

# NSAIDs の iPS 細胞における オートファジーに与える影響

笹沼いづみ\*, 増田 好希\*<sup>1</sup>

Effect of NSAIDs on autophagy of iPS cells

Izumi SASANUMA and Yoshiki MASUDA

Whether effect of NSAIDs and cellular autophagy interact to control stem cell function is currently unknown. Here we show that iPS cells synthesize more  $\beta$ -glucosidase than their immediate progenitors in vivo, even when proliferation decreased with NSAIDs. Our analyses reveal that activation of NSAID response pathways drives both an increase of  $\beta$ -glucosidase synthesis and altered receptor activations that together promote stem cell functions and differentiation. We show that inhibition of  $\beta$ -glucosidase locks differentiation-initiation cells in this distinct inhibition programme. The NSAID inhibiting the cell proliferation renders activation of  $\beta$ -glucosidase to NSAID and differentiation. Thus, the stem cell must induce  $\beta$ -glucosidase involved in activation of autophagy to differentiate.

KEYWORDS: iPS cells, NSAIDs, Autophagy

## 1. 緒言

iPS 細胞は人工誘導幹細胞であり、ES 細胞と同様にすべての細胞に分化が可能な幹細胞である。幹細胞を再生医療に用いるためには、細胞の分化や増殖を調節することが必要であり、これには様々な調節因子が関与することが明らかになってきた。非ステロイド抗炎症剤(以下 NSAID とする)は抗炎症作用の他に様々な生理活性を示すことが知られている。

本研究では NSAIDs の iPS 細胞に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料及び方法

供試細胞: iPS 細胞 (PBRC-HPS003)。NSAIDs: アセチルサリチル酸、イブプロフェン、エテンザミドを用いた。iPS 細胞の培養: modified DMEM/F12 SUBSER-ESrP。細胞数の測定: MTT 法。形質変化観察: ギムザ液で染色した。 $\beta$ -グルコシターゼ活性: サリシンを基質として測定した。遺伝子発現: RT-PCR。受容体の検出: ウェスタンブロッティングを用いた、フィルターリタレーション分析を行った。タンパク質の分析: タンパク質量はローリー法、分子量は SDS-PAGE で測定した。細胞数の測定: MTT 法で行った。

\* 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

\*1 専攻科 物質工学コース(Materials Chemistry and Bioengineering, Advanced Course)

### 3. 結果

#### 3. 1 NSAIDs による iPS 細胞の増殖への影響

NSAIDs が iPS 細胞の増殖に与える影響を検討するため、NSAIDs を iPS 細胞の培養に添加し、細胞の増殖量を測定した (図 1)。コントロールの培養では、培養時間に伴いほぼ直線的に細胞が増殖した。アスピリンでは 2 週目でコントロールとほぼ同様の値を示したが、3 週目で大きく増殖速度が減少した。イブプロフェンでは、2 週目で増殖速度の低下が認められ、3 週目では再び増殖速度の上昇が認められた。エテンザミドでは 2 週目でコントロールと同様の値を示したが、3 週目では、大きく増殖速度が減少した。高濃度アスピリンでは、ほぼ直線的に細胞が増殖するが、その増殖速度は、コントロールと比較して約半量であった。NSAIDs を添加した培養では、コントロールと比較すると培養 3 週目で細胞濃度が約半量になっていることが認められた。

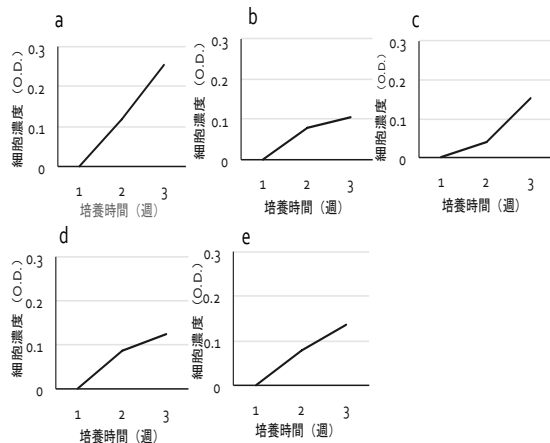


図 1 NSAIDs による iPS 細胞の増殖への影響。iPS 細胞の培養に添加した NSAIDs はアスピリン (b)、イブプロフェン (c)、エテンザミド (d)、高濃度アスピリン (e)、無添加をコントロール (a) とした。

