

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

老化関連トランスクリプト - ムデータベース構築 (23-8)

主任研究者

直江 吉則 国立長寿医療研究センター研究所 老化機構研究部免疫研究室 (室長)

研究要旨

老化研究における遺伝子発現マイクロアレイデータベースは世界中未だ存在しないことから、幼若ならびに加齢マウスから臓器、組織ならびに細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いてそれら臓器、組織ならびに細胞の遺伝子発現プロファイルを得、データベースを作成することを目的として本研究を開始した。今年度は若齢 (8 週齢) ならびに老齢 (24 か月齢) 雄性マウスの 11 類の臓器 (脳、眼、心臓、胃、肝臓、腎臓、精巣、骨格筋、骨髄、パイル板、大腸)、T 細胞、大腿骨細胞ならびに加齢モデルマウス (J20 マウス) の大脳皮質の遺伝子発現様式をマイクロアレイより解析し遺伝子発現プロファイルを得た。

T 細胞ならびに大腿骨細胞の加齢に伴う遺伝子発現変化を詳細に調べた結果、加齢に伴い遺伝子発現が変化し、それら細胞の機能低下に関与する候補遺伝子の絞り込みに成功した。今後、それら候補遺伝子の詳細な機能を調べることにより、加齢に伴う T 細胞の機能低下ならびに大腿骨の骨密度低下の機序が明らかになることが期待される。

主任研究者

直江 吉則 国立長寿医療研究センター研究所 老化機構研究部免疫研究室 (室長)

A. 研究目的

近年、多くの生物を対象に実施されているゲノムプロジェクトによって大量の情報が得られるようになり、ヒトゲノム解読により細胞や遺伝子を一つ一つ解析するというアプローチから、全ゲノム遺伝子およびたんぱく質を網羅的に解析するアプローチへの転換となった。まさにゲノム機能の網羅的な解析による統合的な生命システムの理解を目指した研究への移行期と言える。このような時代背景の中、マイクロアレイを用いた全ゲノムの網羅的な解析技術は、日々進歩し、かつその重要性が高まっている。NCBI の Gene Expression

Omunibus では学術論文に発表されたマイクロアレイのデータ(約 50 万データ) がインターネット上に公開され、誰でもそのデータの閲覧が可能である。また、多くの全世界の研究所においてその研究所の特色にあった遺伝子発現マイクロアレイデータが公開されている(MGI の Gene Expression Database、東大医科研の Body Map、理研 RCAI の RefDic 等)。しかしながら、老化研究における遺伝子発現マイクロアレイデータベースは世界中未だ存在しない。そこで、幼若ならびに加齢マウスから臓器、組織ならびに細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いてそれら遺伝子発現プロファイルを得る。また、研究内から無料(当研究開発費)でサンプル(脳、神経、骨格筋等)を募集し、マイクロアレイデータを取得し、発現プロファイルデータならびに解析結果をサンプル提供研究者にフィードバックする。一定期間、研究所内でそれらデータを公開し、データを研究所内で共有する。加齢に伴う遺伝子発現変化の研究は多く行われていないことから、老化に関与する遺伝子を見出すことが可能になると考えられる。ホームページを通じてデータベースを全世界に公開することを最終目標として研究を進める。

B. 研究方法

若齢マウス(8 週齢)ならびに老齢マウス(24 か月齢)マウスより各臓器を摘出した。T 細胞サブセットは MACS (Milteny) を用いて脾臓より分離した。それら臓器ならびに細胞から RNA を Trizol (Life technologies) により単離、Dnase 処理後、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて RNA を精製した。得られた RNA は Agilent's low RNA input linear amplification kit PLUS (Agilent) を用いて標識した。Agilent Whole Mouse Genome array に 65°C、17 時間インキュベートし、洗浄後、スキャンしデータを得た。データは Agilent's feature extraction ならびに Genespring software (Agilent) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究提案ではヒト材料を扱う実験を行わないため、人権の保護の観点からは生命倫理上の問題及び法令上の問題は生じない。

