

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16143

研究課題名（和文）腸内分泌細胞構成の加齢変化とその制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Age-Related Changes in Enteroendocrine Cell Subtype Composition and Their Regulatory Mechanisms

研究代表者

小山 明（中島明）（Nakajima-Koyama, May）

京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員（RPD）

研究者番号：80868026

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、腸内分泌細胞を含む様々な小腸上皮細胞種に対する加齢の影響を調べるために、自然加齢マウスを用いた組織学的解析および網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、加齢に伴う細胞構成の変化や細胞種特異的な遺伝子発現変化を明らかにした。さらに、小腸上皮細胞の加齢変化を制御する複数のシグナル伝達経路を同定した。その結果に基づき、*in vitro*において、小腸上皮の加齢変化を模倣する小腸オルガノイド培養系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小腸上皮の加齢変化を制御するメカニズムの一端を解明することができた。さらに、小腸上皮の加齢変化が代謝異常の要因となる可能性が示唆された。この研究成果が、加齢性代謝疾患の予防法・治療法の開発につながることを期待される。さらに、*in vitro*において小腸上皮の加齢変化を模倣する小腸オルガノイド培養系の構築に成功したことから、臓器老化研究におけるオルガノイド培養系の有用性が示され、本研究成果が、健康長寿社会の実現に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted histological analysis and comprehensive gene expression analysis using naturally aged mice to investigate the effects of aging on various intestinal epithelial cell types, including enteroendocrine cells. As a result, we revealed changes in cellular composition and cell type-specific gene expression alterations associated with aging. Furthermore, we identified multiple signaling pathways that regulate the aging-related changes in intestinal epithelium. Based on these findings, we successfully established an *in vitro* intestinal organoid culture system that mimics the aging changes in the small intestine.

研究分野：幹細胞

キーワード：幹細胞 小腸 加齢 老化 オルガノイド 腸内分泌 トランスクリプトーム解析 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 個体老化における小腸上皮の役割

小腸は、栄養吸収、内分泌制御、バリア形成などを介して、全身の恒常性を制御する重要な器官である。近年、加齢に伴う腸内細菌叢の乱れが、肥満や糖尿病などの加齢性代謝疾患を引き起こす要因となることが示唆されている (DeJong et al., *Cell Host Microbe*, 2017)。したがって腸内環境からの刺激を直接受容する小腸上皮は、加齢性疾患発症や個体老化進行において重要な役割を果たすと考えられる。先行研究により、加齢に伴う、小腸上皮のタイトジャンクションを介した物理的バリア機能低下が、全身性炎症を引き起こすことがわかってきた (Thevaranjan et al., *Cell Host Microbe*, 2017)。その一方で、小腸上皮の活発な新陳代謝や小腸上皮が担う多様な機能が、腸内環境の加齢変化を受けてどのように変容するのか、さらにその加齢変容が個体老化にどのようにつながるのかはいまだ明らかではない (図 1)。

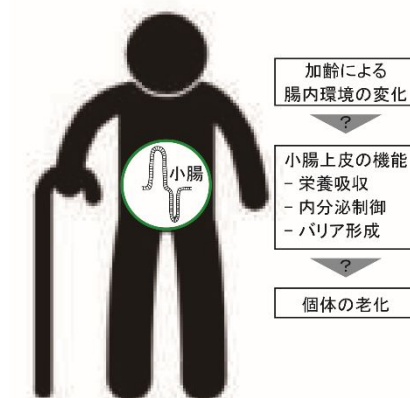


図1: 個体の老化における小腸上皮の役割

(2) 小腸上皮幹細胞と分化細胞の加齢変化

加齢に伴う小腸上皮の機能変化および個体老化における役割を明らかにするためには、細胞レベルでの加齢変化とその分子基盤を理解することが重要である。小腸上皮の元となる小腸上皮幹細胞は、絶えず細胞分裂しながら、吸収上皮細胞、ゴブレット細胞、パネート細胞、腸内分泌細胞、タフト細胞などの分化細胞を供給する。小腸上皮幹細胞の自己複製と分化を制御する分子機構については、個体の発生期や若齢期における研究が盛んに行われているが (Beumer J. & Clevers H., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2021) 小腸上皮幹細胞および分化細胞の加齢変化とその制御機構については不明な点が多い。

(3) これまでの研究成果

研究代表者は、若齢 (約 3 月齢) と加齢 (約 24 ヶ月齢) マウス由来の小腸を用いて、小腸上皮細胞の加齢変化の解析を実施した結果、小腸上皮細胞のターンオーバー速度遅延、細胞増殖能の低下、腸内分泌細胞への分化能の上昇、損傷後再生能の低下が観察された。以上の加齢変化のうち、腸内分泌細胞への分化能上昇に着目した。腸内分泌細胞はサブタイプごとに異なる腸管ホルモンを分泌し、消化液の分泌、腸管運動、腸管免疫、食欲、代謝を制御するため (Gribble et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 2016) 腸内分泌細胞数の増加が、小腸上皮の内分泌機能、さらには、全身の恒常性に影響を与える可能性があると考えた。さらに、予備的結果から、腸内分泌細胞サブタイプ構成が加齢により変化する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

