

学位論文題名

Death-associated protein 3 regulates  
cellular senescence through oxidative stress response

(Death-associated protein 3の細胞老化における機能解析)

学位論文内容の要旨

【目的】

DAP3 (Death-associated protein 3)はインターフェロン $\gamma$ による細胞死に関与する遺伝子として単離・同定され、Hela細胞株に強制発現させると細胞死を誘導することが報告されてきた。また最近、DAP3がミトコンドリアに主に存在することが明らかとなり、DAP3のミトコンドリア代謝における機能についてもその関与が示唆されている。しかし、DAP3によるアポトーシス誘導メカニズムもしくはミトコンドリア代謝における機能については不明な点が多い。一方、細胞老化には種々のストレス応答関連遺伝子が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、アポトーシス関連遺伝子はストレスを受けた後の細胞の運命(Death or Senescence)を決定づけるのに重要な役割を果たしていると考えられ、癌化からの逸脱という観点からもその関与が注目されている。そこで、我々はDAP3の細胞老化における機能を探索する目的で、正常細胞の継代およびストレス暴露による細胞老化におけるDAP3の発現変化を観察した。さらにshRNAを用いたDAP3タンパクの発現抑制がストレス感受性および細胞老化に及ぼす影響について検討した。

【結果】

DAP3タンパクはMRC5(正常細胞)継代による細胞老化でその発現が経時的に減少することが明らかとなった。またYMM/TERT細胞を用いてStress-Induced Premature Senescence(SIPS)におけるDAP3発現変化を検討したところ、過酸化水素刺激でのみ減少し、同等に細胞老化を誘導するUVもしくは $\gamma$ 線刺激ではDAP3は減少しなかった。DAP3はミトコンドリア移行シグナルをもつが、ミトコンドリアに加えて細胞質での発現も報告されている。YMM/TERT細胞を分画して検討したところ、SIPSにおけるDAP3の減少は主にミトコンドリア画分で観察された。次に、shRNAを用いてDAP3の発現減少(ノックダウン)が細胞老化に及ぼす影響を検討した。Clonogenic survival assayを用いて酸化ストレスに対する感受性を検討したところ、DAP3をノックダウンしたNIH3T3細胞は、酸化ストレス耐性が増加していることが明らかとなった。DAP3をノックダウンした細胞は、細胞内ROS(活性酸素)産生が低下していたことから、ミトコンドリアにおけるROS産生を低下させることによりストレス耐性を増加させたと考えられた。また驚いたことに、DAP3をノックダウンしたMouse Embryonic Fibroblastsでは、継代による細胞老化(replicative senescence)が誘導されないことが明らかとなった。

【考察・結論】

これらの結果から、DAP3は細胞の酸化ストレス感受性に関与し、細胞老化の制御に機能的な役割を果たしていることが強く示唆された。アポトーシス促進能に加えてDAP3の新たな機能が明らかとなった。

細胞老化時にDAP3が減少している事実と、DAP3をノックダウンした場合に細胞老化が回避される事実は一見矛盾した結果に見える。細胞老化時におけるDAP3の減少はストレス刺激の結果、細胞の保護機構として酸化ストレス抵抗性増加させるためにDAP3が減少したものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

## Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response

(Death-associated protein 3の細胞老化における機能解析)

Death-associated protein 3 (DAP3) はインターフェロン $\gamma$ による細胞死に関与する遺伝子として単離・同定され、Hela 細胞株に強制発現させるとアポトーシスを誘導することが報告されてきた。最近、DAP3 が主にミトコンドリアに存在し、ミトコンドリア代謝への関与が示唆されている。更に、DAP3 タンパク質の発現低下がミトコンドリアにおける呼吸能を低下させると報告された。一方、細胞老化には種々のストレス応答関連遺伝子が重要な役割を果たしており、アポトーシス関連遺伝子はストレスを受けた後の細胞の運命 (Death or Senescence) を決定づけるのに重要な役割を果たしていると考えられ、癌化からの逸脱という観点からもその関与が注目されている。そこで、本研究では DAP3 の細胞老化における機能を探索する目的で、正常細胞の継代およびストレス暴露による細胞老化における DAP3 の発現変化を観察した。さらに DAP3 タンパクの発現抑制がストレス感受性および細胞老化に及ぼす影響について検討した。

MRC5(ヒト胎児肺正常繊維芽細胞)、HE1 (ヒト胎児正常繊維芽細胞)及び MEF (マウス胚繊維芽細胞)の継代培養による細胞老化 (replicative senescence) において DAP3 の発現が減少していた。次に YMM/TERT 細胞を用いて Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) における DAP3 発現変化を検討したところ、過酸化水素刺激でのみ減少し、同等に細胞老化を誘導する紫外線もしくは X 線刺激では DAP3 は減少しなかった。さらに、過酸化水素刺激後の DAP3 mRNA の発現変化を定量的に検討したところ、mRNA の発現量に変化が認められなかったことから、DAP3 のタンパク発現は翻訳後もしくはタンパク分解によって制御されていると考えられた。DAP3 はミトコンドリア移行シグナルをもつが、ミトコンドリアに加えて細胞質での発現も報告されている。YMM/TERT 細胞を分画して検討したところ、SIPS における DAP3 の減少は主にミトコンドリア画分で観察された。次に、DAP3 のノックダウンが細胞老化に及ぼす影響を検討した。Clonogenic survival assay を用いて酸化ストレスに対する感受性を検討したところ、DAP3 をノックダウンした NIH3T3 細胞は、酸化ストレス耐性が増加して

いることが明らかとなった。DAP3 のノックダウンに加えて外来性の DAP3 を発現させた実験群においては酸化ストレス耐性がコントロールと同等にもどっていたことから、酸化ストレス耐性の増加は DAP3 のタンパク発現低下に起因することが強く示唆された。また、DAP3 をノックダウンした細胞は、細胞内活性酸素産生が低下していたことから、ミトコンドリアにおける活性酸素産生を低下させることによりストレス耐性を増加させたと考えられた。また、DAP3 をノックダウンした MEF では、継代による細胞老化が誘導されないことが明らかとなった。発表にあたり、副査の小野江教授からは、replicative senescence と SIPS の違いや SIPS を誘導する刺激としての過酸化水素、紫外線および X 線のシグナルの違い等の質問がなされ、更に副査の畠山鎮次教授からは、DAP3 タンパク低下の機序およびヒトとマウスの細胞を使い分けた理由等の質問があった。最後に主査の上出教授より、細胞老化の定義等の質問がなされたが、いずれの質問に対しても、申請者は自己のデータおよび論文を引用しつつ、適切な回答を行なった。

この論文は、DAP3 が、細胞の酸化ストレス感受性に関与し、細胞老化の制御に関与することを示したもので、高く評価され、今後、細胞内活性酸素が関与する種々の疾患の予防や治療への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに充分は資格を有するものと判定した。