

9130 食塩及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重要な接点であると考えられる。食品中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、膵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をがCCKを分泌すると言う報告があるが、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、昨年度に引き続き、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検討することを目的とした。

昨年度までに、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、35%パーコールを用いた密度勾配遠心で、密度の比較的大きい画分に、消化管ホルモン産生細胞のマーカーとなるクロモグラニンA陽性の細胞が分離されることを明らかにした。この画分をさらにセルソーターで細分画することによって、消化管ホルモン産生細胞に富む画分が得られた。精製した細胞を小さなカラムにつめ、37度に保温しつつ、5 μ Mのグルコースを添加すると、消化管ホルモンの一種であるガストリックインヒビトリペプチド(GIP)が放出された。CCKについては現在の方法では検出感度が低いのでさらに測定法を検討中である。精製した細胞は消化管ホルモン放出能を持っていることが明らかになったが、さらに応答を高める条件を検討する必要がある。

9130 食塩及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、血液中に分泌され、摂取した食物の消化吸収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。食物成分による消化管ホルモンの分泌は食物と生体との重要な接点であると考えられる。食品中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、膵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をがCCKを分泌すると言う報告がある。また、ラットの小腸還流実験で、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、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・精製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。

本研究は、昨年度に引き続き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しさらにセルソーターを用いた分離精製方法を開発することを目的とした。

実験方法

細胞の分散方法は、昨年度に報告した方法で行った。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。

ウイスター系雄ラット250から300gくらいのものを5匹使用した。ラットを一夜絶食させて小腸を取り出し、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、DNase0.05mg/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35%パーコールを用いた密度勾配遠心を行った。消化管ホルモン産生細胞を含む画分をさらにセルソーターで前方散乱光を指標にして分画、精製した。

消化管ホルモン産生細胞には共通してクロモグラニンAというペプチドが含まれており、近年、隣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バング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、昨年度に測定したガストリンのほかにコレシストキニン、GIPをELISA法で測定した。

結果

図1は細胞を分散した後、35%パーコール密度勾配遠心によって分画したものである。昨年度の実験でガストリンが検出された画分と同じ画分にCCKを含む細胞が濃縮されていることが明らかとなった。図2は濃縮した消化管ホルモン産生細胞画分をさらにセルソーターで分画したものである。本機械で細胞を分画後、各々の画分の消化管ホルモン産生細胞数を測定したところ、図の画分3に最も高密度に消化管ホルモン産生細胞が濃縮されることが明らかになった。

