

## 個人の組織から分離された繊維芽細胞及びそれらから作成されたiPS細胞のエピジェネティッククロック解析

堀江 信之・高橋 和利\*・加治 和彦\*\*

### Epigenetic Clock Analysis of Fibroblasts Prepared From a Single Donor and iPS Cells Derived from the Fibroblasts

Nobuyuki HORIE, Kazutoshi TAKAHASHI, and Kazuhiko KAJI

#### 緒言

ヒトの遺伝情報は、 $3 \times 10^9$ 塩基対の配列として、主に核DNAに保存されている。ゲノムプロジェクトの成功と、その後の次世代シーケンサーの普及により、個人個人の違いも含めた種としてのヒトの遺伝情報の全体像が明らかになりつつある。一方、DNAの配列によらない、世代間の形質の伝達であるエピジェネティックな現象も古くから知られており、最近になって、ヒストンの修飾や、DNAのメチル化がその主な機構であることが明らかになってきた。脊椎動物のゲノムDNAでは、CpGの配列のシトシンのおよそ7割がメチル化を受けている。また、CpGのメチル化は、細胞分裂時にDNA複製に伴って保存されることが知られており、この保存的なメチル化がDNAの発現に影響を与えることで、エピジェネティックな現象の一部が説明できるとされている。エピジェネティックな遺伝現象の代表例としては、ゲノムインプリンティングなどがあるが、このような原則として一生変わらないDNAのメチル化がある一方で、ヒトの一生を通じて変化するDNAメチル化があることも明らかになってきた。

エピジェネティッククロックは、ヒトまたは動物のDNAのメチル化を指標として、その個体の年齢を推測する技術で、DNAのメチル化が、細胞分裂の履歴により、または経時的に変化することを基礎としている。解析技術の進歩により、DNAのメチル化の網羅的な解析が可能となってきた。年齢とともに変化するDNAのメチル化は予想以上に多く見出されており、ヒトゲノム中でDNAメチル化の標的となることが知られている48万箇所の15-29%が加齢に伴い変化している<sup>1,2)</sup>との報告がある。Horvathら<sup>3)</sup>は、353か所のメチル化部位のメチル化の割合から、ヒトの組織や細胞の年齢を推定する方法を確立した。さらに、Weidnerらは、わずか3か所のメチル化の割合から、5.4歳の誤差で年齢推定が可能であることを示した<sup>4)</sup>。

ASF-4細胞は、単一の個人から30年以上にわたり採取された組織から分離された線維芽細胞であり、ヒト個体の老化と細胞老化の関連を研究する上で非常に貴重な細胞である。これまで、提供年齢に対応して、細胞の分裂寿命が短くなり、またテロメア長も短縮することが明らかになっている<sup>5)</sup>。本研究では、この細胞に対して、これまでに知られているエピジェネティッククロックの方法を適用して、推定された年齢と提供年齢との相関性について検討を行うと

\* Staff Research Investigator, Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, University of California San Francisco

\*\* 日本薬科大学・生命医療薬学分野、(株)コーセー・研究顧問

もに、この方法が、DNAメチル化のかかわる老化機構の解明に有効かどうかについて検討した。

## 方 法

### 1. データの取得と統計解析

ASF-4細胞として、表1に挙げた採取年齢の異なる12種の細胞を用いた<sup>5)</sup>。これらのASF-4系列の細胞株は、JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) に寄託されており、研究用細胞株として入手可能である。DNAのメチル化の解析は、illumina社のInfinium Human Methylation 450K BeadChipを用いて行った。また、12種のASF-4細胞より作成した36種のiPS細胞についても同様の方法で解析した。解析したデータをidat形式のファイルで保存したのち、統計解析用ソフトウェアRおよびR上の生物情報解析パッケージであるBioconductorのRnBeads<sup>6)</sup> パッケージを用いて解析を行った。提供年齢に対する、線形モデルによる解析についてはRを基にした統合環境であるChipster<sup>7)</sup>を用いた。線形モデルによる解析における検定および、ASF-4細胞とiPS細胞のメチル化の違いに関する検定には、経験的ベイズ法<sup>8, 9)</sup>を用いた。また、p-値の調整には、Benjamini-Hochberg法<sup>10)</sup>を用いた。年齢推定に用いるメチル化部位の最適化の計算には、Rのleapsパッケージ<sup>11)</sup>を用いた。なお、iPS細胞の作成<sup>12)</sup>及びDNAメチル化解析の実験は、共同研究者の高橋らにより、2010年から2012年にかけて、前任場所である京都大学 iPS細胞研究所 (CiRA Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University) で行われた。

表1 DNAメチル化測定に用いた細胞株

Name	Donor Age (year)	Number of cell lines	Number of iPS cell lines generated from ASF-4 cells
ASF-4-1	36.2	1	6
ASF-4-2	47.5	1	5
ASF-4-3	56.9	2	10
ASF-4-4	62.6	4	8
ASF-4-5	67.4	4	7

DNAメチル化測定に用いた正常繊維芽細胞である、ASF-4系列の細胞とそれから作成されたiPS細胞株の数を示した。また、ASF-4細胞を作成した際の提供年齢 (Donor Age) を示した。

