

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05925

研究課題名（和文）腸管オルガノイド培養系を活用したフラボノイドによる管腔側作用機序の解明

研究課題名（英文）The effect of flavonoid from the mucosal side in intestinal organoids

研究代表者

小酒井 貴晴（Kozakai, Takaharu）

山形大学・地域教育文化学部・理工学研究科・教授

研究者番号：70391480

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）：腸管におけるフラボノイドの機能、特にグルコースなどの栄養成分の吸収能に及ぼす影響を検討するために、従来のUssing-chamber組織培養法と比較しながら、オルガノイド細胞培養系による新規評価法の開発を目指した。成マウスの小腸組織から、幹細胞マーカーLGR5陽性細胞が約2倍多く含まれる単離条件下でオルガノイドを形成させたが、満足な実験操作性を確保できなかった。組織培養において、プロアントシアニンはグルコースと共輸送されるNa⁺流を抑制した。一方で、胆汁酸は小腸では能動的イオン流を促進したが、大腸では抑制した。管腔側からのNa⁺依存性吸収能を詳細に検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイド細胞培養法を改良して栄養素の吸収能を精密に計測しようと試みた。オルガノイドのハンドリングなど十分な実験操作性が得ることができなかったが、オルガノイドの供試した新規実験法の基盤的知見を得ることができた。また、フラボノイドなど、摂食する食成分やそれに対応した分泌成分などの影響を受けることを解明した。これらの結果から、腸管部位ごとのオルガノイド培養系による吸収評価法が必要であることが理解できた。食品栄養成分の腸管における吸収能力をより精密に理解して、ヒトの精密栄養管理技術に貢献する基礎成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the function of flavonoids, the effects of absorption capacity of nutrients such as glucose in the intestinal tract, we aimed to develop a novel method using an organoid cell culture system while comparing it with the conventional Ussing-chamber tissue culture method. Organoids were formed from small intestinal tissue of adult mice under isolation conditions that contained approximately twice as many stem cell marker LGR5-positive cells. However, satisfactory experimental operability was not achieved. In tissue culture, proanthocyanins inhibited Na⁺ flux co-transported with glucose. On the other hand, bile acids promoted active ion transport in the small intestine but inhibited it in the large intestine. It is necessary to study the Na⁺-dependent absorption in each nutrition and/or the chemical substance.

研究分野：栄養生理学

キーワード：腸管上皮 化学受容認識 能動輸送 経上皮短絡電流 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食後の急激な血糖値上昇を抑制する機能性食品や臨床薬として、難消化性デキストリンや二糖類から単糖への分解を抑制するグルコシダーゼ阻害剤が実用化されている。しかし、Na⁺依存的にグルコースを能動的に吸収する腸管 Na⁺/グルコース共輸送体 1(SGLT1)の輸送活性を抑制する因子は、リンゴからフラボノイドの1つであるフロリジン(Phlorizin: フロレチンとグルコースの配糖体)が発見されているものの、医薬品として実用化されていない。もし、Na⁺/グルコース共輸送体 1(SGLT1)を抑制できれば、腸内で分解・生成された単糖のみならず、食品に含まれる単糖さえも吸収抑制できるはずで、血糖値上昇を強力に抑制できるはずである。そこで、フラボノイドなどの食品由来成分による SGLT1 阻害因子を探索すると同時に、その管腔側からの作用機序の解明が重要である。

現在、よく使用される評価系は、1) 正常な腸管上皮細胞やモデルとなるガン細胞を培養容器のシャーレ上に広げる形で培養しており、グルコースが粘膜側からのみ吸収されている確証はない。実際に粘膜側と血液側の仕切り(極性)がないので、どこから吸収・取り込まれているか不明である。また、2) 血液・粘膜側の仕切り(極性)形成のために、インサート式培養試験も開発されているが、標的個体から単離した初代細胞系では培養維持が難しく、実際にはヒト結腸ガン由来の細胞株 Caco-2 細胞を用いられることが多い。さらに、3) 腸管上皮には、幹細胞、内分泌細胞、吸収分泌細胞、杯細胞など様々な細胞が局在しており、それらの細胞間相互作用により、粘膜側と血液側のバリア機能を充実させているが、上記の培養系では、正常な幹細胞を培養できないため、正常な上皮機能を保持している培養とは言いがたい。つまり、この分野の研究の課題は、血液・粘膜側の仕切り形成培養が困難であり、正確なグルコース吸収を *in vitro* 実験系で評価できていないことにある。

