

氏 名 ・ (本籍)	蛇口 琢 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 899 号
学位授与の日付	平成 27 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Massive bowel resection upregulates the intestinal mRNA expression levels of cellular retinol-binding protein II and apolipoprotein A-IV and alters intestinal vitamin A status in rats (大量腸管切除にて腸管細胞内レチノール結合タンパク質 II およびアポリポタンパク質 A-IV の遺伝子発現が上昇しラット腸管におけるビタミン A 環境を変化させる)
論文審査委員	(主査) 教授 大森 泰文 (副査) 教授 高橋 勉 教授 山崎 正和

## 学位論文内容要旨

Massive bowel resection upregulates the intestinal mRNA expression levels of cellular retinol-binding protein II and apolipoprotein A-IV and alters intestinal vitamin A status in rats.

大量腸管切除にて腸管細胞内レチノール結合タンパク質 II およびアポリポタンパク質 A-IV の遺伝子発現が上昇しラット腸管におけるビタミン A 環境を変化させる

申請者氏名 蛇口 琢

### 研究目的

短腸症候群においては広範囲腸管切除に伴いタンパク質、脂肪、炭水化物、無機質、ビタミンといった様々な栄養素の吸収不良が起きる。これらのひとつであるビタミン A は生体において多様な生理作用を持つ重要な微量栄養素である。ビタミン A は腸管においては腸管上皮細胞の増殖を促進し腸管順応（腸切除時の腸管内吸収面積の減少を絨毛の細胞が増殖して補おうとする反応）との関連（Wang JL et al. J Nutr. 127, 1297-1303, 1997）が示唆されている。これらの報告や基礎実験の結果から我々はビタミン A が腸切除時に吸収不良を改善する上で重要な働きをすると考えるに至り、広範囲腸管切除時におけるビタミン A の吸収不良を補うようなメカニズムの存在を想定した。そこで広範囲腸管切除が腸管内でビタミン A の吸収、輸送、貯蔵へ与える影響を検討すべく本研究を立案した。そこで得られた知見から短腸症候群患者の栄養管理に資することが本研究の目的である。

### 研究方法

短小腸群（75%小腸切除ラットモデル）とコントロール群（腸管切離・再吻合を行う）を作成し術後1週間後に腸管および肝臓の組織を採取した。遺伝子レベルでの影響を調べるためビタミン A 代謝に関与する細胞内レチノール結合タンパク質（CRBP）I、CRBP II、レシチン：レチノールアシル基転移酵素（LRAT）遺伝子等をリアルタイム PCR を用いて定量し各群間の発現量の差を比較した。タンパク質レベルでの変化をウェスタンブロッティングにより検討した。形態的な検討のため腸管組織に対し HE 染色、免疫組織染色を行い各群での比較を行った。CRBP II と LRAT の協調作用の検討のため培養細胞を用い CRBP II ないし LRAT 単独と CRBP II と LRAT が共存する環境下でのビタミン A を定量し、取り込みの効率を

比較した。また小腸と肝臓の組織に含まれるビタミン A を高速液体クロマトグラフィーによって定量し比較した。これらの結果から短小腸状態が腸管内のビタミン A 吸収、輸送、貯蔵に与える影響について検討した。

### 研究成績

CRBP II は空腸粘膜の可溶性タンパク質のおよそ 1% を占めるタンパク質で、腸管に豊富に存在し、腸管内腔から腸管吸収上皮細胞内へのビタミン A の取り込みにおいて中心的な役割を担っていると考えられている。本実験では短腸群の腸管組織において CRBP II 遺伝子の発現が有意に上昇していた。腸管吸収上皮細胞内へ取り込まれたビタミン A がエステル化され生成されたレチニルエステルはカイロミクロンに組み込まれリンパ管を經由して大循環にのって肝臓に運ばれ貯蔵される。カイロミクロンを構成するアポリポタンパク A をコードする ApoA4 遺伝子が短腸群の腸管組織にて有意に上昇していた。

