

## 38. 部分的リプログラミングによる老化細胞の若返り機構の解明

金沢大学がん進展制御研究所 教授 城村 由和

### 概要

本研究では、老化細胞が正常細胞へと若返る現象、すなわち「老化細胞リプログラミング」の実現可能性を検証することを目的とした。さらに、その分子基盤を解明し、エピゲノム変化を含む根本原理を明らかにすることで、「山中因子」を用いることなく、より効果的かつ安全な健康寿命延伸法の確立を目指した。

本研究の一環として、老化細胞特異的に「山中因子 (OSKM)」を Tet-on システムによりドキシサイクリン依存的に発現させることが可能な遺伝子改変マウスモデル「p16-CreERT2・ROSA26-CAG-lsl-rtTA3-IRES-mKate2・TetO-OSKM」を作製した。このモデルを用い、非アルコール性肝炎および慢性腎不全を誘導後に「部分的リプログラミング」を施した結果、両疾患に特徴的な組織線維化の進行が顕著に抑制され、炎症性マクロファージの浸潤が大幅に軽減することを確認した。特に腎臓においては、組織障害がほぼ完全に修復され、正常構造へと再生するという顕著な改善が観察された。さらに、老化細胞の若返りメカニズムを解明すべく、「部分的リプログラミング」前後の老化細胞を単一細胞レベルで遺伝子解析した結果、老化細胞のリバイバルを制御する鍵となる因子群を同定するに至った。これらの知見は、老化細胞の運命転換に関する新たな学術的枠組みを提供し、老化関連疾患の革新的治療戦略の基盤となることが期待される。

最後に、研究室の立ち上げという重要な時期において、本研究助成を賜り、研究の推進に多大なるご支援をいただいたことに深く感謝申し上げます。

### 背景および目的

近年のモデルマウスを用いた分子遺伝学的解析により、個体老化および加齢性疾患の発症機序において、DNA 損傷などによって誘導されるストレス応答の一環として生じる\*\*「細胞老化」が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。細胞老化に伴い、不可逆的な増殖停止を示す細胞は、生理活性因子群「SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)」を分泌する特徴を有し、これらの「老化細胞」の蓄積が、がんを含む加齢性疾患の発症および病態進行に寄与する可能性が示唆されている。実際、慢性炎症巣の一部を形成すると考えられる老化細胞を遺伝学的・薬理学的手法により選択的に除去することで、がん、動脈硬化、非アルコール性脂肪肝炎、糖尿病など多岐にわたる加齢性疾患を予防・改善し得ることが、申請者らおよび海外の複数の研究グループにより報告されている。しかしながら、生体内においてどの細胞種が老化細胞へと変化し、いかなる機能変容が加齢性疾患の発症・進行に関与するのか\*\*、さらには老化細胞除去技術が生体に及ぼす長期的影響については、未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、老化細胞除去に代わる新たな戦略として、老化細胞特異的に「山中因子」を一過的に発現させることで老化細胞を正常細胞へと若返らせる、「老化細胞リプログラミング」の可能性を検証することを目的とする。さらに、本研究を通じて老化細胞リプログラミングの背後にあるエピゲノム変化などの基本原理を解明し、「山中因子」を用いることなく安全かつ効果的に老化細胞をリプログラムする技術の開発を目指し、健康寿命の延伸に向けた分子基盤の構築に貢献する。

## 方法

本研究では、老化細胞特異的に「山中因子」を Tet-on システムによりドキシサイクリン依存的に発現する遺伝子改変マウスモデル「p16-CreERT2・ROSA26-CAG-lsl-rtTA3-IRES-mKate2・TetO-OSKM」を用い、老化細胞リプログラミングの生理学的影響を評価した。

まず、本マウスを用いて、8週間のコリン欠損・低メチオニン・高脂肪食負荷により非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を誘導した。その後、タモキシフェンを投与し、ドキシサイクリン含有水を24時間自由摂取させることで、老化細胞特異的に「山中因子」を一過的に発現させ、2週間後に病理学的解析を実施した。脂肪蓄積の評価にはHE染色、線維化の指標としてSirius Red染色、炎症性マクロファージの浸潤評価にはF4/80抗体を用いた免疫組織化学(IHC)解析を行った。さらに、肝障害の指標として血清中のAST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)およびALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)を測定した。

