

明 細 書

発明の名称：

老化細胞もしくはSASPを標的とした治療薬／予防薬、老化細胞を検出するデータの取得方法及び治療薬／予防薬のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 老化した細胞で発現する非翻訳RNAを標的とする炎症関連遺伝子発現の抑制もしくは細胞生存制御を介した老化細胞に起因する疾患を治療する薬剤、対象に老化細胞を検出するデータを取得する方法、及び治療薬／予防薬をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞に、活性酸素種などによる酸化ストレス、放射線・抗がん剤等によるDNA損傷、がん遺伝子の活性化など種々のストレスが加わると、不可逆的に細胞周期が停止する「細胞老化」という状態が生じる。細胞老化は、DNA修復機構やアポトーシスと並び、DNA損傷やミトコンドリア障害による遺伝子変異の蓄積から生じるがん抑制機構として機能している。しかし、体内に蓄積した老化細胞は、様々な炎症性タンパク質を高発現し、周囲の組織に分泌するSASP (Senescence-associated secretory phenotype) によって慢性炎症を誘発し、がん・神経変性疾患・動脈硬化・アルツハイマー・肺線維症・骨粗鬆症・自己免疫疾患をはじめとする加齢に伴う多くの疾患および病態を引き起こすことが知られている。したがって、体内の老化細胞もしくはSASPを制御することは、疾患発症の抑制、あるいは治療に繋がる可能性がある。

[0003] 細胞老化の誘導や制御機構の全貌は未だ明らかになっていないものの、老化細胞に選択的に細胞死を誘導するセノリティックドラッグ (Senolytic drugs) や、老化細胞の分泌するSASPを抑制するセノモルフィックドラッグ (Senomorphic drugs) は、健康寿命を延ばす可能性があり、加齢に伴う病態の発症や進行の予防・治療法として期

待を集めている。

[0004] 特許文献1には、機能不全ミトコンドリアを除去して、SASPを抑制するためのミトコンドリア膜電位低下剤とp53阻害剤を対象細胞に共送達するための細胞老化を抑制する複合体が開示されている。特許文献2には、幹細胞の細胞老化を抑制可能な細胞老化抑制剤が開示されている。

[0005] しかしながら、特許文献1に記載の複合体は、細胞老化に伴う機能不全ミトコンドリアの除去を目的としていることから、老化細胞の完全な除去にはつながらない。また、特許文献2に記載の細胞老化抑制剤は、抗酸化作用は認められるものの、細胞老化を排除することまではできないと考えられている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2021-24852号公報

特許文献2：特開2018-52879号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：CasellaG et al. Nucleic Acids Res 2019, Vol47(14), pp.7294-7305.

非特許文献2：Ting T et al, Science,2011, Vol.6017, pp.593-596. doi: 10.1126/science.1200801. Epub2011 Jan 13.

非特許文献3：Kishikawa T et al, JCI Insight. 2016, Jun 2;1(8):e86646. doi: 10.1172/jci.insight.86646.

非特許文献4：Solovyov A Cell Rep, 2018, Vol.23(2),pp.512-521. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.042.

非特許文献5：Franses J W et al, Oncologist. 2018, Vol. 23(1):pp. 121-127, Published online 2017 Aug 31, doi:10.1634/theoncologist.2017-0234.

非特許文献6：Billingsley K J,Scientific Reports 2019, volume 9, Article number: 4369.

非特許文献7: Oezguer E et al. Clin Chim Acta. 2021, Vol.514, pp.74-79 . doi: 10.1016/j.cca.2020.12.008. Epub 2020 Dec 31.

非特許文献8: Cambier L et al, Scientific Reports, 2021, vol. 11, Article number: 94.

非特許文献9: Nogalski, M T et al, Nature Communications. 2019, vol. 10, Article number: 90.

非特許文献10: Bersani F et al, PNAS, 2015, 112(49), pp.11548-15153. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518008112>.

非特許文献11: Nogalski, M T et al, PNAS, 2020, Vol. 117 (50), pp. 31891-31901, <https://doi.org/10.1073/pnas.2017734117>.

非特許文献12: Kojima R et al., Nature Communications, 2018, vol.9, Article number: 1305(2018), DOI:10.1038/s41467-018-03733-8.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 以下に詳述するように、本発明者らは、正常細胞では発現が見られない非翻訳RNAが老化細胞で高発現しており、炎症性遺伝子群の発現を制御していることを見出した。さらに、非翻訳RNAの発現を制御することで老化細胞に細胞死を誘導できることを見出した。そこで、この非翻訳RNAを標的とし、有害なSASPを抑制し、さらに老化細胞に細胞死を誘導し排除し得る治療薬を提供し、細胞老化を標的とした新しい治療法、Senotherapyを提供することを課題とする。また、標的である非翻訳RNAやそれに伴って発現が変化する分子や当該遺伝子領域のエピゲノムを検査することにより対象において細胞老化状態を初期に検出できることを見出した。そこで、これを検出することによって、老化細胞を検出し、ひいては老化細胞に起因する疾患の診断につなげるデータの取得方法を提供することを課題とする。また、老化細胞の生存とSASP制御の新たな標的分子を見出したことから、これを用いた治療薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の治療薬、データの取得方法、及び治療薬のスクリーニング方法に関する。

(1) 老化細胞に起因する疾患の治療薬及び／又は予防薬であって、h S A T I I RNAの発現抑制もしくは活性阻害、及び／又はC T C F発現を増加させることを特徴とする医薬組成物。

h S A T I I RNA発現の増加、C T C F発現の減少が細胞老化と深く関連していることから、これらを調節可能な物質は細胞老化に起因する疾患を治療することができる。

[0010] (2) 前記医薬組成物がh S A T I I RNAの発現抑制もしくは活性阻害及び／又はC T C F発現を増加させる核酸医薬であることを特徴とする(1)記載の医薬組成物。

特に、本明細書で例示したように、h S A T I I RNAやC T C Fの発現や活性を調節する核酸もしくは化合物は医薬として有効である。

[0011] (3) 対象に細胞老化が生じているかデータを取得する方法であって、試料中のh S A T I I RNA、C T C F発現、ゲノムDNAのエピゲノム変化のいずれか1つを検出することを特徴とするデータ取得方法。

h S A T I I RNAやC T C Fの発現や活性の変化は細胞老化に特異的な現象であるから、これらの発現や活性変化を捉えることによって、老化細胞を検出することが可能である。また、正常細胞に細胞老化誘導時もしくはがん細胞に細胞老化様の表現型が誘導される過程で、h S A T I I RNA発現増加及び／又はC T C F発現の減少に先立って、h S A T I I DNA領域の膨潤化とクロマチンアクセシビリティ上昇などのエピゲノム変化がおこる。したがって、それを検出する検査方法は、老化細胞を早期に検出する有効な検査方法となり得る。

