

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04052

研究課題名(和文) アンモニアによる腸管恒常性の破綻機序の解明—異常エピジェネティクス制御に着目して

研究課題名(英文) Dysregulation of intestinal homeostasis by ammonia

研究代表者

鈴木 卓弥 (Suzuki, Takuya)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：30526695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸管は、大量の異物が流れ込む場であるため、それらの侵入を防ぐ生体防御(バリア)の最前線を担っている。この腸管バリアの制御が崩れると、炎症を基盤とした種々の疾患につながる。本研究は、腸内細菌の主要な代謝産物であるアンモニアによる腸管恒常性の破綻のメカニズムを明らかにすることを目的とした。一連の研究から、腸管内に異常蓄積したアンモニアは、腸管バリアの主要構造であるタイトジャンクションを損傷すること、この作用はアンモニアが腸管上皮細胞のミトコンドリア機能を損傷し、酸化ストレスを起こすことによって引き起こされることが明らかとなった。本研究成果は、腸管バリア制御の新たなメカニズムを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管バリアの損傷は、炎症性腸疾患だけでなく、代謝性疾患、腎臓病、自閉症スペクトラムなど、様々な疾患の発症や進展に関わることが明らかになり、新たな治療ターゲットとしても注目されてきている。本研究は、アンモニアが腸管バリアのネガティブレギュレーターであることを見出し、その作用機序を明らかにした。広く人の研究に貢献しうることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The intestinal tract is the front line of biological defense (barrier) that prevents the entry of large numbers of foreign substances into the intestine. When the intestinal barrier is out of control, it leads to various inflammation-based diseases. The purpose of this study was to clarify the mechanism of disruption of intestinal homeostasis by ammonia, a major metabolite of intestinal bacteria. A series of studies revealed that ammonia accumulated abnormally in the intestinal tract damages tight junctions, the main structure of the intestinal barrier, and that this effect is caused by ammonia damaging the mitochondrial function of intestinal epithelial cells and causing oxidative stress. The results of this study demonstrate a new mechanism of intestinal barrier regulation.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：食品科学

キーワード：腸管バリア アンモニア タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

腸管は、大量の異物が流れ込む場であるため、それらの侵入を防ぐ生体防御(バリア)の最前線を担っている。腸管バリアは複数の要素のよって構成され、そのなかで上皮細胞の発現するタイトジャンクション(TJ)構造は、上皮細胞間を介する異物の侵入を防ぐ役割をもつ。この腸管バリアの制御が崩れると、炎症を基盤とした種々の疾患につながる。そのきっかけには遺伝的な要因(ゲノム配列の一次情報)だけでなく、腸内環境の変化が深く関わるが、そのメカニズムは十分に明らかでない。ごく最近、私たちは、腸管バリアの損傷を呈する複数の疾患マウス(大腸炎、慢性腎臓病、老齢)において、腸管内でアンモニアの異常蓄積が共通して起きていることを独自に見出した。これらの実験的事実から、アンモニアの蓄積が腸管バリアのネガティブレギュレーターであるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、腸内細菌の主要な代謝産物の1つであるアンモニアによる腸管バリア損傷のメカニズムを明らかにすることを目指し、疾患予防の新たな予防手段の開発を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞を用いた。粘膜側からアンモニアを作用させ、TJバリア機能を解析した。また、ウェスタンブロット法、蛍光免疫染色法、DNA マイクロアレイ法、定量 PCR 法などを併せて実施した。

4. 研究成果

(1) アンモニアによる腸管 TJ バリアへの影響

腸管上皮 Caco-2 細胞にアンモニア(0~60 mM)の濃度で作用させたとき、濃度依存的に TJ バリアの指標である経上皮電気抵抗値の低下、蛍光デキストラン透過速度の上昇が確認され、アンモニアは TJ バリアを損傷することが示された(図1)。このときアンモニアによる細胞死や細胞損傷は確認されなかった。ウェスタンブロット法により TJ タンパク質の発現を調べたところ、アンモニアは ZO1、ZO2、Occludin、Claudin-1、Claudin-3 の発現を低下させた。この低下は、蛍光免疫染色法による解析でも確認された(図2)。

