

<研究課題> 腸管内分泌細胞を起点とした老化制御ネットワークの同定

代表研究者 東京大学大学院医学系研究科 助教 五十嵐 正樹

【まとめ】

腸管は、代謝の制御に重要な役割を果たす臓器であるが、その加齢による変化とその全身へ及ぼす影響はよく知られていない。加齢に伴い、腸管内分泌細胞数が増加することを見出しているが、本研究では、腸管上皮の SIRT1 が、その腸管内分泌細胞の加齢による変化を規定し、転写因子 Neurogenin3 と腸管ホルモン GLP-1 の調節を通じて糖代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

1. 研究の目的

腸管は、栄養吸収、GLP-1 などの腸管ホルモン分泌、腸内細菌叢などを通じて、代謝の制御に重要な役割を持つ臓器であることが知られているが、その加齢現象における役割はあまり知られていない。

NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 は、カロリー制限下での腸管上皮幹細胞の増殖能力増加に重要な役割をもつ(Igarashi M and Guarente L. Cell. 2016)。さらに、加齢にともない腸管上皮における SIRT1 の発現が低下し、SIRT1 の欠失により腸管上皮幹細胞の減少が促進されることから(投稿中)、SIRT1 は腸管上皮細胞の老化に重要な役割をもつ遺伝子と考えられる。

マウスの実験で、加齢により Chromogranin A 陽性腸管内分泌細胞数が増加することを見出している。これらのことを踏まえ、加齢により分泌が変化する腸管内分泌細胞の種類と腸管ホルモンを同定し、そのホルモンの全身の老化表現型への影響とその制御メカニズムを明らかにする。

1-1 加齢において変化する腸管ホルモンの同定

1-2 腸管ホルモンの変化が全身の加齢性変化に与える影響の解明

1-3 加齢による腸管内分泌細胞の制御機構の解明

以上の研究項目により、未だ知られていない

腸管を軸とした老化に関する臓器ネットワークが明らかになり老化研究に新しい展開をもたらすだけでなく、老化関連疾患の新しい予防、治療法開発へと展開することが期待される。

2. 研究方法と経過

2-1 加齢において変化する腸管ホルモンの同定

高脂肪食を負荷した SIRT1 ノックアウトマウスを用いて、加齢において変化する腸管ホルモンを同定する。SIRT1 ノックアウトマウスについては、腸管上皮特異的 SIRT1 ノックアウト (Villin cre floxed SIRT1) マウス、腸管内分泌細胞特異的 SIRT1 ノックアウト (Neurogenin3 cre floxed SIRT1) マウスを用いて実験を行う。これらのマウスから単離した絨毛での mRNA の解析を基に、加齢により変化する腸管ホルモンの候補を検索し、実際に、それらの血中濃度を測定する。免疫染色により、特定の腸管ホルモンを分泌する内分泌細胞の数を評価する。

2-2 腸管ホルモンの変化が全身の加齢性変化に与える影響の解明

高脂肪食を負荷した Villin cre floxed SIRT1 マウス、Neurogenin3 cre floxed SIRT1 マウスを用いて、OGTT や ITT を施行し、腸管上皮に発現する SIRT1 の糖代謝への影響を調べる。また、老齢の Villin cre floxed SIRT1) マウスで OGTT や ITT を施行し、糖代謝に関わる表現型を解析することで、腸管内分泌細胞の老化の、加齢に伴う耐糖能変化への影響を調べる。最後に、ホルモン受容体アンタゴニストにより、特定の腸管ホルモンの作用を抑制し、その糖代謝への影響を調べる。

2-3 加齢による腸管内分泌細胞の制御機構の解明

SIRT1 が腸管内分泌細胞を制御するメカニズムを決定するにあたり、腸管内分泌不死化細胞株 GLUTag および STC-1 を使用する。SIRT1 活性阻害剤であるニコチナミドや EX527 でこれらの細胞を処理して、腸管ホル

