

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21497

研究課題名(和文)老化細胞起源の同定と個体の老化制御

研究課題名(英文)Origins of senescent cells that regulate aging in vivo

研究代表者

中西 真(Nakanishi, Makoto)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40217774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：p16Ink4a遺伝子座のExon1にCreERT2を挿入し、タモキシフェン存在下でp16陽性細胞をtdTomatoで蛍光染色可能なマウスを作製した。また同時にDTRも挿入し、ジフテリア毒素(DT)依存的に選択的にp16陽性細胞を除去可能なマウスも作製した。これらを用いて、様々な臓器・組織からtdTomato陽性細胞を単離してシングルセルトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、老化細胞はさまざまな細胞種を起源としており、多様な性質を持っていることがわかった。さらに、これらをDTにより除去することで、様々な加齢や生活習慣病に伴う病態が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化が様々な加齢性変化や生活習慣病に関わっていることが報告されているが、細胞老化研究は試験管内の解析が主であり、個体内のいつ、どこで、どのような性質を持っているのか全く分かっていなかった。このことから、個体老化や生活習慣病病態がどのように老化細胞により制御されているのか全く不明であった。本研究により、世界で初めて一細胞レベルで老化細胞を解析可能なマウスが作製され、その解析から老化細胞の起源は多様であり、又それらの性質も起源となる細胞依存的に非常に不均一であることが分かった。これらの成果は、今後老化細胞により個体老化がどのように制御されるのかを理解する上で非常に重要な知見を与えるものとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify senescent cells in individuals and analyze these cells at the single-cell level to determine the origin of senescent cells and their role in individual aging. Mice were generated in which p16-positive cells could be fluorescently stained with tdTomato in the presence of tamoxifen by insertion of CreERT2 into Exon1 at the p16Ink4a locus, currently the most reliable senescent cell marker. At the same time, DTR was also inserted to generate mice capable of selectively removing p16-positive cells in a diphtheria toxin (DT)-dependent manner. Using these mice, tdTomato-positive cells were isolated from various organs and tissues and subjected to single-cell transcriptome analysis. The results showed that senescent cells originated from various cell types and had diverse properties. Furthermore, their removal by DT improved the pathologies associated with various aging and lifestyle-related diseases.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞老化 p16 シングルセル解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有史以来、人類は“ヒトはなぜ老いるのか？”という生物学的命題に対して、飽くなき探究を続けてきたが、未だ明快な回答はもちろんのこと、手がかりすらほとんど得られていない。ごく最近になり、老化細胞マーカーである INK4a(p16)遺伝子プロモーターを利用して、マウス個体から老化細胞を強制的に除去すると、様々な老年病発症を抑制し、かつ寿命の延長も認めるといった結果が報告された。このことから、個体内における老化細胞の蓄積が加齢性変化や寿命の決定、さらにはがんを含めた老年病発症の原因に、重要な役割を担っていることが示唆された。細胞老化は、分裂寿命に伴うテロメア長の減少や、酸化的ストレス、DNA 損傷、さらにはがん遺伝子活性化などの様々な原因により誘導される細胞現象である。しかしながら、個体内のどこに老化細胞が存在するのか？またその起源はどの細胞なのか？については、個体内の老化細胞を可視化・同定することができないなかったため、全くわかっていない。

