

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究（21－27）

主任研究者 渡邊 淳 国立長寿医療研究センター 共同利用推進室（室長）

研究要旨

研究推進基盤センターは、国立長寿医療研究センター（以下 NCGG）内で実施される研究を技術的に支援する組織である。網羅的な生体分子解析技術や遺伝子改変技術等の向上は日進月歩で、老年病に関する高度専門医療に資する研究開発を推進する NCGG としては、常に新しい技術の情報収集とそれらの可能な限りの実装を行なっているだけでなく、NCGG 独自の研究にマッチした既存技術の創意工夫なども行なっている。

本研究では、老年病患者試料等の解析や、その解析から得られた疾患関連候補分子の性状分析、機能解析などを実施し、既存技術の有用性を立証して研究支援に応用できる基盤を構築する。今回は以下の3項目を実施した。

- 1) 分析機器の性能向上により疾患バイオマーカーの探索研究が盛んとなっている。NCGG では認知症の血液マーカー分子の探索研究が複数進行していることから、本研究では質量分析装置を用いて血中タンパク質の解析技術の構築を試みる。また網羅的解析によるタンパク質の変動解析やパスウェイ解析などの解析手法を確立する。
- 2) ゲノム編集技術を利用した遺伝子ノックアウトおよびノックインを、マウス、ゼブラフィッシュ、ヒト培養細胞において実施できる環境を整える。またこれを用い、認知症に関連した遺伝的多型、および DNA のメチル化多型の機能解析を試行する。
- 3) 加齢動物に特徴的なリンパ球（老化関連リンパ球）の存在が明らかになり、個体の老化に伴う免疫機能低下や炎症に関与していることが示唆されている。免疫系の老化における老化関連リンパ球の意味を研究する技術として、これらリンパ球の増殖や活性を個体レベルで制御できる実験系が求められている。本研究では、老化関連リンパ球で発現増加する因子を標的した低分子化合物や抗体を用いてこれらを個体レベルで除去したり、活性を阻害したりする技術を開発する。

主任研究者

渡邊 淳 国立長寿医療研究センター 共同利用推進室（室長）

分担研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター 分子機能解析室（室長）

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター バイオセーフティ管理室（室長）

A. 研究目的

加齢による身体機能の低下や疾患は、年齢とともに生体内で生ずる様々な変化が積み重なった結果として引き起こされる。そこで、これら疾患の発症原因や病態を解明し、その理解に立脚して予防法や治療法を開発するにあたり、加齢に伴う生体内の変化を分子レベルで正確に解析する必要がある。本研究は、共用機器の整備や基盤となる研究システムの運用に携わる研究推進基盤センターを構成する研究グループが有機的に連携し、エイジングファームやバイオバンクなど当センター独自の研究リソース活用することにより、老化による生命現象の変化を網羅的かつ効率よく解析することを目指している。また、本研究を通じて研究基盤を充実させ、センターにおける研究活動の推進に資することも目的のひとつとして掲げている。

はじめに分析機器の性能向上により、疾患バイオマーカーの探索研究が盛んとなっており、NCGG では認知症の血液マーカー分子の探索研究が複数進行している。そこで本研究では質量分析装置を用い、アルツハイマー病における血中タンパク質の網羅的解析手法を構築し、特定の因子の変動や、どの経路が関与しているかについてパスイ解析を行う。さらに、翻訳後修飾の同定に関する解析技術の構築を目指す。

二つ目は老年病の発症原因や病態を解明し、その理解に立脚して予防法や治療法を開発するには疾患のモデルとなる動物が必要である。当センター内では現在、メディカルゲノムセンターを中心としたゲノム解析からアルツハイマー病やレビー小体型認知症の発症に関連したバリエーション（DNA の塩基置換）を持つ遺伝子が次々と発見されており、次の段階としてそれらバリエーションのもたらす影響をモデル動物で評価することが必要となっている。この場合、効率やコストの面、またノウハウの蓄積がなされるという点、さらに技術の継承がなされるということから、変異体を集約的に作成する支援体制をセンター内に構築するのが合理的である。そこで本研究ではゲノム編集技術を利用して、高齢者特有の疾患に関連する遺伝子のノックアウトとバリエーションのノックインをマウスとゼブラフィッシュ、さらに培養細胞で行い、それらをセンター内研究者に供給できる体制の構築を目的とする。

