

## ミトコンドリア DNA メチローム解析によるミトコンドリア 老化尺度の開発と新規細胞老化機構の解明

三 上 貴 浩\* 村 嶋 亜 紀\*

### DEVELOPMENT OF MITOCHONDRIAL SENESCENCE MARKER AND ELUCIDATION FOR CELLULAR SENESCENCE BY MITOCHONDRIAL DNA METHYLOME ANALYSIS

Takahiro Mikami and Aki Murashima

Key words: DNA methylome, cellular senescence.

#### 緒 言 方 法

DNA のメチル化はさまざまな疾患の発症リスクとの関連が示唆されており、特定の DNA 領域のメチル化プロファイルはそれ自体が独立した生命予後の規定因子である可能性が示されている。しかし、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のメチローム解析はほぼ皆無であり、またその生理学的意義も不明である。本研究では老化に関連する DNA エピジェネティックマーカーを探索するため、健常者の末梢血単核細胞 (PBMC) から抽出した mtDNA 全領域のメチル化プロファイルを明らかにし、mtDNA のメチル化プロファイルの個人間の差異と暦年齢との関係を解析した。血液細胞 mtDNA のメチル化情報を取得し、暦年齢との相関を検証したうえで、精度の高い DNA メチル化情報に基づく「ミトコンドリア年齢尺度」「ミトコンドリア加齢尺度」の開発を行った。そして、今後は核 DNA (nDNA) メチル化プロファイルから求めた「細胞年齢尺度」「細胞加齢尺度」との比較検討を行う予定である。

#### A. 健常者の PBMC から抽出した mtDNA 全領域のメチル化プロファイル解析

メチロームマーカー検証群としての192名を性年代ごとのランダムサンプリングにより選定した(一部の年代では全数を抽出した)。血液サンプル中の PBMC を遠心分離によって精製した。PBMC から抽出した total DNA をバイサルファイト処理し、核 DNA と mtDNA を含む全ゲノムをターゲットにパイロシークエンシング (bisulfite-Pyrosequencing) を行った。1 検体当たり 0.5  $\mu$ g の DNA を用いた。

#### B. メチル化プロファイルの個人間の差異と暦年齢との関連性に関する解析手法の検討

Hannum et al.<sup>1)</sup> の手法に準じて解析を行った。すなわち、F 検定により DNA メチル化と暦年齢との相関解析を実施した。

得られたメチル化データについて、位置とそれに対応するメチル化率を入力した DataFrame を作成し、それを特徴量として生物学的年齢を予測す

\* 岩手医科大学解剖学講座人体発生学分野 Department of Anatomy, Iwate Medical University, Iwate, Japan.

るモデルを検討した。F 検定により DNA メチル化と暦年齢との相関解析を実施するとともに、正則化回帰モデル (regularized regression model) の Elastic Net を用いた。

### 結 果

#### A. 健常者の PBMC から抽出した mtDNA 全領域のメチル化プロファイル解析

対象者の血液サンプルより PBMC を分離し、その DNA を抽出した。これには nDNA と mtDNA のいずれも含まれる。これらをまとめた全ゲノムをターゲットにパイロシーケンシングを行い、メチロームプロファイルを得ることに成功した。

#### B. メチル化プロファイルの個人間の差異と暦年齢との関連性に関する解析手法の検討

年齢尺度を解析する際の Elastic Net の有効性を検証するために、Zou et al. の解析<sup>2)</sup> を参考に、要素 0、1、2 をランダムに配置した 100×10000 の行列で最初の 100 列が年齢と相関するように再配

置し、このデータにおいて Elastic Net の有効性を検証した。penalty としての λ 値を変化させ λ 値が大きい段階で相関が認められる列を選んだ結果、最初の 100 列以外からも多く選ばれてしまうことがわかった。そこで、Hannum et al. の研究<sup>1)</sup> を参考に、まずは bootstrap approaches を用いることを検討している段階である。更に Elastic Net 以外の方法も模索中である。

#### C. 「ミトコンドリア年齢尺度」「ミトコンドリア加齢尺度」の開発

現在、正則化回帰モデルの Elastic Net と bootstrap を用いて、生物学的年齢を予測する「ミトコンドリア年齢尺度」、加齢速度を予測する「ミトコンドリア加齢尺度」を解析しているところである。

