

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19754

研究課題名(和文)組織の老化を評価する画期的かつ簡便な手法の構築

研究課題名(英文)Development of innovative method to evaluate tissue aging

研究代表者

伊吹 裕子(Ibuki, Yuko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30236781

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、熱処理による細胞骨格の崩壊に基づくDNA切断を指標に、組織の老化を測定する評価系を構築することを目的としている。老齢マウスの脾臓リンパ球に熱処理を行うと、若齢マウスに比べ、低温度、短い処理時間からDNA損傷マーカーであるヒストンH2AXリン酸化(-H2AX)の強い誘導が認められた。また、ヒト正常皮膚線維芽細胞を継代老化させた場合も、熱処理後の-H2AXの顕著な上昇が認められた。この時、老化細胞では、熱作用によりフィラメントアクチンが崩壊していることが明らかとなり、本手法により細胞骨格を指標とした“組織の老化”を評価できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年齢に応じて、熱曝露後の細胞骨格アクチンの崩壊量が異なり、誘導されるDNA損傷応答が変化すること、それはリンパ球のような浮遊系の細胞でも検出できることが、本研究により明らかになった。熱曝露により生ずるDNA損傷が加齢によって変化することを示したことは学術的にも意義があるが、老化防御という観点から社会的意義も大きい。また、これまで多くの老化マーカーが検討されてきたが、“組織の老化”を評価できる方法は確立されていない。細胞骨格というこれまでとは異なる視点から評価する本手法は、非侵襲的で簡便な新しい老化測定法の構築に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study is to develop an evaluation system for tissue aging by measuring cytoskeleton disruption-induced DNA damage after heat treatment. Heat treatment induced histone H2AX phosphorylation (-H2AX), known as a DNA damage marker, more remarkably in spleen lymphocytes from aged mice than that of young mice. The similar trend was observed when human normal skin fibroblasts were used. The cells of high passages (aged cells) showed strong -H2AX generation compared with that of low passages. Filament actin in aged cells was vulnerable to heat stress. These results suggested that detection of -H2AX after heat treatment may be a good index to evaluate tissue aging.

研究分野：毒性学

キーワード：老化 熱 -H2AX アクチン DNA損傷 細胞骨格 DNase I

1. 研究開始当初の背景

日本は、現在、これまでに経験したことのない超高齢社会を迎えている。近年、健康寿命を延ばす取り組みが数多くなされ、老化を遅らせるための研究は日夜盛んに行われ、抗酸化性食品の摂取の効能やカロリー制限など多くの情報が得られつつある。一方、老化の進み方には大きな個人差がある。老化の度合いを簡単に測定できれば、個人が自分の生物学的年齢を知り、食事などによる老化防止の取り組みの効果を判断し、老化を遅らせるための算段を行うことができる。

これまで老化の指標として、血圧、骨密度、筋力などとともに、老化を評価するバイオマーカーとして、性ホルモン、成長因子、ビタミンなど加齢性の変動を示す様々なものが挙げられてきた。一方、加齢に伴う皮膚など組織の弾力性の低下は明らかであり、老化指標として有用であることが報告されているが、皮膚以外の体の中の組織においては、簡単にその老化度を調べる指標は今のところ存在しない。

2. 研究の目的

組織の弾力性を左右する因子に細胞骨格がある。本研究では、我々が発見した知見をもとに、皮膚だけでなく、体全体の“組織の老化”を細胞骨格で評価できる方法の構築に挑戦する。細胞骨格蛋白質であるアクチンはすべての真核細胞に多量に発現しており、細胞骨格の主要な構成成分である。アクチンは Deoxyribonuclease I (DNase I) と結合して存在しているが、我々は、熱をかけるとアクチンが崩壊し、DNase I が遊離、遊離した DNase I は核移行し DNA を切断するという、全く新しい DNA 切断機序を見出した。そこで、もし年齢に応じて、アクチンと DNase I の結合力や熱による遊離量が変化すれば、その切断量を老化の評価に使用できるのではないかと考えた。細胞骨格というこれまでとは異なる新しい視点から、簡便な“組織の老化”の測定方法の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスの購入

