

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04043

研究課題名(和文) 老齢動物の組織に存在する老化細胞の同定とその除去による個体寿命延長効果

研究課題名(英文) Identification of senescent cells in the tissues of aged animals and the effect of their removal on prolonging individual life span.

研究代表者

石神 昭人 (Ishigami, Akihito)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：50270658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：老齢動物の組織や臓器に存在する老化細胞を特定するため、シングルセル遺伝子発現解析により、老化関連遺伝子、老化細胞の同定を試みた。そして、3種類の老化関連遺伝子(AG1, AG2, AG3)を見出した。既報より、AG1はアポトーシスの誘導、AG2は炎症の抑制、AG3は細胞増殖の抑制に関与する。しかし、AG1, AG2, AG3と老化との関連性を示す報告は未だない。また、組織学的解析により、老齢動物の肝臓でAG1陽性細胞を確認した。AG1陽性細胞は、老化細胞である可能性が高い。老齢動物に存在する老化細胞を特定できれば、その細胞を積極的に除去するSenolytic薬の探索、ヒトへの臨床応用が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られる研究成果は、誰もが知りたい「老化機構の解明」、そして日本における高齢者の健康寿命の延伸(老化制御)に繋がる。

研究成果の概要(英文)：To identify senescent cells in tissues and organs of aged animals, we attempted to identify age-associated genes (AGs) and senescent cells by single-cell transcriptome analysis. We found three age-associated genes (AG1, AG2, and AG3). According to previous reports, AG1 is involved in induction of apoptosis, AG2 inhibition of inflammation, and AG3 inhibition of cell proliferation. However, there have been no reports showing a relationship between AG1, AG2, and AG3 and aging. Histological analysis revealed AG1-positive cells in the liver of aged animals, which are likely to be senescent cells. If we can identify senescent cells in aged animals, we can search for senolytic drugs that actively eliminate these cells and apply them to clinical use in humans.

研究分野：老化

キーワード：老化 老化関連遺伝子 老化細胞 トランスクリプトーム解析 シングルセル遺伝子発現解析

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老化は、成長期(性成熟期)以降、すべての種で起こる加齢に伴う生理機能の低下である。そのため、老化過程の初期段階、すなわち若齢動物の組織には、細胞機能に異常のない「若い細胞」のみが存在する。一方、老化が進行した老齢動物の組織には、細胞機能が衰退、異常化した、いわゆる「老化細胞」が存在し、その数も加齢に伴い増加することが予想される。従って、老化の終末期を迎えた老齢動物の組織には、「若い細胞」と「老化細胞」が混在することが想像される。また、老化を組織等の細胞集団の変化として捉え、細胞微小環境の加齢に伴う変動を動的に追跡するためには、1細胞トランスクリプトーム解析、即ち「包括的シングルセル(1細胞)遺伝子発現解析」が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

- (1) 本研究では、シングルセル遺伝子発現解析(Nx1-seq: Next generation 1 cell sequencing)により、老化に関連した遺伝子を組織毎に1細胞レベルで包括的に探索、同定する。また、同定した老化関連遺伝子を指標にして、組織毎に老齢動物に存在する老化細胞を同定し、その機能低下機構を解明する。但し、本研究で申請者が定義する「老化関連遺伝子」とは、老化の機構に直接関与する遺伝子だけではなく、間接的に発現変動する、すなわち老化機構に直接関与しない遺伝子も含む。さらに、老化の影響が組織毎に異なる可能性も十分に考慮し、組織特異的に加齢により発現変動する遺伝子も含む。
- (2) 次に、同定した老化関連遺伝子を指標(目印)として、老齢動物の各組織に存在する「老化細胞」を同定する。また、老化細胞ではヘテロクロマチンが減少する可能性があることから、エピゲノム解析やオープンクロマチン様式の領域解析も1細胞で行う。老化細胞を特定したあと、老化細胞を積極的に除去する方法を確立する。老齢動物の組織に存在する老化細胞の除去は、個体寿命の延長や各種疾患の発症抑制をもたらす可能性がある。また、ヒトでの老化制御(健康寿命の延伸)を達成するため、ヒトへの応用の可能性も探る。

### 3. 研究の方法

- (1) 本研究では、東京都健康長寿医療センター研究所、実験動物施設において長期飼育(自然老化)している30月齢以上の超高齢マウスと6月齢の若齢マウスを用いて、シングルセル発現解析(Nx1-seq)により、老化関連遺伝子を組織毎に探索する。様々な組織を用いる理由は、老化の影響が組織毎に異なる可能性が考えられるためである。
- (2) シングルセル発現解析により得られた老化関連遺伝子の情報を基に幾つかのクラスタリング手法を用い、老齢動物の組織に存在する老化細胞を同定する。さらに細胞の表現型と遺伝子発現をリンクさせ、老化細胞の状態(若齢動物由来細胞との違い)を明らかにする。また、老化細胞ではヘテロクロマチンが減少する可能性があることから、エピゲノム解析やオープンクロマチン様式の領域解析も1細胞で行う。さらに、老化関連遺伝子を強制発現させたトランスジェニックマウスや遺伝子を破壊したノックアウトマウスの表現型も解析する。

