

平成30年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13051

研究課題名(和文) 腸管上皮幹細胞における加齢に伴うエピゲノム変化に着目した老化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism underlying aging based on epigenome alterations in intestinal epithelial stem cells

研究代表者

齋藤 義正 (SAITO, Yoshimasa)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：90360114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オルガノイド培養技術によりマウス腸管上皮幹細胞を培養・維持し、網羅的な遺伝子発現やエピゲノム変化などを検討することで老化の分子機構の解明を試みた。若いオルガノイドが旺盛な増殖能を示すのに対し、老化したオルガノイドでは増殖能および組織形成能が低下していた。また、幹細胞マーカーでありWntシグナル経路の受容体であるLgr5が老化に伴いヒストンH3リジン27トリメチル化により抑制されていることを示した。以上の結果より、老化したマウスの腸管上皮由来オルガノイドでは、幹細胞の増殖能や組織構築能力が低下しており、これらの一連の変化はエピゲノム変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism underlying aging, we established intestinal epithelial organoids derived from both young and aged mice and investigated gene expression profiles and epigenome alterations. We found that cell proliferation and tissue formation were significantly inhibited in intestinal epithelial organoids derived from aged mice. In addition, epigenetic modifications including suppression of Lgr5 by trimethylation of histone H3 lysine 27 induced suppression of Wnt signaling. These findings indicate that epigenome alterations may lead to disabilities of cell proliferation and tissue formation during the process of aging.

研究分野：消化器病学

キーワード：老化 加齢 エピゲノム変化 腸管上皮幹細胞 オルガノイド培養

## 1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するDNAやヒストンに対する化学修飾のことであり、通常、細胞分裂後も継承される変化である。研究代表者らは、これまでにがん細胞において通常の遺伝子のみならず、タンパク質をコードしない小さなRNAであるマイクロRNAの発現もエピジェネティクス機構によって制御されていることを世界に先駆けて報告した(Saito Y *et al.* Cancer Cell 9, 435, 2006)。

(2) 近年、エピジェネティクスががんをはじめとする疾患のみならず、加齢や老化においても重要な役割を果たすことが明らかになってきた。例えば、一卵性双生児のゲノム配列は同じであるが、その後の異なる生活環境や生活習慣により、一方にだけ糖尿病やがんなどの疾患が発生することや、両者で寿命が異なることがしばしば認められる。これらの変化は加齢により生じたエピゲノム変化(エピジェネティクス変化の総称)が原因となっていると考えられる。異なる生活環境や生活習慣の下で加齢していくことで、エピゲノム変化が蓄積し、疾患の発症や寿命に影響を与えていることが考えられる。

(3) 腸管上皮幹細胞などの組織幹細胞は、永続的な自己複製能と多分化能を有し、組織を構成する上で最も重要な細胞である。また、このような組織幹細胞は一生を通じて自己複製するため、老化の過程でのエピゲノム変化などの蓄積を観察する上で、極めて良いモデルになると考えられる。連携研究者である佐藤俊朗らが開発したオルガノイド培養技術は、幹細胞の維持に必須な因子のみを加えた無血清培地を用いてマトリゲル中で3次元培養を行うことで、幹細胞が立体的な組織構造体(オルガノイド)を形成しながら増殖することを可能にした(Sato T *et al.* Nature 459, 262, 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の2点について明らかにすることを目的とする。

(1) 腸管上皮幹細胞を用いて、加齢に伴う食物抗原や腸内細菌などのストレスによる遺伝子の発現変化およびエピゲノム変化の網羅的解析を行う。加齢において鍵となる遺伝子のエピゲノム変化を特定し、「老化」という生命現象の分子メカニズムを明らかにする。

(2) エピゲノム変化が薬剤などにより可逆的であることを利用し、がんなどの疾患の予防を含めたアンチエイジング医療への応用についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、各週齢のマウスにおける腸管上皮幹細胞を培養・維持するため、オルガノイド培養を行った。また、遺伝子発現やエピゲノム変化の網羅的解析を行い、加齢制御遺伝子を特定すると同時に加齢の分子メカニズムを明らかにするため、以下の実験を行った。

