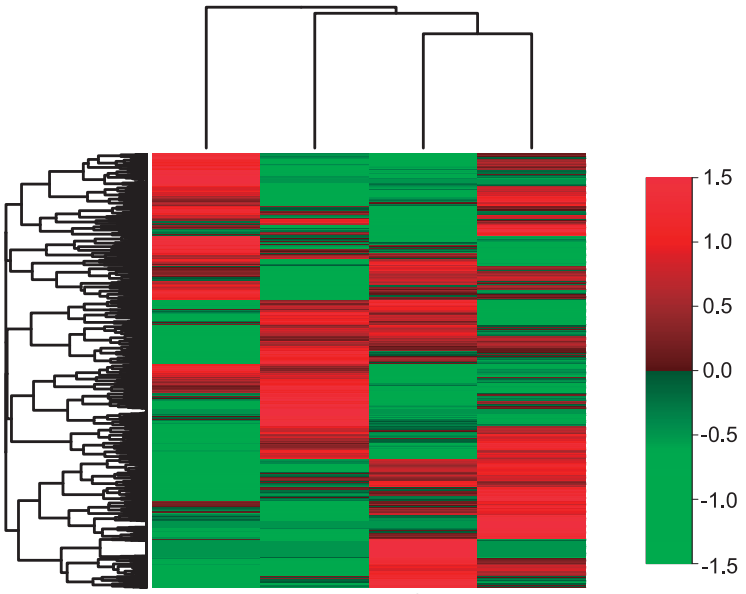
14　異所性のDNAが惹起する老化・疾患の網羅的比較解析	松井　秀彰

【目的】本研究では異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA、そして細胞外から侵入したウイルス DNA のそれぞれのセンサーおよびそれらが惹起する細胞内応答、細胞外応答、個体病理を比較することでそれぞれの特徴を描出する。さらにモデル動物において異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA が惹起する近隣や遠隔への臓器連関、あるいは老化や加齢関連疾患の臓器連関、を *in vivo* で検証する。それらにより現在は明確な区別がなされていない、老化 vs.加齢関連疾患、および異所性の核 DNA vs.異所性のミトコンドリア DNA、それぞれのもたらす特徴的な生体局所の病理と臓器連関を明らかにし、老化や各種疾患への介入シーズの同定につなげる。

【方法】Hela 細胞などの汎用株化細胞および主だったヒト細胞の初代培養細胞などを併用し、各種異所性 DNA に対するセンサーを網羅的に解析した。また各種 DNA 導入法を用いて培養細胞の細胞質に各種異所性 DNA を導入し、それぞれに対して RNA シークエンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。同様の手法を用いて、各種異所性 DNA それぞれの場合に培養上清に分泌されたタンパク質を回収し、DIA プロテオーム解析により分泌形質の種類や量の違いを網羅的に解析することを試みた。

【結果】各種異所性 DNA に対するセンサー候補の網羅的な同定を行った。ここではミトコンドリア DNA に対して実施した結果の一部を提示する。このようにいくつかのセンサー候補分子が同定されたため、ついで各分子が本当にセンサーとして機能しているかどうかを siRNA による遺伝子ノックダウンや KO 細胞の樹立による解析を行った。cGAS KO、IFI16 KO、STING KO 細胞では異所性のミトコンドリア DNA に対する炎症が抑制されることを明らかにした。同様にして精製した各種 DNA を各種細胞に導入し、網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。こちらは現在公表に向けてデータの収集や整理を行っている。細胞外応答の網羅的同定については、まず培養細胞上清を定量的に分析するための様々な条件検討を行った。適切と判断された条件のもと、培養細胞上清を DIA プロテオーム解析に供することで、細胞外分泌タンパクの網羅的な同定に成功した。

