

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08441

研究課題名(和文) カルニチンと中鎖脂肪酸の併用による膵外分泌機能不全と栄養障害の治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment for pancreatic exocrine insufficiency and nutritional disorders by using combination of carnitine and medium-chain fatty acids.

研究代表者

山本 明子 (YAMAMOTO, AKIKO)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授

研究者番号：60402385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重炭酸緩衝液の表層灌流にて 0.45 ± 0.04 nl/mim/mm²の基礎分泌を認め、ラウリン酸の投与で 0.71 ± 0.02 nl/min/mm²と約60%増加し、さらにカルニチン(50 μM)を加えると 0.94 ± 0.04 nl/min/mm²と約30%増加した。表層還流液からグルコースを除くと10分後には水分泌は 0.23 ± 0.03 nl/mim/mm²まで減少したが、C12の投与で 0.52 ± 0.10 nl/mim/mm²まで回復し、さらにカルニチンの投与で 0.61 ± 0.12 nl/min/mm²まで増加した。OCTN2、FABPpm、FATP4、CD36、FFAR1、FFAR4のmRNAが発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中鎖脂肪酸(本研究ではラウリン酸:C12)は、炎症状態下でも安全な優れたエネルギー供給源として役立ち、インスリン抵抗性も改善するため、栄養不良や炎症状態が持続しているようなインスリン抵抗性が増し、糖質利用が低下している病的状態では糖質にとって代わる安全で最適なエネルギー源であることが報告されている。今回の検討では、グルコース非存在下でも、膵導管細胞は中鎖脂肪酸をエネルギー源として利用可能であり、膵臓での水分泌を促し、カルニチンの投与でさらに膵導管細胞での水分泌が増加した。膵外分泌の低下している慢性膵炎などの低栄養状態の患者に中鎖脂肪酸とカルニチンの同時投与は低栄養の改善に大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：In guinea pig pancreatic ducts, the rate of basal fluid secretion was 0.45 ± 0.04 nl/mim/mm² (mean \pm SD, n=5). When C12 (500 μM) was added to the bath, the secretory rate increased by about 60% to 0.71 ± 0.02 nl/min/mm². When carnitine (50 μM) was added to the bath in the presence of C12, the secretory rate increased to 0.94 ± 0.04 nl/min/mm². When glucose was removed from the bath, basal fluid secretion was reduced to 0.23 ± 0.03 nl/mim/mm² (n=3). Addition of C12 in the absence of glucose recovered the secretory rate to 0.52 ± 0.10 nl/mim/mm². Addition of carnitine (50 μM) further increased the secretory rate to 0.61 ± 0.12 nl/min/mm². Messenger RNA expression of OCTN2, FABPpm, FATP4, CD36, FFAR1 and FFAR4 was detected in isolated ducts. The data suggest that pancreatic ducts express fatty acid transporters and receptors and carnitine transporters and produce fluid secretion using fatty acid (C12) as an energy source in the absence of glucose.

研究分野：膵外分泌

キーワード：膵導管細胞 中鎖脂肪酸 カルニチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中鎖脂肪酸は、長鎖脂肪酸とは異なり、脂肪酸結合タンパクに依存せず、速やかに細胞内に取り込まれ、容易にエネルギーとして変換される。それゆえに、心筋や骨格筋のエネルギーとしての重要性が検討され、心筋のエネルギー代謝を促進するとして心筋症に罹患している人の代謝療法として提案されている (Labarthe *et al. Cardiovasc Drugs Ther* 2008)。また、中鎖脂肪酸は炎症関連メディエーターである IL-8 の分泌を転写レベルで抑制した (Hashimoto *et al. British Journal of Pharmacology* 2002)り、リポ多糖に対する免疫応答を調節し、分泌型免疫グロブリン A 発現を増強することによりラットの腸管を保護した (Kono *et al. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004) など炎症状態下でも安全な優れたエネルギー供給燃料として役立つことが報告されている (Hecker *et al. JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2014)。さらに、インスリン抵抗性も改善する (Nowak *et al. Sci Rep* 2018) ため、栄養不良や炎症状態が持続しているようなインスリン抵抗性が増し、糖質利用が低下している病的状態では糖質にとって代わる最適なエネルギー源である。実際の臨床の場合でも、クローン病や短腸症候群の患者、経管栄養などに使用されている。

