

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16538

研究課題名(和文)新規WRN早老症モデルマウスにおけるRECQL5の脂質代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of RECQL5 in regulation of lipid metabolism in novel Werner's syndrome model mice

研究代表者

澁谷 修一 (Shibuya, Shuichi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 老化ストレス応答研究プロジェクトチーム・研究員

研究者番号：70866342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルナー症候群(Ws)モデルとして新規に作出したWrn/Recql5 2重欠損マウスはWsと同様の高インスリン血症を伴う脂質代謝異常を呈することを明らかにした。内臓脂肪組織では脂質代謝関連に加えて老化関連遺伝子発現も増加し、老化細胞の蓄積も捉えた。老化細胞の除去は欠損マウスの脂質代謝異常を改善した。以上から、WRNとRECQL5の2重欠損は老化細胞の蓄積を起因とする脂質代謝異常を引き起こすことが示唆された。またWsの特徴であるサルコペニア肥満における脂質代謝異常と骨格筋制御の関連も見いだされ、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、WRNとRECQL5の2重欠損は老化細胞の蓄積に起因する脂質代謝異常を引き起こすことが明らかとなった。Ws患者においても様々な組織に蓄積した老化細胞が老化病態を引き起こすと考えられる。本研究の成果は老化細胞を標的としたWsの新たな治療戦略へ応用できる可能性がある。また我々が作出したWrn/Recql5 2重欠損マウスは新規WsモデルマウスとしてWsの研究発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：WRN/RECQL5 double-deficient mice we generated as a novel model of Werner's syndrome (WS) exhibited abnormal lipid metabolism accompanied by hyperinsulinemia similar to WS. In visceral adipose tissue, the expression of senescence-related genes increased in addition to lipid metabolism-related genes, suggesting the accumulation of senescent cells. Removal of senescent cells improved dyslipidemia in the double-deficient mice. These results suggest that double deletion of WRN and RECQL5 causes dyslipidemia caused by the accumulation of senescent cells. In addition, we found a relationship between dyslipidemia and function of skeletal muscle in sarcopenic obesity, which is a characteristic of WS.

研究分野：老年医学

キーワード：早老症 ヘリカーゼ 脂質代謝 細胞老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群は *WRN* 遺伝子変異による機能欠失を原因とする成人性早老症であり、症例の約 8 割が日本で報告されている。20 歳代から毛髪変化や白内障を生じ、四肢萎縮、脂質代謝異常、インスリン抵抗性に起因する糖尿病などを併発、悪性腫瘍や冠動脈疾患により 50 歳代で死に至る。*WRN* は RecQ ファミリーに属し、DNA 2 重らせん構造をほどいて一本鎖にするヘリカーゼ活性により DNA 修復・複製・組換え・転写の細胞分裂の際に重要な酵素である。ウェルナー症候群は成人以降に発症する最も生理的老化に近い早老症であり、ウェルナー症候群の発症原因および治療法の研究は老化研究の基礎ともなり得る。しかしながら、これまで作出されている *Wrn* 欠損マウスはウェルナー症候群特徴的な表現型を示さず発症メカニズムや治療法開発研究の妨げとなっている。

RecQ ファミリーは *WRN* に加え *RECQL*、*BLM*、*RECQL4*、*RECQL5* の計 5 種類が同定され、互いの機能的重複が予想される。興味深いことに *WRN* と *RECQL5* タンパク質が生理的に結合する機能的相互作用が報告された。我々は実際に野生型マウスの主要組織で *Wrn* と *Recq15* の遺伝子発現レベルを調べたところ、各組織での発現分布が一致した。これらの結果は、*RECQL5* と *WRN* が相補的な役割を果たしている可能性を示唆した。

ウェルナー症候群における *WRN* と *RECQL5* の機能的代償性を解明するために新規ウェルナー症候群モデルとして *Wrn/Recq15* 2 重欠損マウスを作出した。我々はこれまで *Wrn/Recq15* 2 重欠損マウスの老化様表現型を調べてきた中で、この 2 重欠損マウスはウェルナー症候群様のインスリン抵抗性を伴う脂質代謝異常を呈することを明らかにした。*WRN* と *RECQL5* の 2 重欠損により誘導されるゲノム不安定性が細胞老化を誘導し、脂質代謝異常を含むウェルナー病態を誘導すると予想される。

### 2. 研究の目的

本研究では、*RECQL5* 欠損に起因する脂質代謝異常の発症メカニズムを解明することを目的とする。特に、ウェルナー早老病態との関連が予想される老化細胞蓄積に着目し、脂質代謝経路の調節機序における老化細胞の寄与を明らかにする。さらに本研究で得られた成果から老化進展の基礎メカニズムを考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Wrn* および *Recq15* の 2 重欠損により誘導される細胞老化様表現型解析

E13.5 日の胎仔から線維芽細胞を単離培養した。播種した細胞は 2 日毎に細胞数をカウントし、増殖能を評価した。細胞老化マーカー SA-β-Gal は SPiDER-β-Gal を用いた蛍光染色により評価した。DNA ダメージマーカー γ-H2AX は免疫染色法により検出した。また老化関連遺伝子発現は RT-PCR 法により調べた。

