

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03692

研究課題名(和文) 老化に伴う組織細胞における inflammaging のクロマチン機構解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of age-associated inflammaging in tissues at the chromatin level

研究代表者

蓑田 亜希子 (Minoda, Aki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40721569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う低レベルの慢性炎症は老化特徴のひとつであり、臓器・組織機能低下の一因だと考えられているが、その分子機構は明らかでない。本研究では老化に伴いエピゲノムを介した遺伝子制御機能低下の結果、免疫応答遺伝子の正常な発現が維持できなくなることを仮説に立て検証する事を目標とした。さらに低タンパク食を中年から取り入れる事により炎症レベルを下げる事が出来るか最先端技術(1細胞RNA-seqおよび1細胞エピゲノム解析)及びマウスを用いることにより検証する事を目的とした。コロナ渦の為実験の準備開始が遅れたが、1細胞解析のデータを得る事に成功した。研究期間内に解析までには至っていないが今後も解析を続ける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会における健康長寿実現には体内の老化現象を分子レベルで理解する必要がある。加齢に伴う臓器機能低下(老化)は様々な加齢性疾患発症の原因の一つと考えられている。老化の特徴の一つと言える免疫力の低下は、感染リスク、癌、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患などの発症要因である。Inflammaging(低レベルの慢性炎症)は老化特徴のひとつであり、臓器・組織機能低下の一因だと考えられているが、その分子機構は分かっていない。本研究は最先端技術を用い組織が細胞レベルでどう老化していくか、さらには低タンパク食が炎症を抑える効果があるのかを分子レベルで検証した。

研究成果の概要(英文)：Low-level chronic inflammation associated with aging is one of the hallmarks of aging and is thought to be one of the causes of organ and tissue dysfunction, but its molecular mechanism is not clear. The purpose of this study was to test our hypothesis that normal expression of immune response genes cannot be maintained as a result of epigenome-mediated gene control function deterioration with aging. Furthermore, we set out to verify whether the introduction of a low-protein diet from middle age can lower the level of inflammation. We applied state-of-the-art technology (single-cell RNA-seq and single-cell epigenome analysis) and mice to answer these questions. Due to the corona pandemic, experiments were grossly delayed, but we succeeded in obtaining sequencing data for single cell analysis. We have not reached the point of meaningful analysis, but we will continue the analysis in the future.

研究分野：1細胞解析技術を用いた老化研究

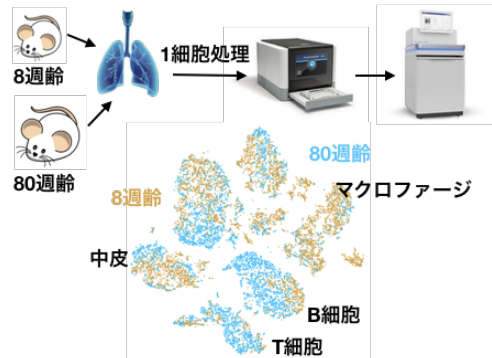
キーワード：老化 1細胞解析 エピゲノム 遺伝子発現 scRNA-seq scATAC-seq

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における健康長寿実現は、高齢者のQOL (Quality of Life) 維持および向上と同時に医療費削減が期待され重要であるが、実現には体内の老化現象を分子レベルで理解する必要がある。老化の特徴の一つと言える免疫力の低下は、感染リスク、癌、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患などの発症要因である。加齢に伴う臓器機能低下(老化)は様々な加齢性疾患発症の原因の一つであると考えられている。Inflammaging (低レベルの慢性炎症) は老化特徴のひとつであり、臓器・組織機能低下の一因だと考えられているが、その分子機構は分かっていない。Inflammagingの多くの研究は個々の免疫細胞を対象とした研究に限られ、組織・臓器自体を対象とした統合的研究には至っていない。Inflammagingは組織を構築する多様な細胞が形成に関わると考えられており、最終的に個体老化という複雑な動向を理解するには、組織レベルでの包括的かつ網羅的な研究が重要である。さらに食により老化速度が変化することが報告されているが、食の違いの効果を組織で網羅的に解析した報告はされていない。

