

機関番号：82674

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590389

研究課題名 (和文) ウェルナーヘリカーゼのもつ抗老化・抗がん化作用の解析：テロメア安定化の観点から

研究課題名 (英文) Analyses of Werner helicase functions: From the viewpoint of its telomere stabilization

研究代表者

石川 直 (ISHIKAWA NAOSHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究員

研究者番号：30184485

研究成果の概要 (和文)：ウェルナー症候群 (WS) 患者皮膚および骨格筋組織を収集し Southern blot 法によりテロメア長を解析した。WS 患者皮膚組織において、30 歳代以降、正常人群と比べテロメア長が急速に短縮 (25 歳相当) すること、また、骨格筋組織では、WS 患者個体差が大きいものの、出生早期からテロメア長が有意に短縮していることを明らかにし、国際雑誌 (Aging, 2011) に報告した。これは WS 患者の *in vivo* でのテロメア長動態について世界初の報告であり、テロメア長短縮が WS 患者における若年での肉腫発症および中年以降の癌腫発生に関与することを統計学的に示した最初の報告である。

研究成果の概要 (英文)：we measured terminal restriction fragment (TRF) lengths of 10 skin samples collected from extremities of 8 WS patients aged between 30 and 61 years that had been surgically amputated because of skin ulceration. Whereas the values of TRF length in younger WS patients (in their thirties) were within the normal range, those in older WS patients were markedly shorter relative to non-WS controls. Regression analyses indicated that the TRF length in WS was significantly shorter than that in controls ( $p < 0.001$ ). Furthermore, we found that TRF lengths in muscle adjacent to the examined epidermis were also significantly shorter than those of controls ( $p = 0.047$ ). These data demonstrate for the first time that *in vivo* telomere loss is accelerated in systemic organs of WS patients, suggesting that abnormal telomere erosion is one of the major causes of early onset of age-related symptoms and a predisposition to sarcoma and carcinoma in WS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：老化、がん化、ウェルナー症候群、テロメア

## 1. 研究開始当初の背景：

ウェルナー症候群 (WS) はほぼ正常に性成熟に達した後種々の老化現象が正常のほぼ二分の一の時間経過で発現してくることから、最も重要な老化モデルとされてきた。また、本疾患では染色体の不安定生が増していること、平均と異なる種類の悪性腫瘍 (肉腫) が若年で発症してくることが知られていた。1996 年 WS の責任遺伝子 (*WRN*) が単離され、DNA ヘリカーゼ活性をもつことが判明した。分子生物学的・分子遺伝学的解析の結果、WS は *WRN* 遺伝子のホモ不全 (殆どの症例で点突然変異による終止コドンの出現による短縮型異常タンパクの生成) により発症すること、種々のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスが作成され個体老化にウェルナーヘリカーゼが関与すること等々が明らかにされてきた。モデルマウスの系で、*Wrn* 遺伝子単独欠損では早老症症状は示さず、テロメアを短縮させた動物で *Wrn* 遺伝子を欠損させると早老症を発症することから (Chang et al. 2004)、テロメア短縮とウェルナーヘリカーゼの相互作用に注目が集まった。しかしながら、ウェルナーヘリカーゼはテロメア構造に存在することが報告されているものの、相互作用する分子は判明していない。また、ウェルナー症候群で平均と異なる種類の悪性腫瘍 (肉腫) が若年で発症してくる臓器特異的発がんの問題は全く説明されていなかった。

## 2. 研究の目的：

(1) WS 患者の *in vivo* でのテロメア動態を解析し、未だに議論の分かれる、WS でテロメア短縮が促進しているという説と個体差の範囲内である (*WRN* 遺伝子欠損はテロメア短縮に直接関与しない) との説に関して、

