

小腸絨毛委縮メカニズムの解明とその回復に与える栄養素の作用機序

鈴木 拓史

山形大学地域教育文化学部食環境デザインコース 助教

諸 言

これまでに非経腸栄養時の絨毛委縮メカニズムには、小腸管腔側からの栄養素流入刺激の損失ならびに絨毛基底部に存在する小腸様未分化細胞の分裂・増殖能の低下であると考えられている。経口から摂取された栄養素は、小腸吸収細胞を介して効率的に体内に吸収され、その過程で絨毛は栄養素の種類、質、量を認識し、それらを効率的に消化・吸収すべく絨毛内の遺伝子発現分布を巧みに調節する機能を獲得している^{1,2)}。特に、細胞の成長や増殖に関連する遺伝子の絨毛内発現分布は絨毛基底部に偏っている¹⁾。長期間の非経腸栄養下では、このような絨毛内遺伝子発現分布を調節するメカニズムが破綻している可能性が考えられ、その回復に栄養素の刺激が重要であると示唆されている。また近年、栄養素の刺激が遺伝子発現調節レベル（クロマチンの構造変化、転写因子の結合など）への作用として小腸絨毛上皮細胞に影響を与えることが明らかとなっており³⁾、栄養素刺激がエピジェネティック調節機構を介して非経腸栄養時からの小腸機能回復に寄与する可能性が考えられる。

そこで本研究は、ラットを用いて長期間の非経腸栄養時の絨毛委縮メカニズムの詳細と経口から栄養素を再摂取した際の絨毛委縮回復メカニズムの詳細について、細胞周期関連因子、mTOR 経路関連因子などの細胞増殖とアポトーシスに関連する因子の発現変化ならびに発現調節メカニズムに焦点を当てて検討を行った。

実験方法

中心静脈栄養法 (TPN)

8 週齢 Wistar 系雄ラット、体重 200g の動物を各群 4～6 匹使用し、馴化期間 6 日後、麻酔下でラットの頸静脈へのカテーテルの挿入・留置術を施行した。TPN 手術 1 日後に TPN 輸液を開始し、TPN 輸液にはネオパレン 2 号輸液（大塚製薬）を用い、250kcal/kg/日となるように 7 日間継続投与した。試験期間中、動物は

絶食とし、水のみ自由摂取させて飼育した。

単種類栄養素投与

7 日間の TPN 施行後、栄養素の経口投与を 1 日 1 回、3 日間行った。TPN 輸液により 1 日に投与する全投与エネルギー量（250kcal/kg/日）から投与栄養素のエネルギー量を差し引いたエネルギー量は、TPN 輸液を継続して投与することにより補った。投与した栄養素は、脂質として長鎖脂肪酸 (LCT) と中鎖脂肪酸 (MCT)、糖質としてグルコース (Glu) とフルクトース (Fru) および糖質投与の浸透圧コントロールとしてカルボキシメチルセルロース (CMC)、アミノ酸としてグルタミン (G) とアルギニン (A) をそれぞれ投与した。TPN 手術のみを施行した動物を Sham 群、7 日間の TPN を施行した動物を TPN 群、7 日間の TPN 施行後に各栄養素を経口投与した動物は、各投与栄養素の種類から LCT 群、MCT 群、Glu 群、Fru 群、CMC 群、G 群、A 群とした。

組織採取

Sham 群ならびに各栄養素投与群は、TPN 輸液開始から 10 日後に屠殺し、TPN 群は TPN 開始 7 日後に屠殺し、空腸を採取した。

組織化学染色

各群の空腸包埋試料をクリオスタット凍結薄切切片法により厚さ 7 μ m の薄切切片として切り出し、Hematoxylin and Eosin (HE) 法により染色した。染色された組織切片は顕微鏡下で観察・撮影し、組織形態学的な評価を行った。

二糖類分解酵素活性測定

二糖類分解酵素活性測定は Dahlqvist, A らによる方法を用い、二糖類分解酵素による二糖類の分解により生

成されたグルコース量を検出することで酵素の比活性を測定した。

遺伝子発現解析 (リアルタイムRT-PCR)