### 2. エピジェネティッククロックによる推定年齢の計算方法

#### (1) Hovarthによる年齢推定

Hovarthらの方法<sup>3)</sup>では、Infinium Human Methylation 450K BeadChipで解析される353部位の $\beta$ 値 ( $\beta$ -value)を用いて年齢を推定している。また、年齢の推定については、式1を用いて、各DNAメチル化部位の $\beta$ 値とメチル化部位に割り当てられた係数の線形結合により $\chi$ の値を計算し、さらに式2を用いて年齢を推定している。これらの式は、RnBeadsに含まれるMethylAgerによる年齢推定でも用いられていた。推定年齢の計算は、文献のsupplement dataに含まれるtutorialに従って計算を行った。また、tutorialには、 $\beta$ 値の処理にあたり、推奨の正規化方法の記載があったため、その正規化を行った数値を用いて年齢の推定を行った。

$$x = a_1 \beta_1 + a_2 \beta_2 + a_3 \beta_3 + \dots \dots \dots (式 1)$$

$a_n$  : coefficients,  $\beta_n$  :  $\beta$ -Value of the DNA methylation sites

$$Age_e = \begin{cases} \chi < 0 \dots (1 + AdultAge) \cdot e^\chi - 1 & \dots \dots \dots (式 2) \\ \chi \geq 0 \dots (1 + AdultAge) \cdot \chi + AdultAge \end{cases}$$

$Age_e$  : Estimated Age,  $AdultAge = 20$

(2) Weidnerによる年齢推定

Weidnerらの方法<sup>4)</sup>では、3か所のDNAメチル化部位の $\beta$ 値より年齢を推定する。年齢の推定は、論文に記載された式を用いてRにより計算した。

(3) RnBeads, MethylAgerによる年齢推定と最適化

MethylAgerによる年齢推定では、既定の解析では761個のDNAメチル化部位の $\beta$ 値より年齢推定を行う。また、計算する際に、Horvathらの方法と同じ数式を用いて年齢を変換したのちに年齢推定を行っていた。また、MethylAgerパッケージに含まれる、試料の年齢データから年齢推定に用いるメチル化部位を選択する機能を用いて、ASF-4細胞、ASF-4細胞から作成したiPS細胞、および全ての細胞の年齢を推定できるメチル化部位を決定した。さらに、Rのパッケージであるleapsに含まれる回帰分析の最適化機能を用いて、細胞の年齢を推定できる最小の数のメチル化部位を決定した。

## 結 果

### 1. ASF-4系列の細胞とその細胞から作成されたiPS細胞のDNAメチル化解析

DNAメチル化部位のデータとして、ASF-4細胞12種、iPS細胞36種から1細胞種について1試料としてデータを得た。DNAメチル化部位の数として、48577か所分のデータを得て、正規化、多型性を示す部位の除去などを行い、最終的に1試料当たり473607か所のデータを得た。(これらのデータの中には欠損値も存在するため、計算する値によってはこれより少ない数となることもある。)これらの部位について、エピジェネティッククロックの計算に用いる $\beta$ 値( $\beta$ -value)と統計処理に用いるM値(M-value)を計算した。 $\beta$ 値は特定の部位のメチル化の割合に対応した値であり、M値は統計処理に向けた値とされている<sup>12)</sup>。 $\beta$ 値の平均は、ASF-4細胞で0.474、iPS細胞で0.490であった。

計算に先立って、まず $\beta$ 値の提供年齢ごとの平均値を求めた。提供年齢ごとの $\beta$ 値の平均は、ASF細胞では、36.2歳から67.4歳の間でほとんど変わらず、0.472から0.475の値(0.474 ± 0.001 [SD])となった。また、iPS細胞でも、もとになった細胞の提供年齢との関連は見られず、 $\beta$ 値の平均値は0.489から0.490の値(0.490 ± 0.0002 [SD])となった。

次に、DNAメチル化部位ごとの $\beta$ 値と提供年齢との相関係数を計算した。ASF-4細胞の相関係数は絶対値の平均が0.288であるのに対し、iPS細胞では0.176となり、ASF-4細胞でより大きい値を示した。正の相関係数を示すDNAメチル化部位と負の相関係数を示すDNAメチル化部位の割合について検討したところ、相関係数が正であるメチル化部位の割合は、ASF細胞とiPS細胞で、それぞれ、42.6%と52.1%であった。相関係数の大きさ、正負の割合は、ASF-4細胞、iPS細胞で大きな違いはなかったが、分布には差があり、相関係数の絶対値が0.7以上となるDNAメチル化部位の割合は、ASF-4細胞でより高く4.12%だったのに対し、iPS細胞では、

0.014%であり、ASF-4細胞とiPS細胞では100倍以上の差があった。

以上より、DNAメチル化の割合の平均 ( $\beta$  値) は、ASF-4細胞とiPS細胞でほぼ変わらず、iPS細胞がやや高い値を示し、それぞれの細胞で提供年齢による差は見られないことが分かった。一方、提供年齢との相関性で見ると、正及び負の相関係数を示す部位の割合に大きな差は見られなかったが、ASF-4細胞で、より大きい相関係数を持つDNAメチル化部位の数が多いことが分かった。

以上をさらに確認するために、M値を用いて、提供年齢とDNAメチル化の関係を、線形モデルを用いて解析した。その結果、提供年齢と有意な関連を示すメチル化部位の割合は、ASF-4細胞で0.399% (1888/473195, 調整p-値<0.05), iPS細胞で0.286% (1355/473195, 調整p-値<0.05), ASF-4細胞とiPS細胞を含む細胞全体で0.0104% (48/473195, 調整p-値<0.05) となり、ASF-4細胞, iPS細胞, 全体の細胞の順で提供年齢との関連がみられることが示された。

