

消化管ホルモンの分泌に対する細胞極性の影響 —小腸上皮細胞の極性異常を呈するノックアウトマウスを用いた研究—

原田 玲子

大阪大学大学院医学系研究科細胞生物学 特任講師
(現 宝塚医療大学保健医療学部 教授)

緒 言

インクレチンは、食事摂取に反応して腸管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進する消化管ホルモンで、糖尿病の新たな治療標的として脚光を浴びている¹⁾。インクレチンの薬理作用に関する研究は盛んであるが、インクレチン分泌細胞の細胞生物学的研究は未だ少ない。

インクレチンには glucagon-like peptide 1 (GLP-1) と glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) があり、食事摂取に伴い GLP-1 は小腸下部の L 細胞、GIP は小腸上部の K 細胞から分泌されることが知られている²⁾。インクレチンを産生するこれらの小腸上皮細胞は、頂端側（管腔に面する側）と側底側（血管などに面する側）という極性を有する。図 1 に示すように、小腸上皮細胞が頂端側において栄養素（主として糖質）を感受すると、インクレチンは側底側（つまり反対側）から血中に分泌され、血流を介して膵β細胞に作用する。糖質を感知する受容体としてはナトリウム依存性グルコース輸送体 SGLT が候補として知られているが、SGLT は小腸上皮細胞において頂端側の細胞膜上に局在している³⁾。このためインクレチンが正常に作用するに

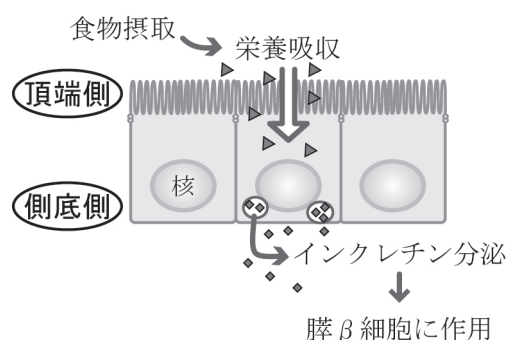


図 1 小腸上皮細胞の極性とインクレチン分泌

小腸上皮細胞の頂端側において栄養素が感受されると、側底側からインクレチンが分泌される。

は、小腸上皮細胞における頂端側と側底側との連携が非常に重要と考えられるが、その機構は未だ解明されていない。

我々の研究グループでは以前、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab8a のノックアウトマウス (Rab8a KO マウス) を作成・解析し、このマウス的小腸上皮細胞では頂端側への蛋白の輸送が選択的に障害されることを Nature 誌に発表した⁴⁾。これらの背景から私は、Rab8a KO マウスがインクレチン分泌機構の細胞生物学的解明に役立つであろうという着想に至った。そこで本研究では Rab8a KO マウスを用いて、小腸上皮細胞の極性異常が SGLT や GLP-1 の局在に及ぼす影響を、細胞生物学的手法を用いて解明した。

実験方法

本研究で使用している Rab8a KO マウスは、我々の研究グループが revertible knockout 法を用いて作成したものである⁴⁾。動物実験においては、大阪大学の実験動物指針を遵守した。また実験は大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行われた。Rab8a KO マウスとしては Rab8^{-/-} マウスおよび Rab8^{geo/geo} マウスを用い、wild-type マウスとしては同腹の Rab8^{+/+} マウスを用いた。Rab8a KO マウスは生後約 4 週齢で死亡するため、本研究では全て 3 週齢のマウスを解析した。

免疫染色実験では、マウスを麻酔下にて固定液 (3% Paraformaldehyde / 0.1 M phosphate buffer) で経心灌流固定し、小腸を取り出した。小腸上部としては十二指腸を用い、小腸下部としては大腸境界部付近を用いた。さらに後固定とクライオプロテクション (20% sucrose / 0.1 M phosphate buffer) の後、組織片を凍結し、クライオスタットを用いて薄切した。

