

東邦大学審査学位論文（博士）の要旨

論文要旨

【論文題目】

Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses

【論文要旨】

DNA、ヒストンの化学修飾や non-coding RNA に代表されるエピジェネティック制御は、遺伝子発現、発生やがんなどの疾患の発症に深く関わっている。細胞老化は大きく 2 種類に分類され、細胞分裂の繰り返しによるテロメア短縮を起因とする複製老化と、テロメアの長さに関係なくストレスにより誘導される早期誘導老化がある。細胞老化でもエピジェネティック制御を受けることが推察されているが、細胞老化とエピジェネティック制御の関係は未だ不明な部分が多い。

本研究では、genetic background を統一させるため同一の培養細胞 (Normal human diploid fibroblast TIG-3 細胞) を用いて、複製老化と早期誘導老化として活性化がん遺伝子 *ras* の導入によるストレス誘導老化と温度感受性 SV40T 抗原でトランスフォームした不死化細胞 (SVts8 細胞) を非許容温度下で速やかに老化誘導した細胞を老化のモデル系とし、遺伝子発現と DNA メチル化変化をマイクロアレイで測定することで、老化誘導の機構の違いを考慮しながら、細胞老化特異的なエピゲノムの網羅的な解析を試みた。老化細胞とコントロール細胞 (増殖細胞) から取得したゲノムワイドな遺伝子発現及び DNA メチル化解析結果を統合解析することで、DNA メチル化制御を受けた遺伝子の検索を行った。

異なる方法で誘導した老化細胞の遺伝子発現パターンを比較したところ、細胞増殖制御に必須の細胞周期や免疫に関わる遺伝子が共通して変動するが、各老化細胞で変動する遺伝子群は違う事が分かった。DNA メチル化解析では、複製老化細胞では継時的な DNA メチル化変化を認めたが、*ras* 誘導老化細胞や非許容温度下で老化誘導した SVts8 細胞では、DNA メチル化にほとんど変化がなかった。このことにより、老化誘導環境により DNA メチル化変化が大きく変わり、遺伝子発現へ関与する要因も変わると考えられる。複製老化における遺伝子発現と DNA メチル化解析結果を統合解析したところ、大多数の遺伝子は DNA メチル化制御を受けないが、細胞周期や免疫に関わる遺伝子を含む 759 遺伝子で、DNA メチル化での遺伝子発現制御を示唆する結果が得られた。また、免疫に関わる遺伝子では、non-CpG island 領域 (open sea) が多く低メチル化され、高発現に関与している可能性が示唆された。さらに、プロモーター領域の高メチル化とともに発現の低下を認めた microRNA のターゲット候補遺伝子には、細胞老化やがんなどに関連する遺伝子が含まれる事がわかった。これらの結果により、複製老化の導入や確立に関わる一部の遺伝子は、DNA メチル化による制御を受けている可能性が示唆された。

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

平成 25 年入学	研究分野 生物分子科学	氏名 榎 みずほ
審査委員	(主査) 東邦大学・理学部・准教授 永田 喜三郎 (副査) 東邦大学・理学部・教授 渡辺 直子 (副査) 東邦大学・理学部・教授 岸本 利彦 (副査) 東邦大学・名誉教授 小林 芳郎 (副査) 畿央大学・健康科学部・教授 前原 佳代子	
(論文題目) 複製老化特異的な DNA メチル化による遺伝子発現の調節		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨)		
<p>【背景・目的】</p> <p>DNA、ヒストンの化学修飾や non-coding RNA に代表されるエピジェネティック制御は、遺伝子発現、発生やがんなどの疾患の発症に深く関わっている。細胞老化は大きく 2 種類に分類され、細胞分裂の繰り返しによるテロメア短縮を起因とする複製老化と、テロメアの長さに関係なくストレスにより誘導される早期誘導老化がある。老化誘導方法の違いや細胞の種類や組織によってエピジェネティックプロファイルが違う事が報告されているが、細胞老化研究にしばしば用いられている TIG-3 細胞での細胞老化とエピジェネティック制御の関係は未だ良く分かっていない。また、通常ではメチル化されない TSS 付近の CpG islands での高メチル化と関連する遺伝子の低発現に関しては良く研究されているが、それ以外のメチル化変化に関してはあまり多くの事は分かっていない。</p> <p>本研究では、3 種類の老化誘導方法により TIG-3 細胞を老化誘導し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現と DNA メチル化変化のデータ取得し、低メチル化も含め領域別にメチル化変化や関連する遺伝子発現変化を解析することで、老化誘導法の違いによる TIG-3 細胞の網羅的なメチル化変化と遺伝子発現の関連を調べる事を目的とする。</p> <p>【結果】</p> <p>結果 1: 異なる方法で誘導した老化細胞の表現型は似ているが、遺伝子発現パターンは異なっている。</p> <p>3 種類の老化細胞の遺伝子発現パターンを比較したところ、細胞増殖制御に必須の細胞周期や免疫に関わる遺伝子が共通して変動するが、各老化細胞で変動する遺伝子群は違う事が分かった。DNA メチル化解析では、複製老化細胞では継時的な DNA メチル化変化を認めたが、Ras 誘導老化細胞や非許容温度下で老化誘導した SVts8 細胞では、DNA メチル化にほとんど変化がなかった。これらの老化タイプによる DNA メチル化変化の差は、いくつかの要因が推察される。一つは、老化による DNA メチル化変化は、細胞分裂の繰り返しによるエラーの集積により起こると考えられる。そのため、急速に老化誘導される早期老化では、エラーが集積するほど細胞分裂をしないう</p>		

