

長寿医療研究開発費 平成 30 年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

細胞競合による栄養依存的な腸上皮恒常性と寿命の制御（28-44）

主任研究者 赤木 一考 国立長寿医療研究センター
組織恒常性研究 PT（プロジェクトリーダー）

研究要旨

3年間全体について

食餌制限（Dietary restriction: DR）は、酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類を含む様々な動物で寿命を延長させることが知られている。もちろん、飢餓状態や栄養失調症に陥るほどのDRは寿命を短縮させるが、適切なレベルで行えば寿命の延長だけに限らず、がん、肥満、糖尿病、神経変性疾患などの予防に繋がることを示されている。しかし、DRの作用機構、特に各組織における作用については、未だに不明な部分が多く残されている。

近年、腸内細菌叢の異常を含む腸管恒常性の破綻が、多くの生物種の健康や寿命に大きな影響を及ぼすことが明らかにされている。ショウジョウバエにおいても、腸管恒常性と寿命は密接に関係している。加齢したショウジョウバエの腸管では、腸幹細胞の異常増殖により腸管の形成異常（dysplasia）や機能不全が起きる。そのような腸管上皮恒常性の破綻により致死率が上昇することが明らかにされている。その要因の一つが、腸管バリア機能の低下による腸透過性の上昇である。主任研究者は、ショウジョウバエを用いたこれまでの研究から、加齢に伴う腸管バリア機能の破綻がDRによって抑制できることを明らかにしていた。したがって本研究では、その作用機序を明らかにすることを目的として研究を行なった。その結果、ショウジョウバエ腸管では、DRによって転写因子 *dMyc* の発現が一定に保たれており、アポトーシスを抑制することで腸管バリア機能を維持していることが明らかになった。一方、高栄養条件において個体や加齢した個体では、*dMyc* の発現が低下し高頻度でのアポトーシスが誘発されていることがわかった。また、その *dMyc* 依存的なアポトーシスの誘導に細胞競合のシステムが関わっていることが示唆された。そこで、加齢や栄養条件が腸管における細胞競合に与える影響について、遺伝学、分子生物学、生化学的手法を用いて検討した。

平成 30 年度について

平成 30 年度は、本研究の成果を論文として投稿したため、リバイスのための実験を多く行なった。これまでに、*dMyc* を腸管の分裂終了細胞（enteroblast: EB、enterocyte: EC）でノックダウンすると、DRにおける寿命延伸効果が減弱することがわかっていたが、*dMyc* の強制発現による効果は詳しくは明らかにされていなかった。そこで、*dMyc*

を EB/EC 特異的に強制発現し、寿命を調べた。その結果、*dMyc* の強制発現によって、高栄養条件において健康寿命が延伸することがわかった。これらの結果等を加え、論文を再投稿し、本研究成果は PLOS Genetics 誌に掲載された。

主任研究者

赤木 一考 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究 PT (プロジェクトリーダー)

分担研究者

なし

研究期間 平成 28 年 7 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

A. 研究目的

本研究では、まず DR によって腸管バリア機能が維持される分子機構について明らかにすることを目的とする。さらに、加齢や高栄養条件によって、腸管での細胞競合システムの機能がどのように変化するか、また、その変化が加齢時に観察される腸透過性の上昇や炎症を含む腸上皮組織恒常性の破綻にどのように寄与するかを明らかにする。それらによって、腸管上皮恒常性維持における細胞競合の役割について、そのシグナル経路や作用機序の解明を目指す。

B. 研究方法

3 年間全体について

腸管バリア機能における *dMyc* の重要性について

ショウジョウバエの腸透過性を定量的に観察するために、青色色素給餌法 (Smurf assay) を用いた。すなわち、ショウジョウバエに青色色素を溶かしたスクロース溶液を給餌し、全身が青く変化するか否かで腸透過性を定量した。この方法を用いて、腸管分裂終了細胞 (enteroblast: EB、enterocyte: EC) 特異的な *dMyc* ノックダウンが、腸透過性に影響するかどうかについて調べた。

