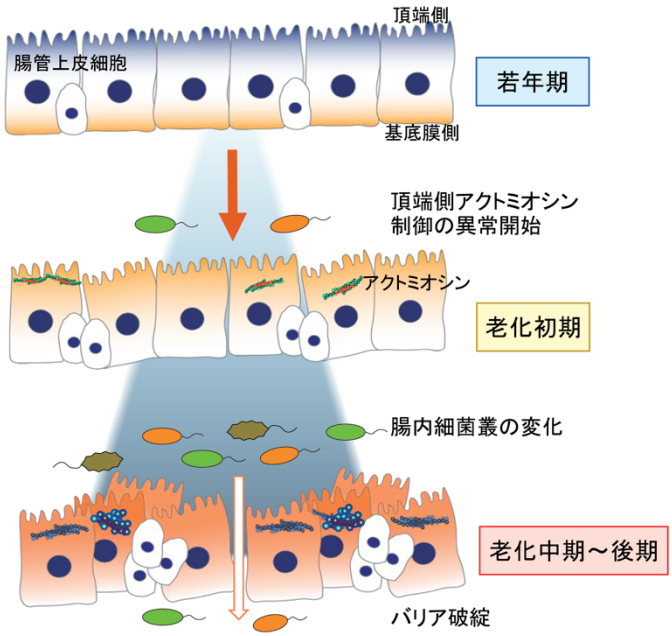
47　加齢に伴う腸管機能低下と腸内細菌叢変化の機構解析	矢野　環

【目的】腸管上皮組織は腸管管腔内の物質、とくに腸内細菌由来の免疫を活性化しうる物質の体腔内への漏出を防ぐ物理的バリアとして重要である。このバリア機能は加齢と共に低下し、全身性の炎症の原因となり、生活習慣病等の病態悪化をおこすため、バリア破綻の分子機構解明が重要である。しかし、加齢依存的な現象は個体差や環境要因との相互作用がおおきいことから解析が難しく、その分子機構は多くが不明である。本研究は加齢に伴う腸管機能低下の分子機構を、特に老化初期に着目して解析した。

【方法】本研究はショウジョウバエ成虫腸管をモデルとして用い、筆者らがこれまでに検討してきた、老化による機能低下を模倣する遺伝学的手法を用いて、RNA-sequence 解析を行った。また、その結果を基に、組織学的な検討を行った。

【結果】RNA-sequence 解析の結果、老化初期にアクチン骨格制御に関与する遺伝子発現が上昇すること、その発現上昇は JNK 経路活性によりさらに顕著となることが明らかとなった。腸管上皮細胞の頂端側には細胞接着部位の張力を規定するアクトミオシンが機能している。上皮細胞における非筋ミオシンの局在を検討したところ、老化によりその局在が異常になること、JNK 活性化により、より若年から局在異常が生じること、ミオシンの機能低下、あるいは活性化によるアクトミオシン張力の上昇のいずれもが老化時のバリア破綻を悪化させることが明らかとなった。老化初期におけるアクチン骨格制御因子の発現上昇は、腸内細菌叢の変化以前に生じており、宿主の変化が加齢依存的な機能低下のきっかけとなっている可能性が示唆された。

老化初期の腸管上皮細胞頂端側のアクトミオシン制御異常が老化中後期のバリア破綻の発端となる



47. 加齢に伴う腸管機能低下と腸内細菌叢変化の機構解析

矢野　環

東北大学 大学院薬学研究科 生命機能解析学分野

Key words：腸管上皮，加齢，バリア破綻，腸内細菌叢，細胞骨格

緒　言

腸管内には多様な種類の常在細菌が存在し、食餌成分の消化、分解、腸管免疫系との相互作用など、宿主生理機能に大きく寄与している。腸内常在菌叢は食餌や宿主の免疫、疾患などにより変動し、宿主免疫系を刺激した結果、腸管上皮組織の炎症や、それに起因した上皮のバリア破綻による腸内細菌、および細菌由来の物質の体腔内への漏出による全身性の炎症の原因となっている。こういった腸内細菌叢の変化は宿主の老化時に顕著であり、それが全身性の炎症により悪化する病態の増悪に寄与していることが明らかとなってきている。腸内細菌叢の変化と宿主の腸管上皮のバリア機能破綻は互いに影響し合い、増悪ループを形成していると考えられており、腸内細菌叢変化による加齢依存的な病態の機構を解明するためには、腸内細菌のみに着目するのではなく、宿主組織の機能低下との関連を検討する必要がある。

