

## 【研究背景】

100歳を超える方を百寿者、とくに110歳以上の方をスーパーセンテナリアンと呼びます。これら長い寿命を誇る方々の多くは、加齢に伴う疾患（加齢性疾患）発症や認知機能の低下がみられず、健康長寿の理想像といえます。そのため、長寿者でみられる健康長寿の分子遺伝学的背景を明らかにすることを目指し、これまで多くの研究が行われてきました。

とくに近年では、エピゲノムの視点から健康長寿や老化を理解しようとする研究が多く行われています。エピゲノムとは、DNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の働きを変化させる機構のことで、代表的な現象としてDNAのCpGサイト<sup>\*9</sup>と呼ばれる部位のメチル化・脱メチル化が挙げられます。ヒトゲノム上には約3,200万ヶ所のCpGサイトが存在し、環境要因によって可逆的にエピゲノム状態が変化するCpGサイトや、加齢に伴ってメチル化・脱メチル化が一方に進んでいくCpGサイトなどがあります。そして加齢に沿って一定の変化を示す数百ヶ所のCpGサイトに注目し、それらのエピゲノム状態から本人の年齢を推定する手法も開発されています（エピゲノム時計・エピゲノム年齢）。ただし、従来のエピゲノム年齢推定手法はDNAマイクロアレイを用いており、近年飛躍的に発展している超並列型DNAシーケンサー（または、次世代シーケンサー）を用いた既存手法はありませんでした。

また国外では、この手法により健康長寿を達成している人々が、実際の年齢よりも若いエピゲノム年齢を示すことが報告されています。しかしながら、どのような機能に関わる遺伝子のエピゲノム状態が若く維持されているのか、さらに、若い状態を維持することだけが重要なのかどうか、詳細な理解につながる証拠は得られていませんでした。

そこで本研究では、超並列型DNAシーケンサーを利用した新規の日本人に適したエピゲノム年齢推定法を開発するとともに、東京百寿者研究（TCS）と全国超百寿者研究（JSS）に参加したスーパーセンテナリアンを含む101歳から115歳の方々と、TMM計画の地域住民コホート調査に参加した20歳から79歳の方々のエピゲノム状態を比較解析し、健康長寿に関わるCpGサイトの探索を行いました。

## 【研究成果】

TMM計画の調査に参加した方のうち20歳から79歳までの健常な421名、および、TCSまたはJSSに参加した101歳から115歳までの94名の血液から抽出したDNAを抽出し、独自に開発したキャプチャープローブを用いたバイサルファイトシーケンシング<sup>\*10</sup>により、約76万ヶ所のCpGサイトのエピゲノム状態を測定・解析しました。

ヒトゲノム上に存在する多数のCpGサイトのなかには、加齢に沿ってエピゲノム状態が変化するものがあり、機械学習等で使われる手法を用いることで、DNAメチル化状態から本人の年齢を推定するための計算モデル（エピゲノム時計）を作成できます。そこで、TMM計画参加者421名のエピゲノム情報の80%を計算モデルの学習に、20%を計算モデルの評価に用いてエピゲノム時計の開発・評価を行いました。その結果、エピゲノム情報を用いて、高精度に暦年齢を推定する日本人に適した新規のエピゲノム時計を開発できました（ピアソンの相関係数 $r = 0.96$ ）。

続いて、開発したエピゲノム時計を用いて、百寿者のエピゲノム年齢を計算し、実際の年齢と

の比較を行うことで、老化が進んでいるか、抑制されているかを評価しました。その結果、男性1名を除き、暦年齢よりも若いエピゲノム年齢が示されました（図1 a）。また、エピゲノム状態に影響する血中の細胞種組成の違いを考慮した指標（エピゲノム年齢加速<sup>\*11</sup>）においても、百寿者のエピゲノム年齢は若い状態に維持されていることが明らかになりました（図1 b）。