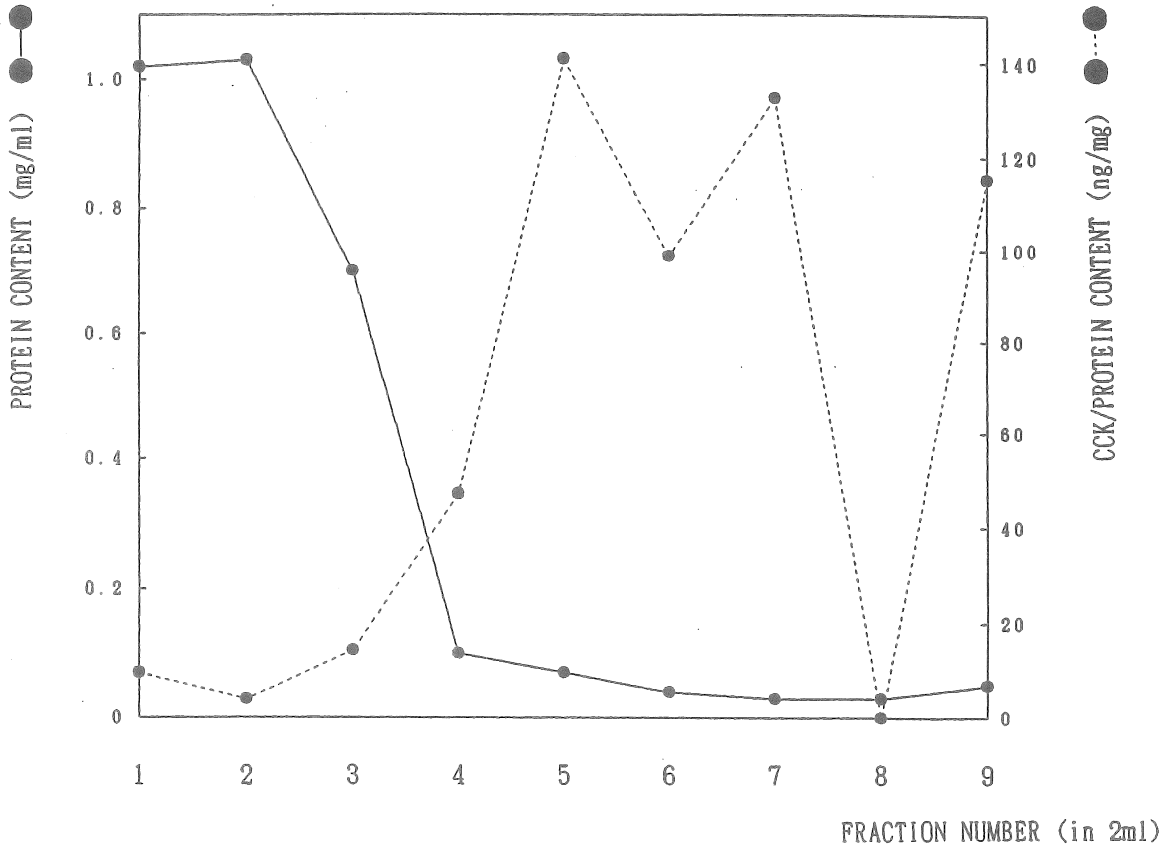


図1 35%パーコール密度勾配遠心法による消化管ホルモン産生細胞の分離とCCKの検出。パーコール密度勾配遠心は昨年度に確立した方法で行った。CCKはOAL658抗体を用いELISA法で検出した。CCKの濃度は、その画分に含まれる全タンパク質1mg当りのng(CCK33当量)で表した。標準としてブタCCK33を用いた。

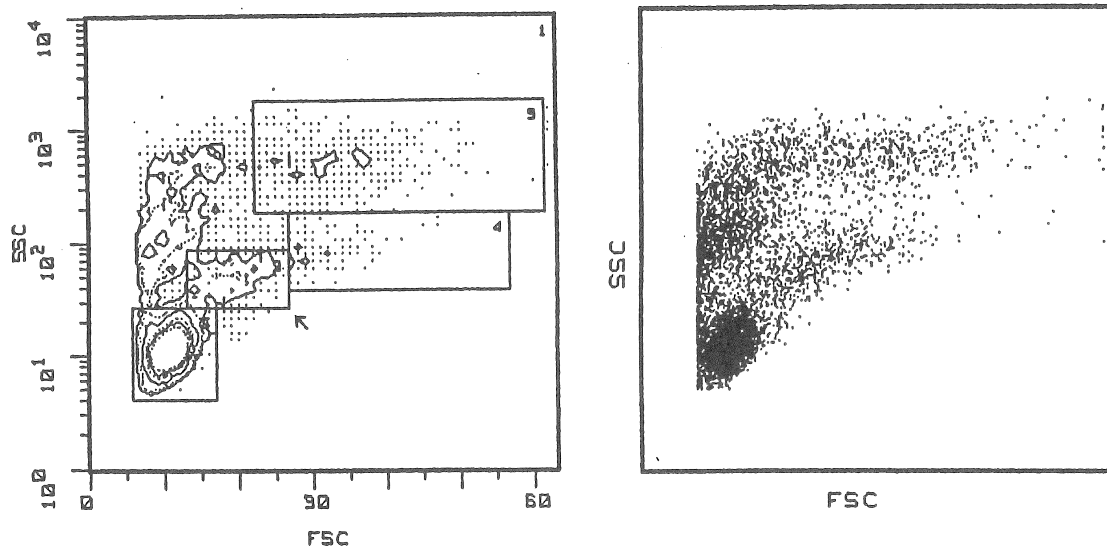


図2 セルソーターによる消化管ホルモン産生細胞画分の精製。右は細胞の分布
左は分画範囲を表す。左の図中、3番の範囲に消化管ホルモン産生細胞が濃縮され
ていた。（矢印）

この細胞画分が腸管からの刺激によって消化管ホルモンを分泌する機能があるかどうかを、グルコースによるGIPの放出を指標にして検討した。37度で外套管を保温した小型カラムに精製した細胞を詰めて、上から37度のグルコース溶液(5 uM)を流したところ、GIPの放出が観察された。現在、CCKの放出を検討中である。