異所性の核 DNA に対する細胞外分泌因子の解析結果



14. 異所性の DNA が惹起する老化・疾患の網羅的比較解析

松井　秀彰

新潟大学 脳研究所 脳病態解析分野

Key words：老化，加齢関連疾患，異所性の DNA

緒　言

ウイルスや細菌などの微生物が細胞に感染した場合、その微生物の DNA-RNA を認識し自然免疫反応が惹起されることはよく知られている［1，2］。現在の人類の大きな課題である COVID-19 においても自然免疫反応の差が重症化の鍵となっていると言われている[3]。最近では核の障害などが原因で核 DNA が細胞質に漏出した場合に、cGAS-STING 経路がそれを認識し、炎症反応や細胞老化関連分泌形質（SASP）を惹起し、個体老化につながることが盛んに報告されている［4〜6］。一方でミトコンドリア DNA がミトコンドリア外に漏出した際のセンサーや下流のパスウェイは非常に知見が乏しかった。私たちは様々なパーキンソン病モデルおよび脳研究所に蓄積されたヒトパーキンソン病剖検脳を解析することで、その共通の病態としてミトコンドリア DNA が細胞質に漏出し炎症反応を惹起していることを明らかにした[7, 8]。またパーキンソン病モデルにおいて、この“ミトコンドリアから漏出したミトコンドリア由来の DNA”の分解を促進すると、炎症反応、細胞死、神経変性などが改善することを明らかにするとともに、漏出したミトコンドリア DNA のセンサーとして IFI16 を初めて同定した［7］。

ここで微生物、特にウイルスの DNA、核から漏出した核由来の DNA、ミトコンドリアから漏出したミトコンドリア由来の DNA の大きく分けて 3 つのパターンの異所性の DNA がそれぞれヒト疾患の病態に重要であることがわかってきたことになる。これらの 3 つに共通する機構も当然想定されているが、一方で確実に異なる病態も存在するはずである。例えば核 DNA の漏出は SASP を介して、周囲の細胞や組織にも老化を誘導する可能性が示唆されているが、そのようなことはウイルス感染では報告されていない。また核 DNA の漏出の際のセンサーは何種類か報告があり cGAS が最も報告も多く、高い信頼性を持って再現されている。一方で私たちがミトコンドリア DNA のセンサーを検討し同定した IFI16 は他にはウイルス DNA のセンサーとしての報告はあるが、核 DNA とは反応しにくい。このように 3 つのパターンの異所性の DNA はそれぞれそのセンサー、細胞内応答、SASP を含めた細胞外応答、個体病理、そしてヒトにおける老化や疾患への関与、などの面においてそれぞれ異なることが想定される。

本研究では異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA、そして細胞外から侵入したウイルス DNA のそれぞれのセンサーおよびそれらが惹起する細胞内応答、細胞外応答、個体病理を比較することでそれぞれの特徴を描出する。さらにモデル動物において異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA が惹起する近隣や遠隔への臓器連関、あるいは老化や加齢関連疾患の臓器連関、を *in vivo* で検証する。それらにより現在は明確な区別がなされていない、老化 vs. 加齢関連疾患、および異所性の核 DNA vs.異所性のミトコンドリア DNA、それぞれのもたらす特徴的な生体局所の病理と臓器連関を明らかにし、老化や各種疾患への介入シーズの同定につなげる。

方　法

1. 各種異所性 DNA に対するセンサーの網羅的同定

Hela 細胞などの汎用株化細胞および主だったヒト細胞の初代培養細胞などを併用し、各種異所性 DNA に対するセンサーを網羅的に解析した。特に異所性のミトコンドリア DNA、異所性の核 DNA、ウイルス DNA 侵入に対するセンサーおよびその結合親和性を比較することにより、異所性のミトコンドリア DNA、異所性の核 DNA、ウイルス DNA

