Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-22

老化細胞の細胞接着面積増大を引き起こすNectin-4の分子機構解析

片所, 諒子

(Degree)
博士（理学）

(Date of Degree)
2024-03-25

(Date of Publication)
2026-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第8856号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490081

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博士論文

老化細胞の細胞接着面積増大を引き起こす Nectin-4 の分子機構解析

令和 6 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

片所 諒子

目次

要旨 3

略語 5

第 1 章　序論 6

1-1 細胞老化 6

1-2 細胞老化誘導（テロメア短縮、がん原遺伝子活性化） 6

1-3 細胞老化のメリット 7

1-4 細胞老化と疾患 8

1-5 老化細胞の形態的変化 9

1-6 Nectin 10

1-7 Rac1 11

1-8 本研究の目的及び概要 11

第 2 章　実験手法 12

第 3 章　結果 22

3-1 老化細胞における Nectin-4 と接着面積の関係 22

3-1-1 Etoposide による老化誘導に伴う細胞形態の観察 22

3-1-2 Etoposide 処理した際の Nectin-4 発現レベルの解析 23

3-1-3 *Nectin-4* ノックダウン細胞における老化細胞の形態観察 23

3-1-4 Nectin-4 過剰発現した細胞の形態解析 24

3-1-5 Nectin-4 過剰発現細胞、*Nectin-4* ノックダウン細胞の老化アッセイ 25

3-1-6 老化誘導した正常線維芽細胞の細胞接着面積の解析 26

3-1-7 3 次元細胞培養した老化細胞の表面積の解析 27

3-2 老化細胞が細胞接着面積増大に至るまでのシグナル経路 27

3-2-1 老化誘導細胞における SFK-PI3K 経路 28

3-2-2 正常線維芽細胞の老化誘導における SFK-PI3K 経路 28

3-2-3 Nectin-4 過剰発現細胞における Nectin-4-SFK-PI3K 経路 29

3-2-4 Rac1 を活性阻害した Nectin-4 過剰発現細胞の細胞接着面積 29

3-2-5 Rac1 を活性阻害した老化細胞の細胞接着面積 30

3-3 細胞接着面積と細胞死 30
3-3-1 Nectin-4 と細胞の生存の解析 31
3-3-2 老化誘導による細胞接着面積の増大と生存の関係 31
3-3-3 細胞接着面積を制限した老化細胞の細胞生存率 32
3-3-4 *Integrin β1* ノックダウン細胞の細胞接着面積 32
第 4 章　考察 34
細胞体積 34
細胞老化とアポトーシス 35
Nectin-4 の下流のシグナル 35
Integrinβ1 36
膜テンション 36
接着因子としての役割と Nectin ファミリーとの関係 37
Nectin-4 の治療標的について 38
参考文献 39
図表 39

【要旨】

老化細胞の細胞接着面積増大を引き起こす Nectin-4 の分子機構解析

細胞老化は、抗がん剤などによる DNA 損傷やテロメアの短縮などによって引き起こされる細胞応答であり、不可逆的な細胞周期の停止として定義される。細胞は DNA 損傷を受けると転写因子 p53 の活性を介してアポトーシスあるいは細胞老化を引き起こす。これまでにアポトーシスの分子メカニズムは解明されてきているが、細胞老化に至る詳しいメカニズムは未解明のままである。先行研究では、DNA 損傷を誘導する抗がん剤である Etoposide を用いて高濃度処理でアポトーシスを、低濃度処理で細胞老化を誘導する実験系が確立され、それらのマイクロアレイ比較解析により老化細胞特異的に発現上昇する遺伝子の探索が行われた。その結果、Nectin cell adhesion molecule 4（Nectin-4）をはじめとするいくつかの遺伝子が p53 依存的に細胞老化誘導時に発現上昇した。

細胞老化が引き起こされると細胞の代謝や形態が大きく変化する。老化細胞の特徴として細胞体積が増大しかつ形態が扁平であることが挙げられるが、その形態の変化を制御する詳しい分子メカニズムは解明されていない。Nectin-4 は免疫グロブリンスーパーファミリーである Nectin ファミリータンパク質に属し、細胞膜に局在している。細胞外のドメインを介して Nectin 同士で相互作用する性質を持ち、細胞接着因子として働くことが知られている。また、Nectin の下流において細胞内シグナル因子を活性化させ細胞内骨格の制御を行うことが知られているが、Nectin-4 と細胞老化との関連は全く報告がない。そこで本研究では細胞老化における Nectin-4 の機能解析を行った。

ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞及び正常線維芽細胞 Hs68 細胞の老化誘導により Nectin-4 は発現上昇し、老化誘導細胞の顕微鏡下での細胞接着面積の増大及び細胞体積の増大が観察された。老化誘導時、*Nectin-4* をノックダウンすると細胞老化マーカーにはほとんど変化はなかったが、細胞老化に伴う細胞接着面積増大及び体積増大が抑制された。さらに Nectin-4 を過剰発現させると、細胞は老化細胞に類似した細胞接着面積が増大した形態を示した一方、細胞体積の変化はなかった。この時、老化マーカーの有意な変化は観察されなかったことから Nectin-4 は細胞老化の誘導自体には関与せず、老化細胞において細胞接着面積の増大に関わっていることが示唆された。

続いて老化誘導時の細胞接着面積増大の分子メカニズムを調べるため、Nectin の下流因子として知られている Src family kinase（SFK）、Phosphoinositide 3-kinase（PI3K）をそれぞれの阻害剤で活性阻害したところ、いずれの阻害でも Nectin-4 過剰発現による細胞接着面積の増大が抑制され

た。また、これらの阻害剤は Etoposide による老化時の細胞接着面積の増大も抑制した。また、この時の細胞老化マーカーには変化がなかったため、面積増大の抑制は細胞老化の変化によるものではないことが確認された。以上のことから DNA 損傷による細胞老化誘導時に、Nectin-4 は SFK 及び PI3K を介して細胞接着面積増大に働いていることが示唆された。次に SFK-PI3K により活性化され細胞の形態制御に重要な Rac1 が Nectin-4 による面積増大に関わっているかを解析した。Rac1 は低分子量 G タンパク質であり、GDP 結合不活性型と GTP 結合活性型を切り替えることで細胞内に情報を伝達する。ドミナントネガティブに働く変異体 Rac1N17 を作成し、細胞老化誘導及び Nectin-4 過剰発現による細胞接着面積増大への影響を調べた。その結果 Rac1N17 を過剰発現させると細胞老化誘導や Nectin-4 過剰発現による細胞接着面積増大が抑制されたことから、Nectin-4 は Rac1 の活性を介して細胞接着面積増大を引き起こすことが示唆された。以上のことから DNA 損傷による細胞老化誘導時に、Nectin-4 は SFK、PI3K 及び Rac1 を介して細胞接着面積の増大に働いていることが示唆された。

さらに老化細胞における Nectin-4 の機能を調べるため、細胞死の解析を行った。結果、老化誘導時に *Nectin-4* をノックダウンするとアポトーシスの指標である AnnexinⅤ陽性細胞の割合、PARP の切断が増加したため、アポトーシスが引き起こされたことが示唆された。このアポトーシスが細胞接着面と関連があるかを調べるためにタイムラプス撮影により細胞のトラッキングを行い、老化誘導細胞の細胞接着面積と生存率の関係を調査した。その結果、細胞接着面積の小さい細胞は細胞死を引き起こす様子が観察され、細胞接着面積と生存率の間に強い正の相関が見られた。細胞接着面積の影響をさらに解析するため、接着面積を人為的に制限するコートを施した培養皿上で老化細胞のタイムラプス撮影を行ったところ、接着面積を小さく制限した老化細胞ではより多くの細胞死が引き起こされたことから、老化細胞の細胞接着面積増大は細胞の生存に働くことが示唆された。また、細胞の生存を維持する因子として Integrinβ1 が候補として挙げられた。

本研究から Nectin-4 は老化細胞において SFK-PI3K-Rac1 経路で細胞接着面積の増大に働き、老化細胞の生存に寄与することが明らかとなった。

【略語】

CCK8　：cell counting kit-8

DDR　：DNA-damage response

D-MEM　：Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO　：dimethyl sulfoxide

DMF　：*N,N*‐dimethylformamide

ECM　：extracellular matrix

EdU　：5-ethiynyl-2’-deoxyuridine

GAPDH　：glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

mTOR　：mammalian target of rapamycin

PI3K　：phosphatidylinositol 3-kinase

PI　：propidium iodide

qPCR　：quantitative polymerase chain reaction

SA-β-Gal　：senescence-associated β-galactosidase

SASP　：senescence-associated secretory phenotype

SFK　：src family kinase

TEMED　：*N,N,N′,N′*-Tetramethyl ethylenediamine

Rac1WT　：Rac1 wild type

【第 1 章　序論】

1-1 細胞老化

細胞老化は、DNA 損傷、酸化ストレス、がん遺伝子の活性化、テロメアの短縮など、さまざまなストレスによって誘発される不可逆な増殖停止として定義される（Serrano et al., 1997; Chen and Ames, 1994; Di Leonardo et al., 1994）。細胞老化は 1960 年代にヒト線維芽細胞の培養中に分裂の上限に達した後、増殖を停止することが観察された（Hayflick, L et al., 1961）。「ヘイフリック限界」として知られるこの分裂の上限は、細胞分裂のたびにテロメアが徐々に短縮することによって引き起こされ、ゲノムの不安定性や DNA 損傷の蓄積を防ぐための機構と考えられている（Courtois-Cox, S et al., 2008 ; Hayflick, L et al., 1961）。細胞老化はさまざまな生物学的な要因やストレスによって引き起こされ、通常は組織の機能維持やがんの抑制に寄与するが、一方で老化関連の病態や慢性炎症を引き起こす可能性もあり、老化細胞の発生メカニズムやその生存維持機構の解明は重要である。一般的に老化の原因として報告されるのは核 DNA の損傷であり、DNA 損傷応答（DDR）経路を活性化する。DDR はチェックポイント機能により細胞周期の進行を阻止し、損傷した遺伝情報が娘細胞に伝播するのを防ぐ。修復されずに DNA 損傷が持続すると、DDR シグナル伝達も持続し、増殖停止が長期化する（Fumagalli M et al., 2014）。DDR シグナルの下流では、ATM および ATR の標的である腫瘍抑制因子 p53 が活性化され、老化に関連した細胞周期停止の必須の因子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p21 の発現を促進させ、これら p53 と p21 は細胞老化の指標として用いられる。

老化細胞はアポトーシスに対する抵抗性を持ち、これは BCL-2 ファミリーを含む生存機構の増強によるものである（Yosef R et al., 2016 ; Chang J et al., 2016）。アポトーシスと細胞老化を決定する分子機構の詳細は不明であるが、細胞の運命は初期の刺激の強度と持続時間、および損傷の性質と細胞種に依存するという報告がある（Childs BG et al., 2014）。老化とアポトーシスの機構は p53 経路の活性に集中しているため、アポトーシスに対する老化細胞の抵抗性が p53 のレベルと活性に依存している可能性もある（Kirschner K et al., 2015）。老化細胞のアポトーシス耐性は異常な蓄積を引き起こし、これが個体にとって悪影響を与える要因となる。

1-2 細胞老化誘導（テロメア短縮、がん原遺伝子活性化）

細胞老化誘導において始めて発見され、最もよく特徴付けられたメカニズムの 1 つは、テロメアの短縮である。一般的な DNA 複製機構では染色体 DNA 末端を完全に複製することができないため、テロメラーゼの発現やテロメア間の組換えなどのテロメア維持機構が存在しない場合、DNA 複製の各回でテロメアが短くなる。特定の長さ未満においてテロメアキャッピング因子または保

護構造が失われると極めて短いテロメアが、末端を 1 つしか持たない DNA 二重鎖切断（one-ended DSB）に似るようになり、DDR が引き起こされる（d'Adda di Fagagna F et al., 2003; Herbig U et al, 2004）。複製老化は、少数のテロメア DDR シグナル伝達で引き起こされ、多くのテロメア DDR シグナルを必要としない（Hemann MT et al., 2001）。DNA 二重鎖切断がテロメア内に局在している場合、修復の効率が大幅に低下するため、短縮されていないテロメアでも持続的な DDR が発生する（Fumagalli M et al., 2012 ; Bae NS et al., 2007）。したがって、細胞老化の引き金となるテロメアでの持続的な DDR 活性化は、テロメア長とは無関係に、増殖細胞におけるテロメア短縮時と非増殖細胞におけるテロメア DNA 損傷の両方で起こり得る（Rossiello F et al., 2017）。

がん原遺伝子の活性化もまた細胞老化の強力な誘導因子となる。がん原遺伝子である H-RAS などは細胞の過剰増殖を引き起こし、最終的に DDR 経路に関与して細胞老化を誘導する（Di Micco R et al., 2006, Halazonetis TD et al., 2008）。このプロセスはがん原遺伝子細胞老化として知られ、強力な抗腫瘍メカニズムであり、正常細胞でのがんを引き起こす可能性のある遺伝子変化が起こると細胞増殖を阻止される。がん原遺伝子誘導細胞老化の間、細胞は ARF の代わりに p16 を上方制御することによって細胞周期を停止する（Michaloglou C et al., 2005）。p16/INK4a の上方制御は、pRB の CDK4/6 のリン酸化を抑制し、サイクリンおよび CDK の転写制御に関与する転写因子の E2F ファミリーを抑制する（Attwooll C et al., 2004）。

1-3 細胞老化のメリット

胚の発生において老化細胞は有益な役割を持ち、組織の成長とパターン形成を制御するために哺乳動物の発生中の胚や胎盤で発生する（Storer, M. et al., 2013 ; Munoz-Espin, D. et al, 2013）。マウスの胚では、これらの細胞は胎生 10.5～11.5 日目に出現し、胎生 17.5 日目にアポトーシスを起こすかマクロファージによって除去される（Muñoz-Espín D et al., 2013、Storer M et al., 2013）。同様に、両生類では体の成長を形作るために発生中の特定の段階で TGF-β によって細胞の老化が起こる（Davaapil, H. et al., 2017）。したがって、生物の発生時の細胞老化は正常な発達と形態形成にとって重要であり、細胞老化はもともと進化中の発生メカニズムとして生じた可能性が考えられている。

腫瘍抑制活性は主に細胞周期停止によって媒介されるが、他の細胞老化の効果として老化関連分泌因子（SASP）が挙げられる。時間の経過とともに、SASP は適切な組織の発達、組織の修復、免疫細胞の動員を促進するが、持続的な暴露は慢性炎症を引き起こし、老化関連疾患やがんの原因となる。

細胞老化は組織の損傷後の修復と構造の維持に寄与する。例えば肝繊維症では老化により ECM

を産生する細胞の増殖が抑制され、肝臓が損傷した後の症状の進行が抑制される（Krizhanovsky V et al., 2008 ; Kim KH et al, 2013）。これらの細胞からの SASP は NK 細胞を引き寄せ、肝臓から老化細胞を除去して肝臓の恒常性を回復させる。また、ECM タンパク質である CCN1 は皮膚の損傷治癒中に線維芽細胞の老化を促進させ、皮膚繊維症を抑制し（Jun, J. I. et al., 2010）、SASP 因子である PDGF-AA は損傷閉鎖を促進する（Demaria, M. et al., 2014）。さらに細胞老化の誘導により膵臓における繊維症の進行が抑制されるという報告もある（Fitzner, B. et al., 2012）。

老化細胞が恒常性を維持する有益性は、老化細胞の有益な機能が発揮された後、免疫系による排除に依存する（Krizhanovsky V et al., 2008 ; Sagiv, A., & Krizhanovsky, V.,2013）。老化細胞由来の特定のケモカインは特有の免疫細胞を引き寄せ、NK 細胞、T 細胞、およびマクロファージが老化細胞と相互作用する（Coppé, J. P et al., 2008 ; Freund, A., 2010）。この免疫応答はがんの発生を制限する一方で、老化細胞の生存が存続するとがんの発生や転移、再発リスクの増加に寄与する。

1-4 細胞老化と疾患

老化細胞は一時的に有益な効果をもたらす可能性があるが、加齢に伴ってすべての組織に慢性的に蓄積し有害な結果をもたらす。どの程度の蓄積量により生体に悪影響を及ぼすかは不明だが、高齢の霊長類の皮膚には少量の老化細胞（約 10〜15%）しか存在しないにも関わらず（Herbig U et al., 2006）、少量の老化細胞を若いマウスに移植すると組織の機能不全を引き起こす（Xu M, Pirtskhalava et al., 2018）。老化関連疾患の部位に細胞老化の存在することは多くの例が報告されているが、それが病気を引き起こすのか、それとも病理の結果であるのかは不明である。白内障、膵性糖尿病、変形性関節症などは、細胞の増殖機能の喪失が病状の原因となる（Baker DJ et al., 2011 ; Shimizu I et al., 2012 ; Martin JA et al., 2004）。アテローム性動脈硬化、Ⅱ型糖尿病、乳がんは SASP からの炎症が疾患の原因となる（Zhou X, et al., 2006 ; Minamino T et al., 2009 ; Thangavel C et al., 2011）。さらに、老化細胞は肺線維症を促進するが、肝線維症を制限するため、SASP を介した細胞外マトリックスのリモデリングが疾患の進行や抑制を制御する可能性がある（Chilosi M et al., 2013 ; Kong X et al., 2012）。

若年者では組織を正常に保つ機能が、遺伝的または外部からのストレスによって損失し、発症する場合がある。例えば、成人した若年者において反復的な関節損傷により、軟骨基質への損傷が組織の自己修復能力を超えると、変形性関節症が引き起こされる（Roos EM, 2005）。損傷による関節炎と加齢に伴う関節炎の関節には老化した軟骨細胞が存在し（Loeser RF, 2009 ; Martin JA et al., 2004）、短期間の強いストレスは、老化によって老化細胞を生成する通常の磨耗の際に見られるものと同様のストレスである。若年者の疾患とは対照的に、加齢に関連した疾患は老化細胞が蓄積

した組織など、老化の過程によってすでに機能不全になっている組織に発生する。この摩耗による老化細胞の出現により、前駆細胞の細胞周期が停止し、幹細胞の機能不全が引き起こされ、疾患の原因となるストレスに対する組織の抵抗力が低下する。さらに、疾患の進行に伴い二次的に老化細胞が生成され、これが疾患の進行を助長する可能性がある。このモデルは、II型糖尿病やアテローム性動脈硬化などの症例で示されている。ここに述べた老化細胞の蓄積に伴う疾患は知られている中でもほんの一部であり、近年では老化細胞の除去により疾患の進行や発症を遅らせる治療法の開発が盛んである。

1-5 老化細胞の形態的変化

老化細胞の細胞表面積は、老化の初期段階では均一である一方で、寿命の最終段階においては不均一に増加する。ヒト胎児線維芽細胞の研究によれば、初代培養細胞の細胞表面積は 1,000 μm^2 未満で均一であるが、老化が進行すると非常に不均一で範囲が 1,000 μm^2～9,000 μm^2に及ぶことが報告されている（Wang, E. and Gundersen, D., 1984）。老化を誘導した細胞体積においても約 4 倍に増加する（Hutter E et al., 2004）。例えば初代培養細胞の IMR-90 線維芽細胞の体積が通常は 1×10^{-5} mm^3未満であるのに対し、老化が誘導された細胞は $4\sim7\times10^{-5}$ mm^3の範囲に増加する（Chen QM et al., 2000）。初代線維芽細胞の培養は継代を繰り返すと、細胞数の倍加が徐々に遅れ、大きな細胞の数が増加する。個々の細胞は異なるタイミングで複製老化に入り、これが集団倍加率の減少と平均細胞体積の増加に寄与する。デフェロキサミン、H_2O_2 処理による老化誘導、複製老化により増殖能力の限界に達した細胞集団では細胞体積の不均一性が見られる一方で、ドキソルビシン誘導細胞老化ではあまり見られない（Song YS et al., 2005）。この細胞体積のばらつきは、DDR シグナルの活性化のタイミングの違いに関連している可能性があるが、細胞のサイズが異なる理由はまだ解明されていない。

細胞は分裂を続けると増殖が停止する段階にまで分裂の速度を徐々に落とす場合と細胞周期が突然停止して細胞体積が増加する場合がある。従って細胞周期の停止が不可逆的な状態にあるかどうかに応じて細胞体積が異なる。前者の場合、細胞が一定の体積を維持するサイズチェックポイント機能を持つ細胞もあるが、どのように機能するかは不明である（Rattan SI et al., 1992）。後者の場合、細胞が休止状態である G0 期に入り細胞周期が停止する可能性がある。通常細胞周期が停止すると新しい分子合成も停止するが、増殖因子が存在する状態では、老化の過程で mTOR 活性が高まり、タンパク質合成が増加し、細胞内のタンパク質量と体積が増加する（Hendrix MJ et al., 1996）。老化した細胞では増殖シグナル伝達が不完全である可能性があり（Park JS et al., 2001）、これらの現象の詳細なメカニズムは未解明であり、より体系的な研究が必要とされている。

1-6 Nectin

Nectin（Nectin-1、-2、-3、および-4）は、カルシウム非依存性の免疫グロブリン様分子のファミリーで、1 回膜貫通タンパク質であり、3 つの Ig 様ドメインを含む細胞外領域と膜貫通領域、および Afadin 結合モチーフ細胞質尾部領域という同じドメイン構成を持つ（Takai Y. et al., 2008 ; Mandai K et al., 1997）。Nectin-1、-2、-3 の Afadin との結合モチーフは、Afadin の PDZ ドメインに結合する保存された配列の Glu/Ala-X-Tyr-Val であり、Nectin-4 はこの保存されたモチーフ持たないが、C 末端の Gly-His-Leu-Val モチーフを介して結合する（図 1A）。

Nectin は、発生の段階において、上皮、内皮、神経の組織における細胞間の接着に働く（Takai and Nakanishi, 2003）。Nectin ファミリーはすべて、C 末端の細胞質尾部を介して F-アクチン結合タンパク質である Afadin と直接相互作用する（図 1B）Afadin はα-カテニンと結合し、カドヘリンの細胞質ドメインによって認識されるβ-カテニンとも相互作用する。これらの相互作用の結果、Nectin とアファディンはカドヘリンを含むタンパク質を細胞間接着部位に動員し、その結果接着結合が形成される（Takai Y. et al., 2000）。Nectin は細胞間接着に寄与する同種親和性を持ち、かつ、Nectin-1 と Nectin-3、Nectin-1 と Nectin-4、Nectin-2 と Nectin-3 の間の異種親和性をも持つ（Satoh-Horikawa K et al., 2000 ; Aoki J et al., 1997）。また、Nectin は、Integrin, PARD3, PICK1, MUPP1, MPP3, zyxin, willin などの複数の種類のタンパク質と相互作用することにより、細胞接着に加えて、細胞の移動、極性、生存、分化などのさまざまな細胞機能を調節することが知られている。また、Nectin-1 と Nectin-3 の相互作用により Rac1, CDC42 が活性化し、葉状仮足及び糸状仮足が形成されるという報告がある （Kawakatsu et al., 2002; Ogita and Takai, 2006）。Nectin-1, Nectin-3 の機能についてはよく研究されているが、Nectin-4 の機能についてはあまり研究されていない。がん領域において Nectin-4 が盛んに研究されおり、肺がん、乳がん、卵巣がんなど様々ながんにおいて Nectin-4 の発現量が上昇し（Fabre-Lafay et al., 2007; Pavlova et al., 2013; Takano et al., 2009）、Nectin-4 の下流にある phosphoinositide 3-kinases（PI3K）/Akt の経路を介してがんの悪性化に働くことも報告されている（Zhang et al., 2016）。

成人の多くの組織の Northern blot 解析によれば、Nectin-1 と-2 は広く分布しているが、Nectin-4 は主に胎盤と気管に発現している。しかし、最近のトランスクリプトーム解析により、細胞老化の誘導と確立に必要な重要な転写因子である p53 に依存して Nectin-4 が老化細胞で優先的に上昇することが明らかになった。先行研究では、骨肉腫由来 U2OS 細胞で Nectin-4 の強制発現が老化に関連する senescence-associated β-galactosidase （SA-β-gal） staining（細胞老化マーカー）にほとんど影響を与えず（Nagano et al., 2016）、Nectin-4 が老化の調節にどのような役割を果たすのか

は不明のままである。

1-7 Rac1

Rac1 は、細胞の構造、細胞接着面積、接着、極性、運動など、さまざまな細胞機能を調節する Rho ファミリーsmall GTPase のメンバーである（Abdrabou and Wang, 2018; Bustelo et al., 2007）。Rac1 は、GDP と GTP 分子の交換を促進するグアニンヌクレオチド交換因子（GEFs）によって活性化される。通常、葉状仮足の発達には Rac1 の活性が必要であり、その活性化は局所的な Rac1 活性化で促進される（Montell, D. J. et al., 2012）。Rac1 は、葉状仮足の形成に関与する複数のタンパク質と相互作用し、特に WAVE 関連複合体との相互作用によってアクチン重合核形成が活性化される。さらに、Rac1 は足場タンパク質である lamellipodin とも相互作用し、葉状仮足のアクチンフィラメントの伸長を促進する（Law, A.-L. et al., 2013）。また、葉状仮足でのインテグリンによる接着が Rac の活性化を促進し、正のフィードバックループを形成して Rac の活性化を持続させるため、葉状仮足の安定化に必要である（Lawson, C. D. & Burridge, K., 2014）。しかしながら、現在のところ Rac1 と老化に関連する形態学的変化との関係についての報告はない。

1-8 本研究の目的及び概要

これまで述べた通り老化細胞は身体への悪影響が提唱され、加齢疾患発症期以降の解明や除去へ向けての研究が活発である。一方、特徴的な表現型をもつにも関わらず細胞構造への研究はまだまだ少なく、未解明な分子機構が数多く存在すると考えられる。本研究では、老化細胞の特徴的な接着面積と体積の増大に着目し、Nectin-4 を介する機構を明らかにすることを目的とする。

本研究から Nectin-4 が老化誘導の制御そのものには関与していないことが示された一方、Nectin-4 は老化に伴う細胞接着面積の増大に関与していることが示された。さらに、SFK-PI3K-Rac1 シグナル伝達経路が、Nectin-4 依存的な細胞接着面積の増大に必要であり、さらに接着面積の増大が老化細胞の生存に寄与することが示唆された。

【第 2 章　実験手法】

2-1 細胞培養

U2OS 細胞（ヒト骨肉腫由来；ATCC）及び Hs68 細胞（ヒト正常二倍体線維芽細胞；JCRB 細胞バンク）を使用した。U2OS 細胞及び Hs68 細胞は 10%FBS、100 μg/mL ストレプトマイシン（Meiji Seika Pharma）、100 U/mL ペニシリン（Meiji Seika Pharma）を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium（D-MEM）（富士フィルム和光純薬）を培養液として用い、37℃、5% CO_2 存在下の CO_2 インキュベーター（Panasonic）で培養した。細胞は 100 mm Culture Dish（CORNING）で培養し、約 75～90%コンフルエントのタイミングで 3 ~ 4 日おきに継代を行った。Dulbecco's Phosphate-buffered Saline （D-PBS）（富士フィルム和光純薬）で 2 回洗浄した後、1 mL の D-PBS と 0.2 mL のトリプシン／EDTA 溶液（富士フィルム和光純薬）を滴下しなじませ 37℃で 5 分間静置した。D-MEM を 9 mL 加え懸濁し、血球計算盤（Thoma）に満たし、細胞をカウントした後、実験に合わせた細胞数を播種した（次表参照）。