腸管分裂終了細胞特異的な *dMyc* ノックダウンによる腸管への影響について

EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンによって、腸管でのアポトーシスが誘導されるかどうかについて、TUNEL 法を用いて調べた。

dMyc ノックダウン依存的な腸細胞のアポトーシスにおける腸内細菌叢の影響について

EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンによって観察されたフェノタイプが、腸内細菌叢の変化による影響なのかどうかを確かめるため、ショウジョウバエに抗生物質を給餌し、腸

内細菌叢の影響を排除した上で実験を行なった。抗生物質は、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン（それぞれ 50 μ g/ml）のカクテルを用いた。

腸管における *dMyc* 発現レベルの加齢変化について

主任研究者は、ショウジョウバエ腸管における *dMyc* mRNA の発現が加齢に伴い低下することと、その低下が DR によって抑制できることを明らかにしていた。しかし、*dMyc* mRNA の発現レベルの低下が、EC の数が変化したこと依存している可能性が考えられた。そこで、羽化後 7 日、21 日、35 日、49 日目の腸管における *Pdm1*（EC マーカー）の発現を qRT-PCR を用いて調べた。

腸管における細胞競合の観察および細胞競合能力の加齢変化と栄養の影響について

ショウジョウバエ腸管における細胞競合の解析には、遺伝学的モザイク解析（5966-GS, CoinFLP system）を用いた。このシステムでは、薬剤投与によって一過的に、分裂終了細胞である腸芽細胞（enteroblast: EB）と腸細胞（enterocyte: EC）のみに GFP で標識された変異細胞を作成することができる。このシステムを用いて、DR 条件で飼育した若いショウジョウバエ個体の腸管に *dMyc* ノックダウン細胞をモザイク状に作成し、それらの細胞の挙動について経時的に観察した。さらに、腸管における *dMyc* ノックダウン細胞の除去機能が加齢に伴いどのように変化するかについて明らかにするため、同様の実験を加齢させた個体（羽化後 21 日、28 日、35 日、56 日目）を用いて行った。さらに、栄養条件の違いによる影響についても調べた。

平成 30 年度について

EB/EC 特異的な *dMyc* 強制発現が寿命に与える影響について

主任研究者は、EB/EC 特異的に *dMyc* をノックダウンすると、DR による寿命延伸効果が減少することを見出していた。さらに、EB/EC 特異的に *dMyc* を強制発現すると高栄養条件下において寿命が延伸することを示唆する結果を得ていた。しかし、*dMyc* 強制発現による寿命延伸効果が安定しないことや、DR 条件では寿命が短縮するという問題点があった。そこで、EB/EC 特異的に *dMyc* を中年期から活性化する方法や断続的に活性化する方法を検討し、寿命への影響を調べた。

（倫理面への配慮）

本研究の研究対象はショウジョウバエであるため、人権保護や倫理面に配慮する必要のある研究は含まれていない。

C. 研究結果

3 年間全体について

腸管バリア機能における *dMyc* の重要性について

主任研究者は、EB/EC 特異的に *dMyc* をノックダウンすると、DR による寿命延伸効果が減少することを見出していた。そこで、その原因を明らかにするため、EB/EC 特異的に *dMyc* をノックダウンした個体の腸透過性について、青色色素給餌法を用いて調べた。その結果、*dMyc* のノックダウンにより DR 条件下での腸透過性が有意に上昇していることが明らかになった。

腸管分裂終了細胞特異的な *dMyc* ノックダウンによる腸管への影響について

次に、EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンにより腸透過性が上昇した原因を明らかにするため、腸管におけるアポトーシスの有無について TUNEL 法を用いて調べた。その結果、コントロール個体では、DR 条件においてアポトーシスがほとんど観察されないのに対して、*dMyc* をノックダウンした個体では、腸管でのアポトーシスが顕著に観察された。さらに、EB/EC 特異的に *dMyc* をノックダウンした個体に、アポトーシス阻害因子である *p35* を強制発現すると、観察されていた腸透過性の上昇がレスキューできることが明らかになった。

dMyc ノックダウン依存的な腸細胞のアポトーシスにおける腸内細菌叢の影響について

EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンによって観察された腸管でのアポトーシスが、腸内細菌叢の変化によってもたらされたものかどうかについて検討するため、EB/EC 特異的に *dMyc* をノックダウンした個体に、抗生物質のカクテルを給餌し、腸内細菌叢の影響を排除した上で、腸透過性について調べた。その結果、腸内細菌叢の有無とは関係なく、EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンによって腸透過性の上昇が観察された。さらにこの時、アポトーシスに関連する遺伝子の発現も有意に上昇していた。