### 考 察

正則化回帰モデルの Elastic Net を用い、メチル化プロファイルと暦年齢との関係を検討した結果、複数のメチル化サイトは暦年齢と関係性があつた

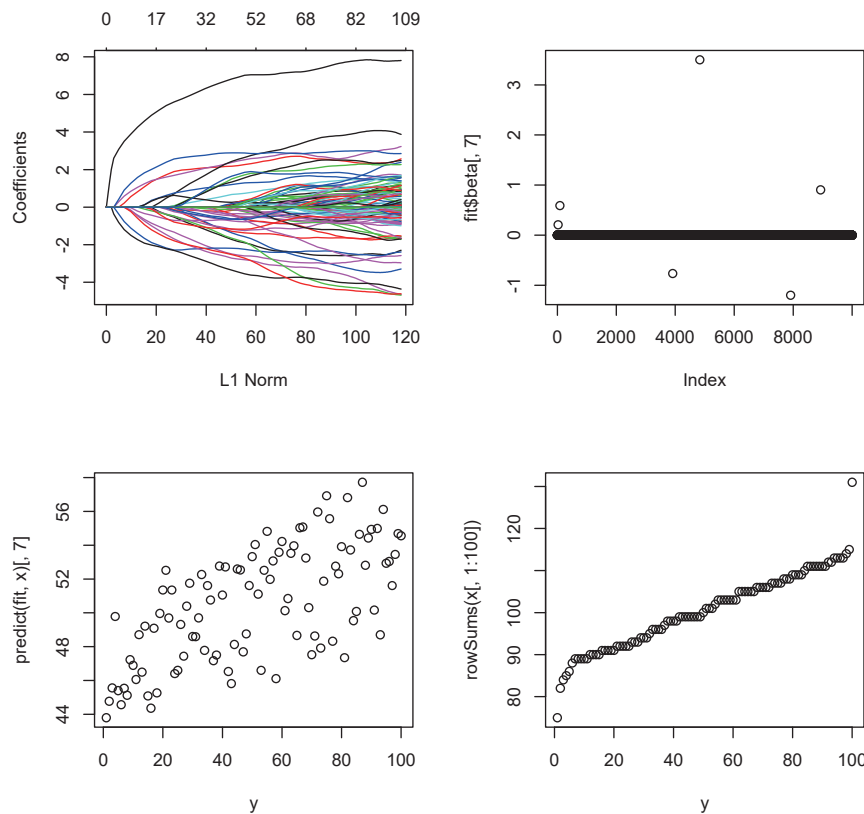


図 1. DNA メチローム解析における Elastic Net の検証

Fig.1. The assessment of Elastic Net model for DNA methylome analysis.

We evaluated Elastic Net model in 100×10000 matrix rearranged with the first 100 columns associated with the age.

が、これがどのような生理学的意義を有するかは更なる解析の必要があり、現在検討中である。

更に Elastic Net では、必ずしも年齢相関領域からのみ抽出されるとは限らないことがわかった。現在、解析を外注した DNA サンプルにおいて同様の方法を行っているが、多くのメチル化サイトが選ばれてしまい、更に検証群と探索群をランダムに入れ替えることでその領域も変わってきてしまうという結果となった。今後はより特異的な DNA メチル化バイオマーカーの探索方法を検討する。

本研究が取り組む新規の遺伝子検査では塩基修飾（エピジェネティクス）に注目し経年的な変化を解析するものだ。本検査により直近の生活習慣を反映した現状を把握できる。肌や容姿といった外観による判断基準ではなく、内的に分子生物学レベル（遺伝子レベル）にて客観的年齢（老化状況）が判断できるようになる。被験者に対して内的な真の年齢を提示することで健康増進を啓発し、不摂生の抑止力となり、予防医学が推進されることが期待される。

更に、現状で期待できるのは動脈硬化と老化との相関であるが、DNA メチル化はこれ以外にも

広範な疾患にかかわっていることが予測される。したがって同様の検査から測定できる内容が次第に増えていくことが期待できる。具体的には特定の遺伝子領域のメチル化を計測することで、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病などの疾患の早期診断をすることができるというものである。これにより、疾患早期発見に寄与する。

## 総 括

DNA ゲノムのなかで、そのメチル化率が年齢と相関する DNA 領域を同定する系を検討した。その結果、この系では必ずしも年齢と相関する DNA 領域だけでなく、それ以外の多くの DNA 領域をも抽出してしまう結果となった。今後は Elastic Net の前に bootstrap approaches を用いることを検討している。更に Elastic Net 以外の方法も模索中である。

## 参 考 文 献

- 1) Hannum G, et al. (2013): Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*, **49**(2), 359-367.
- 2) Zou H, et al. (2005): Regularization and variable selection via the elastic net. *J R Statist Soc B*, **67**, 301-320.