

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590468

研究課題名(和文)テロメア依存性細胞老化に関与する遺伝子の機能解析：hTERT、WRNを中心に

研究課題名(英文)Analyses of gene function for telomere dependent cellular senescence

研究代表者

石川 直(Ishikawa, Naoshi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30184485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：1)本研究に関連する論文作成に多くの時間を費やした。その結果、英文原著2報、英文総説1報を採択出版できた(業績参照)。2)正確なコントロール確立のためテロメア配列を導入したプラスミッドに対しQ-FISH法によりテロメア長定量解析を行った。テロメア光度の出現パターンは確認、正確な検量方法確立のため実験を継続中。3)共同研究により、メダカのテロメアが発生成長期に短縮したのち伸長する動態を発表した。テロメア長を検知して恒常性を維持する機構を示唆する現象として重要な知見と考える(業績文献)。4)これまでの研究により、細胞系列特異的増殖動態を判断する指標としてテロメア短縮が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the in vivo telomere dynamics in Werner syndrome, trisomy 21, and diabetes. Furthermore, our studies of telomere dynamics in patients after living-donor liver transplantation, and in patients with alcoholism and actinic keratosis, have revealed possible factors impacting on telomere maintenance. We also observed end-to-end chromosome fusion in human fibroblast strains at the senescent stage with very short telomeres, and some tumor cells, suggesting that telomere loss could play a role in genetic instability associated with tumorigenesis. Recently, we analyzed details of the telomere dynamics in iPS cells, indicating that telomere has been lengthen or well maintained during reprogramming process. The telomeres of some iPS cell strains became shorter as passages increased without differentiation induction, and those strains showed chromosomal abnormalities. The data suggested that telomere shortening could be a novel marker of iPS cell quality.

研究分野：分子病理学

キーワード：テロメア リプログラミング ウェルナー症候群 加齢 線維芽細胞 細胞老化 iPS細胞 ダウン症

1. 研究開始当初の背景

染色体末端のテロメア構造は真核生物に普遍的に存在し、染色体融合を防いで染色体を維持する。一方、テロメア短縮による細胞老化(細胞増殖停止)は、個体老化にも重要な要因であると考えられているが、未説明の点が多く残されている。

私達はサザンブロット法によりヒト臓器別のテロメア長(世界的にも過半数を占める)を報告してきた(連携研究者:田久保・仲村)。広範な解析から、個体差の大きいテロメア長が細胞・組織特異的に調節されること(引用文献1、Takubo et al., 2002) また Post-mitotic 細胞(大脳灰白質)解析から生来のテロメア長と癌死に反相関を見出し、長いテロメアが長寿命と相関することを世界で初めて報告して注目された(引用文献2、Nakamura et al., 2007)。最近ヒトでは下垂体テロメアが最も長いことを証明し、テロメア長解析の普遍的有効性を報告した(引用文献3、Ishikawa et al., 2011)。

ペプチド核酸(peptide nucleic acid)をプローブに用いた quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH)法は、カナダ BC Cancer Center の Lansdorp らが開発した。定量性に優れた手法として世界水準の論文で採用されているが、疾患に用いた報告は少なく、技術習熟したラボも限られている。私達はその精度において世界レベルに達している日本では唯一のラボである(連携研究者:田久保・仲村)。最近、私達は本手法によりヒト正常線維芽細胞の染色体別テロメア長を解析し、株特異的テロメア短縮と染色体融合の関連を解明した(引用文献4、Takubo et al. 2010)。

ウェルナー症候群(Werner syndrome, WS)は成熟後発症する典型的早老症として加齢研究の鍵を握ると注目され研究されて来た。責任遺伝子 WRN 遺伝子はテロメア維持に重要な働きをすることが報告されて来たが、WS 患者組織の in vivo テロメア長解析の報告はなかった。私達は、最近英文誌に、WS 患者皮膚のテロメア長はコントロール群に比べ短く、約 20 年短縮が亢進していること、post-mitotic 細胞からなる骨格筋においても、個体差が見られるものの患者群で有意に短縮していることを報告した(引用文献5、Ishikawa et al., 2011)。WS は日本人に特異的に多く発症することからも、本症の病態の解明と治療法の確立は日本人研究者の重要課題である。

