

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05474

研究課題名(和文) 乳児消化管での栄養吸収および腸内細菌定着に対する細胞内消化の重要性の解明

研究課題名(英文) Analysis of the importance of intracellular digestion for nutrient absorption and gut microbial colonization in the infant intestinal tract

研究代表者

大島 健司 (Oshima, Kenji)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90391888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳児期の栄養状態は成人後の疾患リスクにも影響を与えるため、乳成分の消化・吸収プロセスを理解することは生涯健康の維持に重要である。そこで本研究では、乳成分のうちタンパク質が乳児消化管内で生理機能を発揮する分子メカニズムを理解するため、腸上皮細胞によるエンドサイトーシスおよび細胞内消化の果たす役割について評価・解析を行った。乳児マウス腸内での乳機能性タンパク質ラクトフェリン(LF)の分解を解析したところ、消化管内での分解は限定的であり、LFは未分解のままでも体腔内へと吸収されていた。また乳成分の機能解析の基盤研究として、乳児期腸管の発達に伴う遺伝子の発現および腸内細菌叢の変化について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳児栄養の消化・吸収機構を理解することは、乳児の発育だけでなく、免疫関連疾患や代謝関連疾患などについて一生の疾病リスクを管理する上でも重要である。古くから乳児腸管細胞ではエンドサイトーシスが活発であることが観察されているものの、その意義については明らかとなっていない。そのため本研究では、乳児腸上皮細胞でのエンドサイトーシスおよび細胞内消化に着目し、個々の乳成分が吸収・分解される機構の解析を目的とする。本研究の成果は、乳児栄養や乳児医療だけでなく、生涯健康促進についての基礎的知識となり、応用実装への発展が期待できるものである。

研究成果の概要(英文)：Because nutritional status in infancy influences the risk of metabolic diseases in adulthood, understanding the digestive and absorptive processes of nutrients in infants is important for the maintenance of lifelong health. In this study, we evaluated and analyzed the role of endocytosis and intracellular digestion in intestinal epithelial cells in order to understand the molecular mechanisms by which proteins in milk exert their physiological functions in the infant gastrointestinal tract. We analyzed the degradation of milk functional protein lactoferrin (LF) in the intestine of infant mice. The degradation was limited, and LF was absorbed into the body cavity even in its undegraded state. As a basic study for the functional analysis of milk components, we analyzed the changes in gene expression and intestinal microbiota during the development of the infant intestinal tract.

研究分野：農芸化学

キーワード：乳児栄養 乳タンパク質 ラクトフェリン 消化管

1. 研究開始当初の背景

乳児期の栄養状態は、その後の生涯を通して代謝系や身体的機能に影響を与える要因であることが提唱されているが、なぜ乳児期特異的なのかなど、メカニズムについてまだ多くのことが未解明のままである。乳中には生理機能を発揮する乳タンパク質や成長因子、サイトカイン、免疫グロブリンなどが含まれ、乳児の組織形成を促進し、免疫系の発達を制御することが知られている。特に出産後数日間に産生される初乳はタンパク質に富み、その摂取は乳児の正常な発達に非常に重要であることが知られている。また乳にはマイクロRNAを含む細胞外小胞が多く含まれていることが知られているが、その機能や腸管内の動態は不明である。さらに生後の免疫系発達には腸内細菌も必須であることが知られている。免疫系が発達する乳児腸管では成人と大きく腸内細菌叢が異なっており、乳酸菌やビフィズス菌など炎症誘導性の低い菌種が優勢となっている。乳児型腸内細菌叢の形成と維持には、乳タンパク質とその分解産物や乳オリゴ糖が非常に重要な役割を果たすことが多くの研究により明らかとなっている。

