

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590885

研究課題名(和文)慢性疾患患者末梢白血球の環状テロメアDNAの定量によるゲノム老化の評価について

研究課題名(英文)The evaluation of genomic aging by quantifying telomeric circular DNA in peripheral leukocytes of patients with chronic disease.

研究代表者

前田 豊樹 (Maeda, Toyoki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30264112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではテロメアの長さから病気による老化促進の測定を目指している。テロメアとは染色体の末端部のことで、細胞分裂の時にテロメアが短くなるため、白血球のテロメアの長さから老化の程度が判る。しかし、実験的なストレスや疾病の種類ごとに、平均長や切れ落ちたテロメアからわかるテロメア短縮量よりも、テロメアの長さの分布のほうが鋭敏に異なっていた。過酸化水素、生活習慣病、慢性炎症では、短いテロメアが増え、放射線暴露や慢性神経疾患では、短いテロメアが減る、つまり老化細胞が死滅することがわかり、病的老化に2種類のパターンがあることが判明した。テロメアの長さの分布の推移によって質的に異なる細胞の老化を追跡できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to measure the aging promotion due to diseases by means of the somatic telomere length. Telomere is a structure of chromosome ends, which shortens at every cell cycle parallel to cell aging. The telomere length distribution is a parameter corresponding more sensitively to experimental stress or disease conditions than the mean telomere length or the amount of deleted telomeric DNA indicating the shortness of telomere. Hydrogen peroxide, life-style associated diseases, and chronic inflammation were associated with the increase of short telomeres, and the radiation exposure, chronic neurological diseases were associated with the decrease of short telomeres, which implied the increased death of old somatic cells. Taken together, there are two types of patterns of cellular aging in terms of the difference in the telomere length distribution.

研究分野：老化制御学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：老化 テロメア

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、臨床例を中心に末梢白血球テロメア長関連パラメータすなわち、サザンブロット法により、テロメアの平均長、テロメア長の分布、テロメア近傍領域であるサブテロメア領域のメチル化の程度を解析し、様々な病態で、ゲノムの老化性変化が促進されることを確認してきた。この老化性変化を、鋭敏に捉えることが出来れば、疾病状態を老化の促進性変化、つまり老化速度に置き換えて病状を量的に評価できるのではないかと考えられる。とりわけ、その進行が評価しにくい慢性疾患において、ゲノム老化抑制の観点からの生活習慣の是正が可能になると期待される。上記に掲げた、しかし、3つのパラメータは、日々の診療に用いられるほど、感度よくゲノム老化性変化を反映するほどではなく、この目的のためには、より鋭敏なテロメア関連のゲノム老化指標が必要であると感ずるに至った。

### 2. 研究の目的

老化に伴うテロメア短縮を、あらためて見直すと、テロメア短縮の際には、テロメアの末端部分のごく一部が、環状になってゲノム DNA から欠失していくことが判明している。申請者らは、この欠失環状テロメアを経時的に定量性を持って追跡出来れば、テロメアの絶対的な長さに関連したパラメータの追跡では、不可能であった、ほぼリアルタイムのゲノム老化速度測定が可能になるのではないかと考えるに至った。

### 3. 研究の方法

環状テロメア DNA の抽出は、Rolling Circle Amplification (RCA) 法を用いて微量の環状テロメアを効率的に増幅して検出する方法を取った。これは、酵素反応により、糸車のように、環状 DNA をなぞるように何周にもわたって DNA を増幅する方法である。この増幅反応条件を揃えて、増幅反応産物をテロメアプローブによりドットハイブリダイゼーションで定量的に検出した。環状 DNA の抽出は、大腸菌からプラスミドを抽出するアルカリ法に準じた方法で行った。材料として、患者由来の末梢白血球のほか、定量性を確認するのに、培養細胞(血管内皮細胞)に過酸化水素を作用させたり、放射線照射処理を行うなど、老化促進する条件下での環状テロメア量の変化を捉えることも試みた。