2. 研究の目的

テロメア短縮とテロメア機能不全(染色体癒合や欠失頻度亢進)の関連が知られている。私達は個体間および細胞株間で両者の関係性の差の大きいことを明らかにしてきたが、それらが生じる機序の詳細は殆ど不明である。テロメア維持に関与する遺伝子(hTERT, WRN)の導入・欠失によるテロメア動態変化

とテロメア機能不全の変動との相関を多種類の培養細胞を対象とした分子レベル(染色体長短腕毎)でのテロメア長の詳細解析を通して、テロメア構造が破綻し機能不全に陥る原因(細胞老化や癌化に繋がる)を解明し、不全状態を未然に回避する手掛かりを探る。

3. 研究の方法

1) 正常ヒト線維芽細胞株およびウェルナー患者由来線維芽細胞株を細胞老化に至るまで継代培養する。経時的にサンプリングし、サザンブロット法で terminal restriction fragment (TRF) 長、および metaphase spread から Q-FISH 法でテロメア長を求める。両者の値から、サブテロメア長と染色体別テロメア長を求める。また、染色体核型解析(染色体癒合: Telomere association: TAS)も合わせて行う。テロメア動態を示す諸因子と染色体不安定現象(特に TAS)出現頻度や細胞周期変化との相関について統計学的解析を行う。

2) hTERT 遺伝子導入細胞について同様の解析を行う。(不死化細胞株では元株と導入初期、安定期を比較)

3) 他の正常細胞株およびウェルナー患者由来線維芽細胞株への遺伝子導入実験を試みる。

4) 当初の方法に加え、(研究協力者豊田雅士博士らにより作製された)山中4因子(遺伝子)導入によりリプログラムされた iPS 細胞(ヒト線維芽細胞株および羊膜細胞由来)のテロメア長・染色体特異性等について、測定・検討した。

4. 研究成果

1) 本研究に関連する(テロメア長調節に関する)論文作成(自著総説および共同研究者論文の添削、査読者に対する応答等)に多くの時間を費やした。その結果、国際紙に英文原著 14 報、英文総説 1 報が採択された(業績参照)。Corresponding author として 4 報。

2) これまでの私達の実験系の検討、および最近のテロメア学における国際共同研究等から、テロメア長の定量解析には正確なコントロール(確定した target sequence)が重要であると指摘されている。私達はシーケンスの明確であるテロメア配列をプラスミッドに導入し、Q-FISH 法によりテロメア長定量解析の予備実験を行った。テロメア光度の出現パターンは確認できたが、正確な検量線(検量方法)を確立するには至っていない。(実験継続中である)

3) WS 患者由来の線維芽細胞株(WRN 欠失細胞)において、これまでの私達の予備的実験により推測されている事象;(作業仮説c) 供与者年齢補正後の正常線維芽細胞との比較で WS 線維芽細胞の分裂能が低いこと(最大 PDL が正常株より小さい)を解析株数を増やして(最終 PDL まで培養し)明らかにした。

4) (研究協力者豊田雅士博士らにより)山中4因子(遺伝子)導入によりヒト線維芽細胞

から iPS 細胞株の樹立が試みられたが、現在のところ樹立株は得られていない。細胞老化に近いパッセイジを用いたためリプログラム効率が悪かった可能性が考えられた。現在より継代数の若い細胞を用いた実験を計画している。また、京都大学 CiRA から TIG 由来 iPS 細胞株を入手して、親株とのテロメア長変異を解析中。

5) 共同研究により、メダカのとテロメアが発生成長期に『振動しながら』短縮したのち伸長する動態を発表した。テロメア長を検知して恒常性を維持する機構を示唆する現象として重要な知見と考える(業績文献)。