[0012] (4) 老化細胞に起因する疾患を検査に使用することを特徴とする(3)記載のデータ取得方法。

老化細胞が深く関わっている疾患であることが分かれば、対症療法だけで

はなく、(1)や(2)に記載の医薬組成物が高い効果を奏することが期待できる。疾患が老化細胞に起因するものであるかを検査することにより、最適な治療薬を提供することが可能となる。

[0013] (5) 老化細胞に起因する疾患の治療薬及び／又は予防薬をスクリーニングする方法であって、老化細胞の培地に候補化合物を添加し、hSATIIRNA発現減少、hSATIIRNA機能阻害、CTCF発現の増加、SASP因子の発現減少、hSATIIDNA領域の収縮、クロマチンアクセシビリティの低下の少なくともいずれか1つを指標として、候補化合物を選択することを特徴とする医薬のスクリーニング方法。

細胞老化に特異的な変化を指標とすることにより、新規の医薬組成物をスクリーニングすることができる。特に、hSATIIRNAと炎症性SASP関連遺伝子群の発現上昇、CTCF発現の低下や、hSATIIDNA領域の膨潤化、クロマチンアクセシビリティの上昇などのエピゲノム変化は老化細胞に特異的な現象であることから、その変化を検出することでセノリティックドラッグ、セノモルフィックドラッグをスクリーニングすることができる。

[0014] (6) 老化細胞に起因する疾患の治療法であって、疾患が老化細胞に起因するものであるか、(3)又は(4)に記載の方法でデータを取得し、(1)又は(2)に記載の治療薬を投与することにより疾患を治療する方法。

(7) 老化細胞に起因する疾患の治療法であって、hSATIIRNAの発現抑制もしくは活性阻害及び／又はCTCF発現を増加させる化合物を投与することを特徴とする疾患の治療方法。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A]クロマチンのアクセシビリティの増加に関連した転写産物のスクリーニングのスキーム(a)、増殖期及びX線により細胞老化を誘導したIMR-90細胞におけるATAC-seqピークの変化を示すボルケーノプロット(b)、RNA-seqデータ(GSE130727)のボルケーノプロットにおいて(b)に示したクロマチンのアクセシビリティが変化している

652の転写産物(c)を示す。(b)、(c)において、横軸FCは倍率変化(fold change)、縦軸はFDRを示す。

[図1B]増殖期とX線により細胞老化を誘導したIMR-90細胞のhSATII遺伝子座におけるATAC-seq及びRNA-seq(GSE130727)データのピークを示す。2つの生物学的反復による結果を示している。ATAC-seq、RNA-seqにおいて、上2列が増殖期、下2列が細胞老化誘導後のIMR-90細胞で得た結果を示す。

[図2A]セントロメア由来の非翻訳RNA(hSAT α)又はペリセントロメア由来の非翻訳RNA(hSATII)を過剰発現させたSVts8細胞およびX線誘導老化SVts8細胞におけるSASP関連遺伝子発現のヒートマップ。

[図2B]hSAT α (x軸)またはhSATII(y軸)RNA過剰発現SVts8細胞において、ベクター発現細胞と比較したクロマチンのアクセシビリティの変化を示す散布図。

[図2C]hSAT α 又はhSATII RNAを過剰発現させたSVts8細胞における老化(上)および炎症反応(下)に関連する遺伝子セットのエンリッチメント解析。

[図2D]増殖中又はX線により細胞老化を誘導したSVts8細胞におけるSASP遺伝子発現に対するhSATII RNAノックダウンの影響をRT-qPCRで解析した結果を示す図。*** $P<0.001$ 。

[図3A]健常者もしくはWerner症候群患者由来皮膚の線維芽細胞を用いて、SASP遺伝子発現に対するhSATII RNAノックダウンの影響を解析した結果を示す図。

[図3B]ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、酸化ストレス誘導性の老化細胞に置いてSASP遺伝子発現に対するhSATII RNAノックダウンの影響を解析した結果を示す図。

[図4A]質量分析により同定された280個のhSATII RNA結合タンパク質の遺伝子オントロジー解析結果(左)。このうち26のタンパク質が

クロマチン結合 (GO : 0003682) に分類された。上位 10 位の遺伝子とユニークペプチド数を右側にまとめている。

[図4B]SVts8細胞溶解物を用いてhSAT α 又はhSATII RNAプルダウンアッセイを行い、ウェスタンブロットングによりCTCFとの結合を解析した結果を示す図。

[図4C]HEK-293T細胞において、FLAGタグを付加したCTCF (野生型)、CTCF $\Delta ZF1-11$ (変異型)、CTCF $\Delta ZF3-6$ (変異型) を発現させ、各分子の発現をウェスタンブロットにより解析した結果を示す図。

[図4D]HEK-293T細胞で発現させたFLAGタグ付きCTCF WT、CTCF $\Delta ZF1-11$ 、又は $\Delta ZF3-6$ のhSATII RNAへの結合をRIP-qPCRにより解析した結果を示す図。NS: Not significant、*** $P < 0.001$ 。

[図5A]CTCF強制発現SVts8細胞において、hSATII RNA発現がSASP様炎症関連遺伝子の発現へ及ぼす効果をRT-qPCR解析した結果を示す図。相対発現量は、ベクター発現細胞の値から正規化した値を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

[図5B]CTCFをsiRNAにより発現抑制したSVts8細胞におけるSASP様炎症関連遺伝子の発現をRT-qPCRにより解析した結果を示す図。相対発現量は、コントロールsiRNAで処理した細胞の数値から正規化している。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

[図5C]継代培養で細胞老化を誘導したTIG-3細胞におけるhSATII RNA、CTCF、細胞老化と炎症関連遺伝子群の発現をRT-qPCRで解析した結果を示す図。各遺伝子の発現量は、継代初期の発現量に対して正規化した値を示す。*** $P < 0.001$ 。

[図5D]継代培養で細胞老化を誘導したTIG-3細胞におけるCTCFタンパク質の減少及び細胞老化マーカータンパク質の発現をウェスタンブロットングにより解析した結果を示す図。

[図6A] ChIP-seq解析により、CTCF結合ピークの変化を示すベン図。

[図6B] ChIP-seq解析で得られたピークのうち、中心±2 kb領域のシグナルのプロファイルプロット（左）及びk-meansアルゴリズムを用いて2つのクラスに分割したヒートマップ（右）。ウィルコクソンの順位和検定のP値を示す。

