

# 老化に伴う内在性レトロウイルスの発現上昇をモデル化した細胞株の作成



A Cell Line Model for Age-related Endogenous Retrovirus Activation (AERA)

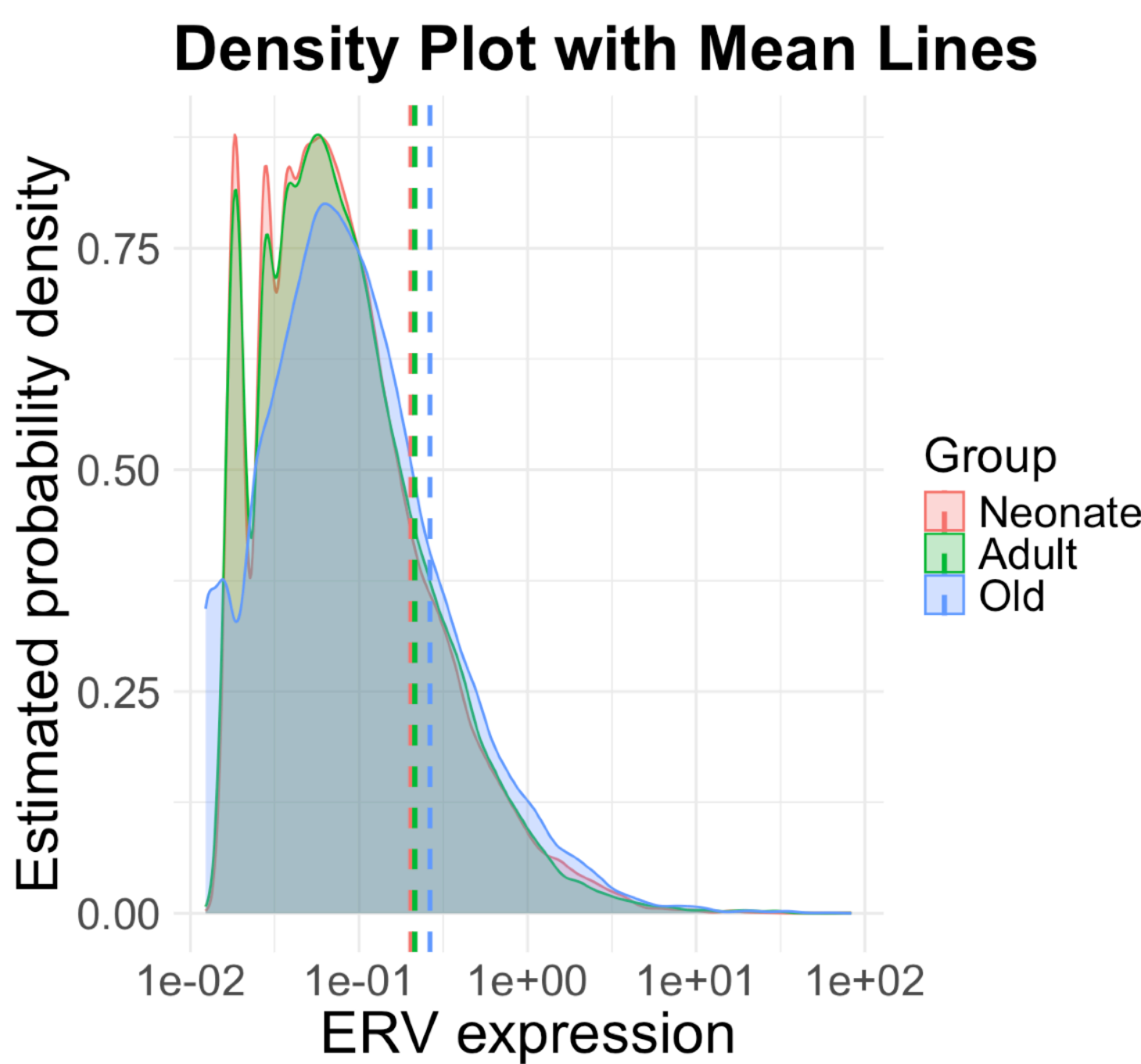
伊藤圭介<sup>1</sup>, 富川奈緒子<sup>1</sup>, 瀬藤和也<sup>2</sup>, 池川雅哉<sup>3</sup>, 村松正道<sup>4</sup>,  
栗山長門<sup>1</sup>, 木下和生<sup>1</sup>

