

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：63801  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26640126  
研究課題名(和文) 高深度シーケンシングによる百十歳以上長寿者のミトコンドリアDNA体細胞変異率決定  
  
研究課題名(英文) Gene regulatory network of supercentenarians reveals resilience against hypoxia stress  
  
研究代表者  
井ノ上 逸朗 (Inoue, Ituro)  
  
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授  
  
研究者番号：00192500  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：超長寿者は遺伝要因、生活習慣などの要因で長寿となっていると考えられる。これまでさまざまな研究がなされてきたものの、超長寿の要因は未だ不明とされている。老化メカニズムについて多数の仮説が提唱されており、その一つが『ミトコンドリア異常説』である。ミトコンドリアは細胞小器官でありエネルギー産生を司り、同時に細胞毒性を持つスーパーオキシドも産生することが知られている。すなわち老化との関連が示唆され、長寿ではレジスタンスの存在が示唆される。本研究ではミトコンドリアDNA配列決定により超長寿者に特徴的な遺伝子多型の検出を試みた。結論としては、超長寿者に特徴的な遺伝子変異は検出できていない。

研究成果の概要(英文)：Supercentenarians (SC, ages 110-119 years) are individuals who exhibit exceptional longevity (EL). EL is rare and is thought to be a combined influence of environmental and genetic factors, where genetic contribution is approximately 20-30%. It is likely that the molecular mechanisms of EL are shared with those of healthy aging - being free of age-related diseases and functionally independent in daily life activities. To explore the genetic contributions of SC, we utilized RNA sequencing and iPSC technology to differentiate gene expression profiles of SC from the control (CTRL) subjects in the hypoxia condition. iPSC-EC from SC has the following characteristics: (1) a more robust stress response mechanism; (2) responds faster in the presence of stress; (3) shows resilience to stress; (4) and exhibits transcriptional stability. These characteristics might contribute to exceptional longevity.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：超長寿者 ミトコンドリア変異 次世代シーケンサー ヒトゲノム配列再解析

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は長寿国であり、男女とも平均寿命は世界のトップレベルにある。そのため、100歳以上の長寿者は多く、特に110歳以上の超長寿者も数多く存在する。本研究は超長寿者の長寿の要因を探索する研究として始めた。

長寿者のゲノム全域アソシエーション・スタディにより ApoE に有意差を有する SNP が同定されているものの、他には強い遺伝的要因が検出されていない。ApoE は高脂血症やアルツハイマーの関連する遺伝子で長寿との遺伝的関連はあるものの機能的な関与についてはあきらかになっていない。また慶應義塾大学の広瀬先生は24人の全ゲノム配列決定をおこなった。全ゲノム配列決定なので多くの多型が検出されるものの、長寿を特徴づける際立った遺伝子多型、変異は得ていない。総合的に考察すると長寿を規定する遺伝的要因には強いものはないと推測される。そこで、逆説的に老化メカニズムに注目した。老化メカニズムについて多数の仮説が提唱されており、その一つが『ミトコンドリア異常説』である。ミトコンドリアは細胞の発電所と呼ばれる細胞小器官であり、エネルギー産生を司る、同時に細胞毒性を持つスーパーオキシドも産生することが知られている。スーパーオキシドは老化に直接関与すると考えられている。ヒト mtDNA は 16,569 塩基対の閉鎖環状 DNA で、2 種類の rRNA 遺伝子、22 種類の tRNA 遺伝子、電子伝達系に関わる 13 種類のタンパク質コード遺伝子が存在する。

次世代シーケンサーの開発により、膨大な量の塩基配列情報が比較的簡便に得ることができるようになった。超深度の解析も可能となり、ミトコンドリアのヘテロプラスミーの検出も可能である。

### 2. 研究の目的

本研究は、元来は超長寿者の長寿における要因の特定であるが、さまざまな遺伝解析では特徴的な遺伝的要因を検出するにはいたっていない。おそらく遺伝的要因は存在していても弱い効果しかないと推測される。そこで長寿と相反する現象として老化に注目した。

『長寿者では mtDNA の体細胞変異の蓄積が一般的な高齢者に比べて少なく、エネルギー産生能が損なわれておらず、活性酸素産生による細胞障害が少ないため、生体システムが加齢に伴う老化現象に対して頑健性を維持している』という仮説に基づき、新生児から110歳以上の超長寿者まで、各年齢層での mtDNA 体細胞変異蓄積について次世代シーケンサーを用いて検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、シーケンスキャパシティーを考慮して20例の超長寿者を mtDNA シーケ