国外でも百寿者のエピゲノム年齢は若い状態にあることが報告されており、本研究の結果はそれらを再現するとともに、100歳を超える突出した長寿の背景には特徴的なDNAメチル化状態が存在することを明らかにしました。

続いてエピゲノムワイド関連解析（Epigenome-wide association study ; EWAS）<sup>\*12</sup>により TMM 計画参加者の20歳から79歳の方々に年齢に沿って高メチル化が進む408 CpG サイトと低メチル化が進む1,701 CpG サイトを検出しました。これらのCpGサイトの多くは、百寿者においても加齢に沿った高メチル化または低メチル化を示しました（図2 a）。一方で、百寿者でDNAメチル化が若い状態に維持されているCpGサイトや（図2 b, c）、逆にDNAメチル化の変化が加速しているCpGサイトも発見されました（図2 d）。さらに、94名の百寿者に特徴的なCpGサイトを抽出し、機能の意味づけを行いました。その結果、百寿者で若い状態に維持されているCpGサイトの多くは、がん遺伝子や、がん抑制遺伝子の近傍に集まっていること、逆にエピゲノム状態変化が加速していたCpGサイトの多くは免疫関連遺伝子の近傍に集まっていることが明らかになりました（図3）。

タンパク質機能に着目したネットワーク解析の結果、百寿者で若く維持されていたCpGサイトはがんのほか、認知機能に関わる領域にも存在することが示されました。この結果は、がん罹患や認知機能の低下を示さないという百寿者の典型的な特徴を説明できます（図4 a）。一方で老化方向にエピゲノム変化が加速していたCpGサイトはTGF- $\beta$ シグナル伝達の活性化に関与する領域に存在することが示されました（図4 b）。さまざまな加齢性疾患は慢性的な炎症が関与していると考えられていることから、抗炎症作用を有するTGF- $\beta$ は、Successful aging<sup>\*13</sup>において重要な役割を担っていると考えられます。この結果は、若いエピゲノム状態を保つことだけでなく、加齢に伴って、より老化が進むエピゲノム変化の重要性を示唆しています。

また、百寿者において老化方向に進んでいたこれらのCpGサイトは、一般的なエピゲノム時計では考慮されにくく、若い状態を保つことの重要性が過大評価されている可能性も示されました。

以上の結果から、本研究により日本人に適したエピゲノム年齢推定法（エピゲノム時計）を確立できたこと、さらに百寿者のエピゲノム年齢解析により、健康長寿に関連するCpGサイトを明らかにすることができました。

## 【まとめと展望】

百寿者においては、がんや認知機能に関わるゲノム領域のエピゲノム状態が若く維持されていた一方で、抗炎症に関わる領域では老化が進んだような状態にあることが明らかになりました。

若い状態を保つことが健康状態の維持に重要であると広く考えられていますが、加齢を止めることはできません。本研究では若く保たれるゲノム領域に加えて、加齢に伴って特定のエピゲノム領域がより老化が進んだ状態になることの重要性を示しました。

