

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11605

研究課題名(和文) 分裂終了細胞における新規な老化マーカーの探索とその機能の解析

研究課題名(英文) Transcriptomic analyses of mouse cardiac myocytes and cardiac non-myocyte cells: postmitotic vs. proliferative cells

研究代表者

竹中 康浩 (Takenaka, Yasuhiro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20586789

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)：哺乳類の多くの組織は、その大部分が増殖停止細胞で構成され、増殖性細胞はごく少数に限られている。近年、増殖停止細胞も細胞老化の表現型を示し、個体の老化に重要な役割を果たすこと、あるいは病態に関与することが示唆されている。本研究では、若齢および老齢マウス心臓から増殖停止細胞である心筋細胞と増殖性細胞である非心筋細胞を分離し、それぞれ網羅的遺伝子発現量解析を行い、両者における遺伝子発現の違いを明らかにした。その結果、老齢心筋細胞では、一部のミトコンドリア呼吸鎖の遺伝子発現が低下していることに加えて非コードRNAの一種である核小体低分子RNAの発現量が低下していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化研究は老化に伴う組織の機能低下に加えて多くの疾患の診断や治療を根底から変える可能性を秘めており、老化の根本的なメカニズム解明は高齢化の進む現代において急務である。多くの多細胞生物において老化とは分裂細胞の分裂限界として現れる現象と、非分裂性細胞の生存限界として現れる現象との重なり合いの結果である。本研究の成果により将来的には、当該老化マーカーのカイネティクスを元にした個体老化レベルの多面的評価法の確立が期待される。また既に蓄積したマーカー分子の軽減、消去法を模索することによる老化表現型の緩和や高齢期における心機能低下の治療への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Adult heart mostly contains long-lived postmitotic cardiomyocytes and non-cardiomyocytes that have proliferative potential. Here, we isolated cardiomyocytes and non-cardiomyocytes from young and aged mouse heart, and performed transcriptome analyses to understand the differences of gene expression in postmitotic and proliferative cells. Gene ontology analyses revealed that genes associated with inflammatory response were upregulated in aged cardiac myocytes, whereas genes including two ATP synthases in mitochondrial respiratory were significantly downregulated. We also found that the expression levels of some small nucleolar RNAs (snoRNAs) are decreased cardiomyocytes with aging. snoRNAs are deeply involved in RNA modification such as pseudouridylation stabilizing ribosomal RNA and mRNA splicing. Therefore, the age-related reduction in snoRNA expression may lead to the destabilization of rRNA, splicing dysfunction, and ultimately a decrease in protein synthesis capacity.

研究分野：老化生理学

キーワード：老化 心筋 非心筋 分裂終了細胞 トランスクリプトーム解析 ミトコンドリア 核小体低分子RNA snoRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化研究は老化に伴う組織の機能低下に加えて多くの疾患の診断や治療を根底から変える可能性を秘めており、老化の根本的なメカニズム解明は高齢化の進む現代において急務である。多くの多細胞生物において老化とは分裂細胞の分裂限界として現れる現象と、非分裂性細胞の生存限界として現れる現象との重なり合いの結果である。しかし線維芽細胞や幹細胞など細胞分裂能をもった分裂細胞の老化研究が進む一方で心筋細胞や神経細胞などの分裂終了細胞の研究は解析が遅れていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化個体の分裂終了細胞等に普遍的な新規遺伝子マーカーを同定し、分裂終了細胞の老化が個体の老化にどのように寄与しているのかを本老化マーカーの加齢におけるカイネティクス及び機能解析により解明することである。この目的のために簡便な単離法が確立されている心筋細胞を分裂終了細胞の材料として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 老齢マウス心筋細胞の網羅的トランスクリプトーム解析 (1~2年目)

分裂終了細胞に特徴的な新規の老化マーカーを同定するために、若齢 (4~8週齢) および老齢 (1、1.5及び2年齢) のマウス心臓から Differential Adhesion 法により心筋細胞を単離した。同様に分裂終了細胞と分裂細胞との比較を行う目的から分裂性の心臓線維芽細胞についても調製し、それぞれの細胞について RNA 抽出を行い、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。

