

## 長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

老化細胞を可視化および除去できる新規遺伝子改変モデルマウスの開発と  
免疫老化機構の解析（30-38）

主任研究者 亀井 優香 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部（研究員）

### 研究要旨

細胞老化は個体の加齢性変化に影響する要因の一つであると考えられている。生体から老化細胞を除去可能な遺伝子改変マウスを用いた複数の先行研究において、老化細胞の除去が組織の加齢性変化を軽減すること、また疾患モデルにおいては病態の発症や進行を食い止めることが示されている。そこで本研究では、生体内において免疫系をはじめとする老化細胞を可視化し、かつそれらをジフテリア毒素の投与により任意の時期に除去できる老化細胞可視化モデルマウスを新たに作出することを試みた。具体的には、観察が容易である蛍光タンパク質遺伝子（tdTomato）あるいはヒト特異的な細胞表面抗原（hCD2）をマーカー遺伝子として用いた。また、個体内にみられる種々の老化細胞を可視化および除去するために、老化細胞において発現が増加する遺伝子（*Ink4a*）の下流に、この遺伝子の生理的な発現を妨げないようマーカー遺伝子とジフテリア毒素受容体遺伝子（DTR）をノックインした。このノックインマウス（tdT-DTR および hCD2-DTR）の胎児線維芽細胞を継代培養により老化させると、ノックインしたマーカータンパク質の発現が増加した。また、その tdT-DTR マウス由来の細胞がジフテリア毒素の添加により除去できることを確認した。現在、このノックインマウス個体を用いて、少なくとも皮膚と脾臓においては加齢によりマーカー遺伝子の発現が増加することを観察している。今後、作出したモデルマウスの皮膚と脾臓を中心に、細胞老化と組織の加齢性変化の関連を調べる。組織中の老化細胞を生体から除去することで、老化した個体の組織における機能（特に免疫機能）の恒常性にどのような変化を及ぼすのかを検討したい。

### 主任研究者

亀井 優香 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部（研究員）

### 分担研究者

なし

## A. 研究目的

個体老化にともない免疫機能が低下することが問題となっているが、実際に免疫細胞の老化を定量的に測定することはこれまで成功しておらず、それらの生理的な意義はよく分かっていない。近年、生体内における老化細胞の機能を知るために、生体内の老化した細胞のみを可視化でき、その老化細胞を任意に除去することができる遺伝子改変マウスが構築されている (*Dev. Cell*, 2014, 31, 722; *Nature*, 2011, 479, 232)。本研究部に所属する杉本らは、生体内で老化細胞のみをルシフェリンの発光により可視化し、その老化細胞をジフテリア毒素の投与により任意の時期に除去できる遺伝子組換えマウスを作製した (*JCI insight*, 2016, 1, e87732)。しかし、老化細胞を可視化するマーカーとして用いたルシフェラーゼが基質の投与を必要とする点、また、今のところ、その発光が肺や脂肪など特定の組織でしか観察されなかったという点で免疫老化研究には用いにくかった。そこで本研究では、生体内において老化免疫細胞（特に老化リンパ球）を可視化し、かつそれらを任意に除去することを目的とした老化細胞可視化モデルマウスを新たに作出する。そのモデルマウスを用いて個体老化にともなう免疫細胞の老化状態を定量的に測定し、さらに老化免疫細胞を個体から除去した際に起こる個体や免疫機能への影響を調べる。

## B. 研究方法

老化細胞で発現量が増加する遺伝子 *Ink4a* の下流に、可視化用マーカータンパク質をコードした配列をノックインしたマウスを作製した。マーカー遺伝子と直列に DTR 遺伝子も 2A ペプチド配列と共にノックインすることで *Ink4a* タンパク質の機能を損なわずに発現を検出し、かつジフテリア毒素 (DT) の投与により任意のタイミングで老化細胞を除去することを目指した。この作製には Cas9 遺伝子組換え系を用いた *in vivo* ゲノム編集技術を駆使し、マイクロインジェクション法により、1 細胞期の受精卵にマーカー遺伝子断片を直接ノックインした。