今後は、本研究で開発したエピゲノム時計を指標にした健康長寿を達成するための生活習慣改善や予防方法の開発が期待されます。

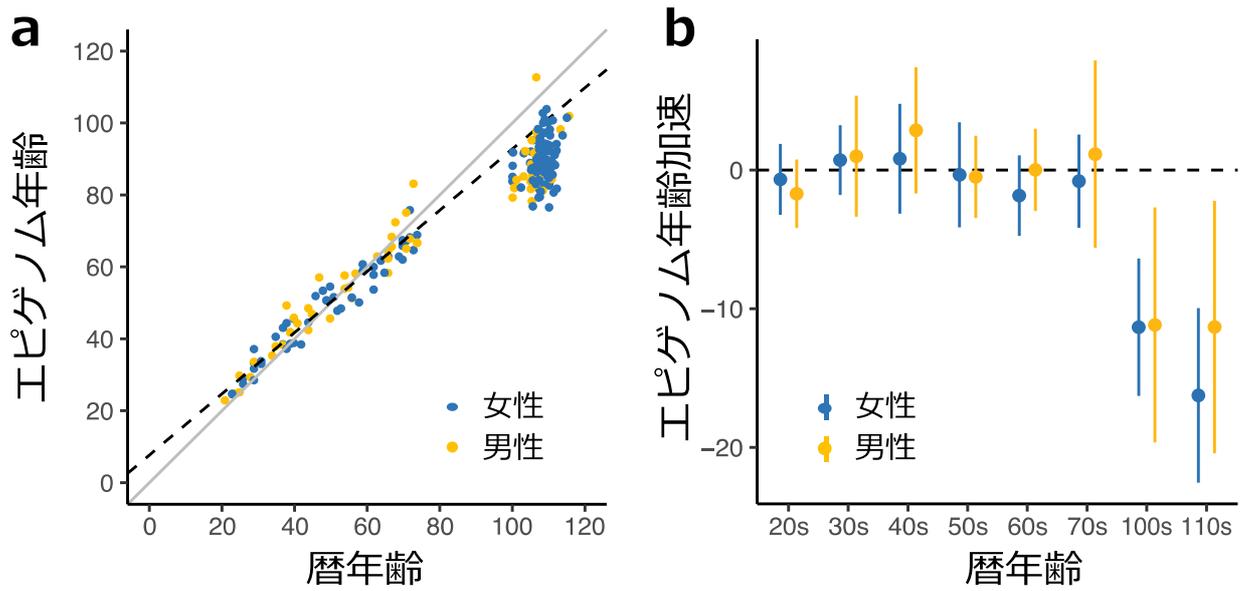


図1. エピゲノム状態から計算したエピゲノム年齢と暦年齢との関係。

(a) エピゲノム年齢と暦年齢の関係。(b) 暦年齢に対するエピゲノム年齢の逸脱。負の値はエピゲノム年齢が若い状態を示す。

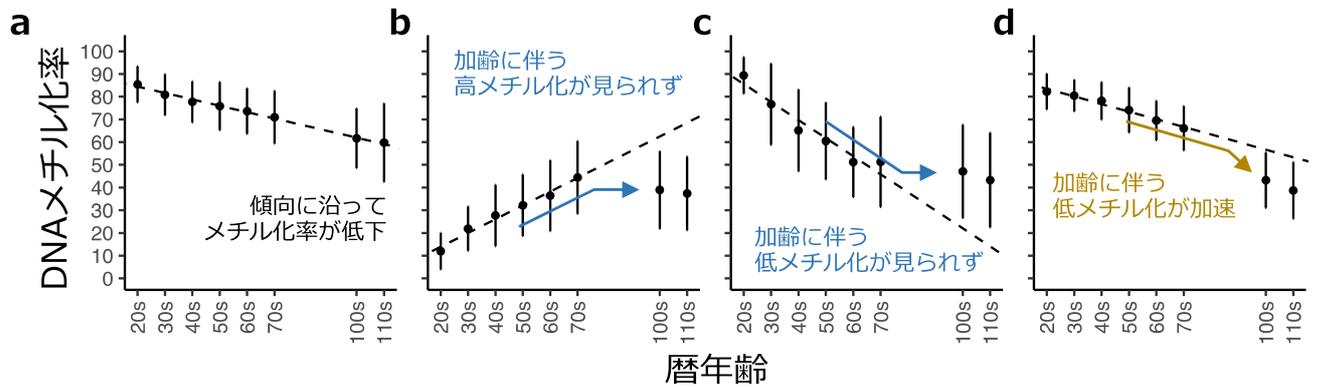


図2. 本研究で注目した CpG サイトの代表例。

(a) 百寿者の DNA メチル化率が 20 歳から 79 歳で見られる低メチル化の傾向に沿っている CpG サイト。(b) 百寿者で加齢に沿った高メチル化が見られず、若い状態に維持されていた CpG サイト。(c) 百寿者で加齢に沿った低メチル化が見られず、若い状態に維持されていた CpG サイト。(d) 百寿者で、加齢に沿った傾向より低メチル化が加速していた CpG サイト。

