

## 核膜障害に起因する遺伝性早老症に対する治療戦略の基盤構築

広島大学大学院 医系科学研究科 分子細胞情報学

齋藤 敦

### 1. 諸言

核膜 (nuclear envelope) は2枚の脂質二重膜 (内膜および外膜)、核膜孔、核ラミナから構成されている。最近、細胞の老化や様々な細胞ストレスが、核膜コンポーネントの品質劣化や変性を引き起こし、核輸送破綻や核膜崩壊など、重篤な核機能障害に陥る興味深い現象が見出されている。このような核膜の多機能構造の破綻・消失は核膜ストレスと定義され、新たな研究概念として提唱されている (図1)。この核膜ストレスは、疾患発症とも関わる可能性が指摘されている。遺伝性早老症であるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 (HGPS) は、核ラミナを構成する Lamin A の遺伝子変異から生じる核膜ストレスが原因で発症することが知られている<sup>1,2)</sup>。しかし、核膜ストレスの発生メカニズム、細胞応答機構あるいは HGPS 発症に至る分子機序などについては解明されておらず、核膜ストレスという研究概念は定着しつつあるが、その分子の実体や疾患発症との関わりについては希薄なままである。

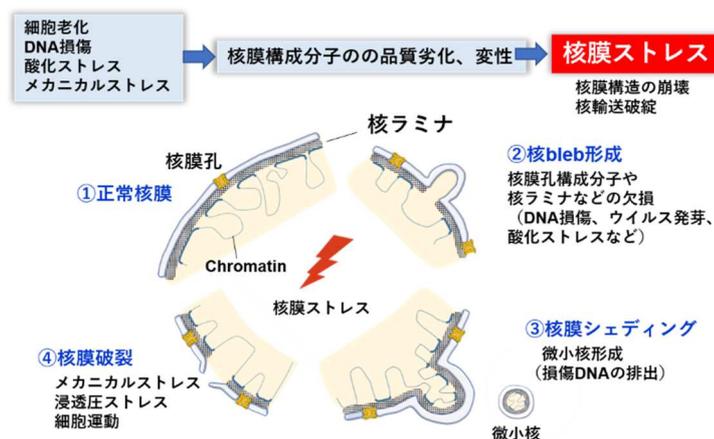


図1 DNA 損傷、酸化ストレスなどで核膜構成成分が劣化し、核膜崩壊や核輸送破綻が生じる現象を核膜ストレスという。核膜ストレス時には②~④に示すような様々な形態変化が生じるが、いずれも核ラミナが反応の起点となる。

HGPS の原因遺伝子として変異 Lamin A (progerin) が知られており、progerin 発現細胞の核膜は陥入あるいは突出部が多数認められる歪な形態を呈する<sup>1,2)</sup>。研究代表者はこれまでに、同定した小胞体膜貫通型転写因子 OASIS が、核膜の一部が膨れ上がった核膜 bleb に特異的に集積する現象を見出した。この OASIS が集積する核膜 bleb 形成部位では Lamin が消失しており、両者は相互排他的な関係にある。また、progerin が局所的に凝集して、核膜構造が破綻した部位に OASIS が集積することもすでに確認している。このことは、OASIS が核ラミナ崩壊と核膜ストレスの初期応答に関わる鍵分子であり、核膜局所における OASIS の機能とその破綻が HGPS の病態形成に関わる可能性を示唆している。そこで本研究では、核膜ストレス時における OASIS の局在変化の解析と相互作用分子の探索を実施し、核膜崩壊部に集積する OASIS の生理的意義を調べた。さらに、核膜ストレスによる核膜崩壊に対して OASIS が寄与する核膜修復メカニズムの解明を目指した。

## 2.方法

Lamin shRNA を安定的に発現する Hela 細胞株を樹立し、核膜ストレスと核膜崩壊が頻発する細胞として実験に使用した。この Lamin shRNA Hela 細胞に FLAG タグを付加した OASIS を発現させ、核膜 bleb をはじめとする核膜崩壊部における OASIS の集積とその他の核膜構成分子の局在変化を免疫染色法によって調べた。

OASIS は細胞種特異的に発現することがわかっており、human glioblastoma U251MG 細胞をはじめとする複数の細胞ではその発現がほとんど観察されない。この U251MG 細胞を親株として、OASIS を安定的に発現する細胞株 (U251MG-OASIS 細胞) を樹立した。U251MG 細胞および U251MG-OASIS 細胞を用いた transwell assay を実施して核膜構造を破綻させ (図 2)、核内 DNA の損傷を指標として OASIS による核膜保護および修復効果を検証した。

