

令和元年6月5日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08602

研究課題名(和文) 加齢による組織恒常性の破綻におけるmicroRNAが果たす役割の解明

研究課題名(英文) Roles of microRNA in age-related disruption of tissue homeostasis

研究代表者

金田 勇人 (Kaneda, Hayato)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40528212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：特定の成長因子の投与により幹細胞機能のみならず、組織レベルで加齢性機能障害が改善される事が示され、幹細胞老化の制御による新しい老化制御研究領域が開拓された。しかし、加齢により生体恒常性が破綻するメカニズムは未だほとんど解明されていない。私達はこれまでにmicroRNAが幹細胞の機能制御に重要であることを明らかにしており、幹細胞老化にも重大な影響を及ぼしていることが推測された。本研究では幹細胞老化のメカニズム解析を行い、その結果に基づいて幹細胞老化を誘導できる遺伝子改変マウスを作製した。そのマウスでは老齢マウスと同様の分子動態が一部認められたことから、老化解析の有用なツールとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な高齢化の進行により老化研究が推進されつつあるが、未だ老化自体の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。幹細胞老化を調べることで、細胞老化と個体老化との関連を分子レベルで理解できる可能性がある。本研究では様々な幹細胞老化に共通する分子機構を調べ、それに基づいて幹細胞老化を模倣する遺伝子改変マウスを作製した。老化メカニズムの一端を解明しただけでなく、このマウス自体が次の老化研究に有用なツールとなり得る。がんを含む老年性疾患の克服と健康寿命の延伸に向けた重要な一歩となる成果だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Functional recovery of tissue stem cells by a specific growth factor has opened the possibility for the therapy of geriatric diseases. However, molecular mechanisms underlying the disruption of organismal homeostasis remains largely unknown. Previously, we have demonstrated that some of microRNAs are important for the regulation of stem cell functions. These results provided insight into its relationship to the stem cell aging. In this study, we first investigated molecular mechanisms underlying the stem cell aging. Based on the results of it, we next generated gene-modified mice that can induce the tissue-specific stem cell aging. We confirmed aging-like molecular dynamics in the specific tissues; therefore, our mouse might be a useful for aging studies.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞老化 microRNA 組織幹細胞 間葉系幹細胞 腸管上皮幹細胞 老化 再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

老化に伴い様々な炎症性分泌因子を放出するようになる Senescence-associated secretory phenotype (SASP)は、細胞老化と組織・個体老化をつなぐ分子機構として注目されつつある。血中の SASP 因子の増加により、神経新生や筋再生能の低下が誘導され、組織レベルの恒常性破綻の一因となることが示された。さらに、細胞老化マーカーとして知られる p16Ink4a を発現する細胞がアポトーシスするマウスでは、様々な加齢性機能障害や表現型が遅延することから、老化した細胞の蓄積による老化促進効果は、個体レベルの老化現象にも影響を与えていることが分かる。一方、組織幹細胞の老化に伴う機能障害も恒常性破綻の重大な原因と考えられる。老化に伴う造血幹細胞(HSCs)のリンパ球産生能の低下、骨格筋幹細胞の筋再生能の低下、間葉系幹細胞(MSCs)の骨芽細胞分化能の低下など、様々な幹細胞老化が報告されている。また、近年 GDF11 の投与により骨格筋幹細胞の筋再生能が回復し、心肥大や脳機能低下などの加齢性機能障害を回復できる事も分かってきた。これらは幹細胞老化制御による組織・個体老化の制御の可能性を示している。

申請者は、神経幹細胞(NSC)の分化能が発生の進行に伴い変化する分子機構の研究から、miR-17/106 依存的なシグナル応答性の制御により、エピジェネティックな変化無しに、低下した NSC のニューロン分化能が回復することを発見した(Naka H, Nat Neurosci, 2008; Naka-Kaneda H, PNAS, 2014)。このような miRNA による「コンピテンシーの制御」は細胞機能調節の根幹的なメカニズムの一つだと考え、幹細胞老化の研究に発展させてきた。実際に、様々な組織幹細胞において miR-17 は加齢に伴い発現が低下しており、その発現制御により老齢マウス由来 HSC のリンパ球産生能や MSC の骨芽細胞分化能を回復できる事が分かった。組織幹細胞の miRNA の発現を調べてみると、老化に伴い広範な miRNA の発現低下が誘導され(MSC では若齢時に発現する miRNA の 85%以上もの miRNA が発現低下する)、少なくとも NSC、HSC、MSC において、miRNA の発現が低下するにつれて機能障害が誘導される。これらの事から、miRNA の発現異常が生体恒常性の破綻に重要な影響を与えていると考え、本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

