学位論文題名

Role of Hes1 on contact inhibition of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes

(脂肪前駆細胞における細胞増殖のコンタクトインヒビションに関する Hes1 の役割)

学位論文内容の要旨

[背景と目的] 細胞増殖は生物における発生や発達過程に重要な現象であり、無秩序な細胞増殖は細胞の癌化のような異常を来すことから、細胞増殖の制御は生存のために必須な役割を果たしている。培養細胞においても細胞がコンフルエントに到達する際、細胞間接触により、細胞増殖のコンタクトインヒビション(接触阻害)といわれる細胞増殖の停止が生じる。この接触阻害は、細胞の運命や発達過程において重要なシグナル伝達の一つである Notch シグナリングの関与が報告されている。しかしながら、Notch あるいは Notch エフェクターのどちらが細胞増殖の接触阻害を誘導するかは明らかではない。

Notch エフェクターの一つである Hes1(*Hairy and enhancer of split 1*)は、細胞増殖に関与するサイクリン依存性キナーゼ(Cdk)インヒビターである *p21Cip1*, *p27Kip1*, *p57Kip2* の転写を抑制することが知られている。そのため、細胞増殖の接触阻害における Hes1 の役割を明らかにすることは重要であり、Hes1 に焦点を当てた。

Hes1 の役割を明らかにするため脂肪細胞分化のモデル細胞である 3T3-L1 脂肪前駆細胞に注目した。この細胞はコンフルエントに到達すると一時的に増殖を停止するが、ホルモン等の分化誘導試薬を加えることで細胞周期は同調し再開、数サイクルに渡って細胞分裂を行う。この細胞分裂は特に MCE(mitotic clonal expansion)とよばれている。3T3-L1 細胞において、Hes1 は脂肪細胞分化のために必要であることが報告されており、Hes1 の細胞周期に関する役割を明らかにすることは、MCE や脂肪細胞分化の詳細な理解のためにも重要である。そこで、3T3-L1 細胞における細胞増殖の接触阻害に及ぼす Hes1 の影響を明らかにすることを目的として研究を行う。

[材料と方法] Hes1 の役割を明らかにするため、3T3-L1 細胞に二つの処理を行う。一つは、*N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-D-phenylglycine t-butyl ester* (DAPT)を用いて Notch シグナリングを薬剤で抑制する。*Hes1* 低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)を発現する安定発現細胞株を作成、遺伝子レベルで Notch シグナリングを抑制する。細胞増殖の接触阻害の測定は、細胞数の計測と細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫染色により行う。遺伝子発現をリアルタイム PCR により、タンパク質発現量をウエスタンブロッティング法で、それぞれ測定する。

[結果] *Hes1* の発現が細胞間接触によって増加するかどうか 3T3-L1 細胞にて測定した。*Hes1* の発現は増殖中の細胞と比較して、コンフルエントの細胞で上昇したことから、3T3-L1 細胞において、Notch は細胞間接触によって活性化することが示唆された。

次に 3T3-L1 細胞の MCE 時において、DAPT による Cdk インヒビター抑制効果をリアルタイム PCR にて測定した。DAPT は *p21Cip1*, *p27Kip1*, *p57Kip2* の発現を促進した。MCE 時におけるこれらの遺伝子発現の上昇の効果を細胞数の変化で確認した結果、DAPT 処理により細胞数増加が減少し、細胞分裂過程を直接抑制した。

そこで DAPT による Cdk インヒビターの上昇に *Hes1* が関与するかどうかを明らかにするため、*Hes1*-shRNA を発現する 3T3-L1 細胞を作成した。*Hes1* ノックダウン細胞において、*p21Cip1* と *p27Kip1* の発現は増加したが、*p57Kip2* の発現は増加しなかった。この結果から、*Hes1* が *p21Cip1* と *p27Kip1* の発現を抑制することが示唆された。

