

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06900

研究課題名(和文) リプログラミング技術を利用した細胞老化のエピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenetic analysis of cellular senescence using the technology for reprogramming cells

研究代表者

三好 浩之 (Miyoshi, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：70219830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：分裂停止し老化した正常ヒト線維芽細胞からiPS細胞を樹立できるかどうかを検討した。その結果、山中リプログラミング4遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)のみの導入では樹立することはできず、Lin28、SV40LTと2種類のエピジェネティクス制御化合物の追加により、非常に低い頻度ではあるが樹立することができた。老化細胞由来iPS細胞の増殖や形態は、50回以上継代を重ねても、老化前の細胞由来iPS細胞と変わらず、網羅的遺伝子発現、ゲノムワイドのDNAメチル化およびヒストン修飾の比較解析においても差はほとんど見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は、DNA損傷、酸化ストレス、がん遺伝子発現などのストレスによって誘導され、不可逆的に細胞分裂が停止する現象であるが、その分子機構はまだ不明な点が多い。本研究では、分裂能を完全に失い老化した正常ヒト線維芽細胞から、非常に低い頻度ではあるがiPS細胞を樹立することができた。このことから、エピジェネティックな変化によって細胞は老化するが、リプログラミングによってエピジェネティックな変化はリセットでき、分裂停止した老化細胞は若返ることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We asked whether iPS cells could be generated from replicatively senescent human fibroblasts. We were not able to generate iPS cells with the four Yamanaka reprogramming factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc). However, we succeeded in generation of iPS cells, albeit with extremely low efficiency, using lentiviral vectors expressing the four factors plus Lin28 and non-integrating lentiviral vector for transient expression of SV40LT together with two chemical compounds targeting epigenetic enzymes. There was no difference between iPS cells from senescent cells and control iPS cells for cell growth and morphology up to passage 50 as well as global gene expression profiles, DNA methylation status, and histone modifications. There was also no difference for cellular senescence of fibroblasts differentiated from iPS cells. These results indicate that cellular senescence caused by epigenetic changes can be rejuvenated by reprogramming.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 リプログラミング エピゲノム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老化とは、加齢とともに非可逆的に進行する多くの分子的、生理的、形態学的な衰退現象であると定義される。個体の老化は、加齢に伴う各組織・臓器の機能あるいはそれらを統合する機能が低下し、個体の恒常性を維持することが不可能になり、最終的には死に至る過程である。加齢に伴う老化の特徴は、組織・臓器により異なり、特に再生系組織と非再生系組織では老化のメカニズムも大きく異なると考えられ、個体の老化現象は非常に複雑かつ多面的である。そこでこれまでの老化研究は、1961年に Hayflick によって報告された、ヒト線維芽細胞を試験管内で培養すると細胞の分裂回数には限界があり増殖停止状態になるという細胞老化についての研究が多く行われてきた。現在この分裂寿命による細胞老化は、テロメラーゼ活性のないヒト体細胞において細胞分裂毎のテロメアの短縮により p53 経路が活性化され、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI)の p21 が蓄積することにより増殖が停止すると理解されている。また、骨髄や上皮組織等に含まれる組織幹細胞は、弱いテロメラーゼ活性を持ち、テロメアの短縮を遅延させ一生を通して細胞供給を可能にしているが、加齢とともにテロメアは短縮し、基本的には有限の分裂寿命を持ち老化することが明らかとなっている。さらに、酸化ストレスや DNA 損傷あるいは癌遺伝子の発現などの様々なストレスによって、分裂寿命によらない早期細胞老化が引き起こされることもわかってきた。早期老化では、p53 経路や p16<sup>Ink4a</sup>/Rb 経路の活性化およびポリコム遺伝子による CDKI のレベル上昇により増殖が停止することが明らかとなっている。しかしながら、細胞が老化する分子メカニズムはまだその多くが解明されておらず、細胞老化という複雑な現象の十分な理解には至っていない。