腸内分泌細胞各サブタイプから分泌される様々な腸管ホルモンは、全身の恒常性に影響を与えるが、現在までに、腸内分泌細胞サブタイプ構成の加齢変化を体系的に調べた報告はほとんどない。さらに、腸内分泌細胞サブタイプごとの分化を制御する機構についても十分に明らかにされていない。本研究では、single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) による遺伝子発現の網羅的解析ならびに小腸オルガノイド培養技術を用いて、腸内分泌細胞サブタイプ分化の加齢変化とその制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、腸内分泌細胞の加齢変化が個体老化に与える影響を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) scRNA-seq を用いた小腸上皮細胞の加齢変化の解析

従来、腸内分泌細胞は、腸管ホルモンの種類によって 8 種類のサブタイプに分類されてきたが、近年の scRNA-seq 技術の進歩により、若いマウス個体において、従来考えられてきたよりも多様な腸内分泌細胞サブタイプが存在することが示された (Haber et al., *Nature*, 2017)。そこで、腸内分泌細胞のサブタイプ構成 (種類と割合) の加齢変化を明らかにするために、若齢時および加齢時のマウス小腸上皮細胞の scRNA-seq 解析を実施する。また、腸内分泌細胞以外的小腸上皮細胞種についても、全体的な細胞構成、細胞種ごとの亜集団構成、遺伝子発現プロファイルの加齢変化を調べる。さらに、小腸上皮加齢変化の制御機構を明らかにするために、scRNA-seq 解析により同定した加齢性発現変動遺伝子群に対して、Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN) による上流因子予測解析を行う。

(2) 小腸上皮の加齢変化の分子機構の解明

小腸上皮は体外に取り出し、in vitro で自己組織体 (小腸オルガノイド) を培養することができる (Sato

et al., *Nature*, 2009)。小腸オルガノイドは簡便に遺伝子導入を行うことができる上に、培地条件を操作することで、生体内の環境を模倣することが可能である。そこで、若齢マウス由来小腸オルガノイド培養系において、項目(1)で見出した候補上流因子の発現や活性を人工的に制御し、小腸上皮の加齢変化(細胞構成と遺伝子発現)を模倣できるかを検証する。さらに、候補上流因子の発現や活性が *in vivo* において加齢変化を示すかどうかを調べるとともに、薬剤や中和抗体を用いた加齢個体への介入実験を行い、若返りを示すかどうかを検証する。

(3) 小腸上皮の加齢変化の種間比較

ヒトの小腸上皮のエイジングにおいてもマウスと同様の分子機構が存在するのかを明らかにすることが重要である。しかしながら、健常者のヒト小腸検体を解析することは困難である。そこで、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドを用いた小腸上皮エイジングモデル系の構築を試みる。具体的には、項目(2)にて、マウス小腸上皮の加齢変化を制御する上流因子が同定できた場合は、ヒトにおいて同様の分子機構が存在するかどうかについて、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドを用いて検証する。

4. 研究成果

(1) scRNA-seq を用いた小腸上皮細胞の加齢変化の解析

若齢マウスと加齢マウス各 3 個体において、小腸上皮細胞の scRNA-seq 解析を実施した。具体的には、マウス小腸上皮から陰窩領域を採取し、単一細胞に分散後、FACS により EpCAM 陽性上皮細胞を回収した。その後、10x Genomics 社の Single Cell 3'Gene Expression をプラットフォームとした scRNA-seq 解析を行った(図 2)。当初の主たる目的は、腸内分泌細胞サブタイプ構成の加齢変化の解析であったが、腸内分泌細胞とパネート細胞については、シングルセル化処理に弱く、解析に十分な細胞数が得られなかった。その他の小腸上皮細胞種(幹細胞、前駆細胞、吸収上皮細胞、ゴブレット細胞、タフト細胞)については、加齢に伴う細胞構成変化や遺伝子発現変化を検出することができた。これら各細胞種について詳細な解析を行った結果、分化細胞種ごとの成熟や亜集団構成が加齢により変化し、小腸のバリア機能や全身の代謝制御に影響を与える可能性が示唆された。さらに、加齢依存的な発現変動遺伝子群に対して、Ingenuity Pathway Analysis を実施した結果、加齢に伴い活性が促進、ならびに、抑制されると予測される上流因子を多数得た。

