

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591976

研究課題名(和文) アミノ酸制御ミルクと新生マウス人工哺乳システムによるアミノ酸特異的腸管機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of amino acid-signal transduction in the intestinal system, applying a new nipple-bottle feeding system and artificial milk formula for newborn mice.

研究代表者

吉田 和弘 (YOSHIDA, KAZUHIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：10220633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸が独立した腸管細胞増殖因子として機能することを明らかにするため、新生マウス人工哺乳システムにより、アミノ酸制御ミルクを新生マウスに対し投与したところ、グルタミン欠如により高頻度に出血性腸炎が出現した。ラット腸管上皮培養細胞IEC6ではグルタミン欠失に伴って明らかな細胞増殖抑制を認めた。腸管増殖を誘導するグルタミンの欠損が腸管細胞にアポトーシスと腸管出血を引き起こすことから、新たな炎症性腸疾患モデルとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have presented that feeding neonatal mice with glutamine-deleted artificial milk formula induced high incidence of colonic hemorrhage due to the epithelial cell death, applying a new nipple-bottle feeding system for newborn mice. IEC6 rat intestinal epithelial cells cultured with low concentration of glutamine underwent apoptosis. Glutamine deprivation might cause instability of the intestinal epithelial alignment by apoptosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はタンパク質の構成成分としてだけでなく、生体内で独自に重要な役割を担っていると考えられてきたが、現在のところ、腸管機能や消化器疾患への関与は未知の分野となっている。

我々は、特定のアミノ酸が肝細胞増殖に強く関わり、細胞増殖や免疫機能に重要な mTOR を介したシグナルであることを証明し (Shigemitsu K, et al; FEBS Lett. Mar 26; 447 (2-3):303-6, 1999, Shigemitsu K, et al; J Biol Chem. 274(2):1058-65, 1999.)、同じ増殖シグナルが小腸上皮細胞においても重要であることを示してきた (Ban H, Naomoto Y, Yamatsuji T, et al; Int. J. Mol. Med. 13. (4):537-43, 2004.)。

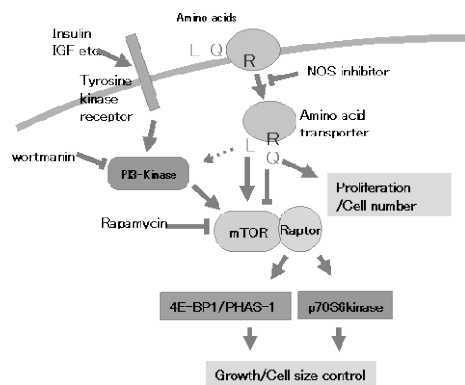


図1. アミノ酸によって制御される mTOR を介した細胞増殖シグナル

(Naomoto Y, Yamatsuji T, et al; Int J Mol Med. 16(2):201-4, 2005.より改変)

さらに、栄養学上においては、腸管細胞増殖に重要な役割を担っていると推定されていたグルタミンがアミノ酸シグナルを上位で制御していることが細胞生物学的手法により証明した。(Nakajo T, Naomoto Y, Yamatsuji T, et al; Biochem Biophys Res Commun. 326(1):174-80, 2005. Naomoto Y, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Int J Mol Med. 16(2):201-4, 2005. 図1)

それによって、アミノ酸は特異的な増殖シグナルが惹起していることが知られるようになったが、そのシグナルが生体内での腸管細胞増殖、あるいは臨床的な腸管免疫機能に対していかなる意義を持つのかを解明することは困難であった一因は以下のことが考えられる。

培養細胞系を用いて証明されたアミノ酸シグナルを具現化できる実験動物モデルが存在しなかったからと考察される。疾患動物モデルとして有用なマウス、あるいはラットを用いることが試みたが、新生時から的人工授乳が技術的に難しく、アミノ酸を付加、ある

いは欠失したミルクを調整する技術開発とあわせて、出生時より調整された人工研究過程であった。

2004年に岡山大学の干場は、新生マウスに出生直後より人工ミルクを哺乳し、完全な人工飼育を行うシステムを確立し報告した。我々は、このシステムを導入することにより、これまで培養細胞系で証明された各アミノ酸の特異的なシグナルが臨床的にいかなる生理的あるいは病理・病態学的変化をもたらすかを解明できると考えた。

## 2. 研究の目的

人工哺乳システムを導入して、アミノ酸制御ミルクを新生マウスに授乳し、その結果、腸管をはじめ各臓器にどのような生理的あるいは病態学的変化をきたすかを解析を行った。各アミノ酸をマウス用人工ミルク中の蛋白の含量に則して調整し、新生マウスに対して7日間授乳したところ、人工調整ミルクでも順調に摂取量が増加し、体重についても増加を認めた。

