

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03431

研究課題名(和文)新規マウスモデルを用いた細胞老化制御機構の解明による『老い』の分子基盤の構築

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanisms of cellular senescence using a novel mouse model to establish the molecular basis of aging

研究代表者

城村 由和 (Johmura, Yoshikazu)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：40616322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、分子遺伝学的解析から、老齢個体から人工的に老化細胞を除去すると、加齢性疾患の発症が有意に遅れ、さらには寿命そのものも延長することがわかり、老化細胞の蓄積が個体老化の主な原因の一つであることが示された。しかし、生体内における老化細胞の誘導・除去・蓄積のメカニズムや、老化細胞が個体老化を引き起こす分子基盤は不明な点が多い。本研究では、一細胞レベルで老化細胞を同定・単離・トレース可能なマウス、および老化細胞特異的な遺伝子改変マウスを樹立・解析することで、生体内における老化細胞の誘導・除去・蓄積の機構やその役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞を一細胞レベルで同定・検出できるマウスを用いた老化細胞の動態・性状解析により、生体内における老化細胞は多様性に富んでいることを見出すとともに、がん治療でも使用されている免疫チェックポイント阻害剤の老化病態治療への応用につながる知見を得ることができた。また、老化細胞の蓄積やそれを起点とした慢性炎症が個体老化や加齢関連疾患の病態の基盤であることも明らかにすることができた。本研究成果は、21世紀の先進医療において重要課題の一つである老化・老年病の予防法の開発につながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, molecular genetic analysis has shown that artificially removing senescent cells from old individuals significantly delays the onset of age-related diseases and even extends life span itself, indicating that the accumulation of senescent cells is one of the main causes of individual aging. However, the mechanisms of induction, removal, and accumulation of senescent cells in vivo and the molecular basis for senescent cell-induced individual aging remain unclear. In this study, we established and analyzed mice in which senescent cells can be identified, isolated, and traced at the single-cell level, and genetically engineered mice specific for senescent cells, to clarify the mechanisms of induction, removal, and accumulation of senescent cells in vivo and their roles.

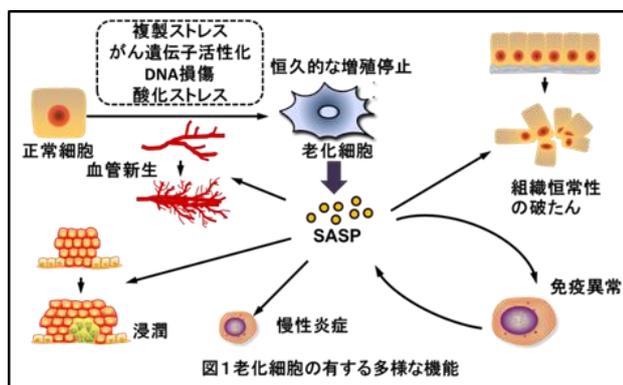
研究分野：老化生物学

キーワード：細胞老化 細胞周期 一細胞解析 慢性炎症 非アルコール性脂肪肝炎 個体老化

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本にとって、健康寿命の延長は最大の懸念事項である。健康寿命の延長には、医療システムの改革や生活習慣病、食習慣等の改善が有効な手段であることは明白である。しかし、抜本的な対応には老化制御機構の俯瞰的理解と、老化に伴う加齢性疾患や、臓器・組織の機能低下を予防する技術の開発が必要不可欠である。近年、マウスモデルを用いた分子遺伝学的解析から、個体の老化制御についてパラダイムシフトが起こった。すなわち、老体個体から人工的に老化細胞を除去すると、動脈硬化や腎障害などの老年病の発症が有意に遅れ、さらには寿命そのものも伸びることが示された (Nature 2011, 2016)。この原因として、培養細胞レベルでの解析では、老化細胞の有する炎症性サイトカインや増殖因子を分泌する表現型『SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotypes』によって、組織微小環境に慢性炎症場が形成されるのではないかと考えられている (図1、Y. Johmura et al. Cancer Science 2016)。

