

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：35305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22700768

研究課題名(和文) 大腸炎ラットにおけるペプチド輸送担体の大腸異所発現の機構解明とペプチド食の影響

研究課題名(英文) Intestinal peptide transporter expression and influence of a peptide diet in colitis rats

研究代表者

白神 俊幸 (SHIRAGA, TOSHIYUKI)

ノートルダム清心女子大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：70363596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患時の腸管ペプチド輸送担体(PEPT1)の発現異常機構を調べる目的で、ヒト腸管Caco-2細胞単層培養系を用いて検討した結果、サイトカインのIL-6およびTNF- α がPEPT1の発現をmRNAレベルで調節していた。リポ多糖刺激により、PEPT1たんぱく質の有意な低下がみられ、これはたんぱく質の合成低下、あるいは分解亢進によることが示唆された。また、酸化ストレス負荷下において、PEPT1 mRNAは低下し、細胞間接着の低下が関わると考えられた。一方、大腸炎ラットにおいて食餌が血液指標などに与える影響を検討したが、ペプチド食の特異的な影響はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism underlying the aberrant expression of the intestinal peptide transporter PEPT1 in inflammatory bowel disease was investigated using the human intestinal Caco-2 cell monolayer. PEPT1 expression was regulated by TNF- α and IL-6 at the mRNA level. A significant reduction in the levels of PEPT1 was observed after lipopolysaccharide stimulation, suggesting that this might be attributed to increased degradation or reduced synthesis of the PEPT1 protein. Additionally, PEPT1 mRNA levels decreased under oxidative stress conditions and are thought to be involved in the decrease in cell-cell adhesion. The effects of diet on the plasma index of the colitis rats were studied, but no peptide diet-specific influence was observed.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：PEPT1 炎症性腸疾患 大腸炎ラット Caco-2細胞 サイトカイン LPS 酸化ストレス ペプチド

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患は、未だ詳細な発症メカニズムが明らかにされていない難治性の疾患である。現在のところ、消炎鎮痛剤などの薬物療法と栄養・食事療法による症状の改善および寛解期の維持が主である。したがって、より効果的な治療法の確立が望まれる。興味深いことに、本疾患患者や実験的大腸炎ラットにおける報告から、小腸ペプチド輸送担体 (PEPT1) の大腸における異所性発現が炎症の誘発や悪化に、小腸における発現低下が栄養障害に深く関与することが推測され、これらの背景にインターフェロン- γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-1 (IL-1) などの炎症性サイトカイン類や大腸菌由来のリポ多糖 (LPS) が関与すること、また PEPT1 が大腸菌由来の好中球遊走ペプチドを輸送することを示唆するデータも蓄積されてきている。

本疾患の発症メカニズムについては不明な点が多いが、発症の要因として酸化ストレスの影響も考えられている。実際、患者を対象とした研究で、末梢白血球による活性酸素過剰産生、病変組織内の活性酸素過剰発生、および炎症性サイトカインの分泌亢進が報告されている。これらのことは、体内で過剰産生された活性酸素による酸化ストレスや過剰に分泌されたサイトカインが炎症を誘発・悪化させ、PEPT1 の発現にも影響を与えることによって、悪循環が助長されている可能性を示唆する。

以上より、炎症性腸疾患における PEPT1 の発現調節メカニズムを解明することは、炎症抑制や栄養状態改善を目指した、より効果的な治療法を考えるうえで有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性腸疾患時の大腸異所発現および小腸発現低下のメカニズムに関して、ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の単層培養を用いた *in vitro* モデル系で炎症性サイトカイン、LPS および酸化ストレス負荷を模倣した過酸化水素 (H_2O_2) の添加の影響を PEPT1 遺伝子およびたんぱく質レベルで検討すること、実験的大腸炎誘発ラットを用いた *in vivo* の系でペプチド食摂取が血中成分値および病態へ与える影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞は、10%ウシ胎児血清含有 DMEM (Dullbecco's Modified Eagle's Medium) 中で 5%CO₂ 環境下において培養し、2~3 日ごとに継代した。透過性膜 (6-well Transwell、コーニング) 上に 4.67×10^5 /well で播種し、14 日間単層培養することにより分化させ、刷子縁膜と側底膜の

極性が形成されたものを実験に用いた。また、細胞間の接着強度 (タイトジャンクションの形成) と分化度をみるために、膜抵抗値 (TEER) を測定した。

(2) サイトカイン類、LPS、NF- κ B 阻害剤および過酸化水素 (H_2O_2) の添加

サイトカイン類 (IL-1、IL-6、IL-8、IFN- γ 、TNF- α) は 50 ng/ml の最終濃度で側底膜側の培養液に添加し、LPS は 100 ng/ml の最終濃度で刷子縁膜側あるいは側底膜側の培養液に添加した。その後、48 時間培養した。NF- κ B 阻害剤実験においては、NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7082、メルク) によるプレトリートメントを 10 μ M の濃度で 1 時間行った後、LPS 添加培養液に置換し、48 時間培養した。 H_2O_2 添加実験においては、側底膜側の DMEM 中に、最終濃度が 0 mM、1 mM、あるいは 4 mM となるように添加した。その後、2 時間、あるいは 24 時間培養した。

(3) リアルタイム RT-PCR 解析

細胞から NucleoSpin RNA/Protein (タカラバイオ) を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq II および Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いたリアルタイム PCR により、PEPT1 mRNA の発現量を定量した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

(4) 免疫沈降、ウエスタンブロット解析

上述の NucleoSpin RNA/Protein を用いて細胞より総たんぱく質を抽出した。総たんぱく質 (250 μ g) と抗ヒト PEPT1 抗体 (rabbit polyclonal antibody、サンタクルズ) を用いて、PureProteome Protein G Magnetic Beads (ミリポア) により免疫沈降を行った。免疫沈降後の PEPT1 たんぱく質をウエスタンブロットし、2000 倍希釈の一次抗体 (goat polyclonal antibody、サンタクルズ)、5000 倍希釈の二次抗体 (donkey α -goat IgG、サンタクルズ) による抗原抗体反応後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア) を用いて化学発光検出し、画像解析により発光強度を測定した。

(5) 動物実験

Wistar 系ラット (雄、6 週齢、日本チャールス・リバー) を一週間馴化飼育したのち、5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS、MW: 5000、和光純薬工業) を含む水道水 (DSS) を一週間自由飲水させ、大腸炎を誘発した。コントロール群には水道水 (Cont) を自由飲水させた。この期間、AIN-93G のたんぱく質源を 20% フジプロ-F (不二製油) あるいはハイニート-AM (不二製油) に置換した大豆たんぱく質食 (Pro) あるいは大豆オリゴペプチド食 (Pep) を自由摂取させた。その間、

採餌量、体重、便性状の確認を行った。その後、麻酔下で全採血し、血清・血漿分離および腸管組織の採取を行った。なお、本実験は、ノートルダム清心女子大学動物実験委員会承認を得て実施された。

4. 研究成果

(1) 各種サイトカイン類による影響

PEPT1 mRNA レベルにおいては、TNF- 添加群でコントロールに比べ PEPT1 発現が有意に低下、IL-6 および IL-8 添加群で有意な発現上昇がみられた。PEPT1 たんぱく質レベルにおいては、IFN- および TNF- 添加群で有意な発現低下、IL-1 および IL-6 添加群で有意な発現上昇がみられ、TNF- および IL-6 添加群では mRNA レベルとたんぱく質レベルで同様の挙動を示した。これらの結果より、IL-6 が PEPT1 の発現増加に関与し、大腸異所性発現の引き金となる可能性と、TNF- が下部小腸における PEPT1 の発現低下に関与する可能性が考えられた。

以上より、IL-6 および TNF- による PEPT1 発現への影響に関して、*in vivo* における現象を部分的に説明できるエビデンスが得られた。しかし、他に報告されている知見と異なる挙動を示すサイトカインもあり、実験条件などの更なる検討が必要である。

(2) LPS による影響

Caco-2 細胞の刷子縁膜側および側底膜側の LPS 刺激により、PEPT1 の mRNA レベルには有意な変化がみられなかった。しかし、たんぱく質レベルにおいては、側底膜側に LPS を添加することにより PEPT1 発現の有意な低下がみられた。この結果より、Caco-2 細胞における LPS による PEPT1 の発現調節は、mRNA レベルではなく、たんぱく質レベルで行われており、側底膜側からの刺激に特異的に反応していることが示唆された。

また、本実験では、全細胞抽出液を用いて検討しているため、LPS 刺激による PEPT1 たんぱく質の発現低下に細胞膜へのソーティングの変化が関与している可能性は考えにくく、新規たんぱく質合成の低下、あるいはたんぱく質分解系の亢進による可能性が考えられた。

(3) LPS 刺激に対する NF- κ B 阻害の影響

上述の結果を受け、LPS シグナルの下流において活性調節を受けることが知られている転写因子 NF- κ B を阻害した際の PEPT1 発現に与える影響を検討した。その結果、側底膜側に LPS を添加することで有意な発現低下が認められていた PEPT1 たんぱく質レベルは、LPS 添加前に 10 μ M の BAY11 でプレトリートメントを行うことにより、BAY11 の添加濃度に依存してコントロール群のレベルまで回復することが明らかとなった。このことから、LPS 刺激により活性化される NF- κ B のシグナルの下流において、PEPT1 たんぱく質の合成

の低下、あるいは分解の亢進のどちらかが影響していることが示唆された。

したがって、実験的にゴルジ体を破壊する場合と微小管を破壊する場合の両条件下において、BAY11 によるプレトリートメントの有無と LPS 添加の有無の影響を調べ、PEPT1 たんぱく質の変化が新規に合成されたものと既に合成されたもののどちらに依存しているのか検討する予定である。

(4) H₂O₂ による酸化ストレス負荷の影響

H₂O₂ 添加による PEPT1 発現への影響については、mRNA 発現レベルは H₂O₂ 4 mM 添加群の添加 24 時間で有意な低下がみられた。また、たんぱく質発現レベルも mRNA と同様に 4 mM 添加群の添加 24 時間で低下した。一方、H₂O₂ 1 mM 添加群や添加 2 時間では、このような現象は起こらなかった。これらの結果より、酸化ストレス負荷下における PEPT1 発現の調節は mRNA レベルで行われており、過度の酸化ストレスへの長時間の曝露が PEPT1 発現量を低下させることが明らかとなった。

そこで、H₂O₂ 添加によって生存細胞数が減少しているのか否か確認するため、トリプシン処理し回収した細胞を血球計算盤で計測したところ、生存細胞数はどの群においても差異はなかった。一方、TEER 値は、4 mM 添加群の添加 24 時間で有意に低下していた。

これらの結果より、本条件下の酸化ストレスは細胞生存率には影響を与えず、細胞接着強度が低下したことが引き金になり、PEPT1 発現に影響を与えたのではないかと考えられた。

今後は、ヒト PEPT1 遺伝子プロモーター・ルシフェラーゼキメラ遺伝子を導入した Caco-2 細胞を上記の条件で培養し、プロモーター解析を行い、転写活性調節への影響について検討する予定である。

(5) ペプチド食摂取が大腸炎ラットの各種パラメーター(血液成分値、栄養状態、病態等)へ与える影響

DSS 投与の DSS/Pro 群および DSS/Pep 群において、摂餌量の減少に伴う体重停滞と減少がみられた。また、DSS 投与 2 日目より下痢が出現し、さらにその後血便が認められるようになった。次に各種血液指標について検討した結果、Cont 群に対して DSS 群で変化する傾向がみられた主なものは、アルブミン・血糖・中性脂肪・カルシウム・ナトリウム・カリウム(低下)、遊離脂肪酸・マグネシウム・炎症マーカーの C 反応性たんぱく(増加)であった。

以上より、Cont/Pro 群および DSS/Pro 群、Cont/Pep 群および DSS/Pep 群において、DSS 投与による栄養障害や症状悪化は明らかであったが、一部を除き、これらの変化に対する Pep 食の特異的な影響はみられなかった。体内のたんぱく質栄養状態、糖や脂質の代謝異常に DSS 群における摂餌量の減少が大きく

関わったと考えられるが、小腸 PEPT1 の発現低下もその一因であることが考えられる。今後、今回検討した血液指標以外のパラメータについても調べるとともに、PEPT1 以外の各種栄養素輸送担体の発現変動と栄養状態および病態との関連性についても解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

Shiraga, T. and Inoue, Y. Influence of lipopolysaccharides on the expression of human peptide transporter (PEPT1) in intestinal Caco-2 cell monolayers. 35th ESPEN Congress, Leipzig, Germany (September, 2013)

井上結貴、渡邊みり、白神俊幸。ヒト腸管細胞株の PEPT1 発現に与えるリポ多糖の影響。第 9 回日本栄養改善学会中国支部学術総会(2013年6月 倉敷)

白神俊幸、井上結貴、田中知実、國本あゆみ。ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞におけるペプチド輸送担体 PEPT1 の発現におよぼすリポ多糖の影響。第 66 回日本栄養・食糧学会大会(2012年5月 仙台)

井上結貴、白神俊幸。ヒト腸管由来 Caco-2 細胞におけるペプチド輸送担体の mRNA 発現に与える炎症性サイトカインの影響。第 14 回日本病態栄養学会年次学術集会(2011年1月 横浜)

白神俊幸、井上結貴、井上里加子、山本浩範、武田英二。炎症性腸疾患とペプチドトランスポーター。第 5 回トランスポーター研究会年会(2010年7月 東京)

白神俊幸、井上里加子、山本浩範、武田英二。ヒト炎症性腸疾患モデル細胞におけるペプチド輸送担体および関連分子の遺伝子発現調節。第 64 回日本栄養・食糧学会大会(2010年5月 徳島)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ndsu.ac.jp/department/food/staff.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

白神 俊幸 (SHIRAGA, Toshiyuki)

ノートルダム清心女子大学・人間生活学部・准教授

研究者番号： 70363596