[図6C] IG F2とH19の間に位置するICRに結合するCTCFへのhSATII RNAの影響をChIP-qPCRで解析した結果を示す図。

[図6D] ゲノムDNAへのCTCFの結合に及ぼすhSAT α またはhSATII RNAの影響をEMSAによって解析した結果を示す図。

[図6E] 代表的なSASP因子であるCXCL10及びCXCL11の遺伝子座のRNA-seq、CTCF ChIP-seq及びATAC-seqプロファイルを示す図。

[図6F] 3C-qPCRアッセイでhSATII RNAがクロマチン相互作用を減弱させたことを示す図。コンスタント領域（C）と各ターゲット領域（T）の相対相互作用が示されている。NS: Not significant、* $P < 0.05$ 。

[図7A] SVts8細胞にレトロウイルスにより導入されたhSATII RNAの発現をRT-PCRによって確認した結果を示す図。

[図7B] 左: hSATII RNAの発現により、多極化した細胞が増加していることを示す図。顕微鏡像及び多極細胞の割合を示す。* $P < 0.01$ 。右: hSATII RNAの発現により、染色体ブリッジが生じる細胞が増加していることを示す図。顕微鏡像及び多極細胞の割合を示す。*** $P < 0.001$ 。

[図7C] hSATII RNAを過剰発現させたSVts8細胞の核型分析（ $n = 20$ ）の結果を示す図。*** $P < 0.001$ 。

[図7D] hSATII RNAを過剰発現させたSVts8細胞の足場非依存性増殖能を示す図。* $P < 0.05$ 。

[図7E]左：CTCFを過剰発現させたSVts8細胞におけるhSATII RNA発現の多極化に対する効果を示す免疫染色像。右：CTCFを過剰発現させたSVts8細胞において、hSATII RNA発現によって生じた多極細胞の割合を示す図。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

[図8A]マウス胎児線維芽細胞MEFsにレトロウイルスにより導入されたMajSAT RNAの発現をRT-PCRによって検証した結果を示す図。

[図8B]左：MajSAT RNAの発現により、多極化した細胞が増加していることを示す図。顕微鏡像及び多極細胞の割合を示す。 $*P<0.05$ 。右：MajSAT RNAの発現により、染色体ブリッジが生じる細胞が増加していることを示す図。顕微鏡像及び染色体架橋が生じた細胞の割合を示す。 $*P<0.05$ 。

[図8C]MajSAT RNAを過剰発現させたMEFsの足場非依存性増殖能を示す図。 $***P<0.001$ 。

[図8D]MajSAT RNAを過剰発現させたMEFsの核型分析 ($n=20$) の結果を示す図。 $***P<0.001$ 。

[図8E]MajSAT RNAを過剰発現させたMEFsをヌードマウスの皮下に移植し、20日目 (MEF/MajSAT RNA #2)、あるいは30日目 (MEF/Vector、MEF/MajSAT RNA #1、MEF/MajSAT RNA #3) の腫瘍の重量 (左) 及び写真 (右) を示す。 $**P<0.01$ 。

[図9A]RPE-1/hTERT細胞由来の細胞外小胞に含まれているhSATIIとhSAT α RNAのRT-qPCRによる解析結果。 $*P<0.05$ 、 $***P<0.001$ 。

[図9B]EXOticデバイスで生成されたデザイナーエクソソームによるSASP様炎症関連遺伝子の発現をRT-qPCRにより評価した。各値はEXOtic-Nuc処理した細胞により正規化した。

[図9C]大腸がん検体におけるhSATII RNAプローブを用いたRNA-ISHの結果を定量化したボックスプロット。正常上皮細胞と腫瘍細胞 (

左)、及び正常線維芽細胞とがん関連線維芽細胞(右)におけるhSATII RNA陽性細胞率が示されている。上下のヒンジはそれぞれ第3、又は第1四分位、上下のひげは、四分位範囲の1.5倍以内の最高値と最低値を、ボックス内の水平線は中央値を示す。ボックス内の水平線は中央値。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

[図9D]細胞老化に伴うペリセントロメア由来hSATII RNAの発現増加が、SASP関連性炎症遺伝子の発現を誘発する機構を模式的に示す図。

[図10A]細胞老化を誘導したヒト臍間質細胞でsiRNAによりhSATII RNA発現を抑制し、効果を解析した結果を示す図。

[図10B]hSATII RNA発現が高い老化線維芽細胞、不死化細胞、がん細胞では、hSATII RNA発現を抑制することにより、細胞死もしくは増殖抑制が誘導されることを示す図。

[図11A]TIG-3細胞に継代培養により細胞老化を誘導する際の、各継代数でのhSATII RNA DNA領域の開き具合と遺伝子発現をDNA-FISHとRT-qPCRで比較した解析結果。NS:Not significant、*** $P < 0.001$ 。

[図11B]各種がん細胞株のDNaseIシーケンスデータからhSATII RNA DNA領域のクロマチンアクセシビリティをプロットした散布図。

[図12]スクリーニングの一態様を模式的に示す図。

[図13]hSATII RNAの機能と、hSATII RNAを標的とするSeno-therapyの概念を模式的に示す図。

発明を実施するための形態

[0016] 以下にデータを示しながら具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0017] 以下に示す治療薬は、加齢性疾患、炎症性疾患や病態に対して効果を有する。加齢性疾患や病態とは、加齢に伴い発症するあらゆる疾患・病態を含み得る。例えば、加齢によって患者数が増加する乳がん、大腸がん、膵臓がんをはじめとするがん、特に炎症性のがんや、心血管疾患、アルツハイマー病

、パーキンソンなどの神経変性疾患、骨粗鬆症、変形性膝関節症、緑内障・白内障・黄斑変性症などの眼変性疾患、慢性閉塞性肺疾患、慢性腎疾患、自己免疫疾患、乾癬などの炎症性疾患、サルコペニア、肥満により発症する脂肪肝、肝硬変などの肝疾患、糖尿病、前立腺肥大が挙げられる。また、加齢に伴って発症する炎症性疾患や病態だけではなく、炎症を伴う感染症、例えばCOVID-19などの感染症による炎症、さらに細胞老化を抑制することによる幹細胞移植時の効率化などに対しても効果を有する。

[0018] 以下に示す治療薬は、老化細胞で発現している非翻訳RNAを標的としていることから、すでに発症している疾患だけではなく、細胞老化による疾患の発症を抑制することができる。したがって、疾患発症の予防、再発防止等においても効果を奏する。投与方法については、各疾患において通常用いられている投与方法に準じて投与を行うことができる。

