

# 皮膚角化細胞の老化を防ぐ脂質分子種の網羅的探索とその分子機構

慶應義塾大学薬学部

前川 大志

Skin is exposed to a variety of DNA damage-inducible stimulations such as chemicals and ultraviolet rays. The accumulation of DNA damages causes cell senescence of keratinocytes, which causes solar keratosis and melanoma. Those diseases not only threaten the life of patients itself but also decrease the quality of life of the patients. Thus, it is important to uncover molecular mechanisms and signatures of keratinocyte senescence. We have previously found that knockdown of SPOP, a substrate recognition receptor for cullin-3 (CUL3) ubiquitin ligase, in non-cancerous human keratinocyte-derived HaCaT cells exhibited cell senescence phenotypes (e.g. upregulation of p21 mRNA) as well as dysregulation of intracellular cholesterol distributions. These results suggest the relationships between cell senescence and lipid metabolisms controlled by the CUL3/SPOP ubiquitin ligase. In this study, we aim to characterize SPOP-knockdown HaCaT cells from the standpoint of cell cycle and to measure lipid molecular species in SPOP-knockdown HaCaT cells using untargeted lipidomics by the combination of LC-MS/MS9030 and MS-DIAL 4. We showed that SPOP knockdown drastically inhibited the translation of CDC6 and CDT1, which is essential for DNA replication licensing, leading to the upregulation of p21 mRNA and G1/S arrest (Sanada, [Maekawa](#) et al., BBRC. 2023). Our untargeted lipidomics revealed that neutral lipids were decreased in SPOP-knockdown HaCaT cells. Our results suggest a decrease of neutral lipids as a lipid signature of G1/S arrest HaCaT cells that mimic keratinocyte senescence.

## 1. 緒 言

皮膚は我々の内部と外界を隔てる一番外側に存在する組織であり、人体最大の組織とも言える。日常生活において、衣類で覆われていない皮膚の領域は恒常的に外界からの多様な刺激に晒されており、化学物質や紫外線などは皮膚組織、特にケラチノサイトのDNA損傷を引き起こす。このDNA損傷の蓄積はケラチノサイトの加齢依存的な細胞老化に繋がり、日光角化症などの原因となる。日光角化症は皮膚癌の発症誘発だけでなく、シミやシワの主因となり、患者の容姿への影響（生活の質の低下）が大きく懸念される。従って、ケラチノサイトの細胞老化の分子機構やその分子マーカーを同定することができれば、当該分子基盤に対する介入方法の開発に繋がり、将来的には皮膚の老化進行抑制剤の開発に資する。即ち、皮膚癌などの疾患予防、容姿維持に伴う生活の質の向上のために、老化進行抑制剤の開発標的となるケラチノサイトの細胞老化の新しい分子機構の導出が必要である。

Cullin-3 (CUL3) ユビキチンリガーゼは、基質認識受容体を介して標的基質タンパク質をユビキチン化するE3複合体である。CUL3 ユビキチンリガーゼの基質認識受容体はBTB domainを有しており、ヒトには183種類のBTB

domain containing protein (BTBP) 遺伝子がアノテーションされている<sup>1)</sup>。各BTBPが異なる基質タンパク質と結合し、その後に修飾されるユビキチン鎖のパターン（ユビキチンコード）やユビキチン化基質タンパク質の運命（分解や新規機能付加）も多様であることから、CUL3/BTBPの軸は極めて多岐にわたる生理機能を発揮できる。我々は今までに、幾つかのBTBPに関して、機能的な基質タンパク質を同定し、それぞれの軸の血管内皮細胞、各種癌細胞における機能を解明してきた（図1）。

