

22. 加齢に伴う血中細胞外小胞の性状変化による加齢疾患発現機構の解明

岡山大学学術研究院医歯薬学域 消化器・肝臓内科学 教授 大塚 基之

概要

本研究では、加齢に伴う肝非実質細胞の細胞老化が細胞外小胞を介して肝実質細胞に与える影響の解明を目的としました。特に、非実質細胞で発現が増加した RNA 編集酵素 ADAR1 が細胞外小胞に含まれ実質細胞に伝播することで肝発癌リスクを高める仕組みに注目しました。この研究を通じて加齢関連疾患の新たな理解と介入法の開発を目指しました。

まず、若年者と高齢者の肝組織を比較し、細胞老化が非実質細胞で優先的に進行していることを確認しました。また、ADAR1 を含む細胞外小胞が実質細胞に取り込まれ、RNA 編集機能を発揮することを示しました。さらに、血中細胞外小胞から非実質細胞由来のものを示す表面マーカーを探索するとともに、老化細胞で PDL1 の発現が高まることを老化の指標として利用する可能性を検討しました。これらの検討により、非実質細胞の老化が細胞外小胞を通じて実質細胞に影響を及ぼし、加齢関連疾患、特に肝発癌のリスクを高める可能性が示されました。また、PDL1 の発現量を指標とした細胞外小胞の操作や、表面マーカーを利用した老化細胞の特定が、加齢関連疾患の新たな診断および治療戦略につながることを期待されます。

今後の課題として、血中細胞外小胞を効率的に操作する技術の開発や、加齢関連疾患における細胞外小胞の役割のさらなる検証が挙げられます。また、抗加齢対策として細胞外小胞を活用する新たな治療法の可能性を模索します。本研究の推進には、細胞外小胞を高感度で検出するための digital PCR 機器が不可欠でしたが、本助成金のご支援により研究を円滑かつ効率的に進めることができました。貴重なご支援に深く感謝申し上げます。

背景および目的

以前から、加齢現象の病因としての「体液説」が仮説として唱えられているがその真偽については現在も議論が続いている。しかし、パラピオーシス等の方法で若年個体の体液を老齢個体に還流すると様々な細胞で若返りが得られるという表現型が現象として多数報告されており (Nature 2022, 309 など)、その分子機構が解明できれば、それによる種々の加齢現象に対する介入法が開発できる可能性がある。

これまで我々は癌を対象とした悪液質の分子メカニズムの解明を行っており、病巣から放出される特異的な細胞外小胞が癌悪液質の原因になっていることを明らかにした (Clin Transl Med. 2022)。症候的に類似な点が多い「担癌状態における筋萎縮と加齢現象の一つであるサルコペニアのメカニズム」などには一定の共通項があるのではないかと考えられる。

個体で見た時の細胞老化は、例えば、腸管上皮の実質細胞はターンオーバーが早いため老化細胞は自然脱落していくだろうし、一方で、例えば肝臓実質細胞はターンオーバーが乏しいため細胞老化は起きにくいと考えられる。それらの事項を鑑みると、個体で見た時に老化を来す細胞は、実質細胞の老化よりも各臓器組織に存在する間質細胞のほうが顕著と考えられる。

しかし実際に加齢に伴って問題になるのは、例えば筋細胞の萎縮など実質細胞の障害が問題になる。この時、間質細胞の細胞老化と実質細胞の障害を繋げる因子として、担癌患者の悪液質と同様に、非実質細胞から放出さ

れる細胞外小胞が実質細胞に働きかけて、種々の加齢現象を惹起するのでは、と仮説を立てた。我々はこれまでも、間質細胞が細胞老化を来す際に、細胞内で慢性炎症が惹起され、インターフェロン系（IFN系）の活性化が起き、その下流因子でRNA編集酵素ADAR1の発現が増えることを報告した（npj Aging Mech Dis. 2018）。