侵入、それぞれを特徴づける異所性 DNA-センサー反応を解析した。

2. 各種異所性 DNA に対する細胞内応答の網羅的時系列追跡

低侵襲マイクロインジェクターあるいは各種 DNA 導入法を用いて培養細胞の細胞質にミトコンドリア DNA、核 DNA またはウイルス DNA を導入した。それぞれに対して RNA シークエンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を、時系列を追って実施した。このような低侵襲 DNA 導入と、siRNA 実験やウイルス感染実験を並行して実施することで、異所性のミトコンドリア DNA-異所性の核 DNA-ウイルス DNA 侵入、それぞれを特徴づける細胞内応答を抽出しようと試みた。

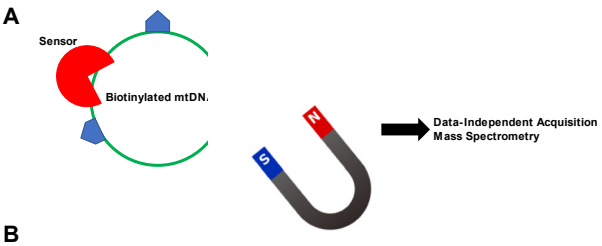
3. 各種異所性 DNA が惹起する細胞外応答の網羅的同定

項目 2 と同様の手法を用いて、異所性のミトコンドリア DNA - 異所性の核 DNA - ウイルス DNA 侵入、それぞれの場合に培養上清に分泌されたタンパク質を回収し、DIA プロテオーム解析により分泌形質の種類や量の違いを網羅的に解析することを試みた。

結　果

1. 各種異所性 DNA に対するセンサーの網羅的同定

異所性の DNA に対するセンサーを同定するために、まず各種 DNA、ミトコンドリア DNA、核 DNA、ウイルス DNA を精製し、そしてその DNA に対してビオチンを生化学的に付加した。それを各種培養細胞の細胞質画分に混合し、ビオチン-アビジンプルダウンを行い、その産物を DIA プロテオーム解析に供することで、センサー候補の網羅的な同定を行った。ここではミトコンドリア DNA に対して実施した結果の一部を提示する（図 1）。このようにいくつかのセンサー候補分子が同定されたため、ついで各分子が本当にセンサーとして機能しているかどうかを siRNA による遺伝子ノックダウンや KO 細胞の樹立による解析を行った。cGAS KO、IFI16 KO、STING KO 細胞では異所性のミトコンドリア DNA に対する炎症が抑制されることを明らかにしたが、引き続き他のセンサー候補に関しても siRNA 実験及び KO 細胞の樹立による解析を進めている。



Gene name	Molecular Weight	Identified Peptide Count	Protein Group Score	Control	mtDNA	Ratio
[redacted]		10	0.99183542	0.0.E+00	9.9.E+06	Infinity
		8	0.989726	0.0.E+00	6.2.E+06	Infinity
		5	0.99193292	0.0.E+00	4.7.E+06	Infinity
		5	0.988425	0.0.E+00	1.3.E+06	Infinity
		2	0.9846954	0.0.E+00	1.8.E+05	Infinity
CGAS	59 kDa	7	0.9858467	1.0.E+04	1.3.E+07	1249.343011
[redacted]		2	0.99126342	8.8.E+03	3.0.E+06	344.1109731
		10	0.99211032	5.6.E+04	1.4.E+07	251.3843958
		6	0.99113905	8.8.E+04	1.2.E+07	136.4993456
		17	0.99302004	6.8.E+05	7.9.E+07	116.3404129
		16	0.99229792	1.7.E+06	1.4.E+08	86.77537107
		7	0.99219811	1.0.E+06	8.7.E+07	84.07731631
IFI16	88 kDa	13	0.99206155	4.3.E+05	2.2.E+07	50.47843146
[redacted]		9	0.9884366	1.6.E+05	7.6.E+06	47.94156908
		8	0.9889278	4.7.E+05	1.9.E+07	39.38374169
		11	0.99269678	1.1.E+06	3.6.E+07	31.33415813

