

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16540

研究課題名(和文) 脂肪組織の老化に特異的なlncRNAの同定と発現制御による糖尿病態からの回復

研究課題名(英文) Identification of lncRNAs specific for aging of adipose tissue and recovery from diabetic conditions by regulation of their expression

研究代表者

岩下 雄二 (Iwashita, Yuji)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70730406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質に翻訳されないlong non-coding RNA(lncRNA)が、老化による組織機能の低下や病態への移行にどのようなかたちで関連しているかを明らかにするため、若年期、中年期、老年期のマウスの、内臓脂肪と皮下脂肪組織の遺伝子発現変化を、マイクロアレイを用いて比較した結果、細胞老化や慢性炎症に関連するタンパク質に加え、新規の老化関連lncRNAが、月齢特異的に発現変化していた。これらのlncRNAの発現抑制により、他の老化関連タンパク質の発現低下や細胞数の減少が見られたことから、老化関連lncRNAが老化細胞の維持に必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal how the long non-coding RNAs (lncRNAs) that are not translated into proteins are associated with tissue dysfunction and pathogenesis during aging, difference of gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue were compared between young, middle-aged and old mouse by microarray analysis. In addition to proteins related to cellular senescence and chronic inflammation, novel senescence-associated lncRNAs were differentially expressed in an age-dependent manner. By inhibition of expression of these genes, expression of other marker proteins in aging were altered and reduction of cell numbers were observed. These results suggest that senescence-associated lncRNAs are required for maintenance of senescent cells.

研究分野：老化のシステム生命科学

キーワード：分子生物学 老化 脂肪 マイクロアレイ lncRNA siRNA shRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) lncRNA は、超並列型 DNA シークエンサーにより可能となった、ゲノムワイドな転写物・クロマチン状態の測定により見出された新しいタイプの遺伝子で、タンパク質をコードしていない 200 bp 以上の RNA と定義される。2014 年 6 月の時点で、タンパク質に翻訳される遺伝子の数がヒトで 19881 種であるのに対し、lncRNA は 15877 種が存在するとされていた(GENCODE version 21)。ヒトゲノム計画の後継として、アメリカの NHGRI が主導して行った ENCYCLOPEDIA OF DNA ELEMENTS (ENCODE) プロジェクトにおいても、lncRNA の存在と重要性が強調されるなど、大量の lncRNA の発見により、ribosomal RNA や transfer RNA のような一部の RNA のみが機能分子であるという、これまでの誤った認識を正し、すべての生命現象を lncRNA とタンパク質を含むかたちで再構成する試みが、多くの分野で行われつつある。すでに、lncRNA が組織特異的・病態特異的に発現し、転写・翻訳・タンパク質間結合の制御を含む様々なプロセスを通して分子機能に影響を与えることが示されている。lncRNA 機能の破綻は病気の原因になることも示唆され、がんや糖尿病などの生活習慣病の原因遺伝子を探るゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果、病気と関連する遺伝子多型がタンパク質をコードしないイントロンや遺伝子間領域にある場合が 88%を占めるといった報告もあり、それらの領域に存在する lncRNA の研究が病気の新たな遺伝的背景の解明につながると期待されている。

(2) 糖尿病には I 型と II 型があり、I 型ではすい臓の細胞のインスリン分泌の欠如、II 型では細胞によるインスリン分泌の低下に加え、インスリンを受容する骨格筋・肝臓・脂肪のインスリン抵抗性が主な原因と考えられている。近年、日本の糖尿病の 95%を占める II 型糖尿病の原因として、肥満等により肥大化した脂肪細胞が細胞老化を起し、慢性炎症を経て分泌された TNF- α などの悪玉アディポカインが、血流を通して骨格筋等に作用し、インスリン抵抗性の獲得に加担していることが注目を集めている。

