

博士論文

ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞に及ぼす影響  
に関する基礎研究

2020年

松井 龍宣

DOCTORAL DISSERTATION

Effect of Histidine Deficiency in the Intestinal Epithelial Cells

2020

Tatsunobu Matsui

# 目次

序論	1
1 研究の背景・目的	
2 小腸上皮細胞による組織修復機構	
3 ヒスチジンおよびアルギニンについて	
4 ヒスチジンおよびアルギニンと小腸上皮細胞との関連	
5 本論文の構成	
第1章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走に与える影響	10
1-1 概要	
1-2 方法	
1-3 結果	
1-3-1 各種生体内アミノ酸欠乏による遊走への影響	
1-3-2 遊走におけるヒスチジンまたはアルギニンの濃度検討	
1-3-3 ヒスチジンまたはアルギニン欠乏時の遊走低下と TGF- $\beta_1$ の関連	
1-3-4 ヒスチジンまたはアルギニン欠乏時の遊走低下における機序解明	
1-4 考察	
1-5 小括	

第2章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の細胞生存率に与える影響・・・・・・・・・・ 32

2-1 概要

2-2 方法

2-3 結果

2-3-1 ヒスチジン欠乏による細胞生存率への影響

2-3-2 細胞生存率におけるヒスチジンの濃度検討

2-3-3 ヒスチジン欠乏によるアポトーシスへの影響

2-3-4 アポトーシスにおけるヒスチジンの濃度検討

2-3-5 ヒスチジン欠乏によるアポトーシス亢進の機序解明

2-3-6 ヒスチジン欠乏によるミトコンドリアへの影響

2-3-7 小腸上皮細胞以外の細胞でのヒスチジン欠乏による影響

2-3-8 小腸上皮細胞におけるヒスタミンの影響

2-4 考察

2-5 小括

総括・・ 56

研究業績・・ 59

謝辞・・ 60

参考文献・・ 61

## 序論

### 1 研究の背景・目的

出血や潰瘍を始めとする小腸粘膜上皮障害は、重症に至るまで痛みを伴わないことが多く、自覚症状がないために発見が遅れることがしばしばある [1-3]。そのため、症状が進行しやすく、小腸壁に穴が開いてしまう穿孔が生じて初めて発見されることも多いことから、臨床現場では大きな問題となっている。近年、カプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡を含む内視鏡技術の発達により、これまで発見が困難であった小腸の出血や潰瘍を早期に検出できるようになった [4]。しかし、これらの内視鏡による検査は簡便に利用できる手法ではなく、何らかの症状が現れ受診した際や人間ドックでの再検査等、検査のきっかけがないと実施されないため、小腸粘膜上皮障害の根本的な解決には至っていない。そのため、未だ臨床現場では、小腸の出血や潰瘍の早期発見や予防を含めた対処法が求められている。

一方で、血中のアミノ酸濃度を測定し、健常人と疾患患者のアミノ酸バランスを比較、統計的に解析することで、種々の疾患における血中アミノ酸の変動パターンを特定し、疾患の早期発見につなげようとする試みがある [5]。これまでがんの診断への応用研究が最も進んでいるが [5-7]、小腸粘膜上皮障害を併発する疾患での研究報告もあり [8-13] (Table 1)、その一つが慢性腎臓病である。慢性腎臓病では腸内細菌叢の変化や尿毒素の蓄積により腸管のバリア機能が低下し、出血や潰瘍を含む腸管粘膜障害が起こる [8]。同時に慢性腎臓病の患者には、血中ヒスチジン濃度の低下がみられる [14]。さらに、クローン病や潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患でも、血中ヒスチジン濃度の低下が複数報告されている [9-13]。このように、生体内における血中ヒスチジン濃度の低下と小腸における疾患の関連性が注目されている。特に、慢性腎臓病や炎症性腸疾患では小腸粘膜上皮障害と血中ヒスチジン濃度の低下が同時に認められており、その関連性が強く疑われている。一方、アルギニンと消化管の関連については、マウス大腸上皮細胞を用いた研究でアルギニン欠乏により遊走が低下すること [15]、壊死性腸炎を発症した未熟児でアルギニンの投与により症状が改善することが報告されている [16]。このように、ヒスチジンやアルギニンの欠乏は小腸粘膜上皮における種々の病態に関連することが疑われているが、小腸粘膜上皮障害との直接的な因果関係については不明な点が多い。

そこで本研究では、小腸の出血や潰瘍の発症に関わる小腸上皮細胞の遊走および細胞生存率に着目し、小腸上皮細胞におけるヒスチジンの役割を解明することを目的とした。

Table 1 種々の疾患における血中ヒスチジンおよびアルギニンの低下

疾患	ヒスチジン or アルギニン	血中濃度比 (%)	引用文献
肺がん	ヒスチジン	92	[5]
胃がん	ヒスチジン	87	
	アルギニン	94	
大腸がん	ヒスチジン	89	
	アルギニン	92	
乳がん	ヒスチジン	97	
前立腺がん	アルギニン	96	
膵臓がん	アルギニン	73	[7]
炎症性腸疾患	ヒスチジン	38 (潰瘍性大腸炎)	[9]
	ヒスチジン	69 (クローン病)	
	ヒスチジン	84	[12]
	ヒスチジン	87	[13]
慢性腎臓病	ヒスチジン	87-89*	[14]

※健常人との比較ではなく軽症患者との比較

## 2 小腸上皮細胞による組織修復機構

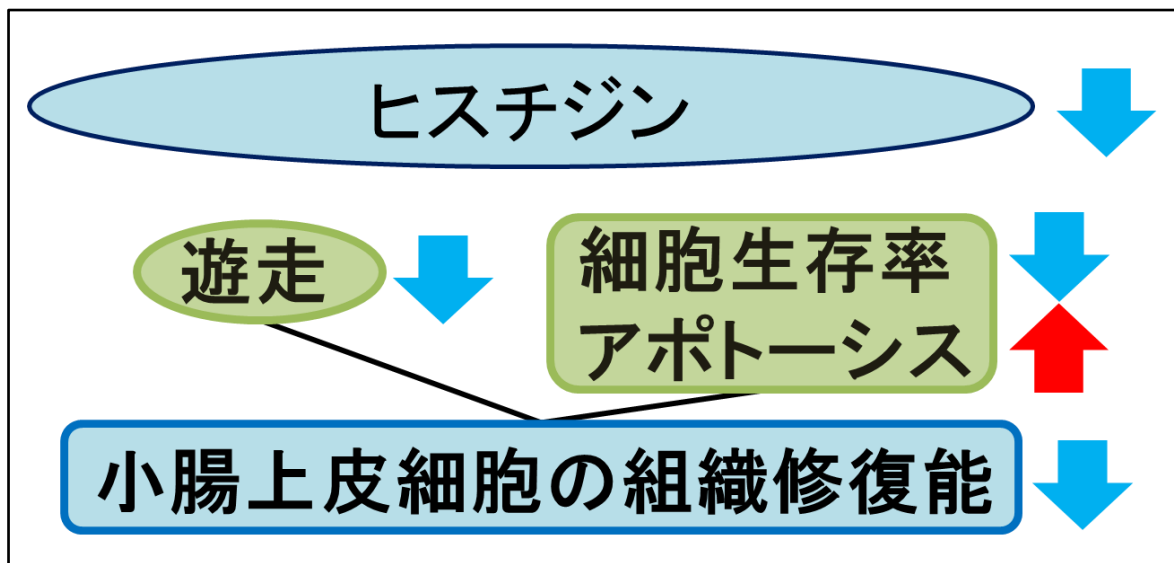
小腸は摂取した食物を消化し、栄養成分を吸収する重要な臓器である [17]。また小腸の管腔表面は、小腸粘膜上皮で覆われており [18]、日常的に細菌感染、胃酸による pH 変化、食物繊維の通過に伴う物理刺激等の外的刺激から生体を保護している [19]。しかし小腸上皮細胞に強い外的刺激が加わると、小腸粘膜上皮が破綻し、その直下にある粘膜固有層や毛細血管が障害を受けることで出血や潰瘍を生じる。また小腸粘膜上皮の破綻は、薬物の副作用、身体的・精神的ストレス、さらに各種疾患の合併症でも誘発されるため、ヒトは絶えずそのようなリスクにさらされていると考えられる。そのため、様々な外的刺激に対して小腸上皮細胞による組織修復は、小腸保護に重要な役割を果たしている [20]。

小腸上皮細胞による組織修復機構は、遊走、増殖および分化・成熟の 3 つの段階に分けられる [21, 22]。まず小腸粘膜上皮が破綻すると、その直下にある粘膜固有層や毛細血管が管腔側へ表出することを防ぐため、小腸上皮細胞が遊走し、次に同細胞が増殖して破綻部位を完全に埋め、さらに分化し成熟することにより組織修復が完了する [23]。組織修復過程における細胞の遊走は、細菌感染や物理的・化学的刺激を阻止する初期反応であり、特に重要である [24-26]。また、これらの組織修復機構が正常に機能するためには、小腸上皮細胞の生存が安定的に維持されている必要がある。

多細胞生物には、不要な細胞や有害な細胞を除去する生体恒常性維持機構として、プログラムされた細胞死すなわち細胞のアポトーシスがみられる [27]。アポトーシスは、小腸上皮細胞の恒常性にも重要な役割を果たしており、小腸粘膜上皮障害に伴う修復時に損傷を受けた細胞や不要な細胞を除去するため、アポトーシスが亢進する [28]。細胞生存は、生存シグナルとアポトーシスシグナルの適度なバランスの上に成り立つため、その詳細を解析するには細胞生存率だけでなく、アポトーシスも評価する必要がある。アポトーシスを評価するには、アポトーシス関連タンパク質である caspase ファミリーの活性化を検証する方法がある。caspase ファミリーはアポトーシスの制御に必須とされるタンパク質分解酵素の一群で、アポトーシス刺激が入ると分解・活性化し、そのプロテアーゼ活性により下流の caspase を順に分解・活性化することでアポトーシスを発現・亢進するシグナル伝達機構を持つ [29, 30]。またアポトーシス刺激の種類により活性化される caspase が異なるため、アポトーシスの発現経路の追跡が可能である。主要

な経路は、アポトーシスの亢進刺激別に、デスレセプターを介した経路（caspase-8 活性化）、小胞体ストレスを介した経路（caspase-12 活性化）、そしてミトコンドリアを介した経路（caspase-9 活性化）の3つである [31]。

本研究では、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞に及ぼす影響を検討するため、小腸粘膜上皮組織の修復初期反応として重要であることが知られている細胞の遊走、ならびに組織修復の基盤とされている細胞の生存とアポトーシスに焦点を当て実験を行った (Fig. 1)。



**Fig. 1** ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞に及ぼす影響  
矢印はヒスチジンを欠乏させた際の本実験結果を示す。



### 3 ヒスチジンおよびアルギニンについて

L-ヒスチジンは、タンパク質を構成する生体内アミノ酸 20 種類の 1 つであり、塩基性アミノ酸に分類される [32, 33] (Fig. 2)。ヒトでは、生体内での合成経路が限られるため不可欠アミノ酸とされており [33, 34]、主に食物から小腸のアミノ酸トランスポーターを介して吸収されることで得ることができる [35]。食事からのヒスチジン摂取が不足すると、血中のアルブミン濃度低下を始めとする様々なタンパク質の合成阻害や、赤血球形成不全によるヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低下、またアトピー性皮膚炎を始めとする皮膚疾患が起こる [36-38]。しかし、ヒスチジンの欠乏と小腸疾患との関係は解明されていない。

ヒスチジンは生体内でヒスチジン脱炭酸酵素により生理活性物質のヒスタミンに代謝される [39]。ヒスタミンの受容体は 4 種類 (H1-H4) が知られており、それら発現には局在性があるが、ヒスタミンが結合することで、血圧降下、血管拡張、血管透過性亢進または胃酸分泌の促進等の作用を示す [40]。一方、ヒスチジンはカルノシン合成酵素により  $\beta$ -アラニンと結合してジペプチドのカルノシンとなる [41]。カルノシンは抗酸化作用を持ち、酸化ストレスから生体を保護する働きがある [42]。このようにヒスチジンおよびその代謝物は生体で多様な機能を持つことが知られているが、ヒスチジンの欠乏がどのようにして小腸粘膜上皮障害を引き起こすかについては不明である。

ヒスチジン同様、L-アルギニンもまた生体内アミノ酸の 1 つであり、塩基性アミノ酸に分類される [32] (Fig. 3)。健康な成人が生体機能を維持するために必要な量のアルギニンは体内で合成されるため、不可欠アミノ酸ではない [43]。しかし、炎症性疾患、腎機能障害、感染症、ストレス、小腸の外科的切除等、一部の人にとっては体内で十分なアルギニンが合成されず食事による補充が必要となる [44]。

アルギニンは脳下垂体に作用し、成長ホルモンの分泌を促進することから、子供の成長に大切なアミノ酸である [45]。またアルギニンは、下部消化管の治癒に重要な役割をもつポリアミンの主要な前駆物質であることが報告されている [46]。さらに、アルギニンは一酸化窒素 (NO) 合成酵素の基質でもあるため、NO の血管平滑筋細胞への作用による血管拡張作用を持つ [33, 47]。最近では、 $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸や核酸にアルギニンを加えた経腸栄養剤が術後の感染防御に有効だと報告されている [48]。

このように、ヒスチジンおよびアルギニンは様々な生理機能を有しており、これらの欠乏条件下では生体の機能低下が示唆されている。よって、生体内で一定量維持されていることが重要であると考えられる。

### ヒスチジン(His)

- ・塩基性アミノ酸
- ・不可欠アミノ酸
- ・ヒスタミンへ代謝 → 血圧降下、血管拡張、血管透過性亢進、胃酸分泌促進
- ・カルノシンへ代謝 → 抗酸化作用

Fig. 2 ヒスチジンの特徴と分子構造

### アルギニン(Arg)

- ・塩基性アミノ酸
- ・可欠アミノ酸
- ・ポリアミンの基質 → 細胞の増殖に不可欠
- ・一酸化窒素(NO)へ代謝 → 血管拡張

Fig. 3 アルギニンの特徴と分子構造

## 4 ヒスチジンおよびアルギニンと小腸上皮細胞との関連

アミノ酸と小腸上皮細胞の遊走または増殖についての知見は、アルギニン、グルタミン、ロイシンに関する報告がある [49]。

アルギニンは小腸上皮細胞に 4 mM 添加した際に遊走を促進し、mammalian target of rapamycin (mTOR) およびその下流の 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) のリン酸化量を増加させたことから、そのメカニズムが mTOR/p70S6K 経路であると報告されている [50]。また、アルギニンは NO 合成酵素の基質であるとともに、小腸上皮細胞への NO ドナーの添加により遊走が促進されることから、アルギニンの代謝により生じた NO が遊走を促進することが示唆されている [51]。さらに、アルギニンを添加することにより focal adhesion kinase (FAK) と呼ばれる細胞接着に関与する因子の発現が増加し、遊走が促進されるという報告がある [51, 52]。しかし、いずれもアルギニンを添加した際の報告であり、アルギニンを欠乏させた際に小腸上皮細胞へ及ぼす影響は報告されていない。

一方で、グルタミンについては欠乏による影響の報告がある。グルタミン欠乏条件下では、細胞増殖の低下とアポトーシスの亢進が起こり、いずれも 1 mM のグルタミン添加により回復するとともに、1 mM のグルタミン添加時には非添加時と比較し、extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化量が増加した [53]。また、グルタミン欠乏条件下で小腸上皮細胞に 2.5~10 mM のグルタミンを添加した際に増殖を促進するとともに、ERK のリン酸化量を増加させた報告もあり、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介した経路の関与が示唆されている [54, 55]。ロイシンはその添加により遊走を促進し、アルギニンと同様 p70S6K のリン酸化量を増加させるが、NO の放出を増加させることはなく、その遊走促進もアルギニンより効果が低い [56]。

このように、それぞれのアミノ酸で異なる作用を有し、その制御経路も多岐にわたるが、これらは相互に作用しあっている可能性がある。例えば、グルタミンは、アルギニンやロイシンによる p70S6K のリン酸化を阻害するという報告がある [57]。mTOR/p70S6K 経路を阻害する分子機構は明らかになっていないが、個々のアミノ酸が持つ分子機構に加え、その相互作用も小腸上皮細胞とアミノ酸の関係における研究に広がりをもたらしている。しかし、このような状況にあって、ヒスチジンによる細胞の遊走や増殖に関わる影響やシグナル伝達は報告がない。

また、ヒスチジンおよびアルギニンの両アミノ酸とも、その欠乏により小腸上皮細胞に及ぼす影響やそのシグナル伝達機構については解明されていない。一方でアルギニンは大腸上皮細胞において、その欠乏により遊走を低下させることが報告されている[15]。よって本研究では、より新規性が高いと考えられたヒスチジン欠乏における小腸上皮細胞への影響とそのメカニズムの解明を目的とし、一部の実験においてアルギニンを比較対照として用いた。

## 5 本論文の構成

序論では、本研究における背景と目的を示すとともに、本論文の構成を記述した。

第1章では、小腸上皮細胞による組織修復機構の初期反応である遊走について、各実験の結果と考察を記述した。生体内アミノ酸 20 種類を含む培地をコントロールとし、1 種類ずつ各アミノ酸を欠乏させた培地を用いて細胞の遊走を評価した結果、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走を最も低下させることを見出した。また、細胞の遊走はヒスチジンの濃度に依存して低下し、遊走の維持に必要とされるヒスチジンの最小濃度は 10  $\mu\text{M}$  であった。ヒスチジンの欠乏による遊走低下の分子メカニズムは、transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) の転写抑制により細胞外 TGF- $\beta_1$  量が低下し、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路である Smad および non-Smad シグナル経路が抑制されたためと考えられた。