図 1. 異所性のミトコンドリア DNA に対するセンサー候補の網羅的検索

a) 実験の模式図。ビオチンを付加したミトコンドリア DNA を培養細胞の細胞質画分に導入し、ビオチン-アビジンプルダウンを実施、その後プルダウン産物について DIA プロテオーム解析を実施した。

b) 同定されたタンパク質の一部を表形式で記載。未発表データのため、分子名は大半を非公開とした。

2.　各種異所性 DNA に対する細胞内応答の網羅的時系列追跡

同様にして精製した各種DNAをHela細胞に低侵襲マイクロインジェクターあるいはリポフェクションで導入した。並行して各種 KO 細胞にも導入することで、各種センサーによって惹起される炎症反応などの差異の同定も行った。こちらも現在公表に向けてデータの収集や整理を行っている。

3.　各種異所性 DNA が惹起する細胞外応答の網羅的同定

まず培養細胞上清を定量的に分析するための様々な条件検討を行った。適切と判断された条件のもと、培養細胞上清を DIA プロテオーム解析に供することで、細胞外分泌タンパクの網羅的な同定を行った。感度特異度のバランスもあるが、概ね2,000を超えるタンパク質の定量的な同定が可能であった。ここでは異所性の核 DNA に対して実施した結果の一部を提示する（図2）。

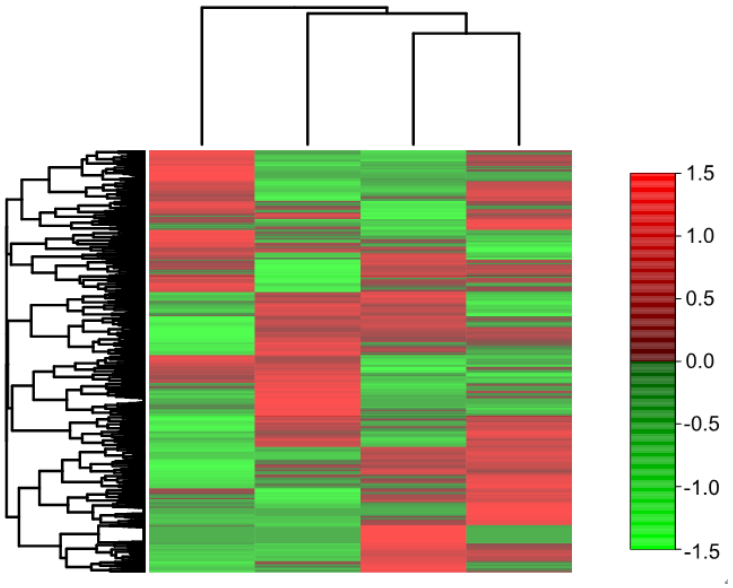


図 2.　異所性の核 DNA による細胞外分泌タンパクの網羅的検索
同定されたタンパクのヒートマップ解析。分子名や細胞の具体的な種類は、未発表データのため非公開とした。

考　察

異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA、そして細胞外から侵入したウイルス DNA、これらは自然免疫応答を惹起し、様々な疾患や老化につながる。異所性ミトコンドリア DNA による細胞内外の応答［7］、異所性の核 DNA による細胞内外の応答、そして、従来より知られている細胞外から侵入したウイルス DNA に対する自然免疫反応、これらの惹起する疾患病態や老化は当然異なるはずである。それらを一つひとつ別々に解析するのではなく、同じプラットホームで詳細な比較検証を行うことにより、それぞれの病態をより詳らかにし、特異的な介入シーズを発掘する。特に本研究では網羅解析を中心としており、各種 DNA に対するセンサー、各種センサーの下流の反応、その結果の SASP などの細胞外応答、これらの結びつきのネットワークを数理解析・データベース化する予定である。なおパーキンソン病における異所性のミトコンドリア DNA 病態の上流にあるαシヌクレインの異常について最近論文報告した［9］。