免疫染色の一次抗体としては以下の抗体を用いた：goat anti-SGLT-1 (M-19) (Santa Cruz sc-20582) ,

goat anti-GLP1 (C-17) (Santa Cruz sc-7782), Rabbit anti Chromogranin A (94-130) (矢内原研究所 Y291)。二次抗体としては以下の抗体を用いた: Alexa 488-labeled donkey anti-rabbit IgG, Alexa 568-labeled donkey anti-goat IgG (Invitrogen)。免疫染色後さらに DAPI を用いて核染色を行った。コンフォーカル写真は共焦点レーザー顕微鏡オリンパス FV1000D を用いて撮影した。

結 果

1. Rab8a KOマウスにおけるSGLTの異常

低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab8 は、酵母で分泌 (exocytosis) に重要な Sec4 の相同分子であり、培養細胞を用いた過去の実験から、Rab8 は哺乳類では神経の樹状突起や上皮細胞の側底側への小胞輸送に重要と考えられてきた⁵⁾。組織や個体での Rab8a の役割を解明するために、我々は Rab8a を欠損するマウスを作成して解析を行った⁴⁾。

Rab8a KO マウスは2週齢を少し過ぎてから下痢と体重減少を呈し、生後3—4週間で殆ど死亡した。各組織の形態学的観察を行ったところ、小腸は2週齢で大きな変化はなかったが、3週齢で微絨毛の短小化が認められた。小腸以外の組織では大きな変化は認められず、予想されていた神経細胞の樹状突起の異常も認められなかった。

小腸組織をさらに詳細に解析したところ、Rab8a KO マウスの小腸上皮細胞においては、驚くべきことに側底側に輸送される種々の蛋白 (LDL 受容体, Na^+/K^+

ATPase, E-カドヘリン) の分布が正常であるのに対し、頂端側に輸送される種々の蛋白 (dipeptidyl peptidase IV, alkaline phosphatase, peptide transporter¹⁾) では局在の異常が認められた。糖質を感知する受容体である SGLT は小腸上皮細胞において頂端側の細胞膜上に局在していることが知られているため、Rab8a KO マウスにおいて局在を調べたところ、SGLT も局在異常を示し、細胞内やや頂端側において広汎に蓄積した染色が大量に認められた (図2)。

2. Rab8a KOマウスにおけるGLP-1の異常

GLP-1 は、SGLT が小腸上皮細胞頂端側で糖質を感知したのを受けて、小腸下部の L 細胞から分泌される。Rab8a KO マウスにおいて SGLT が局在異常を示すことから、GLP-1 の産生にも異常が生じることが予想される。そこで本研究では小腸における GLP-1 の局在を解析した。

図3に示すように、Rab8a KO マウスでは小腸下部において、GLP-1 陽性細胞の数の増加が認められた。また、wild-type マウスでは小腸上部では GLP-1 陽性細胞はほとんど存在しないのに対し、Rab8a KO マウスでは小腸上部においても GLP-1 陽性細胞が点在していた。このことから Rab8a KO マウスの小腸全体において、GLP-1 産生細胞が増えていると考えられる。

倍率を上げて観察すると、GLP-1 陽性細胞において、GLP-1 陽性顆粒の局在や、一細胞当たりの顆粒の数には明らかな差は認められないことが解った。GLP-1 陽性顆粒は wild-type と Rab8a KO マウスの双方において、核の周辺や細胞の側底側に分布し、調節性分泌経路に典型的な大型分泌顆粒であった。

Chromogranin A は腸クロム親和性細胞 (ECL 細胞) などの神経内分泌細胞に局在し、調節性分泌経路において分泌顆粒形成に重要な役割を担うと報告されている⁶⁾。そこで小腸上皮細胞を抗 GLP1 抗体および抗 Chromogranin A 抗体で二重染色したところ、wild-type マウスでは GLP-1 陽性細胞は Chromogranin A 抗体で染まらないのに対し、Rab8a KO マウスでは GLP-1 と Chromogranin A との共発現が認められた。

