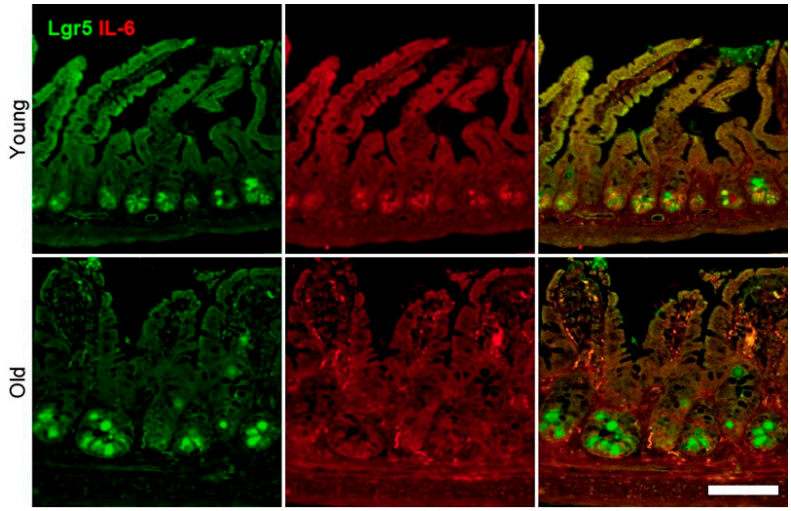
125　生体恒常性の維持・回復法の創出	金田　勇人

【目的】独自に見い出した microRNA によるコンピテンシーの制御の観点から、幹細胞老化に共通する根幹的なメカニズムを解明し、組織恒常性の破綻および個体老化プロセスの分子機構を明らかにすることで生体恒常性の維持・回復法の創出を目指す。

【方法】若齢（3 ヶ月齢）および老齢（24 ヶ月齢以上）マウスから間葉系幹細胞（MSC）や造血幹細胞（HSC）を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った後、実際に老化にともなう機能障害に関与する microRNA（miRNA）をスクリーニングしてメカニズムを明らかにする。そこで得られた知見を基にコンディショナルノックアウトマウスを作製し、人為的に幹細胞老化を誘導して組織恒常性の破綻・個体老化への影響を調べる。

【結果】主に MSCs を用いて機能解析を行った結果、miR-17 だけでなく広範な miRNA の発現が低下しており、DNA 損傷応答（DDR）にともなう miRNA の誘導も喪失していた。これにより DDR 能の喪失が起こり、DNA 損傷が蓄積することが幹細胞老化の根幹的なメカニズムだと示唆された。また、DDR 能に必須な miRNA の同定にも成功した。実際に生体内における DDR 能の喪失を、老齢マウスの腸管上皮幹細胞（ISC）で確認した。また、幹細胞老化に重要だと明らかになった miR-17 ファミリーを ISC でノックアウトすると、老齢時と同様にオルガノイド形成能の低下や炎症の誘導が確認された。

腸管上皮幹細胞の老化にともなう DNA 損傷応答能の低下



125. 生体恒常性の維持・回復法の創出

金田　勇人

滋賀医科大学 解剖学講座

Key words：幹細胞，老化，組織恒常性，microRNA，再生

緒　言

老化に伴い様々な炎症性分泌因子を放出するようになるSenescence-associated secretory phenotype（SASP）は、細胞老化と組織・個体老化をつなぐ分子機構として注目されつつある。血中のSASP因子の増加により、神経新生や筋再生能の低下が誘導され、組織レベルの恒常性破綻の一因となることが示された。さらに、細胞老化マーカーとして知られる $p16^{Ink4a}$ を発現する細胞がアポトーシスするマウスでは、様々な加齢性機能障害や表現型が遅延することから、老化した細胞の蓄積による老化促進効果は、個体レベルの老化現象にも影響を与えていることが分かる。一方、組織幹細胞の老化に伴う機能障害も恒常性破綻の重大な原因と考えられる。老化に伴う造血幹細胞（HSC）のリンパ球産生能の低下、骨格筋幹細胞の筋再生能の低下、間葉系幹細胞（MSC）の骨芽細胞分化能の低下など、様々な幹細胞老化が報告されている。また、近年GDF11の投与により骨格筋幹細胞の筋再生能が回復し、心肥大や脳機能低下などの加齢性機能障害を回復できる事も分かってきた。これらは幹細胞老化制御による組織・個体老化の制御の可能性を示している。

