胞膜、オルガネラ分画への移行も観察されることもあり次年度以降の慎重な解析が必要と考えられた。

A. 研究目的

糖尿病等の生活習慣病では血管内皮細胞の早期老化が生じる。一方、老化制御系の破綻は癌化に繋がる。細胞老化の制御機構を正しく理解することは疾患病態を把握する上で重要だが、その制御システムは不明の点が多い。その中でもp16^{INK4a}（以降はp16と省略）遺伝子が重要な役割を演じていることは広く知られる。p16は細胞増殖に必須なキナーゼ cyclin-dependent kinases (CDKs) の阻害分子として同定されたが、強制発現で老化が惹起される、培養を重ねると発現が増加する、高齢動物の細胞で発現が高い、癌でしばしば欠損するなどから、「老化制御の鍵因子」と認識されるに至った。しかしp16による老化制御の分子機序は未だ不明であり、CDKs阻害効果では一過性の細胞増殖停止は説明できても、老化形質（不可逆な増殖停止、形態変化、炎症性サイトカイン誘導、など）は全く説明できない。

従来の研究ではp16遺伝子のメッセージ発現誘導をもって「老化誘発」と結論され、p16蛋白の発現様式は検討されなかった。そこで我々は、ヒト初代培養血管内皮細胞が継代培養を重ねることにより誘導される老化過程においてp16のメッセージおよび蛋白の発現様式を解析した。意外なことに、ヒト血管内皮細胞においては増殖期からp16メッセージが十分に発現しており、継代に依存して発現量は上昇したものの顕著ではなかった。驚くべきことに、p16蛋白の局在に関しては明瞭な変化が起きていた。即ち、p16蛋白は増殖期で

は細胞質に存在し、老化すると核に移行することが解った。さらに驚くべきことに、癌細胞では常にp16蛋白の殆どが細胞質に存在していた。このようなp16蛋白の細胞内局在に関する知見は、その重要性にも関わらず国内外の研究者の誰もが気づいておらず、申請者の独創的な研究成果である。

本研究では、細胞老化の分子機構の解明に向けてp16蛋白の局在制御の分子基盤を明らかにする。具体的には、p16蛋白の新規結合パートナーの同定、核と細胞質でのp16蛋白の修飾差異を明らかにする。さらにp16蛋白の修飾や結合パートナーの特性に影響を与える薬剤をスクリーニングすることで、糖尿病性血管障害の治療薬（血管内皮細胞の早期老化抑制薬）、癌治療薬（強制的老化誘発薬）の開発に向けて研究を展開する。さらに培養細胞を用いた実験により、これらの薬剤の効果と毒性を判定する。以上、ウェット（細胞培養）とドライ（分子解析）の2つの実験系を駆使しながら、生活習慣病や癌などの細胞老化に関わる諸疾患に対する創薬研究を実行する。

B. 研究方法

1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞（murine embryonic fibroblasts, MEF）はマイトマイシンC

（MMC）処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。カニクイザルES細胞（CMK-6）、

ヒトES細胞 (KhES-1、KhES-3、HES-3)、ヒトiPS細胞 (京都大学由来株 (201B7、253G1)、成育医療センター由来株 (#25、#40)) は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上で培養した。コロニーの大きさやディッシュ上でのコロニー密度に注意し、継代時の剥離はトリプシンとコラゲナーゼを用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (human aortic endothelial cells, HAEC) は、ロンザグループ社から購入した。

2. 分化誘導プロトコール

未分化サルES細胞 (CMK-6)、ヒトES細胞 (KhES-1、KhES-3)、ヒトiPS細胞 (201B6、201B7、253G1) をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed社のHydro cellを用いて3日間スフェア (sphere) 形成させた。一部の実験においては、未分化ES細胞、iPS細胞を、コラゲナーゼ処理によりMEFの混入を避けて回収した後に、ハンギングドロップ方により3日間スフェア (sphere) 形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子 (vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6)) を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子は同様の6種類である。ヒトの場合、平面培養後、2週間以内に敷石状の細胞が増殖して、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。サルの場合は、2週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所にも囊状構造物が形成され、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。

3. 形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。

4. 免疫染色法

細胞の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1次抗体と反応させ、アレクサ標識2次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。解析した抗原は、p16、p21、

