

皮膚細胞ゲノムのメチル化測定による加齢マーカーの開発

東海大学医学部

今西 規

With the aim of developing molecular markers that can be applied to quantitatively assess skin cell ageing, we planned to carry out genomic analysis of skin epidermal cells sampled from a large number of subjects. Here we focused on the 'epigenetic clock', a method to estimate human ages based on methylation status of the genomes. Although various epigenetic clocks have been developed for various organs for people in Western countries, these are expected to have large errors if applied to the Japanese skin data. So, it is necessary to collect original epigenetic data and develop a formula for estimating ages suitable for Japanese skin tissue. The resulting age estimator is expected to be of use not only in the cosmetology field, but also in various fields such as forensic medicine and physical anthropology. As this study has been significantly delayed from its original plan and is still ongoing, the main results of the study will be published elsewhere in the future. In this paper, we present the results of verification experiments on each technical element that was required to complete this research. Specifically, we report the evaluation of sampling methods that allow samples to be taken without contact between the subject and the experimenter, a comparison of the collection efficiency of five different sample types, and the results of trial measurements of bacterial flora that is possibly associated with aging. After several trial experiments, we have achieved a situation where we can use these technologies consistently. The collection and analysis of samples for this study is currently underway. In the near future, the main objective of this study -the development of ageing markers for skin- should be achieved.

1. 緒言

1.1. 研究の背景と目的

ヒトゲノムのメチル化とは、CpG配列のC(シトシン)にメチル基(-CH₃)が付加される反応である。遺伝子領域のメチル化は遺伝子発現制御のための重要な機構のひとつである。メチル化の状態はヒトの発生初期にリセットされ、その後は加齢とともに徐々に変化するが、一部のサイトは年齢に正確に比例してメチル化度(メチル化を受けたDNAの割合)が増加または減少する。このことを利用して、ヒトゲノム上のCpGサイト353ヶ所のメチル化度からヒトの年齢を推定する手法が開発された¹⁾。2018年には皮膚や血液などの組織を対象とした改良版のメチル化年齢推定法が提唱され、予測精度が向上した²⁾。このメチル化年齢(DNA methylation age)は加齢の分子マーカーとして脚光を浴びており、各種疾患との関連や再生医療・加齢研究などへの応用について現在も精力的に研究が行われている。

一方で、この手法には欠点もある。第一に、多数のCpGサイトのメチル化度を測るためにはメチル化測定用アレイを用いた実験が必要であり、実験のコストが非常に高い。



Development of molecular marker for aging based on epigenetic changes of skin cells

Tadashi Imanishi

Tokai University School of Medicine

第二に、メチル化年齢の推定式は主に欧米人のデータを使って作成されたため、日本人にもそのまま適用できるのかどうかは十分に検証されていない。そこで本研究では、できるだけ低コストの実験手法で、かつ正確な年齢推定ができる新しい方法の開発をめざしている。さらに、この手法を日本人の皮膚試料に適用し、予測精度の検証と新たな年齢推定式の開発を行うことをめざしている。

皮膚の加齢に関する新たな分子マーカーを開発することは、コスメトロジー分野の発展のために必要である。コスメトロジー分野にはアンチエイジング効果を謳う化粧品やサプリメント食品が数多くあるが、その科学的なエビデンスは明確でないことが多い。本研究により皮膚の加齢分子マーカーを確立することができれば、アンチエイジング効果を客観的に評価できるようになり、分野の発展に大きく貢献できると期待される。

1.2. 検証実験の目的

本研究では皮膚の加齢マーカーを作ることを目的として、多くの被験者から試料を採取する計画である。しかし、開発する年齢推定法は将来的に法医学分野で広く活用できることが望ましいので、皮膚だけでなく他の非侵襲的に採取できる試料についても、可能な範囲で同時に試料を収集することにした。そこで本研究では、皮膚表皮細胞に加えて爪、毛髪、唾液、口腔内粘膜について実際のサンプリングを行い、DNA抽出効率の検証を行う。また、本研究では、新型コロナウイルス感染症の流行が完全に終息していない状況下で、感染事故を決して起こさないような安全な方式で試料採取を行うことが必要とされた。そのため、実験

