153. 老化細胞の生存機構阻害による老化細胞除去法の開発

長野　太輝

神戸大学 バイオシグナル総合研究センター シグナル統合経路研究部門

Key words：LY6D，空胞，細胞老化，マクロピノサイトーシス

緒　言

近年、老化関連疾患の発症の原因として「細胞老化」が注目されている［1］。細胞老化は加齢やDNA損傷などの刺激によって誘導されるストレス応答であり、細胞分裂の永続的な停止が最大の特徴である。細胞老化に至った細胞（老化細胞）は、分裂停止による自己再生能の消失に加え、炎症性サイトカインなどの分泌タンパク質を放出することから、周囲の細胞や組織の機能に大きな影響を与えることが知られている［2］。実際、Bakerらが老化細胞を体内から除去できるように遺伝子改変したマウスを作製した結果、心血管疾患や認知症といった老化関連症状の改善および寿命の延長が見られたことから、体内の老化細胞を除去することが老化関連疾患の有効な治療法となる可能性が示されている［3］。このような背景から、老化細胞に細胞死を誘導することで体内から除去する薬剤の探求が盛んに行われており、マウスを用いた研究から現在約 7 種類が報告されている。この中にはヒトでの臨床応用が進められているものもあるが、ヒトで重篤な副作用を引き起こす例も知られており、変形性関節症などごく一部の疾患の治療にしか適用されていないのが現状である。これは現在研究されている老化細胞除去薬がいずれも細胞の抗アポトーシスシグナルを抑制することで細胞死を誘導するため、老化していない正常な細胞もアポトーシスにより排除してしまうことが主な原因であると考えられている。この課題を解決するためには、老化細胞のみで特異的に働いている生存維持メカニズムを阻害し、細胞死を誘導する薬剤の開発が必要である。

そこで本研究では、我々が独自に同定した老化細胞特異的な遺伝子である *LY6D*［4］を標的とした老化細胞除去法の開発の基盤となる実験を行う。我々は現在までに、LY6D が老化時に発現上昇し、Src Family Kinase（SFK）や Ras を介してエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスを誘導することを見出している［5］。マクロピノサイトーシスは Ras 変異がん細胞において周囲の細胞外液を大量に取り込むことにより細胞の生存に必要な栄養分の補充を行っていることが報告されている。老化細胞は高い代謝活性を持ち、生存に多量のエネルギーを必要とすることが知られているため、老化誘導に伴うマクロピノサイトーシスを阻害した際の細胞生存率の変化を解析する。また、細胞外に存在する LY6D が細胞内の SFK を活性化するメカニズムは未知であるが、何らかの細胞膜貫通タンパク質が細胞外から細胞内へのシグナル伝達を担っていることが予想される。この膜貫通タンパク質はマクロピノサイトーシス阻害の標的因子となる可能性があるため、質量分析法により LY6D と相互作用する膜タンパク質の探索を行う。

方　法

1. 細胞培養、薬剤処理

ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞およびヒト正常繊維芽細胞 Hs68 細胞は 10% FBS を含む DMEM を用い、37℃、5%CO_2存在下で培養した。細胞への発現ベクターのトランスフェクションは Effectene Transfection Reagent（Qiagen）を用いて行った。本研究に用いた発現ベクターは以下である：pcDNA3-HA-Ras（野生型および活性化型 G12V、下流のシグナル因子との相互作用が変化する T35G、E37G、Y40C の各種 Ras の N 末端に HA タグが付加された配列を持つ）および、pEGFP、pcDNA3-HA-LY6D および p3xFLAG-LY6D（野生型 LY6D のシグナルペプチド配列の直後に HA タグおよび Flag タグが付加された配列を持つ）。細胞老化の誘導は DNA 二本鎖切断を引き起こす

Etoposide を細胞に 48 時間処理し、その後薬剤を含まない DMEM で 5 日間培養することで行った［4］。LY6D のノックダウンは ON-TARGETplus Smart Pool siRNA for LY6D（GE Healthcare Dharmacon、L-012615-01）を Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent（ThermoFisher）でトランスフェクションすることで行った。PI3K の阻害は wortmannin または LY294002 を培養液に加えることで行った。また、低アミノ酸条件下での細胞培養には 0.2 mM グルタミンを含む DMEM を用いた。