2. 研究の目的

急速に解明されているオルガノイド培養系は、上皮幹細胞から増殖した球体の細胞塊で、様々な細胞群で構成されている上に、管腔側と血液側との細胞極性も存在している(文献)。上皮組織の構成細胞である幹細胞・内分泌細胞・吸収分泌細胞などが混在する正常な単層上皮膜を形成するオルガノイドならば、より正常上皮の機能を保持しており、正当な評価が得られることが期待できる。

そこで、本実験の目的を、1) 能動的グルコース吸収能を評価できるオルガノイド実験系を確立させた上で、グルコース吸収阻害機序を解明すること、加えて、従来法である Ussing-chamber 法を用いて、2) グルコース吸収阻害効果を有する食品由来成分、特に有望なフラボノイドやプロアントシアニジンの効果を解明することとした。しかしながら、オルガノイドの新規評価法の確立が困難で遅延してしまったため、3) 加齢などの生理的条件の変化やグルコース以外の管腔側成分による管腔側からの作用機序を従来法である Ussing-chamber 法(文献)で検討することとした。

3. 研究の方法

1) オルガノイド培養系を用いたフラボノイド機能・グルコース新規吸収評価法の確立

正常な単層上皮膜を形成するオルガノイド(球状細胞塊; 内側が粘膜側、外側が血液側)の培養系を用いたグルコース吸収阻害の評価系を構築するために、幹細胞マーカー Lgr5 陽性細胞を多く含む単離フラクションの同定、オルガノイド形成に適した酸素濃度の比較、吸引ピペットによるオルガノイドのハンドリングを検討した。

マウス空腸を滅菌済み生理的食塩水(D-PBS)で10秒間、3回激しく振ることで洗浄した。洗浄した組織片を、EDTAバッファー内で眼科用ハサミを用いて1mm角に小片化した。小片化した組織を8mLのEDTAバッファーを入れた15mL遠沈管に入れ、震盪機を用いて震盪(150rpm、30min、4)した。遠心分離機(500rpm、5min、4)にかけ、組織を沈殿させて上清を破棄した。5mLピペットを用いて氷上で50回ピペッティングし、遠心分離にて組織を沈殿させて上清を回収した。上記の手順を4回繰り返し、フラクションを5つ回収した。抗LGR5抗体(Abcam、OT12A2)と二次抗体(Invitrogen、A-11029)にて免疫化学染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察し、陽性細胞の数をカウントした。最も陽性率が高値であったフラクション3番を供試して、オルガノイドを形成させた。その際に、培養器内の酸素ガス濃度条件を、20%(対照区)と5%(低酸素)で検討した。

2) Ussing-chamber を用いた Na⁺依存性のグルコースに及ぼすフラボノイドの影響

摘出したマウス空腸上皮組織を HEPES 緩衝液(pH7.4、37)で洗浄したのち、腸間膜に沿って切開し、内容物を洗い流した。その後、粘膜側を下にして、組織をコルク付きシャーレに針を用いて固定した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて平滑筋組織を剥離し、上皮標本を作製した。この上皮標本を Ussing-Chamber (組織露出面積: 0.5cm²) に固定した。培養液は 100 % O₂ ガスを通気した HEPES 緩衝液(pH7.4)を用いた。チャンバーの血液側および管腔側の槽を、HEPES 緩

衝液 10 mL で満たした。Na⁺依存性のグルコース吸収量は、短絡電流として短絡電流固定装置（日本光電、CEZ-9100）を用いて測定した。電位差および短絡電流は、AC/DC コンバーター（AD Instruments Pty Ltd, MacLab /8S）を介してパーソナルコンピュータに記録した。実験中は、組織を 37℃ に保ち、電位測定用および電流測定用の電極として、銀-塩化銀電極（WORLD PRECISION INSTRUMENTS）を用いた。電極は、1 M NaCl を含む 2% 寒天で固めた塩橋を介して作成した。試験物質（イソフラボン）は DMSO または実験水に溶解させて、あらかじめ管腔側に添加しておき、30 分後に管腔側へグルコース 10mM になるように添加した。グルコース添加後の短絡電流値の増大量を Na⁺と共輸送されるグルコースとして評価した。