次に、ASF-4細胞とiPS細胞でのメチル化状態の違いについて検討した。iPS細胞を作成する際には、DNAのメチル化が大きく変化し、特に脱メチル化が重要であるとされている<sup>14)</sup>。今回の解析では、提供年齢との相関性に差がみられたが、メチル化の割合は、ASF-4細胞とそれから作成したiPS細胞で大きな差がみられず、 $\beta$  値で比較した場合は、むしろiPS細胞の方がメチル化の割合が大きい結果が得られた。そこで、ASF-4細胞とiPS細胞でメチル化の状態が異なるかどうかを、M値を用いて検討した。その結果、81.2% (384107/473195, 調整p<0.01) の部位でメチル化に有意な差が存在した。このことから、今回用いた細胞でも、iPS細胞の生成に伴い部位ごとのメチル化状態は大きく変化していることが示された。また、ASF-4細胞からiPS細胞が生ずる歳のメチル化変化については、iPS細胞でメチル化の割合が減少する部位の割合が、上記の有意差のある部位で61.9% (237697/384107) となり、ASF-4細胞とiPS細胞を比較すると、平均のメチル化の割合は、iPS細胞でやや高く、iPS細胞が生じるときの変化では、脱メチル化が起こる部位の方が多いという結果となった。

## 2. 既存の方法による年齢推定

DNAメチル化部位を用いた既存の3種の年齢推定による結果を表2および図1に示す。Horvathらの方法では、白血球を含む多くの組織について、およそ3.6歳の誤差で年齢が推定できるとされている<sup>3)</sup>。結果を見ると、正常組織に近いと考えられるASF-4でも、誤差が17.40年 (RMSE) となり、あまり良い推定はなされていなかった。

Widnerらの方法では、白血球細胞について3か所のメチル化部位からおおよそ5歳の誤差で年齢が推定できるとされている<sup>4)</sup>。今回の結果では、正常組織に近いASF-4でも誤差が、27.10年 (RMSE) となり、Horvathの方法と同様にあまり良い推定とはなっていない。

表2. 年齢推定による誤差

Epigenetic Clock	Horvath et. al. (2013)	Weidner et. al. (2014)	MethylAger (default)
ASF-4 cells	17.40	27.10	23.91
iPS cells	56.78	46.34	56.99
All	49.94	42.27	50.78

既定のエピジェネティッククロックの方法で年齢を推定し提供年齢との誤差を求めた。誤差は、RSME (root mean square error) で示した。

MethylAgerの既定のメチル化部位での年齢推定もASF-4の場合の誤差が23.91年となり、既存の3種の方法はASF-4の場合に適応した場合、あまり良い推定年齢を与えないことが明らかとなった。

ASF-4細胞の提供年齢と推定年齢の相関係数についても、いずれの場合も0.21-0.32となり、全体として、あまり良い相関が見られなかった。iPS細胞での年齢推定についても、3種の方法とも提供年齢との相関は得られず、さらに、Horvathらの方法では、推定された年齢の平均が0.35歳±0.11 (SD)、MethylAgerでの推定で-0.56歳±0.04 (SD) となり、いずれも0歳に近い値が得られた。Horvathのエピジェネティッククロックによる年齢推定では、iPS細胞の推定年齢が0歳付近となることが知られている<sup>3)</sup>ので、これに近い結果が得られたものと考えられる。