一方、胚盤胞の内部細胞塊から樹立される ES 細胞では、テロメアが長いだけでなくテロメラーゼが発現しており、分裂を繰り返してもテロメアは短縮せず無限の分裂寿命を持つ多能性幹細胞である。また、体細胞に 4 種類の遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を強制発現させることで細胞のリプログラミングが起こり、ES 細胞と同様の多能性を獲得した iPS 細胞を誘導できることが示された(Takahashi et al. Cell, 2006 他)。iPS 細胞は、c-Myc による体細胞特異的遺伝子の発現抑制と Oct3/4、Sox2、Klf4 による ES 細胞特異的に発現する遺伝子の転写活性化および ES 細胞特異的なヒストン(H3K4、H3K27)メチル化パターンを誘導することにより多能性を獲得し(Sridharan et al. Cell, 2009)、テロメア長も回復することが明らかとなっている(Marion et al. Cell Stem Cell, 2009)。一方、4 種類のリプログラミング遺伝子の発現は、DNA 損傷反応の誘導と Ink4a/Arf 遺伝子座のクロマチンリモデリングを通して、p53、p16<sup>Ink4a</sup>、p21 の発現上昇による細胞老化を引き起こし、リプログラミングの初期段階を阻害することが報告された(Banito et al. Genes Dev, 2009)。さらに、p53 遺伝子欠損マウスの胎仔線維芽細胞や、siRNA 法により p53、p21、p19<sup>Arf</sup>、p16<sup>Ink4a</sup> を抑制した体細胞から iPS 細胞を作製すると、数倍～10 倍以上樹立効率が上がることも報告された(Utikal et al. Nature, 2009 他)。このことから、細胞の老化とリプログラミングには共に p53 経路や Ink4a/Arf 遺伝子座の発現が大きく関わっており、老化関連経路の抑制がリプログラミングに重要であることが示唆されていた。

### 2. 研究の目的

リプログラミング技術により非可逆的細胞周期停止状態にある老化細胞からも iPS 細胞を樹立することができるのか? という疑問が本研究の出発点である。老化細胞から iPS 細胞を樹立できた場合には、元の老化細胞や老化前の細胞由来の iPS 細胞との間で、遺伝子発現レベル、エピジェネティックな変化、細胞周期や細胞機能などの性状を比較解析することにより、細胞老化の分子メカニズム解明の新たな糸口となることを目指す。

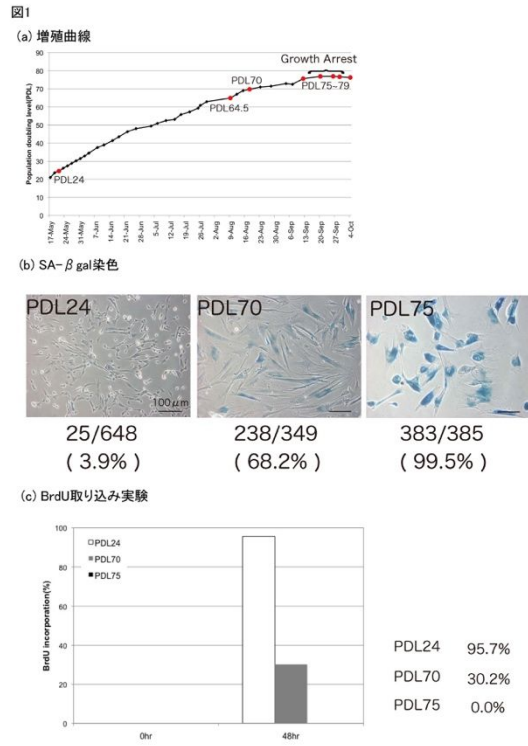
### 3. 研究の方法

継代培養を重ねて分裂停止したヒト老化線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を試みる。そのために、レンチウイルスベクターを用いて 4 遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を強制発現させると共に、p53 経路や p16<sup>Ink4a</sup>/Rb 経路を抑制する、あるいはリプログラミングを促進すると考えられる遺伝子や化学化合物の添加を組み合わせることにより、樹立効率を高める。iPS 細胞の確認は、アルカリフォスファターゼ(AP)活性陽性、内在性の Nanog、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子の発現、テロメラーゼ活性、未分化マーカー(Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81)の免疫染色で行い、最終的には NOD/SCID マウスの精巣に移植してテラトーマ形成を行い三胚葉系への分化能で判断する。老化細胞から iPS 細胞が樹立できた場合には、老化前の細胞から樹立した iPS 細胞、および元の老化細胞と老化前の細胞について、マイクロアレイ解析、RNA-Seq 解析、DNA メチル化解析、クロマチン免疫沈降法を用いて、遺伝子発現レベルおよびエピジェネティック変化を比較解析する。また、iPS 細胞の継代培養を重ねて増殖能を比較し、in vitro で様々な細胞に分化誘導した際の分化能と増殖能も比較する。

