

論文の内容の要旨

論文題目 NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の腸管内分泌細胞における役割の解明

氏名 三浦 雅臣

背景

近年、我が国では高齢化が進み、高齢者の人口は増加の一途をたどっている。それに伴って医療や介護など様々な問題が浮上してきており、高齢者ががんや認知症、心・脳血管疾患に罹患せずに QOL を維持して生活できること、つまり健康寿命の延伸が重要な課題となっている。がんや認知症、心・脳血管疾患は、加齢に伴って増加する、いわゆる加齢性疾患であるが、その病態やメカニズムは様々な分野で研究されている。特に、長寿遺伝子、抗老化遺伝子として知られる「Sirtuin」が、老化制御に関わる分子の一つとして加齢性疾患を紐解く重要なターゲットとして着目されている。「Sirtuin」は、その哺乳類ホモログとして Sirt1 (Sirtuin1) から Sirt7 が同定されているが、Sirt1 に関しては、NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素として、エネルギー代謝、細胞増殖・分化、アポトーシス、免疫応答そしてインスリン分泌などあらゆるプロセスに関与していることが知られている。種々の動物種において、カロリー制限を行うと寿命が延長することが知られているが、そのカロリー制限による寿命の延伸のメカニズムにおいても Sirt1 が関与する可能性が示され、Sirt1 をターゲットとしたヒトへの臨床応用も試みられ始めている。

糖代謝領域においても、インスリン分泌や膵β細胞の保護、あるいはインスリン抵抗性において Sirt1 が重要であるという報告が多数ある。糖代謝を調節する臓器としては、主に膵臓・肝臓・筋肉・脳・腸管・腎臓などが知られており、それぞれについて Sirt1 との関わりが論じられている。腸管に関して言えば、カロリー制限下における腸管の幹細胞の Sirt1 の機能や、がんの発生・進展における Sirt1 の働きが研究されている。しかしながら、腸管内分泌細胞に関する Sirt1 の機能については報告がない。近年、腸管は栄養吸収臓器としての側面だけではなく、内分泌臓器としての一面も着目されており、腸管 L 細胞から分泌されるインクレチンの一つである GLP-1 に関しては、抗糖尿病薬として治療標的となっている。内分泌臓器としての腸管と Sirt1 との関連を検討することによって、さらに新たな糖尿病の治療戦略が得られる可能性がある。消化管ホルモンを分泌する腸管内分泌細胞は、腸管幹細胞を起源とし、様々な転写調節を受けて分化する。腸管全体の割合で言えば腸管内分泌細胞はわずか 1% 程度であるが、その分化には壮大かつ緻密なプロセスが存在していることが知られている。カロリー制限下においては、腸管の内分泌細胞が減少することが指摘されているが、カロリー制限と Sirt1 が深く関連していることから、腸管内分泌細胞の分化調節にも Sirt1 が関与していることが予想される。

そこで、腸管の Sirt1 ノックアウトマウスを使用し、その表現型を調べることで、腸管の内分泌細胞の分化調節と Sirt1 との関連を検討することとした。これらを明らかにするこ

とによって、腸管内分泌細胞を標的とした新たな糖尿病治療薬を探索することを目的として研究を行った。

方法

腸管特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Villin-Cre-Sirt1^{loxP/loxP} floxed マウス) を用いて、その糖代謝に関連する表現型を調べることにした。具体的には、野生型マウスと比較した体重推移や各臓器の重量、組織像、血清脂質、糖負荷試験、インクレチン分泌などを確認した。腸管特異的 SIRT1 ノックアウトマウスにおいて、GLP-1 を介して糖代謝が改善している可能性が示唆されたため、腸管内分泌細胞に着目し、染色や RNA 定量、オルガノイド培養などを行った。得られた結果から、さらにそのメカニズムを調べるために、フローサイトメーターにて単離した腸管内分泌細胞を用いた RNA 解析、ベクターを用いた Luciferase 活性解析を行った。そして、SIRT1 を標的とした物質 (NAM: nicotinamide) を用いてマウスへの投与実験を行った。