乳児は大量の乳を摂取し、急激に成長する。人の場合乳児は50%以上のエネルギーを乳脂肪から得ており、一般的な哺乳動物の乳はそれ単体で見れば高脂肪食品とも考えられる。しかしながら、乳児の消化能力は大人と比べ弱く、どのようにして効率的に栄養を吸収しているかは不明である。また乳による乳児栄養が生理機能を発揮するメカニズムを理解するためには、乳児腸管における食物の分解吸収機構を知る必要がある。乳児、特に新生児では消化能力が未熟であり、多くの乳成分は未分解または部分分解の状態では腸内へ到達する。乳児腸管では大人型腸管に比べ透過性が高く、より大きな分子量の物質が管腔側から体腔側へと移行し、血流に乗り全身へと輸送される。そのため乳成分は生理活性を残したまま腸上皮層を通過して体内へと取り込まれ、機能を発揮することができると考えられている。

これまで食品成分の消化吸収機構は大人型腸管をモデルとして解析が進んでいるが、上記のように乳児腸管と大人型腸管では性質が異なることが明らかとなっている。乳児腸管について生化学レベルから生理学、形態学レベルで解析されているものの、細胞生物学レベルから分子生物学レベルでの解析はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

腸内細菌の菌叢や腸管分布パターン、食物の消化能力などが乳児と大人で大きく異なることが知られている一方、乳児型腸上皮細胞の性質との関連については研究があまり進んでいない。乳児腸管は大人型腸管とは異なり大型分子を直接体内に取り込む性質を持つことが古くから知られており、主に形態学的解析により乳児型腸管では大人型腸管とは異なるエンドサイトーシス機構が存在し、細胞内消化が活発であることが示唆されているが、その生理的意義については明らかとなっていない。本研究では、乳児型腸上皮細胞によるエンドサイトーシスおよび細胞内消化に着目し、乳児特異的消化機構の解析を通して、乳成分が吸収・分解される機構の解析を目的とする。

申請者はこれまでに、乳機能性タンパク質ラクトフェリン (LF) および腸上皮由来抗菌タンパク質による乳児腸内細菌叢形成制御と、ホスファチジルセリン結合乳タンパク質 MFG-E8 による乳脂肪球および細胞外小胞の産生と乳中での機能について解析を行ってきた。また申請者らは培養腸上皮細胞を用いて LF のエンドサイトーシスを解析しており、細胞に取り込まれた LF は数時間細胞内に安定にとどまったのち頂端側および基底側へと再放出されることを明らかとしている。再放出された LF は未分解または部分分解されていた。そこで本研究では、乳成分として LF、MFG-E8 および細胞外小胞について乳児消化管での消化・吸収および腸上皮細胞での細胞内消化について解析を行う。またこれら乳成分の細胞内分解が乳児腸内細菌叢形成にどのように影響するかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 乳児腸管での LF 分解の解析

出産直後である 2-3 日齢、大人型腸管へと分化が始まる乳児期中期である 10 日齢および離乳後の 30 日齢マウスに 50 μ g/g 体重となるよう PBS に溶解したウシ LF (bLF) を経口投与し、300 分まで経時的に管腔内容物を含む小腸組織をサンプリングした。抗 bLF 抗体による Western blotting により腸管内で生成される bLF 分解断片について解析した。また細胞内消化について検討するため、3 日齢および 10 日齢マウスに上と同じ条件で bLF を経口投与し、管腔内容物と小腸組織を別々にサンプリングした。管腔内容物と小腸組織に含まれる bLF について Western blotting により解析した。

(2) 乳児腸管組織での LF 吸収の解析

上記と同様に bLF を経口投与した 3 日齢および 9 日齢マウスから得た小腸組織から組織切片を調製し、抗 bLF 抗体により蛍光免疫組織染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡により観察を