ちに老化状態に陥るために、DNA メチル化変化が見られない可能性がある。二つ目は、DNA メチル化を維持するメチル化酵素の *DNMT1* の減少によるエラーの増加も考えられる。早期老化では老化により *DNMT1* の発現は若干低下する程度 (RIS は 0.70 倍、SVts8 では 0.80 倍) だが、複製老化では 0.23 倍と大幅に発現が低下する。さらに、低メチル化状態を維持する *TET1* 遺伝子の減少も DNA メチル化変化の要因として関わっている可能性も考えられる。これらのことにより、老化誘導環境により DNA メチル化変化が大きく変わり、遺伝子発現へ関与する要因も変わると考えられる。

結果 2 : 複製老化では、non-CpG island 領域 (open sea) の低メチル化が免疫関連遺伝子の高発現と関連している。

DNA メチル化変化のみられた複製老化細胞を用いて、遺伝子領域および CpG island 周辺でのメチル化変化の傾向を調べた結果、免疫関連遺伝子では open sea が他の領域に比べて顕著に低メチル化されている事が分かった。遺伝子発現と DNA メチル化解析結果を統合解析したところ、大多数の遺伝子は DNA メチル化制御を受けないが、細胞周期や免疫に関わる遺伝子を含む 867 遺伝子で、DNA メチル化での遺伝子発現制御を示唆する結果が得られた。また、低メチル化と関連し高発現している免疫関連遺伝子は、non-CpG プロモーターを持つ遺伝子が多く、open sea の低メチル化が高発現に関与している可能性が示唆された。低メチル化のメカニズムはまだ分からない事が多いが、脱メチル化に関与すると報告されている TET ファミリーの中で、TET1 と TET3 とは異なり、老化状態で高発現し、且つ CpG サイトに特異的に結合する CXXC ドメインを持たない TET2 が、open sea の低メチル化に関わっているのではないかと推察する。

結果 3 : DNA メチル化により発現制御を受けた microRNA(miRNA)が一部の老化に関わる遺伝子の発現に関与している。

複製老化において、7 つの miRNA でプロモーター領域の高メチル化を伴った発現低下がみられた。これらの miRNA がターゲットとする遺伝子を検索したところ 27 遺伝子が抽出され、それらの遺伝子の中には転写抑制に関わる *EIF4EBP2*、サーカディアンリズム制御に重要な役割を果たす *CRY2*、Senescence-associated secretory phenotype (SASP)に関わる IL-6 の signal transducer である *IL6ST* や p53 の安定化に関わる *ZMAT3* などが含まれた。これらの結果は、老化の誘導及び維持に関わると考えられる一部の遺伝子の高発現に、DNA メチル化制御を受けた miRNA が関与している可能性を示唆している。

【結論】

本研究により、3 種類の老化誘導方法で老化した TIG-3 細胞は、似たような表現型を示すが遺伝子発現パターンは違う事が分かった。また、早期老化では DNA メチル化変化がみられないが、複製老化では DNA メチル化変化が起こり、老化の導入や確立に関わる一部の遺伝子は、DNA メチル化による制御を受けている可能性が示唆された。

以上から審査委員は一致して本論文提出者：榊みずほが最終試験に合格したことを認めた。

