

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790397

研究課題名(和文) 老化に伴う疾患予防及び治療へ向けた老化指標解明のための基盤研究

研究課題名(英文) Groundwork study for senescence indicator leading to diseases prevention and treatment with the aging

研究代表者

板倉 陽子 (Itakura, Yoko)

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：30582746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化と個体老化における相関を明確にするため、由来年齢・継代数の異なる老化モデル細胞および高齢心疾患患者由来細胞の細胞形態・増殖能・表面マーカー・糖鎖変化における比較解析を実施した。その結果、老化モデル細胞の糖鎖プロファイルにおける比較解析により、シアル酸に特徴的な変化が細胞老化および個体老化において生じることが示唆された。また、高齢患者由来の細胞では幹細胞マーカーなどに個体差は認められず、継代に応じた変化が確認された。以上により、糖鎖変化による老化指標の可能性を見出した。また、臨床検体由来細胞との比較から得られる結果は、今後、疾患との関連性を明らかにする指標として大きく期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated cellular senescence and human aging-dependent glycan changes on human diploid fibroblasts derived from differently-aged skin and human cardiac cells derived from elderly patient with heart disease using lectin microarray. The glycan profiles in their early passage of elderly-derived fibroblasts were different from those of fetal-derived fibroblasts, especially 2-6sialylated glycan forms. Moreover, mesenchymal stem cell markers, such as CD-antigens including glycoproteins, in patient-cardiac cells were decreased in cellular senescence. Therefore, it was suggested that the glycan change has the potential for senescence indicator. In the future, these findings will be helpful to evaluate the various multipotent stem cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 細胞老化 個体老化 再生 レクチンマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化には細胞老化と個体老化という2つの事象が存在し、一般的に細胞老化の蓄積が個体老化へ影響を及ぼしているのではないかと考えられている。加齢とともに増加する各種疾患は、こうした細胞老化が生体内で機能的悪影響を及ぼしていることに起因すると予想される。そのため、当該研究分野において細胞の特性を調べ、老化の原因解明につなげようという動きが活発化してきた。1960年代、Hayflickらは生体外における細胞培養を実施し、細胞の分裂寿命を発見(Hayflick and Moorhead, *Exp. Cell Res.*, 1961)、さらに細胞の増殖速度の低下を確認した。その後、この老化細胞(WI-38)類似の特性を持ついくつかの細胞株が樹立され、細胞老化研究の材料として、部位特異的な老化マーカー、テロメアーゼ活性、ミトコンドリアDNAなど様々な性質が研究されている(Dimri et al., *PNAS*, 1995, Harley et al., *Nature*, 1990, Hayashi et al., *JBC*, 1994)。

(2) 高齢化社会を迎えた現在の日本において、老化現象の解明は個人の生活確保のみならず、社会・経済においても必要不可欠な課題となっている。ここ数年、厚生労働省主体の科学研究費助成課題にも老化をテーマとした項目は数多く挙げられている。近年では肥満や遺伝子変異による老化への影響なども報告されている(Lin et al., *Aging Cell*, 2011, Maxwell et al., *PNAS*, 2011)。しかし、細胞老化および個体老化に関し、明確な関連性や老化そのものの指標はいまだ確立していない。

(3) 過去の研究から、細胞の糖鎖変化は様々な状況に応じて生じることが明らかとなっている。がん化や分化に伴い変化する糖鎖は生体機能における異常や変異と密接な関係にあると予想される。また、細胞表層に多くの機能糖鎖があることから、細胞間接着や情報伝達において生体内変化に非常に重要だと考えられる。事実、これまで申請者自身はレクチンと呼ばれる糖結合性タンパク質と糖鎖の相互作用を解析することにより様々な細胞の糖鎖プロファイル解析を行ってきた。対象として、マウスおよびヒト由来胚性幹(ES)細胞ならびに胎児性がん(F9、NCR)細胞やその分化誘導体、各種間葉系幹細胞などの解析を実施してきた。そして、それらの細胞表層の糖鎖プロファイル解析により、細胞には固有の糖鎖プロファイルが存在し、種類や分化状態に応じて異なることを示してきた(Kuno and Itakura et al., *JPB*, 2008, Toyoda et al., *GTC*, 2011)。