静岡社会健康医学  
大学院大学

<sup>1</sup>：静岡社会健康医学大学院大学, <sup>2</sup>：京都府立医科大学・大学院医学研究科 地域保健医療疫学,  
<sup>3</sup>：同志社大学 生命医科学研究科, <sup>4</sup>：神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター

老化に伴い、内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus, ERV) の発現が上昇しているという報告がある[4]。我々は年齢の増加とともに ERV の発現が単一種類の細胞において上昇するか、NCBI 遺伝子配列データベース上の RNA-seq データを用いて検討した。新生児、成人 (19-45 歳)、高齢者 (65 歳以上) の 3 つの群から採取した末梢血 CD14 陽性単球における、long-terminal repeat (LTR) を含む ERV の発現を TE local プログラムを用いて比較したところ、成人ー新生児、高齢者ー新生児、高齢者ー成人、全ての比較で発現の有意な上昇が認められた。次に、早老症ウェルナー症候群の原因遺伝子 *WRN* のコンディショナルノックアウト細胞を ヒト 293 細胞 で CRSPR/Cas9 を用いて作成した。一過性に Cre リコンビナーゼを発現し、exon 15 - 16 を欠失した細胞を作成した。タンパク発現の喪失は抗 *WRN* 抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。ノックアウト細胞 3 クローンと非ノックアウト (*loxP* ノックイン) 細胞 3 クローンから、RNA を精製し、トランスクリプトームシーケンスを行った。TElocal を用いて、ERV の発現を定量した。*WRN* ノックアウト細胞において、ERV の発現上昇が認められた。したがって、*WRN* ノックアウト 293 細胞は老化の一面をモデル化した細胞であると考えられた。この細胞は老化に伴う ERV 発現上昇機構を研究するために有用なツールになると考えられる。また、我々は現在、静岡県で進行中の多目的ゲノムコホート研究 (しずおか研究) において、様々な年齢の参加者から提供された血液検体を用いて、ERV 発現と健康指標の関連を調べる計画を進めている。この研究において、本細胞を ERV 発現定量系の確立に応用する予定である。