行い、腸上皮細胞による bLF のエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスの観察を行った。

(3) 乳児小腸抽出液による bLF の in vitro 消化

上記と同様に bLF を経口投与した 3, 6, 30 日齢マウスの小腸組織から、管腔内容物懸濁液と細胞を溶解させた組織抽出液を調製した。それぞれの溶液を用いて、bLF (1mg/mL) の in vitro 消化を行った。内容物懸濁液での反応は pH7.5 で 1~3 時間、組織抽出液での反応は pH5.5 で 6~24 時間、それぞれ室温で行った。消化後の bLF について Western blotting により解析した。

(4) 質量分析法による bLF 断片の構造解析

質量分析法により小腸内で生じる bLF 断片の構造解析を試みた。小腸組織内容物懸濁液または組織抽出液により in vitro 消化を行った bLF 分解断片を、SDS-PAGE により分画した。ゲルをおよそ 10kDa ごとに 7 等分し、それぞれからタンパク質を抽出した。得られたタンパク質をトリプシンと Lys-C で完全消化し、micro LC-ESI/MS/MS により解析した。検出されるペプチド断片を選択し、多重反応モニタリングにより定量比較することで、in vitro 消化 bLF 断片の大きな構造の推定を試みた。

(5) 乳児消化管発達に伴うカテプシンの発現解析

乳児型腸管の性質を司る遺伝子 Blimp-1 を欠損するマウスと野生型マウスについて、乳児腸管での遺伝子発現プロファイルがデータベース上に登録されている[Muncan, Vanesa, et al. Nat Comms 2 452.]. この情報を解析したところ、細胞内プロテアーゼであるいくつかのカテプシン遺伝子の発現に差が見られた。そこで実際にこれらカテプシン遺伝子が乳児消化管の発達や離乳により発現変化するか、リアルタイム PCR により定量解析した。

(6) 腸上皮細胞による乳由来細胞外小胞の取り込み解析

出産後 8~12 日の C56BL/6N マウスおよび MFG-E8 ノックアウトマウスから搾乳し、得られた乳汁から超遠心分離により細胞外小胞を調製した。得られた細胞外小胞を PKH67 により蛍光ラベルした。多孔性膜のセルカルチャーインサート上で 4 週間培養した腸上皮細胞株 Caco-2 の頂端側に蛍光ラベル細胞外小胞を添加した。2 時間培養した後に、Hoechst33342 により核を染色して固定化し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(7) 離乳期前後の腸内細菌叢および腸管遺伝子発現変遷の解析

3, 10, 18, 35 日齢の ICR マウスから内容物を含む小腸、盲腸、結腸を摘出し、精製キットを用いてゲノム DNA を抽出した。得られた DNA 溶液に含まれる腸内細菌 16S ribosomal DNA をリアルタイム PCR により定量した。

3, 10, 18, 35 日齢の ICR マウスから小腸、盲腸、結腸の RNA を抽出し、cDNA を合成した。粘液層関連遺伝子、抗菌タンパク質遺伝子、IgA 産生遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 乳児腸管での LF 分解の解析

マウス乳児小腸上部から中部にかけて、Western blotting により 45 kDa の bLF 断片が大量に検出された。この断片は投与後 2 時間までに最大量となり、3 時間まで消化管内で観察された。投与後 60~120 分で、投与した bLF のおよそ 10%量が消化管内に 45kDa 断片として存在してお

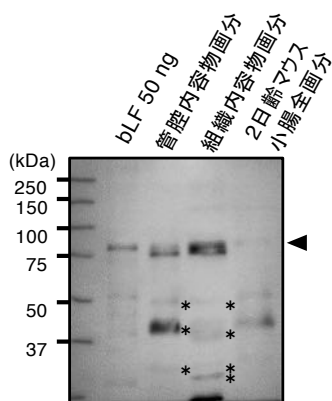


図 1 3 日齢マウス小腸各画分の bLF 断片 (*)

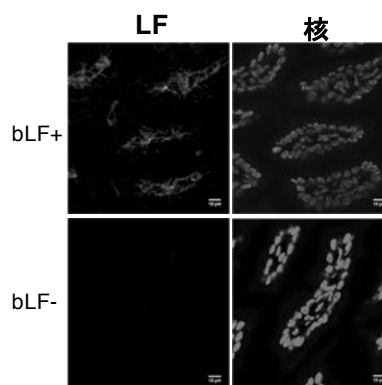


図 2 9 日齢マウス小腸絨毛断面の抗体染色像

り、多くの bLF は乳児消化管内では消化酵素により完全消化されることがなく、比較的大きな構造を保っていることが明らかとなった。45kDa 断片を含む bLF 部分分解断片、は腸管腔内容物と小腸組織で観察された (図 1)。Western blotting により検出された乳児腸管内 bLF 分解断片は、トリプシン分解物とは異なるパターンであった。

(2) 乳児腸管組織での LF 吸収の解析

投与 1 時間後の 3 日齢マウス小腸近位では、抗体反応性の bLF が細胞内に局在している様子が観察された。9 日齢マウス小腸では、粘膜固有層に強いシグナルが観察されると共に、上皮細胞内や細胞間にも bLF のシグナルが観察された (図 2)。

(3) 乳児小腸抽出液による bLF の in vitro 消化

乳児腸管腔内で検出された bLF 断片の生成に関わる酵素がどこに存在するか明らかにするため、マウスの小腸組織から管腔内容物懸濁液と組織抽出液を調製し、bLF の in vitro 消化を行った。その結果、3, 6, 30 日齢の管腔内容物懸濁液により bLF は 50 kDa と 30kDa の分解断片へと切断された。この断片はトリプシン消化により生成される分解断片とほぼ同じ大きさであった。しかしながら管腔内容物懸濁液による消化では乳児消化管で主要に見られる 45kDa 断片は生じなかった。3, 6 日齢の組織抽出液による消化により、49kDa, 47kDa, 37kDa, 30kDa の bLF 分解断片が生じた。また、離乳後である 30 日齢の組織抽出液による消化により、50kDa, 45kDa, 30kDa の分解断片が生じた。今回の解析では、乳児期に生じる 45kDa の bLF 断片の切断に必要なプロテアーゼが存在する場所は特定できなかったが、消化管腔に存在するプロテアーゼ以外のプロテアーゼが必要となる可能性が示唆された。

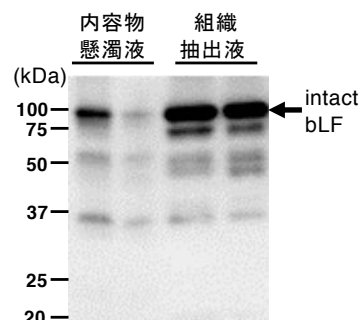


図 3 3 日齢小腸抽出液の in vitro 消化により生じた bLF 断片

(4) 質量分析法による bLF 断片の構造解析

精製 bLF をトリプシンと Lys-C で完全消化し、microLC-ESI/MS/MS により解析すると、bLF 全長の 65.0% をカバーするペプチド断片が検出された。この中からプリカーサーイオンとなる 28 種のペプチド配列 (全長配列の 50.4% をカバー) を選択し、多重反応モニタリングによりプリカーサーイオンの定量比較を行う系を立ち上げた。

小腸組織抽出液により in vitro 消化を行った bLF のペプチド断片を解析したところ、50~30kDa に相当する画分から bLF の N 末端付近から C 末端付近まで全長に渡る複数のペプチドが検出された。今後、上で設定した多重反応モニタリングを行い、それぞれの画分に含まれるペプチド断片量を解析することにより、ペプチド断片配列の大まかな構造を決定する予定である。

(5) 乳児消化管発達に伴うカテプシンの発現解析

腸管内での bLF の分解について、部分的には細胞内プロテアーゼが関与していることが示唆された。そこで細胞内プロテアーゼ遺伝子のうち、データベース解析により乳児型腸管で高く発現していると予想される 6 種のカテプシン遺伝子について、2 日齢、10 日齢、30 日齢及び成獣マウスの腸管における発現量を相対定量した。乳児型遺伝子の発現する 2 日齢と成熟型遺伝子の発現が開始する 10 日齢では全てのカテプシンの発現量に有意差は見られなかった。一方離乳後である 30 日齢では、全てのカテプシン遺伝子発現が成獣マウスと同レベルにまで大幅に減少していた。小腸の部位における発現量の差は見られなかった。

(6) 腸上皮細胞による乳由来細胞外小胞の取り込み解析

MFG-E8 は乳中に豊富に存在する膜結合型タンパク質で、貪食細胞による細胞外小胞のファゴサイトーシスを促進する機能が知られている。MFG-E8 が腸上皮細胞による乳細胞外小胞の取り込みを促進するか解析するため、野生型マウスと MFG-E8 ノックアウトマウスの乳汁に含まれる細胞外小胞解析した。細胞外小胞として得られた総タンパク質量は同程度であり、タンパク質量あたりの細胞外小胞マーカー HSC70 タンパク質も同程度であった。そのため MFG-E8、細胞外小胞の産生、分泌には影響しないと考えられる。

セルカルチャーインサート上で培養し機能分化させた Caco-2 細胞に蛍光ラベル細胞外小胞を添加し、細胞への取り込み量を顕微鏡視野あたりの蛍光面積で比較した。その結果、野生型に比べ MFG-E8 を欠く細胞外小胞の方が高い蛍光面積だった。また蛍光標識した細胞外小胞自体を観察したところ、MFG-E8 ノックアウトマウスの細胞外小胞は凝集塊を形成していた。

(7) 離乳期前後の腸内細菌叢および腸管遺伝子発現変遷の解析

乳成分による乳児腸内細菌叢形成解析の礎として、乳児期から離乳期までの腸内細菌叢と腸内細菌叢形成に影響する遺伝子群の発現を解析した。3, 10, 18, 35 日齢の小腸、盲腸、結腸に生息する 6 組の腸内細菌群について 16S rDNA を用いて相対量変化を解析し、主成分分析により解析した。total 16S rDNA 量に対する存在割合を基にした解析では、各日齢のクラスターは全て異なる位置に分布していたが、マウスゲノム量あたりの存在量を基にした解析では、離乳期前後でクラスターの位置が分けられた。このことから、存在割合は各日齢間で変化する一方で、存在量は離乳に伴う変化が主要であると考えられる。またクラスターの大きさに着目すると、存在割合と存在量のどちらも離乳期以降においてクラスターがより広範囲に散在しており、腸内細菌叢の個体差は離乳期に増加する可能性が示唆された。

3, 10, 18, 35 日齢の小腸、盲腸、結腸で発現する粘液層関連遺伝子 3 種、抗菌タンパク質遺伝子 2 種、IgA 産生遺伝子 4 種について相対発現量変化を解析し、主成分分析により解析した。解析対象とした遺伝子について離乳期前後で発現が大きく変化することが示された。またクラスターの大きさに着目すると、完全離乳後においてクラスターがより広範囲に散在しており、遺伝子発現の個体差は離乳後に増加する可能性が示唆され、遺伝子発現の個体差の増加は離乳期以降の腸内細菌叢の個体差に応答する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 OSHIMA Kenzi	4. 巻 57
2. 論文標題 乳に含まれる細胞外小胞と酸性リン脂質結合タンパク質の新たな機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 205 ~ 206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.57.205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鬼頭一平, 伊藤大貴, 宮田真路, 瀬野大太, 松田 幹, 大島健司
2. 発表標題 離乳期マウスにおける腸内細菌叢形成に影響する消化管内タンパク質の発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川千尋, 宮田真路, 瀬野大太, 松田幹, 大島健司
2. 発表標題 乳児腸管におけるラクトフェリンの分解吸収機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第183回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------