217　腎特異的エンハンサーアトラスに基づく発生機序解明	笠原　朋子

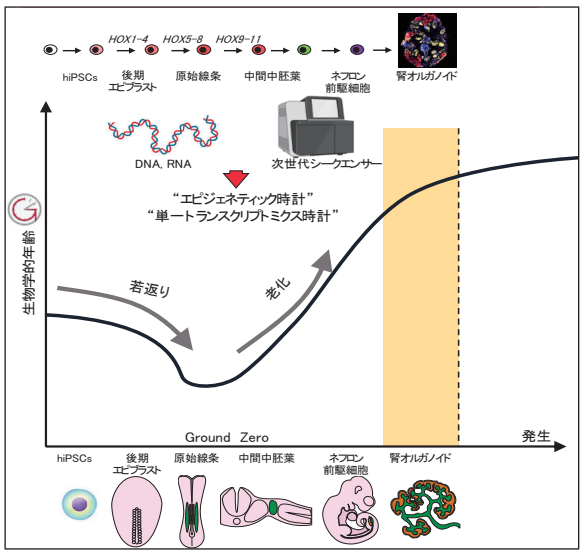
【目的】近年の技術の進歩により、老化や発生生物学の分野でも機械学習の可能性が引き出されている。今日、老化指標の一つとして加齢時計が提唱された。加齢時計とは、年齢とともに変化するメチル化プロファイルやトランスクリプトームプロファイルに基づき、数学的に導き出された年齢推定法である。特に最近の研究では、初期胚の発生過程における生物学的老化のダイナミクスを追跡し、生物学的年齢が最も低くなるポイント「グランドゼロ」を指摘している。

腎臓の発生は後期エピブラストの細胞が原始線条に移動し、原腸陥入を経て中間中胚葉が形成される。中間中胚葉から尿管芽とネフロン前駆細胞が派生し、後腎（のちの腎臓）をつくる。これまで著者はヒト iPS 細胞から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞へと単層にて高効率に分化誘導する方法を開発した。この誘導法は世界に先駆けてヒト腎の発生過程を初期から忠実に再現した。著者はヒトの iPS 細胞から胚性腎臓の発生を模倣した分化培養系を用いて、ヒトの胚発生過程における生物学的加齢動態を明らかにした。

【方法】ヒト iPS 細胞の分化誘導系に加齢時計を適用し、腎の各発生段階のサンプルを分析した。

【結果】DNA メチル化解析と RNA-seq 解析を行い様々な加齢時計を適用した結果、発生初期の中間中胚葉期で生物学的年齢が最も低くなることが観察され、腎臓の発生における若返りの可能性が示唆された。また主成分分析により、発生過程は加齢と異なる意味を持つ 2 つの過程から構成されている可能性が初めて示唆された。PC1 は発生とともに単調に増加し、PC2 は原始線条期で増加し中胚葉期以降で減少することが明らかになった。さらに興味深いことに、PC1 は初期化のシグネチャーと正の相関を示し、PC2 は負の相関を示した。このことは、PC1 が主に加齢関連遺伝子、PC2 が初期化関連遺伝子である可能性を示している。老化の関連経路の中には、原始線条の段階で活性化され、その後抑制されるものがある。したがって、それらの経路は老化後の若返りを促進する。以上のことから、本研究ではハーバード大学との共同研究にて確立したトランスクリプトミクス時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いて、ヒト腎の老化の始まりを評価した。その結果、中間中胚葉前後にて生物学的年齢が最小となる「グランドゼロ」が存在することが明らかになった。さらに腎臓の老化におけるエピジェネティック・トランスクリプトミクスな変化に関連する化合物の探索を行うとともに、機械学習を用いた加齢時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いてヒト腎の発生初期から評価している。本研究はヒト腎の老化の始まりのタイミングを明らかにし、それらの細胞運命を変化させる抗老化薬の開発を行い、慢性腎臓病の新規治療開発に繋がる。

本研究の概要



217. 腎特異的エンハンサーアトラスに基づく発生機序解明

笠原　朋子

*京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点

Key words：腎臓，発生，老化，ヒト iPS 細胞，トランスクリプトーム

緒　言

1. 腎臓はいつから老化するのか

老化はすべての生物に共通した生命現象であり多くの疾患や病態の発生と関わっている。腎臓の老化は慢性腎臓病（CKD）のリスクを高める。しかし腎臓の老化メカニズムならびにその指標については繊維化や三次リンパ節の変化以外ほとんど分かっていなかった。またヒトの各臓器の中では腎臓が老化しやすく生物学的寿命を決定すると考えられているが、ヒト腎の老化がいつから始まるのかは解明されていない。