(2) 腸管上皮細胞の網羅的遺伝子発現の解析と酸化ストレスの役割

アンモニアによる腸管上皮 TJ バリアの損傷の要因を探るため、DNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。アンモニアにより 76 と 98 の遺伝子の発現がそれぞれ 2 倍以上に上昇、低下した(図3)。上昇した遺伝子群を抽出して、その変動の生理学的意義を見出すために遺伝子オントロジー解析を行った。結果として、複数のパスウェーがアンモニアより活性化していることが検出された。なかでも「response to reactive oxygen species; 活性酸素種への応答」が特徴的であり、アンモニアが酸化ストレスを引き起こしていることが示唆された(図3)。そこで酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド量を調べたところ、アンモニアによって増加していることが認められた。さらに、抗酸化剤である N-アセチルシステインで Caco-2 細胞を前処理したとき、アンモニアによる腸管 TJ バリア損傷が軽減された(図4)。これらの結果から、アンモニアは腸管上皮の酸化ストレスを引き起こして、腸管バリアを損傷させることが示された。

(3) ミトコンドリア機能への影響

ミトコンドリアは酸化リン酸化によりエネルギー産生を行うため、活性酸素種の産生の主要な場である。ミトコンドリア機能の損傷が起きると、活性酸素種の適切な除去ができなくなり、細胞は過剰な酸化ストレスに暴露される。アンモニアを作用させた腸管上皮 Caco-2 細胞では、細胞内 NADH や ATP が減少し、またミトコンドリアの膜電位の低下も認められ、ミトコンドリア機能障害が確認された。さらに、電子伝達系に関わる遺伝子群の発現を調べたところ、アンモニアにより *Ndufa11*, *Ndufb3*, *Ndufb10*, *Ndus4*, *Uqcrl10* などの遺伝子群が顕著に低下した。一方で、抗酸化剤 N-アセチルシステインは、ミトコンドリアの機能障害や遺伝子発現の低下を抑制しなかった。つまり、アンモニアによる酸化ストレスの増大と腸管バリア損傷は、ミトコンドリア機能障害の下流の減少であることが示唆された。

一連の研究を通して、過剰なアンモニアは腸管バリアのネガティブレギュレーターであること、その分子メカニズムとして、ミトコンドリアの機能障害による酸化ストレスの増大が深く関わることが示された。本研究成果は、複数の炎症性疾患に関わる腸管バリア損傷の新たなメカニ

ムを解明したものであり、疾患予防の新たなアプローチを提案するものと期待される。

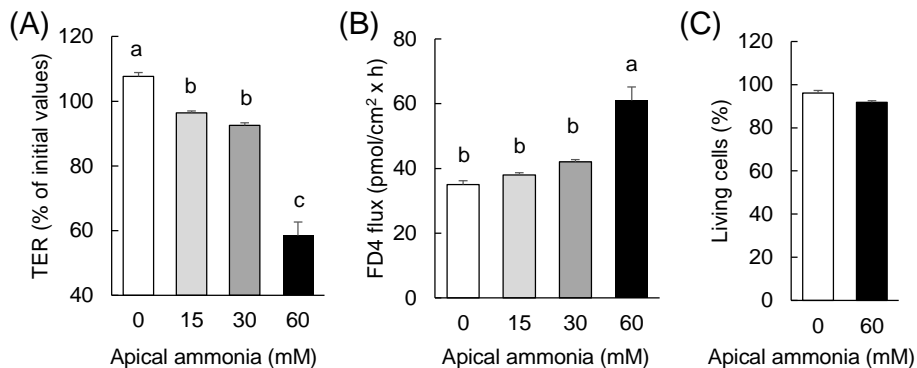


図 1 . ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗値 (A)、蛍光デキストラン透過速度 (B)、細胞生存性 (C)