3) Ussing-chamber を用いた Na⁺に依存する他の輸送基質の管腔側機序の解明

摘出した腸管をあらかじめ 95%O₂ + 5%CO₂ ガスを通気させておいた Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液（pH7.4、38℃）で洗浄した後、上皮組織標本を作製し、Ussing-chamber（組織露出面積：0.64cm²）に固定した。各種胆汁酸やアミノ酸を管腔側に添加して短絡電流の変化を測定した。

4. 研究成果

1) オルガノイド培養系を用いたフラボノイド機能・グルコース新規吸収評価法の確立

視野に認められる全細胞中の Lgr5 陽性細胞数（図 1）を測定し、その割合を表したグラフを図 2 に示した。フラクシオン間や標本の作成方法（サイトスピン法または塗布法）に関わらず、フラクシオン 3 で Lgr5 陽性細胞の割合が多くなる傾向が認められた。EDTA バッファ処理の 3 回後のフラクシオンには幹細胞が多く含まれているので、以後の実験ではフラクシオン 3 を用いて実験を実施した。

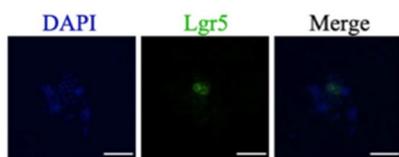


図 1、Lgr5 陽性細胞

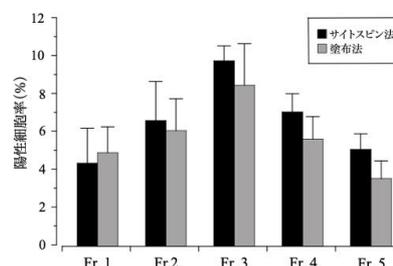


図 2、各フラクシオンにおける陽性細胞率

次に、オルガノイド形成に適した培養環境を設定するために、培養に重要な酸素濃度を検討した。通常の 20% 酸素濃度（5% 二酸化炭素 + 75% 空気）と嫌気性を高めた 5% 酸素濃度（5% 二酸化炭素 + 90% 窒素）で培養して、オルガノイドの直径を計測した（図 3、4）。

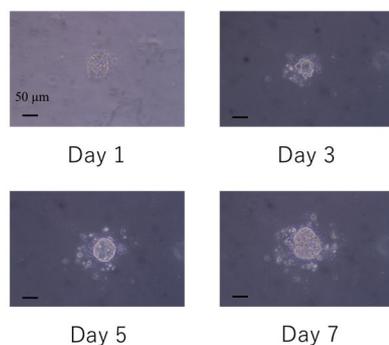


図 3、オルガノイドの成長過程

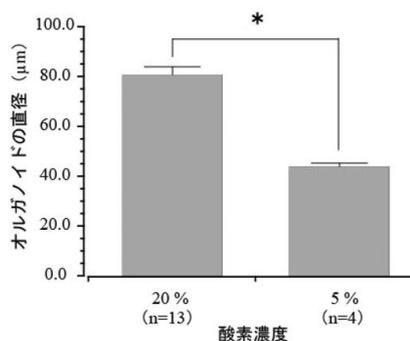


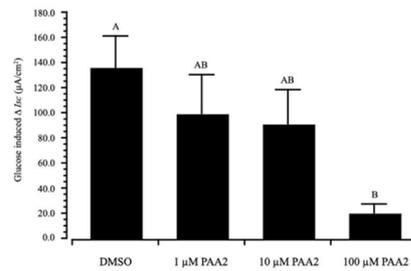
図 4、オルガノイド成長に及ぼす酸素濃度

上記のように、形成させたマウス空腸オルガノイドを倒立顕微鏡下で微小な吸引用ピペットで固定した上で、注入用ピペットを粘膜側（内部）へ挿入して、吸収基質と試験サンプル（食品由来成分）注入することにした。

吸引用ピペットなどは卵移植用ピペットとマニピュレーターを活用した。しかし、持ち上げたり、移動させるなどのハンドリングが難しく、検討が困難であった。ピペットの材質をガラス製品やプラスチック製品などに変更することで硬さによる柔軟性も検討したが、思うようにハンドリングすることができなかった。本研究期間中における研究成果全体を考慮して、期間終盤には、Ussing-chamber（従来法）による管腔側機序の検討を進めることとした。

2) Ussing-chamber を用いた Na 依存性のグルコースに及ぼすフラボノイドの影響

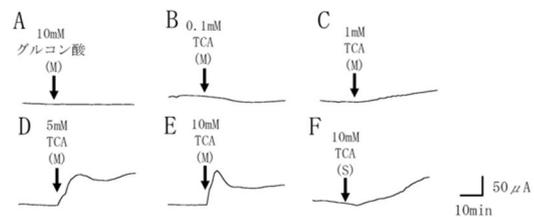
様々なフラボノイドを検討した。特に、プロアントシアニジン-A2 は、グルコース誘導性短絡電流値を強く抑制した。対照区のグルコース誘導性短絡電流値は $136.45 \pm 24.85 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。また、1, 10, 100 μM プロアントシアニジン-A2 処理におけるグルコース誘導性短絡電流値はそれぞれ、 $99.56 \pm 30.82 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $91.46 \pm 27.00 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ および $20.43 \pm 7.48 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった (図 5)。プロアントシアニジン-A2 は能動的グルコース吸収を管腔側から抑制することが示された。



3) Ussing-chamber を用いた Na に依存する他の輸送基質の管腔側機序の解明

グルコース以外にも食品中のアミノ酸や有機酸、肝臓から分泌される胆汁酸などは、小腸で Na^+ 依存的に吸収されていることが知られている。これらの吸収機序や調節機序をグルコースと比較しながら検討することとした。

特に、二次胆汁酸は、大腸において短絡電流値を減少させた。この効果には TGR5 細胞膜上受容体の関与が示された。しかし、一次胆汁酸は小腸の短絡電流を増大させた。しかも、この増大効果は TGR5 細胞膜上受容体の阻害剤では阻害できなかった。この結果は、胆汁酸の吸収機序や認識機序が消化管部位によって異なることを示している。



< 引用文献 >

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J. and Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244): 262-5. (2009)

Lane L. Clarke. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296(6): G1151-G1166. (2009)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shibata M, Takahashi T, Endo K, Kozakai T, Azuma Y, Kurose Y.	4. 巻 57(2)
2. 論文標題 Age-related Regulation of Active Amino Acid Transport in the Ileum of Broiler Chickens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Poult Sci.	6. 最初と最後の頁 131-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190070.	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 Hayashi H, Yamakado M, Yamaguchi M, Kozakai T.	4. 巻 82(4)
2. 論文標題 Leptin and ghrelin expressions in the gastrointestinal tracts of calves and cows.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 475-478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0680.	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 柴田実可子, 高橋辰行, 小酒井貴晴, 黒瀬陽平.	4. 巻 70
2. 論文標題 育成初期の卵用鶏における成長に伴う腸管アミノ酸吸収変化の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東北畜産学会報	6. 最初と最後の頁 7-13
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 Yuko Kuwahara, Kohei Takahashi, Miho Akai, Ikuo Kato, Takaharu Kozakai, Shinji Asano, Toshio Inui, Yoshinori Marunaka, Atsukazu Kuwahara.	4. 巻 147
2. 論文標題 Minimum biological domain of xenin-25 required to induce anion secretion in the rat ileum.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides.	6. 最初と最後の頁 170680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2021.170680	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 Takahashi K, Kuwahara Y, Kato I, Asano S, Kozakai T, Marunaka Y, Kuwahara A.	4. 巻 43
2. 論文標題 Secondary bile acid lithocholic acid attenuates neurally evoked ion transport in the rat distal colon.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 223-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.43.223.	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0件

〔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		
ポーランド	Warsaw University of Life Sciences		