第2章では、小腸上皮細胞による組織修復機構の基礎となる細胞生存率について検討し、各実験の結果と考察を記述した。ヒスチジン欠乏は、小腸上皮細胞の著明な細胞生存率の低下を引き起こすことを見出し、そのメカニズムはミトコンドリア膜電位の低下によって誘導されたアポトーシスの亢進であることを明らかにした。また、細胞生存率の低下とアポトーシスの亢進はヒスチジン濃度に依存し、その維持に必要とされるヒスチジンの最小濃度は 10  $\mu\text{M}$  であった。さらに、他の消化管上皮細胞として胃上皮細胞を、消化管以外の細胞として腎線維芽様細胞を用いてヒスチジン欠乏条件下における細胞生存率の低下およびアポトーシスの亢進を検討したところ、小腸上皮細胞が最もヒスチジン欠乏に対する感受性が高いことが示唆された。

総括では、各章で得られた結果および考察をまとめ、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走、細胞生存率に及ぼす影響とそれらのメカニズムについてまとめた。

## 第1章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走に与える影響

### 1-1 概要

本章では、小腸上皮細胞による組織修復機構の初期反応である遊走について、ヒスチジン欠乏が与える影響を評価するとともに、そのメカニズムを検討した。

小腸上皮細胞の遊走は、小腸粘膜上皮の直下にある粘膜固有層や血管の管腔側への表出を防ぐために、細胞が寄り集まって損傷個所を埋める初期反応である [24-26]。遊走は即時的な反応であり、その後起こる増殖とは独立している [19]。小腸上皮細胞の遊走が低下した場合、粘膜固有層や血管が小腸管腔に表出してしまい、出血や潰瘍の成因となる。そのため、小腸上皮細胞の遊走は、出血や潰瘍を予防するために重要な細胞応答である [20]。そこで本章では、小腸上皮細胞の遊走に焦点を当てて実験を行った。

実験の構成は、まずヒスチジン欠乏条件下での小腸上皮細胞の遊走低下を評価するために、小腸上皮細胞を播種したプレートに円形スクラッチを作製し、その細胞欠損面積の縮小率を測定した。続いて小腸上皮細胞の遊走低下を改善するために必要なヒスチジンの最小濃度を検討するとともに、その遊走低下のメカニズムを検討した。

## 1-2 方法

### 1-2-1 実験試料

細胞は、Rat intestinal epithelial cell-6 (IEC-6, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan) を用いた。

細胞培養のための培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (DMEM培地, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) を前培養に用い、実験条件用培地として、20種類のアミノ酸を含んだDMEM培地 (Full培地, Cell Science & Technology, Miyagi, JapanまたはResearch Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、L-ヒスチジン欠乏DMEM培地 ( $\Delta$ His培地, Cell Science & Technology, Miyagi, JapanまたはResearch Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、L-アルギニン欠乏DMEM培地 ( $\Delta$ Arg培地, Cell Science & Technology, Miyagi, JapanまたはResearch Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、各種アミノ酸欠乏DMEM培地 (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、20種類のアミノ酸を全て欠乏させたDMEM培地 (Zero培地, Cell Science & Technology, Miyagi, JapanまたはResearch Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を用いた。以上の培地組成は、Table 1-1、1-2に詳細を示した。また、全培地に抗菌剤 (Penicillin/streptomycin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加し、前培養時のみFetal bovine serum (FBS, Equitech-Bio, Kerrville, TX, USAおよびGE Healthcare, Little Chalfont, UK) も添加した。また、実験条件に応じて、L-ヒスチジンおよびL-アルギニン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、TGF- $\beta_1$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を培地に添加した。

Table 1-1 Full 培地の組成

Full medium			Full medium	
[mg/L]			[mg/L]	
Amino acids			Vitamins	
Gly	Glycine	30.0	Choline chloride	4.0
Ala	L-Alanine	35.6	D-Calcium pantothenate	4.0
Arg	L-Arginine HCl	84.0	Folic acid	4.0
Asn	L-Asparagine · H <sub>2</sub> O	60.0	Niacinamide	4.0
Asp	L-Aspartic Acid	53.2	Pyridoxine hydrochloride	4.0
Cys	L-Cystine 2HCl <sup>※</sup>	63.0	Riboflavin	0.4
Glu	L-Glutamic Acid	58.8	Thiamine hydrochloride	4.0
Gln	L-Glutamine	584.0	i-Inositol	7.2
His	L-Histidine HCl · H <sub>2</sub> O	42.0	Inorganic salts	
Ile	L-Isoleucine	105.0	CaCl <sub>2</sub>	200.0
Leu	L-Leucine	105.0	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.1
Lys	L-Lysine HCl	146.0	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200.0
Met	L-Methionine	30.0	KCl	400.0
Phe	L-Phenylalanine	66.0	NaHCO <sub>3</sub>	3.7
Pro	L-Proline	46.0	NaCl	6400.0
Ser	L-Serine	42.0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125.0
Thr	L-Threonine	95.0	Other components	
Trp	L-Tryptophan	16.0	HEPES	5960.0
Tyr	L-Tyrosine	71.3	D-Glucose	1000.0
Val	L-Valine	94.0	Phenol red	15.9
			Na pyruvate	110.0

※システインはシスチンとして添加



Table 1-2 各培地中のアミノ酸濃度

		Full medium	$\Delta$ His medium	$\Delta$ Arg medium	Zero medium
		[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
Amino acids					
Gly	Glycine	400	400	400	0
Ala	L-Alanine	400	400	400	0
Arg	L-Arginine	400	400	0	0
Asn	L-Asparagine	400	400	400	0
Asp	L-Aspartic Acid	400	400	400	0
Cys	L-Cystine	400	400	400	0
Glu	L-Glutamic Acid	325	325	325	0
Gln	L-Glutamine	4000	4000	4000	0
His	L-Histidine	200	0	200	0
Ile	L-Isoleucine	800	800	800	0
Leu	L-Leucine	800	800	800	0
Lys	L-Lysine	800	800	800	0
Met	L-Methionine	200	200	200	0
Phe	L-Phenylalanine	400	400	400	0
Pro	L-Proline	400	400	400	0
Ser	L-Serine	400	400	400	0
Thr	L-Threonine	800	800	800	0
Trp	L-Tryptophan	80	80	80	0
Tyr	L-Tyrosine	400	400	400	0
Val	L-Valine	800	800	800	0

各アミノ酸欠乏培地は、 $\Delta$ His 培地および $\Delta$ Arg 培地のように、Full 培地から該当するアミノ酸のみを 0  $\mu$ M とした。

TGF- $\beta_1$  測定では、Quantikine<sup>®</sup> ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- $\beta_1$  Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ELISA キットを用いた。

ウエスタンブロットでは、Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Basel, Switzerland) をサンプル調製に、Canget signal solution (Toyobo, Osaka, Japan) を抗体反応に、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) をタンパク質検出反応に用いた。また、一次抗体として、anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)、anti-TGF- $\beta$  polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR, pSer2448) polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-phosphorylated 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p-p70S6K, pThr389) polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK, pThr202/Tyr204) polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-Smad2/3 monoclonal antibody (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、anti-phosphorylated Smad2 (p-Smad2, pThr8) polyclonal antibody (Acris Antibodies, Herford, Germany)を、二次抗体として polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin antibody (Dako, Glostrup, Denmark)、polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Dako, Glostrup, Denmark) を用いた。

リアルタイム PCR では、ISOGEN II (Nippon Gene, Toyama, Japan) を RNA 抽出に、ReverTra Ace qPCR RT (Toyobo, Osaka, Japan) を cDNA 合成に用いた。

### 1-2-2 細胞培養

IEC-6 細胞は 10%FBS および抗菌剤 (100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) を添加した DMEM 培地を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーターで前培養を行った。特記しない限り、コンフルエントの状態まで前培養を行った。その後、Full 培地、 $\Delta$ His 培地、 $\Delta$ Arg 培地、各種アミノ酸欠乏培地等 (いずれも FBS なし、抗菌剤あり、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養) に交換し、各種実験を行った。

### 1-2-3 遊走の測定

遊走は、細胞欠損面積の変化 (wound healing assay と呼ばれる方法) で評価した。6-cm ディッシュに IEC-6 細胞を前培養しコンフルエント状態にした上で、アスピレーターを用いて直径約 1 mm の円形スクラッチを作製した。その後、培地を各種実験条件の培地に交換し、12 時間培養した。マイクロアナライザー (Nihon Poladigital, Tokyo, Japan) で、円形細胞欠損面積を解析し、以下のように細胞欠損面積の変化から遊走によって縮小した面積比を算出し、遊走の指標とした。

$$\text{遊走 (\%)} = (\text{培養前 (0 時間) の円形細胞欠損面積} - \text{培養後 12 時間の円形細胞欠損面積}) / \text{培養前 (0 時間) の円形細胞欠損面積} \times 100$$

### 1-2-4 培養上清中の TGF- $\beta_1$ 濃度の測定

培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度の測定は、Quantikine<sup>®</sup> ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- $\beta_1$  Immunoassay を用いて測定した。吸光度は、SpectraMax 190 Microplate Reader (molecular devices, Tokyo, Japan) を用いて 450 nm で測定した。リファレンスは 540 nm で測定した。

### 1-2-5 ウェスタンブロット

タンパク質の発現レベルおよびリン酸化レベルは、ウェスタンブロット法を用いて解析した。IEC-6 細胞は、各培地で適時 (最大 12 時間まで) 培養後に培地を除去し、Protease inhibitor cocktail tablets を溶解した RIPA バッファーを適量添加の上、スクレイパーで回収し細胞破碎サンプルとした。回収したサンプルのタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。適量のサンプルを 5-20% SDS-polyacrylamide gel にアプライし電気泳動を行った後、PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜は、Canget signal solution で希釈した一次抗体 (anti-TGF- $\beta$  (1:1000)、anti-Smad2/3 (1:1000)、anti-p-Smad2 (1:1000)、anti-p-mTOR (1:1000)、anti-p-p70S6K (1:1000)、anti-p-ERK (1:1000)、anti-p-JNK (1:1000)、anti- $\beta$ -actin (1:5000)) と 4°C で 12 時間反応させた。その後、Canget signal solution で希釈した二次抗体 (HRP 標識された goat anti-mouse IgG または goat anti-rabbit IgG) と反応させた後、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate で発光させ、Image Quant LAS-4000 Mini (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) で撮像し、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) で解析した。

### 1-2-6 定量的リアルタイム PCR

IEC-6 細胞は、各培地で 12 時間培養後に培地を除去し、ISOGEN II を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA 濃度は、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、吸光度 260 nm で測定した。測定後、ReverTra Ace qPCR RT を用いて、cDNA を合成した。反応は 37°C、15 分で行った後、98°C、5 分で reverse transcriptase の不活性化を行った。遺伝子発現量は、ABI FAST 7500 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた定量的リアルタイム PCR 法で測定した。TaqMan probe 法を用い、ラット *Tgf-β<sub>1</sub>* (NM\_021578) に対する forward primer 5'-THC TTC GCA TCA CCG T-3'、reverse primer 5'-TAG TAG ACG ATG GGC AGT GGC-3'、TaqMan probe 5'-GCT GCG TGC CGC AGG CTT TGG-3' (5'末端に蛍光標識：6-carboxyfluorescein (FAM)、3'末端にクエンチャー標識：6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)) を使用した。各サンプルとも triplicate で測定し、その平均値を用い、発現レベルは内部標準物質の *GAPDH* (Rn99999916\_s1; PE Applied Biosystems) により補正した。またデータは、 $\Delta \Delta$  Ct 法で算出した。

### 1-2-7 統計解析

各データは平均値±S.D.で示した。統計解析は IBM SPSS statistics ver. 24 を用い、one-way ANOVA で解析し、群間の有意差検定は Scheffe test で行った。Fig. 1-3 (D) の TGF-β<sub>1</sub> 添加有無の比較のみ Levene の等分散検定で解析し、群間の有意差検定は student's *t*-test で行った。いずれも有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 1-3 結果

### 1-3-1 各種生体内アミノ酸欠乏による遊走への影響

生体内には 20 種類のアミノ酸が存在する [33]。これら 20 種類のアミノ酸において、小腸上皮細胞の遊走への影響を検討するため、各アミノ酸の欠乏培地を用いて遊走を評価した。

各アミノ酸の欠乏培地で IEC-6 細胞を 12 時間培養した際の遊走を評価した (Fig. 1-1)。結果、10 種類の各アミノ酸欠乏条件下で遊走が有意に低下した ( $\Delta$  His,  $\Delta$  Arg,  $\Delta$  Val,  $\Delta$  Ile,  $\Delta$  Glu,  $\Delta$  Lys,  $\Delta$  Leu,  $\Delta$  Tyr,  $\Delta$  Trp,  $\Delta$  Phe)。特に、 $\Delta$  His 培地における遊走の低下が最も顕著であった ( $28 \pm 4\%$ , Full 培地を 100%として)。次いで、 $\Delta$  Arg 培地における遊走の低下も同程度であった ( $30 \pm 8\%$ , Full 培地を 100%として)。遊走が低下した 10 種類の各アミノ酸欠乏条件のうち、7 種類が不可欠アミノ酸 ( $\Delta$  His,  $\Delta$  Val,  $\Delta$  Ile,  $\Delta$  Lys,  $\Delta$  Leu,  $\Delta$  Trp,  $\Delta$  Phe) であった。一方で、その他 10 種類の各アミノ酸欠乏条件 ( $\Delta$  Cys,  $\Delta$  Asp,  $\Delta$  Met,  $\Delta$  Gln,  $\Delta$  Thr,  $\Delta$  Ala,  $\Delta$  Asn,  $\Delta$  Pro,  $\Delta$  Ser,  $\Delta$  Gly) では、有意な遊走の低下はみられなかった。

### 1-3-2 遊走におけるヒスチジンまたはアルギニンの濃度検討

1-3-1 節でヒスチジン欠乏条件下において IEC-6 細胞の遊走が著明に低下することが判明した。次にその濃度依存性を検証した。

$\Delta$  His 培地にヒスチジンを 0、5、10、50、200  $\mu$ M (200  $\mu$ M は Full 培地相当) 添加した各培地で IEC-6 細胞を 12 時間培養した際の遊走を評価した。IEC-6 細胞の遊走は、ヒスチジン濃度が 5  $\mu$ M 以下で有意に低下した。また、ヒスチジン濃度が 10  $\mu$ M 以上で、IEC-6 細胞の遊走は Full 培地と同等まで回復した (Fig. 1-2 (A))。

同様に、 $\Delta$  Arg 培地にアルギニンを 0、10、50、100、400  $\mu$ M (400  $\mu$ M は Full 培地相当) 添加した各培地で IEC-6 細胞を 12 時間培養した際の遊走を評価した。IEC-6 細胞の遊走は、アルギニン濃度が 10  $\mu$ M 以下で有意に低下した。またアルギニン濃度が 50  $\mu$ M 以上で IEC-6 細胞の遊走は Full 培地と同等まで回復した (Fig. 1-2 (B))。

### 1-3-3 ヒスチジンまたはアルギニン欠乏時の遊走低下と TGF- $\beta_1$ との関連

TGF- $\beta_1$  は、小腸上皮細胞の遊走に關与する因子として知られている [23, 58]。ヒスチジン欠乏による IEC-6 細胞の遊走低下に、TGF- $\beta_1$  が關与するかを検討した。

まず培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度を測定した。IEC-6 細胞を 12 時間培養した後、培養上清を採取し、培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度を測定した。TGF- $\beta_1$  濃度はそれぞれ Full 培地で  $1581 \pm 121$  pg/mL、 $\Delta$ His 培地で  $446 \pm 164$  pg/mL、 $\Delta$ Arg 培地で  $433 \pm 278$  pg/mL であった。TGF- $\beta_1$  濃度は、 $\Delta$ His 培地または  $\Delta$ Arg 培地では Full 培地と比較して 3 分の 1 程度の濃度となっており、有意な低下がみられた (Fig. 1-3 (A))。

次に、1-3-2 節でヒスチジン濃度依存的に遊走が低下したが、その遊走低下と培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度の關連性を検討した。1-3-2 節と同条件で IEC-6 細胞を 12 時間培養し、ヒスチジンまたはアルギニン濃度依存的な遊走低下と培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度の關連性を検討したところ、ヒスチジン濃度が  $5 \mu\text{M}$  以下、アルギニン濃度が  $10 \mu\text{M}$  以下で、Full 培地と比較して有意に TGF- $\beta_1$  濃度が低下した (Fig. 1-3 (B), (C))。また、TGF- $\beta_1$  濃度とヒスチジン濃度は正の相關關係があり、いずれも濃度が上昇することで遊走を回復させた。

さらに、Full 培地と  $\Delta$ His 培地の TGF- $\beta_1$  濃度の差分を  $\Delta$ His 培地に添加することで、遊走が回復するかどうかを検討した。Full 培地上清中の TGF- $\beta_1$  濃度と  $\Delta$ His 培地上清中の TGF- $\beta_1$  濃度の差は約  $800$  pg/mL であったことから、 $\Delta$ His 培地または  $\Delta$ Arg 培地に終濃度  $800$  pg/mL の組換え TGF- $\beta_1$  を添加し、その遊走が回復するかどうかを検討した。 $\Delta$ His 培地または  $\Delta$ Arg 培地では低下した 12 時間後の遊走は、終濃度  $800$  pg/mL の TGF- $\beta_1$  を添加した各培地を用いることで、Full 培地と同等まで回復した (Fig. 1-3 (D))。