6) 当研究課題期間中に纏められの研究から、細胞系列特異的増殖動態を判断する指標としてテロメア短縮が重要であることが示唆された。

<引用文献>

1. Takubo et al., *Exp. Geront.* 37, 523-531(2002)
2. Nakamura K, Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Kishimoto H, Fujiwara M, Kato M, Oshimura M, Ishii A, Ishikawa N. Telomere DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older. *Exp Gerontol* 42: 944-950, 2007
3. Ishikawa, N., Nakamura, K., Izumiyama, N., Aida, J., Sawabe, M., Arai, T., Kishimoto, H., Fujiwara, M., Ishii, A., Takubo, K. : Telomere length dynamics in the human pituitary gland: robust preservation throughout adult life to centenarian age. *Age*, 34, 795-804, 2012
4. Takubo K, Aida J, Izumiyama N, Ishikawa N, Fujiwara M, Poon SSS, Kondo H, Kammori M, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Baird DM, Nakamura K. Chromosomal instability and telomere lengths of each chromosomal arm measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicative senescence. *Mech Age Dev.*, 131, 614-624, (2010)
5. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A, Kuroiwa M, Takubo K. Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2011 Apr;3(4):417-29.

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 15 件)

Tamura Y, Izumiyama-Shimomura N, Kimbara Y, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J, Chiba Y, Matsuda Y, Mori S, Arai T, Fujiwara M, Poon SSS, Ishizaki T, Araki A, Takubo K, Ito H. Telomere attrition in beta and alpha cells with age. *AGE*, 2016; 38:61. 査読有、DOI

10.1007/s11357-016-9923-0.

Hitoshi Hatakeyama, Hiromi Yamazaki, Ken-Ichi Nakamura, Naotaka Izumiyama-Shimomura, Junko Aida, Hiroetsu Suzuki, Shuichi Tsuchida, Masaaki Matsuura, Kaiyo Takubo, and Naoshi Ishikawa. Telomere attrition and restoration in the normal teleost *Oryzias latipes* are linked to growth rate and telomerase activity at each life stage. *AGING* January 2016, Vol. 8 No 1 (Received: 09/25/15; Accepted: 01/18/16; Published: 01/20/16 Online ISSN: 1945-4589, PMID: 26789258, PMCID: PMC4761714 査読有。

Changes of telomere status with aging: An update
Naoshi Ishikawa, Ken-Ichi Nakamura, Naotaka Izumiyama-Shimomura, Junko Aida, Yoko Matsuda, Tomio Arai and Kaiyo Takubo. *Geriatr Gerontol Int* 2016; 16 (Suppl. 1): 30-42. 査読有、doi: 10.1111/ggi.12772

Matsuda Y, Ishiwata T, Izumiyama-Shimomura N, Hamayasu H, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Arai T. Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. *PLoS One* 10: e0117575. 2015 査読有。

Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Arai T, Toyoda M, Nakamura K, Takubo K. Arm-specific telomere dynamics of each individual chromosome in induced pluripotent stem cells revealed by quantitative fluorescence *in situ* hybridization. *Tissue Cell* 2014; 46, 470-476 査読有。

Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Terai M, Matsuda Y, Aida S, Arai T, Takubo K. Determination of telomere length by the quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) method. *Am J AnalChem* 2014;5:775-83. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2014.512086> 査読有。

Tamura Y, Izumiyama-Shimomura N., Kimbara Y., Nakamura K., Ishikawa N., Aida J., Chiba Y., Mori S., Arai T., Aizawa T., Araki A., Takubo K., Ito H. Beta Cell Telomere Attrition in Diabetes: Inverse Correlation Between HbA1c and Telomere Length. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 2771-2777 査読有。

Kawano Y., Ishikawa N., Aida J., Sanada Y., Izumiyama-Shimomura N., Nakamura K.,

Poon SSS., Matsumoto K., Mizuta K., Uchida E., Tajiri T., Kawarasaki H., Takubo K. Q-FISH measurement of hepatocyte telomere lengths in donor liver and graft after pediatric living-donor liver transplantation: Donor age affects telomere length sustainability. *PLoS One* 2014;9: e93749, <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0093749> 査読有。