ンスに用いる。対照群として新生児、20歳未満、40歳未満、60歳未満、80歳未満、80歳以上100歳未満の年齢層ごとに20例の検体を研究に用いる。

核DNAの混入を避けるため、mtDNA エキストラクターCTキット(和光純薬工業)により高純度の mtDNA を 100 - 500ng 抽出する。核DNAは別個に精製する。

変異スペクトラム(トランジション対トランスバージョンの比率)、アミノ酸置換を伴う有害変異蓄積などにおける長寿者固有の特性を検出する。mtDNA に de novo に生じたサブクローナルな体細胞変異を同定するためには、超高深度シーケンスが必要であり、その実験・解析手法の確立を行った。

また、超長寿者の末梢血 T 細胞から iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞まで分化する系を確立している(慶應義塾大学百寿研究センター新井先生からの供与)。それらに低酸素負荷を与え、対照から得た iPS 細胞との比較をおこなった。特に RNA 発現解析で検討している。RNA 発現は cDNA ライブラリー調整後、HiSeq2500 (illumina) で配列決定し、リードクリーニング後、TopHat-Cuffdiff でマッピングしている。遺伝子発現量は fragment per kilobase of transcript per RNA-seq reads mapped (FPKM) で示している。

### 4. 研究成果

20人の超長寿者のミトコンドリア DNA を MiSeq で解析したところ、長寿者に特徴的な塩基変異を認めなかった。ミトコンドリアにはヘテロプラスミーが存在する可能性があり、読み取りの深度が足りなかった可能性もありさらに検討中である。

超長寿者を遺伝子発現プロファイルから特徴づけるため、超長寿者の末梢血 T 細胞から iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化させ、対照者からの iPS 細胞と RNA sequencing で RNA 発現を比較した。

GO Term	Count	%	P-Value
<b>Downregulated genes in SC, n=171</b>			
M phase	13	8.07	5.70E-05
cell adhesion	19	11.80	8.30E-05
biological adhesion	19	11.80	8.46E-05
cell cycle phase	14	8.70	1.27E-04
phosphoinositide-mediated signaling	7	4.35	1.68E-04
mitosis	10	6.21	2.15E-04
nuclear division	10	6.21	2.15E-04
M phase of mitotic cell cycle	10	6.21	2.45E-04
organelle fission	10	6.21	2.89E-04
cell cycle process	15	9.32	7.78E-04
<b>Upregulated genes in SC, n=299</b>			
response to virus	19	6.51	1.54E-13
immune response	41	14.04	1.82E-12
defense response	30	10.27	2.64E-07
response to wounding	27	9.25	5.43E-07
response to organic substance	32	10.96	7.35E-07
innate immune response	13	4.45	2.67E-06
response to lipopolysaccharide	9	3.08	3.57E-05
cell adhesion	27	9.25	7.70E-05
biological adhesion	27	9.25	7.88E-05
response to molecule of bacterial origin	9	3.08	7.94E-05

Table. Top 10 gene ontology (GO) terms of the downregulated and upregulated genes in CTRL\_NULL vs. SC\_NULL.

内皮細胞に分化させた段階では超長寿者由来内皮細胞と対照由来内皮細胞の間に特に

大きな違いは認めていないが、これらを低酸素状態においたところ、超長寿者からの内皮細胞は形態上低酸素刺激に対して抵抗性を示した。そこで、網羅的遺伝子発現を検討し、対照（40 - 60 歳）と比較し、ストレスに対して遺伝子発現変化が小さいことが示され、低酸素刺激に対してレジリエントであると結論付けられた。

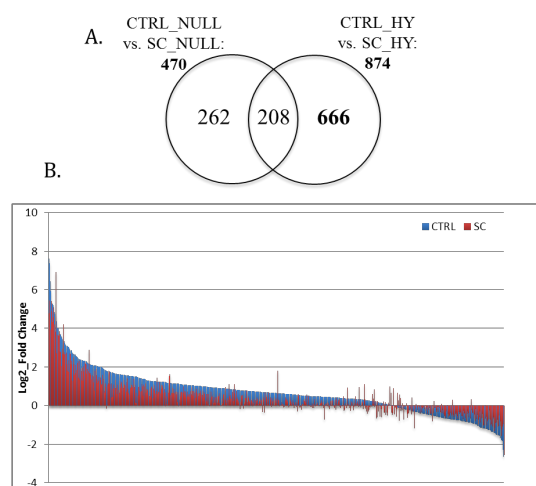


Figure. Differentially expressed genes (DEGs): (A) 666 significant exclusive for CTRL\_HY vs. SC\_HY, (B) change in gene expression ( $\log_2$  fold-change) of the 666 DEGs before and after hypoxia treatment.