それぞれの動物から採取した空腸粘膜組織から total RNA を抽出後、cDNA に変換し、それらを鋳型として、SYBR green 法により栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子、細胞周期、アポトーシス、mTOR 経路に関連する遺伝子の発現解析を行った。

免疫組織化学染色

クリオスタット凍結薄切切片法により得られた組織切片 (Sham 群と TPN 群) に対して抗 Ki-67 抗体を反応させ、メタルエンハンサー DAB 染色キットにより検出した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP: Chromatin immunoprecipitation) 法

Sham 群と TPN 群の空腸試料を用いて、抗アセチル化ヒストン H3 抗体、抗アセチル化ヒストン H4 抗体、抗トリメチル化ヒストン H3 リジン 9 抗体をそれぞれ ChIP に用いた。また、免疫沈降のネガティブコントロールとしてウサギ IgG を用いた。

結 果

7日間TPN施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛の形態学的変化と二糖類分解酵素活性ならびに栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現に及ぼす影響

HE 染色法により空腸絨毛組織の形態学的変化を観察したところ、Sham 群と比較して TPN 群の空腸絨毛の顕著な委縮が観察された。また、TPN7 日後からの栄養素投与群では、特に脂質と糖質を投与した群において TPN 群と比較して明らかな空腸絨毛の形態回復が観察された (図 1A)。続いて、微絨毛上に存在する二糖類分解酵素の活性を測定した結果、スクラーゼならびにマルターゼ活性は、TPN 群で有意に減少した。栄養素投与群では、TPN 群と比較して、スクラーゼ活性は、グルコース、フルクトース、アルギニン投与により活性が有意に増加し、マルターゼ活性は MCT ならびにアルギニン投与により有意に増加した (図 1B)。また、栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子の発現解析では、スクラーゼイソマルターゼ複合体 (Si)、脂肪酸結合タンパク質 (Fabps)、レチノール結合タンパク質 (Rbp2) などの

遺伝子発現が7日間の TPN により顕著に減少した。一方、TPN 後に各種栄養素を投与すると、ほとんどの遺伝子発現が顕著に増大した。特に、脂質ならびに糖質を投与した群で遺伝子発現の増大が顕著であった。また、LCT よりも MCT、グルコースよりはフルクトース、グルタミンよりはアルギニンを投与した群において、それら遺伝子の発現がより増大した (図 1C)。

7日間TPN施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響

TPN 群で Sham 群と比較して有意に発現が減少した遺伝子は CyclinG1 と CyclinG2 であった。CyclinD1、Myc、PCNA 遺伝子の発現は、TPN 群において有意に増大した。一方、栄養素投与群では、MCT ならびにフルクトース投与群で全ての遺伝子の発現が著しく増大した。アルギニン投与群では、MCT ならびにフルクトース投与群ほど顕著な増大は見られなかったが、TPN 群と比較して CyclinA2、CyclinD3、CyclinG2、p21、p53 遺伝子の発現が増大した (図 2)。

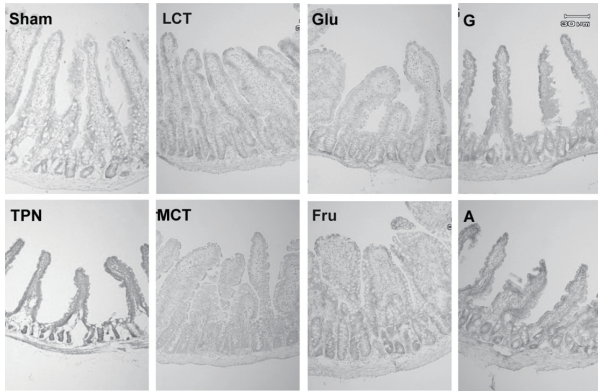
7日間TPN施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内アポトーシス関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Caspase1 ならびに Caspase3 遺伝子の発現が、Sham 群と比較して TPN 群で顕著に減少した。栄養素投与群では、MCT ならびにフルクトース投与群で著しい遺伝子発現の増大が観察された。アルギニン投与群では、MCT ならびにフルクトース投与群ほど顕著な増大は見られなかったが、TPN 群と比較して Caspase3、Caspase4 遺伝子の発現が増大した (図 3)。