さらに、*Hes1* が細胞増殖の接触阻害に関与するかどうかを調べるため、*Hes1* ノックダウン細胞を用いて、コンフルエントに到達後から 2 日間に渡り細胞数を測定した結果、この細胞では細胞数は増加し細胞増殖が停止しないことが明らかになった。Ki-67 による免疫染色においても、細胞増殖は同様に停止されなかった。このように、3T3-L1 細胞において、*Hes1* の遺伝子発現量を減少させた細胞では無限に細胞増殖する可能性が示唆された。

Hes1 は 17β エストラジオールやヘレグリンβ1 を介した条件下で、*E2F-1* (細胞周期の進行に必要な転写因子) の発現上昇を抑制することが乳がん細胞において報告されている。そのため、*E2F-1* の遺伝子発現量を *Hes1* ノックダウン細胞にて測定した結果、*E2F-1* の発現は上昇した。一方この細胞において、*E2F-1* を転写因子とする遺伝子である、*Myc*, *cyclin E1*, *cyclin A2* の遺伝子発現を測定した結果、これらの遺伝子発現は上昇した。さらに、*cyclin E1* と *cyclin A2* のタンパク質の量も上昇した。以上の結果から、3T3-L1 細胞において *Hes1* は *E2F-1* とそのターゲット遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

[考察] *Hes1* の発現はニューロン間において、神経突起の接触による Notch シグナリングの活性化によって上昇することが報告されている。本研究でも *Hes1* の発現は 3T3-L1 細胞において、細胞間の接触により増加することが示された。このように、*Hes1* の発現は 3T3-L1 細胞において Notch シグナリングの活性化を介して増加し、細胞増殖における接触阻害を誘導することが示唆された。

E2F-1 と *Myc* の発現は G0 期で抑制されるため、*E2F-1* と *Myc* の発現上昇は細胞周期の進行を示唆すると考えられる。また、*Myc* は *p27Kip1* による細胞増殖停止を抑制するため、*Myc* の発現上昇は *Hes1* ノックダウン細胞において細胞周期の進行に重要な役割を果たす可能性がある。さらに、*cyclin A2* 及び *cyclin E* タンパク質の増加は S 期への進行を促進することから、3T3-L1 細胞においても同様に機能したことが予想される。

p21Cip1 と *p27Kip1* は *cyclin E/Cdk2* 複合体に結合し、Cdk の触媒活性を阻害することが報告されている。しかしながら、*Hes1* ノックダウン細胞において *p21Cip1* と *p27Kip1* の発現は上昇したが細胞周期は停止しなかった。これらの結果は、上昇した *cyclin E1* タンパク質が *p21Cip1* と *p27Kip1* の効果を限定的にした可能性がある。一方で、*p21Cip1* あるいは *p27Kip1* は、安定した *cyclin D1/Cdk4* 複合体の構築を促進し、さらに *p21Cip1* は *cyclin D1* の核内移行を阻害する。そのため、*p21Cip1* と *p27Kip1* の発現上昇は 3T3-L1 細胞において、細胞周期の進行に影響を及ぼした可能性がある。

[結論] *Hes1* の発現は 3T3-L1 細胞において、細胞間接触により増加し、さらに *E2F-1*, *Myc*, *cyclin E1*, *cyclin A2* の発現を抑制し、細胞増殖の接触阻害を引き起こす。また、細胞間接触による *Hes1* の発現上昇は、*p21Cip1* と *p27Kip1* の発現を抑制する。以上の結果から、*Hes1* は 3T3-L1 細胞において、細胞増殖の接触阻害に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	畠山	鎮次
副査	教授	佐邊	壽孝
副査	准教授	松本	美佐子
副査	教授	高田	賢藏
副査	教授	本間	さと

学位論文題名

Role of Hes1 on contact inhibition of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes

(脂肪前駆細胞における細胞増殖のコンタクトインヒビションに関する Hes1 の役割)

本研究は、生物における発生や発達過程に重要な細胞増殖の制御機構の検討のため、培養細胞における細胞増殖のコンタクトインヒビション（接触阻害）において重要なシグナル伝達の一つである Notch シグナリングの関与に注目し、脂肪細胞分化のモデル細胞である 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いて、Notch エフェクターの一つである *Hairy and enhancer of split 1* (Hes1) が細胞増殖のコンタクトインヒビションに及ぼす影響を明らかにすることを目的として行ったものである。

