

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790298

研究課題名(和文)スフィンゴ糖脂質による腸管上皮細胞の消化吸収機能の制御メカニズム

研究課題名(英文)Roles of glycosphingolipids in enterocytes for lipid absorption

研究代表者

田島 織絵(TAJIMA, Orië)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：10362237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GM2/GD2合成酵素遺伝子およびGD3合成酵素遺伝子欠損(DKO)マウスの腸管上皮細胞では成体マウスで主要とされるGA1を欠損し、GM3やLacCer、スルファチドの発現が認められた。また、DKOマウスではコレステロールやGalectin-4などの脂質ミクロドメイン(ラフト)集積分子がラフトから乖離していた。さらにDKOマウスでは脂肪酸輸送体のラフト局在が変化し、脂肪酸吸収能が低下していた。これらの結果から、正常なラフトの構造や機能を保持するために適切なGSL組成が必須であり、GSLsがラフトを介した脂質吸収に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Double knockout (DKO) mice of GM2/GD2 synthase and GD3 synthase lacked all ganglio-series gangliosides including asialo-series, except GM3, despite the fact that composition of glycosphingolipids (GSLs) in small intestine of wild type (WT) mice was converted from GM3, GM1 and GD1a to GA1 during suckling-to-weanling transition. Analysis of fractionated membrane extracts revealed that fundamental molecules including cholesterol and galectin-4 dispersed from the GEM/rafts in the DKO mice. As for floating patterns of lipid-binding proteins, levels of raft-associated FAT/CD36 and FATP4 were significantly decreased in the DKO mice, while these molecules appeared in both raft and non-raft fractions in the wild type mice. Isolated enterocytes from the DKO mice showed significantly reduced fatty acid uptake. These results strongly suggested that proper composition of GSL is critical to regulate architecture and functions of GEM/rafts, and fatty acid uptake via these microdomains.

研究分野：生化学

キーワード：ガングリオシド 脂肪酸吸収 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質 (GSLs) は細胞膜脂質ミクロドメイン (ラフト) の主要構成成分であり、細胞膜を介したシグナル伝達調節に深く関与している。多くの研究から GSLs はラフトを介して種々の細胞機能を調節することが報告されており、糖鎖変異が癌や神経疾患、感染症などの成因に関与することも明らかとなってきた。これらの事実は、正常な生体機能を発揮する上で質的・量的に適切な糖鎖構造を保持することが重要であることを強く示唆している。一方、マウス腸管上皮細胞においては、主要 GSLs が離乳期を境に GM3 から GA1 へとダイナミックに変換されることが明らかにされているが、その生理的意義は不明である。

小腸吸収性上皮細胞には種々の輸送体タンパク質が発現し栄養素の選択的な吸収が行なわれている。脂肪細胞や筋細胞においてはこれまで様々な研究によりラフトを介した栄養素輸送体の作用メカニズムが明らかにされてきたが、腸管上皮細胞のラフト機能に関する知見はあまり多くない。近年、栄養素の細胞内取り込みにおいてラフト構造の重要性が示唆されており、ラフトを介した消化・吸収機能の詳細な分子メカニズムや GSLs によるラフト機能調節メカニズムを解明していくことが喫緊の課題であると考えられた。

2. 研究の目的

我々が解析を進めてきた GM2/GD2 合成酵素遺伝子および GD3 合成酵素遺伝子のダブルノックアウト (DKO) マウスでは種々の神経症状を呈することが確認され、糖脂質の変異がラフトの構造崩壊および機能障害を惹起することが示唆された。さらに、本 DKO マウスでは、特に離乳期直後において著しい発育不良を示し、栄養障害に起因すると思われる突然死を頻発する。本 DKO マウスでは酸性スフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) として最も単純な構造である GM3 までしか合成できず、成体マウスの小腸で主要とされる GA1 を欠損していることが予測される。糖鎖改変マウスは脂質ラフトを介した腸管上皮細胞機能を解析する上で極めて有用な生体モデルであり、新たな消化吸收メカニズムの検討が可能である。したがって、本研究では、糖鎖改変マウスを用いて腸管上皮細胞機能調節における GSLs の具体的な役割とその作用メカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) GM2/GD2 合成酵素遺伝子および GD3 合成酵素遺伝子欠損に伴う小腸の GSL 組成とラフト構成分子の変化について以下の検討を行なった。

