<研究課題>

生体内リプログラミングにより誘導される循環物質を介した抗加齢療法

代表研究者 兵庫医科大学医学部総合診療内科学 助教 庄嶋 健作

【抄録】

老化とは身体を構成する臓器・細胞が経時的に機能を失い、再生できなくなる過程であり、この失った再生能を取り戻すことで、サクセスフルエイジングを実現し得る抗加齢につながる。先行研究では、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (リプログラミング因子) を用いた人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 誘導方法を応用し、遺伝子改変マウスの生体内で短期間リプログラミング刺激を与えること (生体内短期間リプログラミング) で、腫瘍化を回避し、早老症マウスの寿命延長・筋再生増強に成功した。生体内短期間リプログラミングは腫瘍化のリスクがあり、リプログラミング因子の発現を短期間にすることでリスクを軽減しているが、現状では臨床応用は厳しい。そこで、生体内短期間リプログラミングが誘導する循環物質に着目して、腫瘍化リスクを最小化した臨床応用可能な抗加齢開発を目指した。また、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた遺伝子導入技術の開発を進めることで、臨床応用への道を拓く。

1. 研究の目的

2006年に発表された人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の誘導技術 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) を用いたリプログラミング技術) の発見 (Takahashi *et al.*, Cell, 2006) 以来、生体外で準備した細胞・組織を用いた再生医療が注目され、多くの研究が進められてきた。これまでの研究では、網膜 (Mandai *et al.*, N Engl J Med, 2017) や神経組織 (Takahashi *et al.*, Curr Opin Biotechnol, 2018) といった組織において、加齢に伴う損傷に対する臨床試験が行われ、一定の成果が報告されている。しかし、こうした治療法にはいくつかの課題が存在している。特に、大型臓器の障害に対しては、体外での細胞培養や組織作製にかかる高額な費用や長い時間、さらには移植時の生着率の低さといった問題が指摘されている。これらの課題を克服するために、移植を介さずに損傷を受けた臓器自体の再生を促進する新たな治療法が求められている。そこで、生体内で OSKM を誘導する技術 (生体内リプログラミング) に着目した。

これまでの研究から、*in vitro* (試験管内) におけるリプログラミングの過程では、老化に伴う細胞変化 (テロメアの短縮やミトコンドリア機能の低下など) が逆転することが報告されている (Mahmoudi & Brunet, Curr Opin Cell Biol, 2012)。一方で、生体内でリプログラミングを行うと、がん化のリスクが伴うことが指摘されており (Ohnishi *et al.*, Cell, 2014)、抗加齢療法への応用には大きな課題が存在している。

そこで代表研究者が所属していた研究グループは、ドキシサイクリン (DOX) の投与によって OSKM を過剰発現させる遺伝子改変マウスを用い、短期間のリプログラミング刺激を与える、生体内短期間リプログラミングを開発した。この手法により、がん化のリスクを抑えながら、早老症マウスの寿命延長や高齢マウスの筋再生促進に成功した (Ocampo *et al.*, Cell, 2016)。

老化とは、身体を構成する臓器や細胞が時間とともに機能を失い、再生能力が低下する現象である。この失われた再生能を取り戻すことができれば、抗加齢療法としての新たな道が開か

れると考えられる。本研究では、生体内短期間リプログラミングがどのように再生能を向上させるのかを明らかにし、それを基に新しい治療法の開発を目指した。

2. 研究方法と経過

2-1 リプログラミング刺激により再生する臓器の検討

リプログラミングがどの臓器に対して再生促進効果を持つのかをまず検討することにした。代表研究者が所属していた研究グループの報告後、David Sinclair 教授（ハーバード大学）らが、c-Myc を除いた 3 因子 (Oct4, Sox2, Klf4) を用いることで腫瘍化のリスクを軽減し、DNA 脱メチル化酵素 TET1, TET2 を介した網膜神経細胞の再生に成功した (Lu *et al.*, Nature, 2020)。また、Thomas Braun 教授（マックスプランク研究所）らの研究では、心筋細胞特異的にリプログラミングを行うことで、成人心筋細胞を胎児期様に脱分化させ、心筋再生を達成した (Chen *et al.*, Science, 2021)。