我々は、神経幹細胞（NSC）の分化能が発生の進行に伴い変化する分子機構の研究から、miR-17/106依存的なシグナル応答性の制御により、エピジェネティックな変化無しに、低下したNSCのニューロン分化能が回復することを発見した［1，2］。このようなmicroRNA（miRNA）による「コンピテンシーの制御」は細胞機能調節の根幹的なメカニズムの一つだと考え、幹細胞老化の研究に発展させてきた。実際に、様々な組織幹細胞においてmiR-17は加齢に伴い発現が低下しており、その発現制御により老齢マウス由来HSCのリンパ球産生能（未発表）やMSCの骨芽細胞分化能を回復できる事が分かった［3］。また、miR-17は幹細胞のSASPや成長因子の発現にも関与していることが分かってきた。若齢MSCにおいて、miR-17依存的に発現するGdf6は、老化に伴うリンパ球減少、筋再生能低下、神経前駆細胞減少などを回復する再生誘導因子として機能することが明らかとなった。近年老化への関与が報告されている慢性炎症の改善効果も見られ、老化に伴うmiR-17の発現低下は、幹細胞の分化能の異常による細胞供給だけでなく、恒常性維持因子の発現異常による組織および個体スケールの恒常性にも影響している可能性がある［3］。組織幹細胞のmiRNAの発現を調べてみると、老化に伴い広範なmiRNAの発現低下が誘導され（MSCでは若齢時に発現するmiRNAの85%以上が発現低下する）、少なくともNSC、HSC、MSCにおいて、miRNAの発現が低下するにつれて機能障害が誘導される。これらの事から、miRNAの発現異常が生体恒常性の破綻に重要な影響を与えていると考え、幹細胞老化のメカニズム解明・制御による生体恒常性の維持・回復法の創出を目的として本研究を計画した。現在までに、*in vivo*における幹細胞老化に伴う機能障害の検証と、慢性炎症誘導への寄与について新しい知見を得ることができた。

方　法

1. 幹細胞老化に共通するメカニズムの解明と制御

幹細胞老化に重要なmiR-17/106を同定し、複数の幹細胞の機能回復に成功している。このmiR-17/106により制御される、幹細胞老化に共通するメカニズムの解明を試みた。まず、老化したMSCとHSCにおける網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、miR-17/106に限らず広範なmiRNAの発現が低下していた。この中から老化に伴う機能障害に実際に関与しているものを探索・同定し、どのような機能障害の原因になっているのかを明らかにした。

2. 腸の老化が生体恒常性の破綻に与える影響の解明と制御

若齢時の MSC が分泌する GDF6 により、組織恒常性が回復した研究結果から、炎症の改善が生体恒常性維持に重要な可能性が示唆された。しかし、どのようにして慢性炎症が誘導されるのかは分かっていない。個体スケールの老化プロセスの解明には、どの組織の機能障害が重要であるかを明らかにする必要がある。突然変異の発生頻度や老化関連遺伝子の発現上昇が最も高い組織であることから、腸を標的に生体恒常性への影響を調べることにした。腸管上皮幹細胞（ISC）で遺伝子操作が可能な Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスを用いて、幹細胞老化のメカニズム解析から判明した幹細胞老化に重要な miR-17/106 を欠損させ、人為的に幹細胞老化を誘導することで生体恒常性への影響を調べた。網羅的遺伝子発現解析により、老化した ISCs では炎症性因子の発現が誘導されていることを明らかにしているが、miR-17/106 を欠損させても炎症性因子の発現上昇が誘導され、血中濃度が上昇することを明らかにした。また、実際に老化したマウスの ISCs において、一部機能の低下が起こっている事も確認した。

結果および考察

1. 幹細胞老化に共通するメカニズムの解明と制御

（1）幹細胞老化に共通するメカニズムの解明

自身の研究成果により、miR-17 ファミリーが複数の組織幹細胞の老化に大きく影響している事が明らかとなった。そこで、若齢（3 ヶ月齢）および老齢（24 ヶ月齢以上）マウスから MSCs をソーティングし、miRNA microarray により網羅的発現解析を行った。その結果、miR-17 ファミリーだけでなく、広範な miRNA の発現低下が誘導されている事が分かった（図 1）。MSCs ほどではないが、HSCs や NSCs でも同様の現象が誘導されており、幹細胞老化に共通するメカニズムであることが示唆された。また、DNA 損傷により発現が誘導されることが知られている DNA 損傷応答（DDR）miRNA（DDR-miR）の発現を調べてみると、10 Gy の X 線照射（IR）により若いコントロールの MSCs で多数誘導される DDR-miR の発現誘導も見られなくなっていた（図 1）。一方、miRNA だけでなく、mRNA の網羅的発現解析も行い、老化に伴い発現が低下する老化関連遺伝子 X も同定した。興味深いことに、この X を shRNA によりノックダウンすると（shX）、若齢マウス由来の MSCs でも老齢マウス由来のものと同様に DDR-miR の発現低下が誘導された（図 1）。