若齢マウスとして 6 週齢、老齢マウスとして 84 週齢ならびに 92 週齢の C57BL/6N マウスを購入し、コンベンショナルな環境で 1~2 週間程度飼育を行った後、実験に使用した。動物実験は静岡県立大学動物実験倫理委員会規則を遵守して行った。

(2) 脾臓リンパ球、骨髄幹細胞の調整

C57 BL/6N マウスより脾臓を取り出し、培地中でピンセットを用いて押しつぶした後、静置し大きな固形物を取り除いた。赤血球溶解液を加えピペティング後、遠心洗浄し、一定濃度に調整した。骨髄幹細胞はマウス大腿骨より採取し、脾臓リンパ球と同様の濃度に調整した。

(3) ヒト細胞の培養と細胞老化の検討

ヒト前骨髄性白血病 HL-60 は理研細胞バンクより購入し、10%ウシ胎児血清(FBS)を含む RPMI 培地にて培養した。ヒト正常二倍体皮膚線維芽細胞 ASF-4-1 細胞は JCRB 細胞バンクより PDL(Population doubling level)=34 のものを購入した。10%FBS を加えた EMEM で継代培養し、PDL が 54 以上になったものを老化細胞として使用した。老化の判定は、細胞増殖速度、ガラクトシダーゼの活性、p16 とヒストン H3S10 リン酸化をウエスタンブロット法にて行った。

(4) 熱曝露と DNA 損傷の検出法

熱曝露は水浴にて、40~45 度で行った。脾臓リンパ球、骨髄幹細胞はマイクロチューブに懸濁液として入れ、ヒト正常皮膚線維芽細胞はシャーレをパラフィルムで巻いて付着状態のまま熱曝露した。

γ -H2AX の検出はウエスタンブロット法にて行った。 γ -H2AX 抗体は Merck Millipore (#05-636) より購入した。また、正弦電場ゲル電気泳動法にて DNA 二本鎖切断を検出した。

(5) 細胞骨格フィラメントアクチン(F-アクチン)の解析

ASF-4-1 細胞は 10%ホルマリンにて固定し、Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton PHDG1-A)を加え、フローサイトメーター(CytoFlexS)にて解析した。

4. 研究成果

(1) 熱曝露後の γ -H2AX の誘導 若齢マウスと老齢マウスでの比較

マウスを使用する実験を行う前に、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いて、熱曝露の条件設定を行った。採取する組織は、最も簡便に採取できる血液細胞が第一候補となるため、浮遊細胞を用いて予備検討を行った。HL-60 細胞では、41~44 分、30 分の曝露で顕著な γ -H2AX の誘導が認められた。そこで、以後の浮遊血液系細胞を使用した実験はこれを含む温度域を用いて行うこととした。

若齢および老齢の C57BL/6N マウスを頸椎脱臼による安楽死措置後、脾臓リンパ球と骨

髄幹細胞を採取した。一定細胞数に調整し、37~44 にて30分、または42 にて~60分の熱ストレスをかけた。熱曝露後、細胞を回収し、ウエスタンブロッティングにて γ -H2AXを測定した。その結果、脾臓リンパ球において、老齢マウスは若齢マウスに比べ、低温度、短い処理時間から強い γ -H2AXを誘導した(図1)。一方、骨髄幹細胞では、熱曝露後の γ -H2AXについて、年齢による差は認められなかった。