者が接触せず、被験者自身で採取を行うことを前提として、試料の採取方法を作成することにした。

本研究の後半部分では、皮膚の表皮細胞のメチル化年齢を推定するとともに、同じ被験者の皮膚細菌叢を調べる計画である。メチル化年齢はさまざまな疾患群で実年齢と大きくずれることや、状況によってはメチル化年齢が加速する現象も知られている³⁾。そこで、メチル化年齢と細菌叢の関連を明らかにすることを目的としている。ここでは方法論が機能することを検証するための試験的な細菌叢解析を行った。

2. 方法

2.1. 皮膚表皮細胞のサンプリングとDNA抽出

既報⁴⁾を参考に、表皮細胞のサンプリングには2種類の方法を用いた。ひとつは市販の洗顔シート、もうひとつはエタノール消毒綿である。それぞれを使って、被験者自身で皮膚の一定面積を拭っていただいた。この洗顔シートまたはエタノール消毒綿を被験者自身で15mL遠沈管に入れた。その後、実験者側で蒸留水4mLを添加しボルテックスで20秒混和したのち、30分静置した。次にボルテックスで20秒混和し、遠沈管内でシートを絞った。その後遠心条件2000G×1分間で遠心分離した後、上清を廃棄し沈降物のみを使用した。ここからのDNA抽出にはQIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN社) を使用し、製造者の提供するプロトコルにしたがって操作を行った。

2.2. 爪および毛髪のサンプリングとDNA抽出

毛髪については毛根あり、毛根なしの2種類の材料を用意した。いずれも1cmの長さにそろえた。これをQIAamp DNA Investigator Kitを使用して、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの処理を行った。proteinase Kによる酵素処理のステップは、56℃で3時間に変更した。

爪は「爪切り」で切り取り、組織破碎・細胞破碎などの特別な処理を行わずにそのまま、またはヤスリを用いて粉末化して使用した。QIAamp DNA Investigator Kitを使用して、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの処理を行った。proteinase Kによる酵素処理のステップは、目視により完全に溶けるまで行った。

2.3. 唾液および口腔内粘膜細胞のサンプリングとDNA抽出

唾液は被験者自身で10mLチューブに入れ、実験者に渡す方法をとった。DNA抽出にはQIAamp DNA Investigator Kitを使用した。

口腔内粘膜細胞は、専用の綿棒 (Isohelix Swab SK-2S, Isohelix社) を用いて採取を行った。被験者自身で口腔内

の右頬内側および左頬内側を各50回ずつこすり、キットに添付のチューブに格納して実験者に渡す方法をとった。その後はIsohelix Buccalfix Plus DNA Isolation Kit (BFP-50, Isohelix社) を用いて、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの操作を行った。

2.4. 細菌叢解析

各試料から抽出したDNAに対して、細菌の16S rRNA遺伝子のほぼ全長を増幅できるユニバーサルプライマーS-D-Bact-0008-c-S-20およびS-D-Bact-1391-a-A-17を用いてPCRを行った。このプライマーセットには実績があり、20種のバクテリアゲノムの混合物をほぼ均一の割合で検出することに成功している⁵⁾。塩基配列の決定にはMinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies社、以下ONT社) を使い、フローセルにはFlow Cell R9.4.1 (FLO-MIN106D, ONT社) を使用した。複数のサンプルを一度のランで解析するため、Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004, ONT社) によってサンプルにバーコードを付加しつつ塩基配列を決定した。得られたデータをMinION専用のベースコーラーであるGuppy version 3.2.8 (ONT社) で塩基配列に変換した。個々の配列の種同定と集計には、クラウド上でメタゲノム解析ができるEPI2ME (ONT社) とGenomeSync-GSTKシステム⁶⁾を使用した。