考 察

本研究により、Rab8aKO マウスの小腸上皮細胞において、糖質を感知する受容体である SGLT が頂端側の細胞膜上に局在せずに、細胞内に異常蓄積すること

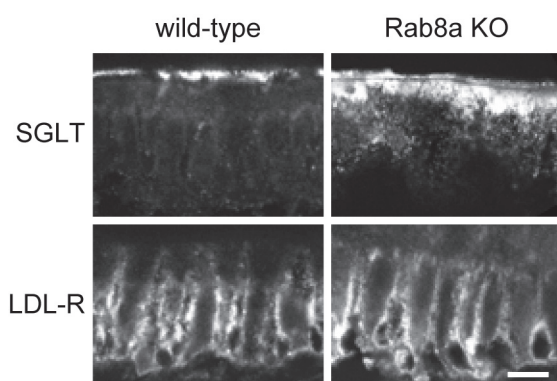


図2 Rab8a KOマウスにおけるSGLT局在の異常

(上段) 小腸上皮細胞において SGLT は、wild-type マウスでは頂端側の細胞膜上に局在するが、Rab8a KO マウスでは細胞内に異常蓄積する。(下段) LDL 受容体は wild-type マウス、Rab8a KO マウスとも側底側に分布する。スケールバーは 10 μm を示す。

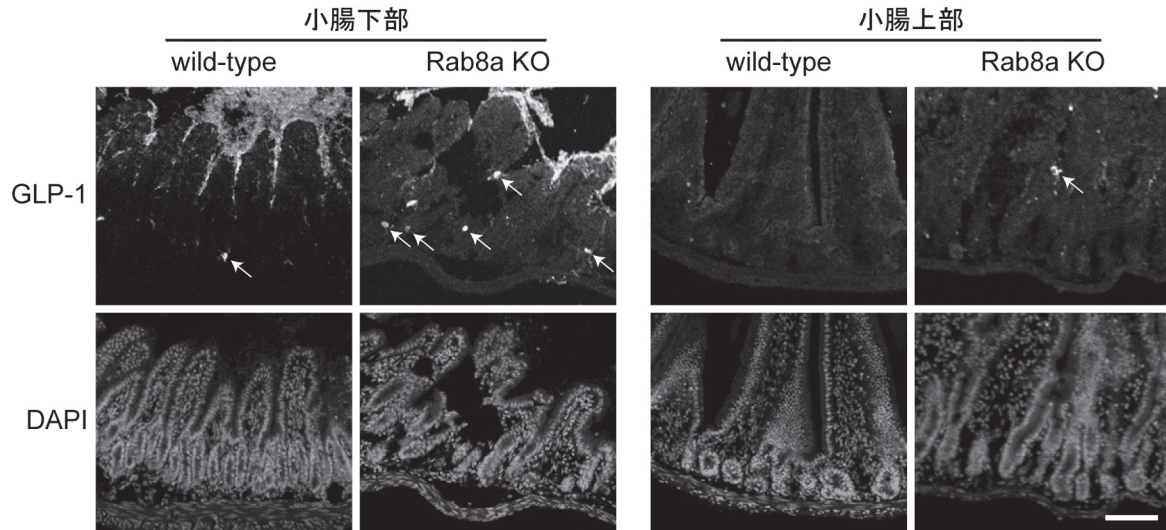


図3 Rab8a KO マウスにおける GLP-1 の異常 (低倍率画像)

(左 2 列) 小腸下部において、GLP-1 陽性細胞 (矢印で示す) は Rab8a KO マウスの方が wild-type マウスより多く認められた。(右 2 列) 小腸上部において、GLP-1 陽性細胞は wild-type マウスではほとんど存在しないが、Rab8a KO マウスでは点在していた。下段は DAPI による核染色像である。スケールバーは 100 μm を示す。

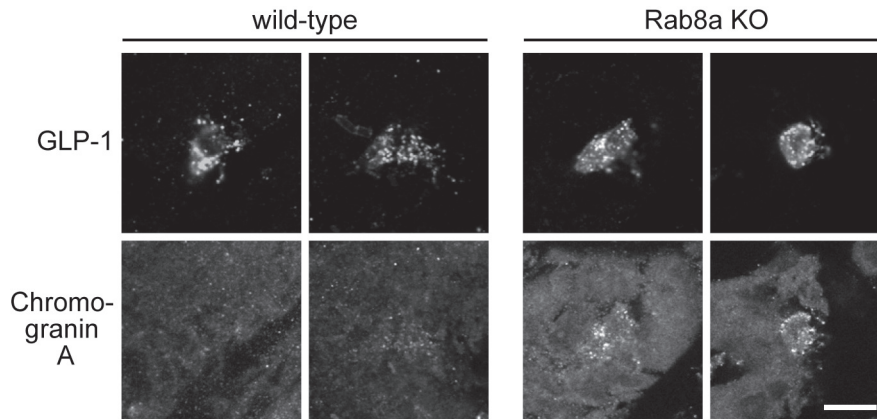


図4 Rab8a KO マウスにおける GLP-1 の異常 (高倍率画像)

