

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09392

研究課題名(和文) 病態依存的に変動する腸管ムチンの水分保持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of the water retention into the intestinal mucin that fluctuates depending on the pathological condition

研究代表者

市川 尊文 (Ichikawa, Takafumi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：30245378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ムチンは複雑な糖鎖構造を持っているため、水分保持力に関連している可能性がある。ムチンと水分子の関係性を明らかにすることを目的とした。絶食モデルマウスにおいて、スルホムチンであるPGM34発現が上昇し、同時にアクアポリン3分子の発現も上昇した。絶食により飲水量が少なくなるのに加え、上皮細胞の代謝回転が停滞し、管腔内からの水分採取能が低下することから、細胞内にある水分子を、水チャネルを使って粘液層に供給するため、AQP3が高発現すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで臨床で汎用されてきた止瀉薬(下痢止め)は、管腔内の水分吸収作用を機序とするため、即効性はあるが根本治療にはつながらない。そこで、即効性がない反面、一度産生されると一定期間の産生維持と腸内環境改善が期待できるムチンという局面から腸内の水分調節を図るのが、効果的であると考えた。生体にとって最も重要な水をターゲットとした治療を提案することの危険性、つまり脱水や浮腫など全身性症状を引き起こす可能性がある一方で、ムチン関連性腸管特異的な水チャネルが存在したことから、慢性下痢症に対して安全かつ一時的でない治療の一助となると確信している。

研究成果の概要(英文)：Mucins have a complex glycan structure, which may be related to their ability to retain water. The purpose of this study was to clarify the relationship between mucins and water molecules. In a mouse model of fasting, the expression of PGM34, a sulfomucin, was increased, and at the same time, the expression of aquaporin 3 molecules was also increased. This suggests that AQP3 is highly expressed in order to supply intracellular water molecules to the mucus layer using water channels, since fasting reduces the amount of water consumed, stagnates the metabolic turnover of epithelial cells, and decreases the ability to extract water from the lumen.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ムチン 水分子 アクアポリン 絶食 小腸 PGM34 粘膜

1. 研究開始当初の背景

水は生命にとって不可欠なものであり、生体内の水の恒常性は巧妙に維持されている。体液や多くの細胞間の水分調節は、浸透圧に依存した水分子移動によるものである。

消化管は、体内でありながら外界と接する唯一の臓器であるため、方向性を持つ上皮細胞の管腔側が、いわゆる「外」であり、濃度勾配に依存する浸透圧だけでは説明がつかない。つまり、もろに腸内環境に左右されるわけである。しかし実際には、摂取した食物や腸内細菌などの外来物質と直（じか）に接しているわけではなく、粘液と呼ばれる領域を間に挟んでいる。この粘液が、病原体など有害物質を積極的に排除するバリア機能を果たしている。そして、その成分は、約15%のムチンと数%の無機塩類、そして80%以上を占めるのが水である。そのため、粘液構造内に多量の水分子を囲い込まなければならない。腸粘膜の水分恒常性において、当然、浸透圧依存の要素はあるものの、それ以上に、ムチンという複雑な糖鎖構造が水分保持力に関連している可能性は否定できない。

ムチンと水分は、共存してこそ機能的であり、切っても切り離せないものである以上、少なからず相互関係が生じているはずである。いくつかの研究グループによれば、粘液産生細胞での水チャネルの発現、肺癌における水チャネルとムチンの関連性の示唆といった重要な事象を掴んではいないものの、それ以上のエビデンスは無いに等しい。ムチン構造の隙間に水分子が入り込むことで、弾性が生み出されることは想像に難（かた）くないが、粘液が機能を十分に発揮するには、粘液層への水分の供給と保持に関するある機構が存在すると予想する。

2. 研究の目的

栄養状態変動や病態経過に伴って変化する腸管ムチンの水分供給と保持機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