カルニチンは、酸化のために長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に運搬する役割を担うことで知られるが、中鎖脂肪酸においてもカルニチンがミトコンドリア内への取り込みを促進するという報告もあり、カルニチンは中鎖脂肪酸のエネルギー利用を促進する可能性がある。

体内のカルニチンは 25% が肝臓、腎臓、脳などでアミノ酸のリジンとメチオニンから生合成され、75% が食事から摂取される。カルニチンの体内への取り込みは、小腸・大腸に分布するカルニチントランスポーター OCTN2 (一部自然拡散的) による。加齢に伴う生合成能力の低下や食事量の減少に伴い、高齢になるほど筋肉中のカルニチン濃度が低下する (Costell *et al. Biochem Biophys Res Commun* 2018)。また、消化吸收機能が低下している疾患ではカルニチン欠乏が起きやすいと言われているが、カルニチン欠乏が消化吸收機能にどのような影響を与えるかは検討された報告はなく、不明である。

CFTR は、上皮細胞 (膵臓では導管細胞) の管腔膜に発現する cAMP 依存性陰イオンチャネルである。cystic fibrosis では、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) を原因遺伝子とし、気道、膵管、消化管などの上皮膜の陰イオン輸送が障害される。膵導管細胞からの HCO_3^- ・水分分泌は CFTR に依存しており、cystic fibrosis や慢性膵炎では CFTR の機能異常により、膵腺房細胞が萎縮し、膵酵素の分泌が減少する。また、膵導管細胞からの HCO_3^- 分泌は減少し、小腸管腔内の pH の低下による消化酵素 (特にリパーゼ) の酵素活性が低下するため、脂質や蛋白質の吸収不良が生じ、低栄養状態になる。日本での平均生存期間は 21.8 年と非常に予後が悪いが、適切な栄養管理により予後の改善が報告されている。このような膵外分泌機能が障害された栄養障害の治療法としての中鎖脂肪酸の役割は検討されていない。

2. 研究の目的

膵液中の高濃度の HCO_3^- を含むアルカリ性の液体成分は導管の上皮細胞 (導管細胞) から分泌される。導管細胞からの HCO_3^- 分泌は apical membrane に局在する CFTR が関与するが、 HCO_3^- の分泌エネルギーは basolateral membrane に局在する ATP を利用する Na^+ - K^+ pump である。 Na^+ - K^+ pump 活性は HCO_3^- 分泌に完全に依存しているので、 HCO_3^- 分泌を測定することは Na^+ - K^+ pump 活性の測定と同義語として考えることができる (Ishiguro *et al. J Physiol* 1998; Yamaguchi, Yamamoto *et al. J Physiol* 2017)。中鎖脂肪酸はカルニチンとの共同で脂肪酸を効率よく酸化することによってエネルギーを蓄え、 Na^+ - K^+ pump の駆動力を上げることにより膵外分泌を促進していると想定している。

本研究では、膵導管細胞に脂肪酸受容体や脂肪酸トランスポーターの発現の有無、膵導管細胞の HCO_3^- ・水分分泌において、カルニチンは中鎖脂肪酸の膜輸送を促進し、中鎖脂肪酸のエネルギー利用を促進することができるのか、中鎖脂肪酸のみをエネルギー源として使用し、 HCO_3^- ・水分分泌を行うことができるのか、中鎖脂肪酸が細胞内 pH や細胞内 Ca^{2+} シグナリングに及ぼす影響、以上を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モルモット膵臓および単離小葉間膵管から mRNA を抽出し RT-PCR 法にて、OCTN2、FABPpm、FATP4、CD36、FFAR1、FFAR4 の発現を検討した。

