

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21266

研究課題名（和文）健康寿命の延伸に向けた老化細胞を除去するSenolytic薬の探索

研究課題名（英文）The search for senolytic drugs that eliminate senescent cells to extend healthy life expectancy

研究代表者

土志田 裕太（Doshida, Yuta）

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・研究員

研究者番号：60966919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：老化細胞は、老齢動物の組織に存在する機能が低下した細胞である。既に我々は老化細胞の目印となる遺伝子（老化関連遺伝子）を同定している。本研究の目的は、これらの老化関連遺伝子を用いて、既知の薬剤から老化細胞を積極的に除去する「老化細胞除去薬」を発見することである。初年度では、マウスから単離した肝細胞に、同定した老化関連遺伝子の発現を人為的に誘導し、老化に関連する現象である H2A.X陽性核（DNA損傷の指標因子）の増加が認められた。最終年度では、生体で高い精度で老化細胞除去薬の探索を行うため、マウス肝臓で安定的に老化関連遺伝子の発現を誘導できるよう遺伝子を編集したマウスを2系統作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老齢動物の臓器に存在する老化細胞は、臓器における老化の原因の一つとして考えられる。老化細胞除去薬によって臓器から老化細胞のみを除くことで、加齢に伴い衰えた臓器機能が若いときと同程度まで改善することが期待される。したがって、健康寿命の延伸を達成するためには、有用な老化細胞除去薬が必要である。本研究では、我々が同定した老化関連遺伝子を用いて、肝臓の老化細胞を除去する老化細胞除去薬の探索に必要な遺伝子組換え動物を世界で初めて作製した。本研究の成果は、健康寿命の延伸に向けた研究の基盤形成に寄与するものである。今後、研究を継続することで有用な老化細胞除去薬の同定とヒトへの応用研究への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Senescent cells have impaired physiological function and exist in the tissues of old animals. We have already identified three age-associated genes that works as the marker of senescent cells in aged mouse livers. This study aims to discover the Senolytic drugs that actively eliminate senescent cells in aged mouse livers. In the first year of this study, the expression of the identified age-associated genes was artificially induced in hepatocytes isolated from mice; we observed an increase in H2A.X-positive nuclei, which is an indicator of DNA damage and an age-related phenomenon. In the final year of this study, we generated two strains of transgenic mice to achieve the robust screening for the Senolytic drugs in mouse livers. The gene of these transgenic mice are edited to stably induce the expression of age-associated genes in the mouse liver.

研究分野：老化

キーワード：老化 老化関連遺伝子 老化細胞除去薬 老化細胞 肝臓 遺伝子組換え動物

### 1. 研究開始当初の背景

老化は、加齢に伴う生理機能の低下である。若齢動物の組織は、細胞機能が正常な「若い細胞」で構成される。一方、老齢動物の組織には、細胞機能が衰退した「老化細胞」が存在し、その数は加齢に伴い増加すると予想される。すなわち、老齢動物の組織には、「若い細胞」と「老化細胞」が混在している可能性がある(図1)。有限の分裂能を持つ線維芽細胞を用いた細胞老化研究は近年飛躍的に進展し、p16, p21, Foxo4, p53 や、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子といった老化関連遺伝子が明らかになってきた(J. Cell Biol. 192(4), 2011, Annu Rev Pathol 5 99 1 18, 2010)。加えて、これらの老化関連遺伝子を標的として、老化細胞を積極的に除去する老化細胞除去薬(Senolytic 薬)が開発され、老齢動物の生理機能を改善できることが明らかになってきた(Cell 169:132.e116, 2017)(図2)。老化を制御し、より確実に健康寿命の延伸を達成するためには、既存のものに加え、より有用性の高い Senolytic 薬の開発、同定する必要がある。雑な老化機構は、今までに同定された老化関連遺伝子や SASP 因子のみですべてを説明することは難しい。そのため、まだ同定されていない老化関連遺伝子が数多く存在すると予想される。まだ誰も見出せていない老齢動物の組織に存在する老化細胞を特定するためには、老化細胞の指標となる老化関連遺伝子を組織や臓器毎に数多く見出す必要がある。老齢動物の組織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。

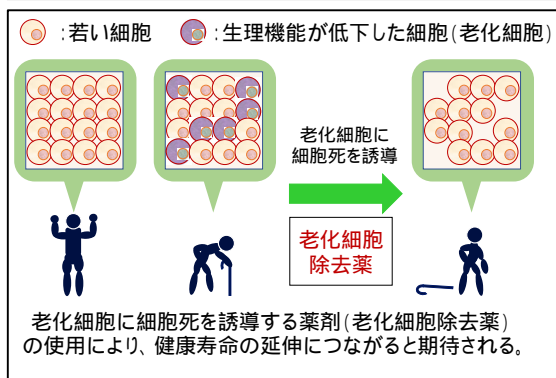
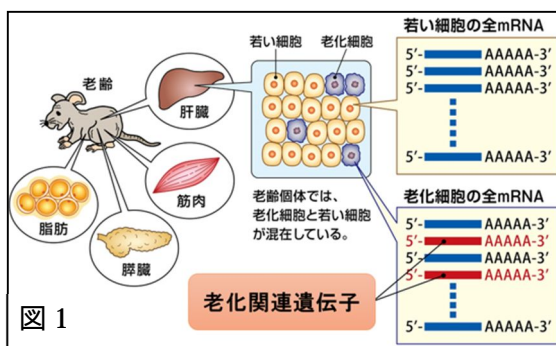