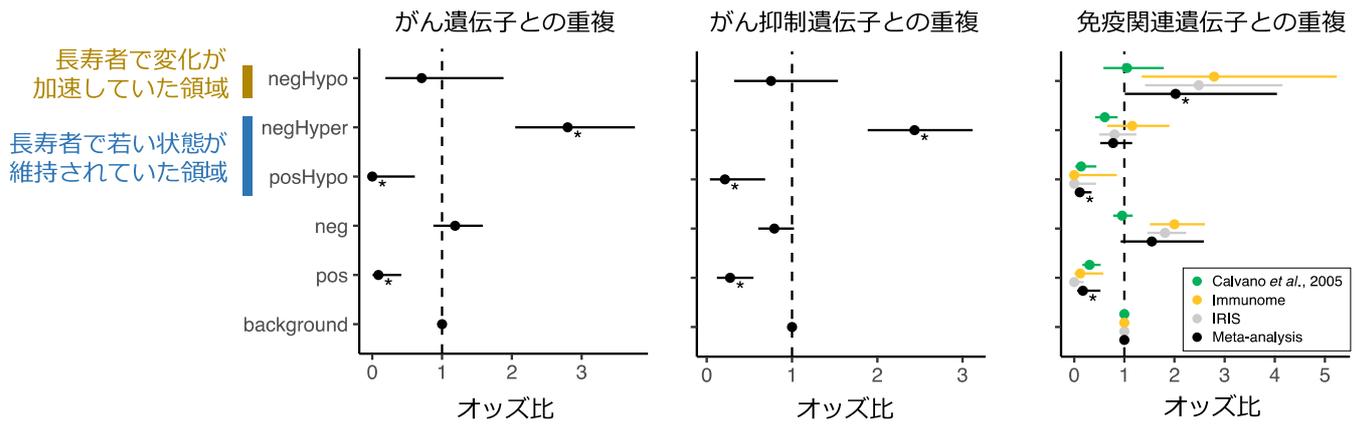


図3. 百寿者で特徴的なエピゲノム状態が観察された領域の特徴。

百寿者で若いエピゲノム状態が維持されていた領域にはがん遺伝子やがん抑制遺伝子が多く含まれ、百寿者でエピゲノム状態の変化が加速していた領域には免疫関連遺伝子が多く含まれていた。

