

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16619

研究課題名(和文)筋サテライト細胞におけるエピゲノム記憶と老化誘導

研究課題名(英文)Regulation of aging by epigenetic memory in satellite stem cell

研究代表者

早野 元詞(HAYANO, Motoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：30593644

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): ICEマウスにおいてDNA損傷依存的な老化誘導によって、Pax7陽性細胞が減少していることが明らかになった。また、筋肉組織としてのRNA-seqによる遺伝子解析からPax7の遺伝子発現量が低下し、Myh9やMy14などの筋萎縮に関連する遺伝子発現がICEマウスにおいて変化していることが明らかになった。さらに、遺伝子発現だけでなくTtn、Tnnt3、Nebなど筋形成に重要な遺伝子のmRNAスプライシングが老化に伴って減少するだけでなく、ICEマウスの筋肉でスプライシング異常が生じていることが確認された。このことは、DNA損傷が多様な幹細胞制御に老化において関わっていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴って筋力と筋肉量が低下してサルコペニアを発症する。世界的に5億人がサルコペニアを発症し、その分子機序が不明なため治療薬が存在しない。ICEマウスはDNA損傷依存的な老化誘導と、サルコペニアの表現を観察することが出来る。本研究からICEマウスにおいて老化において観察されるPax7遺伝子の低下と、筋肉機能や構成に重要なMyh9やMy14などの遺伝子発現低下が確認された。さらに遺伝子発現だけではタンパク質として機能しているか不明であるが、Ttn、Tnnt3、Nebなどの筋肉分化、機能に必須の遺伝子のスプライシング異常が確認され、加齢における筋力低下の分子機序の重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文): We found that the number of Pax7-positive cells was reduced by DNA damage-dependent induction in ICE mice. Gene expression analysis of muscle tissue by using RNA-seq revealed that the gene expression of pax7 was decreased and that the expression of genes related to muscle atrophy, such as Myh9 and My14, was altered in ICE mice. Furthermore, not only gene expression but also mRNA splicing of genes important for myogenesis, such as Ttn, Tnnt3, and Neb, decreased with aging, and abnormal splicing was observed in the muscles of ICE mice. This indicates that DNA damage is involved in diverse stem cell regulation in aging.

研究分野: 老化

キーワード: 筋肉 サルコペニア DNA損傷 ICEマウス Pax7 Myh9 Ttn スプライシング異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアとは5 ~ 13%の60~70歳の方が加齢に伴って筋肉量および筋力が低下する疾患であり、2016年にWHOにて疾患として認定されている。筋線維には大きく分けて速筋と遅筋の2種類があり、持久力などには速筋が、瞬発力には遅筋が機能する。加齢に伴って女性では速筋の0.37%、男性は0.45%の萎縮が観察される(Tournadre et al., 2019)。これまで、サルコペニアに対する有効なモデルが存在しなかったが、研究代表者がHarvard Medical SchoolのDavid A. Sinclair研究室において開発を行っている(図1A)。DNA損傷をI-PpoIと呼ばれるエンドヌクレースによって短期間誘導することによって、エピゲノム変動依存的な老化様表現系が生じる(Hayano et al., 2019; Jae-Hyun et al., 2019)。ICEマウスは通常2年かかる老化誘導が5ヶ月に短縮することができ、サルコペニアの表現系である筋肉量低下と筋力低下を示す(図1B、C)。さらに、記憶力も3歳齢近くの生理的加齢マウスまで低下し、骨密度を含めた老化表現系が観察される(図1D、E)。これまでの研究成果から、ICEマウスや生理的加齢マウスにおいて炎症、脂質代謝に關与する遺伝子がFOXO1やCTCFといった転写因子によって脱制御を受けることが老化誘導の原因であることが示されている。ICEマウスを用いることによって、老化の表現系の再現、実験速度の促進、さらには老齡マウスおよびICEマウスの培養細胞を用いた老化制御薬のスクリーニング系の確立が期待される。既にICEマウスの培養細胞系は確立されており、筋肉同様FOXO1やCTCFがストレスへの脆弱性において重要な因子であることを報告している(Hayano et al., 2019; Jae-Hyun et al., 2019)。

