

生体内の細胞老化の解析から個体老化の分子基盤を理解する

大森 徳貴, 城村 由和, 中西 真

1. はじめに

細胞はDNA損傷, テロメアの短小化, がん遺伝子の活性化, 酸化ストレスなどのさまざまなゲノムストレスを受けると, 細胞老化が誘導されることが知られている。細胞老化によって生じる「老化細胞」の特徴として, 細胞周期停止因子p16^{Ink4a}が発現することで不可逆的な増殖停止を示すことや, SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる炎症性サイトカインなどを分泌する性質を獲得することが知られている。このような老化細胞に特有の性質は*in vitro*の培養システムを用いて解析されてきた。近年, マウスを用いた研究から, 加齢個体から老化細胞を除去するとさまざまな加齢性疾患が改善し健康寿命が延伸されることが示され, 細胞老化は加齢変化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。しかし, 生体内の老化細胞を同定・分離するための適切なツールがなかったため, 生体内の老化細胞がどのような細胞種から誘導されるのか, またそれらの性質は未知であった。そこで筆者らは, 老化細胞のマーカー遺伝子であるp16^{Ink4a}に着目し, 1細胞レベルでp16陽性細胞を可視化可能なマウスモデルを樹立し, 解析を行った¹⁾。本稿では, これまでの生体内の細胞老化研究に用いられてきたマウスモデルを紹介するとともに, 1細胞解析技術を用いた生体内の老化細胞についての最近の知見や今後の展望について概説する。

2. p16^{Ink4a}に着目したマウスモデル

さまざまな手法で老化細胞を可視化するマウスモデルの樹立が試みられてきた。老化細胞のマーカー遺伝子である

p16^{Ink4a}プロモーターを利用した代表的なマウスモデルについて以下のものがあげられる (表1)。

1) p16^{Ink4a}発光モデルマウス

2009年に, 細菌人工染色体 (BAC) を用いてヒトp16^{Ink4a}遺伝子の3番目のエキソン中のストップコドンの直前にLuciferase遺伝子を組み込んだhp16-Lucマウスが初めて生体内の老化細胞を可視化するマウスモデルとして報告された²⁾。その後, 2013年には内在性p16^{Ink4a}遺伝子の1番目のエキソンにLuciferase遺伝子を組み込んだマウスモデルである, mp16-Lucマウスが樹立された³⁾。翌年別のグループから, BACを用いマウスp16^{Ink4a}遺伝子の2番目のエキソンの代わりにLuciferase遺伝子, 赤色蛍光タンパク質mRFP遺伝子, 単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を同時に発現する3MR融合遺伝子を組み込んだマウスモデルである, p16-3MRマウスが樹立された⁴⁾。これらのマウスでは観察時におけるp16陽性細胞を発光シグナルとして検出可能である一方, 1細胞レベルでの解析が困難なため細胞数や臓器・組織内の分布などの重要な情報を得ることが難しく, 一度p16陽性になった細胞がその後どうなるのか, いわゆる「細胞運命動態」に関する解析には適していなかった。

2) p16^{Ink4a}蛍光モデルマウス

次に, 内在性p16^{Ink4a}遺伝子の1番目のエキソン領域に赤色蛍光タンパク質tdTomato遺伝子を組み込んだマウスモデルである, p16-tomマウスが樹立された⁵⁾。このマウスでは1細胞レベルでの検出は可能であったが, *in vivo*ではp16^{Ink4a}を高発現させた特殊な細胞でしかtdTomatoを検出できなく感度は低かった。その後, 内在性p16^{Ink4a}遺伝子の3番目のエキソン領域にCreリコンビナーゼ遺伝子を組み込んだマウスモデルである, p16-Creマウスが樹立され, このマウスとCreリコンビナーゼの活性依存的に細胞が赤色蛍光から緑色蛍光へと標識するR26-mTmGマウスを掛け合わせ, p16-Cre/R26-mTmGマウスが樹立された⁶⁾。このマウスでは組織でのp16陽性細胞を検出できたものの, その割合は想定されていた細胞数よりも非常に少なく, 十分なCreリコンビナーゼの活性が得られず感度が低くなっていると考えられた。また, Creリコンビナーゼは発現すると恒常的に活性を示すため, 一度p16^{Ink4a}の活性が上

東京大学医科学研究所癌防御シグナル分野 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1 4号館2F)

