

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：22590077

研究課題名（和文） 消化管障害の分子メカニズムとグルタミンによる保護機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of protective effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction

研究代表者

赤木 玲子（AKAGI REIKO）

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：50150967

研究成果の概要（和文）：本研究により、ヒト結腸癌由来培養細胞(Caco-2)へのエタノール添加はバリア機能を可逆的に障害し、その際誘導される熱ショックタンパク質（HSP70）は熱ショック転写因子（HSF）1 のリン酸化と核への移行によるものであることが明らかとなった。熱ショックにより誘導された HSP70 はエタノール添加によるバリア機能障害からの回復を促進したことから、HSP70 はバリア機能を保護する役割を果たす可能性が考えられる。消化管保護効果が知られているグルタミンはエタノール添加による障害時の HSF1 のリン酸化を促進し、HSP70 の誘導を増強することにより、Caco-2 のバリア機能の回復を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the protective effect of glutamine on barrier dysfunction induced by ethanol, by using human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2). Our results show that addition of glutamine to culture medium significantly improved the disruption of integrity caused by ethanol, which was associated with increased expression of heat shock protein 70 (Hsp70). Ethanol exposure moderately activates heat shock factor 1 (HSF1), which was characterized by increased DNA-binding activity and phosphorylation status of HSF1. Remarkably, glutamine treatment enhanced ethanol-mediated expression of Hsp70 and activation of HSF1. Up-regulation of Hsp70 by pretreatment with heat stress also promoted recovery from the ethanol-induced barrier dysfunction. Taken together, these observations indicate that glutamine protects the intestinal barrier function in Caco-2 cells, in part by modulating HSF1-mediated Hsp70 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

消化管は、細菌などの外来異物と常に接しており、感染防御と免疫寛容という、相反する免疫システム系を制御することによって

恒常性を維持している特殊な臓器である。このバランスが壊れると炎症性腸疾患や、アレルギー、敗血症など重篤な疾病を発症する。消化管特異的な免疫反応については、その分

子機構が解明されつつあるが、温熱ストレスや酸化ストレスなどに対するストレス応答との関連については、不明な点が多く残されている。

研究代表者の赤木は、種々な臓器障害において、ヘム分解系酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 の誘導が細胞保護的に機能することを明らかにしてきた。これらの研究過程で、敗血症モデルラットの消化管障害の程度と HO-1 誘導強度が逆相関関係にあることを見出し、炎症性腸疾患におけるグルタミン (Gln) の保護効果が、腸管上皮細胞特異的な HO-1 誘導を介するものであることを報告した。さらに、しかしながら、Gln による HO-1 誘導、さらには HO-1 による腸管上皮細胞保護効果のメカニズムについては依然として不明である。

研究分担者の井上は、2000 年より熱ショック転写因子 (HSF) の生理機能を明らかにする目的で HSF1 の欠損マウスを作製してその表現系を解析し、正常な個体の発生や維持に必須の遺伝子であるのみならず、発熱・炎症に関わるサイトカイン遺伝子の発現制御にも関与していることを報告した。

以上の背景のもと、私たちは 2008 年に安田女子大学に着任して以来、「消化管のストレス応答と生体防御機構」を分子レベルで明らかにすることを目的として共同研究を始めるに至った。

2. 研究の目的

腸管上皮細胞は腸管内の有害物質に対するバリアを形成している。私たちは、ヒト消化管培養細胞 Caco-2 にエタノール (EtOH) を添加することによりバリア機能の崩壊を伴う消化管障害モデルを作成した。消化管保護薬として臨床でも用いられる Gln を培地中に添加すると、EtOH によるバリア機能障害は有意に改善された。本研究では Gln の消化管保護作用のメカニズムを明らかにする目的で、種々なストレス負荷が Caco-2 のバリア機能に及ぼす影響を詳細に調べ、その障害の度合いと熱ショックタンパク質 (HSP) 動態との相互関係を調べるために、HSF1 の活性化に着目して検討した。

3. 研究の方法

24 穴トランスウエル上 DMEM 培地中で培養 7 日以後の Caco-2 を用い、経上皮電気抵抗 ; transepithelial electric resistance (TER) および FITC-イヌリン (分子量約 5,000) の基底膜側から管腔側への透過率を指標としてバリア機能を検討した。一方、6 穴トランスウエル上で培養した Caco-2 細胞より抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロット法により HSF1、HSP70、HO-1 を検出した。同様にして培養した Caco-2 から抽出した核

