

平成 30 年 7 月 11 日現在

機関番号：33504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21474

研究課題名(和文) 高脂肪食摂取下における腸管粘膜防御機能と吸収機構に関するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mucosal immune functions and intestinal absorption mechanisms in high fat diet mice

研究代表者

志茂 聡 (Shimo, Satoshi)

健康科学大学・健康科学部・准教授

研究者番号：80734607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食モデルマウスを用いて、高脂肪食摂取による腸管粘膜防御機能への影響を明らかにした。高脂肪食マウス(HFD群)では、通常食マウスと比較して20週齢で有意な血糖値上昇がみられ、粘膜固有層内のIgA形質細胞数の減少を認めた。超微形態解析では、HFD群の筋間神経叢内の軸索Varicosity内のシナプス小胞の減少がみられたが、SGLT阻害剤投与後は、シナプス集積と軸索側枝の形成を多数認めた。高脂肪食摂取が腸管IgAの分布に影響を与えることとともに、腸管筋間神経叢内のVaricosityのシナプス動態異常を惹起することに加えて、SGLT阻害剤が腸管筋間神経叢に保護的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a mouse hyperglycemia model using prolonged high-fat diet (HFD) ingestion, and analyzed the changes in the distribution of immunoglobulins in the lamina propria and the effect of an SGLT inhibitor (phlorizin) on neurons in the myenteric plexus. In HFD mice, a significant increase in the blood glucose level was observed at the age of 20 weeks as compared with the normal diet mice. Furthermore, the number of IgA plasma cells decreased in the lamina propria. Compared to STD mice, those on a prolonged HFD had decreased varicosity number and smaller varicosity minor axis in the neurons of the myenteric plexus. In HFD mice, phlorizin treatment resulted in ameliorated hyperglycemia and increased synaptic vesicle of varicosities in the myenteric plexus. These results support the notion that nerve damage underlies diabetic symptoms of mucosal immune functions and dysmotility, and reveals adaptive enteric nerve system responses to the prolonged ingestion of a HFD.

研究分野：機能形態学

キーワード：高脂肪食 小腸吸収上皮細胞 SGLT 腸管免疫 IgA アウエルバッハ神経叢 SBF-SEM

1. 研究開始当初の背景

一般的に動物腸管は消化および吸収を主に司り、日々膨大な量の食物を摂取し、分解・吸収している。しかし、粘膜の脆弱性や高浸透性といった特徴は、常に病原微生物による感染や有害物質による病気などを起こしやすい。欧米型の高脂肪食の摂取では腸管でのバリア機能の低下および透過性の亢進することが報告されており、近年増加傾向である肥満や糖尿病のインスリン抵抗性の一因になっていると推測される[Sato J et al. Diabetes. 2014, 37(8):2343-2350.]。また、血糖コントロール不良の糖尿病患者の下痢や易感染性の要因として自律神経障害が主として考えられているが、高血糖状態が腸管免疫機能に何らかの影響を与えている可能性は否定できない。さらに、新たな糖尿病治療薬として SGLT 阻害薬など糖吸収に対する薬剤が出てきているが、重症低血糖などの重度の副作用の報告もいくつか出てきており、腸管での吸収機構のメカニズムの解明が急務である[SGLT2 阻害薬の適正使用に関する Recommendation. 日本糖尿病学会. 2014]。しかし、偏った食物摂取やこれらを標的とした吸収阻害薬が腸管吸収機能や免疫防御機能にどのような影響を与えているか、形態学および免疫組織化学的解析は十分ではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞組織内の可溶性血清蛋白の保存が良好に行える生体内凍結技法を用いて、小腸吸収上皮細胞の免疫組織化学的解析および超微形態学的に解析を行い高脂肪食摂取が腸管粘膜防御機能にどのような影響を与えているか明らかにすることである。さらに、糖吸収(SGLT)阻害薬であるフロリジン投与による腸管への影響を明らかにし、肥満や糖尿病の予防やメカニズムの解明することである。研究の目的を以下の4点にまとめた。

- (1) 高脂肪食摂取が小腸吸収上皮細胞にどのような形態変化をもたらすか？
- (2) 高脂肪食摂取が腸管吸収機構に変化はみられるのか？
- (3) 高脂肪食摂取が小腸粘膜の IgA 分布に影響を与えるか？
- (4) 高脂肪食摂取が腸管蠕動運動にどのような影響を与えるか？

3. 研究の方法

- (1) 高脂肪食摂取が小腸吸収上皮細胞にどのような形態変化をもたらすか？

実験には4週から高脂肪食(60Kcal%fat, Research Diets, inc.)の給餌を開始し、12-20週間飼育期間されたマウス(C57BL/6J, HFD群)を用いた。また、対照群として通常食で飼育されたC57BL/6Jマウス(STD群)を使用した。試料作製は、生体内凍結技法(図1)を用いた。ネブタール麻酔下C57BL/6マウスの