(2) モルモットから膵臓を摘出し、コラゲナーゼで処理した後、実体顕微鏡下で直径約 100 μm の小葉間膵管を単離した。5% CO_2 存在下で 37 $^{\circ}\text{C}$ にて約 3 時間培養すると、両端が自然に閉じて内腔に分泌液が貯留した状態となる。内腔に分泌液が貯留した膵管を倒立顕微鏡のステージ上で、37 $^{\circ}\text{C}$ で HCO_3^- CO_2 緩衝液にて表層還流し、経時的に明視野像を取得し、管腔内容積の変化から水分分泌速度を求め、膵管上皮の単位表面積あたりで表した。低濃度ラウリン酸 (C12: 500 nM) および高濃度ラウリン酸 (C12: 500 μM) に対する HCO_3^- ・水分分泌を測定した。また、グルコースを含まない HCO_3^- CO_2 緩衝液で表層還流し、ラウリン酸 (C12: 500 μM) に対する HCO_3^- ・水分分泌を測定した。

実験条件

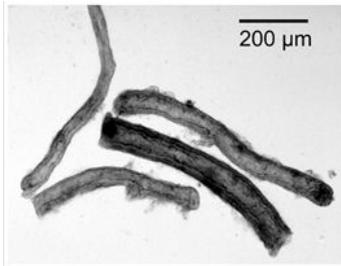
Primer

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>Slc22a5</i>	GTGAACGGCTTTCTTCTGC	GTGAGGATGGCTGTCCAGGAT
<i>Got2</i>	GTTACGCCGTGATGTCTACC	GCAAAACATTAATGCCCTGTT
<i>Slc27a4</i>	GCCCTAATCTTCGAGGGTACAG	AGGCTGGTATGGATCTCACAGA
<i>Cd36</i>	AATGCAAGGAAGGAAACCT	AGATTTCACCACCAAGC
<i>Ffar1</i>	CTGCTTACGCTGCTTTTGTG	ACTCTGGGATGGTCTCTCT
<i>Ffar2</i>	CACCCAAGAGCAGCTAGACC	GCACCACCGAAGAAGAGAAG
<i>Ffar4</i>	AGTTCTGATGGAAGCGGAGA	TTTTCTCCATTGTTCTCTG
<i>Gpr84</i>	CCAGTGATGGGATTTCTGCT	CAGCAACCATGTGAACAACC

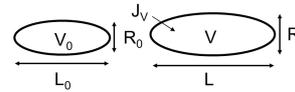
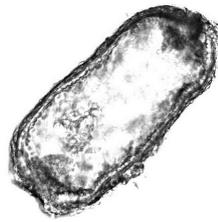
PCR反応条件

96°C 5min
 96°C 25sec
 60°C 50sec
 72°C 50sec
 72°C 7min
 } 35 cycles

培養前



培養後



$$R/R_0 \approx L/L_0$$

$$V/V_0 = (A/A_0)^{1.5}$$

$$J_v = (V_{n+1} - V_n)/E$$

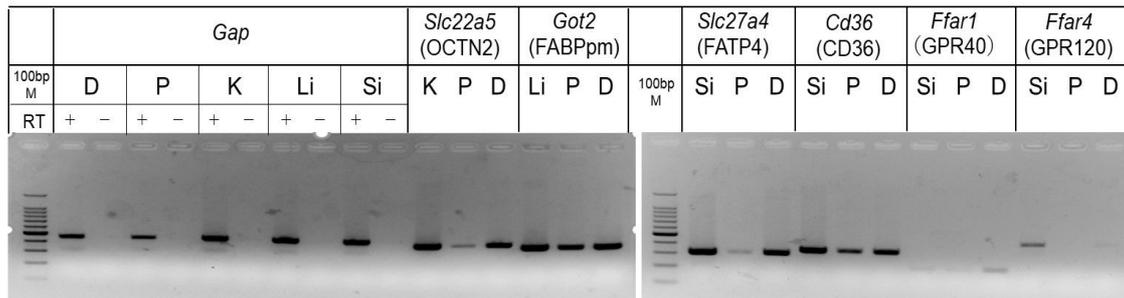
J_v : Fluid secretory rate per unit area of epithelium ($\text{nl min}^{-1} \text{mm}^{-2}$)
 E: Luminal surface area of the epithelium

