

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17927

研究課題名(和文) 栄養素による小腸吸収上皮細胞のエピゲノム制御機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of small intestinal epithelial cells by nutrients

研究代表者

本間 一江 (Honma, Kazue)

静岡県立大学・食品栄養科学部・客員共同研究員

研究者番号：80724765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究よりスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)の発現増大には、その遺伝子周辺のヒストンのアセチル化の増大が関与していることを示してきたが、本研究では、HDAC阻害作用のある酪酸がHDAC1の結合量を低下させることでSIの発現増大を促進することを明らかにした。また、小腸オルガノイドの分化成長中の遺伝子発現変化に及ぼすヒストンアセチル化の影響を、酪酸およびHAT阻害剤を用いて検討した結果、酪酸は小腸オルガノイドの分化成長中にもH3K9のアセチル化とSIの発現を増大させること、小腸幹細胞の吸収細胞への分化にはGCN5によるヒストンアセチル化が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酪酸やHDAC阻害剤は細胞増殖を阻害し分化を促進することが示されており、in vivo小腸において観察されていた酪酸によるSIの発現誘導も細胞の分化が促進した結果である可能性があった。本研究で酪酸は、分化した吸収細胞でも直接SIの発現を高めることおよび小腸細胞の分化を介してSIを誘導することの両方の作用を確認することができた。消化管内で酪酸は腸内細菌による食物繊維の資化によって生成することから、今後も糖質の代謝産物である短鎖脂肪酸の小腸の消化吸収機能に対する役割の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that increased expression of sucrase-isomaltase (SI) is associated with increased acetylation of histone H3 around the gene in previous studies. In the present study, it was revealed that butyrate, HDAC inhibitor, increase in SI expression through reducing the binding of HDAC1 around the gene. We also investigated the effect of histone acetylation on changes in gene expression during differentiation of small intestinal organoids using butyrate and HAT inhibitors. As a results, we found that butyrate increased H3K9 acetylation and SI expression during differentiation of small intestinal organoids. In addition, it was suggested that histone acetylation by GCN5 is important for the differentiation of small intestinal stem cell into enterocyte.

研究分野：分子栄養学、食生活学

キーワード：小腸 ヒストンアセチル化 酪酸 HDAC スクラーゼ・イソマルターゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸細胞は、幹細胞から吸収細胞に分化する過程で消化吸収関連遺伝子を発現させ、流入する栄養素の消化吸収に対応している。例えば、二糖類水解酵素や糖輸送担体は、クリプト部から徐々に発現が増大して、絨毛中央部から先端部で最大となる。このような吸収細胞の分化成熟時に起こる遺伝子発現調節には、TR や GR といったホルモン受容体やいくつかの核内転写因子が関与している。しかしながら、プロモーター領域における転写の ON/OFF といった調節機構だけでは、食事として摂取した栄養素のシグナルによって起こる遺伝子発現調節を説明することはできなかった。

これまでの研究から、我々は、摂取する糖質の量や質が消化吸収関連遺伝子の発現を変化させる際、その遺伝子周辺のヒストンのアセチル化修飾およびアセチル化ヒストン結合タンパク質の結合量が増大することを明らかにしてきた。小腸における糖質消化吸収関連遺伝子の転写調節で観察されたこのようなエピゲノムの変化は、プロモーター領域ではなくその下流の転写領域で起こっており、RNA polymerase II の活性化(リン酸化)による転写伸長を促進していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、消化管の吸収上皮細胞がどのような機構で、摂取した栄養素に応答して遺伝子発現を変化させるのかを明らかにすることである。臨床的には、術後や摂食嚥下障害などのため経腸栄養をやめると絨毛の萎縮や欠落が起こり、消化吸収能は極端に低下する。消化吸収関連遺伝子の発現も絶食によって低下するが、再摂食にはそれらを回復させる効果がある。

