

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870487

研究課題名(和文) 消化管粘膜上皮における味覚・嗅覚関連物質受容と経上皮膜イオン輸送制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of transepithelial ion transport by taste/olfactory sensing in the intestinal epithelium

研究代表者

唐木 晋一郎 (Karaki, Shin-Ichiro)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00363903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の管腔は、生体にとっては外部環境であり、味覚・嗅覚と同様の分子機構によって、腸内の化学環境を感受していることが明らかとなってきた。本研究では、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸が腸管粘膜で感受され、分泌応答を惹起する際の受容体の種類(GPR41/FFA3)を明らかとし、乳酸菌代謝産物を含む経腸栄養剤によって、腸内細菌叢と有機酸濃度が調整され、経腸栄養時の下痢の予防に役立つ可能性が示唆された。また、ポリフェノール類の腸粘膜機能に対する機能性を明らかとし、今後の応用研究における基礎的知見を得ることができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Lumen of the gastrointestinal (GI) tract is external environment for living body. Recent studies have been revealing that mucosa of the GI tract sense the luminal chemical environment by using the molecular mechanism the same as taste and olfactory sensing. The present study have shown that (1) the intestinal mucosa senses short-chain fatty acids (SCFAs), which are metabolic products of the gut microbiota, by a specific receptor, GPR41/FFA3, and that (2) two week feeding of rats with an enteral formula, which is containing lactic acid fermented products, regulates luminal microbiota and SCFAs, suggesting that the formula is useful for preventing diarrhea during enteral nutrition. In addition, the study has shown that polyphenols including viniferin (a dimer of resveratrol) and quercetin (a flavonol) stimulate intestinal mucosa, inducing epithelial fluid secretion and changes of the mucosal barrier function. These chemicals is expected to be applied to clinical use in future.

研究分野：生理学

キーワード：腸内細菌 消化管管腔内化学物質受容 短鎖脂肪酸 Ussing chamber viniferin quercetin GPR41 FFA3

## 1. 研究開始当初の背景

人体には少なくとも 1000 種、100 兆個の常在菌が生息し、その大部分は大腸の管腔に存在している。近年、国内外において、腸内細菌叢の遺伝子レベルでの網羅的解析が進められ、これまで単離培養が不可能なために明らかにされてこなかった腸内細菌叢の全体像が明らかにされつつあり、腸内環境の恒常性のみならず、肥満や糖尿病など、消化管以外の疾病との関連も明らかとなってきた (e.g. *Nature* **489**: 220-230, 2012)。このため、2000 年に提唱された「ヒトとヒトの常在細菌叢は一つの生命体、すなわち“超有機体”である」(*Science* **288**: 287-293, 2000)、との概念も広く認知されるようになってきた。

当初、腸内細菌と宿主であるヒト自身との間の相互作用は、主として腸内細菌によるヒトの粘膜免疫系の賦活化作用によるものとして議論されていたが (e.g. *Nature* **489**: 231-241, 2012)、私はさらに、腸内細菌の代謝 (発酵) 作用により産生される様々な化学物質が、腸管の粘膜によって味覚や嗅覚のように感受され、種々の生理作用を惹起している可能性がある、と考えた。腸内細菌叢の産生した化学物質を消化管粘膜上皮の化学受容細胞が感受し、消化管ホルモン等の化学伝達物質の放出や腸管神経系・迷走神経求心路への情報伝達を介して、蠕動運動・腸液分泌などの局所作用、食欲制御・血糖値制御などの全身作用が惹起されるのではないだろうか。

