



Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion

松村, 公男

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-04-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2997

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002997>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	松村 公男
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 2035 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 4 月 9 日

【 学位論文題目 】

Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion(消化管ホルモン分泌におけるオリゴペプチドトランスポーター(PEPT1)の役割に関する研究)

審 査 委 員

主 査	教 授	東 健
	教 授	久野 高義
	教 授	林 祥剛

【背景】

消化管に散在する消化管内分泌細胞より分泌される glucagon like peptide-1 (GLP-1)、glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)、cholecystokinin (CCK) などの種々の消化管ホルモンは摂食によって分泌され、インスリン分泌や腸管蠕動、胆嚢収縮などを制御することにより生体のエネルギー恒常性維持に重要な役割を果たしている。これらの消化管ホルモンの分泌は神経系によっても制御されるが、主として糖、脂質、タンパク質など種々の栄養素が消化管内分泌細胞を直接刺激することにより分泌が惹起される。しかし、これら栄養素による消化管ホルモン分泌の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

近年、徐々に消化管内分泌細胞の栄養素感知機構の研究が進む中で、例えば、GLP-1 を分泌する消化管 L 細胞は、脂肪酸をリガンドとする 7 回膜貫通型受容体、GPR120 を介して脂肪酸を感知し、GLP-1 を分泌している事が示された。また消化管において糖吸収を担うグルコーストランスポーターである sodium/glucose cotransporter1(SGLT1)は消化管内分泌細胞にも発現しており、この SGLT1 を介したグルコース取り込みが消化管内分泌細胞の電氣的興奮を惹起し、糖刺激による GLP-1 分泌を引き起こしている可能性が示唆されている。このように脂肪酸や糖による消化管ホルモン分泌の分子メカニズムに関しては栄養素を認識する受容体やトランスポーターの関与が徐々に明らかとなってきている。

一方、摂食されたタンパク質の分解産物であるオリゴペプチドに関しては、未分解のタンパク質またはアミノ酸を腸管内に直接投与するよりも、あらかじめ加水分解したオリゴペプチドの状態で腸管内に投与する方が CCK や GLP-1 などの消化管ホルモン分泌を強く刺激したという実験結果が報告されている。しかしその分子機構は不明である。

生体において摂食されたタンパク質は消化分解され、消化管内においては、その大部分がオリゴペプチドの状態で存在し、オリゴペプチドトランスポーター PEPT1 を介して体内に吸収されている。PEPT1 はジペプチド、またはトリペプチドを基質とする 12 回膜貫通型のトランスポーターであり、オリゴペプチドとプロトン細胞内に共輸送する。この輸送エネルギーとしてはプロトン濃度勾配が利用されており、細胞外が弱酸性条件下において基質とプロトンが効率よく細胞内に輸送される。このように PEPT1 はプロトンを輸送することから起電性のトランスポーターであり、基質の取り込みに伴い細胞の興奮を引き起こす可能性が考えられる。このような背景をもとに、私は、消化管内分泌細胞においては、PEPT1 を介して取り込まれたオリゴペプチドが細胞膜の興奮を引き起こし、ホルモン分泌を惹起しているという仮説をたてた。

【目的】

本研究においては、上記の仮説を検証する目的で、消化管内分泌細胞のモデルとして STC-1 細胞を用い PEPT1 のホルモン分泌における役割を検討した。

【方法】

まず消化管内分泌細胞に PEPT1 が発現しているか否かを調べるためにマウス小腸切片において PEPT1 の発現領域を *In situ* hybridization 法で検討した。また対応する連続切片において内分泌細胞マーカーであるクロモグラニン A に対する抗体を用いた免疫染色を行い、消化管内分泌細胞を同定した。

またより詳細な解析を行うために消化管内分泌細胞のモデルとして主に CCK を分泌する細胞株である STC-1 細胞を用いた。STC-1 細胞に PEPT1

と成長ホルモン遺伝子を共発現させ、ヒト成長ホルモンの分泌を指標として PEPT1 が導入された STC-1 細胞のホルモン分泌能を評価した。この細胞の刺激には PEPT1 の基質として Glycyl-Glycine (Gly-Gly) および Glycyl-Sarcosine (Gly-Sar)を用いた。