	サイズ	メーカー	播種した細胞数	培地量（mL）
dish	60 mm	CORNING	$3.0\times10^5 \sim 5.0\times10^5$	4.0
	35 mm	CORNING	$5.0\times10^4 \sim 2.0\times10^5$	2.0
Multi well plate	6 well	CORNING	$5.0\times10^4 \sim 2.0\times10^5$	2.0
	12 well	CORNING	$2.0\times10^4 \sim 1.2\times10^5$	1.0
	24 well	CORNING	$1.0\times10^4 \sim 6.0\times10^4$	0.50
	96 well	CORNING	$3.0\times10^3 \sim 5.0\times10^3$	0.20

2-2 プラスミド構築

p3XFLAG-Nectin-4 は C 末端に FLAG タグが付加された Nectin-4 を発現させるプラスミドであり、以下の方法により作成した。N 末端に HA タグが付加された Nectin-4 プラスミド （pcDNA3-HA-Nectin-4；大西, 2014 修士学位論文）を鋳型とし、下表の Nectin-4-Fw プライマー及び Nectin-4-Rv プライマーを用い、Nectin-4 のコード領域を KOD -Plus- Neo を用いた PCR 法により増幅した。その後 1%アガロースゲル（アガロースは Agarose S（ニッポンジーン）を使用）を用いて電気泳動し、バンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス）を用いて付属のプロトコールに従い使用し Nectin-4 の DNA 断片を精製した。p3XFLAG-CMV-14（Sigma-Aldrich）の EcoR I, Kpn I 配列へ DNA Ligation Kit Ver.2.1（Takara）を用いて 16℃30 分のライゲーション反応により挿入し作成した。

pEGFP-Nectin-4 は C 末端に GFP タグが付加された Nectin-4 を発現させるプラスミドであり、以下の方法により作成した。p3XFLAG-Nectin-4 の作成時と同様の方法で Nectin-4 のコード領域を下表の Nectin-4-Fw プライマー及び Nectin-4-Rv プライマーを用い、Nectin-4 のコード領域を KOD -Plus- Neo を用いた PCR 法により増幅して pEGFP-C3（BD Biosciences）の EcoR I, Kpn I 配列へライゲーション反応により挿入し作成した。

pcDNA3-HA-Rac1WT は N 末端に HA タグが付加された野生型の Rac1 を発現させるプラスミドであり、以下の方法により作成した。ヒト cDNA ライブラリーを鋳型とし、下表の Rac1-Fw プライマー及び Rac1-Rv プライマーを用い、Rac1 のコード領域を PCR 法により増幅して pBluescript SK（+）（pSK ベクター）（Stratagene）の EcoR I 配列へライゲーション反応により挿入し、pSK-Rac1WT を作成した。変異体の作成には pSK- Rac1WT を鋳型とし、下表の Rac1G12V-Fw プライマー及び Rac1G12V-Rv プライマーを用いて Rac1G12V の変異を、下表の Rac1T17N-Fw プライマー及び Rac1T17N-Rv プライマーを用いて Rac1T17N の変異を導入した DNA 配列を pSK の EcoR I 配列へライゲーション反応により挿入した。pSK ベクターに挿入されたそれぞれの Rac1 のコード領域を制限酵素 EcoR I により切り出し、pcDNA3-HA へライゲーション反応により挿入することにより pcDNA3-HA-Rac1WT、pcDNA3-HA-Rac1G12V、pcDNA3-HA-Rac1T17N を作成した。

プラスミド構築に用いたプライマーは次表の通りである。

プライマー名	配列
Nectin-4-Fw	5’-CGTGGATCGAATTCATGCCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGAT-3’
Nectin-4-Rv	5’-CGTGCTCGGCGGCCGCTCAGACCAGGTGTCCCCGCCCATT-3’
Rac1-Fw	5’-GCGAATTCACCATGCAGGCCATCAAGTGTG-3’
Rac1-Rv	5’-GCGAATTCTTACAACAGCAGGCATTTTCTC-3’
Rac1-G12V-Fw	5’-GCGGATTCACCATGCAGGCCATCAAGTGT-3’
Rac1-G12V-Rv	5’-GTGGTGGTGGGAGACGTAGCTGTAGGTAAA-3’
Rac1-T17N-Fw	5’-GCGGATTCACCATGCAGGCCATCAAGTGT-3’
Rac1-T17N-Rv	5’-GTGGTGGTGGGAGACGGAGCTGTAGGTAAAAATTGCCTACTG-3’

2-3 遺伝子導入

細胞を播種し 24 時間培養後、Effectene Transfection Reagent（Qiagen）を用いて付属のプロトコールに従い遺伝子導入を行った。各試薬量を下記表に記す。

Dish／plate	buffer EC（μL）	Plasmid（μg）	Enhancer（μL）	Effectene（μL）	Medium add to cells（μL）	Medium add to complexes（μL）
60 mm	75	0.50	4.0	5.0	2000	500
35 mm	50	0.20	1.6	2.0	800	300
6 well	50	0.20	1.6	2.0	800	300
12 well	37.5	0.15	1.2	1.2	400	200
24 well	30	0.10	0.80	1.0	175	175

2-4 遺伝子サイレンシング

細胞を播種し 24 時間培養後、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent（Thermo Fisher）を用いて遺伝子サイレンシングを行った。Lipofectamine RNAiMAX Reagent を Opti-MEM（Thermo Fisher）で希釈し穏やかに混合した。別のチューブで ON-TARGETplus Human Nectin4 siRNA（GE

Healthcare Dharmacon）を Opti-MEM で希釈し穏やかに混合した。それぞれの希釈液を穏やかに混ぜ合わせ 5 分間静置し、この間に新鮮な培養液を細胞に添加した。静置後、細胞に siRNA の混合液を添加した。96 ウェルプレートの場合、混合液と培養液を混ぜ合わせたものを細胞に滴下した。混合液を添加後 24 時間培養後、培養液を交換した。コントロールとして ON-TARGETplus Non-targeting Pool（GE Healthcare Dharmacon）を用いた。各試薬量を下記表に記す。

Dish／plate	Lipofectamine（μL）	Opti-MEM add to Lipofectamine（μL）	10 μM siRNA（μL）	Opti-MEM add to siRNA（μL）	Medium add to cells（μL）
60 mm	9.0	150	3.0	150	2000
35 mm / 6 well	4.5	75	1.5	75	1000
12 well	2.3	37.5	7.5	37.5	500
24 well	1.1	18.8	3.8	18.8	250
96 well	0.28	9.4	1.9	9.4	125

2-5 薬剤処理

Etoposide による老化誘導は U2OS 細胞においては 2.0 μM の Etoposide（Sigma Aldrich）で 24 時間処理し、その後 Etoposide を除いた培養液に交換しさらに培養した。Hs68 細胞では 0.50 μM の Etoposide で 2 日間処理し、その後 Etoposide を除いた培養液に交換しさらに培養した。Etoposide の処理時間は実験の条件に応じて変更した。

遺伝子導入細胞を選抜するために 800 μg / mL の G418（富士フィルム和光純薬）による薬剤セレクションを U2OS 細胞に行った。G418 処理はネオマイシン耐性をもつアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ-II を発現後、24 時間後から行い、2 日おきに同濃度の G418 を処理し計 5 日間培養した。

SFK の阻害剤として 10 μM の PP2（Hanke et al., 1996）（Merck Millipore）を U2OS 細胞及び Hs68 細胞に処理した。3 日以上処理する際には 2 日おきに培養液を交換し、その際にも同濃度の阻害剤を処理した。

PI3K の阻害剤として 20 μM LY294002 の（Vlahos et al., 1994）（Merck Millipore）を U2OS 細胞及び Hs68 細胞に処理した。3 日以上処理する際には 2 日おきに培養液を交換し、その際にも同濃度の阻害剤を処理した。

Etoposide、PP2、LY294002 は DMSO（ナカライテスク）に溶解し、G418 は超純水に溶解して使用した。

2-6 免疫染色

次の溶液を調製した。

・固定液

37% Formaldehyde（富士フィルム和光純薬）が 3.7%（v/v）になるように使用直前に 1×PBS で希釈

・透過液

Triton X-100（Sigma Aldrich）が 0.5%（v/v）になるように 1×PBS で希釈

・ブロッキング溶液

BSA（Promega）が 1.0%（w/v）になるように 1×PBS で溶解

・核染色溶液

20 mM Hoechst 33342（Eurogentec）を使用直前に 1×PBS で 10 μM になるように希釈

各処理を行った細胞を、1×PBS で 2 回洗浄した。固定液を加えて室温で 15 分間振盪することで細胞の固定を行った。固定後、1×PBS を用いて 2 回洗浄した。透過液を加え、室温で 15 分間振盪することで、細胞膜透過処理を行った。1×PBS で 2 回洗浄を行った後、ブロッキング溶液で 1 時間、室温で振盪しブロッキングを行なった。ブロッキング後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を加え 4℃で一晩振盪した。翌日、1×PBS を用いて室温で 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返すことで洗浄した。ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を加え室温で 1 時間暗所にて静置した。その際、F-アクチンを染色する場合は Alexa Fluor 488 Phalloidin（Thermo Fisher）も二次抗体希釈液に 1/250 になるように添加し、二次抗体と同時に処理を行った。その後 1×PBS を用いて室温で 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返すことで洗浄した。核染色溶液を加え室温で 15 分間暗所にて静置し、細胞核染色後、1×PBS を用いて 2 回洗浄した。カバーガラスをスライドガラス（Matsunami Glass）の上に封入剤（ImmunoBioScience）を用いてマウントし、20 倍のレンズ（Nikon）あるいは 60 倍の油浸レンズ（Nikon）を用いて蛍光顕微鏡（Keyence）で観察した。油浸オイルは Carl Zeiss Immersol Immersion Oil（Thermo Fisher）を用いた。用いた抗体は次表の通りである。

抗体名称	メーカー	ホスト	希釈率
FLAG M2	Sigma Aldrich	Mouse	1 : 1000
HA 3F10	Roche	Rat	1 : 500
Anti-Rat IgG （Ax546）	Thermo Fisher	Goat	1 : 1000
Anti-Mouse IgG （Ax546）	Thermo Fisher	Goat	1 : 1000
Anti-Mouse IgG （Ax647）	Thermo Fisher	Goat	1 : 1000

2-7 SA-β-Gal 染色

Senescence β-Galactosidase Staining Kit（Cell Signaling）に付属された試薬を用いて細胞老化を評価した。まず、次の溶液を準備した。

・20mg/ml X-gal 溶液

X-gal （ナカライテスク）が 20 mg / ml になるように DMF（ナカライテスク）で溶解

・ガラクトシダーゼ染色

24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり以下の溶液を混合

超純水	450 µL
1×Staining Solution	50 µL
100X Solution A	5.0 µL
100X Solution B	5.0 µL
20mg/ml X-gal 溶液	25 µL

・核染色溶液

Hoechst 33342 を使用直前に 1×PBS で 10 µM になるように希釈

細胞を 24 ウェルプレートで培養し、各処理を行った後、500 µL の 1×PBS で 2 回洗浄した。キットに付属された 250 µL の 1×Fixative Solution を加え室温で 10 分間振盪することで、細胞を固定した。固定後、1×PBS で 2 回洗浄し、250 µL のガラクトシダーゼ染色を加え、37℃のインキュベーター（ADVANTEC）内で 16 時間静置した。核染色溶液を加え室温で 15 分間暗所にて反応させ、細胞核を染色後、1×PBS で 2 回洗浄し、蛍光顕微鏡（Keyence）で観察した。

2-8 EdU アッセイ

Click-iT Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor 488 dye（Thermo Fisher）を用いて細胞増殖能力を評価した。まず、次の溶液を準備した。

・固定液

37% Formaldehyde を 3.7%（v/v）になるように直前に 1×PBS で希釈

・透過液

Triton X-100（Sigma Aldrich）が 0.5%（v/v）になるように 1×PBS で希釈

・ブロッキング溶液（3 % BSA）

BSA を 3.0%（w/v）の濃度になるように 1×PBS で溶解

・Click-iT Plus reaction cocktail

染色する 24 well plate の 1 well あたり以下の溶液を混合

1X Click-iT reaction buffer	132 µL
Copper protectant	3.0 µL
Alexa Fluor picolyl azide	0.36 µL
1X Click-iT EdU buffer additive	15 µL

・核染色溶液

Hoechst 33342 を直前に 1×PBS で 10 µM になるように希釈

細胞を 24 ウェルプレートで培養し、各処理を行った。キットに付属された EdU を D-MEM で希釈し、10 µM に調製したものを細胞に処理した。EdU を添加後、で 3 時間（U2OS 細胞）、あるいは 24 時間（Hs68 細胞）培養し、その後 500 µL の 1×PBS で 2 回洗浄した。350 µL の固定液を加え、室温で 15 分振盪することで、細胞を固定した。固定後、500 µL のブロッキング溶液（3 % BSA）を用いて 2 回洗浄した。350 µL の透過液を加え、室温で 20 分振盪することで、細胞膜透過処理を行った。透過処理後、500 µL のブロッキング溶液（3 % BSA）で 2 回洗浄を行った。150 µL の Click-iT Plus reaction cocktail を添加し室温で 30 分暗所にて反応させた。その後 500 µL のブロ

ッキング溶液（3％BSA）で洗浄を行い、さらに 500 µL の 1×PBS で洗浄を行った。250 µL の核染色溶液を加え室温で 15 分暗所にて反応させ、細胞核を染色後、1×PBS で 2 回洗浄し、20 倍のレンズ（Nikon）を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

2-9 クリスタルバイオレット染色

以下の試薬を各濃度になるように超純水で調製してクリスタルバイオレット染色液を作成した。

Crystal violet	（富士フィルム和光純薬）	0.1 % （w/v）
Ethanol	（Sigma Aldrich）	10 % （v/v）

各処理を行った培養細胞を 1×PBS で 3 回洗浄した後、ウェルやディッシュ内の底面が十分に浸る量のクリスタルバイオレット染色液を入れ室温で 30 分振盪した。その後水で 10 回以上すすぎ、染色液を洗い流した後、室温で乾燥させた。細胞一つ一つの形態を観察する場合は染色した細胞を倒立型位相差顕微鏡に付属されたカメラ（OLYMPUS）で撮影した。ウェル内の細胞の生存率を測定する場合、スキャナー（EPSON）を用いてウェル全体をスキャンした。

2-10 リアルタイム PCR

RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて、3.5 cm Dish 上の培養細胞から RNA を抽出した。なお細胞の回収から cDNA 合成まで、チップ及びマイクロチューブは RNase free のものを用いた。1 ml の buffer RLT 当たり 10 µL の β-mercaptoethanol（ナカライテスク）を添加し、これを培養皿に 340 µL 添加した。22 G の注射針（TERUMO）を用いて細胞を懸濁した後、マイクロチューブに移し、15,000 rpm で 3 分間遠心操作をした。上清を新しいチューブに移し、340 µL の 70%エタノールを添加し、ピペッティングによりよく混和した。キットに付属の RNeasy スピンカラムにアプライし、付属のプロトコールに従い RNA 精製を行った。超微量分光計（Thermo Fisher）を用いて RNA の濃度を測定した。

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡）を用いて、RNA を逆転写し cDNA を作成した。サンプルの RNA 量が 6 µL 中 500 ng になるように RNase フリー水で調製した後、付属のプロトコールに従い cDNA への逆転写を行った。反応後、氷上で急冷し、-20℃で保存した。

cDNA を鋳型に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（東洋紡）と目的の遺伝子を増幅するプライマーを用いて、LightCycler 480 System II（Roche）で解析した。1 ウェルあたり以下の量になるように反応液を調製し、96 ウェルプレート（Roche）にアプライした。

滅菌水	3.946 µL
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	5.0 µL
Forward Primer （100 µM）	0.027 µL
Reverse Primer （100 µM）	0.027 µL
cDNA	1.0 µL

LightCycler 480 System II にプレートをセットし、下記の 3 ステップによる PCR サイクルを実施した。

ステップ	サイクル数	温度	時間	Ramp Rate
初期変性	1	95℃	60 秒	4.4℃/秒
PCR	50	95℃	15 秒	4.4℃/秒
		55℃	15 秒	2.2℃/秒
		72℃	30 秒	4.4℃/秒
融解曲線	1	95℃	5 秒	4.4℃/秒
		65℃	60 秒	2.2℃/秒
		95℃	continuous	0.11℃/秒
冷却	1	50℃	30 秒	2.2℃/秒

全ての反応が終わった後、融解曲線から単一のサイズの産物が増幅されていることを確認した。Ct 値から mRNA の相対量を算出し、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH を用いて標準化を行った。目的の遺伝子に対するプライマーの配列は次表のとおりである。

プライマー名	配列	Tm 値（℃）
GAPDH Fw	5’-CAATGACCCCTTCATTGACCT-3’	64.8
GAPDH Rv	5’-ATGACAAGCTTCCCGTTCTC-3’	63.1
p21 Fw	5’-CGACTGTGATGCGCTAATG-3’	63.1
p21 Rv	5’-TCTCGGTGACAAAGTCGAAG-3’	63.0
Nectin-4 Fw	5’-CTGCCATGTCAGCAATGAGT-3‘	64.0
Nectin-4 Rv	5’-TGGAATGCTGATGACTTGGAG-3‘	65.1

2-11 ウエスタンブロット解析

以下の溶液を作成した。

・細胞溶解液

Tris-HCl （pH 7.5）		50 mM
EDTA	（ナカライテスク）	1 mM
EGTA	（ナカライテスク）	1 mM
2-Mercaptoethanol	（ナカライテスク）	10 mM
NaCl	（ナカライテスク）	150 mM
Triton X-100	（Sigma Aldrich）	1 %（v/v）
Leupeptin	（ペプチド研究所）	5 μg/mL
APMSF	（富士フィルム和光純薬）	1 mM
Na_3VO_4	（富士フィルム和光純薬）	1 mM

Leupeptin、APMSF、Na_3VO_4 は使用直前に加えた。

・5 x SDS sample buffer

Tris-HCl （pH 6.8）		200 mM
SDS	（Bio-Rad）	5 %（w/v）
BPB	（ナカライテスク）	0.0151 % w/v）
Sucrose	（ナカライテスク）	50 %（w/v）
DTT	（ナカライテスク）	50 mM

・SDS-PAGE Running buffer

Tris	（ナカライテスク）	25 mM
Glycine	（富士フィルム和光純薬）	192 mM
SDS	（Bio-Rad）	0.1 %（w/v）

・転写バッファー

Tris	（ナカライテスク）	19.8 mM
glycine	（富士フィルム和光純薬）	149 mM
SDS	（Bio-Rad）	0.01%（w/v）
Methanol	（富士フィルム和光純薬）	20 %（v/v）

・TBS-T

Tris-HCl（pH 7.5）		10 mM
NaCl	（ナカライテスク）	150 mM
Tween-20	（富士フィルム和光純薬）	0.05 %（v/v）

・ブロッキング溶液

Tris-HCl（pH 7.5）		10 mM
NaCl	（ナカライテスク）	150 mM
Tween-20	（富士フィルム和光純薬）	0.05 %（v/v）
BSA	（Promega）	0.5 %（w/v）
NaN_3	（富士フィルム和光純薬）	0.05 %（w/v）

・基質溶液

Tris-HCl （pH 9.5）		100 mM
$MgCl_2$	（ナカライテスク）	5 mM
NaCl	（ナカライテスク）	100 mM

・BCIP 溶液

BCIP	（ナカライテスク）	50 mg/mL
Dimethylformamide	（ナカライテスク）	100%

・NBT 溶液

NBT	（富士フィルム和光純薬）	150 mg/mL
Dimethylformamide	（ナカライテスク）	70% （v/v）

各処理を行った培養細胞に細胞溶解液を添加し、ピペッティングにより懸濁後、チューブに移し 15,000 rpm で 10 分間、4℃で遠心操作した。添加した細胞溶解液の量はディッシュの大きさ及び細胞数によって変化させた（下記表参照）。

ディッシュ	35 mm	60 mm	100 mm
細胞溶解液（μL）	75 ~ 100	150 ~ 200	300 ~ 500

上清を新しいチューブに移した後、タンパク定量を行った。Protein Assay（Bio-Rad）を用いた比色定量法の一つである Bradford 法により決定した。5 x SDS sample buffer を細胞抽出液の 4 分の 1 量加え、95℃で 5 分間加熱しタンパク質を熱変性させた後、氷上で冷却した。その後、5 x SDS sample buffer が 1 x になるように Lysis buffer で希釈した 1 x SDS sample buffer を用いて、サンプル間のタンパク質濃度をそろえた。

解析するタンパク質の分子量に応じて 8.0〜15%の SGS-PAGE ゲル（90mm（W）×80mm（H）×1mm（T））を、ミニスラブゲル作製キット（ATTO）を用いて作成した。電気泳動槽（ATTO）にゲル板をセットし、SDS-PAGE Running buffer で満たした。1 レーンあたり 1 〜 20 µg のタンパク質量になるようにサンプルを 20~25 µL アプライし、電源装置（ATTO）を用いて定電流によりタンパク質を泳動させた。ウェット式の転写であるブロッティング装置（EIDO）を用いて PVDF 膜（Merck）に転写した。ブロッティング装置を 1 L の転写バッファーで満たし、氷水で転写装置を冷却しながら 65 mA の定電流で 16 時間転写を行った。

転写後、PVDF 膜を 40 mL のブロッキング溶液で、1 時間室温で振盪した。続いて、PVDF 膜をハイブリダイゼーションバッグに入れ、そこにブロッキング溶液で希釈した一次抗体を入れ封入し、4℃で一晩静置し、一次抗体反応を行なった。一次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T を用いて室温で 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返した。続いて、PVDF 膜をハイブリダイゼーションバッグに入れ、そこにブロッキング溶液で希釈した二次抗体を入れ封入し、室温で 1 時間静置することで抗体反応を行った。二次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T を用いて室温で 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返した。洗浄後、PVDF 膜を 40 ml の基質溶液に 40 µl NBT 溶液、40 µl BCIP 溶液を添加した発色液に加え、室温で 5〜20 分間浸透し発色反応を行った。発色反応後、PVDF 膜をスキャナー（EPSON）を用いてスキャンし、必要に応じて Image J Fiji（Schindelin et al., 2012）を用いてバンドの光学密度を測定してタンパク質の発現量とした。検出されたバンドの分子量の確認には分子量スタンダード（SMOBIO）を用いた。用いた抗体は次表の通りである。

抗体名称	メーカー	ホスト	希釈率
FLAG M2	Sigma Aldrich	Mouse	1 : 2500
HA 3F10	Roche	Rat	1 : 500
p-SFK （Y418）	Thermo Fisher	Rabbit	1 : 1000
p21	MBL	Mouse	1 : 500
γ-Tubulin	Sigma Aldrich	Mouse	1 : 2000
Akt	Cell signaling	Rabbit	1 : 1000
p-Akt （T308）	Cell signaling	Rabbit	1 : 1000
v-Src （Ab-1）	Sigma-Aldrich	Mouse	1 : 100
Nectin-4	abcam	Rabbit	1 : 1000
Anti-rat IgG （AP）	Santa Cruz	Goat	1 : 2500
Anti-mouse IgG （AP）	Promega	Goat	1 : 2500
Anti-Rabbit IgG （AP）	Promega	Goat	1 : 2500

2-12 フローサイトメーター

3.5 cm Dish 上の培養細胞を、1 mL の D-PBS で 2 回洗浄した後、0.5 mL のトリプシンを滴下しなじませ、すぐにアスピレーターで取り除いた。37℃で 5 分間静置し、1 mL の PBS に細胞を懸濁した後、5 mL ポリスチレンラウンドチューブ（CORNING）に移した。細胞の体積を測定する場

合、フローサイトメーター（BD Biosciences）を用いて FSC-A のチャンネルで検出した。死細胞の割合を測定する場合、培養上清中に含まれる細胞も含めて解析を行った。培養上清をマイクロチューブに移し、その後の PBS での洗浄液も回収した。培養上清及び洗浄液を 5,000 rpm で 5 分間遠心操作した後、上清の沈殿物を 0.5 mL D-PBS に懸濁し、トリプシン処理をした細胞懸濁液と混合した。1 μL/mL のヨウ化プロピジウム（Sigma-Aldrich）で細胞を 15 分間染色し、フローサイトメーターを用いて各細胞のヨウ化プロピジウムの蛍光強度を測定した。ヨウ化プロピジウムでの染色前の細胞も解析にかけネガティブコントロールとした。ヨウ化プロピジウムの蛍光シグナルは FL3-A のチャンネルで検出した。

2-13 3 次元細胞培養

Cellmatrix Type1-A（新田ゼラチン）内の A、B、C 液を氷上で冷却しながら、8:1:1 の割合で混合し、コラーゲン混合溶液とした。トリプシンにより剥離した細胞をコラーゲン混合溶液中にいれ泡立てないように注意しながら容器を振盪しよく混合した。混合溶液を新しいディッシュ上に充填した後、直ちに 37℃30 分静置し、ゲル化させた。硬化した後に、D-MEM を重層した。

2-14 細胞接着面積、体積測定

細胞接着面積を測定する場合、クリスタルバイオレット染色あるいは免疫染色を行い、顕微鏡からの像を得た。顕微鏡像から 1 細胞の輪郭を Image J Fiji を用いて囲い、細胞の面積を測定した。細胞は 30 細胞以上測定した。細胞体積は 3D 細胞培養を行った細胞を、ファロイジンよる染色を行った。染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss）で撮影を行い、得られた連続切片から二値化を行い、細胞表面積を算出した。

2-15 生細胞数測定

Cell Counting Kit-8（CCK8）（DOJIND）を用いて細胞数を測定した。CCK8 溶液を D-MEM で 11 倍希釈した混合液を調製し、96 ウェルプレート上の細胞に 110 μL ずつ滴下した。CO_2 インキュベーター内で 1 時間呈色反応を行い、測定の直前に 5 分間室温に静置した。マイクロプレートリーダー（Bio-Rad）を用いて 450 nm の吸光度を測定し、630 nm の波長を参照波長とした。

2-16 統計学的解析

各実験は同条件で独立に 3 回以上実施した。定量実験については、平均値、標準偏差を算出し、student の t 検定を実施して有意差を評価した。標準偏差をエラーバーとして図示し、t 検定で得られた p 値が 0.05 よりも小さければグラフに * を付し、0.01 よりも小さければ ** を付した。

【第 3 章　結果】

3-1 老化細胞における Nectin-4 と接着面積の関係

老化細胞は、平坦で拡大した形態など、さまざまな特徴的な形態学的変化を示すことが知られている。しかし、1960 年代に老化に関連する形態学的変化が初めて発見されて以来（Hayflick, L et al., 1961）、このプロセスが老化においてどのように調節されているかは不明のままであった。本研究では Nectin-4 の接着面積増大機能に着目し老化細胞の形態と Nectin-4 の関係について調査した。

