

9027 食塩およびミネラルが消化管ホルモン分泌細胞に及ぼす影響

伏木 亨(京都大学)

消化管ホルモンは食物の摂取によって、主に消化管から血液中に分泌され、摂取した食物の消化吸收を促進するばかりでなく、体全体の代謝や食欲にまで大きな影響を及ぼすことが明らかになっている。消化管ホルモンの分泌は食物と生体との接点として重要なステップであると考えられる。消化管ホルモンの産生分泌細胞は特異抗体を用いた組織染色などの方法でほぼ同定されているが、それらの消化管ホルモンが、食物成分のうちの何によって分泌刺激を受け、また、その刺激受容機構はどのようなものであるのかについては殆ど解明されていない。マグネシウムやカルシウムがCCKを分泌するという報告があるが、これらミネラルが消化管ホルモン分泌に与える影響の機構についても、食品成分によるそれと同様、全く明らかにはなっていない。生化学的機構がよく分からない原因の一つとして、消化管ホルモン産生細胞が単離されていないことがあげられる。小腸上皮では、消化管ホルモン産生細胞は上皮に存在する細胞の僅か1%にも満たない。従って、食品成分やミネラルと消化管ホルモン産生細胞との相互作用を生化学的に解析するためには消化管ホルモン産生細胞を濃縮することが必要である。本研究においては、ミネラルによるコレシストキニン分泌機構の解明を研究するために、ラット消化管から消化管ホルモン産生細胞画分を濃縮する方法を開発することを目的とした。

ラット小腸上皮細胞をコラゲナーゼとディスパーゼ消化によって分散させた。このものを細胞分散液とし、消化管ホルモン産生細胞と腸管細胞との構造の違いに着目して35%パーコールを用いた密度勾配遠心を行ったところ、密度の比較的小さい画分に、小腸上皮細胞の大部分を占める腸管細胞が分離された。この画分よりも密度の大きい画分に、ガストリンに富む細胞が分画された。CCKも検出された。この画分には、ガストリン産生細胞のみならず、すべての消化管産生細胞が集まっているものと思われる。消化管ホルモン産生細胞には共通してクロモグラニンというペプチドが含まれており、本研究では、消化管ホルモン産生細胞画分のマーカー物質であるクロモグラニンは、ガストリンが検出された画分とまったく同じ画分に検出された。これらのことから、分画した画分には、消化管ホルモン産生細胞が濃縮されていることが明かである。今後、目的細胞の純度を更に高めるためにセルソーター等を使う予定である。濃縮された細胞を用いて、ミネラルや食品成分の刺激を解明して行きたいと考えている。

9027 食塩およびミネラルが消化管ホルモン分泌細胞に及ぼす影響

伏木 亨(京都大学)

研究目的

消化管ホルモンは食物の摂取によって、主に消化管から血液中に分泌され、摂取した食物の消化吸收を促進するばかりでなく、体全体の代謝や食欲にまで大きな影響を及ぼすことが明らかになっている。消化管ホルモンの分泌は食物と生体との接点として重要なステップであると考えられる。消化管ホルモンは現在までに数十種類発見されており、それらの産生分泌細胞は特異抗体を用いた組織染色などの方法でほぼ同定されている。しかし、それらの消化管ホルモンが、食物成分のうちの何によって分泌刺激を受け、また、その刺激受容機構はどのようなものであるのかについては殆ど解明されていない。

食品に含まれているミネラルが消化管ホルモンの分泌に与える影響としては、酵素分泌を促進する機能を持つ消化管ホルモンであるコレシストキニン(CCK)の分泌促進が報告されている。とくに、マグネシウムやカルシウムがCCKを分泌するという報告がある。Goらは6mMのマグネシウムをひと小腸に還流し、有意なCCK分泌を観察した。また、菅野らは、ラットの還流実験で、CCKの分泌に還流液中のカルシウムが必須であることを示している。しかし、これらミネラルが消化管ホルモン分泌に与える影響の機構については、食品成分によるそれと同様、全く明らかにはなっていない。消化管に存在する食品成分やミネラルがどのような生化学的機構を介して消化管ホルモン産生細胞を刺激するのかがよく分からない原因の一つとして、消化管ホルモン産生細胞が単離されていないことがあげられる。小腸上皮は腸管細胞と呼ばれる栄養素の吸収に関与する細胞が大多数を占めており、消化管ホルモン産生細胞は上皮に存在する細胞の僅か1%にも満たない。従って、食品成分やミネラルと消化管ホルモン産生細胞との相互作用を生化学的に解析するためには消化管ホルモン産生細胞を濃縮することが必要である。