(4) 上記のことから、老化現象に糖鎖がどのように関わるかを知ることは、老化におけるより詳細な細胞特性を知る上で非常に重要だといえる。しかし、現状では老化に伴う

糖鎖変化に関する知見は数少ない。老化マーカーを確立することあるいは老化の規定化を行うことで、老化に伴う疾患予防、機能回復が目指せるのではないかと考えた。そこで、細胞の老化に関わる糖鎖変化を検出し、老化に伴う細胞の質的变化および細胞老化と個体老化の関係性を明らかにし、老化の機能解明、さらには将来的な臨床応用への礎となることを目指した。

2. 研究の目的

(1) 現代の高齢化社会において、老化はそれに関わる疾患、介護、財政などの面において様々な問題を抱えうる。しかし、老化現象である2つの事象において、「細胞老化」と「個体老化」に関する明らかな相関はいまだ認められていない。一方で、様々な研究成果から細胞老化の蓄積が加齢に影響しているのではないかと予測されている。また、老化と呼ばれる機能異常の蓄積が加齢に伴う疾患を導いているのではないかと推測することは容易である。そこで、細胞の種類や状態を鋭敏に反映し、生体内における機能に深く関わる糖鎖を用いて、細胞老化および個体老化の解明を目指した。細胞老化および個体老化を示す糖鎖変化を指標とし、2つの老化にともなう生体内の動的変化を追求した。そして、将来的に、糖鎖変化そのものあるいはそれらを指標とすることで得られる生体内変化を解明することにより老齢疾患の治療および予防へと導くことを目指した。その第一歩として、老化を規定する指標の開発を実施した。

3. 研究の方法

(1) 当施設で大橋らによって樹立された、TIG(Tokyo Metropolitan Institute of Gerontologyの頭文字由来)とよばれるヒト皮膚繊維芽細胞である研究用老化モデル細胞および当該施設の患者である高齢の心疾患患者由来臨床検体から取得した細胞を対象に、レクチン-糖鎖間相互作用を解析するエバネッセント波励起型レクチンマイクロアレイ法を用いて、それらの細胞の抽出物から得られた糖鎖プロファイル情報を取得し、比較解析した。市販されているレクチンマイクロアレイ用チップ(LecChip)は基板上に45種類の様々な特異性を有するレクチンが固定されており、蛍光標識した糖タンパク質はレクチンに結合したもののみがシグナルとして検出される。このレクチン-糖鎖間相互作用解析による糖鎖のプロファイルは細胞特異的であり、細胞特性を再現性よく観察することに適しているため、細胞や継代回数特異的な糖鎖変化を統計的に検出した。

(2) 具体的には、「老化」を規定するために、由来年齢の異なる細胞を各々長期間培養し、経時的に細胞ペレットを回収した。その過程において、細胞形態、増殖速度、-ガラ

クトシダーゼ活性などを観察した。さらに、回収した細胞より抽出物を取得し、レクチンマイクロアレイ法による糖鎖プロファイル解析を実施した。サンプルには老化モデル細胞として知られる、正常ヒト皮膚繊維芽細胞（胎児：TIG-3S、高齢：TIG-101、TIG-102）を用い、糖鎖プロファイル解析にはエパネッセント波励起型レクチンマイクロアレイを使用した。

（3）細胞老化と個体老化の関連性を示すため、レクチンマイクロアレイ法により糖鎖プロファイルデータを取得すると同時に、主成分解析などの統計的な比較解析を実施した。

（4）採取条件の異なる（株化した継続培養および初代培養）細胞に焦点をあて、高齢患者由来の臨床検体から取得した細胞の糖鎖プロファイルを複数解析すると同時に、個体差を確認するために細胞増殖能および表面マーカー（血球・間葉系幹細胞）の確認を行った。また、臨床検体由来の細胞を経時的に回収し、継代回数に応じた糖鎖プロファイルを解析した。

4. 研究成果

（1）由来細胞の年齢により増殖停止に至る分裂回数は予想通り大きく異なっていた。胎児由来の細胞において分裂倍加指数（PDL）がおよそ90であるのに対し高齢者由来の細胞ではおよそ60付近であった。