研究代表者はこれまでの研究において、細胞老化誘導には、がん抑制遺伝子 p53 の活性化によって細胞周期の G2 期から直接 G1 期に移行し、M 期をスキップすることが重要であることを明らかにした。(Y. Johmura et al. Molecular Cell 2014, Scientific reports 2016)。一方、老化細胞特有の性質である SASP には、老化過程におけるメチル化 p53 の分解が必要であり、これらがユビキチンリガーゼ Fbxo22 により制御されていることを明らかにした (Y. Johmura et al. Nature communications 2016)。さらに、研究代表者の研究より得た知見を応用して DNA 損傷非依存的に誘導した老化細胞の安定的な培養法の確立に成功しており、この培養系と shRNA ゲノムワイドスクリーニングを組み合わせた解析から、SASP を中心とする老化細胞機能を制御する鍵分子を見出しており、培養細胞レベルでの老化誘導・SASP 発現の分子メカニズムの理解に貢献してきた。



しかし、生体内において、どのような細胞種が老化細胞になりうるのか、老化細胞がいかなる刺激で誘導・除去・蓄積するのかについては解析が進んでいない。さらには、生体内において老化細胞が SASP を介して周囲の細胞の遺伝子発現や細胞表現形にどのような影響を与えているかは全くもって不明である。これらの重要課題の究明がなされてこなかった大きな要因として、生体内における老化細胞を一細胞レベルで検出することが困難であることや、老化細胞特異的な遺伝子改変マウスや時期・組織特異的に細胞老化誘導を可能にするようなマウスを用いた実験系が存在しないことなどが挙げられ、新たなモデルマウスの樹立・解析が強く望まれているのが現状であった。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子工学的アプローチによる細胞系譜解析により老化細胞を蛍光標識することで、世界で初めて老化細胞を個体で同定・単離・トレースを可能にするマウス樹立・解析することで、加齢や肥満・糖尿病・発がんなどの病態に伴う個体内での老化細胞の局在やダイナミクスを解析し、老化研究でもっとも重要な課題の一つである、『生体内における老化細胞の誘導・除去・蓄積のメカニズムやその役割』を明らかにすることを目的とした。さらに、各臓器・組織より老化細胞を FACS でソーティングし、包括的 1 細胞遺伝子発現解析により老化細胞の遺伝子発現の共通性・特異性 (シグネチャー) を決定することで、生体内における老化細胞の誘導原因や機能を明らかにすることも目指した。

(2) p16-CreERT2 マウスによる老化細胞特異的な遺伝子改変を利用して、老化細胞選択的な除去マウスや SASP 抑制マウスを構築・解析することで、老化細胞の蓄積や老化細胞から生じる炎症応答が個体老化や加齢関連疾患の病態に与える影響を解析することを目的とした。

(3) 老化細胞誘導の主要制御因子である p53 を細胞周期特異的に発現するシステムを利用した全身性・組織特異的な細胞老化誘導マウスを樹立・解析することで、老化細胞の蓄積が組織および周辺細胞群に与える影響を組織切片解析、および生理・病理解析により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 16INK4A プロモーターの下流に CreERT2 リコンビナーゼ遺伝子を組み込んだ老化細胞特異的なノックアウトや遺伝子発現を可能とする『p16-CreERT2 マウス』を樹立した。さらに p16-

CreERT2マウスとROSA26-CAG-*lsl*-tdTomatoマウスを交配することにより、タモキシフェン(TAM)投与依存的に老化細胞を蛍光標識することで、世界で初めて老化細胞を個体で同定・単離・トレースを可能にする『p16-tdTomatoマウス』を樹立した。p16-tdTomatoマウスを用いて、様々な週齢・病態における組織・臓器(脳、心臓、肺、腎臓、肝臓、皮膚)を、共焦点顕微鏡を用いた組織切片解析やイメージング解析を行い、老化細胞の割合の変化や老化細胞になる細胞種を同定するとともに、透明化技術を用いた解析により、組織内の三次元動態を解析した。さらに、明らかになった局在情報をもとに、老化細胞とその周辺細胞を含む組織片を用いて、老化細胞が生じる前後で包括的1細胞遺伝子発現解析を行った。

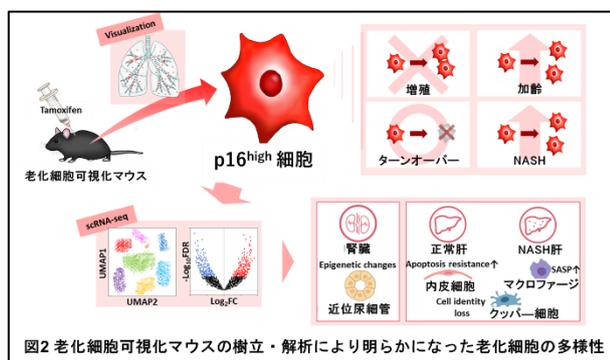
(2) 老化細胞選択的な除去マウスを樹立するために、p16-CreERT2マウスとROSA26-*lsl*-DTR-IRES2-tdTomatoマウスを交配することにより、タモキシフェン投与依存的に老化細胞選択的に除去できる『p16-DTR-tdTomatoマウス』を樹立した。一方、SASPの主要制御因子であるNF- κ Bの抑制因子IkappaBのドミナントネガティブ体であるIkappaB-S32AS36AをCre活性依存的に発現させることができる『ROSA26-CAG-*lsl*-IkappaB-S32AS36Aマウス』を構築した。さらに、このマウスをp16CreERT2マウスと交配することで、SASP抑制モデルである『p16-IkappaB-S32AS36Aマウス』を樹立した。上記のマウスを用いて、加齢関連疾患である非アルコール性脂肪肝炎や腎不全の病態に対する影響を解析した。

(3) 時期・組織特異的に細胞老化を促進可能なマウスを樹立するために、細胞周期G2期においてのみ活性化p53を発現できるp53TSD-geminin融合遺伝子を構築した。さらに、この融合遺伝子をCre活性依存的に発現させることができる『ROSA26-CAG-*lsl*-p53TSD-gemininマウス』を構築した。さらに、このマウスをCAG-CreERT2マウスと交配することで、たもきしふえん投与依存的に全身性に細胞老化を誘導できる『CAG-p53TSD-gemininマウス』を樹立した。上記のマウスを用いて、若齢期にタモキシフェンを投与することで、全身性に細胞老化を誘導した際の表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) p16INK4Aプロモーターの下流にCreERT2リコンビナーゼ遺伝子を組み込んだ老化細胞特異的のノックアウトや遺伝子発現を可能とする『p16-CreERT2マウス』を樹立することに成功した。さらにp16-CreERT2マウスとROSA26-*lsl*-tdTomatoマウスを交配することにより、タモキシフェン投与依存的に老化細胞を蛍光標識することで、世界で初めて生体内の老化細胞を一細胞レベルで同定・単離・トレースを可能にした。実際に、この『p16-tdTomatoマウス』を用いて、正常・非アルコール性脂肪肝炎を誘導した肝臓における一細胞RNA-seq解析を行った結果、正常肝臓でもっとも老化細胞の割合が多かった肝類洞壁内皮細胞では、細胞老化に伴いタンパク質の品質管理に関わる機能が低下することが示唆された。また、次に老化細胞の割合が多かったクッパー細胞では、細胞老化に伴い免疫機能の低下とともに、肝類洞壁内皮細胞様に遺伝子発現パターンを示すことが明らかになり、細胞の同一性の喪失が生じていることが示唆された。一方、非アルコール性脂肪肝炎を誘導した肝臓においては、正常肝臓で認められた肝類洞壁内皮細胞やクッパー細胞の変化に加えて、多くの免疫細胞で老化細胞が認められることが分かった。特にマクロファージ細胞では、培養細胞を用いた解析で報告されているように、炎症機能の増強が認められることが分かった。これらの結果は、病態に応じて様々な細胞種が老化細胞になることや細胞種ごとに異なる特徴的な遺伝子発現プロファイルを示すことを示している(図2, Cell Metabolism 2020)。

一方、自然加齢した『p16-tdTomatoマウス』を用いて、様々な臓器・組織における老化細胞の一細胞RNA-seq解析を行った。皮膚に関しては、様々な細胞種において老化細胞が存在することが認められたが、特に線維芽細胞において多く認められた。また、老化線維芽細胞における遺伝子発現変化を解析したところ、線維化の促進に関わる遺伝子の発現が高いことが明らかになった。また、腎臓に関しても様々な老化細胞種が同定されたが、その大部分は近位尿細管細胞であることが分かった。また、その特徴として、水分子輸送に関わるアキアポリン関連遺伝子群の発現が高いことも分かった。肝臓に関して、非アルコール性肝炎病態モデルで老化細胞が多く認められた血管内皮細胞やクッパー細胞などの非実質細胞に加えて、肝実質細胞において多くの老化細胞が認められた。その遺伝子発現の特徴として、その他の非実質細胞種のマーカーを発現する、いわゆる『細胞系譜の不安定』が認められた。このように、自然加齢においても多様な細胞種が老化細胞になることや細胞種ごとに異なる特徴的な遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。これらの結果より、これまで考えられていた以上に生体内における老化細胞は多様性に富んでいるという新しい概念を構築することができた。