### 4. 研究成果

- (1) 老齢(27月齢)と若齢(6月齢)のラット肝臓実質細胞を用い、老齢で発現量が大きく変動する遺伝子を探索した。そして、遺伝子発現が大きく変動している上位100遺伝子をピックアップした。老化はすべての生物種で共通に起こる現象である。そこで、次に動物種による特異性を排除するため、解析対象をラットからマウスに変更した。そして、これら100遺伝子について、マウスでもラットと同様に老齢と若齢で変化が認められるかバリデーションした。その結果、4種類の老化関連遺伝子に絞り込むことができた。
- (2) 4種類の老化関連遺伝子について、さらに絞り込むため、様々な月齢(3,6,12,24,32-34月齢)のマウス肝臓を用いて遺伝子発現の加齢変化をqPCRにより詳細に解析した。そして、最終的に3種類の老化関連遺伝子(AG1,AG2,AG3と命名)にまで絞り込んだ。今までに報告された論文より、AG1はアポトーシスの誘導、AG2は炎症の抑制、そしてAG3は細胞増殖の抑制に関与する可能性がある。しかし、AG1,AG2,AG3と老化との関連性を示す報告は未だない。さらに、得られた膨大な老若ラット肝臓実質細胞のシークエンスデータから1細胞毎にAG1,AG2,AG3を高発現している細胞を解析した。すると、老齢ラットの肝臓実質細胞では、同一の細胞にこれら3種類の遺伝子が高発現している割合が高かった。これは、3種類の遺伝子を高発現している細胞が老齢動物に存在する老化細胞である可能性を強く示唆している。
- (3) 老化関連遺伝子を高発現する老齢動物の肝臓に存在する老化細胞を可視化すべく、*in situ* ハイブリダイゼーション法による細胞染色を実施した。そして、老齢動物の肝臓実質細胞において、AG1陽性細胞を確認した。AG1陽性細胞は、目的とする老化細胞である可能性が高い。
- (4) 遺伝子発現の加齢変化をqPCRにより詳細に解析した。その結果、32-34月齢の老齢マ