この手法を用いることにより、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなど従来の手法では達成し得なかったアミノ酸シグナルの選択的ノックアウトモデルをデザインし、具体的に作成することが可能となった。最近まで栄養素としてしか評価されていなかった各アミノ酸が持つ細胞生物学的機能を解明する研究が可能になると考えられる。

そこで、各種アミノ酸、具体的にはわれわれの先行研究にて明らかになった腸管増殖因子として働きうるロイシン、アルギニンおよびグルタミンを選択的に欠如あるいは付加したアミノ酸ミルクを調整、人工哺乳を行い、各種アミノ酸を欠失した状態での新生マウスにいかなる生理学的・病理学的変化が生じるのかを解析する。

腸管や肝臓といった消化器だけでなく、免疫担当臓器や神経系組織を採取し、免疫組織学的染色や電子顕微鏡も用いた病理学的解析を行い、細胞増殖、細胞周期や細胞死に関わる分子生物学的解析を加え、アミノ酸シグナルがいかなる生体出力を示すのかを解明する。

## 3. 研究の方法

各種アミノ酸欠失あるいは付加が生体に及ぼす影響を解明するため、新生マウス人工哺乳システムを導入し各種アミノ酸制御ミルクを新生マウスに与え、生体に引き起こされる変化を病理学的および分子細胞学的手法を用いて解析する。

腸管に対するアミノ酸シグナル伝達系を解析する培養細胞として、ラット胎児より確立された腸管上皮細胞である IEC6 および IEC1

8を用いて、アミノ酸から mTOR を介する細胞増殖シグナルの解析・検討を行い、各アミノ酸のシグナル伝達分子としての意義を解明する。

#### 4. 研究成果

1) アミノ酸制御ミルクが新生マウスに与える影響の評価:

新生マウス人工哺乳システムを用いて、各種アミノ酸のうち、腸管細胞増殖因子であることが判明したロイシン、アルギニンおよびグルタミンを選択的に欠如、あるいは付加したアミノ酸制御ミルクを調整して新生マウスに対し投与した(図2)。

グルタミンが欠如したミルクを与えられたマウスでは、通常のミルクを与えられた群と比較して高頻度に出血性腸炎が出現した。グルタミンが欠如したミルクを与えられたマウスの腸管において、病理学的に著明な炎症細胞の浸潤と腸管上皮構造の破壊が認められた。そして、細胞増殖の指標である BrdUの取り込み阻害、および Ki-67の発現抑制が各々の免疫染色によって判明し、アポトーシスの指標である Cleaved Caspase-3の強い発現が認められた。電子顕微鏡による解析結果においても、アポトーシスの増強が示された。

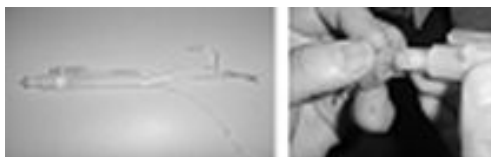


図2. 新生マウス人工哺乳システムを用いたアミノ酸制御ミルクの投与

2) 腸管上皮培養細胞におけるアミノ酸増殖シグナルの解析:

小腸腸管上皮培養細胞 IEC6 においては、グルタミンの欠失によって、明らかなる増殖抑制を認めた。IEC6の増殖抑制機構を解明するため、フローサイトメトリーを行ったところ、グルタミン欠失による G1G2 期の変化は認められなかったが、sub-G0 期の細胞数増加を認めた。ウエスタン法により、グルタミンの欠失によって引き起こされる Cleaved Caspase-3の増加が示され、アポトーシスの関与が示唆された。

3) 本研究の意義および重要性:

本研究はこれまで単なるひとつのタンパク質構成成分として理解されてきたアミノ酸が、独立した腸管細胞増殖因子として確実に

機能していることを明らかにすることができた。

また、腸管細胞の増殖を誘導するアミノ酸であるグルタミンの欠損が腸管細胞にアポトーシスを誘導し、ひいては腸管出血を引き起こす原因と考えられることから、新たな炎症性腸疾患モデルとなり得る可能性を発見できた。

これまでの結果に、さらなる文献的考察を加え、学会発表、誌上発表投稿、掲載予定である。

#### 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1件)

1) Kazuhiro YOSHIDA, Yoshio NAOMOTO, To moki YAMATSUJI, Kaori SHIGEMITSU, Munenori TAKAOKA, Takuya FUKAZAWA, Naomasa I SHIDA, Jiro HAYASHI, Yohko HIRABAYASHI, Astushi URAKAMI, Kazutaka NAKASHIMA, I chiro MORITA and Minoru HAISA, Amino acid signaling in the intestine: The roles of glutamine, leucine and arginine. *K awasaki Medical Journal*, 2014 掲載予定

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 和弘 (YOSHIDA KAZUHIRO)

川崎医科大学医学部・講師  
研究者番号：10220633

(2)研究分担者

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)

川崎医科大学医学部・准教授  
研究者番号：40379730

(3)連携研究者

無