腎臓の発生は後期エピブラストの細胞が原始線条に移動し、原腸陥入を経て中間中胚葉が形成される。中間中胚葉から尿管芽とネフロン前駆細胞が派生し、後腎（のちの腎臓）をつくる。

これまで著者はヒト iPS 細胞（前期エピブラストに相当）から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞へと単層にて高効率に分化誘導する方法を開発した。原始線条において頭尾軸に沿った器官の特徴を決定する HOX 遺伝子を順に発現させ、原腸陥入によって中間中胚葉、ネフロン前駆細胞を作製することで、生体内のものと同様の性質をもつ腎オルガノイドの作製に成功した。この誘導法は世界に先駆けてヒト腎の発生過程を初期から忠実に再現した［1］。

2. 加齢時計による生物学的年齢の予測

老化は個人・臓器間で異なり同じ年齢でも老化が進んでいるヒトもそうでないヒトもいて指標が必要とされていた。その老化指標の一つとしてエピジェネティック時計が提唱された［2］。エピジェネティック時計とは、ゲノム上の特定の CpG において年齢とともに変化するメチル化値の組み合わせに基づき、数学的に導き出された年齢推定法である。

これまで生殖細胞は老化しないとされてきたが、エピジェネティク時計の開発により近年精子細胞が老化し受精後の子孫にて若返る可能性が提唱され、マウス胚発生の初期段階に生物学的年齢が最も低くなる時期が存在することが明らかになった。またマウスにおいて若返りは着床後の発生段階の原腸陥入で起こり、その段階が生物の老化の始まりであることが明らかになった［3］。

腎臓においても全血中の DNA で推定されたエピジェネティック時計は eGFR、微量アルブミン尿および尿酸と関連していることが報告されている。

これまで著者らはマウス腎臓においてこのエピジェネティック時計を抑制する化合物を開発した（PCT/JP2022/30040）。この薬剤を用い肝臓と腎臓のエピジェネティック時計を比較すると 20 週からすでに腎臓は肝臓より時計が進んでいるが 101 週時点では同程度になる。また幼弱では変化がでるが老齢になってから介入してもエピジェネティック時計を遅らせることはできない。

そこで本研究では腎臓の老化におけるエピジェネティックな変化、特に DNA メチル化に関連する化合物の探索を行うとともに、機械学習を用いたエピジェネティック時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いてヒト腎の発生初期から老化の観点から評価する。本研究はヒト腎の老化の始まりのタイミングを明らかにし、それらの細胞運命を変化させる抗老化薬の開発を行い、慢性腎臓病の新規治療を開発することを目的とする。

*現在の所属：東北大学 大学院医学系研究科 病態液性制御学分野

方法および結果

1. ヒト腎発生段階におけるエンハンサーの同定

遺伝子の発現は、遺伝子の遠位にある「エンハンサー」により、極めて特異的かつダイナミックに制御されている［4］。エンハンサーは非コーディング領域に存在し、プロモーターの転写を遠位から強力に増強する。エンハンサーとプロモーターの位置はそれぞれが生み出す RNA を検出することにより網羅的に同定できるが、エンハンサーRNA（eRNA）は転写後に迅速に分解されるため同定が非常に困難であった。著者は、単一核 RNA-seq（single-nuclei RNA-seq : snRNA-seq）を用いて、エンハンサーとプロモーターを超高感度に同定できる独自手法を開発した（Kasahara et al. 投稿準備中）。本手法により、核内にて転写中の RNA の 5'端キャップ構造を捉え、次世代シークエンサーを用いて転写開始点を 1 塩基の高解像度にて定量的に網羅できる。そこでヒト iPS 細胞 1231A3 株（健常者由来 iPS 細胞、山中伸弥教授樹立株）から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドのサンプルを作製し、単一核 RNA-seq を行い、各発生段階特異的なエンハンサーを同定した。

2. ヒト腎系譜での iPS 細胞分化における加齢時計の測定

ヒト腎の転写ネットワークの変化がどのように関与するか未だ不明な点が多くあった。そこでヒト iPS 細胞 201B7 株（健常者由来 iPS 細胞、山中伸弥教授樹立株）から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドのサンプルを作製し、腎系譜でのエピジェネティック時計およびトランスクリプトーム時計の測定と薬剤の効果を検討した。