さらにこの PEPT1 発現 STC-1 細胞を Gly-Gly で刺激した場合の細胞膜電位変化をパッチクランプ法で評価した。また細胞内カルシウム濃度変化を評価するため、膜電位測定実験と同様の PEPT1 発現 STC-1 細胞にカルシウム指示薬である Fura-2 蛍光色素を導入し、その蛍光強度変化を指標として Gly-Gly 刺激による細胞内カルシウム濃度変化を評価した。

また電位依存性カルシウムチャネル阻害剤である nifedipine で PEPT1 発現細胞を処置した場合のジペプチド誘導性ホルモン分泌を評価し、ジペプチド誘導性ホルモン分泌への電位依存性カルシウムチャネルの関与を検討した。

【結果】

マウス小腸の *In situ* hybridization 解析から PEPT1 はこれまでの報告と同様に小腸絨毛上皮細胞に幅広く分布している事が確認できた。また対応する連続切片を用いたクロモグラニン A の免疫染色においては PEPT1 陽性細胞にクロモグラニン A 陽性のシグナルが認められ、PEPT1 が消化管内分泌細胞に発現している可能性が示唆された。

PEPT1 を発現させた STC-1 細胞のホルモン分泌を共発現させた成長ホルモンの分泌を指標として評価したところ、PEPT1 の基質である Gly-Gly および Gly-Sar 刺激によりホルモン分泌が惹起された。一方、PEPT1 を発現しない STC-1 細胞では Gly-Gly や Gly-Sar によるホルモン分泌は惹起されなかった。またホルモン分泌は PEPT1 の基質取り込みが活性化する弱酸性(pH5.5)の緩衝液でのみ起こることからも PEPT1 を介した基質取り込みがホルモン

分泌を引き起こしている可能性が強く示唆された。さらに PEPT1 発現 STC-1 細胞をモノマーのグリシンで刺激した場合はホルモン分泌が惹起されなかったことから Gly-Gly の分解産物によって産生された単量体のアミノ酸により分泌が起こっているわけではなく PEPT1 を介したジペプチドの取り込みがホルモン分泌刺激につながっていることが明らかになった。

PEPT1 の基質取り込みを介したホルモン分泌の分子メカニズムをより詳細に解析するために PEPT1 発現 STC-1 細胞を Gly-Gly で刺激した場合の細胞膜電位変化をパッチクランプ法により評価したところ、Gly-Gly 刺激により細胞膜の脱分極が起こっていることが明らかとなった。また Fura-2 試薬を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定したところ PEPT1 発現 STC-1 細胞では Gly-Gly 刺激により細胞内カルシウム濃度の上昇が起こる事が明らかとなった。以上から PEPT1 を介した基質取り込みは消化管内分泌細胞の電氣的興奮と細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし、ホルモン分泌を惹起していることが強く示唆された。また L 型電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤である nifedipine で処置した PEPT1 発現 STC-1 細胞では Gly-Gly 刺激によるホルモン分泌が障害されたことから、PEPT1 の基質取り込みを介したホルモン分泌には L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性化を介した細胞内カルシウム濃度上昇が必要であることが示唆された。

【考察】

これまで消化管内分泌細胞の生理機能については、単離することが困難なばかりでなく、機能解析のための適切な細胞株や実験系がないため、詳細な研究が困難であった。しかしながら、STC-1 細胞をモデルとした本研究から、PEPT1 を介した基質取り込みが内分泌細胞の興奮を引き起こし、細胞内へのカルシウム流入を誘導する事で、ホルモン分泌の引き金を引いている可能性

が示された。また免疫組織染色の結果より消化管内分泌細胞に PEPT1 が発現している事が示唆されることから、生体内においても PEPT1 を介したジペプチドの細胞内取り込みがホルモン分泌を引き起こしている可能性がある。消化管ホルモンの分泌は様々な因子により複合的に調節されているが、PEPT1 を介したオリゴペプチドの取り込みも、摂食により消化管ホルモン分泌が惹起されるための一経路となっていることが示唆される。

【結論】

本研究の結果から、経口摂取されたタンパク質による消化管ホルモン分泌のメカニズムとして、タンパク質の加水分解産物であるオリゴペプチドが PEPT1 を介して消化管内分泌細胞に取り込まれ、この際に生ずる細胞の電氣的興奮が、細胞内へのカルシウム流入を引き起こし、ホルモン分泌を惹起している可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2 0 2 3 号	氏 名	松村 公男
論 文 題 目 Title of Dissertation	Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion 消化管ホルモン分泌におけるオリゴペプチドトランスポーター（PEPT1）の役割に関する研究		
審 査 委 員 Examiner	主 査 東 健 Chief Examiner 副 査 林 祥 岡 Vice-examiner 副 査 久 野 高 義 Vice-examiner		
審査終了日	平成 2 0 年 3 月 2 6 日		