図1. ヒト末梢血単球における加齢に伴うERV発現上昇



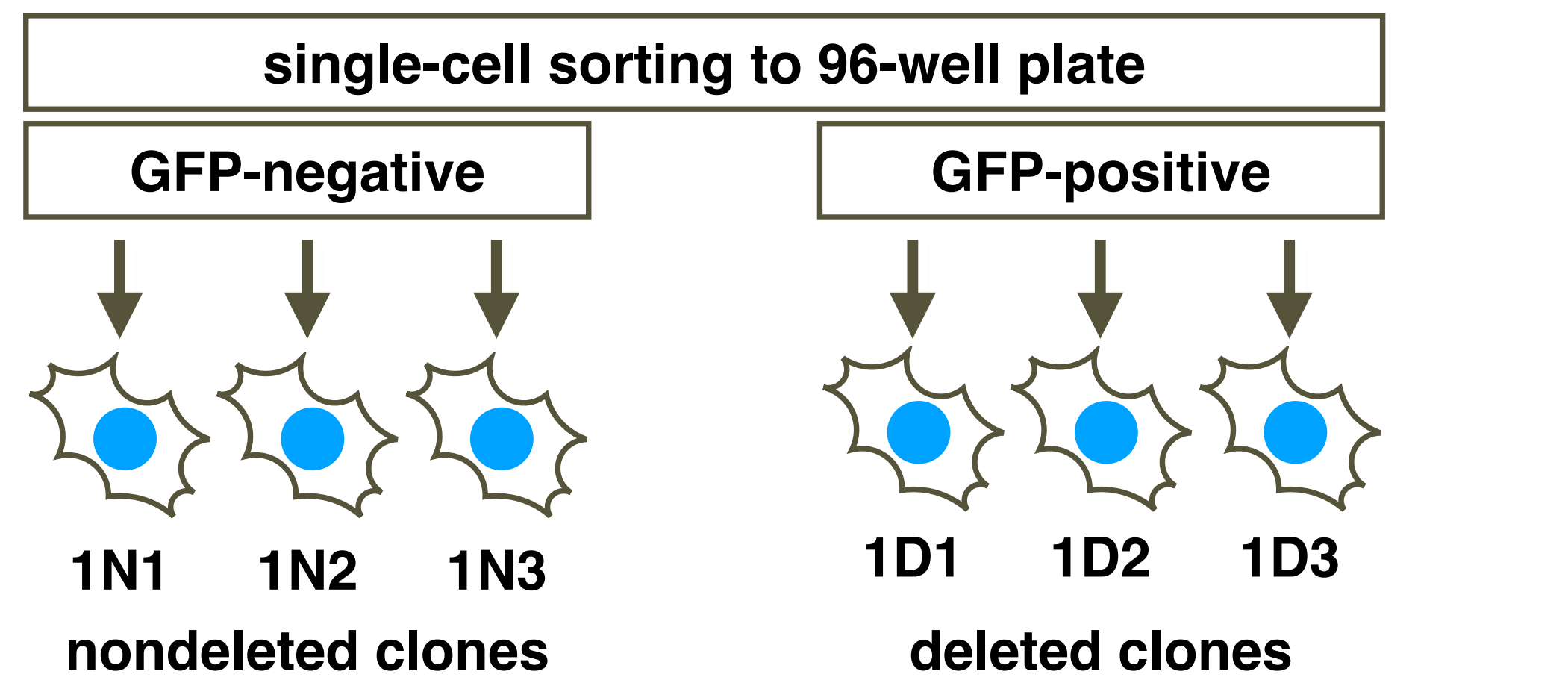
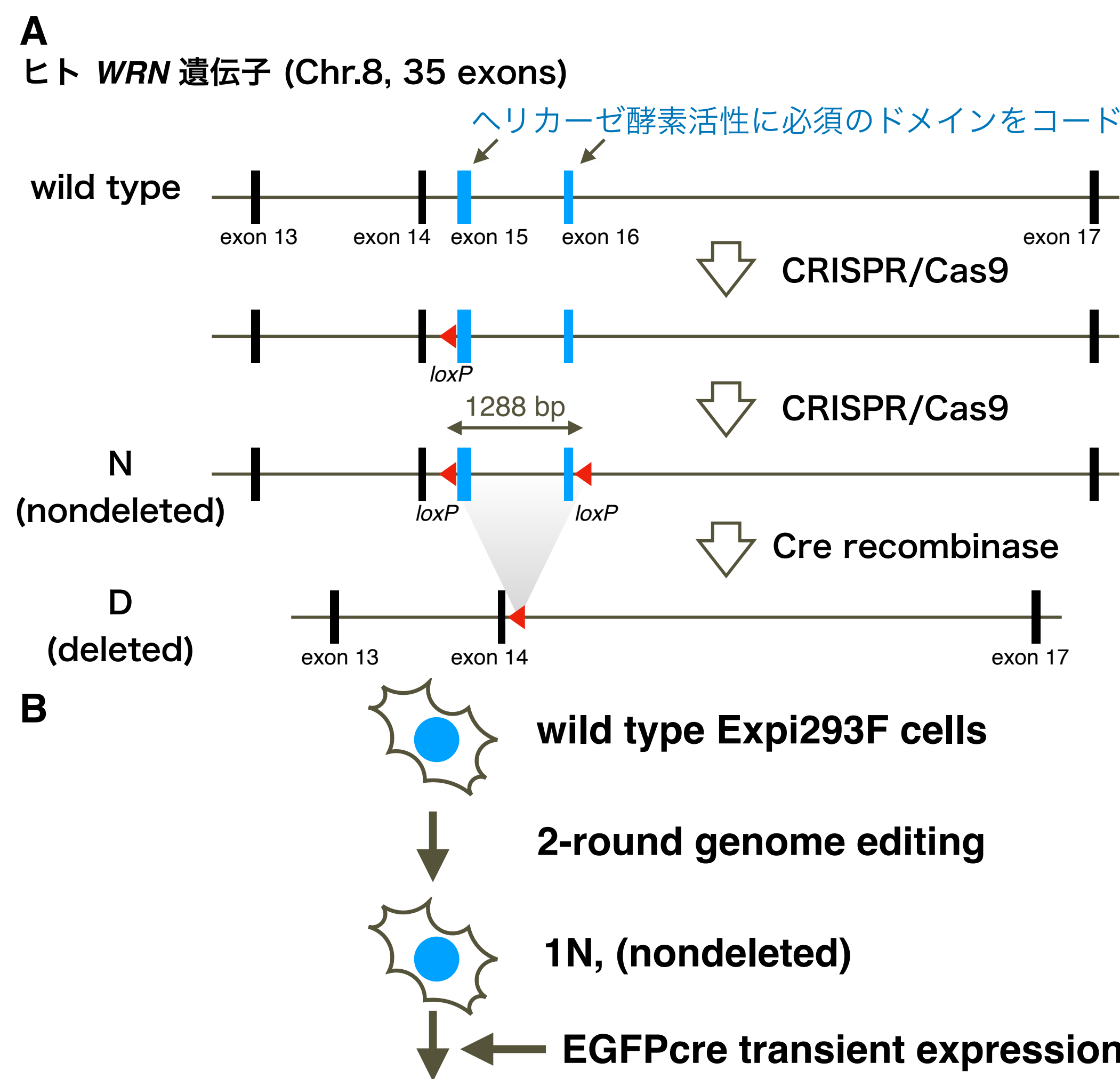
NCBI の Sequence Read Archive より入手した、健康カナダ人新生児 (Neonate, 臍帯血)、成人 (Adult, 19-45 歳)、高齢者 (Old, 65 歳以上) 【各群 3 人】末梢血より磁気ビーズ法で単離した CD18 陽性単球細胞の RNA-seq データ[1]を解析した。遺伝子座別に transposable element (TE) の発現定量を行う TElocal-1.1.1 プログラム[2]を用いた。TElocal の推奨に従い、ヒトゲノムへの mapping は repeat 配列の特性を考慮した条件で STAR-2.7.10a プログラムを用いて行った。TE 遺伝子座の情報は GRCh38\_Ensembl\_rmsk\_TE.gtf.locInd を使用した。各 TE 毎に計数された read count は total read count in million で除算し、サンプル間補正を行った。TE の発現分布を比較するため、統計ソフト R の geom\_density() 関数を用いて確率密度推定曲線を群ごとに描画し (縦軸は確率密度)、各群の TE 1 座位あたりの平均発現量を垂直線としてプロットした。その際、TE のうち ERV (annotation に “LTR” を含むもの) に限定し、かつ、全群で発現量が 0.01 - 100 の間の TE (45,380 座位) に限定した (外れ値除外のため) (表 1)。TE の発現分布の 3 群間有意差検定を Wilcoxon 符号付き順位検定で行った結果、3 通りすべての比較で 0.05 以下の確率値であった (表 2)。

