

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

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 金森 久美子 国立長寿医療研究センター 炎症・免疫機構研究部
(研究補助者)

研究要旨

細胞老化は組織の加齢性変化に影響を与える生理現象であると考えられている。近年、この細胞老化と組織や個体レベルでの老化との関係を検証するため、生体内の老化細胞を可視化・除去できるいくつかのモデルが作出された。しかし、老化細胞を可視化・除去できる組織は限られており、加齢における細胞老化の関与を検証できていない臓器が少なくない。加えて、多くのモデルはトランスジェニックマウスであるため、ランダムな領域に導入された遺伝子の発現が生体内の現象としての細胞老化をどの程度反映しているか、という課題が残されている。

高齢者の QOL を著しく損なう原因のひとつとして免疫系の機能低下が挙げられる。老齢個体の免疫系細胞では細胞老化マーカー p16^{INK4a} が上昇することが知られているが、免疫機能との因果関係ははっきりしていない。本研究では、細胞老化のマーカーとして知られている p16^{INK4a} をコードする CDKN2A 遺伝子のエクソン 3 の下流に 2 種類のマーカー分子 (tdTomato、hCD2) のいずれか一方とヒトジフテリア毒素受容体を導入した新しい 2 種類のノックインマウスモデル (CDKN-tdT-hDTR マウス /CDKN-hCD2-hDTR マウス) を作成した。

これらのマウスから調製した胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) は、継続的な培養で誘導される p16^{INK4a} の発現にともなってそれぞれのマーカー分子 (tdTomato、hCD2) を発現し、また老齢個体においても、脾臓や肺、リンパ球でのマーカー遺伝子の高い発現量が確認された。さらに、抗体毒素 (イムノトキシン) やジフテリア毒素を用いた手法により、脾臓、肺、リンパ球、皮膚などの組織において老化細胞を除去できたことを強く示唆する結果が得られた。本研究において、現在明らかとなっていない免疫老化や皮膚の加齢性変化などにおける細胞老化の生理的意義を検証できる、新しいモデルの開発に成功した。

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 (特任研究員)
(平成 30 年度～平成 31 年度 (令和 1 年度))

金森久美子 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 (研究補助員)
(令和 2 年度)

研究期間 平成 30 年 4 月 1 日～令和 3 年 3 月 31 日

A. 研究目的

高齢者の QOL を大きく低下させる免疫老化をはじめとした加齢組織の機能低下における、細胞老化の生理的関与を検証する、新しい評価モデルの構築と解析。

B. 研究方法

1. 老化細胞可視化除去を目的とした 2 種類のノックインマウスの樹立

生理的な細胞老化という現象を評価するため、細胞老化マーカー分子 p16^{INK4a} をコードするゲノム上の CDKN2A 遺伝子 (第 3 エクソン下流) に対し、ゲノム編集による遺伝子導入を行った。これにより、蛍光分子 tdTomato とヒトジフテリア毒素受容体 (hDTR) を導入した CDKN-tdT-hDTR マウスならびに、ヒト CD2 (hCD2) と hDTR を導入した CDKN-hCD2-hDTR マウスの 2 種類のノックインモデルを作出した。

2. 胎児線維芽細胞を用いた導入遺伝子の発現と機能の評価

作出した 2 種類のノックインマウスそれぞれから MEF 細胞を調製し、継続的な培養によって細胞老化を誘導した。この際、導入した可視化マーカー分子 (tdT /hCD2) は細胞老化マーカー p16^{INK4a} の誘導とともに発現量が増加することを確認した。次に hDTR の発現誘導を評価し、CDKN-tdT-hDTR マウス由来の MEF 細胞ではこれを確認できたため、実際にジフテリア毒素の処理を行った。この際、継続的な培養で p16^{INK4a} の発現量が高くなった細胞では毒性がみられることを確認した。一方、CDKN-hCD2-hDTR マウス由来の胎児線維芽細胞では hDTR の発現が確認できなかったため、イムノトキシンによる老化細胞の除去を想定し、植物由来の毒素であるサポリンを結合させた抗 hCD2 抗体 (anti-hCD2-SAP) の開発を行った。次に anti-hCD2-SAP を CDKN-hCD2-hDTR マウス由来の MEF 細胞に処理し、p16^{INK4a} の発現量が高い細胞を選択的に除去できることを確認した。