(2) 分裂終了細胞に特徴的な老化マーカーの同定とそのカイネティクス解析 (2年目)

トランスクリプトーム解析の結果から候補分子を絞り込み、分裂終了細胞 (心筋) に特徴的な新規老化マーカーを同定した。若齢期から老齢期における個体レベルでの発現量変動を qPCR 法で再確認した。

(3) 培養細胞を用いた新規老化マーカーの老化における機能解析 (2~3年目)

培養細胞を用いて分裂終了細胞の老化プロセスにおける新規老化マーカー分子の機能を解析した。同定した新規老化マーカー遺伝子のノックダウン実験を行って遺伝子導入細胞の SA- β -gal 活性等の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 分裂終了細胞に特徴的な新規の老化マーカーを同定するために、まず若齢 (14~16週齢) および老齢 (1年齢) のマウス心臓からコラゲナーゼ還流法により心筋細胞を単離した。同時に分裂終了細胞と分裂細胞との比較を行う目的から分裂性の非心筋細胞についても調製した。次に若齢および老齢心筋細胞および非心筋細胞から RNA 精製を行い、RNA シーケンス解析に供した。その結果老齢の心筋細胞において RNA 発現量が増加している遺伝子を多数同定した。心筋細胞の単離方法については既報 (Ackers-Johnson et al., Circulation Research 2016, 30;119(8):909-920) をもとに実験を開始したが、いくつかの問題が生じたため条件検討にかなりの時間を要した。具体的には以下の1)~4)を中心とする解決すべき課題が発生した。

- 1) 生存率や形態のよい心筋及び非心筋細胞が多く得られない
 - 2) 心筋細胞と非心筋細胞の分離が不十分
 - 3) マウス1匹の心筋および非心筋細胞からでは十分な量の全 RNA を得られない
 - 4) 老齢マウス由来心臓は若齢より組織が固くコラゲナーゼ処理で十分に細胞が分離しない
- そこで1年目は既存のプロトコルを改良して上記課題を克服し、心筋細胞について RNA シーケンス解析を行う事ができた。ただし、1) については現在でも引き続き検討を行っている状態である。なお、2)～4) については以下の方法により課題を克服することができた。
- 2) メッシュフィルターを用いて心筋と非心筋画分を迅速かつ効率的に分離する
 - 3) 複数マウスから心筋又は非心筋由来 RNA を調製して RNA シーケンス解析にかける
 - 4) 老齢マウスの心臓の場合はコラゲナーゼ量を増やす

(2) トランスクリプトーム解析の結果から候補分子を絞り込み、分裂終了細胞に特徴的な新規老化マーカーを同定した。心筋細胞および非心筋細胞の RNA シーケンス解析により得られた結果からいくつかの GO タームに分けて候補老化マーカー遺伝子を絞り込んだ結果、心筋細胞では一部のミトコンドリア関連遺伝子の発現が低下していることに加えて non-coding RNA の一種である核小体低分子 RNA (snoRNA) の発現が変動していることが明らかになった。ミトコンドリア関連遺伝子や snoRNA の発現量低下は心筋細胞に特徴的なものであり、これまでに報告が無かったため、分裂終了細胞の新規な老化マーカーとなりうる事が示唆された。

(3) ミトコンドリア関連遺伝子や snoRNA の発現量については定量的 PCR にて改めて解析を行った。その結果、図1に示した通り、心筋細胞ではいくつかの snoRNA の発現量が増加に伴って変化していることが明らかとなった。一方、非心筋細胞では心筋細胞とは異なる snoRNA の発現変動が認められた。

(4) 次にこの snoRNA がどのような機能をもつのかについて重点的に研究を行った。まず snoRNA を過剰発現やノックダウンするためのベクター系の構築を行った。過剰発現には U6 プロモーターによる shRNA 発現用のレンチウイルスベクター、ノックダウンには CRISPR-Cas9 によるゲノム編集用のレンチウイルスベクターを購入し、これをマウスの培養細胞である 3T3-L1, NIH3T3 もしくはマウス胎児線維芽細胞 MEF に導入して、老化マーカーである SA-β-gal 活性の測定などを行った。その結果一部の細胞で SA-β-gal 活性の上昇が認められた。

