

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15354

研究課題名（和文）発生エンハンサーによるヒト腎発生の機序解明

研究課題名（英文）Deciphering the Mechanisms of Human Kidney Development Through Enhancers

研究代表者

笠原 朋子（Kasahara, Tomoko）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40806957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞から腎臓の発生過程を忠実に再現し、トランスクリプトミクス時計を用いて各発生段階の生物学的年齢を測定した。その結果中間中胚葉期に生物学的年齢が最小となる点が存在することを発見した。また主成分分析により発生過程が加齢とは異なる2つの過程から構成されていること、初期化関連遺伝子と加齢関連遺伝子の関与が示唆された。さらに腎発生過程では若返りが起こり、ROS、TNF、p53経路が関与していることが明らかになった。本研究はヒト腎臓の老化の始まりとメカニズムを解明し新たな抗老化戦略の開発に繋がる可能性を示した。本研究の知見は発生と老化の関係性の理解を深め、健康長寿の実現に向けた基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒト腎臓の発生過程における生物学的年齢の変化と若返りのメカニズムを世界で初めて明らかにした点で学術的に意義深い。加齢に伴う腎機能低下は高齢者の QOL を大きく損なう要因であり、本研究で得られた知見は腎臓の老化メカニズムの理解に貢献し、革新的な抗老化治療法の開発に繋がることが期待される。さらに、他の臓器の発生過程における老化の始まりやメカニズムの解明にも応用可能であり、超高齢社会における健康長寿の実現に向けた重要な一歩となり得る。

研究成果の概要（英文）：Human iPS cells were utilized to faithfully recapitulate kidney development, and biological age at each stage was measured using a transcriptomic clock. Results unveiled a point during the intermediate mesoderm stage where biological age reaches its minimum. Principal component analysis indicated that development comprises two distinct processes differing from aging, suggesting the involvement of initialization-related and aging-related genes. Moreover, rejuvenation occurs during kidney development, with ROS, TNF, and p53 pathways playing a role. This study illuminates the onset and mechanisms of kidney aging and highlights the potential for developing innovative anti-aging strategies. The findings contribute to understanding the relationship between development and aging, providing a foundation for achieving healthy longevity.

研究分野：発生学

キーワード：腎臓 ヒトiPS細胞 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚発生は「発生エンハンサー」を中心とした転写ネットワークによりダイナミックに制御されている。エンハンサーは非コーディング領域に存在し、プロモーターの転写を遠位から強力に増強する。エンハンサーとプロモーターの位置はそれぞれが生み出す RNA を検出することにより網羅的に同定できるが、エンハンサー-RNA (eRNA) は転写後に迅速に分解されるため同定が非常に困難であった。そこで単一核 RNA-seq (snRNA-seq) を用いてエンハンサーとプロモーターを超高感度に同定できる手法により、核内にて転写中の RNA の 5'端キャップ構造を捉え次世代シーケンサーを用いて転写開始点を 1 塩基の高解像度にて定量的に網羅する。しかし、ヒト胚を研究に用いることは倫理的・技術的に難しく、腎臓の発生機序はまだ詳しく分かっていない。転写ネットワークは、発生段階の細胞種に極めて特異的である。ゆえに、ヒトの腎発生を理解するには、腎の発生過程における転写ネットワークを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞から腎細胞への独自の分化誘導技術と、世界最高感度の独自オミクス技術を駆使して、ヒト腎の「発生エンハンサー」を同定する。これまでに申請者は、ヒト iPS 細胞から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞へと、単層にて高効率に分化誘導する方法を開発した。原始線条において HOX1 から HOX11 まで順に発現させ、生体内のものと同等の性質を持つネフロン前駆細胞を得られる。この誘導法により、世界に先駆けてヒト腎の発生過程を初期から忠実に再現した。本研究では、この技術を用いてヒト iPS 細胞から腎発生過程の各段階の細胞を作製し、snRNA-seq と EPI-C を行う。それにより、腎発生過程の「発生エンハンサー」とその転写ネットワークを網羅的に同定する。これによりヒト腎発生の分子メカニズムを詳しく理解する。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎臓の発生段階における転写ネットワークの同定