上記と合わせ、これまで通り、平均テロメア長、テロメア長分布、サブテロメア領域メチル化を追跡し、比較検討した。

### 4. 研究成果

期待した環状テロメア DNA 定量は、検体や培養条件間でのバラツキが極めて大きく一定の傾向を得ることは出来なかった。環状テロメア DNA は、非腫瘍性の体細胞では極めて微量で、抽出操作毎に回収量がバラツキ、増幅を行った場合に、そのバラツキがさらに増幅され、一定の結果が得られなかったと推定している。

一方、疾病の種類によっては、予想されるほどテロメア短縮が目立たない例も見られることが判ってきた。当初は、テロメア長分布の解析

から、老化性変化は、テロメアの長い領域に、比較的良く反映されることが判っていたので、テロメアの長い細胞、すなわち若い細胞群の増減が影響していると考えていたが、ときに老化促進条件下で、むしろ平均テロメア長や長いテロメアの量が増加が観察されることは、この考えだけでは説明が出来ない。テロメア長分布をよく観察すると、初期の解析では、バラツキが大きく、老化指標としては使いにくいと判断していた短テロメア量の変化により、この奇妙な現象が起こっていることが判ってきた。この短テロメアの現象は、本研究申請以前の研究で、放射線照射によって誘導される培養細胞に見られるもので、極特殊な条件下に例外的に見られるものだと考えていたが、アルツハイマー病などの例では、長テロメアは、減少するのだが、短テロメアも減少していた。この短テロメアの変化は、通常の生理的老化の際に見られる短テロメアの増加とは相反する現象で、老細胞がよく死滅していることを示していると考えられる。つまり、このことは、緩やかに老化が進む時は、テロメアの長い若い細胞が減少し、テロメアの短い老細胞が増加するが、ある種の老化促進ストレス条件下では、老細胞は、そのストレスに耐えきれず、早々に死滅していくと考えられる。無論、このストレスは、テロメアを短縮する作用も併せ持つので、ゲノム老化を促進するが、細胞集団の平均テロメア長や、短縮の際に欠失してくる環状テロメア DNA を定量することでは区別することが出来ない異種の老化現象が存在することになる。長いテロメアと短いテロメアが同時に減少すると平均テロメア長の変化は相殺され、平均テロメア長は、ゲノム老化を反映しなくなるからである。これまでの、解析により、様々な病態で、テロメア短縮は誘発され、ゲノム老化が促進されるが、そのパターンには2種類存在することを突き止めることが出来たと言える。これは、老化促進性ストレスの中には、細胞老化に至る限界テロメア短縮が、早められる、つまり、余裕があるはずの長さのテロメアでも、細胞老化状態に誘導されるようなストレスと細胞老化とテロメア長の関連には影響を及ぼさないストレスという2種類の老化促進ストレスの存在を同時に暗示している。従って、従来、テロメア長を指標とした研究でヒトの老化性変化と関連が薄いとされた病態も、テロメア分布の観点から見直せば、違った評価になる可能性がある。

従来のテロメア長関連パラメータの解析では、疾病の有無のみならず、いくつかの臨床パラメータが、これらのテロメア長関連パラメータと相関することを突き止め、ゲノムの老化性変化を臨床検査結果から推定出来ることは、以前に報告したが、特殊温浴によるストレス発散効果によって、ゲノムの老化性変化を示す一連のパラメータの改善が確認されるとともに、意外なことにこれに伴い短テロメアが増加する、すなわち老細胞がよく保持されることが判った。これは、いわば細胞レベルでの長寿化を見たことになる。ここにきて、テロメアを指標とした

アンチエイジング戦略は、テロメアの短縮を抑制するだけでなく、テロメアが短くなっても正常細胞として細胞レベルの元気長寿を目指すという2方向性の戦略によりこれまでよりも効果的な抗老化を図れる方向性が示せたと言える。