|                  | Neonate | Adult   | Old     |
|------------------|---------|---------|---------|
| before filtering | 754,264 | 754,264 | 754,264 |
| < 0.01           | 679,545 | 678,860 | 658,524 |
| 0.01 - 100       | 74,718  | 75,398  | 95,739  |
| > 100            | 1       | 6       | 1       |

表2. 3群間のWilcoxon 符号付き順位検定の確率値

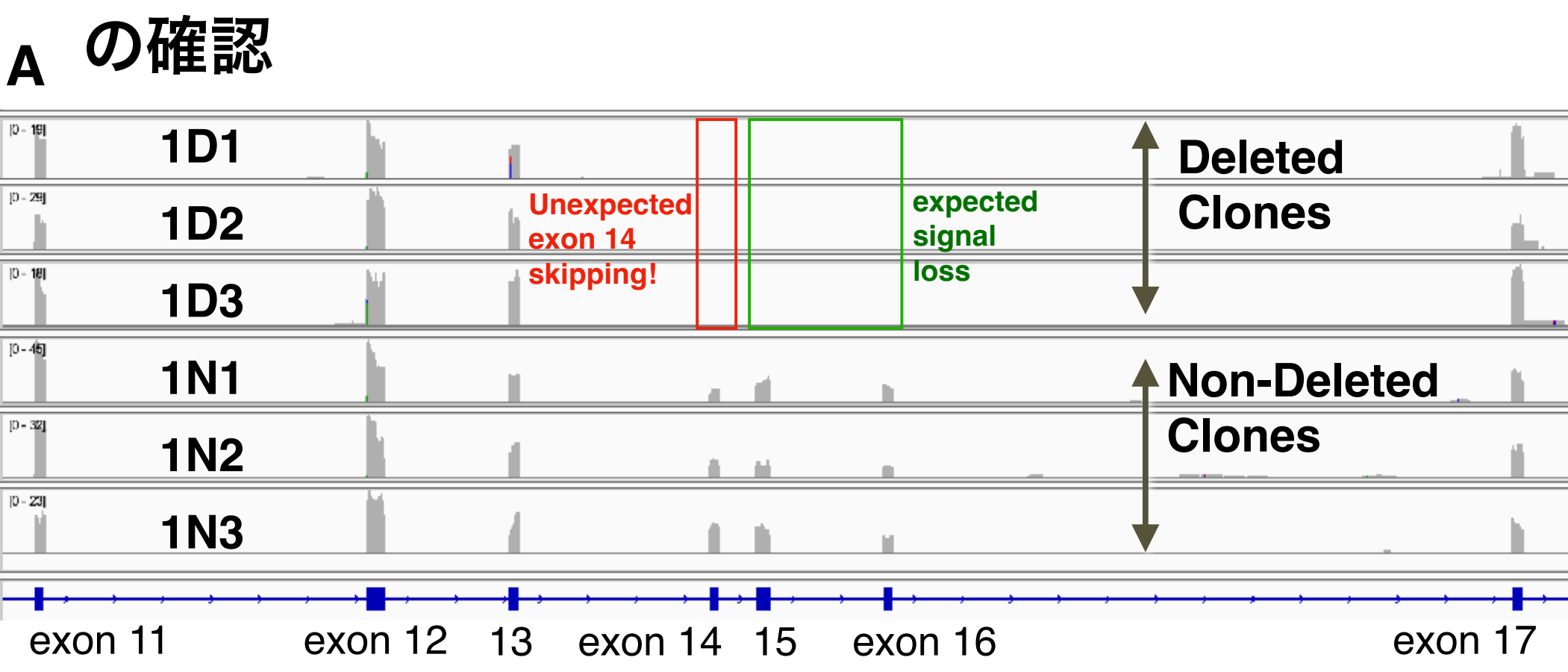
|         | Adult   | Old     |
|---------|---------|---------|
| Neonate | 0.03161 | < 1e-15 |
| Adult   |         | < 1e-15 |