左 2 列に Rab8a KO マウスの GLP-1 陽性細胞を 2 個、右 2 列に wild-type マウスの GLP-1 陽性細胞をそれぞれ 2 個ずつ示した。抗 GLP-1 抗体 (上段) と抗 Chromogranin A 抗体 (下段) による二重染色である。スケールバーは 10 μm を示す。

が認められた。また小腸全体において、GLP-1 産生細胞の増加が認められた。GLP-1 は SGLT からの情報を得て分泌されるため、SGLT が機能しないことにより GLP-1 の産生は抑えられると予想されたが、GLP-1 産生細胞の増加は、このシステムがより複雑なものであることを示唆するものである。今後は血中 GLP-1 濃度の測定を行い、GLP-1 の分泌が Rab8aKO マウスにおいて阻害されていないか調べる必要がある。

さらに本研究では、Rab8aKO マウスにおいて GLP-1 と Chromogranin A との共発現が認められた。この結

果に対しては以下の二つの仮説が考えられる：1) ECL 細胞など、L 細胞以外の内分泌細胞が GLP-1 を産生するようになった、または 2) L 細胞において調節性分泌経路が活性化されて Chromogranin A の発現量が上昇した。これらの可能性をさらに探究するには、今後の経時的、定量的な解析が必要である。

本研究で観察された GLP-1 産生細胞の増加は非常に興味深い現象である。さらなる研究によって、この増加の機構が解明されて、GLP-1 産生細胞の数を増やすことが可能になれば、それは糖尿病の新薬の開発につなが

ることも期待される。

要 約

インクレチンは糖尿病の新たな治療標的として脚光を浴びている消化管ホルモンである。小腸上皮細胞の頂端側において、糖質を感知する受容体である SGLT が栄養素を感受すると、インクレチンは側底側から血中に分泌されるため、頂端側と側底側との連携が重要と考えられるが、その機構は未だ解明されていない。

我々は以前、低分子量 GTP 結合蛋白 Rab8a の KO マウスにおいて小腸上皮細胞の頂端側への蛋白輸送が選択的に障害されることを解明した。そこで本研究ではこのマウスを解析し、小腸上皮細胞の極性異常がインクレチンの産生に及ぼす影響の解明を試みた。

Rab8a KO マウスの小腸上皮細胞においては、SGLT が頂端側の細胞膜上に局在せずに、細胞内に異常蓄積することが認められた。また小腸全体において、GLP-1 産生細胞の増加が認められた。Rab8a KO マウスにおいては GLP-1 と Chromogranin A との共発現が認められたことから、L 細胞以外の内分泌細胞が GLP-1 を産生するようになった可能性や、L 細胞において調節性分泌

経路が活性化された可能性が考えられる。さらなる研究によって GLP-1 産生細胞を増加させる機構が解明されたなら、それは糖尿病の新薬の開発につながることも期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。貴財団の助成金は金銭的および精神的に大きな助けと励みになりました。また、本研究では大阪大学医学研究科の原田彰宏教授および細胞生物研究室的メンバーにご助力頂いており、感謝致します。

文 献

- 1) J. E. Campbell, & D. J. Drucker, : *Cell Metabolism*, 17, 819-837, 2013.
- 2) A. M. Habib, et al, : *Endocrinology*, 153, 3054-3065, 2012.
- 3) F. Reimann, et al, : *Cell Metabolism*, 8, 532-539, 2008.
- 4) T. Sato, et al, : *Nature*, 448, 366-369, 2007.
- 5) 原田彰宏 : *生化学*, 80, 830-832, 2008.
- 6) 渡部剛ほか : *顕微鏡*, 43, 29-34, 2008.