

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22818

研究課題名（和文）NAD+およびエピゲノムの制御による老化メカニズムの解明と新たな抗加齢介入の開発

研究課題名（英文）Elucidation of Aging Mechanisms by Regulation of NAD+ and Epigenome and Development of New Anti-Aging Interventions

研究代表者

齋藤 義正（Saito, Yoshimasa）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：90360114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：老化の分子メカニズムを解明するため、老化マウスの腸管上皮からオルガノイド（組織構造体）を樹立し、遺伝子発現変化やエピゲノム変化を解析した。老化マウス由来のオルガノイドにおいては、増殖能や組織構築能力が低下していた。また、エピゲノム変化により、幹細胞マーカーであるLgr5やWntシグナル経路の遺伝子発現が老化マウス由来オルガノイドで低下していた。さらに、NAD+前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）の投与により、老齢マウス由来腸管上皮オルガノイドが若齢由来のような形態に変化し、幹細胞関連遺伝子の発現も回復した。NMNがNAD+活性を上昇させ、抗加齢効果を示していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により特定された加齢特異的なエピゲノム変化や遺伝子発現変化およびニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）などのNAD+の前駆体の投与による変化をさらに詳細に検討することで、老化の分子メカニズムを解明すると共に新たな抗加齢介入の基盤が開発されることが期待される。開発に成功すれば、高齢者の健康寿命の延長ならびにQOLの向上が実現し、がんをはじめとする加齢関連疾患の予防や高齢者の臓器移植の成功率向上などにつながることを期待される。最終的には、高齢者における医療費や介護負担の軽減にもつながり、現在我が国において大きな問題となっている医療経済の改善にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of aging, we established organoids from the intestinal epithelium of aging mice and analyzed gene expression changes and epigenomic changes.

The organoids from aged mice showed reduced proliferative capacity and tissue building ability. In addition, epigenomic changes led to decreased gene expression of stem cell markers such as Lgr5 and Wnt signaling pathway in organoids from aged mice. In addition, administration of nicotinamide mononucleotide (NMN), an NAD+ precursor, changed the morphology of intestinal epithelial organoids from aged mice to that of young mice and restored the expression of stem cell-related genes, suggesting that NMN increases NAD+ activity and has an anti-aging effect.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：老化 NAD+ エピゲノム オルガノイド 抗加齢

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会に突入した我が国において、高齢者における医療費や介護負担の増大が深刻な問題となっており、抗加齢により健康寿命を延長させることは喫緊の課題となっている。

これまでの様々な研究から、摂取カロリーを抑えると寿命が延長するというカロリー制限仮説が支持されている (de Cabo et al. Cell. 157, 1515, 2014)。カロリー制限によってニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性のヒストン脱アセチル化酵素であるサーチュインが活性化されることが報告された (Imai S et al. Nature. 403, 795, 2000)。

(2) NAD⁺は、全ての生物種に存在する古典的な補酵素であり、酸化還元反応で中心的役割を果たしている。長寿遺伝子であるサーチュインが NAD⁺依存性であることや、NAD⁺が加齢とともに体内で減少することから、NAD⁺前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を投与することにより、NAD⁺濃度を体内で上昇させることで寿命を延長させる研究が大きな注目を集めている。サーチュインが活性化することにより、様々なエピゲノム変化が生じ、長寿遺伝子群の発現を制御していることが予想されるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

(3) 近年、組織幹細胞を3次元で培養することにより、*in vitro*で各臓器を模倣した組織構造体を培養するオルガノイド培養法が開発された。研究代表者の齋藤は、老齢マウスの腸管上皮からオルガノイドを樹立し、老化モデルを確立することに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、老齢マウスの腸管上皮からオルガノイドを樹立し、エピゲノム変化を網羅的に解析することで老化の分子機構を解明する。さらに、NAD⁺の制御およびエピゲノム制御に基づく新たな抗加齢介入についても検討を行うことで、高齢者の健康寿命を延長するシーズを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 加齢マウスからの腸管上皮オルガノイドの樹立と加齢変化の検討

C57BL/6 マウスを用いて、10 週齢未満の若齢マウスおよび 50 ~ 100 週齢の加齢マウスから腸管上皮を採取し、オルガノイドを樹立した。

若齢および老齢の腸管上皮から樹立したオルガノイドにおいて、形態変化・増殖能および老化マーカーである α -galactosidase の蓄積や Cdkn1a (p21) および Cdkn2a (p16) の発現変化、サーチュイン活性などを解析することで加齢変化の検討を行った。