3-1-1 Etoposide による老化誘導に伴う細胞形態の観察

細胞老化を引き起こした培養細胞は細胞体積が増加し、また顕微鏡下での接着面積も著しく増加する表現型を示すことが知られている（Campisi, 2013; Kuilman et al., 2010）。また、細胞老化が進行すると接着面積が不均一になる報告がある（Wang, E. & Gundersen, D., 1984）。老化細胞の接着面積を定量する本研究を遂行するにあたり、データの安定性を図るため、ばらつきの小さい条件を設定することを目的とし、抗がん剤である Etoposide 処理による細胞老化誘導において細胞の接着面積の増大の程度および不均一性を検証した。ヒト骨肉腫細胞である U2OS 細胞に Etoposide を用いて DNA 損傷を与え、クリスタルバイオレット染色を行った細胞の様子を顕微鏡により観察した。顕微鏡下における細胞が接着している領域を細胞接着面積とし、以後、細胞接着面積と呼ぶ。老化誘導後、7 日目までの細胞接着面積の変化及び分散を観察した。その結果、老化誘導していないコントロール細胞では日数の経過による細胞接着面積の中央値の大きな変動はなく約 1,500 μm^2 を保っていた一方、老化誘導細胞は経時的に増大し、7 日目には中央値はコントロール細胞の約 7.3 倍になった（図 2A, B）。また、コントロール細胞では一定であった細胞接着面積の標準偏差も、老化誘導細胞では時間経過に伴い増加した。この結果を踏まえ、以降 Etoposide 処理による老化誘導の細胞接着面積を計測する実験を行う際には十分に細胞接着面積が増加しかつ標準偏差が比較的小さい老化誘導後 3 日目に計測した。続いて老化誘導細胞の細胞接着面積の増大に伴い、細胞体積が変化しているかどうかを調べた。細胞体積の尺度としてフローサイトメトリーの前方散乱を用い、Etoposide 処理した U2OS 細胞を分析した。前方散乱光強度は測定粒子の表面積を反映する。本解析は U2OS 細胞をトリプシン処理により遊離した細胞の状態で測定しているので、解析対象の細胞はほぼ球形であることから、前方散乱光の増加は細胞体積の増加に対応する。解析の結果、Etoposide 処理後、細胞体積は約 2.5 倍に増加しており（図 2C）、これは以前報告された老化細胞の表現型と一致している（Biran et al., 2017）。また、細胞体積の解析において別の原理であるコールターカウンター法を用いた実験において同様に老化誘導後、細胞体積が増

大した（図 2D）。もし細胞の形状が比例して大きくなることを想定すると体積比は面積比の２分の３乗になる。しかし、今回得られた結果からは、老化細胞はコントロールと比較して、体積の相対的な変化よりも面積の相対的な変化の方が大きいことが示された。したがって、老化細胞はコントロール細胞と同様の形状ではなく、扁平な形状をしていることが考えられる。以上より Etoposide による老化誘導の際に細胞接着面積及び細胞体積が増大することが示された。

3-1-2 Etoposide 処理した際の Nectin-4 発現レベルの解析

マイクロアレイ比較解析または RNA-seq の網羅的解析および qPCR 法により、DNA 損傷、テロメア短縮、がん遺伝子の活性化の刺激によって誘導された老化細胞において Nectin-4 が発現上昇していることが観察されている（Nagano et al., 2016; Komseli et al., 2018; Lau et al., 2019）。特に DNA 損傷を与えた老化誘導では Nectin-4 が最も発現上昇の大きい因子であることが報告されている（Nagano et al., 2016）。そこで、Etoposide 処理により老化誘導した U2OS 細胞において Nectin-4 の発現上昇が誘導されるか否かを qPCR 法により確認した。経時的な変化を調べるために Etoposide による老化誘導後 3 日目、5 日目、7 日目の U2OS 細胞を回収し qPCR 解析を行った。図 3A, B に示されるように、Etoposide 処理に応じて Nectin-4 の mRNA レベルが増加し、細胞老化の際に発現量が上昇する p21 の発現と同様の時間的パターンで、処理から 5 日目にピークを迎えた。また、老化誘導前と比較して mRNA レベルは約 45 倍の量に増加した。続いてタンパク質レベルの変化もウェスタンブロッティング法により観察した。タンパク質レベルも mRNA レベルと同様に老化誘導により発現が増加し、そのピークは処理後 5 日目でコントロールと比較して約 3 倍に増加することが観察された（図 3C）。これらの結果から、U2OS 細胞においては Etoposide による老化誘導時に Nectin-4 が mRNA レベルとタンパク質レベルで発現が上昇し、処理後 5 日目に最高値に達することが示された。

3-1-3 *Nectin-4* ノックダウン細胞における老化細胞の形態観察

Etoposide による細胞老化において Nectin-4 が発現上昇することを確認し、他の文献においても老化細胞では Nectin-4 の発現上昇が報告されているが、これまでに老化細胞における Nectin-4 の機能に関する報告はない。そこで細胞老化における Nectin-4 の機能を調べるため、*Nectin-4* をノックダウンした老化細胞の形態的変化を観察した。まず *Nectin-4* を標的とした siRNA によるノックダウンを確認するために *Nectin-4* ノックダウン細胞および老化誘導を行った細胞の *Nectin-4* の mRNA レベルを qPCR 法により調べた。3-1-2 で見られたように Etoposide 処理により *Nectin-4* の mRNA の発現上昇がみられ、その発現上昇が *Nectin-4* を標的とした siRNA 処理によって約 30 %

のレベルまで抑制されたことを確認した（図 4A）。この条件で細胞接着面積の変化を観察した。結果、*Nectin-4* のノックダウン処理のみではコントロール細胞と比較して細胞接着面積の中央値がやや低下する傾向が観察された（図 4B, C）。また、Etoposide による老化誘導細胞では老化誘導していない細胞と比較して細胞接着面積の中央値が約 4 倍に増加し、その上昇が *Nectin-4* のノックダウンによって約 40 %抑制された。続いて同条件において細胞体積をフローサイトメトリーにより計測した（図 5A）。*Nectin-4* ノックダウンのみでは細胞体積の変化は見られず、Etoposide 処理のみでは約 2.2 倍増加した。また、Etoposide 処理時に *Nectin-4* のノックダウンを行ったところ、Etoposide 処理のみと比較して約 18%抑制された。また、コールターカウンター法での細胞体積の計測でも同様に Etoposide 処理により上昇した細胞体積は *Nectin-4* ノックダウンにより抑制された（図 5B）。この結果から、Nectin-4 が Etoposide に処理による細胞老化誘導の際、細胞接着面積と体積の両方に関するサイズの調節に関与している可能性が示された。

3-1-4 Nectin-4 過剰発現した細胞の形態解析

次に、Nectin-4 と細胞形態との関係を調べるために FLAG タグ付き Nectin-4 を含む発現ベクターを構築し、細胞に過剰発現した際の細胞接着面積を計測した。初めに Nectin-4 過剰発現プラスミドを U2OS 細胞に導入した後、ウェスタンブロッティング解析および免疫染色により Nectin-4 タンパク質の発現を確認した（図 6A, B）。免疫染色の像から Nectin-4 は細胞膜全体に分布しており（図 6A）、これは細胞膜接着分子としての Nectin-4 の機能と一致した（Takai and Nakanishi, 2003; Noyce and Richardson, 2012）。また細胞膜のみならず核周辺にも強いシグナルがみられたがこれは過剰発現によりゴルジ体や輸送小胞に蓄積した細胞膜へ輸送前の Nectin-4 が染色されている可能性が考えられる。ウェスタンブロッティング解析において予測される分子量付近に明瞭なバンドがみられたことを確認した（図 6B）。興味深いことに、Nectin-4 を過剰発現させると、老化細胞によく似た細胞接着面積が増大した形態を示した。この Nectin-4 過剰発現細胞の細胞接着面積を計測するために FLAG 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞接着面積の定量を行った。また、蛍光顕微鏡で非発現細胞の細胞接着面積の計測も行うため、同時に Phalloidin による F-アクチンの染色を行い細胞の形態を明瞭にし、蛍光顕微鏡で得られた像から細胞接着面積の定量を行った。その結果、Nectin-4 を過剰発現していない細胞と比較して過剰発現細胞では細胞接着面積が有意に増大した（図 7A, B）。よって Nectin-4 は細胞接着面積を増大させる働きをもつことが示された。続いて Nectin-4 過剰発現の細胞体積をフローサイトメトリーの前方散乱光及びコールターカウンター法により計測した。しかし、Nectin-4 の過剰発現による細胞体積の増加は見られず（図 7C, D）Nectin-4 の発現上昇のみでは、細胞体積の増加をもたらさないことが示唆された。

3-1-5 Nectin-4 過剰発現細胞、*Nectin-4* ノックダウン細胞の老化アッセイ

Nectin-4 過剰発現により細胞接着面積が増加する老化細胞様の表現型がみられたため、Nectin-4 が老化誘導を促進し、細胞老化の進行によって行っている可能性が考えられた。そこで Nectin-4 による老化誘導能を調べるために、Nectin-4 過剰発現細胞において Etoposide による老化誘導を行い、細胞老化の程度を調べた。まず senescence-associated β-galactosidase（SA-β-Gal）染色を行った（図 8A, B）。細胞老化の誘導によってリソソーム内の加水分解酵素である β-galactosidase が pH の高い状態でも活性を持つことが知られており、この β-galactosidase を SA-β-gal と呼び、老化細胞のマーカーとして広く用いられている（Dimri et al., 1995）。各サンプルに SA-β-Gal 染色を行った後、位相差顕微鏡にて像を取得し、青色に呈色されている細胞の割合を計測した。結果、Nectin-4 過剰発現のみの条件では SA-β-gal 活性に変化は見られなかった。老化誘導により SA-β-gal 活性の上昇が観察された一方、老化誘導細胞における Nectin-4 過剰発現による活性の変化は見られなかった。続いて同様の条件においてチミジンのアナログである EdU の取り込み量を測ることで増殖能を調べた（図 8C, D）。各サンプルに 3 時間 EdU を取り込ませた後、Click-iT Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor 488 dye を用いて EdU を取り込んだ細胞を染色し、蛍光顕微鏡で得られた像から EdU を取り込んだ細胞の割合を測定した。結果、Nectin-4 過剰発現のみの条件では EdU の取り込み量に変化は見られなかった。老化誘導により細胞老化の表現型である増殖能の低下が観察されたが、Nectin-4 過剰発現による変化は見られなかった。以上の結果から Nectin-4 過剰発現により老化マーカーの変化は引き起こされないことが明らかとなった。

続いて *Nectin-4* のノックダウンにより老化マーカーが変化するかを調べた。siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、Etoposide により細胞老化を誘導し SA-β-gal 活性の計測を行った（図 9A）。結果、*Nectin-4* ノックダウンの条件のみでは活性に変化はなく、Etoposide 処理による老化誘導で活性の上昇がみられた。老化細胞において *Nectin-4* ノックダウンしたによる SA-β-gal 活性の変化は観察されなかった。また、同様の処理条件において EdU の取り込み量を調べたところ、*Nectin-4* ノックダウンのみによる増殖能の低下は観察されなかったが、老化誘導時の Nectin-4 ノックダウンは老化誘導のみの場合と比較してさらなる増殖能の低下が引き起こされた（図 9B）。以上の結果は *Nectin-4* ノックダウン細胞において増殖能に変化は見られたことが他の結果と矛盾している。これは 3-3 で述べるが老化細胞での *Nectin-4* ノックダウン細胞がアポトーシスを引き起こすことが要因と考える。*Nectin-4* ノックダウン老化細胞が細胞死を引き起こした結果、増殖能が低下した細胞群が生き残った可能性が考えられる。以上の結果から Nectin-4 は細胞老化の促進や抑制には働かないことが示唆された。

3-1-6 老化誘導した正常線維芽細胞の細胞接着面積の解析

ここまでの結果は人骨肉腫由来の U2OS 細胞を用い、Etoposide による老化誘導を行った際のみの結果である。細胞老化において Nectin-4 による細胞接着面積増大の機能の一般性を検証するために、正常繊維芽細胞 Hs68 細胞を用い Nectin-4 が老化誘導細胞の細胞接着面積に影響があるか実験した。まず Etoposide による老化誘導で Nectin-4 の発現量が上昇するか否かを qPCR 法により検証した。U2OS 細胞と同様に Hs68 細胞においても Etoposide 処理による *Nectin-4* の発現量上昇が見られ、*Nectin-4* のノックダウンにより抑制された（図 10A)。*Nectin-4* のノックダウンによる発現量抑制は Etoposide 処理なしの場合も見られ、このことから U2OS 細胞と比較して老化誘導前の Nectin-4 の発現量が多いことが推測される。続いて同条件において老化アッセイである SA-β-gal 活性および EdU の取り込み量を測定した。結果、Etoposide 処理により細胞老化が誘導されたが、*Nectin-4* ノックダウンは老化誘導に変化を与えないことを確認した（図 10B, C)。さらに同条件においてクリスタルバイオレット染色を行い、細胞接着面積を計測した。*Nectin-4* ノックダウンのみの場合においても細胞接着面積の減少がみられた。Etoposide 処理により細胞接着面積が増大し、*Nectin-4* ノックダウンにより抑制された（図 10D, E)。

続いて他の老化誘導方法でも Nectin-4 が細胞接着面積に影響を与えるか検証した。Hs68 細胞は細胞分裂が繰り返されることによりテロメアの短縮が誘導され、その結果、複製老化が生じる。そこで、複製老化誘導方法を用い Nectin-4 と細胞接着面積との関係を解析した。まず複製老化における Nectin-4 の発現量を qPCR 法により計測した。複製老化が進行すると、*Nectin-4* の発現量が上昇し、*Nectin-4* のノックダウンによってその発現が抑制されることが確認された（図 11A)。SA-β-gal 染色および EdU アッセイにより、継代数 46 回の Hs68 細胞では老化が進行していることが示されたが、この際にも Etoposide による老化誘導の場合と同様に *Nectin-4* ノックダウンによる老化マーカーの変化は見られなかった（図 11B, C）ことから、Nectin-4 は複製老化においても老化誘導自体には関与しないことが確認された。細胞の接着面積は複製老化誘導時においても有意に増加し、*Nectin-4* ノックダウンによってこの接着面積増加が抑制されたことから、Nectin-4 は複製老化においても細胞接着面積を増大させる機能を有することが示唆された （図 11D, E)。

さらに、がん原遺伝子である Ras の活性化型変異体である RasG12V の過剰発現により細胞老化を誘導した細胞において解析を行った。RasG12V の過剰発現を行った U2OS 細胞に対して SA-β-gal 染色および EdU アッセイを行い、RasG12V の過剰発現により細胞老化が誘導されたことを確認した（図 12A, B)。また、RasG12V の過剰発現細胞において *Nectin-4* のノックダウンを行っても老化誘導が起こらないことを確認した。続いて RasG12V の過剰発現を行った U2OS 細胞及び

Hs68 細胞に対して免疫染色により過剰発現細胞、及び F-アクチンを染色し、蛍光顕微鏡での像から細胞接着面積を計測した。U2OS 細胞、Hs68 細胞双方の場合において RasG12V 過剰発現により細胞接着面積が増大することが観察され、が *Nectin-4* ノックダウンにより抑制された（図 12C - F）。この結果からがん原遺伝子の活性化による老化誘導の場合にも Nectin-4 が細胞接着面積増大に働くことが示唆された。

以上の結果は、Nectin-4 が老化誘導方法や細胞の種類に関係なく、細胞老化に伴う接着面積拡大の制御に関与していることを示している。

3-1-7 3 次元細胞培養した老化細胞の表面積の解析

ここまでの結果は培養皿での 2 次元培養の結果であり、ヒト生体内での議論を行うためには 3 次元培養環境での解析が必要である。特に 2 次元培養での細胞接着面積と 3 次元培養での細胞表面積が同等にあたるのか、あるいはまったく違った構造を持ち、性質がまったく異なるのかを検討する必要がある。そこで、コラーゲンゲルを用い生体内の環境を模倣した培養環境で老化細胞の細胞接着面積の変化が 3 次元培養下でも見られるのかを明らかにすることを目的とし、3 次元培養を行った。pEGFP を過剰発現させた U2OS 細胞をコラーゲン中に播種し、24 時間静置後、Etoposide による老化誘導を行った。その後共焦点顕微鏡により観察し、得られた像から imageJ で立体構築を行い、細胞表面積の算出を行った。結果、老化細胞はコントロール細胞と比較して細胞表面積が増大する傾向が見られた（図 13A）。しかし老化誘導していないコントロール細胞は細胞が増殖し 1 細胞の表面積の解析が困難であったため、定量化はできなかった。続いて *Nectin-4* をノックダウンしコラーゲン中に播種した後、Etoposide 処理による老化誘導し、F-アクチンを蛍光染色した。その後同様に共焦点顕微鏡で観察を行い、imageJ による表面積の定量を行った。*Nectin-4* をノックダウンすると今までの結果と一貫して表面積の減少が見られ（図 13B, C）、このことから 3 次元培養条件でも Nectin-4 により細胞接着面積が増大されることが示された。

3-2 老化細胞が細胞接着面積増大に至るまでのシグナル経路

ここまでの結果から、Nectin-4 が老化細胞の細胞接着面積において重要な因子である可能性が示された。Nectin-4 の形態学的な知見は見当たらないが、がん組織における疾患では Nectin-4 周辺のシグナルについての研究が盛んに行われている（Pavlova et al., 2013 ; Zhang et al., 2016）。このため、Nectin-4 の発現上昇がどのシグナル経路で細胞接着面積を制御するのかを解明するために、これまでに得られた知見に基づいて Nectin-4 の下流の因子を検討した。

3-2-1 老化誘導細胞における SFK-PI3K 経路

これまでに明らかにされていることとして、Nectin-1 と Nectin-3 の相互作用により SFK が活性化する（Fukuhara et al., 2004; Sakisaka and Takai, 2004）、Nectin-4 の下流では PI3K が活性化する（Das et al., 2015; Zhang et al., 2016）、という結果が報告されている。また、SFK は PI3K を活性化することが知られている（Pleiman et al., 1994; Lu et al., 2003）ため、SFK、PI3K 経路に着目し、SFK 及び PI3K の阻害剤を用いた際の細胞接着面積の変化を調べた。

SFK と PI3K の活性化は、それぞれ、SFK の活性に必要な SFK の Tyr418 のリン酸化レベル（Smart et al., 1981）と、PI3K 下流シグナル伝達の主要なリン酸化部位である Akt の Ser473 のリン酸化レベル（Alessi et al., 1996）をウェスタンブロッティングにより評価した。老化誘導時に SFK の阻害剤である PP2、PI3K の阻害剤である LY29002 を処理すると、老化誘導により SFK 及び Akt の上昇したリン酸化レベルはそれぞれの阻害剤によって抑制された（図 14A, B）。この時の細胞接着面積を観察すると老化誘導により増大した細胞接着面積がそれぞれの阻害剤により抑制された（図 14 C, D）。これらの結果から、SFK と PI3K は老化細胞の細胞接着面積増大の制御に寄与することが示唆された。

しかし、この結果のみでは、SFK と PI3K の阻害が老化誘導を直接抑制し、細胞接着面積の増大が抑制される可能性も考えられる。よって SFK と PI3K が老化誘導ではなく面積増大に作用しているかを調べるために老化アッセイを行った。細胞老化の指標である SA-β-gal（図 15A）および EdU 取り込み量の測定（図 15B）によって老化アッセイを行ったところ、PP2 および Y294002 処理による変化はなかった。これらの結果は、SFK-PI3K 経路が老化そのものを制御するのではなく、老化に伴う細胞接着面積増大に直接作用することが示唆された。また、老化誘導による細胞体積の増大はこれらの阻害剤によって抑制されたことから、SFK-PI3K 経路は細胞老化の際の細胞体積増大にも働く可能性が示された（図 15C）。

3-2-2 正常線維芽細胞の老化誘導における SFK-PI3K 経路

次に、老化時の細胞接着面積拡大における SFK と PI3K の関与の一般性を評価するために、正常線維芽細胞 Hs68 細胞を用い、細胞老化誘導の際に PP2、LY2949002 を処理した接着面積を評価した（図 16A）。その結果、Etoposide 誘導による細胞接着面積増大が PP2 と LY294002 により阻害され、U2OS 細胞と同様の結果が得られた。また、PP2 と LY294002 の同時処理では細胞接着面積の抑制に相加的な効果はなかった。このことから SFK と PI3K の接着面積増大に至るシグナル経路は同一の経路であることが考えられる。さらに別の老化誘導方法として RasG12V の過剰発現により誘導された細胞老化による細胞接着面積の増大も PP2 や LY294002 処理により阻害された（図

16B)。以上の結果は、細胞種や誘導刺激に依らず老化細胞では、SFK-PI3K 経路を介して細胞接着面積が制御されることを示している。

3-2-3 Nectin-4 過剰発現細胞における Nectin-4-SFK-PI3K 経路

さらに、SFK と PI3K による細胞接着面積の増大が Nectin-4 の発現上昇による細胞接着面積増大に関与しているか否か、また同一の経路にあるかを調べた。まず、Nectin-4 の下流のシグナルに SFK と PI3K の活性か見られるのかを調査した。Nectin-4 を過剰発現させ、SFK の Tyr418 のリン酸化レベル及び Akt の Ser473 のリン酸化レベルの経時的な変化を調べると、過剰発現後、1 日毎にリン酸化レベルが上昇し、Nectin-4 過剰発現後、2~3 日目に SFK と PI3K の活性化が観察された（図 17A, B)。さらに、PP2 と LY294002 処理は、Nectin-4 の過剰発現による細胞接着面積増大を有意に抑制した（図 17C, D)。これらの結果から、SFK と PI3K は Nectin-4 が細胞接着面積を増大させるシグナル伝達因子として機能していることが示唆された。

上述したように、SFK および PI3K は、Etoposide 処理および Nectin-4 の過剰発現によって誘導される細胞接着面積の増大に寄与する。しかし、Nectin-4、SFK、PI3K が、老化細胞の細胞接着面積の増大を制御する同一のシグナル経路にあるかどうかは不明である。そこで、Etoposide による老化誘導を行い、その上で *Nectin-4* のノックダウンと PP2 と LY294002 の同時処理を行い面積抑制効果の相加性を検証した（図 17E)。Etoposide による細胞接着面積の増大は、*Nectin-4* ノックダウン、PP2、LY294002 によりそれぞれ有意に抑制され、*Nectin*-4 ノックダウンへの PP2 および LY294002 による追加処理では、相加的な面積抑制効果は認められなかった。これらの結果は、Nectin-4、SFK、および PI3K が細胞接着面積の増大を制御する同じシグナル経路上にあることが示唆された。以上の結果を総合すると、Nectin-4 は SFK-PI3K シグナル伝達経路を活性化し、老化に伴う細胞接着面積の増大を誘導していることが示唆された。

3-2-4 Rac1 を活性阻害した Nectin-4 過剰発現細胞の細胞接着面積

次に SFK、PI3K 経路が細胞接着面積をどのように制御しているかを検討した。Nectin-4 はがんの進行において PI3K を活性化し、低分子 GTPase の Rac1 を活性化することが報告されている（Takano et al., 2009; Zhang et al., 2016)。また、Rac1 は葉状仮足などの細胞形態形成に関与していることが広く知られている（Abdrabou and Wang, 2018; Bustelo et al., 2007)。そこで Rac1 が Nectin-4 による細胞接着面積の増大に関与しているかを調べることを目的とし､HA タグを付加した Rac1 の変異体（G12V : 構成的活性型、T17N : ドミナントネガティブ型）を構築した（Best et al., 1996; D'Souza-Schorey et al., 1997)。構築した Rac1 を含むプラスミドを U2OS 細胞に導入した後、ウェ

スタンブロッティング解析によりタンパク質の発現を確認した（図 18A）。以前報告されたようにRac1WT のみの過剰発現によりわずかに細胞接着面積の増大が引き起こされた（図 18B, C）（Frank et al., 2006）。さらに構成的活性型の Rac1G12V の過剰発現により、細胞接着面積の増大の効果はより強くなることが見られたが、ドミナントネガティブの Rac1T17N の過剰発現による細胞接着面積の変化は見られず（図 18B, C）、細胞接着面積が Rac1 の活性依存的に増加したことが示された。さらに Nectin-4 と Rac1 の共過剰発現を行った場合、Nectin-4 過剰発現により増大した細胞接着面積は Rac1WT による変化は見られず、Rac1G12V により増強されたが、Rac1T17N により有意に減衰された（図 18B, C）ことから、Nectin-4 による細胞接着面積の増大には Rac1 の活性が必要であることが示唆された。

3-2-5 Rac1 を活性阻害した老化細胞の細胞接着面積

続いて Rac1 の活性が老化誘導時の細胞接着面積増大に関わっているか否かを検証した。Nectin-4 過剰発現細胞の結果と一致して Etoposide による細胞接着面積の増大は Rac1T17N の過剰発現により抑制された（図 19A, B）。これらの結果は、Rac1 の活性が細胞老化に伴う細胞接着面積の増大において Nectin-4 の下流で機能することを示唆している。さらに、各 Rac1 は、SA-β-gal 染色および EdU アッセイによって確認された老化誘導自体には影響を及ぼさなかった（図 13C, D）ことから、Rac1 活性が老化の誘導に直接影響を与える可能性は排除された。

次に、Etoposide による細胞接着面積の増大における Nectin-4 と Rac1 の関連性について解析した。Nectin-4 のノックダウンと Rac1T17N の過剰発現は、いずれも Etoposide による細胞接着面積の拡大を有意に抑制した。これらの処理を同時に行った場合、相加的な細胞接着面積の抑制効果は観察されず（図 19E）、Nectin-4 経路と Rac1 経路が同一である可能性が示唆された。さらに RasG12V の過剰発現により誘導された細胞老化による細胞接着面積の増大も Rac1T17N の過剰発現により阻害された（図 19F）。結論として、以上の結果は、老化誘導及び Nectin-4 過剰発現によって引き起こされる細胞接着面積の増大は、SFK-PI3K-Rac1 経路を介することを示唆している。

3-3 細胞接着面積と細胞死

ここまで老化細胞の細胞接着面積の増大機構に着目してきたが、老化細胞の接着面積が増加することによる生理的意義は知られていない。細胞外マトリックスでコーティングされた接着領域上で細胞を培養し、細胞接着面積を減少させることで細胞死が誘導されることが報告されており（Chen et al. 1997）、接着面積増加による意義の候補として細胞死からの回避が考えられた。そこで Nectin-4 による細胞接着面積の増大により老化細胞の生存が促進されるのではないかと推測し、