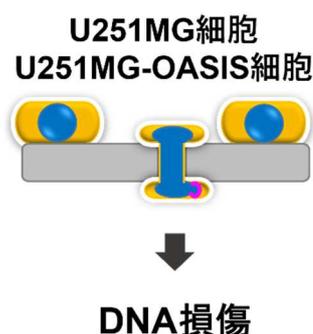


図 2 Transwell assay の模式図。U251MG 細胞あるいは U251MG-OASIS 細胞 (OASIS 安定発現 U251MG 細胞) が孔を通過する際に核膜が破綻し (赤色部)、DNA 分解酵素などに曝されることで DNA 損傷が引き起こされる。

野生型および OASIS 欠損マウスから採取した初代培養アストロサイトを抗がん剤ドキ

ソルビシン (doxorubicin : DOXO) で処理することで核膜ストレスを誘発し、細胞老化マーカーの発現変化を調べた。また、老化細胞を染色する senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) 染色を実施し、OASIS が細胞の老化に及ぼす影響を解析した。

### 3.結果

#### 3.1 核膜ストレス応答時における OASIS の局在変化と相互作用分子の探索

Lamin shRNA Hela 細胞に FLAG-OASIS を発現させ、免疫染色を実施した。核膜 bleb における OASIS および各種核膜構成因子の局在を調べると、核膜孔複合体 (nuclear core complex : NPC)、linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) 複合体の構成因子である SUN1 には、OASIS の集積する核膜 bleb での局在はみられなかった。一方で、SUN1 と同じく LINC 複合体の構成因子である SUN2 と Nesprin2 は、OASIS と同様に核膜 bleb を覆うような局在パターンを示した。さらに、核膜の修復を担う LAP2-emerin-MAN1 (LEM) タンパク質のうち LAP2beta と MAN1 は、OASIS が集積している核膜 bleb の一部に集積する局在パターンを示した。

#### 3.2 核膜の保護および修復に対する OASIS の役割

OASIS を発現していない U251MG 細胞および U251MG-OASIS 細胞を用いて transwell assay を実施した。核膜構造の破綻によって引き起こされる DNA 損傷の指標として、DNA 二重鎖切断マーカー gammaH2AX を認識する抗体を用いて免疫染色を行うと、U251MG-OASIS 細胞で gammaH2AX のドットが減少している細胞が多数観察された (図3)。

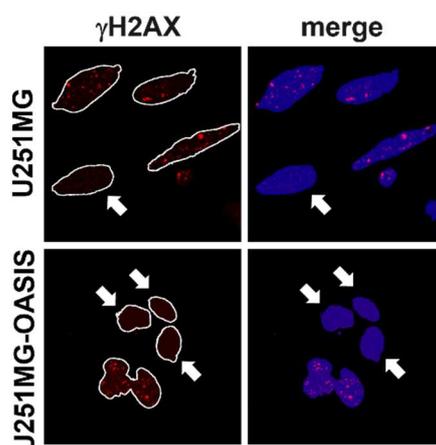


図3 U251MG 細胞および U251MG-OASIS 細胞を用いた免疫染色。白線は核の輪郭、青色 (DAPI) は核、白矢印は DNA 損傷が抑制されている細胞を示す。

#### 3.3 OASIS が核膜ストレスによる細胞老化に及ぼす影響

野生型および OASIS 欠損マウスから採取した初代培養アストロサイトを、抗がん剤 DOXO で処理して核膜ストレスを誘発すると、細胞老化マーカーのひとつである p21 の発現レベルが OASIS タンパク質の増加と連動して上昇することが確認された。この p21 の発現誘導は、OASIS 欠損アストロサイトではみられなかった。DOXO で処理した野生型および OASIS 欠損アストロサイトを用いて SA-beta-gal 染色を実施すると、野生型細胞では SA-beta-gal 陽性の老化細胞が観察された（図 4）。一方で、OASIS 欠損細胞では DOXO で処理しても SA-beta-gal 陽性の老化細胞は増加しなかった。

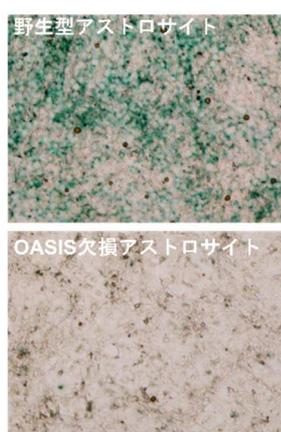


図 4 DOXO 処理した野生型および OASIS 欠損アストロサイトを用いた SA-beta-gal 染色。OASIS 欠損細胞では SA-beta-gal 陽性の老化細胞が減少している。