2. 空胞形成の観察

Ras または LY6D を過剰発現させた細胞を顕微鏡（BZ-9000、Keyence）により撮影した位相差画像により空胞形成を観察した。Ras または LY6D の発現ベクターを導入する際にトランスフェクションマーカーとして GFP 発現ベクター（pEGFP）を用い、GFP 陽性細胞について空胞の有無を計数し、空胞形成率を計算した。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は WST-1 アッセイまたはクリスタルバイオレット染色により行った。WST-1 アッセイは 96 ウェルプレートで培養した細胞に WST-1 試薬（Roche）を添加し、37℃で 20 分間インキュベーションすることで行った。生細胞のミトコンドリア脱水素酵素により生じたテトラゾリウム塩の生成を 450 nm の吸光度よって測定した。クリスタルバイオレット染色は 12 ウェルプレートで培養した細胞をクリスタルバイオレット（Wako）で染色することで行った。ウェル内の染色された部分を生細胞が定着していた部分とし、その面積を定量することで細胞生存率を比較した。

結　果

1. LY6D は PI3K を活性化させることでマクロピノサイトーシスを誘導する

LY6D によるマクロピノサイトーシスの誘導には SFK-Ras が必要であることを既に見出しているが、Ras の下流で働く因子はまだ明らかでない。Ras の活性化型変異体（G12V）を U2OS 細胞に過剰発現させると、マクロピノサイトーシスによる空胞形成が誘導されるが（図 1a）、そこに MAPK、Ral、PI3K のそれぞれの経路を選択的に活性化させることが知られている 3 種の変異（T35S、E37G、Y40C）［6］をさらに導入することで、空胞形成にどの因子が関わっているかを調べた。その結果、T35S および E37G では空胞形成が消失したのに対し、Y40C では空胞形成を誘導したことから、空胞形成には PI3K が関与することが示唆された（図 1a）。空胞形成に PI3K の活性が必要であるか明らかにするため、PI3K の阻害剤である Wortmannin および LY294002 存在下で LY6D および Ras を過剰発現させた結果、いずれの過剰発現による空胞形成も PI3K 阻害によって抑制されたことから、Ras は PI3K を活性化させることで空胞形成を誘導することが示唆された（図 1b）。また、マクロピノサイトーシスの誘導にはアクチン重合が関わり、PI3K がアクチン重合を促進することが知られているため、アクチン重合の阻害剤であるサイトカラシン D を細胞に処理したところ、LY6D の過剰発現で誘導される空胞形成が大きく抑制された（図 1c）。以上の結果から、LY6D は Ras－PI3K 経路を活性化させることでアクチン重合を促進し、マクロピノサイトーシスを誘導することが示唆された。