図2. ヒト293 早老症原因遺伝子 *WRN* のノックアウト細胞の作成



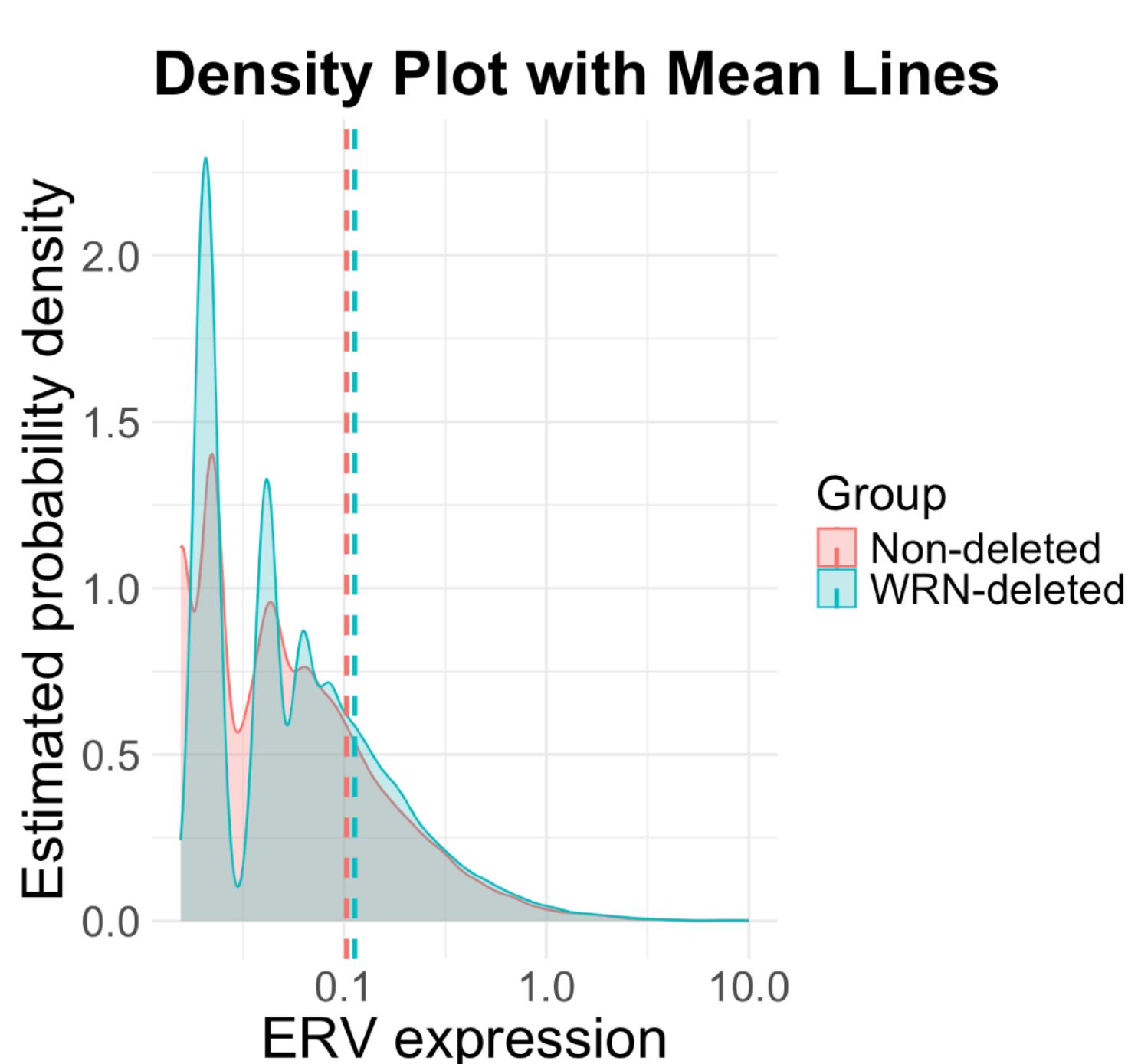
**A.** *WRN* 遺伝子 エクソン15と16を欠失したヒト ES 細胞から分化した間葉系幹細胞で ERV の発現が上昇するという既報[3, 4]に基づき、293 細胞でエクソン15と16のコンディショナルノックアウト細胞を作成した。2回のゲノム編集により *loxP* 部位を段階的にホモ導入 (N) した。**B.** 得られたクローン 1N に EGFPcre 発現プラスミドを一過性導入し、翌日、GFP 陽性と陰性分画を single-cell sorting した。得られた複数のコロニーで exon 15 と 16 が欠失しないこと (1N1~3)、欠失していること (1D1~3) を genomic PCR で確認した。