まず、ヒト iPS 細胞から腎臓系譜へ誘導し各発生段階の DNA を抽出し Illumina Methylation EPIC BeadChip を用いてゲノム全体の 85 万箇所のメチル化部位を定量的に解析した。即ち SeSAMe R パッケージを用いて正規化しベータ値を計算する。次に各サンプルの DNA メチル化レベルの確率密度分布を 30 ビンに離散化し計算し、後に scipy.stats.entropy Python 3.9 パッケージを使用してシャノンエントロピーを計算した。遺伝子アノテーションには、Human Genome Reference Consortium GRChg38 を使用した。得られたデータを様々なエピジェネティック時計（http://gladyshevlab.org:3838/SudoClock/）に代入して生物学的年齢を測定した。このエピジェネティック時計は、発生初期の若い年齢も正しく予測し、生体内のエピブラストに相当するヒト iPS 細胞へのリプログラミング時にも適応できている。またヒトの老化も定量的に測定することができ、全死亡率、認知能力、虚弱、パーキンソン病、ダウン症候群、Werner 症候群などの様々な加齢関連疾患と相関する。

次に、ヒト iPS 細胞から腎臓系譜へ誘導し各発生段階の RNA-sequence 解析を行い、ハーバード大学医学部 Gladyshev 研究室にて確立した様々なトランスクリプトーム時計に代入し生物学的年齢（tAge）を測定した。遺伝子アノテーションには、Human Genome Reference Consortium GRChg38 を使用した。その結果、発生初期の中間中胚葉期で生物学的年齢が最も低くなることが観察され、腎臓の発生における若返りの可能性が示唆された（図 1）。また主成分分析により、発生過程は加齢と異なる意味を持つ 2 つの過程から構成されている可能性が初めて示唆された（図 2）。PC1 は発生とともに単調に増加し、PC2 は原始線条期で増加し中胚葉期以降で減少することが明らかになった。さらに興味深いことに、PC1 は初期化のシグネチャーと正の相関を示し、PC2 は負の相関を示した（図 3）。このことは、PC1 が主に加齢関連遺伝子、PC2 が初期化関連遺伝子である可能性を示している。老化の関連経路の中には、原始線条の段階で活性化され、その後抑制されるものがある（図 4）。したがって、それらの経路は老化後の若返りを促進する。

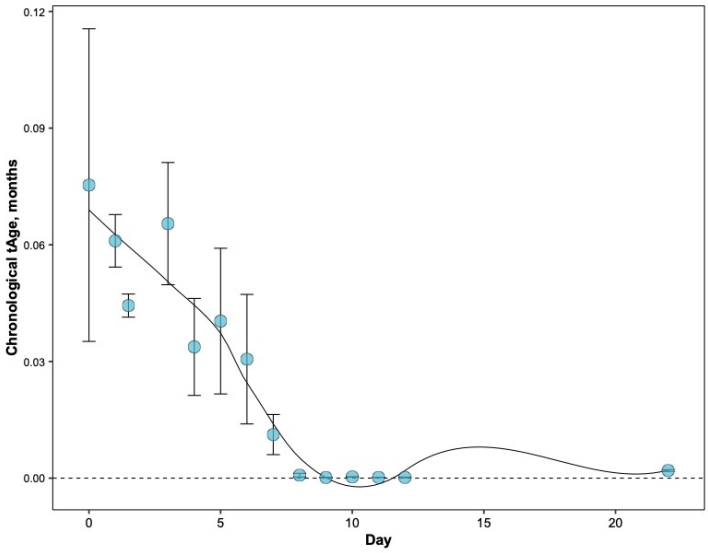


図 1. ヒト腎発生段階における生物学的年齢

ヒト iPS 細胞 201B7 株（健常者由来 iPS 細胞、山中伸弥教授樹立株）から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドを誘導し、各段階におけるトランスクリプトーム時計を測定した。Day0 はヒト iPS 細胞、Day1 は後期エピブラスト、Day2～6 は原始線条、Day7～9 は中間中胚葉、Day10～12 はネフロン前駆細胞、Day13～22 は腎オルガノイドを示す（n＝3）。