腸管における細胞競合の観察および細胞競合能力の加齢変化と栄養の影響について

細胞競合とは、遺伝的な変異を持つなどの細胞適応度の低い細胞 (loser cell) が、正常な細胞 (winner cell) と隣接した際に、アポトーシスによって組織から除去される機構で、組織恒常性維持に重要な役割を持つと考えられている。また、ショウジョウバエやマウスの組織では、*Myc* の発現が低い細胞は、loser cell になることが知られている。そこで、EB/EC 特異的な *dMyc* ノックダウンによって引き起こされるアポトーシスが、細胞競合によるものである可能性について検討するため、遺伝学的モザイク解析を行なった。まず、DR 条件で飼育した若いショウジョウバエ個体の腸管に *dMyc* ノックダウン細胞を作成し、それらの細胞の挙動について経時的に観察した。その結果、*dMyc* ノックダウン細胞はアポトーシスで除去されることがわかった。またその時、近傍の野生型腸幹細胞が増殖し、細胞のターンオーバーを補償していることが明らかになった。次に、DR および高栄養条件で飼育した個体間で、*dMyc* ノックダウン細胞の除去効率 (細胞競合能力) に差があるかどうかについて検討した。その結果、若い個体では DR および高栄養条件において、細胞競合能力に差がないことが示唆された。さらに、同様の実験を加齢させた個体を用いて行った。その結果、DR および高栄養条件ともに加齢に伴う *dMyc* ノックダウン細胞の除去効率の低下が観

察された。一方で、DR 条件で飼育した個体では、高栄養条件で飼育した個体と比べて、*dMyc* ノックダウン細胞の除去効率の低下に明らかな遅延が観察された。これらのことから、加齢により腸管での細胞競合能力が低下することと、その低下が DR によって抑制できることが示唆された。

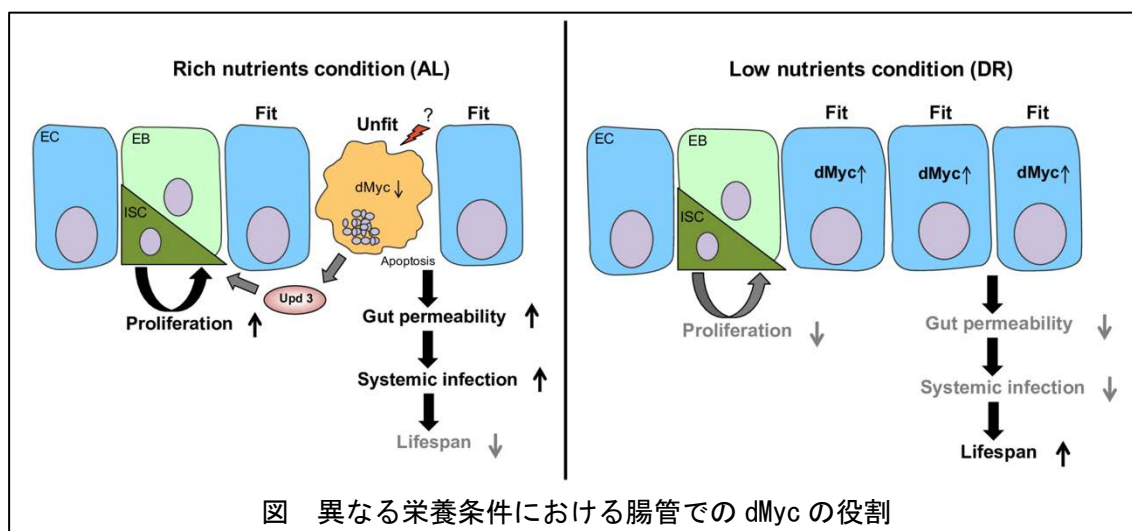
腸管における *dMyc* 発現レベルの加齢変化について

腸管での加齢に伴う *dMyc* mRNA レベルの低下が、EC の数が変化したこと依存しているかどうかを明らかにするため、EC マーカーである *Pdm1* の加齢変化を qRT-PCR 法によって調べた。その結果、老化した個体においても *Pdm1* の発現に変化は見られなかった。したがって、EC における細胞レベルでの *dMyc* の発現が加齢に伴い低下することが示唆された。