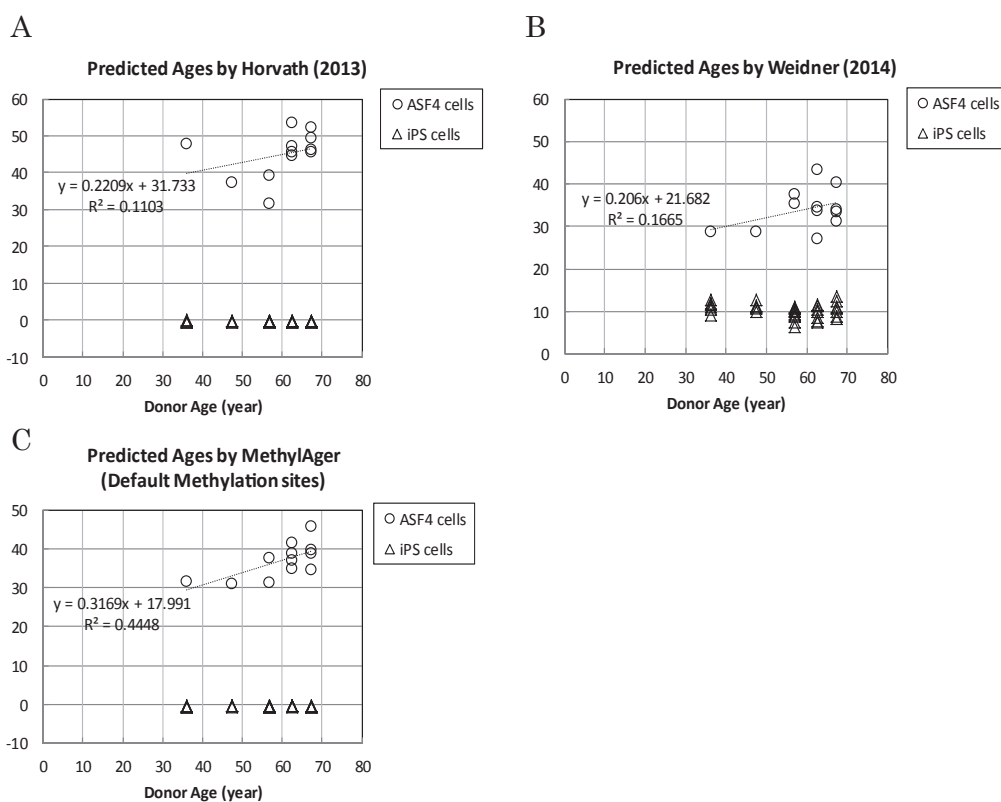


図1. 既存の方法を用いたエピジェネティッククロックの計算結果

既存の方法を用いたエピジェネティッククロックの方法を用いて、各細胞の年齢推定を行った。A, Horvathらによる方法；B, Weidnerらによる方法；C, MethylAgerによる年齢推定。グラフ中の点線はASF-4-1からASF-4-5系列の細胞のDonor Ageと推定年齢の回帰直線を示し、数式はその回帰式を示す。

### 3. RnBeads, MethylAgerによる年齢推定の最適化

既存の方法で、あまり良い年齢推定が行えなかったので、MethylAgerの機能を用いて、年齢を推定するメチル化部位の最適化を行った。その結果、ASF-4細胞では24個、iPS細胞では、30個、ASF-4とiPS細胞を含む細胞全体では66個のメチル化部位が選ばれた。それぞれのメチ

ル化部位を用いた推定年齢の誤差は、ASF-4細胞で2.71年、iPS細胞で3.32年、ASF-4とiPS細胞を含む全細胞で0.59年（いずれもRMSE）となり、いずれの細胞集団においても適切なメチル化部位を用いることにより、精度の高い年齢推定が可能となった。ただし、場合によっては、試料数以上のメチル化部位が選ばれてしまうため、偶然の一致で精度が上がっている可能性が否定できなかった。そこで、得られたメチル化部位について説明変数の最適化を行い、説明変数（DNAメチル化部位の $\beta$ 値）の数を減らしながら残差平方和が最も小さくなる組み合わせを選ぶ方法で、年齢推定が行える最小のDNAメチル化部位を決定した。計算には、Rのleapsパッケージにあるregsubsets関数を用いた。また、推定年齢の計算は、MethylAgerでの推定と同様に、Horvathの方法でも用いられている式1、式2を用いて行った。その結果、ASF-4細胞では3つのメチル化部位、iPS細胞と、ASF-4細胞およびiPS細胞を含む全細胞については、8つのメチル化部位を用いることにより、それぞれ0.71年、5.70年、1.89年（いずれもRMSE）の誤差で年齢推定が可能であることが分かった。この過程で得られたメチル化部位の数と、それぞれの細胞集団に対する推定年齢の誤差を表3に、推定年齢のグラフを図2に示す。また、選ばれたメチル化部位を表4に示す。

表3. 最適化された8か所、4か所、3か所のメチル化部位の $\beta$ 値を用いた年齢推定による誤差

Cell Line for Optimization	ASF-4 Cells			iPS Cells			All Cells*			
	8	4	3	8	4	3	8	4	3	
Number of Methylation sites										
Errors in Predicted Ages (RMSE)	ASF-4 Cells	0.01	0.41	0.71	15.58	21.67	25.40	1.82	4.23	4.89
	iPS Cells	11.70	10.72	15.58	5.70	8.04	9.08	1.91	4.49	5.00
	All Cells*	10.13	9.28	13.50	9.22	12.88	14.94	1.89	4.43	4.98

\* ASF-4 and iPS Cells

それぞれの推定年齢と提供年齢の誤差をRMSEで示した。

## 考 察

### 1. ASF-4細胞についての各種方法による年齢推定

ASF-4細胞は、健常な個人から採取された皮膚組織から作成された繊維芽細胞である。核型も正常組織と一致し、また採取年齢に対応した細胞寿命を持つなど正常組織のモデルと考えることができ、遺伝的背景および環境が一定であることから、ヒト個体のあるいは細胞老化を研究する際の理想的な材料と考えられる<sup>5)</sup>。DNAのメチル化と個体の老化の関連が深いことは、古くから知られている。実際に年齢と相関性を示すDNAメチル化部位がどの程度あるかについては15-29%との報告があるが、今回のASF-4細胞のデータでは、相関係数の絶対値として0.5以上の部位が16.7% (78698/470401) あり、以前の報告と一致している。しかし、平均としてのメチル化の割合は、提供年齢に依存して変化しておらず、提供年齢に依存したメチル化、脱メチル化が同程度起こっていると考えられる。

今回、既存のエピジェネティッククロックによる年齢推定を行った結果、正常組織に近いと考えられるASF-4細胞でも、これらの方法ではあまり良い年齢推定が行えなかった。Weidnerらの方法は、もともと血球細胞を対象とした方法であるため、組織による違いが考えられる。一方、Horvath, MethylAgerの方法は多くの組織に適応可能とされているため、組織と培養細胞の違い、あるいは遺伝的背景や環境の差を反映している可能性が考えられる。DNAメチ