三つ目は加齢動物に特徴的なリンパ球（老化関連リンパ球）の存在が明らかになり、個体の老化に伴う免疫機能低下や炎症に関与していることが示唆されている。免疫系の老化における老化関連リンパ球の意味を研究する技術として、これらリンパ球の増殖や活性を個体レベルで制御できる実験系が求められている。本研究では、老化関連リンパ球で発現増加する因子を標的した低分子化合物や抗体を用いてこれらを個体レベルで除去したり、活性を阻害したりする技術を開発する。

B. 研究方法

研究は、各所属施設の専門委員会の審査、承認を得て、動物愛護や遺伝子組み換え、ヒトサンプル使用等に関係する法律を遵守して実施し、本年度は以下の研究を行った。

1) 血中タンパク質の網羅的解析

アルツハイマー病の血中タンパク質を解析するにあたり、患者の血液の網羅的解析でマーカー候補となるペプチドの同定率を上げることが必須となる。そのためには、液体クロマトグラフィーでのペプチドの分離条件の検討が必要不可欠であることから、カラムの選択や流速及びグラジエント等のパラメーターの条件検討を行い、解析方法の最適化を試みた。さらにアルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿を用い、血液中に高濃度に含まれる主要な 14 種類のタンパク質の抗体が固定化されたアフィニティーカラムを用いて、液体クロマトグラフィーで分離を行った。素通り画分と吸着した画分に分けた後、各々の画分はトリプシンで消化し、質量分析を行った。変動があったタンパク質についてはウェスタンブロットにより、変化がないか確認を行った。質量分析では捉えることが困難なタンパク質に関しては、サンドイッチ ELISA やウェスタンブロットを用いた解析を行った。アルツハイマー病では脳内炎症が起こっていることから、sTREM2、MCP-1/CCL2、YKL-40 と Clusterin、fractalkine、Free BDNF、TNF- α 、IL-1 β /IL-1F2、IL-6、IL-8/CXCL8、IL-10、C-Reactive Protein/CRP、GFAP の解析を行った。

2) ゲノム編集技術を認知症研究へ応用するための環境構築

マウスとゼブラフィッシュに対し、ゲノム編集（ノックアウトおよびノックイン）を行えるよう環境整備した。NCGG で見出された 5 つの新規認知症関連遺伝子を対象として、有効なガイド RNA のデザイン法や導入法、変異の検出法などを見出した。ガイド RNA と Cas9 タンパク質の複合体を形成させた後、マウス受精卵へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入、受精卵の偽妊娠マウスへの移植、自然出産あるいは帝王切開による産仔の取得、仮親による育成を行った。離乳した産仔（G0; 変異の possible carrier）から DNA を抽出し、ノックアウトについては HMA (heteroduplex melt curve analysis)を行った。HMA 後、変異が検出された G0 については変異がモザイクで存在すると考えられた。ノックインについては変異導入箇所を PCR により増幅した後、ダイレクトシーケンスあるいは制限酵素処理により、一塩基置換の有無を解析した。変異を有している可能性のある G0 マウスを野生型マウスとアウトクロスし、F1 マウスを得た。F1 の中の変異キャリアの同定は G0 の変異同定と同じ手法により行った。すべての変異は最終的にシーケンスにより確認した。