そこで、これまでの申請者の知見と仮説を基に、加齢に伴って起きる実質細胞の障害の一つとして「老化に伴う発癌リスクの増加」に着目し、加齢に伴う変化として、1) 血中を循環する細胞外小胞内のRNA編集酵素含量の変化の有無の検証、2) その細胞外小胞の実質細胞移行性獲得とその機序の検討、3) RNA編集酵素取り込みによる病態発生メカニズムの検討、を順番に進め、加齢に関わる病態生理に関する知見を得たいと考えた。その研究の一環として、まず脂肪肝における肝発がんの過程で、肝臓の非実質細胞が優先的に細胞老化を起し、そこでのADARの発現増強が肝実質細胞へと細胞外小胞を介して伝播して、発癌に至るのではという仮説を検証することとした。

方法

1. 肝非実質細胞の細胞老化

個体の老化に伴う肝臓内の細胞老化の状況を把握するために、若年者の肝組織と高齢者の肝組織を細胞老化マーカーの一つであるp16で染色をした。染色用の組織には市販のtissue arrayを用いた。

2. 細胞外小胞へのADAR1の含有の有無

細胞外小胞にADAR1蛋白が含有され、それが近隣の細胞に取り込まれるかどうかを検討するために、肝癌細胞由来の細胞外小胞を不死化した正常肝細胞に添加して、取り込みを観察した。高感度に検証するために、ADAR1蛋白にHiBiTtagを付加し、肝実質細胞にLgBiTを発現させる系を構築することでLuciferaseの発現量で検証できるようにした。

3. 肝実質細胞でのADAR1の機能

細胞外小胞から取り込まれたADAR1が肝実質細胞内で機能をしているのかを検討するために、ADAR1の標的遺伝子として知られているAZIN1 RNAの変異の有無をdigital PCRで確認した。

4. 細胞外小胞表面マーカーの探索

血液中には 10^{12} 個/ml程度の細胞外小胞が流れており（図1）、

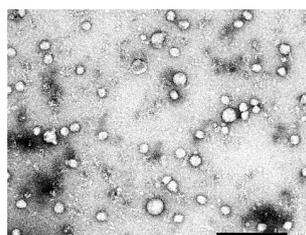


図1. 血液中の細胞外小胞.

血液中には大量の細胞外小胞が流れているが、それがどの細胞由来かを同定するのは通常は困難。

それがどの細胞由来かは一概には分からない。その中から細胞老化をきたした肝非実質細胞由来の細胞外小胞を血清から単離するために、細胞外小胞の表面マーカーで肝非実質細胞由来であることを同定することを考えた。データベース検索によって可能性のあるマーカーを探索した。

5. 老化細胞でのPDL1の発現状態の検索

細胞外小胞内のADAR1含有量を検討することで細胞老化の程度を判定するのは、得られる細胞外小胞が微量過ぎて困難が予想されたため、surrogate markerを検索していたところ、細胞老化をきたした細胞ではPDL1の発現

が増強するという報告 (Wang et al. Nature 2022, 358) がなされた。そこで、肝組織を用いて肝非実質細胞の細胞老化の状態を PDL1 の発現の程度で検討できないか、肝癌組織を用いた PDL1 を含む組織多重免疫染色で検討した。

6. 細胞外小胞での肝非実質細胞の細胞老化の推定

血中の細胞外小胞から肝非実質細胞由来と推定した細胞外小胞の表面上の PDL1 の発現量を検証するために、抗体に DNA バーコードを付加した immunoPCR による検出を試みた。In vitro で細胞老化を惹起した肝非実質細胞の上清から得られる細胞外小胞を用いてその検証を行った。

結果および考察

1. 肝非実質細胞の細胞老化

Tissue array を用いた肝組織染色では、高齢者由来の肝組織では、若年者由来の肝組織よりも肝非実質細胞での細胞老化の進展が目立って検出された。

この結果からは、実質臓器における細胞老化は、実質細胞よりもその周囲の非実質細胞で優先的に起きていることが示唆された。

2. 細胞外小胞への ADAR1 の含有の有無

非実質細胞の細胞老化が惹起されたときに、そこから放出される細胞外小胞に細胞老化で発現が増強する ADAR1 蛋白が包含されるかどうか、それが近隣の実質細胞に伝播するかどうかを HiBiT tag をつけた ADAR1 蛋白と実質細胞側に LgBiT を発現させた系で検討した。この系では、もし HiBiT tag 付きの ADAR1 蛋白が細胞外小胞に包含されて実質細胞に取り込まれると Luciferase が形成され基質を添加すると発光することで判断できる。実際に、ADAR1 を発現する肝癌細胞株の上清からとった細胞外小胞を肝実質細胞に添加すると、細胞外小胞が取り込まれて ADAR1 が肝実質細胞内で発現していることが示された。