得られた遺伝子改変マウスのマーカー遺伝子が老化細胞で機能することを確認するために、遺伝子改変マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を調製した。継代を繰り返して細胞老化を引き起こさせた細胞で、マーカー遺伝子が発現していることを確認した。また、DT の添加によって老化細胞が除去されることを確認した。

*Ink4a* 遺伝子を発現している組織を明らかにするために、ノックインマウス個体から組織を摘出し、RNA を抽出した。*Ink4a* 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いた RT-qPCR により、組織中の転写量を求めた。*tdTomato* と *hCD2* 遺伝子についても特異的なプライマーを設計し、RT-qPCR により組織中の転写量を求めた。

マーカータンパク質が発現していることを *in vivo* イメージングで観察した。体毛が観察の妨げとなるため、*tdT-DTR* マウスを Hr 遺伝子欠損マウス (ヘアレスマウス) と交配し

て毛のない tdT-DTR ノックインマウスを得た。Excitation を 500 nm-535 nm、Emission を DsRed に設定し、得られた画像は ImageMath で処理した。

(倫理面への配慮)

本研究計画には動物実験が含まれている。本研究に関する動物実験の実施に関しては、日本学術会議により出された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守した。実験動物の福祉を踏まえ、使用および処分に関する苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会により承認を受け、研究機関が定めた動物実験取扱規定に則って実施した。

### C. 研究結果

昨年度は、Cas9 遺伝子組換え系を用いた *in vivo* ゲノム編集技術により、目的の遺伝子配列がノックインされたマウスを 2 系統ずつ得た。遺伝子改変マウスから調製した MEF では、継代を繰り返して細胞老化を引き起こさせると、マーカー遺伝子が転写および翻訳レベルで発現することを確認した。また、tdT-DTR マウスの MEF では DT の添加によって老化細胞が除去されることを確認した。

今年度は、ノックインマウス個体中におけるマーカータンパク質の発現を確認することを目指した。まず、11 か月齢のノックインマウスから様々な組織を採取し、RT-qPCR 法により *Ink4a* 遺伝子を発現している組織を明らかにすることを試みた。わずかではあるが、3 か月齢の若い個体と比べて 11 か月齢の個体では、脾臓と皮膚において *Ink4a* 遺伝子の転写量が増加していた (図 1)。

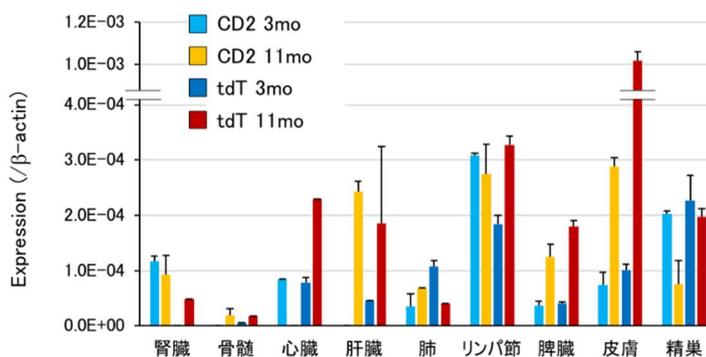
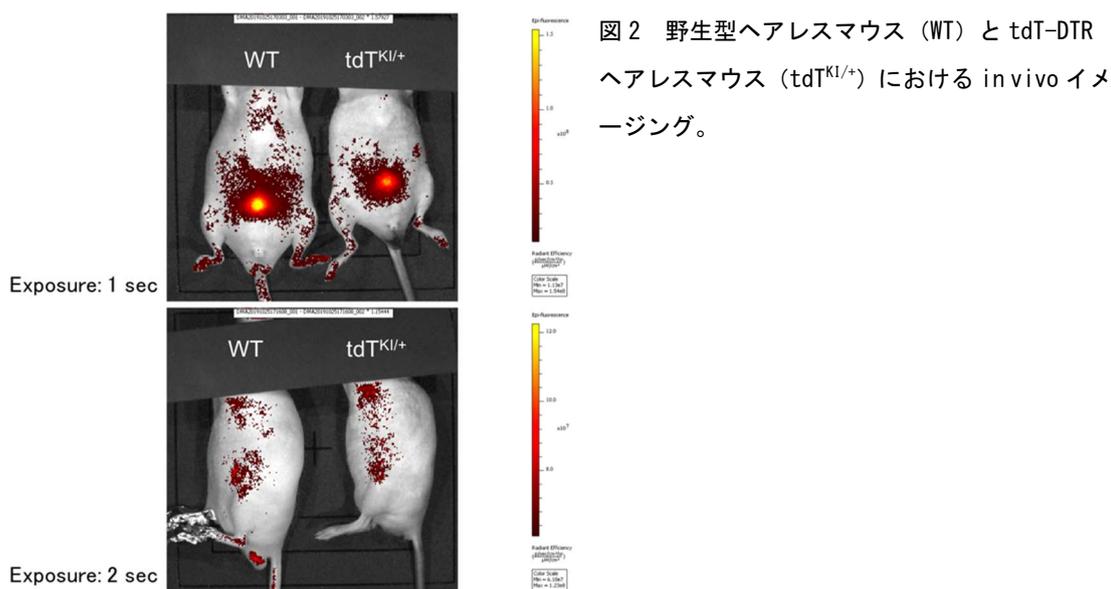