しかし、ノックダウンの効果が認められなかったりウイルス導入のストレスで細胞の性質が大きく変化したりして解析はかなり難航している。今後は遺伝子導入法の改善などを行って上記問題点を解決し、snoRNA が分裂終了細胞の老化においてどのような役割を果たしているのかを明らかにしていく予定である。

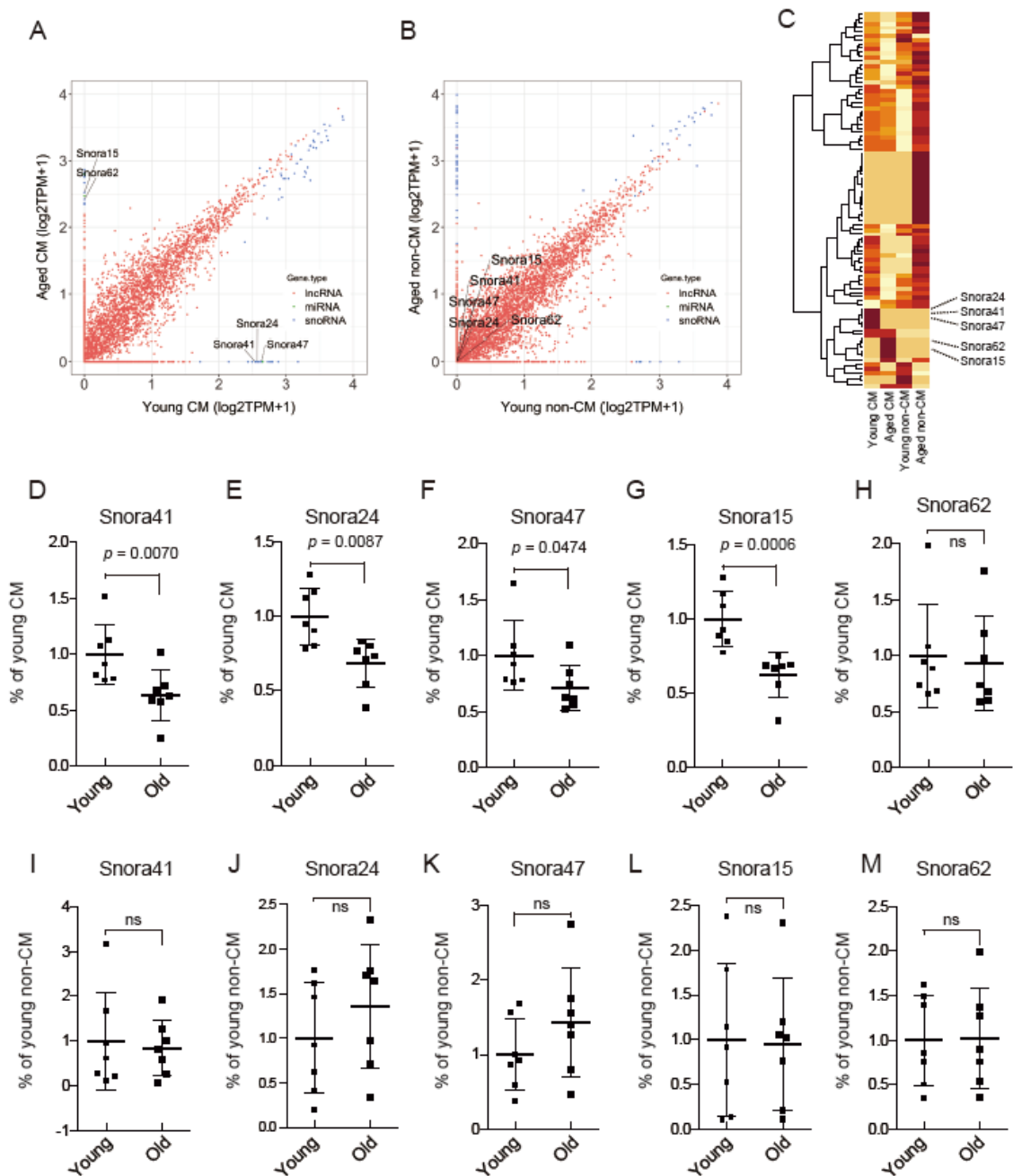


図1 心筋および非心筋細胞における snoRNA 発現量変化 A, 若齢対老齢心筋細胞の遺伝子発現の散布図 B, 若齢対老齢非心筋細胞の遺伝子発現の散布図 C, snoRNA 発現量のヒートマップ D-H, 心筋細胞における snoRNA の発現量を qPCR で解析した I-J, 非心筋細胞における snoRNA の発現量を qPCR で解析した