3. 肝実質細胞での ADAR1 の機能

そのような肝実質細胞に取り込まれた ADAR1 蛋白が機能を発揮しているのかを確認するために、ADAR1 の RNA 編集酵素としての標的因子としてよく知られている AZIN1 遺伝子の RNA に遺伝子編集が起きているかを digital PCR で確認したところ、右図のように、細胞外小胞を添加した肝実質細胞内では AZIN1-RNA の A to I editing がより高頻度で起きていることが示された(図 2)。

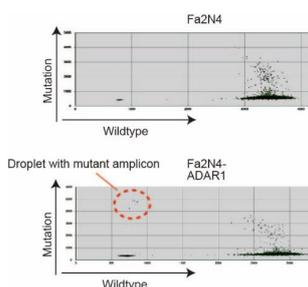


図 2. ADAR1 の発現にともなう AZIN1RNA の変異の検出。

ADAR1 が発現した細胞内では標的遺伝子である AZIN1 の RNA に A to I 編集が起きている。

この結果は、個体の老化に伴って肝臓内では非実質細胞で細胞老化が優先的に惹起され、そこで発現した ADAR1 が細胞外小胞に含有されて近隣の実質細胞に取り込まれ、RNA 編集の頻度が高まり、肝発がんの危険が高まる一因になっていることが示唆された。

4. 血清中からの肝非実質細胞由来の細胞外小胞の単離にむけたマーカー探索

そこで、血中の細胞外小胞を単離することが出来れば、その中の ADAR 1 蛋白の含有量を見ることで老化に伴う肝発がんの危険度が推定できるのではないかと考えた。このためには、肝非実質細胞由来の細胞外小胞のみを単離してその性状を解析する必要がある。そのために、肝非実質細胞から放出されているであろう細胞外小胞の表面マーカーで肝非実質細胞特異的なものがあればそれを目印に単離できるのではないかと考えた。そのような表面マーカーの検索をデータベースを用いて行ったところ、肝非実質細胞に特異的に発現する表面マーカーとして PCDH7 と ITGA1 を同定することが出来た。

5. 老化細胞での PDL1 の発現状態の検索

上記の方法で血中の細胞外小胞から肝非実質細胞由来と考えられる細胞外小胞を単離した場合に、その中の ADAR 1 蛋白の含有量で細胞老化の程度を推定したいところではあったが、単離される細胞外小胞が極めて微量であるため、内容物の探索がしにくいことが判明した。そこで、ADAR1 蛋白含有量に変わる細胞老化のサロゲートマーカーを探索したところ、細胞老化をきたした細胞では PDL 1 の発現量が増えることが報告された (Wang et al. Nature 2022, 358)。そこで、実際に細胞老化をきたした肝非実質細胞でも PDL 1 の発現量が増えているかどうか、脂肪肝を母地とした肝癌組織で PDL 1 の発現量がどうなっているかを検討した (図 3)。

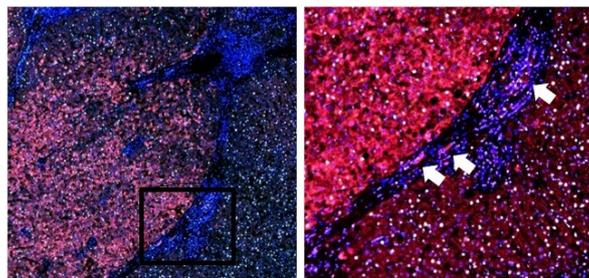


図 3. 肝癌組織周辺の非実質細胞での PDL1 発現増強.

肝癌組織では PDL1 発現が増強しているが (赤)、その周辺の非実質細胞でも PDL1 の発現が増強している (矢印) .