細胞接着面積と生存の解析を行った。

3-3-1 Nectin-4 と細胞の生存の解析

Nectin-4 ノックダウンによる細胞接着面積拡大の抑制が細胞死につながるかどうかを調べるために、WST-8 アッセイを用いて、*Nectin-4* をノックダウンした老化細胞とノックダウンしていない老化細胞の相対的な細胞数（Etoposide の投与前後）を比較した（図 20A）。*Nectin-4* ノックダウンは非老化誘導細胞の細胞増殖および生存に影響を及ぼさなかった一方、老化誘導細胞においては *Nectin-4* ノックダウンにより、相対細胞数が有意に減少した。正常線維芽細胞の Hs68 細胞でも同様の結果が得られた（図 20B）。他の指標として細胞死を直接評価するために、*Nectin-4* ノックダウン細胞を細胞死の指標であるヨウ化プロピジウム（PI）で染色した。*Nectin-4* のノックダウンは、Etoposide 処理による老化誘導と組み合わせると細胞死を有意に増加させ、老化細胞において Nectin-4 は細胞の生存に働いていることが示唆された（図 20C）。老化細胞の生存における Nectin-4 の役割をより詳細に調べるために、*Nectin-4* ノックダウン細胞とコントロール細胞の間で、老化誘導刺激である Etoposide に対する感受性を比較した（図 20D, E）。*Nectin-4* ノックダウンは、IC50 が約 50%低下したことから、Etoposide に対する感受性が増加したことが示唆された（図 20D）。同様の傾向は Hs68 細胞でも観察され（IC50 は 89%減少）（図 20E）、Nectin-4 を介した接着面積の増大が老化細胞の生存促進に寄与している可能性を裏付けている。

3-3-2 老化誘導による細胞接着面積の増大と生存の関係

細胞接着面積と生存率の関係をより直接的に解析するために、Etoposide 処理の 3 日目から 5 日目までのタイムラプス撮影により、大きい接着面積の細胞と小さい接着面積の細胞の細胞生存率を比較した（図 21A - G）。取得した画像に基づいて、3 日目に細胞接着面積を測定し、5 日目の細胞の生存を判定した（つまり 5 日目まで生存した細胞と 5 日目までに細胞死を引き起こした細胞に分類した）（図 21A, B）。 生細胞と死細胞の細胞接着面積の度数分布ヒストグラムから、接着面積の大きい細胞は 5 日目まで生存する傾向があり、逆に小さい細胞ほど細胞死を引き起こしやすい傾向が見られ（図 21C, D）、細胞接着面積の増大が細胞の生存に寄与していることが示唆された。これに伴い、細胞接着面積と生存率の間には *Nectin-4* ノックダウンしていない老化誘導細胞とノックダウンした老化誘導細胞でそれぞれ R=0.621 と 0.603 の正の相関が見られた（図 21E, F）。また、大きい接着面積の細胞 （>2400 μm^2、データセットの中央値に相当）と小さい接着面積（< 2400 μm^2）で細胞死率を比較したところ、統計学的にも小さい細胞ほど有意に高い死滅率を示した（図 21 G）。さらに、大きい接着面積の細胞と小さい接着面積の生存率の差が *Nectin-4* ノックダウン細胞で同様に観察され（図 21C - G）、これは細胞接着面積と老化細胞の生存能力の直接的な

関係を支持している。

この細胞死をもたらす小さい細胞接着面積が細胞死に伴う細胞の縮小などを示す可能性が考えられた。この可能性を否定するため細胞のタイムラプス撮影画像から一細胞の連続的な細胞接着面積を取得し、プロットした（図 22)。結果、細胞死を引き起こす直前の細胞接着面積の減少がほとんど観察されないため、細胞死をもたらす小さい細胞接着面積は細胞死の初期の兆候ではないことを確認している。

3-3-3 細胞接着面積を制限した老化細胞の細胞生存率

細胞接着面積と細胞の生存の関係をより詳細に明らかにするため、接着面積を制限するコーティング上で老化細胞のタイムラプス撮影を行い、細胞の生存の判定を行った。これには一部の領域にのみフィブロ Nectin の結合モチーフである RGD ペプチドを共有結合させているチャンバーを用いた。チャンバー内には直径 20 μm、30 μm、100 μm、200 μm の円形の細胞接着パターンがコートされており、RGD モチーフには Integrin が結合し、細胞が接着することが可能である（図 23A)。ウェルごとに異なる大きさのパターンが存在し、これら四つのウェル上に細胞を播種し、老化誘導後、大きさが異なるパターンごとの細胞死の割合を調べた。小さいパターンの方（直径 20 μm、30 μm）でより多くの細胞死が引き起こされる傾向があることが観察されたことから（図 23B)、老化細胞の接着面積が小さくなると細胞死が引き起こされることが示唆された。

次に、細胞接着を制限することでアポトーシスが引き起こされることが知られていることから、接着面積縮小による細胞死がアポトーシスによって引き起こされるかどうかを調べた（Chen et al. 1997)。アポトーシスのマーカーであるアネキシン V 陽性細胞の割合は、Etoposide と *Nectin-4* ノックダウンの同時処理によって増加した （図 24A)。さらに、アポトーシスの実行時にカスパーゼによって切断される DNA 修復タンパク質である PARP の切断も評価した。老化細胞では Nectin-4 のノックダウンにより PARP の切断が増加しており（図 24B)、細胞接着面積増大の抑制により老化細胞がアポトーシスを引き起こしやすくなったことが示唆された。以上の結果から Nectin-4 による細胞接着面積の増大が生存に働くことが明らかとなった。

3-3-4 Integrinβ1 ノックダウン細胞の細胞接着面積

この RGD コーティングの結果から面積増大による生存には Integrin が関与している可能性が考えられた。Integrin と Nectin-1 及び -3 の相互作用が報告されている （Sakamoto Y, et al. 2006)、Integrinβ1 の発現上昇で細胞接着面積増大が報告されている（Lesjak MS, et al. 2014）ことからも Integrin が細胞老化の接着面積増大に関与すると予測し、細胞老化を誘導し、*Integrinβ1* をノックダウンした際の細胞接着面積の変化を観察した。その結果、老化誘導で増大した細胞の面積が

Integrinβ1 のノックダウンにより有意に抑制されることが観察され（図 25A）、Nectin-4 過剰発現細胞でも同様に Nectin-4 により増加した細胞の面積が *Integrinβ1* のノックダウンによりにより有意に抑制された（図 25B）。これらのことから Nectin-4 による細胞接着面積増大には Integrin を介していることが示唆された。

本研究により、Nectin-4 が SFK/PI3K/Rac1 経路を活性化することにより老化細胞の細胞接着面積増大を促進し、これが老化細胞の生存に寄与する可能性があることが示唆された（図 26）。

【第 4 章　考察】

細胞老化が引き起こされると細胞の形態が巨大化することは広く知られているがその分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では老化細胞において Nectin-4 は細胞接着面積の増大に寄与し、さらに細胞の生存にも働くことが示された。これらの結果を踏まえて細胞老化における Nectin-4 の機能について考察する。

細胞体積

細胞体積の変化は *Nectin-4* ノックダウンで細胞老化による体積増大の抑制が見られたものの、Nectin-4 過剰発現においては体積増大の大きな変化は観察されなかった。これは体積増大においては Nectin-4 のみでは機能せず、他の因子が関与する可能性が示唆される。この候補として以前細胞体積を増大させる因子として報告があった mammalian target of rapamycin （mTOR） が挙げられる （Edinger and Thompson, 2002; Fingar et al., 2002）。mTOR は Akt の下流にあり、細胞老化において活性化される （Astle et al., 2012; Demidenko and Blagosklonny, 2008; Edinger and Thompson, 2002; Manning et al., 2002）。Akt の下流であれば Nectin-4 の過剰発現により活性が上昇すると予測されるが、体積に変化は見られないことから、老化時のみ活性化され得る因子が Nectin-4 と共働して mTOR を制御している可能性が考えられる。細胞体積の制御においては mTOR を制御している Akt 以外の因子を解析することで明らかとなると考える。細胞の面積と体積は相関関係にあるとは限らないことが今回の結果から明らかとなった。このことから Nectin-4 による細胞接着面積の増大は接着面を広げるように平たく形態変化していると予想される。この扁平的な形態変化は細胞膜を蛍光標識した細胞を共焦点顕微鏡で観察し、細胞の立体構築をすることで確かめられると考える。また、細胞体積増大は *Nectin-4* ノックダウンで抑制されたことから体積の増大にも Nectin-4 は必要であることが示唆された。この細胞体積増大の抑制は仮にタンパク質の合成スピードに変化がないのであれば細胞質のタンパク質濃度を上昇させると予想される。細胞質のタンパク質の濃度変化により老化が誘導されるという報告（Neurohr et al., 2019）もあり、細胞質のタンパク質の濃度変化は細胞の機能的な変化をもたらすと考えられる。

細胞外マトリックスに結合する複合体が接着シグナルによって生存に寄与することが報告されており（Ilić et al., 1998）、そして細胞接着領域の制限が細胞接着因子などの遺伝的変化を引き起こすことが報告されている（Jain et al., 2013）。本研究では、Nectin-4 による細胞の接着面積拡大が生存につながることを示し、3 次元培養環境下でも細胞の表面積において同様の傾向が見られた。さらに、3D 培養の表面積が増加すると、ストレスファイバーやビンキュリンのレベルも増加すると報告されている（Bao et al., 2017）。したがって、細胞領域の広がりが接着面積を増加させ、三次

元環境でも生存促進につながると考えられる。

細胞老化とアポトーシス

本研究では、*Nectin-4* のノックダウンにより、老化した細胞がアポトーシスを引き起こしやすくなる現象が観察された。老化細胞がなぜ抗アポトーシスの性質を持つのかは様々な見解があるが、この理由については以下のことが考えられる。老化細胞は生体内で老化細胞が機能する際に創傷治癒や免疫機能の向上などに寄与していると考えられている機能が生体にとって有益な機能面であると考えられている（Calcinotto A, et al. 2018）。組織が損傷を受けた場合、細胞老化を誘導することで損傷に応答して修復を促進する役割を果たす。一方、損傷した組織の中では様々なストレスを受けやすい環境にさらされる環境でもあるため、老化細胞は平常よりも強い生存機構を備えている必要があるのかも知れない。こうした有益な機能は老化細胞が役割を全うした後、速やかに排除されれば問題ないが、何らかの問題で長期に組織内にとどまってしまうと慢性炎症が引き起こされてしまう可能性もあり、厳密な制御が必要であると思われる。

序論でも述べたように、低濃度の Etoposide 処理は細胞老化を引き起こす一方、高濃度の Etoposide 処理はアポトーシスを誘発する手法が以前の研究において確立されており、p53 の発現量や修飾の違いによってアポトーシスと老化の運命が決定されるとされている（Nagano T, et al. 2016）。今回の結果からは、本来は細胞老化として進むはずだった運命が、*Nectin-4* のノックダウンにより細胞死へと変わる可能性が考えられる。老化細胞へと向かう運命である細胞を細胞死に変えるプロセスや原理が解明出来れば老化細胞の除去や老化細胞の発生を抑制する応用へとつなげることが可能である。

Nectin-4 の下流のシグナル

今回 SFK-PI3K の下流因子として Rac1 に注目した理由は PI3K 経路の下流にあり、葉状仮足を形成することが知られていたためである。一方 PI3K の下流では Rac1 以外にも Cdc42 が活性化するという報告があり（Jiménez et al., 2000）、Cdc42 は Rho ファミリータンパク質で糸状仮足の形成に働くことが知られている（Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995）。Rac1 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現により細胞接着面積が正常な細胞と同程度まで回復しないことから老化細胞の接着面積は Rac1 のみならず他の因子が働く可能性も考えられる。ここで示した Rac1、Cdc42 以外にも PI3K によって活性化しうる Rho ファミリーは複数あり（Yang & Shin, 2008）、表現型を決定づける因子を特定するにはこれらのタンパク質の解析が必要になってくると考えられる。

Nectin-4 は細胞外ドメインが膜上のプロテアーゼにより切り離され、遊離するということが知

られており、この遊離されたペプチドはがんの予後不良を示すマーカーとなるという報告がある（Fabre-Lafay et al., 2005, 2007; Siddharth et al., 2018）。細胞内の SFK シグナル経路が活性化するために細胞質のドメインではなく細胞外のドメイン及び他の膜タンパク質を介しているのであればこの遊離した Nectin-4 細胞外ペプチドの影響も考慮するべきである。これまでの解析は Nectin-4 を過剰発現している細胞に注目してきていたが、遊離した Nectin-4 は過剰発現細胞以外の周囲の細胞にも影響を与える可能性がある。これを調べる方法としてはまず培養上清に遊離した Nectin-4 の細胞外ドメインが存在するのかを確かめ、Nectin-4 過剰発現細胞と同じ培養皿上にありかつ Nectin-4 を過剰発現していない細胞の解析を行うことで周囲への影響が調べられる。またそれ以外の方法に Nectin-4 過剰発現細胞の培養上清を通常の細胞に処理する方法や、Nectin-4 細胞外ドメインのペプチドを合成し細胞に処理する方法が挙げられる。Nectin-4 は 1 個の細胞膜上で Nectin 同士が結合する *cis* 結合と異なる細胞膜上の *trans* 結合をともに形成することが知られているが、この方法では *trans* 結合の影響を調べることが可能である。Nectin-4 過剰発現細胞での解析は *cis*、*trans* 結合両方の解析であったが、*trans* 結合のみの解析により新たな機能が見つかる可能性がある。

Integrin β1

Nectin-4 による細胞接着面積制御は複製老化の際にも観察された。*Nectin-4* をノックダウンすると複製老化を引き起こしている細胞でも細胞接着面積が減少する結果から Nectin-4 は細胞接着面積が増大した後でも細胞接着面積を維持するために働くことが考えられる。また、細胞接着面積の増大には Rac1 が働くことが示唆された。接着斑により細胞は基質と接着しており、接着斑には Focal Adhesion Kinase（FAK）が存在し、FAK のリン酸化によって Rac1 が活性化するという報告がある（Chang et al., 2007; Chiu et al., 2016）。Integrin は FAK のリン酸化を誘導し細胞内にシグナルを伝達することが知られている（Guan and Shalloway, 1992; Mitra and Schlaepfer, 2006; White et al., 2004）ため、Nectin-4 は細胞接着面積を維持するために、Integrin と相互作用し FAK の活性化に働いているのではないかと考えられる。このことを確かめるためには Nectin-4 発現時の FAK の活性や Integrin との相互作用を見る必要がある。また、細胞接着面積が増大したあとに *Nectin-4* ノックダウンにより面積増大が抑制されることは Hs68 細胞における複製老化でしか見ていないため、Etoposide による老化誘導や U2OS 細胞での実験での検証が必要だと考えられる。

膜テンション

Nectin-4 が細胞接着面積を制御することが示唆されたことから、細胞表面積の変動により細胞

膜のテンションにも影響を与えることが可能性の一つとして考えられる。老化細胞では細胞膜のテンションが低下することが報告されており（Rebehn L, et al. 2023）、また様々なサイトカインやケモカインを分泌することも知られている（Kuilman T and Peeper DS, 2009）。細胞膜のテンションの低下は膜の変形や融合が助長され、分泌小胞が細胞膜と融合しやすくなる可能性が考えられる。老化細胞の分泌物の増加はこのような細胞膜の性質の変化も助長させている要因であるのかも知れない。*Nectin-4* のノックダウンにより細胞表面積の増大が抑制されることから、老化誘導により減少した細胞膜が回復する方向に働く可能性が考えられる。老化細胞の細胞膜のテンションが増加することによりサイトカイン及びケモカインの分泌が阻害される可能性が考えられる。現在認識されている老化細胞が生体に与える悪影響は主に老化細胞由来の分泌物による慢性炎症が原因であり、老化細胞の除去のみならずこの分泌物の除去法も模索されている。細胞表面積を阻害できる手法が確立できればこの分泌因子を阻害することも可能になるのかも知れない。

接着因子としての役割と Nectin ファミリーとの関係

Nectin ファミリーは Nectin-1、Nectin-２、Nectin-3、Nectin-4 の４つから構成されており、すべて細胞外に 3 つの Ig 様ドメインがあり、細胞内に Afadin 結合モチーフを含む細胞質尾部がある（Samanta D, and Almo SC., 2015）。これらは組織により発現パターンが異なり、Nectin-4 以外は恒常的に多くの組織において発現が見られる。またシグナル経路として下流 Nectin-1 と Nectin-3 の下流では SFK が活性化することが知られており、本研究の Nectin-4 と同経路の活性を制御している。このことから Nectin の他ファミリーにおいても同様の細胞接着面積を制御している可能性が考えられる。今回の実験では老化誘導していない細胞において Nectin-4 をノックダウンしても細胞接着面積に大きな変化は見られなかった。しかしこれは Nectin-4 の内在性の発現がほとんどないためであると考えられる。Nectin-4 以外の Nectin ファミリーでの恒常的な発現細胞のノックダウンにより細胞接着面積が抑制される可能性が考えられる。しかしこれとは別の可能性として Nectin ファミリーをノックダウンしても老化誘導していない細胞では細胞接着面積が変化しない可能性もある。これは今回見出した経路が老化細胞特異的な経路での細胞接着面積の制御が行われていた場合であり、非老化誘導細胞は別の機構で細胞接着面積制御が行われていた場合である。この場合は Nectin ファミリーのなかでもやはり Nectin-4 のみが老化細胞の接着面積制御に関わると考えられる。Nectin ファミリーが細胞接着面積を制御するのか否かを結論付けるのはさらなる実験が必要であると思われる。

Nectin-4 の治療標的について

老化細胞は老化関連疾患の原因となり、老化細胞除去による老化関連疾患の治療の研究が進められている。実際老化細胞に細胞死を誘導することで体内から除去するように遺伝子改変したマウスにおいて、心血管疾患や認知症といった老化関連疾患の改善や健康寿命の延長が見られ、老化細胞の除去が老化関連疾患の有効な治療法になる報告が集積されてきている（Baker DJ, 2016; van Deursen JM, 2019）。しかし、開発されてきた老化細胞除去薬は老化細胞非特異的な因子を標的としており、重篤な副作用が生じた事例も見られ、未だ実用化には至っていない（Justice JN, et al. 2019）。老化細胞が長期間生存することが疾患の一因であるが、なぜ損傷を受けた老化細胞が生存を維持し続けるのかは不明である。本研究の老化細胞巨大化を端緒とした研究により、意外にも、生存メカニズムとの関連が明らかになってきており、本研究の細胞内へのシグナル伝達の因子が同定できれば老化細胞の新規の生存機構として加わると共に老化細胞除去の新たなターゲット因子となり得る。細胞老化巨大化の解明、そして老化細胞生存の新たな機構を見出すことで老化細胞除去への一助となることが期待される。

細胞体積の変動は老化細胞のみならず、がん細胞にも見られることが報告されている。がん細胞の巨大化は薬剤耐性を持つ細胞群やより悪性度の高い細胞群を産み出すことが報告されており（Sundaram M, et al. 2004）、細胞体積の増大はがんのマーカーとしても有用な方法であることも報告されている（Shashni B, et al. 2018）。抗がん剤等に耐性を持つがん細胞の存在は大きな問題であり、がん細胞生存維持機構への研究が行われてきているが、そこに本研究で解明される巨大化が関与する可能性がある。また、Nectin-4 は様々ながんにおいて高発現することも知られているため、（M-Rabet M, et al. 2017）、Nectin-4 を標的とした治療法は老化細胞のみならずがん細胞にも直接細胞死を誘導する一挙両全の効果を持つ可能性も期待できる。老化細胞のサイズへの理解は老化細胞のみならず、サイズの均衡が崩れたがん細胞などにもその機構が応用できる可能性を持ち、今日の生物学に大きく貢献出来うるものだと考える。

【参考文献】

Abdrabou, A. & Wang, Z. Post-Translational Modification and Subcellular Distribution of Rac1: An Update. *Cells* **7**, (2018).

Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–51 (1996).

Aoki, J., Koike, S., Asou, H., Ise, I., Suwa, H., Tanaka, T., Miyasaka, M. & Nomoto, A. Mouse homolog of poliovirus receptor-related gene 2 product, mPRR2, mediates homophilic cell aggregation. *Exp. Cell Res.* **235**, 374–84 (1997).

Astle, M. V., Hannan, K. M., Ng, P. Y., Lee, R. S., George, A. J., Hsu, A. K., Haupt, Y., Hannan, R. D. & Pearson, R. B. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: Implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* **31**, 1949–1962 (2012).

Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E. & Helin, K. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* **23**, 4709–16 (2004).

Bae, N. S. & Baumann, P. A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Mol. Cell* **26**, 323–34 (2007).

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D. & Van Deursen, J. M. Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).

Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L. & van Deursen, J. M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–6 (2011).

Bao, M., Xie, J., Piruska, A. & Huck, W. T. S. 3D microniches reveal the importance of cell size and shape. *Nat. Commun.* **8**, 1–12 (2017).

Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. & Lim, L. The Ras-related GTPase Rac1 Binds Tubulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 3756–3762 (1996).

Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z. & Krizhanovsky, V. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* **16**, 661–671 (2017).

Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M. & Baker, D. J. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578–582 (2018).

Bustelo, X. R., Sauzeau, V. & Berenjeno, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* **29**, 356–370 (2007).

Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M. & Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol. Rev.* **99**, 1047–1078 (2019).

Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).

Campisi, J., Kapahi, P., Lithgow, G. J., Melov, S., Newman, J. C. & Verdin, E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature* **571**, 183–192 (2019).

Chan, A. S. L. & Narita, M. Short-term gain, long-term pain: The senescence life cycle and cancer. *Genes Dev.* **33**, 127–143 (2019).

Chang, F., Lemmon, C. A., Park, D. & Romer, L. H. FAK Potentiates Rac1 Activation and Localization to Matrix Adhesion Sites: A Role for βPIX. *Mol. Biol. Cell* **18**, 253–264 (2007).

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A. & Zhou, D. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* **22**, 78–83 (2016).

Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).

Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. & Dilley, T. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* **113**, 4087–97 (2000).

Chen, Q. & Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4130–4134 (1994).

Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J. & Van Deursen, J. M. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* **354**, 472–477 (2016).

Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–53 (2014).

Chilosi, M., Carloni, A., Rossi, A. & Poletti, V. Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl. Res.* **162**, 156–73 (2013).

Chiu, Y. W., Liou, L. Y., Chen, P. T., Huang, C. M., Luo, F. J., Hsu, Y. K. & Yuan, T. C. Tyrosine 397 phosphorylation is critical for FAK-promoted Rac1 activation and invasive properties in oral squamous cell carcinoma cells. *Lab. Investig.* **96**, 296–306 (2016).

Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 2853–68 (2008).

Courtois-Cox, S., Jones, S. L. & Cichowski, K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **27**, 2801–9 (2008).

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. & Jackson, S. P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–8 (2003).

Das, D., Satapathy, S. R., Siddharth, S., Nayak, A. & Kundu, C. N. NECTIN-4 increased the 5-FU resistance in colon cancer cells by inducing the PI3K–AKT cascade. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **76**, 471–479 (2015).

Davaapil, H., Brockes, J. P. & Yun, M. H. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development* **144**, 106–114 (2017).

Demaria, M. *et al.* Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* **7**, 165–176 (2017).

Demidenko, Z. N. & Blagosklonny, M. V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* **7**, 3355–3361 (2008).

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540–2551 (1994).

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P. G. & d'Adda di Fagagna, F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–42 (2006).

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. & Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367 (1995).

D'Souza-Schorey, C. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445–5454 (1997).

Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2276–2288 (2002).

Fabre-Lafay, S., Garrido-Urbani, S., Reymond, N., Gonçalves, A., Dubreuil, P. & Lopez, M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-α-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J. Biol. Chem.* **280**, 19543–19550 (2005).

Fabre-Lafay, S. *et al.* Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer* **7**, 73 (2007).

Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16**, 1472–87 (2002).

Frank, S. R., Adelstein, M. R. & Hansen, S. H. GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *EMBO J.* **25**, 1848–1859 (2006).

Freund, A., Orjalo, A. V, Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–46 (2010).

Fukuhara, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Honda, T., Hoshino, T., Yamada, T., Ogita, H., Okada, M. & Takai, Y. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J. Cell Biol.* **166**, 393–405 (2004).

Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobreva, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P. & d'Adda di Fagagna, F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 355–65 (2012).

Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C. & d'Adda di Fagagna, F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One* **9**, e110969 (2014).

Guan, J. L. & Shalloway, D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* **358**, 690–692 (1992).

Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**, 1352–5 (2008).

Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).

Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y. & Greider, C. W. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* **107**, 67–77 (2001).

Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Chu, Y. W., Trevor, K. T. & Seftor, R. E. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 507–25 (1996).

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J. M. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311**, 1257 (2006).

Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14**, 501–13 (2004).

Huang, K. & Lui, W. Y. Nectins and nectin-like molecules (Necls): Recent findings and their role and regulation in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 54–61 (2016).

Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stöckl, P., Jansen-Dürr, P. & Gnaiger, E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J.* **380**, 919–28 (2004).

Ilić, D., Almeida, E. A., Schlaepfer, D. D., Dazin, P., Aizawa, S. & Damsky, C. H. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell Biol.* **143**, 547–60 (1998).

Jain, N., Iyer, K. V., Kumar, A. & Shivashankar, G. V. Cell geometric constraints induce modular gene-expression patterns via redistribution of HDAC3 regulated by actomyosin contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11349–11354 (2013).

Jiménez, C., Portela, R. A., Mellado, M., Rodríguez-Frade, J. M., Collard, J., Serrano, A., Martínez-A, C., Avila, J. & Carrera, A. C. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell Biol.* **151**, 249–261 (2000).

Justice, J. N., Nambiar, A. M., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Pascual, R., Hashmi, S. K., Prata, L., Masternak, M. M., Kritchevsky, S. B., Musi, N. & Kirkland, J. L. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* **40**, 554–563 (2019).

Kawakatsu, T., Shimizu, K., Honda, T., Fukuhara, T., Hoshino, T. & Takai, Y. Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 50749–55 (2002).

Kim, K.-H., Chen, C.-C., Monzon, R. I. & Lau, L. F. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2078–90 (2013).

Kirschner, K., Samarajiwa, S. A., Cairns, J. M., Menon, S., Pérez-Mancera, P. A., Tomimatsu, K., Bermejo-Rodriguez, C., Ito, Y., Chandra, T., Narita, M., Lyons, S. K., Lynch, A. G., Kimura, H., Ohbayashi, T., Tavaré, S. & Narita, M. Phenotype specific analyses reveal distinct regulatory mechanism for chronically activated p53. *PLoS Genet.* **11**, e1005053 (2015).

Komseli, E.-S. *et al.* A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence. *BMC Genomics* **19**, 37 (2018).

Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F.-S. & Gao, B. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* **56**, 1150–9 (2012).

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. & Lim, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1942–1952 (1995).

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. & Lowe, S. W. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–67 (2008).

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–2479 (2010).

Kuilman, T. & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94 (2009).

Lau, L., Porciuncula, A., Yu, A., Iwakura, Y. & David, G. Uncoupling the Senescence-Associated Secretory Phenotype from Cell Cycle Exit via Interleukin-1 Inactivation Unveils Its Protumorigenic Role. *Mol. Cell. Biol.* **39**, (2019).