従来の分子機構解明を目的とした解析技術では、重要と予想される1種の細胞にあらかじめ解析的を絞り、対象とする組織からその細胞をフローサイトメトリーにより分離することで解析がすすめられてきたが、この方法では解析可能な細胞種数は限られ、標的とした細胞が組織内で本当に重要な細胞であるかを客観的に見ることはできない。近年の著しい技術的進歩により、標的細胞種を絞らずに組織を構築するほとんどの細胞種を同時に1細胞レベルで解析できるシングルセル・オミックス解析が可能になった。本技術を組織に用いることで、老化に伴う新規細胞の発見や、多様な細胞の中で最も老化現象に重要な細胞の客観的同定、また、各細胞で増減する分子機構やエピジェネティック変化を捉える事が期待される。申請者らは老化分子機構を包括的に捉えるための予備的検討として、8週齢から80週齢までのマウス肺の8週齢毎の

図1：シングルセルオミックス解析の流れ



マウス肺の8週齢毎の scRNA-seq (single cell RNA-seq) データを得た (協力研究者・茂呂和世との共同研究、図1参照)。その結果、肺組織全体に転写活性上昇が見られることが明らかになった (図2A)。B細胞のデータを抽出すると56週齢以降に転写レベルが上昇し、炎症の際見られる転写活性化と似ている (図2B)。このような転写活性状態は免疫細胞だけでない

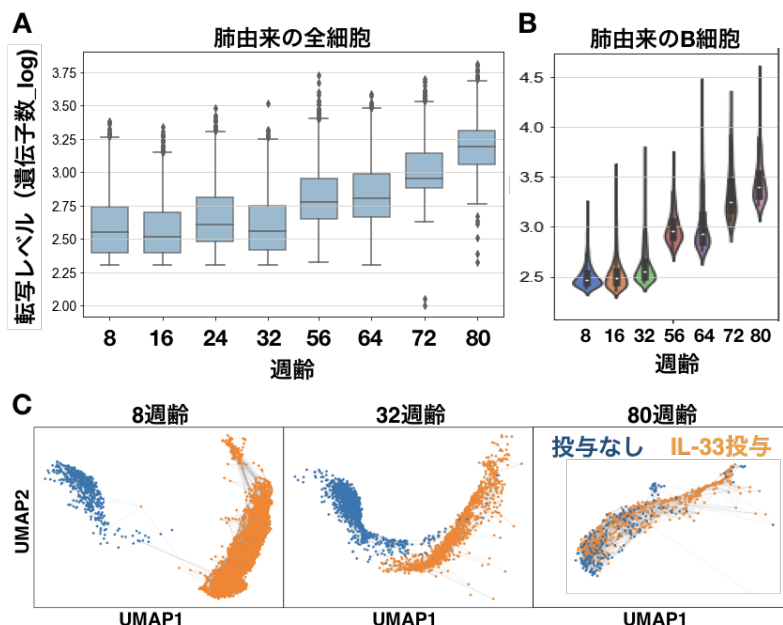


図2：老化に伴うマウス肺細胞の転写活性化

scRNA-seqデータ解析から、1細胞にて検出された遺伝子数は老化に伴い上昇する (A：全細胞、B：B細胞)。老化に伴いB細胞は2型自然免疫活性化状態と同様な転写状態を示す (C：IL-33なしの細胞がIL-33ありの細胞と重なる)。

く、肺胞上皮細胞や線維芽細胞などの非免疫細胞でも確認できている。この解析で見られた転写活性の上昇が炎症によるものなのか、または、単に細胞周期や代謝で見られる現象なのかを確認するために、肺での2型炎症を誘導できるIL-33投与を行ったマウスとの比較を行った。その結果、8週齢のB細胞はIL-33投与の有無で全く異なる場所にプロットされ、異なる表現型を持つことが示されたが、32週齢では各群のプロットが近づき、80週齢では完全に重なり区別が付かなくなることが分かった（図2C）。つまり加齢とともに肺細胞にて恒常的な転写活性化が起こり、その結果細胞は炎症状態の細胞と類似してくるということが示された。このような現象はB細胞だけでなく複数の免疫細胞で観察されており、これまで老化研究で証明することが困難とされてきた「加齢に伴う転写制御機能不全がinflammagingを起こす状態」をscRNA-seq解析により示すことができたと考えている。

2. 研究の目的

Inflammagingがどのように起きるのか、なぜ多様な細胞に共通して起きるのかは未だ分かっていない。さらに食の変化により寿命に影響が出ることが多々報告されていることから、本研究では食の効果を入flammagingの角度から解析する。具体的には遺伝子発現を制御するクロマチン構造の変化が結果的にinflammagingに繋がる可能性を検討する。免疫細胞は速やかに環境シグナルに応答する必要があるため、多くの遺伝子がポーズド (paused) あるいはポイズド (poised) 状態を維持している事が知られている。ポーズド状態はポリメラーゼ複合体が転写開始点付近に結合しているにも関わらず、NELFなどの阻害タンパク質がポリメラーゼに結合し転写延長を抑制している状態である。これらは環境シグナルが検知されると、NELFが外れ転写延長が直ちに始まる。