図2 老化細胞除去薬による健康寿命の延伸

### 2. 研究の目的

当研究室では既に、老化細胞の指標遺伝子として3種類の老化関連遺伝子(Gli1 pathogenesis-related 1, Glipr1; C-type lectin domain family 12, member a, Clec12a; pleckstrin homology-like domain, family A, member 3, Phlda3)を同定した(図3, Doshida Y et.al., Sci Rep, 2023)。本研究では同定した3種類の老化関連遺伝子を用いて、老齢動物の肝臓に存在する老化細胞を積極的に除去する「Senolytic 薬」の発見を目的とする。研究の第一段階では、若齢マウス肝臓の実質細胞にこれら3種類の老化関連遺伝子を個別に導入、高発現させて細胞老化や老化に関連した現象を誘導するか明らかにする。第一段階の達成は、第二段階の礎となる。第二段階では、ハイスループットスクリーニング法を確立し、老化細胞を除去する Senolytic 薬を探索する。既存の報告から、Phlda3 は細胞増殖の抑制に関与、Clec12a は炎症の抑制に関与、Glipr1 はアポトーシスの促進に関与すると推測される。これら3種類の新規老化関連遺伝子は、今までに老化との関連を示唆した報告はない。本研究で確立する Senolytic 薬のハイスループットスクリーニング法は、老化細胞の解析にも応用が可能であり、老化機構の理解がさらに深まることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 老化関連遺伝子の導入、高発現による細胞老化の誘導

若齢マウスからコラゲナーゼ灌流法を用いて単離した肝細胞に5種類の老化関連遺伝子(Glipr1, Clec12a, Phlda3, p16, p21)をリポフェクション法により導入した。そして、細胞老化マーカーである SA-β-gal の活性上昇や H2A.X の陽性核の増加を調べ、若齢マウス肝臓の実質細胞に細胞老化、および老化に関連する現象を誘導できたかを評価した。

#### (2) Senolytic 薬の探索に向けたハイスループットスクリーニング系の構築

Senolytic 薬のハイスループットスクリーニング系を構築するために、CRISPR/Cas9 法と呼ばれる遺伝子編集技術を用いて、肝臓で老化関連遺伝子 (Glipr1) の発現が誘導されるマウス (遺伝子組換え動物) を 2 系統作製した。具体的には挿入したい箇所のマウスゲノム配列 (数百 bp 程度のサイズで、ホモロジーマームと呼ばれる) の間に、Glipr1 遺伝子とその発現を制御するプロモーター配列を配置したドナーベクターを作製した。このドナーベクターを CRISPR/Cas9 法に用いることで、ホモロジーマーム内の DNA 配列を相同組換えによりマウスゲノムに挿入することができる。

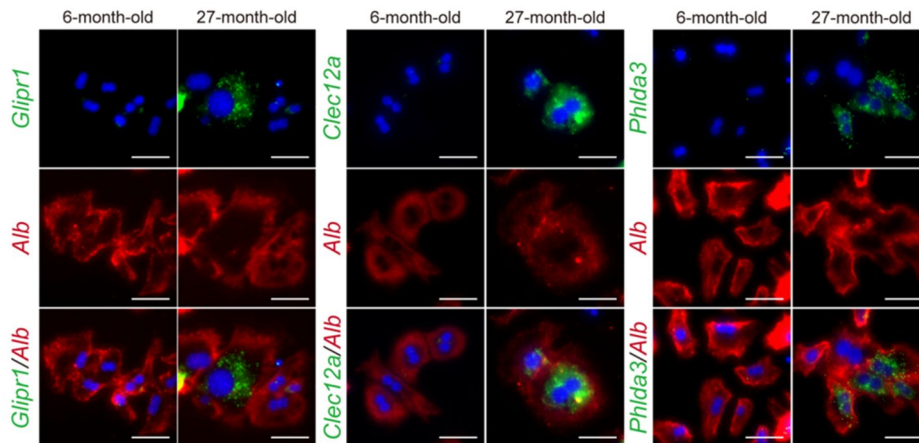


図3 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法による老化関連遺伝子を発現するマウス肝細胞の検出。青色は DAPI 色素により染色された細胞核，赤色は肝細胞の指標遺伝子であるアルブミン遺伝子 (Alb) の mRNA を示す。それぞれの老化関連遺伝子の mRNA は緑色で示されている。Scale bar = 50  $\mu$ m. Doshida Y et.al., Sci Rep, 2023 より引用