Law, A.-L., Vehlow, A., Kotini, M., Dodgson, L., Soong, D., Theveneau, E., Bodo, C., Taylor, E., Navarro, C., Perera, U., Michael, M., Dunn, G. A., Bennett, D., Mayor, R. & Krause, M. Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration in vivo. *J. Cell Biol.* **203**, 673–689 (2013).

Lawson, C. D. & Burridge, K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* **5**, e27958 (2014).

Lesjak, M. S., Marchan, R., Stewart, J. D., Rempel, E., Rahnenführer, J. & Hengstler, J. G. EDI3 links choline metabolism to integrin expression, cell adhesion and spreading. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 499–508 (2014).

Loeser, R. F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 971–9 (2009).

Lu, Y., Yu, Q., Liu, J. H., Zhang, J., Wang, H., Koul, D., McMurray, J. S., Fang, X., Yung, W. K. A., Siminovitch, K. A. & Mills, G. B. Src Family Protein-tyrosine Kinases Alter the Function of PTEN to Regulate Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Cascades. *J. Biol. Chem.* **278**, 40057–40066 (2003).

Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S. & Takai, Y. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell Biol.* **139**, 517–28 (1997).

Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol. Cell* **10**, 151–162 (2002).

Martin, J. A., Brown, T. D., Heiner, A. D. & Buckwalter, J. A. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S96-103 (2004) doi:10.1097/01.blo.0000143818.74887.b1.

Martin, J. A., Brown, T., Heiner, A. & Buckwalter, J. A. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology* **41**, 479–91 (2004).

Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–4 (2005).

Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F. & Komuro, I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* **15**, 1082–7 (2009).

Mitra, S. K. & Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 516–523 (2006).

Montell, D. J., Yoon, W. H. & Starz-Gaiano, M. Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 631–645 (2012).

M-Rabet, M., Cabaud, O., Josselin, E., Finetti, P., Castellano, R., Farina, A., Agavnian-Couquiaud, E., Saviane, G., Collette, Y., Viens, P., Gonçalves, A., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Olive, D., Bertucci, F. & Lopez, M. Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **28**, 769–776 (2017).

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. & Serrano, M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104–18 (2013).

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.* **6**, 31758 (2016).

Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J. & Amon, A. Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* **176**, 1083–1097 (2019).

Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53–62 (1995).

Noyce, R. S. & Richardson, C. D. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol.* **20**, 429–439 (2012).

Ogita, H. & Takai, Y. Activation of Rap1, Cdc42, and rac by nectin adhesion system. *Methods Enzymol.* **406**, 415–24 (2006).

Park, J. S., Park, W. Y., Cho, K. A., Kim, D. I., Jhun, B. H., Kim, S. R. & Park, S. C. Down-regulation of amphiphysin-1 is responsible for reduced receptor-mediated endocytosis in the senescent cells. *FASEB J.* **15**, 1625–7 (2001).

Pavlova, N. N., Pallasch, C., Elia, A. E. H., Braun, C. J., Westbrook, T. F., Hemann, M. & Elledge, S. J. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. *Elife* **2**, e00358 (2013).

Pleiman, C., Hertz, W. & Cambier, J. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* **263**, 1609–1612 (1994).

Rattan, S. I., Derventzi, A. & Clark, B. F. Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **663**, 48–62 (1992).

Rebehn, L., Khalaji, S., KleinJan, F., Kleemann, A., Port, F., Paul, P., Huster, C., Nolte, U., Singh, K., Kwapich, L., Pfeil, J., Pula, T., Fischer-Posovszky, P., Scharffetter-Kochanek, K. & Gottschalk, K.-E. The weakness of senescent dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, (2023).

Reymond, N., Fabre, S., Lecocq, E., Adelaide, J., Dubreuil, P. & Lopez, M. Nectin4/PRR4, a New Afadin-associated Member of the Nectin Family that Trans-interacts with Nectin1/PRR1 through V Domain Interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 43205–43215 (2001).

Roos, E. M. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr. Opin. Rheumatol.* **17**, 195–200 (2005).

Rossiello, F., Aguado, J., Sepe, S., Iannelli, F., Nguyen, Q., Pitchiaya, S., Carninci, P. & d'Adda di Fagagna, F. DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. *Nat. Commun.* **8**, 13980 (2017).

Sagiv, A. & Krizhanovsky, V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* **14**, 617–28 (2013).

Sakamoto, Y., Ogita, H., Hirota, T., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Yasumi, M., Kanzaki, N., Ozaki, M. & Takai, Y. Interaction of integrin αvβ3 with nectin: Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions. *J. Biol. Chem.* **281**, 19631–19644 (2006).

Sakisaka, T. & Takai, Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 513–521 (2004).

Samanta, D. & Almo, S. C. Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 645–58 (2015).

Satoh-Horikawa, K., Nakanishi, H., Takahashi, K., Miyahara, M., Nishimura, M., Tachibana, K., Mizoguchi, A. & Takai, Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 10291–9 (2000).

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).

Shashni, B., Ariyasu, S., Takeda, R., Suzuki, T., Shiina, S., Akimoto, K., Maeda, T., Aikawa, N., Abe, R., Osaki, T., Itoh, N. & Aoki, S. Size-Based Differentiation of Cancer and Normal Cells by a Particle Size Analyzer Assisted by a Cell-Recognition PC Software. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 487–503 (2018).

Shekarabi, M. & Kennedy, T. E. The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell. Neurosci*. **19**, 1–17 (2002).

Shimizu, I., Yoshida, Y., Katsuno, T., Tateno, K., Okada, S., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Ito, T., Zechner, R., Komuro, I., Kobayashi, Y. & Minamino, T. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.* **15**, 51–64 (2012).

Siddharth, S., Nayak, A., Das, S., Nayak, D., Panda, J., Wyatt, M. D. & Kundu, C. N. The soluble nectin-4 ecto-domain promotes breast cancer induced angiogenesis via endothelial Integrin-β4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **102**, 151–160 (2018).

Smart, J. E., Oppermann, H., Czernilofsky, A. P., Purchio, A. F., Erikson, R. L. & Bishop, J. M. Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6013–6017 (1981).

Song, Y. S., Lee, B. Y. & Hwang, E. S. Dinstinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 580–90 (2005).

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. & Keyes, W. M. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119–30 (2013).

Sundaram, M., Guernsey, D. L., Rajaraman, M. M. & Rajaraman, R. Neosis: A novel type of cell division in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 207–218 (2004).

Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S. & Takai, Y. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J. Cell Biol.* **150**, 1161–76 (2000).

Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H. & Rikitake, Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 309–42 (2008).

Takai, Y. & Nakanishi, H. Nectin and afadin: Novel organizers of intracellular junctions. *J. Cell Sci.* **116**, 17–27 (2003).

Takano, A., Ishikawa, N., Nishino, R., Masuda, K., Yasui, W., Inai, K., Nishimura, H., Ito, H., Nakayama, H., Miyagi, Y., Tsuchiya, E., Kohno, N., Nakamura, Y. & Daigo, Y. Identification of Nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* **69**, 6694–6703 (2009).

Thangavel, C., Dean, J. L., Ertel, A., Knudsen, K. E., Aldaz, C. M., Witkiewicz, A. K., Clarke, R. & Knudsen, E. S. Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 333–45 (2011).

van Deursen, J. M. Senolytic therapies for healthy longevity. *Science (80-.).* **364**, 636–637 (2019).

Wang, E. & Gundersen, D. Increased organization of cytoskeleton accompanying the aging of human fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* **154**, 191–202 (1984).

White, D. E., Kurpios, N. A., Zuo, D., Hassell, J. A., Blaess, S., Mueller, U. & Muller, W. J. Targeted disruption of β1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* **6**, 159–170 (2004).

Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* **24**, 1246–1256 (2018).

Yang, H. W., Shin, M.-G., Lee, S., Kim, J.-R., Park, W. S., Cho, K.-H., Meyer, T. & Heo, W. Do. Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases. *Mol. Cell* **47**, 281–90 (2012).

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I. & Krizhanovsky, V. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **7**, 11190 (2016).

Zhang, Y. *et al.* A novel PI3K/AKT signaling axis mediates Nectin-4-induced gallbladder cancer cell proliferation, metastasis and tumor growth. *Cancer Lett.* **375**, 179–189 (2016).

Zhou, X., Perez, F., Han, K. & Jurivich, D. A. Clonal senescence alters endothelial ICAM-1 function. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 779–85 (2006).

経過日数		1	2	3	4	5	6	7
DMSO	標準偏差	441	390	422	393	298	390	372
	中央値（μm^2）	1625	1573	1746	1473	1339	1531	1347
Etoposide	標準偏差	994	1586	2252	2654	4342	5555	6886
	中央値（μm^2）	3384	5365	7322	7767	7513	9689	9882

表 1.　図２Ｂのグラフの中央値と標準偏差値

A



IgV : Ig like domain (variable)
IgC : Ig like domain (constant)
TM : Transmembrane region

B

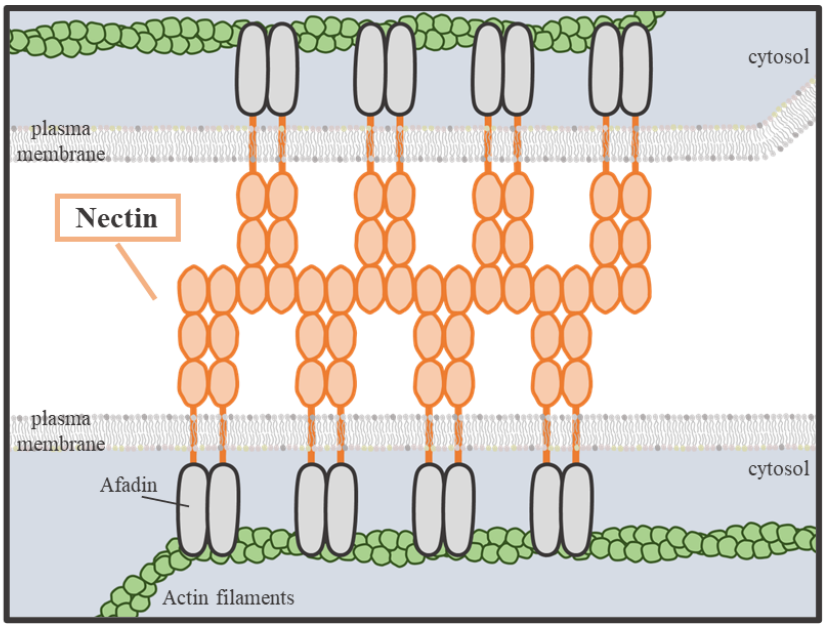


図 1. Nectin-4 の概要

(A) Nectin-4 のドメイン構造。細胞外に 3 つの免疫グロブリン様ドメインがあり、一番外側の免疫グロブリン様ドメインにより Nectin 同士は相互作用する。また、細胞内の 4 アミノ酸 (GHLV) により Afadin と相互作用する。(B) Nectin の細胞接着因子としての概要図。Nectin は細胞外ドメインを介して細胞接着の際に細胞接着因子として機能する。また、細胞内の Afadin を介してアクチンフィラメントと相互作用する。

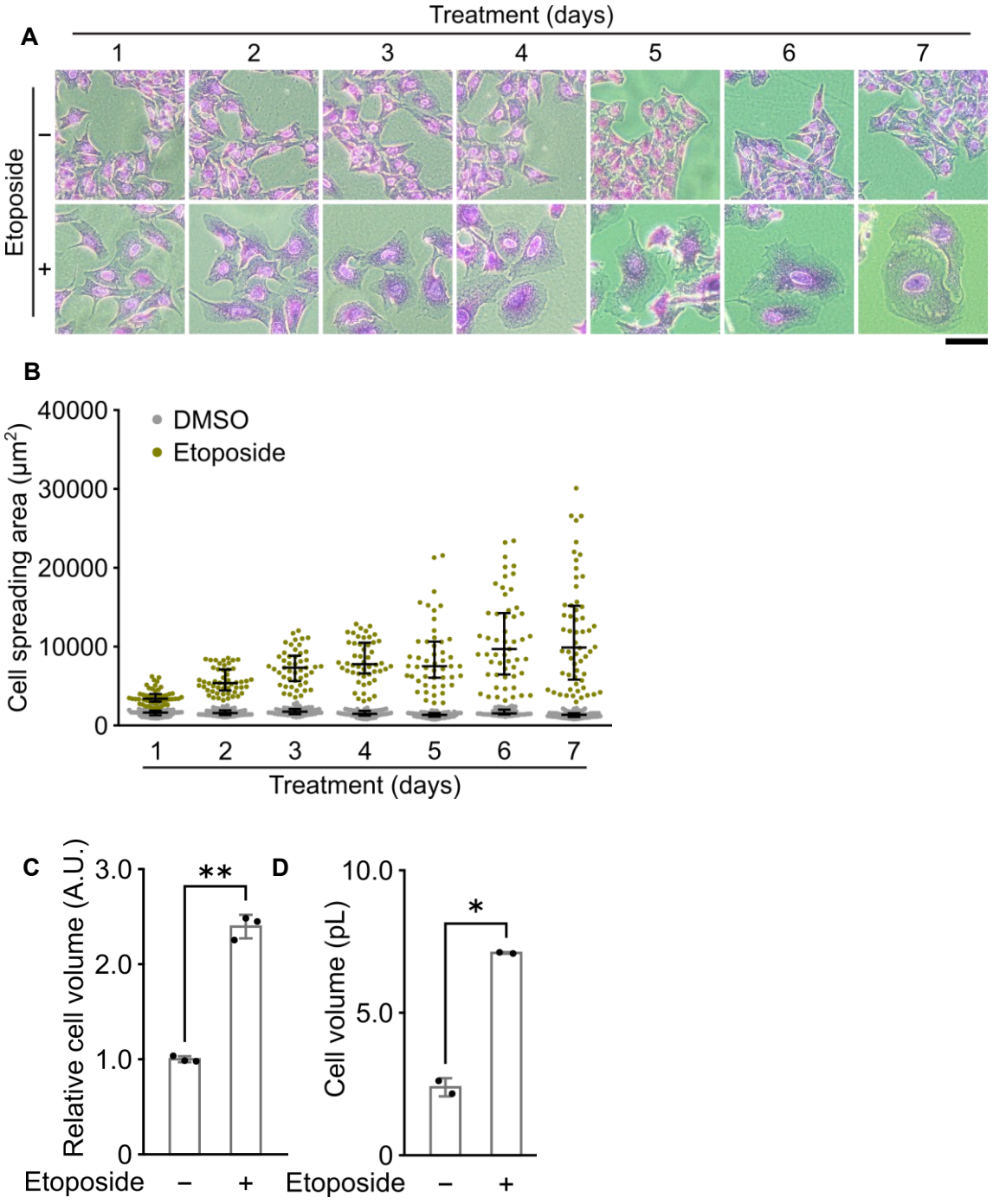


図 2. Etoposide による老化誘導に伴う細胞形態の観察

(A) 2 μM エトポシドでそれぞれの時間処理した U2OS 細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、細胞接着面積を顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 (A) と定量化したグラフ (B) を示す。(A) スケールバーは 200 μm を示した。**(B)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、50 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(C)** 薬剤処理後 3 日目の細胞においてフローサイトメーターにより FSC-A を計測することで細胞の体積を測定した。3 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**(D)** 薬剤処理後 7 日目の細胞において Scepter により細胞の体積を測定した。2 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。***：** $P < 0.05$, ****：** $P < 0.01$

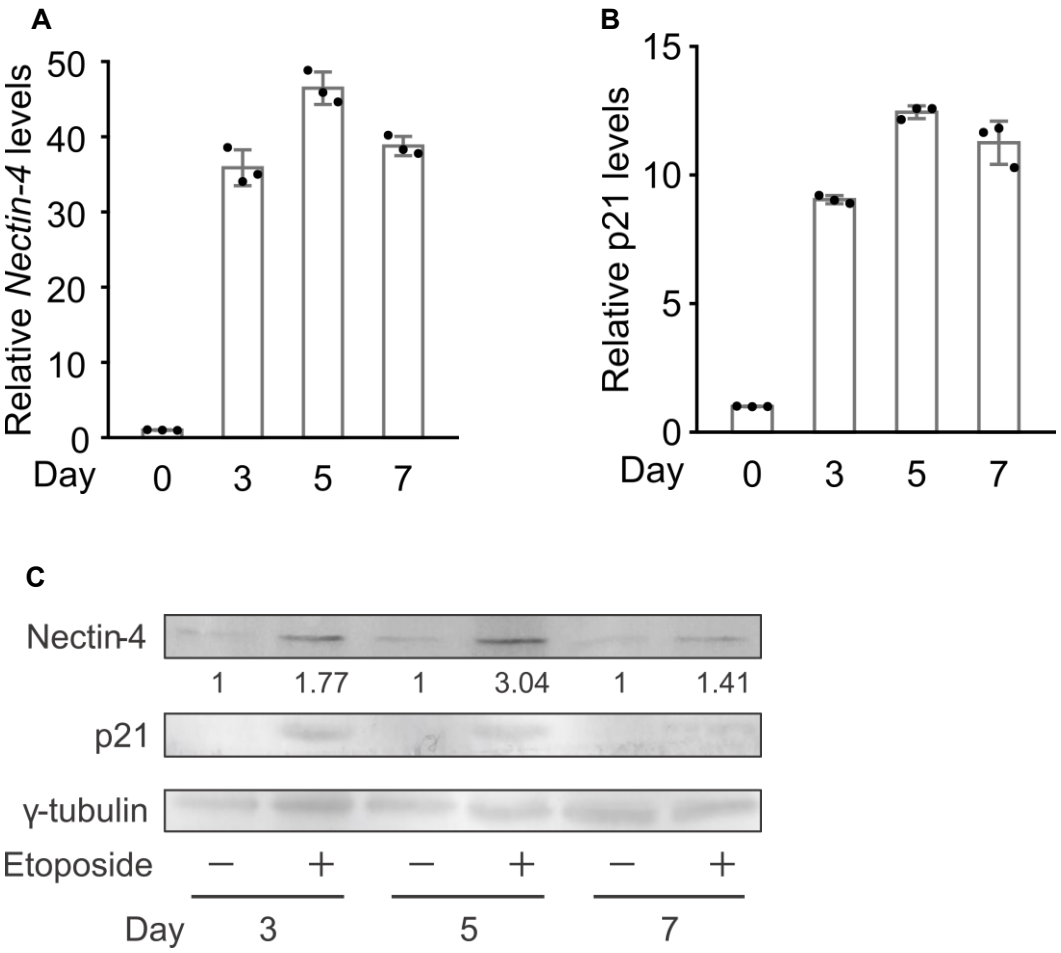


図 3. Etoposide 処理した際の Nectin-4 発現レベルの解析

U2OS 細胞に 2.0 μM Etoposide を 2 日間処理し、培地を交換後さらに 1 ～ 5 日間培養した。**(A, B)** 処理前の細胞及び処理後 3 、 5 、 7 日後の細胞を回収した。回収した細胞から得られた RNA を用いて qPCR を行い、*Nectin-4* **(A)**、*p21* **(B)** の相対的 mRNA 発現量を評価した。 3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(C)** 薬剤処理後 3 、 5 、 7 日後の細胞を回収し、ウェスタンブロッティング解析により Nectin-4、p21 のタンパク質量を評価した。ローディングコントロールとして γ-tubulin を用いた。Nectin-4 のタンパク質レベルは ImageJ を用いて定量し、γ-tubulin で標準化を行い、Etoposide の無処理と比較し相対的な発現レベルを評価した。

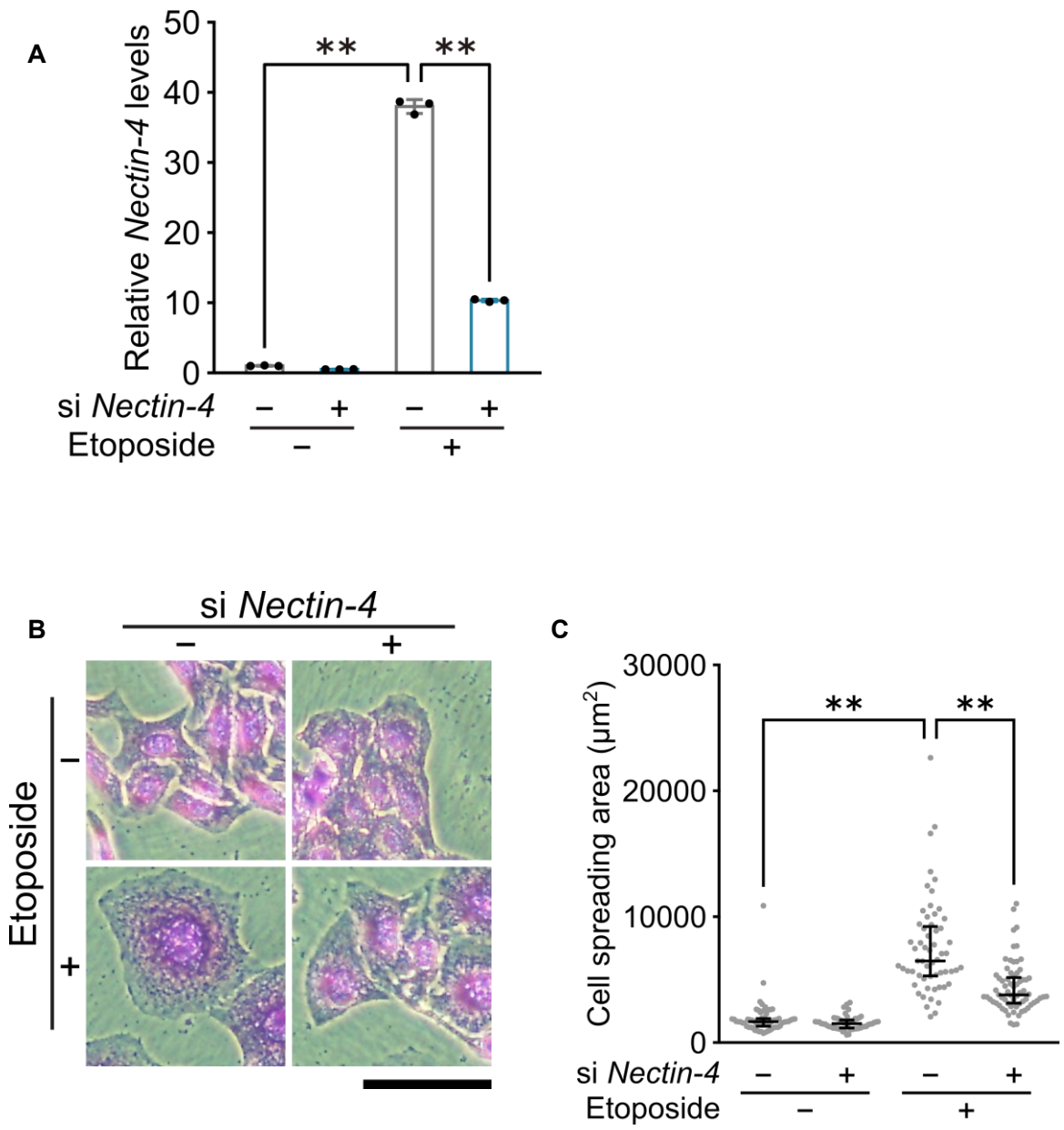


図 4. Nectin-4 ノックダウン細胞における老化細胞の形態観察

(A) siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、2.0 μM Etoposide で 7 日間処理した U2OS 細胞の Nectin-4 の mRNA レベルを qPCR により調べた。**(B, C)** siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、2.0 μM Etoposide で 3 日間処理した U2OS 細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、細胞面積測定を行った。代表的な写真 **(B)** と定量化したグラフ **(C)** を示した。**(B)** スケールバーは 200 μm を示した。**(C)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、50 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**：$P < 0.01$

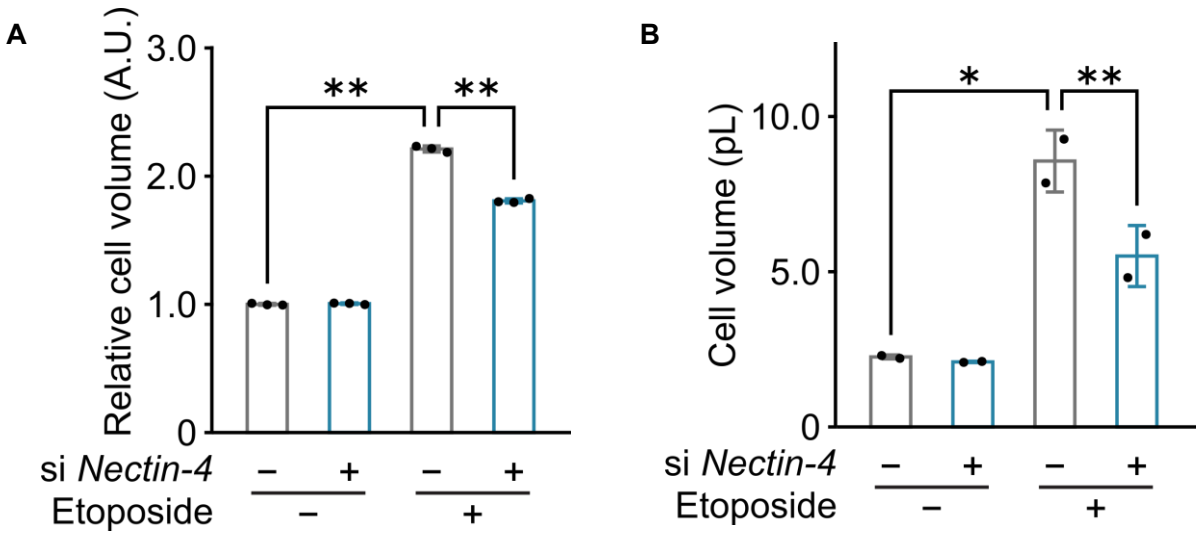


図 5. Nectin-4 ノックダウン細胞における老化細胞の細胞体積

(A) siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、2.0 μM Etoposide で 3 日間処理した U2OS 細胞をフローサイトメーターにより FSC-A を計測することで細胞の体積を測定した。3 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**(B)** siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、2.0 μM Etoposide で 7 日間処理した U2OS 細胞を Scepter により細胞の体積を測定した。2 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。*： $P < 0.05$, **： $P < 0.01$