3. ノックインマウスの組織における、導入遺伝子の発現と機能の評価

老齢マウスの脾臓とリンパ節からリンパ球を回収し、FACS で hCD2 高発現細胞集団を分取することで、p16^{INK4a} の発現レベルが異なる細胞集団に対しトランスクリプトーム解析を行った。また老齢 CDKN-hCD2-hDTR マウスに PBS もしくは anti-hCD2-SAP を尾静脈から投与し、FACS と RT-qPCR によって脾臓などの組織で p16^{INK4a} の発現レベルを解析した。さらに老齢 CDKN-tdT-hDTR マウスには PBS もしくはジフテリア毒

素を投薬し、背部の皮膚における p16^{INK4a} の発現レベルを RT-qPCR によって解析した。

4. 胎児線維芽細胞を用いた細胞老化不均一性の解析

CDKN-hCD2-hDTR マウス由来の MEF 細胞を用いて p16^{INK4a} の発現とともに細胞表面に hCD2 が発現することを指標とし、セルソーターによって p16^{INK4a} の発現レベルが異なる細胞集団を分取し、トランスクリプトーム解析を行った。これにより、細胞老化の進行速度が異なる細胞集団間において、炎症性因子類の発現量に大きな差があることがわかったため、RT-qPCR による確認を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた動物実験の実施に関しては、日本学術会議による「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

I. 老化細胞可視化除去を目的とした 2 種類のノックインマウスの樹立

ゲノム編集技術を用いた相同遺伝子組み換え法によるノックインを行い、CDKN2A 遺伝子のエクソン 3 下流に 2 種類の可視化マーカー分子 (tdTomato、hCD2) のいずれかと hDTR を導入した 2 種類のノックインマウスモデル (CDKN-tdT-hDTR マウス /CDKN-hCD2-hDTR マウス) の作成に成功した。

II. 老化免疫細胞除去マウスの樹立と解析

CDKN-hCD2-hDTR マウスから MEF 細胞を採取して培養した結果、p16^{INK4a} の mRNA の増加にともなう細胞表面分子 hCD2 の発現上昇を確認できた。また個体レベルでも、CDKN-hCD2-hDTR マウスの老齢化個体は若齢個体と比べ、脾臓や肺などで hCD2 の mRNA の発現レベルが高く、リンパ球 (B 細胞 /T 細胞) においても hCD2 を高発現した細胞集団が増加していることを確認できた。さらにこの hCD2 の発現レベルを指標にリンパ球をセルソーターで 2 種類の細胞集団に分取し、トランスクリプトーム解析にて比較した結果、老化リンパ球の細胞表面マーカーとしての可能性をもつ候補分子を複数発見した。

CDKN-hCD2-hDTR マウスでは hDTR の発現を確認できなかったため、生体内での老化細胞除去の新しい戦略として、抗 hCD2 モノクローナル抗体に細胞毒素サボリンを結合させたイムノトキシンを作成した。作成したイムノトキシンを CDKN-hCD2-hDTR マウスから調製した MEF 細胞に処理した結果、hCD2 を発現している細胞集団に対し選択的に細胞死を誘導できることがわかった。さらに生体においても、イムノトキシンの投

与個体では対照個体と比べ、hCD2 高発現リンパ球の集団が明らかに小さく、脾臓や肺における p16^{INK4a} の mRNA の発現レベルも低いという結果が得られた。