2. 研究の目的

これまで、個体老化の原因として様々な遺伝子素因や環境因子が提唱されているが、個体の加齢過程においていかなる原因が主たるものであるかについては全くわかっていない。また老化の主たる原因が、臓器・組織において異なるのかどうかについても不明である。ごく最近になり、老化細胞の蓄積が、個体の加齢性変化や老年病発症に重要な役割を果たしていることが示された。蓄積した老化細胞は、様々な炎症性サイトカインや増殖因子を分泌し、組織微小慢性炎症を惹起することで、多様な加齢性変化や老年病発症の基盤となっていると考えられる。老化細胞は、恒久的増殖停止を特徴とする細胞形質で、DNA 損傷や酸化的ストレス、さらにはがん遺伝子活性化などの多様なストレスにより誘導されることがわかっている。しかしながら、個体における老化細胞がどのような細胞を起源にもち、どこに存在するのかについては未だ推察の域を脱しない。以上のことから、個体における老化細胞起源を、臓器・組織において特定することは、新たな抗加齢療法や老年病予防戦略の確立に必要不可欠である。また実際にこれら細胞を個体内で老化誘導した際の個体全体の加齢性変化や寿命、さらには別の臓器の加齢性変化を解析することで、特定の臓器・細胞種により個体全体の老化が制御される可能性を明らかにできると考えた。本研究は、申請者らが作製した世界で初めて老化細胞を個体で同定・単離可能な p16CreER^{T2}-tdTomato マウスと、個体での細胞老化制御システムを利用して、“個体全体の老化が特定の細胞種の細胞老化により制御される”ことを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. p16CreER^{T2}-tdTomatoマウスについては既に樹立済みで、高齢マウスも存在している。生後1年半のp16CreER^{T2}-tdTomatoマウスの各臓器・組織から、老化細胞をtdTomato蛍光強度でFACSにより単離し、シングルセルトランスクリプトーム解析を行う。
2. シングルセルトランスクリプトーム解析の結果から、tdTomato陽性細胞の細胞起源を同定する。
3. 生後1年半のp16CreER^{T2}-tdTomatoマウスの各臓器をキュービックスシステムにより透明化し、tdTomato陽性老化細胞の臓器内での局在を、脈管系との位置関係を含めて明らかにする。
4. 組織・細胞特異的にp53TSD/K117R-gemを発現するマウスの寿命、全身の加齢性変化、老年病発症について解析する。さらには発現させていない別の臓器の変化について病理・生理学的に解析し、老化細胞による臓器連関制御機構を解析する。

以上により、各臓器における細胞老化の起源を明らかにし、それらの老化を個体内で制御することで、どの臓器のどの細胞が個体の老化を制御しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

1. p16(tdTomato)陽性細胞を FACS により単離し、陰性細胞と共にシングルセルトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、肝臓および腎臓において様々な細胞種で p16 陽性細胞が同定された(図1および2)。これらの細胞においては、p16 陰性細胞と比較して、細胞老化の特徴的な遺伝子(炎症性サイトカインや抗アポトーシス遺伝子)の発現が亢進していることが分かった。しかしながら、細胞老化を定義づけるような共通遺伝子の発現亢進は同定できず、細胞老化マーカーとして利用可能な遺伝子は存在しなかった。このことは、個体内での老化細胞は非常に多様であり、老化細胞の起源に依存して多様な性質を示すと考えられた。

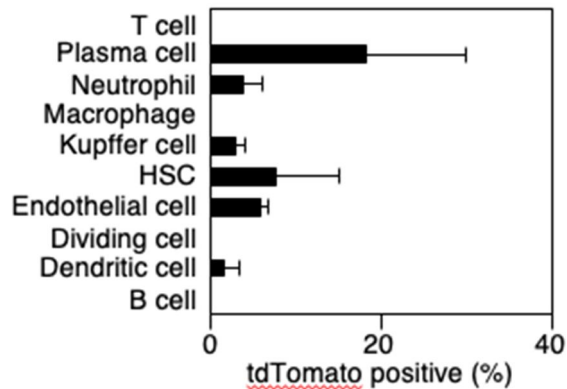


図1 肝臓の細胞種と老化細胞の割合。

2. 様々な臓器・組織のシングルセルトランスクリプトーム解析から、全ての臓器・組織において老化細胞は特異的なクラスターは形成せず、起源となる細胞種の性質に強い影響されることが分かった。

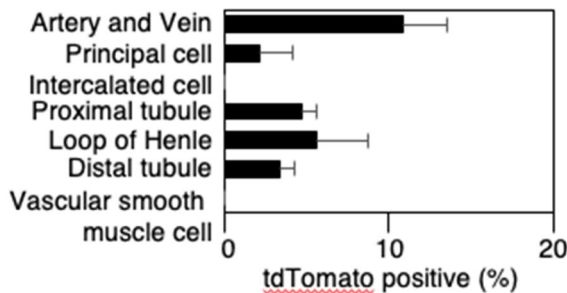


図2 腎臓の細胞種と老化細胞の割合。

3. p16CreER^{T2}-tdTomato マウス由来の肺を CUBIC システムにより透明化して老化細胞の 3D イメージングを行なった(図3)。その結果、意外なことに肺では肺門近くの肺胞上皮細胞に p16 陽性細胞が多数同定された。このことは、換気により吸入された空気中の汚れや化学物質により細胞老化が誘導される可能性を示唆している。