データは bioRxiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.08.20.554007v1>)

Figure 4 より転載

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takenaka Yasuhiro, Hirasaki Masataka, Bono Hidemasa, Nakamura Shigeo, Kakinuma Yoshihiko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transcriptome Analysis Reveals Enhancement of Cardiogenesis-Related Signaling Pathways by S-nitroso-N-pivaloyl-D-penicillamine (SNPiP): Implications for Improved Diastolic Function and Cardiac Performance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/FJC.0000000000001552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takenaka Yasuhiro, Hirasaki Masataka, Inoue Ikuo, Ikeda Masaaki, Ohata Hisayuki, Kakinuma Yoshihiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Transcriptome analyses of mouse cardiac myocytes and non-cardiomyocytes: postmitotic vs. proliferative cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.08.20.554007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiro Takenaka, Ikuo Inoue, Masataka Hirasaki, Masaaki Ikeda, Yoshihiko Kakinuma	4. 巻 290(15)
2. 論文標題 Temporal inhibition of the electron transport chain attenuates stress-induced cellular senescence by prolonged disturbance of proteostasis in human fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3843-3857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiro Takenaka, Ikuo Inoue, Takanari Nakano, Masaaki Ikeda, Yoshihiko Kakinuma	4. 巻 289(6)
2. 論文標題 Prolonged disturbance of proteostasis induces cellular senescence via temporal mitochondrial dysfunction and subsequent mitochondrial accumulation in human fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1650-1667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹中 康浩、平崎 正孝、井上 郁夫、池田 正明、大畠 久幸、柿沼 由彦
2. 発表標題 増殖停止細胞の老化を解き明かす：トランスクリプトーム解析による老齡マウス心筋細胞の核小体低分子RNA（snoRNA）とミトコンドリア遺伝子発現
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹中 康浩、平崎 正孝、井上 郁夫、池田 正明、大畠 久幸、柿沼 由彦
2. 発表標題 個体老化における増殖停止細胞（心筋細胞）と増殖性細胞（非心筋細胞）のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第46回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹中 康浩、井上 郁夫、平崎 正孝、池田 正明、柿沼 由彦
2. 発表標題 タンパク質恒常性（プロテオスタシス）の視点から見たストレス誘導性細胞老化とその制御：ミトコンドリア代謝の重要性
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Takenaka, Masataka Hirasaki, Ikuo Inoue, Masaaki Ikeda, Yoshihiko Kakinuma
2. 発表標題 Transcriptomic analyses of mouse cardiac myocytes and cardiac non-myocyte cells: postmitotic vs. proliferative cells
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Takenaka, Ikuo Inoue, Masaaki Ikeda, Yoshihiko Kakinuma
2. 発表標題 Vitamin E and rapamycin treatment attenuate cellular senescence induced by prolonged disturbance of proteostasis in human fibroblasts
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中 康浩、平崎 正孝、井上 郁夫、池田 正明、柿沼 由彦
2. 発表標題 細胞老化に伴って蓄積する老化関連凝集体の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中 康浩、平崎 正孝、池田 正明、井上 郁夫、柿沼 由彦
2. 発表標題 Analysis of senescence-associated protein aggregates in replicative senescent MRC-5 cells
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脂質タンパク質複合体を含む多検体試料を分析するための電気泳動用スラブ型ポリアクリルアミドゲル及びその方法	発明者 竹中 康浩、井上 郁夫、柿沼 由彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-001983	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

研究室ホームページ（主な研究内容）
<https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/seitaitougyogaku/kenyunaityou.html>

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
研究分担者	平崎 正孝 (Hirasaki Masataka) (10522154)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	
研究分担者	柿沼 由彦 (Kakinuma Yoshihiko) (40233944)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	大畠 久幸 (Ohata Hisayuki) (80256924)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

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