7週齢オスのBALB/cマウスに3Gy放射線照射を行い、消化管粘膜傷害モデルを作成した。照射後5日目に小腸を採取した。

7週齢オスのBALB/cマウスを対象に16時間絶食を行い（自由飲水）、絶食モデル動物とした。コントロールマウスは通常飼育を行った。

(2) 病理学的検討

採取した小腸を4%PFA/PBSにて固定し、HE染色、PAS染色、免疫化学組織染色法により、ムチン抗体およびアクアポリン抗体により染色した。

(3) mRNA発現解析

組織中のアクアポリン mRNA 発現を解析するため、リアルタイムPCR法を用いて発現比較した。

4. 研究成果

(1) 放射線照射モデルにおける粘液産生

3Gyの全身放射線照射を行ったマウス小腸において、照射後1日目にはクリプトの増殖細胞数が減少し、3日目には盛んな細胞増殖が観察され、比較的安定的に小腸傷害が得られた。粘液分泌に変化が生じるかを検討するため、PAS染色を施したところ、放射線照射後5日目に、粘液産生の亢進が確認された(図1)。しかしながら、アクアポリン発現の変化を捉えることができず、粘液産生が盛んになる絶食モデルでの検討に切り替え、現象が捉えられた時点で、放射線モデルに立ち返り、線量などの検討を加える予定とした。

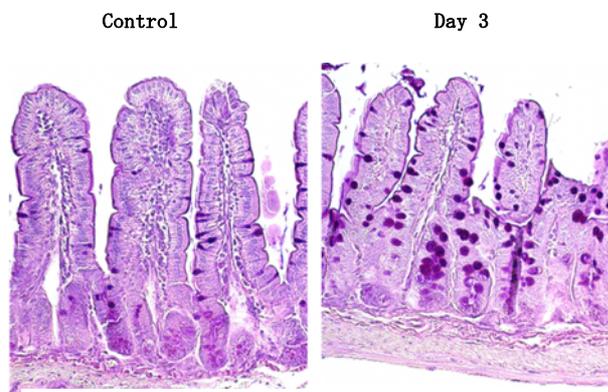


図1 放射線モデルにおける回腸のPAS染色

(2) 絶食モデルにおける小腸形態

16時間絶食を行うと、8%程度の体重減少が見られたが、行動に目立った変化は見られなかった。HE染色により経時的な組織学的を観察したところ、時間経過とともにエオシン好染性・核ヘマトキシリン部位の面積が増加した(図2)。HE染色の結果をふまえ、絶食時間が長くなるにつれて細胞数が増えているのではないかと考え、細胞数の計測をした。空腸、回腸とも絶食0hから16hまで絨毛10本、クリプト10個ずつ細胞数を数えて平均値を算出したが、絶食時間の経過に伴う大きな変化は見られなかった。細胞数が変わらないものの核の濃染が見られる理由として絨毛の収縮が考えられたため、絨毛高さの計測をした。絶食0hから16hまでそれぞれ20本ずつ絨毛の長さを測定したところ、空腸回腸いずれも絶食時間の経過とともに絨毛高さが短縮する傾向にあった(図省略)。絶食により絨毛が短縮する一方、細胞数が変化していないことから上皮細胞の代謝回転が停滞していると予想された。