図3. ヒト293 早老症原因遺伝子 *WRN* ノックアウト



**A.** RNA-seq の結果 exon 15 と 16 のシグナル欠損に加えて、exon 14 の欠損が認められた。この予想外の exon skipping により、計画された frameshift (582 a.a., 67 kD) & nonsense-mediated mRNA decay が起こらず、in-frame 欠失 (1351 a.a., 153 kD) が起きている可能性があった。**B.** *WRN* タンパクのウェスタンブロットでは wild type では 1432 a.a., 162 kD のバンドが認められたが、1D1~3 ではやや短い弱いシグナルのバンドが認められ、in-frame 欠失を示す RNA-seq の結果と矛盾しないと思われた。1N1~3 では発現の低下が認められ、*loxP* の挿入が遺伝子発現に影響した可能性がある。1D1~3 が発現する *WRN* タンパクは活性に必須のドメインを欠損するため、機能は喪失していると考えられる。抗体: [anti-*WRN*] A300-238A-T (Bethyl), [anti- $\beta$ -tubulin] TU27 (BioLegend)

図4. 293 *WRN* のノックアウトによる ERV 発現上昇



後 (表 3) 23,043 座位 ERV 発現量の確率密度推定曲線を示す。

表3. 解析対象のERV 座位数

|                  | Non-deleted | WRN-deleted |
|------------------|-------------|-------------|
| before filtering | 754,264     | 754,264     |
| < 0.01           | 708,776     | 706,411     |
| 0.01 - 100       | 45,488      | 47,853      |
| > 100            | 0           | 0           |