図 1 ノックインマウスの各臓器における *Ink4a* 遺伝子の発現量。

次に、各臓器のマーカー遺伝子の転写量を調べた。*Ink4a* 遺伝子と同様に、わずかではあるものの脾臓と皮膚においてマーカー遺伝子の転写量が増加傾向にあることが観察され

た。

そこで、マーカートンパク質が発現していることを *in vivo* イメージングで観察するために、tdT-DTR マウスを Hr 遺伝子欠損マウス(ヘアレスマウス)と交配して毛のない tdT-DTR マウスを得た。このマウスを IVIS で観察したが、加齢にかかわらず Ink4a が発現する精巣においても、野生型ヘアレスマウスと違いが見られなかった (図 2)。その後、このマウスから臓器を取り出し、臓器に対して励起光を当てて観察したが、蛍光は見られなかった。



ノックインマウス個体における可視化用マーカートンパク質の発現を確認するために、精巣におけるウェスタンブロッティングや、同じく精巣や皮膚における免疫染色を試みた。しかし、マーカートンパク質の発現は検出できなかった。

#### D. 考察と結論

本研究では、生体内において老化免疫細胞を可視化し、かつそれらを任意に除去することができる老化細胞可視化モデルマウスを新たに作出することを目指している。今年度は、Cas9 遺伝子組換え系を用いた *in vivo* ゲノム編集技術により得られたノックインマウス個体から、可視化用マーカートンパク質を検出する系を確立することを試みた。しかし、現在のところ検出系を確立するに至らなかった。今年度に用いた加齢マウスは最高齢でも 12 か月齢であり、検出可能なマーカートンパク質量を発現させるにはマウスをより加齢させる必要があるかもしれない。また、MEF ではマーカートンパク質の発現が十分に観察できたことから、組織での観察が困難であれば初代培養細胞を用いた観察も検討する必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 亀井優香、川口耕一郎、小谷祐子、松田一成、保田朋波流、真下知士、杉本昌隆、丸山光生

「老化細胞可視化除去モデルマウスを用いた皮膚老化解析への試み」

第 42 回日本分子生物学会年会、福岡、2019 年 12 月

- 2) 亀井優香、川口耕一郎、金湘殷、保田朋波流、真下知士、杉本昌隆、丸山光生

「老化細胞可視化除去マウスの作製と免疫老化機構の解明」

第 42 回日本基礎老化学会大会、仙台、2019 年 6 月

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