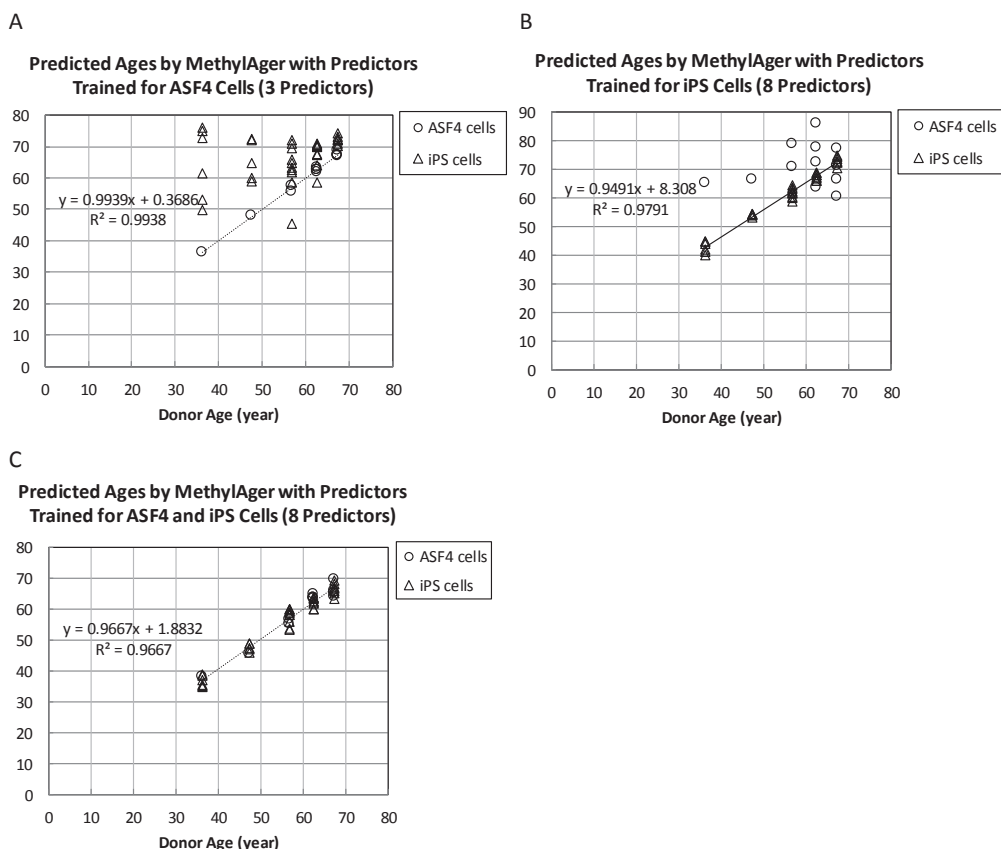


図2. 最適化したメチル化部位を用いたエピジェネティッククロックの計算結果

MethyAgerで年齢推定に用いるメチル化部位を最適化したのち、さらにメチル化部位の数を減らして、エピジェネティッククロックの計算を行った。A, ASF-4細胞に最適化された3つのメチル化部位を用いた年齢推定の結果。ASF-4細胞の提供年齢と推定年齢についての、回帰直線と回帰式を示した。B, iPS細胞に最適化された8つのメチル化部位を用いた年齢推定の結果。iPS細胞を作成した細胞の提供年齢と推定年齢についての、回帰直線と回帰式を示した。C, すべての細胞（ASF-4細胞及びそれらから作成されたiPS細胞）に最適化された8つのメチル化部位を用いた年齢推定の結果。全ての細胞の提供年齢（iPS細胞の場合は、その作成元となった細胞の提供年齢）と推定年齢についての、回帰直線と回帰式を示した。

ル化については、双子を用いた研究から、遺伝的背景の影響は小さいと考えられているが<sup>15)</sup>、民族差などについては今後検討する必要があると考えられる。また、DNAメチル化の解析方法自体も、年齢推定の目的からは最適化する余地が考えられる。網羅的なDNAメチル化については、illumina社のhuman methylation beadsを用いた方法が標準的な方法となっているが、データ処理の過程での正規化の方法や、正規化を行うデータセットにより、 $\beta$ 値の絶対値が変動することが知られており、実際今回の解析でも用いるデータセットが変わると異なる推定値を与えることが観察された。Horvathのエピジェネティッククロックのtutorialには、推奨される正規化方法の手順が示されており、エピジェネティッククロックの方法を一般化するためには、データ処理の方法も含めて標準化する必要があると考えられる。

今回のデータでは、特にASF-4細胞について、年齢推定に用いるメチル化部位を選びなおすことにより高精度の年齢推定が可能であることが示された。事前の統計解析により、ASF-4細胞では、特に $\beta$ 値と提供年齢の相関性が高いことや、相関係数の高いDNAメチル化部位が多

数存在することが示され、このことが原因の一つと考えられる。実際、選ばれたメチル化部位の相関係数を見ても、iPS細胞や、ASF-4細胞とiPS細胞を合わせた全ての細胞に比べ、ASF-4細胞で特に高い値となっていた。(表4)

表4. 最適化した年齢推定のためのメチル化部位とその機能情報

Cell Type	No.	Probe ID	Correlation Coefficient	Gene Symbol	Function Annotation	
					Enhancer	Promoter
ASF-4 Cells	1	cg09045105	-0.928	BOLA1	TRUE	
	2	cg14765959	-0.953			
	3	cg25206071	0.966	IL19		
	4	cg13992382	0.939	NAV1	TRUE	
	5	cg06354193	0.916	PRDM16		
	6	cg09972762	0.955	CPT1A		
	7	cg16718760	-0.943	ERC2	TRUE	
	8	cg27113856	0.957	PSPC1	TRUE	
iPS Cells	1	cg10287301	-0.705	UBFD1		TRUE
	2	cg18699287	-0.600			TRUE
	3	cg22835630	-0.700	SNORD115-29		
	4	cg10813544	-0.752			
	5	cg03655016	0.778			
	6	cg07067171	-0.749	FKBP9		TRUE
	7	cg08475257	-0.679	SF3B2		TRUE
	8	cg14595059	-0.718	ATAD5		TRUE
All Cells (ASF-4 and iPS Cells)	1	cg10209083	0.605		TRUE	
	2	cg14334965	0.710	YY1		TRUE
	3	cg18699287	-0.469			TRUE
	4	cg11635074	-0.602	VPS25		TRUE
	5	cg06144080	-0.659	EDEM2		TRUE
	6	cg17108748	-0.600	FLJ40330		
	7	cg23279355	-0.588	CMYA5	TRUE	
	8	cg24797508	-0.501	PIK3R1		