リン酸化p38MAPキナーゼ、等である。p38MAKキナーゼの阻害実験においては、特異的低分子阻害剤であるSB203581を用いた。

5. ウェスタンブロッティング

既報の手法によってウェスタンブロッティングを行った。2次抗体と発色はECLキットを用いた。

6. 免疫沈降

既報の手法により行った。沈降に際しては、セファロースビーズの他に多摩川精機から供与されたナノ磁性体ビーズも用いた。

7. MS解析

セラバリュ社に委託して行った。

8. β ガラクトシダーゼ測定

細胞を2%formaldehyde/0.2%glutaraldehydeで固定した後に、SA- β -Gal染色液で反応させて、測定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。

ヒトES細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成17年11月9日に、ヒトES細胞の使用計画の文部科学大臣の確認を初めて受けた (17諸文科振第734号)。その後、研究者の追加・削除と研究業績の変更、使用期間と使用の方法の変更、使用機関の基準に関する説明の変更についても平成18年11月24日に文部科学大臣の確認を得た (18諸文科振第743号)。さらにその後、文部科学省指針の改定に伴う変更と使用の方法の変更についても平成19年12月18日に文部科学大臣の確認を受けた (19国文科振第26号)。さらにその後、研究者の追加・削除について平成20年3月11日、10月27日に文部科学省に届け出た。さらにその後、使用の期間の変更、ヒトES細胞株の変更について平成21年7月13日に文部科学大臣の確認を得た (21諸文科振第6491号)。

C. 研究結果

1. サルES細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞の老化とp16、p21の動態

サルES細胞から分化誘導した血管内皮細胞は8継代までは増殖したが、次第に細胞のサイズが増大して、細胞増殖が遅延し、最終的には増殖を停止した。増殖初期にはp38の活性化は認めず、p16、p21の発現も認めなかったが、老化に一致してp38の活性化を認めた。p16も発現が誘導されたが、核内集積は一部の細胞でしか認められなかった。一方、p21は明瞭な核内集積を認めた。

ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞においても、サルES細胞からの分化誘導の場合と同様に、継代を重ねると細胞増殖の遅延と細胞サイズの増大など、細胞老化と考えられる状態に陥った。細胞老化に至るまでの継代数は、サルES細胞の場合と異なりヒトES細胞(KhES-1)では20継代程度であった。増殖期の比較的早期からp38活性化を認めたが、p16タンパクは細胞質に局在していた。増殖中期には一部の細胞でp16タンパクの核内集積が見られたが、p21の発現はその時点では乏しく、老化時にはp16とp21の核内集積を認めた。

ヒトiPS細胞においては、10継代程度で細胞老化が認められた。増殖初期からp38活性化を認めたが、p16のタンパク発現は認めなかった。また、増殖中期から後期にかけてp16およびp21のタンパク発現を認めたが、主に細胞質に局在していた。また、p16は老化時にも一部の細胞でしか核内集積を認めなかったが、p21は明瞭な核内集積を認めた。

なお、いずれの細胞においても、老化した細胞においてのみ、SA- β -galが陽性を示すことを確認した。

2. ヒト初代培養血管内皮細胞における細胞老化とp16の動態

ヒト初代培養血管内皮細胞の中でも、HUVEC、HAECを用いて、増殖曲線を検討して細胞老化の可能性を解析したところ、21継代前後で増殖速度が落ちて、細胞のサイズの増大が認められた。HUVECを用いてp16の細胞内の局在を、核と細胞質に分けてウェスタンブロッティングによって検討したところ、継代と共に細胞質から核への移行が確認された。

3. HeLa細胞におけるp16の動態

HeLa細胞においては、p16蛋白そのものの発現量が極めて多く、安定した分子解析が可能と考えられ、血管内皮細胞ではないが、この細胞も使用した。HeLa細胞においては、シスプラチンやドキソルビシン等の抗がん剤によるp16発現と核移行が確認された。この時、SA- β -galが陽性を示すことを確認したので、細胞死のみではなく細胞崩壊が同時に惹起されていることが示され、血管内皮の老化と類似の機序が視される。