そこで私と共同研究者らは、本研究を開始するまでに、短鎖脂肪酸の受容と生理作用に関する研究を行ってきた。短鎖脂肪酸 (SCFAs) は主として難消化性炭水化物 (オリゴ糖や水溶性食物繊維) を腸内細菌が代謝することによって産生される酢酸、プロピオン酸、酪酸などであり、大腸内容物中には 100 mmol/kg を超える高濃度で存在する (*Physiology and clinical aspects of short-chain fatty acids*, 1995)。SCFAs は栄養分としても吸収されるが、大腸粘膜を管腔側から刺激して蠕動運動や腸液分泌を惹起することが 1980 年代に元北大特任教授の矢島博士により報告された (*J Physiol* **368**: 667-678, 1985; *J Physiol* **403**: 559-575, 1988)。しかし、SCFAs の受容機構や蠕動運動・腸液分泌の作用機序は長く不明なまま残されていたため、私たちは 2000 年頃より、SCFAs のラット大腸における生理作用に関する研究を開始した。その結果、ラット遠位結腸において、SCFAs はセロトニン (5-HT) 放出→神経伝導→アセチルコリン (ACh) 放出という経路で結腸の輪走平滑筋を一過性に、プロスタグランジン (PG) 産生を介した非神経性経路により持続性に収縮させることや、モルモット遠位結腸粘膜では、コリン作動性の神経反射作用によって Cl<sup>-</sup> 分泌が、非神経性の作用によって K<sup>+</sup> 分泌が惹起されることを報告した。さらに、2003 年に同定された短鎖脂肪酸受容体 FFA2 (GPR43)

と FFA3 (GPR41) が、ラットおよびヒトの L 型腸内分泌細胞に発現していることを報告した。L 型腸内分泌細胞は、インクレチンとしても知られるグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) が含有される腸内分泌細胞である。しかし、SCFAs による腸液分泌に係る受容体がどのタイプの FFA であるかは、研究開始当初は不明であった。

腸内分泌細胞は、20 世紀初頭のホルモンの発見以来、消化管内腔の化学受容細胞と考えられてきたが、その化学受容の分子機構については、100 年以上の間不明なままであった。しかし、1991 年 Buck と Alex によって嗅覚受容体 OR が発見されたことをきっかけに (*Cell* **65**: 175-187, 1991; 2004 年ノーベル医学・生理学賞)、甘味/旨味受容体 T1Rs、苦味受容体 T2Rs が相次いで発見され、さらに辛味受容に関連し、温度センサーでもある TRP チャネルが同定されると、これらの受容体やチャネルが味細胞や嗅覚細胞だけでなく、消化管粘膜にも発現しているということが報告された (*Am J Physiol* **295**: G260-G272, 2008)。

消化管粘膜におけるこれらの受容体の刺激が、どのような生理作用を惹起するのかが、受容体の発見当初は明らかではなかったが、申請者らは、2009 年、苦味物質 6-propyl-2-thiouracil (6-PTU) がヒトやラット結腸粘膜において、アニオン分泌を惹起すること発見した。その後、香草タイムの香気物質、thymol もヒトとラット結腸においてアニオン分泌を惹起し、TRPA1 チャネルの関与を報告した。しかし、消化管粘膜における化学受容から、経上皮アニオン分泌に至るシグナル伝達経路に関してはほとんどが不明なまま残されていた。

## 2. 研究の目的

腸内細菌の主要な代謝産物である SCFAs が腸粘膜を刺激することによって惹起される水分分泌に関与する SCFA 受容体のタイプを同定すること。また、腸内細菌代謝産物や食品由来成分の中から腸管粘膜の化学受容系を刺激し、分泌作用等粘膜機能に影響を与える成分をスクリーニングし、作用機序を明らかにする。さらに動物実験に加えて、ヒト摘出腸管を用いて、ヒトの腸管が実験動物 (ラット/マウス) と同様の影響を受けるかどうかも明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (ヒト摘出腸管)

静岡済生会総合病院 (静岡市) および駿甲会コミュニティーホスピタル甲賀病院 (焼津市) において、大腸がん摘出手術を受ける患者に対し、担当医師によるインフォームド・コンセントにより検体提供の同意を頂いた。同意を頂いた患者より摘出された腸管組織

は、摘出直後に担当医師が病理診断を行い、正常組織部分を切り出して重炭酸 Ringer 液に浸漬した。このビニールバッグをクーラーボックスに入れ、病院から大学の研究室まで輸送し、実験に供した。