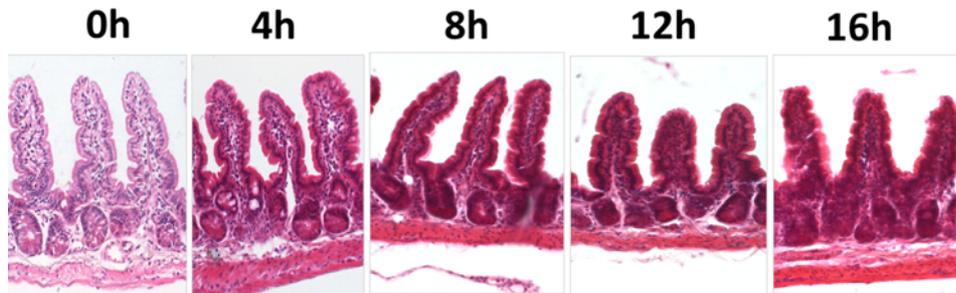


図2 回腸のHE染色像

(3) 絶食モデルにおける粘液産生

糖鎖依存的なムチン抗体としてPGM34、HCM31およびコアタンパク質のムチンMUC2抗体を用いて検出した。絶食時間経過とともに、回腸においては杯細胞および分泌粘液にスルホムチンPGM34陽性部位の発現が上昇した(図3)。一方空腸においては大きな変化が認められなかった。MUC2も同様の発現を示した。シアロムチンHCM31に関して空腸・回腸全体を通して発現強度の変化が見られなかった。

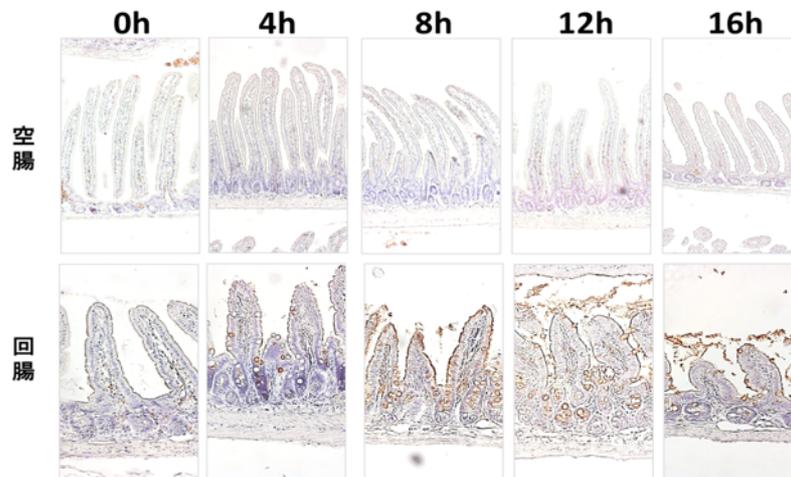


図3 PGM34抗体による検出

(4) 絶食下における水チャネル発現

絶食モデルマウス小腸におけるアクアポリンmRNA発現をリアルタイムPCRにて解析したところ、AQP3の遺伝子発現が絶食16h後に全体を通して発現が上昇した(図4)。一方AQP9については絶食前とほぼ変化を認めなかった。

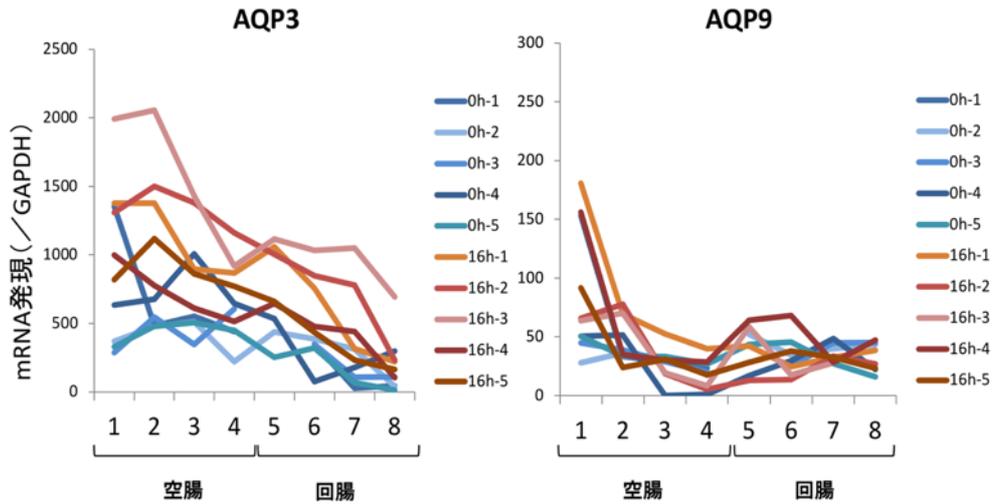


図4 小腸組織におけるアクアポリン mRNA 発現解析

また、AQP3 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、絶食 0h では空腸絨毛の上皮細胞膜でのみ発現が見られた。一方絶食 16h では空腸・回腸両方で、細胞質全体に発現が見られるようになった (図5)。

