

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700909

研究課題名(和文)非経腸栄養時の小腸機能回復に及ぼす栄養素の役割

研究課題名(英文)Role of nutrients against intestinal functions recovery under non-enteral nutrition state

研究代表者

鈴木 拓史 (Suzuki, Takuji)

山形大学・教育文化学部・助教

研究者番号：50587110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非経腸栄養法モデル動物を用いて、非栄養素流入時の絨毛萎縮機構と機能低下時からの栄養素再投与に伴う小腸機能回復機構について解析を行った。非経腸栄養時の絨毛萎縮機構には細胞増殖に関連するmTOR経路の活性低下と細胞周期関連遺伝子(Cyclins)の発現低下が関与する可能性が示唆された。また、栄養素再投与に伴い、小腸の主機能である栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子のほとんどがその発現を増大させ、その効果は再投与する栄養素の種類(糖質、脂質、アミノ酸)や栄養素の質(グルコース、フルクトース、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸、グルタミン、アルギニン)の違いにより大きく異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed underlying mechanism of villus atrophy by non-influx of nutrient, and investigated whether re-administration of nutrient recovers intestinal functions using nutrient non-influx model of rats. Our data suggested that inactivation of mTOR pathway and downregulation of cell cycle related genes such as cyclins are associated with villus atrophy in non-influx model animals. In addition, we demonstrated that almost genes related to digestion and absorption of nutrients significantly increased by re-administration of nutrient. Interestingly, we revealed that there was a different effect between each nutrient category such as carbohydrates, lipids and amino acids and further between each nutrient quality such as glucose, fructose, medium-chain triacylglycerol, long-chain triacylglycerol, glutamine and arginine.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：小腸機能回復 経腸栄養法 中心静脈栄養法 絨毛萎縮 管腔内栄養素流入刺激 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

生命を維持するために必要とされる栄養素は、中心静脈栄養法 (TPN) で補給することが可能であり、アメリカ静脈経腸栄養学会 (ASPEN) が定める絶対的静脈栄養の適応に位置づけられる疾患 (腸閉塞、炎症性腸疾患など) 以外は、経腸栄養法による回復治療を行うことができる。実際に、長期間の TPN 後、より早期に経腸栄養を開始した患者の予後は良好であるという知見が得られている。しかしながら、経腸摂取が可能な栄養素による小腸機能回復機構の詳細は未だ不明であり、経腸栄養法の早期導入ならびに経腸栄養剤の開発・普及の弊害となっている。そこで、経腸栄養法の早期導入の重要性を示すための科学的根拠を得るために、詳細な分子作用メカニズムを解明する必要がある。

2. 研究の目的

非経腸栄養法下では、小腸絨毛は著しく萎縮し、栄養素の消化・吸収機能も低下することが知られている。さらに近年、栄養素の小腸への流入が小腸機能の早期回復に寄与するだけでなく、消化管を介した他臓器への回復刺激となり得る可能性が示唆されている。そこで、本研究では、非栄養素流入下の絨毛萎縮メカニズムの詳細を明らかにすると共に、長期間の非経腸栄養法施行による小腸機能低下時からの機能回復に及ぼす栄養素再投与の影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非経腸栄養モデル動物の作出

Wistar 系雄ラットに対して麻酔下で TPN 輸液投与用のカテーテルを頸静脈へと留置する手術を施した。カテーテルは、噛み切り防止ワイヤー内を通して飼育ケージ外へ出し、シリンジポンプを用いて 250kcal/kgBW/day となるように栄養輸液 (大塚製薬ネオパレン 2 号輸液) を 24 時間かけ

て 7 日間連続投与した (TPN 群)。手術のみを施し、その後自由摂食・自由飲水で飼育した動物を Sham 群とした。

(2) 栄養素の再投与

TPN7 日後から注目した栄養素を 3 日間経口投与した。栄養素は、糖質としてグルコース (Glu 群)、フルクトース (Fru 群) [総投与熱量の 20%]、脂質として中鎖脂肪酸 (MCT 群)、長鎖脂肪酸 (LCT 群) [総投与熱量の 25%]、アミノ酸としてグルタミン (G 群)、アルギニン (A 群) [総投与熱用の 5%] を投与した。

(3) 空腸試料の採取

TPN 輸液投与ならびに栄養素投与終了後に動物を屠殺し、空腸を摘出した。摘出した空腸の一部分は組織化学染色ならびに免疫染色に用い、その他の部位は粘膜層のみを剥がし取り、遺伝子発現解析、タンパク質発現解析、二糖類分解酵素活性測定のそれぞれに用いた。