#### (2) *RECQL5* 欠失が誘導する脂質代謝異常メカニズム解明

2 重欠損マウスの内臓脂肪を摘出し、RNA-seq により遺伝子発現プロファイルを調べた。また、内臓脂肪におけるいくつかの遺伝子発現は RT-PCR 法により調べた。

#### (3) 老化細胞除去による脂質代謝異常改善作用

老化細胞除去物質としてフラボノイドの一種であるフィセチンを使用した。5  $\mu$ M フィセチンを 8 日間 2 重欠損細胞に添加し、細胞数の計測により老化細胞除去作用を評価した。また、2 重欠損マウスにフィセチン (100 mg/kg/day) を週 5 回、8 週間経口投与し、体重変化および内臓脂肪重量を調べた。

#### (4) ウェルナー-早老病態における脂質代謝と骨格筋制御の関連

外因性の炎症ストレスを誘導するために、2 重欠損マウスに LPS (1 mg/kg) を腹腔に単回投与し、2 日後に大腿四頭筋を摘出した。摘出した大腿四頭筋の HE 染色標本を作製し、顕微鏡画像から筋線維径を定量した。もう一方の大腿四頭筋から凍結切片を作製し、Oil-red-O 染色により筋内脂肪滴を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) *Wrn* および *Recq15* の 2 重欠損は細胞老化を誘導する

*Wrn/Recq15* 2 重欠損マウスの胎仔由来線維芽細胞を単離し、細胞老化様表現型を調べた。野生型細胞と比較して 2 重欠損細胞は増殖能低下、細胞老化マーカー SA- $\beta$ -Gal 陽性細胞数の増加、DNA ダメージマーカー H2AX の増加、および核構造異常を示した。また 2 重欠損細胞は老化関連遺伝子 *p16* や SASP 関連遺伝子発現も増加した。2 重欠損マウス細胞が示したこれらの細胞老化様特徴はウェルナー-症候群患者由来細胞と共通していた。

#### (2) *Wrn* 欠損マウスにおける *Recq15* 欠失は脂質代謝および細胞老化関連遺伝子発現を変化させる

次に、2 重欠損マウスの内臓脂肪組織で RNA-seq による遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。その結果、脂質代謝関連遺伝子セットに複数の発現変化が認められ、脂質代謝経路の変化を示した。また、SASP に含まれる炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子セットに発現増加が認められ、内臓脂肪における老化細胞の蓄積も示唆された。RT-PCR でも 2 重欠損脂肪組織の遺伝子発現を調べたところ、脂質分解に関わる *Pgc1* の発現低下や、*p16*、*p21*、*Tnf-*、*Il-6*、*Il-1* などの老化関連遺伝子発現の増加を認めた。

#### (3) 老化細胞除去は脂質代謝異常を改善する

次に老化細胞除去による脂質代謝異常の改善作用を調べた。まず、老化細胞除去作用を有するフラボノイドの一種であるフィセチンを 2 重欠損細胞に添加すると細胞数が減少し、老化細胞除去作用を示した。また、フィセチンを 2 重欠損マウスに投与すると、有意に体重および内臓脂肪量が減少し、脂質代謝異常の改善作用が認められた。以上の結果から、WRN と RECQL5 の 2 重欠損により誘導される老化細胞蓄積が起因となり、脂質代謝異常を引き起こすことが示唆された。さらに老化細胞をターゲットとしたウェルナー-早老症の治療戦略も見いだされた。

#### (4) ウェルナー-早老病態における脂質代謝と骨格筋制御の関連

ウェルナー-症候群は内臓脂肪蓄積と顕著な四肢萎縮を併発するサルコペニア肥満を発症することから、ウェルナー-早老病態における脂質代謝と骨格筋制御の関連が強く示唆される。高齢者の骨格筋線維内に脂肪が蓄積する筋内脂肪の増加が報告されており、加齢により筋質低下が進行する。2 重欠損マウスに LPS 投与による外因性の炎症ストレスを誘導したところ、WT と比較して筋線維の萎縮が増悪し、Oil-red-O で染色される筋線維内の顕著な脂肪滴蓄積が認められた。

早老病態における脂質代謝と骨格筋制御の関連が強く示唆されたため、今後は脂質代謝異常が関与する骨格筋老化機構を解明する発展的研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shuichi Shibuya, Yusuke Ozawa, Koutaro Yokote, Takahiko Shimizu
2. 発表標題 Wrn and Recq15 deletions promote adipose senescence and dyslipidemia
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuichi Shibuya, Yusuke Ozawa, Koutaro Yokote, Takahiko Shimizu
2. 発表標題 Wrn and Recq15 deletions accelerate adipose senescence and dyslipidemia
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁谷 修一、小澤 祐介、横手 幸太郎、清水 孝彦
2. 発表標題 新規ウェルナー早老症モデルマウスは脂肪細胞老化および脂質代謝異常を呈する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuichi Shibuya, Kenji Watanabe, Takahiko Shimizu
2. 発表標題 Wrn and Recq15 deletions promote adipose senescence and dyslipidemia
3. 学会等名 IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuichi Shibuya, Kenji Watanabe, Takahiko Shimizu
2. 発表標題 Elucidation of the onset mechanism of premature aging using novel Werner ' s syndrome model mice
3. 学会等名 JSBMG Korea-Japan Joint Symposium 2023 ( 国際学会 )
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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