より詳細な解析を行い、最終結論を確定する。

(2) WS 患者由来の線維芽細胞株における *in vitro* テロメア動態を解析する。

## 3. 研究の方法：

(1) 難治性潰瘍のために手術をうけた WS 患者組織 (表皮組織、骨格筋組織) から、炎症部分を除いた組織を分離し、顕微鏡観察により変性のないことを確認し、構成細胞の定量を行った。標準法で DNA を抽出し、ゲノフィールド電気泳動にて quality check を行った。テロメア長に関しては、サザンブロット法で得られた Terminal restriction fragment (TRF) length データをテロメア長解析ソフトウェア (Telometric: Grant et al., 2001) を用い解析した。コントロール群との比較検討は、重回帰解析による統計解析を行った。

(2) ウェルナー症候群患者由来線維芽細胞の *in vitro* テロメア動態の解析。新たに獨協大・簗持教授から提供された *WRN* 欠損株については、遺伝子異型タイプの分析を行った (癌研病理石川部長に依頼し、TaqMan 法で遺伝子変異の解析を行う)。細胞老化に至る迄継代培養し、*in vitro* 増殖、形態変化等を観察した。

(3) Q-FISH 法により培養細胞の分裂中期細胞を PNA プローブで染色し、各 pq 腕のテロメアおよびセントロメアの蛍光量を蛍光顕微鏡下 CDC カメラで測定した。テロメアの蛍光量をサザンブロット法による TRF 長で校正し、一分子レベルのテロメア長の解析を行った。2方法を統合することにより、100bp レベルからのテロメア長の定量を試みた。

(仲村分担)

#### 4. 研究成果：

(1) 患者組織を表皮細胞、骨格筋細胞別に切除・トリミングし、各々のテロメア長を Southern blot 法により検出した TRF 長を、より客観的・再現性のあるソフトウェア Telometric を用いて算出し、種々の統計解析モデルを用いて WS 患者組織群とコントロール群との関係を、初期値・年齢・群間差異等について解析した。その結果、①WS 患者皮膚組織において TRF 長がコントロール群に比し有意に短縮していることが証明された ( $p < 0.001$ )。経時変化解析から、WS 患者群では 30 歳代以降、正常人群と比べテロメア長が急速に短縮 (25 歳相当) することを明らかにした (図 1)。

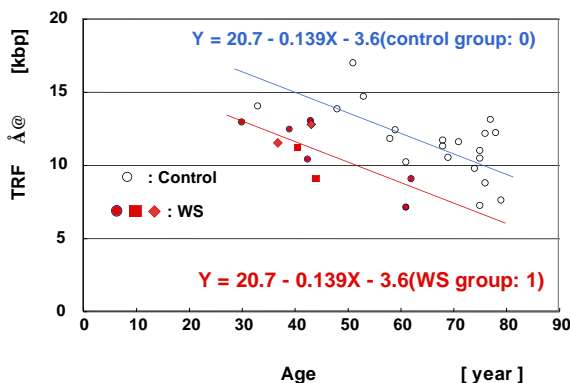
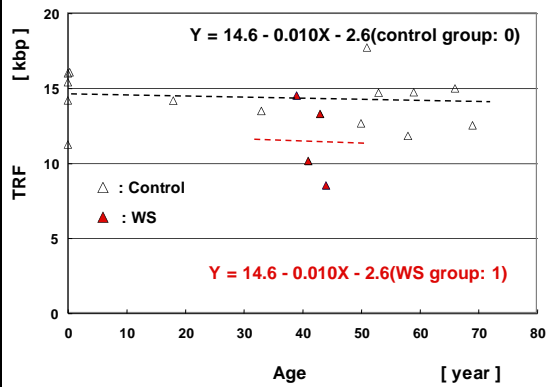


図 1：皮膚組織における TRF 長の年齢変化：WS 患者群対コントロール群の比較

② 一方、骨格筋組織では、出生後からの経年変化 (短縮) は上皮細胞に比し著しく小さいことが示された。WS 患者群とコントロール群間の差異は有意であった ( $p = 0.047$ )。WS 群でも個体差が大きいものの、出生早期からテロメア長が有意に短縮しているケースのあることが示唆された (図 2)。