結果

高脂肪食負荷を与えた腸管特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Villin-Cre-Sirt1^{loxP/loxP} floxed マウス) では、体重増加が抑制されており、OGTT や ITT において糖代謝が改善していることが示された。糖代謝が改善していたのは、GLP-1 分泌が増大しており、腸管内分泌細胞が増加していたことが原因の一つとして考えられた。腸管特異的 SIRT1 ノックアウトマウスだけでなく、腸管内分泌前駆細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスにおいても GLP-1 分泌が増大しており、腸管内分泌細胞が増加していることが示された。これらより、腸管内分泌細胞の分化に SIRT1 が関与しており、その活性を低下させることで腸管内分泌細胞が増加し、結果として GLP-1 分泌が増大することが示された。腸管内分泌細胞の分化と SIRT1 の関連については、フローサイトメーターにて単離した腸管内分泌細胞の RNA 解析によって Ngn3 (Neurogenin3) が関与していることが明らかとなった。Ngn3 は膵臓においては膵β細胞の分化において重要な転写因子であり、腸管においても内分泌細胞の分化調節に関与していることが知られている。腸管内分泌前駆細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスにおける腸管の染色においても、Ngn3 の発現が上昇していることが確認でき、Sirt1 の活性が低下することによって Ngn3 が上昇し、腸管内分泌細胞が増加することが示唆された。さらに Ngn3 と Sirt1 との関わりについて検討するため、Ngn3 の転写調節領域をクローニングしてベクターに挿入し、Luciferase 活性を用いたプロモーター解析を行った。結果としては、Sirt1 が直接 Ngn3 の転写調節領域を制御している可能性は否定的と考えられた。最後に、NAD 代謝において SIRT1 を抑制する物質として NAM (Nicotinamide) が知られているが、NAM をマウスに投与することによって、その代謝の表現型を調べるとともに、腸管の内分泌細胞が増加するかどうかを検討したが、糖代謝における変化は認められず、内分泌細胞の増加も認められなかった。

考察

高脂肪食負荷を行った腸管特異的 SIRT1 ノックアウトマウスでは、体重増加が抑制され、糖代謝の改善が認められた。それは腸管内分泌細胞を増加させることによって GLP-1 分泌量を増加させて達成されているものと考えられた。近位空腸から抽出した mRNA の発現解析では、Ngn3 を含む内分泌細胞系の遺伝子変化は認められなかったものの、組織染色において内分泌細胞の増加が確認できた。フローサイトメーターによって単離した内分泌細胞の定量 PCR において Ngn3 が特異的に上昇していたことから、一連の内分泌細胞増加のメカニズムには、Ngn3 が関与していることが示された。Ngn3 は、膵臓における内分泌細胞の分化に必要不可欠な転写因子であるが、腸管においても内分泌細胞の分化に深く関連していることが知られている。腸管幹細胞からの分化の過程で一過性に Ngn3 が発現し、それに続いて NeuroD や ISL-1 などの様々な転写因子が発現することで、腸管内分泌細胞に分化する。今回の研究においては、SIRT1 活性の低下が Ngn3 の活性上昇をもたらし、それによって内分泌細胞が増加したと考えられた。

Sirt1 と Ngn3 の間に介在するメカニズムについては、単離した腸管内分泌細胞の RNA 発現解析において、Ngn3 の上流にある転写因子である Math1 や NeuroD などの転写因子の活性に変化が認められなかったことから、直接 Sirt1 が Ngn3 の転写調節を行っている可能性があると考えられた。それを証明するために、Ngn3 の転写調節領域を挿入したベクターを用いて Luciferase 活性の測定実験を行った。しかしながら、Sirt1 の活性を変化させても、Luciferase 活性が変化しなかったことから、直接的に Sirt1 が Ngn3 に結合して転写調節を行うという可能性は否定的であると考えられた。Sirt1 は、NAD 依存性のデアセチラーゼとして、様々な遺伝子のアセチル化に関与することが知られているが、今回の研究における Sirt1-Ngn3 の関連についても、アセチル化を介したメカニズムが介在している可能性がある。今後は、Sirt1 のアセチル化に関与する分子の同定を行い、アセチル化を介した Ngn3 の上昇のメカニズムを検討していく必要がある。

今回の研究の最後に、SIRT1 活性を抑制する物質として知られる NAM をマウスに投与する実験を行った。先行研究では、NAM の長期投与によって糖代謝の改善が認められることが示されているが、腸管の内分泌細胞数については言及がない。今回の研究では、マウスへの NAM 投与実験を行い、腸管内分泌細胞の数量的変化を検討した。その結果、NAM によって、マウスの体重増加抑制効果が一部で認められたものの、OGTT や GLP-1 分泌の上昇を始めとする、代謝改善効果は認められず、内分泌細胞の増加も認められなかった。先行研究におけるプロトコルとは NAM の投与期間やマウスの背景が異なるという条件の違いはあるが、NAM による腸管内分泌細胞の増加はないものと考えられた。

SIRT1 活性を抑制させる物質としての NAM 投与実験については否定的な結果ではあったが、SIRT1 活性を調節することによって腸管内分泌細胞の分化を制御できるという点については、糖代謝疾患治療の新たな標的になりうる。GLP-1 陽性細胞を含む腸管内分泌細胞

の数を増やすための SIRT1 阻害は、将来、糖尿病の治療薬として開発される可能性が大いにあると考えられる。

結論

腸管における内分泌細胞の分化には SIRT1 が関与しており、SIRT1 の活性低下は内分泌細胞の増加をもたらすことが明らかとなった。さらに、内分泌細胞の分化と SIRT1 との間には Ngn3 が関与しており、SIRT1 活性低下によって Ngn3 の上昇がもたらされ、内分泌細胞の分化促進へと繋がることが示された。