平成 30 年度について

腸管分裂終了細胞特異的な *dMyc* 強制発現が寿命に与える影響について

EB/EC 特異的に *dMyc* を中年期（羽化後 21 日目）から活性化する方法や断続的に活性化する方法を検討した。その結果、EB/EC 特異的に *dMyc* を断続的に活性化すると、高栄養条件下において健康寿命が延伸することがわかった。またこの時、加齢に伴う腸透過性の上昇も抑えられていることが明らかになった。



D. 考察と結論

3 年間全体について

本研究の成果により、腸管の分裂終了細胞における *dMyc* の発現は、それらの細胞の適応度 (cellular fitness) を規定するバロメーターとして働くことがわかった。そのため、高栄養条件や加齢した個体の腸管では *dMyc* の発現が低い細胞が多く出現するため、アポトーシスが頻発し、腸透過性が上昇するため感染症のリスクが高まると考えられる。一方で、DR 条件下では、

腸管での *dMyc* の発現が維持されているため、細胞死が起こりにくく寿命の延伸に寄与していることが明らかになった (図)。また、このような腸管上皮恒常性の制御に細胞競合のシステムが関わっていることが示唆された。以上の内容は、*PLOS Genetics* 誌に掲載された (Akagi et al., 2018)。さらに、ショウジョウバエの腸管における細胞競合能力が加齢に伴い低下すること、DR によってその低下が遅延できることが強く示唆された。一方で、DR による細胞競合能力低下の遅延が、高栄養と DR 条件における *dMyc* の発現レベルの違いによって説明できるのかどうか、さらなる解析が必要である。また、加齢に伴い適応度の低い細胞を除去する能力が低下するのであれば、老齢個体の腸管には、そのような細胞が残存していることが考えられる。したがって、現在、それらの細胞を可視化するための実験に取り組んでいる。

加齢に伴い腸管における *dMyc* の発現が低下することは示すことができたが、その発現の低下が EC のみで起こるのか、ISC や EB においても同様に *dMyc* の発現が低下するのかについては明らかにされていない。したがって、ISC や EB のマーカーとともに *dMyc* の発現を観察することで、腸管における *dMyc* の加齢変化を細胞レベルで明らかにしていく予定である。また、我々は EB/EC 特異的に *dMyc* を断続的に活性化することで高栄養条件での健康寿命が延伸することを示したが、細胞レベルでの影響は観察できていない。特に、EC は倍数体の細胞であるため、*dMyc* の強制発現により EC の倍数性がどのように変化しているのかについて注目し、今後も解析を進めていく予定である。さらに、今後は哺乳類においても同様のシステムが働いているのかどうかについても検討を行いたいと考えている。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 28 年度

- 1) Akagi K, Sarhan M, Sultan S. AR, Nishida H, Koie A, Nakayama T, Ueda H. A biological timer in the fat body comprising Blimp-1, β Ftz-f1 and Shade regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 143: 2410-2416, 2016.

平成 29 年度

なし

平成 30 年度

- 1) Akagi K*, Wilson K.A., Katewa S.D., Ortega M., Simons J., Hilsabeck T.A., Kapuria S., Sharma A., Jasper H., Kapahi P*. Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*. *PLOS Genetics*, 14(11):

e1007777, 2018 (*co-corresponding author)

- 2) Aly H., Akagi K., Ueda H. Proteasome activity determines pupation timing through degradation speed of timer molecule Blimp-1. *Development, Growth & Differentiation*, 60(8): 502-508, 2018

2. 学会発表

平成28年度

1) 赤木 一考

Intestinal cellular fitness is required for gut barrier function and lifespan extension upon dietary restriction

第9回 NAGOYA グローバルリトリート, 2017年2月10日, 大府市 (招待講演)

2) 赤木 一考

Intestinal Homeostasis and Aging in *Drosophila*

The 1st MORPHOMEOSTASIS Meeting, 2016年6月26日, 三島市

3) Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness through *dMyc* to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*