また、IEC-6 細胞内での TGF- $\beta_1$  生合成が転写および翻訳レベルで低下しているかどうかを検証した。IEC-6 細胞の *Tgf- $\beta_1$*  mRNA 量と、TGF- $\beta_1$  は細胞内で前駆体として生合成されるため TGF- $\beta$  前駆体タンパク質の量を測定した (Fig. 1-4)。IEC-6 細胞を 12 時間培養した後、RNA 抽出または細胞破碎サンプルを調製し実験を行った。*Tgf- $\beta_1$*  mRNA は、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地または  $\Delta$ Arg 培地で有意に減少していた ( $\Delta$ His:  $0.63 \pm 0.13$  倍,  $\Delta$ Arg:  $0.62 \pm 0.22$  倍, Fig. 1-4 (A))。細胞内 TGF- $\beta$  前駆体タンパク質も同様に、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地または  $\Delta$ Arg 培地で有意に減少していた ( $\Delta$ His:  $71 \pm 10\%$ ,  $\Delta$ Arg:  $54 \pm 8\%$ , Fig. 1-4 (B))。

#### 1-3-4 ヒスチジンまたはアルギニン欠乏時の遊走低下における機序解明

1-3-3 節で、ヒスチジン欠乏により、IEC-6 細胞内の TGF- $\beta_1$  生合成が転写レベルで低下し、TGF- $\beta$  前駆体タンパク質および細胞外 TGF- $\beta_1$  タンパク質の量を減少させ、遊走低下を引き起こしていることが示唆された。そこで、IEC-6 細胞の遊走低下のメカニズムを明らかにするため、TGF- $\beta$  を介した各シグナル伝達経路の関与について検討した。

TGF- $\beta_1$  をリガンドとしたシグナル伝達経路としては、Smad を介した経路が知られており、IEC-6 細胞においてもその経路が報告されている [23, 58]。よって、ヒスチジン欠乏条件下での IEC-6 細胞中の Smad2 リン酸化量を検討した。IEC-6 細胞を 12 時間培養した後、細胞を回収し、サンプルを調製した。 $\Delta$  His 培地または  $\Delta$  Arg 培地におけるリン酸化 Smad2 発現量は、Full 培地と比較して有意に減少していた ( $\Delta$  His : 66  $\pm$  16%,  $\Delta$  Arg : 54  $\pm$  27%, Fig. 1-5 (A, B))。一方で、 $\Delta$  His 培地または  $\Delta$  Arg 培地における Smad2/3 発現量は、Full 培地と比較して有意差はみられなかった ( $\Delta$  His : 85  $\pm$  20%,  $\Delta$  Arg : 80  $\pm$  27%, Fig. 1-5 (A, C))。

一方で、TGF- $\beta$  を介したシグナル伝達経路には Smad に依存しない経路 (non-Smad 経路) も存在する。そこで、遊走における non-Smad 経路の関与の有無について、関連分子である mTOR、p70S6K、ERK のリン酸化量を検討した。IEC-6 細胞を 12 時間培養した後、細胞を回収し、サンプルを調製した。 $\Delta$  His 培地におけるリン酸化 mTOR およびリン酸化 p70S6K の発現量は、Full 培地と比較して減少傾向がみられた (p-mTOR : 85  $\pm$  17%, p-p70S6K : 80  $\pm$  30%, Fig. 1-6 (A, B))。また、 $\Delta$  His 培地におけるリン酸化 ERK の発現量は、Full 培地と比較して有意に減少した (p-ERK : 66  $\pm$  23%, Fig. 1-6 (C))。一方で、 $\Delta$  Arg 培地においては、mTOR、p70S6K、ERK のいずれのリン酸化量も有意に減少した (p-mTOR : 66  $\pm$  31%, p-p70S6K : 53  $\pm$  30%, p-ERK : 63  $\pm$  35%, Fig. 1-6 (A-C))。

## 1-4 考察

本章では、ヒスチジンが小腸上皮細胞の遊走において重要な役割を果たし、TGF- $\beta$  シグナル経路を介して遊走を制御していることを明らかにした。

ヒスチジン欠乏は、生体内アミノ酸 20 種類の中で最も強く IEC-6 細胞の遊走を抑制した (Fig. 1-1)。これは、IEC-6 細胞の遊走において、ヒスチジンが重要な役割を果たすという初めての報告である。また、この遊走低下は全アミノ酸欠乏条件の Zero 培地とほぼ同等であったことから、ヒスチジンは IEC-6 細胞の遊走に不可欠であることが判明した。同様にアルギニン欠乏も、ヒスチジン欠乏に次ぐ遊走低下がみられた (Fig. 1-1)。アルギニンについては、小腸上皮細胞の遊走に関して、その欠乏における報告はないが、大腸上皮細胞に対する次のような報告がある [15]。その報告中では、アルギニン欠乏条件下で 12 時間培養後の遊走を測定した際に、400  $\mu\text{M}$  アルギニン含有培地 (本実験の Full 培地の Arg 濃度に相当) を 100%とすると、遊走が約 70%に低下するとされている。本結果では、Full 培地と比較して約 30%に低下するため、大腸上皮細胞より小腸上皮細胞の方がアルギニン欠乏の影響を受けやすい可能性がある。

また、ヒスチジンとアルギニンの欠乏以外で特筆すべき点として、遊走が低下した 10 種類のアミノ酸欠乏条件のうち、7 種類が不可欠アミノ酸 ( $\Delta\text{His}$ ,  $\Delta\text{Val}$ ,  $\Delta\text{Ile}$ ,  $\Delta\text{Lys}$ ,  $\Delta\text{Leu}$ ,  $\Delta\text{Trp}$ ,  $\Delta\text{Phe}$ ) であり、IEC-6 細胞の遊走において、不可欠アミノ酸の重要性が示唆された。一方で、メチオニンとスレオニンの 2 種類の不可欠アミノ酸については、各欠乏条件下で遊走は低下しなかったことから、小腸上皮細胞の遊走にはメチオニンおよびスレオニンが必要でないことが示唆された。

また本研究により、IEC-6 細胞の遊走はヒスチジンまたはアルギニン濃度に依存して低下し、IEC-6 細胞の遊走維持に必要なヒスチジンおよびアルギニンの最小濃度は、それぞれ 10  $\mu\text{M}$  および 50  $\mu\text{M}$  であることがわかった (Fig. 1-2)。正常ラットの血中ヒスチジン濃度が約 25-60  $\mu\text{M}$ 、血中アルギニン濃度が約 70  $\mu\text{M}$  であるため [59, 60]、本研究で得られた IEC-6 細胞の遊走維持に必要なヒスチジンまたはアルギニンの最小濃度以下になることは、生理的変動の範囲では生じにくいと考えられた。しかしながら、種々の疾患において、血中ヒスチジン濃度の低下が報告されており (Table 1)、クローン病の患者では健常人と比較して血中ヒスチジン濃度が 40%程度にまで低下するという報告がある [9]。このように特定の病態下では血中ヒスチジン濃度または血中アルギニン



濃度の低下が報告されており、本研究で得られた最小濃度を下回る可能性がある。このような場合には、臨床でも小腸上皮細胞の遊走能が低下する可能性がある。ただし、生体内におけるアミノ酸の供給は血液からだけでなく、小腸管腔側からの吸収や細胞内でのタンパク質・ペプチドからの供給が複合的に関与すると考えられるため、*in vivo* における基礎データや臨床データの取得、蓄積が必要と考えられる。今後、生体内におけるヒスチジンまたはアルギニンの血中および小腸上皮細胞内の濃度と、本実験で得られた結果の整合性を確認することが重要であると考えられた。

次に、培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度を検討したところ、ヒスチジン欠乏またはアルギニン欠乏のいずれも Full 培地の約 3 分の 1 となっており (Fig. 1-3 (A))、その低下した濃度分の TGF- $\beta_1$  を  $\Delta$ His 培地、 $\Delta$ Arg 培地に添加した際に、遊走がほぼ 100%まで回復した (Fig. 1-3 (D))。このことから、TGF- $\beta_1$  が遊走制御に重要な役割を担っていることが示唆され、両アミノ酸濃度の低下による小腸上皮細胞の遊走低下は、主に TGF- $\beta_1$  濃度の低下に依存していると考えられた。また、ヒスチジン濃度またはアルギニン濃度の上昇に比例して TGF- $\beta_1$  濃度が上昇したことから (Fig. 1-3 (B, C))、小腸上皮細胞は両アミノ酸濃度の変化に応答して TGF- $\beta_1$  濃度を制御すると考えられた。小腸上皮細胞において、TGF- $\beta_1$  の添加が遊走を促進するという報告はあるが [23, 58]、ヒスチジンやアルギニンが TGF- $\beta_1$  濃度の調節に関与するという報告はなく、本結果は新規性が高いと考えられた。

また、IEC-6 細胞の TGF- $\beta_1$  は mRNA 量、前駆体タンパク質量のどちらも、ヒスチジンやアルギニンの欠乏により減少したことから (Fig. 1-4)、これらのアミノ酸欠乏により TGF- $\beta_1$  生合成が転写および翻訳レベルで抑制され、細胞外へ分泌される TGF- $\beta_1$  濃度が低下し、遊走の低下が引き起こされたと考えられた。しかしながら、これらのアミノ酸欠乏がどのように TGF- $\beta_1$  生合成を低下させるかは、現時点で不明である。

TGF- $\beta$  シグナル伝達経路は、その下流にある Smad ファミリーを介した経路が主に知られている [23, 58]。本研究結果から、ヒスチジンまたはアルギニンの欠乏条件下では培養上清中の TGF- $\beta_1$  濃度の低下に伴い、Smad2 のリン酸化が抑制され、遊走の低下が起こることが示唆された (Fig. 1-5)。また、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路には、Smad を介した経路以外にも、non-Smad 経路と呼ばれる Smad 非依存的な経路があり、IEC-6 細胞でも報告されている。TGF- $\beta$  刺激による non-Smad 経路には大きく分けて 2 つの経路があり、1 つは PI3K/Akt を介した mTOR/p70S6K 経路、もう 1 つは MAPK を介した ERK

経路である [61]。本結果では、ヒスチジン欠乏またはアルギニン欠乏のいずれにおいても、これら3つの経路すべての関連分子のリン酸化量 (p-mTOR, p-p70S6K, p-ERK) に、有意な減少ないしは減少傾向がみられたことから、Smad および non-Smad のどちらの経路も関与していることが示唆された (Fig. 1-6)。

IEC-6 細胞においては、基礎培地に 1 ng/mL の TGF- $\beta_1$  を添加した際、ERK のリン酸化レベルの上昇が報告されており [58]、本結果とも一致する。しかしながら、基礎培地に 4 mM のアルギニンを添加した際、mTOR/p70S6K 経路を介してラット小腸上皮細胞の遊走が促進されたが、ERK 経路は関与しなかったという報告がある [50]。この ERK 経路に関しては本研究のアルギニン欠乏時の結果と異なるが、上記報告はアルギニンを添加した際の結果であること、添加したアルギニンの量が 4 mM とラット血中濃度の 10 倍以上という高濃度であることから、実験条件が異なることによるものと考えられた。また、ERK と mTOR の間にはシグナルのクロストークが存在し [62]、TGF- $\beta$  は ERK/mTOR 経路を介して遊走を調節する可能性もある。

しかしながら、ヒスチジン欠乏またはアルギニン欠乏による Smad 経路や non-Smad 経路の抑制が、どのような因子を制御し遊走低下を引き起こすかは、現時点では不明である。TGF- $\beta_1$  と関連する報告としては、接着細胞の遊走を制御するインテグリンが挙げられる。インテグリンは、コラーゲンなどの細胞外マトリクスと結合し、細胞接着を調節することで、遊走を制御するタンパク質として知られている [63]。小腸上皮細胞における報告はないが、ヒト神経膠芽腫細胞において 1 ng/mL の TGF- $\beta_1$  を添加するとインテグリン発現が亢進することが報告されている [64]。さらに、ヒト腹膜線維芽細胞において 1 ng/mL の TGF- $\beta_1$  を添加するとインテグリン発現の亢進により遊走を促進することが報告されている [65]。また興味深いことに、前者では転写レベルでのインテグリン発現亢進が示唆されているが、後者では転写レベルの変化はなく翻訳レベルの亢進であることが示唆されている [64, 65]。このように、TGF- $\beta_1$  は細胞遊走に深く関与するインテグリンの発現を制御している。また、小腸上皮細胞における TGF- $\beta$ /Smad2 のシグナル伝達経路を介した遊走制御に関する報告に、FAK の発現促進に関するものがある。FAK はインテグリンを始めとする細胞接着因子と相互作用し、接着細胞の遊走に関与するタンパク質である [52]。IEC-6 細胞において、基礎培地に TGF- $\beta_1$  を添加すると、Smad を介したシグナル経路の亢進により、mRNA およびタンパク質レベルで FAK 発現量が増加することで遊走を促進したという報告がある [58, 66]。また同様に、アルギニンを基礎培地に添加した際に、FAK タンパク質のリン酸化亢進により遊走の促進がみられたという報告もある [51]。したがって、ヒスチジン欠乏およびアルギニ

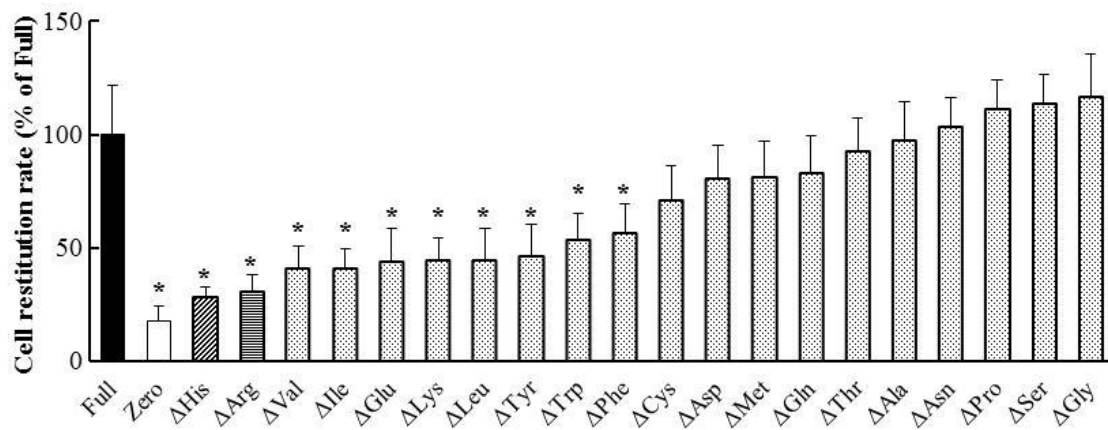
ン欠乏は、TGF- $\beta_1$  生合成の低下による Smad 経路や non-Smad 経路の抑制に続き、細胞接着を制御する因子であるインテグリンや FAK の発現ないしは FAK のリン酸化を抑制した結果、細胞遊走が低下した可能性が考えられたが、今後の検証が必要である。

ヒスチジンについては、シグナル伝達に関する研究が進んでおらず情報はないが、アルギニンに関しては、上記以外にも消化管上皮細胞におけるアルギニンの代謝経路から 2 つの遊走制御メカニズムが報告されている。1 つはアルギナーゼによるポリアミンの前駆物質であるオルニチンへの代謝、もう 1 つは NO 合成酵素による NO とシトルリンへの代謝である [15]。アルギナーゼによるアルギニンからオルニチンへの代謝は、大腸上皮細胞の傷害修復時に必須であると考えられており、アルギナーゼをノックアウトした細胞へオルニチンを処置すると遊走が回復すること、オルニチンからポリアミンへの代謝を阻害すると遊走が低下するが外来のポリアミンを添加することで回復することが報告されている [15, 51]。対して、アルギニンの NO への代謝は、小腸上皮細胞が潰瘍表面を遊走により覆う際に必須であるとする報告がある [67]。また、NO は遊走が促進している小腸上皮細胞で発現が増加しており、創傷治癒への寄与が示唆されているとともに、NO ドナーの添加により遊走が促進されアルギニン添加と同様の効果を示している [51]。アルギニン欠乏による遊走への影響に関しては、TGF- $\beta_1$  以外にもこれらのメカニズムの関与も考えられる。しかしながら、TGF- $\beta_1$  を  $\Delta$  His 培地、 $\Delta$  Arg 培地に添加した際に、遊走がほぼ 100%まで回復したことから (Fig. 1-3 (D))、主として TGF- $\beta_1$  を介したシグナル伝達経路に依存していることは明らかである。アルギニンが TGF- $\beta_1$  を介したシグナル伝達経路により遊走を制御するという報告はなく、ヒスチジンに至っては、メカニズムのみならず、遊走を制御するという報告自体がない。そのため、本結果は、ヒスチジンおよびアルギニンが TGF- $\beta_1$  発現を介した小腸上皮細胞の遊走を制御することを明らかにした初めての報告である。