(4) 組織化学染色

10%ホルマリンリン酸緩衝液により固定された試料を洗浄後、30%スクロース溶液に浸して内部水分をスクロース溶液に置換し、O.C.T. コンパウンドで包埋した。空腸包埋試料をクリオスタット凍結薄切片法により厚さ 7 μ m の薄切片として切り出し、Hematoxylin and Eosin (HE) 法により染色した。染色された組織切片は顕微鏡下で観察・撮影し、組織形態学的な評価を行った。

(5) 二糖類分解酵素活性測定

二糖類分解酵素活性測定は Dahlqvist, A らによる方法を用い、二糖類分解酵素による二糖類の分解により生成されたグルコース量を検出することで酵素の比活性を測定した。

(6) 遺伝子発現解析 (リアルタイム RT-PCR)

それぞれの動物から採取した空腸粘膜組織から total RNA を抽出後、cDNA に変換し、それらを鋳型として、SYBR green 法により栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子、細胞

周期、mTOR 経路に関連する遺伝子の発現解析を行った。

(7) 免疫組織化学染色

クリオスタット凍結薄切切片法により得られた組織切片 (Sham 群と TPN 群) に対して抗 PCNA 抗体あるいは抗 Ki-67 抗体を反応させ、メタルエンハンサー-DAB 染色キットにより検出した。

4. 研究成果

(1) 7日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛の形態学的変化と二糖類分解酵素活性ならびに栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現に及ぼす影響

HE 染色法により空腸絨毛組織の形態学的変化を観察したところ、Sham 群と比較して TPN 群の空腸絨毛の顕著な委縮が観察された。また、TPN7 日後からの栄養素投与群では、特に脂質と糖質を投与した群において TPN 群と比較して明らかな空腸絨毛の形態回復が観察された (図 1A)。

微絨毛上に存在する二糖類分解酵素の活性を測定した結果、スクラーゼならびにマルターゼ活性は、TPN 群で有意に減少した。栄養素投与群では、TPN 群と比較して、スクラーゼ活性は、グルコース、フルクトース、アルギニン投与により活性が有意に増加し、マルターゼ活性は MCT ならびにアルギニン投与により有意に増加した (図 1B)。

栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子の発現解析では、スクラーゼイソマルターゼ複合体 (Si)、脂肪酸結合タンパク質 (Fabps)、レチノール結合タンパク質 (Rbp2) などの遺伝子発現が 7 日間の TPN により顕著に減少した。一方、TPN 後に各種栄養素を投与すると、ほとんどの遺伝子発現が顕著に増大した。特に、脂質ならびに糖質を投与した群で遺伝子発現の増大が顕著であった。また、LCT よりも MCT、グルコースよりはフルクトース、グルタミンよりはアルギニンを投与した群

において、それら遺伝子の発現がより増大した (図 1C)。

これらの結果から、TPN 施行後 3 日間、各種栄養素を経口から摂取させると栄養素の消化・吸収に関連する多くの遺伝子が顕著に発現を増大させた。特に、脂質ならびに糖質投与により、劇的な遺伝子発現誘導が引き起こされることが明らかとなった。また、その誘導には栄養素の種類 (脂質、糖質、アミノ酸) と質の違い (LCT と MCT、Glu と Fru) が大きく影響する可能性を示唆された。

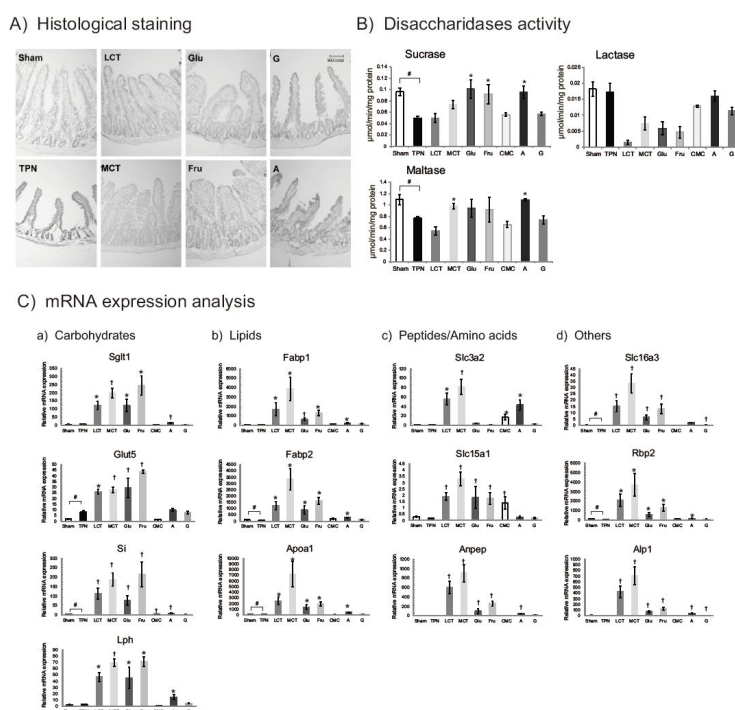


図 1 7日間 TPN 施行後の栄養素経口投与による空腸絨毛の形態学的変化と二糖類分解酵素活性ならびに栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現に及ぼす影響

A): HE 染色による空腸絨毛の形態観察。クリオスタット凍結薄切切片法により得られた各群の薄切切片を HE 染色法により染色し、カメラ付き顕微鏡で撮影した ($\times 100$)。スケールバーは $30 \mu\text{m}$ 。B): 二糖類分解酵素活性測定。Dahlqvist, A らによって開発された方法を用い、二糖類分解酵素による二糖類の分解により生成されたグルコース量を検出することで酵素の比活性を測定した。グラフの値は平均値 \pm SEM ($n=4-6$) で示した。* $p<0.05$ (Sham vs TPN, t-test Welch)。* $p<0.05$ (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。C): 栄養素の消化・吸収に関連する遺伝子発現解析。各群の空腸粘膜組織より total RNA を抽出後、cDNA に変換し、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。a) は、糖質の消化・吸収に関連する遺伝子 [ナトリウム-グルコース共輸送体 (Sglt1)、フルクトース輸送体 (Glut5)、スクラーゼイソマルターゼ複合体 (Si)、ラクターゼ/フロリジン水解酵素 (Lph)]、b) は、脂質の吸収に関連する遺伝子 [肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (Fabp1)、小腸型脂肪酸結合タンパク質 (Fabp2)、アポリポタンパク質 (Apos1)]、c) は、ペプチド/アミノ酸の消化・吸収に関連する遺伝子 [塩基/中性アミノ酸輸送体 (Slc3a2)、オリゴペプチド輸送体 (Slc15a1)、アミノペプチダーゼ (Anpep)]、d) は、その他的小腸に発現する遺伝子 [モノカルボン酸輸送体 (Slc16a3)、レチノール結合タンパク質 (Rbp2)、アルカリフォスファターゼ (Alp1)]。グラフの値は平均値 \pm SEM ($n=4-6$) で示した。* $p<0.05$ (Sham vs TPN, t-test Welch)、* $p<0.05$, * $p<0.1$ (TPN vs 各栄養素投与群, Kruskal-Wallis steel test)。

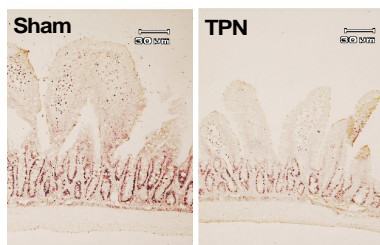
(2) 非栄養素流入時の絨毛萎縮メカニズムの解明

7 日間 TPN 施行により絨毛基底部の増殖細胞内の細胞増殖マーカータンパク質である proliferation cell nuclear antigen (PCNA) ならびに Ki-67 の絨毛内発現量が Sham 群と比較して顕著に減少した (図 2)。このとき、

細胞周期関連遺伝子の発現は、TPN 群において有意に減少した（図 3A）。また、細胞外からの刺激を受け取り、細胞増殖をコントロールする mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路に参与する分子の遺伝子発現は、mTOR 複合体 1 を形成する Raptor や細胞外のアミノ酸刺激を mTOR 複合体 1 へと伝えるメディエータータンパク質である RagC の遺伝子発現が有意に減少することが明らかとなった（図 3B）。さらに、Akt シグナル下流に存在し、リン酸化を受けることで mTOR 複合体 1 活性を抑制する PRAS40 タンパク質のリン酸化レベルが TPN 群で顕著に増大することが明らかとなった（図 4）。

以上の結果から、7 日間の TPN による絨毛萎縮は、細胞増殖を調節する mTOR 経路の活性低下に伴う細胞周期関連因子の発現低下が、基底部に存在する増殖細胞の増殖能低下を引き起こすことが主要な要因である可能性が示唆された。これら因子の発現は、栄養素の再投与により顕著に増大することも明らかにしていることから、管腔内栄養素流入刺激は、mTOR 経路活性ならびに細胞増殖能維持に重要であり、絨毛の形態ならびに小腸における栄養素の消化・吸収能を維持する上で管腔内への栄養素の流入刺激が最重要である可能性が示唆された。

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)



Ki-67

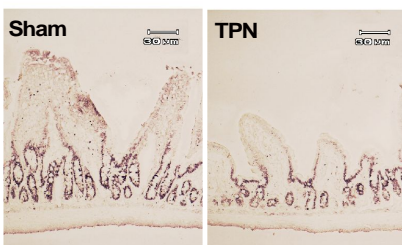
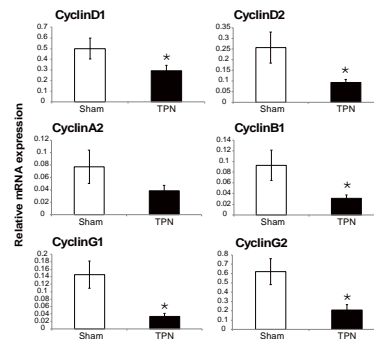


図 2 細胞増殖マーカーの絨毛内発現

A) 細胞周期関連遺伝子



B) mTOR 経路関連遺伝子

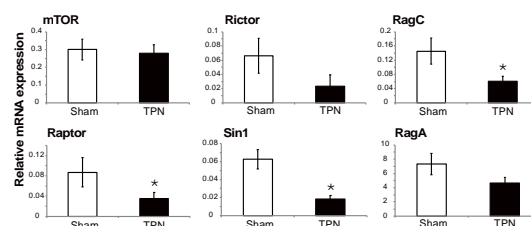


図 3 細胞周期と mTOR 経路関連遺伝子の発現解析

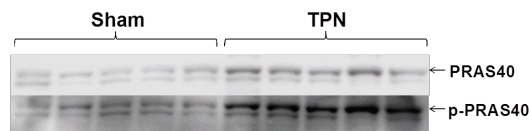


図 4 mTOR 複合体 1 の活性を抑制する PRAS40 のリン酸化レベル

現在、ラット小腸上皮細胞（IEC-6 細胞）を用いて、各種栄養素（糖質、脂質）が IEC-6 細胞の細胞周期に与える影響について検討を行っている。2 種の細胞周期同調法により細胞周期を同調させたときに、存在する栄養素の種類が IEC-6 細胞の細胞増殖にどのような影響を与えるのかについて解析を進めている。また、ヒト大腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞を用いて、非栄養素存在下の腸上皮モデルの構築を行い、*in vitro* 系により今回得られた現象について再現性ならびに更なる詳細なメカニズムの解明を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 5件)

鈴木 拓史, 真柳 佑希, 笠原 彩子, 氣田 歩, 佐藤 彩香, 消化管内栄養素非流入下の小腸絨毛萎縮メカニズムに対する mTOR 経路の関与, 第 68 日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 06 月 1 日, 酪農学園大学

真柳 佑希, 笠原 彩子, 氣田 歩, 佐藤 彩香, 鈴木 拓史, 非経腸栄養時の小腸機能回復に及ぼす栄養素の役割, 第 47 回日本栄養・食糧学会東北支部大会, 2013 年 10 月 5 日, 秋田県カレッジプラザ

真柳 佑希, 笠原 彩子, 氣田 歩, 佐藤 彩香, 鈴木 拓史, 基盤栄養学研究のための非経腸栄養モデル動物の構築, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 05 月 26 日, 名古屋大学

鈴木 拓史, 笠原 彩子, 氣田 歩, 佐藤 彩香, 真柳 佑希, 非経腸栄養時の小腸機能回復に及ぼす栄養素の役割, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 05 月 26 日, 名古屋大学

Takuji Suzuki, Ayako Kasahara, Ayumi Keta, Ayaka Sato and Yuki Mayanagi, Oral administration of nutrients recovers intestinal functions in total parenteral nutrition (TPN) model of rats, Experimental Biology 2013, 2013 年 04 月 21 日, 米国 Boston Convention and Exhibition Center

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 拓史 (Suzuki, Takuji)

山形大学・地域教育文化学部・食環境デザインコース・助教

研究者番号: 50587110