2ヶ月齢

10ヶ月齢

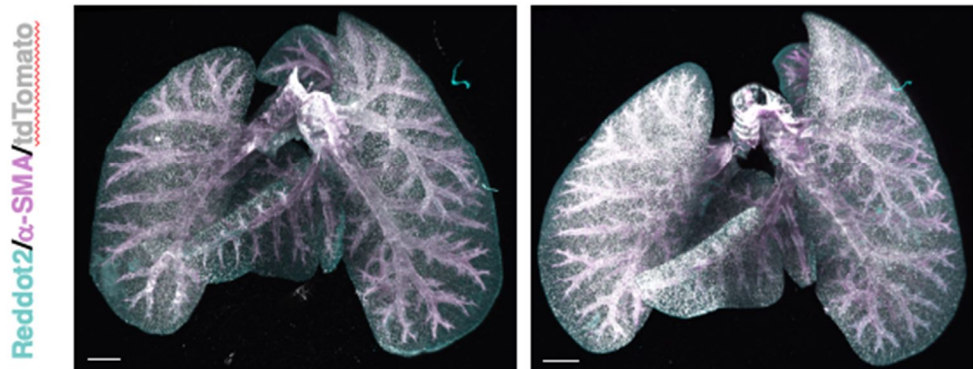


図3 透明化肺の老化細胞 3D イメージ。

4. p53TSD/K117R-gem を発現するマウスの解析をしたところ、全身の様々な臓器・組織に典型的な加齢性変化を認めた。現在さらに詳細な解析を進めている。

考察

本研究の結果、老化細胞はさまざまな細胞種を起源としており、多様な性質を持っていることがわかった。さらに、これらを DT により除去することで、様々な加齢や生活習慣病に伴