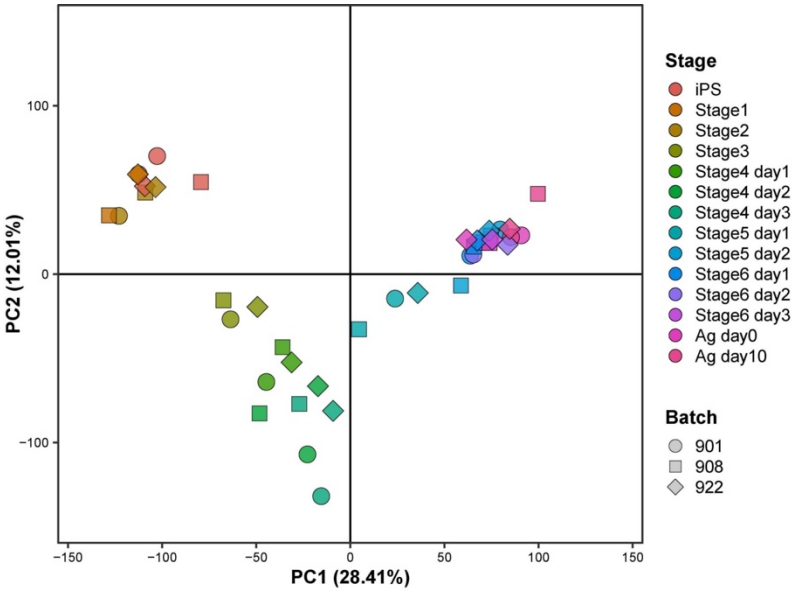


図 2. ヒト腎発生段階における主成分分析（PCA）

ヒト iPS 細胞 201B7 株（健常者由来 iPS 細胞、山中伸弥教授樹立株）から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞、腎オルガノイドを誘導し、各段階における RNA-seq 結果から PCA 解析を行った。Stage1 は後期エピブラスト、Stage2～4 は原始線条、Stage5 は中間中胚葉、Stage6 はネフロン前駆細胞、Ag は腎オルガノイドを示す（n＝3）。

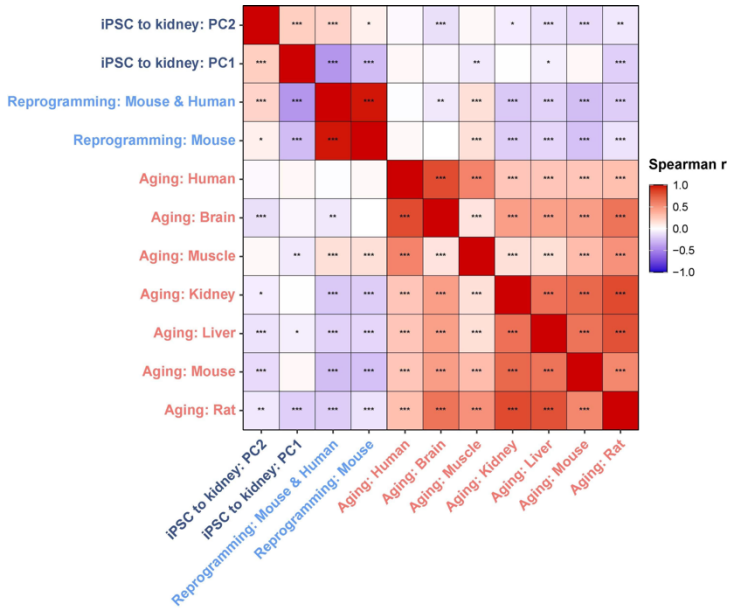


図 3. 老化やリプログラミング経路との関連性

ヒト iPS 細胞から腎系譜への主成分解析より PC1 を構成する成分および PC2 を構成する成分のヒートマップ（n＝3）。Aging: Human は老化したヒトの全組織、Aging : 組織はヒトおよび齧歯類（Mouse および Rat）の老化した組織、Reprogramming: Mouse & Human はマウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞へのリプログラミングした際の経路を示す（n＝3）。相関係数および p 値はスピアマン相関係数を使用して算出した。