(ヒト結腸上皮由来培養細胞株 Caco-2 の単層培養標本)

Caco-2 をスナップウェル上に播種して培養し、腸上皮様標本を作製し、摘出腸管と同様に Ussing chamber 実験を行った。

(GPR41-KO および GPR43-KO マウス)

腸液分泌に關与する SCFAs を同定するため、東京農工大学の木村准教授より、GPR41-KO および GPR43-KO マウスの供与を受けた。

(Ussing chamber 法)

腸管切除手術によって摘出されたヒト腸管の病巣周囲の正常組織部分、および実験動物(ラット/マウス)の腸管から、粘膜-粘膜下組織標本を作製し、Ussing chamber に装着、経上皮膜電位を 0mV クランプして短絡電流を起電性イオン輸送の指標として記録すると共に、1 分間隔で 3 秒間+10mV クランプを行い、オームの法則から上皮膜コンダクタンス(経上皮膜抵抗の逆数)を計算、記録した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト腸管粘膜の経上皮イオン輸送に対する SCFAs の作用

これまで、SCFAs の腸管粘膜上皮イオン輸送に対する作用は、ラットやモルモット結腸において行われてきたが、ヒト腸管においては報告が無かった。それは、ヒト結腸粘膜上皮では、齧歯類で測定されるようなイオン輸送の変化が惹起されなかったためと思われる。ヒト摘出腸管を用いた私の Ussing chamber 実験においても、ヒト結腸粘膜-粘膜

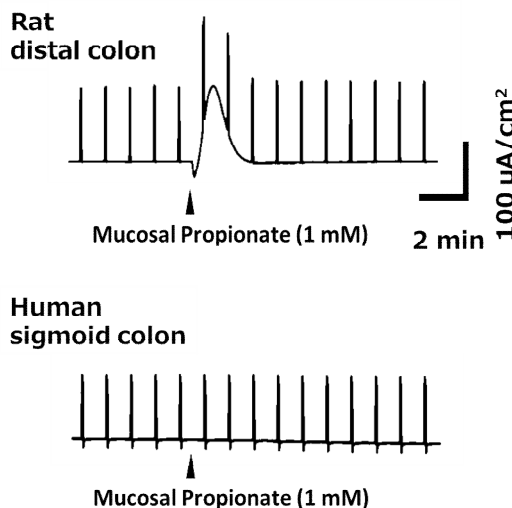


図 1 Ussing chamber に装着したラット遠位結腸及びヒト S 状結腸粘膜 粘膜下組織標本に対するプロピオン酸の作用

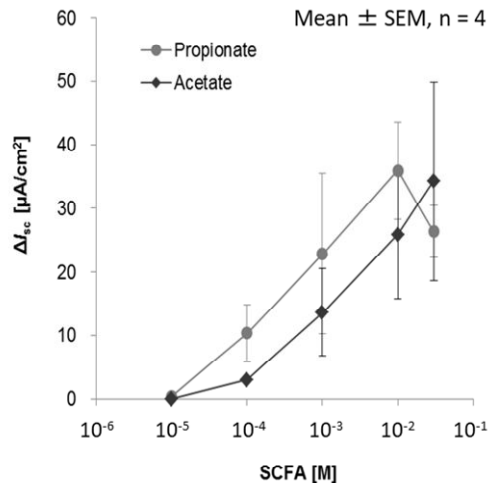
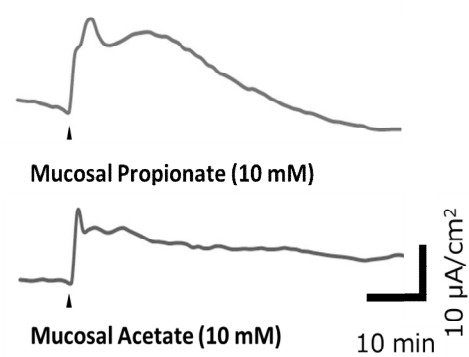