ヒト iPS 細胞 201B7 株 (健康者由来 iPS 細胞 山中伸弥教授樹立株) から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドのサンプルを作製する。snRNA-seq を用いて、各発生段階のサンプルの解析を行い、SCAFE (Single Cell Analysis of Five-prime End)、Cicero (Pliner HA et al. Mol Cell. 2018) を用いて各発生段階特異的なエンハンサーおよびプロモーターを同定する。

(2) ヒト腎臓における老化の始まり Ground Zero の同定

トランスクリプトミクス時計を用いて、各発生段階のサンプルの生物学的年齢を測定する。

(3) 転写ネットワークと遺伝子発現を指標に各段階の遺伝子発現制御機構から老化や若返りの機序を同定する。遺伝子アノテーションには FANTOM5 と Human Genome Reference Consortium GRCh38 を使用する。

4. 研究成果

(1) ヒト腎発生段階におけるエンハンサーの同定

遺伝子の発現は、遺伝子の発現は、遺伝子の遠位にある「エンハンサー」により、極めて特異的かつダイナミックに制御されている (Bonev B et al. Cell 2017)。エンハンサーは非コーディング領域に存在し、プロモーターの転写を遠位から強力に増強する。エンハンサーとプロモーターの位置はそれぞれが生み出す RNA を検出することにより網羅的に同定できるが、エンハンサー-RNA (eRNA) は転写後に迅速に分解されるため同定が非常に困難であった。単一核 RNA-seq (single-nuclei RNA-seq : snRNA-seq) を用いて、エンハンサーとプロモーターを超高感度に同定できる手法がある。本手法により核内にて転写中の RNA の 5'端キャップ構造を捉え、次世代シーケンサーを用いて転写開始点を 1 塩基の高解像度にて定量的に網羅できる。そこでヒト iPS 細胞 1231A3 株 (健康者由来 iPS 細胞 山中伸弥教授樹立株) から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドのサンプルを作製し、単一核 RNA-seq を行い SCAFE (Single Cell Analysis of Five-prime End)、Cicero (Pliner HA et al. Mol Cell. 2018) を用いて各発生段階特異的なエンハンサーを同定した (図 1)。驚くべきことに解析を進めているなかで原始線条から中間中胚葉細胞において老化、若返り機構が生じていることが明らかになった。生命は受精から死まで老い続けるのか? 否、生命には若返りが存在するかもしれない。生物学的年齢という老化の物差しを胚発生期に当てはめると受精段階からある点まで生物学的年齢は下がり最小点を迎える。マウス胚発生過程におけるこの最小点「Ground Zero」はすでに特定されていることが明らかになった (Kerepesi et al., Science Adv. 2021, Gladyshev VN. 2021)。そこでヒトの腎臓における Ground Zero が発生初期に存在するという仮説を立て次の研究を進めた。

(2) ヒト腎系譜での iPS 細胞分化における加齢時計の測定

生物学的年齢を測定する手法として広く利用されているエピジェネティック時計がある (Horvath, Genome Biol. 2013)。エピジェネティック時計とはゲノム上の特定の CpG におけるメチル化値の変化に基づき数学的に導き出された年齢推定法である。しかし線虫のように DNA メチル化のない種もあり、エピジェネティック時計が遺伝子発現に与える影響は不明である。実際、

申請者はエピジェネティック時計が逆転する矛盾が生じることを発見した。ヒト老化モデルである **Klotho KO** マウスとコントロールマウスのエピジェネティック時計を測定したところ、より老いているはずの **Klotho KO** マウスの生物学的年齢が若い結果となった (図2)。このことからエピジェネティック時計だけでは確固たる老化指標にはなり得ず、トランスクリプトミクスによる制御も重要であると考えた。このような背景で開発したのが **tAge** である。申請者と加齢時計の第一人者であるハーバード大学の **Vadim N. Gladyshev** 教授の研究室では共同で、年齢と紐づいた大規模 RNA-seq データを数理的に解析しトランスクリプトミクスな変化から生物学的年齢 (**tAge**) を世界で初めて測定できるようになった。この研究では 41 種の哺乳類と様々な臓器から収集した RNA-seq データをフィロジェネティック回帰 (**phylogenetic regression**) や **Elastic Net** 回帰で解析し寿命予測シグネチャを特定した。次に機能的遺伝子セットのエンリッチメント解析を行い寿命延長に関連する分子経路を明らかにしている。