ASF-4細胞、ASF-4細胞より作成したiPS細胞および両者の細胞について、年齢推定を行うためのメチル化部位を決定した。決定されたメチル化部位のillumina社によるID番号と、その部位の $\beta$ 値と提供年齢との相関係数を示した。それぞれの細胞ごとに、8種の部位を選定し、さらに、No.1-4で示した部位、およびNo.1-3で示した部位を用いて、推定年齢(エピジェネティッククロック)の計算を行った(表3参照)。さらにそれぞれの部位について、公共データベースに登録されている機能を示した。Enhancerの欄、およびPromoterの欄でTRUEはその機能が推定されていることを示す。

最適化の過程でメチル化部位の選定に用いた残差平方和を最小にする方法は、数学的に不安定であることが知られており、選別する順番などで異なる結果の出ることが知られている。したがって、今回選ばれた部位が一般のヒト繊維芽細胞に適応可能かどうかは不明であり、今後検討する必要がある。しかしながら、今回、個人から採取されたASF-4細胞において、少ない数のメチル化部位から非常に高い精度での年齢推定が可能であることから、遺伝的背景や環境が一定な場合は、提供年齢に対応したメチル化を受ける部位が多数存在し、DNAのメチル化から高い精度での年齢が推定できると考えられる。線形モデルを用いた解析でもASF-4細胞においては、1888か所有意な提供年齢依存性がみられた。これらの部位は、相関係数としては、絶対値として0.8以上の値を示しており、このことから、少なくとも個人の正常な組織では、平均として年齢に正確に依存したメチル化を受ける部位がかなり多く存在することが示唆された。



## 2. iPS細胞のDNAメチル化とエピジェネティッククロックによる年齢推定

今回の研究では、正常組織のモデルとなるASF-4細胞と合わせて、その細胞から作成したiPS細胞についてもエピジェネティッククロックによる年齢推定を行った。iPS細胞が誘導される過程では、DNAメチル化が大きく変化することが知られており、当初脱メチル化が重要とされたが、その後メチル化が行われる部位も多数存在することが示されている<sup>14)</sup>。また、完全にDNAメチル化の状態が変化するわけではなく、ある程度元の細胞のDNAメチル化を含めたエピジェネティックな形質を保持していることが示されている<sup>16)</sup>。今回のASF-4細胞とiPS細胞のDNAメチル化の解析結果でも平均としてのメチル化の割合は大きく変化していなかったが、部位ごとに見るとおよそ8割の部位で有意にメチル化の割合が変化しており、DNA全体のメチル化パターンが大きく変化していることが示された。

エピジェネティッククロックの解析については、Horvath, Weidnerらの方法で、iPS細胞についての推定年齢が0歳付近となることが報告されており<sup>3)</sup>、細胞のリプログラミングの過程で、細胞年齢がリセットされることとの関連が示唆されている。今回の結果でも、Horvathらの方法による年齢推定では、以前の報告通りiPS細胞の年齢が0.35歳±0.11 (SD) となった。Weidnerらの方法では、iPS細胞の推定年齢が10歳程度となったが、いずれの場合ももともなった細胞の提供年齢への依存性はなくなり、実際の年齢より若い年齢となることは共通していた (図1)。一方、最適化されたメチル化部位を用いた年齢推定の場合は、ASF-4細胞で最適化した場合にiPS細胞について提供年齢依存性がなくなり、また、iPS細胞で最適化した場合は部分的にASF-4細胞の提供年齢依存性がなくなるという結果となった。ASF-4細胞で最適化した場合のiPS細胞に対する推定年齢は、むしろ実際の提供年齢より高い値が推定されていた。さらに、ASF-4細胞とiPS細胞を含む細胞全体について最適化した場合は、全ての細胞で年齢推定が可能であった (図2)。以上のことから、今回用いたASF-4細胞とそれから作成されたiPS細胞については、1. 正確な提供年齢を推定できるという基準でメチル化部位を選択した場合、対象となる細胞集団では正常細胞、iPS細胞を問わず、提供年齢が推定できるメチル化部位が選択できること、2. ASF-4細胞で正確な提供年齢を推定できる方法でiPS細胞の提供年齢を推定した場合、メチル化パターンが大きく変化しているため提供年齢依存性がなくなることは共通しているが、必ずしもiPS細胞の推定年齢が0歳付近になることはないことが結論される。