## 1-5 小括

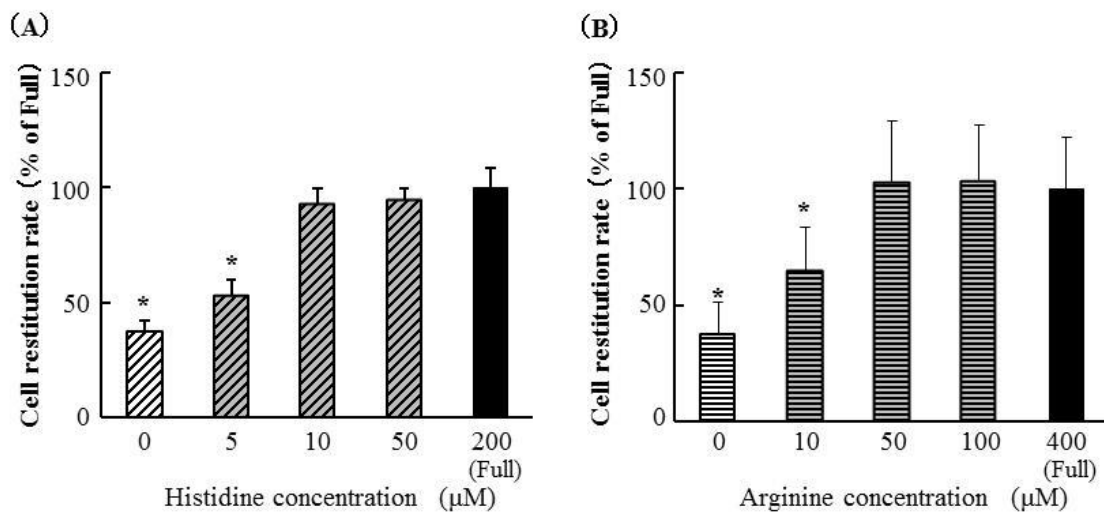
本章の実験結果から、小腸上皮細胞の遊走においてヒスチジンが重要な役割を果たすことが判明した。また TGF- $\beta_1$  を介して小腸上皮細胞の遊走を制御することを明らかにした。

生体内アミノ酸 20 種類に対し、各アミノ酸欠乏培地を用いて IEC-6 細胞の遊走への影響を検討したところ、ヒスチジン欠乏が生体内アミノ酸 20 種の中で最も遊走を低下させることを見出し、アルギニン欠乏もヒスチジン欠乏に次ぎ遊走を低下させた。また IEC-6 細胞の遊走は、ヒスチジンおよびアルギニンに濃度依存性を示し、遊走維持に必要な最小濃度は、それぞれ 10  $\mu$ M と 50  $\mu$ M であった。さらに、ヒスチジンおよびアルギニン欠乏条件下における IEC-6 細胞の遊走低下のメカニズムは、IEC-6 細胞内の TGF- $\beta_1$  生合成が転写および翻訳レベルで低下し、それに伴い細胞外に分泌される TGF- $\beta_1$  が減少することで、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路である Smad 経路および non-Smad 経路のリン酸化が抑制された結果、遊走が低下したものと考えられた (Fig. 1-7)。



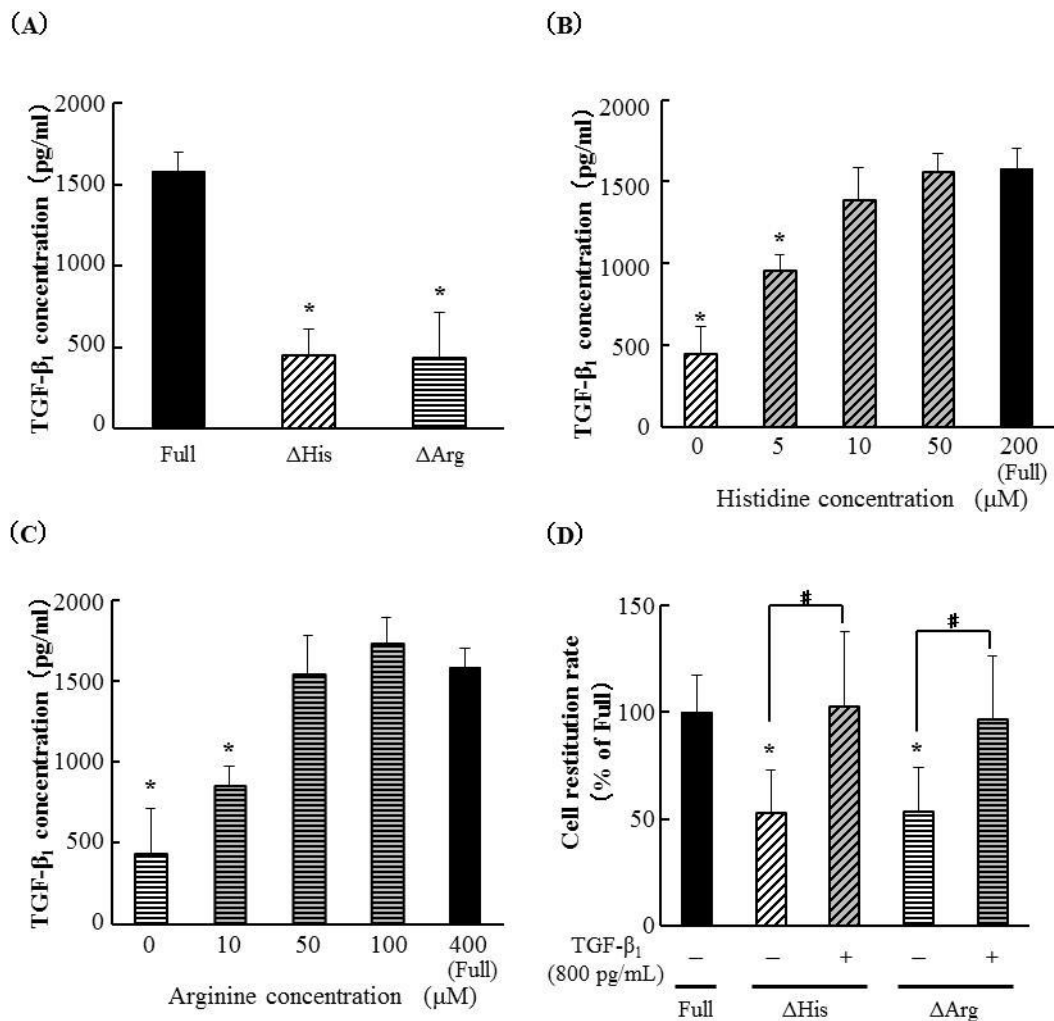
**Fig. 1-1 Effects of individual amino acid deficiencies on intestinal cell restitution.**

The cell restitution rates in Full without each of the 20 intravital amino acids were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 7–8). \* $P$  < 0.05 vs. Full.



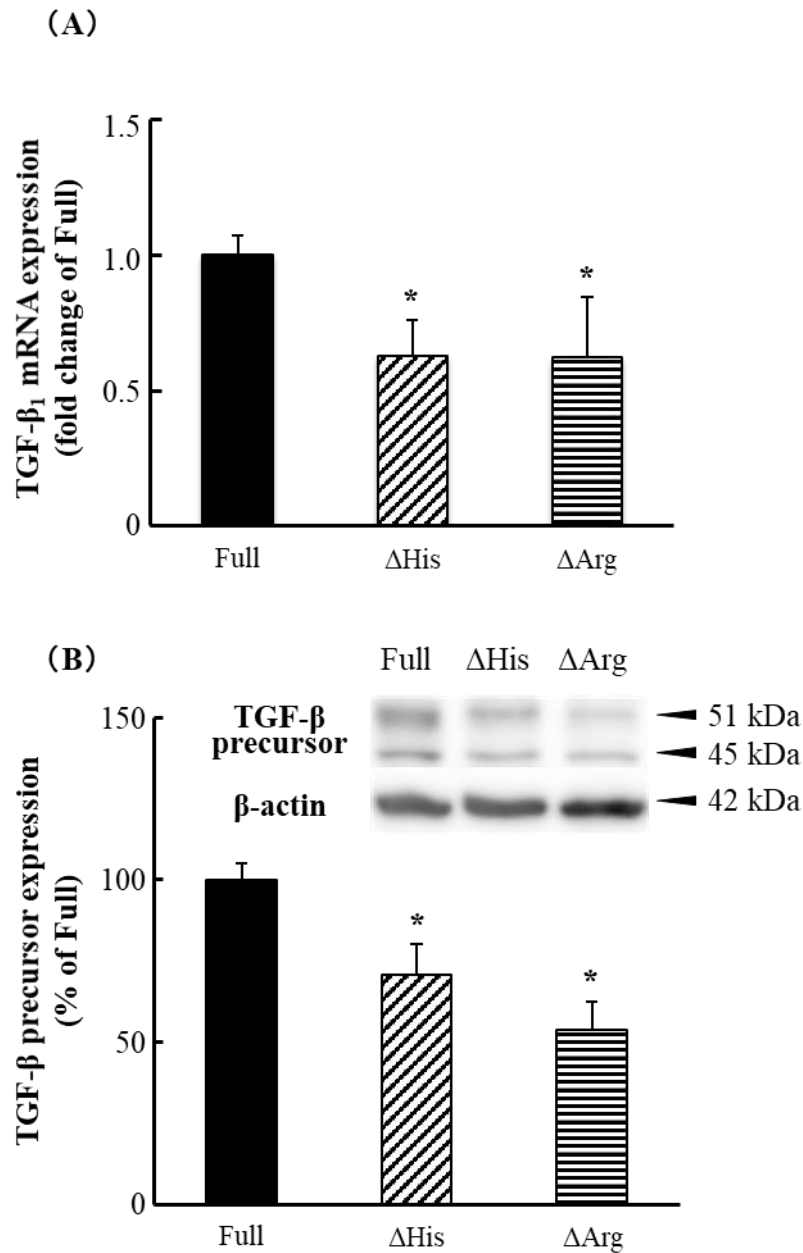
**Fig. 1-2 Effect of histidine or arginine concentration on intestinal cell restitution.**

(A) Cell restitution rates were measured for 12 h with the following histidine concentrations: 0, 5, 10, 50 and 200 μM. Cell restitution rates were expressed as percentages of that in Full (200 μM histidine). Data represent mean ± S.D. (n = 8). \* $P < 0.05$  vs. Full. (B) Cell restitution rates were measured for 12 h with the following arginine concentrations: 0, 10, 50, 100 and 400 μM. Cell restitution rates were expressed as percentages of that in Full (400 μM arginine). Data represent mean ± S.D. (n = 8). \* $P < 0.05$  vs. Full.



**Fig. 1-3 Effect of TGF-β<sub>1</sub> on intestinal cell restitution.**

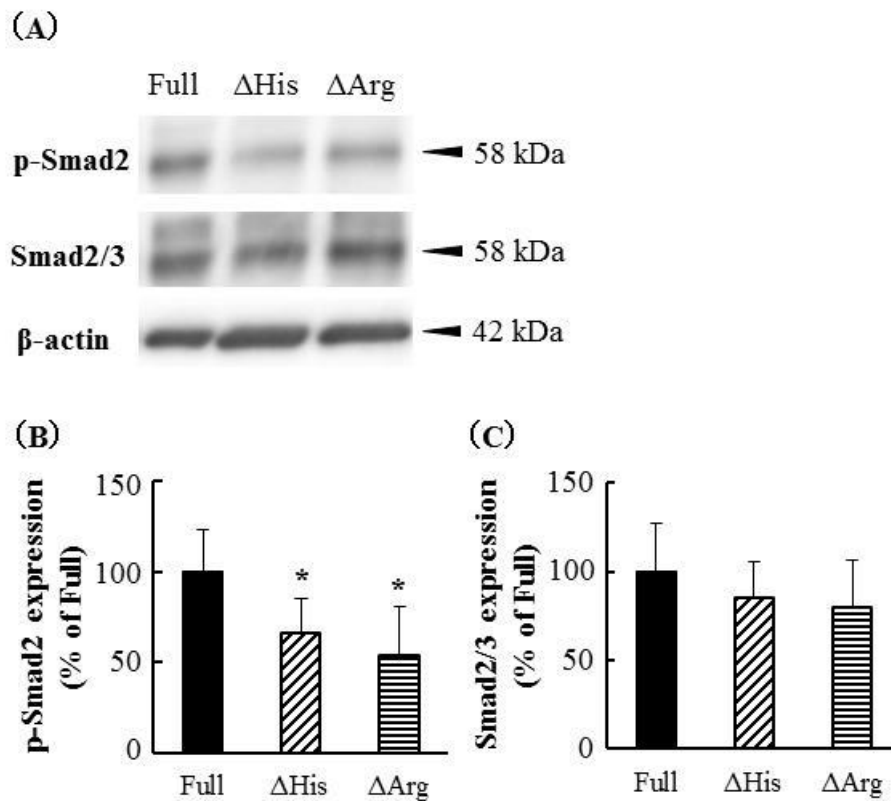
(A) TGF-β<sub>1</sub> concentrations in medium supernatants were evaluated for 12 h in Full, ΔHis or ΔArg. Data represent mean ± S.D. (n = 5–6). \**P* < 0.05 vs. Full. (B) TGF-β<sub>1</sub> concentrations in medium supernatants were evaluated for 12 h with the following histidine concentrations: 0, 5, 10, 50 and 200 μM. Data represent mean ± S.D. (n = 3–6). \**P* < 0.05 vs. Full. (C) TGF-β<sub>1</sub> concentrations in medium supernatants were evaluated for 12 h with the following arginine concentrations: 0, 10, 50, 100 and 400 μM. Data represent mean ± S.D. (n = 3–6). \**P* < 0.05 vs. Full. (D) Cell restitution rates were measured for 12 h in Full, ΔHis or ΔArg. “-” represents non-addition of TGF-β<sub>1</sub> and “+” represents addition of 800 pg/ml TGF-β<sub>1</sub>. Cell restitution rates were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 5–8). \**P* < 0.05 vs. Full. <sup>#</sup>*P* < 0.05 non-addition vs. addition of 800 pg/ml TGF-β<sub>1</sub> to ΔHis or ΔArg.



**Fig. 1-4 Production of TGF-β<sub>1</sub> in cells under histidine or arginine deficiency.**

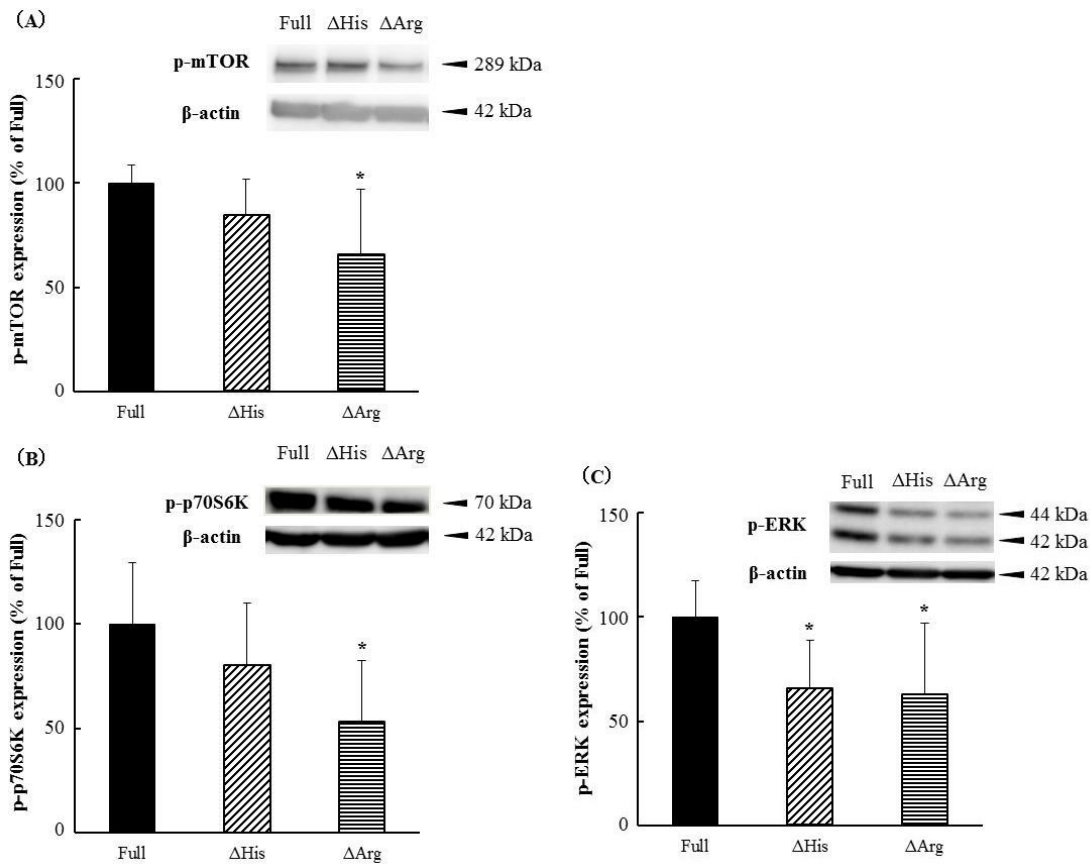
IEC-6 cells were incubated under 5% CO<sub>2</sub> for 12 h in Full, ΔHis or ΔArg. (A) *Tgf-β<sub>1</sub>* mRNA levels were expressed as fold changes relative to that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 3). \**P* < 0.05 vs. Full. (B) Whole-cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-TGF-β precursor and anti-β-actin (loading control) antibodies. The level of TGF-β precursor was expressed as percentage of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 3). \**P* < 0.05 vs. Full.