Understanding of the molecular basis for aging by characterizing cellular senescence *in vivo*

Satotaka Omori, Yoshikazu Johmura and Makoto Nakanishi (Division of Cancer Cell Biology, The Institute Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930550

© 2021 公益社団法人日本生化学会

表1 これまでに報告されていた代表的な老化細胞可視化マウスモデル

	種類	場所	時期特異性	組織観察	解像度	
(A) hp16-Luc		発光	外来性	○	△	×
(B) mp16-Luc		発光	内在性	○	○	×
(C) p16-3MR		発光	外来性	○	○	×
(D) p16-tom		蛍光	内在性	○	×	△
(E) p16-Cre		蛍光	内在性	×	○	△

(A) hp16-Lucマウスでは、外在性のヒトの $p16^{Ink4a}$ の3番目のエクソンのストップコドンの直前に Luciferase が組み込まれている。(B) mp16-Lucマウスでは、内在性の $p16^{Ink4a}$ の1番目のエクソン領域に Luciferase が組み込まれている。(C) p16-3MRマウスでは、外在性のマウスの $p16^{Ink4a}$ の2番目のエクソン領域に 3MR が組み込まれている。(D) p16-tomマウスでは、内在性の $p16^{Ink4a}$ の1番目のエクソン領域に tdTomato が組み込まれている。(E) p16-Creマウスでは、内在性の $p16^{Ink4a}$ の3番目のエクソン領域に Cre が組み込まれている。

がった細胞が蛍光標識され続け、標識された細胞がいつ生じたかなどに関する時間的解析には適さないと考えられる。このように、これまでのマウスモデルでは、検出感度の低さと時期特異性が問題であった。

3) p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスモデル

そこで筆者らは、生体内の老化細胞を時期特異的に1細胞レベルで蛍光標識可能なシステムの構築を目指した。時期特異性での標識を可能とするため、タモキシフェン (TAM) により遺伝子の発現調節が可能となる Cre^{ERT2} システムを用いることにした。また、十分な Cre リコンビナーゼ活性を可能にするため、組換え遺伝子の発現量を上昇させると報告されていたネオマイシン遺伝子カセットも同時に組み込むことにした⁵⁾。まず、この Cre^{ERT2} リコンビナーゼ・ネオマイシン遺伝子カセットを内在性の $p16^{Ink4a}$ 遺伝子の1番目のエクソンに組み込み、p16陽性細胞で Cre^{ERT2} が発現するマウスモデルである p16-Cre^{ERT2} マウスを作製した。このマウスと Cre^{ERT2} リコンビナーゼ活性依存的に tdTomato を発現する Rosa26-CAG-lsl-tdTomato マウスを交配し、TAM 依存的に p16 陽性細胞を赤色蛍光で標識可能なマウスモデル (p16-Cre^{ERT2}-tdTomato) を樹立した (図1A)。このマウスの胎仔線維芽細胞に対し DNA 損傷剤ドキシソルビシンによる老化誘導刺激存在下で培地に TAM

を添加したところ、約40%の細胞が tdTomato 陽性となった。さらに、これらの細胞をセルソーターにより tdTomato 陽性と陰性に分取した後に定量PCRとウエスタンブロットを行ったところ、両者とも正常細胞と比べて $p16^{Ink4a}$ の発現が上昇しているが、陽性細胞の方が陰性細胞よりも2倍近く発現が高くなっていた。これらの結果から、p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスでは、老化細胞の中でも $p16^{Ink4a}$ の発現が高い細胞を標識可能なことが明らかとなった。

4) p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスモデルを用いた生体内の老化細胞の動態解析

$p16^{Ink4a}$ 発光モデルマウスなどを用いた研究から、加齢に伴い $p16^{Ink4a}$ の発現が上昇することがわかっており、個体老化に伴う老化細胞の数の増加・蓄積が示唆されていた。しかし、発光系の特性のため、検出された $p16^{Ink4a}$ の発現の上昇が、1細胞あたりの発現量の上昇を示すのか、細胞数の増加に起因するのかわかりは不明であった。そこでまず、7か月齢の p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスに TAM を投与して p16 陽性細胞を標識し切片を作製したところ、脳・心臓・肺・肝臓・腎臓・小腸・大腸・皮膚といったさまざまな臓器・組織にて p16 陽性細胞が確認された。次に、2か月齢と12か月齢のマウスから採取した肺・肝臓・腎臓・皮膚に対してフローサイトメトリー解析を行ったところ、p16