SPOP (speckle-type POZ protein) は、BTBPの一つであり前立腺癌や子宮体癌などにおいて基質結合領域に非常に多くのアミノ酸変異が同定されている極めて重要な癌関連タンパク質であり、その腫瘍増殖における機能解析が進んでいる<sup>2)</sup>。一方で、ケラチノサイトに代表される癌化していない細胞における機能は殆ど不明なままである。我々は今までに、SPOPをヒト不死化ケラチノサイトHaCaT cellsにおいて発現抑制すると細胞増殖が著しく阻害され、p21のmRNAレベルが増加することを明らかにしている。この表現型は細胞老化の表現型に酷似しており、SPOP発現抑制HaCaT cellsが老化したケラチノサイトをミミックしていると示唆される。また興味深いことに、SPOP発現抑制HaCaT cellsにおける細胞内生体膜コレステロール局在をD4Hプローブ<sup>3)</sup>により観察した結果、その局在や蛍光強度の減少を見出した（前川、未発表）。D4Hの生体膜コレステロールへの結合性はコレステロールの量だけでなく、周辺の脂質環境により影響を受ける<sup>4)</sup>。即ち、SPOP発現抑制HaCaT cellsではコレステロールに加え、リン脂質や中性脂質などの脂質代謝全体が変動している可能性が強く示唆される。以上より、SPOPを介入点とすることで、



Comprehensive screen of lipid species that prevent keratinocyte cell senescence

Masashi Maekawa

Department of Pharmacy, Keio University

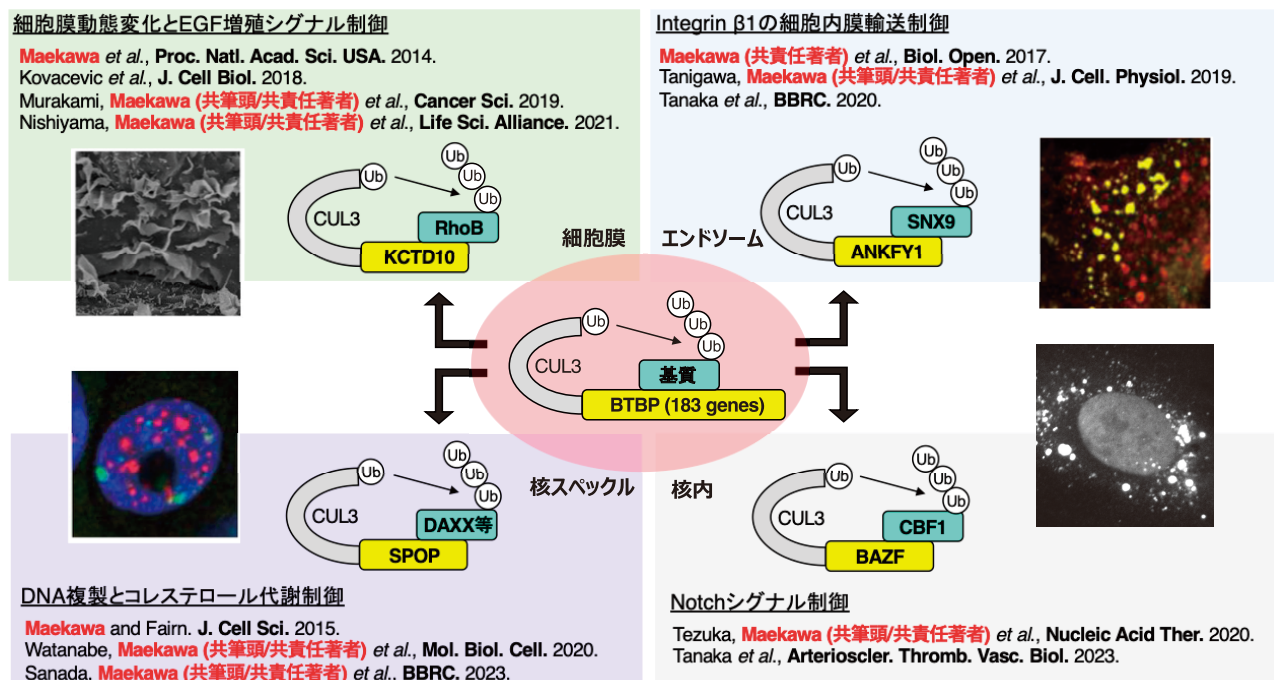


図1 我々が明らかにしてきたCUL3/BTBP/基質タンパク質軸の多様な生理機能

細胞老化と脂質代謝変動の因果関係を探ることができると着想した。そこで本研究では、1) SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状をcell cycleの観点から解き明かし、2) SPOP発現抑制HaCaT cellsの脂質代謝変動をノンターゲットリピドミクスによりノンバイアスに捉えることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状解析