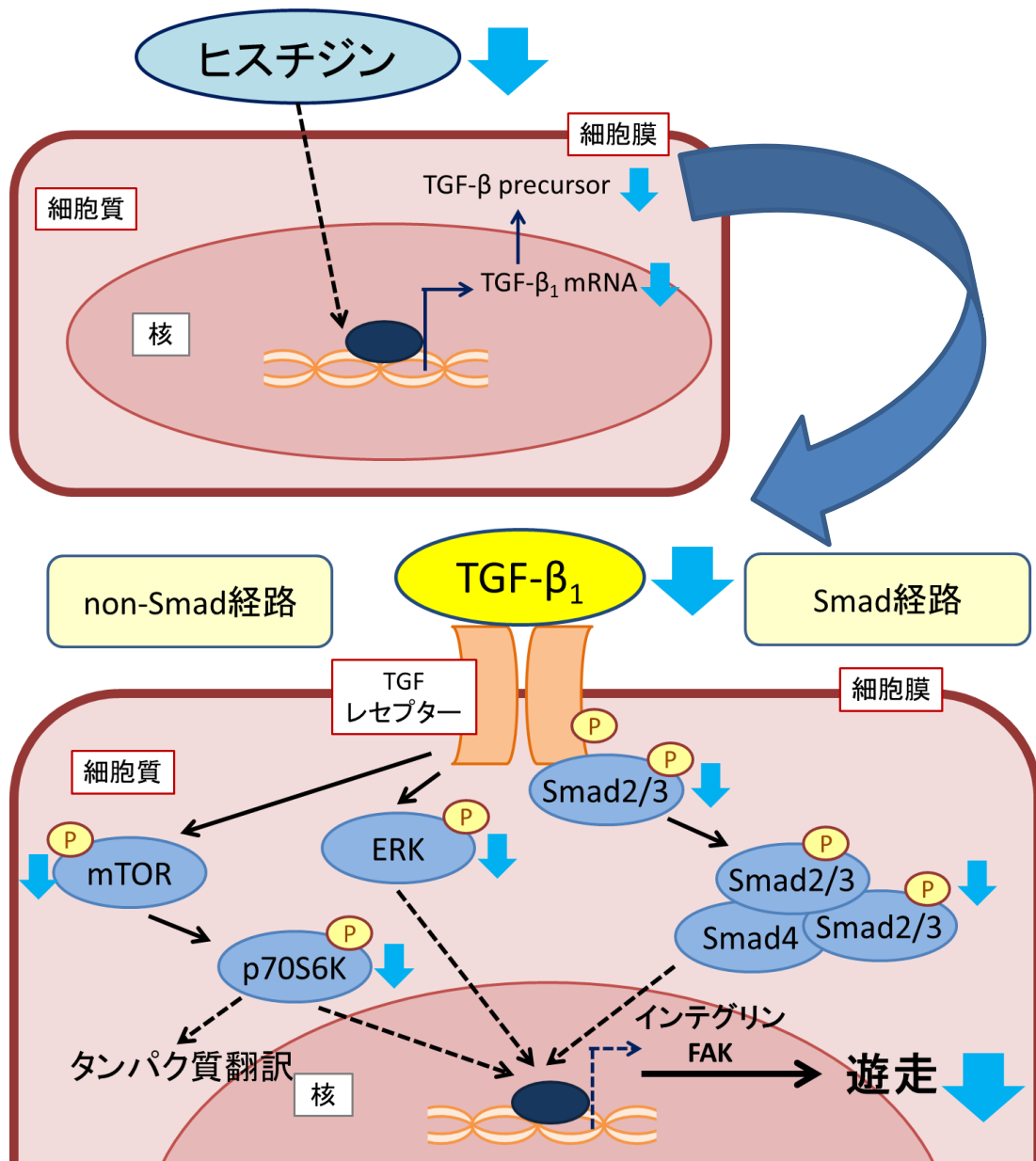
**Fig. 1-5 Phosphorylation of Smad2 in intestinal epithelial cells under histidine or arginine deficiency.**

IEC-6 cells were incubated under 5% CO<sub>2</sub> for 12 h in Full, ΔHis or ΔArg. (A) Whole-cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-phosphorylated-Smad2, anti-total Smad2/3 and anti-β-actin (loading control) antibodies. (B) Phosphorylated-Smad2 levels were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 9). \**P* < 0.05 vs. Full. (C) Total Smad2/3 levels were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 9). \**P* < 0.05 vs. Full.



**Fig. 1-6 Phosphorylation of other molecules in intestinal epithelial cells under histidine or arginine deficiency.**

IEC-6 cells were incubated under 5% CO<sub>2</sub> for 12 h in Full, ΔHis or ΔArg. (A) Whole-cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-phosphorylated mTOR and anti-β-actin (loading control) antibodies. Phosphorylated mTOR levels were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 9). \**P* < 0.05 vs. Full. (B) Whole-cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-phosphorylated p70S6K and anti-β-actin (loading control) antibodies. Phosphorylated p70S6K levels were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 9). \**P* < 0.05 vs. Full. (C) Whole-cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-phosphorylated ERK and anti-β-actin (loading control) antibodies. Phosphorylated ERK levels were expressed as percentages of that in Full. Data represent mean ± S.D. (n = 9). \**P* < 0.05 vs. Full.



**Fig. 1-7** 小腸上皮細胞の TGF-β<sub>1</sub> を介したシグナル伝達経路

ヒスチジン欠乏下の小腸上皮細胞では、TGF-β<sub>1</sub> 発現量が減少し、それを介したシグナル伝達経路上の Smad、mTOR、p70S6K、ERK のいずれのリン酸化も低下した結果、遊走が低下した。

## 第2章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の細胞生存率に与える影響

### 2-1 概要

本章では、小腸上皮細胞の組織修復能を評価するため、細胞生存率を指標にヒスチジン欠乏の影響を評価した。また、ヒスチジン欠乏による細胞生存率低下の原因と考えられたアポトーシスの亢進について、そのメカニズムを検討した。

小腸上皮細胞の細胞生存率が低下すると、小腸上皮細胞が小腸の管腔表面に正常に分布できず剥がれ落ちてしまい、その直下の粘膜固有層や血管が管腔側に表出することで障害が及び、出血や潰瘍の成因となる [22-24]。また、小腸粘膜上皮の修復機構は、遊走、増殖、分化・成熟の3つの段階で構成される [21, 22]。これらの修復過程が正常に機能するためには、小腸上皮細胞が健全であること、即ち小腸上皮細胞の細胞生存率が維持されていること、アポトーシスの異常亢進が起こっていないことが重要である。よって、本章では、小腸上皮細胞の細胞生存率およびアポトーシスを検討した。

実験の構成は、まずヒスチジン欠乏条件下での小腸上皮細胞の細胞生存率の低下およびアポトーシスの亢進を現象として捉え、それらを改善するために必要なヒスチジンの最小濃度を決定した。また、その細胞生存率低下のメカニズムについて、アポトーシス関連タンパク質の解析から、ミトコンドリアを介した経路によるアポトーシスであることを特定した。

## 2-2 方法

### 2-2-1 実験試料

細胞は、Rat intestinal epithelial cell-6 (IEC-6, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan)、Rat gastric mucosal cells (RGM1, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan)、Rat kidney cells (NRK, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan) を用いた。

細胞培養のための培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (DMEM 培地, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) を前培養に用い、実験条件用培地として、20 種類のアミノ酸を含んだ DMEM 培地 (Full 培地, Cell Science & Technology, Miyagi, Japan または Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、L-ヒスチジン欠乏 DMEM 培地 ( $\Delta$ His 培地, Cell Science & Technology, Miyagi, Japan または Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan)、20 種類のアミノ酸を全て欠乏させた DMEM 培地 (Zero 培地, Cell Science & Technology, Miyagi, Japan または Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を用いた。以上の培地組成は Table 1-1、1-2 に詳細を示した。また、全培地に抗菌剤 (Penicillin/streptomycin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加し、前培養時のみ Fetal bovine serum (FBS, Equitech-Bio, Kerrville, TX, USA および GE Healthcare, Little Chalfont, UK) も添加した。また、実験条件に応じて、L-ヒスチジン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、TGF- $\beta_1$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を培地に添加した。

ウエスタンブロットでは、Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Basel, Switzerland) をサンプル調製に、Canget signal solution (Toyobo, Osaka, Japan) を抗体反応に、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) をタンパク質検出反応に用いた。また、一次抗体として、anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)、anti-caspase-3 polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-caspase-8 monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK)、anti-caspase-9 monoclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、anti-caspase-12 polyclonal antibody (Abnova, Taipei, Taiwan) を用い、二次抗体として、polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin antibody (Dako, Glostrup, Denmark)、polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Dako, Glostrup, Denmark) を用いた。

### 2-2-2 細胞培養

各種細胞は 10%FBS および抗菌剤 (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) を添加した DMEM 培地を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーターで前培養を行った。特記しない限り、コンフルエントの状態まで前培養を行った。その後、Full 培地、ΔHis 培地、Zero 培地等 (いずれも FBS なし、抗菌剤あり、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養) に交換し、各種実験を行った。

### 2-2-3 細胞生存率の測定

細胞生存率は、96 ウェルプレートに各種細胞を前培養しコンフルエント状態にした後、培地を各種実験条件の培地に交換し、経時的に 18 時間まで培養後に測定した。測定は、Cell counting kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて行った。吸光度は、SpectraMax 190 Microplate Reader を用いて 450 nm で測定した。リファレンスは 650 nm で測定した。

### 2-2-4 ウェスタンブロット

タンパク質の発現レベルおよびリン酸化レベルは、ウェスタンブロット法を用いて解析した。各種細胞は、各培地で適時 (最大 12 時間まで) 培養後に培地を除去し、Protease inhibitor cocktail tablets を溶解した RIPA バッファーを適量添加の上、スクレイパーで回収し細胞破碎サンプルとした。回収したサンプルのタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。適量のサンプルを 5-20% SDS-polyacrylamide gel にアプライし電気泳動を行った後、PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜は、Canget signal solution で希釈した一次抗体 (anti-caspase-3 (1:5000)、anti-caspase-8 (1:2000)、anti-caspase-9 (1:1000)、anti-caspase-12 (1:1000)、anti-β-actin (1:5000)) と 4°C で 12 時間反応させた。その後、Canget signal solution で希釈した二次抗体 (HRP 標識された goat anti-mouse IgG または goat anti-rabbit IgG) と反応させた後、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate で発光させ、Image Quant LAS-4000 Mini (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) で撮像し、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) で解析した。

### 2-2-5 アポトーシス細胞の蛍光観察

アポトーシス細胞の蛍光観察は、FITC-Annexin V で蛍光染色したアポトーシス細胞を顕微鏡下で観察、撮像することで実施した。スライドチャンバーに IEC-6 細胞を前培養した後、培地を各種実験条件の培地に交換し、6 時間または 12 時間培養した。細胞染色は、Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (PromoCell, Heidelberg, Germany) を用いて行った。蛍光観察時の excitation と emission の波長は、それぞれ 492 nm と 514 nm で行った。観察、撮像は、TCS SP5 MP fluorescence microscope (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて行った。

### 2-2-6 ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア膜電位は、96 ウェルプレートに IEC-6 細胞を前培養しコンフルエント状態にした後、培地を各種実験条件の培地に交換し、経時的に 12 時間まで培養後に測定した。測定は、Mito-ID Membrane Potential Cytotoxicity Kit (Enzo Life Sciences, New York, NY, USA) を用いて行った。蛍光検出時の excitation と emission の波長は、それぞれ 490 nm と 590 nm で行い、Wallac 1420 ARVO MX plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) で測定した。

### 2-2-7 統計解析

各データは平均値±S.D.で示した。統計解析は IBM SPSS statistics ver. 25 を用い、one-way ANOVA で解析し、群間の有意差検定は Scheffe test で行った。Fig. 2-3 の TGF- $\beta_1$  添加有無の比較のみ Levene の等分散検定で解析し、群間の有意差検定は student's *t*-test で行った。いずれも有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 2-3 結果

### 2-3-1 ヒスチジン欠乏による細胞生存率への影響

ヒスチジン欠乏が IEC-6 細胞の生存へ及ぼす影響を検討するため、ヒスチジン欠乏培地を用いて細胞生存率を評価した。

IEC-6 細胞を 18 時間培養した際の細胞生存率を評価した (Fig. 2-1)。結果、 $\Delta$ His 培地における細胞生存率は、Full 培地と比較して  $37 \pm 2\%$  に低下した (Fig. 2-1 (A))。また Zero 培地における細胞生存率は、Full 培地と比較して  $33 \pm 5\%$  に低下した (Fig. 2-1 (A))。さらに、 $\Delta$ His 培地で IEC-6 細胞の経時的な細胞生存率の変化を検証したところ、Full 培地と比較して 3 時間までは有意な変化はみられなかったが、6 時間以降で細胞生存率が有意に低下した (Fig. 2-1 (B))。Zero 培地においても同様に、6 時間以降で細胞生存率が有意に低下した (Fig. 2-1 (B))。

### 2-3-2 細胞生存率におけるヒスチジンの濃度検討

2-3-1 節でヒスチジン欠乏が IEC-6 細胞の細胞生存率を著しく低下させることが判明した。次にその濃度依存性を検証するとともに、IEC-6 細胞の細胞生存率を維持するために最低限必要なヒスチジン濃度を評価した。

$\Delta$ His 培地にヒスチジンを 0、1、5、10、50、200  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{M}$  は Full 培地相当) 添加した各培地で IEC-6 細胞を 18 時間培養した際の細胞生存率を検討した。IEC-6 細胞の細胞生存率は、ヒスチジン濃度が 5  $\mu\text{M}$  以下で有意に低下した。また、ヒスチジン濃度が 10  $\mu\text{M}$  以上の際には、IEC-6 細胞の細胞生存率は Full 培地と同等であった (Fig. 2-2)。

さらに、このヒスチジンの最小濃度は、1 章で示した遊走における最小濃度と同じであった。そこで、ヒスチジン欠乏による IEC-6 細胞の遊走低下と、細胞生存率低下が同一メカニズムかどうかを確認するため、1-3-3 節と同様に培養上清中へ終濃度 800 pg/mL の TGF- $\beta_1$  を添加し、細胞生存率が回復するかどうかを検討した結果、TGF- $\beta_1$  添加による回復はみられなかった (Fig. 2-3)。



### 2-3-3 ヒスチジン欠乏によるアポトーシスへの影響

消化管上皮細胞における細胞生存率の低下は、アポトーシスの亢進によって引き起こされるという報告がある [68, 69]。そこで、ヒスチジン欠乏下におけるアポトーシス亢進の有無について検討した。

まず、アポトーシス亢進の有無を確認するため、細胞内における活性化 caspase-3 発現量を検討した。各培地で IEC-6 細胞を経時的に 12 時間まで培養した際の活性化 caspase-3 発現量を測定したところ、Full 培地と比較して  $\Delta$ His 培地、Zero 培地とも 9 時間時点から増加傾向がみられ、12 時間時点で有意に発現量が増加した (Fig. 2-4 (A, B))。12 時間時点では、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地での活性化 caspase-3 発現量は  $221 \pm 86\%$  にまで増加した。

また、Annexin V 染色によるアポトーシス陽性細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。6 時間時点では Full 培地、 $\Delta$ His 培地ともアポトーシス陽性細胞はみられなかったが、12 時間時点では Full 培地においてアポトーシス陽性細胞がみられなかったのに対し、 $\Delta$ His 培地ではアポトーシス陽性細胞を示す緑色蛍光がみられ、活性化 caspase-3 発現量の増加と一致した (Fig. 2-4 (C))。

### 2-3-4 アポトーシスにおけるヒスチジンの濃度検討

2-3-3 節で、ヒスチジン欠乏はアポトーシスを亢進することが判明した。そこで、細胞生存率と同様に、そのヒスチジン濃度依存性を検証するとともに、アポトーシスを亢進させないヒスチジンの最小濃度を検討した。

$\Delta$ His 培地にヒスチジンを 0、1、5、10、50、200  $\mu$ M (200  $\mu$ M は Full 培地相当) 添加した各培地で IEC-6 細胞を 9 時間培養した際の細胞内における活性化 Caspase-3 発現量を測定した。活性化 caspase-3 発現量は、ヒスチジン濃度が 5  $\mu$ M 以下で有意に増加し、ヒスチジン濃度が 10  $\mu$ M 以上の際には Full 培地と同等であった (Fig. 2-5)。

### 2-3-5 ヒスチジン欠乏によるアポトーシス亢進の機序解明

次にアポトーシス亢進が起こるメカニズムについて検討した。アポトーシスには大きく分けて3つの経路が存在する [31]。デスレセプターを介した経路、小胞体ストレスを介した経路、そしてミトコンドリアを介した経路の3つである。各経路のシグナル伝達機構には、それぞれ caspase-8、caspase-12、caspase-9 の活性化が関係しており、それを指標にすることで、アポトーシス亢進のメカニズムを検討した。

各培地で IEC-6 細胞を 12 時間培養した際の活性化 caspase-8、caspase-12、caspase-9 発現量を測定した。各培地とも活性化 caspase-8 および活性化 caspase-12 の発現量について、12 時間を通して変動はみられなかった (Fig. 2-6 (A-D))。一方で、活性化 caspase-9 発現量は、 $\Delta$  His 培地において、Full 培地と比較して培養後 6 時間以降で有意に増加した (Fig. 2-6 (E, F))。また Zero 培地においては、Full 培地と比較して培養後 3 時間以降で有意に増加した (Fig. 2-6 (E, F))。

### 2-3-6 ヒスチジン欠乏によるミトコンドリアへの影響

2-3-5 節で、ヒスチジン欠乏条件下におけるアポトーシスの亢進は、ミトコンドリアを介した経路であることが示唆された。そこで、ミトコンドリア機能の指標として、ミトコンドリア膜電位を評価した。