ショウジョウバエ中腸後部はヒト小腸と同様に層状の上皮細胞に覆われ、その損傷を腸管幹細胞の分裂・分化によって修復する機構を有しており、腸管上皮組織の損傷応答や癌化のモデルとして多用されている。さらに、ショウジョウバエは平均寿命が約 70 日であることから、宿主と腸内細菌の関連、特に加齢依存的な病態の検討にきわめて有用である。これまでに我々はショウジョウバエをモデルとして腸管上皮組織におけるオートファジー機能を研究する過程で、腸内常在菌に対して上皮細胞が産生する活性酸素種に対して、上皮細胞自らが惹起する不用な損傷応答をオートファジーが抑制し、過剰な幹細胞分裂を抑制することで腸管恒常性を維持し、常在菌に対する免疫寛容として機能していることを明らかにしてきた［1］。また我々は、腸管上皮細胞におけるオートファジー不全は加齢依存的なバリア破綻を生じさせ寿命を延長させることを明らかにしている［2］。本研究では、加齢依存的な腸内細菌変化と腸管機能異常との関係を網羅的に解析し、加齢に伴う腸管上皮組織のバリア破綻と腸内細菌叢変化の関連の分子機構を解明することを目的とした。

方　法

1. 腸管バリア機能の測定

2.5%青色色素 Brilliant blue FCF/5% sucrose をコーンミール餌に混ぜて成虫に 1 日摂取させた後、腸管からの青色色素の漏出を目視により判定した。バリア破綻の程度は、破綻無し（レベル 0）、破綻あり（レベル 1、2、3）の 4 段階に判定した［2］。

2. 寿命の測定

それぞれの遺伝子型の個体（成虫メス）を、胚発生より羽化後 3 日まで 18℃、その後 27℃で通常のコーミール餌で飼育して、3 日おきに死亡数を計測した。

3. 幹細胞分裂測定（PH3 陽性細胞数の測定）、免役染色

成虫メスを PBS 中で解剖し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、リン酸化ヒストン H3（PH3）に対する抗体で染色し、中腸の部分における PH3 陽性細胞数を蛍光顕微鏡による観察により測定した。腸管の免役染色も同様に固定、

抗体による染色の後、Leica SPE 共焦点顕微鏡により観察した。

4. 中腸後部の RNA-sequence 解析

中腸後部を各サンプルあたり 30～50 匹から採取し、total RNA 抽出を行った。RNA-sequence のためのライブラリ作製、シーケンシング解析（DNBSEQ-G400 100 b ペアエンド解析）、得られたシーケンスデータのゲノム配列へのマッピングは受託解析により行った。得られたリード数のデータは、R（version3.4.0）を用いてリード数の平均値が 10 以下と 10^5以上の遺伝子のデータを除去後、パッケージ edgeR を用いて TMM 法により正規化した。エンリッチメント解析は DAVID を用いた。

5. 腸内細菌叢解析

RNA-sequence 解析に用いた個体と同一の飼育容器で飼育した個体から中腸を摘出し、ゲノム DNA を抽出した。腸内細菌叢解析は抽出したゲノム DNA について、細菌 16S rRNA の V3V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスを受託解析にて行い、Greengene（ver.13.8）をデータベースとして解析した。