3. 結果

3.1. 皮膚表皮細胞のサンプリングに関する条件検討

同一人物の顔の右頬と左頬から、2種類の方法 (A: 市販の洗顔シート、B: エタノール消毒綿) で皮膚表皮細胞を採取した。いずれのサンプリング方法を用いても遠心後の溶液は白濁し、沈殿物が認められた。つまり表皮細胞が採取できていることが確認できた。また、それぞれの最終的なDNA抽出量は、A: 0.144ng/μL、B: 0.374ng/μLであった (表1)。この結果から、いずれの方法でもゲノム解析に用いるには十分なDNA量が得られるが、エタノール消毒綿を使用する方が効率的にDNAを回収できることが判明した。

表1 条件検討に用いたサンプルとDNA収量 (液量 50μL)

サンプル	DNA濃度 (ng/μL)
皮膚A (洗顔シート)	0.144
皮膚B (エタノール消毒綿)	0.374
毛髪C (毛根を含む)	0.195
毛髪D (毛根を含まない)	0.0079
爪E (そのまま)	1.12
爪F (粉末)	0.0911

3. 2. 毛髪および爪のサンプリングに関する条件検討

同一人物の毛髪 10mm からの DNA 抽出を試みた。proteinase K による酵素処理のステップでは、毛根を含む毛髪 (サンプル C) と毛根を含まない毛髪 (サンプル D) のいずれのサンプルも 3 時間のインキュベーションで全て溶け切っていた。それぞれからの DNA 回収量は、C : 0.1950ng/μL、D : 0.0079ng/μL であった (表 1)。両者には 25 倍の差がある。毛根があれば数本で十分な DNA を回収できるのに対し、毛根がない場合はかなりの長さあるいは多くの本数が必要と考えられた。

左手の第一指 (親指) から爪を切りそのまま使用したもの (サンプル E、8mg) と、爪を粉末化したもの (サンプル F、2mg) について、DNA 抽出を行った。そのまま使用したサンプル E は 24 時間の酵素処理で半分ほど溶け残っていたのに対し、粉末化したサンプル F は 3 時間で完全に溶けていた。抽出された DNA 量はサンプル E では 1.12ng/μL であったのに対し、サンプル F では 0.0911ng/μL であり、収量には 10 倍以上の差があった (表 1)。いずれの方法でも解析に十分な量の DNA が得られるが、酵素処理時間は overnight とすることが望ましいと考えられた。

3. 3. 唾液および口腔内粘膜細胞のサンプリングと細菌叢解析に関する条件検討

試験的に唾液と口腔内粘膜細胞の採取を行い、さらに DNA 抽出を行ったところ、いずれも高濃度で DNA が抽出できることを確認した。

3. 4. 細菌叢解析の試験的实施

皮膚と唾液から抽出した DNA について、細菌叢解析を試験的に実施した。塩基配列決定は問題なく実行できたが、ライブラリとして使用した DNA 量を少量に制限したため得られた read 数は皮膚が 12 本、唾液が 339 本であった。それぞれの塩基配列データを EPI2ME ソフトウェアによって種同定し、生物種の系統樹とともに表示した (図 1 および図 2)。塩基配列決定に使用した DNA シークエンサーがロングリードを決定できるタイプであるため、種レベ

ルでの分類が可能であった。なお、GenomeSync-GSTK システムを用いた細菌叢の解析でも、EPI2ME と一致する結果が得られた。皮膚の細菌叢解析では、皮膚の常在菌として知られている表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) やアクネ菌 (*Cutibacterium acnes*) などが検出された。唾液の細菌叢解析では、口腔内の常在菌である *Streptococcus salivarius* をはじめとする Streptococcus 属