SPOPに対し、配列の異なる2種類のsiRNAをRNAimaxにより、HaCaT cellsにそれぞれトランスフェクションし、72時間後に細胞を定量PCR、ウェスタンブロット法に供し、細胞周期やDNA複製に関与する遺伝子やタンパク質の量を検討した。DNA合成能については、チミジンアナログ (Edu) の取り込みにより評価した。Cdt1とCdc6の翻訳活性については、シクロヘキシミド (CHX) のpulse-chase実験とL-homopropargylglycine (HPG) のクリックケミストリーにより解析した。

### 2.2. ノンターゲットリピドミクス

SPOPおよび、CDC6、CDT1の下流で代謝制御を受ける脂質分子種を網羅的に捉えるためLC/Q-TOFMS (Shimadzu LC-MS030) を用いたノンターゲットリピドミクスを行った。具体的には、配列の異なる2種類のSPOP、CDC6、CDT1に対するsiRNAをRNAimaxにより、HaCaT cellsにそれぞれトランスフェクションし、72時間後に細胞を一層抽出後、ノンターゲットリピドミクスに供した<sup>5)</sup>。データ解析はMS-DIAL 4 softwareを用いた<sup>5)</sup>。

## 3. 結果

### 3.1. SPOPはHaCaT cellsにおいてDNA複製ライセンス因子CDC6とCDT1の翻訳を正に制御する

SPOPを発現抑制したHaCaT cellsの性状の解析を進めた結果、p21のmRNAレベルの増加に加えて (図2A)、Eduの新規合成されたDNAへの取り込みが著しく阻害されることが分かった (図2B)。これらの結果はSPOPの発現抑制により、p21が転写レベルで発現上昇し、G1/S arrestが生じている可能性を強く示唆するものである。次にこの分子機構を調べるため、DNA合成の初期段階に関与するDNA複製ライセンス因子CDC6、CDT1と、DNA2本鎖をほどこき、DNA polymeraseとDNAとの結合を可能にするMCM complex (MCM2-7) の発現をウェスタンブロット法により調べた。その結果、CDC6とCDT1のタンパク質がSPOPの発現抑制により顕著に減少し、MCM complexのタンパク質発現には影響は見られなかった (図2C)。これら分子群のmRNAレベルを調べた結果、SPOPの発現抑制により有意に減少する遺伝子は存在しなかった。また、CDC6やCDT1の発現抑制によっても、p21のmRNA発現の増加が認められた。以上の結果から、SPOP発現抑制HaCaT cellsでは、DNA複製ライセンス因子CDC6、CDT1の翻訳が阻害されることで、p21の発現が上昇し、G1/S arrestが生じ、細胞老化に似た表現型を示していることが示唆された。更に、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを一定時間処理した後、wash

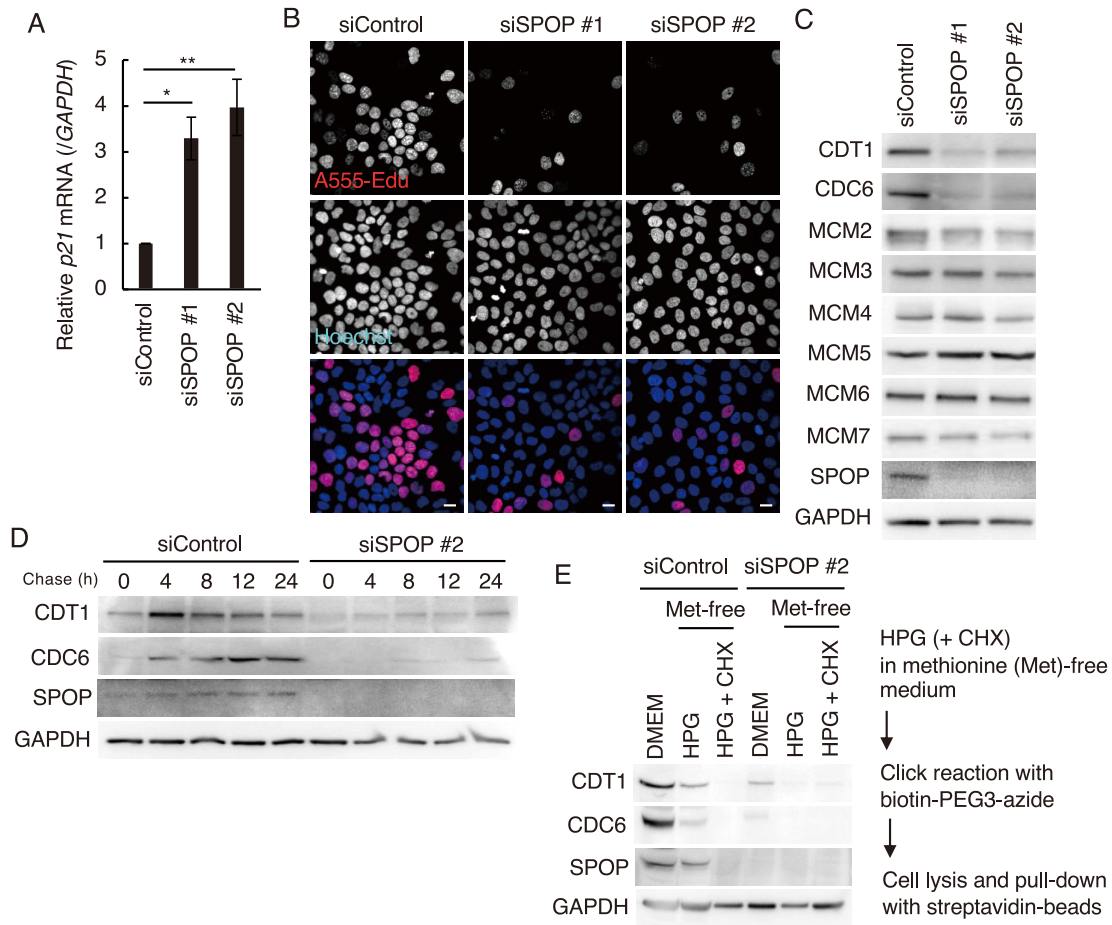


図2 SPOPの発現抑制により、p21 mRNAレベルの上昇(A)、DNA新輝合成の抑制(B)、CDT1とCDC6のタンパク質レベルの減少(C)、翻訳阻害(D、E)が認められる。細胞は全てHaCaT cells。Figures were reproduced from Sanada *et al.*, BBRC. 2023.

outして、その後のタンパク質の新規合成を調べた結果、SPOPの発現抑制によりCDC6とCDT1のタンパク質新規合成が著しく阻害された(図2D)。同様の結果は、クリックケミストリーが可能なアミノ酸アナログHPGでも得られた(図2E)。以上より、SPOPはHaCaT cellsにおいて、DNA複製ライセンス因子であるCDC6とCDT1の翻訳を正に制御していることが明らかになった<sup>6)</sup>。

### 3. 2. SPOP発現抑制HaCaT cellsでは中性脂質が減少する

G1/S arrestを起こし細胞老化に似た表現型を示すSPOP発現抑制HaCaT cellsをノンターゲットリピドミクスに供した結果、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)に代表される主要リン脂質の量に大きな変化は見られなかった。一方で興味深いことに、SPOP発現抑制により、中性脂質の量が減少していた。SPOP発現抑制時と同様に、G1/S arrestを誘導するCDC6、CDT1の発現抑制の際にも同様の脂質変

動を確認した。以上より、G1/S arrestを伴う細胞老化において、細胞内では中性脂質の量が減少することが示唆された(大谷, 前川, 未発表)。中性脂質の生合成関連遺伝子のmRNAレベルには顕著な上昇が見られていなかったことから、中性脂質の分解が亢進していると考えられた。