脳においてはパーキンソン病こそが異所性のミトコンドリア DNA による疾患と考えているが、類似の現象は肝臓の非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）や心臓における加齢性の心不全でもおきている可能性がある。全身では異所性の核 DNA が老化を惹起する。本研究は主に培養細胞やゼブラフィッシュを用いているが、新潟大学および脳研究所には様々な疾患モデルマウスや剖検例が蓄積されており、得られた結果を即座にヒトにおける検証に持っていくプラット

フォームが確立されている。それらを利用し、様々な加齢関連疾患の相互同士、あるいはそれらと全身老化を本質的に切り分けることで、それぞれの病態の理解に繋がり、健康寿命の延伸に寄与する。さらに老化や加齢関連疾患の臓器連関を時空間的に明らかにすることで、全身あるいは臓器間でおこる悪循環の理解とそれを止める新たな手法の開発に繋げていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学脳研究所脳病態解析分野研究室の菱田竜一准教授、山中智行准教授、大塚尭慶助教、酒井晶子助教、Godfried Dougnon 助教である。

文　献

1) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000 Dec 7;408(6813):740-5. PMID: 11130078 DOI: 10.1038/35047123

2) Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. Immunity. 2013 May 23;38(5):870-80. PMID: 23706668 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.004

3) Li M, Ferretti M, Ying B, Descamps H, Lee E, Dittmar M, Lee JS, Whig K, Kamalia B, Dohnalová L, Uhr G, Zarkoob H, Chen YC, Ramage H, Ferrer M, Lynch K, Schultz DC, Thaiss CA, Diamond MS, Cherry S. Pharmacological activation of STING blocks SARS-CoV-2 infection. Sci Immunol. 2021 May 18;6(59):eabi9007. PMID: 34010142 DOI: 10.1126/sciimmunol.abi9007

4) Glück S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang TW, Schmacke NA, Bridgeman A, Rehwinkel J, Zender L, Ablasser A. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. Nat Cell Biol. 2017 Sep;19(9):1061-1070. PMID: 28759028 DOI: 10.1038/ncb3586 Epub 2017 Jul 31.

5) Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangensteen KJ, Simithy J, Lan Y, Lin Y, Zhou Z, Capell BC, Xu C, Xu M, Kieckhaefer JE, Jiang T, Shoshkes-Carmel M, Tanim KMAA, Barber GN, Seykora JT, Millar SE, Kaestner KH, Garcia BA, Adams PD, Berger SL. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. Nature. 2017 Oct 19;550(7676):402-406. PMID: 28976970 DOI: 10.1038/nature24050. Epub 2017 Oct 4.

6) Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. Nat Commun. 2018 Oct 8;9(1):4109. PMID: 30294002 DOI: 10.1038/s41467-018-06613-3

7) Matsui H, Ito J, Matsui N, Uechi T, Onodera O, Kakita A. Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease. Nat Commun. 2021 May 25;12(1):3101. PMID: 34035300 DOI: 10.1038/s41467-021-23452-x

8) Matsui H, Kenmochi N, Namikawa K. Age- and α-Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish Nothobranchius furzeri. Cell Rep. 2019 Feb 12;26(7):1727-1733.e6. PMID: 30759385 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.015

9) Matsui H, Ito S, Matsui H, Ito J, Gabdulkhaev R, Hirose M, Yamanaka T, Koyama A, Kato T, Tanaka M, Uemura N, Matsui N, Hirokawa S, Yoshihama M, Shimozawa A, Kubo S, Iwasaki K, Hasegawa M, Takahashi R, Hirai K, Kakita A, Onodera O. Phosphorylation of α-Synuclein at T64 Results in Distinct Oligomers and Exerts Toxicity in models of Parkinson's Disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Jun 6;120(23):e2214652120. PMID: 37252975 DOI: 10.1073/pnas.2214652120