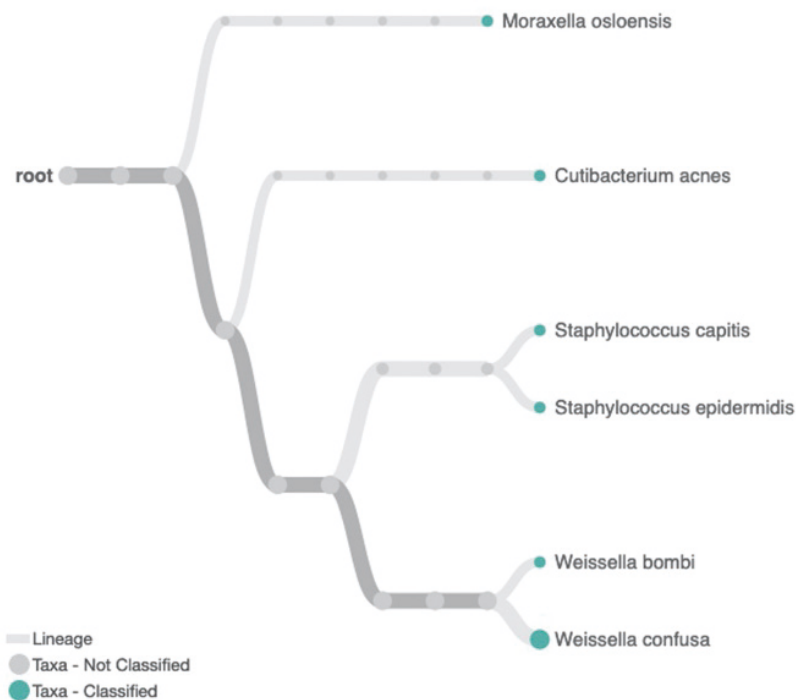


図 1 皮膚細菌叢の解析例。検出された主要な細菌を種レベルで表示した。

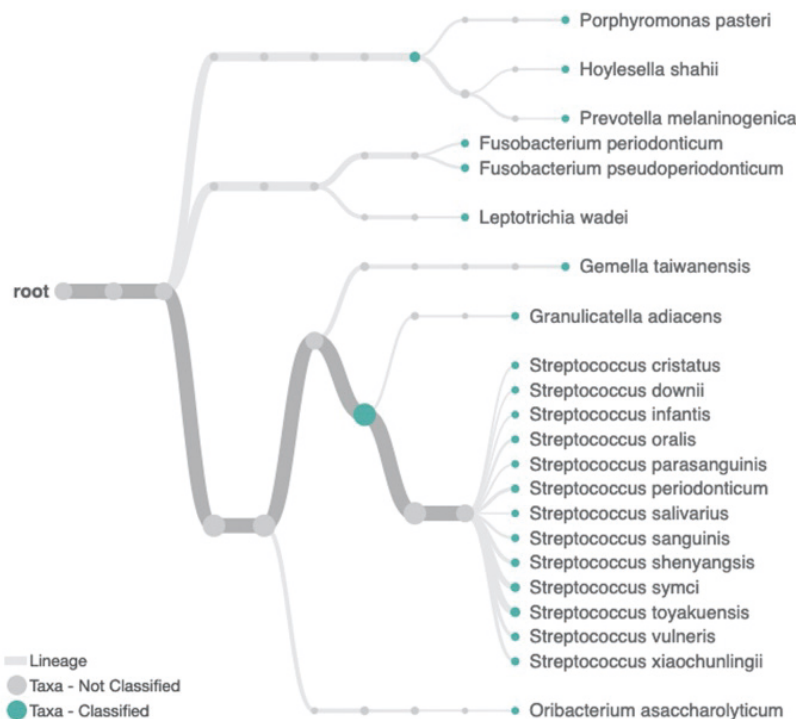


図 2 唾液細菌叢の解析例。検出された主要な細菌を種レベルで表示した。

の細菌が優勢であった。また、皮膚細菌叢と比較すると大きな多様性を持つことも示唆された。以上の結果から、皮膚および唾液（口腔内）の細菌叢に関するデータを問題なく取得できることを確認できた。