その結果、癌細胞では PDL 1 が高発現であるとともに、背景肝の中では非実質細胞が PDL1 を高発現している、つまり、肝癌のある肝臓の背景肝では細胞老化は非実質細胞で優先的に起こることが示された。

6. 細胞外小胞での肝非実質細胞の細胞老化の推定

これらの結果から、血中の細胞外小胞から肝非実質細胞由来と思われる細胞外小胞を単離して、その表面の PDL1 発現量を見ることで、肝非実質細胞の細胞老化の程度を推定できることになるが、これとても、肝非実質細胞由来の細胞外小胞量が少ないために十分な解析に足るとは言い難かった。そこで、図 4 のような抗体に DNA バーコードを添加した immunoPCR 法を用いて細胞外小胞表面の PDL1 量を PCR で検出することとした(図 4)。

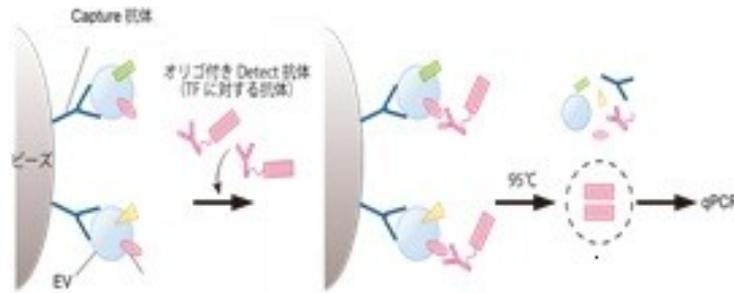


図 4. DNA バーコードをつけた抗体による細胞外小胞表面抗原の検出.

細胞外小胞表面の表面抗原の有無を検出するために、抗体に DNA バーコードを付加し、その PCR 増幅によって存在を確認する方法を樹立.

パイロット的ではあるが、細胞外小胞表面の PD-L1 を定量できることが示された(図 5)。

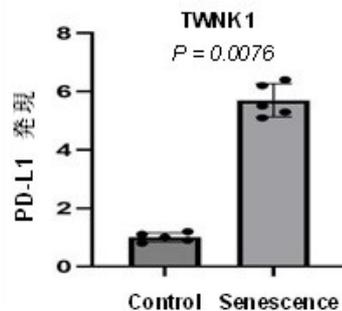


図 5. 細胞老化をきたした肝非実質細胞由来の細胞外小胞の PDL1 発現.

細胞老化を惹起した肝非実質細胞由来の細胞外小胞表面の PDL1 の発現状況を抗体につけた DNA の PCR 増幅によって確認.

以上の結果から、個体老化が起きたときに、実質臓器、特に肝臓においては、非実質細胞で細胞老化が起きており、そこで細胞老化に伴って発現増加した ADAR 1 をはじめとする因子が実質細胞に細胞外小胞を介して伝播し、肝癌をはじめとした加齢関連疾患が発生する病態生理を形成していることが示唆された。

この結果は加齢に伴う種々の疾患が細胞外小胞を介して発生していることを示唆しており、パラピオーシスで老化を惹起、あるいは、若返りがこれまで報告されてきた中には、細胞外小胞を介した現象が含まれているのではないかと考えられ、今後、抗加齢対策において、血中細胞外小胞の manipulation が一つの方策になりうることを示唆された。

(完)

引用文献

- 1) Pálovics R, Keller A, Schaum N, Tan W, Fehlmann T, Borja M, Kern F, Bonanno L, Calcuttawala K, Webber J, McGeever A; Tabula Muris Consortium; Luo J, Pisco AO, Karkanas J, Neff NF, Darmanis S, Quake SR, Wyss-Coray T. Molecular hallmarks of heterochronic parabiosis at single-cell resolution. *Nature*. 2022;603(7900): 309-314.
- 2) Shibata C, Otsuka M, Seimiya T, Kishikawa T, Ishigaki K, Fujishiro M. Lipolysis by pancreatic cancer-derived extracellular vesicles in cancer-associated cachexia via specific integrins. *Clin Transl Med*. 2022;12(11):e1089.

- 3) Yamagami M, Otsuka M, Kishikawa T, Sekiba K, Seimiya T, Tanaka E, Suzuki T, Ishibashi R, Ohno M, Koike K. ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *NPJ Aging Mech Dis.* 2018;15;4:11.
- 4) Wang TW, Johmura Y, Suzuki N, Omori S, Migita T, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Yamazaki S, Shimizu E, Imoto S, Furukawa Y, Yoshimura A, Nakanishi M. Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes. *Nature.* 2022;611(7935):358-364.