Horvathらのエピジェネティッククロックについては、組織や細胞の年齢だけではなく、生理的な老化状態とも関連があるとの報告がある<sup>17)</sup>。この方法でiPS細胞の推定年齢が0歳付近に推定されることは、iPS細胞で、テロメア長が回復していることなどを考えると非常に興味深い<sup>18, 19)</sup>。今回の解析では、MethylAgerを用いた年齢推定でもiPS細胞で0歳付近の年齢が推定される結果となった。これら2つの方法は、計算方法もほぼ共通しており、ともに多くの組織で年齢推定可能なメチル化部位を選んでいるのが特徴である。しかし、実際のメチル化部位はほとんど重なりがなく、共通するのは9か所のみであった。したがって、共通のメチル化部位が偶然に選ばれたせいで、iPS細胞の推定年齢が0歳付近になったのではなく、異なる組織に適応可能なエピジェネティッククロックの計算に使用できるメチル化部位を選ぶと、iPS細胞の推定年齢が0歳付近に推定される可能性が考えられる。

一方、今回のデータでは、正常組織に近いと考えられるASF-4細胞において、正確な提供年齢を推定できるメチル化部位を選択しても、iPS細胞の推定年齢は0歳付近にはならなかった。原因としては、今回対象としたASF-4細胞が個人から採取された単一の組織 (真皮組織) に由来するものであり、年齢の影響のほかに、組織の違い、遺伝的背景や生活環境の影響を強く受

けていることが考えられる。組織の種類や生活環境によらないエピジェネティッククロックを計算できるメチル化部位を選んだ場合、一般的な性質としてiPS細胞の推定年齢が0歳付近になるかどうかは、エピジェネティッククロックの民族差などとの問題と合わせて検討が必要と考えられる。

最近になって、iPS細胞が元の組織の年齢の影響を受けており、エピジェネティックな性質が一部保存されているとの報告がなされている<sup>20, 21)</sup>。今回の研究で、ASF-4細胞に加え、それらから作成したiPS細胞、およびASF-4細胞とiPS細胞全体で、年齢を推定できるメチル化部位を選択できたことは、iPS細胞の誘導の際にもエピジェネティックな性質がDNAメチル化を通じて保存されていることを示唆していると考えられる。実際、最適化したのちのそれぞれ8か所のメチル化部位のうち、有意なメチル化の変化を起こしていると判定される部位 (p値<0.01) は、ASF-4細胞については、8か所中6か所であるのに対し、iPS細胞では、8か所中2か所であり、ASF-4細胞とiPS細胞を含む全細胞では、すべてが変化しないと判定された部位であった。しかしながら、今回の研究では、iPS細胞について、年齢推定のために選択された部位には、少数ではあるがiPS細胞の作成の際にメチル化が大きく変化すると判定される部位も含まれていた。また、線形モデルを用いた解析で提供年齢との関連性を示すとされたメチル化部位の数も、ASF-4細胞、iPS細胞の順で多く、両者に共通して年齢依存性を示す部位は最も少ないことから、iPS細胞に特異的な、提供年齢依存性を示すメチル化部位の存在が示唆された。このような部位には、ASF-4細胞で、弱い年齢依存性を示すDNAメチル化部位のメチル化が、iPS細胞の誘導の過程で保存されたものに加えて、iPS細胞の成立の過程で、提供年齢に依存したメチル化あるいは脱メチル化がなされた部位が含まれている可能性も考えられる。後者の部位の状況については、もともとASF-4細胞において、提供年齢依存性を示すメチル化を受けていた部位が、年齢依存性を保ったままメチル化または脱メチル化されたのか、あるいは新たに提供年齢依存的にメチル化の変化が起こったのか検討が必要である。

### 3. 年齢推定に用いたメチル化部位の生物学的意義

今回選定されたメチル化部位について推定されている機能について表4に示した。ASF-4細胞、iPS細胞、および全細胞について選ばれたDNAメチル化部位を見ると、遺伝子の近傍にあるものが多く、また、ASF-4細胞では、エンハンサー活性が示されている領域に存在するものが多かった。一方、iPS細胞及び全細胞については、プロモータ領域にあるものが多い傾向がみられた。また、ASF-4細胞で選ばれた部位と関連のあるNAV1とPSPC1遺伝子については、老化との関連が報告されていた<sup>22)</sup>。エピジェネティッククロックについては、組織からの年齢推定に加え、体の部位ごとの生理的な年齢を反映するとの報告もある<sup>17, 23, 24)</sup>が、その計算のもととなっているメチル化部位の生理的な意義付けについては不明な点が多い。今回選ばれた部位について、細胞集団ごとに機能的な特徴がみられたことから、提供年齢依存性を示すメチル化部位の近傍にある遺伝子と老化との関連について、今後さらに検討する必要があると考えられる。

## 要 約

本研究では、30年以上にわたり、単一のドナーから調製された線維芽細胞であるASF-4細胞を用いてエピジェネティッククロック (EC) 解析を行った。Bioconductorに登録されている

DNAメチル化解析用のソフトウェア, MethylAger (RnBeads) の機能を用いて最適化を行い, ASF-4細胞, およびASF-4細胞より調製されたiPS細胞の両方でDNAメチル化部位からの年齢の推定が可能であることを示した. さらに, ASF-4細胞, それから作成したiPS細胞, および全細胞について, それぞれ3から8か所のメチル化部位を用いて, 6年未満の誤差 (RMS誤差:RMSE) での年齢推定が可能であった. EC解析により得られたメチル化部位は, 遺伝子の近傍に存在する傾向があり, それらの遺伝子には, これまでに老化との関連が報告されているものが含まれていた. 線維芽細胞だけでなく, iPS細胞についても年齢推定が可能であったことから, iPS細胞においても, 一部の年齢依存性を示すメチル化部位が存在していることが示唆された. また, EC解析により選ばれたメチル化部位が, 老化関連遺伝子の近傍にある例が見いだされることから, EC解析は, DNAメチル化を伴う加齢に関連する遺伝子を同定する方法としても有効であることが示唆された.