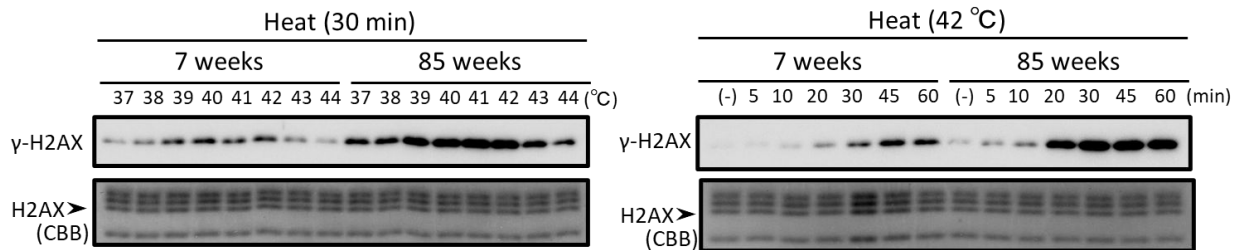


図1 マウス脾臓リンパ球における熱曝露後の γ -H2AXの誘導

- (2) 正常二倍体皮膚線維芽細胞を用いた継代老化細胞の作成と老化による細胞骨格の変化
 正常ヒト皮膚線維芽細胞 ASF-4-1 を培養し、各 PDL での老化度を確認した。PDL が 54 以上になると細胞の増殖率が有意に低下した。老化の指標である β -ガラクトシダーゼの活性の上昇、細胞周期調節因子である p16 の発現量の上昇、細胞分裂のマーカーであるヒストン H3S10 リン酸化の低下が PDL の増加とともに示されたことから、PDL54 以降の細胞増殖が遅くなった細胞は、老化した状態であることが確認された。
 そこで、PDL46 と PDL58 の細胞の F-アクチンの状態をファロイジン染色にて検討した。細胞内 F-アクチンを示す蛍光量は老化細胞において低下していた。

- (3) 熱曝露後の γ -H2AX の誘導 継代老化細胞での比較
 PDL46 の正常ヒト皮膚線維芽細胞と PDL58 の継代老化細胞を使用し、37~45 にて60分、または45 にて~60分の熱ストレスをかけた。 γ -H2AX は、温度、曝露時間依存的に誘導され、PDL46 に比べ PDL58 において顕著であり、(1)における脾臓リンパ球と同じ傾向となった(図2)。さらに、正弦電場ゲル電気泳動法により、45 にて60分の熱曝露後の DNA 二本鎖切断を解析した。その結果、PDL46 に比べ PDL58 において多くの DNA 切断が認められ、 γ -H2AX のデータと一致するものとなった。

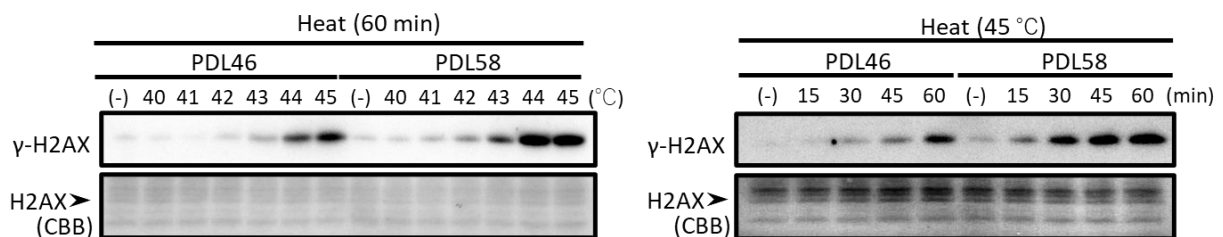


図2 継代老化させた正常二倍体線維芽細胞における熱曝露後の γ -H2AXの誘導

- (4) 熱曝露後の細胞骨格の変化
 (2)において通常細胞に比べ、細胞内 F-アクチン量が老化細胞にて減少しているまたは F-アクチンの構成が完全でないことが示されたので、熱曝露後の F-アクチンの変化について検討した。熱により F-アクチンへのファロイジン結合が低下したことから(図3) 熱曝露による F-アクチンの崩壊が示唆された。さらにその崩壊は PDL の高い老化細胞にて顕著であった。よって、老化による熱曝露後の γ -H2AX の増加は、細胞骨格アクチンの崩壊に関連することが示唆された。