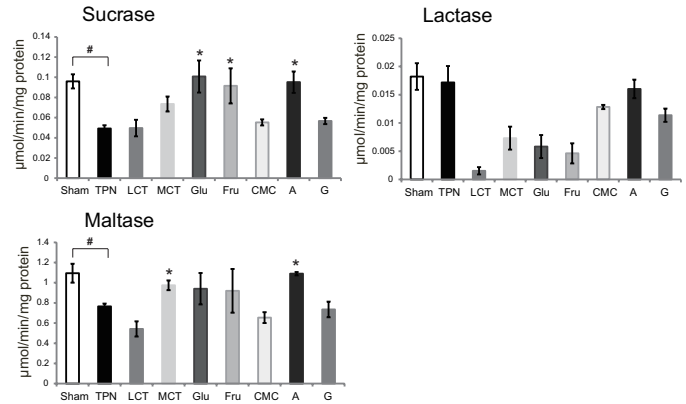
7日間TPN施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内 mTOR 経路関連遺伝子の発現に及ぼす影響と7日間の TPN が及ぼす mTOR 関連遺伝子上のヒストン化学修飾レベルの変化

mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路には、mTOR 複合体1 (mTORC1) を介した経路と mTOR 複合体2 (mTORC2) を介した経路の大きく分けて2経路存在する。mTORC1は、mTOR と Regulatory associated protein of mTOR (Raptor)、mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein (mLST8) と PRAS40 とで構成されており、直接栄養素によって活性化され、細胞増殖・成長などを調節するとされている。

A) Histological staining

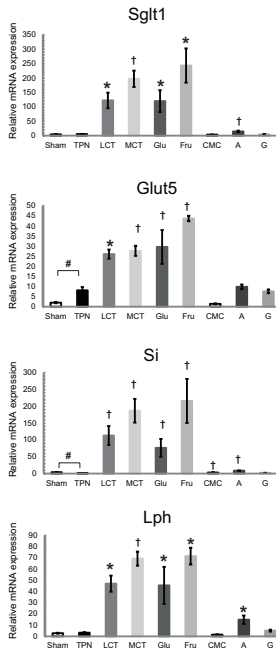


B) Disaccharidases activity

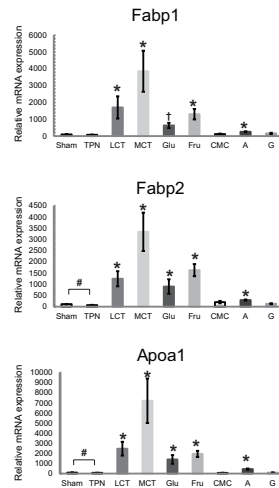


C) mRNA expression analysis

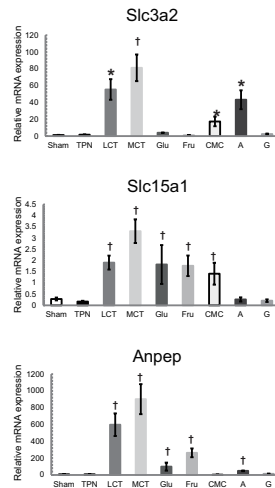
a) Carbohydrates



b) Lipids



c) Peptides/Amino acids



d) Others

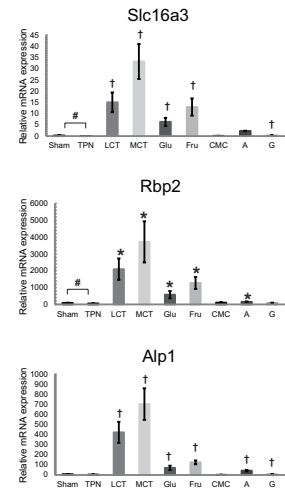


図1 7日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛の形態学的変化と二糖類分解酵素活性ならびに栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現に及ぼす影響