また、その特徴として、水分子輸送に関わるアキアポリン関連遺伝子群の発現が高いことも分かった。肝臓に関して、非アルコール性肝炎病態モデルで老化細胞が多く認められた血管内皮細胞やクッパー細胞などの非実質細胞に加えて、肝実質細胞において多くの老化細胞が認められた。その遺伝子発現の特徴として、その他の非実質細胞種のマーカーを発現する、いわゆる『細胞系譜の不安定』が認められた。このように、自然加齢においても多様な細胞種が老化細胞になることや細胞種ごとに異なる特徴的な遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。これらの結果より、これまで考えられていた以上に生体内における老化細胞は多様性に富んでいるという新しい概念を構築することができた。

一方、研究開始当初は予期していなかったが、一細胞遺伝子発現解析から、老化細胞の一部は免疫チェックポイント関連遺伝子 PD-L1 の発現が高いことも見出した。実際にフローサイトメトリーを用いた解析や組織免疫染色の解析により、タンパクレベルでの発現も確認できた。また、細胞追跡実験により、PD-L1 陽性細胞は加齢に伴い体内に蓄積しやすいことも見出した。加えて、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-L1 抗体の投与により、老化細胞の除去が可能であることや様々な加齢性変化を改善できることを見出した (Nature 2022)。この結果は、不明な点が多かった老化細胞の蓄積機構の基礎的な理解が進むことに加え、現在、がん治療でも使用されている免疫チェックポイント阻害剤の老化病態治療への応用といった新たな展開がもたらされることを示唆している。

(2) ジフテリア毒素 (DT) 依存的に tdTomato で標識された p16 陽性細胞を除去可能なマウスモデル (p16-DTR-tdTomato マウス) を樹立に成功した。このマウスに対し、コリン欠乏・低メチオニン高脂肪食飼料 (CDA-HFD) を与えることで NASH を誘導し、老化細胞の除去による影響の検証を試みた。6 週間 CDA-HFD を与え、後半の 3 週間で p16 陽性細胞を除去したところ、肝臓の脂肪化や炎症が改善することが明らかとなった (図 3)。この結果から、p16 陽性細胞を除去することで NASH の進行を抑制できるのではないかと考えられる。

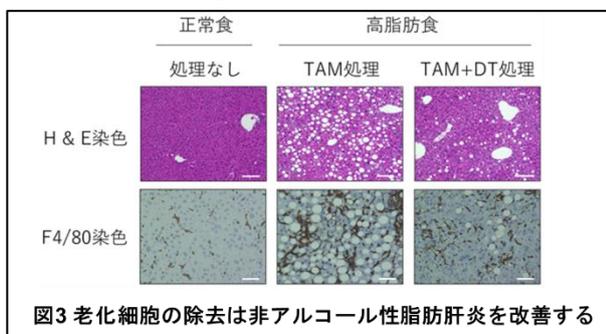


図3 老化細胞の除去は非アルコール性脂肪肝を改善する

一方、横紋筋融解症急性腎障害において老化細胞の動態や除去による影響の解析を行った。その結果、この急性腎不全モデルにおいて老化細胞は腎臓皮質中の近位尿細管上皮細胞に多く認められること、それを遺伝学的に除去すると腎機能が改善することが分かった。さらに、老化細胞の特徴的な機能の一つである SASP と呼ばれる炎症亢進機能を抑制できるマウスモデルの樹立に成功した。このマウスモデルにアデニン食餌性慢性腎不全を誘導したところ、野生型マウスでは腎臓皮質に認められる老化細胞の蓄積がほとんど起こらず、さらには慢性腎不全の代表的な特徴の一つである線維化も抑制されることが明らかになった。この結果は、少なくとも慢性腎不全においては、老化細胞による SASP がパラクリンのように働くことで周囲に細胞老化を引き起こすこと、それによって慢性腎不全を引き起こすことが強く示唆された。

