Glycative Stress Research

Online edition : ISSN 2188-3610
Print edition : ISSN 2188-3602
Received: May 17, 2018
Accepted : July 18, 2018
Published online : September 30, 2018
doi:10.24659/gsr.5.3_129

Review article

Epigenetics and aging

Yoshimasa Saito, Hidetsugu Saito

Division of Pharmacotherapeutics, Keio University Faculty of Pharmacy, Tokyo, Japan

Glycative Stress Research 2018; 5 (3): 129-134
(c) Society for Glycative Stress Research

（総説論文：日本語翻訳版）

老化とエピジェネティクス

齋藤義正、齋藤英胤

慶應義塾大学薬学部薬物治療学講座

抄録

エピジェネティクスとは、発生や分化の過程において、DNA 配列の変化を伴わずにクロマチン構造の変化により遺伝子発現を精密に制御する機構である。エピジェネティクス変化の代表的なものとして、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化およびメチル化などがある。葉酸代謝とメチオニン代謝を含む代謝経路のことを One Carbon Metabolism と呼んでおり、この代謝経路を構成する栄養素（メチオニン、葉酸、ビタミン B_{12}）は、エピジェネティクス制御機構へ作用し、遺伝子の発現などにも影響を与えている。これらのエピジェネティクス機構の破綻は、がんや生活習慣病、精神疾患などさまざまな疾患の原因になることが報告されている。

近年、加齢と共に幹細胞も機能が低下し、組織の構築や維持ができなくなるステムセルエイジング仮説が提唱されている。老化による個体の機能低下には、組織幹細胞における経時的なエピジェネティクス変化が重要な役割を果たすことが指摘されている。糖化ストレスがゲノム修飾に影響する可能性は十分考えられる。我々は、新たな幹細胞の 3 次元培養法であるオルガノイド培養により樹立した腸管上皮オルガノイドを用いて、エピジェネティクス変化に着目した老化の分子メカニズムの解明や、エピゲノム編集技術に基づく新たな抗加齢介入の開発に挑戦している。

連絡先：齋藤義正
〒 105-8512　東京都港区芝公園 1-5-30
慶應義塾大学薬学部薬物治療学講座
TEL：03-3434-6241
メール：yoshimasa.saito@gmail.com
共著者：齋藤英胤　hsaito@a2.keio.jp

Glycative Stress Research 2018; 5 (3): 129-134
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

KEY WORDS: エピジェネティクス変化、DNAメチル化、ヒストン蛋白修飾、one-carbon metabolism、幹細胞老化、抗加齢医学

エピジェネティクス変化による遺伝子発現の制御

エピジェネティクス機構は、DNA 配列の変化を伴わずにクロマチン構造の変化により遺伝子発現を精密に制御する機構であり、分化、発生、インプリンティング、X 染色体不活性化などの生命現象に深く関与している。エピジェネティクスは通常、細胞分裂後も継承される変化である。この機構が破たんすれば、癌や生活習慣病、精神疾患などさまざまな疾患の原因になることが報告されている[1-3]。エピジェネティクス変化の代表的なものとして、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化およびメチル化などがある。また、DNAの塩基配列情報の総称をゲノムと呼ぶのに対し、そのゲノムを修飾するエピジェネティクス情報の総称をエピゲノムと呼んでいる。

DNAのメチル化は脊椎動物のゲノムにおける唯一の生理的な修飾である。DNAメチル化とは、DNAの5'側からシトシン（C）、グアニン（G）の順に並んだ2塩基配列（CpG）におけるシトシンの5位炭素原子にメチル基が付加される反応であり、DNAメチル化酵素（DNA methyltransferase：DNMT）によって触媒される（*Fig. 1*）[2,3]。多くの遺伝子のプロモーター領域にはCpGアイランドというCpG配列のクラスターが形成されている。遺伝子のプロモーター領域がメチル化されると、下流の遺伝子発現は抑制されることが知られている。一方、DNA脱メチル化は、DNA複製に依存して生じる受動的脱メチル化と、DNA複製に依存しない能動的脱メチル化に大別される。能動的脱メチル化はTET（ten-eleven translocation）による水酸化反応が大きな役割を担っていると考えられている[4]。TETはシトシンの5位のメチル基（5mC:5-メチルシトシン）を水酸化し、5hmC(5-ヒドロキシメチルシトシン）に変換する（*Fig. 1*）。変換された5hmCは、細胞分裂やDNA塩基除去修復機構により非メチル化シトシンへと変換され、脱メチル化される。5hmCは、DNA脱メチル化経路において中間体としての役割を担っていると推測されているが、それ自体が新たなエピジェネティックな調節を担っている可能性がある。以上のように、5mCは“第5の塩基”、5hmCは“第6の塩基”とも考えられており、癌の発症や進行、生活習慣病、神経疾患など多くの分野において、極めて重要な役割を果たすことが推測されているが、その生物学的な役割については未だ不明な点が多く残されている。