A) : HE 染色による空腸絨毛の形態観察。クリオスタット凍結薄切切片法により得られた各群の薄切切片を HE 染色法により染色し、カメラ付き顕微鏡で撮影した (×100)。スケールバーは 30 μm。B) : 二糖類分解酵素活性測定。Dahlqvist, A らによって開発された方法を用い、二糖類分解酵素による二糖類の分解により生成されたグルコース量を検出することで酵素の比活性を測定した。グラフの値は平均値 ±SEM (n=4-6) で示した。#p<0.05 (Sham vs TPN, t-test welch)、*p<0.05 (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。C) : 栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現解析。各群の空腸粘膜組織より total RNA を抽出後、cDNA に変換し、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。a) は、糖質の消化・吸収に関連する遺伝子 [ナトリウム-グルコース共輸送体 (Sglt1)、フルクトース輸送体 (Glut5)、スクラーゼイソマルターゼ複合体 (Si)、ラクターゼフロリジン水解酵素 (Lph)]。b) は、脂質の吸収に関連する遺伝子 [肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (Fabp1)、小腸型脂肪酸結合タンパク質 (Fabp2)、アポリポタンパク質 (Apoa1)]。c) は、ペプチド/アミノ酸の消化・吸収に関連する遺伝子 [塩基/中性アミノ酸輸送体 (Slc3a2)、オリゴペプチド輸送体 (Slc15a1)、アミノペプチダーゼ (Anpep)]。d) は、その他の小腸に発現する遺伝子 [モノカルボン酸輸送体 (Slc16a3)、レチノール結合タンパク質 (Rbp2)、アルカリフォスファターゼ (Alp1)]。グラフの値は平均値 ±SEM (n=4-6) で示した。#p<0.05 (Sham vs TPN, t-test welch)、*p<0.05, †p<0.1 (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。