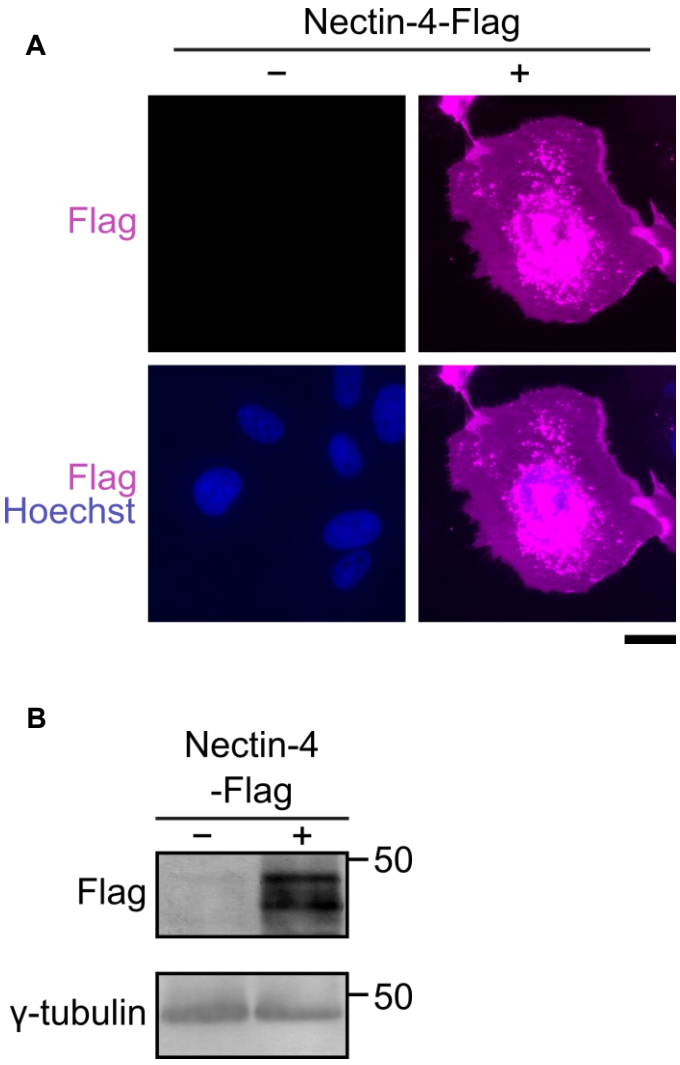


図 6. FLAG-Nectin-4 局在および発現確認

(A) U2OS 細胞に p3XFLAG-CMV-14-Nectin-4 を過剰発現させてから 24 時間後の細胞を抗 FLAG 抗体による免疫染色（マゼンタ）及び Hoechst （青）による染色を行った。スケールバーは 50 µm を示す。**(B)** 同条件でウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして γ-tubulin を用いた。

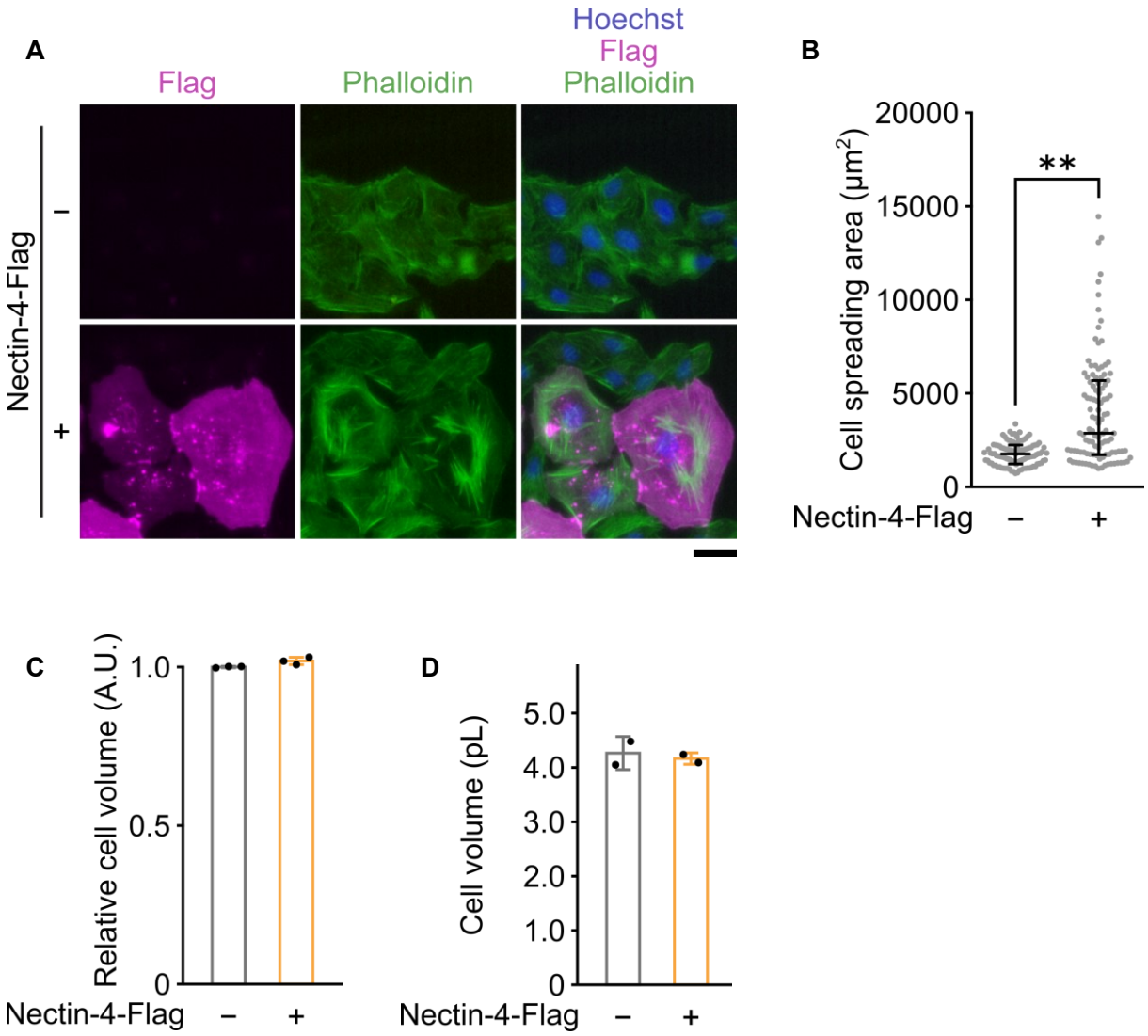


図 7. Nectin-4 過剰発現した細胞の形態解析

(A) U2OS 細胞に FLAG-Nectin-4 を過剰発現させ 5 日間培養した。その後、抗 FLAG 抗体による免疫染色（マゼンタ）及び Phalloidin（緑）、Hoechst（青）による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 **(A)** と定量化したグラフ **(B)** を示す。**(A)** スケールバーは 50 μm を示す。**(B)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(C)** FLAG-Nectin-4 を過剰発現させ 5 日間培養した U2OS 細胞をフローサイトメーターにより FSC-A を計測することで細胞の体積を測定した。3 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**(D)** FLAG-Nectin-4 を過剰発現させ 7 日間培養した U2OS 細胞を Scepter により細胞の体積を測定した。2 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**：$P < 0.01$

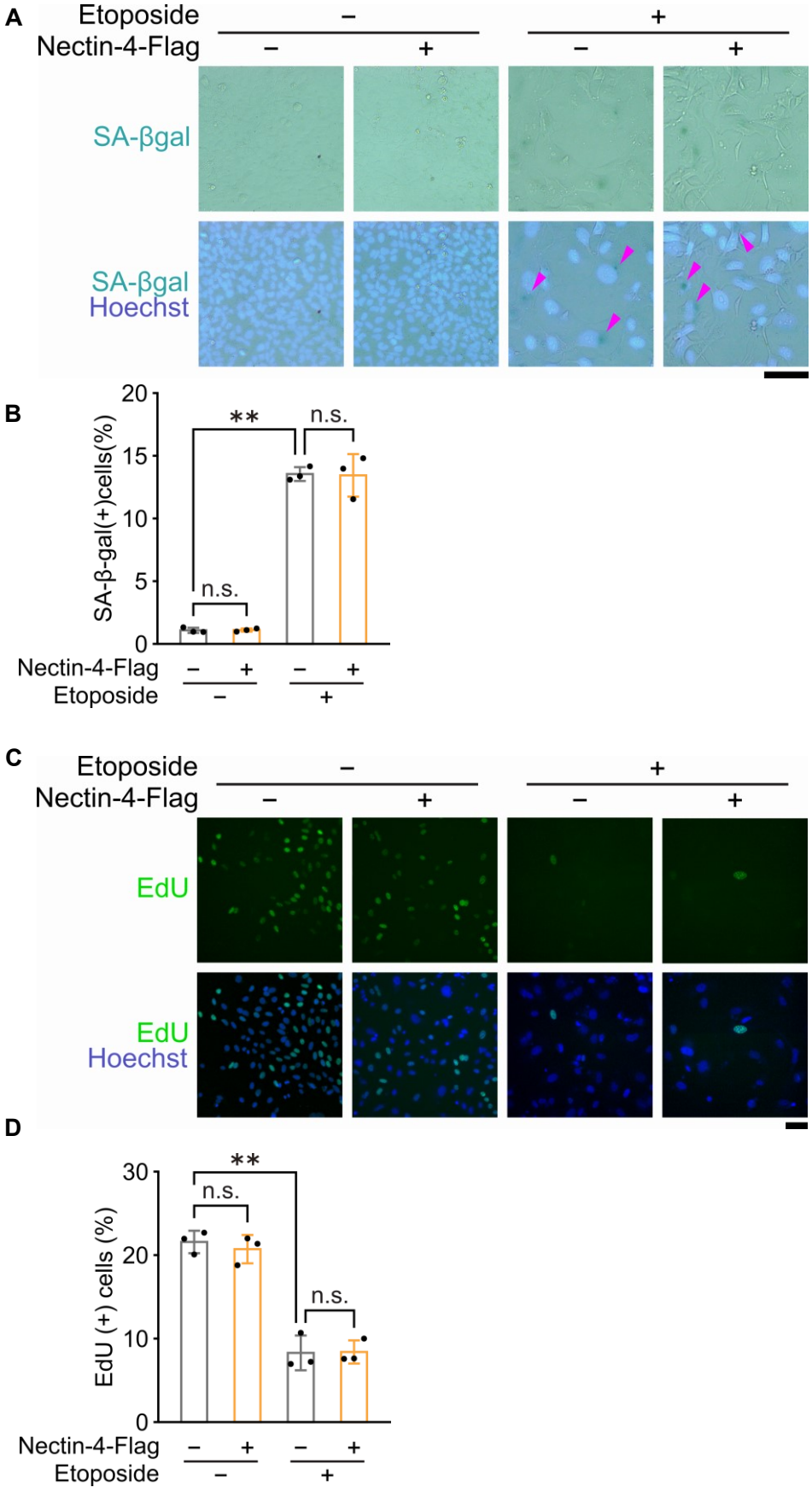

A
Etoposide
Nectin-4-Flag
SA-βgal
SA-βgal
Hoechst
B
SA-β-gal(+)cells(%)
**
n.s.
n.s.
Nectin-4-Flag
Etoposide
C
Etoposide
Nectin-4-Flag
EdU
EdU
Hoechst
D
EdU (+) cells (%)
**
n.s.
n.s.
Nectin-4-Flag
Etoposide

図 8. Nectin-4 過剰発現細胞の老化アッセイ

(A, B) U2OS 細胞に FLAG-Nectin-4 を過剰発現させ、800 μg/mL G418 により発現細胞を選抜した。その後、Etoposide 2.0 μM を 2 日間処理し、培地を交換後さらに 5 日間培養した。薬剤処理後 7 日目の細胞において SA-β-gal 染色を行った。代表的な写真 **(A)** と定量化したグラフ **(B)** を示した。スケールバーは 100 μm を示し、矢印は SA-β-gal 陽性細胞を示した。**(C, D)** 同条件において EdU の取り込みの測定を行った。代表的な写真 **(C)** と定量化したグラフ **(D)** を示した。スケールバーは 200 μm を示し、緑色蛍光は EdU 陽性細胞を表し Hoechst 蛍光（青）は全細胞を表した。******： $P < 0.01$

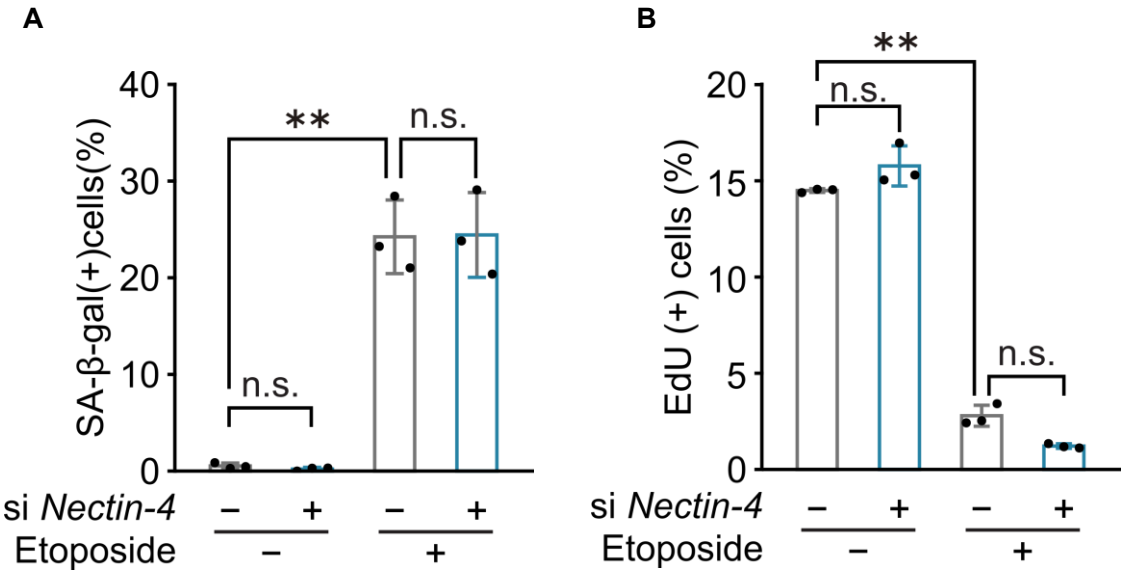


図 9. *Nectin-4* ノックダウン細胞の老化アッセイ

(A, B) U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、2.0 μM Etoposide を 2 日間処理し、培地を交換後さらに 5 日間培養した。薬剤処理後 7 日目の細胞において SA-β-gal 染色 **(A)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(B)** を行った。 細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。 **：$P < 0.01$

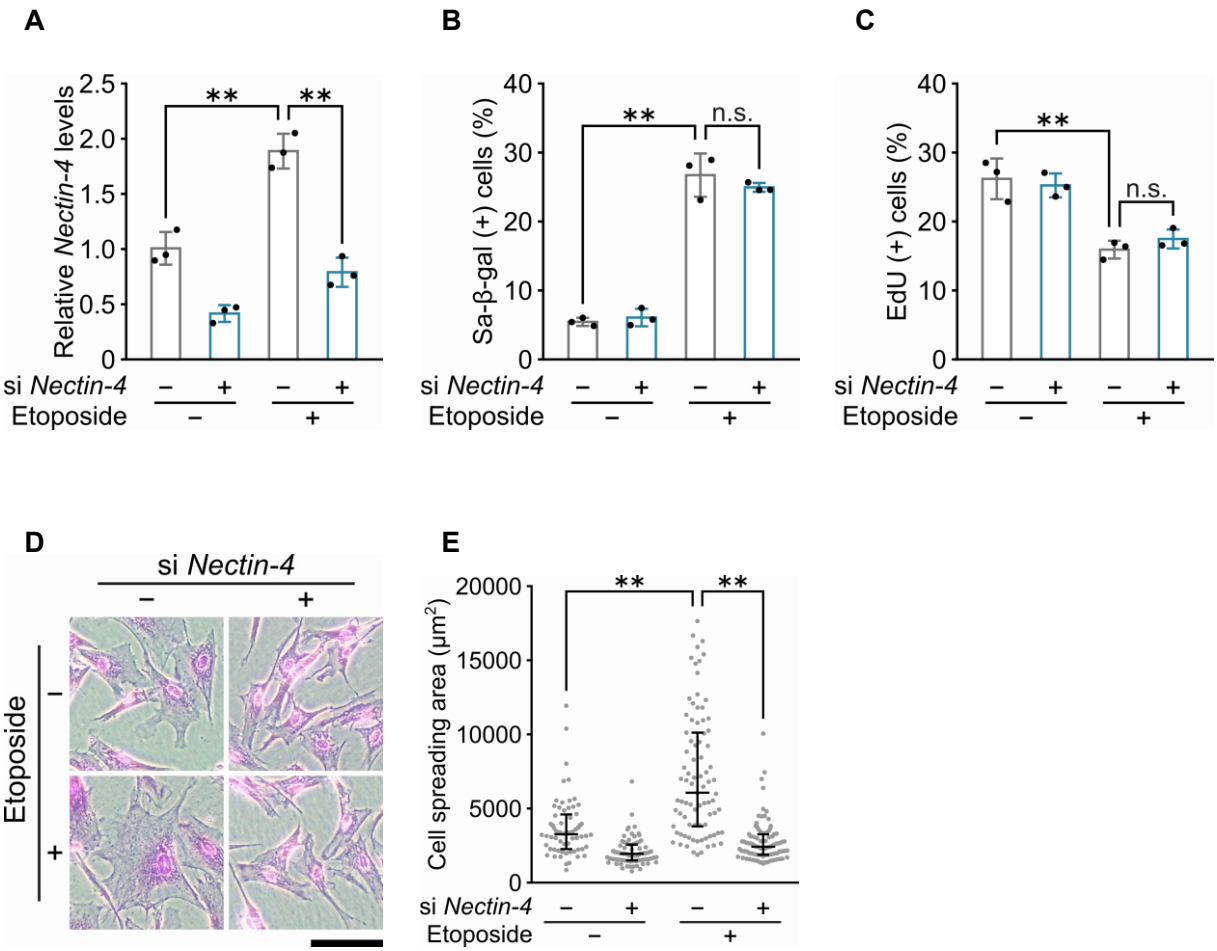


図 10. Hs68 細胞での Etoposide による老化誘導細胞の細胞接着面積の解析

(A) siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、0.5 μM Etoposide で 2 日間処理し、培地を交換後さらに 1 日間培養した。薬剤処理後 3 日目の細胞の Nectin-4 の mRNA レベルを qPCR により調べた。**(B, C)** 同条件において SA-β-gal 染色 **(B)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(C)** を行った。細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(D, E)** 同条件の細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、細胞面積測定を行った。代表的な写真 **(D)** と定量化したグラフ **(E)** を示した。**(D)** スケールバーは 200 μm を示した。**(E)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、50 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**：$P < 0.01$

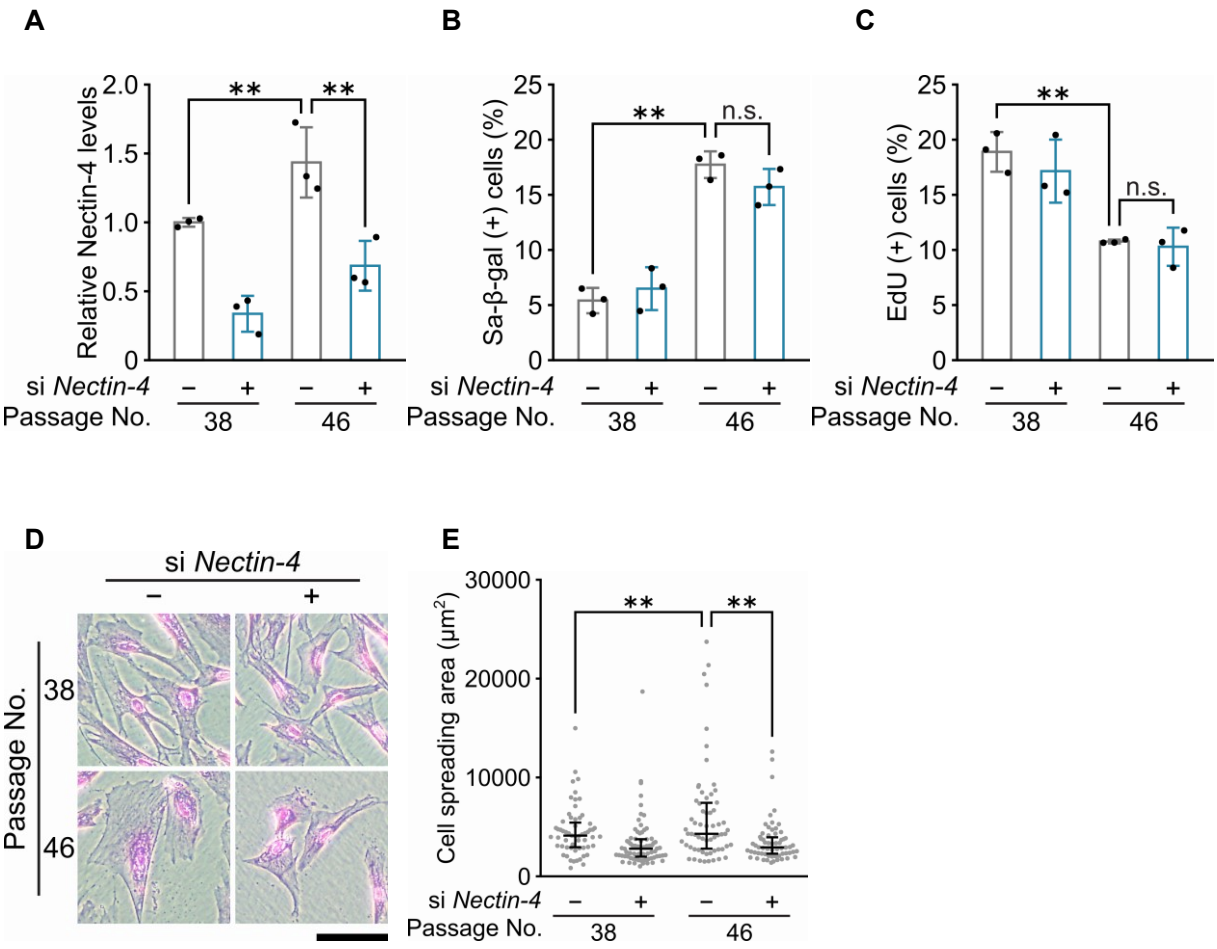


図 11. Hs68 細胞での複製老化による老化誘導細胞の細胞接着面積の解析

(A) 継代数 38 及び 46 の Hs68 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、6 日間培養した。*Nectin-4* の mRNA レベルを qPCR により調べた。3 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**(B, C)** 同条件で SA-β-gal 染色 **(B)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(C)** を行った。 細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(D, E)** 同条件において Hs68 細胞クリスタルバイオレットにより染色し、細胞のサイズを顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 **(D)** と定量化したグラフ **(E)** を示した。**(D)** スケールバーは 200 μm を示す。**(E)** 細胞は 50 細胞以上計測し 5 ～ 95 パーセンタイル値をグラフに示した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**：$P < 0.01$

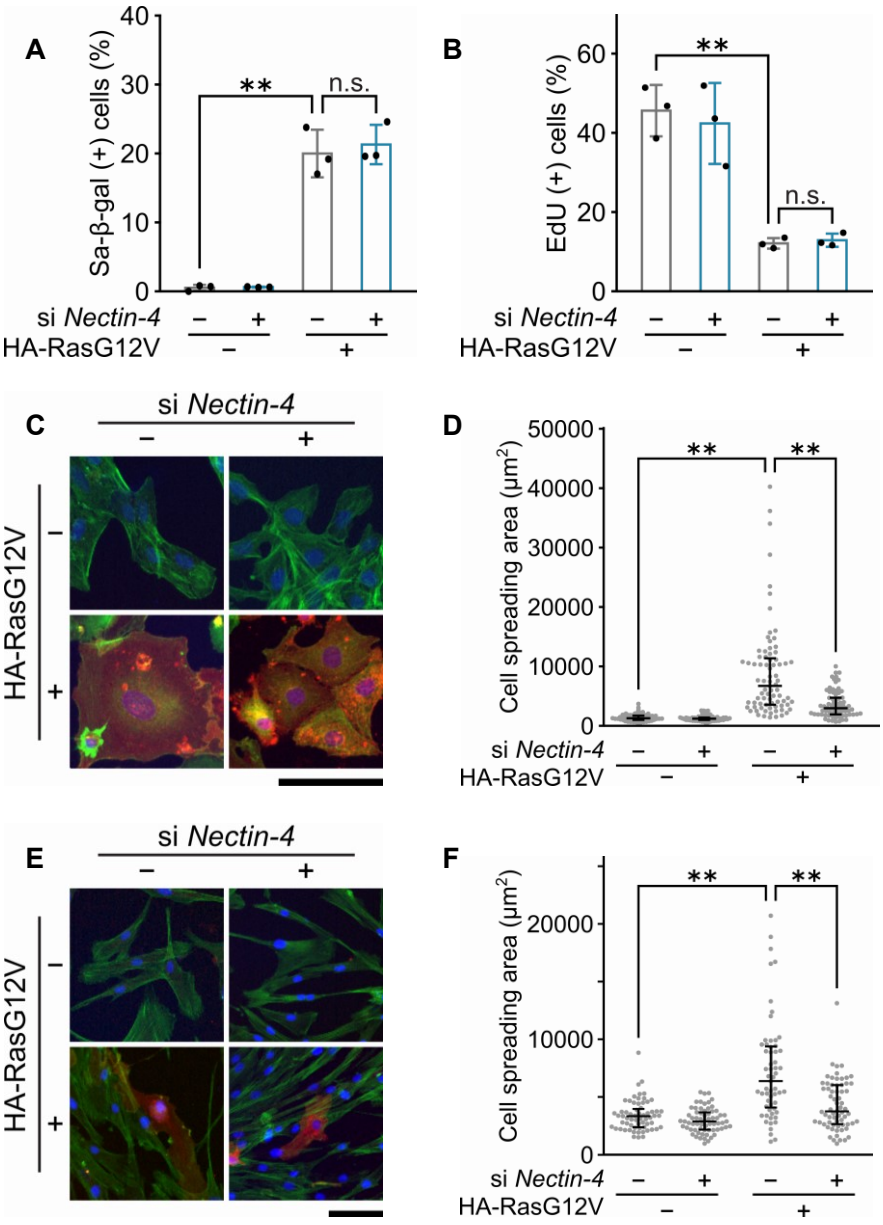


図 12. がん原遺伝子の活性化による老化誘導細胞の細胞接着面積の解析

(A, B) U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、HA-RasG12V を過剰発現させ、800 μg/mL G418 により発現細胞を選抜した。過剰発現後後 7 日目の細胞において SA-β-gal 染色 **(E)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(B)** を行った。細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(C, D)** U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、HA-RasG12V を過剰発現させ、800 μg/mL G418 により発現細胞を選抜した。過剰発現後後 5 日目の細胞を抗 HA 抗体による免疫染色（赤）及び Phalloidin（緑）、Hoechst（青）による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 **(C)** と定量化したグラフ **(D)** を示した。**(C)** スケールバーは 100 μm を示した。**(D)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(E, F)** 同条件の実験を Hs68 細胞で行った。代表的な写真 **(E)** と定量化したグラフ **(F)** を示した。**(E)** スケールバーは 100 μm を示した。**(F)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。
**：$P < 0.01$

