

令和元年6月24日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08414

研究課題名(和文) テロメア長を調節する分子機構の解明：iPS化のリプログラム現象を解析に活用して

研究課題名(英文) Molecular mechanism of telomere length regulation: Lesson from reprogramming of iPS cells

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)・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト線維芽細胞およびそれ由来のiPSCを染色体Q-FISH法により解析し、iPSCのテロメア長には細胞間(inter-cell)および染色体間(intra-cell)でも大きな幅があるものの、iPS化に伴い由来細胞と比し平均値(中央値)は有意に増大し、リプログラムによってテロメア長伸長が起こることが確認出来た。また、iPSCテロメア値は新生児値に相当すること、細胞老化期に高度の短縮を示すテロメアがリプログラム時に平均以上に伸長すること(テロメア長補正機構を示唆)、テロメア長はTERT活性亢進のみならずトリミング活性により染色体毎に巧妙に調節されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト正常2倍体細胞(線維芽細胞)の最初期から老化期に渡るテロメア長の“lifelong”プロファイルを明らかにすることはテロメア生物学に留まらず加齢科学の根幹の解明に資すると考えられる。本研究では、ヒト線維芽細胞およびそれ由来のiPSCを染色体Q-FISH法により解析し、iPSCのテロメア長には細胞間および同一細胞内の染色体間でも大きな幅があるものの、iPS化に伴い由来細胞と比し平均値(中央値)は有意に増大し、リプログラムによってテロメア長伸長が起こることが確認出来た。以上の結果から、テロメア長はTERT活性亢進のみならずトリミング活性により染色体毎に巧妙に調節されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate “lifelong” telomere dynamics at chromosomal level must contribute to clarify not only telomere biology but human aging process. We have analyzed sets of parental strains and derived iPSCs. Telomere lengths have been reported to be elongated in induced pluripotent stem cells (iPSC) during their reprogramming process. However, the precise profiles of the telomere lengthen at chromosomal level have largely remain to be solved. We analyzed telomere lengths by metaphase quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) method, and found that the telomere lengths in iPSCs seem to be reflected neonatal state, and the telomere dynamics (lengthen or shorten) during the sequential subculture of human diploid fibroblast strains (TIG series) were different among each chromosome end. Frequencies of chromosomal instability (TAS) occurring differ among strains. The donor age of the cell strains was suggested to contribute the difference.

研究分野：分子細胞生物学、基礎老化学

キーワード：テロメア iPSC細胞 リプログラム 染色体Q-FISH 細胞老化 染色体特異性 ヒト線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

数少ない老化マーカーとしてテロメア長(短縮)が有用であるとされる。私達は全身臓器のテロメア長が個体特異的であること、細胞株間でテロメア長や短縮率に差異のあること、特異的染色体の癒合が起こること等を解明してきたが、それらが生じる機序の詳細は未解明である。

世界的な先進ラボにおいて、テロメア維持に関与する遺伝子(伸長因子のテロメラゼ複合体やその関連分子、トリミング因子である種々のエンドヌクレアーゼとその関連分子、調節因子として作用する Shelterin 複合体構成分子)の解析も進められているが、いずれも限られた細胞(株)を対象とした研究で、ヒトテロメア長や短縮率の個体差/細胞(株)間相違の生ずる原因またそれらとテロメア機能不全(細胞老化や癌化に繋がる)の因果関係の全体像は未解明であった(現在も基本的には同様の状況である)。

私達は、これまでに、正常ヒト線維芽細胞を細胞老化に至るまで培養し、初代培養細胞(メタフェーズ)の染色体別テロメア長短縮と染色体融合との相関を解析し、株特異的テロメア短縮と染色体融合の関連を解明した(Takubo et al. 2010)。このデータが今回の計画を立案する上で重要な契機となった。また、私たちはこれ迄に、MRC-5 細胞株とそれ由来の iPSC (国立成育医療研究センター樹立)の比較を行い、染色体ごとでテロメア長の伸長が異なることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、多種類のヒト培養細胞(iPS 細胞株を含む)を対象とした分子レベル(染色体毎)でのテロメア長とテロメア維持に関与する複雑な遺伝子群発現との比較解析を通して、テロメア構造維持の恒常性が破綻し機能不全に陥る原因解明を目指した。

正常ヒト線維芽細胞株(TIG series 7 株)において、テロメア短縮による染色体癒合の発現頻度とテロメア動態との相関について 最短テロメア長とサブテロメア長との総体がテロメア機能に重要であること、株間差のある PDL あたりのテロメア短縮率とテロメア不全(染色体癒合: Telomere association) 発現率に正相関のあることが強く示唆された。

幹細胞の維持は生体の維持あるいは若さを保つことと通ずる。テロメア長は幹細胞で保持されることが推測されているが、その本態は未解明な点が多い。山中 4 因子の導入により樹立される induced pluripotent stem cell (iPSC)は幹細胞としての性格を持つ。その遺伝子情報のリプログラミング過程において、テロメアが伸長することがよく知られている。しかし、その動態については不明の点が多く残され、特に染色体別の解析は殆ど報告されていない。私共はこれまで iPSC のテロメア定量を行い、テロメア長が維持されることは iPSC の品質評価に有用であること等を報告してきた(Terai et al., 2013)。

3. 研究の方法

習熟している Southern blot 法、ペプチド核酸プローブに用いた Q-FISH 法に用いた解析を援用しテロメア動態(伸長と短縮)を染色体ごとに解析し、株観の相違および共通性を明らかにする。