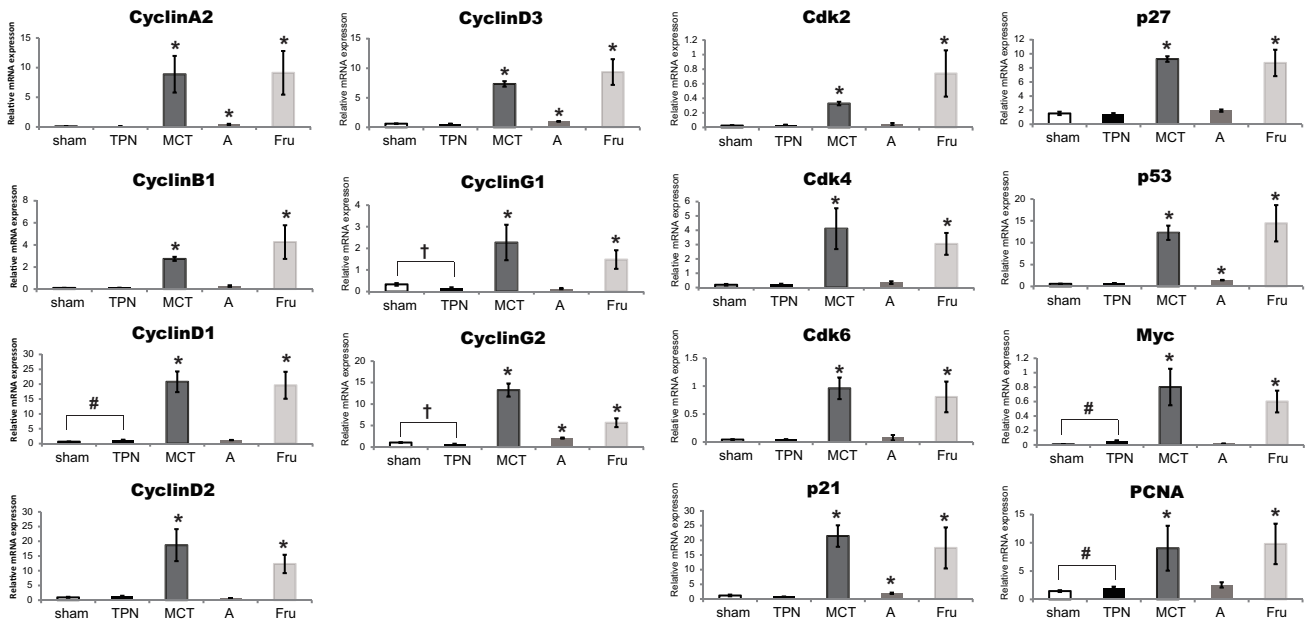


図2 7日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響

各群の空腸粘膜組織より total RNA を抽出後、cDNA に変換し、細胞周期の調節に関連する遺伝子発現についてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。グラフの値は 28s ribosomal RNA 発現量で補正し、平均値 ±SEM (n=4-6) で示した。#p<0.05, † p<0.1 (Sham vs TPN, t-test welch)、*p<0.05 (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。

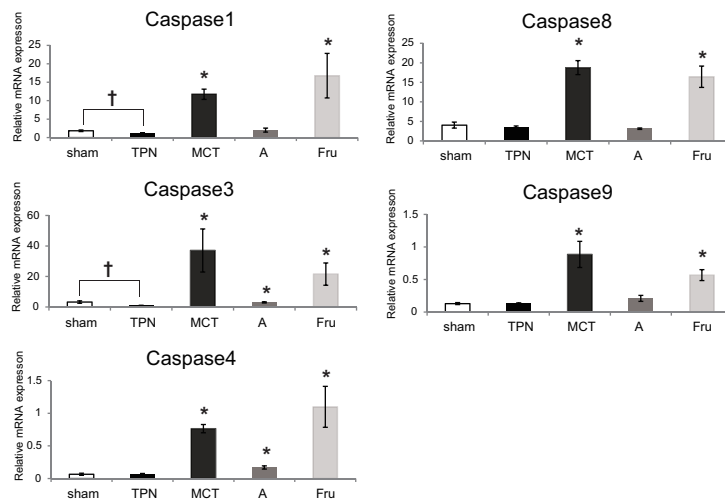


図3 7日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内アポトーシス関連遺伝子の発現に及ぼす影響

各群の空腸粘膜組織より total RNA を抽出後、cDNA に変換し、アポトーシスに関連する遺伝子発現についてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。グラフの値は 28s ribosomal RNA 発現量で補正し、平均値 ±SEM (n=4-6) で示した。#p<0.05, † p<0.1 (Sham vs TPN, t-test welch)、*p<0.05 (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。

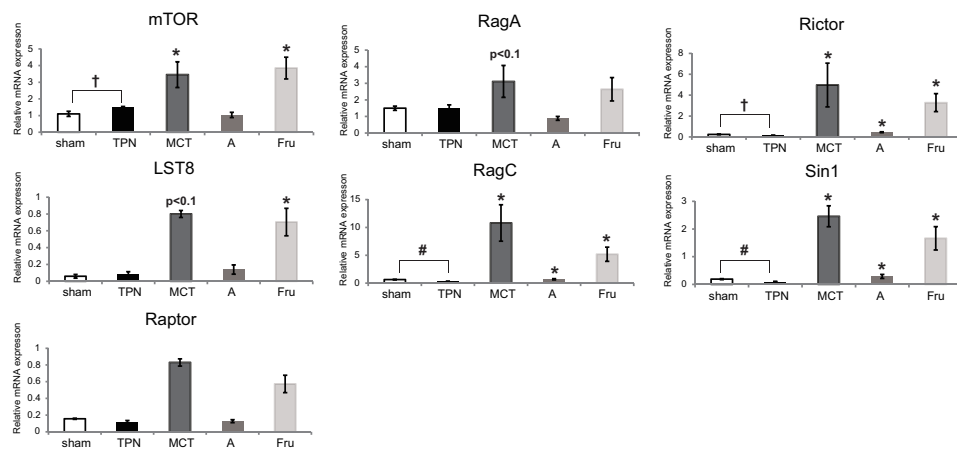
一方、mTORC2 は、mTOR と rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor)、mLST8 と Sin1 (SAPK-interacting protein) で構成されており、主に成長因子により活性化され、栄養素による活性化は引き起こされないとされている。Rag タンパク質は、細胞外からのアミノ酸による刺激を mTORC1 に伝える役割を担っており、A/