3T3-L1 脂肪前駆細胞は、コンフルエントに到達すると一時的に増殖を停止するが、ホルモン等の分化誘導試薬により mitotic clonal expansion (MCE) とよばれる細胞分裂が再開し、脂肪細胞に分化する。Hes1 はこの脂肪細胞分化にも必要であることが報告されている。そこで、本研究においては、3T3-L1 細胞がコンフルエントに達した 2 日後に、MCE を誘導し、Hes1 や下流の遺伝子発現について検討した。まず、Notch エフェクターとしての Hes1 の役割を明らかにするため、 γ セクレターゼインヒビターである DAPT を用いて Notch シグナリングを抑制したところ、Hes1 発現の持続的低下が観察され、分化誘導剤投与第 1 日目において Cdk インヒビターの発現の促進が観察された。次に、Hes1 抑制の効果を培養開始時から検討する目的で、Hes1 に対する低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) を安定発現する細胞株を使用することで、分化誘導第一日目に既に Cdk インヒビターの発現の増加をみとめられることを確認した。また、Hes1 ノックダウン細胞ではコンフルエントに達した後も、細胞数が増加し、接触阻害が抑制されることを確認した。次に、Hes1 ノックダウン細胞にて遺伝子発現を測定した結果、転写因子 *E2F-1* の発現は上昇し、さらに E2F-1 が発現制御する遺伝子群の転写レベル及びタンパク質発現レベルも増加させることを示した。以上の結果より、Hes1 は 3T3-L1 細胞における細胞増殖及び接触阻害の制御に重要な役割を果たす

ことが示された。

審査会において、副査の佐邊教授より、分化誘導前での Notch や Hes1 の抑制実験の質問に対して、Hes1 ノックダウン細胞では分化誘導なしでも接触阻害が誘導されなかったため、分化誘導に依存した結果ではないと回答した。副査の高田教授からも、分化誘導をしない実験系の必要性が指摘され、さらに 3T3-L1 細胞を使った理由を問われたが、脂肪細胞における分化誘導前後の接触阻害における Hes1 の検討の有用性を回答した。副査の松本准教授からは、薬理的および shRNA による Hes1 の抑制が持続的であるのに対し、その下流遺伝子の発現パターンが一致しない理由について質問があった。これに対し、Hes1 以外の Notch エフェクターが p57^{Kip2} を抑制する可能性を回答した。副査の本間教授からは、Hes1 発現抑制による Cdk インヒビター遺伝子への作用、および E2F-1 抑制による Myc や CyclinE1 への作用が一過性であることから、並行して生じる Hes1 や E2F-1 を介さない系の可能性、及びそれらの可能性を否定するための実験系に関して質問があった。これに対し、今回の実験は接触阻害の一つの系を示したものであり、他の系を否定するものではないと回答した。また、接触阻害に関わる Notch 以外の因子にはどのようなものがあるかとの質問に対し、ネクチンなど細胞接着因子の報告があることを回答した。主査の畠山教授からは、Hes1 ノックダウン細胞で細胞増殖が停止しなかった細胞の形態に関する質問があり、単層であった細胞の上に重層して増殖していく現象もみられたと回答した。さらに、本研究は、脂肪分化、接触阻害、Notch シグナルのどれに焦点をあてた実験かとの質問に対し、Notch シグナルと接触阻害の関係について検討するための研究であると回答した。また shRNA の実験法に関して、佐邊教授、高田教授、畠山教授より、今回は一つの配列に関してしか検討していないことやレトロウイルス発現系により樹立されたクローン細胞の信頼性などに関する問題点が指摘されたが、今後の重要な改善点であると回答した。

この論文は、Notch シグナル重要な Hes1 の発現制御が、脂肪細胞の接触阻害の制御に重要であることを示しており、脂肪細胞分化を含む代謝疾患の制御に重要な知見となることが期待できる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。