京都大学 iPS 研究所で樹立された iPSC 細胞株中にすでに私達がテロメア長を解析している株が国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の細胞バンクに寄託されていたことから、3 種: TIG-120 株(6 歳女性皮膚由来線維芽細胞株) TIG-114 株(36 歳男性皮膚由来線維芽細胞株), TIG-107 株(81 歳女性皮膚由来線維芽細胞株)を入手した。これらのテロメア長と以前私達が解析した親株のテロメア長の比較検討を行った。

4. 研究成果

テロメア光度には細胞(核板)間(inter-cell)および同一細胞内染色体間(intra-cell)で大きな幅があるものの、iPS 化に伴い増大し、リプログラムによってすべての染色体末端でテロメア長延長が起こることが示された。iPSC テロメア値は新生児値に相当することが示された。一方、すべての染色体末端でテロメア長延長が起こることが示されたが、細胞老化期に著明な短縮を示す(特定の染色体末端)テロメアがリプログラム時により高度に伸長する傾向を示す現象見いだした(リプログラミングはテロメア短縮を補正する)(論文作成中)。

株間で絶対普遍的な染色体特異性ルールは確定できなかったものの、テロメア長の動態を基準として複数の細胞株で; 1) 細胞老化期に著明なテロメア短縮を示し、リプログラムにより平均値以上の伸長を示す染色体グループ(還元すると、テロメア短縮率の高い染色体、eg. #9p, 16p, 22q, Yq) 2) テロメア長順位の大きな変動のないグループ(平均的テロメア短縮を示す、eg. 14p, 21, Yq) 3) iPSC と老化期でテロメア長の変化の極めて小さいグループ(あるいは、リプログラムによって伸長しないテロメアを有する染色体が、少数ながら存在する。)(e.g. 2p, 3p, 8q, 10q, Yp) が認められた。テロメア動態(特に早期)解明のため iPSC が有用であることが示された。これらの結果は、今回の研究期間ではその分子基盤の解明までは至らなかったものの、テロメア長は TERT 活性亢進のみならずトリミング活性により染色体毎に巧妙に調節されることが示唆する、ユニークで貴重な基礎データを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

1. Hiraishi N, Terai M, Fujiwara M, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Tomita K, Matsuda Y, Arai T, Takubo K, Ishiwata T. Quantitative fluorescence in situ hybridization for investigation of telomere length dynamics in the pituitary gland using samples from 128 autopsied patients. *Tissue Cell*. 2018 Aug;53:1-7. doi: 10.1016/j.tice.2018.05.008. PMID:30060819 (原著、査読あり)
2. Tomita K, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Nakamura KI, Ishikawa N, Matsuda Y, Arai T, Ishiwata T, Kumasaka T, Takahashi-Fujigasaki J, Hiraishi N, Yamada M, Fujiwara M, Takubo K. Changes in telomere length with aging in human neurons and glial cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization analysis. *Geriatr Gerontol Int*. 2018 Oct;18(10):1507-1512. doi: 10.1111/ggi.13500. PMID: 30095207
3. Aoki Y, Aida J, Kawano Y, Nakamura KI, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Nakamura Y, Taniai N, Uchida E, Takubo K, Ishiwata T. Telomere length of gallbladder epithelium is shortened in patients with congenital biliary dilatation: measurement by quantitative fluorescence in situ hybridization. *J Gastroenterol*. 2018 Feb;53(2):291-301. doi: 10.1007/s00535-017-1411-5. (原著、査読あり)
4. 石川直, 相田順子, 田久保海誉, 松田陽子, 新井富生, 石渡俊行. テロメア短縮と老化および高齢者に好発する疾患との関連. *病理と臨床* 2018 36(2): 102 -109 2018 (総説、査読なし)
5. Tamura Y, Izumiya-Shimomura N, Kimbara Y, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J, Chiba Y, Matsuda Y, Mori S, Arai T, Fujiwara M, Poon SSS, Ishizaki T, Araki A, Takubo K, Ito H. Telomere attrition in beta and alpha cells with age. *Age* (査読あり) Jun; 38(3):61, 2016.
6. Hatakeyama H, Yamazaki H, Nakamura K, Izumiya Shimomura N, Aida J, Suzuki H, Tsuchida S, Matsuura M, Takubo K, and Ishikawa N. Telomere attrition and restoration in the normal teleost *Oryzias latipes* are linked to growth rate and telomerase activity at each life stage. *AGING*, (査読あり) 2016; 1-15
7. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Matsuda Y, Arai T, Takubo K. *Geriatr Gerontol Int* (査読あり) 2016; 16 (Suppl.1): 30-42.

〔学会発表〕(計 3件)

1. Naoshi ISHIKAWA, Ken-ichi Nakamura, Junko AIDA, Kaiyo TAKUBO, Masashi TOYODA, Toshiyuki ISHIWATA
Telomere dynamics during “lifelong” culture of human diploid cell strains at chromosome level: Lesson from iPS cells. 第107回日本病理学会、札幌、2018.6.21-23
2. Naoshi ISHIKAWA, Masashi TOYODA, Junko AIDA, Toshiyuki ISHIWATA
Telomere dynamics of human diploid cell strains at chromosome level: Lesson from iPS cells (Second report). 第41回日本基礎老化学会大会、東京(東京理科大学葛飾キャンパス)、2018. 5.31-6.2
3. Naoshi ISHIKAWA, Masashi TOYODA, Toshiyuki ISHIWATA. Telomere dynamics during “lifelong” culture of human diploid cell strains at chromosome level: Lesson from iPS cells. 第40回日本基礎老化学会大会. 名古屋. 2017. 6. 16

〔その他〕

ホームページ等

研究チームのホームページ: <http://www.ttaggg-rtgp.org/>

6. 研究組織

(1)研究分担者: なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：仲村 賢一

ローマ字氏名：Nakamura Ken-ichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。