[0019] 「細胞老化 (cellular senescence、あるいは単に senescence と言う。)」とは、正常な細胞が継続的なDNA損傷応答により不可逆的に増殖を停止した状態である。細胞老化が生じている細胞を老化細胞といい、炎症性タンパク質や細胞外小胞などのSASP因子を分泌する。また、「細胞老化様」とは、正常細胞もしくは老化細胞において炎症性遺伝子群の発現が上昇し、炎症性タンパク質群や細胞外小胞などを分泌する状態である。細胞老化とヒトや動物の個体の老化 (aging) は、異なる概念である。個体の老化は物理学的な年齢であるが、細胞老化は生物学的加齢であり、細胞がどれだけストレスを受けたかによって老化細胞が増加するものである。

[0020] SASP因子として分泌される物質には、炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックス分解酵素、増殖因子などの炎症性タンパク質やエクソソームなどの細胞外小胞が含まれる。炎症性タンパク質としては、具体的には、TNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカイン、CCL1~CCL28まで同定されているCCケモカイン、CXCL1~CXCL17まで同定されているCXCケモカイン、XCL1、XCL2のCケモカイン、

CX3CL1のCX3Cケモカイン、MMP1～MMP28まで同定されているマトリックス分解酵素、TGF- β 、BMP、FGF、PDGF、HGFなどの増殖因子が含まれる。また、これ以外にも、炎症に伴って分泌される種々の物質が含まれ得る。

[0021] また、本発明の治療薬が効果を奏する疾患あるいは病態であるかは、以下で詳細に示す検査によって判断することができる。予め検査を行い、本治療薬が効果を奏するかを判断することは、患者に対して適切な治療法を選択するだけではなく、医療経済上も重要なこととなる。

[0022] [老化細胞において発現が変化している転写産物の解析]

以下でデータを示しながら、細胞老化の治療標的について説明する。なお、以下で用いているアッセイ法等の実験手法は、特に断らない限り当分野で通常行われている方法に拠っている。

[0023] 細胞老化をおこした細胞は異常な核形態を示し、炎症性遺伝子の発現が細胞質核酸認識機構の活性化を介して誘導されることが報告されている。さらに、細胞老化によりクロマチン構造に劇的な変化が誘導され、遺伝子発現が変化することが知られている。そこで、細胞老化の過程におけるクロマチン構造と遺伝子発現の変化の機構を明らかにする目的で、老化細胞と正常細胞におけるクロマチンのアクセシビリティとRNAの発現変化を比較した。

[0024] ヒト正常二倍体線維芽細胞IMR-90(ATCCより入手)の増殖期及びX線によって細胞老化を誘導した細胞を用い、ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin sequencing)を行った。細胞老化の過程で、16325の領域 (false discovery rate<0.05) が変化していることが明らかとなった (図1A、(a))。

[0025] ATAC-seqの結果、X線により細胞老化を誘導したIMR-90において、クロマチンのアクセシビリティが増加した14356のピークと、減少した1969のピークがあった (図1A、(b))。クロマチンのアクセシビリティに変化のあった16325領域に関し、GRCh37/hg1

9及びRepeatMaskerを含むデータベースを使用して652の転写産物についてアノテーションを行った。

- [0026] この652の転写産物について、その発現レベルを公開されているデータ（GSE130727、非特許文献1）を用いて再解析を行った（図1A、（c））。増殖期及びX線により細胞老化を誘導したIMR-90細胞のRNA-seqデータ（GSE130727）を用いて、発現レベルを解析した。その結果、ペリセントロメア領域に存在する反復配列であるhSATII（human satellite II）遺伝子座は、X線で細胞老化が誘導されたIMR-90細胞では、アクセシビリティが高く（図1A、（b））、また、その発現が増殖期の細胞に比べて著しく増加していることが明らかとなった（ $\log_{10}$ fold change = 2.8、図1A、（c））。
- [0027] 増殖期及びX線により細胞老化を誘導したIMR-90細胞のATAC-seqデータとRNA-seqデータ（GSE130727）とを統合すると老化細胞では増殖細胞に対してhSATII遺伝子座でのクロマチンアクセシビリティが高く、転写も増加していた（図1B）。ここではデータを示さないが、継代培養による細胞老化誘導や、がん遺伝子H-Ras^{V12}を発現させたIMR-90細胞、長期にわたって継代培養を続けた正常二倍体線維芽細胞TIG-3においても、細胞老化に伴ってhSATII RNAの発現が検出された。
- [0028] hSATII RNAについては、膵臓がん細胞では、RNA転写の亢進が認められることをはじめとして（非特許文献2）、大腸がんなどの多くのがんやパーキンソン病、ウイルス感染症においても高発現していることが報告され、がんの診断マーカーの候補となり得ることも開示されている（非特許文献3～9）。さらに、hSATII RNAを標的としたLNAを用いて、がん細胞や腫瘍の増殖が抑制されることも示されている（非特許文献10～11）。しかしながら、hSATIIが老化細胞で発現し炎症性遺伝子群の発現を制御していることは、本発明者らが初めて見出したことである。

[0029] [hSATII RNA発現が与える変化]

hSATII RNA発現が生物学的にどのような影響を与えるか解析を行った。不死化ヒト繊維芽細胞株であるSVts8細胞(TIG-3細胞に温度感受性SV40-Large T抗原を遺伝子導入した細胞株)を用い、hSATII RNAを過剰発現させた。RNA-Seqの結果、hSATII RNAの過剰発現は、SASP様の炎症性遺伝子群の発現を誘導した。一方、セントロメア領域に位置するヒトサテライト α RNA(hSAT α)の過剰発現では、炎症性遺伝子群の発現は見られなかった(図2A)。また、hSATII RNAの過剰発現により炎症性遺伝子群の領域がオープンになることが示されたが、hSAT α RNAではおこらなかった(図2B)。炎症反応とSASPに関連する遺伝子群の発現解析においても、hSATII RNAの過剰発現が、SASP様の炎症性遺伝子発現を増加させていることが示唆された(図2C)。

[0030] さらに、増殖期及びX線で細胞老化を誘導したSVts8細胞において、siRNAを用いてhSATII RNAをノックダウンし、SASP関連遺伝子であるCXCL10、IL1A、IFNB1の発現を解析した。hSATII RNAのノックダウンは、siRNAをLipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)によりSVts8細胞に導入して行った。以下のsiRNA配列を用い、20nM濃度でトランスフェクションし、2日後に各遺伝子の発現をRT-qPCRにより解析した。

