

腸内環境変化が小腸上皮細胞の水吸収に与える影響 —AQP3スプライシングバリエーションの培地交換後の発現量の変化—

Effects of intestinal environmental changes on water absorption by small intestinal epithelial cells.

—Changes in expression levels of AQP3 splicing variants after medium exchange—

西川 真由

Mayu Nishikawa

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 : Caco-2細胞, AQP3, 培地交換

Key words : Caco-2 cells, AQP3, Culture medium exchange

1. 研究目的

細胞膜に存在して水を選択的に通す水チャネルであるアクアポリン(AQP)は、ヒトでは約13種類が存在している。その中でもAQP3は小腸の上皮細胞などに発現していて、体内における水の吸収・排出・移動について重要な役割を担っていると考えられている。AQP3には第5エクソンを欠失したスプライシングバリエーション(AQP3-short)が存在し、Caco-2細胞を低浸透圧環境下で人工的な水流入状態にするとその発現量が増加することから、小腸における水吸収に重要な役割を担っていることが推測されている。

本研究は、腸内環境変化が水の吸収能に与える影響をその作用機序から読み解くこと、特に腸内環境変化の中でも局所環境において定常的に起こっていると考えられる浸透圧変化/炎症性変化に着目し、腸内環境変化が起こすさまざまな細胞反応と水吸収の連携の一端を明らかにすることを目的としている。

2. 研究実施内容

低浸透圧変化/炎症性変化を含む腸内環境変化が与える影響について、低浸透圧変化/炎症性変化による通常型AQP3/AQP3-shortのmRNA発現量を調べるにあたり、最適な細胞の状態を調べる事を目的とし、小腸上皮様細胞株Caco-2細胞を分化誘導後(1)7日間、(2)21日間培養し、通常型AQP3とAQP3-shortのmRNAの経日的な発現量の変化を、Realtime PCR法で調べた。

(1)分化誘導後7日間培養した場合のmRNAの経日的な発現量の変化：分化誘導後1日目としたmRNA発現量変化を2日置きに調べたところ、通常型AQP3の発現量は7日目まで大きな変化は見られなかったが、AQP3-shortの発現量は分化が進むにともなって増加し、7日目には約6倍にまで増加していた。

(2)分化誘導後21日間培養した場合のmRNAの経日的な発現量の変化：分化誘導後1日目としたmRNA発現量を7日目以降3日ごとに21日目まで調べたところ、(1)の結果と異なり、7日目までに通常型AQPは約1.6倍に増加しており、その後少しずつ増加して、21日目には2.6倍まで増加していた。一方、AQP3-shortのmRNA発現量も、7日目で(1)のような大きな増加が見られなかった。その後徐々に増加して13日目に約2倍まで増加した後、19日目までは徐々に減少していく傾向を示していたが、21日目に急に5倍まで増加していた。

(1)ではmRNA抽出のタイミングで2日ごとに培地交換を行っていたが、(2)では分化誘導後4日目から19日目まではmRNAの抽出のタイミングで3日ごとに培地交換を行い、19日目に培地効果を行って2日後の21日目にmRNA抽出を行っていた。(1)と(2)の結果の違いから、培地交換からの日数の違いによってmRNA発現量に違いが生じている可能性があるかと推測した。Caco-2細胞は、 Na^+ 、 Ca^{2+} などのミネラル成分をはじめ、

さまざまな栄養素に対する吸収能力を保持している細胞株であることから、培地交換後、培地成分が Caco-2 細胞に吸収されることによって低浸透圧環境になり、これが引き金となって通常型 AQP3 および AQP3-short の発現量が変化した可能性があると考え、培地交換後の時間が発現量変化に与える影響を調べることにした。

(2) の結果から、分化誘導後の日数の影響も合わせて検討する必要があると思われたため、

(3) A:分化誘導後 12 日目, B:分化誘導後 21 日目の 2 種類の Caco-2 細胞をもちいて、通常型 AQP3, AQP3-short の発現量の培地交換後の経時変化を調べた。

(3) A:分化誘導 12 日後, B:分化誘導 21 日後の Caco-2 細胞における、通常型 AQP3, AQP3-short の発現量の培地交換後の経時的な変化: 培地交換前の mRNA 発現量を 1 とした mRNA 発現量変化を、培地交換 10, 24, 48, 72 時間後に調べたところ、A, B どちらの実験においても、培地交換後 10 時間後には、通常型 AQP3, AQP3-short とともに 50%程度まで発現量が減少していた。その後、通常型 AQP3 の発現量は経時的に増加、72 時間後には 1.2~1.4 倍に有意に増加していたが、AQP3-short では、一時的に発現量が回復した後再び減少し、72 時間後には 40~60%まで減少していた。実

験前に予想していたような、培地交換後の AQP3-short の急激な発現量増加を捉える事はできなかった。

3. まとめと今後の課題

分化誘導後の培地交換により発現量は変化し続けている事が分かった。炎症状態が通常型 AQP3 / AQP3-short の発現量変化に与える影響を調べるにあたり、卒論で取り組んでいた LPS 添加による実験モデルは、AQP3 および AQP3-short の発現量は僅かな変化に留まることから、もう少し大きく発現量の変化が期待できる炎症性サイトカインでの処理などを検討する必要があると考える。

4. この助成による発表論文等

①学会発表

[1]西川真由他「AQP3 スプライシングバリエントの培地交換後の発現量の変化」、日本薬学会第 144 年会, 2024 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市) (発表確定)

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 (DB2330)「腸内環境変化が小腸上皮細胞の水吸収に与える影響」を受けたものです。