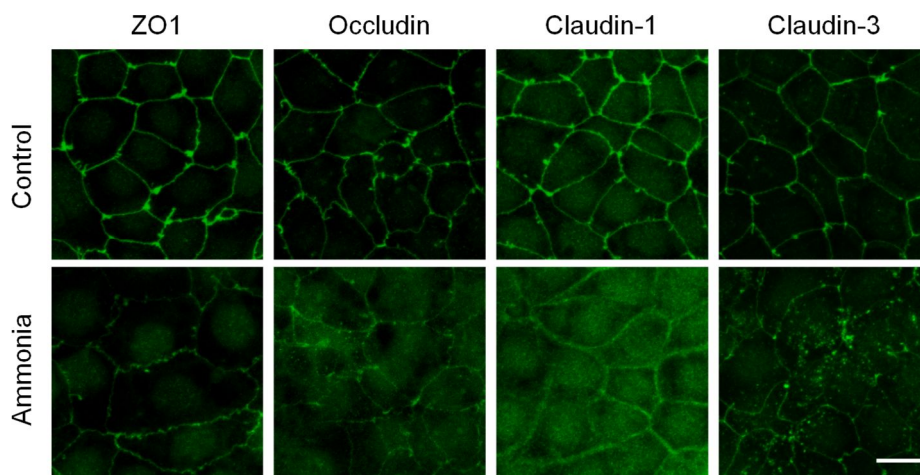


図 2 . ヒト腸管上 Caco-2 細胞の TJ タンパク質の発現局在 (ZO1、Occludin、Claudin-1、Claudin-3)

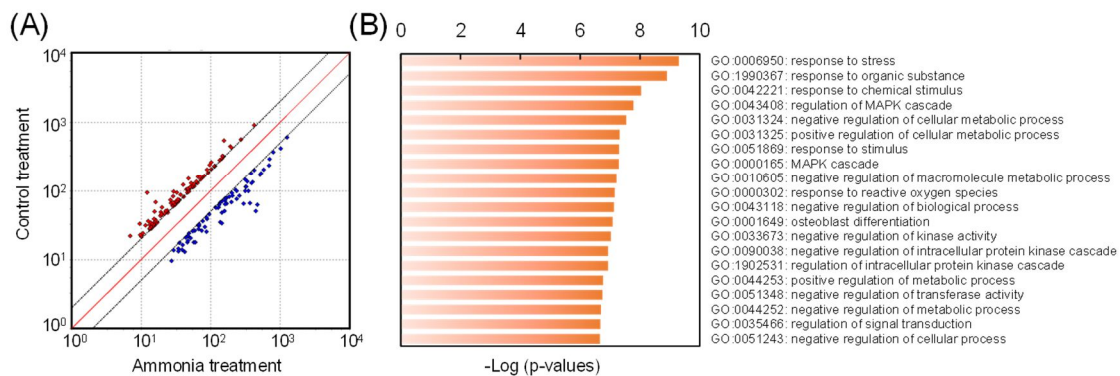


図 3 . DNA マイクロアレイ法による変動遺伝子のプロット (A) 遺伝子オントロジー解析 (B)

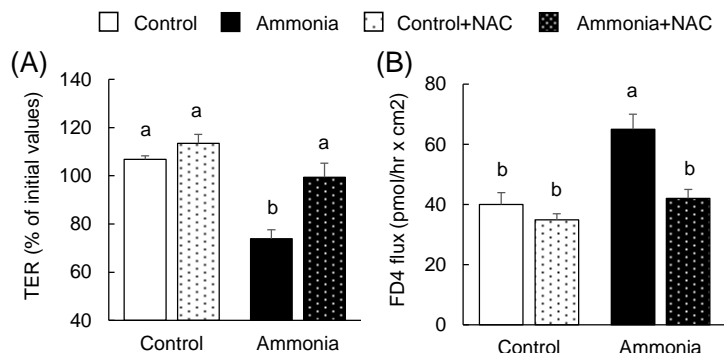


図 4 . ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗値 (A) と蛍光デキストラン透過速度 (B)