特定の成長因子の投与によって幹細胞機能のみならず、組織レベルで加齢性機能障害が改善される事が示され、幹細胞老化の制御による新しい老化制御研究領域が開拓された。しかし、加齢により組織恒常性が破綻するメカニズムは未だほとんど解明されていない。申請者は、老化した複数の組織幹細胞で広範な microRNA(miRNA)の発現低下が誘導されており、特定の miRNA の発現を回復させることで、分化能や分泌因子の発現量を回復できることを発見した。この分泌因子には、様々な組織の加齢性機能障害を回復できるものを含んでおり、miRNA の発現異常が生体恒常性の破綻に重要な影響を与えていると考えられた。そこで、加齢による組織恒常性の破綻における miRNA が果たす役割の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

以下の3つの実験を通して目的を達成する。

### (1) 幹細胞老化に共通する分子機構の解析

若齢・老齢マウスから採取した組織幹細胞での遺伝子発現プロファイルを調べ、幹細胞老化に共通する分子メカニズムを解析する。

### (2) DNA 損傷応答能に必須な miRNA の探索

DNA 損傷の蓄積は老化において共通して確認される表現型である。DNA 修復、アポトーシスの誘導など、DNA 損傷応答に必須な miRNA を探索する。

### (3) 腸管上皮幹細胞における幹細胞老化の *in vivo*での検証

老齢マウスの腸管上皮幹細胞において、実際に老化による機能障害が生じているか確認する。

### (4) 腸管上皮幹細胞の老化誘導が生体恒常性の破綻に与える影響の検証

Lgr5-CreER-IRES-EGFP マウスを用いて腸管上皮幹細胞(ISCs)で老化を誘導できるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、生体恒常性の破綻に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 幹細胞老化に共通する分子機構の解析

申請者はこれまで、異なる組織幹細胞の老化に共通する分子機構について探索と解析を進めてきた。多くの組織では恒常性の維持に細胞のターンオーバーが重要な役割を果たしており、必要な細胞を供給する組織幹細胞の機能障害は、組織恒常性の破綻に重大な影響を及ぼしていると考えられる。現在、個別の組織幹細胞の老化現象についての研究が進められているが、一方でこれらに共通する分子機構については全く分かっていない。このような分子機構が存在すれば、それを制御することで組織特異的に老化を誘導することが期待できる。そこでまず、若齢(2-3月齢)および老齢(24月齢以上)マウスから間葉系幹細胞(MSCs)と造血幹細胞(HSCs)をセルソーターで分取し(ともに progenitor を含む)、それらの網羅的遺伝子発現データの比較解析を行い、共通する変化を調べた。その結果、Wnt シグナルの異常を介して広範な microRNA

の発現低下が誘導されていることが明らかとなった。Dicer、Drosha、Ago2、p68/p72、Dgcr8 などの microRNA 生合成に関連する主なタンパク質の発現量に変化はなく、未知のメカニズムによるものと思われる。MSCs を使って解析を続けた結果、若齢 MSCs に老齢 MSCs で発現が低下していた特定の遺伝子をノックダウン/ノックアウトすると、老化時と同様に広範な miRNA の発現低下が生じ、DNA 損傷応答 (DDR) で誘導される DDR-miR の発現応答も喪失していることが分かった。DDR のエフェクタータンパク質であるリン酸化 ATM や Chk1 も同様に誘導されず、DNA 損傷の蓄積とみられる H2AX の増強がみられたことから、単に老化の結果として転写レベルが全体的に低下したのではなく、この遺伝子を介した DDR の制御機構が障害されていると推測された。DDR 関連遺伝子の異常は WRN や BRCA1 のように早老症やがんの原因としても知られており、この現象は幹細胞老化の根幹的なメカニズムとして重要なものだと考えられる。

## (2) DNA 損傷応答能に必須な miRNA の探索

申請者は、網羅的遺伝子発現解析結果を基に機能的スクリーニングを行い、標的としている生命現象に重要な制御因子を同定する実験手法を強みとして分子機構の解明を行ってきた。同様の手法を応用して、DDR に必須な DDR-miR の探索に着手している。マイクロアレイ解析データを基にパターン解析等により 25 の候補に絞り込み、全ての候補についての CRISPR/Cas9 ベクターを作製して loss-of function による機能的スクリーニングを行った。図 1 にはポジティブコントロール(+CT)として同定した幹細胞老化に共通して変化が見られた遺伝子と、効果の高かった miRNA のノックアウト (KO) による DDR foci の喪失を示した。また、Western blot によりリン酸化 ATM の発現も確認し、DDR に必須な複数の miRNA を同定した (未発表)。DDR はがんの薬剤感受性・耐性にも重要なため、関連するものが同定されると予想していたが、実際にがんの薬剤や放射線への感受性・耐性に関わるとの報告があるものが同定されており、スクリーニング系は正しく機能したと思われる。