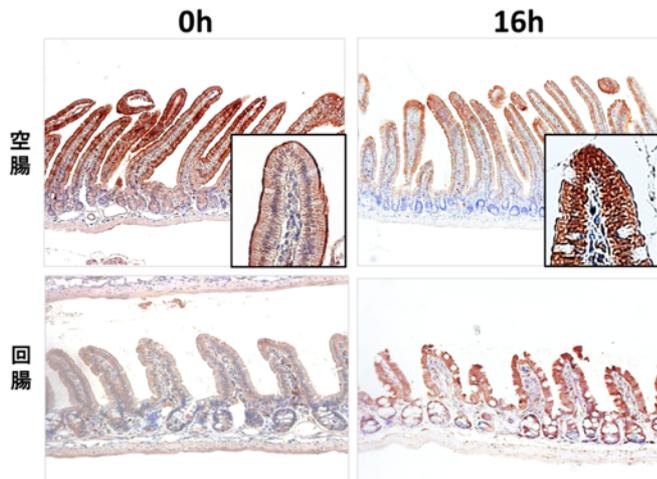


図5 AQP3 抗体による免疫染色

(5) ムチンとアクアポリンの局在関係

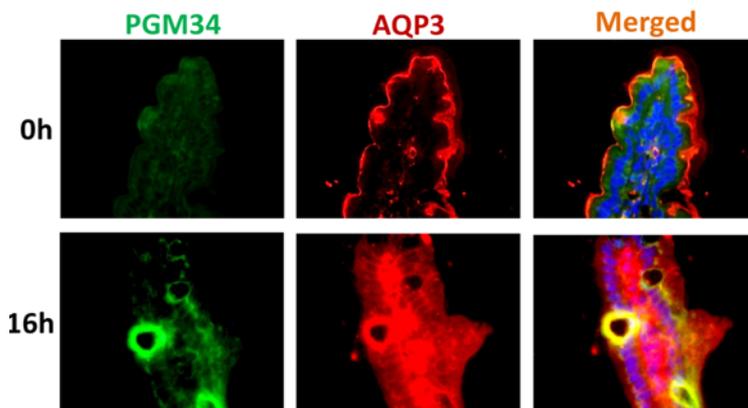


図6 PGM34 および AQP3 の二重染色

AQP3 は 0h の時は上皮部分にのみ発現していたが、絶食 16h では発現部位が杯細胞はじめ細胞質全体に発現するようになったことから、PGM34 および AQP3 の共染色を行った。共染色の結果、杯細胞に PGM34 と AQP3 が共に発現していることが確認された (図6)。

絶食状態の腸管では粘液（特に PGM34 陽性ムチン）分泌が亢進することで、腸管粘膜を保護している。PGM34 は硫酸基を含むため粘性が高い。これが粘液の中に多く発現することで更に粘性が増し、腸管粘膜の保護に貢献しているのではないかと考えた。