タンパク質を用いて、ビオチン標識した熱ショックエレメント (HSE) をプローブとして gel shift assay を行った。Caco-2 に対するストレスとして、熱ショック負荷 (42°C、1 時間)、もしくは EtOH (6%、2 時間) を培地中に添加した。Gln は 4mM になるように培地中に添加した。

4. 研究成果

(1) Caco-2 培養液に EtOH 処理 (5%~8%、2 時間) すると、濃度依存的に TER の低下とイヌリン透過性亢進が認められた。TER とイヌリン透過性を比較すると、傾向は同じくするが TER の方が EtOH の低濃度での応答性が鋭敏であったことから、TER をバリア機能の指標とすることにした。

(2) EtOH 処理 (6%、2 時間) 24 時間後の Caco-2 において TER を測定したところ、Gln 非添加培地中では対照の 50% に低下していたが、4mM Gln 添加により 80% にまで回復した。EtOH 処理 (6%~10%、2 時間) 24 時間後の TER は EtOH の濃度依存的に低下したが、いずれの濃度においても Gln 添加により TER の低下は抑制された。(図 1)

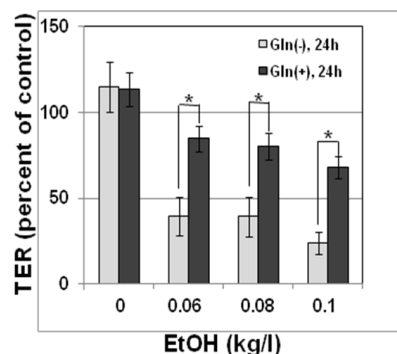
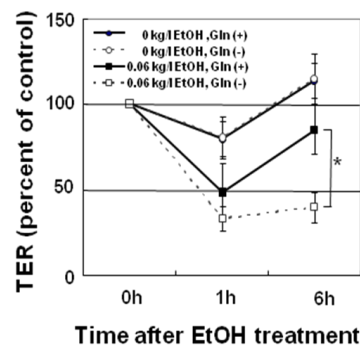


図1 EtOH処理によるTER低下とGln添加の影響

(3) EtOH 処理 (6%、2 時間) により細胞内では HSF1 のリン酸化を伴う HSP70 の誘導が認められ、その程度は熱ショック負荷 (42°C、1 時間) と同等であった。一方、HO-1 は熱ショック負荷や EtOH 処理では発現誘導されな

かったが、ヘミンにより強く誘導された。ヘミン添加は HSF1 や HSP70 の発現には影響しなかったことから、EtOH 処理とは異なるメカニズムによるストレス負荷である可能性が考えられる。Caco-2 を EtOH 処理することにより HSF1 の活性化（リン酸化）とともに核内への移行が認められ、その効果は培地中に Gln を添加することにより増加した。（図 2）

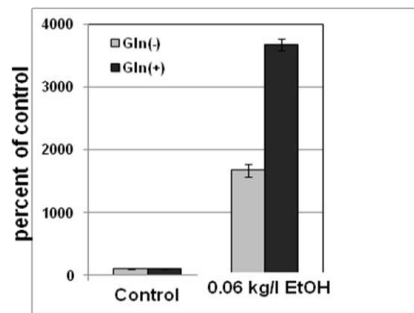
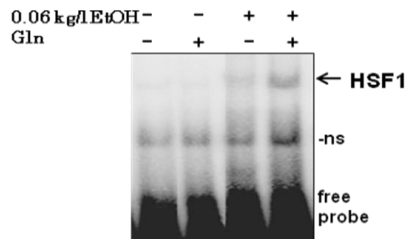
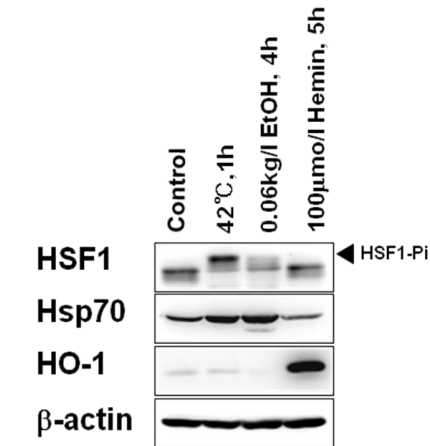


図2 EtOH処理によるHSF1活性化と核内への移行に及ぼすGln添加の影響

(4) Gln 存在下に培養した Caco-2 に対して熱ショック（42°C、1 時間）負荷 6 時間後に EtOH 処理（6%、2 時間）を行ったところ、熱ショックのみではバリア機能に影響を及ぼさなかったが、EtOH 添加による TER 低下からの回復の顕著な早期化が認められた。熱ショック負荷後に EtOH 処理すると 6 時間後にはバリア機能は対照レベルに回復したが、その時の細胞内には HSP70 の強い誘導が認められた。