消化管ホルモンは小腸のクリプト部位に存在する幹細胞から分裂し、細胞内に分泌顆粒を持つ細胞として分化する。腸管細胞が僅か数日で小腸絨毛先端まで移動し剝落するのに対し、消化管ホルモン産生細胞は絨毛に数十日以上も留まっていると言われている。腸管

細胞に比べて、細胞内に顆粒を持っていること、寿命が長いことなどの性質を利用してこれを濃縮することが可能であると思われるが、未だ誰も生理活性を維持した状態で単離に成功していない。

本年度の研究においては、ミネラルによるコレシストキニン分泌機構の解明を研究するために、ラット消化管から消化管ホルモン産生細胞画分を濃縮する方法を開発することを目的とした。

実験方法

細胞を分散させる方法には、物理的振動、化学的方法、酵素処理の3つがあり、一般にはこれらを組み合わせて用いることが多い。ここでは近年最もよく用いられているコラゲナーゼとディスパーゼを用いた酵素消化による分散を行った。ディスパーゼは細胞と細胞基質間のフィブロネクチンを消化する酵素である。また、同じく細胞と細胞基質間の安定に寄与しているカルシウムイオンをEDTAでトラップして分散を促進させた。コラゲナーゼやディスパーゼは製品のロットによる違いがあるので本実験ではシグマ社製コラゲナーゼタイプ4と合同酒清ディスパーゼについて実験を通して同じロットのものを使用した。

1回の精製操作には、ウィスター系雄ラット250から300gくらいのものを5匹を使用した。ラットを一夜絶食させて小腸を取り出した。それぞれの小腸は0.1mg/mlの大豆トリプシンインヒビター(シグマ社製)を含む生理食塩水50mlを通して管腔側を洗い、切り開いた後、コラゲナーゼ0.1mg/ml、ディスパーゼ2mg/ml、DNase 0.05mg/mlを含むTCM-199培地で37度30分間消化した。50xgで5分間遠心した上清を細胞分散液としてストックする。沈澱画分はもう一度同じ培地で消化し遠心上清を得た。2回目の遠心後の沈澱は25mMHEPES、1mMEDTAを含むリン酸緩衝液で20分間分散を行った。全ての遠心上清をいっしょにまとめ、200メッシュのステンレス網を通しさらに400メッシュのステンレス網を通した。ろ液を1000xgで30分遠心し、細胞を沈澱させた。このものを細胞分散液とし、さらにパーコールを用いた密度勾配遠心を行った。パーコールは20%から40%まで、種々の濃度のものを調製して細胞の分離状態を検討してみたが、35%濃度のときに目的とする消化管ホルモン産生細胞と腸管細胞とが最も良く分離された。

消化管ホルモン産生細胞には共通してクロモグラニンというペプチドが含まれており、近年、膵酵素分泌抑制作用があるペプチドホルモンとして発見されたパンクレオスタチンと同じ物質であることが明らかになっている。本研究では、消化管ホルモン産生細胞画分のマーカー物質としてクロモグラニンの組織染色を行った。また、消化管ホルモンの代表として、測定が容易なガストリンをラジオイムノアッセイで測定した。小腸のガストリン