各培地で IEC-6 細胞を 12 時間培養しミトコンドリア膜電位の変化を評価したところ、Full 培地と比較して  $\Delta$  His 培地では培養後 6 時間以降で有意なミトコンドリア膜電位の低下がみられた (Fig. 2-7)。また、Full 培地の培養開始時 (0 時間) の値を 100% として比較すると、12 時間時点の  $\Delta$  His 培地におけるミトコンドリア膜電位は、 $61 \pm 4\%$  であった (Fig. 2-7)。Zero 培地においても Full 培地と比較して、培養後 6 時間以降で有意なミトコンドリア膜電位の低下がみられ、 $\Delta$  His 培地と同様の結果を示した (Fig. 2-7)。

### 2-3-7 小腸上皮細胞以外の細胞でのヒスチジン欠乏による影響

小腸上皮細胞以外の細胞に対して、ヒスチジン欠乏の応答性やその強弱は不明である。そこで、ラット胃上皮細胞の RGM1 細胞を小腸以外の消化管上皮細胞として、ラット腎線維芽様細胞の NRK 細胞を消化管上皮細胞以外の細胞として比較対象に用い、ヒスチジン欠乏への応答性の違いについて、細胞生存率とアポトーシスを指標に評価した。

まず、RGM1 細胞と NRK 細胞を各培地で 18 時間培養し、細胞生存率を測定した。RGM1 細胞では、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地および Zero 培地で有意に細胞生存率が低下した（それぞれ  $75 \pm 6\%$ ,  $40 \pm 13\%$ , Fig. 2-8 (A)）。一方、NRK 細胞では、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地で有意な細胞生存率の低下はみられなかった ( $92 \pm 6\%$ , Fig. 2-8 (B))。Zero 培地では有意な細胞生存率の低下はみられたものの、 $85 \pm 10\%$ にとどまり著明な変化はみられなかった (Fig. 2-8 (B))。

次に、RGM1 細胞と NRK 細胞を各培地で 12 時間培養し、細胞内の活性化 caspase-3 発現量を測定した。RGM1 細胞では、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地および Zero 培地で活性化 caspase-3 発現量が有意に増加した ( $163 \pm 23\%$ ,  $269 \pm 33\%$ , Fig. 2-8 (C))。一方、NRK 細胞では、Full 培地と比較して、 $\Delta$ His 培地で有意な活性化 caspase-3 発現量の増加はみられなかった ( $117 \pm 16\%$ , Fig. 2-8 (D))。Zero 培地では有意な活性化 caspase-3 発現量の増加はみられたものの、 $159 \pm 15\%$ にとどまり RGM1 ほどの変化はみられなかった (Fig. 2-8 (D))。

### 2-3-8 小腸上皮細胞におけるヒスタミンの影響

心筋細胞において、ヒスチジンの代謝物であり、様々な生理活性を持つヒスタミンの欠乏がアポトーシスを亢進したという報告がある [70]。そこで、IEC-6 細胞におけるヒスチジン欠乏下で、代謝物であるヒスタミンの形で作用しているかどうかを検討した。

$\Delta$ His 培地に  $10^{-3} \sim 10^{-8}$  M のヒスタミンを添加し、細胞生存率の回復およびアポトーシスの抑制がみられるかどうかを検討した。結果、 $\Delta$ His 培地にヒスタミンを添加しても、細胞生存率、アポトーシスのいずれにも変化はみられなかった (Fig. 2-9)。

## 2-4 考察

本章では、IEC-6 細胞において、ヒスチジン欠乏が著明に細胞生存率を低下させ、そのメカニズムはミトコンドリア膜電位の低下によって誘導されたアポトーシスの亢進であることを明らかにした。

まず、ヒスチジン欠乏条件下における IEC-6 細胞の細胞生存率への影響を評価したところ、Full 培地と比較して有意な低下がみられた (Fig. 2-1 (A))。陽性対照として置いた全アミノ酸欠乏条件の Zero 培地と同等の低下を示したことから、ヒスチジン欠乏が細胞生存率低下へ及ぼす影響が大きいことが示唆された。このことから、ヒスチジンが IEC-6 細胞の生存率維持に重要であることが明らかとなった。

また細胞生存率の経時的変化は、Full 培地と比較して  $\Delta$  His 培地において 6 時間以降で有意に低下した (Fig. 2-1 (B))。その細胞内におけるヒスチジン濃度を測定したところ、 $\Delta$  His 培地で培養する前の IEC-6 細胞  $1.0 \times 10^7$  個における細胞内ヒスチジン濃度は  $54.6 \mu\text{M}$  であったのに対し、培養 6 時間時点では定量下限 ( $< 13.3 \mu\text{M}$ ) を下回っていたため (data not shown)、IEC-6 細胞の細胞生存率の低下と細胞内ヒスチジンの消費が一致していることが判明した。また小腸上皮細胞である IEC-6 細胞は、その倍加時間が約 18 時間と短時間であり、細胞の増殖、代謝回転が速いため [71]、ヒスチジンを始めとする生育に必要な成分の要求性が高く、欠乏の影響を受けやすい可能性があると考えられた。

次に、ヒスチジン欠乏による IEC-6 細胞の生存率低下のメカニズムについて検討した。IEC-6 細胞の遊走低下と細胞生存率低下は、ヒスチジン濃度に対する推移が同じであったため (Fig. 1-2 (A), Fig. 2-2)、遊走制御のメカニズムである TGF- $\beta_1$  産生阻害と同一のメカニズムである可能性があったが、培養上清中へ終濃度  $800 \text{ pg/mL}$  の TGF- $\beta_1$  を添加しても、細胞生存率は全く回復しなかった (Fig. 2-3)。このことから、ヒスチジン欠乏が IEC-6 細胞の遊走低下に及ぼす作用と細胞生存率低下に及ぼす作用は異なり、細胞生存率の低下は別のメカニズムにより制御されていることが判明した。

消化管上皮細胞における細胞生存率の低下は、アポトーシスの亢進によって引き起こされるという報告があるため [68, 69]、ヒスチジン欠乏がアポトーシスを亢進するかどうかを検討した。結果、IEC-6 細胞におけるヒスチジン欠乏は、経時的に活性化 caspase-3

発現量を増加させ、アポトーシスを亢進することが判明した (Fig. 2-4 (A, B))。また、活性化 caspase-3 発現量の増加は、Annexin V 染色を用いた蛍光顕微鏡観察によるアポトーシス陽性細胞の発現タイミングと一致した (Fig. 2-4 (C))。さらに、アポトーシスにおけるヒスチジン濃度依存性を検討した結果、ヒスチジン濃度の低下とともにアポトーシスが亢進することが明らかとなり (Fig. 2-5)、その推移は細胞生存率の推移と一致した (Fig. 2-2)。よって、細胞生存率の低下はアポトーシスの亢進によって引き起こされたと考えられた。

さらに、ヒスチジン欠乏条件下における IEC-6 細胞のアポトーシス誘導経路を検討した。アポトーシスの主要な経路としては、3つの経路が知られている [31]。それは、デスレセプターを介した経路、小胞体ストレスを介した経路、そしてミトコンドリアを介した経路の3つである。検討の結果、活性化 caspase-9 発現量の増加がみられたことから、ヒスチジン欠乏条件下で起こるアポトーシスの亢進は、ミトコンドリアを介した経路であることが判明した (Fig. 2-6)。

ミトコンドリアを介したアポトーシスの経路は、細胞に何らかのストレスが加わることでミトコンドリア膜透過性遷移孔が開き、ミトコンドリア膜電位が低下することで、シトクロム c の放出、caspase-9 の活性化、caspase-3 の活性化とシグナルが伝達され、アポトーシスを誘導する [72, 73]。本実験結果はこの過程に一致し、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞に何らかのストレスを与え、ミトコンドリアの膜電位を低下させアポトーシスを誘導することで、細胞生存率の低下を引き起こしたと考えられた (Fig. 2-7)。細胞ストレスにより生じるシグナルをミトコンドリアへ伝える経路として、アポトーシスの促進タンパク質である Bax や Bak の活性化がミトコンドリア膜電位の低下を引き起こすという報告がある [74]。また、抗アポトーシスタンパク質である Mcl-1 について、潰瘍性大腸炎患者の消化管上皮細胞における発現量減少が確認されており、アポトーシス亢進の原因であるとされている [75]。今後、ヒスチジン欠乏がアポトーシス促進タンパク質の活性化またはアポトーシス抑制タンパク質の不活性化に寄与しているかどうかを検討する必要がある。また、小腸上皮細胞におけるミトコンドリア機能障害は、酸化ストレスによる細胞へのストレス負荷で誘導されることが報告されている [76]。現時点では、ヒスチジン欠乏条件下で酸化ストレスが誘導されているかどうかは不明であるが、検討の必要があると考えられた。小腸上皮細胞へ 25~50 mM の高濃度のヒスチジンを添加することにより、酸化ストレスや tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 刺激による IL-8 産生を抑制できるとする報告がある [77]。メカニズムは不明であるものの、

酸化ストレスや TNF- $\alpha$  刺激はいずれも細胞死であるアポトーシス亢進を誘導するシグナルであり、ヒスチジンがそれらに対する抑制効果を持つことは本研究結果と一致する。また、同研究グループはヒスチジンを含むジペプチドであるカルノシン ( $\beta$ -Ala-His) や Gly-His を作用させた場合でも IL-8 分泌量を抑制させたと報告している [78]。よって、ヒスチジン欠乏によるアポトーシス亢進は、ヒスチジン欠乏による直接的な影響またはその代謝産物である生理活性物質の欠乏としての影響という 2 つの作用点が可能性として考えられた。

また本研究により、IEC-6 細胞の細胞生存率維持に必要なヒスチジンの最小濃度は 10  $\mu$ M であることが判明し、これはアポトーシス亢進を抑制するために必要なヒスチジンの最小濃度と一致した (Fig. 2-2、Fig. 2-5)。これらの結果から、10  $\mu$ M 以上のヒスチジン濃度を維持することで、小腸上皮細胞の生存率低下およびアポトーシス亢進を抑制することができると考えられた。しかしながら、今回の結果は *in vitro* の結果であり、生体内での小腸では pH、腸内細菌、蠕動運動、免疫反応といった要因が関与すると考えられる [79-82]。そのため、小腸上皮細胞の生存率について、ヒスチジン濃度のみでは完全に説明することは難しい。今後、*in vivo* における基礎データや臨床データの取得、蓄積が必要と考えられる。

またヒスチジン欠乏による細胞生存率の低下について、小腸上皮細胞である IEC-6 細胞以外の細胞でも共通した事象なのかどうかを検証したところ、胃上皮細胞である RGM1 細胞においては、小腸上皮細胞である IEC-6 細胞と同様の傾向を示し、ヒスチジン欠乏条件下で有意な細胞生存率の低下とアポトーシスの亢進がみられた (Fig. 2-8 (A, C))。このことから、消化管上皮細胞において、ヒスチジン欠乏による本事象は共通であることが示唆された。しかし、その影響の程度は異なり、IEC-6 細胞の方が RGM1 細胞の約 2 倍、変化の程度が大きかった (Fig. 2-1, 2-4, 2-8)。

一方で、腎線維芽様細胞である NRK 細胞においては、小腸上皮細胞である IEC-6 細胞と異なり、ヒスチジン欠乏条件下で細胞生存率とアポトーシスに影響がみられなかった (Fig. 2-8 (B, D))。このことから、ヒスチジン欠乏による本事象は、消化管上皮細胞に高い感受性を示す反応であると考えられた。その理由としては、消化管上皮細胞は、非常に代謝回転が速いことから、ミトコンドリア膜電位の低下のような細胞の分裂や代謝に不可欠なエネルギー産生機能の障害が、短時間で大きな影響として現れたと考えられた。

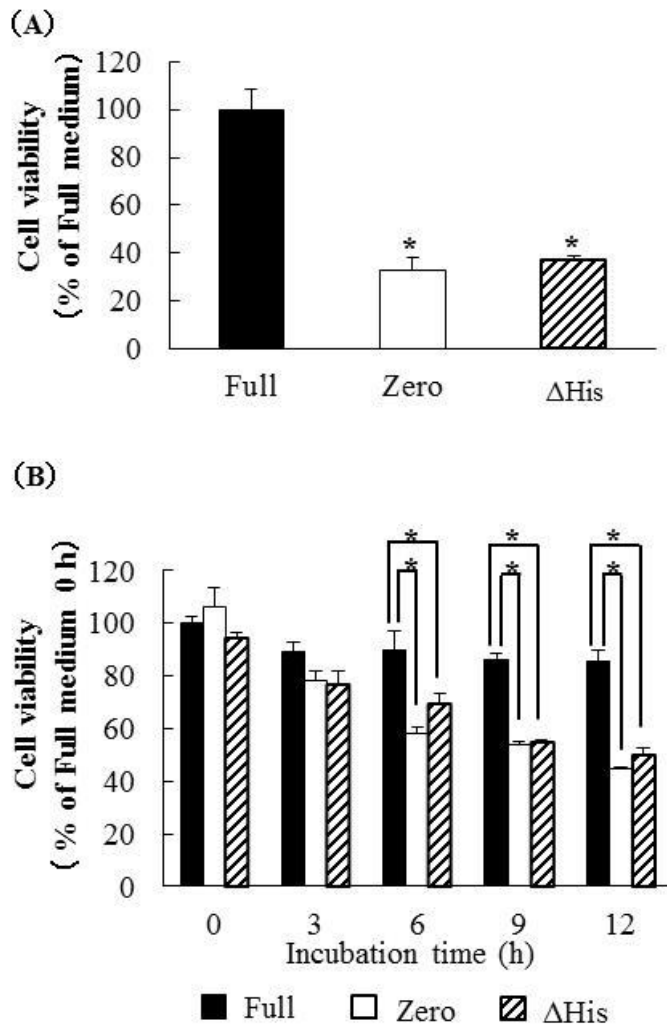
また心筋細胞では、ヒスチジンの代謝物であり、様々な生理活性を持つヒスタミンの欠乏がアポトーシスを亢進したという報告があるが [70]、IEC-6 細胞におけるヒスチジン欠乏条件下では、心筋細胞とは異なり、代謝産物であるヒスタミンの添加が細胞生存率やアポトーシスの回復に影響しないことが判明した (Fig. 2-9)。

## 2-5 小括

本章の実験結果から、小腸上皮細胞の生存において、ヒスチジンが重要な役割を果たすことが判明した。また、ヒスチジン欠乏による小腸上皮細胞の生存率の低下に、ミトコンドリアが関与することを明らかにした。

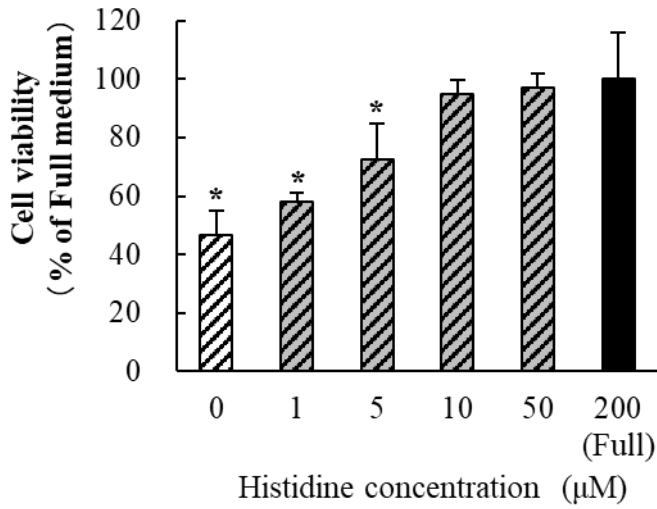
ヒスチジン欠乏条件下で IEC-6 細胞の生存率が有意に低下することを見出し、そのメカニズムはミトコンドリア膜電位の低下によって誘導されたアポトーシスの亢進であることを明らかにした (Fig. 2-10)。また、IEC-6 細胞の生存率低下とアポトーシス亢進は、ヒスチジンに濃度依存性を示し、その維持に必要な最小濃度は 10  $\mu\text{M}$  であった。さらに、ヒスチジン欠乏条件下における細胞生存率の低下およびアポトーシスの亢進は、他の細胞種と比較し、小腸上皮細胞である IEC-6 細胞において高い感受性を示した。





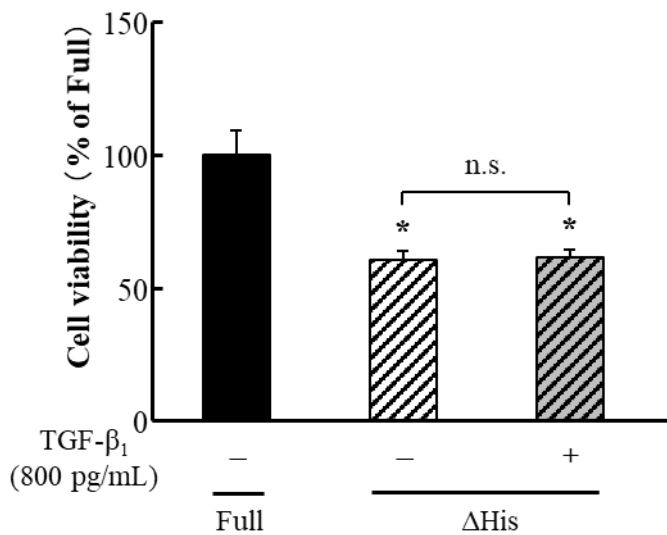
**Fig. 2-1 Effect of histidine deficiency on cell viability.**

(A) IEC-6 cells were incubated for 18 h in Full, Zero or ΔHis. Cell viability was expressed as a percentage of the Full. Data represent mean ± S.D. (n = 6). \**P* < 0.05 vs. Full. (B) IEC-6 cells were incubated for 0, 3, 6, 9 or 12 h in Full, Zero or ΔHis. Cell viability was expressed as a percentage of 0 h in the Full. Data represent mean ± S.D. (n = 6). \**P* < 0.05 vs. Full.