(図 3)

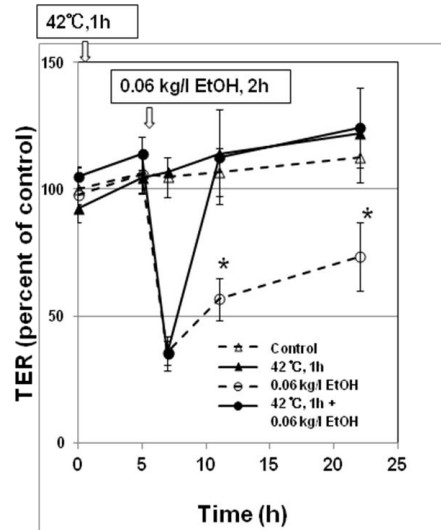


図3 熱ショックがEtOH処理によるTER低下に及ぼす影響

以上の結果から、Caco-2 への EtOH 添加はバリア機能を可逆的に障害し、その際誘導される HSP70 は HSF1 のリン酸化と核への移行によるものであることが明らかとなった。熱ショックにより誘導された HSP70 は EtOH 添加によるバリア機能障害からの回復を促進したことから、HSP70 はバリア機能を保護する役割を果たす可能性が考えられる。消化管保護効果が知られている Gln は EtOH 添加による障害時の HSF1 のリン酸化を促進し、HSP70 の誘導を増強することにより、Caco-2 細胞のバリア機能の回復を促進する可能性が示唆された。

本研究助成を受けた過去3年間で、Caco-2 における種々なストレス負荷によるストレス関連因子の変動を検討した。その過程で、cDNA マイクロアレイ解析により熱ショックにより small Maf が誘導されることが新たに分かった。small Maf は MARE 配列を介して HO-1 の転写を制御することが知られている。HSP32 としても知られる HO-1 の熱ショック応答性には不明な点が多く残されていたが、熱ショック負荷により誘導された small Maf は MARE 配列を介して HO-1 の転写を制御する一方で、同時に活性化される HSF1 もしくは HSP70 は small Maf と相互作用することにより、HSP 群を絶妙に発現制御している可能性が示唆された。

以上の研究成果を踏まえ、消化管における熱ショック応答の詳細を明らかにする目的で、今後は HSP70、HO-1 等の発現制御メカニズムを分子レベルで詳細に追究し、それらに及ぼす Gln の影響について検討したいと考えている。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Reiko Akagi, Michiko Ohno, Kiminori Matsubara, Mitsuaki Fujimoto, Akira Nakai and Sachiye Inouye, Glutamine protects intestinal barrier function of colon epithelial cells from ethanol by modulating Hsp70 expression, *Pharmacology*, 査読有、Vol. 1, No. 1-2, 2013, 104-111
- ② Sachiye Inouye, Michiko Ohno, Hidetomo Kikuchi and Reiko Akagi, Heat Shock Response in Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cells, *J. Yasuda Women's University*, 査読有、Vol. 40, 2012, 383-388
- ③ Tsuyoshi Tahara, Masayoshi Yamamoto, Reiko Akagi, Hideo Harigae and Shigeru Taketani, The low expression allele (IVS3-48C) of the ferrochelatase gene leads to low enzyme activity associated with erythropoietic protoporphyria, *Int J Hematol*, 査読有、Vol. 92, No. 12, 2010, 769-771
- ④ Izumi Yanatori, Mitsuaki Tabuchi, Yasuhiro Kawai, Yumiko Yasui, Reiko Akagi, and Fumio Kishi, Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells, *BMC Cell Biology*, 査読有、Vol. 11, No. 1, 2010, 39-49
- ⑤ Takii R, Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Hayashida N, Ichikawa H, Hai T, Nakai A., Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3, *J Immunol.*, 査読有、Vol. 184, No. 2, 1041-1048
- ⑥ Fujimoto M, Hayashida N, Katoh T, Oshima K, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Inouye S, Takii R, Nakai A., A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock, *Mol Biol Cell.*, 査読有、Vol. 21, No. 1, 2010, 106-116

[学会発表] (計 19 件)

- ① 赤木玲子、井上幸江：消化管出血によるバリア機能障害機構 (2013. 5. 31-6. 1) 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会 (徳島)
- ② 井上幸江、藤本充章、中井彰、赤木玲子：

ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現は熱ショック転写因子 1 によって巧妙に調節されている (2012. 12. 13-16) 第 85 回日本生化学会大会 (福岡)

- ③ 谷本愛, 井上幸江, 赤木玲子：ヒト肝癌由来細胞に及ぼす熱ショック応答性におけるグルタミンの効果 (2012. 11. 10-11) 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (松江)
- ④ 井上幸江, 大森智子, 桃谷紗矢香, 坂井原美希, 笹川愛, 赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ 1 の転写制御における熱ショック転写因子のはたらき (2012. 11. 10-11) 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (松江)
- ⑤ 赤木玲子, 平本真菜, 小川浩子, 井上幸江：消化管バリア機能とヘムオキシゲナーゼ誘導との関係 (2012. 11. 10-11) 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (松江)
- ⑥ 赤木玲子, 藤本充章, 中井彰, 井上幸江：Heme Oxygenase-1 の熱ショック転写因子による発現制御機構 (2012. 9. 1-2) 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会 (札幌)
- ⑦ 赤木玲子, 井上幸江, 太野路子, 松原圭典, 藤本充章, 中井彰：グルタミンによる消化管バリア機能保護作用のメカニズム (2012. 5. 18) 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会 (岡山)
- ⑧ 赤木玲子、太野路子、菊地秀与、井上幸江：消化管上皮におけるバリア機能障害メカニズムの解析 (2011. 11. 12-13) 第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (高松)
- ⑨ 赤木玲子、太野路子、菊地秀与、藤本充章、中井彰、井上幸江：熱ショック転写因子 (HSF) による Heme Oxygenase-1 の発現制御 (2011. 11. 4-5) 第 6 回臨床ストレス応答学会 (名古屋)
- ⑩ 井上幸江、太野路子、菊地秀与、藤本充章、中井彰、赤木玲子：熱ショック因子によるヘムオキシゲナーゼ 1 の転写制御 (2011. 9. 21-24) 第 84 回日本生化学会大会 (京都)
- ⑪ 赤木玲子、太野路子、菊地秀与、藤本充章、中井彰、井上幸江：ヘムオキシゲナーゼ 1 の熱ショック転写因子による発現制御 (2011. 8. 26) 第 8 回 Heme Oxygenase 研究フォーラム (京都)
- ⑫ 井上幸江、藤本充章、中井彰、赤木玲子：熱ショック転写因子によるストレスタンパク質ヘムオキシゲナーゼの発現制

- 御 (2011. 5. 13-14) 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 (広島)
- ⑬ 井上幸江、太野路子、藤本充章、中井彰、赤木玲子 : ストレスタンパク質へムオキシゲナーゼの熱ショック転写因子による発現制御 (2011. 3. 28-31) 日本薬学会第 131 年会 (静岡)
- ⑭ 井上幸江、赤木玲子、太野路子、藤本充章、中井彰 : 消化管上皮細胞のエタノール障害とグルタミンによる保護作用 (2010. 12. 7-10) 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
- ⑮ 梁取いずみ、安井ゆみこ、河合康宏、赤木玲子、岸文雄 : へムと非へム鉄の輸送機構の解明 (2010. 9. 11-12) 第 34 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (東京)
- ⑯ Yumiko Yasui, Miho Watanabe, Akina Maruyama, Nobuaki Matsui, Nobuyuki Fukuishi, Reiko Akagi and Masaaki Akagi : Inhibitory effect of carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 on TNF-alpha release from activated-RBL-2H3 cells (2010. 7. 17-23) 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (Copenhagen, Denmark)
- ⑰ 梁取いずみ、安井ゆみこ、河合康宏、赤木玲子、岸文雄 : へムと非へム鉄の輸送と代謝 (2010. 5. 14-15) 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 (山口)
- ⑱ 赤木玲子、太野路子、桂昌司、中井彰、井上幸江 : グルタミンによる消化管保護効果発現のメカニズム (2010. 5. 14-15) 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 (山口)
- ⑲ 赤木玲子、太野路子、桂昌司、中井彰、井上幸江 : 種々なストレス応答における熱ショック転写因子 (HSF) の関与 (2010. 11. 19-20) 第 5 回臨床ストレス応答学会 (徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 玲子 (AKAGI REIKO)
安田女子大学・薬学部・教授
研究者番号 : 50150967

(2) 研究分担者

井上 幸江 (INOUE SACHIYE)
安田女子大学・薬学部・教授
研究者番号 : 60159978