### (1) 各週齢のマウスからの腸管上皮オルガノイドの樹立

本研究の動物実験では、C57BL/6 マウスを通常食と高脂肪食で飼育し、各週齢(1, 5, 10, 20, 30, 40, 50週)のマウスから腸管上皮幹細胞を採取し、オルガノイド培養を行った。組織を細かく処理した後、マトリゲルで包埋し、EGF、Noggin、R-spondin1などの幹細胞の維持に必須な因子のみを加えた無血清培地を用いて3次元培養を行った。それぞれの週齢で樹立したオルガノイドにおける増殖能や形態変化を詳細に検討した。

### (2) エピゲノム変化および遺伝子発現変化の網羅的解析

樹立したオルガノイドにおけるDNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノムの変化をバイサルファイト変換後およびクロマチン免疫沈降(ChIP)後のDNAを用いて次世代シーケンス解析を行うことで網羅的に探索した。また、マイクロRNAなどのnon-coding RNAを含む全遺伝子の発現変化をマイクロアレイによって網羅的に解析した。

### (3) 加齢制御遺伝子の探索とアンチエイジング医療への応用

以上のマウスにおける腸管上皮幹細胞における遺伝子発現プロファイルおよびエピゲノム変化を解析し、加齢に伴う老化の過程で重要な役割を果たす遺伝子を探索した。

また、特定された加齢制御遺伝子は、エピジェネティクス機構によってその発現が制御されていることが予想される。エピジェネティクス変化は基本的に可逆的であるため、樹立したオルガノイドにDNAメチル化阻害薬やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬などの薬剤を添加することで、エピジェネティクス変化を人為的に制御することが可能かを検討した。

加齢に関する重要な遺伝子の発現を制御できることが可能になれば、エピジェネティック治療がアンチエイジングを介してがんをはじめとする疾患の新たな予防戦略となることが期待される。

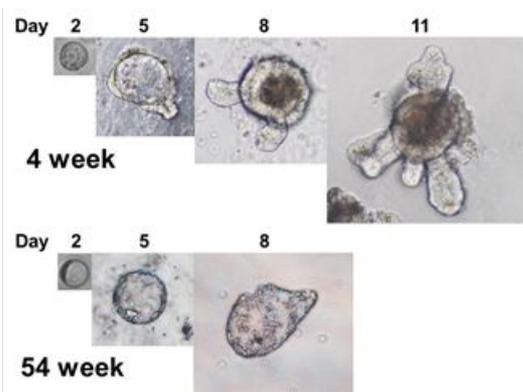
## 4. 研究成果

(1) これまで、老化に関する研究がなかなか発展しなかった大きな要因の1つとして、*in vitro*で老化の本態を反映し、エピゲノムから代謝産物に至る統合的な解析を行い得る良いモデルが存在しなかったことがあげ

られる。申請者らは、オルガノイド培養技術により、マウスの腸管上皮幹細胞を永続的に培養・維持することに成功した。加齢に伴うエピゲノム変化は、幹細胞に蓄積していくことから、この3次元の組織構造体（オルガノイド）は、老化の研究を行う上で極めて強力な研究ツールとなることが期待される。

(2) 下図に示す通り、申請者らは、4週齢および54週齢のC57BL/6マウスの腸管上皮から幹細胞を分離・培養することに成功した。

4週齢のマウス腸管上皮由来のオルガノイドは幹細胞が存在する突起状の陰窩コンパートメントが認められるのに対し、54週齢のマウス由来のオルガノイドにおいては、陰窩コンパートメントが認められず、培養開始から8日目には細胞増殖が減退していく様子が観察された。この結果は、若い幹細胞が旺盛な増殖能を示すのに対し、老化した幹細胞では増殖能が低下し、老化に伴う幹細胞の枯渇につながっていることが示唆された。



(3) マイクロアレイおよびリアルタイムPCRにより網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、幹細胞マーカーである *Lgr5* の発現が老齢腸管上皮由来オルガノイドで有意に低下しており、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により、老齢腸管上皮由来オルガノイドにおいて Wnt シグナル経路が有意に抑制されていることが示された。

また、加齢に伴うエピゲノム変化について解析を行ったところ、クロマチン免疫沈降ChIP) アッセイにて *Lgr5* のプロモーター領域における遺伝子発現抑制系のヒストン修飾であるヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) が老齢腸管上皮由来オルガノイドにおいて有意に亢進していた。ヒストンメチル化阻害薬である 3-deazaneplanocin A (DZNep) の投与により *Lgr5* の発現は回復した。