離乳前 (2 週齢) および離乳後 (4 週齢) の DKO マウス小腸から GSLs を抽出し、TLC 法を用いて発現 GSLs の変化を野生型 (WT) マ

ウスと比較した。

小腸から絨毛部 (成熟上皮細胞) crypt 部 (未分化細胞およびパネート細胞) および間葉系細胞層を分離し、それぞれの細胞層からショ糖密度勾配法により脂質ラフト分画を調製した。調整した脂質ラフト分画を用いて、各分画におけるコレステロール濃度やラフト構成分子群の floating パターンを検討した。

(2) DKO マウス小腸における栄養素輸送体の発現変化と脂肪酸取り込み能について検討した。

離乳後 (4 週齢) のマウスを用いて十二指腸、空腸、および回腸から絨毛部腸管上皮細胞を単離し、グルコース輸送体 (GLUT、SGLT)、アミノ酸輸送体 (SLC) のサブタイプや脂肪酸輸送体 (FABP、FAT、FATP) およびコレステロール輸送体 (SRB1) などの発現変化をリアルタイム RT-PCR 法により検討した。また、離乳前 (2 週齢) のマウスを用いて同様の検討を行なった。

腸管上皮細胞から調整した脂質ラフト分画を用いて、脂肪酸輸送体の floating パターンを検討した。

空腸から単離した腸管上皮細胞に蛍光標識した脂肪酸アナログを添加し、脂肪酸の取り込み能を WT マウスと DKO マウスで比較検討した。

離乳直後の若齢マウス (4 週齢) を用いて 15 週間の高脂肪食負荷実験を行ない、GSLs 変異の影響を検討した。

(3) DKO マウス小腸における組織形態学的異常について HE 染色により検討した。また、構成上皮細胞に特異的な染色法 (マーカー分子抗体を用いた免疫染色、ムコ多糖染色など) を用いて、それぞれの細胞 (吸収性上皮細胞、腸管内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞) の数や分布の異常の有無についても検討を加えた。

(4) crypt 部未分化細胞における GSLs 変異の影響を検討した。

crypt に焦点をあて、幹細胞の増殖状態 (増殖マーカー Ki-67 抗体による免疫染色) やアポトーシス状態 (TUNEL 染色) について組織形態学的に検討した。

小腸上皮より crypt 部の細胞を分離採取し、ウエスタンブロッティングおよびリアルタイム RT-PCR 法を用いて増殖関連分子の発現レベルを WT マウスと DKO マウスで比較検討した。

4. 研究成果

(1) DKO マウス小腸における GSLs 発現パターンとラフト構成分子の変化

小腸における GSLs の発現を TLC 法により解析した結果、先行報告と同様に、WT マウスでは離乳に伴って主要 GSLs が酸性 GSLs (GM3、

GM1、GD1a) から GA1 や fucosyl-GA1 に移行することが確認された。一方、DKO マウスでは GM2/GD2 合成酵素遺伝子と GD3 合成酵素遺伝子の欠損に伴って GM3 以降の酸性 GSLs を欠失していたが、離乳後においては、GM3 よりもむしろその前駆構造である LacCer やスルファチドの発現が顕著であった。

小腸の絨毛部、crypt 部、および間葉系細胞層から調整したラフト脂質ラフト分画を用いて、マーカー分子の floating パターンを WT マウスと DKO マウスで比較した結果、いずれの部位においても Flotillin1 や Caveolin1 の floating パターンに差異は認められなかった。しかし、DKO マウスでは絨毛部においてラフト常在分子のひとつである Galectin4 のラフト局在が著しく低下していた (図 1)。