免疫組織染色では CRBP II が絨毛の吸収上皮細胞により強く発現し、また短腸群にて強く発現しているように観察された。CRBP II と LRAT の両方が吸収上皮細胞にて陽性であり同じ細胞に 2 つのタンパク質が共局在していた。

培養細胞による実験では HEK (human embryonic kidney) 293T 細胞に CRBP II または LRAT 単独、ないし両方を発現させレチニルエステルの生成量の変化を観察した結果、CRBP II や LRAT 単独に比べ、両方を発現させた細胞でレチニルエステルの生成量が有意に上昇した。

### 結論

本研究の結果から短小腸ラットでは CRBP II や ApoA4 遺伝子の発現上昇を介し腸管吸収上皮内でのビタミン A のエステル化や大循環への輸送が亢進されることが示唆された。また免疫組織染色による形態学的な検討および培養細胞による実験から CRBP II と LRAT が協調的に働くことでビタミン A のエステル化が促進されることが示唆された。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森 泰文

申請者： 蛇口 琢

論文題名：Massive bowel resection upregulates the intestinal mRNA expression levels of cellular retinol-binding protein II and apolipoprotein A-IV and alters the intestinal vitamin A status in rats（大量腸管切除にて腸管内レチノール結合タンパク質 II およびアポリポタンパク質 A-IV の遺伝子発現が上昇しラット腸管におけるビタミン A 環境を変化させる）

## 要旨

小腸切除に伴う短腸症候群において、栄養吸収不良を代償するために腸管順応が生じる。この腸管順応にビタミン A が重要な役割を担うことが知られていることから、著者は、ラットの 75%腸管切除モデル(SB ラット)を使用し、ビタミン A 吸収関連因子の mRNA やタンパクの発現動態を詳細に検討した。その結果、SB ラットの腸管で cellular retinol binding protein II (CRBP II)と apolipoprotein A-IV (APOA4)の mRNA が有意に増加することを見出した。タンパクレベルでも SB ラットの腸管上皮細胞内で CRBP II が増加すること、またこれらの細胞内では CRBP II に結合したレチノールをエステル化し、ビタミン A の体内への吸収に重要な役割を有する lecithin retinol acyltransferase (LRAT)が共発現していることも確認された。以上より、短腸症候群においては、腸管切除で減少したビタミン A の総吸収量を補うために、腸管上皮細胞における CRBP II や APOA4 の発現量を高めることで、腸管上皮細胞当たりのビタミン A 吸収量を高めるという代償システムがあることが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

短腸症候群で栄養吸収不良が生じることは良く知られているが、そのうちのビタミン A 吸収量低下を代償するメカニズムは不明であった。本論文は、腸管切除により CRBP II と APOA4 が有意に上昇するというビタミン A 吸収の代償メカニズムの一端を提示した初めての論文であり、斬新性は高いと考えられる。

### 2) 重要性

短腸症候群は長期もしくは生涯にわたり高カロリー輸液に依存することもあり、患者の「生活の質」を著しく害する。特に、腸管順応に必要なビタミン A 自体が不足することも解決すべき問題である。本研究により不足したビタミン A の吸収量上げるシステムが存在し、これに関与する分子を特定した点は、今後の治療戦略に重要な知見を与えている。

### 3) 研究方法の正確性

ラットの 75%腸管切除による短腸症候群モデルは確立されたものであり、腸管離断吻合を陰性対照とした点も正しい選択である。定量的 RT-PCR やイムノブロッティング、免疫染色、液体クロマトグラフィー、トランスフェクションなどの方法も定法にしたがって正しく施行している。さらにデータの統計学的解析およびその解釈も正しく行われている。データの信頼性は高いものと考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

研究の背景と目的、研究方法、実験結果の記載と図表の提示方法は明瞭で理解しやすい。また、考察も論理的に組み立てられているとともに、本研究において解明できなかった点や解釈が困難な点など、いわゆる弱点に関しても丁寧に説明されており好感が持てる表現となっている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。