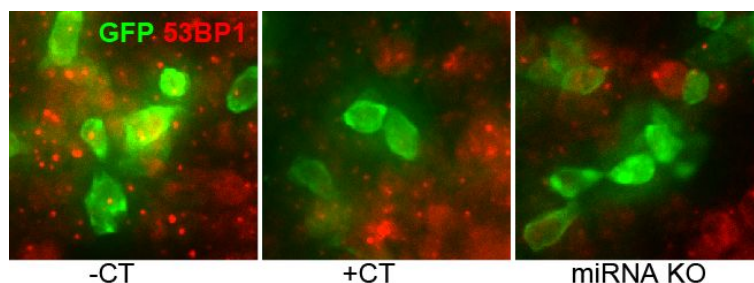


図 1 DDR に必須な miRNA の探索

DDR で誘導される 53BP1 の foci が positive control (+CT) や同定した miRNA を CRISPR/Cas9 ベクターにより KO (miRNA KO) すると喪失した

## (3) 腸管上皮幹細胞における幹細胞老化の *in vivo* での検証

セルソーターで分取でき、接着細胞として増殖させられることから、主に MSCs を使って幹細胞老化の分子メカニズムの解析を行ってきた。しかし、実際に *in vivo* の老化した幹細胞で DDR 能の低下が生じているのかは不明であった。また、個体老化プロセスの解析にあたっては、どの組織の機能障害が重大な影響を及ぼしているのかが重要な課題である。突然変異の発生頻度と増加加速度が最も高く (Ono T, Genes and Environment, 2006)、ライプイメーシングにより細胞老化マーカーの p16Ink4a のレポーター活性が大きく上昇することが報告されていることなどから (Yamakoshi K, J Cell Biol, 2009)、申請者は腸を最初の標的とすることとした。腸陰窩の Lgr5 陽性の腸管上皮幹細胞 (ISCs) を GFP で検出できる Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスを実際に約 2 年飼育して老化させ、放射線照射による DNA 損傷の誘導を行って解析したところ、*in vivo* の ISCs でも DDR 能の低下が生じている事が確認できた (図 2)。

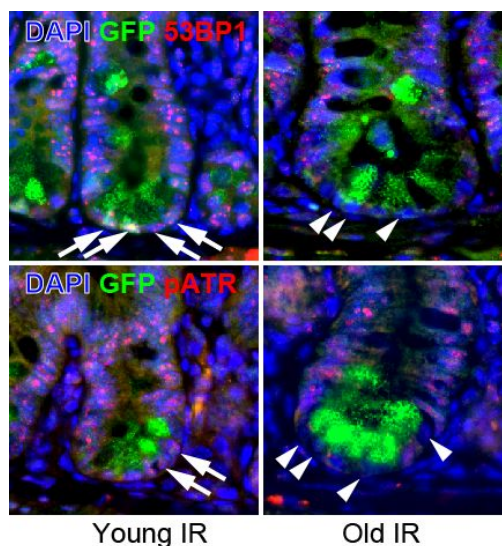


図 2 腸管上皮幹細胞 (Lgr5-GFP+) の老化による DDR 能の低下

矢印: DDR foci +, 矢頭: DDR foci -

## (4) 腸管上皮幹細胞の老化誘導がが生体恒常性の破綻に与える影響の検証

これまでの解析で幹細胞老化に共通して重要だと分かってきた遺伝子を ISCs で欠損させるマウスの作製を行った。ISCs 特異的な遺伝子操作には、Lgr5 プロモーター下でタモキシフェン依存的に Cre/LoxP システムを駆動する Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 (以下 Lgr5-Cre と表記) マウ

スが多く用いられている。ISCs 特異的に幹細胞老化に共通する遺伝子や DDR に必須な miRNA を KO するコンディショナル KO (cKO) マウスを作製した。ISCs でこの遺伝子の KO を誘導すると、コントロールで観察されるリン酸化 ATR (pATR) の凝集による DDR フォーカスの形成 (図 3) が見られなくなったことから、ISCs でも MSCs と同様にこの遺伝子が幹細胞老化と DDR 能の低下に関与しており、幹細胞老化に共通する重要な遺伝子であることが確認された。

