

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08919

研究課題名(和文)血清中テロメアDNA解析による老化パラメータの開発

研究課題名(英文)The development of aging parameters by serum telomere DNA analysis

研究代表者

前田 豊樹 (Maeda, Toyoki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30264112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの検討で、染色体末端のテロメアDNAおよびその近傍に特異的な現象を追跡することで、老化性変化を従来よりも短い時間レンジで捉えられるようになった。そしてテロメア長の分布解析により単純テロメア長追跡では捉えられない、温熱の影響などによるスーパーエイジングなど多様な老化パターンを捉えることができるようになった。しかし、リアルタイムでの老化速度測定に向けて、死滅しつつある老細胞の染色体外テロメアDNA量測定を試みたが、信頼しうる測定系の確立には至らなかった。この過程で、染色体外テロメアDNA分画には、必ずしも染色体末端のテロメアに由来しないものが含まれうるという新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：By analyzing the telomere length distribution of peripheral white blood cells and the variation of subtelomeric hypermethylation it was possible to more accurately detect the biological aging state by measuring the average telomere length than by analyzing only. These newly developed methods were useful for detecting and evaluating a new type of anti-aging condition that aged cells live longer at a mild hot state than at normal temperature. In addition, we attempted to measure the amount of extrachromosomal telomere DNA derived from aged somatic cells but did not succeed to detect the rate of aging in a short period of time. In the course of this research, it was found that several DNA fragments extracted from non-nuclear DNA fractions contain intrachromosomal telomeric sequences along with telomere-like DNA sequences at the chromosome ends.

研究分野：Geriatrics

キーワード：テロメア 生物学的老化

### 1. 研究開始当初の背景

テロメアは、ヒトでは10~15kbの染色体末端に存在する反復DNA配列構造

(TTAGGG/AATCCC) $n$ であるテロメアは、細胞分裂のたびにわずかずつ短縮して、細胞分裂を繰り返した老細胞では、テロメアは短くなるため、細胞の老化時計ともいわれる。ヒト末梢白血球中の平均テロメア長は、加齢とともに年間に平均20~100塩基対ずつ平均テロメア長が短縮してゆく。また、これまで生活習慣病をはじめとする様々な疾病、喫煙、強い慢性的社会的ストレスなどの病的状況下で平均テロメア長が短縮することが報告されてきた。しかし、これらのデータを臨床現場で活用するとなると、患者生活指標の設定に活用し得る段階には至っておらず、このためには、よりこまやかかつ正確な総合的生物学的老化状態の把握が必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

体細胞テロメアDNA長を生物学的老化指標として、まず、その変化速度から老化速度を把握するべく、テロメア長とその分布ならびに近傍のエピジェネティックな変化を評価し、さらに老化して死滅していく細胞の量を、テロメアが限界まで短縮して、ついには融化した細胞由来のテロメアすなわち細胞外テロメア断片量から推定し、これらのテロメア関連パラメータを総合的に比較検討して、逐次老化状態を把握することを目指した。

### 3. 研究の方法

慢性疾患患者において、末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、テロメアプローブを用いたゲノムサザン法により、平均テロメア長、テロメア長分布、テロメア周辺領域の脱メチル化、実年齢、疾患重症度を示す臨床マーカー(一般血液検査、炎症マーカーなど)との関連の有無を検討する。

そして、まず血管内皮細胞などの正常培養細胞系で、ゲノムサザンによるテロメア長と上清中の老化死滅細胞由来のテロメアDNAを、反復DNA検出を目的とした改変PCRにより定量

する系を確立して、これを患者血清に応用して、患者ごとの加齢や種々の基礎疾患の存在ならびに臨床検査値の変動による、細胞老化に比例した染色体外テロメアの出現量の変化と前述の他のテロメア関連パラメータとの関連の程度を明らかにして、末梢白血球中の細胞内と細胞外のテロメアDNA量が、老化過程を定量的に示すパラメータと言えるかを検証することを試みた。