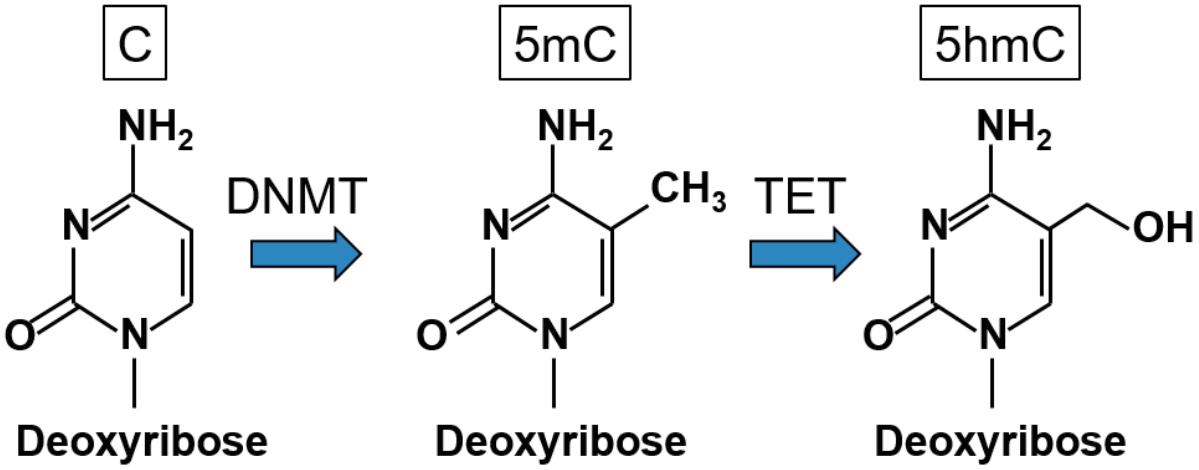

Fig. 1. **DNA methylation and demethylation.**
A methyl group is added to the 5-position of cytosine by DNA methyltransferase (DNMT) and it becomes 5-methyl-cytosine. TET hydroxylates the methyl group of the 5-position of cytosine (5mC:5-methyl cytosine) and converts it to 5hmC (5-hydroxymethyl cytosine). The converted 5hmC is converted to unmethylated cytosine through cell division and DNA base excision repair mechanism and as a result, becomes demethylated.

DNAメチル化に加え、ヒストン修飾も遺伝子発現に重要な役割を果たしている。*Fig. 2*に示すように、一般的に活発な発現を認める遺伝子のプロモーター領域では、DNAメチル化は認められず、ヒストンはアセチル化されている。一方で、ヒストンH3の9番目のリジン残基（H3K9）がメチル化されると、DNMTおよびヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase: HDAC）をリクルートし、DNAがメチル化され、ヒストンが脱アセチル化される。これらの修飾により、クロマチン構造が凝集し、遺伝子発現が不活化される。また、DNAメチル化を介さないエピジェネティックな機序による遺伝子発現の抑制機構として、ポリコーム抑制複合体（polycomb repressive complex: PRC2）によるヒストンH3の27番目のリジン残基（H3K27）のメチル化が報告されている（*Fig. 2*）[2,3]。

また、重要な点としては、これらのエピゲノム変化はDNAメチル化阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、ヒストンメチル化酵素阻害薬などの薬剤により基本的に可逆的であり、癌などの疾患に対する次世代の分子標的治療薬として大きな注目を集めている[5]。実際、DNAメチル化阻害薬であるAzacitidine（ビダーザ®）およびヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるVorinostat（ゾリンザ®）が骨髄異形成症候群および皮膚T細胞リンパ腫の適応としてそれぞれ認可され、大きな効果をあげている[6]。