#### 3. 2 NSAIDs による iPS 細胞の $\beta$ -グルコシダーゼ活性への影響

NSAIDs が、iPS 細胞の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性へ与える影響を検討するため、NSAIDs を iPS 細胞の培養に添加し、細胞内と細胞外の本酵素活性を測定した (図 2)。コントロールの培養では、細胞外の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は上昇し、細胞内の

$\beta$ -グルコシダーゼ活性はほとんど変化しなかった。アスピリンでは細胞外の活性は、2 週目ではコントロールとほぼ同様の値を示し、3 週目では活性が上昇するが、その上昇はコントロールと比較して約半量であった。細胞内の活性では培養時間に伴わずかに上昇した。イブプロフェンでは細胞外の活性は、2 週目で大きく上昇し、3 週目の上昇は低かった。細胞内の活性は 2 週目では低下し、3 週目も同様に低下した。エテンザミドでは細胞外の活性は 2 週目でコントロールとほぼ同様の値を示し、3 週目ではわずかに上昇した。細胞内の活性は培養時間に伴いほぼ直線的に上昇した。その上昇はコントロールと比較して明らかに大きい値を示した。高濃度アスピリンでは細胞外の活性は培養時間に伴いほぼ直線的に上昇し、3 週目の値はコントロールのそれとほぼ同様の値を示した。細胞内の活性は 2 週目では低下し、3 週目も同様に低下した。

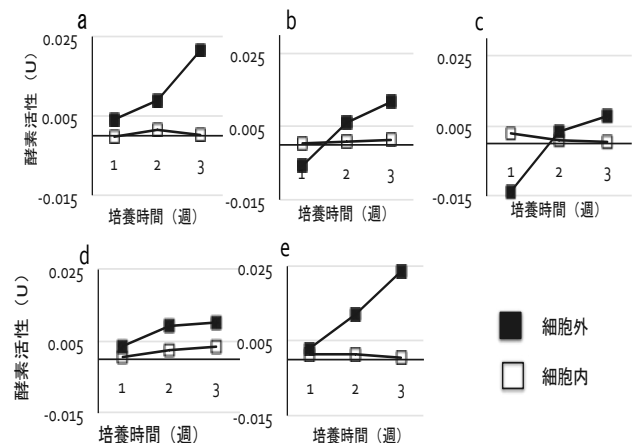


図 2 NSAIDs による iPS 細胞の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性への影響。iPS 細胞の培養に添加した NSAIDs はアスピリン (b)、イブプロフェン (c)、エテンザミド (d)、高濃度アスピリン (e) であり、無添加をコントロール (a) とした。酵素活性は細胞あたりの量として示した。

#### 3. 3 NSAIDs の iPS 細胞培養への影響

NSAIDs が、iPS 細胞の形態へ与える影響を検討するため、iPS 細胞をギムザ液により染色し、顕微鏡による観察を 1 週間ごとに、計 3 週間行った。

この検討で、細胞の形態に変化のあった条件について、さらに検討を行った。即ち、神経誘導条件でのNSAIDの影響を検討した。その結果、エテンザミドを加えて培養したものには、表面の変化が大きく現れた(図3)。

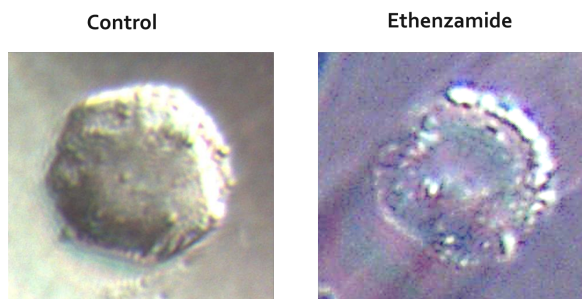


図3 神経誘導 iPS 細胞への NSAIDs の影響。iPS 細胞の培養に添加した NSAIDs はエテンザミドであり、無添加をコントロールとした。

### 3. 4 NSAIDs により活性化された受容体の検出

NSAIDs が iPS 細胞の受容体へ与える影響を検討するためフィルターリタレーション分析により活性化された受容体の検出を試みた。培養1週目では細胞内においてアスピリン、エテンザミド、高濃度アスピリンを添加した培養で15~20kDaの受容体が活性化された。細胞内ではイブプロフェンを添加した培養で約50kDaの受容体が活性化された(図4)。