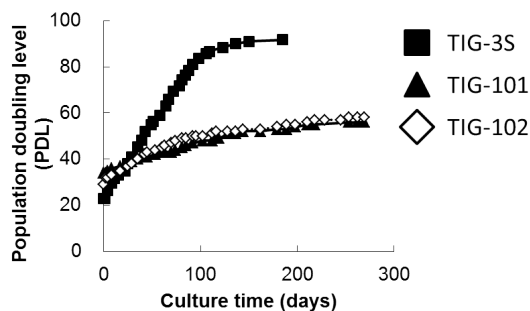


図1 胎児および高齢者由来細胞における増殖曲線

（2）各培養段階において経時的に取得した細胞の抽出物では、細胞種特異的な糖鎖プロファイルが得られ、年齢に応じて特定のレクチンシグナルが増加または減少するなど、年齢ごとに異なる糖鎖プロファイル変化を示し、継代回数に応じて特有の変化を示すことが示唆された。一方で、統計的な解析により得られた各細胞に共通する糖鎖プロファイル変化では、継代回数の増加に応じて一部のO結合型糖鎖の露出を示唆する結果となった。

（3）由来年齢の異なる細胞の比較において

は、細胞の年齢に応じて変化が見られたのは主に 2-6シアル酸含有糖鎖であり、胎児と高齢者由来の細胞間において顕著な差が存在していた。

以上のことから、糖鎖プロファイル変化が細胞および個体の老化に反映されていることが示唆され、細胞老化と個体老化を示唆する糖鎖プロファイルの間には統計的にも有意な特徴があり、2種の老化に関わる糖鎖変化の存在が示された。これは、生体内の老化に伴う変化を調べるうえで重要な指標となり得る。

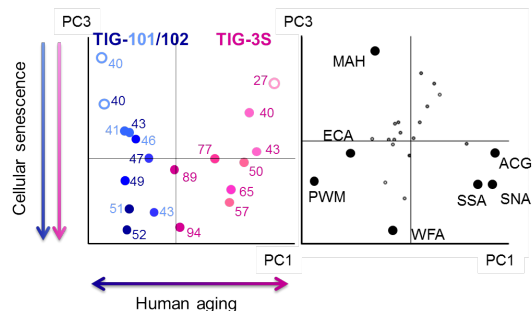


図2 胎児および高齢者由来細胞の糖鎖プロファイルデータにおける主成分解析

（4）高齢患者から取得した細胞は一部を除き非常に早い段階（PDLがおよそ10-15）で増殖を停止した。また、間葉系幹細胞マーカーなど複数の細胞表面マーカーに大きな差は認められなかった。一方、糖鎖においては、皮膚の細胞とは異なり、検体に特徴的なプロファイルが得られた。また、上記の結果として、経時的な糖鎖プロファイル変化では、老化モデル細胞において特定のレクチンシグナルが増加することを示したが、一部の臨床検体由来細胞においても同様の結果が得られた。しかし、疾患または個体差との関連性についてはさらに複数の継続的な解析が必要であると考えられた。

以上により、高齢心疾患患者由来の細胞老化における糖鎖変化を検出しており、今後、本研究に用いた細胞のように由来組織および疾患などの状態を考慮した細胞老化ならびに個体老化における糖鎖変化の相関を示すことで、再生医療における細胞移植療法のための安全で効率的な細胞の評価や高齢疾患に対する治療および予防に応用可能な老化指標の可能性を見出した。

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）

〔学会発表〕(計 2 件)

板倉陽子、老化指標を導く糖鎖プロファ

イル変化の解析、第 37 回日本基礎老化学
会大会、平成 26 年 6 月 26 日(木)～
平成 26 年 6 月 27 日(金)、あいち健康
プラザ(愛知県・知多郡東浦町)

板倉陽子、MONITORING OF THE DAMAGE TO
FREEZE-THAWED CELLS BY GLYCAN
PROFILING USING A LECTIN MICROARRAY、
ISSCR 10th Annual Meeting、平成 24 年
6 月 13 日(水)～平成 24 年 6 月 15
日(金)、パシフィコ横浜(神奈川県・横
浜市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/ketsukanihaku.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 陽子 (ITAKURA, Yoko)

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：30582746