図 2：骨格筋組織における TRF 長の年齢変化：WS 患者群対コントロール群の比較



これらの結果は国際雑誌 (Aging, 2011) に採択され、WS 患者の *in vivo* でのテロメア長動態について世界初の報告としてインパクトを与えた。また、WS においても各臓器・細胞においてテロメア長の個人差が大きいこと、臓器ごとのテロメア動態が大いに異なることが示唆された。また、本研究は、テロメア長短縮が WS 患者における若年での肉腫発症および中年以降の癌腫発生に關与することを統計学的に示した最初の報告としても特筆される

(2) 収集した WS 患者由来繊維芽細胞株を継代培養し、サザンブロット法による TRF 長解析、FISH 法による分子レベルでのテロメア長解析、サブテロメアプローブを用いた染色体組換え解析の結果、① WS 細胞株の最大継代数は、個体差は大きいものの、コントロール株に比し有意に小さく、またほぼ半数の株で培養早期から強い形態異常を示し継代培養がほとんどできなかった。② WS 細胞株のテロメア長は継代早期に細胞老化期パターンとなること、異常短縮テロメアの蓄積すること、また最大継代数の著明に低い株の細胞老化期に異常短縮テロメアの蓄積していた。③ サブテロメア領域において約二分の一の染色体で組換えを生じ、染色体組換えが異常に亢進することが判明した。(正常人由来繊維芽細胞では、同様の方法で組換えは殆

ど検出されない)。ウェルナーヘリカーゼ異常によるテロメア維持機構の破綻が本症発症の基盤の一つとなっていることが強く示唆された。

遺伝子変異型（1、4、5、6型）と上記の *in vitro* 細胞変化と有意の相関は今のところ見つかっていない。

著明な組換え亢進は、テロメア長が正常範囲に維持されたWS線維芽細胞でも認められ、*WRN*遺伝子の多機能性を示すものである。

#### 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6件)

① Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A, Kuroiwa M, Takubo K. Accelerated *in vivo* epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging*. 査読有、3, 2011, 417-429.

② Aida J, Yokoyama A, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Arai T, Takubo K. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *Journal of Pathology*. 査読有、223, 2011, 410-416.

① Takubo K, Aida J, Izumiyama N, Ishikawa N, Fujiwara M, Poon SSS, Kondo H, Kammori M, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Baird DM, Nakamura K. Chromosomal instability and telomere lengths of each chromosomal arm measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicative senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*. 査読有、131, 2010, 614-624.

② Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, Poon SS, Fujiwara

M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *European Journal of Cancer*. 査読有、46, 2010, 430-438.

⑤ Takubo K, Fujita M, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Grabsch H, Arai T, Aida J. Q-FISH analysis of telomere and chromosome instability in the oesophagus with and without squamous cell carcinoma *in situ*. *Journal of Pathology*. 査読有、221, 2010, 201-209.

⑥ Hatakeyama H, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Ishii A, Tsuchida S, Takubo K, Ishikawa N. The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite considerable telomerase activity throughout life. *Mechanisms of Ageing and Development*. 査読有、129, 2008, 550-557.

[学会発表] (計2件)

① 石川直、仲村賢一、下村七生貴、相田順子、田久保海誉、ヒト下垂体のテロメア長の動態統計解析

-下垂体テロメア長はよく保存され、最短テロメア長は寿命と正相関する-、第33回日本基礎老化学会、2010年6月18日、名古屋大学・野依記念学術交流館

② 石川直、仲村賢一、他・名、ウェルナー遺伝子欠損は *in vivo* および *in vitro* でテロメア長を短縮させる。第98回日本病理学会総会、2009年5月2日、国立京都国際会館

[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：

<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 直 (ISHIKAWA NAOSHI )

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究員

研究者番号：30184485

### (2) 研究分担者

仲村 賢一 (NAKAMURA KEN-ICHI)

(2008年度のみ)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究員

研究者番号：60159069

### (3) 連携研究者

田久保 海誉 (TAKUBO KAIYO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究部長

研究者番号：00154956

仲村 賢一 (NAKAMURA KEN-ICHI)

(2009-10年度)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究員

研究者番号：60159069