

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07377

研究課題名(和文) TGF β によるSirt1の制御と炎症性腸疾患の抑制機構の解明研究課題名(英文) Unraveling the regulation of Sirt1 through TGF β and the inhibitory mechanism of Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

天野 恭志 (Amano, Hisayuki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20549331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NMNによるSirt1-NAD⁺経路の活性化により、炎症性腸疾患における“線維化”を抑制する機構を解明するために研究を行ってきた。線維芽細胞の活性化におけるSirt1の発現を解析するために野生型マウス胎仔線維芽細胞に対しTGF β により刺激したところ、Sirt1タンパク質の発現や細胞内NAD⁺量が抑制された。そして、炎症性腸疾患マウスモデルを用いて、大腸の線維化について解析したところ、NMNを投与したマウスでは線維化が抑制された。また、ミトコンドリア機能解析を行った結果、Sirt1機能欠損マウス由来細胞では野生型細胞と比較して酸素消費速度などが有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回申請者らは、炎症性腸疾患における“線維化”におけるSirt1-NAD⁺経路の機能に着目し、本分子経路がミトコンドリアの機能を介して線維化形成を抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory Bowel Disease (IBD) might be prevented by repressing fibrosis in gut. Here, I show that the administration of nicotinamide mononucleotide (NMN), which is a metabolic intermediate on NAD⁺ synthetic pathway, could attenuate fibrosis in colon of mice and fibroblast activation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). RNA sequencing analyses in gut of wild type mice showed that inflammatory pathways were down-regulated by NMN administration. And the extracellular flux analyses showed that the oxygen consumption rate could be significantly improved by NMN in wild type MEFs, but not in Sirt1 deficient cells. Taken together, these results suggest that NMN could attenuate fibrosis in colon tissue and increase mitochondrial activity through Sirt1 and NAD⁺.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：IBD Sirtuin 線維化

1. 研究開始当初の背景

多くの慢性炎症性疾患と同様に、潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患は免疫機能の障害に起因すると考えられているが、その詳細については未解明な部分が多い。また、免疫反応によって誘導される組織の線維化は、がんや糖尿病を含む生活習慣病などの様々な疾患の病因や老化の素因と考えられているが、一方で薬剤などにより可逆的に改善させることが可能である。申請者がこれまでに研究を行ってきた Sirtuin は、様々な組織の線維化形成との関連について近年明らかにされつつある。

申請者は、マウスモデルを用いて、テロメアの短縮による p53 の活性化が、Sirtuin 遺伝子群の発現を抑制し、肝臓の線維化を誘導することを明らかにした。一方で、補酵素 NAD⁺前駆体で Sirtuin の活性促進物質であるニコチンアミドモノヌクレオチドを、四塩化炭素(CCl₄)により肝障害を誘導したマウスに対して投与すると、肝臓におけるコラーゲンや α SMA、TGF β などの発現が抑制され肝線維化が抑制されたが、Sirt1 の機能を欠損したマウスにおいて、NAD⁺前駆体であり Sirtuin の活性促進物質であるニコチンアミドモノヌクレオチドを投与しても線維化が十分に抑制されなかった (*Amano et al. Cell Metabolism 2019, Amano et al. Mol Cell Oncol. 2019*)。このことから、ニコチンアミドモノヌクレオチドは、主に Sirt1 の機能を介して線維芽細胞の機能を抑制し、組織の線維化を抑制する可能性が考えられた。

Sirtuin は、哺乳類では Sirt1-7 から成る遺伝子群であり、NAD⁺依存的に脱アセチル化などのタンパク質の翻訳後修飾を制御する。そしてこの遺伝子群は、真核生物において広く保存されている。Sirtuin はカロリー制限により活性化される特徴を有し、その中でも特に Sirt1 は、ヒストン脱アセチル化酵素活性により、クロマチン構造を調節することで遺伝子発現を制御する。そして近年、Sirt1 が、炎症性腸疾患を含む、慢性炎症性疾患において重要な働きをすることが明らかになりつつある。

線維芽細胞は、臓器や結合組織において、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生する特徴を有する。一般的に、組織における線維芽細胞は、炎症反応を仲介する役割として機能する。そのため、組織や臓器において様々な免疫応答によって分泌される TGF β を含む炎症性サイトカインによって、線維芽細胞は活性化される。その結果、線維芽細胞は筋線維芽細胞へ分化転換し、線維化が誘導される。一方で、他の慢性炎症性疾患と同様に、炎症性腸疾患においても線維芽細胞が重要な機能を有していると考えられるが、その機能についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では炎症性腸疾患や線維芽細胞における Sirt1 の発現や機能について解明することを目的とする。マウス由来線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts, 以下 MEF) や炎症性腸疾患マウスモデルを用いて、Sirt1 やニコチンアミドモノヌクレオチドによる大腸の線維化を抑制する分子経路を探索する。

3. 研究の方法

TGF β による Sirt1 の発現と細胞内 NAD⁺量の制御機構の解析

野生型 MEF に対して TGF β による刺激を行い、Sirt1 タンパク質の発現をウエスタンブロットで解析した。そして、TGF β により刺激した MEF 細胞において、細胞内 NAD⁺量を比色定量法により解析した。