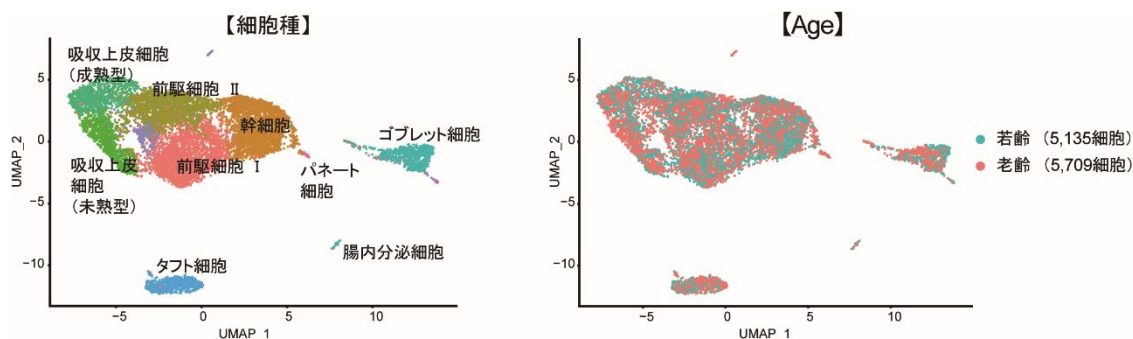


図2: 若齢および老齢マウス由来小腸上皮細胞のscRNA-seq解析

UMAPによる次元削減を行った。左図は細胞種ごとの色分けを示す。

右図は若齢および老齢マウス由来の細胞を色に分けて示す。

(2) 小腸上皮の加齢変化の分子機構の解明

項目(1)で得られた候補上流因子について、特に、シグナル伝達経路、サイトカイン、増殖因子に着目した。若齢マウス由来の小腸オルガノイドに対して、リコンビナントタンパク質ならびに小分子化合物を添加し、候補上流因子計 11 個の活性を操作した。添加 24、48 時間後に小腸オルガノイドを回収し、各細胞種マーカー遺伝子や加齢依存的な発現変動を示した遺伝子群の発現を qRT-PCR により解析した。その結果、小腸上皮の加齢変化を誘導する複数のシグナル伝達経路を同定した。加齢に伴うこれらシグナル伝達経路の活性変化が、マウス小腸で実際に起きていることを確認した。興味深いことに、これらシグナル伝達経路群の活性化レベルのバランスが、加齢時の小腸上皮幹細胞機能の制御に重要であることを示した。一方、これらシグナル伝達経路群の活性変化に対する感受性は小腸上皮細胞種ごとに異なり、そのことが各細胞種特異的な加齢変化を生み出す要因となっている可能性が示された。本研究開始当初に見出していた、加齢に伴う腸内分泌細胞増加についても、その加齢変化を制御するシグナル伝達経路を同定することができた。以上の結果から、小腸上皮の加齢変化を制御するシグナル伝達ネットワークが明らかとなり、これらを人工的かつ統合的に操作することで、*in vitro* において小腸上皮加齢過程を模倣できることが示された。また、これらシグナル伝達経路群の活性変化には、小腸上皮細胞、腸内細菌叢、免疫細胞の相互作用が関与することを示唆するデータを得ており、小腸オルガノイド、腸内細菌、免疫細胞の共培養を行うことにより、より生体に近い *in vitro* エイジングモデル系を構築できると考えられる。さらに今後、生体内においてこれらのシグナル伝達経路に介入し、全身の代謝に与える影響を調べることで、個体老化における小腸上皮の役割を明らかにする。また、

腸内分泌細胞については、小腸上皮組織を固定後、核を抽出してから scRNA-seq 解析を行う、という新手法に切り替えることで、シングルセル化処理による細胞へのダメージを回避し、サブタイプ構成の加齢変化をシングルセルレベルで明らかにすることができると考えている。

(3) 小腸上皮の加齢変化の種間比較

既報 (McCracken et al., *Nat. Protoc.*, 2011) に基づき、ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドを作製したが、その遺伝子発現パターンは胎児様であった。加齢形質を誘導する以前に成体様腸オルガノイドを作製する必要性があり、その方法に関して現在検討中である。

(4) 本研究成果の意義

本研究により、小腸上皮の加齢変化を制御するメカニズムの一端を解明することができた。さらに、小腸上皮の加齢変化が代謝異常の要因となる可能性が示唆された。この研究成果が、加齢性代謝疾患の予防法・治療法の開発につながると考えられる。さらに、in vitro において小腸上皮の加齢変化を模倣する小腸オルガノイド培養系の構築に成功したことから、本研究成果が、オルガノイドを用いた臓器老化研究の発展に寄与し、健康長寿社会の実現に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nalbandian M, Zhao M, Kato H, Jonouchi T, Nakajima-Koyama M, Yamamoto T, Sakurai H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq reveals heterogeneity in hiPSC-derived muscle progenitors and E2F family as a key regulator of proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101312	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------