(3) 若齢期の CAG-p53TSD-geminin マウスはタモキシフェン投与後、約 3 カ月で白内障、脱毛、背骨の湾曲、体重・体脂肪量の低下など様々な加齢性変化が確認できた。さらに、このマウスの組織切片解析を行った結果、肝臓・脾臓の脂肪化や心筋・骨格筋の萎縮、肺の線維化が認められた (図 4)。この結果は、老化細胞の蓄積のみで個体老化を促進できることを示す非常に重要な知見である。

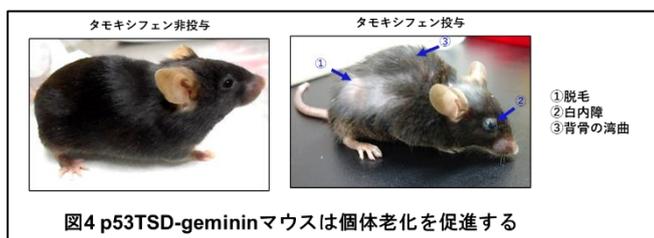


図4 p53TSD-gemininマウスは個体老化を促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Yasuhiro, Johmura Yoshikazu	4. 巻 28
2. 論文標題 Targeting cellular senescence as a therapeutic approach in non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Hepatology	6. 最初と最後の頁 100900 ~ 100900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aohep.2023.100900	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 -
1. 著者名 Li Dan, Wang Teh-Wei, Aratani Sae, Omori Satotaka, Tamatani Maho, Johmura Yoshikazu, Nakanishi Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptomic characterization of Lonrf1 at the single-cell level under pathophysiological conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvad021	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 -
1. 著者名 Wang Teh-Wei, Johmura Yoshikazu, Suzuki Narumi, Omori Satotaka, Migita Toshiro, Yamaguchi Kiyoshi, Hatakeyama Seira, Yamazaki Satoshi, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Furukawa Yoichi, Yoshimura Akihiko, Nakanishi Makoto	4. 巻 611
2. 論文標題 Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 358 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05388-4	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 -
1. 著者名 Reyes Nabora S., Krasilnikov Maria, Allen Nancy C., Lee Jin Young, Hyams Ben, Zhou Minqi, Ravishankar Supriya, Cassandras Monica, Wang Chaoqun, Khan Imran, Matatia Peri, Johmura Yoshikazu, Molofsky Ari, Matthay Michael, Nakanishi Makoto, Sheppard Dean, Campisi Judith, Peng Tien	4. 巻 378
2. 論文標題 Sentinel p16INK4+ cells in the basement membrane form a reparative niche in the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 192 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abf3326	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 Zhu Jing, Wu Wenwen, Togashi Yukiko, Taira Nihira Naoe, Johmura Yoshikazu, Zhu Dajiang, Nakanishi Makoto, Miyoshi Yasuo, Ohta Tomohiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Alteration of Trop-2 expression in breast cancer cells by clinically used therapeutic agents and acquired tamoxifen resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-022-01389-3	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 -

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 17
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 3776 ~ 3793
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 無
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 -

1. 著者名 Omori Satotaka, Wang Teh-Wei, Johmura Yoshikazu, ..., 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Johmura Yoshikazu, ..., 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 城村由和
2. 発表標題 老化細胞の生存維持に重要な代謝特性の理解と それを標的とした新たな個体老化制御法の開発
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城村由和
2. 発表標題 一細胞解析を用いたがんにおける細胞老化の多様性と役割の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王徳偉、城村由和、中西真
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害による老化細胞除去と個体老化制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城村由和
2. 発表標題 Tissue and cell type-specific heterogeneity of p16high senescent cells revealed by single-cell transcriptomes
3. 学会等名 MBSJ2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikazu Johmura
2. 発表標題 Role of cellular senescence in aging and age-related disorder
3. 学会等名 1st International Symposium on Inflammation Cellular Sociology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 城村由和、中西真	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学2022年2月号『代謝性疾患と細胞老化』	

1. 著者名 川上聖司、城村由和、中西真	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 4
3. 書名 生物の寿命延長『老化細胞を選択的に除去するGLS1阻害剤』	

〔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
---------	---------