う病態が改善した。

研究業績
欧文論文

1. Lee HS, Min S, Jung Y-E, Chae S, Heo J, Lee J-H, Kim TS, Kang HC, Nakanishi M, Cha S-S, Cho H. Spatiotemporal coordination of the RSF1-PLK1-Aurora B cascade establishes mitotic signaling platforms. *Nature Commun*, 2021, 12, 5931.
2. Min S, Lee HS, Ji JH, Heo Y, Kim Y, Chae S, Choi YW, Kang HC, Nakanishi M, Cho H. The chromatin remodeler RSF1 coordinates epigenetic marks for transcriptional repression and DSB repair. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49, 12268-12283.
3. Nishiyama A, Nakanishi M*. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet*, 2021, 37, 1012-1027.
4. Kumamoto S, Nishiyama A, Chiba Y, Miyashita R, Konishi C, Azuma Y, Nakanishi M*. HPP1-dependent PARP activation promotes LIG3-XRCC1-mediated backup pathway of Okazaki fragment ligation. *Nucleic Acids Res*, 2021, 43, 5003-5016.
5. Suzuki N, Johmura Y, Wang TW, Migita T, Wu W, Noguchi R, Yamaguchi K, Furukawa Y, Nakamura S, Miyoshi I, Yoshimori T, Ohta T, Nakanishi M*. TP53/p53-FBXO22-TFEB controls basal autophagy to govern hormesis. *Autophagy*, 2021, 17, 3776-3793.
6. Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, Wang TW, Sugiura Y, Matsumoto M, Suzuki N, Kumamoto S, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Takami T, Yamaguchi R, Shimizu E, Ikeda K, Okahashi N, Mikawa R, Suematsu M, Arita M, Sugimoto M, Nakayama KI, Furukawa Y, Imoto S, Nakanishi M*. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science*, 2021, 371, 265-270.
7. Mulholland CB, Nishiyama A, Ryan J, Nakamura R, Yiğit M, Glück IM, Trummer C, Qin W, Bartoschek MD, Traube FR, Parsa E, Ugur E, Modic M, Acharya A, Stolz P, Ziegenhain C, Wierer M, Enard W, Carell T, Lamb DC, Takeda H, Nakanashi M, Bultmann S, Leonhardt H. Recent evolution of a TET-controlled and DPPA3/STELLA-driven pathway of passive DNA demethylation in mammals. *Nat Commun*, 2020, 11, 5972.
8. Omori S, Wang TW, Johmura Y, Kanai T, Nakano Y, Kido T, Susaki EA, Nakajima T, Shichino S, Ueha S, Ozawa M, Yokote K, Kumamoto S, Nishiyama A, Sakamoto T, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Shimizu E, Katayama K, Yamada Y, Yamazaki S, Iwasaki K, Miyoshi C, Funato H, Yanagisawa M, Ueno H, Imoto S, Furukawa Y, Yoshida N, Matsushima K, Ueda HR, Miyajima A, Nakanishi M*. Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16^{high} Cells In Vivo. *Cell Metab*, 2020, 32, 814-828.
9. Nishiyama A, Mulholland CB, Bultmann S, Kori S, Endo A, Saeki Y, Qin W, Trummer C, Chiba Y, Yokoyama H, Kumamoto S, Kawakami T, Hojo H, Nagae G, Aburatani H, Tanaka K, Arita K, Leonhardt H, Nakanishi M*. Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat Commun*, 2020, 11, 1222.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kajino Hidetoshi, Nagatani Tomomi, Oi Miku, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Yamatsugu Kenzo, Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 1
2. 論文標題 Synthetic hyperacetylation of nucleosomal histones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CB00029A	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Johmura Yoshikazu, Harris Alexander S., Ohta Tomohiko, Nakanishi Makoto	4. 巻 111
2. 論文標題 FBX022, an epigenetic multiplayer coordinating senescence, hormone signaling, and metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2718 ~ 2725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14534	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Ieda Daisuke, Negishi Yutaka, Miyamoto Tomomi, Johmura Yoshikazu, Kumamoto Natsuko, Kato Kohji, Miyoshi Ichiro, Nakanishi Makoto, Ugawa Shinya, Oishi Hisashi, Saitoh Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Two mouse models carrying truncating mutations in Mage12 show distinct phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237814	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Omori Satotaka, Wang Teh-Wei, Johmura Yoshikazu, (19名) Nakanishi Makoto	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 814 ~ 828.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2020.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Mulholland Christopher B., Nishiyama Atsuya, (19名) Nakanishi Makoto, Bultmann Sebastian, Leonhardt Heinrich	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent evolution of a TET-controlled and DPPA3/STELLA-driven pathway of passive DNA demethylation in mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19603-1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Pauty Joris, Nakano Shizuka, Usuba Ryo, Nakajima Tadaaki, Johmura Yoshikazu, Omori Satotaka, Sakamoto Naoya, Kikuchi Akihiko, Nakanishi Makoto, Matsunaga Yukiko T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A 3D tissue model-on-a-chip for studying the effects of human senescent fibroblasts on blood vessels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 199 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0bm01297a	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Johmura Yoshikazu, (21名) Nakanishi Makoto	4. 巻 371
2. 論文標題 Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 265 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abb5916	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Suzuki Narumi, Johmura Yoshikazu, Wang Teh-Wei, Migita Toshiro, Wu Wenwen, Noguchi Rei, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Nakamura Shuhei, Miyoshi Ichiro, Yoshimori Tamotsu, Ohta Tomohiko, Nakanishi Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 TP53/p53-FBX022-TFEB controls basal autophagy to govern hormesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1897961	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto Nakanishi
2. 発表標題 UHRF1-dependent LIG1 recruitment on Lagging strand regulates Okazaki fragment joining
3. 学会等名 EPIGENETICS & CHROMATIN (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西 真
2. 発表標題 老化を制御する
3. 学会等名 福島県立医科大学医学部泌尿器科学講座リサーチセミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西 真
2. 発表標題 老化を制御する
3. 学会等名 第34回神戸臨床腫瘍研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西 真
2. 発表標題 老化細胞での細胞死誘導
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー「細胞死研究の新展開」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西 真
2. 発表標題 老化を制御する
3. 学会等名 第39回サイトプロテクション研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

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