#### 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22件)

- (1) 前田豊樹,小柳雅孔,尾山純一,樋口義洋,牧野直樹 種々の臨床検査値と末梢白血球テロメア関連パラメータとの連関の解析 適応医学 14;50-59:2011.
- (2) Makino N, Maeda T, Oyama JI, Sasaki M, Higuchi Y, Mimori K, Shimizu T. Antioxidant Therapy Attenuates Myocardial Telomerase Activity Reduction in Superoxide Dismutase-Deficient Mice. J Mol Cell Cardiol .50;670-677:2011.
- (3) Maeda T, Kurita R, Yokoo T, Tani K, Makino N. Telomerase inhibition promotes an initial step of cell differentiation of primate embryonic stem cell. Biochem. Biophys. Res. Commun. 407;491-494:2011.
- (4) Jing-Zhi Guan, Wei-Ping Guan, Toyoki Maeda,Naoki Makino The effect of vitamin E administration on the elevated oxygen stress and the telomeric and subtelomeric status in Alzheimer 's disease. Gerontology 58;62-69:2011.
- (5) Jing-Zhi Guan, Toyoki Maeda, Naoki Makino The subtelomere of short telomeres is hypermethylated in Alzheimer 's disease Aging and Disease 3;164-170:2011.
- (6) Jing-Zhi Guan, Wei-Ping Guan, Toyoki Maeda,Naoki Makino Different levels of hypoxia regulate telomere length and telomerase activity. Aging Clin Exp Res. 24;213-217:2012.
- (7) Toyoki Maeda, Jing Zhi Guan, Masamichi Koyanagi, Yoshihiro Higuchi, Naoki Makino. Aging-associated alteration of telomere length and subtelomeric status in female patients with Parkinson 's disease. Neurogenetics 26;245-251:2012.
- (8) Jing-Zhi Guan, Wei-Ping Guan, Toyoki Maeda, Naoki Makino. Alteration of telomere length and subtelomeric methylation in human endothelial cell under different levels of hypoxia Archives of Medical Research 43;15-20:2012.
- (9) Oyama JI, Yamamoto H, Maeda T, Ito A, Node K, Makino N. Continuous Positive Airway Pressure Therapy Improves Vascular Dysfunction and Decreases Oxidative Stress in Patients With the Metabolic Syndrome and Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Clin Cardiol .35;15-20:2012.
- (10) Oyama JI, Maeda T, Sasaki M, Higuchi Y, Node K, Makino N. Repetitive hyperthermia attenuates progression of left ventricular hypertrophy and increases telomerase activity in hypertensive rats Am J Physiol-Heart Circ Physiol 302;H2092-2101:2012.
- (11) Yoshihiro Higuchi, Masamichi Koyanagi, Toru Kubota, Toyoki Maeda, Arthur Feldman, Naoki Makino. Upregulation of Anticoagulant Proteins, Protein S and Tissue Factor Pathway Inhibitor, in the Mouse Myocardium with Cardio-Specific TNF-  $\alpha$ 3B1; Overexpression Am J Physiol-Heart Circ Physiol 302; H2352-2362:2012.
- (12) Ishimaru S, Mimori K, Yamamoto K, Inoue H, Imoto S, Kawano S, Yamaguchi R, Sato T, Toh H, Iinuma H, Maeda T, Ishii H, Suzuki S, Tokudome S, Watanabe M, Tanaka JI, Kudo SE, Sugihara KI, Hase K, Mochizuki H, Kusunoki M, Yamada K, Shimada Y, Moriya Y, Barnard GF, Miyano S, Mori M. Increased Risk for CRC in Diabetic Patients with the Nonrisk Allele of SNPs at 8q24. Ann Surg Oncol. 19; 2853-2858:2012.
- (13) Maeda T, Jing-Zhi Guan, Koyanagi M, Makino N. The gender-related alterations in the telomere length and subtelomeric methylation status in patients with Parkinson 's disease Ageing Res 4;61-66:2012.
- (14) Toyoki Maeda, Katsumasa Nakamura, Kazushige Atsumi, Masakazu Hirakawa, Yasuko Ueda, Naoki Makino Radiation-associated telomere length changes of peripheral leukocytes of inpatients with cancer International. Journal of Radiation Biology 89;106-109:2012.
- (15) Maeda T, Jing-Zhi Guan, Koyanagi M, Makino N. Telomerase activity and telomere length distribution in vascular endothelial cell in a short-term culture under the presence of hydrogen peroxide. Geriatrics

and Gerontology International 13;774-782: 2013.