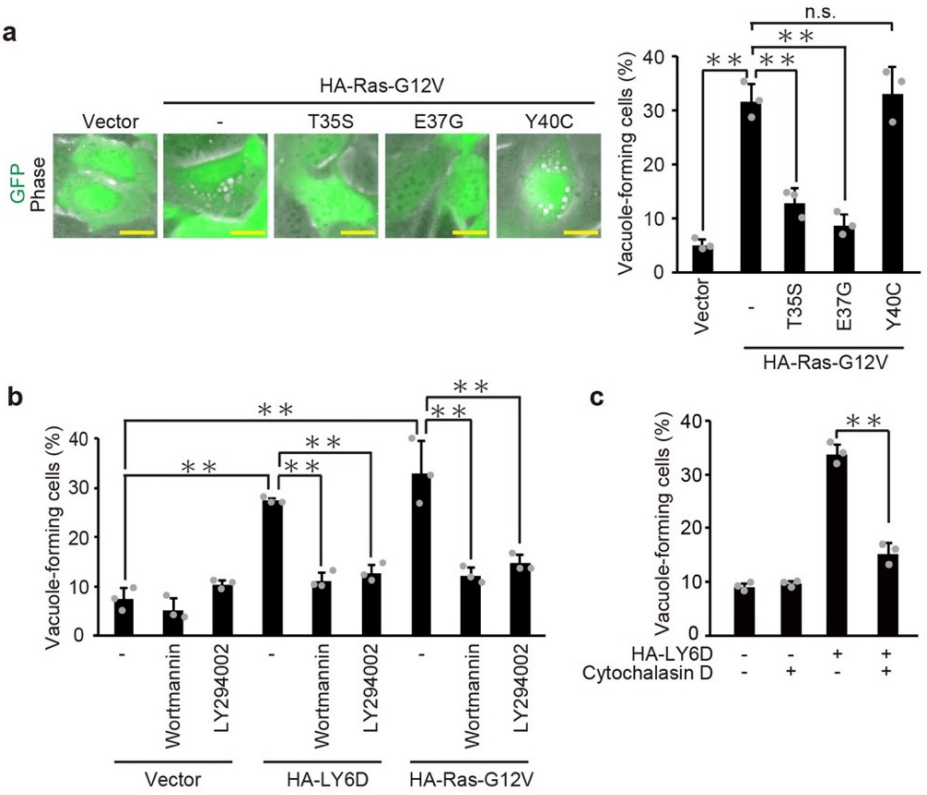

図 1. LY6D は PI3K を活性化させることでマクロピノサイトーシスを誘導する［5, 改変］

a) U2OS 細胞に各種の変異体 Ras を発現させる pcDNA3-HA-Ras（G12V のみ、あるいは G12V に加えて T35S、E37G、Y40C の変異を持つもの）とトランスフェクションマーカーとして pEGFP をトランスフェクションし、24 時間後に顕微鏡観察を行った。代表的な写真（左）および GFP 陽性細胞中の空胞形成細胞の割合（右）を示す。スケールバー：20 μm。

b) U2OS 細胞に pcDNA3-HA-LY6D あるいは pcDNA3-HA-Ras-G12V と pEGFP をトランスフェクションし、8 時間後に 1 μM Wortmannin あるいは 20 μM LY294002 を処理し、その 16 時間後に顕微鏡観察を行った。GFP 陽性細胞中の空胞形成細胞の割合をグラフに示す。

c) U2OS 細胞に pcDNA3-HA-LY6D と pEGFP をトランスフェクションし、8 時間後に 200 nM サイトカラシン D を処理し、その 16 時間後に顕微鏡観察を行った。GFP 陽性細胞中の空胞形成細胞の割合をグラフに示す。

**p＜0.01、n.s.：not significant（p＞0.05）（Student's *t*-test）。

2. LY6D の相互作用因子として 30 種類のタンパク質が得られた

細胞膜上で LY6D と相互作用する因子を探索するため、U2OS 細胞に Flag-LY6D を過剰発現させ、抗 Flag 抗体（F3165、Sigma Aldrich）による免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE により分離後、銀染色により可視化されたバンドのうち、コントロールとなる空ベクターをトランスフェクションした細胞に比べて Flag-LY6D 過剰発現細胞で強いシグナルが観察された 4 箇所の領域をリニアイオントラップ電場型フーリエ変換質量分析計による質量分析に供し、含まれるタンパク質を網羅的に解析した。解析により得られたタンパク質のうち、1）：Flag-LY6D 過剰発現細胞でコントロール細胞より多く検出されたもの、2）：細胞膜に局在するもの、以上の二つの要件を満たすものを LY6D と相互作用する可能性のある因子とした結果、30 種類の候補タンパク質が同定された。今後、これらタンパク質と LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導との関連を明らかにしていく予定である。

3. LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導は老化細胞の生存に寄与している

次に、LY6D が誘導するマクロピノサイトーシスの老化細胞における意義を解析した。Ras 変異によって生じたがん細胞がマクロピノサイトーシスにより細胞外液に含まれるタンパク質をアミノ酸源として利用することが報告されていること［7］、および老化細胞とがん細胞は共に高い代謝活性を持つという共通点から、老化細胞においてもマクロピノサイトーシスが細胞外液やタンパク質の取り込みを促進し、生存維持に働いている可能性が考えられたため、これを検証した。まず、老化細胞を低アミノ酸条件下で培養した際の細胞生存率を WST-1 アッセイにより測定した結果、正常細胞に比べ老化細胞の方が低アミノ酸への感受性が高いことがわかった（図 2a、Bar1 および 5）。また、培地に BSA を添加すると、老化細胞のみで生存率の上昇が見られたことから、老化細胞で促進されたマクロピノサイトーシスが BSA の取り込みを促進した可能性が考えられた（図 2a、Bar5 および 6）。次に低グルタミン条件下での BSA 添加による生存率回復が LY6D によるマクロピノサイトーシスによるものかを調べるため LY6D をノックダウンしたところ、BSA 添加による生存率上昇が見られなくなった（図 2b、Bar4 および 8）。同様の実験をヒト正常繊維芽細胞株である Hs68 細胞において実施し、クリスタルバイオレットによる生着細胞の染色で生存率を定量した結果、U2OS 細胞と同様、LY6D 依存的な BSA 添加による生存率の上昇が見られた（図 2c、Bar4 および 8）。以上の結果から、LY6D は特定の低栄養状態においてマクロピノサイトーシスを誘導することで老化細胞の生存に寄与している可能性が明らかとなった。

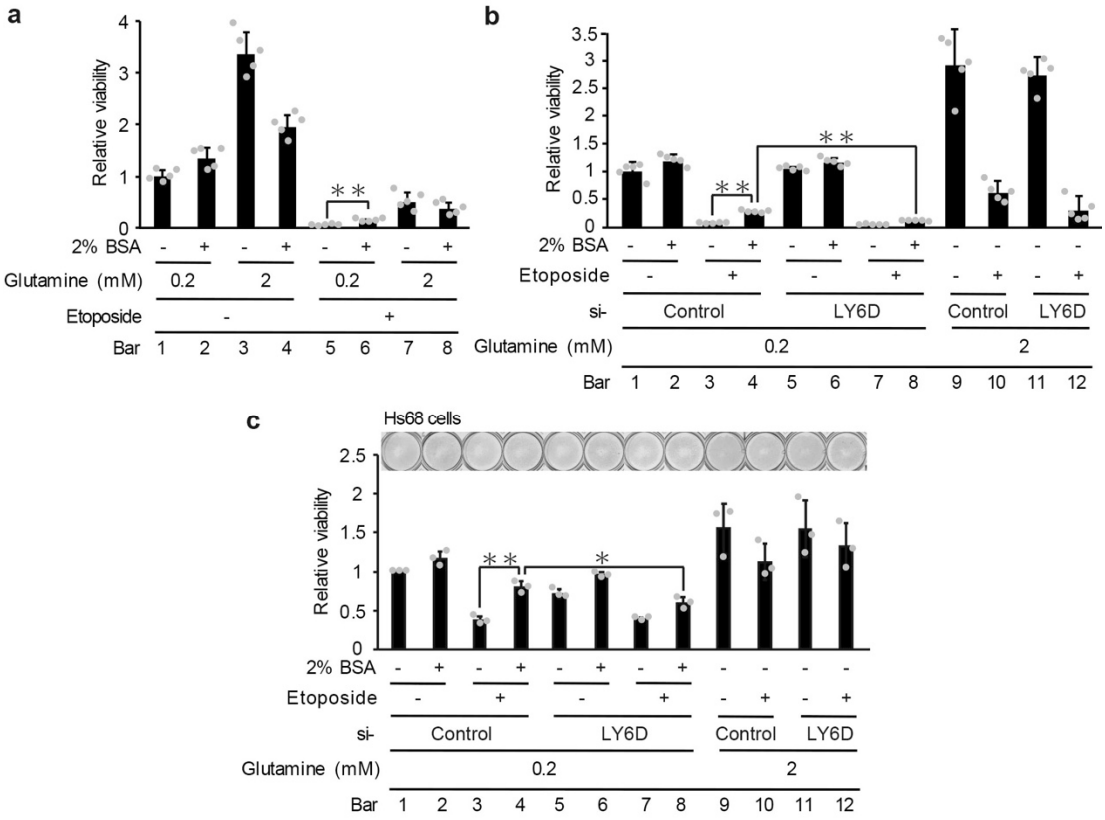

図 2. LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導は老化細胞の生存に寄与している［5, 改変］

a) U2OS 細胞に 2 μM Etoposide を 7 日間処理することで細胞老化を誘導した後、記載したグルタミン濃度および BSA 条件下でさらに 7 日間培養した。細胞の生存率は WST-1 アッセイにより定量化した。

b、c) U2OS 細胞（b）および Hs68 細胞（c）に LY6D に対する siRNA をトランスフェクションした後、(a) と同様の培養を行い、WST-1 アッセイ（b）あるいはクリスタルバイオレット染色（c）で細胞生存率を定量化した。

