

## 霊長類モデルと疾患特異的iPS細胞を用いた 早老症ウェルナー症候群の病態解明



千葉大学医学部附属病院・助教 加藤 尚也

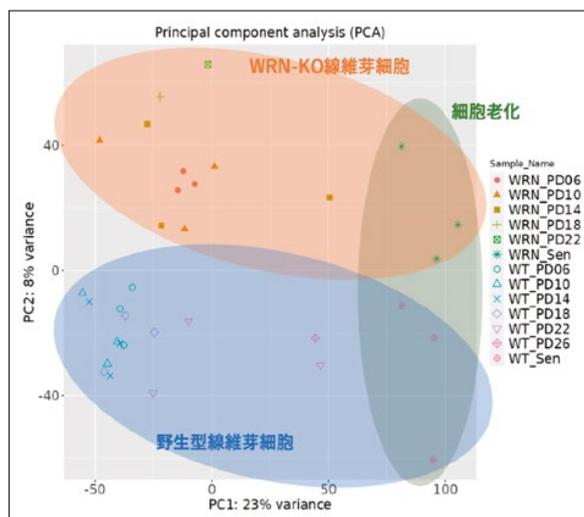
### 【背景と目的】

早老症ウェルナー症候群 (WS) は、思春期以降より種々の老化徴候が促進して出現する遺伝病であり、本邦における指定難病である。原因遺伝子WRNは、これまで様々な研究によりin vitroにおける機能が明らかとなっているが、WSの臨床症状との関連については未だ不明である。その要因としてWRN遺伝子ノックアウトマウスは早期老化フェノタイプを示さず、WSには好適なモデル動物が存在しないことが挙げられる。本研究では、我々が新たに作成したWRN遺伝子ノックアウト (WRN-KO) コモンマーマーモセットを通して、WSの病態メカニズムを解明し、治療開発への足がかりとすることを目的とした。

### 【結果】

WRN-KOマーモセットの作出は、WRN遺伝子Exon 2をターゲットにしたゲノム編集ツールTALEN発現ベクターを受精卵にインジェクションすることで行った。また、同時期に生まれた野生型マーモセットをコントロールとして比較検討した。生後行った体毛におけるジェノタイプングでは、17細胞中16細胞においてWRN-KOを確認した (モザイク率5.9%)。生後5ヶ月時点で、野生型およびWRN-KOマーモセットの耳の一部から線維芽細胞を3株ずつ樹立し、長期培養を行った。長期培養後の最終到達PDL (population doubling level) は、野生型 $26.7 \pm 1.2$  (平均 $\pm$ 標準偏差) に対し、WRN-KO  $18.7 \pm 4.6$ であり、WRN-KOマーモセット線維芽細胞は有意に早期に増殖を停止した ( $p < 0.05$ )。また、PDL6におけるテロメア長比較では、野生型 $1.0 \pm 0.26$  に対し、WRN-KO  $0.47 \pm 0.13$  (野生型を1とした比較) であり、WRN-KO線維芽細胞はテロメア長の有意な短縮を認めた ( $p < 0.01$ )。興味深いことに、健常のヒト6名とWS患者さん8名から採取した皮膚線維芽細胞のテロメア長解析では、健常 $1.0 \pm 0.25$  に対し、WS  $0.58 \pm 0.18$  (健常を1とした比較) であり、WRN-KOマーモセット線維芽細胞は、WS患者さん由来線維芽細胞と同等もしくはそれ以上のテロメア長短縮を示すことが示唆された。さらに、老化細胞を染色するSA- $\beta$ -gal染色を行ったところ、SA- $\beta$ -gal陽性面積 ( $\mu\text{m}^2$ /細胞) は、野生型 $4.6 \pm 2.3$  に対し、WRN-KO  $49.7 \pm 36.6$  であり、WRN-KO線維芽細胞では有意に老化細胞が増加していた ( $p < 0.05$ )。以上から、WRN-KOマーモセット線維芽細胞は、野生型に比して、早期の細胞老化を示すことが明らかとなった。