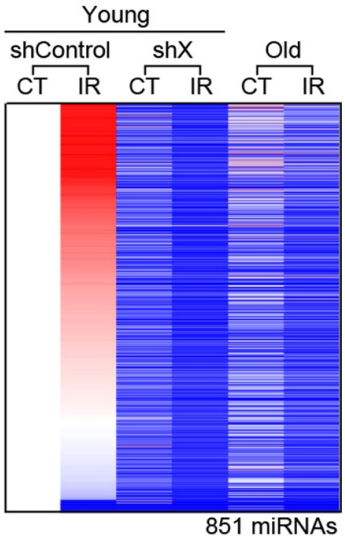


図 1. 間葉系幹細胞における老化および老化関連遺伝子 X のノックダウンによる DDR-miR の発現低下
若齢および老齢マウスから MSCs をソーティング後に培養して増やし、miRNA microarray により網羅的解析を行った。Old および老化関連遺伝子 X をノックダウンした Young MSCs で広範な miRNA の発現低下が誘導された。また、10 Gy の X 線照射（IR）により誘導される DNA 損傷応答 miRNA（DDR-miR）の発現誘導も見られなくなった。

DDR-miR の機能については未解明な部分が多いが、DNA 修復などの DDR に重要だと考えられる。実際に Western blot により DNA 修復時に発現が見られるリン酸化 Chk1（p-Chk1）や DNA 損傷のマーカーである γH2AX を調べてみると、old や shX MSCs では、p-Chk1 の発現が低下し、その代わりに γH2AX が増加していた。つまり、DDR-miR の発現低下により DDR 能が低下し、その結果 DNA 損傷の蓄積が誘導されたと考えられる。DNA 損傷の蓄積は細胞レベルの老化の指標としてだけでなく、その原因としても考えられている。また、組織幹細胞でも DDR 能の喪失が機能障害を誘導することが報告されている［4］。これらのことから、老化に伴い遺伝子 X の発現が低下し、それにより広範な miRNA および DDR-miR の発現誘導が失われ、DDR 能が低下することが幹細胞老化に共通する根幹的なメカニズムではないかと考えられる。

（2）DDR 能に必須な miRNA の探索

DDR-miR の発現低下による DDR 能の喪失が幹細胞老化の重要なメカニズムであることが分かったが、DDR-miR は数が多く、どの miRNA が DDR 能に重要なのかは不明であった。そこで、microarray データから old や shX により発現が誘導されなくなる DDR-miR を抽出し、機能的二次スクリーニングを行った。DDR 能は基本的な細胞機能であるので、MSC ではなく、実験操作が簡便でヒト由来でもある 293T 細胞を用いた。その結果、複数の miRNA が正常な DDR 能に必要で、特に miR-A は CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトにより DDR に伴う 53BP1 の発現誘導の喪失が強く見られた（図 2）。これらの miRNA は正常な DDR 能の維持に必須であり、老化だけでなく、発癌や癌の悪性化にも関与していると考えられる。実際に薬剤耐性に関与している報告があるものもあった。今後、過剰発現によるレスキュー実験を行い、恒常性の回復ができるか確認すると同時に、ガン細胞における機能についても確認していく。

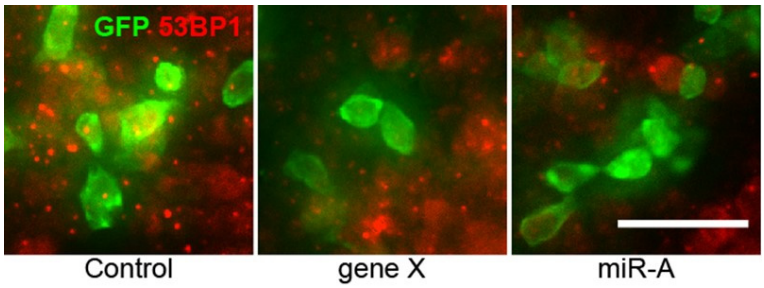


図 2. DNA 損傷応答に必須な miRNA の同定

MSCs の microarray データを基に絞り込みを行い、得られた候補 miRNA を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトしてスクリーニングを行った。293T 細胞に 10 Gy の X 線を照射すると 53BP1 の発現が誘導されるが、ポジティブコントロールの老化関連遺伝子 X や miR-A をノックアウトすると、発現誘導が喪失した。Scale bar: 50 μm。

2. 腸の老化が生体恒常性の破綻に与える影響の解明と制御

細胞レベルの幹細胞老化のメカニズムが明らかになってきたことで、人為的に幹細胞老化を誘導することで組織恒常性への影響を調べることができるようになった。方法で述べたように、個体老化プロセスの解析では腸管上皮幹細胞（ISC）を標的にした。まず、実際に老化したマウス生体内で、ISCs の DDR 能が低下しているかどうか調べた。10 Gy の X 線を照射して、DNA 損傷に応答して発現が誘導される IL-6 を調べたところ、若齢時でのみ確認できた（図 3）。また、通常の培養条件下におけるオルガノイド形成能も著しく低下していた。