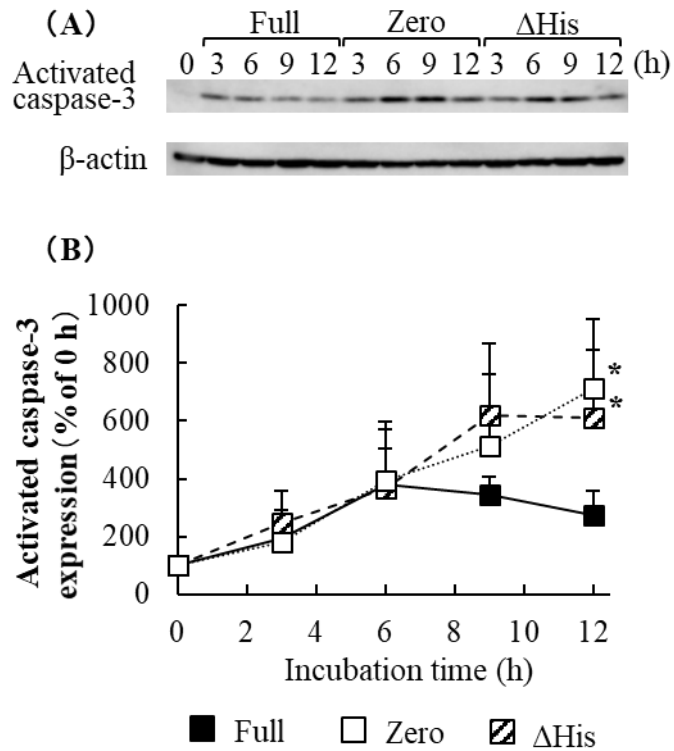
**Fig. 2-2 Effect of histidine concentration on cell viability.**

IEC-6 cells were incubated for 18 h with the following histidine concentrations: 0, 1, 5, 10, 50 or 200 µM. Cell viability was expressed as a percentage of the Full (200 mM histidine). Data represent mean ± S.D. (n = 6). \**P* < 0.05 vs. Full.



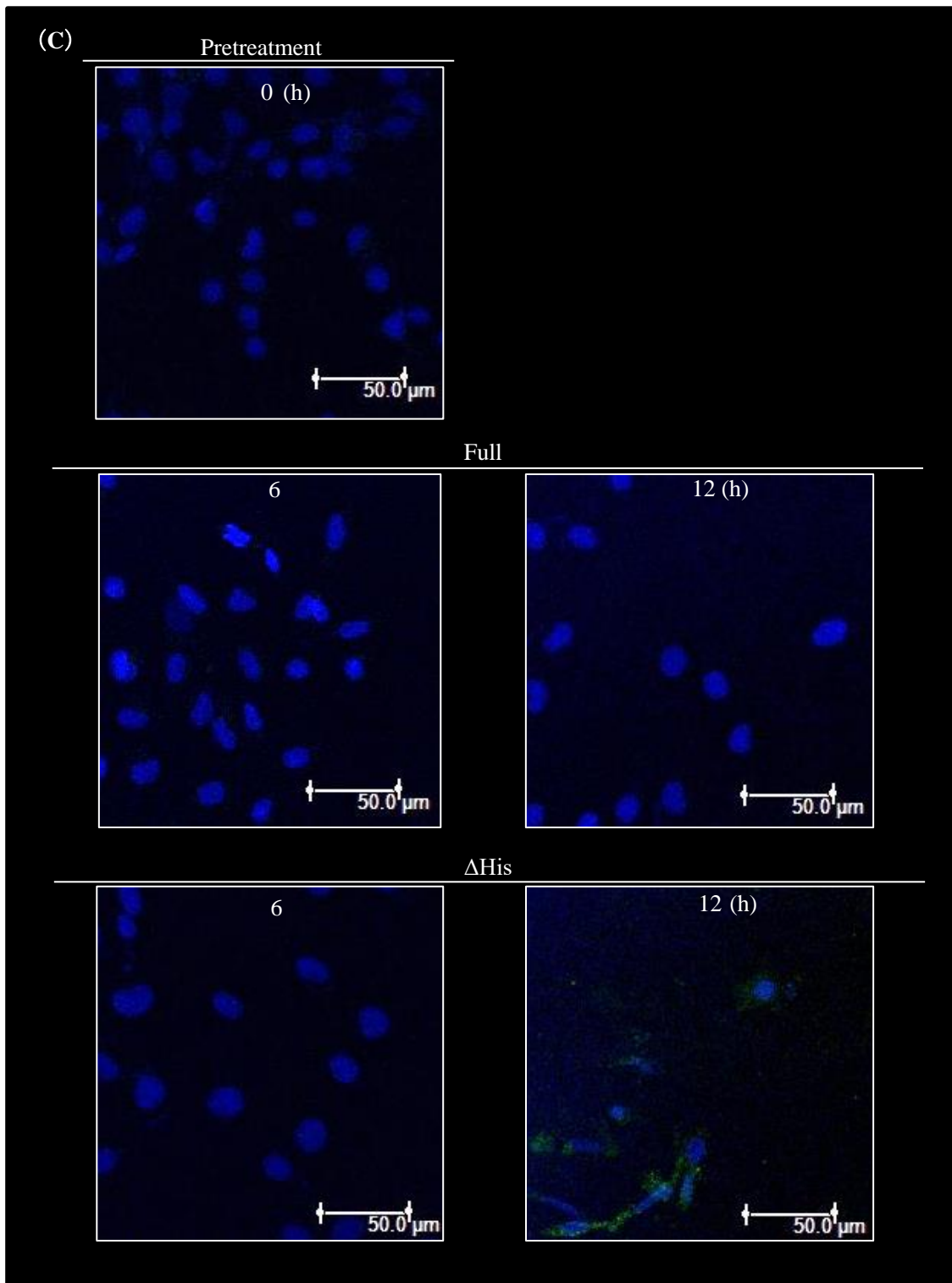
**Fig. 2-3 Effect of TGF-β<sub>1</sub> on intestinal cell viability.**

Cell viability was measured for 12 h in Full or ΔHis. “-” represents non-addition of TGF-β<sub>1</sub> and “+” represents addition of 800 pg/ml TGF-β<sub>1</sub>. Cell viability was expressed as percentages of the Full. Data represent mean ± S.D. (n = 5–6). \**P* < 0.05 vs. Full. n.s.: not significant.



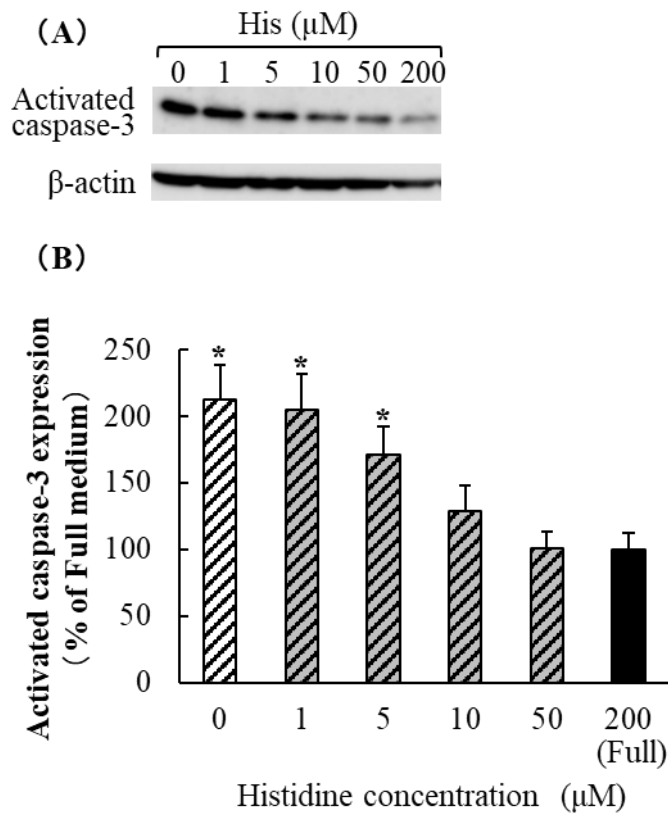
**Fig. 2-4 Effect of histidine deficiency on activated caspase-3 expression and apoptosis.**

IEC-6 cells were incubated for 0, 3, 6, 9 or 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. (A) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-caspase-3 and  $\beta$ -actin (as loading control) antibodies. (B) Data were expressed as a percentage of 0 h. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \* $P$  < 0.05 vs. Full.



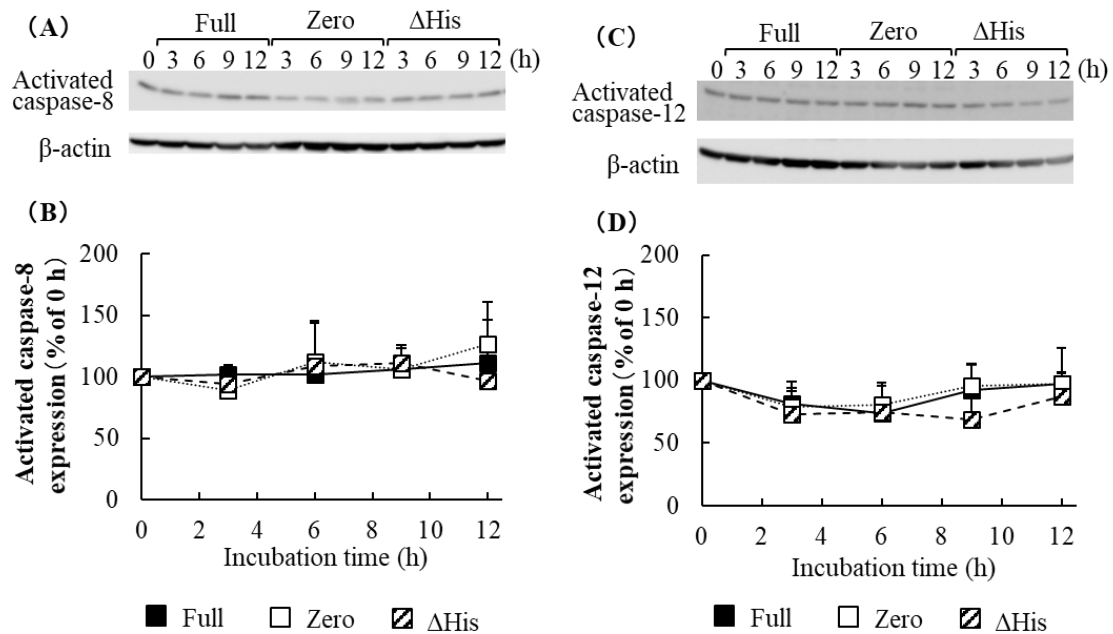
**Fig. 2-4 Effect of histidine deficiency on activated caspase-3 expression and apoptosis.**

(C) IEC-6 cells were incubated for 0, 6 or 12 h in Full or  $\Delta\text{His}$ . Apoptotic cells were stained green (FITC-Annexin V staining). Nuclei were stained blue (Hoechst 33342 staining).



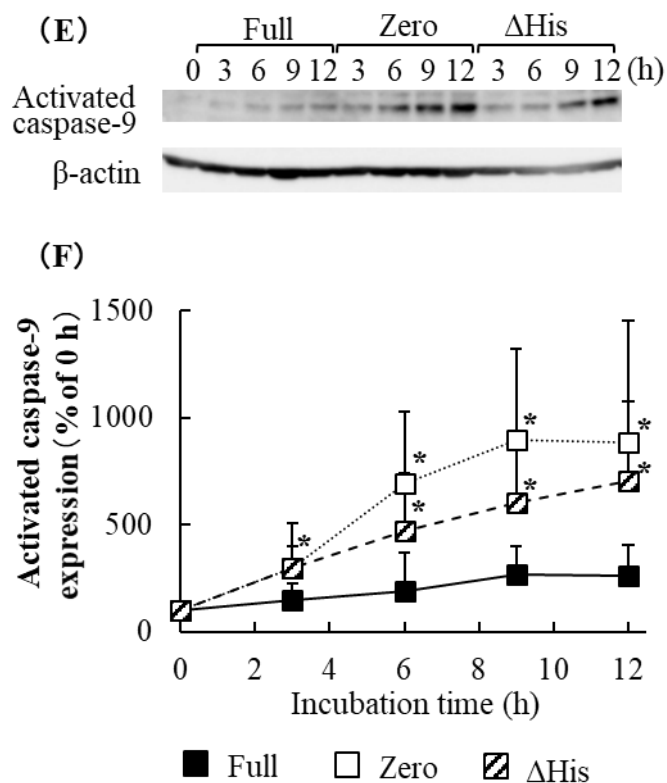
**Fig. 2-5 Effect of histidine concentration on activated caspase-3 expression.**

IEC-6 cells were incubated for 9 h with the following histidine concentrations: 0, 1, 5, 10, 50 or 200 μM. (A) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-caspase-3 and β-actin (as loading control) antibodies. (B) Data were expressed as a percentage of the Full (200 mM histidine). Data represent mean ± S.D. (n = 3). \**P* < 0.05 vs. Full.



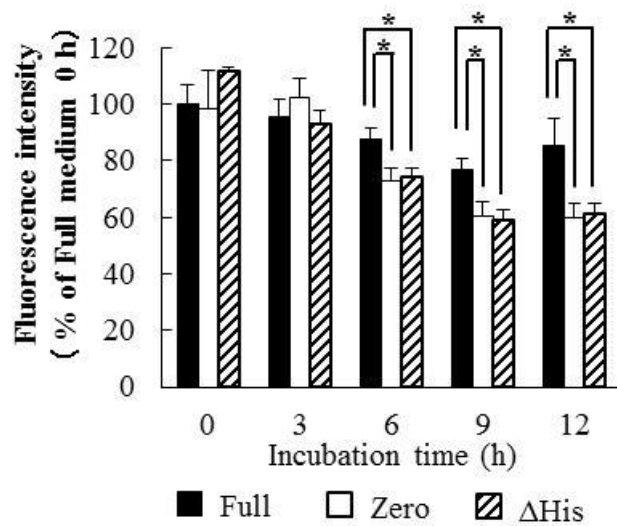
**Fig. 2-6 Effect of histidine deficiency on activated caspase-8, -9 and -12 expression.**

IEC-6 cells were incubated for 0, 3, 6, 9 or 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. (A) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-caspase-8 and  $\beta$ -actin (as loading control) antibodies. (B) Data of (A) were expressed as a percentage of 0 h. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \* $P$  < 0.05 vs. Full. (C) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-caspase-12 and  $\beta$ -actin (as loading control) antibodies. (D) Data of (C) were expressed as a percentage of 0 h. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \* $P$  < 0.05 vs. Full.



**Fig. 2-6 Effect of histidine deficiency on activated caspase-8, -9 and -12 expression.**

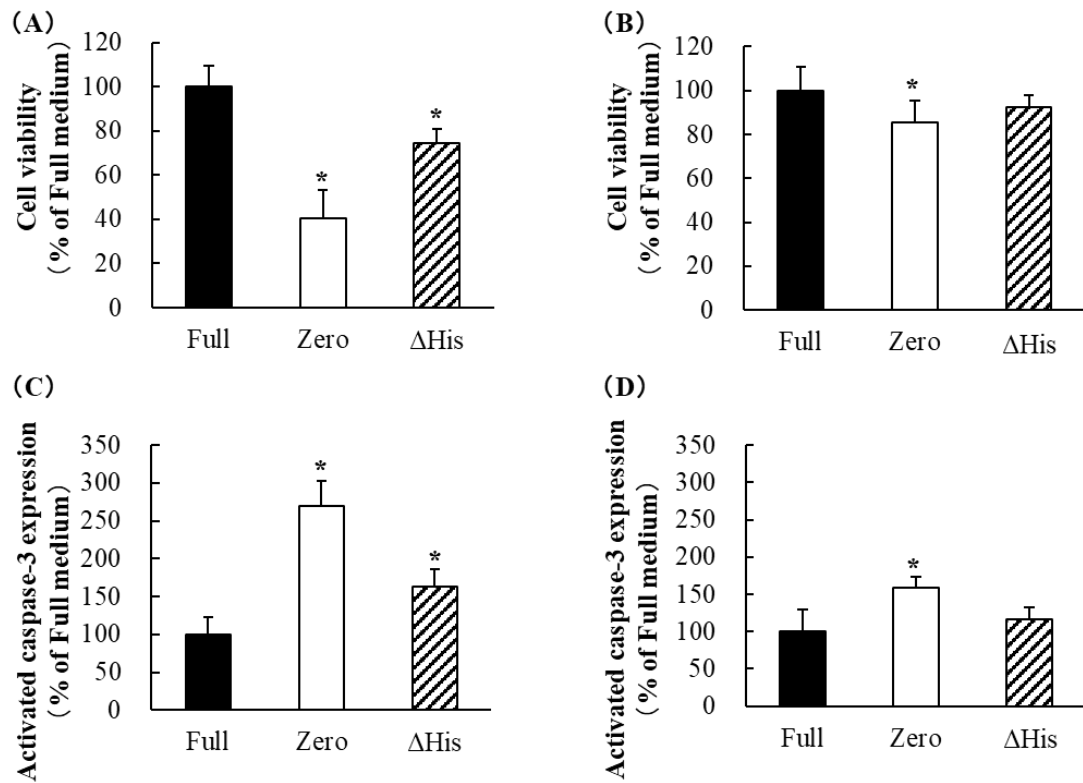
IEC-6 cells were incubated for 0, 3, 6, 9 or 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. (E) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-caspase-9 and  $\beta$ -actin (as loading control) antibodies. (F) Data of (E) were expressed as a percentage of 0 h. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \* $P$  < 0.05 vs. Full.