結　果

1. 腸管上皮細胞における JNK 経路の穏やかで持続的な活性化は密着結合の異常を生じさせ、寿命を短縮させる

腸管上皮細胞特異的なオートファジー不全を起こすと、上皮細胞から分泌されるサイトカイン依存的に腸管幹細胞の穏やかで持続的な分裂亢進が生じる［2］。この穏やかな幹細胞分裂亢進のみを遺伝学的手法で起こすために、幹細胞特異的な発現を起こさせるドライバーDl-GAL4 と、温度感受性の GAL4 阻害タンパク質 GAL80（GAL80ts）を組み合わせ、GAL80 が完全に不活化体にならない温度 25℃で飼育することにより幹細胞特異的に活性型 EGF 受容体を低レベルで発現させる手法を用い、これが老化初期に生じ始めるバリア破綻を悪化させることを見出していた［2］。これは、飼育温度を工夫して温度感受性 GAL80 と組み合わせた GAL4-UAS システムを動かすことによって、組織特異的な遺伝子発現を人為的に低レベルで、特定の細胞種に起こし続けることが可能であることを意味している。これを RNAi 法に応用することによって、加齢に応じた穏やかな機能低下を模倣することができると考えられた。

これまでに、宿主腸管の上皮細胞において加齢依存的に密着接合因子の局在に異常が生じ、腸管幹細胞分裂の亢進とバリア破綻に寄与していることが報告されている［3］。さらに、上皮細胞における JNK 経路活性化により生じるバリア破綻は腸内細菌叢の変化をもたらし、これがバリア機能悪化をもたらすという増悪ループが生じることが示されている［4］。そこで上記の方法（NP-1ts）で JNK 経路の negative regulator である *puckerd*（*puc*）を RNAi 法により弱く発現抑制することで腸管上皮細胞特異的に JNK 経路を穏やかに活性化させた際に、加齢依存的な機能低下が生じるかを検討した。その結果、上皮のバリア機能に重要な密着結合因子 Discs large（Dlg）の局在が若年で異常になること、寿命の中央値が有意に短縮したことから、JNK 経路の穏やかな活性化は加齢に伴う腸管機能低下を増悪させることが示唆され、この系が加齢依存的に生じる腸管機能破綻のトリガーを解明する上で有用であると考えられた。

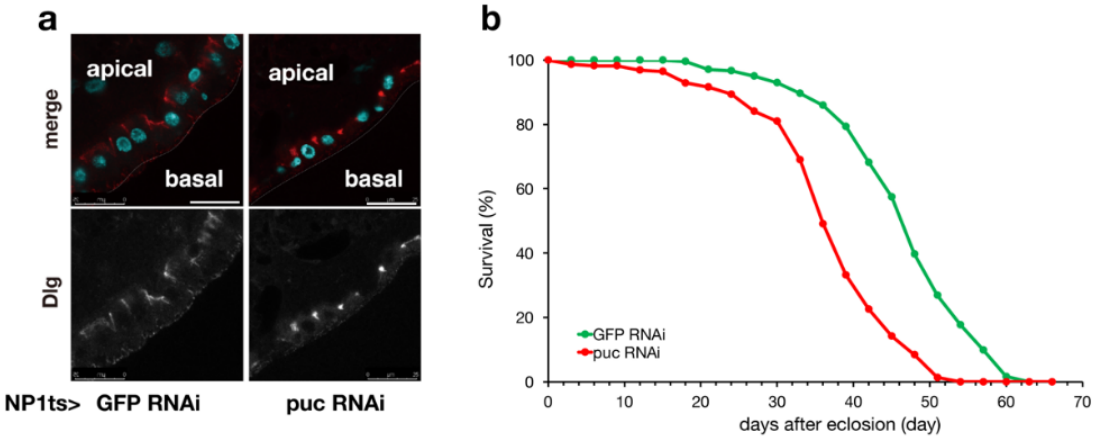


図 1. 腸管上皮細胞特異的 JNK 経路活性化は密着結合に異常を生じさせ、寿命の中央値を短縮させる
腸管上皮細胞特異 *puc* RNAi を NP-1ts ドライバーにより生じさせている。

a) 羽化後 3 日目まで 18℃、その後 10 日目まで 27℃で飼育した個体の腸管後部を免役染色した。(Red : Dlg、Cyan : DAPI)。共焦点顕微鏡を用いて、腸管上皮組織の頂端側 (apical)、基底膜側 (basal) 断面の画像を取得した。コントロール (GFP RNAi) では上頂端面に一定の長さで局在している Dlg が、puc RNAi では点状のシグナルを与えた。スケールバー : 25 μ m。

b) 成虫メス個体に対して NP-1ts ドライバーを用いて puc RNAi を行い、生存率を測定した。$p<0.0001$ (log-rank test)、生存値の中央値は GFP RNAi : 46 日、puc RNAi : 36 日。