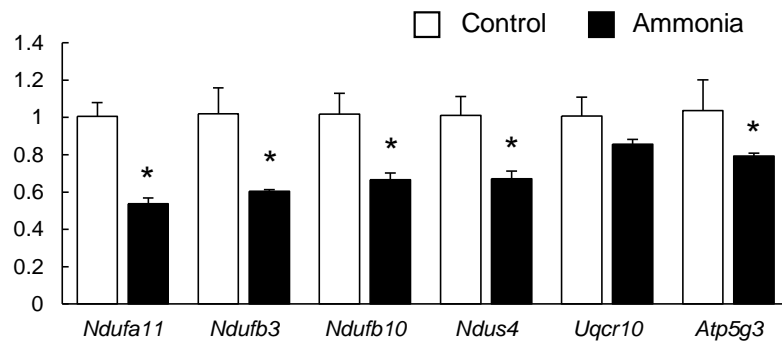


図5. ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の電子伝達系の関連遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mayangsari Yunika, Okudaira Mayu, Mano Chinatsu, Tanaka Yuki, Ueda Osamu, Sakuta Tomohiro, Suzuki Yoshiharu, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 85
2. 論文標題 5,7-Dimethoxyflavone enhances barrier function by increasing occludin and reducing claudin-2 in human intestinal Caco-2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104641 ~ 104641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2021.104641	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 該当する
1. 著者名 Ogawa C., Inoue R., Yonejima Y., Hisa K., Yamamoto Y., Suzuki T.	4. 巻 131
2. 論文標題 Supplemental Leuconostoc mesenteroides strain NTM048 attenuates imiquimod induced psoriasis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 3043 ~ 3055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.15161	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 Guo Mingzu, Xu Wenxi, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 707
2. 論文標題 Curcumin increases heat shock protein 70 expression via different signaling pathways in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108938 ~ 108938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108938	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 Mayangsari Yunika, Sugimachi Natsumi, Xu Wenxi, Mano Chinatsu, Tanaka Yuki, Ueda Osamu, Sakuta Tomohiro, Suzuki Yoshiharu, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 69
2. 論文標題 3,5,7,3',4'-Pentamethoxyflavone Enhances the Barrier Function through Transcriptional Regulation of the Tight Junction in Human Intestinal Caco-2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 10174 ~ 10183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.1c04295	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 該当する

1. 著者名 Xu Wenxi, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 712
2. 論文標題 Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell cycle arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109044 ~ 109044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.109044	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 Adesina Precious Adedayo, Isayama Kana, Sitolo Gertrude Cynthia, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 69
2. 論文標題 Propionate and Dietary Fermentable Fibers Upregulate Intestinal Heat Shock protein70 in Intestinal Caco-2 Cells and Mouse Colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 8460 ~ 8470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.1c03036	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 該当する

1. 著者名 Yokoo Kana, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 35
2. 論文標題 Ammonia impairs tight junction barriers by inducing mitochondrial dysfunction in Caco 2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100758R	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 Sitolo Gertrude Cynthia, Mitarai Aya, Adesina Precious Adedayo, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 84
2. 論文標題 Fermentable fibers upregulate suppressor of cytokine signaling1 in the colon of mice and intestinal Caco-2 cells through butyrate production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2337 ~ 2346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1798212	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 該当する

1. 著者名 Tinh Nguyen Thi Thanh, Sitolo Gertrude Cynthia, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Citrus Limon Peel Powder Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in a Colitic Murine Experimental Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods10020240	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 該当する