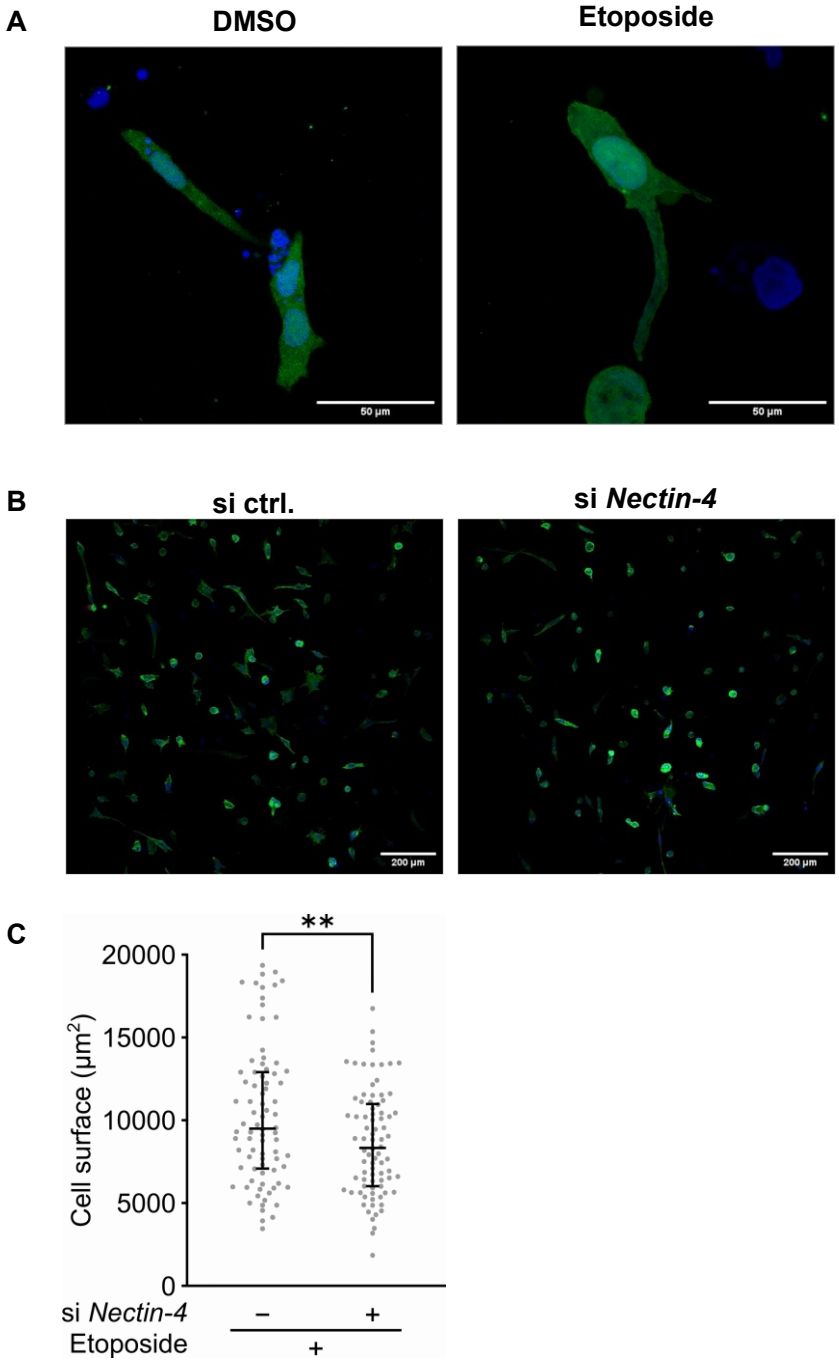


図 13. 3 次元細胞培養した老化細胞の表面積の解析

(A) U2OS 細胞に pEGFP を過剰発現した後、コラーゲン中に播種し、その後 Etoposide による老化誘導を行った。老化誘導後 3 日目の細胞を Hoechst で染色し共焦点顕微鏡により撮影した。スケールバーは 50 µm を示した。**(B, C)** U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、コラーゲン中に播種し、その後 Etoposide による老化誘導を行った。老化誘導後 5 日目の細胞を phalloidin 及び Hoechst で染色し共焦点顕微鏡により撮影した。**(B)** スケールバーは 50 µm を示した。得られた像を ImageJ により 3d 構築し細胞毎の表面積を算出した **(C)**。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**：$P < 0.01$

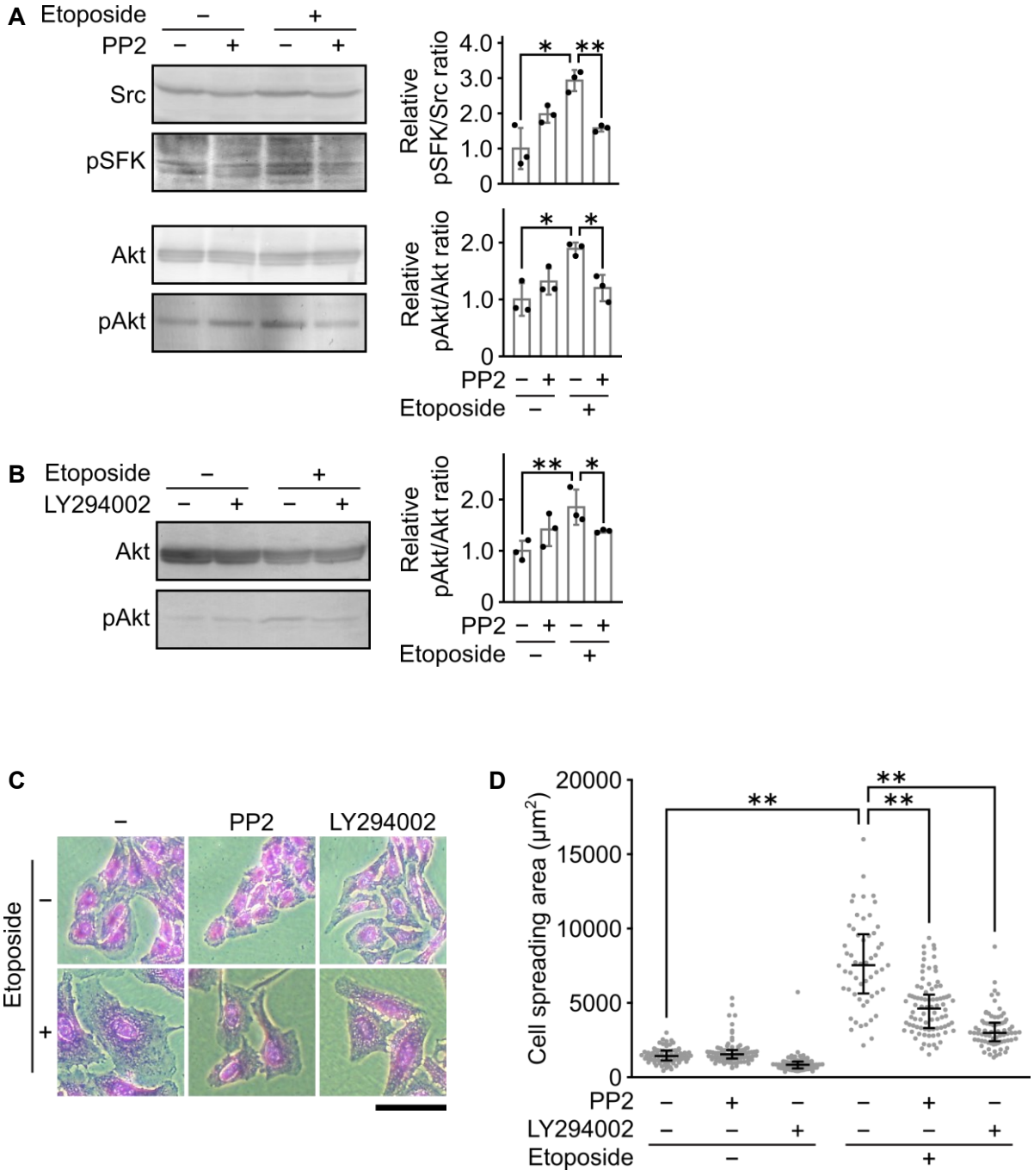


図 14. 老化誘導細胞における SFK-PI3K 経路

(A, B) 10 μM PP2 または 20 μM LY294002 で処理した U2OS 細胞を、2 μM Etoposide の存在下で 3 日間培養し、SFK 及び Akt のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング解析により測定した。リン酸化レベルは ImageJ により定量し、それぞれの総タンパク質量で正規化しした。代表的なウェスタンブロッティング画像（左）とその解析結果(右)を示す。**(C, D)**同条件の U2OS 細胞をクリスタルバイオレットで染色した後、顕微鏡画像解析による細胞面積測定を行った。代表的な写真 **(C)** と定量化したグラフ **(D)** を示す。**(C)** スケールバーは 200 μm を示す。**(D)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。*： $P < 0.05$, **： $P < 0.01$

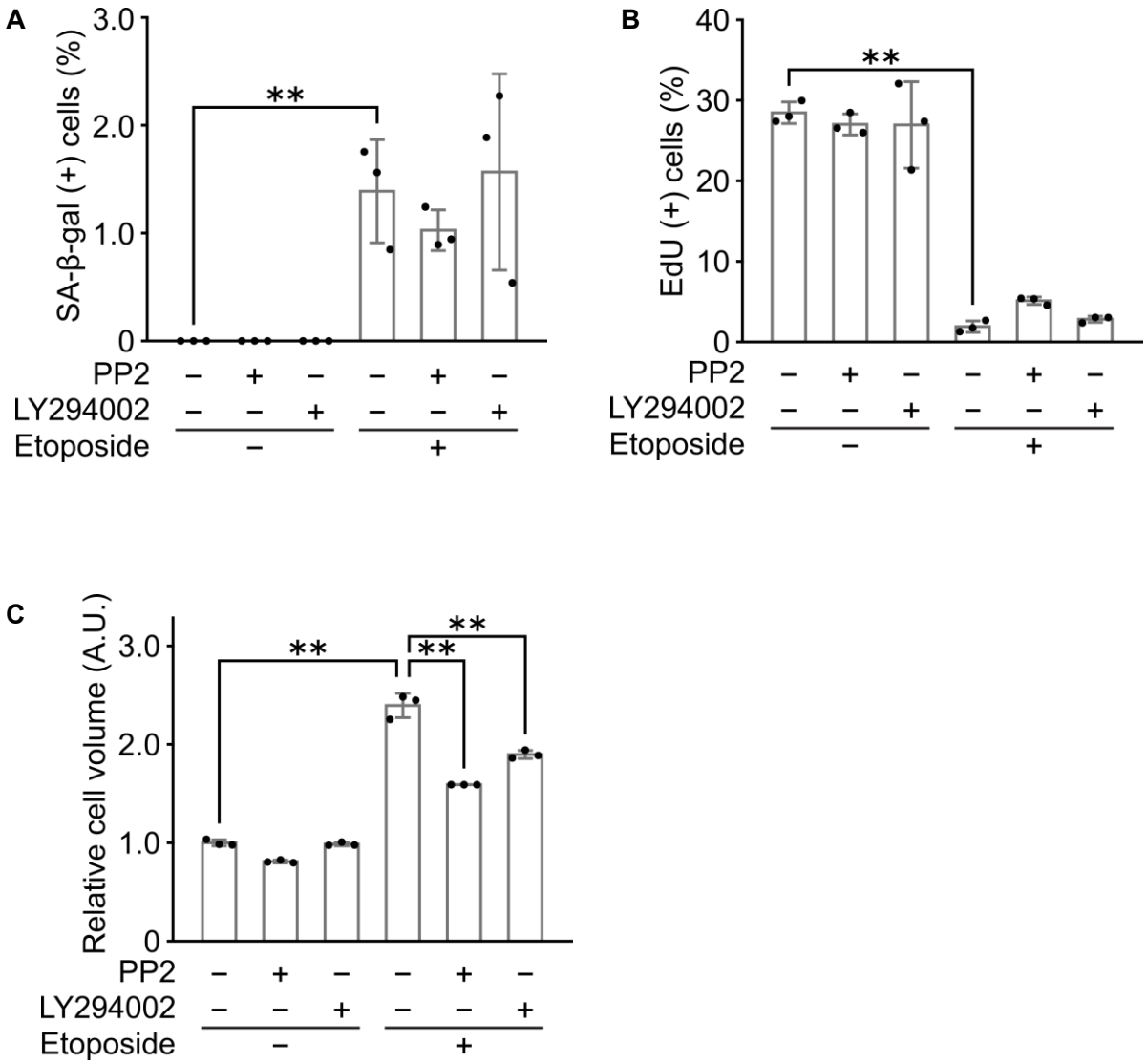


図 15. SFK、PI3K を阻害した際の老化アッセイ、細胞体積

(A, B) 10 μM PP2 または 20 μM LY294002 で処理した U2OS 細胞を、2 μM Etoposide の存在下で 3 日間培養し、SA-β-gal 染色 **(A)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(B)** を行った。細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(C)** 同条件の細胞においてフローサイトメーターにより FSC-A を計測することで細胞の体積を測定した。3 回実験を行い、平均値と標準偏差を示した。**：$P < 0.01$

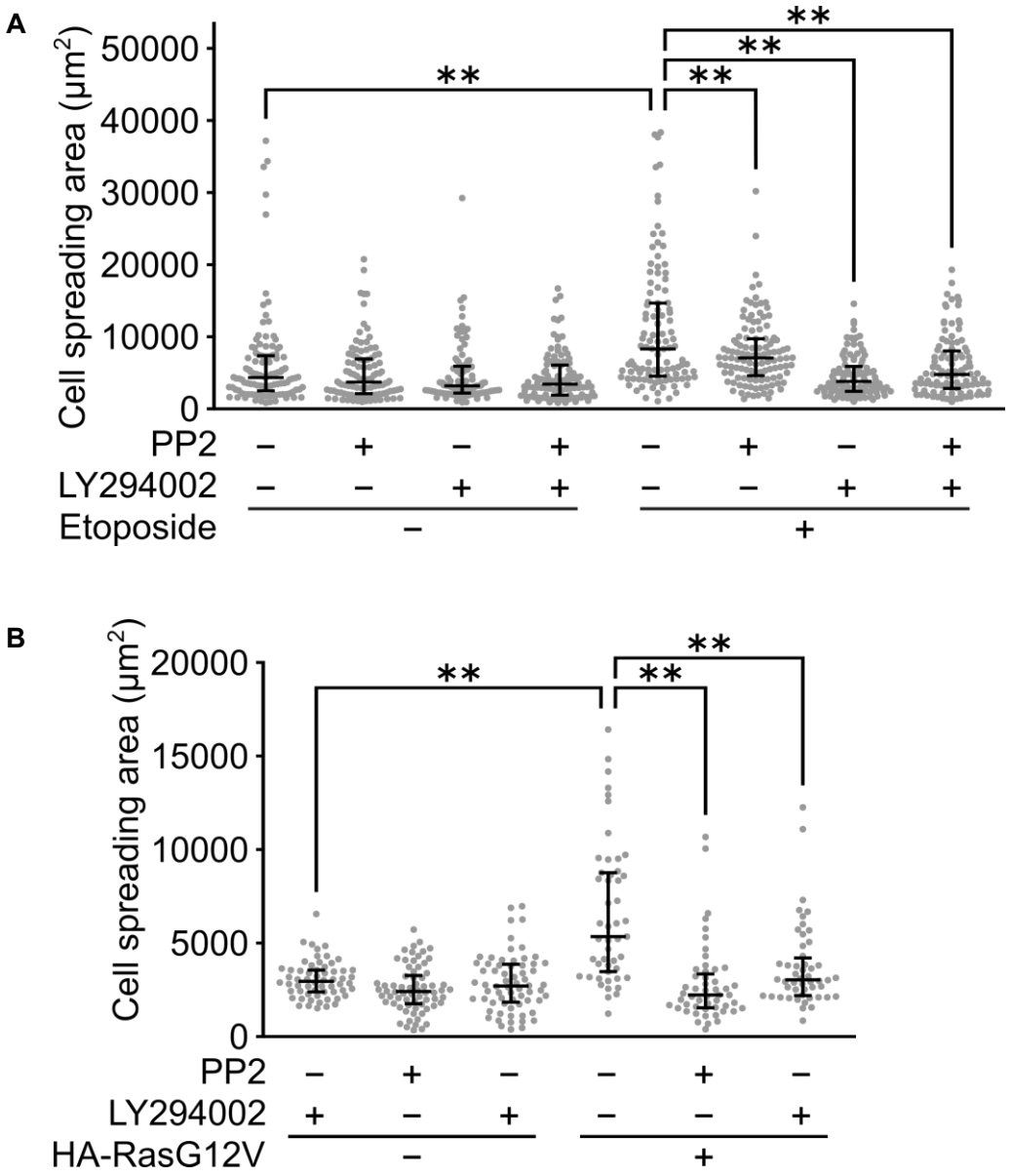


図 16. Hs68 細胞において SFK、PI3K を阻害した際の細胞接着面積

(A) 10μM PP2 または 20μM LY294002 又はその両方で処理した Hs68 細胞を、0.5 μM Etoposide の存在下で 3 日間培養し、クリスタルバイオレットで染色した後、顕微鏡画像解析による細胞面積測定を行った。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(B)** Hs68 細胞に HA-RasG12V を過剰発現させ、10 μM PP2 または 20 μM LY294002 を処理した。過剰発現後後 5 日目の細胞を抗 HA 抗体による免疫染色及び Phalloidin、Hoechst による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。*： $P < 0.05$, **： $P < 0.01$

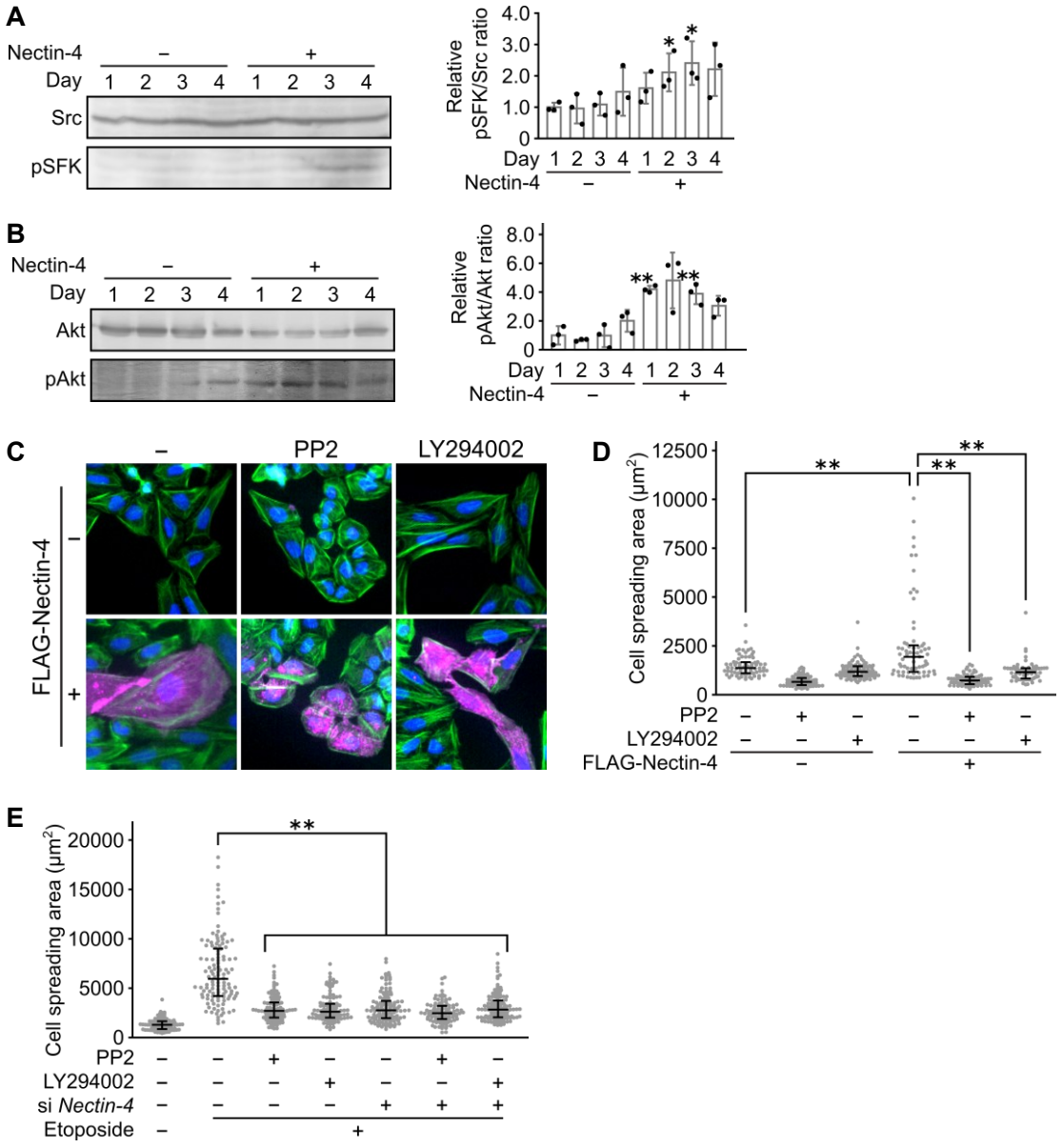


図 17. Nectin-4 過剰発現細胞における Nectin-4-SFK-PI3K 経路

(A, B) FLAG- Nectin-4 を過剰発現させ、それぞれの時間培養した U2OS 細胞の SFK 及び Akt のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング解析により測定した。リン酸化レベルは ImageJ により定量し、それぞれの総タンパク質量で正規化しした。代表的なウェスタンブロッティング画像（左）とその解析結果（右）を示す。**(C, D)** U2OS 細胞に FLAG- Nectin-4 を過剰発現させ、10 μM PP2 または 20 μM LY294002 で処理した。過剰発現後後 5 日目の細胞を抗 FLAG 抗体による免疫染色（マゼンタ）及び Phalloidin（緑）、Hoechst（青）による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 **(C)** と定量化したグラフ **(D)** を示す。**(D)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(E)** siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンし、10 μM PP2、20 μM LY294002 または 2.0 μM Etoposide で 3 日間処理した U2OS 細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、細胞面積測定を行った。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。*****： $P < 0.05$, ******： $P < 0.01$

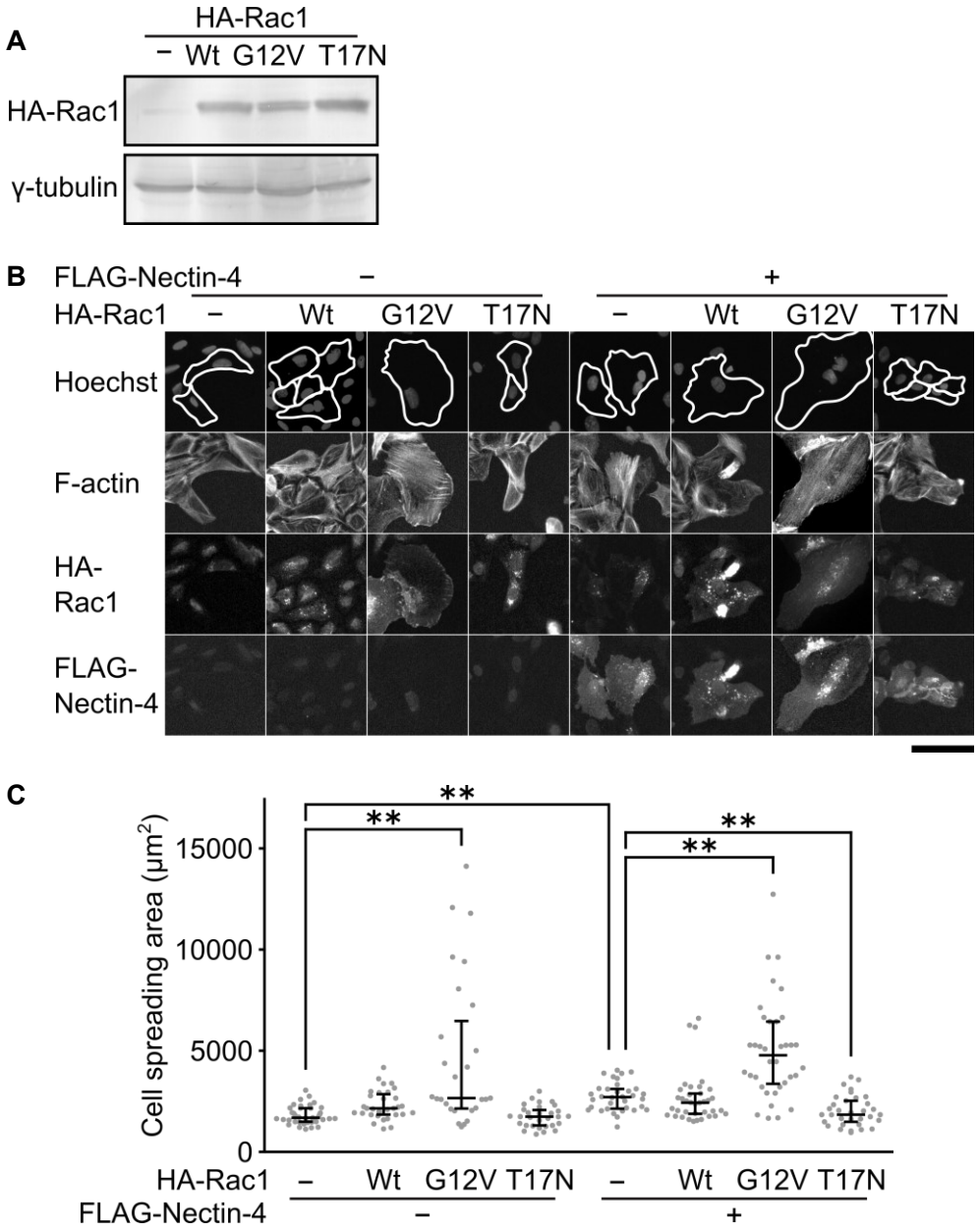


図 18. Rac1 活性阻害した Nectin-4 過剰発現細胞の細胞接着面積

(A) U2OS 細胞に Rac1 Wt 及び Rac1G12V、Rac1T17N を含む pcDNA3-HA ベクターを過剰発現させてから 24 時間後の細胞を抗 HA 抗体による免ウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして γ-tubulin を用いた。**(B, C)** U2OS 細胞に FLAG-Nectin-4、 Rac1 Wt 及び Rac1G12V、Rac1T17N を含む pcDNA3-HA ベクターを過剰発現させ 5 日間培養した。その後、抗 FLAG 抗体及び HA 抗体による免疫染色、Phalloidin 及び Hoechst による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。代表的な写真 **(B)** と定量化したグラフ **(C)** を示す。**(B)** スケールバーは 100 μm を示す。**(C)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、50 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**：$P < 0.01$