Ikedo H., Aida J., Hatamochi A., Hamasaki Y., Izumiyama-Shimomura N., Nakamura K., Ishikawa N., Poon S.S., Fujiwara M., Tomita K., Hiraishi N., Kuroiwa M., Matsuura M., Sanada Y., Kawano Y., Arai T., Takubo K. Quantitative fluorescence in situ hybridization measurement of telomere length in skin with/without sun exposure or actinic keratosis. *Hum Pathol* 2014; 45: 473-480. 査読有。

Sanada Y., Kawano Y., Miki A., Aida J., Nakamura K., Izumiyama NS., Ishikawa N., Arai T., Hirata Y., Yamada N., Okada N., Wakiya T., Ihara Y., Urahashi T., Yasuda Y., Takubo K. Maternal grafts protect daughter recipients from acute cellular rejection after pediatric living donor liver transplantation for biliary atresia. *Transpl Int* 2014, 27, 383-390, 査読有、doi: 10.1111/tri.12273.

Nakamura K., Ishikawa N., Izumiyama N, Aida J, Kuroiwa M, Hiraishi N, Fujiwara M, Nakao A, Kawakami T, Poon SSS, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere Lengths at Birth in Trisomy 18 and 21 Measured by Q-FISH. *Gene* 2014; 533: 199-207. 査読有。

Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K., Aida J, Ishikawa N., Kuroiwa M, Hiraishi N, Fujiwara M, Ishikawa Y, Inoshita N, Yonese J, Matsuura M, Poon SS, Arai T, Takubo K. Short telomeres and chromosome instability prior to histologic malignant progression and cytogenetic aneuploidy in papillary urothelial neoplasms. *Urol Oncol* 2014; 32: 135-145. 査読有。

Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N., Sawabe M, Arai T, Fujiwara M, Ishihii A, Nakamura K., Takubo K. Association of telomere shortening in myocardium with heart weight gain and cause of death. *Sci Rep*, 2013 sre02401. 査読有。

Aida J, Yokoyama A, Shimomura N, Nakamura K., Ishikawa N., Terai M, Poon SSS, Matsuura M, Fujiwara M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere shortening in the esophagus of Japanese alcoholics: Relationships with chromoendoscopic findings, ALDH2 and ADH1B genotypes and smoking history. *PLoS*

One, 8: e63860, 2013 <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063860> 査読有。

Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N., Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K., Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*, 2013, 査読有、doi: 10.1016/j.tice.2013.07.003.

〔学会発表〕(計 16 件)

石川直, 仲村賢一, 泉山七生貴, 相田順子, 田久保海誉 テロメア短縮の 2 相性 (若年期の急速短縮と中高年期の緩徐な短縮) からヒト老化プロセスを再考する 第 38 回日本基礎老化学会大会 パシフィコ横浜 (横浜) 2015.6.13,14

相田順子, 泉山七生貴, 石川直, 直井美穂, 富田健一郎, 長谷川佳代, 藤原睦憲, 松田陽子, 新井富生, 田久保海誉 上皮小体好酸性細胞は老化細胞か 第 104 回日本病理学会総会 名古屋国際会議場 (名古屋) 2015.4.30-5.2

松田陽子, 泉山七生貴, 富田健一郎, 平石直己, 仲村賢一, 石川直, 相田順子, 田久保海誉, 新井富生 膵腺房中心細胞におけるテロメアの短縮と加齢, 発癌, 組織幹細胞との関連第 104 回日本病理学会総会 名古屋国際会議場 (名古屋) 2015.4.30-5.2

平石直己, 藤原睦憲, 相田順子, 泉山七生貴, 仲村賢一, 石川直, 直井美穂, 松田陽子, 新井富生, 田久保海誉 下垂体細胞のテロメアは加齢で短縮するか? -男女別, 前葉, 後葉別テロメア長の検討- 104 回日本病理学会総会 名古屋国際会議場 (名古屋) 2015.4.30-5.2

Aida J, Yokoyama A, Shimomura K-I, Nakamura N., Ishikawa N., Fujiwara M, Matsuda Y, Arai T, Takubo K. Telomere Shortening in Oral Epithelium in Relation To ADH 1B and ALDH 2 Genotypes and Clinicopathologic Findings, 104th Annual Meeting of United States & Canadian Academy of Pathology, Boston, USA, 2015. 3.21-28