(16) J-Z. Guan, T. Maeda, N. Makino. Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leucocytes in female patients with Alzheimer 's disease Aging Clin Exp Res 25;17-23:2013.

(17) Jun-ichi Oyama, Yoshihiro Kudo, Toyoki Maeda, Koichi Node, Naoki Makino. Hyperthermia by bathing in a hot spring improves the cardiovascular functions and reduces the production of inflammatory cytokines in patients with chronic heart failure. Heart and Vessels 13;774-782: 2013.

(18) Maeda T, G. Jing-Zhi, Koyanagi M, Makino N. Alterations in the telomere length distribution and the subtelomeric methylation status in human vascular endothelial cells under elevated temperature in culture condition. Aging Clin Exp Res 25;231-238:2013.

(19) 前田豊樹. 別府市高齢者に置ける温泉利用の実態と既往歴との関連の調査について. 日本温泉気候物理医学会雑誌 77;26-28:2013.

(20) Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. Exp Gerontol. 25;15-27:2014.

(21) Toyoki Maeda, Jing-Zhi Guan, Masamichi Koyanagi, Naoki Makino. Vascular endothelial cell surviving through under prolonged elevated temperature shows persistent or transient up-regulation of telomerase and stress-associated proteins. Appl Cell Biol 2;:2014

(22) Toyoki Maeda1, Jing-Zhi Guan, Masamichi Koyanagi, Naoki Makino. X-irradiation alters

the telomerase activity and the telomere length distribution of cultured human vascular endothelial cells Appl Cell Biol 3;: 2014.

〔学会発表〕(計9件)

(1) 前田豊樹, 牧野直樹 外来男性生活習慣病患者における各種臨床検査値と末梢白血球テロメア長関連パラメータについて 第53回日本老年医学会学術集会(東京, 2011,6/16)

(2) 前田豊樹, 牧野直樹 パーキンソン病女性患者における末梢白血球テロメア長の変化について第22回日本老年医学会九州地方会(佐賀, 2012, 3/3)

(3) 前田豊樹 温熱効果のテロメア DNA 老化性変化への影響の解析 平成23年度日本健康開発財団研究助成発表会(東京, 2012, 3/12)

(4) 前田豊樹, 工藤義弘, 西山保弘, 牧野直樹 鉱泥浴治療効果の客観的指標の探索 第77回日本温泉気候物理学会(仙北, 2012, 6/8-9)

(5) 前田豊樹, 牧野直樹 アルツハイマー病女性患者における末梢白血球テロメア長の変化について 第54回日本老年医学会学術集会(東京, 2012, 6/28-30)

(6) 前田豊樹, 牧野直樹 心エコー検査による心機能評価と白血球テロメア長の相関について 第23回日本老年医学会九州地方会(福岡, 2013, 3/9)

(7) 前田豊樹 別府市高齢者における温泉利用の実態と既往歴との関連の調査について 第78回日本温泉気候物理医学会(シンポジウム)(別府, 2013, 5/24-25)

(8) DNAと老化と病気 前田豊樹 平成25年度別府女医会(別府, 2013, 5/17)

(9) Toyoki Maeda Telomere length distribution of circulating leukocytes in patients with Alzheimer 's disease. XXII World Congress of Neurology (Sept 21-26, Vienna)

〔図書〕(計1件)

ヒトの分子遺伝学(翻訳)第4版(第21章) 村松正實、小南凌監修 メディカル・サイエンス・インターナショナル 2011.

〔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

<http://www.beppu.hosp.kyushu-u.ac.jp/naika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 豊樹 (MAEDA TOYOKI)  
九州大学病院別府病院 准教授  
研究者番号：30264112

(2) 研究分担者

牧野 直樹 (MAKINO NAOKI)  
九州大学病院別府病院 教授  
研究者番号：60157170

小柳 雅孔 (KOYANAGI MASAMICHI)  
九州大学病院別府病院 助教  
研究者番号：00325474

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：