次に、各継代のサンプルからRNAを抽出し、RNAシーケンス解析を行った。PCA (principal component analysis) ではWRN-KOと野生型では異なる分布を示す一方、継代が進み細胞老化に至ると、類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった (左図)。



PDL6において、DEG (differentially expressed gene) 解析を行ったところ、WRN-KO線維芽細胞では、細胞老化マーカーであるCDKN1A (P21) 遺伝子の高発現や、細胞老化に伴って発現が減少するLMNB1の低発現、更に代表的なSASP (senescence-associated secretory phenotype) 遺伝子であるIL6の高発現が見られた。GO (gene ontology) Biological Process解析では、Cell cycleやSister chromatid segregation等の細胞増殖や分裂に関わる遺伝子発現が低下する一方、Blood vessel morphogenesisやVasculature developmentといった血管新生に関わる遺伝子発現が増加することが明らかとなった。さらに興味深いことに、健常のヒト6名とWS患者さん8名から採取した皮膚線維芽細胞のRNAシーケンスにおけるDEG解析でも同様にWS線維芽細胞におけるCDKN1AおよびIL6の高発現とLMNB1の低発現が見られており、GO解析では半数のパスウェイがWRN-KOマーマセット線維芽細胞と共通して変動していた。これらの結果から、WRN-KOマーマセット線維芽細胞は、WS患者さん由来線維芽細胞と同様の遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

In vivoの解析では、生後300日前後に体重増加の停滞が見られた。また生後7ヶ月で行った随時採血において、WRN-KOマーマセットはコントロールに比して著明に高い中性脂肪値を示しており、WS患者さんの7割に合併する脂質異常症が再現されている可能性が示唆された。

### **【考 察】**

本研究では世界初となるWRN-KOマーマセットの創出と同マーマセット由来線維芽細胞の樹立およびこれらのフェノタイプ解析を行った。WRN遺伝子ノックアウトマウスは早期老化フェノタイプを示さず、同マウスから樹立された線維芽細胞も早期細胞老化を示さないことが知られている (Dhillon KK, et al. DNA Repair (Amst). 2010 Jan 2 ; 9 (1) : 11-22)。この原因としてはマウスのテロメアがヒトに比して極端に長いことや、マウスのWRN蛋白アミノ酸配列がヒトと70%の相同性しかないことなどが考えられる。コモンマーマセットはヒトよりも短いテロメアと、ヒトWRN蛋白と90%の相同性を示すWRN遺伝子を有しており、マウスでは再現できなかったWSフェノタイプが再現される可能性が高い。今回の検討においてはWRN-KOマーマセット線維芽細胞において、WS患者さん由来線維芽細胞と同様の早期細胞老化フェノタイプや遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなり、WRN-KOマーマセットのWS霊長類モデルとしての有用性が期待される。WS患者さんは思春期以降に種々の早老症候を示すことから、WRN-KOマーマセットにおいても、今後性成熟を迎えることで、さらなる早期老化症状が発現してくると考えられる。本研究を継続することで最終的にはWSの病態解明や治療開発へと繋げていきたい。

### **【謝 辞】**

本研究は黒滝陽子先生 (実験動物中央研究所)、大内靖夫先生 (千葉大学大学院 医学研究院 イノベーション再生医学)、前澤善朗先生 (同院 内分泌代謝・血液・老年内科学)、横手幸太郎先生 (同院 内分泌代謝・血液・老年内科学) との共同研究であり、本研究を推進するに当たって、多大なるご指導を頂きましたことをこの場をお借りして御礼申し上げます。また、本研究のご支援を頂きました難病医学研究財団の皆様および財団へご寄付下さった皆様に心より感謝申し上げます。今後、本疾患の克服に向け、より一層研究に励んで参ります。