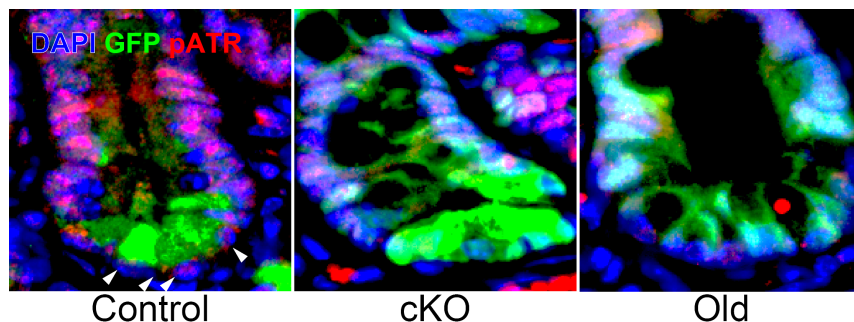


図 3 ISC 老化誘導による DDR 能の低下

若齢マウスの陰窩 (Control) では放射線照射により pATR の凝集による DDR foci が形成されるが (矢頭) ISCs で幹細胞老化に共通して重要な遺伝子を欠損した陰窩 (cKO) および老齢の陰窩 (Old) ではフォーカス形成は見られなかった。CAG-CAT-EGFP レポーターを保持しており、Cre がはたらいた ISCs から生まれた細胞では分化後も GFP の発現が維持される。Old では GFP+ は ISCs。

また、ISCs で幹細胞老化に共通して重要な遺伝子の欠損を 1 ヶ月間誘導したマウスの視床下部では、老齢時と同様に代表的な炎症性サイトカインである IL-6 の発現が誘導されていた (図 4)。視床下部に限局して炎症が誘導されており、視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系に何らかの影響を及ぼしていると考えられる結果が得られた。

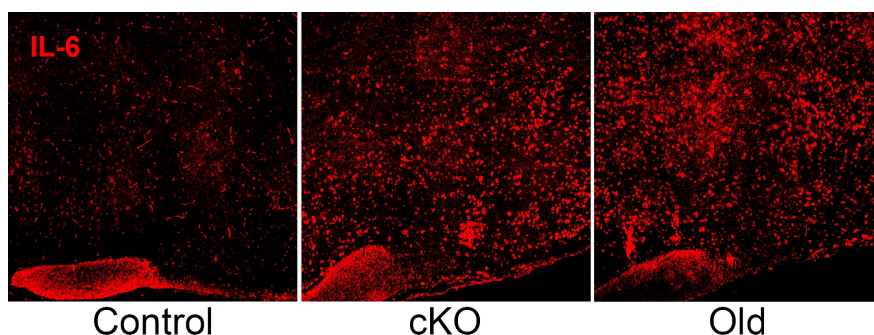


図 4 老化による視床下部領域の炎症誘導

若齢時 (Control) では見られない視床下部領域での IL-6 の発現が、ISCs における幹細胞老化に重要な遺伝子の欠損 (cKO) および老齢 (Old) マウスの脳では誘導されていた

以上のことから、幹細胞老化に共通して重要な遺伝子を欠損させて組織特異的に幹細胞老化を誘導することで、機能障害が他の組織に影響を及ぼしていることが確認できた。これは個体老化プロセスを解析する上で重要な知見であり、個体老化プロセスの組織間ヒエラルキーの解析手法となる可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Watanabe K, Ikuno Y, Kakeya Y, Ikeno S, Taniura H, Kurono M, Minemori K, Katsuyama Y, Naka-Kaneda H: Age-related dysfunction of the DNA damage response in intestinal stem cells. *Inflamm Regen* 2019, 39:8. 査読有

Watanabe K, Ikuno Y, Kakeya Y, Kito H, Matsubara A, Kaneda M, Katsuyama Y, Naka-Kaneda H: Functional similarities of microRNAs across different types of tissue stem cells in aging. *Inflamm Regen* 2018, 38:9. 査読有

Hisamatsu D, Naka-Kaneda H: Reversing multiple age-related pathologies by controlling the senescence-associated secretory phenotype of stem cells. *Neural Regen Res* 2016, 11(11):1746-1747. 査読有

Hisamatsu D, Ohno-Oishi M, Nakamura S, Mabuchi Y, Naka-Kaneda H: Growth

differentiation factor 6 derived from mesenchymal stem/stromal cells reduces age-related functional deterioration in multiple tissues. *Aging (Albany NY)* 2016, 8(6):1259-1275. 査読有