2. 経時的 RNA シーケンスによる老化初期腸管上皮の遺伝子発現変動解析

加齢による組織機能の低下は徐々に悪化するのが特徴であり、腸管の場合はその間、腸内細菌叢の変化と宿主上皮の変化が増悪ループを形成しており［4］、それが腸管老化の分子機構解析を困難にしている。そこで本研究では、腸内細菌叢が変化する以前の老化初期に生じる宿主側の変化を捉えることとした。上記の NP-1ts により *puc* RNAi を起こした個体とコントロール（GFP RNAi）の個体の羽化後 10、20、30 日時点の後部腸管を用いて RNA-sequence 解析を行い、経時的に発現変動遺伝子を検討した。その結果、加齢と共に発現上昇し、JNK 経路活性化でさらに上昇する遺伝子群の GO 解析で Septate junction 因子が得られた（図 2c)。興味深いことに、このクラスターに含まれる因子の多くが、老齢後期（生存率が約 10%程度になる程度の時期）と若齢期（生存率 100%）の後部腸管における RNA-sequence を行った論文［3］において、老齢後期に発現上昇する遺伝子であった。本研究の解析は、生存率 90%以上（GFP)、80%（puc）という老化初期（図 1b、羽化後 30 日）までの遺伝子発現変動を解析しているが、老化後期に起きている異常をすでに捉えることができることを示唆している。そこで、老化初期に変化が生じ始め、老化後期の機能低下につながる遺伝子を同定する目的で、論文［3］と本研究のコントロール（GFP）に共通して発現上昇が見られた 804 遺伝子について、再度クラスタリングを行った（図 2d、e)。その結果、加齢に従って発現増加し、JNK 経路活性化によりさらに増加する遺伝子群として、アクチン骨格制御に関与する遺伝子が得られた。また、RNA-sequence 解析時の腸内細菌叢を解析したところ、腸管上皮細胞からの活性酸素種産生を起こさせる Glucnobactor は 20 日目までは存在率が低く、30 日以降に増え始めたことから（図 2f)、本解析で見られた発現変動は腸内細菌叢の変化前で生じている可能性が考えられた。