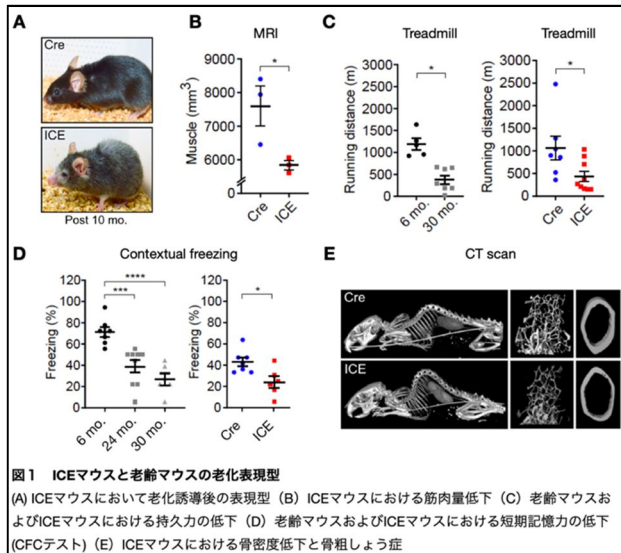


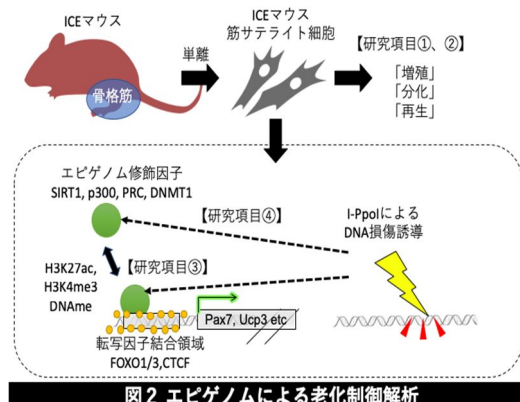
図1 ICEマウスと老齡マウスの老化表現型 (A) ICEマウスにおける老化誘導後の表現型 (B) ICEマウスにおける筋肉量低下 (C) 老齡マウスおよびICEマウスにおける持久力の低下 (D) 老齡マウスおよびICEマウスにおける短期記憶力の低下 (E) ICEマウスにおける骨密度低下と骨粗しょう症

2. 研究の目的

本研究では老化において重要な「増殖」、「分化」、「再生」におけるエピゲノムの機能と分子制御に着目し、細胞の単離と機能解析が可能な筋サテライト細胞に焦点を絞る。特に先行研究から、老化誘導によってICEマウスの筋力の低下やミトコンドリア機能異常、そしてFOXO1/3やCTCF転写因子結合領域におけるH3K27acの変化が観察されている。そのため、これらのエピゲノム制御領域および、Pax3, Pax7, MyoDなど骨格筋幹細胞の機能制御遺伝子に着目する。ライフコースにおいて生じる外的ストレスが、どのようにエピゲノムに記憶され、細胞や臓器機能に長期的影響を与えるのか、その分子機構の基盤を明らかにする。そしてエピゲノム編集によって細胞や組織における遺伝子制御および機能の回復が可能か、「老化の可逆性」について検討する。

3. 研究の方法

4~6ヶ月齢Cre(コントロール)およびICEマウスにおいて3週間のタモキシフェン含有餌を与えることでDNA損傷および老化を誘導する。その後、1ヶ月後および5ヶ月後において腓腹筋のサンプルを回収し、Pax7, Lamin, DAPIの三重染色によって筋サテライト細胞の数を定量する。さらに、ICEマウスにおいて老化誘導し、ICEマウスから単離した筋サテライト細胞においてこれらのFOXO1/3, CTCF結合領域におけるH3K27acレベルを、クロマチン免疫沈降法(ChIP)を用いて解析する。筋サテライト細胞の増殖、分化、再生に重要なPax7, MyoD, Cdk2, Notch signalingなどの遺伝子領域のプロモーター領域に焦点を当て、これまで老化との関連が報告されているH3K4me3, H3K9me3, H3K56ac, H3K27ac, H3K27me3, さらにDNA methylationなどのエピゲノム修飾とSIRT6, p300, PRC complex, DNMT1などのエピゲノム修飾因子の結合をクロマチン免疫沈降法で解析する(図2)。