絨毛部上皮細胞より調整した脂質ラフト

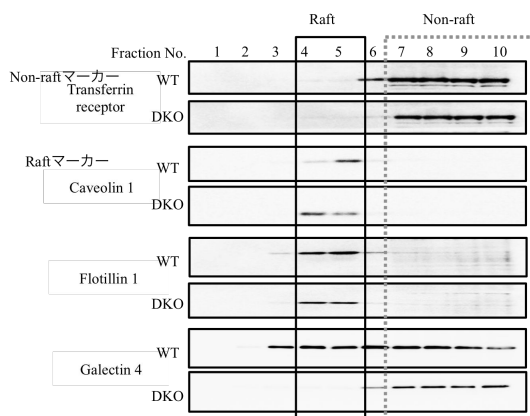


図1. 腸管上皮細胞における膜局在分子のfloating pattern : DKOマウスにおけるラフト局在分子の離散

分画を用いて各分画におけるコレステロール濃度を WT マウスと DKO マウスで比較検討した結果、DKO マウスではラフト分画のコレステロール濃度が著しく低下していた (図 2)。

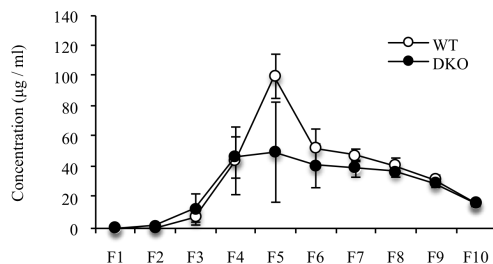


図2. DKOマウスにおけるラフト集積コレステロールの減少

以上の結果から、DKO マウス小腸では糖鎖変異に伴ってコレステロールや Galectin4 がラフトから離散し、正常なラフト構成を欠損していることが示唆された。

(2) DKO マウス小腸における栄養素輸送体の発現変化と脂肪酸取り込み能

4 週齢のマウスでは、空腸において脂肪酸輸送体 FAT/CD36、脂肪酸輸送タンパク質 FATP4、および脂肪酸結合タンパク質 FABP2

の発現量は WT マウスと比較して DKO マウスで顕著に減少していたが、MTP や ApoB の発現量については顕著な差異は認められなかった。コレステロール輸送関連分子の発現量についても顕著な差異は認められなかった。一方、アミノ酸輸送体発現量は DKO マウスで減少していたが、糖輸送体 SGUT1 は DKO マウスで発現が増大していた。2 週齢のマウスではいずれの栄養素輸送関連分子の発現レベルも DKO マウスと WT マウスとで差異は認められなかった。

脂肪細胞などにおいて、脂肪酸輸送体 FAT/CD36 がラフトを介して脂肪酸の細胞内取り込みに寄与することが報告されているが、腸管上皮細胞における知見はほとんどない。脂質輸送関連分子のラフト局在を検討した結果、WT マウスの腸管上皮細胞においては、FAT/CD36 や FATP4 がラフトにも局在することが明らかとなった。一方、DKO マウスでは、これらの分子のラフトでの発現量が著しく減少していた (図 3)。

単離した腸管上皮細胞を用いて脂肪酸の

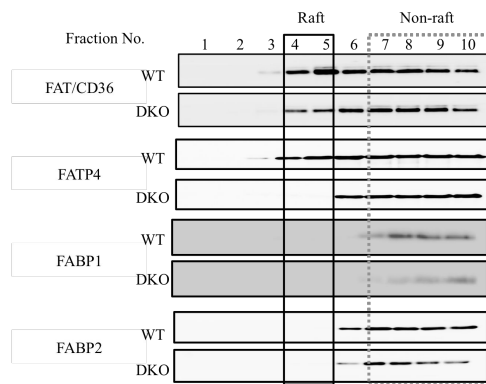


図3. 腸管上皮細胞における脂質輸送関連分子のfloating pattern

取り込み能を検討した結果、WT マウスと比較して DKO マウスでは脂肪酸取り込み能が低下していた。

以上の結果から、腸管上皮細胞において脂肪酸輸送体である FAT/CD36 や FATP4 がラフトに局在すること、および糖鎖変異に伴ってこれらの分子がラフトから乖離することが初めて明らかとなり、GSLs がこれらの分子の機能調節に関与する可能性が示唆された。