動物を用いた実験に関しては国立長寿医療研究センター 動物実験倫理委員会の承認のもと、法令を遵守し研究を遂行した。

C. 研究結果

本研究の最終目的は老化関連遺伝子発現プロファイルのデータベース作成であることから、若齢マウス(8 週齢)ならびに老齢マウス(24 か月齢)マウス(雄性)から脳、眼、心臓、胃、肝臓、腎臓、精巣、骨格筋、骨髄、パイエル板、大腸、ヘルパー T 細胞ならびに細胞障害性 T 細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現様式をマイクロアレイにより調べた。さら

に、2、6、12、18および24か月齢マウスの大腿骨の細胞、また、7、14ならびに19か月齢アルツハイマー病モデル J20 トランスジェニックマウス的大脑皮質から RNA を得、遺伝子発現様式をマイクロアレイにより調べた。データは研究所内のコンピュータ内に保存し、研究所内で自由に閲覧できるようにした。さらに、加齢に伴う T 細胞ならびに大腿骨の細胞の遺伝子発現の変化を詳細に検討した。

加齢に伴うヘルパーT 細胞の遺伝子発現変化の検出

加齢に伴い T 細胞からのサイトカイン産生の低下、活性化マーカーの発現低下ならびにヘルパー機能の低下が報告されている。そこで、幼若マウス(8 週齢)ならびに老齢マウス(24 か月齢)の脾臓から CD4⁺ヘルパーT 細胞と CD8⁺細胞障害性細胞を単離し、それら細胞から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に全遺伝子の発現を調べた。2 倍以上発現量に変化した遺伝子を加齢に伴い変化する遺伝子の候補とした。その結果、加齢に伴い発現が増加した候補が 2912 個(CD4⁺ヘルパーT 細胞特異的ならびに CD8⁺細胞障害性 T 細胞特異的に発現が上昇した候補がそれぞれ 1264 個、1918 個)(Fig1)であり、加齢に伴い遺伝子発現が上昇することが報告されている IL-6 が含まれていた(Fig2)。これら候補遺伝子の機能カテゴリーを Gene Ontology(GO)解析を用いて分類したところ免疫応答、細胞分化、細胞接着ならびに細胞遊走に関与した遺伝子が候補遺伝子の機能として挙げられた。また、加齢に伴い発現が低下する候補が 1871 個(CD4⁺ヘルパーT 細胞特異的ならびに CD8⁺細胞障害性 T 細胞特異的に発現が上した候補が 1217 個、1134 個)(Fig3)であった。これら候補遺伝子の機能カテゴリーは金属イオン結合タンパク質、核酸結合タンパク質ならびに small GTPase であった。