[0031] hSATII siRNA

#1: 5' -UUUCCAUUCC AUUCCAUUC-3' (配列番号1)

#2: 5' -AAUCAUCGAA UGGUCUCGA-3' (配列番号2)

コントロール

5' -AUGAACGUGA AUUGCUCAA-3' (配列番号3)

[0032] また、hSAT11、CXCL10、IL1A、IFNB1の発現量は、RT-qPCRによって解析した。Total RNAは、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) により抽出し、TURBO DNA-freeキット (Applied Biosystems) によって、夾雑するDNAを除去した後、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) によって逆転写を行い、RT-qPCRはSYBR Premix Ex TaqII (TaKaRa) を用いて、StepOne Plus PCR system (Thermo Fisher Scientific) で実施した。プライマーは以下の配列を用いた。

[0033] hSAT11

Forward: 5' -AATCATCGAA TGGTCTCGAT-3'
' (配列番号4)

Reverse: 5' -ATAATTCCAT TCGATTCCAC-3'
' (配列番号5)

CXCL10

Forward: 5' -CCAGAATCGAAGGCCATCAA-3'
(配列番号6)

Reverse: 5' -CATTTTCCTTGCTAACTGCTTTCA
G-3' (配列番号7)

IL1A

Forward: 5' -AACCAGTGCTGCTGAAGGA-3' (配列番号8)

Reverse: 5' -TTCTTAGTGCCGTGAGTTTCC-3'
' (配列番号9)

IFNB1

Forward: 5' -AAACTCATGAGCAGTCTGCA-3'
(配列番号10)

R e v e r s e : 5' - A G G A G A T C T T C A G T T T C G G A G G -
3' (配列番号11)

- [0034] h S A T I I RNAをノックダウンすると、老化細胞において、C X C L 1 0、I L 1 A、I N F B 1の発現が低下した。図2 Dは、コントロール s i RNAで処理した増殖細胞での発現を1として相対発現量を倍率変化 (F C) で示している。また、ここでは示さないが、I M R - 9 0細胞の継代培養による老化細胞でも同様の結果が示された。これらのデータは、細胞老化に伴ってh S A T I I RNAがクロマチンアクセシビリティを変化させることにより、S A S P様炎症関連遺伝子の発現を制御していることを示唆している。
- [0035] 細胞老化に起因する疾患や疾患モデルにおいても、h S A T I I発現が炎症性遺伝子発現の制御を行っているか解析した。W e r n e r症候群は、遺伝性疾患であり、思春期以降に、白髪、白内障など様々な老化徴候が出現し、様々な加齢性疾患の発症により寿命が短い早老症候群の一つである。W e r n e r症候群患者の皮膚由来線維芽細胞 (W F 1 A) と健常者の皮膚由来線維芽細胞 (C t r l) に、継代した日をD a y - 1とし、継代翌日である0日目、及び2日目にh S A T I I s i RNAを導入し、S A T I I発現を抑制し、4日目に細胞からRNAを抽出しR T - q P C Rにより、I L - 8、C X C L 1 0の発現の解析を行った (図3 A)。h S A T I I発現を抑制することにより、I L - 8、C X C L 1 0の発現が有意に抑制されていた。
- [0036] H U V E C (ヒト臍帯静脈内皮細胞) は、酸化ストレスにより細胞老化が誘導できる血管内皮細胞モデルとして知られている。H U V E Cは継代した日をD a y - 1とし、翌日 (0日目) に4 0 0 μ M過酸化水素を加え酸化ストレスをあたえながら2時間培養した後、過酸化水素を除去し、4日目に再度継代を行う。継代翌日 (5日目) に、4 0 0 μ M過酸化水素で2時間培養し、過酸化水素を除去し、翌日 (6日目) h S A T I I s i RNAを導入し、S A T I I発現を抑制し、1日後 (7日目) に、細胞からRNAを抽出

し RT-qPCR により、IL-8、CXCL10、p16 発現の解析を行った（図 3 B）。酸化ストレスを与えて細胞老化を誘導すると、SATII RNA の発現は増加し、siRNA により発現を抑制すると、IL-8、CXCL10 といった SASP 様炎症関連遺伝子の発現と細胞老化マーカーである p16 は有意に抑制されていた。細胞老化が生じていると考えられる Werner 症候群、酸化ストレスを誘導した細胞においても SATII の抑制により、SASP 様炎症関連遺伝子の発現が抑制されることから、SATII が老化細胞において炎症関連遺伝子群の発現を制御していることが示された。

[0037] [hSATII RNA による炎症関連遺伝子の制御機構]

hSATII RNA による SASP 様炎症関連遺伝子の発現促進機構を解析するために、hSATII RNA 結合タンパク質の同定を試みた。セントロメア領域に位置する hSAT α RNA と特定のタンパク質との関連については報告されているが、ペリセントロメア領域に位置する hSATII RNA については報告されていない。そこで、RNA プルダウンと質量分析を行い、280 種の hSATII RNA 結合タンパク質を同定した。

[0038] これらのタンパク質の中から、遺伝子オントロジー解析により 26 のクロマチン結合タンパク質（GO:0003682）を同定したが、質量分析による強度スコアの高さ、及びクロマチン立体構造の維持に寄与している多数の報告から CTCF に焦点を当てて解析することとした（図 4 A）。RNA プルダウンアッセイにより hSATII RNA と CTCF が結合しているか確認を行った。SVts8 細胞溶解物を RNA プルダウンアッセイの後、ウェスタンブロットングにより解析した。hSATII RNA は CTCF に結合しているが、hSAT α RNA は結合していないことが確認された（図 4 B）。

[0039] CTCF のゲノム DNA への結合はゲノムの適切な立体構造の維持に重要であることが知られている。CTCF は RNA 結合タンパク質でもあることから、RNA 免疫沈降（RIP）を行った（図 4 D）。HEK293T 細胞

に野生型CTCF (WT)、CTCFのZF (Zinc Finger) を欠損させた変異体 $\Delta ZF1-11$ 、及び $\Delta ZF3-6$ を発現させた(図4C)。hSATII RNAは、野生型CTCFとの結合は認められるものの、CTCF変異体 $\Delta ZF1-11$ 、及び $\Delta ZF3-6$ との結合は認められなかった(図4D)。CTCFにはZFドメインが11あるが、ZF1またはZF10とRNAとの結合が、クロマチンループを形成して遺伝子発現を制御するために重要であると言われている。しかし、ここではデータを示さないが、hSATII RNAはZF1にもZF10にも結合しないことがわかった。DNA結合ドメインとして知られるCTCFのZF3-ZF6欠損変異体(CTCF $\Delta ZF3-6$)はhSATII RNAと結合できないことから、ZF3-ZF6がhSATII RNAとの結合に重要であることが明らかとなった。