これまでのラットを用いた研究から、3日間の絶食後の再摂食時におけるフルクトース輸送担体の発現誘導に、ヒストンアセチル化修飾が関連していることが明らかになった¹。また、経腸栄養剤や母乳に含まれる中鎖脂肪酸は、ヒストンアセチル化酵素(HAT)であるCBP/P300の遺伝子発現を増大させること²や、短鎖脂肪酸の一つである酪酸にはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害作用があることなどから、栄養素は、ヒストンアセチル化レベルの変化を介して、吸収上皮細胞の遺伝子発現を制御しようと考え、本研究では主に酪酸による遺伝子発現制御を検討した。

3. 研究の方法

(1) 小腸様培養細胞株 Caco-2 を用いた検討

これまでの研究から、3日間の絶食後に酪酸ナトリウム(NaB)添加食を再摂食させたラットの空腸では、スクラーゼ・イソマルターゼ(SI)遺伝子周辺のヒストンH3のアセチル化と転写共役因子の結合が増大し、SiのmRNA発現量が増大することが明らかになったが、これは酪酸が吸収細胞の分化を促進した結果であるか、細胞の分化を介さず直接Siを誘導するかどうかは区別できなかった。そこで本研究では、分化させたCaco-2を酪酸添加培地で培養し、SIの発現およびその遺伝子周辺のヒストンアセチル化への酪酸の影響を調べることにした。ヒストンアセチル化の検討のためには、代表的なHDAC阻害剤であるTricostatin A(TSA)を用いた。

(2) 小腸オルガノイドを用いた検討

ラット小腸およびCaco-2における先行研究より、酪酸によるSIの発現誘導には、その遺伝子周辺のヒストンアセチル化の増大が関与していることを明らかにしてきた。一方、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害作用を持つ酪酸は、様々な幹細胞の増殖を抑制し分化を促進することが知られている。そこで、腸幹細胞から吸収上皮細胞への分化過程におけるヒストンアセチル化を介した遺伝子発現制御機構を検討することとした。

C57BL/6J雄マウスの小腸上部から得たクリプトをマトリゲルに播種し、L-WRN細胞より作製したWnt-3A、R-spondin3およびnogginを含む培地で培養して幹細胞スフェロイドを得た。スフェロイドを継代後、3日後に分化誘導とHDAC阻害剤やHAT阻害剤処理をして、各マーカー遺伝子の発現量およびヒストンアセチル化レベルの変化を調べた。

(3) ラットを用いたレジスタントスターチ(RS)食の機能

SD系雄ラットにRS(type2)食を2週間与え、その後対照のコーンスターチ食に切り替え、2日毎に盲腸内容物の解析と小腸における糖質消化吸収関連遺伝子や消化管ホルモンの発現変化を調べ、RSが単回の食後血糖値だけでなく、RS食でないその後の食事まで影響が持続するかどうかを評価した。

¹ Honma, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014

² Mochizuki, *Br. J. Nutr.*, 2008

4. 研究成果

(1) Caco-2 における酪酸添加による SI 遺伝子周辺のヒストンアセチル化の変動

コンフルエント 7 日後の Caco-2 細胞を、低グルコース培地を用いて 72 時間培養した後、5 mM NaB 培地添加に替えて 12 時間培養したところ、SI の mRNA 発現量は、対照と比較して有意に高く、SI 遺伝子転写領域内の BRD4 および CyclinT1 の結合量が高まっていることが確認され、転写伸長反応が促進していることが示唆された。また、Caco-2 への NaB および TSA の暴露は、SI 遺伝子周辺の HDAC1 の結合量を低下させ、ヒストン H3 のアセチル化を高めることが明らかとなった。

(2) 小腸オルガノイド分化中の遺伝子発現に及ぼす酪酸の影響

HDAC 阻害作用のある酪酸および TSA を含む培地で分化させたオルガノイドでは、分化開始 12 時間後に幹細胞マーカー *Lgr5* の mRNA 発現量が高く、分化開始 12~24 時間後には分化した吸収細胞のマーカーである *Si*、*Mgam* および *Vill* や吸収細胞特異的な転写因子の mRNA 発現量が有意に高かった。オルガノイドの分化開始 48 時間後まで Control ではヒストン H3K9 のアセチル化はほとんど変わらなかったのに対し、TSA や酪酸添加培地で培養した細胞ではヒストン H3K9 のアセチル化が高まっていることが確認された。これらの結果から、酪酸は HDAC を阻害することでヒストンのアセチル化を高め、吸収細胞への分化を促進することが明らかになった。また、HAT 阻害剤 (Anacardic Acid ならびに Butyrolactone 3) を用いた検討から、小腸幹細胞の分化においては、HAT の中でも CBP/p300 よりも GCN5 によるヒストンアセチル化が重要であることが示唆された。