ゼブラフィッシュについても同様にノックイン個体を作成した。ガイド RNA と Cas9 タンパク質の受精卵への導入はマイクロインジェクションにより行った。

3) 老化関連リンパ球を個体レベルで制御する技術の開発

昨年度までに、T細胞とB細胞について老化細胞と非老化細胞を分取することを可能にした。これにより分取した細胞から抽出したRNAをcDNAに逆転写し、増幅したものを次世代シーケンサーで解析し、加齢に伴って蓄積する老化関連T細胞（SA-T細胞）で発現が上昇しているシグナル伝達因子を同定した。そこで、この因子を阻害する化合物を用いて、SA-T細胞の誘導や機能を阻害することを試みた。また、SA-T細胞と同様に、加齢に伴って増加する加齢関連B細胞（ABC）について、細胞骨格制御関連の遺伝子発現の増加が認められたため、細胞骨格が関与する細胞の遊走や抗原取り込み（貪食）について検討した。

i) SA-T細胞を抑制する化合物についての検討

マウスより採取したCD4⁺T細胞を、抗CD3と抗CD28で刺激し、3日間培養した。この時に、SA-T細胞で発現が上昇しているシグナル伝達因子を阻害する化合物を加えた、SA-T細胞（PD1⁺, CD153⁺）の割合を検討した。また、マウスよりSA-T細胞を採取し、化合物存在下、非存在下での抗CD3と抗CD28の刺激に応答したオステオポンチンの産生量について検討した。さらに、高脂肪食を投与した糖尿病モデルマウスに化合物を投与し、脾臓におけるSA-T細胞の割合について検討した。

ii) 老化関連B細胞（ABC）の特性についての検討

マウス由来の濾胞（Fo）B細胞とABCよりRNAを抽出し、定量RT-PCRにより細胞骨格制御関連因子について発現の差異を検討した。また、マウス由来の濾胞（Fo）B細胞とABCの遊走能と貪食能について、それぞれ比較した。

（倫理面への配慮）

臨床試料の解析については、倫理・利益相反委員会によって法令（人を対象とする医学系研究に関する倫理指針）に定められた基準への適合性について審査・承認を得たうえで行った。また、当センターのバイオバンクに保存されている生体試料は既に研究に利用することを許可され、番号化されており、研究者が患者の個人情報を知ることができないようになっている。

遺伝子操作や疾患モデル動物については、当センターの各専門委員会の審査、承認を得て実施した。動物実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」等の遵守、遺伝子組換え実験では、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等の法令を遵守して研究を行った。

C. 研究結果

1. 血中タンパク質の網羅的解析

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿を用いた質量分析によって同定されたタンパク質のリストを作成し、変化が見られたタンパク質について、各々それらの抗体を用いたウェスタンブロットにより、変化がないか確認を行った。現在までに行った各血漿のウェスタンブロットでは、アルツハイマー病患者や認知機能正常者の違いより、個々の検体での違いが大きい、もしくはそれほど顕著な違いが見られない等、アルツハイマー病特異的といったタンパク質は同定されていない。今後、他のタンパク質での検討及び検体数を増やし変化がないか解析を行う予定である。

ミクログリア活性化マーカーの sTREM2、ミクログリア炎症反応マーカーの MCP-1/CCL2、アストロサイト活性化マーカー YKL-40 と Clusterin、神経細胞-ミクログリア相互コミュニケーションマーカーの fractalkine、抗炎症メディエータ Free BDNF、また、炎症系サイトカインとして TNF- α 、IL-1 β /IL-1F2、IL-6、IL-8/CXCL8、IL-10、C-Reactive Protein/CRP、さらに神経炎症関連蛋白として GFAP の血清を用いたサンドイッチ ELISA を用いた解析で、MCP1 と TREM2 が脳内炎症と特に相関するという結果が出ており、更なる解析を行っている。また、アルツハイマー病に密接に関連する APP や ApoE、ニューロフィラメントといったタンパク質についても、それらの抗体を用いたウェスタンブロットによる解析を行ったところ、各症例で変化が見られたことから、症例数を増やして解析を行っている。

2. ゲノム編集技術を認知症研究へ応用するための環境構築

マウスおよびゼブラフィッシュにおいてゲノム編集技術を利用したノックアウトおよびノックイン個体の作出を行えるよう環境整備した。具体的には以下の四項目である。

- 1) 簡便なガイド RNA のデザイン法やオーダー法の選択と、それらの情報を希望者に伝えるための文書化
- 2) エレクトロポレーションによるマウス受精卵へのガイド RNA 導入レシピの検討（実験動物管理室との共同研究による）
- 3) ゼブラフィッシュ受精卵にゲノム編集のためのマテリアル（ガイド RNA と Cas9 タンパク質）を顕微注入するためのシステム立ち上げ
- 4) ゲノム編集の成否を確認するための簡便な変異検出技術の立ち上げ

