

腸内環境変化が小腸上皮細胞の水吸収に与える影響

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

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：アクアポリン3, 発現制御, 炎症性サイトカインTNF- α , 短鎖脂肪酸

Key words : Aquaporin3, Regulation of expression, Inflammatory cytokine TNF- α , Short-chain fatty acids

1. 研究目的

アクアポリン(AQP)は、細胞膜に存在して水を選択的に通す水チャネルで、浸透圧差を利用して水の受動輸送を行い、水の分泌、再吸収、その他の機能に関わっている。哺乳類であるヒトでは約13種類が存在しており、AQP3は消化管などの上皮細胞に発現し、小腸における水吸収では重要な役割を担っていると考えられている^[1]。

AQP3には第5エクソンを欠失したバリエーション(AQP3-short)が存在しており、小腸上皮細胞株Caco-2を低浸透圧環境に置いた時、通常型AQP3が減少しAQP3-shortの発現が急激に増加することが先行研究で報告されている^[2]。また、低浸透圧環境でそれぞれに異なる局在変化を示すことから、通常型AQP3及びAQP3-shortはそれぞれ異なる機能を持ち、存在比率を調節することで、水吸収を調節している可能性があると思われる^[3]。

近年では腸内環境が健康維持に重要とされ、腸内細菌が食物繊維などから生成する短鎖脂肪酸の機能性が多く報告されている^[4]。また、腸内の病原性菌による急性炎症は下痢を伴うことが多く、急性炎症による下痢もAQP3の発現量変化を伴っていることが予想される^[5]。しかし、これらの腸内環境変化がどのようにAQP3の発現量変化に影響を及ぼし、更に水吸収の調節に影響を及ぼしているのかは明確となっていない。本研究は、腸内環境変化が、小腸上皮細胞で水吸収を担うと考えられているAQP3の発現量にどのような影響を与えているか調べ、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

実験はすべて小腸上皮細胞株Caco-2を使用し、分化誘導後1~21日培養した細胞を用いた。AQP3およびそのスプライスバリエーションAQP3-shortの発現量はTaqMan法によるRealtime PCRで、Caco-2細胞の分化誘導マーカータンパク質のmRNA発現量はSYBR法によるRealtime PCRでそれぞれ定量した。

1) Caco-2細胞の分化過程における通常型AQP3、AQP3-shortの発現量の変化。

Caco-2細胞はシート上になってから21日間ほどをかけてゆっくりと分化することが知られている。分化誘導後、1~21日の細胞を経時的に培養し、2~3日ごとに培地交換を行いながら細胞のRNAを抽出して、Caco-2細胞の分化マーカーであるAlkaline phosphatase (ALPI)、N-amino-peptidase (ANPEP)、Sucrase-isomaltase (SI)の各酵素のmRNA発現量と、通常型AQP3およびAQP3-shortのmRNA発現量を定量し、分化過程における発現量の変化を調べた。

ANPEPは分化誘導後7日目、ISは10~13日目でピークに達し、その後徐々に減少していたが、ALPIは7日目で大きく増加した後19日目まで少しずつ増加し、19日目でピークに達した後21日目でもその値が維持されていた。

一方、通常型AQP3は10日目でピークに達した後13日目で一旦減少し、その後また徐々に増加して19~21日目で最も高い発現量を示した。AQP3-shortの発現量変化も同様であった。これらの結果から、Caco-2細胞は分化の過程で、7~10日目にいったん大きな変化が起こり、その後徐々に変化して19~21日目で安定した小腸上皮様の

性質を示すようになると推定された。AQP3 および AQP3-short は、小腸上皮細胞としての機能の成熟に伴って発現する機能性タンパク質の1つであることが確認された。

2) 炎症性サイトカイン TNF- α が通常型 AQP3, AQP3-short の発現量に与える影響.

分化誘導後 21 日目の Caoc-2 細胞について、炎症性サイトカイン TNF- α が AQP3 および AQP3-short の mRNA 発現量に与える影響を調べた。細胞はメンブレン上で培養し、TNF- α は 1,50,100 ng/mL の濃度で、細胞の上 (腸管腔側)、または下 (基底膜側) からそれぞれ添加し、20 時間培養後 RNA を抽出した。

TNF- α は、50~100ng/mL 濃度で、通常型 AQP3、AQP3-short の発現量とともに濃度依存的に減少させる効果があった。炎症時には AQP3 を介した水吸収は抑制され、炎症の原因となっているものが素早く排出されることを促していると考えられた。

3) 短鎖脂肪酸が通常型 AQP3, AQP3-short の発現量に与える影響.

分化誘導後 21 日目の Caco-2 細胞について、酢酸、プロピオン酸、酪酸が AQP3 および AQP3-short の mRNA 発現量に与える影響を調べた。各短鎖脂肪酸はナトリウム塩として 1 または 5mM の濃度で培地に添加し、20 時間培養後 RNA を抽出した。

3 種の短鎖脂肪酸の中では、酢酸と酪酸が通常型 AQP3, AQP3-short の発現量とともに抑制し、特に酢酸では強い濃度依存性が観察された。短鎖脂肪酸は AQP3 の発現量を抑制することによって水吸収を抑制し、便をやわらかく保つ効果があると考えられた。また、その効果は酢酸でもっとも高かった。3 種の短鎖脂肪酸で効果が異なったことから、AQP3 の発現制御はこれら短鎖脂肪酸の構造の違いを認識する受容体を介した反応で行われている可能性が示唆された。

3. まとめと今後の課題

通常型 AQP3/AQP3-short 発現量の制御機構は複数考えられる。先行研究から、浸透圧変化による通常型 AQP3/AQP3-short の発現量および局在変化はストレス応答 MAPK 経路で制御されている可能性が示唆されている。本研究の結果から、浸透圧変化や TNF- α 刺激に対するストレス応答経

路の他、短鎖脂肪酸の受容体として知られる G タンパク質共役型受容体 GPR を介した制御の可能性も示唆された。cAMP 経路もしくは他のシグナル伝達系の経路によって複雑に調節されている可能性があり、AQP3 の制御機構として新たな可能性が示唆されたと思われる。今後の課題としては短鎖脂肪酸の効果の差に着目し、GPR 受容体の関与についてさらに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「腸内環境変化が小腸上皮細胞の水チャネル AQP3 の発現に与える影響」、日本薬学会 第 145 年会、2024 年 3 月 30 日、福岡国際会議場/マリンメッセ福岡 B 館 福岡サンパレス (福岡県、博多市) (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 (B) (DB2422)「腸内環境変化が小腸上皮細胞の水チャネル AQP3 の発現に与える影響」を受けたものです。

主要参考文献

- [1] A. S. Verkman, A. K. Mitra, Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, (2000) 278(1):F13-28.
- [2] 西田真夕, 新規アクアポリン AQP3-short の発現機構解析. 大妻女子大学 卒業論文 (2016).
- [3] 西川真由, 局在変化から見る AQP3 の性質. 大妻女子大学 卒業論文 (2022).
- [4] Kallie E. Hays, Jacob M. Pfaffinger, Rebecca Ryznar, The interplay between gut microbiota, short-chain fatty acids, and implications for host health and disease. *Gut Microbes.*, (2024) 16(1):2393270.
- [5] Nobutomo Ikarashi, *et al.*, Inhibition of Aquaporin-3 Water Channel in the Colon Induces Diarrhea. *Biol. Pharm. Bull.* (2012) 35(6) p.957-962.