そこでヒト **iPS** 細胞 201B7 株 (健康者由来 **iPS** 細胞 山中伸弥教授樹立株) から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドのサンプルを作製し、腎系譜での **tAge** 測定と薬剤の効果を検討した。遺伝子アノテーションには、**Human Genome Reference Consortium GRCh38** を使用した。その結果仮説の通り発生初期の中間中胚葉期で生物学的年齢が最も低くなることが観察され、腎臓の発生における若返りの可能性が示唆された (図3右)。また主成分分析により、発生過程は加齢と異なる意味を持つ 2 つの過程から構成されている可能性が初めて示唆された (図3左)。**PC1** は発生とともに単調に増加し、**PC2** は原始線条期で増加し中胚葉期以降で減少することが明らかになった。さらに興味深いことに、**PC1** は初期化のシグネチャーと正の相関を示し、**PC2** は負の相関を示した (図4左)。このことは、**PC1** が主に加齢関連遺伝子、**PC2** が初期化関連遺伝子である可能性を示している。老化の関連経路の中には原始線条の段階で活性化され、その後抑制されるものがある (図4右)。したがって、それらの経路は老化後の若返りを促進する。

本研究ではハーバード大学との共同研究にて、確立したトランスクリプトミクス時計 (**tAge**) とヒト **iPS** 細胞から腎への誘導技術を用いて、ヒト腎の老化の始まりを明らかにした。その結果、中間中胚葉前後にて生物学的年齢が最小となるヒトの「**Ground Zero**」が存在することが明らかになった。さらに腎臓の発生段階において若返りを示し、トランスクリプトミクスな変化から **ROS** や **TNF**、**p53** 経路に関連して働くことが明らかになった。

現在腎臓だけでなく他の組織細胞でのヒト老化の始まりとその機序を明らかにしている。またヒト発生過程における生物学的年齢の変化と若返りの分子メカニズムの解明は老化研究に新たな視点をもたらし、例えば **Hutchinson-Gilford progeria** 患者由来 **iPS** 細胞の **Ground Zero** は健康者と同様なのか、など特異な老化過程を持つモデルでの機序解明ならびに新たな抗老化戦略の開発に繋がる。

