

長寿医療研究開発費 平成 30 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 流動研究員

研究要旨

免疫老化の原因の一つは、免疫担当細胞の加齢にともなう機能的な低下に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、生体内において老化免疫細胞を可視化し、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した。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ることを検討した。また、免疫系に限らず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*) の下流にこれらの遺伝子の生理的な発現を妨げずに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の老化した胎児線維芽細胞において、ノックインしたマーカー遺伝子が発現していることを確認した。今後、作出したモデルマウスにより個体の老化にともなう免疫老化を定量的に把握する。老化免疫細胞を生体から除去することで、老化した個体における免疫機能の恒常性にどのような変化を及ぼすのか精査し、免疫老化の病原体感染防御能や、ワクチン効果等を含む生理的役割を明らかにする。最終的に、他の生体機能低下や個体老化への影響も考察する。

主任研究者

亀井 優香 国立長寿医療研究センター 流動研究員

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きている (*Dev. Cell*, 2014, 31, 722; *Nature*, 2011, 479, 232)。そのひとつである遺伝子組換えマウスは、生体内で老化細胞のみを可視化でき、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 (*JCI insight*, 2016, 1, e87732)。しかし、今のところ、その蛍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の分子機構の解明には適さなかった。そこで本研究では、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ト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。

(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

今年度はまず、遺伝子導入用のベクターを構築した (図 1)。老化細胞を可視化するマーカー遺伝子として観察が容易である蛍光タンパク質遺伝子 (tdTomato) また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ることとし、それぞれを 2A ペプチド配列でジフテリア毒素受容体遺伝子 (DTR) と直列に連結した (tdT-DTR および hCD2-DTR)。目的の老化細胞特異的遺伝子座 (Cdkn2a/Ink4a) で相同組み換えを起こしやすくするために、導入する遺伝子断片の上流と下流にはそれぞれ約 1 kb の相同配列 (arm) を連結し、プラスミドに挿入した。

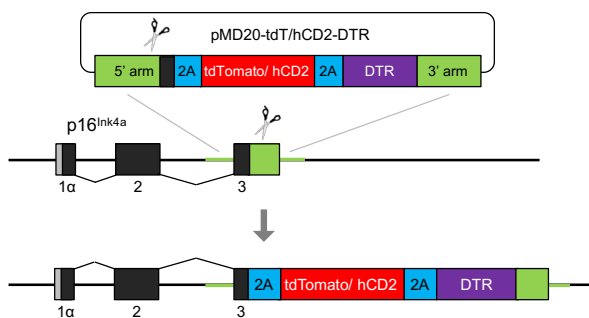


図1 遺伝子導入用ベクターおよび組換え後 Ink4a 遺伝子座の模式図。遺伝子断片は 相同組み換えにより Ink4a 遺伝子のエキソン 3 の下流に組み込まれ、Ink4a タンパク質の機能を損なわずに発現する。

受精卵への遺伝子導入は大阪大学医学部附属動物実験施設の真下知士准教授のグループに依頼した。Cas9 遺伝子組換え系を用いた *in vivo* ゲノム編集技術により、1 細胞期の受精卵にプラスミド断片をマイクロインジェクションした。結果を表 1 に示した。

系統	受精卵数	移植胚数	産仔数
tdT-DTR	246	130	17
	200	62	18
hCD2-DTR	239	136	9

表1 マイクロインジェクションの結果

得られた遺伝子組換えマウス候補の尾からゲノム DNA を抽出し、PCR によりタイピングを行った。tdT-DTR と hCD2-DTR マウスの両系統に対して、2 匹ずつが目的の遺伝子型であると判断し、導入遺伝子全長の遺伝子配列を確認した。