*p＜0.05、**p＜0.01（Student's t-test）。

考　察

本研究より LY6D は PI3K を活性化することでアクチン重合を引き起こし、マクロピノサイトーシスを誘導していることが明らかとなった。以前までの研究から LY6D は細胞膜の脂質ラフト上に SFK-Ras と共に集積し、この SFK-Ras の活性がマクロピノサイトーシス誘導に必要なことを見出していたことから、LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導は LY6D－SFK－Ras－PI3K というシグナル伝達経路により起こることが明らかとなった。細胞膜上に存在する LY6D がどのようなメカニズムで細胞内の SFK を活性化するかは未知であるが、本研究で LY6D の相互作用因子を質量分析により網羅的に解析した結果、30 種類の候補因子を同定している。今後はこれら因子から実際にどの因子がマクロピノサイトーシス誘導に働いているかを明らかにすることが課題である。

また、LY6D が老化細胞でマクロピノサイトーシスを誘導することの生理的意義として、細胞外液を取り込むことで栄養源の補給を行っている可能性が明らかとなった。老化細胞は低グルタミン条件下での生存率の低下を示し、これが培養液への BSA の添加で緩和された。さらに BSA 添加による生存率の回復が LY6D のノックダウンにより抑制されたことから、老化細胞はマクロピノサイトーシスにより細胞外液に含まれる物質を取り込み、栄養源として利用している可能性が示唆された。本研究では LY6D ノックダウンによる老化細胞の生存率低下を観察したが、それ以外にも本研究で明らかにしたマクロピノサイトーシス誘導に関わる因子を阻害することで、老化細胞に細胞死を誘導できる可能性が考えられる。また、上記の LY6D と相互作用する因子の探索で新たに発見された因子にも着目することで、正常細胞に影響を与えず、老化細胞特異的に細胞死を誘導する手法の開発が可能となることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は神戸大学バイオシグナル総合研究センターシグナル統合経路研究部門の鎌田真司教授のもとで行われた。

文　献

1) Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol. 2013;75:685-705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23140366; PMCID: PMC4166529.

2) Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. J Clin Invest. 2013 Mar;123(3):966-72. doi: 10.1172/JCI64098. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23454759; PMCID: PMC3582125.

3) Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. Nature. 2016 Feb 11;530(7589):184-9. doi: 10.1038/nature16932. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26840489; PMCID: PMC4845101.

4) Nagano T, Nakano M, Nakashima A, Onishi K, Yamao S, Enari M, Kikkawa U, Kamada S. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. Sci Rep. 2016 Aug 22;6:31758. doi: 10.1038/srep31758. PMID: 27545311; PMCID: PMC4992837.

5) Nagano T, Iwasaki T, Onishi K, Awai Y, Terachi A, Kuwaba S, Asano S, Katasho R, Nagai K, Nakashima A, Kikkawa U, Kamada S. LY6D-induced macropinocytosis as a survival mechanism of senescent cells. J Biol Chem. 2020 Nov 9;296:100049. doi: 10.1074/jbc.RA120.013500. Epub ahead of print. PMID: 33168631; PMCID: PMC7948989.

6) White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, Karin M, Wigler MH. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. Cell. 1995 Feb 24;80(4):533-41. doi: 10.1016/0092-8674(95)90507-3. PMID: 7867061.

7) Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, Grabocka E, Nofal M, Drebin JA, Thompson CB, Rabinowitz JD, Metallo CM, Vander Heiden MG, Bar-Sagi D. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. Nature. 2013 May 30;497(7451):633-7. doi: 10.1038/nature12138. Epub 2013 May 12. PMID: 23665962; PMCID: PMC3810415.