絶食により、飲水量低下に加え、上皮細胞の代謝回転が停滞し、管腔内からの水分採取能が低下することから、細胞内にある水分子を水チャネルを使って粘液層に供給する必要があると推測した。そこで既に体内に存在する水分を少しでも多く取り込み、保持するために AQP3 が通常摂食時に比べて多く発現すると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maekawa Tatsunori, Tsushima Hiromichi, Kawakami Fumitaka, Kawashima Rei, Kodo Masaru, Imai Motoki, Ichikawa Takafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Associated With Activation of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Stress-Related Gastrointestinal Dysmotility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 article905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.00905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kodo Masaru, Kawashima Rei, Tamaki Shun, Kawakami Fumitaka, Maekawa Tatsunori, Imai Motoki, Koizumi Wasaburo, Ichikawa Takafumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Altered expression of amino acid transporter LATs of intestinal cells in 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 86-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kurosaki Yoshifumi, Imoto Akemi, Kawakami Fumitaka, Yokoba Masanori, Takenaka Tsuneo, Ichikawa Takafumi, Katagiri Masato, Ishii Naohito	4. 巻 314
2. 論文標題 Oxidative stress increases megalin expression in the renal proximal tubules during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F462 ~ F470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00108.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa Tatsunori, Shimayama Hitomi, Tsushima Hiromichi, Kawakami Fumitaka, Kawashima Rei, Kubo Makoto, Ichikawa Takafumi	4. 巻 62
2. 論文標題 LRRK2: An Emerging New Molecule in the Enteric Neuronal System That Quantitatively Regulates Neuronal Peptides and IgA in the Gut	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 903 ~ 912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-017-4476-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hideaki, Kobayashi Koji, Kosuge Yuuko, Sasaoka Yuuichi, Tajika Yosuke, Sugiyama Tsuyoshi, Ichikawa Takafumi, Ishihara Kazuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Nattoessee inhibits the high-fat diet-induced increase in serum lipid levels in ApoE-deficient mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 16 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hideaki, Kosuge Yuuko, Kobayashi Koji, Kurosaki Yoshifumi, Ishii Naohito, Aoyama Naoyoshi, Ishihara Kazuhiko, Ichikawa Takafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Heat-shock protein 72 promotes platelet aggregation induced by various platelet activators in rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 175 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 元川立一, 前川達則, 市川尊文
2. 発表標題 腸管神経・グリア初代培養細胞を用いたLRRK2の機能解析.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川勇太, 川上文貴, 川島麗, 前川達則, 市川尊文
2. 発表標題 消化管におけるLRRK2のIBDリスク遺伝子としての生理的役割の解析.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木竣, 川島麗, 二反田千里, 川上文貴, 前川達則, 栗原誠, 市川尊文
2. 発表標題 絶食下における腸管ムチンの発現変動と水分保持機構の解明.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下真裕佳, 川上文貴, 石川勇太, 今井基貴, 川島麗, 前川達則, 市川尊文
2. 発表標題 大腸炎モデルマウスを用いた高脂肪食摂取の腸管粘膜バリアへの影響解析.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木 竣、川島 麗、香波 優、川上 文貴、前川 達則、栗原 誠、市川 尊文
2. 発表標題 癌剤起因性腸管粘膜炎症におけるアミノ酸トランスポーターLAT発現の意義.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 基貴、川上 文貴、川島 麗、前川 達則、神崎 展、市川 尊文
2. 発表標題 LRRK2-Rab経路によるGLUT4膜輸送の調節メカニズム.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 元川 立一、前川 達則、市川 尊文
2. 発表標題 LRRK2による腸管神経新生調節機構の解明.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 勇太、川上 文貴、川島 麗、前川 達則、市川 尊文
2. 発表標題 IBDリスク分子LRRK2の消化管におけるDSS腸炎に対する影響.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川達則、川島麗、川上文貴、市川尊文
2. 発表標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2変異マウスにおける大腸運動異常と腸管神経病理像.
3. 学会等名 第47回日本潰瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎祥史、井本明美、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁
2. 発表標題 Megalinの制御的膜内切断 (RIP) が酸化ストレスによるmegalin発現の変動に及ぼす影響.
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Sekiya H, Nakamura M, Maehana S, Kashiwagi H, Imamichi Y, Yuhki K, Ushikubi F, Ichikawa T, Kitasato H, Kojima F.
2. 発表標題	Up-regulation of colonic Th1/Th17 cytokines is associated with increased severity of experimental colitis in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1.
3. 学会等名	The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Maekawa T, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Ichikawa T.
2. 発表標題	LRRK2 is associated with gastrointestinal dysmotility induced by restraint stress.
3. 学会等名	Australasian Neurogastroenterology and Motility Association Inc-2017 Conference (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	川上文貴, 山下真裕佳, 石川勇太, 寄元映見, 井阪勇輝, 市川尊文
2. 発表標題	消化管粘膜バリア機構に対する高脂肪食摂取の影響に関する解析
3. 学会等名	第88回日本衛生学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	川上文貴, 山下真裕佳, 石川勇太, 寄元映見, 井阪勇輝, 市川尊文
2. 発表標題	高脂肪食摂取マウスにおける腸管粘膜バリア機能の変化
3. 学会等名	第138年会日本薬学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 鈴木英明, 小菅優子, 石川勇太, 小林浩二, 五十嵐康之, 笹岡悠一, 田近洋介, 黒崎祥史, 井本明美, 石井直仁, 青山直善, 石原和彦, 市川尊文
2. 発表標題 ヒートショックプロテイン72は血小板活性化因子によって誘導された血小板凝集を促進する
3. 学会等名 第58年会日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川達則, 川上文貴, 川島 麗, Jaime Foong, Joel Bornstein, 市川尊文
2. 発表標題 腸管神経におけるLeucine-Rich Repeat Kinase 2の機能解析
3. 学会等名 第37回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島麗、香渡優、玉木竣、川上文貴、前川達則、栗原誠、市川尊文
2. 発表標題 放射線誘導性消化管傷害におけるH2ブロッカーの粘膜防御に対する効果
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川達則、津島博道、川上文貴、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 LRRK2 is associated with gastrointestinal dysmotility induced by restraint stress.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川勇太、川上文貴、山下真裕佳、井阪勇輝、今井基貴、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 IBD関連分子LRRK2の消化管における生理的役割の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下真裕佳、川上文貴、石川勇太、井阪勇輝、今井基貴、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 大腸炎モデルを用いた腸管バリア機構に対する高脂肪食摂取の影響に関する解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井基貴、川上文貴、井阪勇輝、石川勇太、山下真裕佳、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 Leucine-rich repeat kinase 2によるp53のリン酸化とその生理的意義に関する解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井阪勇輝、川上文貴、今井基貴、石川勇太、山下真裕佳、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 LRRK2の糖代謝調節機構における生理的役割の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki H., Kosuge Y., Kobayashi K., Igarashi Y., Sasaoka Y., Kawakami F., Kawashima R., Imoto A., Kuroski Y., Ishii N., Aoyama N., Ishihara K., Ichikawa T.
2. 発表標題 HSP72 and anti-HSP72 antibodies control platelet aggregation induced by platelet activators in rats.
3. 学会等名 The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kodo M., Kawashima R., Koizumi W., Ichikawa T.
2. 発表標題 Expression of amino acid transporters in antitumor agent-induced gastrointestinal mucosal injuries.
3. 学会等名 UEGW 2017 (The 25th United European Gastroenterology Week) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市岡匡睦、井本明美、黒崎祥史、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、横場正典、小寺義男、池永秀樹、竹中恒夫、市川尊文、片桐真人、石井直仁
2. 発表標題 腎症発症前の糖尿病ラット腎皮質におけるオートファジーに対する酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木英明、小菅優子、小林浩二、五十嵐康之、笹岡悠一、川上文貴、川島麗、黒崎祥史、井本明美、石井直仁、青山直善、石原和彦、市川尊文
2. 発表標題 ラットにおいてヒートショックプロテイン72は血小板活性化因子によって誘導された血小板凝集を促進する
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上文貴、井阪勇輝、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 消化管粘膜バリア機構におけるLRRK2の機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井阪勇輝、川上文貴、丸山弘子、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 脂肪組織におけるLRRK2の機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔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	川島 麗 (Kawashima Rei) (70392389)	北里大学・医療衛生学部・准教授 (32607)	

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
---------	---------