(3) 老化による組織機能の低下や、それに伴う病態への移行に lncRNA がどのようなかたちで関連しているか、未だ検証された例は少ない。これまで行われた老化組織の遺伝子発現プロファイルとして、AGEMAP などがあるが、使用されたアレイでは 8,932 個のタンパク質をコードする遺伝子しか計測できず、本研究が主題とする lncRNA に至っては全く計測されていない。また、糖尿病の lncRNA 研究として、インスリンを分泌する細胞が豊富に含まれるランゲルハンス島に特異的に発現する lncRNA の同定が試みられ、その内のいくつかは糖尿病でも発現が

変化することから、lncRNA をターゲットとする病態の解明という戦略の有効性が示されているが、日本人の糖尿病の 95%を占める II 型糖尿病に特徴的な脂肪細胞を介したインスリン抵抗性の獲得の説明になっておらず、老化と lncRNA の関係も一切分かっていない。

2. 研究の目的

遺伝子の中でタンパク質をコードする遺伝子だけでなく、特に lncRNA に注目して、実際に老化した組織で発現が変化し、機能的な違いを生む原因となっているものがあるかを検証する。老化は多様な組織で起こるが、本研究では脂肪組織に焦点を当て、脂肪組織の老化に特異的な lncRNA の同定を網羅的に行い、老化と関連する病態の理解と克服への第一歩とすることを目的とする。老化に伴う脂肪細胞の糖尿病態の原因の一つとされる細胞老化を指標にし、現在知られているほぼ全ての lncRNA を対象に、様々なスクリーニング基準を設け、細胞レベルで発現抑制したときに、糖尿病態を回復させる lncRNA の特定を行う。

3. 研究の方法

(1) 若年期(2 か月齢)、中年期(14 か月齢)、老年期(24 か月齢)の C57/BL6N マウスから、内臓脂肪である精巣上体脂肪組織と、皮下脂肪である、そけい部脂肪組織を各 4 例ずつ採取し、QIAGEN RNeasy Plus Universal Kits を用いて total RNA を精製した。RNA の品質をバイオアナライザによる電気泳動で確認し、Agilent SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 2.0 で解析した。各転写物の存在量をシグナル強度として、Welch の t-test における p-value と、平均値の量比である fold change を threshold として、群間で差のある転写物を同定した。

(2) 公開されているトランスクリプトーム情報のリポジトリである、NCBI Gene Expression Omnibus(GEO)から老化や糖尿病と関連するデータを収集し、それぞれの老化状況において発現変化している遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群を Molecular Signature とし、Gene Set Enrichment Analysis を用いて、細胞状況の類似度、組織特異性、老化特異性を検証するとともに、これらの情報を統合し、老化関連 lncRNA を定義した。ハイスループットなマイクロアレイによるスクリーニングの確認実験として、マイクロアレイの核酸のハイブリダイゼーションを原理とする検出とは異なる原理の測定法である定量 PCR によっても、老化関連 lncRNA の発現変化を確認した。

(3) 様々な細胞状況における全転写物情報を公開している ENCODE プロジェクトのデータの中から、複数のヒト細胞株(GM12878、

H1-hESC, K562, A549, HUVEC, HeLa-S3, HepG2, IMR90, MCF-7, SK-N-SH, NHEK)における、核内または細胞質のRNA塩基配列決定情報を情報学的に解析し、本研究で定義したマウスの老化関連 lncRNA と一致する配列を持つ転写物の情報を抽出した。核における発現強度と、細胞質における発現強度を軸とする散布図を描き、各細胞株を要素とする線形近似曲線の傾きと切片の位置によって、ヒト細胞内での核 細胞質局在と細胞株間の特異性を、各老化関連 lncRNA ごとに検証した。