### 4. 研究成果

ヒト線維芽細胞(NB1RGB)は、継代培養を重ねて集団倍加数(PDL)が 70 では約 70%の細胞が分裂能を失い、PDL 75 でほぼすべての細胞が完全に分裂を停止し老化することを、細胞老化の指標である SA-gal(老化関連 ガラクトシダーゼ)染色の陽性度と DNA 合成の際に取り込まれる BrdU の陰性度により確認した(図 1)。PDL=24, 64.5, 70, 76.3 の NB1RGB 細胞に、非分裂細胞に遺伝子導入可能なレンチウイルスベクターを用いて 4 遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を

導入し、iPS細胞の作製を試みたところ、コントロールの若い細胞(PDL=24)からは0.02%の効率でiPS細胞が樹立できたが、老化細胞(PDL=64.5, 70, 76.3)からは若い細胞の千倍以上の細胞数を用いても樹立することができなかった(表)。次に4遺伝子に加えて染色体非挿入レンチウイルスベクターを用いてp53のshRNAを一過性に発現させる方法を試みた。その結果、PDL=64.5の細胞から0.0025%、PDL=70の細胞から0.0017%と非常に低い効率ではあるがiPS細胞の樹立が可能になった。また、PDL=24の細胞からの樹立効率は約5倍上昇した。しかしながら、分裂増殖能を失ったPDL=76.3の老化細胞からは、ES細胞様コロニーの形成は見られたものの、すべてAP活性は陰性で、iPS細胞の樹立には至らなかった。次に細胞増殖を開始する段階が律速であることが示唆されたことから、染色体非挿入レンチウイルスベクターによってSV40LTを一過性に発現させ、p53経路およびp16/Rb経路を抑制し再び細胞増殖を開始させた後、4遺伝子とp53のshRNAの導入を試みたが、iPS細胞は樹立できなかった(表)。そこで、iPS細胞の樹立効率を上げることが知られているLin28遺伝子の導入に加え、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(RG108)とヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤(BIX01294)を添加した。その結果、非常に低い効率(0.00001%)ながらも、PDL=76.3の老化細胞からiPS細胞を樹立することができた(表)(図2)。また、老化細胞由来iPS細胞の増殖や形態は、50回以上継代を重ねても、老化前の細胞由来iPS細胞と変わらないことが確認された。

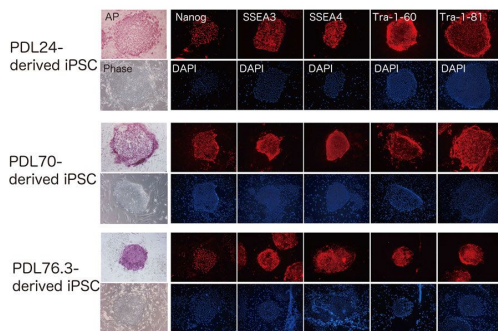


表

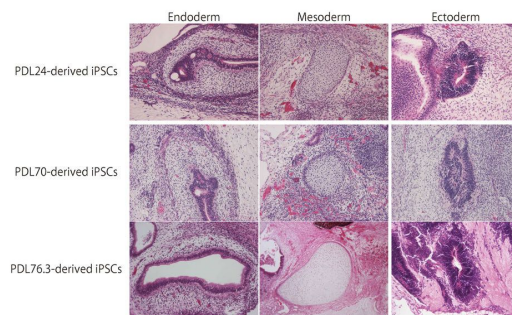
導入遺伝子 添加化合物	iPS細胞樹立効率 (%)			
	PDL: 24	64.5	70	76.3
4F (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)	0.02	0	0	0
4F, p53 shRNA	0.1	0.0025	0.0017	0
4F, p53 shRNA, SV40LT	ND	ND	ND	0
4F, Lin28, SV40LT, RG108, BIX01294	ND	ND	ND	0.00001