B ならびに C/D の 4 種類が各 1 種類ずつ組み合わせることによって mTORC1 へ細胞外からのシグナルを伝える。これら mTOR 経路に関連する因子の遺伝子発現に対する 7 日間の TPN ならびに栄養素の再摂取の影響について解析したところ、mTOR 遺伝子は TPN 群において Sham 群と比較して有意に遺伝子発現が増大した。一方、RagC ならびに

Sin1 遺伝子の発現は、Sham 群と比較して TPN 群で有意に減少した。また、MCT ならびにフルクトース投与群では、全ての遺伝子発現が Sham 群ならびに TPN 群よりも有意に増大した。アルギニン投与群では、MCT ならびにフルクトース投与群ほど顕著な増大は見られなかったが、TPN 群と比較して RagC、Rictor、Sin1 遺伝子の発現が増大した (図 4A)。続いて、7 日間の TPN 施行に伴い有意に遺伝子発現が減少した RagC 遺伝子のプロモーター上のヒストンタンパク質の化学修飾について、ChIP assay を用いて解

析を行ったところ、遺伝子発現を正に調節するヒストン H3 ならびにヒストン H4 のアセチル化レベルは、今回解析したいずれのプロモーター領域において Sham 群と比較して差はみられなかった。一方、遺伝子発現を負に調節するヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化レベルは、TPN 群において、RagC 遺伝子プロモーター領域の -1 ~ -600 bp 付近は有意に増大し、-600 ~ -900 bp、-1751 ~ -2150 bp の領域では増大する傾向を示した (図 4B)。

A) mRNA expression analysis



B) ChIP assay

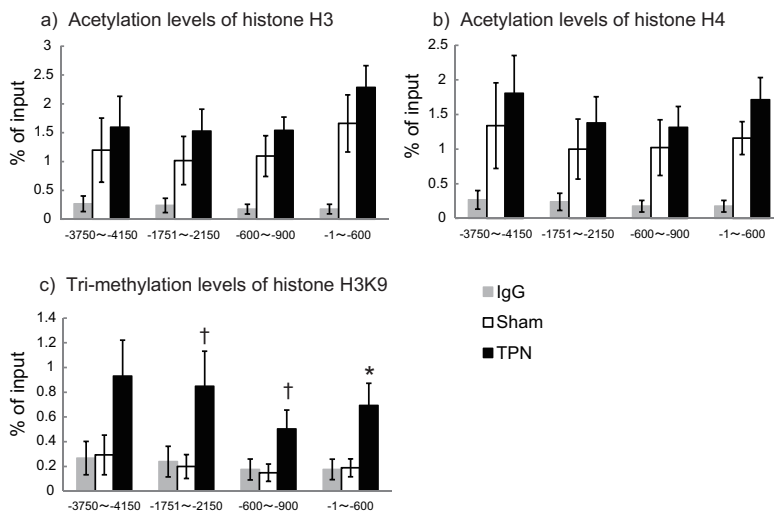


図 4 7 日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛内 mTOR 経路関連遺伝子の発現に及ぼす影響と 7 日間の TPN が及ぼす mTOR 関連遺伝子上のヒストン化学修飾レベルの変化

A): mTOR 経路関連遺伝子の発現解析。各群の空腸粘膜組織より total RNA を抽出後、cDNA に変換し、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。グラフの値は 28s ribosomal RNA 発現量で補正し、平均値 ±SEM (n=4-6) で示した。[#]p<0.05, [†]p<0.1 (Sham vs TPN, t-test welch), *p<0.05 (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。B): クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイによる RagC 遺伝子プロモーター領域におけるヒストンタンパク質の化学修飾レベルの解析。グラフの値は平均値 ±SEM (n=4) で示した。*p<0.05, [†]p<0.1 (Sham vs TPN, t-test welch)。

7日間TPN施行後の空腸絨毛内細胞増殖マーカーKi-67の発現局在の変化

細胞増殖マーカーであるKi-67の空腸絨毛内発現局在について、免疫組織化学染色法により解析を行ったところ、Sham群の空腸絨毛においてはクリプト部にKi-67陽性細胞が局在しているのに対して、TPN群では委縮した絨毛の表面とクリプト部にKi-67陽性細胞が局在することが観察された(図5)。