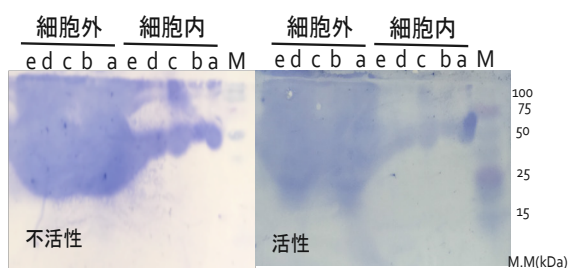


図4 NSAIDs による iPS 細胞の受容体への影響。iPS 細胞の培養に添加した NSAIDs はアスピリン (b)、イブプロフェン (c)、エテンザミド (d)、高濃度アスピリン (e) であり、無添加をコントロール (a) とした。

## 4. 考察

### 4. 1 NSAIDs による iPS 細胞の増殖への影響

NSAIDsをiPS細胞の培養に添加し、細胞の増殖量を測定したところ、NSAIDsを添加した培養では、コントロールと比較し培養3週目で細胞濃度が減少することが明らかになった(図1)。NSAIDの細胞増殖抑制効果については、PG(プロスタグランジン)の合成抑制によるものと考えられてきたが、これ以外の細胞増殖抑制効果が報告されている。細胞増殖を促進する蛋白であるサイクリンA、サイクリンB1、サイクリン依存性キナーゼはNSAIDsの一種であるcelecoxibによって減少し、細胞周期を阻害する蛋白である p21Waf1 と p27Kip1は celecoxibによって増加すると報告されている(1)。さらに、癌細胞のCOX-2発現の有無に関わらず、celecoxibは癌細胞にアポトーシスを引き起こすが、COX-1の阻害剤である SC560にはそのような作用は見られない(1)。このように、NSAIDsは構造により、細胞増殖に及ぼす影響は様々である。

NSAIDの一種であるアスピリンは、抗がん作用があることが知られており、がんの治療や予防薬として期待されている。NSAIDが抗がん作用を持つ理由として、がん増殖を促進するPGの合成阻害が考えられている。しかし、PGは数種類あり多様な生理活性を示し、腫瘍細胞に対しても作用が様々である。なかでもPGE2は腫瘍増殖を亢進し、PGD2は逆に抗腫瘍効果を示す。NSAIDはこれら全てのPGを阻害するため、結果として抗腫瘍効果が一定しない。したがって、PGD2合成を阻害しないNSAIDは細胞増殖抑制効果が高いことが期待される。

今回用いたNSAIDsは、アスピリン(サルチル酸系)、イブプロフェン(プロピオン酸系)、エテンザミド(サルチル酸系)である。サルチル酸系であり、ほぼ全てのCOXの活性を阻害するアスピリンとエテンザミドでは、2週目でコントロールとほぼ同様の値を示したが、3週目で大きく増殖速度が減少した。高濃度アスピリンでは、ほぼ直線的に細胞が増殖するが、その増殖速度は、コントロールに比較して約半量であった(図1)。プロピオン酸系のイブプロフェンでは、2週目で増殖速度の低下が認められたが3週目では再び増殖速度の上昇が認められた(図1)。

全ての、COXを阻害する構造を持つサルチル酸系NSAIDはPG合成阻害による細胞増殖抑制が起きたものと考えられるが、プロピオン酸系はCOX-1の阻害については活性が低いため、PGの生産が行われ

