

腸管上皮が加齢に伴う血管病変形成に与える影響の解明とその治療への応用

五十嵐正樹

東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

【研究の背景】

著者は、カロリー制限下での腸管上皮幹細胞自己複製機構(NAD⁺-SIRT1-mTORC1 経路)を明らかにした(Igarashi M et.al., Cell. 2016)。さらに、加齢に伴う腸管上皮の SIRT1 活性低下に伴い、腸管上皮幹細胞の自己複製能力が低下することから、SIRT1 は腸管上皮の加齢性変化に影響を与えられと考えられる(Igarashi M et.al., Aging Cell. 2019)。一方、老齡マウスの幹細胞 mRNA を解析すると、p21、Rb の発現レベルの上昇を認め、細胞老化に関わる p53-p21 経路、p16-Rb 経路もまた腸管上皮の加齢性変化を特徴づける遺伝子と考えた。

腸管上皮特異的 SIRT1 ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷すると、予想に反して、耐糖能の改善を認めた。GLP-1 が 2 倍程度に上昇しており、GLP-1R アンタゴニスト投与により耐糖能改善の効果は消失した。

一方、腸管の細胞老化の全身への影響を調べるため Cre loxP システムを用い、腸管上皮特異的 p53Rb ダブルノックアウト(p53RbDKO) マウスを作成した。p53RbDKO マウスでは空腹時血糖が低下し、高脂肪食負荷で体重の減少を認める。SIRT1 と細胞老化の耐糖能への関わりは真逆である。

【目 的】

腸管は、栄養吸収、インクレチン分泌、腸内細菌叢などを通じ、全身の代謝の制御に重要な役割を持つ臓器である。しかし、腸管上皮の加齢における変化とその加齢に伴う心血管系の変化への影響は知られていない。そこで、腸管上皮の老化を制御すると考えられる長寿遺伝子 SIRT1 および細胞老化に関わる p53、Rb に着目して、血管病変への影響を解明することで、心血管の老化に重要な影響を及ぼす腸管上皮を軸とした臓器間のネットワークを同定し、心血管病治療法開発へと展開させる。

【方 法】

A. SIRT1 ノックアウトマウスの解析

腸管上皮特異的 SIRT1 ノックアウト(villin cre floxed SIRT1)マウス、内分泌細胞特異的 SIRT1 ノックアウト(Neurogenin3 cre floxed SIRT1)マウスを使用する。これらの SIRT1 ノックアウトマウスの十二指腸、回腸で免疫染色を行い、腸管内分泌細胞、GLP-1 陽性細胞数の変化を明らかにする。SIRT1 の GLP-1 分泌への影響の解析は、腸管内分泌細胞株 STC-1、GLUTag を用いて行う。内分泌系細胞を tomato 遺伝子でラベルしたマウス(Neurogenin3 cre floxed SIRT1, tomato)を作成し、フローサイトメーターで tomato 陽性細胞を単離することで、内分泌細胞の遺伝子発現解析を行う。SIRT1 ノックアウトマウスに高脂肪食や atherogenic diet を投与して、動脈硬化病変や血管の細胞老化を大動脈染色により評価する。GLP-1 の動脈硬化病変への影響を検討するため、GLP-1 受容体ノックアウトマウスを準備し、SIRT1 ノックアウトマウスと交配し、動脈硬化病変への影響を評価する。

B. p53RbDKO マウスの解析

腸管上皮特異的 p53、Rb ダブルノックアウト(p53RbDKO)マウスを作成し、表現型を観察する(LgR5 cre と villin cre を用いた 2 種類のモデルマウスを作成した。)p53RbDKO における、腸管内分泌細胞、GLP-1 陽性細胞数の変化を明らかにし、

GLP-1 濃度を測定する。p53RbDKO マウスでピルビン酸負荷試験、アラニン負荷試験を行い、肝糖新生の評価を行う。p53、Rb ダブルノックアウトマウスに atherogenic diet を投与して上記と同様に動脈硬化病変への影響を解析するとともに、背景にあるメカニズムを明らかにする。

C. 腸内細菌叢を介した腸管上皮の老化制御

腸内細菌叢は、腸管上皮の機能と密接な関係をもつことから、上記のマウスの表現型における腸内細菌叢の関与を、腸内細菌叢移植の実験により明らかにする。

【結 果】

A. SIRT1 ノックアウトマウスの解析

高脂肪食を負荷した上記 SIRT1 ノックアウトマウスでの血中活性型 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。GIP も軽度上昇を認めた。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くと、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。一方で、腸管内分泌細胞株 STC-1 や GLUTag で SIRT1 特異的阻害剤 EX527 で処理したときに、GLP-1 の分泌は増加しないが、内分泌細胞の分化に関わる転写因子 Neurogenin3 が有意に上昇した。

フローサイトメーターで単離した内分泌細胞でも Neurogenin3 が上昇したが、内分泌細胞分化過程で Neurogenin3 の前段階で働く転写因子である Math1 は有意な変化を認めないことから、Neurogenin3 の上昇が内分泌細胞増加の要因であると考えられた。Neurogenin3 mRNA の制御機構について引き続き解析を行う。また、GLP-1 受容体を手し、SIRT1 ノックアウトマウスと交配しており、これらマウスの動脈硬化病変の評価を行う。

B. p53RbDKO マウスの解析

p53RbDKO マウスでは、chromograninA 陽性腸管内分泌細胞数が低下していることがわかった。一方で、ピルビン酸負荷およびアラニン負荷における有意な血糖低下を認め、肝糖新生が低下していることを示唆する。今後、動脈硬化との関わりを明らかにしていく。

C. 腸内細菌叢を介した腸管上皮の老化制御

SIRT1 ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷するとともに、抗生物質(バンコマイシン、メロニダゾール、アンピシリン、硫酸フラジオマイシン)を飲水で投与した。抗生物質の投与は、ノックアウトマウスにおける耐糖能改善、GLP-1 上昇の効果に影響を与えなかった。SIRT1 欠失による腸管内分泌細胞の増加の効果は、腸内細菌叢依存的ではないと考えられる。

【考 察】

腸管上皮の SIRT1 は Neurogenin3 発現と腸管内分泌細胞数の変化を通じて、腸管ホルモンの量を制御していると考えられる。特に、GLP-1 は心血管病変との関わりが、ヒト臨床試験からも示唆されており、腸管の SIRT1 が GLP-1 を介して動脈硬化を制御する可能性がある。また、腸管の細胞老化も GLP-1 分泌や、糖新生を通じた全身のインスリン抵抗性に関わる可能性が示唆され、動脈硬化制御因子となりうる。今後、これら腸管の老化を特徴づける遺伝子変化により、心血管病変を制御する可能性についてデータを蓄積していく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

腸管上皮の老化の加齢に伴う動脈硬化病変への影響を明らかにすることができれば、同定されたメカニズムへの介入などによって、老化に伴う動脈硬化を改善する有効な手段の開発へと発展させることが可能である。本研究は、加齢による腸管上皮の制御機構とそれを起点とする臓器間ネットワークの同定を通じ健康寿命延長を実現するための基盤研究である。

【参考・引用文献】

1. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 166:436-450.2016.
2. Igarashi M, Miura M, Williams E, Jaksch F, Kadowaki T, Yamauchi T, Guarente L. NAD⁺ supplementation rejuvenates aged gut adult stem cells. *Aging Cell*.18:e12935. 2019