次に、ノックインしたマーカー遺伝子が老化した細胞で機能するかを確かめるために、それぞれの系統について繁殖を行い、得られたノックインマウスの雄を野生型の雌個体と交配させ、胎児から MEF を調製した。得られた MEF を継代して細胞老化を引き起こさせたときの、遺伝子の転写量を調べた (図 2)。継代回数が増えるに従って *Ink4a* 遺伝子の転写量が増加し、それとともにマーカー遺伝子の転写量が増加した。また、蛍光顕微鏡による観察においても、継代した MEF でマーカータンパク質が発現していることが認められた (図 3 と図 4)。これらのことから、少なくとも細胞レベルにおいて、ノックインしたマーカー遺伝子が機能していることが確認できた。

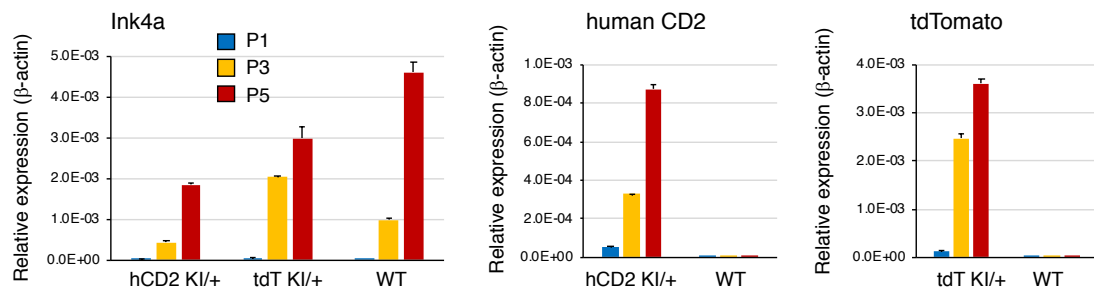


図2 継代したMEFにおけるInk4a、human CD2およびtdTomato遺伝子の転写量。1回（P1）、3回（P3）および5回（P5）継代した細胞からRNAを抽出し、定量RT-PCRをおこなった。

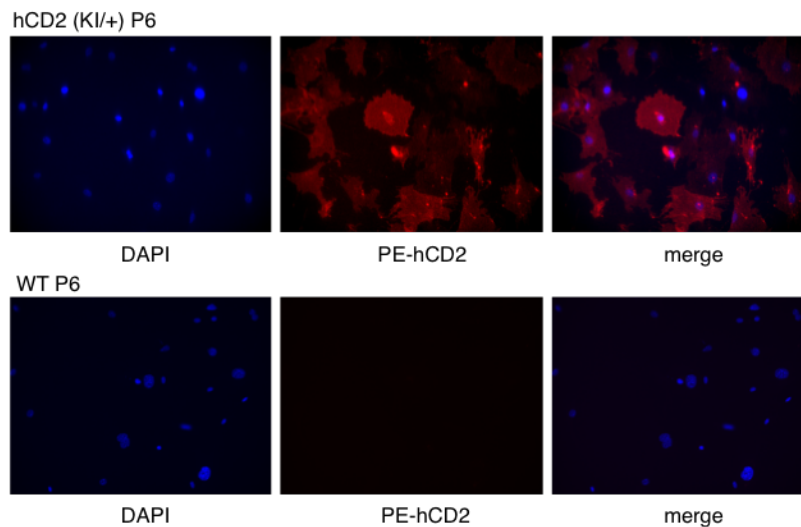


図3 継代したMEFにおけるhCD2タンパク質の発現。6回継代したhCD2-DTRマウスと野生型のMEFをPE付きの抗hCD2抗体で染色して蛍光顕微鏡で観察した。