産生細胞と他の消化管ホルモン産生細胞とは形態学的にも殆ど同じであるので、ガストリンを指標に精製すれば、全ての消化管ホルモン産生細胞が濃縮できる。

結果

Fig. 1は35%パーコール密度勾配遠心によって分散細胞を分離したものである。密度の比較的小さい画分に、ほとんどの細胞が分離された。細胞数でもタンパク質含量で

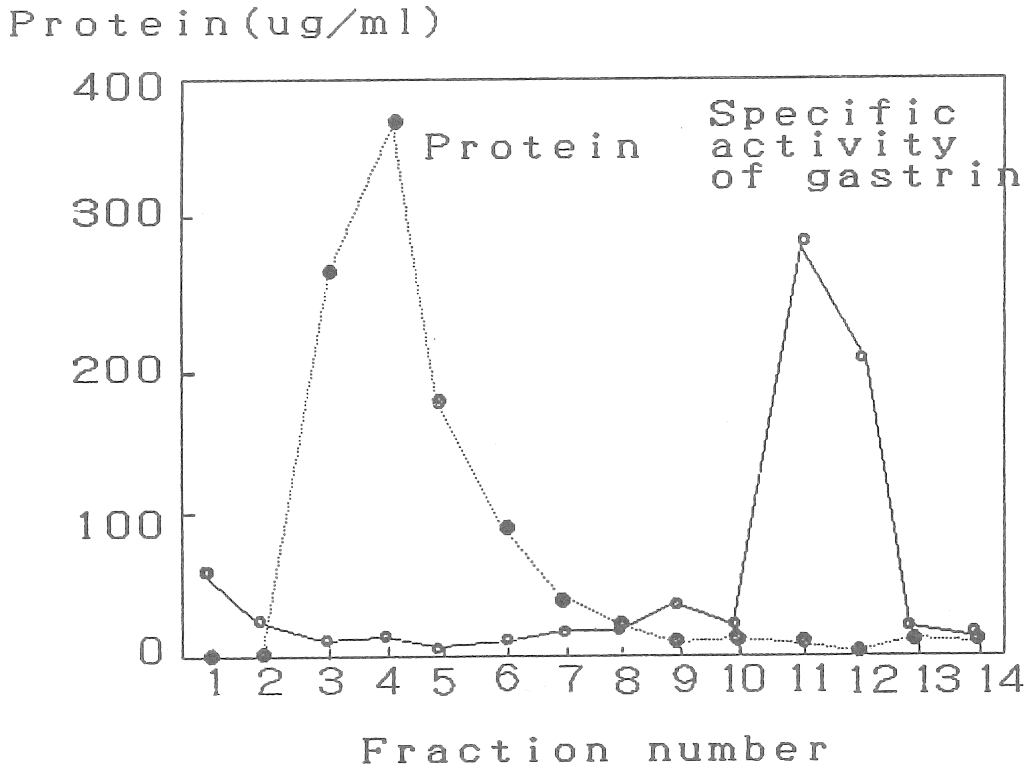


Fig. 1. Percoll density gradient centrifugation of dispersed rat epithelial cells.

も同様の結果が得られた。この画分は、小腸上皮細胞の大部分を占める腸管細胞である。この細胞は栄養素の吸収などの機能を果している。腸管細胞の画分よりも密度の大きい画分、F i g . 1 ではフラクション 1 1 - 1 2 付近には、細胞数は少ないが、ガストリンに富む細胞が分画された。ガストリン含有量を細胞数で割ってガストリンの比活性を計算するとフラクション 1 1 - 1 2 に大きなピークが現れ、この画分にガストリンを含む細胞が高濃度に濃縮されていることが明かである。この画分には、ガストリン産生細胞のみならず、すべての消化管産生細胞が集まっているものと思われる。全ての画分について細胞のクロモグラニンを染色したところ、ガストリンが検出された画分とまったく同じ画分にクロモグラニン染色陽性の細胞が分画されていた（F i g . 2、黒く染色されている細胞）。

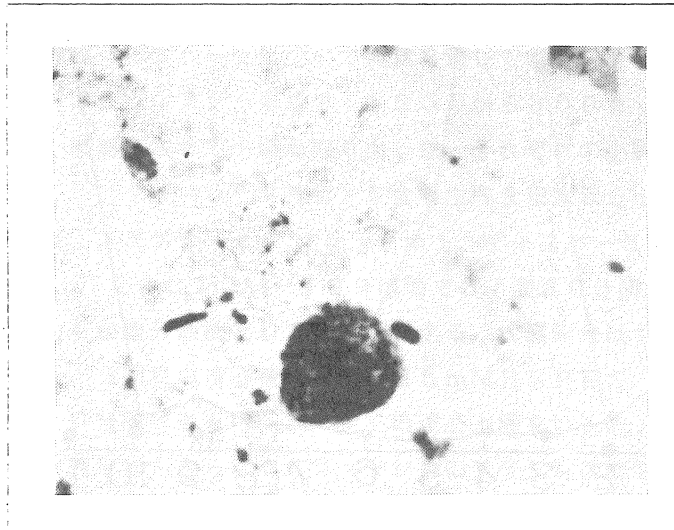


Fig. 2 Chromogranine staining of the concentrated hormone-producing cells.