## 4. 考 察

SPOPは前立腺癌や子宮体癌の患者において、高い頻度でアミノ酸変異が見つかったことから、癌細胞における機能解析を中心に展開されてきた。本研究では野生型SPOPを発現する非癌細胞であるHaCaT cellsにおいて、SPOPのDNA複製ライセンス因子の翻訳制御因子としての機能を初めて明らかにした<sup>6)</sup>。興味深いことに、CDC6、CDT1のmRNAの5'-UTR領域は非常に短く、且つG/C richな領域を有する。これらの配列を認識する特異的な翻訳関連タンパク質がSPOPの標的ユビキチン化基質タンパク質である可能性が考えられる。今後、SPOP結合タンパク質の網羅的解析を進めることで、当該ユビキチン化基質タンパク質の同定が期待される。



SPOPを発現抑制し、細胞老化をミミックしたHaCaT cellsの脂質代謝解析より、G1/S arrestにより中性脂質の減少を見出した。また、遺伝子発現変動から中性脂質の分解が進んでいる可能性が示唆された。SPOPなどを発現抑制しない状態で、強制的に中性脂質の分解を誘導（リパーゼの強制発現など）することで、G1/S arrestや細胞老化の表現型が促進するか検証することで、当該脂質代謝と細胞老化の因果関係に迫ることが可能である。中性脂質が細胞老化を防ぐ分子である可能性を今後、更に詳細に検討することが必要である。細胞周期が進むプロセスにおいて、各チェックポイントが存在するが、その基準の一つに細胞内脂質の質と量があり、細胞内脂質変動が細胞周期の状態や細胞老化を評価できる新たなシグナチュアとなる可能性を秘めている。

## 5. 総 括

本研究により、ケラチノサイトの細胞老化をミミックしたG1/S arrest HaCaT cellsの脂質シグナチュアとして中性脂質の減少を明らかにした。今後は、SPOPの下流でユビキチン化を受け、中性脂質の代謝を担う責任基質タンパク質を同定する必要がある。更に当該基質タンパク質に介入した際の細胞老化への影響を調べる必要もある。HaCaT cellsは不死化された細胞であるので、今後はより生理的な細胞老化と脂質代謝の関連を調べる。具体的には、初代培養系ケラチノサイトを継代老化させて、時間依存的な老化に伴う脂質代謝をノンターゲット解析によって調べ、本研究で得られた脂質代謝変動と比較し、細胞老化と密接に関連する脂質代謝を同定する。近年、高度不飽和脂肪酸が酸化されたオキシリピンの一種に細胞老化を促進させる機能が報告されている<sup>7,8)</sup>。今後、細胞老化に伴い変動する脂質代謝変動の全貌をノンターゲットリピドミクスにより高深度で計測し、明らかにし、当該経路に介入すること

で細胞老化を自在に制御することが期待される。

本研究は愛媛大学プロテオサイエンスセンター・細胞増殖腫瘍制御部門・東山繁樹先生の研究室に在籍していた際に開始した研究です。暖かくも厳しくご指導いただきました同部門の東山繁樹先生、実験サポートをしてくださった長生真未 先生、SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状解析を共に進めてくれた愛媛大学医学部附属病院 形成外科 眞田紗代子先生、中岡啓喜先生、愛媛大学医学部附属病院 皮膚科 佐山浩二先生、藤澤康弘先生に感謝申し上げます。また、ノンターゲットリピドミクス解析は現所属の慶應義塾大学薬学部 有田誠先生の研究室で進めたものです。ご指導とご支援をいただきました有田誠先生、実際に実験を進めてくれた大谷航平君、MS-DIAL4の解析をご指導頂きました東京農工大学 津川裕司先生、理化学研究所 内野春希先生に御礼申し上げます。最後に本研究の推進において多大な援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Petroski and Deshaies., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 9-20 (2005).
- 2) Zhang et al., Cancer Res. 83 (4), 489-499 (2023).
- 3) Maekawa and Fairn. J. Cell Sci. 128 (7), 1422-1433 (2015).
- 4) Ercan et al., EMBO J. 40 (6), e106524 (2021).
- 5) Tsugawa et al., Nat. Biotechnol. 38 (19), 1159-1163 (2020).
- 6) Sanada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 651, 30-38 (2023).
- 7) Wiley et al., Cell Metab. 33 (6), 1124-1136 (2021).
- 8) Liu et al., Cell Metab. 35 (4), 667-684 (2023).