## Abstract

We performed Epigenetic Clock (EC) analysis of ASF-4 cells, which were derived from a single donor at different ages over 30 years. Optimization using a function of MethylAger software was performed and we demonstrated that it is possible to estimate the ages from methylation sites for both ASF-4 cells and iPS cells prepared from ASF-4 cells. For ASF-4 cells, iPS cells, and all the cells, we were able to select three to eight methylation sites, from which the donor ages were estimated with a root mean squared error of fewer than 6 years. Methylation sites obtained by analysis of EC tend to exist in the vicinity of genes, and these genes contained genes related to aging that have been reported so far. Since it was possible to estimate age not only for fibroblasts but also for iPS cells derived from them, it is suggested that some age-dependent methylation sites exist even in the iPS cells. It is also suggested that analysis of the epigenetic clock is valuable as a method to identify genes related to aging involving DNA methylation.

## 引用文献

1. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., and Zhang, K. : Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell*, **49**, pp.359-367 (2013) .
2. Johansson, A., Enroth, S., and Gyllensten, U. : Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS One*, **8**, pp.e67378 (2013) .
3. Horvath, S. : DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.*, **14**, R115 (2013) .
4. Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brummendorf, T. H., and Wagner, W. : Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.*, **15**, R24 (2014) .
5. Kaji, K., Ohta, T., Horie, N., Naru, E., Hasegawa, M., and Kanda, N. : Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture. *Hum Cell*, **22**, pp.38-42 (2009) .
6. Assenov, Y., Müller, F., Lutsik, P., Walter, J., Lengauer, T., and Bock, C. : Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat. Methods*, **11**, pp.1138-1140 (2014) .
7. Kallio, M. A., Tuimala, J. T., Hupponen, T., Klemelä, P., Gentile, M., Scheinin, I., Koski, M., Käki, J., and

- Korpelainen, E. I. : Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC Genomics*, **12**, p.507 (2011) .
8. Smyth, G. K. : Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, **3**, Article3 (2004) .
  9. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., and Smyth, G. K. : limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, **43**, e47 (2015) .
  10. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. : Controlling the false discovery rate: A Practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc.*, **57**, pp.289-300 (1995) .
  11. Lumley, T. : leaps: Regression Subset Selection. (2017) . Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/leaps/index.html>. (Accessed: 15th August 2018)
  12. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, pp.861-72 (2007) .
  13. Du, P., Zhang, X., Huang, C.-C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., and Lin, S. M. : Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*, **11**, p.587 (2010) .
  14. González, F., and Huangfu, D. : Mechanisms underlying the formation of induced pluripotent stem cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, **5**, pp.39-65 (2016) .
  15. Tan, Q., Heijmans, B. T., Hjelmborg, J. V. B., Soerensen, M., Christensen, K., and Christiansen, L. : Epigenetic drift in the aging genome: a ten-year follow-up in an elderly twin cohort. *Int. J. Epidemiol.*, **45**, pp.1146-1158 (2016) .
  16. Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P., and Daley, G. Q. : Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, **467**, pp.285-290 (2010) .
  17. Horvath, S., Gurven, M., Levine, M. E., Trumble, B. C., Kaplan, H., Allayee, H., Ritz, B. R., Chen, B., Lu, A. T., Rickabaugh, T. M., Jamieson, B. D., Sun, D., Li, S., Chen, W., Quintana-Murci, L., Fagny, M., Kobor, M. S., Tsao, P. S., Reiner, A. P., Edlefsen, K. L., Absher, D., and Assimes, T. L. : An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol.*, **17**, p.171 (2016) .
  18. Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M. A. : Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**, pp.141-154 (2009) .
  19. Huang, Y., Liang, P., Liu, D., Huang, J., and Songyang, Z. : Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein Cell*, **5**, pp.194-202 (2014) .
  20. Lo Sardo, V., Ferguson, W., Erikson, G. A., Topol, E. J., Baldwin, K. K., and Torkamani, A. : Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.*, **35**, pp.69-74 (2017) .
  21. Strässler, E. T., Aalto-Setälä, K., Kiamehr, M., Landmesser, U., and Kränkel, N. : Age Is Relative-Impact of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cell Functionality. *Front. Cardiovasc. Med.*, **5**, p.4 (2018) .
  22. Craig, T., Smelick, C., Tacutu, R., Wuttke, D., Wood, S. H., Stanley, H., Janssens, G., Savitskaya, E., Moskalev, A., Arking, R., and de Magalhães, J. P. : The Digital Ageing Atlas: integrating the diversity of age-related changes into a unified resource. *Nucleic Acids Res.*, **43**, pp.D873-D878 (2015) .
  23. Quach, A., Levine, M. E., Tanaka, T., Lu, A. T., Chen, B. H., Ferrucci, L., Ritz, B., Bandinelli, S., Neuhauser, M. L., Beasley, J. M., Snetselaar, L., Wallace, R. B., Tsao, P. S., Absher, D., Assimes, T. L., Stewart, J. D., Li, Y., Hou, L., Baccarelli, A. A., Whitsel, E. A., and Horvath, S. : Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging (Albany, NY)*, **9**, pp.419-446 (2017) .
  24. Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., and Horvath, S. : An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany, NY)*, **10**, pp.573-591 (2018) .