[学会発表](計 18 件)

金田 勇人, 幹細胞老化と組織恒常性の破綻における microRNA が果たす役割, 日本解剖学会, シンポジウム招待講演, 2019

谷浦仁美, 黒野正祥, 峯森溪斗, 渡邊耕一郎, 掛谷侑美, 生野泰彬, 勝山裕, 金田勇人, 組織特異的な幹細胞老化誘導マウスを用いた腸脳関連の解析, 日本再生医療学会, 2019

生野泰彬, 黒野正祥, 木藤寛敬, 渡邊耕一郎, 掛谷侑美, 池野信介, 勝山裕, 金田勇人, 幹細胞老化に伴う DNA 損傷応答能の喪失に必須な miRNA の探索, 日本再生医療学会, 2019

渡邊耕一郎, 西野嘉紘, 菅原直也, 兼田瑞希, 松原葵, 掛谷侑美, 黒野正祥, 谷浦仁美, 生野泰彬, 金田勇人, 腸管上皮幹細胞の老化に伴う機能障害の解析, 日本再生医療学会, 2019

金田 勇人, 幹細胞老化における microRNA の役割と組織恒常性の回復, 日本認知症学会, シンポジウム招待講演, 2018

金田 勇人, 幹細胞老化と組織恒常性の破綻における microRNA が果たす役割, 老化促進モデルマウス学会, シンポジウム招待講演, 2018

金田勇人, 腸管上皮幹細胞の老化に伴う機能障害の解析, 日本炎症・再生医学会, 2018

Hayato Naka-Kaneda, Yasuaki Ikuno, 1Koichiro Watanabe, 1Hiroataka Kito, Yumi Kakeya, Aoi Matsubara, Mizuki Kaneda, Yo Mabuchi, Yu Katsuyama, FUNCTIONAL SIMILARITIES OF MICRORNAS ACROSS DIFFERENT TYPES OF TISSUE STEM CELLS IN AGING, *International Society for Stem Cell Research*, 2018

金田 勇人, 組織幹細胞の老化機構の解明と制御, 日本サイトメトリー学会, シンポジウム招待講演, 2018

金田 勇人, 組織幹細胞の老化機構の解明と制御による再生医療への可能性, 日本再生医療学会, シンポジウム招待講演, 2018

生野泰彬, 木藤寛敬, 兼田瑞希, 松原葵, 山本美葉, 掛谷侑美, 渡邊耕一郎, 井之口文月, 瀧公介, 相見良成, 勝山裕, 金田勇人, 幹細胞老化関連 microRNA の探索, 日本再生医療学会, 2018

渡邊耕一郎, 掛谷侑美, 松原葵, 木藤寛敬, 生野泰彬, 兼田瑞希, 井之口文月, 相見良成, 瀧公介, 勝山裕, 金田勇人, マウス腸管上皮幹細胞の老化に伴う機能障害の解析, 日本再生医療学会, 2018

木藤寛敬, 生野泰彬, 渡邊耕一郎, 松原葵, 兼田瑞希, 掛谷侑美, 井之口文月, 相見良成, 瀧公介, 勝山裕, 金田勇人, 幹細胞老化に伴う DNA 損傷応答能の喪失と SASP に必須な microRNA の探索, 日本再生医療学会, 2018

金田勇人, microRNA による幹細胞老化の制御と組織恒常性の回復, 日本炎症・再生医学会, 2017

Hayato Naka-Kaneda, Daisuke Hisamatsu, Roles of miR-17 family in the age-related dysfunctions of tissue stem cells, 幹細胞シンポジウム, 2017

金田勇人, 間葉系幹細胞由来因子 Gdf6 による老年性機能障害の回復, 日本解剖学会, 2017

金田勇人, 間葉系幹細胞由来分泌因子による老年性機能障害の回復, 日本基礎老化学会, 2016

Hayato Naka-Kaneda, Daisuke Hisamatsu, Shiho Nakamura, Yo Mabuchi, Functional recovery of age-related disorders in multiple tissues by upregulation of a

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 加齢による生理機能の低下を回復または改善する組成物/Compositions for recovering or ameliorating deterioration of physiological functions due to aging

発明者: 金田勇人

権利者: 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/088865

出願年: 2015年12月28日

国内外の別: 国際

取得状況(計1件)

名称: 加齢による生理機能の低下を回復または改善する組成物/Compositions for recovering or ameliorating deterioration of physiological functions due to aging

発明者: 金田勇人

権利者: 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: W02017115789A1

取得年: 2017年7月6日

国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/hyt/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。