#### 4.考察

核膜 bleb における局在パターンより、OASIS は SUN2、Nesprin2、LAP2beta や MAN1 などと協調的に、損傷を受けた核膜の修復や保護を制御する可能性が示唆される。一方で Lamin や NPC、LINC 複合体構成因子のひとつである SUN1 とは排他的であることが示された。LINC 複合体は細胞骨格によって生じた力を核膜に伝える機能を持つことから<sup>3)</sup>、核膜への負荷が低減する可能性が考えられる。また、LEM タンパク質は損傷を受けた核膜の修復を担うことが報告されており<sup>4)</sup>、核膜損傷部位に集積した OASIS はこれらの機能に関与している可能性が示唆される。一方で、OASIS の局所集積を制御するメカニズムや、核膜修復に寄与する詳細なメカニズムはまだ不透明であり、今後さらなる解析を行っていく予定である。また、Transwell assay による核内の DNA 損傷が OASIS 発現細胞で抑制されたことから、OASIS が複数の核膜構成因子と相互作用することで核膜の修復もしくは保護を促進し、DNA 損傷を抑制することが示唆された。

DOXO によって誘導される核膜ストレスに応答して、p21 の発現上昇と細胞老化が観察された。OASIS 欠損細胞では p21 の発現誘導が抑制され、老化細胞も減少していたことから、OASIS は核膜ストレス発生時に p21 の発現誘導を介して細胞老化を引き起こすことがわかった。核膜ストレスに応答して活性化した OASIS が、核膜損傷部位に集積して核膜の

保護および修復に寄与するとともに、p21 の誘導と細胞老化を引き起こす生理的意義には不明な点が多く残されている。OASIS は、p21 を介した細胞老化を誘導して細胞周期を停止させることで、核膜構成因子と協調して核膜の構造および機能異常を修復する時間的猶予を作り出しているのかもしれない。

## 5.結語

本研究によって、小胞体局在分子 OASIS が核膜ストレスという核内の現象に応答して活性化し、核膜の構造および機能異常の回復に寄与するという新規分子機構の一端を明らかにすることができた。また、この新規シグナル経路は p21 を介した細胞老化の誘導も制御しており、OASIS が複雑な核膜ストレス応答経路の鍵分子として機能する可能性を示している。既述の通り、HGPS では核膜の構造異常や細胞老化の制御破綻が観察されており、これらの現象に関連する OASIS が HGPS の病態形成に深く関わる可能性が高い。実際に、HGPS の原因分子である progerin の凝集による核膜破綻部位に OASIS が集積していることもわかっており、OASIS の発現や活性化の誘導が HGPS の発症や病状の進行に対して抑制的に働くことが期待される。今後は、すでに保有している progerin 発現細胞を用いた *in vitro* 解析によって、OASIS が progerin 発現に起因する核膜機能異常に及ぼす影響を検証する。同時に、入手済みの progerin 発現マウスと OASIS 欠損マウスを交配させることで、HGPS 様症状がどのように変化するか解析する。さらに、OASIS の核膜破綻部への集積を指標としてイメージングベースのハイスループット化合物スクリーニング（化合物ライブラリー入手済み）を実施し、OASIS の核膜破綻部への集積を促進して核膜機能異常を抑制する物質を探索することで、HGPS に対する治療戦略の基盤構築へとつなげることを目指す。

## 6.文献

- 1) Scaffidi P., Gordon L., Misteli T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biology*. 2005;3:e395.
- 2) de Vos WH., Houben F., Kamps M., Malhas A., Verheyen F., Cox J., et al. Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Human Molecular Genetics*. 2011;20:4175-4186.
- 3) Rothballer A., Kutay U. The diverse functional LINC's of the nuclear envelope to the cytoskeleton and chromatin. *Chromosoma*. 2013;122:415-429.
- 4) Gu M., Lajoie D., Chen OS., von Appen A., Ladinsky MS., Redd MJ., et al. LEM2 recruits CHMP7 for ESCRT-mediated nuclear envelope closure in fission yeast and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114:E2166-E2175.

## 7.成果発表

雑誌論文

- ・ 投稿準備中

学会発表

- ・ **Atsushi Saito**, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi: Regulations of cellular senescence in glioblastoma mediated by ER-resident transcription factor OASIS. 第 64 回日本神経化学学会大会 (9/30、web 開催) . 2021.
- ・ 上川 泰直、**齋藤 敦**、今泉 和則. アストロサイトにおける核膜ストレスの分子機構. 第 64 回日本神経化学学会大会 (10/1、web 開催) . 2021.
- ・ 上川 泰直、**齋藤 敦**、松久 幸司、今泉 和則. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS による核膜ストレス応答機構解明. 第 94 回日本生化学学会大会 (11/5、web 開催) . 2021.