1. 著者名 Sakai Yuriko, Arie Hideyuki, Ni Yinhua, Zhuge Fen, Xu Liang, Chen Guanliang, Nagata Naoto, Suzuki Takuya, Kaneko Shuichi, Ota Tsuguhito, Nagashimada Mayumi	4. 巻 247
2. 論文標題 Lactobacillus pentosus strain S-PT84 improves steatohepatitis by maintaining gut permeability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-20-0105	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 Takuya	4. 巻 91
2. 論文標題 Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13357	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 鈴木卓弥	4. 巻 24
2. 論文標題 腸腎連関と食物繊維 - 腸管バリアの関わり -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ルミナコイド研究	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) 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 畑堀翔, 中野智裕, 久景子, 米島靖記, 鈴木卓弥	4. 巻 24
2. 論文標題 乳酸菌Leuconostoc mesenteroides NTM048株が産生する菌体外多糖は乾癬モデルマウスの症状を軽減する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ルミナコイド研究	6. 最初と最後の頁 29~37
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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木卓弥
2. 発表標題 腸管タイトジャンクション重要性と食品成分による制御
3. 学会等名 酪農科学シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田奈々, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 酢酸は腸管上皮の細胞保護タンパク質 HSP27 の発現を高める
3. 学会等名 第 53 回 日本栄養 食糧学会 中国 四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上雄紀, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 低タンパク質食はマウス腸管上皮のタイトジャンクション発現を減少させる
3. 学会等名 第 53 回 日本栄養 食糧学会 中国 四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郭名祖, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 クルクミンは細胞保護タンパク質 HSP70 の発現を高める
3. 学会等名 第 53 回 日本栄養 食糧学会 中国 四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Adesina Precious Adedayo, 山本 祥也, 鈴木 卓弥
2. 発表標題 プロピオン酸は大腸上皮のヒートショックプロテイン70 (HSP70) 発現を高める
3. 学会等名 日本食物繊維学会第25回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諫山 佳奈, 山本 祥也, 鈴木 卓弥
2. 発表標題 プロピオン酸は腸管上皮Caco-2 細胞の内皮細胞選択的 接着分子の発現を高める
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 祥也, 大舘 佳歩, 鈴木 卓弥
2. 発表標題 IgA 誘導におけるClass A CpG オリゴDNA のアジュバント効果
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 知紗, 井上 亮, 久 景子, 米島 靖記, 山本 祥也, 鈴木 卓弥
2. 発表標題 乳酸菌Leuconostoc mesenteroides NTM048 の摂取は マウスの乾癬症状を軽減する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xu Wenxi, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya
2. 発表標題 Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell-cycle arrest
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tran Van Hung, Takuya Suzuki
2. 発表標題 Dietary fermentable fibers reduce the chronic kidney disease through protecting intestinal barrier
3. 学会等名 International Medicine & Health Science Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本徹也、山本祥也、鈴木卓弥
2. 発表標題 腸管上皮バリアの制御に関わる新たな腸内細菌代謝物の探索
3. 学会等名 2019年度ハインドガットクラブジャパンシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adesina Precious Adedayo, Takuya Suzuki
2. 発表標題 Dietary fermentable fibers increase intestinal heat shock protein70 through short chain fatty acids production
3. 学会等名 ICoFF2019/ ISNFF2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横尾佳奈, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 高濃度の腸内アンモニアは腸管上皮バリアを損傷する
3. 学会等名 2019年度日本食物繊維学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川知紗, 久景子, 米島靖記, 山本祥也, 鈴木卓弥
2. 発表標題 Leuconostoc mesenteroides NTM048株の摂取は 乾癬モデルマウスの症状を軽減する
3. 学会等名 2019年度日本食物繊維学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木卓弥
2. 発表標題 腸腎連関と食物繊維 - 腸管バリアとの関わり -
3. 学会等名 2019年度日本食物繊維学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木卓弥
2. 発表標題 慢性腎不全と食物繊維 - 腸管上皮バリアの関わり
3. 学会等名 2019年度日本食品科学工学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木卓弥	4. 発行年 2019年
2. 出版社 建帛社	5. 総ページ数 264
3. 書名 腸内細菌 宿主のクロストークと食事要因 第3章	

〔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	井上 亮 (Inoue Ryo) (70443926)	摂南大学・農学部・教授 (34428)	

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