(2) エピゲノムおよび遺伝子発現の網羅的解析による加齢特異的なエピゲノム変化の探索

樹立した腸管上皮オルガノイドにおける遺伝子の発現変化をマイクロアレイにより網羅的に解析した。

また、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シーケンスやクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイにより解析した。エピゲノム変化と全遺伝子の発現変化および加齢変化などを統合的に解析することで、加齢特異的なエピゲノム変化を特定した。

(3) NAD⁺およびエピゲノムの制御による老化メカニズムの解明と新たな抗加齢介入の開発

NAD⁺の前駆体である NMN を老齢腸管上皮オルガノイドに投与することで NAD⁺の回復を試みた。

NAD⁺およびエピゲノムの制御に伴う腸管上皮オルガノイドの増殖能、サーチュイン活性、老化マーカーの変化および加齢特異的なエピゲノム変化を詳細に解析することで、老化の分子メカニズムを解明すると共に新たな抗加齢介入の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 若齢および老齢マウス由来腸管上皮オルガノイドの形態変化

老化を培養皿の中で再現するモデルとして、老齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドを確立した。若いマウスと老化したマウスの腸管上皮からオルガノイドを樹立し、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。

図 1 に示す通り、若齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドは、“budding” と呼ばれる腸管陰窩に

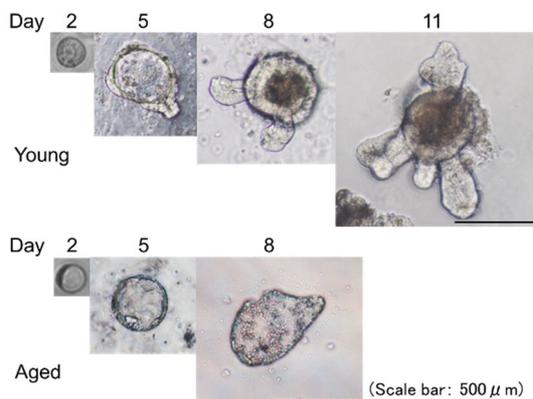


図1 若齢および老齢マウス由来腸管上皮オルガノイドの形態変化

相当する幹細胞が存在する突起状のコンパートメントが認められるのに対し、老齢のマウス由来のオルガノイドにおいては、腸管陰窩構造が認められず、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。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。

さらに、老齢マウスの腸管上皮から樹立したオルガノイドにおいて、老化マーカーである galactosidase の蓄積や Cdkn1a (p21) および Cdkn2a (p16) の発現上昇を確認した。

(2) 老化に伴うエピゲノム変化による Wnt シグナル経路の抑制

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 の発現が老齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドで有意に低下しており (図 2a)、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により、老齢マウス由来の腸管上皮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 (図 2b)。

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) が老齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドにおいて有意に亢進していた (図 2c)。

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 (図 2d)。

以上の結果より、老化したマウスの腸管上皮オルガノイドでは、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を示唆している。

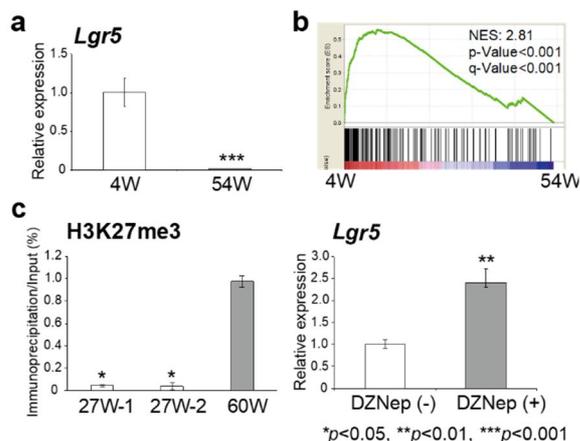


図2 老化に伴うエピゲノム変化によるWntシグナルの抑制

(3) 老齢マウス由来腸管上皮オルガノイドに対する NMN の効果

腸管上皮オルガノイドにおける NAD⁺活性および NMN の効果について検証を行った (図 3)。

上述の結果と同様に、若齢 (6 週齢) 由来の腸管上皮オルガノイドでは、旺盛な増殖能と共に “budding” と呼ばれる幹細胞を含む腸管陰窩を模倣した突起構造が認められたのに対し、老齢 (78 週齢) 由来の腸管上皮オルガノイドでは腸管陰窩構造が少なく、増殖能も低下していた。