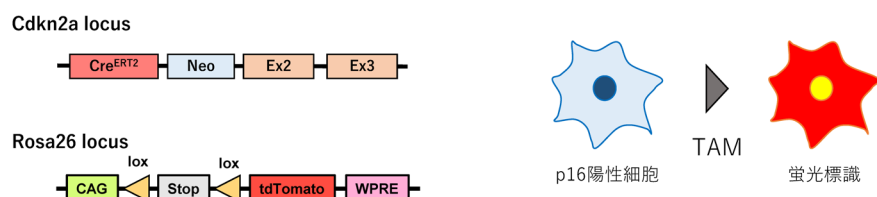
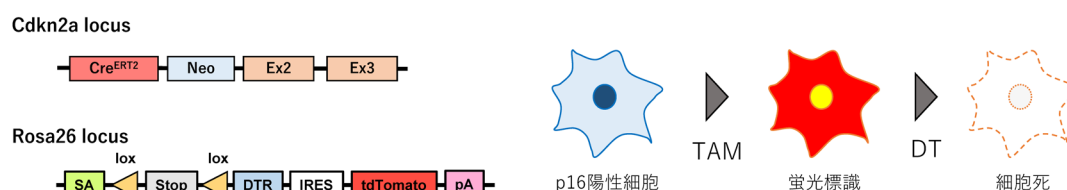
(A) p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウス**(B) p16-Cre^{ERT2}-DTR-tdTomato マウス**

図1 筆者らが樹立した一細胞レベルで老化細胞を解析可能なマウスモデル

(A) p16-Cre^{ERT2}-tdTomatoマウスでは、p16陽性細胞内で発現したCre^{ERT2}がタモキシフェン（TAM）投与により核内に移行する。その結果、Rosa26にあるlox配列に挟まれたSTOP配列はCre^{ERT2}による組換えで除かれtdTomatoが発現し、p16陽性細胞は赤色蛍光でラベルされる。(B) p16-Cre^{ERT2}-DTR-tdTomatoマウスでも(A)と同様のシステムでp16陽性細胞はtdTomatoでラベルされる。ラベルされた細胞は、ジフテリア毒素（DT）を投与されるとtdTomatoとともに発現している受容体（DTR）と結合し、細胞死が誘導される。Neo：ネオマイシン耐性遺伝子、CAG：CAGプロモーター、WPRE：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント、SA：スプライスアクセプター部位、IRES：内部リボソーム導入部位、pA：ポリAシグナル。

陽性細胞の数が加齢に伴い増加することがわかった。さらに、3か月齢のマウスにTAMを投与した後に、3・6か月後の臓器・組織内のp16陽性細胞のクラスター形成の割合や数の変化を解析した。その結果、老化細胞の最も重要な性質の一つである不可逆的な増殖停止機能を示唆するように、少なくとも解析した時間内においてはp16陽性細胞のクラスター形成の増加は認められなかった。また、細胞数の変化から推測される半減期は肝臓では2.6か月、腎臓では2.9か月、肺では4.2か月であることが明らかとなった。

3. 加齢に伴う網羅的遺伝子発現解析と老化細胞の1細胞解析

加齢変化に伴うさまざまな臓器・組織における遺伝子発現の変化をとらえることを目的として、大規模なマウスアトラスの作製が試みられてきた。特に、さまざまな月齢のマウスに対してのバルクRNA-seq解析⁷⁾とシングルセルRNA-seq解析⁸⁾が行われた。

1) バルクRNA-seq解析

バルクRNA-seqは17種類の組織に対して行われた。その結果、加齢に伴い遺伝子発現パターンが変化しない組織（骨、骨髄、脾臓）があることが明らかとなった。その他の組織では遺伝子発現パターンの変動がみられ、特に脾

臓、小腸、胃において大きく変動していることがわかった。また、加齢に伴い変化する遺伝子群は、組織間で類似した発現を示しており、変動開始時期とその振れ幅が異なるだけであった。これらのことから、組織における加齢変化は同じようなメカニズムで起きることが推察されている。