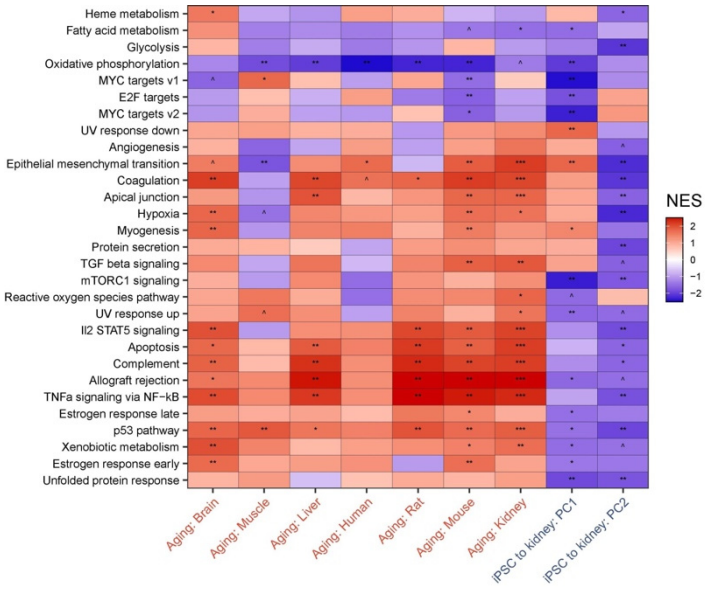


図 4. Pathway 解析に基づく老化やリプログラミングとの関連性

ヒト iPS 細胞から腎系譜への主成分解析より PC1 を構成する成分および PC2 を構成する成分の Pathway 解析（n=3）。Aging: Human は老化したヒトの全組織、Aging: 組織はヒトおよび齧歯類（Mouse および Rat）の老化した組織、Reprogramming: Mouse & Human はマウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞へのリプログラミングした際の経路を示す。相関係数および p 値はスピアマン相関係数を使用して算出した

考　察

本研究ではハーバード大学との共同研究にて、確立したトランスクリプトミクス時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いて、ヒト腎の老化の始まりを明らかにした。その結果、中間中胚葉前後にて生物学的年齢が最小となる“グランドゼロ”が存在することが明らかになった。さらに腎臓の発生段階において若返りを示し、エピジェネティック・トランスクリプトミクスな変化が ROS や TNF、p53 経路に関連して働くことが明らかになった。現在、それらの細胞運命を変化させる抗老化薬の開発を行っており、慢性腎臓病の新規治療開発に繋がると期待する。ヒト腎の老化の始まりを知る上で、胚を研究に用いることは倫理的・技術的に難しい。また多能性幹細胞は、培養・継代しても老化しないことが明らかである。したがってヒト iPS 細胞を活用する上記の手法は、ヒト発生初期の老化を詳しく理解する際に役立つ唯一の方法である。また Werner 症候群患者由来 iPS 細胞を用いて同様の検討を行うことでより詳細に腎臓の老化のメカニズムを解明することができる。さらに薬剤による抗老化の試みは、超高齢化を迎える日本において健康長寿にも繋がる非常に革新的な研究である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、加齢時計の数理学的研究の第一人者であるハーバード大学医学部 Gladyshev 研究室 Vadim N. Gladyshev 教授（米国科学アカデミー会員）、BohanZhang 博士研究員、Alexander Tyshkovskiy 博士研究員である。加えて腎臓再生の権威であるハーバード大学 medical school の Joseph V. Bonventre 教授および Takaharu　Ichimura 博士研究員および腎臓オルガノイド分野で活躍されているハーバード大学 Massachusetts General Hospital, Nephrology Division の Ryuji Morizane 准教授とともに腎臓分野における老化機序についてディスカッションを行った。また東北大学大学院医学研究科病態液性制御学の阿部高明教授の基、本研究を遂行することができた。この場を借りて御礼申し上げる。

文　献

1） Hovarth S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biology. 2013;14(10): R115. PMID: 24138928 DOI: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.

2） Kasahara T*, Tsujimoto H*, Sueta S*, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae S, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Ryosaka M, Sone M, Ikeya M, Watanabe A, Osafune K. A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells. Cell Reports. 2020 Apr 7;31(1):107476. PMID: 32268094 DOI: 10.1016/j.celrep.2020.03.040.

3） Kerepesi C, Zhang B, Lee SG, Trapp A, Gladyshev VN. Epigenetic clocks reveal a rejuvenation event during embryogenesis followed by aging. Science Advances. 2021 Jun 25;7(26): eabg6082. PMID: 34172448 DOI: 10.1126/sciadv. abg6082.

4） Bonev B, Cohen NM, Szabo Q, Fritsch L, Papadopoulos GL, Lubling Y, Xu X, Lv X, Hugnot JP, Tanay A, Cavalli G. Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. Cell. 2017 Oct 19;171(3):557-572.e24. PMID: 29053968 DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.043.