また、細胞を5%クロロホルムで固定した後、抗CCCK抗体を反応させると、ガストリンが検出された画分と反応することも確かめられた。これらのことから、35%パーコール密度勾配遠心法によって、消化管ホルモンに産生細胞に富む画分が濃縮されることが明らかになった。

考察

消化管ホルモン産生細胞は食物と生体内代謝との接点に位置する重要な細胞である。これまでいくつかの研究グループによって小腸からホルモン産生細胞の単離が試みられてきたが未だに成功していない。B a b a rらは犬の小腸から消化管ホルモン産生細胞を濃縮したが、純粋には精製できていない。

本研究の方法によって、かなりの程度消化管ホルモンを濃縮することができたが、まだ相当量の腸管細胞やパネト細胞などの混入がある。本研究で消化管ホルモンのマーカーとして用いたガストリンは、主に胃から分泌されるホルモンであり、胃液の分泌を促進する作用がある。ガストリン産生細胞は小腸上部、特に十二指腸から空腸にかけても分布していることが知られており、本研究で濃縮したホルモン産生細胞画分から検出されたガストリンは小腸上部由来のものである。クロモグラニンによる組織染色の写真からは、濃縮された細胞が脱顆粒していなくて、まだ細胞内にホルモンに富む顆粒を蓄えていることが確認された。今後、さらに精製を進めるためにセルソーターの利用などが有効であると思われる。

消化管ホルモン産生細胞は食物からの情報を受け取る部位とホルモンを開口放出する部位の明らかな極性を有している。前者は微絨毛の上に存在するといわれている。この極性の維持は、食物刺激による消化管ホルモン分泌にとって重要であり、本実験のような方法で、細胞を分散させたもので刺激に応答を起こす極性が維持されているかは明かではない。乳腺細胞では、コラーゲンゲルによって細胞の3次元方向の配向をもたせて生理的な機能の維持に成功している例もあるので、その様な方法も取り入れて行く必要がある。

さらに、小腸においては、バラクリンと呼ばれる、近傍の細胞間のホルモン作用伝達や、神経のモジュレーションなども考えられる。ミネラルによるCCCKの分泌にはこれらの因子は直接は影響していないと考えてはいるが、もしもこれらの細胞間相互作用が無視できないならば、その再構成を試みる必要がある。現在ラットを用いた*i n v i v o*の実験で確認しているところである。

今後の課題

セルソーターなどの機器を用いて、消化管ホルモン産生細胞の精製をさらに進める一方、食物刺激に対する応答性を確認する。応答性が低下していたならば、3次元コラーゲンゲル

ル培地による培養などで細胞の極性を再構築する工夫が必要である。細胞が十分に濃縮されたならば、長期間そのままの機能を有した状態で培養できる条件を検索する。消化管ホルモン産生細胞は既に増殖能を失っていると考えられているが、*in vivo*では寿命が大変長い細胞であることが明らかになっているので、数週間の培養を試みる。この様な系を用いて、本実験の当初の目的である、ミネラルの消化管ホルモン分泌に対する効果を解析して行きたいと考えている。

Effect of NaCl and minerals on secretion of gastrointestinal hormones by hormone-producing cells: Purification of hormone-producing cells from rat small intestine.

Tohru FUSHIKI and Etsuro SUGIMOTO
Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture
Kyoto University

Summary

Gastrointestinal hormone-producing cells were purified from rat small intestine with dispersion and percoll density gradient centrifugation. Rat epithelial cells were dispersed by dispase and collagenase. The dispersed cells were filtrated through 200 and 400 mesh wire filters. The filtrates were then applied on density gradient centrifugation with 35% percoll. The fraction number 11 and 12 on the centrifugation contained gastrin, chromogranin and CCK. The small intestinal absorption cells, which occupy almost 99% of the small intestinal cells, were separated from these cells. It suggested that gastrointestinal hormone producing cells were highly concentrated, and it must be useful for investigation of the effect of minerals on the hormone-release of the cells.