一方、同様のマウスモデルを用い、5週間のアデニン添加食負荷によって慢性腎不全を誘導した。タモキシフェン投与およびドキシサイクリン含有水の自由摂取(24時間)により、老化細胞特異的に「山中因子」を一過的に発現させ、2週間後に病理学的評価を行った。腎線維化の評価にはSirius Red染色、炎症性マクロファージの浸潤解析にはF4/80抗体を用いたIHC解析を実施し、さらに近位尿細管再生の指標として抗LTL(Lotus tetragonolobus lectin)抗体を用いたIHC解析を行った。腎機能障害の指標としては血清中の尿素窒素(BUN)およびクレアチニン濃度を測定した。

また、老化細胞の若返り機構の解明を目的として、本モデルマウスから線維芽細胞を単離・調製し、放射線照射による細胞老化を誘導した後、タモキシフェンおよびドキシサイクリンを添加した。ドキシサイクリン添加前および添加後5日目に固定した細胞をセルソーターを用いてp16陽性老化細胞として分取し、\*\*最新の固定サンプル対応一細胞遺伝子発現解析(scRNA-seq)によるscRNA-seqライブラリーを作製した。作製したライブラリーは次世代シーケンサーおよびスーパーコンピューター「SHIROKANE」を用いて解析を行い、老化細胞リプログラミングに関わる遺伝子発現変動の詳細な検討を行った。

## 結果および考察

本研究では、「老化細胞リプログラミング」が加齢性疾患の病態に及ぼす影響を検証するため、NASHを誘導したマウスにおいて、対照群と老化細胞リプログラミング群において、肝臓内の脂肪蓄積には顕著な差は認められなかった。一方で、線維化や炎症性マクロファージの浸潤は、老化細胞リプログラミング群において部分的ながら改善が認められた。しかしながら、肝障害マーカーであるASTおよびALTの値は、リプログラミング群で減少傾向を示したものの、統計的に有意な差は認められなかった。

一方、CKDを誘導したマウスにおいて、対照群と比較し、老化細胞リプログラミング群では、腎臓の線維化や炎症性マクロファージの浸潤がほぼ正常腎と同等レベルまで改善された。さらに、注目すべき点として、破壊されていた近位尿細管がほぼ正常構造へと再生され、腎障害マーカー(尿素窒素およびクレアチニン)も正常値へと回復する顕著な改善が確認された。

老化細胞リプログラミングの分子機構を解明するために、「山中因子」を発現する前後の老化細胞を用いたscRNA-seqを実施した。まず、「山中因子」の発現を検証したところ、ドキシサイクリン依存的な発現上昇が確認された。次に、トランSCRIPTOME解析を行った結果、「山中因子」の発現量に依存して、老化細胞マーカーであるp16の発現が低下することを確認した。さらに、「山中因子」発現前後の老化細胞データを統合し、UMAP解析を実施したところ、老化細胞リプログラミングによって特異的に形成される新規の細胞クラスターが同定された。このクラスターでは、p16を含む老化関連遺伝子群の発現が顕著に低下しており、老化細胞の表現型が大きく変化していることが示唆された。詳細な解析を行った結果、TGF-betaファミリーを含む線維化促進遺伝子群の発現が大幅に抑制されていることが明らかとなった。さらに、これらの線維化促進遺伝子群の発現制御に関与する因子を同定するため、hdWGCNAによるネットワーク解析を行ったところ、これまで老化細胞との関連がほとんど報告されていない候補因子を新たに同定した。

今後、この候補因子が老化細胞の若返りを誘導する分子メカニズムにどのように関与するのかを明らかにすることで、より効果的な老化細胞リプログラミング技術の確立につながる可能性がある。これらの成果は、老化関連疾患の根本的な治療戦略の開発において、極めて重要な知見を提供するものである。

(完)

#### 発表論文

- 1) Nakano Y, Johmura Y. Functional Diversity of Senescent Cells in Driving Aging Phenotypes and Facilitating Tissue Regeneration. *J Biochem.* 2025 Jan 6:mvae098. doi: 10.1093/jb/mvae098.