[0040] CTCFを強制発現させ、さらにhSATII RNAを過剰発現させたSVts8細胞において、炎症関連遺伝子群の発現をRT-qPCRで解析した(図5A)。CTCFが過剰に発現している状況では、hSATII RNAが発現していてもその効果が失われ、炎症関連遺伝子の発現の増強が見られなかった。さらに、増殖細胞においてCTCF siRNA (Thermo Fisher Scientific、#HSS116455、#HSS116456、Negative Control (Duplex High GC Duplex) siRNA、#46-2000) を用いて、CTCFをノックダウンし、炎症関連遺伝子群の発現を解析した(図5B)。CTCFをノックダウンすると、炎症関連遺伝子の発現が増強した。予期せぬことに、CTCFのノックダウンによって、hSATII RNAの発現も上昇することが明らかとなった。これらの結果から、hSATII RNAによって誘導される炎症関連遺伝子群の発現は、CTCFの機能阻害に依存している可能性が高く、CTCFは細胞老化の過程でhSATII RNAの発現を制御していることが示唆された。そこで、TIG-3細胞(JCRB細胞バンクより入手)に継代培養により老化を誘導し、CTCF発

現量をRT-qPCR及びウェスタンブロッティングで解析した（図5C、D）。継代培養が進むとCTCFの発現量は低下し（図5C、D）、hSATII RNAや炎症関連遺伝子の発現量は増加していた（図5C）。したがって、CTCFは細胞老化の過程で、hSATII RNAの発現を制御していることが示唆された。

[0041] さらに、ここではデータを示さないが、ヒトhSATII RNAと同様に、マウスのペリセントロメア領域に位置するmajor satellite (Major SAT) RNAの発現を解析した。マウス胎児線維芽細胞（MEF）にドキソルビシンによりDNA損傷を生じさせ、細胞老化を誘導したところ、SASP関連炎症遺伝子群とともにMajor SAT RNAの発現増加が見られた。すなわち、マウスでもMajor SAT RNAの誘導はCTCFの発現と負の相関があることが示された。さらに、CTCFはマウスのセントロメアに存在するマイナーサテライト (Minor SAT) RNAではなく、ペリセントロメアに存在するMajor SAT RNAに結合し、SASP関連炎症遺伝子群の発現を上昇させた。これらの知見から、CTCFは細胞老化の際に、ペリセントロメアのサテライトRNAとSASP関連炎症遺伝子群の発現制御に重要であることが示された。

[0042] [hSATII RNAの作用機序]

CTCFのZF3-ZF6 DNA結合ドメインが、hSATII RNAとの結合に関連していたことから、hSATII RNAがCTCFのZFドメインへ直接結合することによって、DNA結合能を変化させるのではないかと仮定し、以下の検討を行った。hSATII RNAを発現させ、ChIP-Seqアッセイを行った（図6A、B）。予想通り、hSATII RNAの過剰発現により、CTCFの結合ピークの分布に変化が見られた。そこで、CTCFの代表的な結合部位であるIGF2とH19の間に位置するICR (imprinting control region) へのCTCFの結合能をChIP-qPCR及びEMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) で解析した

(図6C、D)。hSATII RNA発現により、CTCFのDNA結合能の低下が認められ、また、hSATIIのRNAの濃度依存的にその結合が阻害されることが明らかとなった。

[0043] hSATII RNAは、CTCFとDNAの結合を介したクロマチンとの相互作用を変化させる。したがって、ゲノムの適切な立体構造の維持に重要である可能性が示唆される。そこで、hSATII RNAを発現させ、SASP遺伝子であるCXCL10/CXCL11遺伝子座近傍の染色体コンフォメーションキャプチャー(3C)アッセイを行った。その結果、hSATII RNAの過剰発現により、T2及びT22領域での相互作用が著しく減弱することが明らかとなった。さらに、ATAC-seq解析によって、遺伝子座内のクロマチンアクセシビリティが増大し、SASP関連炎症遺伝子群の発現上昇が認められた。また、X線により誘導した老化細胞でも同様の現象が認められた(図6E、F)。これらの結果から、老化細胞におけるhSATII RNAの発現上昇は、SASP遺伝子座においてクロマチン構造のコンフォメーション変化を引き起こすことが示唆された。これまで細胞老化におけるCTCFの制御とSASP遺伝子発現との関連性の分子機構は解明されていなかったが、ペリセントロメアのhSATII RNAがCTCFの機能を阻害することでクロマチン相互作用に影響を与え、SASP関連炎症関連遺伝子の発現に変化をもたらすことが明らかになった。

[0044] [hSATII RNAの腫瘍に対する効果]

ヒトやマウスのサテライトRNAは、染色体不安定性を誘導し、腫瘍形成につながる可能性が報告されている。そこで、SVts8細胞にSATII RNAを強制発現させ(図7A)、染色体不安定性の典型的な特徴である多極化と染色体ブリッジの形成を免疫染色により解析した(図7B)。抗 α -チューブリン抗体(Sigma-Aldrich)により微小管を、ペリセントリン(Abcam)により中心体を、DAPI(Thermo Fisher Scientific)によりDNAの染色を行った。多極化した細胞の割合は、hSATII RNAを強制発現させた細胞で有意に増加

していた（図7B左）。また、染色体ブリッジを生じている細胞もhSATII RNAを強制発現させた細胞で有意に増加していた（図7B右）。

[0045] さらに、hSATII RNAを強制発現させた細胞は、染色体数の異常や足場非依存性増殖など、腫瘍細胞に見られる表現型を示していた。核型解析を行ったところ、hSATII RNAを強制発現させた細胞では、異常な染色体数を示す細胞が有意に増加していた（図7C）。また、軟寒天コロニー形成アッセイにより、hSATII RNA発現により、足場非依存性増殖が生じるか解析した。hSATII RNA発現によって、足場非依存性増殖を示すコロニーが有意に増加していた（図7D）。

[0046] 次に、hSATII RNAとCTCFを同時に過剰に発現させて、hSATII RNAによって誘導される染色体不安定性に影響が生じるか検討した。SVts8細胞にhSATII RNAとCTCFを強制発現させ、多極化した細胞の割合を図7Bと同様に解析した。その結果、CTCFを発現させると、hSATII RNAによって誘導される染色体不安定性が消失することが明らかとなった（図7E）。したがって、CTCFがhSATII RNAによって誘導される染色体不安定性に関与しており、腫瘍発生の危険因子であることが示唆された。