ウス肝臓での遺伝子発現は、3月齢の若齢マウスに比べてAG1では5.5倍、AG2では7.7倍、AG3では3.0倍も高発現していた。また、ウエスタン法によるAG1,AG2,AG3のタンパク質解析でも加齢に伴いタンパク量が顕著に増加した。これら3種類の遺伝子を高発現している細胞は、私たちが探している老齢動物に存在する老化細胞である可能性が高い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kawahori Kenichi, Kondo Yoshitaka, Yuan Xunmei, Kawasaki Yuki, Hanzawa Nozomi, Tsujimoto Kazutaka, Wada Fumiko, Kohda Takashi, Ishigami Akihito, Yamada Tetsuya, Ogawa Yoshihiro, Hashimoto Koshi | 4. 巻<br>10                    |
| 2. 論文標題<br>Ascorbic acid during the suckling period is required for proper DNA demethylation in the liver   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>21228           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-77962-7  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Doshida Yuta, Sano Haruka, Iwabuchi Sadahiro, Aigaki Toshiro, Yoshida Masayuki, Hashimoto Shinichi, Ishigami Akihito  | 4. 巻<br>15                    |
| 2. 論文標題<br>Age-associated changes in the transcriptomes of non-cultured adipose-derived stem cells from young and old mice assessed via single-cell transcriptome analysis                                  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE  | 6. 最初と最後の頁<br>e0242171        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0242171  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Saga Reina, Uchida Takahiro, Takino Yuka, Kondo Yoshitaka, Kobayashi Hiroaki, Kinoshita Manabu, Saitoh Daizoh, Ishigami Akihito, Makishima Makoto   | 4. 巻<br>81                    |
| 2. 論文標題<br>Radiation-induced gastrointestinal syndrome is exacerbated in vitamin C?insufficient SMP30/GNL knockout mice   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Nutrition   | 6. 最初と最後の頁<br>110931 ~ 110931 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.nut.2020.110931   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Yamaguchi Yohko, Kaida Kohei, Suenaga Yusuke, Ishigami Akihito, Kobayashi Yoshiro, Nagata Kisaburo  | 4. 巻<br>529                   |
| 2. 論文標題<br>Age-related dysfunction of p53-regulated phagocytic activity in macrophages  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>462 ~ 466       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2020.05.121  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>TAKINO Yuka, AOKI Hitoshi, KONDO Yoshitaka, ISHIGAMI Akihito   | 4. 巻<br>66              |
| 2. 論文標題<br>Acerola (&lt;i>Malpighia emarginata</i>) Promotes Ascorbic Acid Uptake into Human Intestinal Caco-2 Cells via Enhancing the Gene Expression of Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 1 | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Nutritional Science and Vitaminology  | 6. 最初と最後の頁<br>296 ~ 299 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3177/jnsv.66.296  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Jang B., Kim M.J., Lee Y.J., Ishigami A., Kim Y.S., Choi E.K.  | 4. 巻<br>46              |
| 2. 論文標題<br>Vimentin citrullination probed by a novel monoclonal antibody serves as a specific indicator for reactive astrocytes in neurodegeneration | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuropathology and Applied Neurobiology  | 6. 最初と最後の頁<br>751 ~ 769 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/nan.12620  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Akasaka-Manyo Keiko, Manyo Hiroshi, Nadanaka Satomi, Kitagawa Hiroshi, Kondo Yoshitaka, Ishigami Akihito, Endo Tamao | 4. 巻<br>167             |
| 2. 論文標題<br>Decreased ADAM17 expression in the lungs of -Klotho reduced mouse   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Biochemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>483 ~ 493 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jb/mvz113  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takigawa Masaki, Masutomi Hirofumi, Shimazaki Yoshitomo, Arai Tomio, Lee Jaewon, Ishii Toshihiro, Mori Yoshiko, Ishigami Akihito | 4. 巻<br>32            |
| 2. 論文標題<br>Age-dependent changes in vancomycin-induced nephrotoxicity in mice  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Toxicologic Pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>57 ~ 66 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1293/tox.2018-0036  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi Keita, Yanai Shuichi, Takisawa Shoko, Kono Nozomu, Arai Hiroyuki, Nishida Yoichiro, Yokota Takanori, Endo Shogo, Ishigami Akihito | 4. 巻<br>663             |
| 2. 論文標題<br>Vitamin C and vitamin E double-deficiency increased neuroinflammation and impaired conditioned fear memory                                 | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Archives of Biochemistry and Biophysics   | 6. 最初と最後の頁<br>120 ~ 128 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.abb.2019.01.003   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Takisawa Shoko, Funakoshi Tomoko, Yatsu Tomofumi, Nagata Kisaburo, Aigaki Toshiro, Machida Shuichi, Ishigami Akihito | 4. 巻<br>9          |
| 2. 論文標題<br>Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in physical performance                              | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>4702 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-41229-7   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>TAKIGAWA Masaki, YATSU Tomofumi, TAKINO Yuka, MATSUMOTO Shigekiyo, KITANO Takaaki, LEE Jaewon, ARAI Tomio, TANAKA Hiroyuki, ISHII Toshihiro, MORI Yoshiko, ISHIGAMI Akihito | 4. 巻<br>65              |
| 2. 論文標題<br>High-Dose Vitamin C Preadministration Reduces Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Mice   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Nutritional Science and Vitaminology   | 6. 最初と最後の頁<br>399 ~ 404 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3177/jnsv.65.399   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                                    |
| 2. 発表標題<br>ビタミンCの新しい健康機能 - 新型コロナウイルスに対するCの効果を考える - |
| 3. 学会等名<br>第59回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (招待講演)              |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石神昭人   |
| 2. 発表標題<br>誰もが望む健康長寿の達成に欠かせないビタミンC                                    |
| 3. 学会等名<br>2020年度ライフィノベーション研究所シンポジウム, 東洋大学ライフィノベーション研究所(Web開催) (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                                   |
| 2. 発表標題<br>皮膚におけるビタミンCの働き - 皮膚でのエピジェネティクス研究も含めて - |
| 3. 学会等名<br>第38回日本美容皮膚科学会総会・学術大会 (招待講演)            |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                                      |
| 2. 発表標題<br>グルコノラクトナーゼ遺伝子破壊マウスを用いたビタミンCに関する諸問題へのアプローチ |
| 3. 学会等名<br>日本ビタミン学会第72回大会 (招待講演)                     |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                               |
| 2. 発表標題<br>漢方薬の抗酸化作用～ビタミンCの話題も交えて～            |
| 3. 学会等名<br>日本東洋医学会茨城地方部会 第26回茨城県部会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                    |
| 2. 発表標題<br>タミンCの長期的な不足は寿命を短縮する     |
| 3. 学会等名<br>第66回 日本栄養改善学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                               |
| 2. 発表標題<br>ビタミンC合成不全マウスを用いた老化研究 - 健康長寿を目指して - |
| 3. 学会等名<br>第1回 ビタミンC研究委員会シンポジウム（招待講演）         |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                                 |
| 2. 発表標題<br>健康寿命と食生活：健康寿命を延ばすためのビタミンC研究、基礎から臨床まで |
| 3. 学会等名<br>第46回東京成長ホルモン成長因子セミナー（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                     |
| 2. 発表標題<br>ビタミンCによる老化制御の可能性         |
| 3. 学会等名<br>第31回日本老年学会総会（合同大会）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                     |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石神昭人                                  |
| 2. 発表標題<br>老化研究における老年医学研究者からみた、技術者の貢献            |
| 3. 学会等名<br>平成30年度日本実験動物技術者協会関東支部総会 第44回懇話会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

〔図書〕 計1件

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>石神昭人        | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>朝倉書店        | 5. 総ページ数<br>746 |
| 3. 書名<br>寿命と成長『動物の事典』 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 橋本 真一<br><br>(Hashimoto Shin-ichi)<br><br>(00313099) | 和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授<br><br><br>(24701) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|