

炎症老化に応答した内在性レトロウイルスの発現動態の解析

赤羽 勇唱（筑波大学 生物学類） 指導教員：川口 敦史（筑波大学 医学医療系）

【背景・目的】

炎症老化とは、DNA の損傷など、加齢に伴う様々なストレスを受けた細胞の形質が変化することによって、個体レベルで慢性的な炎症が引き起こされる現象である。老化形質を示す細胞からは、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインをはじめとする種々の炎症応答関連物質が分泌されており、この現象は細胞老化関連分泌形質（SASP ; Senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれている。SASP による炎症性サイトカインの分泌は様々な加齢性疾患の発症に関連することから、加齢に応答した SASP 関連遺伝子の発現制御機構を理解することは、老化形質の進行を抑制する上で非常に重要である。

近年、加齢に応答してクロマチン動態や DNA 修飾によるエピジェネティックな転写制御が変化することにより、正常な細胞ではサイレンシングされている内在性レトロウイルス（ERV ; Endogenous retrovirus）の異常な発現が報告されている。ERV はレトロトランスポゾン的一种であり、太古のレトロウイルス感染の痕跡であると考えられている。ERV の異常発現は、自然免疫系を活性化することで炎症老化を誘導する可能性が示唆されているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では、ERV の発現制御に関わるエピジェネティックな要因として DNA のメチル化に焦点を当て、炎症老化に応答した ERV 発現動態の解析を目的とした。

【方法】

1. マウス由来培養細胞を用いた ERV の発現制御機構の解析

DNA のメチル化による ERV の発現制御機構を明らかにするため、NIH/3T3 細胞（マウス胎児由来線維芽細胞）、および RAW264 細胞（マウス腹水由来マクロファージ）に DNA メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5AzadC) を添加し、ERV の発現量を RT-qPCR 法により定量した。今回は先行研究に基づき、6 種類の ERV (MMERVK10D3, RLTR10D2, MERV1, ERVB5_1-I, ERVB5_1-ltr, MurERV4) を解析対象とした (Scheller M., *et al.*, *Nature Cancer*, 2021)。

2. RNA-seq 解析による ERV 発現量の比較

加齢に伴う ERV 発現量の変化を調べるため、28 週齢および 63 週齢の野生型マウスより末梢血単核細胞 (PBMC ; Peripheral blood mononuclear cells) を分離し、total RNA を抽出して RNA-seq 解析を行なった。また、DNA の脱メチル化に関わる *Tet2* 遺伝子を血球細胞特異的に欠損したマウス (*Vav1cre/Tet2^{fllox}* マウス ; 筑波大・坂田麻実子教授との共同研究) から分離した PBMC においても同様の解析を行なった。

【結果・考察】

1. マウス由来培養細胞を用いた ERV の発現制御機構の解析

本実験では、5AzadC を異なる濃度 (0, 30, 100, 300 nM) で NIH/3T3 細胞および RAW264 細胞に添加し、ERV 由来 mRNA の相対的な発現量を RT-qPCR 法により定量した (図 1)。また、

β -Actin 遺伝子を内在性コントロールとして用い、データを補正した。

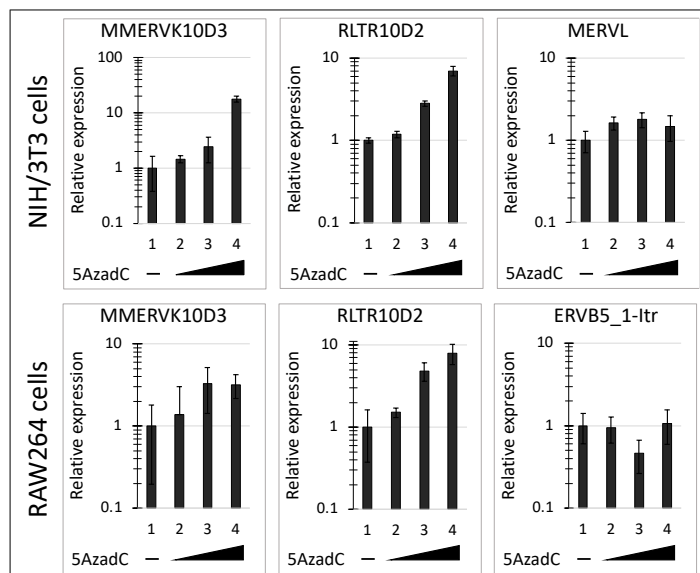


図 1. 5AzadC 処理による ERV 発現量の変化

実験の結果、MMERVK10D3 および RLTR10D2 は、線維芽細胞だけでなくマクロファージでも検出され、5AzadC の濃度依存的に発現量が増加した。よって、これらの ERV は免疫細胞を含む多くの細胞種において、DNA メチル化による発現抑制を受けている可能性が示唆された。一方、MERV1 は線維芽細胞特異的に、ERVB5_1-ltr はマクロファージ特異的に検出され、5AzadC 処理によって発現量に顕著な差が見られなかった。よって、これらの ERV では DNA メチル化による発現抑制の影響が小さいと考えられた。

2. RNA-seq 解析による ERV 発現量の比較

現在解析を進めており、詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

今後、RNA-seq 解析により得られたデータから、発現量の変化に基づいて ERV のクラスタリングを行う予定である。応答性の異なる各クラスターに対し、メチローム解析をはじめとしたエピゲノム解析を行うことで、炎症老化における ERV の発現制御機構を明らかにしていきたい。また、老化した個体の血球細胞では *Tet2* 遺伝子変異が頻繁に見られ、cGAS-STING 経路を介した慢性炎症を惹起することで加齢性疾患が誘導されることが報告されている (Xie J., *et al.*, *Leukemia*, 2023)。cGAS-STING 経路は細胞内二本鎖 DNA を認識することで炎症を惹起すると考えられているが、*Tet2* 遺伝子の変異により本経路が活性化されるメカニズムは明らかになっていない。したがって、ERV 発現の活性化に応答して cGAS-STING 経路が活性化される可能性についても検討していく予定である。