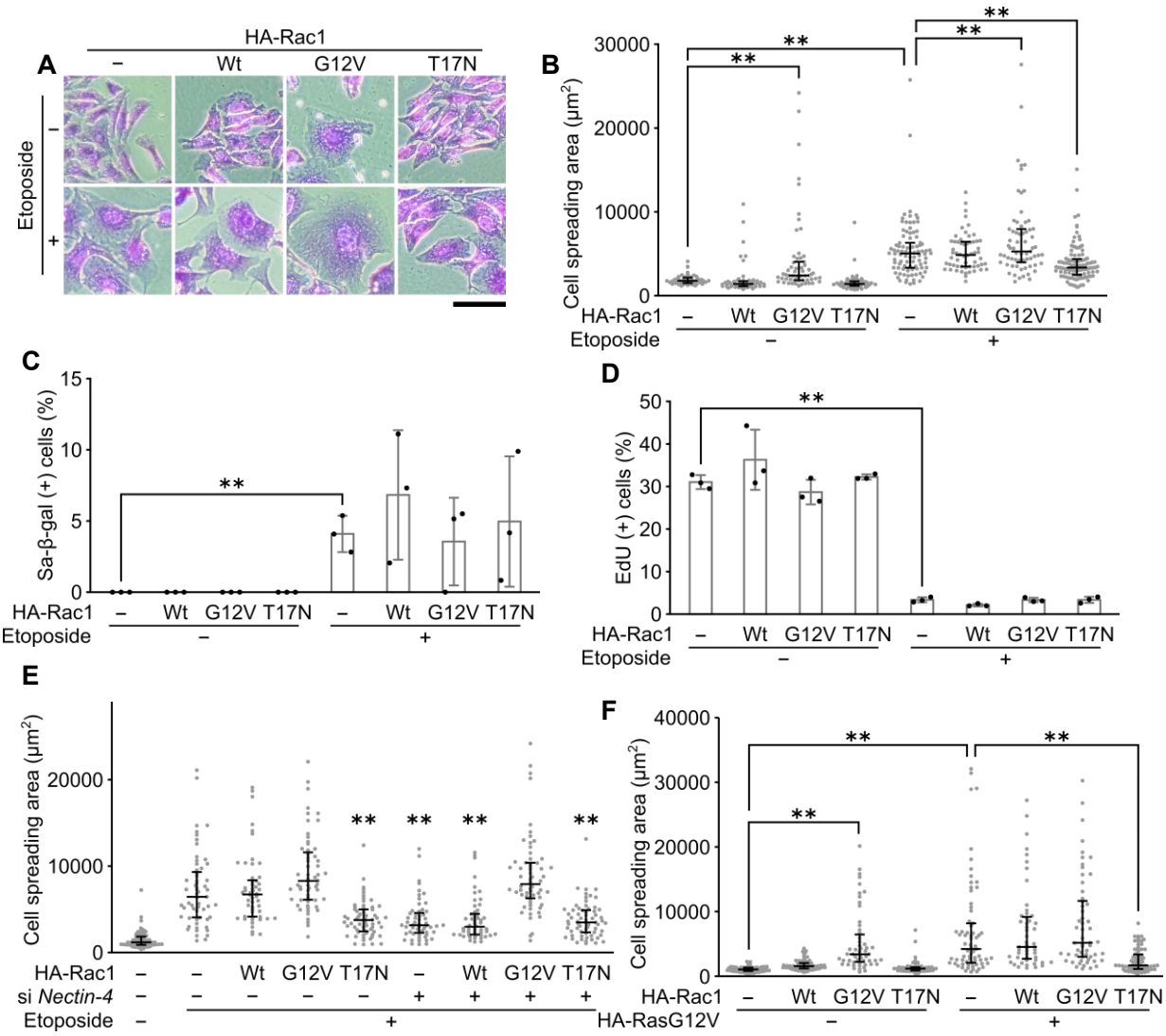


図 19. 3-2-5 Rac1 活性阻害した老化細胞の細胞接着面積

(A, B) U2OS 細胞に Rac1 Wt 及び Rac1G12V、Rac1T17N を含む pcDNA3-HA ベクターを過剰発現させ、800 μg/mL G418 により発現細胞を選抜した。2 μM Etoposide の存在下で 3 日間培養し、クリスタルバイオレットで染色した後、顕微鏡画像解析による細胞面積測定を行った。代表的な写真 **(A)** と定量化したグラフ **(B)** を示す。**(A)** スケールバーは 200 μm を示す。**(B)** グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(C, D)** 同条件の細胞において SA-β-gal 染色 **(C)** と EdU の取り込みの測定の測定 **(D)** を行った。細胞は 1 サンプルあたり 100 細胞計測し、3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(E)** U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、Rac1 Wt 及び Rac1G12V、Rac1T17N を含む pcDNA3-HA ベクターを過剰発現させ 2μM Etoposide で処理した。Etoposide 処理後 3 日目の細胞を、抗 FLAG 抗体及び Phalloidin、Hoechst による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(F)** U2OS 細胞に HA-RasG12V と Rac1 Wt 及び Rac1G12V、Rac1T17N を含む pcDNA3-HA ベクターを過剰発現させた。過剰発現後後 5 日目の細胞を抗 HA 抗体による免疫染色及び Phalloidin、Hoechst による染色を行った。染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。*： $P < 0.05$, **： $P < 0.01$

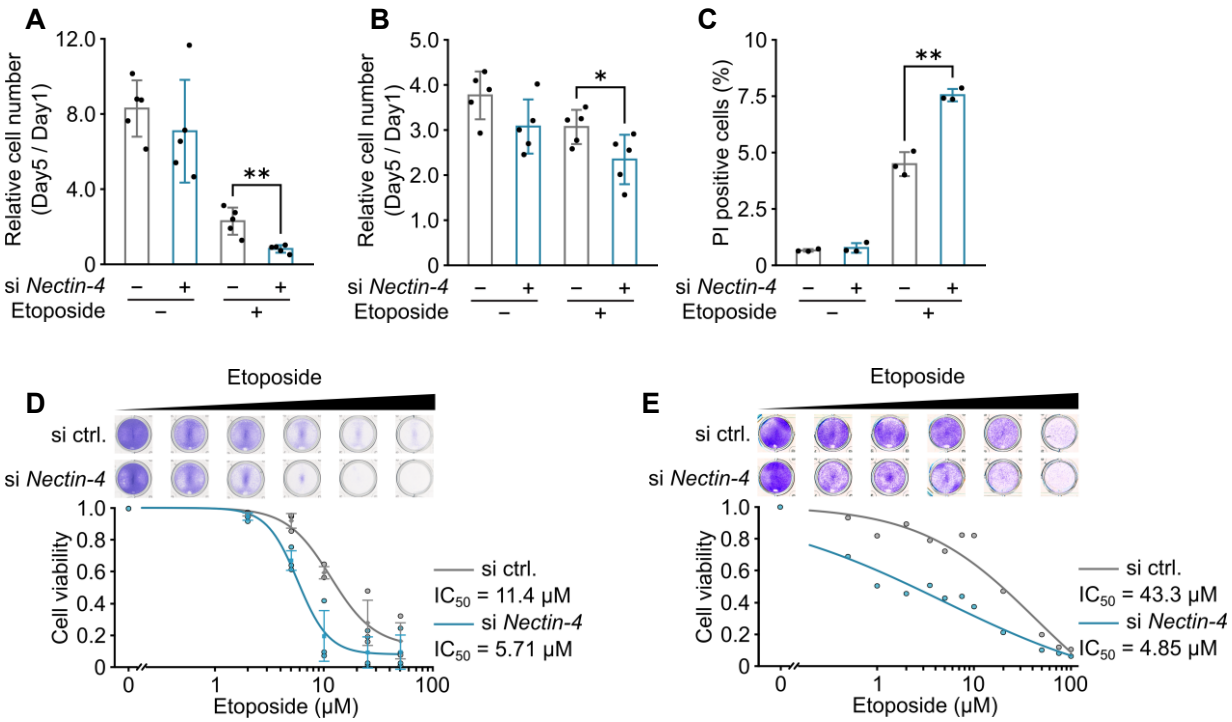


図 20. Nectin-4 と細胞の生存の解析

(A, B) U2OS **(A)** および Hs68 **(B)** 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、2 μM または 0.5 μM エトポシドで 5 日間処理し、WST-8 アッセイを用いて相対細胞数を評価した。5 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(C)** 同条件の U2OS 細胞にヨウ化プロピジウム (PI) 染色を行い、フローサイトメトリーを用い細胞死の割合を測定した。3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(D, E)** U2OS 細胞 **(D)** および Hs68 細胞 **(E)** を各濃度の Etoposide で処理し、細胞生存率をクリスタルバイオレット染色により測定した。IC50 値はデータにシグモイド用量反応曲線を当てはめることによって決定された。*****： $P < 0.05$, ******： $P < 0.01$

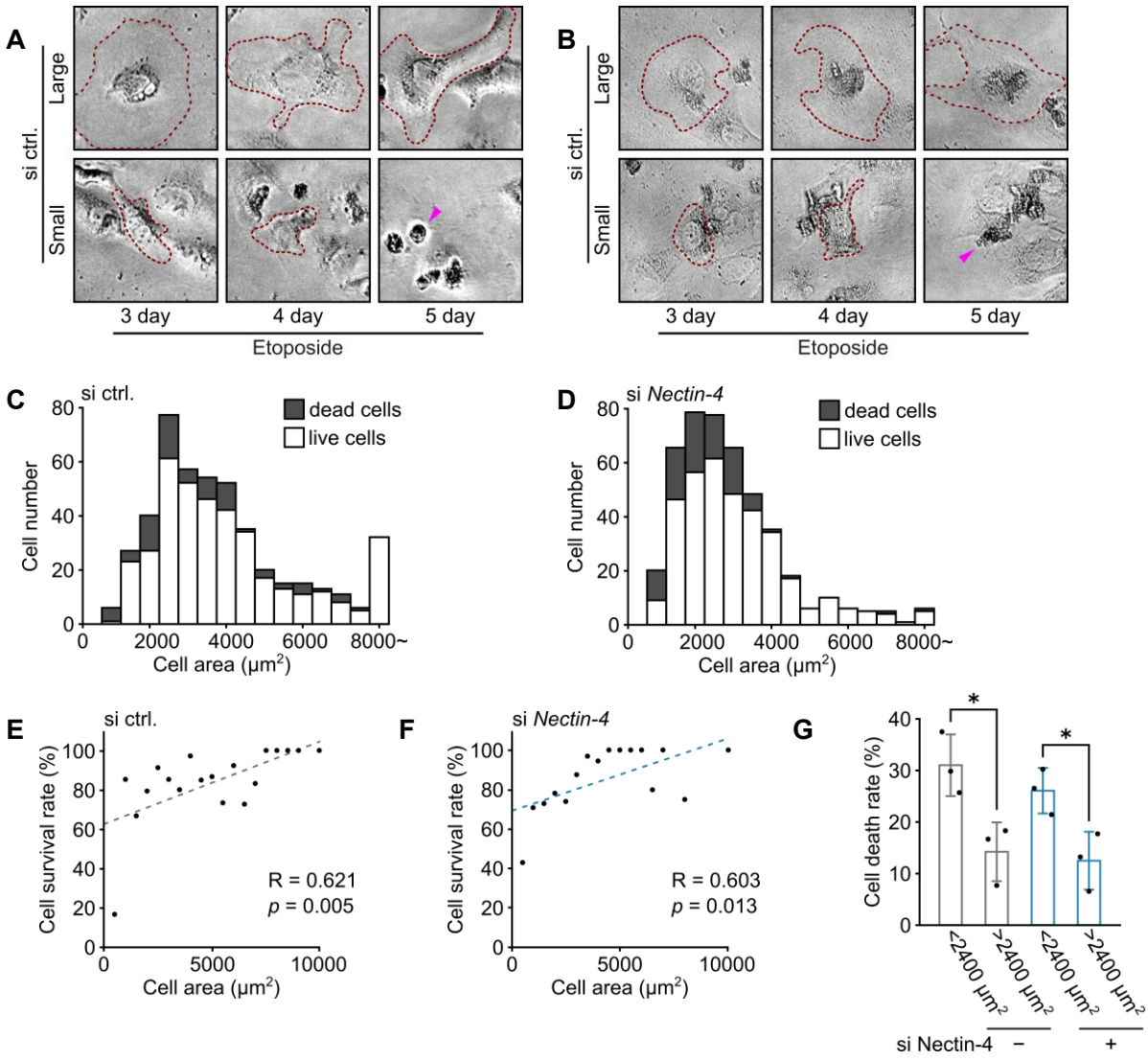


図 21. Nectin-4 のノックダウンの有無に関わらず細胞接着面積が減少すると細胞の生存率が低下した

(A, B) U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、2 μM Etoposide で 5 日間処理した。Etoposide 処理の 3 日目から 5 日目までのタイムラプス画像を取得した。3 日目に細胞面積を測定し、個々の細胞をトラッキングすることによって細胞生存率を測定した。代表的な顕微鏡画像 **(A, B)**、ヒストグラム **(C, D)**、生存率と細胞面積の散布図 **(E, F)** を示した。**(A, B)** 点線は細胞の輪郭を示し、矢印は死んだ細胞を示す。**(G)** 細胞死率を、Nectin-4 ノックダウン細胞の面積の中央値である< 2,400 μm² の細胞と、> 2400 μm² の細胞間で比較した。3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。*****： $P < 0.05$

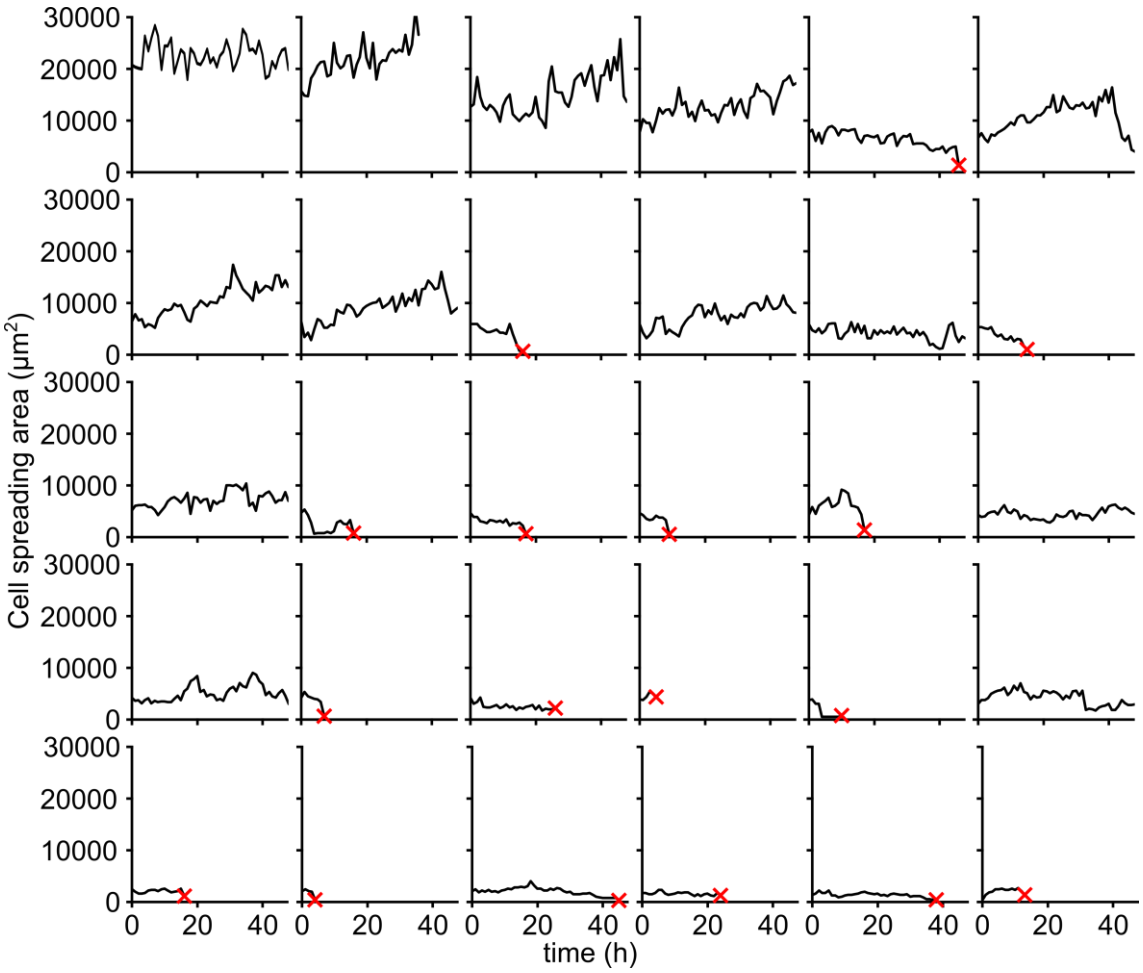
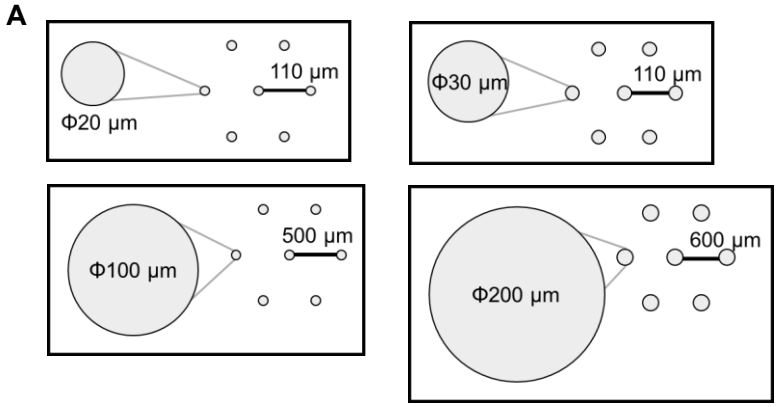


図 22. 一細胞の接着面積の継続的な変化

U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、2 μM Etoposide で 5 日間処理した。Etoposide 処理後 3 日目から 5 日目までのタイムラプス画像を取得した。15 分毎の一細胞の接着面積 (cell #1 ～ #30) の推移をグラフに示し、赤いクロスは細胞死の時点を示した。



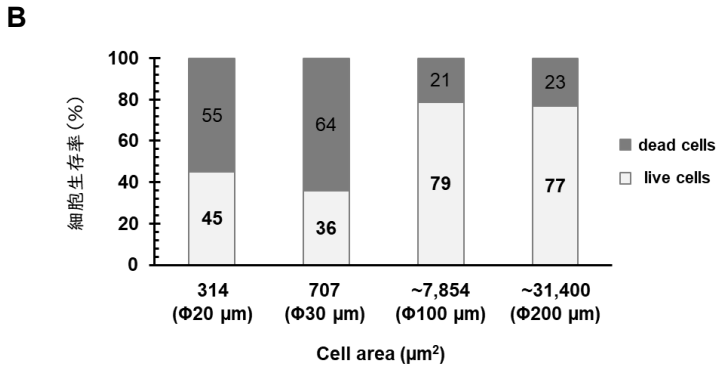


図 23. 細胞接着面積を制限した老化細胞の細胞生存率

(A, B) RGD でコーティングされた直径 20 μm、直径 30 μm、直径 100 μm、直径 200 μm の円形マイクロパターンの基板上 **(A)** に U2OS 細胞を播種し、5 μM エトポシドで 5 日間処理した。エトポシド処理の 3 日目から 5 日目までタイムラプス画像を取得し、5 日目に各直径の生存率を測定した。

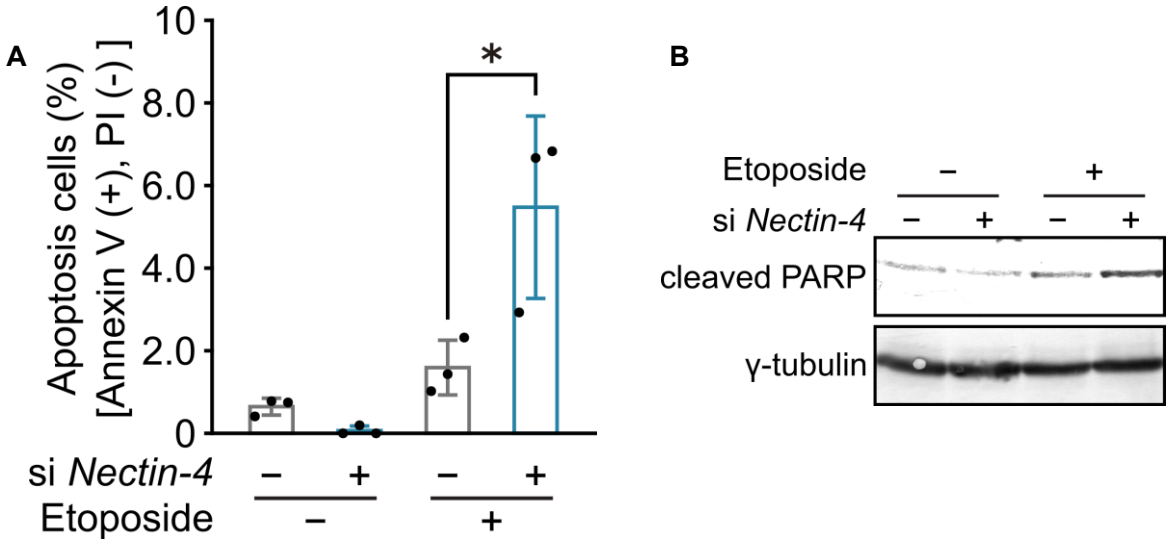


図 24. *Nectin-4* ノックダウン時に細胞老化を誘導するとアポトーシスが促進された

(A) U2OS 細胞に siRNA を用いて *Nectin-4* をノックダウンした後、2 μM Etoposide で 7 日間処理し、annexin V/PI 染色を行い、annexin V 陽性、PI 陰性の細胞の割合を測定した。3 回の実験結果から平均値と標準偏差を示した。**(B)** 同条件の細胞の cleaved PARP のレベルをウェスタンブロッティング解析により検出した。ローディングコントロールとして γ-tubulin を用いた。*$p < 0.05$.

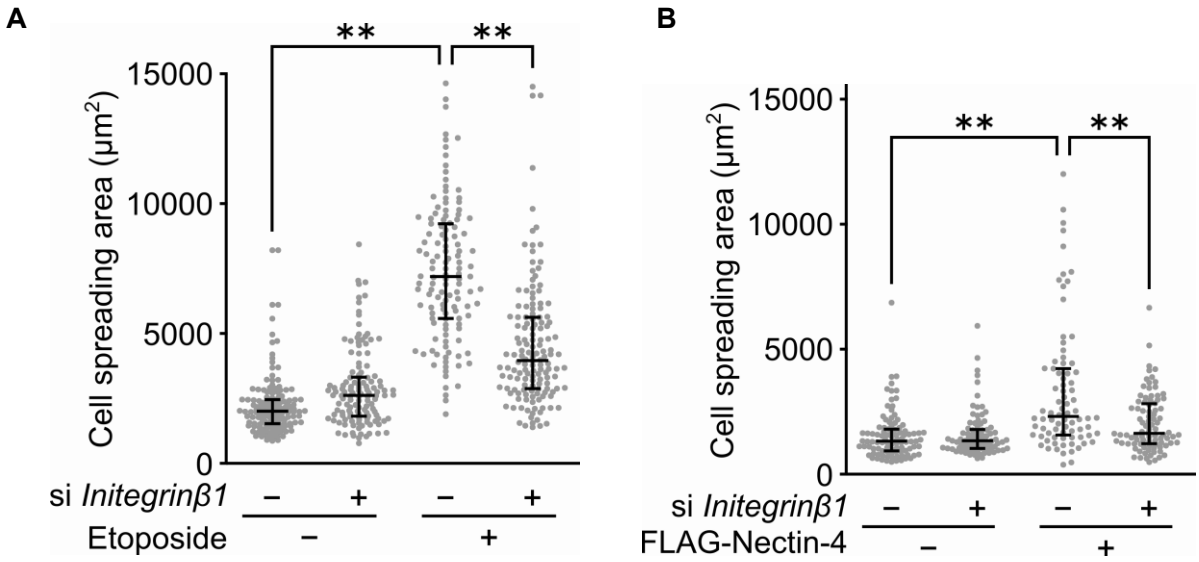


図 25. *Integrin β1* ノックダウン細胞の細胞接着面積

(A) siRNA を用いて *Integrin β1* をノックダウンし、2.0 μM Etoposide で 3 日間処理した U2OS 細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、細胞面積測定を行い、定量化したグラフを示した。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。**(B)** U2OS 細胞に siRNA を用いて *Integrin β1* をノックダウンし、FLAG- Nectin-4 を過剰発現させた。過剰発現後後 5 日目の細胞を抗 FLAG 抗体による免疫染色及び Phalloidin、Hoechst による染色を行い、染色後の細胞面積を顕微鏡画像より測定した。グラフは 5 ～ 95 パーセンタイル値を示し、100 細胞以上計測した。中央値と 25 パーセンタイル値及び 75 パーセンタイル値を線で表した。

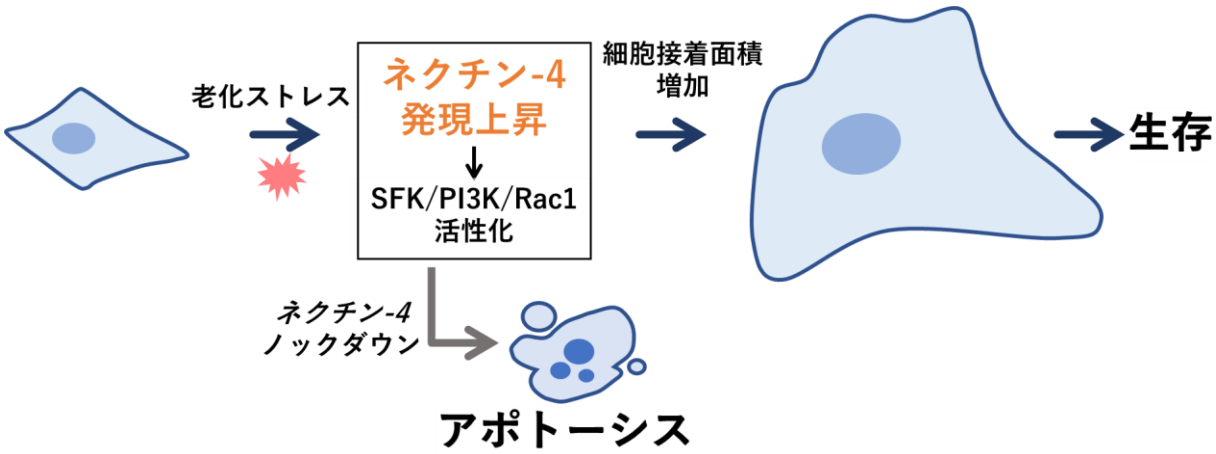


図 26. 本研究の概略図

DNA 損傷により Nectin 4 発現の上昇を誘導し、その後 SFK/PI3K/Rac1 経路を介して細胞接着面積の拡大をもたらし、それによって細胞の生存に寄与する。

謝辞

本研究の一部は、科学技術振興機構（JST）の次世代研究者挑戦的研究プログラム（SPRING）の支援を受けて行われました。ここに記して謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご指導をいただきました鎌田真司教授、岩崎哲史助教、長野太輝先生に感謝いたします。また、宮本昌明教授、影山裕二准教授には本論文の作成にあたり、副査としてご助言を賜りました。厚く感謝申し上げます。

また、鎌田・岩崎研究室、影山研究室の皆様には、研究の実施に際し多くのご助力をいただきました。この場をお借りいたしまして、厚く御礼申し上げます。