



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。



(別紙様式 3)

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 片所 諒子

専 攻 生物学専攻

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

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

指導教員 鎌田真司

【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 (ネクチン-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。ネクチン-4 は免疫グロブリンスーパーファミリーであるネクチンファミリータンパク質に属し、細胞膜に局在している。細胞外ドメインを介してネクチン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、ネクチン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、ネクチン-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ネクチン-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ネクチン-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、ネクチン-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。さらにネクチン-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ネクチン-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、ネクチン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、いずれの阻害でもネクチン-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、ネクチン-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 がネクチン-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、細胞老化誘導及びネクチン-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ネクチン-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、ネクチン-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、ネクチン-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ネクチン-4 の機能を調べるため、細胞死の解析を行った。結果、老化誘導時にネクチン-4 をロックダウンするとアポトーシスの指標である Annexin V 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いていることが示唆された。また、細胞の生存を維持する因子として Integrin $\beta 1$ が候補として挙げられた。

本研究からネクチン-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。

氏名	片所 諒子		
論文 題目	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		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	鎌田 真司
	副 査	教授	宮本 昌明
	副 査	准教授	影山 裕二
	副 査	助教	岩崎 哲史
	副 査		
要 旨			
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のストレス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 損傷を受けるとがん抑制遺伝子である転写因子 p53 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。先行研究において、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することが明らかとなった。本研究は細胞老化制御における Nectin-4 の役割について詳細な機能解析を行い、その結果をまとめた論文である。本論文は「第1章 序論」「第2章 実験手法」「第3章 結果」「第4章 考察」から構成されている。 「第1章 序論」 本研究を行うに至った背景について、老化細胞の特徴、個体における老化細胞の役割、細胞老化と疾患との関係などが分かりやすくまとめられている。そして、本研究で解析を行った Nectin-4 の説明を行ったのち、本研究の目的と研究結果の概要が記載されている。 「第2章 実験手法」 本研究で実施した実験手法について、他の研究者が再現可能となるよう詳細に記述されている。 「第3章 結果」 本研究で行った実験結果が詳細に記載されている。申請者は、まずヒト骨肉腫由来 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 が発現上昇することを見出し、老化誘導細胞の顕微鏡下での培養基質との接着面積と細胞体積が増大することを明らかにした。また、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。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			

氏名	片所 諒子
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。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 Annexin V 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べた。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 Integrin β 1 が関与することを明らかにした。以上の結果から 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。	
「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たがその分子メカニズムは明らかではなかった。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を明らかにした。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を行っている。具体的には、細胞体積やアポトーシスとの関係、Integrin β 1 の関係から細胞接着面積増大へ至る下流シグナル、細胞膜テンションへの関与、細胞接着因子としての機能などについて考察が行われ、最後にがん治療標的としての Nectin-4 の可能性を論じている。 以上のように、本研究は、細胞のストレス応答機構である細胞老化実行の分子機構について解析を行ったものである。論文提出者は、老化細胞で高発現する Nectin-4 について詳細な解析を行い、老化細胞の特徴の一つである細胞接着面積の増大に関与し、老化細胞の生存に寄与するという極めて重要な知見を得た価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の片所諒子は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。	