腸管を剖出し、腸管を開き管腔側を露出し、その後イソペンタン-プロパン混合寒剤(-193℃)を空腸管腔側(絨毛)より直接にかけて生体内凍結を行った。凍結した試料を2%四酸化オスミウム含有アセトン中で凍結置換固定し、エポン包埋する。形態学的解析には、トルイジンブルー染色を行い、厚切り切片に対応した隣接超薄切片は、ウランと鉛の電子染色後、電子顕微鏡(H-7500)で観察を行った。光顕試料は、生体内凍結技法で摘出した試料を2%パラフォルムアルデヒド含有アセトン中で凍結置換を行い、型のごとくパラフィン包埋した。

- (2) 高脂肪食摂取が腸管吸収機構に変化はみられるのか？

トレーサーとして Horseradish peroxidase(HRP)をマウス管腔内に投与した後、前述と同様の手順で試料を作製し、小腸吸収上皮細胞への取り込みおよび通過を光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。

- (3) 高脂肪食摂取が小腸粘膜の IgA 分布に影響を与えるか？

パラフィン包埋した試料を、マイクロトームを用いて5μm連続切片を作製した。形態学的解析はHE染色を用いた。免疫組織学的解析は、各種一時抗体(IgA, J-chain, IgG, IgG1, IgM, Albumin, PG9.5, Synaptophysin)を行った後、さらにビオチン標識した二次抗体を用い、ペルオキシダーゼ-アビジン-ビオチン複合体(ABC)法後、Diaminobenzidine(DAB)発色して光学顕微鏡で観察した。また、一部の切片では、蛍光標識抗体を用いて蛍光多重染色法を行い、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡(FV1000)を用いて観察を行った。

- (4) 高脂肪食摂取が腸管蠕動運動にどのような影響を与えるか？

腸管蠕動運動を調節する、筋間神経叢(アウエルバッハ神経叢)の形態学的解析を行った。上記2群(STD群、HFD群)にSGLT阻害薬であるフロリジンを投与後、麻酔下で空腸の管腔側を露出し、切り出した試料は4%PFA、1%グルタルアルデヒド(0.1MPB)および1%四酸化オスミウムによる浸漬固定を行った。その後、アルコール脱水を行い型のごとくエポン包埋する。形態学的解析には、トルイジンブルー染色を行った厚切り切片に対応した超薄切片を電子染色後、電子顕微鏡にて観察を行った。3次元電子顕微鏡包埋試料を作製後、シリアルブロックフェイス走査電子顕微鏡(SBF-SEM, Carl Zeiss)で撮像した。その後、ImageJ-Fijiにより取得したスタック画像(500~1000枚)のキャリブレーションを行い、Amira5、MIB、Fiji等のソフトウェアを使用して3次元再構築を行った。解析は、光顕用パラフィン試料での免疫組織化学(PGP9.5, Synaptophysin)と3次元再構築した筋間神経叢内における軸索の超微形態学

的解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食摂取が小腸吸収上皮細胞にどのような形態変化をもたらすか？

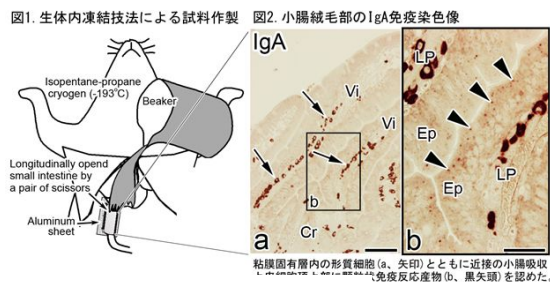
HFD 群では、腸上皮細胞質内に電子密度が高い小胞を多く認めた。一部の側部細胞膜領域では、細胞間接着装置複合体より近位部でも同様の小胞を多数認めた。一方、STD 群では側部膜ひだ咬合 interdigitation は豊富に認められたが、HFD 群で見られた小胞は認めなかった。

(2) 高脂肪食摂取が腸管吸収機構に変化はみられるのか？

HRP 投与による吸収機構の実験では、光顕による観察では、STD 群および HFD 群ともに、小腸吸収上皮細胞質内の頂上部において HRP 陽性像を認めた。しかし、高脂肪食マウスにおいて高脂肪食摂取の影響と思われるエンドサイトーシスの分泌顆粒が、上皮細胞の頂上部から基底部および腸上皮細胞間隙から基底膜側にかけて多くみられたため、トレーサーである HRP との判別が困難であった。実験手法を変更し、空腹時での HRP 投与を行い、再度データ取得を試みたが、安定的にデータを取得することができなかった。厚切り切片による光顕観察と隣接する超薄切片による電顕観察でデータを補完するなど、今後さらなる解析方法を検討が必要となった。

(3) 高脂肪食摂取が小腸粘膜の IgA 分布に影響を与えるか？

STD 群では、粘膜固有層内の形質細胞および小腸吸収上皮細胞質内に IgA 免疫反応産物を認めた(図 2、表 1)。特に、絨毛内の粘膜固有層の基部から中部にかけて形質細胞が多く分布することが明らかとなった。一方、HFD 群では IgA 陽性の形質細胞は減少し、吸収上皮細胞質内の顆粒は認められなかった。



	plasma cell	epithelial cell
Ig-A	+++	++
J chain	+++	++
Ig-κ	+++	+++
Ig-G1	±	-
Ig-M	-	-
Albumin	-	-

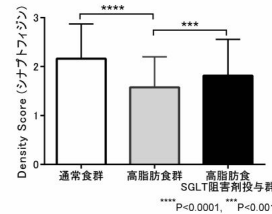
(+++ strong, (++) medium, (+) weak, (±) unclear, (-) negative.