### 4. 研究成果

当初申請者自身の血清から定量PCRでテロメア断片を検出できたことから、その定量法の確立を試みたが、培養系、ヒト血清のいずれにおいても条件による揺らぎが大きく、最終的に信頼性のある定量にはいたらなかった。一方、その裏付けを取るべく、これと並行して末梢血白血球のテロメア近傍領域のメチル化の程度を測定してきたが、測定できた範囲で、揺らぎがありながらもある程度、把握できた細胞外テロメア量とテロメア近傍領域のメチル化の程度は相関が見られ、テロメアのエピジェネティックな変化が老化速度測定のパラメータとしては有用であると目された。臨床検体での検討で老化促進状況とテロメア近傍のエピジェネティクスが並行していることも、あらためて確認でき、テロメアのエピジェネティック変化をパラメータとして臨床検体での検討を進めていった。また、先に疫学調査で温泉入浴が、がんや生活習慣病の予防効果、免疫増強効果を示す知見を報告できたが、本研究でも温泉入浴に見立てた温熱効果による老化への影響を解析し、そこで得られた老化細胞の保持傾向の知見を論文報告できたことをはじめとして、深部体温上昇高効率の特殊温浴による短テロメア細胞集団の保持という新しいタイプの抗老化効果(スーパーエイジング)に関する知見を論文化した。さらに、これまでの血液検査での検討のみならず心電図や心エコーなどの生理学的パラメータにも着目し、テロメアDNA変化との関連を

追ったところ、PR時間と心室拡張能がゲノム老化と相関していることを見だし論文化した。また、背景を揃えた場合、睡眠薬服用者においてテロメア関連のゲノム老化性変化が促進されることを見だし世界睡眠学会で報告を行った。このように臨床検査パラメータとテロメアのエピジェネティックパラメータとの平行性の検討から臨床現場での生物学的老化状態の把握に関する新しい知見をいくつか論文にまとめることができた。

染色体外テロメア分画、細胞外もしくは血清中テロメア分画の測定系の定量性については、測定値のバラツキが大きく一定の割合で必ず特に外れたものが散見された。はずれ値を除くことで定量性が確保される面はあるものの、それでは、ここの患者に対応した信頼できる正確な測定法が開発されたとは言えない。その後の解析で、血清テロメア分画を制限酵素MspIで切断したものにアンカーをつないで一部クローニングし、その塩基配列を決定するとテロメア配列以外の配列が見つかったことから、バラツキの原因が、除ききれずに混在する染色体成分の末端のテロメアではなく、染色体内部に存在するテロメア様配列領域に由来するものである可能性が考えられた。つまり大きな揺らぎの原因として、この染色体内テロメア類似配列が環状欠失するなどのメカニズムにより、染色体外へ放出されたものによる影響が考えられた。このようなテロメアDNAを含む断片は、染色体末端短縮とは無関係に生じると考えられるから、これが細胞融解とともに血清中に遊離されれば、血清中のテロメアDNA量はばらつき、リアルタイムの細胞死滅とは相関しなくなると予想される。

今回の検討で、染色体末端のテロメアDNAおよびその近傍に特異的な現象の追跡を推し進めることで、老化性変化を従来よりも短い時間幅で捉えられるようになったこと、テロメア長の分布解析により単純テロメア長追跡で

は捉えられない、温熱の影響などによるスーパーエイジング(=老細胞の長寿化)など多様な老化パターンを捉えられるようになったこと、リアルタイムでの老化速度測定に向けて、死滅しつつある老細胞の染色体外テロメアDNA量測定を試みたが、染色体外テロメアDNA分画には、必ずしも染色体末端のテロメアに由来しないものが含まれうるという新たな知見を得たこと、などの成果を挙げる事が出来た。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1) Maeda T, Horiuchi T, Makino N. The epigenetic status of subtelomere of peripheral leukocytes corresponds to cardiographic parameters with a gender association. *Geriatr Gerontol Int.* (印刷中)

2) Maeda T, Kudo Y, Horiuchi T, Makino N. Clinical and anti-aging effect of mud-bathing therapy for patients with fibromyalgia. *Mol Cell Biochem.* 444; 87-92: 2018.