4. 免疫沈降法によるp16結合蛋白解明の基礎検討

p16核内移行などの分子機構を解明するために、p16免疫沈降複合体の蛋白解析を行った。

まず、HeLa細胞から抽出して可溶化した蛋白を解析した。免疫沈降に際しては市販のセファローースビーズよりも共同研究者の多摩川精機のナノ磁性体ビーズが非特異的吸着も少なく優れていることが判明したので今回の検討ではこれを用いることとした。沈降物の中に、既にp16と結合することが分かっている分子の存在を確認したところ、CDK4、CDK6の共沈が確認された。これ以外に明らかに検出されるバンドがなかったので、マス解析を行うこととした。また、p16自身の修飾による可能性も考慮して、アセチル化抗体による検討を行い、アセチル化の可能性も示唆された。マス解析は、共同研究者のセラバリュウ社に委託し、MALDI-TOF/MS、MSMSを行って行く予定である。また、核移行のみではなく、細胞膜・オルガネラ分画への移行も認められることも判明、今後の検討課題となった。

D. 考察

本年の研究においては、p16の動態についてさまざまな血管内皮細胞(ヒトES細胞やヒトiPS細胞から我々独自の手法によって分化誘導した血管内皮細胞を含む)やHeLa細胞等において解析するという基礎的検討を十分に行い、分子解析の容易さから、抗がん剤による細胞老化(類似現象)を起こすHeLa細胞を分子解析のツールとして選んだ。また、p16の結合パートナーやp16自体の修飾の解析の糸口となる手法の創出や新たな発見も有り、また、強力な共同研究者の参加も見込まれて、来年度へ向けての準備態勢が十分に整ったと言える。

糖尿病等の生活習慣病に伴う血管障害では内皮細胞の早期老化が起きるとされている。一方、癌では老化制御系が破綻により細胞の不死化が起きる。このように老化制御系の異常は生活習慣病や癌の発症および進展に深く関与しているが、細胞老化制御システムの全貌は明らかにされていない。その中でp16 遺伝子の老化制御への関与は特に注目されている。当初、p16 は細胞周期制御因子 (cyclin-dependent kinases (CDKs) 阻害分子) として同定されたが、1) 強制発現で老化が惹起される、2) 継代培養を重ねると発現が増加する、3) 高齢個体の細胞で発現が高い、4) 癌でしばしば欠損する、などから老化制御の鍵因子と認識されるに至った。しかしp16 による老化制御の分子機構は全く解っていない。この理由は、従来の研究ではp16 メッセージ発現量だけが議論され、蛋白レベルでの解析はされなかったことにあると考えている。そこで本研究では、これまで手つかずであったp16 に関して蛋白レベルでの解析を行って生活習慣病や癌の病態生理に関する新知見を積み重ねていくとともに、これらに疾患に対する新規治療薬の開発研究を実施してゆきたい。

我々は、p16 蛋白の発現様式に関して重要な事実を見いだしている。ヒト血管内皮細胞を用いた解析において、従来の予想に反してp16 メッセージは対数増殖期から発現していること、老化に伴う発現量の変化はわずかであることがまず判明した。さらに、p16 蛋白は増殖期には細胞質に局在し、老化すると核に移行することが明らかとなった。一方、癌細胞ではp16 蛋白の大部分が常に細胞質に存在することも判明した。以上から、これまでの細胞老化はp16 遺伝子の転写により制御されているという予想は誤りであり、細胞老化はp16 蛋白の細胞内局在の変化により制御されるのではないかと考えられた。

本研究では研究期間内に、p16 蛋白の新規結合パートナー、核と細胞質でのp16 蛋白の修飾差を同定することを目指した研究を進める。またパートナーとの結合特性や蛋白修飾に影響を与える薬剤のスクリーニングと、培養細胞への添加実験による効果と毒性の検証を通して、糖尿病性血管障害や動脈硬化症の治療薬 (血管内皮細胞の早期老化抑制) および癌治療薬 (強制的細胞老化誘導) の開発を行ってゆきたい。

E. 結論

研究初年度は様々の種類のヒト血管内皮細胞の老化と共にp16 蛋白の合成と核移行が観察された。その動態は細胞の種類によって異なる

っていた。また、HeLa 細胞においても抗がん添加と共に細胞老化のマーカーが陽性となりp16 蛋白の核内移行が観察された。HeLa 細胞を用いた免疫沈降を主体とする手法による分子機構解析が開始された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. Cellular Reprogramming in press, 2011.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



古紙配合率100%再生紙を使用しています