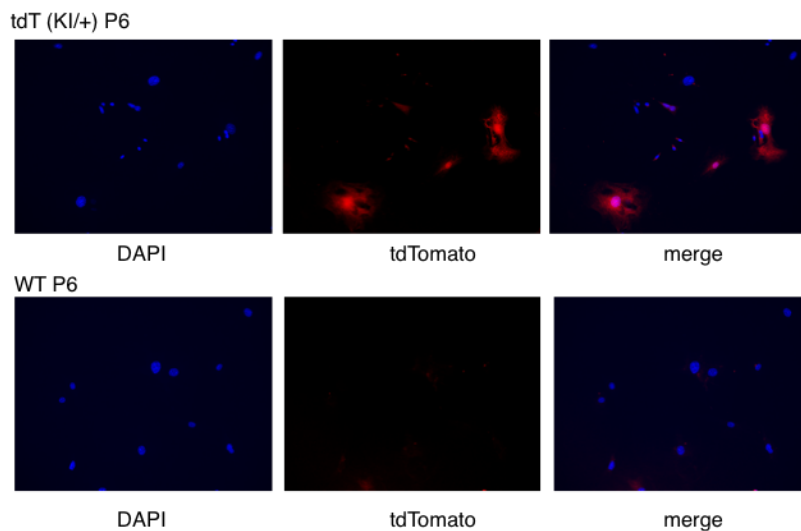


図4 継代したMEFにおけるtdTomatoタンパク質の発現。6回継代したtdT-DTRマウスと野生型のMEFを蛍光顕微鏡で観察した。

さらに、継代によって老化した MEF が DT の投与によって除去できるかを検討した。tdT-DTR マウスの MEF をプレートに播種し、培地に DT を加えて 48 時間後の tdTomato の蛍光量を測定した (図 5)。6 回継代した tdT-DTR の MEF では、DT 添加によって明らかに蛍光量が減少した。

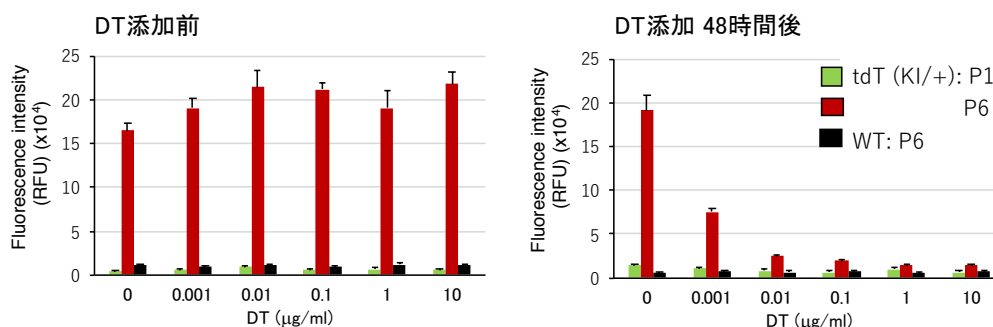


図 5 DT 添加による tdTomato 蛍光量の変化。

また、乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を指標とする細胞傷害試験では、DT の濃度依存的に LDH の放出が増加していることが示された (図 6)。以上のことから、継代により老化した MEF は DT 処理によって除去できていると判断した。

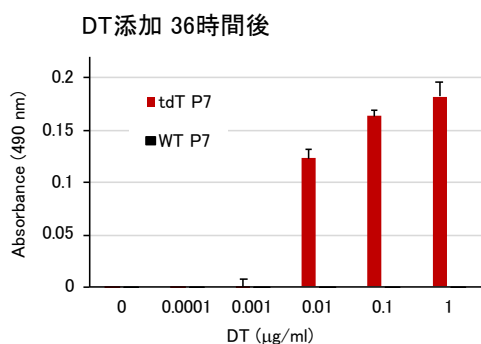


図 6 DT 添加による LDH 放出量の変化。7 回継代した (P7) tdT-DTR および野生型マウスの MEF に DT を添加し、36 時間後に培地中に存在する LDH 活性を測定した。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

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。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。老化した個体中の臓器あるいは細胞（特に免疫細胞）において、マーカー遺伝子が発現するかどうかは今後検討する必要がある。

E. 健康危険情報

なし

※班のすべての健康危険情報について記載すること。このため、分担項目に係る情報であっても分担研究報告ではなく、こちらに記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

2. 学会発表

なし

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

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。