考 察

小腸上皮細胞の栄養素刺激に対する応答性は、正常な状態のときでも腸管内に流入してきた栄養素の種類を認識し、それらを効率的に消化・吸収するための消化酵素、輸送体の発現を誘導する^{4,5,6)}。また、それらの誘導は長期間の絶食からの再摂食時に顕著に促進されることが知られている。本研究からも長期間栄養素刺激を断たれた小腸上皮細胞は栄養素の再流入刺激に対して過剰なまでも多くの遺伝子発現を増大させることで栄養素に対して応答を示すことが明らかとなった。しかしながら、本研究結果は、栄養素の流入刺激が強過ぎたのかほとんどの遺伝子発現が有意に増加したため、これらの遺伝子発現増大作用が栄養素の直接的な作用であるか否かについては判断することができなかつた。それゆえ、投与栄養素量の設定値を下げ、且つ、栄養素投与時間経過に伴う

変化について今後検討すべきと考える。

興味深いことに、細胞周期を正に調節するCyclinD1遺伝子や細胞増殖マーカーであるMyc (myelocytomatosis oncogene) やPCNA (proliferating cell nuclear antigen) の遺伝子発現が7日間のTPN施行に伴い有意に増大し、免疫染色ではKi-67の陽性細胞の局在が基底部だけではなく絨毛上部にまで広がっていることが明らかとなった。当初は、先行研究の結果から長期間の非経腸栄養時には絨毛基底部に存在する小腸様幹細胞の分裂・増殖能が低下していると予想されたが、先行研究の多くがマウスを使用しており⁷⁾、動物種ならびに投与したTPN輸液の組成や投与条件などが他の報告とは異なることが予想外の結果となった原因であると考えられる。しかし、ラットに対する7日間のTPNでは、成熟した小腸吸収細胞で発現が認められる栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子の多くが発現を減少させていることと細胞の増殖に関連する因子の発現が増大していることから、絨毛を覆う上皮細胞の多くが分化・成熟できずに未成熟なままで存在している可能性が示唆された。TPNによるヒト絨毛における影響を調べた先行研究では、本研究結果と同様に細胞増殖マーカー陽性細胞の数がTPNによって増加傾向となることを示しており、本研究結果を支持している⁸⁾。それゆえ、今回の結果について改めて研究デザインの不備がないかを検証すると共に、ラットの長期間の

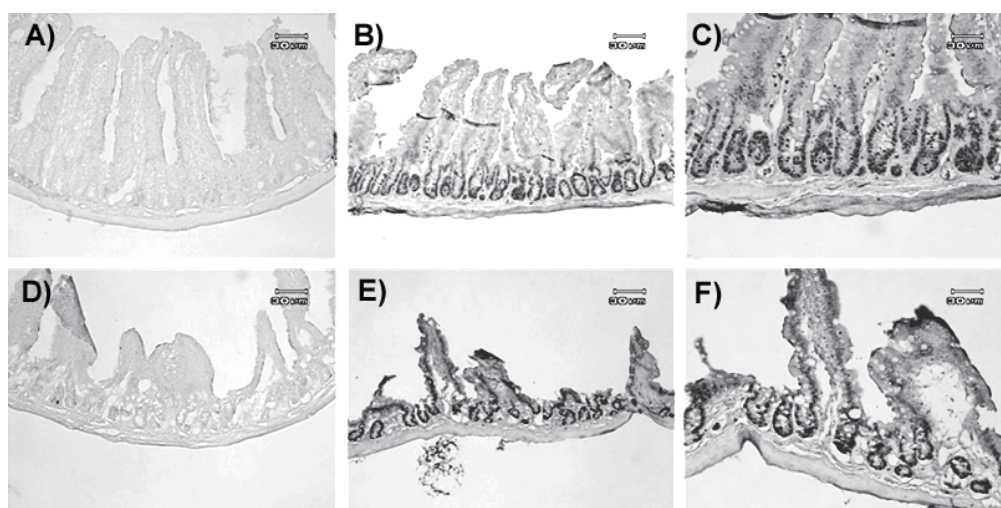


図5 7日間TPN施行後の空腸絨毛内細胞増殖マーカーKi-67の発現局在の変化

クリオスタット凍結薄切切片法により得られたSham群ならびにTPN群の薄切切片を用い、抗ラットKi-67抗体により免疫組織化学染色を行った。検出はDAB染色キットを用いた。A), B), C) がSham群、D), E), F) がTPN群の空腸薄切切片。A), D) は抗体バックグラウンド、A), B), D), E) は100倍、C), F) は200倍での撮影。スケールバーは30 μ m。