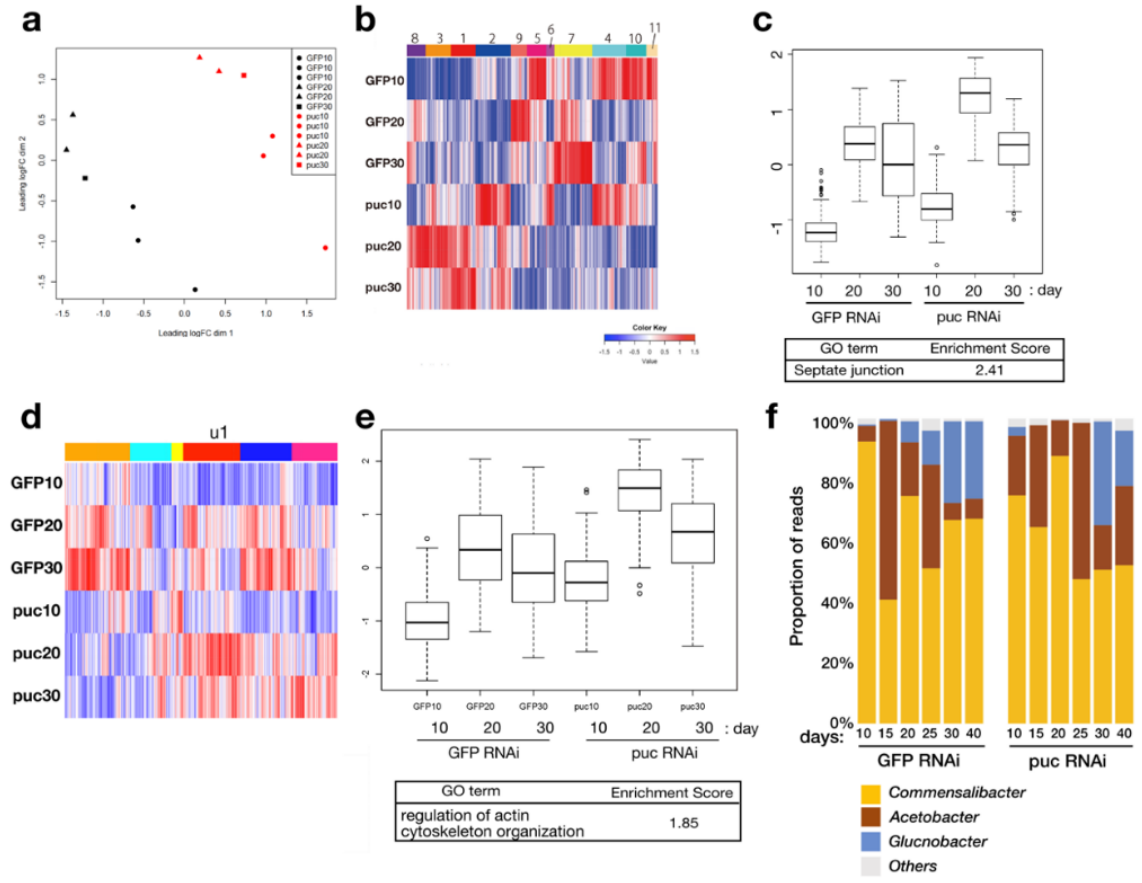


図 2. 老化初期の腸管後部における経時的 RNA シーケンス結果と腸内細菌叢変化

a) 解析サンプルの MDS プロット。右上の枠内 GFP：GFP RNAi、puc：pucNAi。数字は羽化後日数を表す。同一条件サンプルの発現プロファイルは類似しており、加齢に従い変化していくことがわかる。

b) 発現変動遺伝子のクラスタリング、ヒートマップ。日齢による変化、JNK 経路活性化（puc）による発現変動パターンから 11 のクラスターに分けられた。赤が高い発現量、青が低い発現量を表している。

c) b）のクラスター8 の発現パターンとエンリッチメント解析。コントロール腸管（GFP）で老化に従い発現が上昇し、JNK 経路活性化（puc）で上昇が増加するクラスター。

d) 若齢期と老化後期を比較した論文［3］と本研究のコントロール（GFP）に共通して発現上昇が見られた 804 遺伝子に対してのクラスタリング、ヒートマップ。

e) d）のクラスターu1 の発現パターンとエンリッチメント解析。

f) RNA-sequence と同時飼育の個体の腸内細菌叢の解析。

3. 老化初期から生じる上皮細胞頂端側のアクトミオシン変化が腸管バリア破綻の一因である

上皮細胞の頂端側に存在するアクトミオシンは、その張力を変化させることによって、細胞間接着を消失させることなく細胞の形状変化や移動を起こす。図 2 の結果から、頂端側アクトミオシンを GFP 融合ミオシンⅡ（Sqh::GFP）で可視化して検討した。その結果、若齢腸管で頂端側に局在している Sqh::GFP は、加齢初期（30 日齢）で点状の局在異常を起こすこと、JNK 活性化により若齢からこの異常が生じていることを見出した。そこで、ミオシン重鎖（*zip*）の発現低下でミオシン活性を低下させた場合、活性型ミオシン軽鎖（Sqh）発現、またはミオシン活性化因子 Shroom 発現によりミオシン活性を上昇させた場合の腸管バリア機能、および寿命を測定した。その結果、いずれの場合もコントロールと比較してバリア機能を低下させ（図 3a）寿命を短縮させた（図 3b）。したがって、上皮細胞におけるミオシン活性の適切な制御が重要であると考えられた。