MEF における遺伝子発現解析

細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行った。得られた遺伝子発現データを基に Gene Set Enrichment (GSE)解析を行い、特定の機能をもつ遺伝子群の発現がどのように変動したのかについて、TGF β を投与した細胞と TGF β と NMN の両方を投与した細胞の比較し解析を行った。

炎症性腸疾患マウスモデルにおける線維化の解析

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)による炎症性腸疾患マウスモデルを誘導し、大腸の線維化形成について Sirius red 染色による組織解析を行った。

炎症性腸疾患マウスモデルにおける遺伝子発現解析

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)による炎症性腸疾患マウスモデルを誘導し、マウスの大腸から RNA を抽出した。そして、次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行い、得られた結果に対して GSE 解析を行った。特定の機能をもつ遺伝子群の発現がどのように変動したのかについて、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与した群と投与しなかった群の遺伝子発現を比較

し解析した。

酸素消費量の解析

野生型および Sirt1 機能欠損マウス由来 MEF において細胞外フラックスアナライザーによる酸素消費量を測定した。

4. 研究成果

(1) 野生型 MEF に対して TGFβによる刺激を 0、3、12 および 24 時間行い、Sirt1 の発現をウェスタンブロットによる解析を行ったところ、24 時間以上刺激をするとタンパク質レベルでの Sirt1 の発現が低下した。一方で、TGFβのシグナル伝達経路に関わる Smad2 のリン酸化を解析したところ、刺激後 3 時間の時点でリン酸化は残っていたが、24 時間後には消失していた。このことから、Sirt1 のタンパク質レベルでの発現は Smad 経路に非依存的な分子機構によるものと考えられた。そして、TGFβによる細胞内 NAD⁺量の変化について解析したところ、24 時間刺激すると NAD⁺量はコントロールと比較して有意に減少したが、ニコチンアミドモノヌクレオチドを同時に培養液に加えた細胞では有意に回復した。このことから、TGFβにより刺激した細胞では、細胞内 NAD⁺量を積極的に消費するが、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与すると回復することが明らかになった。

(2) TGFβにより刺激した細胞と、TGFβとニコチンアミドモノヌクレオチドの両方で刺激した細胞の遺伝子発現を比較するために、次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行ったところ、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与すると TGFβの標的遺伝子による分子経路の発現が抑制された。そして DSS による炎症性腸疾患マウスモデルにおいて大腸の組織解析を行ったところ、粘膜上皮層が損傷し線維化の誘導が観察されたが、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与したマウスでは抑制された。また、DSS を投与したマウス群と、DSS とニコチンアミドモノヌクレオチドを投与したマウス群を比較するために、次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行ったところ、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与した群では、炎症や TGFβによる分子経路、TLR4 や LPS など微生物叢による分子経路などが抑制された。一方で、ミトコンドリアに関わる経路、特に酸化的リン酸化経路やミトコンドリア膜に関わる分子などが活性化された。

(3) 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸を解析したところ、野生型細胞にニコチンアミドモノヌクレオチドを投与すると、投与しなかった野生型のコントロールと比較してミトコンドリア予備呼吸能は有意に増加した。一方で、ニコチンアミドモノヌクレオチドを投与した Sirt1 機能欠損マウス由来の細胞では、投与しなかった Sirt1 機能欠損細胞と比較して予備呼吸能は有意に増加しなかった。このことから、ニコチンアミドモノヌクレオチドによるミトコンドリア予備呼吸能には、Sirt1 が重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueda T, Kanai A, Komuro A, Amano H, Ota K, Honda M, Kawazu M, Okada H.	4. 巻 3
2. 論文標題 KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML1 ETO by regulating chromatin accessibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fba.2021-00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oka N, Komuro A, Amano H, Dash S, Honda M, Ota K, Nishimura S, Ueda T, Akagi M, Okada H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Amano H, Sahin E.	4. 巻 6
2. 論文標題 Telomeres and sirtuins: at the end we meet again	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 e1632613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23723556.2019.1632613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Amano H, Chaudhury A, Rodriguez-Aguayo C, Lu L, Akhanov V, Catic A, Popov YV, Verdin E, Johnson H, Stossi F, Sinclair DA, Nakamaru-Ogiso E, Lopez-Berestein G, Chang JT, Neilson JR, Meeker A, Finegold M, Baur JA, Sahin E.	4. 巻 29
2. 論文標題 Telomere Dysfunction Induces Sirtuin Repression that Drives Telomere-Dependent Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 1274 ~ 1290.e9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cmet.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ota K, Komuro A, Amano H, Kanai A, Ge K, Ueda T, Okada H.	4. 巻 9
2. 論文標題 High Fat Diet Triggers a Reduction in Body Fat Mass in Female Mice Deficient for Utx demethylase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46445-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 Sirtuin-NAD+経路による炎症性腸疾患関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 炎症性腸疾患関連大腸がんにおけるSirt1-NAD+経路の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患とその関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野恭志、上田 健、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡田 斉 (Hitoshi Okada) (20280620)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------