2) シングルセルRNA-seq解析

シングルセルRNA-seq解析は23種類の組織に対して行われた。加齢に伴う変化を解析したところ、p16^{Ink4a}をコードする遺伝子であるCdkn2aが陽性である細胞数が増加しCdkn2aの発現レベルも上昇することが明らかとなった。この結果はこれまで行われてきたp16陽性細胞可視化マウスモデルからの知見を支持するものである。興味深いことに、Cdkn2a陽性細胞数やCdkn2aの発現レベルは3か月から18か月までは上昇しているものの、18か月齢以降はほぼ同じであった。しかしこの解析では、Cdkn2aがコードしているp16^{Ink4a}とp19^{Arf}を区別できていない。また、Cdkn2a陽性細胞が少ないためさまざまな組織のデータを混ぜて解析しており、どの臓器・組織内のどの細胞種でCdkn2a陽性細胞が増加しているのかなど、その性質を明らかにできていない。

3) p16陽性細胞におけるシングルセルRNA-seq解析

筆者らはp16-Cre^{ERT2}-tdTomatoマウスを用い、肝臓と腎臓からp16陽性細胞を単離し、シングルセルRNA-seq解析を行った。その結果、ほぼすべての細胞種においてp16陽性細胞が検出された。肝臓においては、特に肝類洞内皮細胞 (LSECs) において多く認められた。一方、クッパー細胞ではp16陽性細胞が多く存在する細胞集団はクッパー細胞とLSECsの両者の性質を持っていることが明らかになった。これは、p16陽性になることにより細胞のアイデンティティが変化していることが推察される。また、コリン欠乏高脂肪食を用いた長期間飼育により非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を誘導した肝臓において、p16陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現変化の違いを解析したところ、免疫細胞であるクッパー細胞やマクロファージにおいて、ストレス性転写制御因子AP-1や炎症性サイトカイン制御因子であるNF-kappaB経路の遺伝子の発現上昇が認められた。腎臓においてp16陽性細胞は近位尿管上皮細胞と遠位尿管細胞に多く認められた。特に、近位尿管上皮細胞においては、p16陽性細胞において個体老化との関連も指摘されているmTOR経路の遺伝子群やERストレス関連遺伝子の発現上昇が認められることが明らかになった。一方、p16陽性の遠位尿管上皮細胞においては、SASPや腎障害に関わる遺伝子の発現変化が大きく変化していた。これらの結果から、生体内の老化細胞は多様な細胞から誘導され、細胞種ごとにさまざまな機能変化・性質が認められることが示唆された。

4. 老化細胞の除去

老化細胞は糖尿病や動脈硬化症などのさまざまな加齢関連疾病に関与していることが明らかになりつつあり、そのため老化細胞の除去技術の開発に注目が集まっている。しかし、老化細胞との関与が疑われているものの、実際に老化細胞を除去したときの効果がわかっていない疾患も多く存在する。

1) NASHにおける除去効果

筆者らは、p16-Cre^{ERT2}マウスとCre^{ERT2}リコンビナーゼ活性依存的にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現するRosa26-SA-lsl-DTR-IRES-tdTomatoマウスを交配し、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-Cre^{ERT2}-DTR-tdTomato) を樹立した (図1B)。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病態を誘導し、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。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。

2) 老化細胞の除去法

老化細胞の除去薬の開発は現在行われつつある。最初に老化細胞除去薬として報告されたダサチニブ+ケルセチンの投与は複数の疾患に対して治験段階まで進んでおり、現在フェーズ2段階である。しかし現状ではその他の低分子化合物の除去薬の開発はうまくいっていない。アメリカのUnity社が開発した薬剤UBX0101⁹⁾ はフェーズ2で失敗した。この会社は新たな薬剤としてUBX1967を開発し、網膜症への治療薬としてその効果を検証している¹⁰⁾。低分子化合物以外の手法も数多く取り組まれており、2017年に開発されたFOXO4-DRIペプチドもその一例である¹¹⁾。さらに、がん治療として注目を集めているCAR-T細胞を用いた除去法を応用した手法も開発されている¹²⁾。最近になって、筆者らの研究グループは、老化細胞ではリソソーム膜の損傷に伴う細胞内アシドーシスが誘導されており、それを緩衝するためにグルタミン代謝が亢進していることを見いだした。さらに、グルタミン代謝の主要な酵素GLS1の阻害剤BPTESの投与は*in vitro*で老化細胞を選択的に死滅させられることや、老齢マウスや高脂肪食負荷したApoEノックアウトマウスへBPTESを投与すると、加齢に伴うさまざまな機能低下や動脈硬化症の症状が改善されることを見いだしている¹³⁾。

