

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 新生児期の細胞特性へのアプローチの試み

申 請 者 氏 名 關根 沙知

担当指導教員氏名 田中 亨 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 人間生物学系
専攻分野 生体構造医学
専攻科 病理学

論文要旨

氏名 關根 沙知

表題

新生児期の細胞特性へのアプローチの試み

1 研究目的

小児期の臓器の未熟性の特徴については以前から研究が進んでおり、臨床現場では活用されている。しかし、新生児期・小児期の細胞特性についての研究は進んでおらず、メカニズム解明は十分には行われていない。今回我々は、新生児期の細胞レベル・分子レベルの特徴を一つでも明らかにすることで小児疾患の治療の一助となることを目指し、いくつかのアプローチでその解明を試みた。

オリゴヌクレオチドマイクロアレイにより新生児期に優位な候補遺伝子を絞り込み、この候補遺伝子の解析を行うこととした。細胞の未熟性・幼若性を評価する確立した簡便な実験方法がないため、『細胞老化の負の調節因子』に着目して、研究を組み立てることとした。また、小児がん細胞は成熟が止まった状態と考えられていることから、小児がんは新生児期の特性を残している可能性がある。そのため、小児がんで候補遺伝子の機能評価を行うことは、新生児期の特性につながる可能性があると考えた。

以上より、抽出した遺伝子における細胞老化抑制の効果と小児がん細胞での候補遺伝子の機能・役割の評価を行うことは、新生児期の細胞特性の評価につながると考え、本研究を行った。

2 研究方法

マイクロアレイ解析に基づいて新生児期に発現の高い遺伝子を選択し、免疫組織化学的検討およびウエスタンブロット法によって候補遺伝子の絞り込みを行った。候補遺伝子として *Igf2bp3* (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3) と *Snai2* (snail family transcriptional repressor 2) を抽出した。マウス胎仔線維芽細胞 NIH3T3 細胞、マウス成体線維芽細胞 L929 細胞を用いて、候補遺伝子をノックダウンもしくは過剰発現させ、VP-16 (Etoposide) を用いた DNA 損傷下での老化関連アッセイ SA- β -GAL (senescence-associated beta-galactosidase)、p53 (gene symbol; Trp53) および p21 (gene symbol; Cdkn1a) の発現を評価した。*Igf2bp3* に関しては液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) によって形成される膜のない細胞内構造であるストレス顆粒 (stress granules: SG) の構成要素として機能するという特徴を有していることから、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Green Fluorescent Protein) にて標識した *Igf2bp3* (*Igf2bp3*-GFP) を用いて、*Igf2bp3*-GFP を過剰発現した L929 細胞および NIH3T3 細胞で SG の特徴であるドット状形成の観察を行った。

また臨床応用として、ヒト神経芽腫細胞を用いて評価を行った。*Igf2bp3* のノックダウンを計画

したが、抑制できなかった。そのため、*Igf2bp3* が N^6 -メチルアデノシン (m^6A RNA) のリーダーとして働くという特徴を利用し、 m^6A RNA の主要なメチル基転移酵素である *METTL3* を制御した時の SA- β -gal 活性と p53・p21 の発現の評価を行った。

3 研究成果

Igf2bp3 と *Snai2* は、新生仔期に高い発現を示す遺伝子として検出され、免疫組織化学的検討およびウエスタンブロット法でも新生仔期の優位性が確認できた。成体細胞を用いて *Snai2* を過剰発現させた場合、VP-16 によって誘導される細胞老化においては抑制効果を認め、胎仔細胞での siRNA を介した *Snai2* のノックダウンでは、細胞老化を有意に増強した。一方で、*Igf2bp3* に関しては、過剰発現もしくはノックダウンによる細胞老化への有意な影響は認めなかった。そのため、成体細胞と胎仔細胞に対して *Igf2bp3*-GFP を強制発現させ蛍光観察すると、SG の特徴であるドット状形成が成体細胞よりも胎仔細胞でより明確に観察された。またドット状構造の蓄積は VP-16 投与下でより増加し、対照的に 1, 6-ヘキサンジオール処理で減少することが確認できた。臨床への応用として、神経芽腫細胞を用いた検討では、*METTL3* のノックダウンの状態下において、VP-16 を投与すると細胞老化が誘発されるとともに、TP53 の発現が増強することが示された。

4 考察

Snai2 の機能解析においては、*Snai2* の強制発現時に成体細胞で DNA 損傷後に誘発される細胞老化の減弱作用が明らかになった。さらに *Snai2* をノックダウンした場合、胎仔細胞で DNA 損傷によって誘発される Trp53 の発現が増強された。以前の報告では、*SNAIL2* 欠損細胞は DNA 損傷に対して放射線感受性であることや *MDM2* (a ring-finger-containing E3 ligase that ubiquitinates Slug, Double minute 2 protein) を誘導することによって TP53 の分解を促進することが示されている。*Snai2* においては本研究でも過去の報告に沿った結果が得られているが、細胞老化抑制と関連づけての報告は初めてである。

また *Igf2bp3* の機能解析においては、各新生仔期の臓器で高い発現を認めていたが、細胞老化の観点ではその機能は示せなかった。そのため、SG に注目し、*Igf2bp3*-GFP を強制発現させて蛍光観察をした。SG は mRNA の翻訳と安定性の調節に関与しているが、成体細胞よりも胎仔細胞で多くの SG を誘導する傾向にあった。今後、定量的評価を行うことで、*Igf2bp3* の機能評価につながる可能性が示唆された。

神経芽腫は小児によくみられる固形腫瘍の一つで、集学的治療を行っても予後不良なものから、自然退縮するものまで経過は様々で、高リスク群においては現在も新しい治療法が望まれる疾患である。*METTL3* のノックダウンの研究においては、DNA 損傷下にあるヒト神経芽腫細胞では細胞老化と TP53 活性化が誘導され、*METTL3* の抑制が VP-16 の効果を強める可能性が示された。癌生物学的な側面においては、*METTL3* がより高く発現している膀胱癌細胞では化学療法および放射線療法への耐性を示し、癌細胞の増殖と浸潤を促進しているとの報告もある。以上より *METTL3* は神経芽腫において治療標的となる可能性が示された。

5 結論

新生児細胞の特性という、確立した評価方法のない分野において、複数のアプローチを通して、細胞特性の解明を試みた。結果として *METTL3* や新生児期に発現する *SNAI2* が細胞老化を抑制している可能性を示した。すなわち、新生児期に発現する遺伝子の一部は細胞老化の負の調節因子であると考えられる。本研究により、新生児期細胞の分子レベルの特徴の一端を示すことができたと考えている。