III. 老化皮膚細胞除去マウスの樹立と解析

CDKN-tdT-hDTR マウスから胎児線維芽細胞を採取して培養した結果、p16^{INK4a} の mRNA の増加にともなう tdTomato の蛍光量の増加を確認できた。また培養老化にともなう hDTR の発現が確認され、実際にジフテリア毒素処理群では生細胞数が顕著に少ないことを確認できた。個体レベルでは、tdTomato の蛍光が想定より弱かったため老化細胞の生体イメージングは出来ていないが、ジフテリア毒素を投与した老齢個体では対照個体と比べ皮膚における p16^{INK4a} の発現量が著しく低いという結果を得た。

IV. 胎児線維芽細胞を用いた培養老化不均一性の解析

CDKN-hCD2-hDTR マウスから調製した MEF 細胞の解析から、個々の細胞における培養老化の速度は一樣でないことが示唆された。実際に hCD2 の発現レベルが多様化している継代数 5 の細胞を相対的に低発現のものと高発現のものに分取し、p16^{INK4a} の発現レベルが大きく異なる細胞集団を得た。これらの細胞集団をトランスクリプトーム解析で比較したところ、細胞老化の速度が比較的遅い細胞集団では一部のケモカイン類を中心に炎症性因子の発現が顕著に亢進している事実を発見した（論文投稿準備中）。

D. 考察と結論

MEF 細胞の継続的な培養によって誘導される細胞老化の解析から、両モデルマウスに導入した可視化遺伝子は細胞老化マーカー分子 p16^{INK4a} の発現量を反映して発現することがわかった。両モデルにおける老化細胞の生体イメージングには成功していないが、CDKN-hCD2-hDTR マウスにおいては p16^{INK4a} の発現に応じて細胞表面に hCD2 分子が発現するため、細胞膜を破壊せずにセルソーターによる分取が可能となった。これにより、MEF 細胞や脾臓由来のリンパ球から p16^{INK4a} の発現レベルが異なる集団に対する、トランスクリプトーム解析による比較が可能になった。その結果、老化リンパ球の細胞表面マーカーとしての候補分子を同定した。また培養老化過程の MEF 細胞には比較的緩やかに細胞老化が進行する細胞集団が存在し、これらは特定のケモカインを高発現していることがわかった。

CDKN-hCD2-hDTR マウスでは hDTR が発現しなかったため、細胞表面の hCD2 を標的とした細胞障害性の抗体（イムノトキシン）を用いた老化細胞除去戦略に変更した。この抗体は、MEF 細胞の培養過程で増加する hCD2 高発現細胞集団を選択的に除去できることを確認できた。またイムノトキシンを尾静脈投与した老齢個体では非投与老齢個体と比べ、脾臓や肺全体で p16^{INK4a} の発現が低かったこと、さらに老化リンパ球と考えられる細胞集団が明らかに少なかったことから、組織中に存在する老化細胞の除去に成功した可能性が高い。

一方、CDKN-tdT-hDTR マウスから調製した MEF 細胞は継続的な培養によって誘導される細胞老化にともなって hDTR を発現し、ジフテリア毒素にも感受性を示した。またジフテリア毒素を投与した老齢個体では、非投与老齢個体と比較して、皮膚における p16^{INK4a} の発現が顕著に低かった。したがってこのモデルマウスでは老化皮膚細胞の除去に成功したと考えられる。

本研究では、現在までに老化細胞の関与がはっきりしていない免疫系と皮膚の老化に対し、有望な検証モデルの構築に成功した。また、老化細胞特異的な細胞表面マーカー分子の同定が進めば、イムノトキシンによる老化細胞除去システムの応用の幅はさらに広がると考えられる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

2021年度

1). kenji Watanabe, Yuka Kamei, Ikuo Kimura, Mitsuo Maruyama

Anti-inflammatory effect of water-soluble soy isoflavones with aging and the murine gut microbiome

「大豆たん白質研究」第23巻 2021年6月刊行予定

2. 学会発表

2019年度

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、2019年12月、福岡

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、2019年6月、仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。