図 2 Ussing chamber に装着したヒト回腸粘膜 粘膜下組織標本に対するプロピオン酸および酢酸の作用

下組織標本をプロピオン酸などの SCFAs で刺激しても、分泌作用は惹起されなかった(図 1)。このことは、齧歯類の結腸粘膜標本におけるデータは、ヒトには外挿できないということを意味している。しかし本研究において、ヒト腸管においても、回腸終末部の上皮組織標本においては、アニオン分泌を惹起することを初めて見出した(図 2)。

##### (2) 大腸腸粘膜上皮においてアニオン分泌を惹起する SCFA 受容体の同定

齧歯類の大腸粘膜において、プロピオン酸が惹起するアニオン分泌には、プロピオン酸 > 酪酸 > 酢酸という刺激強度の強さちがいがあることから、2 種類の SCFA 受容体

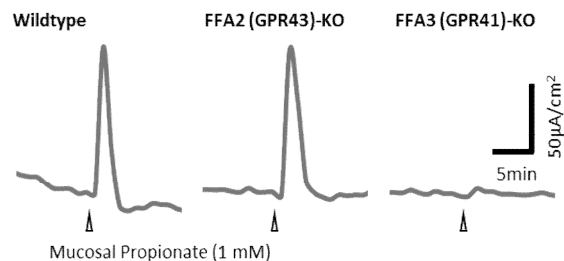


図 3 Ussing chamber に装着した野生型、GPR43-KO および GPR41-KO マウス粘膜 粘膜下組織標本に対するプロピオン酸の作用

GPR43 (FFA2) および GPR41 (FFA3) の中では、GPR41 の関与が示唆されていたが、その直接的な証拠はなかった。しかし今回、GPR43 および GPR41 の KO 動物 (マウス) を用いて Ussing chamber 実験を行ったところ、GPR43-KO マウスの盲腸粘膜上皮では、野生型マウスと同様の分泌作用が惹起されたが、GPR41-KO マウスの盲腸粘膜上皮では、ほとんど惹起されないことが明らかとなった (図 3)。このことから、大腸腸粘膜上皮においてアニオン分泌を惹起する SCFA 受容体は、GPR41 であることが確認された。

### (3) viniferin および resveratrol による腸粘膜刺激作用

各種食品由来成分のスクリーニングを行ったところ、ブドウの果皮やタマネギの皮に多く含まれる resveratrol の二量体である  $\epsilon$ -viniferin が、ラット盲腸粘膜の管腔側刺激によって、1) アニオン分泌作用、2) 一過性の膜コンダクタンス上昇、および、3) FITC デキストラン (FD4) の透過性を惹起することを明らかにし、*Physiological Reports* 誌に発表した。しかし、viniferin はヒトの S 状結腸標本においては同様の作用を惹起せず、resveratrol では惹起された (図 4)。

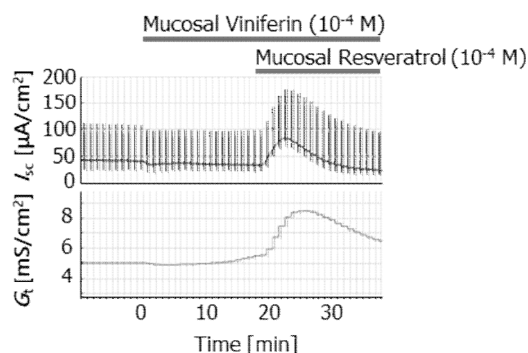


図 4 Ussing chamber に装着したヒト S 状結腸粘膜 粘膜下組織標本の短絡電流 (Isc) および膜コンダクタンス (Gt) に対する viniferin および resveratrol の作用