代謝とエピジェネティクス

近年、One Carbon Metabolismとそれを構成する栄養素が注目されている。

One Carbon Metabolismとは、葉酸代謝とメチオニン代謝を含む代謝経路のことである。この代謝経路を構成する栄養素（メチオニン、葉酸、ビタミンB_{12}）は、エピジェネティクス制御機構へ作用し、遺伝子の発現などにも影響を与えるため、癌などの疾患にも非常に重要な役割を果たすと考えられている（*Fig. 3*）。One Carbon Metabolismのなかで、DNAメチル化に最も寄与するとされている代謝物がS-アデノシルメチオニン（SAM）である。SAMはメチオニンとATPを基質として、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ（MAT）により合成され、DNAメチル化やヒストンメチル化においてメチル基供与体として働く。そしてメチル基を供与したSAMは、S-アデノシルホモシステイン（SAH）へと変換される（*Fig. 3*）。

葉酸欠乏症は、細胞内のSAMを減少させ、ゲノム全体的にシトシンのメチル化を抑制するため、染色体の不安定性や癌遺伝子の活性化を引き起こすことで、発癌のリスクを増大させると考えられている[7]。これまでの疫学研究により、葉酸塩の摂取量と大腸癌などの癌のリスクは逆相関することが示唆されている[8]。50歳～71歳の米

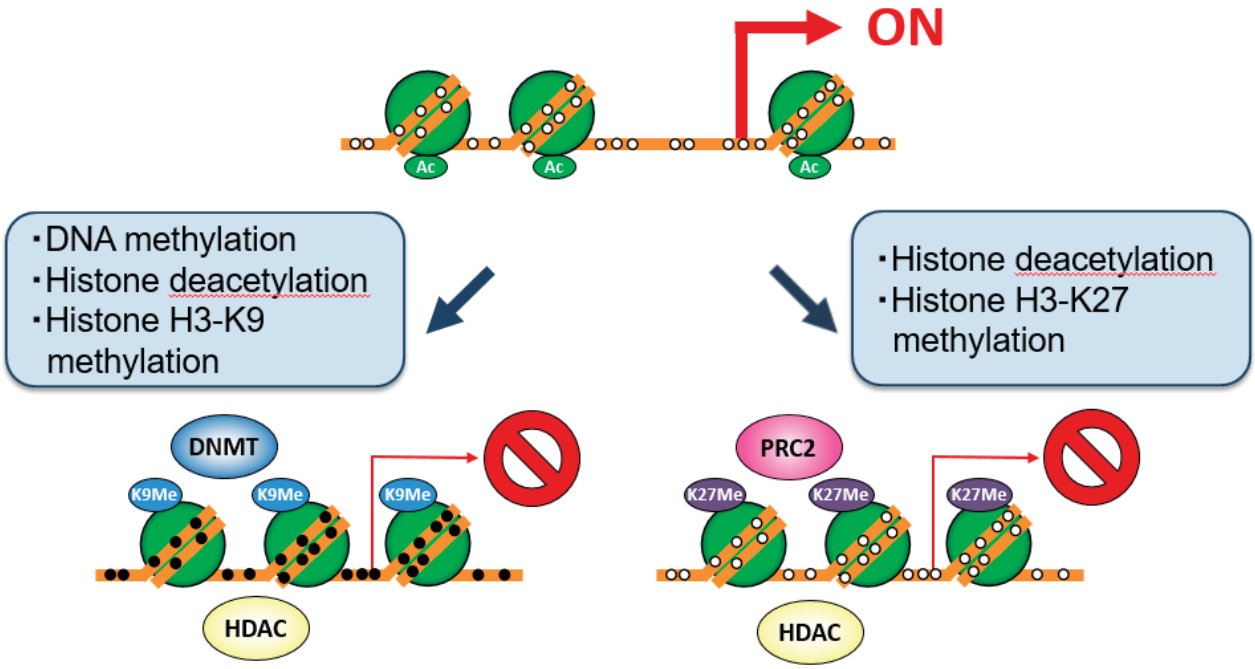

Fig. 2. **Control of gene expression by epigenetic change.**

When histone H3K9 is methylated, it recruits DNMT and HDAC, DNA is methylated and histone is deacetylated. Through these modifications, the chromatin structure is agglutinated and gene expression is deactivated. Meanwhile, when histone H3K27 is methylated by PRC2, it deactivates gene expression not through DNA methylation.

●: Methylated DNA, ○: Demethylated DNA, Ac: Acetylated histone, Me: Methylated histone.

