

## 腸内環境が小腸上皮細胞の水吸収に与える影響

### —AQP3および細胞間接着との関連—

Effect of the intestinal environment on water absorption through small intestinal epithelial cells

—Relationships between AQP3 and adhesion proteins—

永井 つばさ

Tsubasa Nagai

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード：小腸, アクアポリン, 細胞間接着, リポタンパク質

Key words : Small intestine, Aquaporin, Intracellular adhesion, lipopolysaccharides

#### 1. 研究目的

小腸上皮細胞に発現する水チャネルであるアクアポリン3 (AQP3) は、水やグリセロールを浸透圧勾配により選択的に通す水チャネルであり、腎尿細管や小腸上皮細胞に多く発現して水の吸収に重要な役割を担っている。これまで本研究室では、第5エクソンを欠失したAQP3のスプライシングバリエーション (AQP3-short) の存在を見出し、小腸上皮細胞では、低浸透圧刺激によって野生型AQP3-longの発現量が減少する一方、AQP3-shortは急激に増加することから、小腸における水吸収にAQP3-shortが重要な役割を果たしている可能性があると考えてきた。

本研究では、局在が異なる可能性のある通常型AQP3とそのスプライスバリエーションAQP3-shortが、腸内環境変化によってどのように発現量が変化するか、さらに細胞間接着タンパク質への影響、水吸収への影響を明らかにすることを目的とし、小腸上皮様細胞Caco-2を用いて、AQP3発現量変化が細胞間接着タンパク質の発現量変化に与える影響をmRNA発現量変化で、水吸収能に与える影響を低浸透圧刺激後のCaco-2細胞の体積変化で観察した。昨年度は、siRNAをもちいて通常型AQP3およびAQP3-shortの発現量を共に発現抑制したところ、低浸透圧環境下で細胞内へ流入した水の細胞外への排出が遅くなること、また、細胞間接着タンパク質のうち、密着結合に含まれるJAMと裏打ちタンパク質TJP1、および接着結合に含まれるCDH1の発現量が減少していたことから、AQP3が小腸管腔側から細胞内に流入した水を細胞間隙

に排出する際に、細胞間接着タンパク質の協働してはたらいっている可能性を報告した。

今年度は、大腸菌の細胞壁に含まれ炎症誘起作用をもつことが知られているリポ多糖LPSをCaco-2細胞に添加した場合について、接着タンパク質および水吸収能の変化を調べた。

#### 2. 研究実施内容

##### 【方法】

**使用した細胞**：小腸上皮様細胞株Caco-2を用いた。Caco2細胞はヒト小腸上皮様細胞株で、性質が小腸に近く、吸収機能を保持しているため小腸モデルとして有用であり、AQP3-shortも存在している。

**細胞培養**：Caco-2細胞を6-wellプレート上で数日間培養後、各処理を行った。

**LPS処理**：培養培地にLPSを10 $\mu$ g/mLになるように添加したものをLPS添加培地とした。LPS添加培地に交換し、8~24時間後に実験を行った。

**mRNA発現量の定量**：Realtime PCR法をもちいて定量した。

**体積変化の測定**：細胞の断面積変化を観察した。細胞膜に特異的に結合する蛍光色素PKH26で染色し、等浸透圧環境下での細胞をZeiss LSM510共焦点顕微鏡で観察した後、低浸透圧培地に交換し、2分ごとに42分間観察した。観察後、細胞のZ方向の変化を画像解析した。

### 【結果・考察】

**炎症誘引物質 LPS が AQP3 の発現量に与える影響**：通常型 AQP3 の発現量は、LPS 処理 8 時間後までは変化がみられなかったが、24 時間後には有意に増加していた。これに対して、short は、逆に有意に減少し、その変化は 8 時間後から強く現れていた。このことから LPS は AQP3 の通常型と short に対して異なる影響を与えることが明らかになった。

**炎症誘引物質 LPS が水吸収および細胞間接着に与える影響**：低浸透圧環境下での体積変化を調べたところ、LPS で 18~20 時間処理した細胞では、Control 細胞比で有意に膨張率が高かったが、25 分後には Control 細胞と同程度に戻り、その後は有意な違いがみられなかった。このことから、LPS 処理による通常型 AQP3 の発現上昇は、低浸透圧環境下での水流入および排出の両方を増加させている可能性が示唆された。

細胞間接着に与える影響を調べたところ、LPS の添加によって接着タンパク質の発現量に大きな変化は見られなかったが、密着結合に関わるタンパク質 JAM の mRNA 発現量を増加させることが示された。LPS は炎症誘発物質で、腸管内にさまざまな影響を与えると考えられるが、10 $\mu$ g/mL の添加では、細胞間接着には大きな影響を与えず、小腸上皮細胞の AQP3 発現量を変化させて細胞内を通る transcellular な水の動きが誘発される可能性があることが示唆された。

### 3. まとめと今後の課題

本研究では、AQP3 および AQP3-short が細胞間接着タンパク質と協働して小腸上皮細胞から細胞

間隙を通して吸収される transcellular な水の流れに関与している可能性を明らかにした。

大腸菌の細胞壁成分で炎症誘起物質である LPS を小腸上皮細胞 Caco-2 に添加すると、通常型 AQP3 の発現量は増加し、細胞内への水の流入およびそれに続く細胞間隙への水の排出が共に速くなる様子が観察された。腸管内への大腸菌およびそれに誘起される炎症は水の吸収を活発にしている可能性が示唆された。

経口摂取した水分と消化液の大部分は小腸で吸収される。この水吸収のメカニズムが破綻し水の体外排泄量が増加すると下痢が起こり、減少すると便秘が起こる。水吸収のメカニズムが破綻することで、体内の消化液・血液等にも過不足が生じ、不調につながる。通常型 AQP3・AQP3-short の腸管での働きを明らかにすることは、水分再吸収のメカニズムの破綻がどのように起こるのかを明らかにする手がかりになると考えられる。本研究はその第一歩であり、より深く追求していきたい。

### 4. この助成による発表論文等

#### 学会発表

永井つばさ, 大家みなみ, 田中直子, 「水チャネル AQP3 スプライスバリエーションの過剰発現が細胞間接着に与える影響」, 日本薬学会第 142 年会

#### 付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所の研究助成 (DB2226) 「腸内環境が小腸上皮細胞の水吸収に与える影響：AQP3 および細胞間接着との関連」を受けたものです。