

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21277

研究課題名（和文）腸管上皮におけるメカノセンシングとその栄養生理学的役割の解明

研究課題名（英文）Roles of intestinal epithelial mechanosensing in nutritional physiology

研究代表者

鈴木 卓弥（Takuya, Suzuki）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：30526695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、メカノセンサーであるPiezo1の腸管上皮における役割を明らかにすることを目的として、マウスと培養細胞を組み合わせる試験を進めた。腸管上皮特異的Piezo1欠損マウスに食物繊維を摂取させたところ、食物繊維はPiezo1の活性化を介して、抗菌ペプチドReg3発現を誘導することが示された。またこの作用には、Reg3の転写に重要な転写因子STAT3のリン酸化が関わっていることが明らかとなった。またPiezo1欠損マウスでは、腸内細菌叢への影響が確認され、その中で酪酸産生菌の1つであるButyricoccus属が低値を示し、また糞中の酪酸濃度も低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸管上皮のPiezo1は少なくとも腸管の透過性と抗菌ペプチド産生の調節に関わり、腸管ホメオスタシスの維持に関与することが提案された。本研究の知見は、腸管におけるメカノセンシングの新規役割を明らかにするとともに、食品成分の新規的作用様式を見出した。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the role of the mechanosensor Piezo1 in the intestinal epithelium, and was tested in a combination of mice and cultured cells. Dietary fiber fed to mice lacking intestinal epithelial-specific Piezo1 showed that dietary fiber induces antimicrobial peptide Reg3 expression via activation of Piezo1. This effect was also found to be mediated by phosphorylation of STAT3, a transcription factor important for Reg3 transcription. Piezo1-deficient mice also showed effects on the intestinal microflora, including lower levels of Butyricoccus, one of the butyrate-producing bacteria, and lower levels of butyrate in the feces.

研究分野：食品科学

キーワード：Piezo1 腸管バリア メカノセンシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、機械的な刺激(メカニカルストレス)が細胞の振る舞いに影響し、その生理機能を調節することが明らかになってきている。私たちが摂取した食物は、胃内で食物粥となり、一定の物性(粘性や弾性など)をもちながら腸の中を移動する。このとき、特に食物繊維などを多く含む食事は、粘性の高い食物粥を形成し、腸管の上皮細胞に強いメカニカルストレスを与える。しかしながら、腸管によるメカニカルストレスの感知機構(メカノセンシング)とその栄養生理学的役割は、全く謎に包まれている。腸管は、大量の異物が流れ込む場であるため、それらの体内への侵入を防ぐバリアの最前線を担っている。よって、この腸管バリアの制御が崩れると、炎症を基盤とした種々の疾患につながる。私たちは、先行研究において一部の食物繊維が上皮細胞に直接的に感知されてバリア保護作用を示したことから、食物(粥)の物性が腸管機能を調節することを独自に提案している(Hung, Suzuki. Mol Nutr Food Res, 2017)。膜イオンチャネルのPiezoは2010年に見つかったメカノセンサーであり、細胞外からのメカニカルストレスを細胞内シグナルに変換する(Coste et al. Science, 2010)。これらの実験的事実に基づき、このPiezoが腸管内の食物の物性をセンシングし、腸管のバリア制御に重要な役割を持つという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

腸管上皮におけるメカノセンサーPiezo1の役割を、腸管上皮の透過性、抗菌ペプチド産生、腸内細菌叢に着目して探索する。腸管上皮特異的Piezo1欠損マウスとヒト腸管上皮Caco-2細胞を用いて試験を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) Piezo1による腸管上皮透過性への影響

ヒト腸管上皮Caco-2細胞にPiezo1のアゴニストYoda-1、Piezo1を標的としたsiRNAを作用させ、上皮バリア機能を評価した(経上皮電気抵抗値、蛍光デキストラン透過速度)。siRNAによりPiezo1をノックダウンした細胞を用いて、RNAシーケンスによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。また、Piezo1の活性化を確認するため、カルシウム指示薬Fluo8を用いて、細胞内カルシウム濃度のイメージングも実施した。

#### (2) Piezo1による腸管上皮の抗菌ペプチド産生への影響

Villinプロモーター制御下でCre-recombinaseを発現するマウスと、Piezo1-floxマウスを交配させて、腸管上皮特異的にPiezo1を欠損させたマウス(KO)を作成した。野生型(WT)とKOマウスに食物繊維を5日間摂取させ、腸管における遺伝子発現変化をRNAシーケンスにより網羅的に解析した。定量PCRとウェスタンブロット法による遺伝子およびタンパク質発現解析も実施した。Caco-2細胞にYoda-1を作用させ、抗菌ペプチドReg3産生に関わる分子機序を探索した。Caco-2細胞のゲノムDNAを鋳型として、Reg3のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターアッセイ用のプラスミドにクローニングした。このプラスミドを遺伝子導入したCaco-2細胞を用いて、Piezo1によるReg3転写活性への影響を調べた。

#### (3) Piezo1の実験的大腸炎への影響

WTとKOマウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を飲水させ、実験的大腸炎を引き起こした。大腸炎の関連指標として、病態スコア、ヘマトキシリン・エオジン染色、腸管バリア分子、炎症性サイトカインの解析を実施した。

#### (4) Piezo1による腸内細菌叢への影響

WTとKOマウスの糞からゲノムDNAを精製し、16SリボソームRNAを標的とした腸内細菌叢解析を実施した。またLC/MS/MS法により、糞中の有機酸濃度を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) Piezo1による腸管上皮透過性への影響

腸管上皮Caco-2細胞を用いたカルシウムイメージングにより、Piezo1アゴニストが細胞内カルシウム濃度を高めることが示され、腸管上皮細胞でPiezo1が機能していることが確認された。腸管上皮細胞のPiezo1をノックダウンしたところ、腸管上皮バリアの指標である経上皮電気抵抗値が上昇するとともに、デキストラン透過性が低下し、腸管バリア機能の増強が確認された。Piezo1のノックダウンは、定量PCR法により確認した。逆に、Caco-2細胞にPiezo1のアゴニストを作用させたとき、経上皮抵抗値が減少し、腸管透過性が高まった。これら結果より、腸管上皮のPiezo1は腸管バリア調節作用をもつことが示された。さらに、RNAシーケンス解析により、Piezo1ノックダウンは上皮透過性の調節に深く関わる細胞骨格系の複数の遺伝子発現を高めた。この結果より、Piezo1による腸管バリア調節作用には細胞骨格系の遺伝子変動が関わることを提案された。

#### (2) Piezo1による腸管上皮の抗菌ペプチド産生への影響

腸管上皮にメカニカルストレスを強く与えると考えられる食物繊維を、WTおよびKOマウスに摂

取させて、RNA シーケンス解析を実施したところ、小腸の 503 遺伝子が食物繊維の摂取で上昇したが、そのうち 41 遺伝子は KO マウスで上昇しなかった。これらの 41 遺伝子の中に、腸管ホメオスタシスと腸管バリア制御に重要な抗菌ペプチド Reg3 が含まれていた。この Reg3 発現の変動は、定量 PCR 法やウェスタンブロット法によっても確認された。さらに Reg3 発現に重要な STAT3 のリン酸化をウェスタンブロット法により調べたところ、Reg3 発現と STAT3 リン酸化のあいだに有意な正の相関が認められた。さらに Caco-2 細胞において、Piezo1 のアゴニスト Yoda-1 は、Reg3 の遺伝子発現、転写活性を高めるとともに、STAT3 のリン酸化を引き起こした。これらの結果から、食物繊維の摂取は、腸管上皮 Piezo1 の活性化を通して、STAT3 のリン酸化を引き起こして、抗菌ペプチド Reg3 を高め、腸管ホメオスタシスの制御に関わることが示された。

#### (3) Piezo1 の実験的大腸炎への影響

WT マウスへの DSS の投与は、血便や下痢、体重減少を引き起こし、大腸炎症状を誘導した。ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた組織学的解析により、DSS 投与は粘膜構造の損傷、クリプトの消失、免疫細胞の浸潤を誘導したことが示された。ウェスタンブロット法により、DSS 投与は大腸上皮のバリア分子 Occludin、Claudin-3 の低下を引き起こした。定量 PCR 解析の結果、DSS 投与は炎症性サイトカイン IL-6 や CXCL2 の遺伝子発現を高めたことが示された。一方で、これらの症状は KO マウスでも、WT マウスと同様に認められた。一連の実験により、腸管上皮 Piezo1 は DSS による実験的大腸炎の症状に影響しないことが示された。

#### (4) Piezo1 による腸内細菌叢への影響

Piezo1 欠損マウスの腸内細菌叢を調べたところ、顕著な影響は確認されなかったが、Piezo1 欠損マウスの腸内細菌叢では *Oscillospira* 属と *Butyricoccus* 属の占有率が低かった。また LC/MS/MS 解析により、KO マウスの糞中では、有機酸の 1 つである n-酪酸が WT マウスよりも低いことが示された。

一連の研究を通して、腸管上皮 Piezo1 は、腸管上皮の透過性、抗菌ペプチド産生、腸内細菌の制御に関わることが提案された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Dina Mustika Rini, Tomoki Yasui, Yoshinari Yamamoto, Takuya Suzuki
2. 発表標題 Roles of mechanosensitive ion channel Piezo1 in the dietary fiber-mediated Reg3 expression in the intestine of mice
3. 学会等名 The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安居朋紀, Dina Mustika Rini, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 食物繊維サイリウムの摂取は、小腸上皮のメカノセンサー Piezo1を介して抗菌ペプチドReg3の発現を誘導する
3. 学会等名 日本食物繊維学会
4. 発表年 2022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
---------	---------