#### 4. 研究成果

(1) 若齢マウスから単離した肝細胞に、同定した 3 種類の老化関連遺伝子に加え、既知の老化関連遺伝子である p16、および p21 の発現を誘導したい。そこで、ミリ秒単位の電荷付与により細胞膜に一時的に穴を開けることで核酸などの分子を細胞内に取り込ませるエレクトロポレーション法を用いて、マウス初代肝細胞に老化遺伝子の導入を試みた。しかし、導入効率と細胞の生存率に影響するエレクトロポレーション法の条件 (パルス回数、電圧、パルス時間) を検討しても、十分な導入効率は得られなかった。

一方で、発現ベクターを脂質膜で包み込むことで細胞に取り込ませるリポフェクション法を実施したところ、マウス肝細胞の核で老化に関連した現象の一つである DNA 損傷の指標因子 (H2A.X) の増加が認められた。加えて、細胞老化マーカーである SA- $\beta$ -gal の活性が亢進した肝細胞の出現が、老化関連遺伝子の発現誘導により確認された。ただし、マウスより単離した初代肝細胞での、リポフェクション法による発現ベクターの導入効率は、事前に検討したヒト肺癌由来細胞株 A549 細胞への導入効率に比べ低かった。初代肝細胞はその単離工程や培養の継続によって傷害を受けるため、この導入効率の違いは想定内の結果であった。

(2) 研究の第一段階では、リポフェクション法による老化関連遺伝子の導入で、若齢マウス肝細胞に老化に関連する現象が起きることが確認できた。次に、より精度の高いスクリーニング系を確立するため、同定した老化関連遺伝子のうち Glipr1 の発現が誘導されるマウス (遺伝子組換え動物) を 2 系統作製した。これらのマウスは CRISPR/Cas9 法と呼ばれる遺伝子編集技術を用いて作成され、1 系統は、常に肝臓で老化関連遺伝子の発現が誘導される。もう 1 系統は、薬剤をマウスに投与することにより任意のタイミングで肝臓での老化関連遺伝子の発現が誘導できるよう設計した。マウスの出生成績から、これらの遺伝子編集によりマウスに胎生致死や発達遅延などの異常は現在のところ観察されていない。また、作製した 2 系統のマウスは現在繁殖中であり、実験に用いるマウスが十分に得られた段階で、老化関連遺伝子の発現レベルと老化に関連する現象の有無を確かめる。

本研究で作製した老化関連遺伝子の発現が誘導されたマウスや、その初代肝細胞は、既存薬の中から Senolytic 薬として働く薬剤の探索や Senolytic 薬の新規開発に応用が可能であり、健康寿命の延伸に向けた実効的な手段を社会実装する可能性を秘めている。また、Senolytic 薬以外にも、老化を制御する分子 (Senolytic 薬とは異なり、老化細胞を死滅させることなく若い細胞と同等程度まで細胞機能を回復させる分子) の創出にも、本研究の成果を応用可能であると考えられる。

まだ誰も報告していなかった老化細胞の指標遺伝子を用いた本研究の成果は、今後の老化研究におけるイニシアチブを獲得できる可能性が高い。臓器や組織の機能は、加齢に伴いそれぞれ異

なる機能低下を呈することから、臓器や組織ごとに異なる性質の老化細胞が存在する可能性を考慮する必要がある。同時に、これらの老化細胞の機能が低下した機構も、臓器や組織で異なると考えられる。本研究の成果は肝細胞が老化細胞となる機構や、肝臓の老化細胞の性質を調べる上で重要な知見を提供しうるものであり、老化機構の解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Doshida Yuta, Hashimoto Shinichi, Iwabuchi Sadahiro, Takino Yuka, Ishiwata Toshiyuki, Aigaki Toshiro, Ishigami Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing to detect age-associated genes that identify senescent cells in the liver of aged mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-41352-6	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土志田 裕太, 橋本 真一, 岩淵 禎弘, 滝野 有花, 石渡 俊行, 相垣 敏郎, 石神 昭人
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた老齢マウス肝臓での老化肝細胞の指標となる遺伝子の同定
3. 学会等名 第96回日本生化学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Doshida, Shinichi Hashimoto, Sadahiro Iwabuchi, Yuka Takino, Toshiyuki Ishiwata, Toshiro Aigaki, Akihito Ishigami
2. 発表標題 Identification of age-associated genes in liver of aged mice
3. 学会等名 IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土志田裕太, 橋本真一, 岩淵禎弘, 滝野有花, 石渡俊行, 相垣敏郎, 石神昭人
2. 発表標題 ドキシソルピシンによる老化誘導が老化関連遺伝子の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第46回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 老化細胞の判定方法及び老化細胞除去剤のスクリーニング方法	発明者 石神昭人, 土志田裕太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-069280	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------