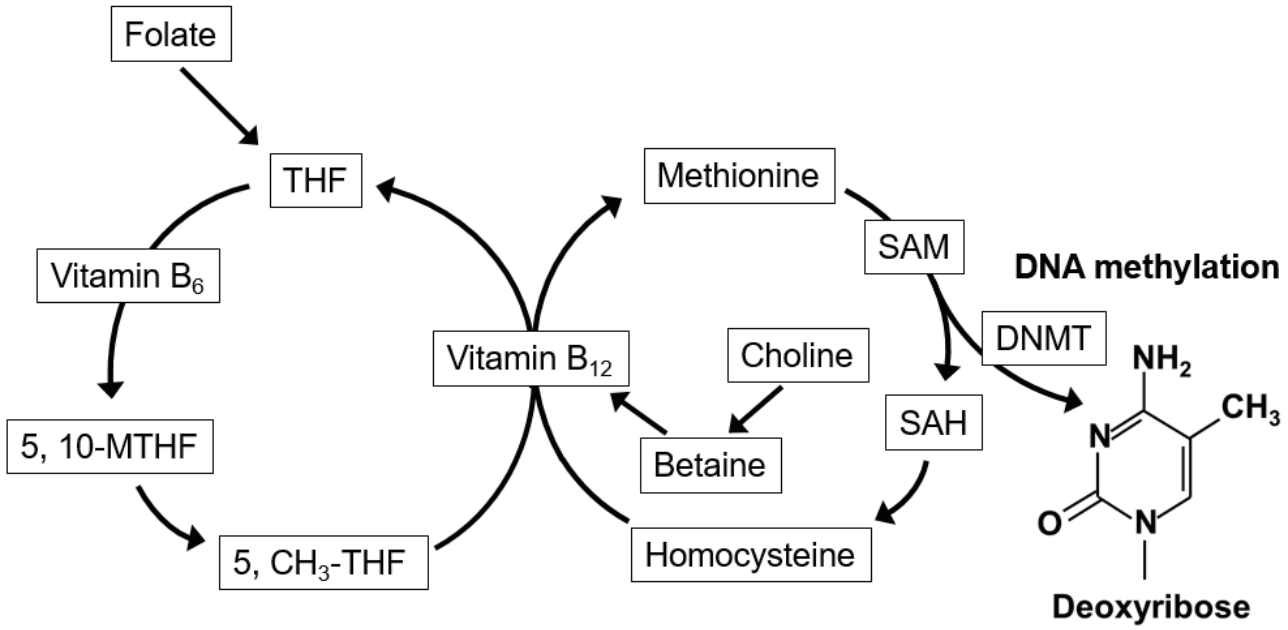

Fig. 3. **One-carbon metabolism and epigenetics.**

One-carbon metabolism is being examined as the mechanism combining nutrients and epigenetics. The nutrients constituting one-carbon metabolism bring about DNA methylation change. SAM of methionine metabolic pathway, in particular, is an important metabolic product playing a role of methyl group donor for DNA methylation and histone methylation.
THF: tetrahydrofolate; 5, 10-MTHF: 5, 10-methylene THF; 5, CH3-THF: 5, methyl-THF; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine.

国人 525,000 人以上を対象に行われたコホート研究 NIH-AARP Diet and Health Study（食事・健康調査）では、総葉酸塩摂取量が 900 μg／日以上の人は、総摂取量が 200 μg ／日未満の人と比較して大腸癌のリスクが 30％ 低いことが明らかになった[9)]。しかし、発癌に対する葉酸塩の効果に関する詳細は、研究によって立証されていない。また、高用量の葉酸を摂取した場合は、癌の発生や進行を促進する可能性も指摘されている[10,11)]。大腸癌およびその他の癌における食物由来の葉酸塩やサプリメントに含有される葉酸の役割を十分に解明するためには、さらなる研究が必要である。これまでのところ、適正量の葉酸塩を摂取することで、ある種の癌のリスクを軽減できる可能性が示されている。一方で、高用量の葉酸補充は、逆に発癌のリスクを上昇させる可能性があり、注意が必要である。