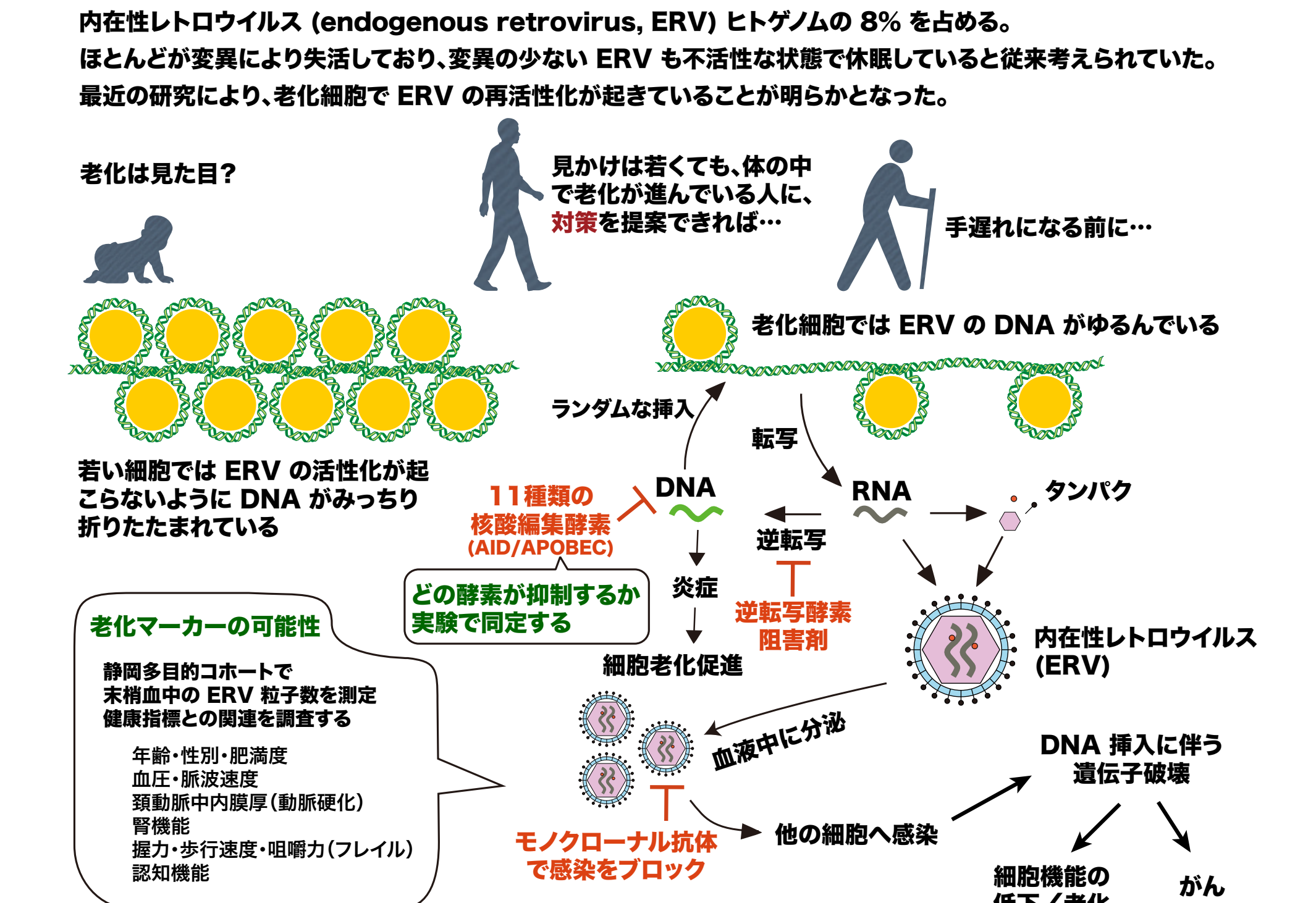
共通は 23,043 座位

## 考察

*WRN* 欠損を有する 293 細胞が、ヒト単球細胞やその他の組織 [4] における老化で認められたERV 発現上昇を模倣していることが示唆された。*WRN*欠損細胞株は、老化に伴うERV発現量の変化をモデル化した細胞株と考えられる。

老化に伴う ERV 発現上昇のメカニズムは不明であるが、*WRN* タンパクがヘテロクロマチン制御因子 (SUV39H1, HP1 $\alpha$ , LAP2 $\beta$ ) と結合するという報告[3]があり、エピジェネティック制御の介在が示唆される。*WRN* コンディショナルノックアウト 293 細胞はこの機構の解明に役立つものと思われる。

## 今後の展望



静岡県で我々が進めている住民コホート研究[5]を利用し、ヒト集団で年齢と ERV 発現の関連を調査する。PCR, ELISA, 質量分析により測定する ERV 発現量が種々の健康指標と関連するかについても解析する予定である。*WRN* コンディショナルノックアウト細胞は ERV 測定系の確立に役立つ。

ERV の増殖が AID/APOBEC 核酸編集酵素によって抑制されるかどうか、その分子機構についても調べる予定である。

## 文献

- Lissner, M. M. et al. Age-Related Gene Expression Differences in Monocytes from Human Neonates, Young Adults, and Older Adults. PLoS One 10, e0132061 (2015); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA257777>.
- Jin, Y., Tam, O. H., Paniagua, E. & Hammell, M. TEtranscripts: a package for including transposable elements in differential expression analysis of RNA-seq datasets. Bioinformatics 31, 3593-3599 (2015); <https://www.mghlab.org/software/telocal>.
- Zhang, W. et al. Aging stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. Science 348, 1160-1163 (2015).
- Liu, X. et al. Resurrection of endogenous retroviruses during aging reinforces senescence. Cell 186, 287-304 e226 (2023).
- しずおか研究: <https://shizuoka-cohort.jp>

開示すべき利益相反はありません