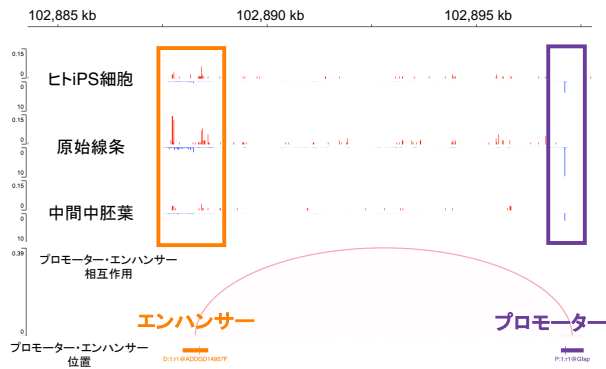


図 1. ヒト腎発生段階におけるエンハンサー・プロモーターの位置と活性、相互作用

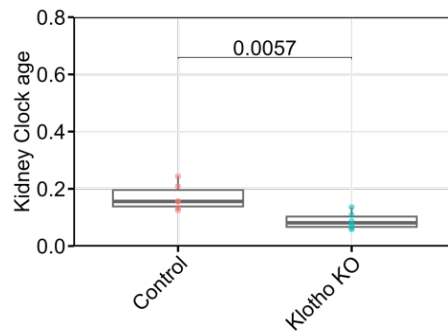


図 2. ヒト老化モデル Klotho KO マウスと WT マウスの腎臓 DNA メチル化時計. Kidney Clock age は腎臓特異的な加齢時計

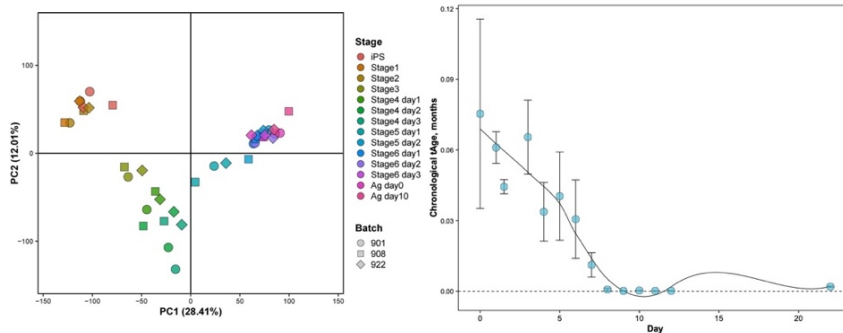


図 3. ヒト iPS 細胞 201B7 株から腎誘導した発生学段階における主成分分析と tAge の測定

(左図) Stage1 は後期エピプラスト、Stage2-4 は原始線条、Stage5 は中間中胚葉、Stage6 はネフロン前駆細胞、Ag は腎オルガノイドを示す (n=3) (右図) Day0 はヒト iPS 細胞、Day1 は後期エピプラスト、Day2-6 は原始線条、Day7-9 は中間中胚葉、Day10-12 はネフロン前駆細胞、Day13-22 は腎オルガノイドを示す (n=3)

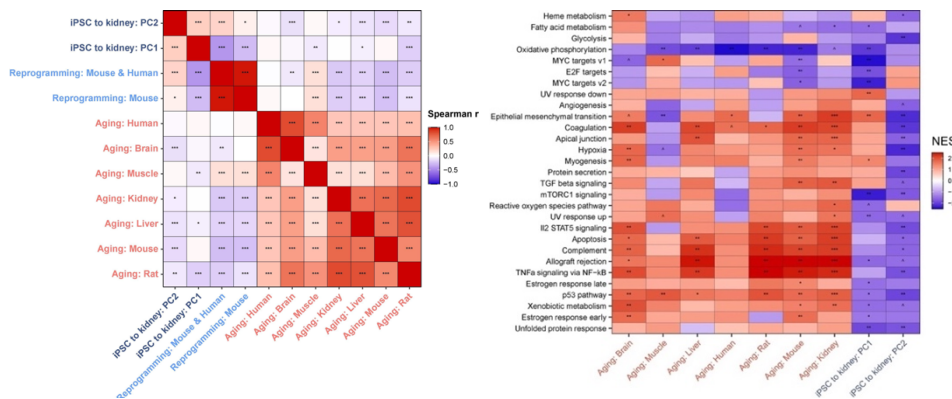


図 4. 老化やリプログラミング経路との関連性

(左図) ヒト iPS 細胞から腎系譜への主成分解析より PC1 を構成する成分および PC2 を構成する成分のヒートマップ (n=3)。Aging: Human は老化したヒトの全組織、Aging: 組織はヒトおよび齧歯類 (Mouse および Rat) の老化した組織、Reprogramming: Mouse & Human はマウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞へのリプログラミングした際の経路を示す (n=3)。相関係数および p 値はスピアマン相関係数を使用して算出した。(右図) ヒト iPS 細胞から腎系譜への主成分解析より PC1 を構成する成分および PC2 を構成する成分の Pathway 解析 (n=3)。Aging: Human は老化したヒトの全組織、Aging: 組織はヒトおよび齧歯類 (Mouse および Rat) の老化した組織、Reprogramming: Mouse & Human はマウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞へのリプログラミングした際の経路を示す。相関係数および p 値: スピアマン相関係数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoko Kasahara
2. 発表標題 Biological age dynamics in a renal development organoid model points to a rejuvenation phase and ground zero of aging
3. 学会等名 GSA 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoko Kasahara
2. 発表標題 Exploring the biological aging dynamics in renal development organoid model
3. 学会等名 ISSCR 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------