図2

(a) 未分化マーカー免疫染色

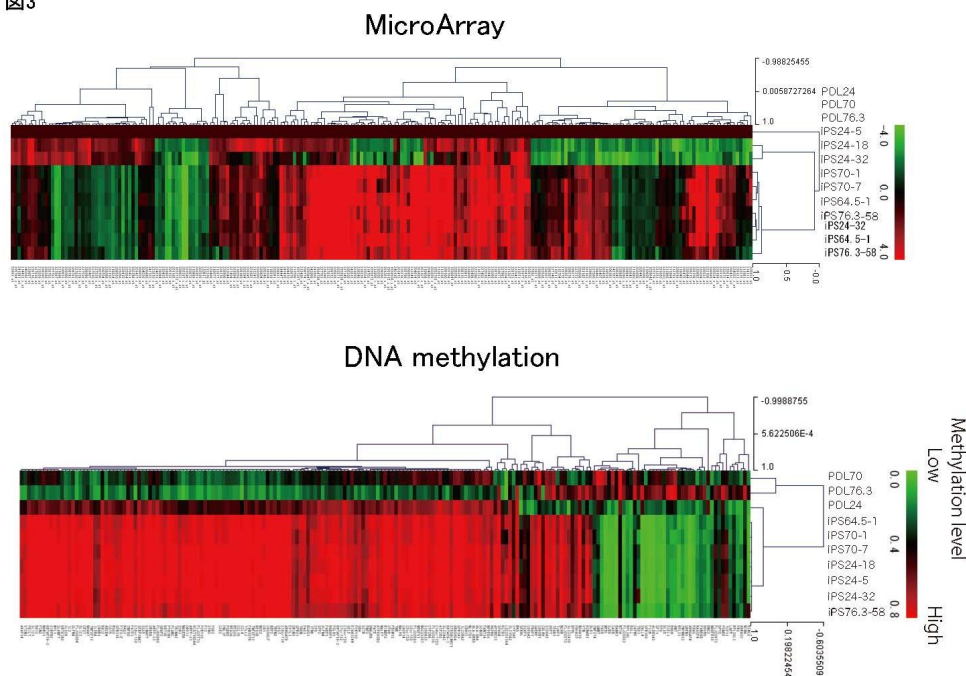


(b) テラトーマの三胚葉系への分化



マイクロアレイとRNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析、イルミナ社のHumanMethylation27BeadChipを使用したゲノム全領域で27,578のCpGサイトのDNAメチル化解析、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3の抗体によるクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)によるゲノムワイドのヒストン修飾解析を行ったところ、老化細胞由来iPS細胞と老化前の細胞由来iPS細胞との間での差はほとんど見られなかった(図3)。また、iPS細胞から線維芽細胞へ分化誘導した後の分裂寿命についても差は見られなかった。

図3



以上の結果から、エピジェネティックな変化によって細胞は老化するが、リプログラミングによってエピジェネティックな変化はリセットでき、分裂停止した老化細胞は若返ることができると考えられる。しかしながら、iPS細胞の樹立効率が極めて低かったことから、樹立できたiPS細胞はまだ完全に老化して分裂停止していなかった細胞に由来する可能性も否定できない。今後、分裂停止した老化細胞のリプログラミング効率をさらに上げることが重要である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

1. Minagawa A, Yoshikawa T, Yasukawa M, Hotta A, Kunitomo M, Iriguchi S, Takiguchi M, Kassai Y, Imai E, Yasui Y, Kawai Y, Zhang R, Uemura Y, Miyoshi H, Nakanishi M, Watanabe A, Hayashi A, Kawana K, Fujii T, Nakatsura T, Kaneko S. Enhancing T cell receptor stability in rejuvenated iPSC-derived T cell improves their use in cancer immunotherapy. *Cell Stem Cell* 23, 850-858 (2018). doi: 10.1016/j.stem.2018.10.005. 査読有
2. Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, Hiratsuka T, Kogure T, Hoshida T, Goshima N, Matsuda M, Miyoshi H, Miyawaki A. Genetically encoded tools for optical dissection of the mammalian cell cycle. *Mol Cell* 68, 626-640 (2017). doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.001. 査読有
3. Hashizume O, Ohnishi S, Mito T, Shimizu A, Ishikawa K, Nakada K, Soda M, Mano H, Togayachi S, Miyoshi H, Okita K, Hayashi J. Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci Rep* 5, 10434 (2015). doi: 10.1038/srep10434. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

1. 三好浩之. Basics and clinical applications of lentiviral vectors. 第23回日本遺伝子細胞治療学会 2017年.
2. 三好浩之. Clinical use of lentiviral vectors. 第22回日本遺伝子細胞治療学会 2016年.
3. 三好浩之. The Use of Suicide Genes in iPSCs for Safety and Cancer Therapy. 第21回日本遺伝子治療学会 2015年.

### 〔図書〕(計1件)

1. 三好浩之. パイオロジクスの開発と品質・安全性確保 下巻 第4部 第2章 第4節 レンチウイルスベクター, エル・アイ・シー, 428-448 (2018).

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 尚美

ローマ字氏名：YOSHIDA, Naomi

研究協力者氏名：楊 正博

ローマ字氏名：YO, Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。