5. おわりに

p16-Cre^{ERT2}-tdTomatoマウスモデルが樹立され、これまでに未知であった生体内の老化細胞の性質などが明らかになりつつあり、研究は今後加速していくであろう。これまで老化細胞のマーカーとしてp16^{Ink4a}が用いられてきたが、筆者らのマウスモデルを用いることで、老化細胞固有の膜表面マーカーなどといった新しいマーカーが見つかることが期待される。前節でもふれたが、さまざまな手法により老化細胞の除去は試みられてきているが、特異性に問題があり、正常な細胞にも影響を与えてしまうオフターゲット問題が生じた。新しいマーカーが発見されれば、老化細胞の除去をより効率的に、安全に行うことが可能になり、間違いなくブレイクスルーとなるだろう。老化細胞が駆逐される世界はもうすぐそこなのかもしれない。

謝辞

本稿で紹介した研究は、中西真教授・城村由和助教 (東京大学医科学研究所癌防御シグナル分野) の指導下で行いました。また、本研究を遂行するのにあたり多大なご協力

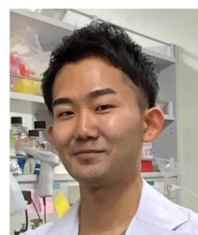
いただきました。癌防御シグナル分野や他の研究室に所属する多くの共同研究者の方々に感謝致します。

文 献

- Omori, S., Wang, T.W., Johmura, Y., Kanai, T., Nakano, Y., Kido, T., Susaki, E.A., Nakajima, T., Shichino, S., Ueha, S., et al. (2020) Generation of a p16 reporter mouse and its use to characterize and target p16high cells in vivo. *Cell Metab.*, **32**, 814–828.
- Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., et al. (2009) Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.*, **186**, 393–407.
- Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H., & Sharpless, N.E. (2013) Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(Ink4a)-luciferase model. *Cell*, **152**, 340–351.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E., et al. (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell*, **31**, 722–733.
- Liu, J.Y., Souroullas, G.P., Diekman, B.O., Krishnamurthy, J., Hall, B.M., Sorrentino, J.A., Parker, J.S., Sessions, G.A., Gudkov, A.V., & Sharpless, N.E. (2019) Cells exhibiting strong p16INK4a promoter activation in vivo display features of senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2603–2611.
- Grosse, L., Wagner, N., Emelyanov, A., Molina, C., Lacas-Gervais, S., Wagner, K.D., & Bulavin, D.V. (2020) Defined p16High senescent cell types are indispensable for mouse healthspan. *Cell Metab.*, **32**, 87–99.
- Schaum, N., Lehallier, B., Hahn, O., Pálovics, R., Hosseinzadeh, S., Lee, S.E., Sit, R., Lee, D.P., Losada, P.M., Zardeneta, M.E., et al.; Tabula Muris Consortium (2020) Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature*, **583**, 596–602.
- Tabula Muris Consortium (2020) A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature*, **583**, 590–595.
- Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017) Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.*, **23**, 775–781.
- Crespo-Garcia, S., Tsuruda, P.R., Dejda, A., Ryan, R.D., Fournier, F., Chaney, S.Y., Pilon, F., Dogan, T., Cagnone, G., Patel, P., et al. (2021) Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition. *Cell Metab.*, **33**, 1–15.
- Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017) Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*, **169**, 132–147.
- Amor, C., Feucht, J., Leibold, J., Ho, Y.J., Zhu, C., Alonso-Curbelo, D., Mansilla-Soto, J., Boyer, J.A., Li, X., Giavridis, T., et al. (2020) Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature*, **583**, 127–132.
- Johmura, Y., Yamanaka, T., Omori, S., Wang, T.W., Sugiura, Y., Matsumoto, M., Suzuki, N., Kumamoto, S., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., et al. (2021) Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science*, **371**, 265–270.

著者寸描

●大森 徳貴 (おおもり さとたか)



東京大学理学系研究科生物科学専攻博士課程2年。

■略歴 2018年東京大学理学部卒業。20年同大学院理学研究科生物科学専攻修了。同年より博士課程進学。現在博士2年。

■研究テーマと抱負 生体内における老化細胞の性質を明らかにすることを目的に研究しています。将来的には老化細胞

除去薬 (Senolytic drug) の開発や、老化細胞を生じさせなくする予防法を確立して、若いなき世界を実現したいと思っています。