### (4) quercetin の腸粘膜刺激による分泌およびバリア機能に対する影響

Quercetin を Ussing chamber に装着したヒト S 上結腸粘膜標本の粘膜側に投与すると、持続的な短絡電流 Isc 上昇と、膜コンダクタンス Gt の減少が惹起された。一方、Caco-2 単層培養標本においては、一過性の Isc 上昇と持続的な Gt 減少が惹起された。これらの結果から、quercetin は、管腔側刺激によって、分泌作用と上皮膜抵抗の上昇が同時に惹起されることが推測され、腸管粘膜上皮のバリア機能を強化するために利用可能であることが示唆された。

## 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 6 件)

- ① Karaki S, Ishikawa J, Tomizawa Y, Kuwahara A. Effects of  $\epsilon$ -viniferin, a dehydrotimer of resveratrol, on transepithelial active ion transport and ion permeability in the rat small and large intestinal mucosa. *Physiological Reports*, 査読有, Vol.4, No. 9, 2016, e12790  
DOI: 10.14814/phy2.12790  
Yajima M, Kimura S, Karaki S, Nio-Kobayashi J, Tsuruta T, Kuwahara A, Yajima T, Iwanaga T. Non-neuronal, but atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids: age-dependent desensitization and restoration under inflammatory condition in mice. *Physiological Report*, 査読有, 4, No.7, 2016, e12759  
DOI: 10.14814/phy2.12759  
Yajima M, Karaki SI, Tsuruta T, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Kuwahara A, Yajima T. Diversity of the intestinal microbiota differently affects non-neuronal and atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids in mice. *Biomedical Research (TOKYO)*, 査読有, Vol. 37, No. 5, 2016, 319-328.  
DOI: 10.2220/biomedres.37.319  
Fujita T, Karaki S, Tateoka T, Kuwahara A. Desacetyl bisacodyl-induced epithelial Cl secretion in rat colon and rectum. *Biomedical Research (TOKYO)*, 査読有, Vol. 37, No. 1, 2016, 13-20  
DOI: 10.2220/biomedres.37.13  
Uwada J, Yazawa T, Islam MT, Khan MRI, Krug SM, Fromm M, Karaki SI, Suzuki Y, Kuwahara A, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Taniguchi T. Cellular Signaling, 査読有, Vol. 35, 2017, 188-196  
DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.04.007  
唐木晋一郎, 腸管上皮におけるマイクロバイオーム代謝産物受容と生理機能. *Bio Clinica* Vol. 32, No. 11, 2017, 70-73

[学会発表](計 19 件)

- ① 唐木晋一郎, 桑原厚和, 腸管粘膜上皮において短鎖脂肪酸が誘発する起電性上皮イオン輸送の部位差・種差、平成 26 年度生理研研究会「粘膜免疫学と膜輸送生理学の融合」(岡崎市) 2014 年 10 月 29 日  
富澤由花, 唐木晋一郎, 桑原厚和、ラット遠位結腸における SCFA 受容体に対する阻害剤の親和性、Hindgut Club Japan

Symposium 2014 (東京) 2014年12月6日

Karaki S, Kuwahara A. Physiological effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelia – difference between species and intestinal segments -, The 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan / The 120th Annual Meeting of the JAA (Kobe, Japan), March 21-23, 2015.

Karaki S, Ishikawa J, Tomizawa Y, Kuwahara A. Effects of  $\epsilon$ -viniferin, a dehydrodimer of resveratrol, on ion transport and ion permeability in the rat intestinal epithelia. 8th FAOPS Congress (Bangkok, Thailand), November 22-25, 2015.

Tomizawa Y, Karaki S, Kimura I, Kuwahara A. Agonists and antagonists for the free fatty acid receptor 3, FFA3 (GPR41) – Short-chain fatty acid-evoked anion secretion in the mice and rat intestinal mucosa. 8th FAOPS Congress (Bangkok, Thailand), November 22-25, 2015.

富澤由花、唐木晋一郎、木村郁夫、桑原厚和、マウスおよびラット大腸粘膜においてSCFA 惹起アニオン分泌を司る SCFA 受容体 FFA3(GPR41)のアゴニストおよびアンタゴニスト. 第21回 Hindgut Club Japan Symposium (東京), 2015年12月5日

Karaki S, Ishikawa J, Tomizawa Y, Kuwahara A. Effects of viniferin, a dehydrodimer of resveratrol, on transepithelial ion transport and epithelial permeability in the rat intestine. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Sapporo, Japan), March 22 – 24, 2016.