（要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度）

消化管に散在する消化管内分泌細胞より分泌される glucagon like peptide-1 や cholecystokinin などの消化管ホルモンは摂食によって分泌され、インスリン分泌や腸管蠕動、胆嚢収縮などを制御することにより生体のエネルギー恒常性維持に重要な役割を果たしている。また、生体において摂食されたタンパク質は消化分解され、消化管内においては、その大部分がオリゴペプチドの状態で存在し、オリゴペプチドトランスポーター (PEPT1) を介して体内に吸収されている。PEPT1 はジペプチド、またはトリペプチドを基質とする 12 回膜貫通型のトランスポーターであり、オリゴペプチドとプロトンを細胞内に共輸送する。本研究では、消化管ホルモン分泌における PEPT1 の役割について検討した。

マウス小腸の *in situ* hybridization により PEPT1 は小腸絨毛上皮細胞に幅広く分布していることを認めた。また、対応する連続切片を用いたクロモグラニン A の免疫染色においては PEPT1 陽性細胞にクロモグラニン A 陽性のシグナルが認められ、PEPT1 が消化管内分泌細胞に発現していることが示唆された。PEPT1 を発現させた STC-1 細胞のホルモン分泌を共発現させた成長ホルモンの分泌を指標として評価したところ、PEPT1 の基質である Gly-Gly および Gly-Sar 刺激によりホルモン分泌が惹起された。一方、PEPT1 を発現しない STC-1 細胞では Gly-Gly や Gly-Sar によるホルモン分泌は惹起されなかった。また、ホルモン分泌は PEPT1 の基質取り込みが活性化する弱酸性 (pH5.5) の緩衝液でのみ生じることからも PEPT1 を介した基質取り込みがホルモン分泌を引き起こしている可能性が強く示唆された。さらに、PEPT1 発現 STC-1 細胞をモノマーのグリシンで刺激した場合はホルモン分泌が惹起されなかったことから Gly-Gly の分解産物によって産生された単量体のアミノ酸により分泌が起こっているのではなく PEPT1 を介したジペプチドの取り込みがホルモン分泌刺激に繋がっていることが明らか

になった。

PEPT1 の基質取り込みを介したホルモン分泌の分子メカニズムをより詳細に解析するために PEPT1 発現 STC-1 細胞を Gly-Gly で刺激した場合の細胞膜電位変化をパッチクランプ法により評価したところ、Gly-Gly 刺激により細胞膜の脱分極が起こっていることが明らかとなった。また、Fura-2 試薬を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定したところ PEPT1 発現 STC-1 細胞では Gly-Gly 刺激により細胞内カルシウム濃度の上昇が起こることが明らかとなった。以上から PEPT1 を介した基質取り込みは消化管内分泌細胞の電氣的興奮と細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし、ホルモン分泌を惹起していることが強く示唆された。また L 型電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤である nifedipine で処置した PEPT1 発現 STC-1 細胞では Gly-Gly 刺激によるホルモン分泌が障害されたことから、PEPT1 の基質取り込みを介したホルモン分泌には L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性化を介した細胞内カルシウム濃度上昇が必要であることが示唆された。

これまで消化管内分泌細胞の生理機能については、単離することが困難なばかりではなく、機能解析のための適切な細胞株や実験系がないため、詳細な研究が困難であった。しかしながら、STC-1 細胞をモデルとした本研究から、PEPT1 を介した基質取り込みが内分泌細胞の興奮を引き起こし、細胞内へのカルシウム流入を誘導することで、ホルモン分泌の引き金を引いている可能性が示された。また免疫組織染色の結果より消化管内分泌細胞に PEPT1 が発現している事が示唆されることから、生体内においても PEPT1 を介したジペプチドの細胞内取り込みがホルモン分泌を引き起こしている可能性がある。消化管ホルモンの分泌は様々な因子により複合的に調節されているが、PEPT1 を介したオリゴペプチドの取り込みも、摂食により消化管ホルモン分泌が惹起されるた

めの一経路となっていることが示唆された。

本研究は、消化管ホルモン分泌について、従来、ほとんど行われなかった PEPT1 の役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。