Ishikawa N., Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Nakamura K., Takubo K. Q-FISH measurement of hepatocyte telomeres in donor & graft after living-donor liver transplantation. 第 37 回日本基礎老化学会大会, 愛知健康プラザ / 健

康科学館（大府市），2014.06.26-27

Nakamura K, Hirose N, Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Takubo K. Telomere length of iPSC cells measured by Q-FISH method. 第 37 回日本基礎老化学会大会, 愛知健康プラザ / 健康科学館（大府市）, 2014.06.26-27

仲村賢一、杉浦善弥、泉山七生貴、石川雄一、藤原睦憲、石川直、相田順子、新井富生、田久保海誉。脂肪腫と異型脂肪腫様腫瘍の細胞遺伝学的、染色体の安定性とテロメア長の差異。第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議 / ANA クラウンプラザホテル広島（広島）, 2014.04.24-26

石川直、泉山七生貴、相田順子、仲村賢一、藤原睦憲、新井富生、田久保海誉。臍臓を構成する細胞系列別のテロメア長の Q-FISH 法による解析：加齢および糖尿病病態との相関の検討。第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議 / ANA クラウンプラザホテル広島（広島）, 2014.04.24-26

相田順子、泉山七生貴、仲村賢一、石川直、杉浦善弥、藤原睦憲、新井富生、田久保海誉。口腔粘膜におけるテロメア短縮とアルコール代謝酵素 ADH1B、ALDH2 の遺伝子型。第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議 / ANA クラウンプラザホテル広島（広島）, 2014.04.24-26

Ishikawa N, Nakamura K, Shimomura N, Aida J, Goto M, Ishikawa Y, Matsuura M, Hatamochi A, Takubo K.: Accelerated in vivo and in vitro telomere loss in werner syndrome. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Seoul, Korea, 2013.6.23-27.

仲村賢一、広瀬信行、下村-泉山七生貴、相田順子、石川直、田久保海誉：Q-FISH 法により測定したテロメア長を指標とした超百歳リンパ球から樹立された iPSC 細胞の評価。第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館（札幌）, 2013.6.6-8.

石川直、仲村賢一、下村-泉山七生貴、相田順子、寺井政憲、豊田雅士、田久保海誉：iPSC 細胞化によるリプログラミング過程でのテロメア動態の Q-FISH 法による解析。第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館（札幌）, 2013.6.6-8.

相田順子、泉山七生貴、仲村賢一、石川直、直井美穂、藤原睦憲、櫻井うらら、新井富生、田久保海誉：糖尿病において β 細胞のテロメアは短縮するか？ - α, β 細胞別テロ

メア長の検討。第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館（札幌）, 2013.6.6-8.

Terai M, Ishikawa N, Toyoda M, Aida J, Takubo K. Chromosomal instability could be induced by telomere shortening although established iPSCs maintain telomerase activity. CiRA International Symposium 2013 "Raising the Next Generation of Stem Cell Research." Kyoto University (Kyoto), 2013, 3.11-12

Ishikawa N, Terai M, Toyoda M, Nakamura K, Shimomura-Izumiyama N, Takubo K. The telomeres of the parental cells were elongated by establishment iPSCs, but the telomere extension rate differed among the clones. CiRA International Symposium 2013 "Raising the Next Generation of Stem Cell Research." Kyoto University (Kyoto), 2013, 3.11-12

〔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
高齢者がん研究グループホームページ
<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川直 (ISHIKAWA, Naoshi)

所属機関：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

部局：東京都健康長寿医療センター研究所

研究員

研究者番号：30184485

(2)連携研究者

1. 仲村 賢一 (NAKAMURA, Ken-ichi)

所属機関：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

部局：東京都健康長寿医療センター研究所
研究員

研究者番号：60159069

2. 田久保 海誉 (TAKUBO, Kaiyo)

所属機関：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

部局：東京都健康長寿医療センター研究所
研究部長(平成 24-26 年)

研究員(平成 27 年)

研究者番号：00154956