興味深いことに、NAD⁺の前駆体である NMN の投与により、再び若齢由来のような形態に変化することを確認している。また、NAD⁺活性についても、老齢マウス由来のオルガノイドでは若齢に比べて低下していたが、NMN の投与により回復した (図 3)。

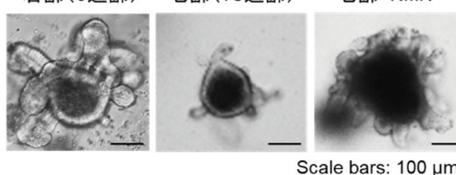
さらに、老齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドに対して NMN を投与することにより、細胞内 NAD⁺ 量の増加に伴う Sirt1 の活性化、幹細胞マーカー Lgr5 の H3K27me3 の低下に伴う発現上昇、老化マーカーである p16、p21 の発現低下を確認した。

以上のように、NMN の投与により、老齢マウス由来の腸管上皮オルガノイドが若齢由来のような形態に変化し、幹細胞関連遺伝子の発現も回復した。抗老化物質である NMN が老化した腸管上皮において NAD⁺活性を上昇させ、抗加齢効果を示していると考えられた。

一方で、Sirt1 阻害剤であるニコチンアミド (NAM) を腸管上皮オルガノイドに投与すると腸管陰窩構造が消失し嚢胞状構造となり、細胞増殖能も有意に亢進していた。Sirt1 阻害が腫瘍化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【腸管上皮オルガノイドの形態】

若齢 (6 週齢) 老齢 (78 週齢) 老齢+NMN



【NAD⁺活性】

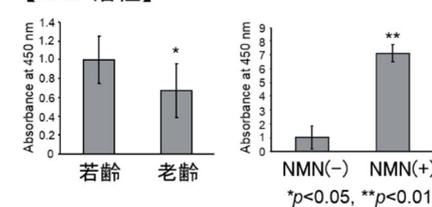


図3 老齢マウス由来腸管上皮オルガノイドにおける形態およびNAD⁺活性の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito Y, Muramatsu T, Kanai Y, Ojima H, Sukeda A, Hiraoka N, Arai E, Sugiyama Y, Matsuzaki J, Uchida R, Yoshikawa N, Furukawa R, Saito H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Establishment of Patient-Derived Organoids and Drug Screening for Biliary Tract Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1265-1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.03.088.	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 Lau DK, Mouradov D, Wasenang W, Luk IY, Scott CM, Williams DS, Yeung YH, Limpaboon T, Iatropoulos GF, Jenkins LJ, Reehorst CM, Chionh F, Nikfarjam M, Croagh D, Dhillon AS, Weickhardt AJ, Muramatsu T, Saito Y, Tebbutt NC, Sieber OM, Mariadason JM.	4. 巻 21
2. 論文標題 Genomic Profiling of Biliary Tract Cancer Cell Lines Reveals Molecular Subtypes and Actionable Drug Targets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 624-637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.10.044.	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 該当する
1. 著者名 Katsuda T, Matsuzaki J, Yamaguchi T, Yamada Y, Prieto-Vila M, Hosaka K, Takeuchi A, Saito Y, Ochiya T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife	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） 10.7554/eLife.47313.	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 該当する
1. 著者名 Yoshikawa N, Saito Y, Manabe H, Nakaoka T, Uchida R, Furukawa R, Muramatsu T, Sugiyama Y, Kimura M, Saito H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glucose Depletion Enhances the Stem Cell Phenotype and Gemcitabine Resistance of Cholangiocarcinoma Organoids through AKT Phosphorylation and Reactive Oxygen Species.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers11121993.	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 Saito Y, Muramatsu T, Saito H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Establishment and Long-Term Culture of Organoids Derived from Human Biliary Tract Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2019.100009.	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 齋藤義正	4. 巻 56
2. 論文標題 腸管上皮オルガノイドを用いたstemセルエイジング研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 994-998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.11_994	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野上和幹、内田諒英、梶山洋平、鈴木裕佳水、齋藤義正、木村真規、齋藤英胤
2. 発表標題 Organoid培養法により樹立した腸管上皮幹細胞に対するNMN (Nicotinamide mononucleotide) による抗老化効果の検討
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野上和幹、齋藤義正、山西健太、木村真規
2. 発表標題 老齢腸管上皮organoidに対するNAD+ 前駆体の抗老化効果と分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020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	金井 弥栄 (Kanai Yae) (00260315)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	

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