4. 研究成果

「外的ストレス」をどのようにして「エピゲノム」が記憶し「老化速度」や疾患を制御しているのか、生後獲得されるアナログな老化制御について解析を行うため、ICEマウスにお

る I-Ppol 誘導を介した老化の加速と、筋力と持久力の測定を行なった。その結果、DNA 損傷を誘導して 10 か月後に Treadmill における筋力の低下が認められた。また、この ICE マウスの筋肉組織を用いて、Pax7 と呼ばれる筋サテライト細胞のバイオマーカーの染色を行なった。筋サテライト細胞は加齢とともに減少し、筋肉の損傷からの再生が低下することが知られているが、ICE マウスにおいて DNA 損傷依存的な老化誘導によって、Pax7 陽性細胞が減少していることが明らかになった。また、筋肉組織としての RNA-seq による遺伝子解析から Pax7 の遺伝子発現量が低下し、Myh9 や Myl4 などの筋萎縮に関連する遺伝子発現が ICE マウスにおいて変化していることが明らかになった。さらに、遺伝子発現だけでなく Ttn、Tnnt3、Neb など筋形成に重要な遺伝子の mRNA スプライシングが老化に伴って減少するだけでなく、ICE マウスの筋肉でスプライシング異常が生じていることが確認された。このことは、DNA 損傷が多様な幹細胞制御に老化において関わっていることを示している。

研究計画において筋サテライト細胞の数や機能に着目し、そのエピゲノム変化の解析を行う予定であったが、遺伝子解析結果から老化誘導に伴うジストロフィー関連遺伝子の変化が観察されたことから、希少疾患と老化の共通する分子機序に着目した。さらに、RNA スプライシング解析から筋肉特異的遺伝子である Ttn、Tnnt3、Neb に自然老化マウスと ICE マウスにてスプライシング異常が観察されている。RNA スプライシング異常は ALS など疾患との相関が知られており、標的とした治療薬開発が進められているが、老化との関係が不明である。今後、エピゲノムを標的とした解析を進めるとともに、スプライシング異常とサルコペニアの関連について分子機序を解析することで、治療薬の開発にも繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Hayano M, Yang J, Bonkowski S M, Amorim A J, Ross M J, Coppotelli G, Sedivy M John, Murphy F George, Oberdoerffer P, Ksander R Bruce, Rajman A Luis A, Sinclair A D | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 DNA Break-Induced Epigenetic Drift as a Cause of Mammalian Aging | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/808659 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Jae-Hyun, Griffin T Patrick, Vera L Daniel L, Apostolides K John K, Hayano M, Meer V M, Salfati L Elias, Oberdoerffer P, Shankland J Stuart, Gladyshev N Vadim, Rajman A L, Pfenning R A, Sinclair A D | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Erosion of the Epigenetic Landscape and Loss of Cellular Identity as a Cause of Aging in Mammals | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/808642 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 早野 元詞 |
| 2. 発表標題 老化を誘導する DNA 損傷によるエピゲノム自己同一性破綻 |
| 3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Motoshi Hayano |
| 2. 発表標題 Epigenetic identify driven by DNA damage induces aging |
| 3. 学会等名 19th HFSP Awardees Meeting（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 早野 元詞 |
| 2. 発表標題 DNA損傷依存的エピゲノム変化による老化誘導と 身体機能低下の分子機構 |
| 3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Motoshi Hayano |
| 2. 発表標題 Epigenetic changes driven by DNA damage induce aging |
| 3. 学会等名 The 10th APRU Population Aging Conference（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 早野 元詞 |
| 2. 発表標題 超高齢社会における医療とヘルスケア |
| 3. 学会等名 日米医療機器イノベーションフォーラム（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 早野元詞 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 株式会社 北隆館 | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 月刊「細胞」クロマチンによる外的環境記憶と老化速度制御機構 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 早野元詞 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 (有)科学評論社 | 5. 総ページ数 6 |
| 3. 書名 後天的DNA損傷がエピゲノムを介して決定する老化速度と、老化治療薬プラットフォーム DNA損傷は記憶され、健康寿命を決定する | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|