たため、培養後期で増殖率が高くなったものと考えられる。

#### 4. 2 NSAIDs が iPS 細胞の $\beta$ -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

NSAIDsをiPS細胞の培養に添加し、細胞内と細胞外の $\beta$ -glucosidase活性をそれぞれ測定したところ、コントロールに比べ細胞外液の $\beta$ -グルコシダーゼ活性の上昇を促したのは高濃度アスピリンを添加した培養で、同様に細胞内液ではエテンザミドを添加した培養であった(図2)。

コントロールと比較し、エテンザミドを添加した培養で細胞内に高い $\beta$ -グルコシダーゼ活性が確認されたことから、エテンザミドはiPS細胞の $\beta$ -グルコシダーゼ生産を誘導する因子であると考えられる。また、細胞内 $\beta$ -グルコシダーゼは、オートファジーにおいて重要な役割を果たすことから、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を上昇させることはオートファジー機能を促進することが推察される。NSAIDのオートファジー誘導については、アスピリンにより細胞内でオートファジーおよび活性化リソソーム機能を誘導すると報告されている(2)。これはアスピリンがmTORC1のエフェクターを阻害するため、起きる現象である。mTORは、細胞増殖やタンパク質合成を制御するために働くセリン/スレオニンプロテインキナーゼであり、オートファジーにおいて負の制御因子であることが知られている(2)。

#### 4. 3 NSAIDs の iPS 細胞培養に及ぼす影響

培地にレチノイン酸を添加したiPS細胞を顕微鏡により観察したところコントロールに比べ、エテンザミドを添加した神経誘導iPS細胞は細胞表面により多くの突起が見られた。これは神経に分化する過程であることを示し、エテンザミドは神経分化を促進することが推察された。

#### 4. 4 NSAIDs により活性化される受容体

活性化された受容体を検出したところ、細胞外においてアスピリン、エテンザミド、高濃度アスピリンを添加した培養で15~20kDaの受容体、細胞内においては、イブプロフェンを添加した培養で約50kDaの受容体が検出された(図4)。 15~

20kDaの受容体は分子量からTGF- $\beta$ 受容体であると考えられる。TGF- $\beta$ は胎児から成人の組織に広く分布しており、その受容体はほとんどの細胞に見いだされる。主に細胞増殖の抑制作用を示し、発生過程や分化の開始に重要な役割を担う。イブプロフェンで活性化された約50kDaの受容体は分子量からステロイド受容体であると考えられた。ステロイド受容体は細胞内に存在し、特にエストロゲン受容体は様々な細胞の増殖を促すことが知られている。

プロピオン酸系NSAIDのイブプロフェンは培養後期の細胞増殖を抑制しなかった。これは、プロピオン酸系NSAIDがCOX 1の阻害活性が低いこと、PGの生産が行われなかったためと考えられる。また、ステロイド受容体を活性化させたことから、細胞増殖と幹細胞の性質を維持したものと考えられた。一方、サルチル酸系NSAIDは細胞の増殖を抑制し、TGF- $\beta$ 受容体を活性化させたことから、細胞の分化を促進すると考えられた。特に、エテンザミドは、細胞内 $\beta$ -グルコシダーゼを誘導し、さらに、神経誘導iPS細胞に形態変化を起こさせた。

細胞が分化する過程では、細胞を再構築する必要がある。オートファジーは、不要になった構造の分解と新しい細胞構造を構築するための材料を供給するために必要な機能である。このオートファジーにおいて、 $\beta$ -グルコシダーゼは、タンパク質の糖鎖を外し分解できる様にする、糖脂質の配糖を切り離し利用可能な脂質を生産すること等の役割を果たす。このどちらも神経の機能維持には重要な過程であり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性の維持は神経分化に重要であると考えられた。今回用いたサルチル酸系NSAIDの中でエテンザミドは、構造中にアミドをもち、この構造が $\beta$ -グルコシダーゼの誘導とオートファジーの活性化に関与する可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam L, Geisslinger G: COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* 15(14):2742-2744 (2001)
- 2) Wang J, Zhang CJ, Zhang J, He Y, Lee YM, Chen S, Lim TK, Ng S, Shen HM, Lin Q: Mapping sites of aspirin-induced acetylations in live cells by quantitative acid-cleavable activity-based protein profiling (QA-ABPP). *Sci. Rep.* 7896 (2015)

【受理年月日 2017年 9月27日】