(3) pH感受性色素である BCECF を細胞内に負荷して脂肪酸が細胞内 pH に与える影響を検討した。

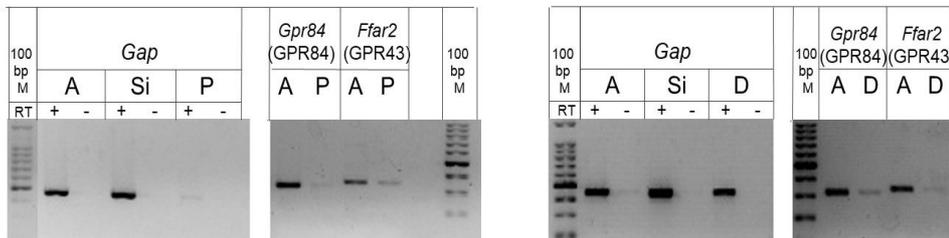
(4) Ca^{2+} 感受性色素である Fura-2 を用いて細胞内に負荷し、脂肪酸が細胞内 Ca^{2+} イオン濃度に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) モルモット全臓および膵導管細胞における脂肪酸受容体および脂肪酸トランスポーターの発現について検討した。



D: pancreatic duct, P: pancreas, K: kidney, Li: liver, Si: small intestine +: RTあり -: RTなし



A: Appendix, Si: small intestine, P: pancreas, D: pancreatic duct, +: RTあり -: RTなし

単離膵管にカルニチントランスポーターである *Slc22a5*(OCTN2)や長鎖脂肪酸のトランスポーターである *Got2*(FABPpm), *Slc27a4*(FATP4), *Cd36*(CD36)の発現を認めた。また、中鎖脂肪酸の受容体である *Ffar1* (GPR40) および長鎖脂肪酸の受容体である *Ffar4*(GPR120)の受容体がわずかに発現していた。カルニチントランスポーターである *Slc22a5*(OCTN2)、長鎖脂肪酸のトランスポーターである *Slc27a4*(FATP4)および中鎖脂肪酸の受容体である *Ffar1* (GPR40) 長鎖脂肪酸の受容体である *Ffar4*(GPR120)は、全膵臓の発現より、単離膵管の発現が強く、主に膵

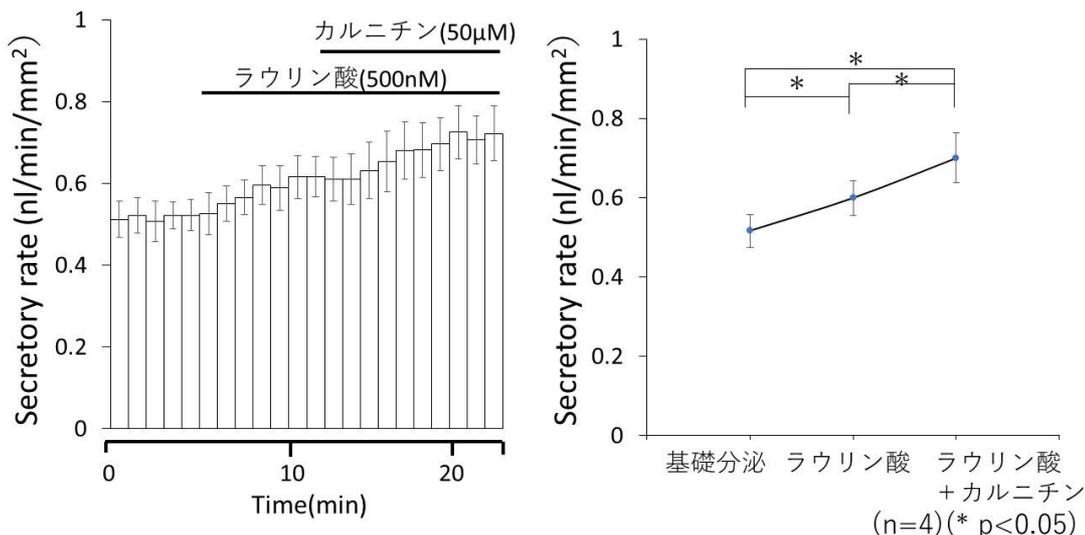
導管細胞で発現していると考えられた。

長鎖脂肪酸のトランスポーターである *Got2*(FABPpm)や *Cd36*(CD36)は全膵臓でも単離膵管でも強く発現していた。

(2) 脂肪酸やカルニチンがモルモット単離膵導管細胞の HCO_3^- ・水分泌へ与える影響

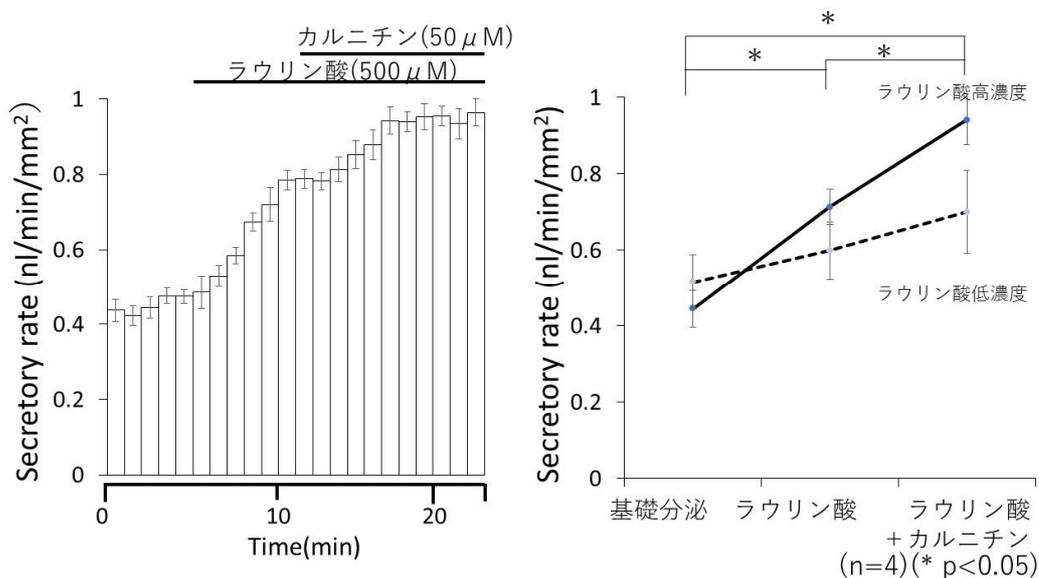
) 低濃度 (500 nM) のラウリン酸とカルニチンが膵導管細胞の HCO_3^- ・水分泌に与える影響

37 の HCO_3^- - CO_2 緩衝液で表層還流すると $0.52 \pm 0.04 \text{ nl/mim/mm}^2$ (mean \pm SE, n=4) の基礎分泌を認め、ラウリン酸 (500 nM) の投与により $0.60 \pm 0.04 \text{ nl/min/mm}^2$ と約 20% 水分泌は増加 (P < 0.05) し、さらにカルニチン (50 μM) を加えると $0.70 \pm 0.06 \text{ nl/min/mm}^2$ と約 20% 増加した (P < 0.05)。



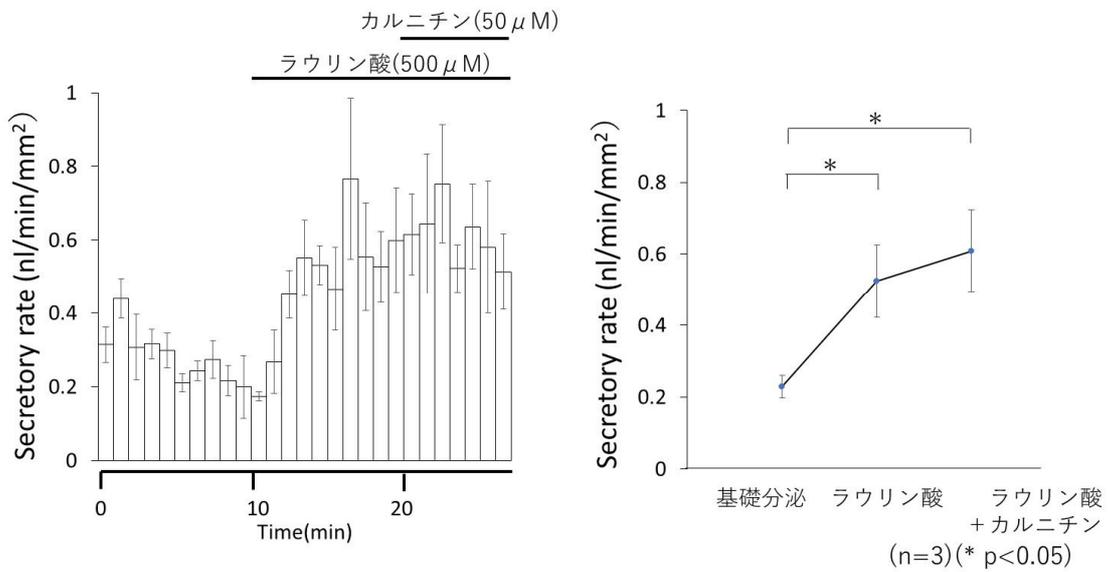
) 高濃度 (500 μM) のラウリン酸とカルニチンが膵導管細胞の HCO_3^- ・水分泌に与える影響

37 の HCO_3^- - CO_2 緩衝液で表層還流すると $0.45 \pm 0.02 \text{ nl/mim/mm}^2$ (mean \pm SE, n=5) の基礎分泌を認め、ラウリン酸 (500 μM) の投与により $0.71 \pm 0.02 \text{ nl/min/mm}^2$ と約 60% 水分泌は増加 (P < 0.05) し、さらにカルニチン (50 μM) を加えると $0.94 \pm 0.04 \text{ nl/min/mm}^2$ と約 30% 増加した (P < 0.05)。



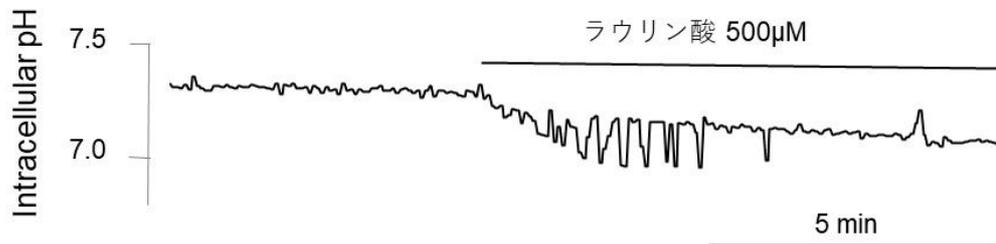
) 膵導管細胞が中鎖脂肪酸のみをエネルギー源として HCO_3^- ・水分泌を行うことができるかどうかの検討

表層還流液からグルコースを除くと、徐々に基礎分泌は低下し、10 分後には $0.23 \pm 0.03 \text{ nl/mim/mm}^2$ (mean \pm SE, n=3) にまで減少した。ラウリン酸 (500 μM) の投与により $0.52 \pm 0.10 \text{ nl/mim/mm}^2$ まで回復し (P < 0.05)、さらにカルニチン (50 μM) の投与で $0.61 \pm 0.12 \text{ nl/mim/mm}^2$ まで増加した。



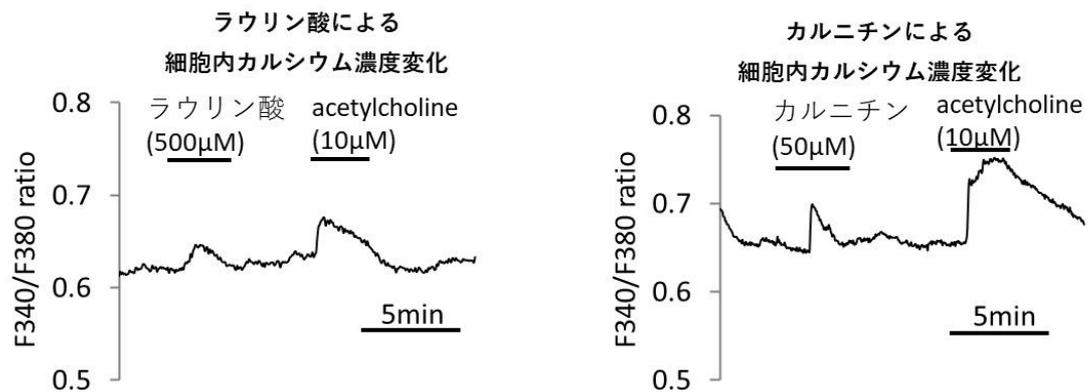
(3) ラウリン酸の細胞内 pH に与える影響

表層還流液にラウリン酸を投与すると細胞内 pH は低下した。



(4) ラウリン酸およびカルニチンが単離細胞内 Ca²⁺イオン濃度に与える影響

表層還流液にラウリン酸とカルニチンを投与すると両者ともに膵導管細胞の細胞内 Ca²⁺イオン濃度を上昇させた。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 石黒 洋、藤木理代、近藤志保、中莖みゆき、小澤祐加、谷口いつか、成瀬 達、山本明子	4. 巻 40臨時増刊特大号
2. 論文標題 膵炎大全 ~膵炎・Up to date ~【膵炎大全~もう膵炎なんて怖くない~】コラム : 嚢胞性線維症に伴う膵外分泌不全	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 1299 - 1302
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 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 H. Ishiguro, M. Yamaguchi, and A. Yamamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of Pancreatic Fluid and Electrolyte Secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreapedia	6. 最初と最後の頁 1 - 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3998/panc.2021.05	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 山本明子、野村奈央、中莖みゆき、持丸由香、谷口いつか、Liu Libin、小澤祐加、樋口万佑子、丹羽永理奈、石黒 洋	4. 巻 42
2. 論文標題 膵癌、膵炎の病態解明と新規治療開発にむけた研究の最前線 膵内・外分泌機能と亜鉛	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 745 - 750
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 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村奈央、山本明子、中莖みゆき、谷口いつか、石黒 洋
2. 発表標題 マウス単離小葉間膵管の水分泌に亜鉛欠乏が及ぼす影響
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本明子、野村奈央、中莖みゆき、谷口いつか、樋口万佑子、Liu Libin、石黒 洋
2. 発表標題 ワークショップ7「膵炎研究の最前線：基礎から臨床へ」マウス単離小葉間膵管の水分泌に亜鉛欠乏がおよぼす影響
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口万佑子、石黒 洋、山本明子、中莖みゆき、谷口いつか、野村奈央、Libin Liu、丹羽永理奈
2. 発表標題 膵導管細胞は脂肪酸 transporter/receptor を発現し脂肪酸は水分泌のエネルギー源となる
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本明子、樋口万佑子、石黒 洋
2. 発表標題 ワークショップ2「臨床の基盤になる膵臓の発生、解剖、生理、病理の新知見」モルモット単離小葉間膵管の水分泌に中鎖脂肪酸とカルニチンがおよぼす影響
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本明子、樋口万佑子、野村奈央、中莖みゆき、小澤祐加、丹羽永理奈、谷口いつか、山口誠、石黒 洋
2. 発表標題 胆汁酸と細胞外pHはGPR40による脂肪酸センシングに影響を及ぼす
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会 DDW-Japan2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 H. Ishiguro, A. Yamamoto and M.C. Steward	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 6
3. 書名 Encyclopedia of Gastroenterology 2nd Edition (E.J. Kuipers)	

1. 著者名 H. Ishiguro, M. Yamaguchi, A. Yamamoto	4. 発行年 2021年
2. 出版社 American Pancreatic Association	5. 総ページ数 11
3. 書名 The Pancreas: Biology and Physiology	

1. 著者名 石黒 洋、中莖みゆき、小澤祐加、山本明子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 5
3. 書名 膵臓症候群	

〔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	石黒 洋 (ISHIGURO HIROSHI) (90303651)	名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授 (13901)	

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