[0047] マウス胎児線維芽細胞（MEFs）を用いてMajSAT RNAを異所性に発現させた結果を示す。図7と同様に、MEFsにMajSAT RNAを強制発現させ（図8A）、多極化及び染色体ブリッジ形成（図8B）を顕微鏡により観察した。いずれも、MajSAT RNAを強制的に発現させることによって、有意に増加していた。さらに、足場非依存性増殖（図8C）、核型（図8D）についても解析を行ったところ、MajSAT RNA発現により、足場非依存性増殖を示す形質転換細胞や染色体の数の異常が有意に増加していた。さらに、これらの細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、腫瘍形成能を示した（図8E）。したがって、ペリセントロメアのサテライトRNAは、発がんを促進する可能性がある結論づけられる。

[0048] 次に、腫瘍の微小環境における h S A T I I RNA の機能に着目し解析した。がん細胞や老化した間質細胞から分泌される細胞外小胞が、がん微小環境において、腫瘍の発生や進行に関与していることが知られている。R P E - 1 / h T E R T 細胞 (A T C C より入手) に、ドキソルビシン (D X R) 、又は 4 0 - g r a y の X 線照射 (X R A) を行い、細胞老化を誘導した。これら細胞から細胞外小胞を回収して R T - q P C R を行ったところ、老化細胞由来の細胞外小胞には、 h S A T I I RNA 量が、増殖細胞由来の細胞外小胞よりも有意に多く含まれていた。しかし、 h S A T α RNA 量は増加が認められなかった (図 9 A) 。

[0049] RNA - s e q データの解析から、ヒト大腸がん細胞株から分泌される細胞外小胞 (エクソソーム) から、 h S A T I I RNA が検出されることが報告されている。これらのことから、老化した間質細胞由来の h S A T I I RNA は、細胞外小胞を介して周囲の細胞に移行し、 S A S P 様炎症因子として機能することが推論される。ここではデータを示さないが、本発明者らは、老化細胞由来の細胞外小胞が、正常細胞の足場非依存性増殖と染色体不安定性を誘導することを確認している。そこで、細胞外小胞に含まれる h S A T I I RNA の関与を評価するために、 E X O t i c デバイス (E X O s o m a l t r a n s f e r i n t o c e l l s) を用いた合成生物学的手法 (非特許文献 1 2) によって、 h S A T I I RNA を含むデザイナーエクソソームを樹立した。作製したデザイナーエクソソームを、 S V t s 8 細胞に取り込ませ、炎症関連遺伝子の発現を R T - q P C R により解析した。 h S A T I I RNA を含むデザイナーエクソソームによって、 S A S P 様の炎症関連遺伝子の発現の促進が認められた (図 9 B) 。すなわち、作製したデザイナーエクソソームは、老化細胞由来の細胞外小胞と同様の腫瘍形成活性を有することを見出した。したがって、老化細胞から分泌されるエクソソームに含まれる h S A T I I RNA は、腫瘍微小環境中の間質細胞において S A S P 様炎症関連遺伝子発現及び染色体不安定性を促進することを示している。

[0050] 腫瘍の微小環境における h S A T I I R N A の発現を原発性大腸癌患者の外科切除標本を用い、R N A i n s i t u h y b r i d i z a t i o n (R N A - I S H) 法により解析した。その結果、h S A T I I R N A を発現している大腸がん細胞が、正常上皮細胞に比べ、有意に多く存在していた (図 9 C 左)。また、がん関連線維芽細胞は、正常間質組織の線維芽細胞よりも h S A T I I R N A 陽性細胞の割合が有意に高かった (図 9 C 右)。したがって、h S A T I I R N A を発現する細胞老化した間質細胞は、S A S P 様炎症因子と h S A T I I R N A を含む細胞外小胞の分泌を介して、腫瘍微小環境において腫瘍形成を促進していることが示唆される (図 9 D)。

[0051] 上記で示したように、h S A T I I R N A を発現する老化した間質細胞は、がん微小環境を形成し、腫瘍形成を促進しているものと考えられる。そこで、h S A T I I 発現を抑制することが、間質細胞の増殖抑制に影響を与えるか解析を行った。正常腭間質細胞 h P S C (S c i e n C e l l より入手) に、h S A T I I の s i R N A を導入し、発現を R T - q P C R によって解析した。培養液にゲムシタピンを添加し細胞老化を誘導すると、h S A T I I R N A の発現が増加した (図 10 A 上段)。同時に細胞生存アッセイ C e l l T i t e r - G l o (プロメガ) を行うと、正常腭間質細胞では h S A T I I ノックダウンの影響を受けないものの、ゲムシタピンで細胞老化を誘導した腭間質細胞では h S A T I I R N A の発現を s i R N A によって抑制すると、細胞死が誘導される (図 10 A 下段)。この結果は、抗がん剤を投与し、h S A T I I R N A の発現を抑制した場合には、がん細胞だけではなく、がん微小環境を形成していた間質細胞も細胞死が誘導されることを意味する。

[0052] 次に、がん細胞だけではなく、老化細胞、不死化細胞でも、h S A T I I R N A の発現を抑制すると、細胞死もしくは増殖抑制が誘導されることを示す。正常細胞 T I G 3、不死化細胞 H E K - 2 9 3 T、大腸がん細胞 L o V o、正常細胞である I M R 9 0 を X 線照射により細胞老化を誘導した老化

細胞に、*siRNA*により*hSAT1*発現を抑制した。*siRNA*導入後3日後の細胞の顕微鏡写真を示す(図10B)。正常細胞である*TIG-3*細胞は増殖に変化は認められないものの、*HEK-293T*細胞、老化を誘導した*IMR-90*細胞では明らかな増殖抑制が認められ、*LoVo*細胞では細胞死が誘導されていることが認められた。これらの結果は、*hSAT1**RNA*発現を抑制することにより老化細胞に細胞死が誘導され排除される、もしくは不死化細胞やがん細胞の増殖が抑制されることを意味し、*hSAT1**RNA*発現の抑制により、細胞老化に起因する疾患を治療できる可能性を示している。