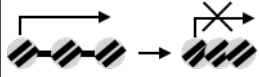
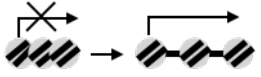
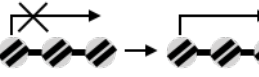
転写制御機能は老化に伴い低下する事が知られているが、特異的な遺伝子群に影響するのか、ランダムなのか、或いはポーズド状態特異的な制御不全なのか、さらには細胞種間に共通点があるのかなどは包括的および網羅的な解析を必要とするため分かっていない。申請者は先述した予備検討実験から、肺組織細胞が老化に伴い炎症が誘導されたマウスと同様な転写状態に変化する事を見出しており、免疫遺伝子はポーズド制御されているものが多い事も加味すると、老化に伴いポーズド状態維持機能低下により、シグナルが不在の場合でも免疫応答遺伝子が恒常的に発現されるという仮説を立てた。これを2種の最先端技術であるシングルセル解析手法 (RNAおよびクロマチン構造) を用いることにより検証する。1細胞解析を用いることにより、本研究ではinflammagingの分子機構に迫る事を目的とし、高齢化社会における健康長寿の実現につながると期待している。

3. 研究の方法

コントロール食及び低タンパク食を若齢マウス (2ヶ月) 及び高齢マウス (17ヶ月) に3ヶ月間与え、組織 (骨髄・肺) を採取しsingle cell RNA-seq (シングルセル遺伝子発現解析) 及び single cell ATAC-seq (シングルセルクロマチン構造) 解析 (10x Genomics) を行う。データ解析を行い本研究の仮説である、加齢に伴う遺伝子発現制御能力低下 (特に免疫遺伝子) が組織レベルで見られるかを検証する。さらにその免疫遺伝子の発現制御能力がダイエットを変えることにより挙げる事が可能かコントロールを餌と低タンパク餌を与えたマウスを比較し検証する。具体的には免疫遺伝子のpoised/poisedが加齢に伴い維持されなくなり、炎症状態に貢献するという仮説を検証する。老齢マウスで維持されていない遺伝子が同定された場合、それらの遺伝子が低タンパクdietを与えた老齢マウスでもコントロールを同じく変化しているか、あるいはpoised/poised状態に近い (若返りしているか) どうかを同定する。

データ解析では先ずscRNA-seqデータに基づき各細胞種 (各クラスター) において

12週齢と80週齢に発現差のある遺伝子を同定し、「不活性化」および「活性化」遺伝子の2グループに分

	不活性化		活性化		ポーズ制御機能不全	
	クロマチン	転写	クロマチン	転写	クロマチン	転写
若齢	開	活性	閉	不活性	開	不活性
老齢	閉	不活性	開	活性	開	活性
						

ける。次にscATAC-seqデータを活用し、「活性化」遺伝子におけるクロマチン構造の変化を同定する。若齢マウスでクロマチン構造が閉まっている場合は「活性化」、開いている場合は「ポーズ制御機能不全」とさらに分ける（ポーズ制御されている遺伝子は転写開始点より1ニュークリオソーム上流が開いている）。最後に「ポーズ制御機能不全」として同定された遺伝子リストをGO (Gene Ontology)およびGSEA (Gene Set Enrichment Analysis)により解析を行い、免疫応答遺伝子が上位に入っているか同定する。

4. 研究成果

残念ながら、コロナ状況の為実験開始が大幅に遅れた。コントロール及び低タンパク食に分けたマウスの飼育を終了し、若齢・老齢マウス及びコントロール食・低タンパク食の組み合わせそれぞれ6匹から肺及び骨髄を取り出し、肺は1細胞化を行った後10x Genomics Chromium 機器に流し、8,000細胞をターゲットとした scRNA-seq 及び scATAC-seq のライブラリ作成に成功した。ライブラリーをIlluminaに流し、fastqファイルを本研究終了少し前に得た事から、実験データを得る事は出来たが本研究期間以内に十分な解析に至らなかった。データ解析は今後も行っていく事から本研究で行った実験の解析結果が inflammaging の分子機構解明に貢献する事を期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------