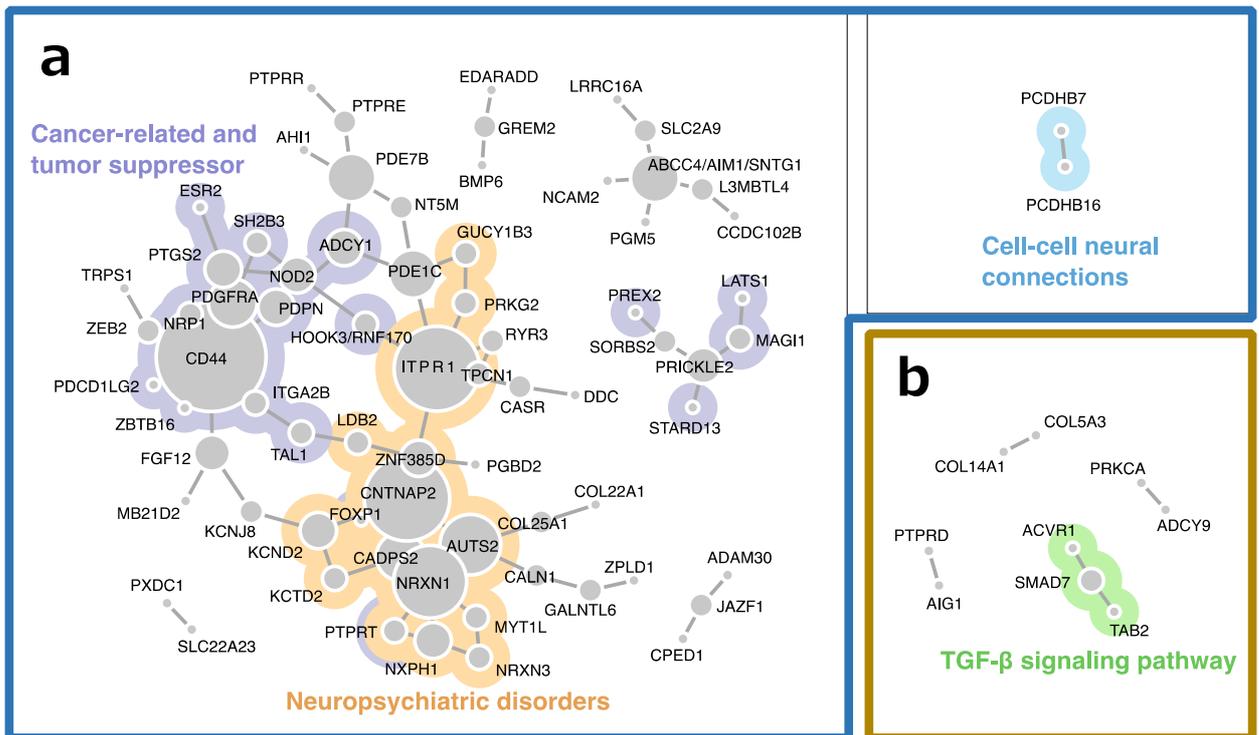


図4. 百寿者で特徴的なエピゲノム状態が観察された遺伝子にコードされるタンパク質の特徴。

(a) 百寿者で若い状態に維持されていた遺伝子に基づいて作成したタンパク質ネットワーク。

(b) 百寿者においてエピゲノム変化が老化方向に進んでいた遺伝子に基づいて作成したタンパク質ネットワーク。隣接するタンパク質間で共通する特徴に基づいて色分けしている。

## 【用語解説】

### \*9 CpG サイト :

C と G の 2 塩基が連続して並ぶ DNA の領域を CpG サイトと呼びます。CpG サイトは DNA のメチル化を受けやすい部位として知られています。

### \*10 ターゲットバイサルファイトシーケンス (Targeted-bisulfite sequencing; TB-seq) :

DNA メチル化解析方法の 1 つです。全ゲノム中に約 3,200 万ヶ所以上存在する CpG サイトのうち、数十万～数百万ヶ所を対象に DNA メチル化解析を行うことができる方法です。本研究では、IMM が独自に設計し、アジレントテクノロジー社が作成した試薬を使用して DNA メチル化解析を行いました。

### \*11 エピゲノム年齢加速の評価 :

エピゲノム年齢と暦年齢の単純な差に基づいて老化状態を評価する以外に、測定値に影響する因子を加味した評価方法も存在します。たとえば血中の細胞種組成（単球や CD4 陽性 T リンパ球など）が変化することで見かけ上の DNA メチル化率が変化することから、本研究では細胞種組成を加味したエピゲノム年齢の進み具合（加速状態）の評価を行いました。

### \*12 エピゲノムワイド関連解析 (Epigenome-wide association study ; EWAS) :

EWAS とは、主に疾患や生活習慣と関連して DNA メチル化状態が変化する CpG サイトを探索する手法です。これにより、これまでも多くの DNA メチル化バイオマーカーが見つかっています。

### \*13 Successful aging :

不老不死とは異なり、人間は老化するものであることを前提とし、身体的・精神的に良好な状態で天寿を全うすることに焦点を当てた概念です。