生命活動を行うすべての細胞は、そのエネルギー源として解糖系を利用する。細胞内では、細胞外から取り込んだグルコースを使ってエネルギー産生が行われている。そして、生体内に存在するほとんどすべての生体高分子は、生命活動に伴ってグリケーション（糖化反応）を受ける。グリケーションによる細胞への影響を糖化ストレスと呼んでいる。当初、グリケーションは、グルコースに代表される還元糖のカルボニル基と蛋白質のアミノ基が非酵素的に反応し、最終的には糖化最終生成物（advanced glycation end-products: AGEs）の生成に至るまでの経路を指していたが、現在ではより広い範疇で使用されている。生体のすべての蛋白質は生命活動を続ける限り、非酵素的な糖化反応を受ける可能性があり、これを避けては通れない。糖尿病のような慢性的な高血糖状態では、生体内のあらゆるところでグリケーション反応が亢進し、その最終産物である AGE が蓄積することになる。現代の高齢化社会においては、年齢を重ねると共にグリケーション反応が癌をはじめとする加齢関連疾患の発症に関わることになる。このグリケーション反応がエピジェネティクスにも影響を与えている可能性が考えられる。特に、糖尿病環境で形成されるヒストンリジンカルボキシメチル化（HL-CM）が、ヒストン修飾や DNA メチル化の変化を介して遺伝子発現にも影響を与える可能性がある。糖尿病に伴う高糖濃度・酸化亢進状態では、HL-CM が生じ、ヒストンアセチル化などに影響を与えることが考えられる。グリケーション反応とエピジェネティクスとの関連については、非常に重要な研究分野であるが、まだほとんどのことが明らかになっておらず、今後の研究成果による解明が期待される。

加齢に伴うエピジェネティクス変化

エピジェネティクスが癌をはじめとする疾患のみならず、加齢や老化においても重要な役割を果たすことが明らかになってきた。例えば、一卵性双生児のゲノム配列は同じであるが、その後の異なる生活環境や生活習慣により、一方にだけ糖尿病や癌などの疾患が発生することや、両者で寿命が異なることがしばしば認められる。これらの変化は加齢により生じたエピジェネティクス変化が原因となっていると考えられる。実際、3 歳と 50 歳の一卵性双生児の DNA メチル化とヒストンアセチル化を比較した研究では、3 歳の一卵性双生児では両者のエピゲノム状態に差はほとんどないが、50 歳の一卵性双生児では明らかな差が認められたことが報告されている[12)]。異なる生活環境や生活習慣の下で加齢していくことで、エピジェネティクス変化が蓄積し、疾患の発症や寿命に影響を与えていることが考えられる。

近年、加齢と共に幹細胞も機能が低下し、それによって組織の構築や維持ができなくなるというステムセルエイジング仮説が提唱されている。造血幹細胞や腸管上皮幹細胞などの組織幹細胞は、永続的な自己複製能と多分化能を有し、組織を構成する上で最も重要な細胞である。また、このような組織幹細胞は一生を通じて自己複製するため、老化の過程でエピジェネティクス変化の蓄積を観察する良いモデルになると考えられる。これまでの研究から、老化による個体の機能低下には、組織幹細胞における経時的なエピジェネティクス変化が重要な役割を果たすことが指摘されている[13)]。*Fig. 4* に示す通り、若い幹細胞においては DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス状態はほぼ均一に保たれている。しかし、加齢に伴い自己複製を繰り返し、さらに環境因子の曝露や慢性炎症、ウイルス・細菌の感染などが加わると、エピジェネティクス変化が蓄積する。老化が進むとエピジェネティクス変化がさらに亢進し、最終的には幹細胞の枯渇に伴う組織の機能不全すなわち個体の機能低下や癌などの増殖異常につながると考えられる。

Issa らは約 400 症例における大腸粘膜組織において、年齢と Estrogen-receptor（ER）遺伝子のメチル化状態を検討したところ、加齢によってメチル化レベルが上昇することを報告している[14)]。一般に、加齢と共にゲノム全体のメチル化シトシン含量は低下する傾向にあるとされている。一方、特定の遺伝子のメチル化状態については加齢とともに亢進することが報告されている。これらの変化が染色体不安定性や癌抑制遺伝子の不活性化を誘導し、発癌に重要な役割を果たしていると考えられている。また、Toyota らも多数の遺伝子のメチル化状態を詳細に解析したところ、異常メチル化には加齢によるメチル化（type A）と癌特異的メチル化（type C）があることを明らかにしている[15)]。Type A の遺伝子としては、ER 遺伝子の他に MYOD、N33 などが報告されている。加齢とともに特定の遺伝子のメチル化状態が亢進するメカニズムについては不明な点が多く、今後のさらなる研究が必要である。