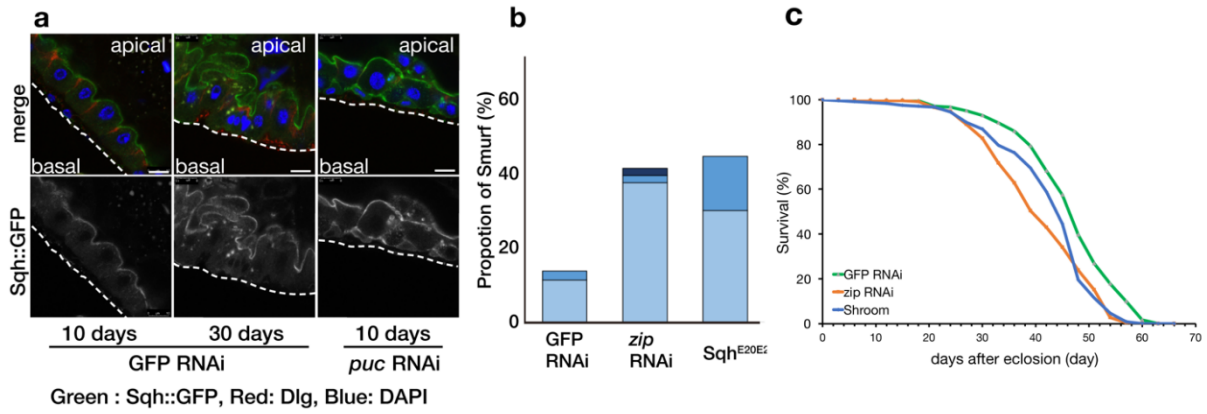


図 3. 頂端側アクトミオシンのバリア機能における重要性

a) 腸管上皮細胞における Sqh::GFP（Green）局在。破線は基底膜面。スケールバー：10 μm。

b) 腸管バリア機能の測定。青色が濃いほどレベルが高い（バリア破綻が進行）。

c) 成虫メス個体に対して NP-1ts ドライバーを用いて zip RNAi または Shroom 発現を行い、生存率を測定した。生存値の中央値は GFP RNAi：46 日、zip RNAi：39 日、Shroom：44 日。

考　察

本研究は加齢依存的な機能低下を遺伝学的手法により模倣することにより、老化腸管におけるバリア破綻とそれに起因する寿命短縮の原因を探索した。その結果、老化初期における腸管上皮細胞頂端部に局在するアクトミオシンの異常が、老化が進んだ時の機能低下の原因となっていることを明らかにした。我々は、腸管上皮の損傷応答を研究する過程で、頂端側アクトミオシンが損傷応答惹起のシグナルプラットフォーム形成に重要である事、損傷応答の過多が上皮のバリア破綻につながることを見出している。本研究で得られた知見は、生存に必須な応答である損傷修復が老化初期に制御不全になり始めることで、老化中期に機能低下を加速させる可能性を示唆している。

謝　辞

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Nagai H, Yano T. Selective autophagy tolerates symbiotic bacteria in the Drosophila intestine. Autophagy 2021 Apr;17(4):1057-1058. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33734015 DOI: 10.1080/15548627.2021.1904490

2) Nagai H, Tatara H, Tanaka-Furuhashi K, Kurata S, Yano T. Homeostatic Regulation of ROS-Triggered Hippo-Yki Pathway via Autophagic Clearance of Ref(2)P/p62 in the *Drosophila* Intestine. Dev Cell. 2021 Jan 11;56(1):81-94.e10 Epub 2021 Apr 1. PMID: 33400912 DOI: 10.1016/j.devcel.2020.12.007

3) Resnik-Docampo M, Koehler CL, Clark RI, Schinaman JM, Sauer V, Wong DM, Lewis S, D'Alterio C, Walker DW, Jones DL. Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behaviour to maintain homeostasis. Nat Cell Biol. 2017 Jan;19(1):52-59. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27992405 DOI: 10.1038/ncb3454.

4) Zhou J, Boutros M. JNK-dependent intestinal barrier failure disrupts host-microbe homeostasis during tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 2020 April 28; 117(17)9401-9412. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32277031 DOI: 10.1073/pnas.1913976117.