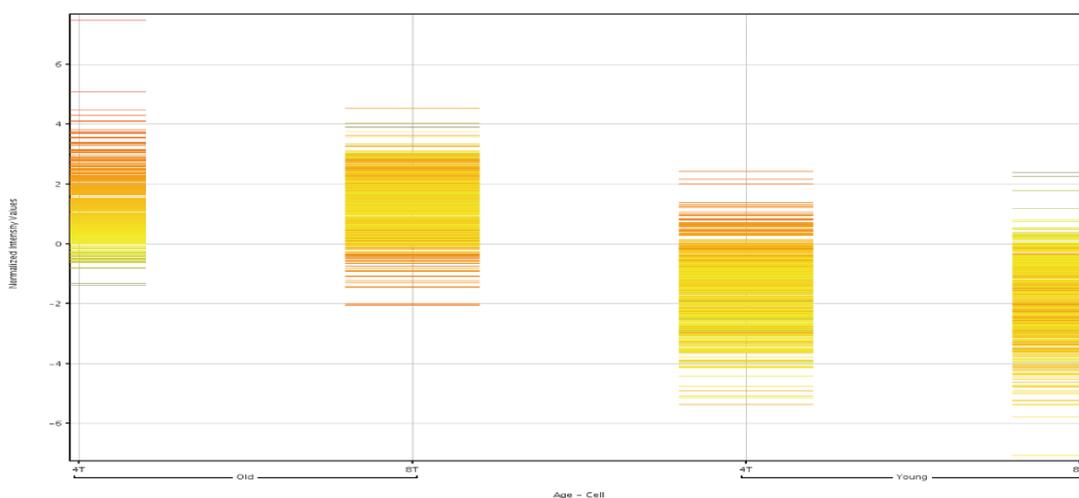


Fig1. 加齢に伴い T 細胞において遺伝子発現が上昇する遺伝子

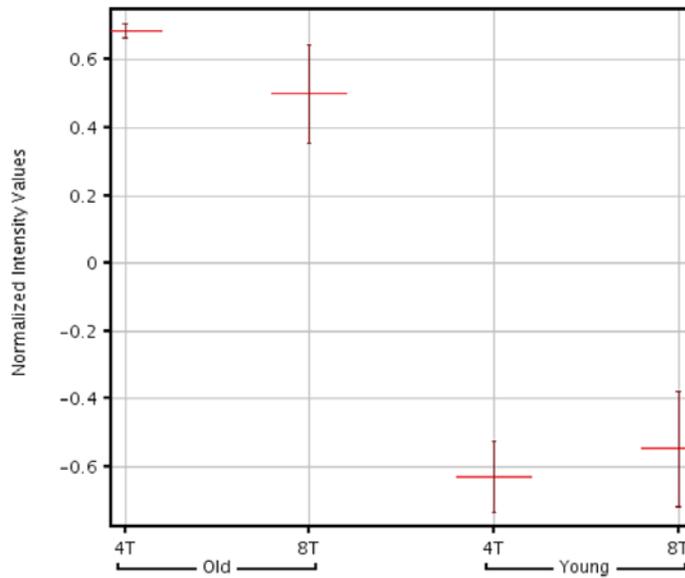


Fig2, IL-6 は T 細胞において加齢に伴い遺伝子発現が上昇する。

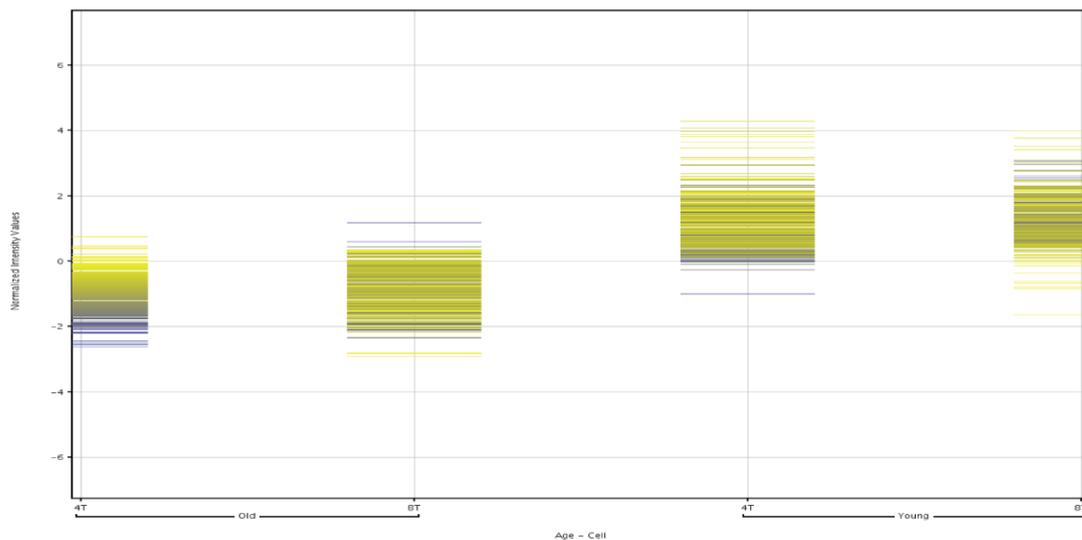


Fig3. 加齢に伴い T 細胞において遺伝子発現が減少する遺伝子

加齢に伴う大腿骨細胞の遺伝子発現変化の検出

加齢に伴い、骨密度の低下が報告され、複数の原因遺伝子の発現低下が知られているが、その詳細な機序は明らかになっていない。そこで、2、6、12、18および24か月齢マウスから大腿骨細胞細胞を単離し、それら細胞から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に全遺伝子の発現を調べた。加齢に伴い遺伝子発現が低下する遺伝子に注目し、550 個の候補遺伝子を見出した (Fig4)。それらの遺伝子にコラーゲンが含まれていた。

Gene Ontology (GO) 解析を用いて分類したところ細胞外マトリックス、細胞接着、コラーゲンならびに細胞外構造形成に関与する遺伝子が含まれていた。

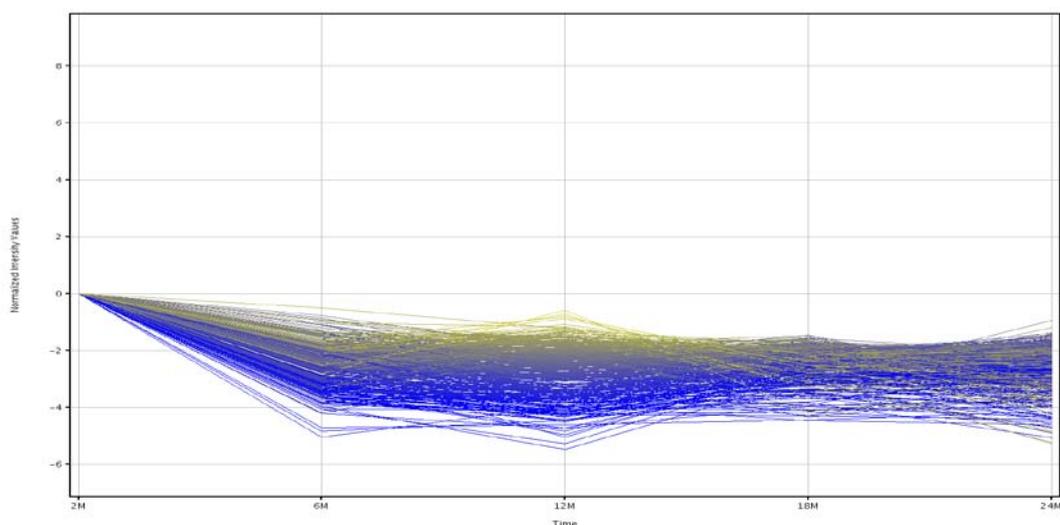


Fig4. 加齢に伴い大腿骨細胞において遺伝子発現が減少する遺伝子

D. 考察と結論

老化研究における遺伝子発現マイクロアレイデータベースは世界中未だ存在しないことから、幼若ならびに加齢マウスから臓器、組織ならびに細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いてそれら遺伝子発現プロファイルを得ることを目的として本研究は開始した。今年度は雄性マウスの 11 種類の臓器(脳、眼、心臓、胃、肝臓、腎臓、精巣、骨格筋、骨髄、パイエル板、大腸)の遺伝子発現様式の得ることが出来た。今後、他の臓器ならびに細胞の遺伝子発現様式を調べるだけでなく、雌性マウスの臓器ならびに細胞の遺伝子発現様式を調べることにより、データベースサンプルの多様性を広げることを目標に研究を進めていく。また、加齢モデルマウス (J20 マウス) と正常マウスの加齢による遺伝子発現の変化比較することにより、加齢モデルマウスの遺伝子発現パターンが正常マウスの加齢のどの時点の遺伝子発現様式に類似しているかを調べ、加齢モデルマウスが加齢研究に適したマウスであるかどうか検討する。

T 細胞ならびに大腿骨細胞の加齢に伴う遺伝子発現変化を詳細に調べた結果、加齢に伴い遺伝子発現が変化する加齢に伴うそれら細胞の機能低下に関与する候補遺伝子の絞り込みに成功した。今後、それら候補遺伝子の詳細な機能を調べることにより、加齢に伴う T 細胞の機能低下ならびに大腿骨の骨密度低下の機序が明らかになることが期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Naito T, Tanaka H, Naoe Y and Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. International Immunology 23: 661-668, 2011.

2. 学会発表

1) 坂部勇、丸山光生、直江吉則 加齢に伴う免疫低下メカニズムの解析 第 11 回日本抗加齢医学会総会 研究助成受賞講演, 京都, 2011 年 5 月 28 日

2) 直江吉則、大野欽司、古関晴彦 ヘルパーT 細胞分化過程における特異的な選択的スプライシングの検出 第 21 回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 2011 年 6 月 11 日

3) 直江吉則, 久保久美子, 土屋由加子, 原恵子, 大野欽司, 古関明彦 Detection of specific alternative splicing during T cell development 第 40 回日本免疫学会総会、千葉市、2011 年 11 月 27 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし