

# 抗老化物質 NAD<sup>+</sup>による腸上皮組織の恒常性制御機構の解明

所属： 奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域

助成対象者：金井賢一

共同研究者：なし

## 概要

NAD<sup>+</sup>の前駆物質 NMN の抗老化効果はさまざまな研究により示されている。その一方で、NAD<sup>+</sup>が老化細胞やがんの悪性を促進することも報告されており、特に高齢期での用法には注意が必要である。本研究ではライフステージにおける個体レベルでの NAD<sup>+</sup>の作用機序を明らかにするために、ショウジョウバエのモデル系を構築した。この系では、薬剤誘導と細胞種特異的なドライバーを駆使したヒト NAMPT 遺伝子発現により時空間的な細胞内 NAD<sup>+</sup>量の増加制御を行える。老化の指標として、主要な死因である腸機能の恒常性に注目し、中齢期から生じる腸幹細胞の悪性化および腸のバリア機能破綻を NAD<sup>+</sup>が促進すること明らかにした。さらに若齢期に限定した NAD<sup>+</sup>の増加がより効果的な抗老化につながることを見いだした。

## abstract

NMN, an NAD<sup>+</sup> booster, has potent anti-ageing functions in humans and other animal model organisms, however NAD<sup>+</sup> promotes malignant functions of senescent cells and cancer cells. It is important for anti-ageing medicine to elucidate the mechanisms of the effects in molecular function level. In this study, we established a *Drosophila* model, which is commonly utilized for ageing study, overexpressing human *NAMPT* gene and increasing intracellular NAD<sup>+</sup> concentration

spatially and temporally by drug administration and GeneSwitch system. In mid-aged *Drosophila* flies, over-proliferation of intestinal stem cells (ISC) and breakdown of intestinal barrier function in midgut are observed as typical ageing makers. The flies specifically expressing NAMPT in ISC shows higher scores of these ageing markers. Furthermore, the flies NAMPT-expressed in all cells showed that much longer lifespan with time-limited drug administration only in young age (10-40 days old).

## 研究内容

### 背景

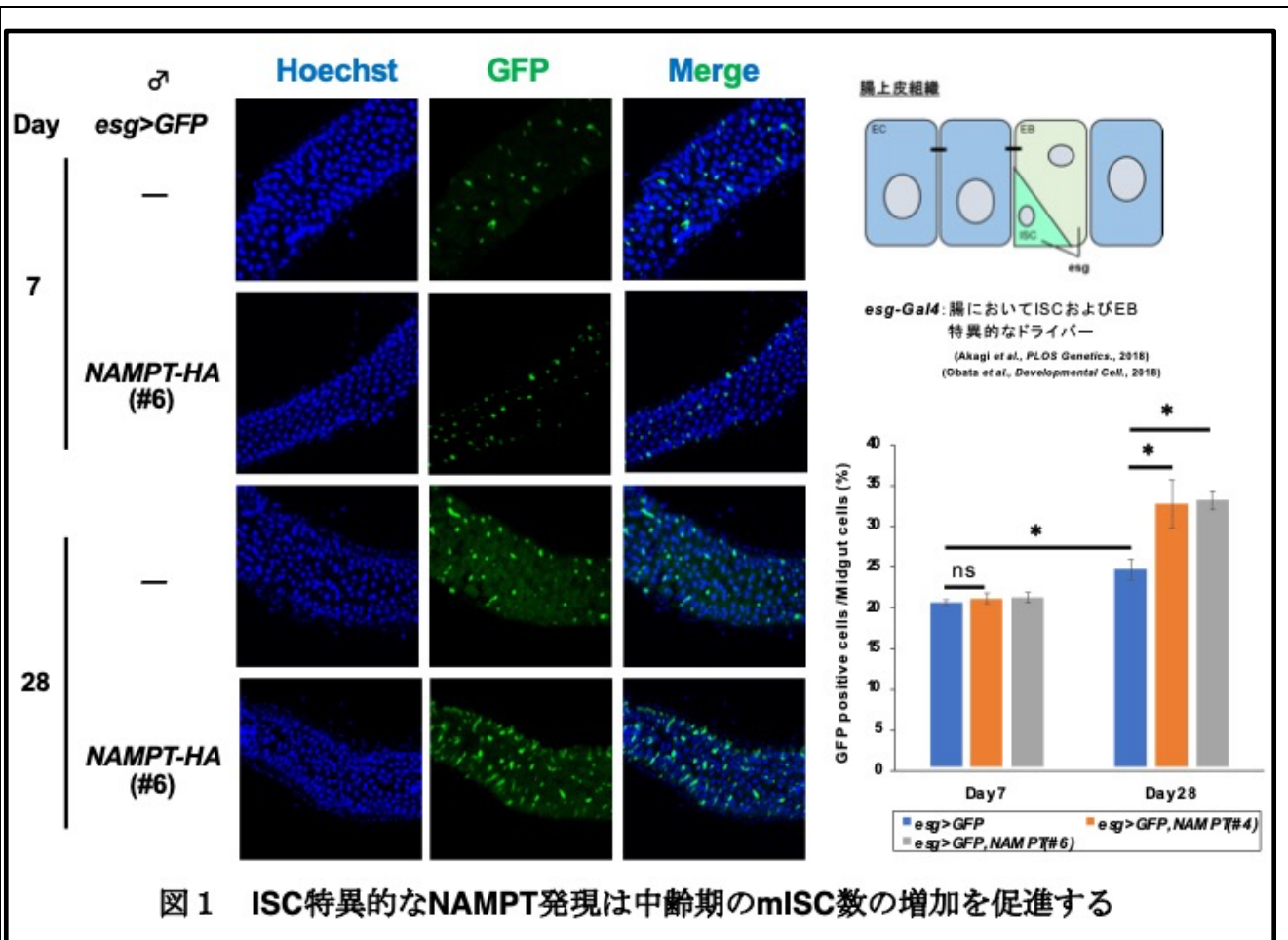
近年、さまざまな抗老化処置が科学論文に報告され、抗老化医学による健康長寿社会の実現に近づいている。その一方で、これらの抗老化処置が生体に対して悪影響を及ぼすという知見が蓄積しており、どのような分子機構によりメリット、デメリットが引き起こされているのかを理解することは必要不可欠である。NAD<sup>+</sup>は抗老化をもたらす物質のひとつとして注目されており (Yoshino *et al.*, Cell Metab., 2018)、前駆物質である NMN や NR が抗老化サプリメントとして市場に出回っている。その一方で、NAD<sup>+</sup>の生合成系の増強が老化の主要因と考えられている SASP(細胞老化関連分泌形質)を促進することやがんの悪性化の促進につながることも報告されており (Covarrubias *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol., 2021)、特に老齢期での不適切な用法が健康被害や疾患リスクを高めることが懸念される。本研究では、ショウジョウバエにヒト NAMPT 遺伝子を発現するシステムを構築することで、時空間的な NAD<sup>+</sup>の増加を可能にした。ショウジョウバエは、25度の飼育下で約2ヶ月と短命な老化研究に適したモデル生物である。本研究では若齢期(7日齢)、中齢期(28日齢)、老齢期(60日齢)とし、主要な死亡原因として知られる腸組織の恒常性破綻を、中齢期から生じるバリア機能破綻や腸幹細胞 (intestinal stem cells: ISC) の過増殖を指標に解析する。

### 目的

NAD<sup>+</sup>の時空間的な増加をコントロールすることで、ライフステージや組織別の抗老化または副作用的な事象を見いだすことで抗老化の効果的な用法を明らかにする。

## 結果

先行研究の結果から、全身での恒常的な NAMPT の発現は寿命を延長することが見いだされた。一方で ISC での特異的な発現では中齢期以降の死亡率が増加することを見いだしていた。本研究では、まず GS システムを用いた薬剤誘導系での NAMPT 発現による寿命への効果を解析した。構築したシステムが機能しているかを評価するために、RU486(ミフェプリストン)の摂餌による NAMPT 発現誘導と NAD<sup>+</sup>量への効果を検証した。全身発現系統 (*da<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*, *Act5C<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*) に対して、羽化後回収し、ハエをそれぞれ薬剤含有または無のエサの 2 群に分けて飼育した。ウエスタンブロットおよび腸組織の免疫染色の結果から、薬剤誘導時のみ NAMPT-HA タンパク質が検出されることを見いだした。また HPLC による NAD<sup>+</sup>の定量解析の結果から、薬剤誘導による NAMPT 発現が個体内の総 NAD<sup>+</sup>量が増加することを見いだした。そこで、この薬剤誘導条件を用いて、寿命の解析を行なった。ISC 特異的な NAMPT 発現系 (*5961<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*) では薬剤により、中齢期以降の死亡率が上昇することが確認できた一方で、全身発現系統では薬剤の有無による統計的な有意な差は見いだされなかった。また Smurf アッセイにより腸のバリア機能に与える NAMPT 発現の影響について解析を行なった。全身発現系統に加えて、ISC 特異的および腸上皮細胞特異的な NAMPT 発現系 (*5966<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*) での中齢期の腸バリア機能を解析した。その結果、ISC 特異的な系統で有意な Smurf 率の増加が見いだされたが、他の系統では有意な差は見られなかった。この結果から、ISC での NAMPT 発現は中齢期までに腸の恒常性を破綻させる可能性が示された。この原因を明らかにするために、中齢期に出現する過増殖する悪性化 ISC (malignant ISC: mISC) に対して NAMPT が作用していると考え、中腸の ISC 数の解析を行なった。ISC 特異的に NAMPT および GFP を発現する系統 (*esg<sup>GS</sup>>NAMPT-HA, GFP* および *esg<sup>GS</sup>>GFP* (コントロール)) をそれぞれ用いて、中腸領域の GFP 陽性細胞の割合を若齢期、中齢期で解析を行なった。その結果、若齢期の時点では ISC 数に対する有意な差は見られないが、mISC が出現する中齢期では有意に ISC 数が増加することを見いだされた(図 1)。これらの結果は、NAMPT 発現が mISC の悪性化を促進し、腸バリア機能を破綻させることが寿命を縮める要因であることを示唆している。さらに老齢期まで生存した個体の腸の組織構造を接着結合のコンポーネントのひとつである Arm タンパク質の免疫染色で観察したところ、加齢により細胞が繊維状の形態に変化していること、さらに NAMPT 発現系統では腫瘍のような多層構造や接着結合が観察できない領域が存在することを見いだしている(成果物 2)。近年、断続的時間制限断食(iTRF)という食事法が抗老化効果を示し、寿命を延



長させることが示された。この報告では、生涯における iTRF 処置ではコントロールとの有意差は明瞭ではないが、若齢期から中齢期の前半（10-40 日齢）までの iTRF 処置により効果的な寿命の延長が示されていた (Ulgherait *et al.*, Nature, 2021)。そこで本研究でも、本研究で見いだされた mISC への悪影響を低減するために 10-40 日齢の期間のみの薬剤による NAMPT 発現誘導を行なった。その結果、全身発現系統 (*Act5C<sup>GS</sup>*>*NAMPT-HA*) において寿命延長と加齢による運動能低下が抑えられることを明らかにした (成果物 3)。

## 今後

本研究から得られた成果により、抗老化物質として注目される NAD<sup>+</sup>の生存に関わる副作用が明らかになった。本研究で示された mISC はヒト消化器がんの前駆状態に想定され、この mISC での NAD<sup>+</sup>増加ががん化を促進すると共に組織機能の低下を引き起こしていると考えている。現在、全身発現系統 (*Act5C<sup>GS</sup>*>*NAMPT-HA*) において、若齢期より短い期間または老齢期のみでの NAMPT 発現誘導による寿命および ISC 数に与える影響を解析する実験を行っており、これまでの結果と合わせて論文として発表するための準備を並行して進め

ている（成果物1）。またこの内容は今年6月の基礎老化学会年会でポスター発表に採択されている（成果物3）。また一方で、全身発現系統（*Act5C<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*）において、神経細胞や筋肉細胞で加齢とともに蓄積することが知られているユビキチン化タンパク質がNAMPTの発現により抑えられることを見いだしており、他の組織においては抗老化作用をもたらしていると期待される結果を得ている。そのため、全身発現系統（*Act5C<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*）ではISCでもNAMPTが発現するが、相反する効果が相殺された結果として寿命に対する有意な影響を示さないと考えられる。また別の可能性として、ISC以外の細胞でのNAD<sup>+</sup>の増加がmISCの発生を抑制しているのではないかと考えている。実際に、腸上皮細胞特異的なNAMPT発現系統（*5966<sup>GS</sup>>NAMPT-HA*）では薬剤によるNAMPT発現により、寿命が延長するという予備データを得ている。今後は、腸上皮細胞特異的なNAMPT発現系統においてmISCの発生が遅延する可能性を中齢期後期の個体を用いて評価するとともに、それぞれの系統での他の老化に対する効果を評価することで、組織別または組織間での恒常性維持機能の探索やライフステージにおける効果の違いを網羅的に解析する。またmISCのような細胞の出現がNMN服用のリスクになることを示し、適用する際には初期がんの早期発見検査などを義務化するなどの提案ができればと考えている。以上のような解析には、本研究で構築した時空間的にNAD<sup>+</sup>の増加を制御可能な系が必須であり、今後の抗老化医学の発展に貢献できると期待している。

#### 引用文献

Covarrubias A.J., Perrone R., Grozio A. & Verdin E. (2021). NAD<sup>+</sup> metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (22(2):119-141)

Ulgherait M., Midoun A.M., Park S.J., Gatto J.A., Tener S.J., Siewert J, Klickstein N, Canman J.C., Ja W.W., Shirasu-Hiza M. (2021), Circadian autophagy drives iTRF-mediated longevity. *Nature* (598(7880):353-358)

Yoshino J., Baur J.A., Imai S. (2018), NAD<sup>+</sup> Intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metabolism* (6;27(3):513-528)

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Spatial-temporal enhancement of NAD<sup>+</sup> biosynthesis provides ideal phases in life stage by an effective anti-aging function without risk effects in malignant intestinal stem cells. (投稿準備中)

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

2. 第45回日本分子生物学会年会(2022/12/1), NAD<sup>+</sup>生合成系酵素 NAMPT による腸上皮幹細胞の悪性化と腸バリア機能破綻の分子機構の解析
3. 第46回日本基礎老化学会大会(2023/6/17-18、演題登録済), ショウジョウバエにおける若齢期に限定した NAD<sup>+</sup>の増強は悪性化腸幹細胞の影響を受けず効果的なアンチエイジング効果を及ぼす

[その他]

適宜、researchmap (<https://researchmap.jp/kkanai0824JS>) に最新の業績を更新する。