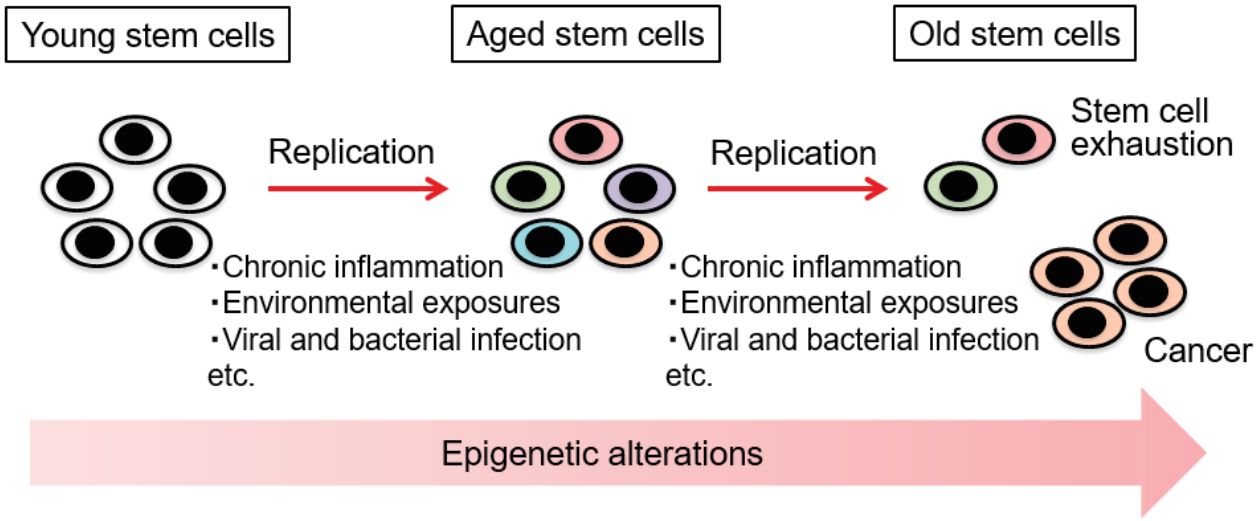

Fig. 4. **Epigenetic changes associated with aging of stem cells.**
The epigenetic conditions of DNA methylation and histone modifications are almost evenly maintained in young stem cells. While stem cells repeat self-replication with aging and the exposure to environmental factors, chronic inflammation and infection with bacteria and virus are added to it, and epigenetic changes accumulate. Epigenetic changes accelerate with aging, finally leading to tissue dysfunction associated with the depletion of stem cells and the abnormal proliferation of cancer and other diseases.

エピジェネティクス変化に着目した老化の分子メカニズムの解明と新たな抗加齢介入の開発

我が国は既に65歳以上の高齢者の割合が21%を超えた超高齢社会の状態にあり、我が国における高齢化は「世界でも類を見ない」速さで進行している。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極めて重要な課題である。

これまで、老化に関する研究がなかなか進展しなかった大きな要因の1つとして、*in vitro*で老化の本態を反映する良いモデルが存在しなかったことがあげられる。我々は、老化によるエピジェネティクス変化や遺伝子発現変化が幹細胞に蓄積することに特に着目し、新たな幹細胞の3次元培養法であるオルガノイド培養により樹立した腸管上皮オルガノイドを用いて老化の分子メカニズムを解明することに挑戦している。オルガノイド培養技術は、組織幹細胞の3次元培養法であり、生体内の特性を*in vitro*で再現できることから、世界的にも大きな注目を集めている。我々はこれまでにマウス腸管上皮および$Apc^{Min/+}$マウスの腸管腫瘍組織よりオルガノイド培養により腫瘍幹細胞を永続的に培養・維持することに成功した[16,17]。さらに難治性癌の代表である胆道癌組織からもオルガノイドを樹立し、1年以上にわたり胆道癌由来の癌幹細胞を培養・維持することに世界に先駆けて成功している[18]。オルガノイド培養法により、これまでにない生体内の細胞と極めて類似性の高い*in vitro*での研究を行うことが可能になった。特に、腸管上皮は陰窩底部に存在する腸管上幹細胞が活発に自己複製と分化を繰り返し、3-4日で全ての細胞が入れ替わるダイナミックな組織である。また、大腸癌をはじめとして、加齢に伴い罹患率が上昇する腸疾患が多く、腸管上皮由来オルガノイドは幹細胞老化を観察する良いモデルであると考えている。