以上の結果より、老化したマウスの腸管上皮由来オルガノイドでは、幹細胞の増殖能や組織構築能力が低下しており、これらの一連の変化はエピゲノム変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 現在、これらの加齢に伴うエピゲノム変化を薬剤や遺伝子特異的なエピゲノム編集技術により制御することで、新たなアンチエイジング医療の開発に応用できるかどうか検討している。これらの成果により、高齢者の健康寿命を延長するシーズを創出できることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計8件)

Saito Y, Nakaoka T, Muramatsu T, Ojima H, Sukeda A, Sugiyama Y, Uchida R, Furukawa R, Kitahara A, Sato T, Kanai Y, Saito H. Induction of differentiation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells to functional hepatocytes using an organoid culture system. *Sci Rep.* 8(1): 2821, 2018. (査読あり)  
doi: 10.1038/s41598-018-21121-6.

Yamada S, Takashina Y, Watanabe M, Nagamine R, Saito Y, Kamada N, Saito H. Bile acid metabolism regulated by the gut microbiota promotes non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma in mice. *Oncotarget* 9(11): 9925-9939, 2018. (査読あり)  
doi: 10.18632/oncotarget.24066.

Nakaoka T, Saito Y, Saito H. Aberrant DNA Methylation as a Biomarker and a Therapeutic Target of Cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 18(6): 1111, 2017. (査読あり)  
doi: 10.3390/ijms18061111.

Nakaoka T, Saito Y, Shimamoto Y, Muramatsu T, Kimura M, Kanai Y, Saito H. Cluster microRNAs miR-194 and miR-215 suppress the tumorigenicity of intestinal tumor organoids. *Cancer Sci.* 108(4): 678-684, 2017. (査読あり) doi: 10.1111/cas.13165.

Saito Y, Nakaoka T, Saito H. A New Molecular Mechanism Underlying the Antitumor Effect of DNA Methylation Inhibitors via an Antiviral Immune Response. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 106: 227-242, 2017. (査読あり)  
doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.08.005.

Yamada S, Kamada N, Amiya T, Nakamoto N, Nakaoka T, Kimura M, Saito Y, Ejima

C, Kanai T, Saito H. Gut microbiota-mediated generation of saturated fatty acids elicits inflammation in the liver in murine high-fat diet-induced steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 17(1): 136, 2017. (査読あり)  
doi: 10.1186/s12876-017-0689-3.

Saito Y, Nakaoka T, Sakai K, Muramatsu T, Toshimitsu K, Kimura M, Kanai T, Saito T, Saito H. Inhibition of DNA Methylation Suppresses Intestinal Tumor Organoids by Inducing an Anti-Viral Response. *Sci Rep.* 6: 25311, 2016. (査読あり)  
doi: 10.1038/srep25311.

Ueki S, Murakami Y, Yamada S, Kimura M, Saito Y, Saito H. microRNA-mediated resistance to hypoglycemia in the HepG2 human hepatoma cell line. *BMC Cancer* 16(1): 732, 2016. (査読あり)  
doi: 10.1186/s12885-016-2762-7.

〔学会発表〕(計3件)

齋藤 義正、内田 諒英、村松 俊英、木村 真規、齋藤 英胤、腸管上皮オルガノイドにおけるエピゲノム変化に着目したステムセルエイジングの解明、第 17 回日本抗加齢医学会総会、2017

齋藤 義正、3次元培養技術の現状と可能性 -スフェロイド培養とオルガノイド培養の比較-、第 7 回スクリーニング学研究会、2016

内田 諒英、齋藤 義正、中岡 哉彰、村松 俊英、木村 真規、齋藤 英胤、オルガノイド培養法により樹立した腸管上皮幹細胞における stem cell aging の検討、第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：胆道癌オルガノイド又は膵臓癌オルガノイドの培養用培地  
発明者：齋藤 義正、金井 弥栄、村松 俊英  
権利者：学校法人慶應義塾  
種類：特許  
番号：特願 2018-052795  
出願年月日：平成 30 年 3 月 20 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://research-highlights.keio.ac.jp/article/99/ancient-antiviral-response-could-help-treat-cancer>

[https://www.youtube.com/watch?v=QgmysbH\\_6\\_A&t](https://www.youtube.com/watch?v=QgmysbH_6_A&t)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 義正 (SAITO Yoshimasa)  
慶應義塾大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90360114

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

佐藤 俊朗 (SATO Toshiro)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：70365245

金井 弥栄 (KANAI Yae)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：00260315

山本 直樹 (YAMAMOTO Naoki)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号：40513289

(4) 研究協力者

( )