3) Maeda T, Mimori K, Suzuki S, Horiuchi T, Makino N. Preventive and promotive effects of habitual hot spa-bathing on the elderly in Japan. *Sci Rep.* 8; 133: 2018.

4) 前田豊樹、堀内孝彦 クインケ浮腫(血管性浮腫)の診断と治療. *呼吸器内科.* 31; 214-220: 2017.

5) 前田豊樹、牧野直樹、前川真貴子、木本泰孝、堀内孝彦 線維筋痛症患者の自宅人工炭酸浴による臨床検査値変化の検討 *九州リウマチ* 36 83-89, 2016.

6) Oyama JI, Shiraki A, Nishikido T, Maeda T, Komoda H, Shimizu T, Makino N, Node K. EGCG, a green tea catechin, attenuates the progression of heart failure induced by the heart/muscle-specific deletion of

MnSOD in mice. J Cardiol.69; 417-427: 2017.

7) Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Shimokawa I, Mori N, Furuyama T. FoxO1 signaling plays a pivotal role in the cardiac telomere biology responses to calorie restriction. Mol Cell Biochem.412; 119-130: 2016.

8) 前田豊樹 臨床検査値から分かる老化時計テロメアの長さ. 薬事日報. 11634号 18-19, 2015.

9) Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Tsuchida K. Calorie restriction increases telomerase activity, enhances autophagy, and improves diastolic dysfunction in diabetic rat hearts. Mol Cell Biochem.403; 1-11: 2015.

10) Makino N, Maeda T, Abe N Effects of Immersion in Artificial Carbon Dioxide on Endothelial Function Assessed with Flow-Mediated Dilation in Patients with Type 2 Diabetes. J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med. 78; 276-284: 2015.

11) Maeda T, Hot spring footbath is effective for low back pain. Appl Cell Biol. 4; 4-5: 2015.

12) Maeda T, Makino N. Hot-spring-bathing accelerates wound healing of pressure ulcer of an unconscious patient. Appl Cell Biol. 4; 1-3: 2015.

13) Guan JZ, Guan WP, Maeda T, Guoqing X, Guang-Zhi W, Makino N. Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening. Mol Cell Biochem.400; 183-187: 2015.

〔学会発表〕(計9件)

1) 前田豊樹 鉱泥浴による難治性慢性疼痛の治療について第320回日本内科学会九州地方会 (福岡 2018, 1/20)

2) 前田豊樹 温泉タンク浴による意識障害のある寝たきり患者の褥瘡治療の一例. 第320回日本内科学会九州地方会 (福岡 2018, 1/20)

3) 前田豊樹 温泉の医用効果 2017年度温泉療法医会九州地区研修会 (鹿児島 2018,1/13)

4) Maeda T. An accelerated telomere shortening in male patients with insomnia treated with sleep medication. World Sleep (Prague, Czech 2017, 10/7-11)

5) 前田豊樹、堀内孝彦別府市高齢者2万人を対象とした温泉利用と既往症に関するアンケート調査の解析. 第82回温泉気候物理医学会 (北海道余市郡 2017, 6/24)

6) 前田豊樹 The Medical Effects of Hot Spring Bathing 別府市-ロトルア市姉妹都市交流30周年記念事業招待講演 (New Zealand, Rotorua 2017, 6/19)

7) 前田豊樹、堀内孝彦. 温泉の医用効果について第15回日本予防医学会 (招待シンポジスト) (湯布院 2017,5/27)

8) 前田豊樹、木本泰孝、堀内孝彦. 自宅人工炭酸浴による線維筋痛症患者治療の試み. 九州リウマチ学会 (2017,3/11 別府)

9) Maeda T. The effects of hot spring bathing (pelotherapy) for chronic pain with fibromyalgia syndrome. 10<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark 2016,7/5).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/organization/07017501/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

前田豊樹 (MAEDA TOYOKI)

九州大学病院別府病院・内科・准教授

研究者番号：30264112

(2)研究分担者

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)

九州大学病院別府病院・内科・教授

研究者番号：90219212

小柳 雅孔 (KOYANAGI MASAMICHI)

九州大学病院別府病院・内科・助教

研究者番号：00325474

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )