

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07948

研究課題名(和文) 味覚受容体を介した腸管恒常性維持機構の総合理解

研究課題名(英文) Integrated understanding of taste receptor-mediated intestinal homeostasis mechanisms

研究代表者

藤原 靖弘 (Fujiwara, Yasuhiro)

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40285292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮特異的Tas1r3欠損マウス(Tas1r3^{-/-} IEC)と対照マウス(WT)を高脂肪高コレステロール食(HFCD)で8週間飼育し、肝疾患を評価した。Tas1r3^{-/-} IEC HFCD群は脂肪滴沈着や中性脂肪(TG)含有量がWT HFCD群より低く、CYP2E1およびAlox15 mRNAの発現も低かった。また、腸炎モデルでは、DSS誘発大腸炎で差はなかったが、インドメタシン誘発小腸炎でTas1r3^{-/-} IEC群はWT群より炎症が軽度で、炎症性サイトカインの発現も低かった。本研究結果から、味覚受容体が代謝性疾患や腸炎の新規治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管上皮特異的な味覚受容体(Tas1r3)欠損マウスを用いた基礎的研究により、味覚受容体の代謝異常関連疾患における役割の理解や、また、薬剤誘発腸炎マウスモデルにおける味覚受容体の役割についても新規知見が得られた。糖質や各種アミノ酸の味覚受容体を介した代謝異常関連疾患や炎症性腸疾患への新規治療薬の探索につながる研究成果を得られた。また、人工甘味料の肝疾患・腸疾患への影響の理解にもつながる結果であった。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelium-specific Tas1r3 knockout mice (Tas1r3^{-/-} IEC) and control mice (WT) were fed a high-fat, high-cholesterol diet (HFCD) for 8 weeks to evaluate liver disease. The Tas1r3^{-/-} IEC HFCD group showed lower lipid droplet deposition and triglyceride (TG) content than the WT HFCD group, as well as lower expression levels of CYP2E1 and Alox15 mRNA. Additionally, in the colitis model, there was no difference in DSS-induced colitis, but in the indomethacin-induced enteritis model, the Tas1r3^{-/-} IEC group showed milder histological inflammation and lower expression of inflammatory cytokines compared to the WT group. These results suggest that taste receptors may be a potential new therapeutic target for metabolic diseases and enteritis.

研究分野：味覚受容体

キーワード：味覚受容体 脂肪肝モデル 薬剤性腸炎モデル

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞のバリア機能破綻と腸管炎症

小腸はわずか一層の消化管上皮を隔てて外界と接しており、腸管上皮細胞は消化吸収という栄養素の取り込み機能の他に、外来食事抗原や腸内細菌叢からのバリア機能や、種々の受容体などを介した情報伝達機能を有することがわかっている。腸管粘膜のバリア機能には、ムチンを主成分とする粘液、免疫グロブリンA、Reg3やdefensinなどの抗菌ペプチドといった分泌型バリア機構だけでなく、腸管上皮細胞間のtight junctionによる物質透過性の制御が構造的バリア機構として知られている。このtight junctionは膜貫通型蛋白質のOccludinやClaudin、そしてZO蛋白質などの細胞内裏打ち蛋白質によって構成され、その発現や分布はTNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカイン、腸内細菌叢やその代謝産物によって変化し、腸管透過性に影響することがバリア機能の破綻へとつながる (Ulluwishewa D et al, J Nutr. 2011, Bhat AA et al, Front Physiol. 2019)。このようなtight junctionの変性によるバリア機能破綻は、炎症性腸疾患、セリアック病、過敏性腸症候群などの種々の腸疾患の病態に関与することが、基礎的・臨床的研究から明らかになりつつある (Chelakkot C et al, Exp Mol Med. 2018)。

消化管味覚受容体と腸管バリア機能

Tas1Rファミリー (Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3)はG蛋白質共役型受容体 (GPCR)の味覚受容体であり、Tas1r2/Tas1r3の複合体が糖やグリシンなどの甘味を、Tas1r1/Tas1r3の複合体がグルタミンなどのうま味を感知し、主に舌の味蕾に存在する。最近の研究結果から、これら味覚受容体は様々な細胞で発現していることが明らかとなり、腸管においては、十二指腸・小腸・大腸の内分泌細胞でその発現が確認されている (Dyer J et al, Biochem Soc Trans. 2005, Margolskee RF et al, PNAS 2007)。味蕾細胞におけるTas1Rの役割は味覚神経への情報伝達であるのに対し、小腸内分泌細胞におけるTas1Rの役割は、内分泌細胞からのGLP-1 (glucagon like peptide-1)やGIP (glucose-dependent insulintrophic peptide)の放出を誘導し、腸管上皮からの糖吸収を促進する (Margolskee RF et al, PNAS 2007)。さらにTas1r3欠損マウスでは小腸Occludinの発現が低下し、腸管透過性が亢進することも報告されており (Xiao W et al, FASEB. 2014)、腸管バリア機能の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。実際、プラセボ対照試験でグルタミンの過敏性腸症候群への有効性についての報告も近年なされた (Zhou Q et al, Gut 2019)。

2. 研究の目的

上記背景で述べたように、腸炎や腸炎関連腫瘍形成・癌進展に味覚受容体が関連している可能性が考えられるが、まだその直接的影響やその受容体を介した治療に結びつく基礎的研究の報告はない。味覚受容体を介した疾患理解の研究において、味覚変化によって生じる摂食行動変化が腸内細菌叢・体重低下・腸炎や担癌状態悪化を誘発しうることを考慮する必要があるが、これまでの報告は全身性Tas1Rノックアウトマウスの解析にとどまる。本申請研究では、腸管上皮特異的Tas1r3欠損マウスを用いた基礎的研究と、ヒト検体におけるTAS1R発現を解析する橋渡し研究を下記の如く計画し、味覚受容体の腸炎・代謝性疾患における役割の理解や、糖質や各種アミノ酸の味覚受容体を介した腸炎や肝疾患への影響の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

腸炎モデル解析

小腸上皮特異的Tas1r3欠損マウス ($Tas1r3^{fl/fl}; Villin-cre^{Tg/-} (Tas1r3^{\Delta IEC})$)と対照コントロールマウス ($Tas1r3^{fl/fl}; Villin-cre^{-/-} (Tas1r3^{fl/fl})$)の表現型を比較検討する。

(1) 体重変化と下痢・血便の程度を経時的に観察し肉眼的粘膜傷害の有無、組織学的炎症の程度や絨毛構造変化の評価を行う。

(2) 腸管組織から抽出したmRNA・蛋白における炎症関連分子や上皮傷害修復関連分子などの発現をqRT-PCR、Western blot、ELISA法等の分子生物学的手法で評価する。

(3) $Tas1r3^{\Delta IEC}$ マウスを用いて、薬剤誘発モデル (インドメタシン/DSS) を作製し、上記 (1)の実験同様の評価方法で対照マウスとの比較検討を行う。

脂肪肝炎モデル解析

小腸上皮特異的 *Tas1r3* 欠損マウス (*Tas1r3^{fl/fl}; Villin-cre^{Tg/-} (Tas1r3^{ΔIEC)}*) と対照コントロールマウス (*Tas1r3^{fl/fl}; Villin-cre^{-/-} (Tas1r3^{fl/fl})*) をそれぞれ通常食飼育群と High-fat+high cholesterol+high fructose (HFCD) 食飼育群に分類し、下記項目について解析する。

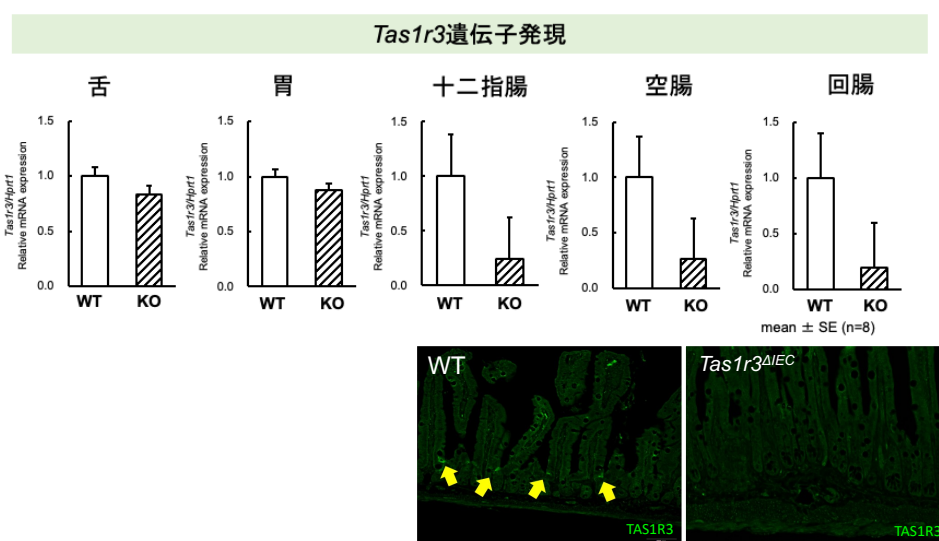
(1) 肝臓脂質分析…肝臓を凍結乾燥後に粉砕化しトリグリセリド、総コレステロール濃度を酵素法にて測定する。また、血漿中のトリグリセリド、総コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度を測定する。

(2) NAFLD/NASH 進展評価…血漿中 AST 値、ALT 値を測定し肝組織における炎症の程度を評価する。また、肝組織を HE 染色にて NAFLD activity score (NAS) を用いて評価する。*Tgfb1* mRNA、*Colla1* mRNA、*Acta2* mRNA の発現を real time PCR 法を用いて検討する。

4. 研究成果

腸管上皮特異的 *Tas1r3* 欠損の確認

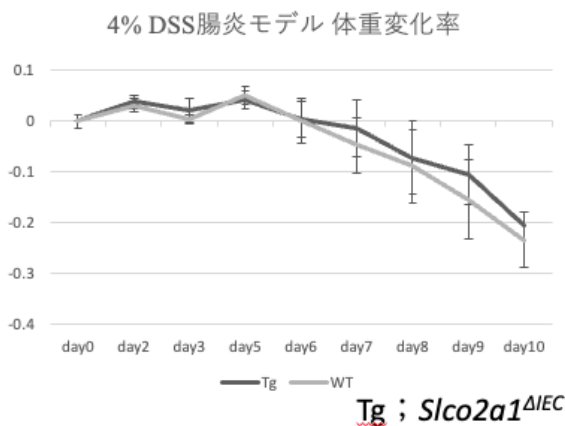
Tas1r3 mRNA を Real-time RT-PCR 法で定量的に、免疫染色で局在について発現を検討し、象徴で発現欠損していることを確認した。



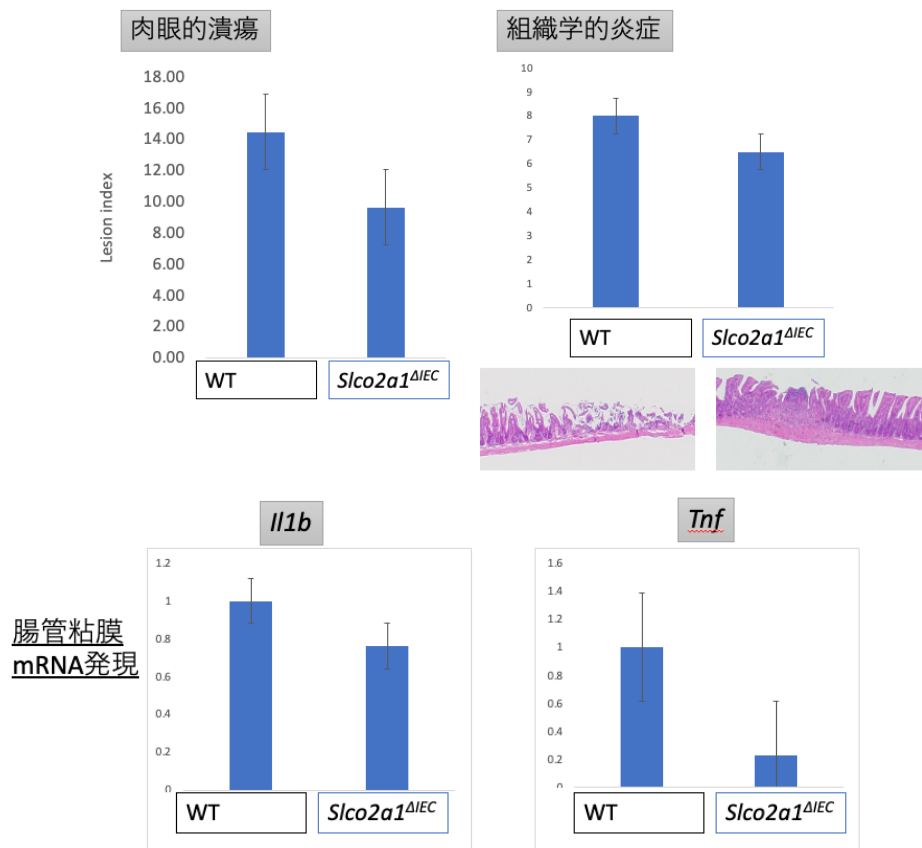
マウス腸炎モデルにおける腸管 TAS1R3 の役割の検討

腸管上皮特異的 *Tas1r3* 欠損マウス (*Tas1r3^{ΔIEC)}* の腸炎の表現型を評価したが、自然発症小腸炎・大腸炎は認めなかった。

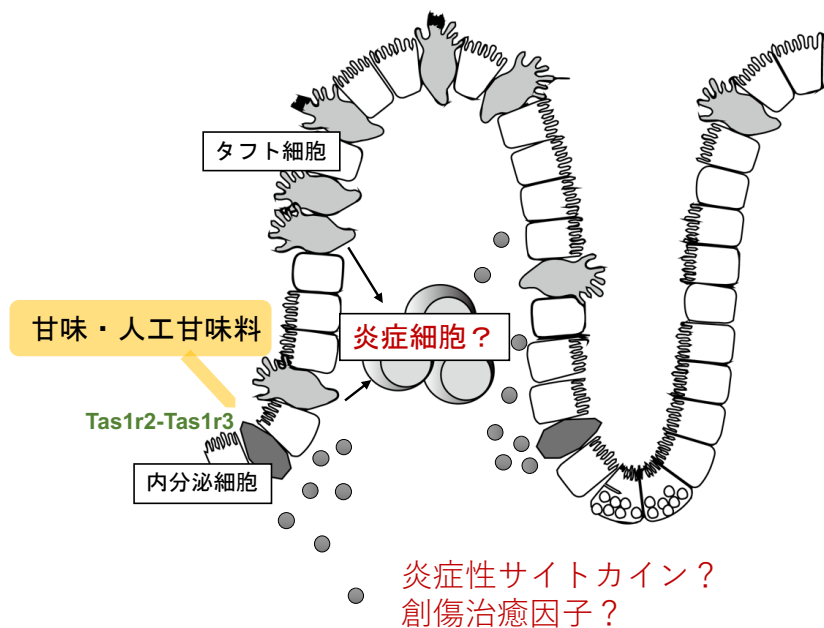
また、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)腸炎モデルでは *Slco2a1^{ΔIEC)}* と WT の間で、表現型に差を認めなかった。



一方、インドメタシン誘発小腸炎モデルでは、WT に比較して *Tas1r3^{ΔIEC}* の方が、小腸炎の組織学的炎症が軽度である傾向と、炎症性サイトカイン発現が低値である傾向を認めた。

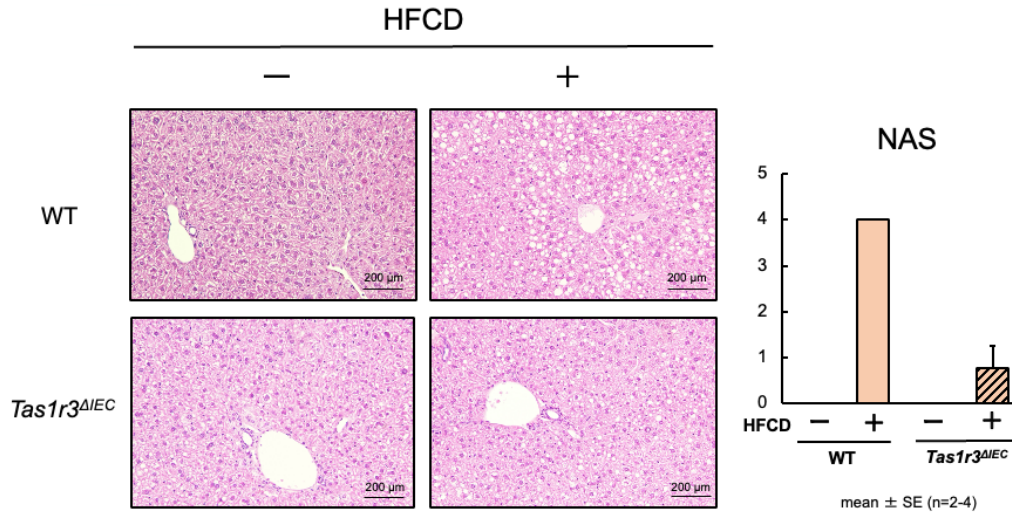


今後は、TAS1R3 のアゴニスト/アンタゴニスト投与の影響を評価し、新規治療ターゲットの発見を目指す。



マウス代謝性脂肪性肝疾患モデルにおける腸管 TAS1R3 の役割の検討

脂肪肝進展の評価は、HE 染色による NAFLD activity score (NAS) にて肝組織の炎症や線維化の程度を算出し、WT HFCD 群に比して *Tas1r3^{ΔIEC}* HFCD 群では脂肪滴の沈着の減少を認め、TG 含有量も低値であった。



また、WT control 群と比較し WT HFCD 群において発現が増加した *CYP2E1* および *Alox15* mRNA の発現が、*Tas1r3^{ΔIEC}* HFCD 群で低下傾向であった。

さらにこれら表現型メカニズム解析のために、HFCD 食で飼育した WT マウスと *Tas1r3^{ΔIEC}* マウスの小腸粘膜トランスクリプトーム解析を行った。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて、分子機能の遺伝子の発現変動を解析したところ、グルタチオン・トランスフェラーゼ (GST) 活性に関連する遺伝子発現が *Tas1r3^{ΔIEC}* マウスの小腸粘膜で誘導されていることが明らかとなった。

	GS DETAILS	ES	NES	FWER p-val
1	GLUTATHIONE_TRANSFERASE_ACTIVITY	28	0.73	0
2	GLUTATHIONE_BINDING	16	0.83	0
3	TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ALKYL_OR_ARYL_OTHER_THAN_METHYL_GROUPS	59	0.59	0
4	MITOGEN_ACTIVATED_PROTEIN_KINASE_BINDING	31	0.61	0.008
5	WW_DOMAIN_BINDING	23	0.67	0.008

個々の GST family の mRNA の発現を確認すると、*Gsta2*, *Gst13*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3*, *Gstm4*, *Gstm5*, *Gstm6*, *Gstm7*, *Gstt1*, *Gstt3*などが、WT マウスに比較して *Tas1r3^{ΔIEC}* マウスで発現増加していることが明らかとなった。以上結果から、*Tas1r3^{ΔIEC}* マウスでは炎症性サイトカインの抑制や GST 活性の増加が、脂肪細胞・肝細胞などに作用し、体重増加が抑制されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro) (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	細見 周平 (Hosomi Shuhei) (60554938)	大阪公立大学・大学院医学研究科・講師 (24405)	

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