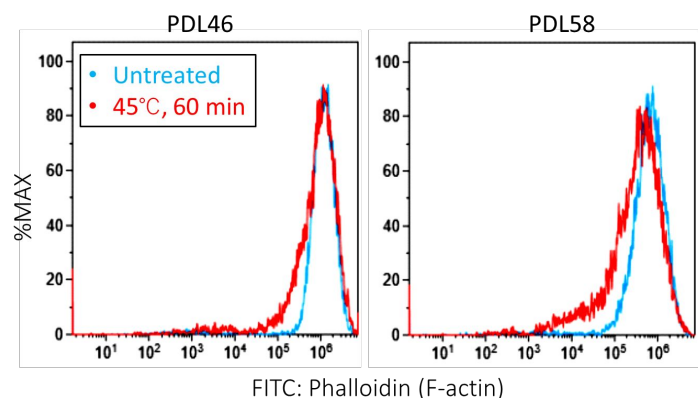


図3 熱曝露後のフィラメントアクチンの減少

(5) 考察と今後の展望

我々は、熱曝露が γ -H2AX を誘導するメカニズムの一つとして、細胞骨格が崩壊し、通常アクチンと結合している DNase I が遊離、核内に移行するため DNA を切断するという機構を考えている。本研究は、老化による細胞骨格の変化を γ -H2AX を指標として評価できるのではないかという仮説に基づいて行った。本研究の成果を通して、熱作用後の γ -H2AX は *in vivo*, *in vitro*とも老化により顕著となり、我々の仮説を支持する結果となった。 γ -H2AX を指標にすれば、熱曝露という単純な方法により細胞の老化を検出できる可能性が示された。細胞骨格を指標とした組織の老化を検出できる方法はこれまでになく、本法が新しい測定手法となることが期待された。一方、老化により顕著となった γ -H2AX 誘導において、本当に細胞骨格からの DNase I が寄与しているかについては、今後検討すべき事項である。また、本研究により、リンパ球のような浮遊細胞で検出が可能であることは示されたが、実際の血液細胞での評価は行っていない。また、実用化のためには、 γ -H2AX の検出として最適な方法の検証も行う必要がある。簡便な組織老化の評価系の構築を目指し、今後それらの検討が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森 優太, 小牧 裕佳子, 福田 哲也, 豊岡 達士, 伊吹 裕子
2. 発表標題 熱ストレスによるアクチン崩壊とヒストンH2AXのリン酸化
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 優太, 鈴木 崇志, 豊岡 達士, 小牧 裕佳子, 伊吹 裕子
2. 発表標題 細胞骨格アクチン崩壊によるヒストン H2AXリン酸化を指標とした組織の老化評価法の構築
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 崇志, 天野 百花, 小牧 裕佳子, 伊吹 裕子
2. 発表標題 老化による紫外線 DNA損傷修復の遅延と損傷応答分子ヒストンH2AXリン酸化の関係
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 崇志, 天野 百花, 小牧 裕佳子, 伊吹 裕子
2. 発表標題 老化に伴う紫外線誘導 -H2AX の変化 NER分子解離遅延との関係
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 優太, 鈴木 崇志, 豊岡 達士, 小牧 裕佳子, 伊吹 裕子
2. 発表標題 熱ストレスによるヒストンH2AX リン酸化を指標とした組織老化の新規評価法
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木崇志, 天野百花, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 老化に伴う紫外線誘導 -H2AX の変化
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 優太, 福田 哲也, 小牧 裕佳子, 豊岡 達士, 伊吹 裕子
2. 発表標題 熱ストレスによる細胞骨格変化とヒストンH2AX のリン酸化誘導
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田哲也, 豊岡達士, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 アクチン構造の崩壊によるDNA二本鎖切断生成
3. 学会等名 第32回変異機構研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野百花, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 老化に伴うヒストン修飾変化と紫外線誘導DNA損傷応答
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野百花, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 老化に伴うヒストン修飾変化と紫外線誘導DNA損傷修復応答
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momoka Amano, Yukako Komaki, Yuko Ibuki:
2. 発表標題 Aging altered histone modification and repair response to UV-induced DNA damage.
3. 学会等名 第24回静岡健康・長寿学術フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Fukuda, Yukako Komaki, Yuko Ibuki
2. 発表標題 Actin disruption causes DNA double strand breaks.
3. 学会等名 The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田哲也、小牧裕佳子、伊吹裕子
2. 発表標題 酸性条件はDNAを傷つける!? - 新しいDNA損傷メカニズムの提案 -
3. 学会等名 富士山麓A&Sフェア
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>光環境生命科学研究室HP http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~photobio/</p>
--

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
研究協力者	小牧 裕佳子 (Komaki Yukako)		
研究協力者	豊岡 達士 (Toyooka Tatsushi)		

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
---------	---------