また、マイクロアレイ結果より、分化開始前と比べて分化開始後に Control で発現増大した遺伝子のうち、かつ Control に対して NaB で 2 倍以上発現が高いもの Network 解析したところ、Pro-opiomelanocortin、G protein-coupled receptors、flavin-containing monooxygenase 5 などエネルギー代謝に関与する分子がピックアップされた。

(3) 小腸糖質消化吸収関連遺伝子の発現に対する RS の持続的な効果

RS 食を 2 週間与えたラットの盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の全体量は対照の 3 倍以上あったが、RS を含まない食餌に切り替えてから徐々に減少し 2 日後には対照と有意な差がないレベルであった。iso-Butyric Acid、n-Valeric Acid および iso-Valeric Acid については存在量が少ないものの減少は緩やかであった。

2 週間の RS 食の摂取は、近位空腸の α -グルコシダーゼや糖輸送単体の遺伝子発現を抑制するだけでなく、遠位空腸における GIP 発現と血中 GIP レベルを低下させた。血中 GIP レベルの抑制は RS を含まない食餌に切り替えてから少なくとも 2 日後までも持続しており、このことは、食後の血糖値と脂肪の蓄積に影響を与え、糖尿病や肥満などの代謝性疾患の予防に役立つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rosas-Perez AM, Honma K, Goda T	4. 巻 Jan 24
2. 論文標題 Sustained effects of resistant starch on the expression of genes related to carbohydrate digestion/absorption in the small intestine.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Food Sci Nutr.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09637486.2019.1711362.	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 Yamauchi H, Honma K, Mochizuki K, Goda T	4. 巻 82
2. 論文標題 Regulation of the circadian rhythmic expression of Sglt1 in the mouse small intestine through histone acetylation and the mRNA elongation factor, BRD4-P-TEFb.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1176-1179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1451743.	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 Goda T, Honma K	4. 巻 66
2. 論文標題 Molecular Regulations of Mucosal Maltase Expressions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Gastroenterol Nutr.	6. 最初と最後の頁 S14-S17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPG.0000000000001980.	査読の有無 無
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 Honma K, Oshima K, Takami S, Goda T	4. 巻 7
2. 論文標題 Regulation of hepatic genes related to lipid metabolism and antioxidant enzymes by sodium butyrate supplementation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolism Open	6. 最初と最後の頁 100043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.metop.2020.100043	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 望月和樹、本間一江、竹田裕子、針谷夏代、合田敏尚
2. 発表標題 小腸におけるスクロースの消化吸収関連遺伝子発現のエピジェネティック制御と生活習慣病発症との関連
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木美佑、本間一江、合田敏尚
2. 発表標題 Caco-2における酪酸添加によるスクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子の発現変動
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Suzuki S, Takami S, Honma K, Goda T
2. 発表標題 Effects of butyrate on sucrase-isomaltase gene expression in intestinal epithelial cells.
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木美佑、鈴木彩花、高見紗依子、本間一江、合田敏尚
2. 発表標題 酪酸摂取による小腸二糖類水解酵素遺伝子周辺のヒストンアセチル化の変動
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間一江、合田敏尚
2. 発表標題 糖質の消化吸収を担う遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第49回日本消化吸収学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aratza M. Rosas-Perez, Honma K, Goda T
2. 発表標題 Sustained effect induced by resistant starch on the regulation of the expression of genes related with digestion/absorption of carbohydrates in the small intestine.
3. 学会等名 American Society for Nutrition 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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