(4) 脂肪細胞へと分化が可能であるマウス胚性線維芽細胞の継代培養を行い、細胞老化に伴う遺伝子発現変化を定量 PCR で測定するとともに、細胞数の計測を行った。4 種類の配列からなる、すでにデザインされた siRNA プール、または新たにデザインした修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド、あるいは shRNA を発現するベクターを構築し、マウス胚性線維芽細胞に導入して、老化関連 lncRNA の発現抑制を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析により、老化に伴い遺伝子発現が変化することが知られている、細胞老化や慢性炎症に関連するタンパク質の発現変化に加え、新規の老化関連遺伝子群が、月齢特異的または脂肪組織の部位特異的に変化していることを明らかにした。遺伝子ごとに、若年期から中年期への移行、または中年期から老年期への移行で大きく変化するものがあり、多様で複雑な制御が行われていることが分かった。明らかな組織機能の異常を示す老年期に発現が変化しているものの中には、中年期などの比較的早期からすでに発現変化しているものもあり、単純な老若の比較だけでなく、データポイントを増やした時間解像度の高い比較解析が今後の老化研究にも求められる。

(2) マウス脂肪組織の老化に特異的な発現変化を示す lncRNA の情報に加え、一部共通した機序が期待される、マウス胚性線維芽細胞の細胞老化に特異的な lncRNA の情報も統合し、老化関連 lncRNA を定義した。これらの遺伝子の多くは、未だ研究されたことがなく、機能未知のものを多数含んでいた。脂肪組織において、これら老化関連 lncRNA の発現変化が起こっていることを、定量 PCR によっても確認した。複数の効果的なフィルターを重ねることで、より確かな遺伝子発現の変化を捉えることが可能となり、これまでアノテーションの付いていない遺伝子群に、機能解明の手掛かりとなる情報を付与することができた。

(3) 本研究で定義した、マウスの老化関連 lncRNA の多くには、共通した配列を持つ、ヒト相同遺伝子が存在することが確認された。

また、それらのヒト老化関連 lncRNA の発現は、細胞株ごとに強度の差が存在することも明らかになった。さらに、老化関連 lncRNA ごとに、一定の特異性を持った細胞内局在を示すことも分かった。これまで研究されてきたタンパク質遺伝子と同様に、老化関連 lncRNA 遺伝子の発現強度や細胞内局在も、細胞状況に依存して変化することを明らかにした。こうした仕組みは、これらの遺伝子の機能制御に関与するものと考えられる。

(4) マウス胚性線維芽細胞の継代培養による細胞老化の早期、つまり不可逆的な細胞増殖の停止を起こしている細胞の割合が低い段階で、すでに一部の老化関連 lncRNA の発現変化を観察した。これは、老化関連 lncRNA の発現変化が比較的大きいことを意味している。標的とした複数の老化関連 lncRNA について、発現抑制が確認されたものの一部には、老化関連タンパク質である INK4A と ARF の発現低下や細胞数の減少が見られ、これら老化関連 lncRNA が老化細胞の維持に必要である可能性を示唆した。老化関連 lncRNA の発現制御により、老化細胞を除去することが可能となれば、分子・細胞レベルでの老化関連病態からの回復の実現へと発展する。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

Yuji Iwashita, Identification of DNA Adducts in Human Gastric Mucosa by DNA Adductome Analysis, THE 12TH INTERNATIONAL CONFERENCE & 5TH ASIAN CONGRESS ON ENVIRONMENTAL MUTAGENS, 2017 年

Iwashita Y, Identification of gastric cancer-related DNA adducts by DNA adductome analysis, 48th Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 2017 年

岩下 雄二, 細胞老化関連 long non-coding RNAs の探索と機能解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

Yuji Iwashita, Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long non-coding RNAs, 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年

岩下 雄二, 細胞老化関連 long non-coding RNAs の探索と機能解析, 第 39 回日本基礎老化学会大会

Yuji Iwashita、Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long non-coding RNAs、CSHL meeting, Mechanism of Aging、2016年

(4)研究協力者
()

Yuji Iwashita、THE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF LONG NON-CODING RNAs IN TWO DIFFERENT TYPES OF CELLULAR SENESCENCE、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学大会合同大会、2015年

岩下 雄二、二種類の細胞老化における長鎖非コードRNAのトランスクリプトーム解析、第38回日本基礎老化学会大会、2015年

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩下 雄二 (IWASHITA, Yuji)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：70730406

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：