TPNによる絨毛上皮細胞の未成熟化機構の詳細と栄養素投与が与える成熟化機構の詳細についての検討を今後行いたいと考える。

また、今回解析を行った mTOR 関連因子の中でも栄養素刺激を mTORC1 に伝えるメディエータータンパク質である RagC の遺伝子発現が7日間の TPN により有意に減少し、尚且つ、その負の遺伝子発現機序には RagC 遺伝子プロモーター領域のヒストン H3K9 のトリメチル化レベルの増大が関連していることを明らかにした。これは、細胞外からの栄養素の刺激が mTOR に伝わり辛くなることを示唆する結果であり、TPN によるクロマチン構造変化を伴う遺伝子発現調節機序の関与についても今後検討を進めていきたいと考える。

近年、腸は「第二の脳」とも呼ばれるようにさまざまな生体内刺激を全身に伝える役割を担っていることが示唆されている。しかしながら、経口からの食物摂取が困難な病態（腸閉塞、炎症性腸疾患、嚥下障害など）における腸機能の低下は生体の恒常性維持を脅かす可能性がある。とくに小腸の主機能である栄養素の消化・吸収能の低下は、直接、我々の健康維持に影響を与える可能性があるため、小腸機能回復の第一優先課題である。本研究結果は、小腸機能が低下した小腸に対する栄養素の再流入刺激が、小腸絨毛上皮細胞の遺伝子発現を劇的に変化させるだけでなく、上皮細胞の成熟化に寄与することを示唆するものであり、課題解決のための有用な科学的根拠となり得ると考える。

要 約

本研究において、ラットに対する7日間の TPN 施行により、空腸絨毛の委縮と栄養素の消化・吸収に関連する多くの遺伝子発現ならびに二糖類分解酵素活性が顕著

に減少することが明らかとなった。一方で、細胞増殖に関連する因子の発現は TPN によりむしろ増大し、7日間の TPN は上皮細胞の未成熟化を促す可能性を示唆した。また、TPN 施行後3日間、各種栄養素を経口から摂取させると栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子だけではなく、mTOR 経路、細胞周期、アポトーシスに関連する遺伝子の多くが顕著に発現を増大させた。特に、脂質ならびに糖質投与により、劇的な遺伝子発現誘導が引き起こされることが明らかとなり、その誘導には栄養素の種類（脂質、糖質、アミノ酸）と質の違い（LCT と MCT、Glu と Fru）が影響を及ぼす可能性を示唆した。

謝 辞

本研究は、平成24年度三島海雲記念財団学術研究奨励金により行われました。本研究を遂行する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各位に深く感謝致します。

引用文献

- 1) T Suzuki, et al, : *Biochim Biophys Acta.*, 1790 (12) , 1624-1635, 2009.
- 2) T Suzuki, et al, : *Biochem Biophys Res Commun.*, 369, 788-793, 2008.
- 3) T Suzuki, et al, : *Biochem J.*, 435 (1) , 43-53, 2011
- 4) H Yasutake, et al, : *Biochim Biophys Acta.*, 1243 (2) , 270-276, 1995.
- 5) T Goda, et al, : *Am J Physiol.*, 268 (6 Pt 1) , G1066-G1073, 1995.
- 6) T Tanaka, et al, : *Biochem J.*, 331 (Pt 1) , 225-230, 1998.
- 7) Y Feng and D. H. Teitelbaum, : *Am J Physiol.*, 302, G236-G249, 2012.
- 8) S Groos, et al, : *J Surg Res.*, 109, 74-85, 2003.