高脂肪食負荷実験を実施した結果、WT マウスと同様に DKO マウスにおいても高脂肪食負荷による体重増加は認められたが、その応答は WT マウスよりも遅延して現れることを示した。腸管上皮細胞における脂質輸送関連分子の mRNA 発現変化を検討した結果、WT マウスでは高脂肪食負荷に伴って脂肪酸輸送体 FAT/CD36 の発現レベルが増大した。DKO マウスにおいては、高脂肪食負荷によって FAT/CD36 に加えて脂肪酸輸送タンパク質 FATP4 や脂肪酸結合タンパク質 FABP1、および FABP2 の発現レベルが増加したが、通常食ではこれらの分子の発現量は WT マウスに比

べて低下していた。

これらの結果から、腸管上皮細胞において、GSLs は食餌性脂質に対する感受性を調節することで脂質吸収を制御している可能性が考えられた。

(3)DKO マウス小腸における組織形態学的異常の検討

HE 染色により小腸の組織形態学的な検討を行なった結果、DKO マウスでは WT マウスと比較して絨毛部の長さが 20%ほど長く、細胞数も 27%ほど多く存在していた。一方、crypt 部では細胞数の顕著な差異は認められなかった。

杯細胞を同定するために PAS 染色およびアルシアンブルー染色を行なった結果、十二指腸、空腸部、および回腸部のいずれにおいても DKO マウスと WT マウスとで陽性細胞の数や分布の差異は認められなかった。

内分泌細胞を同定するために抗クロモグラニン A 抗体を用いた免疫染色を行なった結果、十二指腸、空腸部、および回腸部のいずれにおいても DKO マウスと WT マウスとで陽性細胞の数や分布の差異は認められなかった。

パネート細胞を同定するために抗リゾチウム抗体を用いた免疫染色を行なった結果、十二指腸、空腸部、および回腸部のいずれにおいても DKO マウスでは WT マウスより陽性細胞の数が多く、crypt の基底部にまで分布していた。また、crypt 部より単離した細胞を用いてウェスタンブロッティングを行なった結果、DKO マウスにおいてリゾチウムの発現増大が確認された。

(4) crypt 部未分化細胞における GSLs 変異の影響

増殖マーカー分子である PCNA や Ki-67 を標的とした免疫染色の結果、DKO マウスにおいて crypt 部での陽性細胞数が有意に増加しており、増殖が亢進していることが示唆された。一方、アポトーシスの亢進は確認されなかった。

crypt 部上皮細胞を単離し、腸管幹細胞マーカー分子や種々の受容体の発現レベルを検討した。その結果、DKO マウスにおいて Wnt 受容体(Frizzled)や Wnt 標的分子 (Ascl2 及び Sox9) の発現亢進を認めた。

以上の結果より、糖鎖変異に伴い Wnt シグナルが増強されて未分化細胞の増殖が亢進したことが示唆され、糖脂質糖鎖は腸管上皮未分化細胞の増殖調節に関与するという新たな生体内機能が明らかとなった。

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 0 件)

なし

[学会発表](計 5 件)

田島織絵、糖鎖変異に伴う脂質代謝障害の検討、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 15-18 日、京都国際会館(京都・京都)

田島織絵、糖鎖変異に伴う脂質代謝障害の検討、第 33 回日本糖質学会、2014 年 8 月 10-12 日、名古屋大学豊田講堂(愛知・名古屋)

田島織絵、糖鎖変異による脂質吸収障害の分子メカニズム、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

田島織絵、腸管上皮細胞におけるスフィンゴ糖脂質の役割、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 14-16 日、マリンメッセ福岡(福岡・福岡)

田島織絵、糖鎖変異による小腸機能障害の分子メカニズム、第 31 回日本糖質学会、2012 年 9 月 17-20 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島・鹿児島)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田島 織絵 (TAJIMA, Orie)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：10362237