この知見を踏まえ、我々の研究では肝臓と腎臓の再生に焦点を当てた。肝臓再生のモデルとして 2/3 部分肝切除術を、腎臓再生のモデルとして可逆的一側尿管結紮モデルを用いて、リプログラミング刺激が再生促進に寄与するかを評価した。

2-2 リプログラミング刺激によって誘導される循環物質を同定し、臨床応用可能な形でマウスに投与し、臓器再生が増強するか検討

我々の研究では、リプログラミングによって特定の液性因子が誘導され、それが臓器再生能を向上させる可能性が示唆されている。この液性因子を同定し、これを利用することで、がん化のリスクを最小限に抑えた新規抗加齢療法の開発が可能となると考えた。

また、これまでの知見は遺伝子改変マウスを用いて得られてきたが、臨床応用につなげ

ていくには遺伝子導入システムを確立することが望ましいと考えた。そこでアデノ随伴ウイルス (AAV) を利用した生体内リプログラミングシステムの確立、さらに AAV を用いて液性因子を導入することで、抗加齢療法につなげることを目指した

3. 研究の成果

3-1 リプログラミング刺激により再生する臓器の検討

本研究では、動物実験モデルを確立し、臓器再生能亢進に関する検討を継続している。

3-2 リプログラミング刺激によって誘導される循環物質を同定し、臨床応用可能な形でマウスに投与し、臓器再生が増強するか検討

AAV を用いた遺伝子導入システムは、遺伝子サイズの問題や、導入効率、発現の調整など難しい点が多い。これらの問題点を克服したの作製に必要なプラスミドの設計を進め、*in vitro* での発現を確認している。さらに、これらのプラスミドを改良し、最適な条件を見つけるための実験を続けている。このシステムを用いて、様々な病態モデルマウスでその効果を調べることにより、生体内リプログラミングの有効性と安全性を検証し、抗加齢療法としての実用化を目指している。

4. 今後の課題

未曾有の高齢化社会を迎える日本において、いかにして健康長寿を実現させるかは喫緊の課題である。健康長寿の実現のためには、高齢者医療の充実と共に、各疾患の根源的原因である『老化』に関する基礎医学研究が必要不可欠であり、老化自体を内科的治療対象として捉えることで、その解決に寄与することが期待される。生体内短期間リプログラミングによって再生能を亢進する因子を特定し、それを活用した抗加齢療法を確立することができれば、老化に

対する新規抑制機構が明らかになり、サクセスフルエイジングに対して多大な貢献ができる。現時点では越えるべき課題が多いが、臨床応用の基盤となるように、今後も基礎研究を継続していきたい。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた新たな知見に関して、さらなる研究成果を加えて、学会発表および論文発表を行う予定である。

以上

Anti-Aging Therapy Mediated by Circulating Factors Induced by *In Vivo* Partial Reprogramming

Primary Researcher: Kensaku SHOJIMA
Assistant Professor, Department of General Internal Medicine,
School of Medicine, Hyogo Medical University

Aging is a process in which the organs and cells that make up the body gradually lose their function and become unable to regenerate over time. Restoring this lost regenerative ability could provide a means to intervene in aging. Previous studies have applied the induction method of induced pluripotent stem cells (iPS cells) using reprogramming factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc. By administering partial reprogramming stimuli in genetically modified mice (*in vivo* partial reprogramming), lifespan extension was achieved in progeria model mice, and muscle regeneration was enhanced while avoiding tumorigenesis. However, *in vivo* partial reprogramming carries a risk of tumorigenesis. While limiting the expression duration of reprogramming factors can help mitigate this risk, clinical application remains challenging. To address this, our study focuses on identifying circulating factors induced by *in vivo* partial reprogramming to develop clinically applicable anti-aging therapies with minimal tumorigenesis risk. Additionally, by advancing gene delivery techniques using adeno-associated virus (AAV), we aim to pave the way for clinical applications.