低酸素刺激に反応しないということが、どのように長寿とつながるかは不明であるが、通常のネズミの 10 倍ほどの寿命であるハダカデバネズミでも同様の観察がなされていることはとても興味深い。すなわち、刺激に対して反応しないこと、が長寿と関係しているのかもしれない。4、8、16 時間という時系列で検討すると、低酸素刺激に対して超長寿者由来 iPS 細胞の方が早く反応していた。現時点で考察はできないが、今後の検討課題であろう。

低酸素ストレスにより発現上昇を認めた遺伝子群はウィルス反応や免疫反応に関与する遺伝子群であり、防御反応との関連が示唆される。これらも対照群の方が大きい変化を示していた。

今後ゲノム解析を通じ、長寿に関する全体像をさらに明らかにしていく必要がある。

## 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 8 件)

1. Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer WH, Yoshihara K, Yamamoto A, Kurose K, Enomoto T, Akira S, Hosomichi K, Inoue I. Allelic imbalance in regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus. *PLoS Genet* e1005893, 2016. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pgen.1005893

2. Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, Takahashi A, Nakamura T, Nakashima H, Takada Y, Danjoh I, Shimizu S, Abe J, Kawamura Y, Terashige S, Ogata H, Tatsukawa S, Yin G, Okada R, Morita E, Naito M, Tokumasu A, Onoue H, Iwaya K, Ito T, Takada T, Inoue K, Kato Y, Nakamura Y, Sakurai Y, Suzuki H, Kanai Y, Hosoya T, Hamajima N, Inoue I, Kubo M, Ichida K, Ooyama H, Shimizu T, Shinomiya N. Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann Rheum Dis* 75, 652-659, 2016. 査読有  
DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206191

3. Tamura R, Yoshihara K, Yamawaki K, Suda K, Ishiguro T, Adachi S, Okuda S, Inoue I, Verhaak RG, Enomoto T. Novel kinase transcripts found in endometrial cancer. *Sci Rep* 5, 18657, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/srep18657

4. Hayano T, Yamada S, Hosomichi K, Nakaoka H, Yoshihara K, Adachi S, Kashima K, Tanaka K, Enomoto T, Inoue I. Identification of novel exonic mobile element insertions in epithelial ovarian cancers. *Hum Genome Variation* 2, 15030, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/hgv.2015.30

5. Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, Inoue I. The impact of next-generation sequencing technologies of HLA research. *J Hum Genet* 60, 665-673, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/jhg.2015.102

6. Nakaoka H, Inoue I. Distribution of HLA haplotypes across Japanese archipelago: similarity, difference and admixture. *J Hum Genet* 60, 683-690, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/jhg.2015.90

7. Jinam TA, Kanzawa-Kiriyama H, Inoue I, Tokunaga K, Omoto K, Saitou N. Unique characteristics of the Ainu population Northern Japan. *J Hum Genet* 60, 565-571, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/jhg.2015.79

8. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Honma Y, Oka A, Shiina T, Inoko H, Inoue I. Aggregation of rare/low-frequency variants of the mitochondria respiratory chain-related proteins in rheumatoid arthritis patients. *J Hum Genet* 60, 449-454, 2015.  
査読有  
DOI: 10.1038/jhg.2015.50

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Cristine R. Casingal  
“ RNA sequencing reveals stress responses of iPSC-derived endothelial cells isolated from peripheral blood mononuclear cells of supercentenarians ”  
The 13th International Congress of Human Genetics, Apr 7, 2016  
Kyoto International Conference Center  
(Kyoto, Japan)

〔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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井ノ上 逸朗 (INOUE, Ituro)  
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授  
研究者番号：00192500

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし

## (4)研究協力者

広瀬 信義 (HIROSE, Nobuyoshi)  
新井 康通 (ARAI, Yasumichi)  
Cristine R. Casingal