

## 論 文 要 旨

区 分	Ⓜ・乙	氏名	吉田 瑞姫 Ⓜ
-----	-----	----	---------

**Etoposide-induced cellular senescence suppresses autophagy in human keratinocytes**

【目的】細胞の恒常性維持にオートファジーと細胞老化が関与すると考えられている。しかしながら、オートファジーが細胞老化を促進あるいは抑制に働くのかは明らかとなっていない。そこで、Etoposide (ETO) 刺激・ヒトケラチノサイト (HaCaT) にDNA損傷反応 (DDR) に関連した細胞老化 (DDR関連細胞老化) を誘導して、この老化過程におけるオートファジーの役割を検索した。

【方法】実験モデルは、HaCaT細胞にETO (1.0, 5.0, 10, 25 $\mu$ M)を24時間刺激した。非刺激細胞をコントロール群とした。刺激および非刺激細胞でのDDR誘導、細胞老化誘導およびオートファジー発現には各種マーカーを用いて、細胞免疫染色法とWestern blotting法で検索した。また、オートファジーの阻害実験にはN-acetylcysteine (NAC)を前投与して検討した。

【結果・考察】5.0 $\mu$ M ETO投与細胞において、 $\gamma$ H2AX, p53 binding protein1(53BP1)およびsenescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal)の染色性亢進から、同細胞でのDDR関連細胞老化の誘導が確認された。しかし、1.0 $\mu$ M ETO群においては明らかな老化誘導は認められなかった。老化細胞では、リン酸化ataxia-telangiectasia mutated (ATM)、リン酸化p53 (pp53)およびp21の発現亢進から、ATMシグナル経路の活性化が示された。オートファジーの活性化については、5.0 $\mu$ M ETOを投与した老化細胞ではオートファジーのポジティブ・マーカーであるLC3およびBeclin-1の発現が抑制されたが、ネガティブ・レギュレーターであるRubiconの発現は著明に亢進した。一方、1.0 $\mu$ M ETOを投与された非老化細胞ではポジティブ・マーカーの発現が亢進した。オートファジー阻害剤であるNACを前投与すると、非老化を示していた1.0 $\mu$ M ETO投与細胞において、オートファジー・マーカーの発現は減弱したのに対して、Rubiconおよびp21の発現が亢進した。すなわち、同細胞が老化細胞に移行したことを示した。

【結論】ETO刺激で誘導されるDDR関連細胞老化は、ATM/p52/p21シグナル伝達経路の活性化を介して、オートファジーにより制御される。すなわち、Rubiconによるオートファジー不全はDDR関連細胞老化を促進することが示唆された。