加齢に伴う老化という生命現象は、複数の遺伝子変化が複雑に関連しあって進んでいくものと予想される。そしてそれらの遺伝子がエピジェネティクス変化によって制御されているとすると、新たな低分子化合物などにより、エピジェネティクス変化を人為的に制御することで、加齢に関する重要な遺伝子の発現を制御できる可能性が考えられる。ただし、これらのエピゲノム創薬をアンチエイジングの臨床に応用するためには、老化の鍵となる遺伝子の同定や遺伝子特異的なエピジェネティクス制御の開発などが必要である。従来のDNAメチル化阻害薬やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬などは基本的にゲノム上の全ての領域を脱メチル化したりアセチル化するため、特に副作用の面で大きな問題点が残っている。近年、CRISPR-Cas9技術を改変し、領域特異的にメチル化酵素や脱メチル化酵素をリクルートすることで、特定の遺伝子のエピジェネティクス変化を制御する画期的なエピゲノム編集技術が開発された[19]。エピゲノム編集技術により加齢特異的なエピジェネティクス変化を制御することにより、これまでにない独創的な抗加齢アプローチの基盤が開発されることが期待される。エピゲノム編集だけではなく、現在臨床試験にも用いられている老化制御因子のニコチンアミドモノヌクレオチド（nicotinamide mononucleotide: NMN）[20]やDNAメチル化阻害薬、ヒストンメチル化阻害薬などのエピゲノム作用薬の効果についても検証することで、個々の症例に合致した最適な抗加齢アプローチを開発できる可能性が考えられる。

これらの新たな抗加齢介入の開発に成功すれば、高齢者の健康寿命の延長および生活の質（quality of life: QOL）の向上が実現し、癌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が期待される。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可能性も考えられる。今後のさらなる研究により、エピジェネティクスとアンチエイジング医学が発展し、古今東西、多くの人々が追い求めてきた「若返り」が実現することが期待される。

謝辞

本論文の概要は第11回糖化ストレス研究会（2016年11月10日、東京）にて発表した。

利益相反申告

本研究を遂行するにあたり利益相反に該当する事項はない。

参考文献

1) Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human *cancer cells*. Cancer Cell. 2006; 9: 435-443.
2) Saito Y, Saito H, Liang G, et al. Epigenetic alterations and microRNA misexpression in cancer and autoimmune diseases: A critical review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014; 47: 128-135.
3) Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2014; 44: 31-42.
4) Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. 2017; 18: 517-534.
5) Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, et al. Cancer epigenetics: Modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 267-280.
6) Campbell RM, Tummino PJ. Cancer epigenetics drug discovery and development: The challenge of hitting the mark. *J Clin Invest*. 2014; 124: 64-69.
7) Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: Mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull*. 1999; 55: 578 -592.
8) Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr*. 2004; 80: 1123-1128.
9) Gibson TM, Weinstein SJ, Pfeiffer RM, et al. Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94: 1053-1062.
10) Kim YI. Folate: A magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? *Gut*. 2006; 55: 1387-1389.
11) Ulrich CM, Potter JD. Folate supplementation: Too much of a good thing? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 189-193.
12) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 10604-10609.
13) Issa JP. Aging and epigenetic drift: A vicious cycle. *J Clin Invest*. 2014; 124: 24-29.
14) Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 249: 101-118.
15) Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999; 9: 349-357.
16) Saito Y, Nakaoka T, Sakai K, et al. Inhibition of DNA methylation suppresses intestinal tumor organoids by inducing an anti-viral response. *Sci Rep*. 2016; 6: 25311.
17) Nakaoka T, Saito Y, Shimamoto Y, et al. Cluster microRNAs miR-194 and miR-215 suppress the tumorigenicity of intestinal tumor organoids. *Cancer Sci*. 2017; 108: 678-684.
18) Saito Y, Nakaoka T, Muramatsu T, et al. Induction of differentiation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells to functional hepatocytes using an organoid culture system. *Sci Rep*. 2018; 8: 2821.
19) Morita S, Noguchi H, Horii T, et al. Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol*. 2016; 34: 1060-1065.
20) Mills KF, Yoshida S, Stein LR, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metab*. 2016; 24: 795-806.