モンの変化を調べる。これらの処理で変化する mRNA の定量 PCR の結果により内分泌細胞制御メカニズムの候補を絞り、詳細な解析へと進む。

3. 研究の成果

3-1 加齢において変化する腸管ホルモンの同定

老齢マウス (24 か月齢) では Chromogranin A 陽性腸管内分泌細胞数と、血中 GLP-1 濃度が若齢のマウス (3-6 か月齢) と比べてそれぞれ増加した。Villin cre floxed SIRT1 マウス、Neurogenin3 cre floxed SIRT1 マウスに高脂肪食を負荷し、これらのマウスから単離した絨毛での mRNA の解析を行った。腸管内分泌前駆細胞の分化を促進する転写因子 Neurogenin3 とプログルカゴン mRNA について、ノックアウトマウスではコントロールと比べて 2 倍程度に上昇していた。ソマトスタチン mRNA や PYY mRNA についても SIRT1 ノックアウトマウスで 1.5 倍程度の増加を認めた。GIP やコレシストキニン、セクレチンの mRNA については、SIRT1 ノックアウトマウスでの上昇は軽度であった。Villin cre floxed SIRT1 マウスと Neurogenin3 cre floxed SIRT1 ノックアウトマウスでのブドウ糖負荷後の血中活性型 GLP-1 濃度を測定すると、コントロールに比べて 2 倍程度にまで上昇していた。一方 GIP の上昇は軽度であった。SIRT1 ノックアウトマウスの腸組織で Chromogranin A 抗体および GLP-1 抗体による免疫染色をそれぞれ行うと、絨毛あたりの Chromogranin A 陽性細胞数と GLP-1 陽性細胞の数がそれぞれ上昇していることが確かめられた。

以上より、SIRT1 ノックアウトマウスでは、とくに GLP-1 陽性細胞数が増加しており、血中 GLP-1 濃度の増加を来していることが判明した。他の腸管ホルモンについては、PYY やソマトスタチンの上昇を認めている。

3-2 腸管ホルモンの変化が全身の加齢性変化に与える影響の解明

Villin cre floxed SIRT1 マウスに高脂肪食を負荷して、OGTT、ITT を施行すると、コントロールと比べ耐糖能およびインスリン抵抗性の改善を認める。普通食を摂取した場合でも、老齢の Villin cre floxed SIRT1 マウスでは、コントロールと比べ耐糖能、インスリン感受性の改善を認めた。GLP-1 受容体アンタゴニスト Exendin9-39 の 2 週間腹腔内注射

の後、OGTT、ITT を行うと、Villin cre floxed SIRT1 マウスでの耐糖能およびインスリン抵抗性の改善や体重減少の効果をキャンセルした。Neurogenin3 cre floxed SIRT1 マウスでは、活性型 GLP-1 の増加を認めるものの、体重の変化などは明らかではなかった。Neurogenin3 cre floxed SIRT1 マウスでは、膵臓の内分泌細胞でも SIRT1 を欠失してしまうことが原因として考えられる。

3-3 加齢による腸管内分泌細胞の制御機構の解明

Villin cre floxed SIRT1 マウスの腸絨毛の定量 PCR を行うと、プログルカゴンの mRNA、転写因子 Neurogenin3 mRNA の発現が特異的に上昇している。SIRT1 阻害効果のあるニコチンアミドで処理した不死化内分泌細胞株 GLUTag および STC-1 を解析すると、同様に Neurogenin3 およびプログルカゴン mRNA が特異的に上昇した。一方で、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン A で短時間処理した不死化内分泌細胞株 GLUTag 細胞および STC-1 細胞を解析すると、同様に、Neurogenin3 mRNA が上昇しており、SIRT1 欠失による特定のタンパクないしヒストン脱アセチル化のみならず、HDAC によるヒストン脱アセチル化も腸管内分泌細胞制御に重要な役割を持つことを示唆する。

4. 今後の課題

SIRT1 活性の低下は、Neurogenin3 とプログルカゴン mRNA を上昇させて、腸管内分泌 L 細胞数を増加させるものと考えられる。Neurogenin3 が SIRT1 のターゲットのひとつであると想定され、今後、ヒストン脱アセチル化や特定のタンパクの脱アセチル化に着目して、その制御メカニズムを明らかにしていく。さらには、加齢に伴う内分泌細胞の変化とその加齢における意義を、糖代謝のみならず、多臓器の加齢性変化との関わりにおいても明らかにしていく。

ニコチンアミドやトリコスタチン A も Neurogenin3 の発現を上昇させる。ニコチンアミドは最近、動物実験で健康寿命延伸効果が報告されており、ニコチンアミドの

Neurogenin3 上昇と腸管ホルモン上昇を通じた健康増進作用について検討する。また、HDAC 阻害剤は抗癌剤として臨床応用されていることから、その腸管ホルモンの変化を介した代謝への影響が想定され、今後明らかにしていく。

5. 研究成果の公表方法

日本糖尿病学会、日本肥満学会、日本内分泌学会などでの学術集会で発表し、原著論文にまとめて投稿を行う。

以上