表1. 形質細胞および小腸吸収上皮細胞のIgA, Jchain, Igκ 免疫染色像は類似した傾向であった。

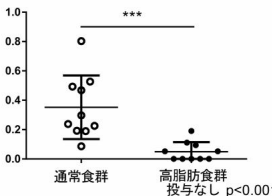
(4) 高脂肪食摂取が腸管蠕動運動にどのような影響を与えるか？

免疫組織化学的解析では、STD 群の筋間神経叢内および筋層間の軸索に沿って顆粒状の Synaptophysin 陽性像を豊富に認めた。一方、HFD 群では Synaptophysin 免疫反応性は弱く、筋間神経叢内の陽性像の減弱がみられた。しかし、HFD 群フロリジン投与後は筋間神経叢内に顆粒状 Synaptophysin 陽性像を豊富に認めた(図)。SBF-SEM による3次元超微形態解析では、STD 群は軸索の Varicosity に多数のシナプス集積を認め、軸索からは複数の側枝の形成を認めた。一方、HFD 群では軸索はらせん状となり、軸索の Varicosity 内のシナプス集積はほとんどみられなかった(図)。HFD 群フロリジン投与後は、Varicosity 内のシナプス集積とともに軸索に多数の側枝の形成を認めた(図)。腸管筋間神経叢において高血糖状態が Varicosity のシナプス動態の異常を惹起することに加えて、SGLT 阻害剤が腸管筋間神経叢に保護的に作用する可能性が示唆された。

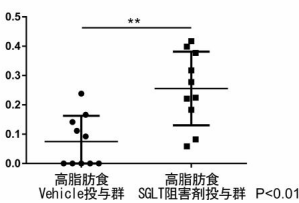
①高脂肪食群ではシナプス顆粒が減少する



②高脂肪食群ではパロコシティの減少がおこる



③SGLT阻害剤投与でパロコシティが増える



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 6件)

- Shimo S, Saitoh S, Nguyen HB, Thai TQ, Muramatsu K, Ohno N. Three-dimensional ultrastructure of myenteric plexus in high-fat diet mice assessed by serial block face scanning electron microscopy. 第74回日本顕微

鏡学会学術講演会、2018。(久留米)

2. 志茂聡、齊藤成、Nguyen HB、Thai TQ、生友聖子、村松憲、大野伸彦. 2型糖尿病モデルマウスにおける腸管神経叢の超微形態学的解析. 第77回日本解剖学会中部支部学術集会、2017。(愛知)
3. Shimo S, Saitoh S, Nguyen HB, Thai TQ, Ikutomo M, Muramatsu K, Ohno N. Sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor has a therapeutic effect on diabetic enteric neuropathy in mice fed a high-fat diet. ISAN2017・JSNR2017, 2017。(Nagoya)
4. 志茂聡、齊藤成、Nguyen HB、Thai TQ、生友聖子、村松憲、大野伸彦. Three-dimensional ultrastructural analysis of myenteric plexus in type 2 diabetic mouse model using SBF-SEM. 生体ボリュームイメージング研究部会 & 生理研研究会合同ワークショップ「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」、2016。(愛知)
5. 志茂聡、齊藤成、生友聖子、村松憲、Nguyen HB、Thai TQ、呉宝、大野伸彦. SBF-SEMを用いた2型糖尿病モデルマウスにおける腸管神経叢の3次元超微形態解析. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016。(福島)
6. 志茂聡、齊藤成、生友聖子、村松憲、大野伸彦. 2型糖尿病 SGLT 阻害剤投与モデルマウスにおける腸管神経叢の3次元超微形態解析. SSSEM&NIPS EM Workshop -Application of Electron Microscopy Big Data for Biomedical Sciences-2015。(愛知)

〔図書〕(計 1件)

1. Shimo S, Saitoh S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S. In Vivo Cryotechnique in Biomedical Research and Application for Bioimaging of Living Animal Organs. 「Part II-8. Immunohistochemical Detection of Soluble Immunoglobulins in Small Intestines」Springer. 33-38. 2016.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kenkoudai.ac.jp/modules/waffle0/index.php?t_m=ddcommon_view&id=28&_dd=waffle0_data2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志茂 聡 (Shimo, Satoshi)

健康科学大学・健康科学部・准教授
研究者番号：80734607