4. 考察

4.1. 方法論の検証結果について

冒頭でも述べたように、本研究は皮膚表皮細胞をターゲットとしたメチル化年齢推定法の開発を目的としている。しかし、他の部位についても同時に試料を得ることが望ましい。そこで、どの試料が効率的に採取可能であるかを検討するために検証実験を行った次第である。まず、皮膚表皮細胞のサンプリングについては問題なく実施できることを確認できた。メチル化状態の測定と細菌叢の解析のいずれの目的に対しても、必要なDNA量を取得することができると考えられた。一方、毛髪についてはDNAの収量に問題があった。また、十分なDNA量を確保するためには毛根を含めることが望ましいが、毛根を含む毛髪を採取するには軽微な侵襲が伴う。特に高齢者や女性などでは心理的な抵抗が強いと予想され、被験者の同意を得ることがやや難しいと考えられた。そして爪については、採取も容易で十分な量のDNAを回収可能であるが、試料採取後の処理に時間と手間がかかることが問題である。しかも、爪は組織学的には皮膚の一部であるとみなすことができるので、皮膚とほぼ同じ結果になる可能性もある。そのため優先順位的には低く設定すべきであろうと判断した。以上の考察から、結論としては、本研究では皮膚表皮細胞に加えて唾液と口腔内粘膜細胞を採取することが望ましいと考えた。

これまでに、皮膚の加齢変化と細菌叢の間には「相関」があるという報告がなされている。しかし、両者の因果関係を証明した研究はない。細菌叢は皮膚の水分量や皮脂量などの物理化学的要因によって影響を受けると考えられるので、皮膚の加齢変化と細菌叢の両方に影響する交絡因子が存在することも、十分に考えられる。一方で私は、両者の関係については、細菌叢が原因で皮膚が老化したのではなく、皮膚細胞の老化が原因で細菌叢が変化したのだと予想している。この仮説を証明するためには、メチル化年齢推定法を用いた皮膚細胞の老化状態の評価が決定的な役割を果たすであろう。さらには皮膚だけではなく、口腔内でも同様の現象が観察される可能性がある。本領域の今後の研究成果に期待したい。

4.2. 本研究のこれから

最後に本研究の今後について述べる。本研究はすでに東

海大学医学部臨床研究審査会の承認を受けて、解析が進行中である。試料としては、さまざまな年代の日本人280名の血液由来DNAを取得している。また、20代から70代のボランティア48名から皮膚表皮細胞、唾液、口腔内粘膜細胞を収集する予定である。以上の試料について、ゲノムのメチル化状態を測定する計画である。本稿で述べたように、サンプリングとDNA抽出までの段階については検証実験は完了した。ゲノム解析の方法は基本的には解析キットを利用しつつ bisulfite sequencing によって行うが、target capture 技術を活用して目的とする CpG サイトを濃縮することで、効率的にゲノム解析を実施する方針である。そして得られた配列データは計算機で解析し、メチル化された DNA 分子の割合を求める。以上のデータをそろえたら、次は機械学習により皮膚の年齢推定式を得る。このためのプログラムはすでに準備ができており、問題なく実行できる見通しである。以上の研究が順調に進めば、近い将来に皮膚の加齢マーカーについて発表できる状況になるであろう。

(引用文献)

- 1) Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14 (10):R115. 2013.
- 2) Horvath S, Oshima J, Martin GM, et al. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging* 10 (7):1758-1775. 2018.
- 3) Onizuka M, Imanishi T, Harada K, Aoyama Y, Amaki J, et al. Donor cord blood aging accelerates in recipients after transplantation. *Scientific Reports* 13 (1): 2603. 2023.
- 4) Bjerre RD, Hugerth LW, Boulund F, et al. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. *Scientific Reports* 9 (1): 17287. 2019.
- 5) Mitsunashi S, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Shiraishi Y, Asano K, and Imanishi T. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer. *Scientific Reports* 7: 5657. 2017.
- 6) Kryukov K, Imanishi T, and Nakagawa S. Nanopore sequencing data analysis of 16S rRNA genes using the GenomeSync-GSTK system. *Methods in Molecular Biology* 2632:215-226. 2023.