保田倫子、唐木晋一郎、下位香代子、セシウムの腸管における透過に関する評価系の確立. 第21回日本フードファクター学会(JSoFF2016)(富山), 2016年11月19 - 20日

唐木晋一郎、富澤由花、木村郁夫、桑原厚和、消化管運動および経上皮イオン輸送における短鎖脂肪酸受容体の役割. 日本食物繊維学会第21回学術集会(静岡市), 2016年11月26 - 27日

唐木晋一郎、保田倫子、消化管粘膜上皮による管腔内化学物質受容と上皮膜機能調節機構. 第22回 Hindgut Club Japan シンポジウム(東京), 2016年12月3日

唐木晋一郎、糸久枝、芦田欣也、高橋毅、桑原厚和、ラット腸管粘膜上皮の水分泌能に対する乳酸菌発酵成分配合流動食の影響. 第32回日本静脈経腸栄養学会学術集会(岡山), 2017年2月23 - 24日

保田倫子、徳山千佳、唐木晋一郎、下位香代子、放射性セシウムによる内部被ばくを防ぐ食品成分探索のための評価系. 日本農芸化学会 2017 大会(京都), 2017年3月20日

Karaki S, Tomizawa Y, Kimura I, Kuwahara

A. Molecular evidence for the involvement of free-fatty acid receptor 3 (FFA3, GPR41) in the short-chain fatty acid-evoked intestinal anion secretion. *The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* (Hamamatsu, Japan), March 28 – 30, 2017

保田倫子、徳山千佳、唐木晋一郎、下位香代子、腸管を介したセシウム移行に食品因子が及ぼす効果. 第26回環境化学討論会(静岡), 2017年6月8日

Nakajima H, Furuya K, Komatsu F, Kashima N, Kumade E, Takemoto I, Maeda T, Watanabe T, Miyazaki T, Karaki SI, Yoshihisa U, Kuwahara A, Koizumi K: Sodium-coupled monocarboxylates transporter 1 (SLC5A8) is decreased in human colon cancer. *World Congress of Gastroenterology at ACG2017* (Orland, FL, USA), Oct 13-18, 2017

唐木晋一郎、Ussing chamber 法による食品成分の生理作用(機能性)解析. 第73回日本栄養食糧学会中部支部大会(岐阜), 2017年11月25日

唐木晋一郎、保田倫子、ヒト腸上皮バリア機能に対するケルセチンの急性作用. 第23回 Hindgut Club Japan Symposium (東京), 2017年12月2日

Karaki S, Yasuda M. Luminal chemosensing and effects of mucosal functions (fluid secretion and barrier function) in the intestine. *The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* (Takamatsu, Japan), March 28 – 30, 2018

Homma T, Terashima K, Ishihara S, Karaki S. Study on inhibitory mechanism of glucose absorption by cabbage vinegar on isolated small intestine of mice. *The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* (Takamatsu, Japan), March 28 – 30, 2018

〔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 1 件)

名称: GPR43 陽性・腸内分泌細胞増加促進剤  
発明者: 桑原厚和、唐木晋一郎、後藤祥二、田代靖人、川島順市、古賀仁一郎  
権利者: 静岡県立大学法人(静岡県)  
種類: 特許

番号：特許第 5561639 号  
取得年月日：2014 年 6 月 20 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

唐木晋一郎 (KARAKI, Shin-ichiro)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教  
研究者番号：00363903

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

桑原厚和 (KUWAHARA, Atsukazu)  
鈴木裕一 (SUZUKI, Yuichi)  
渡邊学 (WATANABE, Manabu)  
保田倫子 (YASUDA, Michiko)  
富澤由花 (TOMIZAWA, Yuka)