現在、これらの基盤的技術に基づきメディカルゲノムセンターから依頼を受けた 2 つの新規レビー小体型認知症関連遺伝子 *MRPL43*, *MFSD3*（マウスでは *Mrpl43*, *Mfsd3*）についてノックアウトマウス個体を、また *MRPL43* のレビー小体型認知症関連バリエーションおよび、アルツハイマー型認知症関連のバリエーションが見つかった、3 つの遺伝子 *MLKL*, *OR51G1* および *SHRPIN* の 3 遺伝子（それぞれマウスでは *Mlkl*, *Olfir578*, *Sharpin*）、計 4 遺伝子についてノックイン変異体マウスの作出を試みた。ノックアウト型ゲノム編集について *Mfsd3* については成功し、*Mrpl43* は体細胞モザイク変異状態で

胚性致死となると判断した。そのためヒト型の認知症関連 *Mrpl43* バリエントのノックイン個体作成に期待が持たれたが、やはりノックイン個体は作成できなかった。*Mkl* のノックアウトおよびノックイン個体の作出については、最終的にノックイン変異がモザイクで存在する G0 個体が一匹得られ、野生型マウスとアウトクロスすることで、最近 *Mkl* ノックイン変異を持つ F1 個体を複数得られた。そしてその後行った *Olf578* と *Sharpin* バリエントのノックインも導入された G0 個体が複数得られており、現在野生型とアウトクロスしている。

ゲノム編集を利用したゼブラフィッシュのノックアウト変異体作製も *Mfsd3* と *Mrpl43* について行った。*Mfsd3* についてはマウス同様、ホモ変異体が 2 系統得られた。*Mrpl43* については、ガイド RNA/Cas9 導入胚における同遺伝子への変異導入は確認できたものの、マウスの場合と同様致死となった。

3. 老化関連リンパ球を個体レベルで制御する技術の開発

i) 化合物による SA-T 細胞の産生や機能の抑制

SA-T 細胞で発現が上昇しているシグナル伝達因子の阻害剤存在下で SA-T 細胞を誘導し、たところ、阻害剤により SA-T 細胞の分化誘導が大幅に減少した。また、この阻害剤存在下で SA-T 細胞を刺激した結果、刺激に応答したオステオポンチンの産生が抑制されることを見出した。また、糖尿病モデルマウスに化合物を投与したところ、脾臓における SA-T 細胞の割合が減少することが明らかになった。

ii) ABC における細胞骨格制御の亢進

ABC において複数の細胞骨格制御因子の発現が上昇していたことから、細胞骨格が関与する細胞遊走や貪食について検討した。その結果、ABC はケモカインがない状態でも遊走すること、ケモカインの濃度勾配存在下では、Fo B 細胞に比べて遊走能が亢進していることが示された。また、FITC を標識したデキストリンの貪食能を検討したところ、ABC が高い貪食能を示すことが明らかになった。

D. 考察と結論

1) 血液バイオマーカーは様々な疾患で注目されていることから、質量分析を用いた血中タンパク質の網羅的解析は研究者に有用な情報となり、同様の解析を必要とする研究にとって基盤となる技術である。しかしながら、現在まで質量分析によって得られた結果が、ウェスタンブロットによって確認できなかった。質量分析では翻訳後修飾や変異によりペプチドの同定率が低下した結果、スコアが変動した可能性が考えられる。また、ウェスタンブロットにおいても抗体のエピトープ部分が何らかの翻訳後修飾や変異によって反応性に違いが出ることも考えられる。血漿タンパク質は特に糖鎖等の修飾がなされているので、今後これらの修飾も考慮に入れ、解析を行っていく予定である。最近、定量プロテオミクスの手法

の進歩によってデータ依存的解析から直接定量情報を得ることができるソフトウェアが開発された。今後、これらの解析からより正確な相対的な定量データが得られれば、ウェスタンブロットの結果との相違がなくなることが期待される。また、パスウェイ解析などによって、疾患群でどのような経路が変化しているのかについての情報が得られ、血液バイオマーカーや治療標的の開発に役立つことが期待される。