12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016年9月11日, 東京

4) Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness through *dMyc* to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*

Frontiers in aging research toward healthy longevity, 2016年11月17日, 東京

5) Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi

栄養制限は *dMyc* の発現を介して腸管での細胞適応度を上昇させ、腸管バリア機能および寿命を向上させる

第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月1日, 横浜市

6) Haruka Nishida, Kazutaka Akagi, Hitoshi Ueda

The advantages of repressor usage for a precise timer system

第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月1日, 横浜市

平成29年度

1) Lucas S. Trindade, Kazutaka Akagi

A *Drosophila* approach to assess the r/K system and the evolution of lifespan

- The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, May 10, 2017, Osaka
- 2) Haruka Nishida, Kazutaka Akagi, Hitoshi Ueda
The advantages of repressor usage for a precise time measurement system in the development of *Drosophila melanogaster*
The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, May 10, 2017, Suita, Osaka
- 3) Kazutaka Akagi
Regulation of intestinal homeostasis and lifespan upon dietary restriction in *Drosophila*
The 2nd MORPHOMEOSTASIS Meeting, 2017年6月10日, 仙台市
- 4) Lucas S. Trindade, Toshiro Aigaki, Kazutaka Akagi
A *Drosophila* approach to assess the r/K system and the evolution of lifespan
第40回日本基礎老化学会大会、2017年6月15日、名古屋
- 5) Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi
Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*
The 3rd International Insect Hormone Workshop, July 9-14, 2017, Nasu, Tochigi
- 6) Hamdy Aly, Kazutaka Akagi, Hitoshi Ueda
Degradation mechanism of a transcriptional repressor Blimp-1, which regulate the pupation timing in *Drosophila*
The 3rd International Insect Hormone Workshop, July 9-14, 2017, Nasu, Tochigi
- 7) Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi
Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*
The 3rd International Symposium on Cell Competition, Aug 29, 2017, Sapporo, Hokkaido
- 8) Lucas Trindade, Toshiro Aigaki, Kazutaka Akagi
Long-term adaptation to a specific food condition may be sufficient to explain the major changes of life-history evolution
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日～9日、神戸市
- 9) Hamdy Aly, Kazutaka Akagi, Yuji Kageyama, Hitoshi Ueda
ショウジョウバエの蛹化タイミングを決める生物タイマーシステムに影響を及ぼす分子
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日～9日、神戸市

平成30年度

- 1) Kazutaka Akagi

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*

Asian Society for Aging Research Symposium 2018, April 18-21, 2018, Jeju, South Korea (招待講演)

2) 赤木一考

キイロシヨウジョウバエにおける食餌制限を介した腸管恒常性と寿命の制御
日本動物学会 第 89 回大会、2018 年 9 月 13～15 日、札幌 (招待講演)

3) 赤木一考

食餌制限による腸管バリア機能の制御機構
第 39 回 日本基礎老化学会シンポジウム、2018 年 10 月 13 日、千葉市 (招待講演)

4) Kazutaka Akagi, Kenneth A. Wilson, Subhash D. Katewa, Mauricio Ortega, Jesse Simmons, Subir Kapuria, Amit Sharma, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*

第 41 回日本基礎老化学会大会、2018 年 5 月 31 日、6 月 1～2 日、葛飾区、東京

5) Lucas Trindade and Kazutaka Akagi

The role of Prefoldin 6 on intestinal homeostasis in *Drosophila melanogaster*

第 41 回日本基礎老化学会大会、2018 年 5 月 31 日、6 月 1～2 日、葛飾区、東京

6) Kazutaka Akagi

Intestinal cellular fitness and aging

The 3rd MORPHOMEOSTASIS meeting、2018 年 7 月 28～29 日、大府市

7) Kazutaka Akagi and Pankaj Kapahi

Dietary restriction enhances intestinal cellular fitness through *dMyc*

The 13th Japanese *Drosophila* Research Conference, September 10-12, 2018, Kyoto

8) Kazutaka Akagi and Pankaj Kapahi

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness to enhance gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*

KEYSTONE SYMPOSIA Cell Competition in Development and Disease, February 24-28, 2019, Tahoe City, California, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし