

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650458

研究課題名(和文)比較生物学的アプローチによる消化管機能回復の鍵因子の探索と経腸栄養法への応用

研究課題名(英文) Exploration of key factors for recovering the gastrointestinal tract by the approach of comparative biology and the application to the enteral feeding

研究代表者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：80423838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット・アフリカツメガエルの小腸における栄養素消化吸収関連遺伝子およびそれらの転写因子の発現は絶食により低下するが、再摂食による応答はアフリカツメガエルでは顕著に高いことが明らかとなった。アフリカツメガエルの上記の遺伝子上のヒストン修飾(アセチル化など)は絶食で亢進するが、ラットでは亢進しないことが明らかとなった。さらに、ヒト小腸様培養細胞における消化吸収関連遺伝子の発現を増大させる食事因子として、ヒストンアセチル化修飾を促進する短鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸が有用である可能性が本研究によって示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that expressions of genes related to nutrient digestion and absorption, and their transcriptional factors in the small intestine were reduced by the fasting in rats and african clawed frogs. These expressions were rapidly recovered in the african clawed frogs, but less in rats, by the re-feeding. Histone modifications such as acetylations in these genes were enhanced in african clawed frogs, but not in rats, by the re-feeding. Food factors inducing the histone acetylation such as short-chain fatty acids and medium-chain fatty acids has the potency of enhancing genes related to nutrient digestion and absorption in human intestine-like culture cells.

研究分野：栄養学

キーワード：絶食 消化管機能低下 アフリカツメガエル ラット 消化吸収関連遺伝子 ヒストンアセチル化修飾

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの疾患の患者および介護状態の高齢者は、慢性的な低栄養状態にあることが問題視されている。その主因は、ヒトの小腸は、常時栄養素を摂取していないと消化吸収機能が低下し、回復するために長期間を費やすことにある。特に、術後ならびに摂食嚥下障害などで中心静脈栄養を受けている患者では顕著である。しかしながら、小腸の消化吸収機能を回復するための治療法ははまだ確立されていない。

一方、カエルなどの無尾両生類は、餌不足や冬眠などによって長期間にわたって食餌を摂取ができないことが多い。そのため、無尾両生類は、ヒトや低栄養動物モデルであるマウス・ラットと比較して、絶食によって小腸の消化吸収機能が低下しにくいと考えられる。実際に、ラットの小腸は絶食によって萎縮し、再摂食しても3日以上小腸の萎縮が回復しないのに対し、アフリカツメガエルの小腸は、再摂食後1日以内に萎縮が回復するという知見を申請者は得ている。これらの知見は、アフリカツメガエルの小腸は、ラットの小腸に比べ消化吸収機能が低下しにくいとともに、回復しやすいことを示唆している。それゆえ、摂食時/絶食時の小腸の消化管機能に関連する遺伝子の発現およびそれらの発現制御機構をヒト・ラットとアフリカツメガエル間で比較することによってヒトの小腸における消化管機能回復の鍵因子を同定することが可能となると考えられる。さらに消化管機能回復の鍵因子の遺伝子発現を増大させる栄養素を同定することによって、小腸消化吸収機能をより早く回復する方法が開発できると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトの小腸および、モデル動物で頻繁に使用されるラットの小腸は、長期間低栄養状態に暴露されると、消化吸収機能が低下した状態になる。その一方で、カエルなどの無尾両生類は、冬眠や餌の不足などによって長期間絶食下に暴露されても、その後の食餌の摂取に問題は生じない。そこで、本研究では、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) とラットの絶食/摂食に対する応答を比較することによって、ラットの小腸における消化管機能回復の鍵因子を同定することを目的とする。さらに、ヒト小腸様培養細胞において、消化管機能回復の鍵因子の発現を増大させる栄養素を探索し、ヒトにおける消化管機能を回復する方法を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 消化管機能回復の鍵因子の探索 絶食させた動物[アフリカツメガエルおよびラット]および非絶食下の動物、再摂食(1日)させた動物の小腸総 RNA

を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行い、小腸における消化管機能回復の鍵因子を探索する。

- (2) 消化管機能回復の鍵因子に關与する転写因子・ヒストン修飾の同定 アフリカツメガエル、ラット、ヒトの小腸における消化管機能回復の鍵因子遺伝子周辺のプロモータ/エンハンサ領域を比較するとともに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によって標的遺伝子周辺における転写因子の結合、修飾ヒストンの結合量に変化があるかを調べる。
- (3) 消化管機能回復の鍵因子の発現を増大させる栄養素の探索 ヒト小腸様 Caco-2 培養細胞において、小腸における消化管機能回復の鍵因子の発現を増大させる栄養素を探索する。

4. 研究成果

(1) 消化管機能回復の鍵因子の探索

アフリカツメガエルにおける解析
低栄養状態に暴露された小腸の機能低下メカニズムおよびその回復メカニズムを明らかにするために、長期間絶食下に暴露され、また、消化管の再生能力が高いことで知られる無尾両生類である *Xenopus laevis* を用い、実験を行なった。成体の *Xenopus laevis* を絶食(22日間、5ヶ月) 摂食(22日間摂食) もしくは絶食後に再摂食(21日間絶食 再摂食1日後)させた小腸を採取し、解析を行った。その結果、22日間および5ヶ月間の絶食は、小腸重量、小腸の絨毛周囲径を顕著に低下させた。それらの低下は、再摂食1日後において顕著に回復した。さらに、小腸における消化吸収関連酵素(アルカリフォスファターゼ、アミノペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、マルターゼ)の活性は、絶食で低下し再摂食1日後に摂食群と同等のレベルまでに回復した。絶食後の再摂食によって、栄養素消化吸収関連遺伝子(*Fabp1*, *Fabp2*, *Rbp2*, *Anpep*)、代謝関連遺伝子(*Hk1*, *Pck4*, *Pck1*, *Gopc2*, *Hmgcr*, *Hadha*, *Acox1*, *Acox2*, *Acadv1*, *Gopd*) および小腸分化・栄養素消化吸収遺伝子の発現に關与する転写因子(*Fxr*, *Cdx-2*, *Creb1*, *Lxra*, *Pparg1a*, *Hnf1a*, *Hnf4*, *Ppara*, *Rara*) の発現が増大することが明らかとなった。これらの結果は、アフリカツメガエルでは、絶食後の再摂食による小腸機能の回復が顕著であることを示している。

ラットにおける解析

ラットにおいても絶食-再摂食の実験を行なった。3日間の絶食によって糖質の消化吸収に關与する遺伝子(*Sglt1*) および、タンパク質の分解・アミノ酸の吸収に關与する遺伝子(*Dpp4*, *Apn*, *Pept1*, *Slc3a1*, *Slc7a9*, *Slc16a10*, *Slc3a2*, *Slc7a7*) の多くの発現が1/5から1/10以下にまで減少するとともに、再摂食1日後においても、そ

のほとんどが低い状態であった。さらに *Sglt1* 遺伝子上のヒストンのアセチル化修飾を観察してみると、再摂食によって増大しなかった。一方、タンパク質消化吸収関連遺伝子の mRNA は、再摂食による応答は見られなかったが、Pre-mRNA の発現量は再摂食によって顕著に増大した。それゆえ、タンパク質の消化吸収関連遺伝子の再摂食後の応答不全は、mRNA の分解レベルでの調節であることが考えられた。

(2) 消化管機能回復の鍵因子に関する転写因子・ヒストン修飾の同定

アフリカツメガエルにおける解析 アフリカツメガエルを 21 日間絶食させると、小腸の脂質の消化吸収関連遺伝子 (*Fabp1*, *Fabp2*) およびそれらの転写因子 (*Cdx2*, *Fxr*) の遺伝子の発現が顕著に低下した。その一方、それらの遺伝子発現は、再摂食 1 日後に絶食と同等のレベルまで回復した。さらに、これら遺伝子上のヒストンのアセチル化、ヒストン H3 リジン 4 番目 (K4) モノメチル化、ヒストン H3K36 モノメチル化、ヒストン H3K36 トリメチル化、PoIII および PoIII のリン酸化量が絶食によって顕著に増大した。さらに、これら遺伝子の Pre-mRNA 量/mRNA 比は、絶食によって低下しなかった。以上の結果は、絶食時のアフリカツメガエルの小腸では、脂質消化吸収関連遺伝子周辺のヒストン修飾を促進させ Pre-mRNA の合成量を維持し、再摂食に備えていることを明らかにした。

ラットにおける解析 SD ラットへの 3 日間の絶食刺激を与えたところ、小腸の糖消化吸収関連遺伝子 (*Sglt1*, *Glut5* および *Si*) の mRNA 量は顕著に低下した。再摂食 24 時間後に、*Glut5* 遺伝子の発現は増大したが、*Sglt1* 遺伝子は増大しなかった。*Sglt1* 遺伝子周辺のヒストン H3 アセチル化、PoIII、アセチル化ヒストン結合タンパク質 BRD4 タンパク質の結合量は、絶食 再摂食によって変化しなかったが、*Glut5* 遺伝子周辺では増大した。これらの結果は、ラット *Sglt1* 遺伝子発現の再摂食による応答不全の原因として、クロマチンの応答低下が考えられた。

消化管機能回復の鍵因子の発現を増大させる栄養素の探索 小腸における消化管機能回復の鍵因子を増大させる食事因子の探索: 1)-2)の実験によって小腸における栄養素消化吸収関連遺伝子上のヒストンのアセチル化修飾は、アフリカツメガエルでは絶食によって増大するが、ラットでは増大しないことが明らかとなった。上記の知見は、アフリカツメガエルにおいて、再摂食後の小腸の回復が迅速に行われる要因の一つに、絶食による栄養素消化吸収関連

遺伝子上のヒストン修飾 (アセチル化、メチル化) の促進がある可能性がある。そこで、ヒストンアセチル化修飾を促進する食事因子の投与が、絶食時の小腸の機能を素早く回復する可能性が考えられた。これまでの研究によって、短鎖脂肪酸である酪酸は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害 (HDAC1) 活性が有することが分かっている。さらに、中鎖脂肪酸であるカプリル酸は、小腸においてヒストンアセチル化酵素 p300 の遺伝子発現を増大させることが明らかとなっている。そこで本研究では、小腸吸収細胞様ヒト細胞培養株 Caco-2 細胞に、短鎖脂肪酸 (酪酸) 中鎖脂肪酸 (カプリル酸) を含む 10%FBS 培地で 48 時間培養し、栄養素消化吸収関連遺伝子 (*Rbp2*, *Slc2a5*) の発現をリアルタイム RT-PCR によって観察した。その結果、短鎖脂肪酸である酪酸は、遺伝子発現を増大 (*Rbp2*) もしくは増大させる傾向 (*Slc2a5*) があることが明らかとなった。さらに、中鎖脂肪酸 (カプリル酸) の投与は、これらの遺伝子発現を増大させる傾向にあった。これらの結果は、絶食時に発現が低下した消化吸収関連遺伝子の発現を増大させる栄養素として、短鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸が有用である可能性が示唆された。これらの結果により、アフリカツメガエルでは、小腸消化吸収関連遺伝子、代謝関連遺伝子、転写因子の絶食による発現低下が再摂食によって迅速に回復することが明らかとなった。一方、ヒト小腸吸収細胞様培養株 Caco-2 細胞において、短鎖・中鎖脂肪酸が、消化吸収関連遺伝子の発現を増大させる傾向があることが明らかとなった。

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 3 件)

Honma K, Masuda Y, Mochizuki K, and Goda T. Re-feeding rats a high-sucrose diet after 3 days of starvation enhances histone H3 acetylation in transcribed region and expression of jejunal GLUT5 gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(6):1071-3 (2014)

Mochizuki K, Goda T, Yamauchi K. Gene expression profile in the liver of *Rana catesbeiana* tadpoles exposed to low temperature in the presence of thyroid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20;420(4):845-50. (2012).

Mochizuki K, Ishihara A, Goda T, Yamauchi K. RNA polymerase II phosphorylation at serine 2 and histone H3 tri-methylation at lysine 36 are key steps for thyroid hormone receptor β gene activation by thyroid hormone in *Rana catesbeiana*

tadpole liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417(3):1069-73. (2012).

〔学会発表〕(計 1 件)

玉置 啓二, 岡田 令子, 石原
顕紀, 望月 和樹, 山内 清志
アフリカツメガエルを用いた消化
管の絶食/再摂食に対する応答の検
討 第 85 回 日本動物学会 2015
年 9 月 11 日 (宮城県仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fp.yamanashi.ac.jp/fdn/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 和樹(MOCHIZUKI, Kazuki)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 80423838

(2) 研究分担者

石原 顕紀 (ISHIHARA, Akinori)
静岡大学・理学部・講師
研究者番号: 70432193

林 久由 (HAYASHI, Hisayoshi)
静岡県立大学・食品栄養学部・准教授
研究者番号: 40238118

(3) 連携研究者

合田敏尚 (GODA, Toshinao)
静岡県立大学・食品栄養学部・教授
研究者番号: 70195923

山内清志 (YAMAUCHI, Kiyoshi)
静岡大学・理学部・教授
研究者番号: 50201827