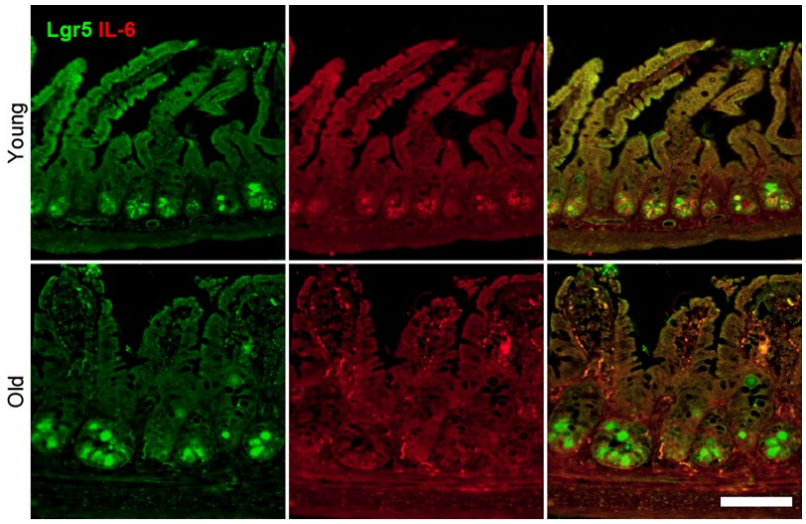


図 3. 腸管上皮幹細胞（ISCs）の老化にともなう DDR 能の低下
若齢および老齢マウスに 10 Gy の X 線を照射し、DNA 損傷に応答した IL-6 の発現誘導を確認した。老化したマウスの回腸では、若齢時には Lgr5 陽性の ISCs で IL-6 の発現が誘導されたが、老化したマウスでは見られなかった。Scale bar: 100 μm。

次に、miR-17 ファミリーをノックアウトした ISCs からオルガノイドを形成したところ、老齢時と同様にオルガノイド形成能が著しく低下していた（図 4）。

また、ノックアウトしてから 3 ヶ月ほどすると、血中の IL-6 を始めとしていくつかの炎症性因子の濃度が上昇し、慢性炎症が誘導されてくることも分かってきた。以上の事から、miRNA による DDR 能の制御は幹細胞および組織・個体スケールの恒常性に重要な役割を担っており、その破綻が老化に寄与していると考えられる。

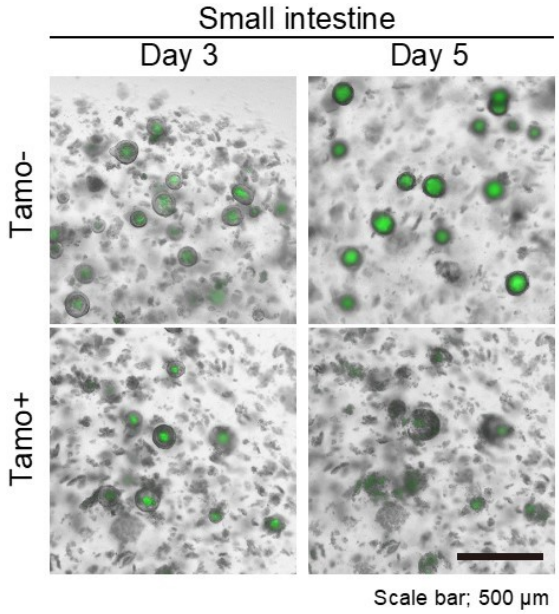


図 4. miR-17 ファミリーのノックアウトによる ISCs のオルガノイド形成能の低下
miR-17 ファミリーをノックアウトしたマウスからオルガノイドを形成すると、老齢時と同様にオルガノイド形成能の著しい低下が認められた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科分子生命情報解析学分野の馬渕洋助教である。

文　献

1） Naka H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H. Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. Nat Neurosci. 2008;11(9):1014-23. Epub 2009/01/23. PubMed PMID: 19160499.

2） Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsuyama J, et al. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(4):1604-9. Epub 2014/01/30. doi: 10.1073/pnas.1315567111 1315567111 [pii]. PubMed PMID: 24474786; PubMed Central PMCID: PMC3910627.

3） Hisamatsu D, Ohno-Oishi M, Nakamura S, Mabuchi Y, Naka-Kaneda H. Growth differentiation factor 6 derived from mesenchymal stem/stromal cells reduces age-related functional deterioration in multiple tissues. Aging (Albany NY). 2016;8(6):1259-75. doi: 10.18632/aging.100982. PubMed PMID: 27311402.

4） Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature. 2007;447(7145):725-9. Epub 2007/06/08. doi: nature05862 [pii] 10.1038/nature05862. PubMed PMID: 17554309.