2) 当該研究は当センターにおける認知症等の長寿医療の中核となる疾患の病態解明に資する研究技術開発を行う課題である。ゲノム編集技術を認知症の理解や痛みの抑制へ応用するための環境構築の第一歩であるノックイン・ノックアウト変異体の作製について全般的に順調に進んでいる。今後もセンター内の横断的協力体制により同定されると期待される新規認知症関連遺伝子はもちろん高齢者の QOL 向上に大切な「痛み」の関連遺伝子の機能解析や治療薬開発をするうえで欠かせない疾患モデル生物を迅速かつ安価に所内研究者に対して提供できることが期待される。なおヒト *MRPL43* 遺伝子のレビー小体型認知症関連バリエーションのマウスへの導入を試みたが産仔が得られずマウスでの当該バリエーションはおそらく細胞、正確には受精卵、の生存を許さないほどに有害な変異であることが示された。この結果からマウスを単純にヒトの認知症モデルとして扱うには結果の解釈に十分な注意が必要であることが明らかになった。モデル動物個体の作製を優先したので、ヒトの培養細胞へのノックインのシステム構築まではリソースが回らずまだ行えていない。次年度の課題である。

3) SA-T 細胞で発現が上昇しているシグナル伝達因子を阻害することにより、*in vitro* における SA-T 細胞の産生と機能を抑制できることが示された。また、*in vivo* においても SA-T 細胞の割合を減らすことができ、この因子が SA-T 細胞制御の標的となり得ることが示された。今後、この因子が SA-T 細胞の産生や機能に関わるメカニズムを解明するとともに、*in vivo* で効果的に SA-T 細胞を抑制できる方法を検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishikimi A, Kojima M, Watanabe K, Watanabe A, Yasuoka M, Oshima H, Tokuda H, Niida S. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among workers in a national research institute and hospital in Central Japan. GHM Open 1: 40-42, 2021.

- 2) Nishikimi A, Watanabe K, Watanabe A, Yasuoka M, Watanabe R, Oshima H, Kitagawa Y, Tokuda H, Niida S, Kojima M. Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies after one-year follow up among workers in a research institute in Japan. Journal of Infection doi: 10.1016/j.jinf.2021.10.021.
- 3) Yasuno F, Kimura Y, Ogata A, Ikenuma H, Abe J, Minami H, Nihashi T, Yokoi K, Hattori S, Shimoda N, Ichise M, Sakurai T, Ito K, Kato T. Kinetic modeling and non-invasive approach for translocator protein quantification with ¹¹C-DPA-713. Nuclear Medicine and Biology 108-109 (2022) 76-84.
- 4) Sugiyama Y, Fujiwara M, Sakamoto A, Tsushima H, Nishikimi A, Maruyama M. The immunosenescence-related factor DOCK11 is involved in secondary immune responses of B cells. Immun Aging 19: 2, 2022.

2. 学会発表

- 1) 錦見昭彦 新型コロナウイルス感染症の特徴とワクチン治療 第 32 回日本老年学会総会 2021 年 6 月 13 日、WEB 開催
- 2) 杉山悠真、錦見昭彦、丸山光生 Diversity of p16^{Ink4a}-associated chronological senescence in MEF culture.第 44 回日本基礎老化学会大会、2021 年 6 月 12 日、愛知
- 3) 丸山光生、杉山悠真、津島博道、錦見昭彦 生体防御系の加齢変化と個体老化 第 94 回日本生化学会大会 2021.11.5
- 4) 杉山悠真、津島博道、錦見昭彦、丸山光生 細胞老化における p16 INK4a の発現に付随した CC ケモカインクラスター遺伝子の特徴的発現様式 日本分子生物学会第 44 回年会 2021.12.3
- 5) Fujiwara M, Maruyama M, Nishikimi A. The role of MELK in B cell proliferation and differentiation. 第 50 回日本免疫学会学術集会 2021.12.9

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