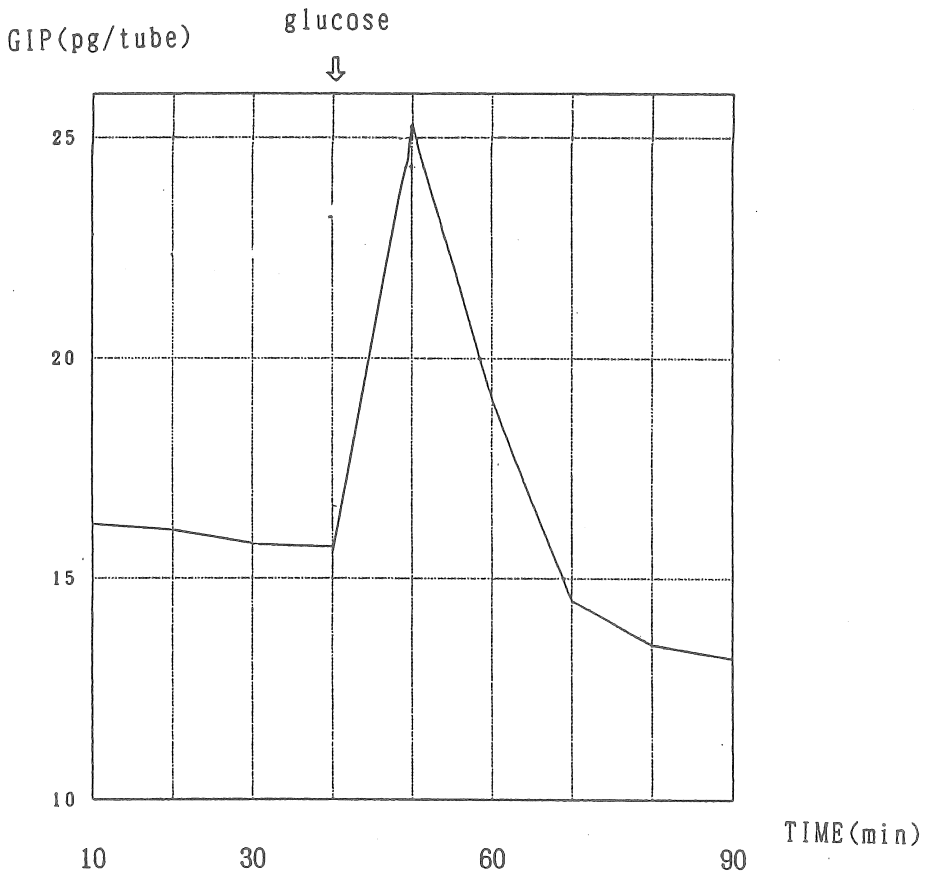


図3 精製した細胞からのGIP放出。精製した細胞をカラムに詰め37度に保温した。5 uMのグルコース溶液を流し、放出されるGIP量をRIAで測定した。

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、純粹には精製できていない。

昨年度に確立したパーコールを用いる密度勾配遠心法によって、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ット細胞などの混入があった。本研究で用いたセルソーターによって消化管ホルモン産生細胞がさらに精製された。分画された画分は、グルコースに応答してG I Pを放出する機能を維持していたが、その応答は強くはなかった。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対する応答性がどの程度維持されているかは明かではない。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。また、得られた細胞画分を、さらに産生する消化管ホルモンごとに細分画するためには、ハイブリドーマなどのような培養できる細胞にすることが必須であり現在計画中である。

今後の課題

セルソーターなどの機器を用いて精製した消化管ホルモン産生細胞が食物刺激に応答することを確かめたが、これをさらにスクリーニングするために、幹細胞や癌細胞などのハイブリドーマを作製することを計画している。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し、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, percoll density gradient centrifugation and cell-sorter. Rat epithelial cells were dispersed by dispase and collagenase and then applied on density gradient centrifugation with 35% percoll. The fraction number 11 and 12 on the centrifugation, which contained gastrin, chromogranin, GIP and CCK, were then applied cell-sorter. The small intestinal absorption cells, which occupy almost 99% of the small intestinal cells, were markedly removed by this process. Purified cells were packed in the column and maintained at 37C. Gastric inhibitory peptide (GIP) was released from the cells when the cells were perfused with 5 μ M of glucose solution. It suggested that gastrointestinal hormone producing cells were highly concentrated and it had an ability of the hormone-release, indicating that the purified cells are useful for investigation of the effect of minerals on the hormone-release of the cells.