[0053] 本発明者らは、*TIG-3*細胞に継代培養により細胞老化を誘導する過程で*hSAT1* DNA領域をDNA-FISHで検出することで、*hSAT1**RNA*の発現に先立って*hSAT1* DNA領域が膨潤化することを見出した(図11A)。なお、DNA-FISHは、配列番号12のプロープを用いて行っているが、*hSAT1* DNA領域を検出することができるプロープであれば、どのような配列を用いてもよい。さらに、複数のがん細胞株のDNase Iシーケンスデータから*hSAT1* DNA領域のクロマチンアクセシビリティを解析したところ、正常な線維芽細胞に比べてがん細胞で明らかにクロマチンアクセシビリティが上昇していた(図11B)。

[0054] 以上の結果から、ペリセントロメアの非翻訳*RNA*である*hSAT1**RNA*を減少させることにより、細胞老化、及びこれに伴う疾患を抑制、あるいは予防することができる。具体的には、*hSAT1**RNA*発現を抑制する薬剤を投与することによって、老化細胞を排除するとともに、SASP因子の分泌を抑制することができる。上記で示してきたように、*hSAT1**RNA*発現を標的として、その発現を抑制する物質は新しい治療薬となり得る。具体的には、上記で示したように*siRNA*、*LNA*などの核酸医薬によって、*hSAT1**RNA*を減少させることができる。例えば、配列番号1及び2で表す*siRNA*は、効率よく、*hSAT1**RNA*を

枯渇させることができるため有用である。また、これに限らず、LNAやsiRNAを新たにデザインして使用してもよい。さらに、hSATII RNA発現を標的とする化合物をスクリーニングして用いることもできる。

[0055] 疾患が細胞老化に起因しているかは、hSATII RNA発現を検査することによって、確認することができる。例えば、配列番号4及び5で示すプライマーセットを使用すれば、hSATII RNA発現を確認することができる。組織サンプルを用いてRNA-ISHで検出することも可能である。hSATII RNAはエクソソームなどの細胞外小胞にも含まれることから、血液・尿・腹水などの体液を用いて細胞外小胞内のhSATII RNAの量を検出することも可能である。また、hSATII RNA発現によって、発現が促進されるSASP因子を測定しても構わない。SASP因子は、RNA発現を測定してもよいし、タンパク質量や分泌された量をELISAで測定してもよい。用いる試料は、疾患部位の組織、例えば、がんであれば生検によって採取した組織であってもよいし、体液由来の細胞外小胞を用いてもよい。また、CTCF発現の低下を検査してもよい。hSATII RNAの発現、SASP因子の発現、CTCFの発現減少が認められた場合には、上述のhSATII RNA発現を抑制する医薬組成物を用いて治療を行うことができる。hSATII RNAの発現に先立ってhSATII DNA領域が膨潤化しクロマチンアクセシビリティが増すことから、DNA-FISH解析やATACシーケンス解析のようなエピゲノム解析や、体液中のゲノムDNA断片や細胞外小胞を用いた解析から、疾患の予測・診断を可能とする可能性がある。

[0056] さらに、hSATII RNA発現抑制、SASP因子の発現抑制、あるいはCTCF発現増加、hSATII DNA領域の収縮やクロマチンアクセシビリティ低下などのエピゲノム変化を指標として、化合物をスクリーニングすることもできる。例えば、FRETアッセイを用いた系を構築することにより、感度良く低分子化合物をスクリーニングすることができる。具体的には、hSATII RNAには、ドナーとなる蛍光物質で標識されたピ

ーズを、CTCFに抗体などの特異的結合物質を介してアクセプターとなる蛍光物質で標識されたビーズを結合させた系を構築することができる（図12）。ライブラリー化合物を添加し、特定の蛍光波長で励起すれば、SATII RNAとCTCFが近接した状態にあるかを判定することができる。あるいは、老化細胞を候補化合物とともに培養し、候補化合物によって、hSATII RNA発現が抑制、あるいはCTCF発現増加、hSATII DNA領域の収縮やクロマチンアクセシビリティ低下がおこれば、老化に起因する疾患の治療薬として機能し得る。老化細胞は実施例で示したような継代培養、X線照射、ドキソルビン暴露等、通常この分野で用いられている細胞老化誘導法を用いることができる。hSATII RNA、CTCF発現は、RT-qPCR、RNA-ISH等、これも周知の方法で解析することができる。また、SASP因子群の遺伝子発現解析や分泌によってもモニターすることができる。

[0057] 以上、示したように、hSATII RNAによるSASP誘導の機序と老化細胞の生存への関与を明らかにした。老化細胞では染色体のペリセントロメア領域が開いて、この領域から非翻訳RNAであるhSATII RNAがさかんに転写されている。hSATII RNAが染色体構造を維持するために重要な機能を担っているCTCFと結合し、その機能を阻害することにより染色体相互作用を変化させ、炎症性遺伝子群の転写が誘導されることを明らかにした。炎症性遺伝子群の転写がさかんな老化細胞は加齢性疾患の発症や病態の増悪に関与する。したがって、hSATII RNAを新たな標的とし、炎症性SASP関連遺伝子群の発現を抑制するSenomorphic機能と老化細胞に選択的に細胞死を誘導するSenolytic機能を併せ持つSenotherapyにより、加齢性疾患を予防もしくは治療できる可能性がある。また、hSATII RNA発現、CTCF発現、ゲノムDNAのエピゲノム変化は細胞老化の初期の段階から生じることであるから、これを検出することにより、加齢性疾患の原因となる老化細胞を早期に検出することができる（図13）。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞老化に起因する疾患の治療薬及び／又は予防薬であって、
h S A T I I RNAの発現抑制もしくは活性阻害、及び／又はC
T C F発現を増加させることを特徴とする医薬組成物。
- [請求項2] 前記医薬組成物がh S A T I I RNAの発現抑制もしくは活性阻
害及び／又はC T C F発現を増加させる核酸医薬であることを特徴と
する請求項1記載の医薬組成物。
- [請求項3] 対象に細胞老化が生じているかデータを取得する方法であって、
試料中のh S A T I I RNA、C T C F発現、ゲノムDNAのエ
ピゲノム変化のいずれか1つを検出することを特徴とするデータ取得
方法。
- [請求項4] 老化細胞に起因する疾患を検査に使用することを特徴とする請求項
3記載のデータ取得方法。
- [請求項5] 老化細胞に起因する疾患の治療薬及び／又は予防薬をスクリーニン
グする方法であって、
老化細胞の培地に候補化合物を添加し、
h S A T I I RNA発現減少、h S A T I I RNA機能阻害、
C T C F発現の増加、S A S P因子の発現減少、h S A T I I D N
A領域の収縮、クロマチンアクセシビリティの低下の少なくともいず
れか1つを指標として、
候補化合物を選択することを特徴とする医薬のスクリーニング方法
。