**Fig. 2-7 Effect of histidine deficiency on the mitochondrial membrane potential.**

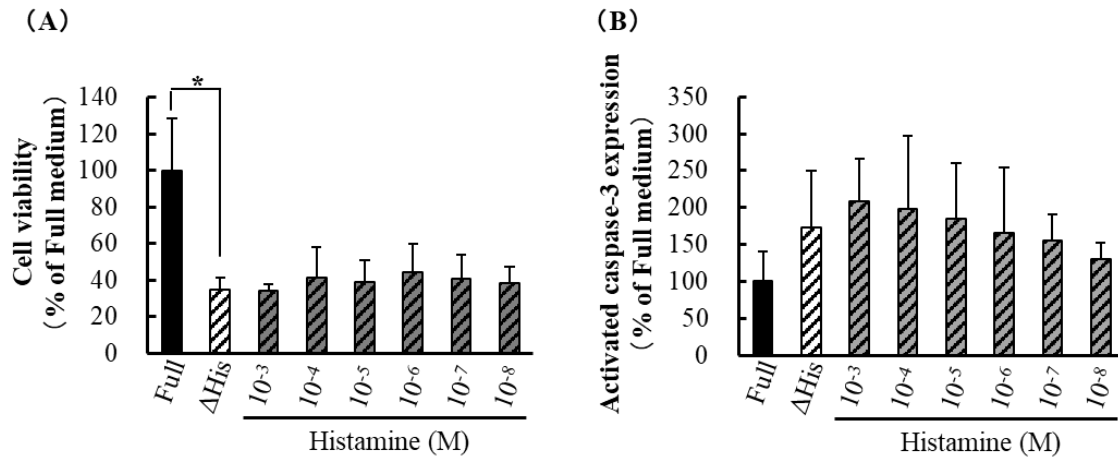
IEC-6 cells were incubated for 0, 3, 6, 9 or 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. The mitochondrial membrane potential was expressed as a percentage of 0 h in the Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $P$  < 0.05 vs. Full.





**Fig. 2-8 Effect of histidine deficiency in other cells.**

(A) RGM1 cells were incubated for 18 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. Cell viability was expressed as a percentage of the Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $P < 0.05$  vs. Full. (B) NRK cells were incubated for 18 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. Cell viability was expressed as a percentage of the Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $P < 0.05$  vs. Full. (C) RGM1 cells were incubated for 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. Activated caspase-3 levels were expressed as a percentage of the Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $P < 0.05$  vs. Full. (D) NRK cells were incubated for 12 h in Full, Zero or  $\Delta$ His. Activated caspase-3 levels were expressed as a percentage of the Full. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $P < 0.05$  vs. Full.



**Fig. 2-9 Effect of histamine concentration on cell viability and activated caspase-3 expression.**

IEC-6 cells were incubated for 18 h (A: cell viability) or 12 h (B: activated caspase-3 expression) in Full, ΔHis and ΔHis with the following histamine concentrations: 10<sup>-3</sup> to 10<sup>-8</sup> M. (A) Cell viability was expressed as a percentage of the Full. Data represent mean ± S.D. (n = 5-6). \**P* < 0.05 vs. ΔHis. (B) Activated caspase-3 levels were expressed as a percentage of the Full. Data represent mean ± S.D. (n = 4). \**P* < 0.05 vs. ΔHis.

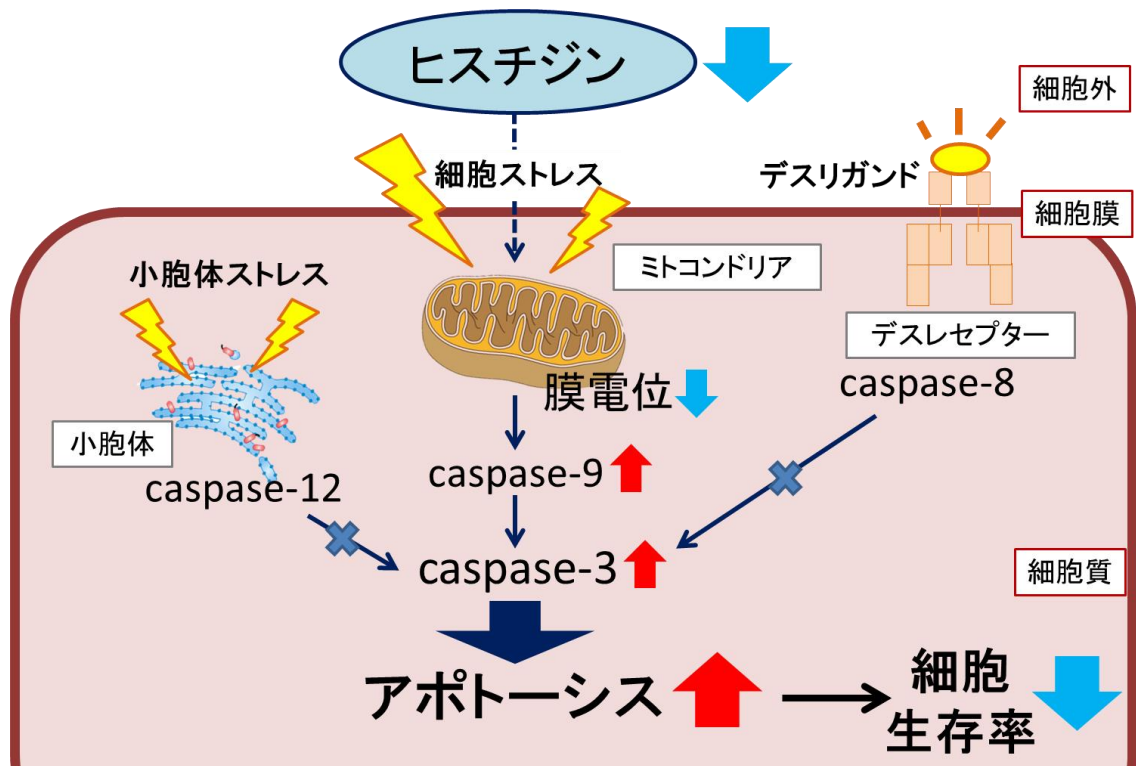


Fig. 2-10 小腸上皮細胞におけるアポトーシスの主要経路

ヒスチジン欠乏による細胞生存率の低下は、ミトコンドリアを介した経路によるアポトーシスの亢進であることが判明した。

## 総括

本研究は、20 種類のアミノ酸の中でヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走および細胞生存率を大きく低下させることを初めて明らかにした。本結果は、小腸上皮細胞の遊走や細胞生存率の維持にヒスチジンが非常に重要な役割を果たすことを示唆している。さらに、ヒスチジンと小腸上皮細胞の関連性を明らかにしたことで、本基礎研究が小腸の出血や潰瘍の原因究明の一助となると考えられた。

本研究では、ヒスチジンの欠乏により遊走および細胞生存率の低下、アポトーシスの亢進が起こることを示した。一方で、いずれの変化も 10  $\mu\text{M}$  以上のヒスチジンで抑制できることを示した。このことは、一定量のヒスチジンを生体内に維持することで、小腸粘膜上皮障害を予防・改善できる可能性を示唆している。一方で、生体における適用には解決すべき課題は多くある。その一つに、ヒスチジンの代謝産物であるヒスタミンによるアレルギーや炎症惹起のリスクがあるため、過剰なヒスチジン摂取は避ける必要がある。今後、*in vivo* や臨床で小腸の出血および潰瘍の改善・予防に対するヒスチジンの適正量等のデータを蓄積することで、適正量が効率よく摂取できるサプリメント等の剤形開発や、推奨食物とその摂取量の目安を決定するというように、ヒトでの安全性が高いヒスチジンの投与方法および摂取法の開発が一つの目指すべき方向性であると考えられた。

また、本研究により、ヒスチジン欠乏によるこれらの事象のメカニズムは、遊走については TGF- $\beta_1$  生合成の転写レベルでの抑制によるシグナル伝達の減弱であり、細胞生存率についてはミトコンドリア膜電位の低下によるアポトーシスの亢進であることを明らかにした。これまで、ヒスチジン欠乏による小腸上皮細胞の遊走および細胞生存への影響やそのメカニズムは報告されておらず、TGF- $\beta$  シグナル経路やミトコンドリア機能との関係を特定した本研究の意義は大きい。また、遊走と細胞生存に必要なヒスチジン濃度が同じであるにも関わらず、TGF- $\beta_1$  の関与が異なる点は非常に興味深い。なぜ異なる経路で制御する必要があるのか、クロストークはないのかという点については、今後の課題である。さらに、ヒスチジン欠乏とアルギニン欠乏で、遊走の抑制程度とそのメカニズムとして TGF- $\beta_1$  が共通していた点も重要な知見である。アルギニンはその添加について、関連するシグナル伝達経路やそれにより調節される転写因子が報告されているため、それらがアルギニンの欠乏にも関連している可能性は高い。また、それら

をヒスチジン欠乏でも検討するといった研究手法によって、小腸上皮細胞におけるヒスチジンの機能やそのメカニズムの解明が進む可能性がある。ヒスチジン、アルギニンとも塩基性アミノ酸であり、メカニズムの共通性も期待できるため、さらなる研究が必要である。

ヒスチジン欠乏によるこれらの事象のメカニズム解明は、学術的な意義とともに、小腸粘膜上皮障害の解決に異なる視点からの進展をもたらす可能性がある。例えば、主要な関連因子である TGF- $\beta_1$  およびミトコンドリアに対する薬剤開発という選択肢も考えられる。しかしながら、薬剤開発については、TGF- $\beta_1$  およびミトコンドリアの特性から困難であると考えられた。TGF- $\beta_1$  は、遊走や分化を促進する一方で、増殖は抑制するといった相反する作用を持ち、過剰または慢性的な作用により肺、肝臓および腎臓に線維化を引き起こすという副作用も持つ。TGF- $\beta_1$  は、このような方向性の異なる多様な作用を持つため、主薬効以外の副作用を制御することが非常に難しいと考えられた。さらに、過剰な TGF- $\beta$  刺激は上皮細胞の発がんリスクを高めるという報告もあり、疾患の重篤性から考えてベネフィットよりもリスクが勝ると考えられた。また、ミトコンドリアに関しては、本研究によりヒスチジン欠乏後 6 時間で膜電位の低下が確認された。ミトコンドリアは膜電位が低下するとシトクロム c を放出するが、シトクロム c の放出後は不可逆かつ速やかにアポトーシスが進行するため、薬剤を適用できるタイミングがほとんどない。さらに、TGF- $\beta$  レセプターおよびミトコンドリアは、全身細胞に広く分布するため、副作用の予測が困難で、それを避けるためには小腸上皮細胞への薬物の特異的輸送や吸収の制御が必要となり現実的ではない。これらの理由から、関連因子である TGF- $\beta_1$  およびミトコンドリアに対する分子レベルでの薬剤開発は難しいと考えられた。一方で、重度の小腸粘膜上皮障害の治療には薬剤治療の他に、経腸栄養療法が行われている。しかし、この経腸栄養療法で使用される栄養剤は、様々な疾患に汎用的に用いられるものであるため、小腸粘膜上皮障害に特化したアミノ酸組成にはなっていない。そこで、小腸粘膜上皮障害に特化したアミノ酸組成の経腸栄養剤の開発という形であれば、本研究で得られた成果を活かせると考えられた。しかしながら、薬剤開発という視点は将来的な可能性はあるものの難しい側面もあると考えられ、前述した栄養学的アプローチの重要性が高まると考えられた。

小腸の出血や潰瘍は発見されにくく、突然の穿孔により QOL を著しく損なう疾患である。本研究は、栄養学的アプローチにより、生体内に一定量のヒスチジンを維持することが小腸上皮細胞における生理的恒常性の保持につながり、小腸の出血・潰瘍の進行を改善・予防するために重要である可能性を示唆した。

## 研究業績

### 公表論文

#### 第1章

Matsui T, Ichikawa H, Fujita T, Takemura S, Takagi T, Osada-Oka M, Minamiyama Y. Histidine and arginine modulate intestinal cell restitution via transforming growth factor- $\beta_1$ . *Eur J Pharmacol.* 2019; 850: 35-42.

#### 第2章

Matsui T, Ichikawa H, Fujita T, Takagi T, Osada-Oka M, Minamiyama Y. Histidine deficiency attenuates cell viability in rat intestinal epithelial cells by apoptosis via mitochondrial dysfunction. *J Nutr Intermed Metab.* 2017; 8: 21-28.

## 謝辞

本学位論文の作成および審査にあたり、お忙しい中にもかかわらず指導教授として終始懇切なご指導・ご鞭撻を頂きました京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 南山幸子教授に深く感謝申し上げます。また、京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 桑波田雅士教授、岩崎有作教授より、ご審査およびご助言を賜りましたことに対し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、同志社大学大学院生命医科学研究科医生命システム専攻 市川寛教授、京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 岡真優子准教授、京都府立医科大学大学院医学研究科 高木智久准教授に数々のご指導・ご助言を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。

実験に際しましては、大阪市立大学医学研究科臨床医科学専攻 竹村茂一講師、中川加奈子実験補助員、京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 小林慧子助手に、ご協力・ご助言頂きましたこと、心より感謝申し上げます。

また、修了生の藤田ともか氏を始め、本研究の遂行にご協力くださいました全ての在校生、卒業生、修了生の皆様に感謝申し上げます。

最後に、いつも温かく見守り、応援してくれた両親、祖母、おじ、おば、友人一同、そして公私とも陰日向に支えてくれた妻の朝美に心より感謝の意を表します。



## 参考文献

- [1] Xu N, Yu Z, Cao X, Wang Z, Yan M. Characteristics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced small bowel injury identified by single-balloon endoscopy or capsule endoscopy. *Med Sci Monit.* 2017; 23: 5237-5245.
- [2] Wada M, Kato M, Hirai Y, Kubosawa Y, Sunata Y, Abe K, Hirata T, Takada Y, Banno S, Takatori Y, Kinoshita S, Mori H, Takabayashi K, Kikuchi M, Kikuchi M, Suzuki M, Kanai T, Uraoka T. Initial Management of colonic diverticular bleeding: observational study. *Digestion.* 2018; 98: 41-47.
- [3] Sakai E, Endo H, Taniguchi L, Hata Y, Ezuka A, Nagase H, Yamada E, Ohkubo H, Higurashi T, Sekino Y, Koide T, Iida H, Hosono K, Nonaka T, Takahashi H, Inamori M, Maeda S, Nakajima A. Factors predicting the presence of small bowel lesions in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Dig Endosc.* 2013; 25: 412-420.
- [4] Kameda N, Higuchi K, Shiba M, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. A prospective, single-blind trial comparing wireless capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *J Gastroenterol.* 2008; 43: 434-440.
- [5] Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F, Moriyama M, Ikeda I, Chiba A, Oshita F, Imaizumi A, Yamamoto H, Miyano H, Horimoto K, Tochikubo O, Mitsushima T, Yamakado M, Okamoto N. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One.* 2011; 6: e24143.
- [6] Fukutake N, Ueno M, Hiraoka N, Shimada K, Shiraishi K, Saruki N, Ito T, Yamakado M, Ono N, Imaizumi A, Kikuchi S, Yamamoto H, Katayama K. A novel multivariate index for pancreatic cancer detection based on the plasma free amino acid profile. *PLoS One.* 2015; 10: e0132223.

- [7] Vissers YL, Dejong CH, Luiking YC, Fearon KC, von Meyenfeldt MF, Deutz NE. Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency? *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 1142-1146.
- [8] Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83: 1010-1016.
- [9] Ooi M, Nishiumi S, Yoshie T, Shiomi Y, Kohashi M, Fukunaga K, Nakamura S, Matsumoto T, Hatano N, Shinohara M, Irino Y, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflamm Res.* 2011; 60: 831-840.
- [10] Chiba T, Suzuki K, Matsumoto T. Plasma-free amino acid profiles in Crohn's disease: relationship with the Crohn disease activity index. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2018; 11: 1-7.
- [11] Hisamatsu T, Ono N, Imaizumi A, Mori M, Suzuki H, Uo M, Hashimoto M, Naganuma M, Matsuoka K, Mizuno S, Kitazume MT, Yajima T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T, Kanai T. Decreased plasma histidine level predicts risk of relapse in patients with ulcerative colitis in remission. *PLoS One.* 2015; 10: e0140716.
- [12] Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, Ząbek A, Jawień E, Pawełka D, Banasik M, Mastalerz-Migas A, Balcerzak W, Kaliszewski K, Skóra J, Barć P, Korta K, Pormańczuk K, Szyber P, Litarski A, Młynarz P. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 163-174.
- [13] Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M, Hibi T. Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2012; 7: e31131.

- [14] Watanabe M, Suliman ME, Qureshi AR, Garcia-Lopez E, Bárány P, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lindholm B. Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 1860-1866.
- [15] Singh K, Coburn LA, Barry DP, Boucher JL, Chaturvedi R, Wilson KT. L-arginine uptake by cationic amino acid transporter 2 is essential for colonic epithelial cell restitution. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302: G1061-G1073.
- [16] Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor AR, Bose CL, Rhoads JM. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 2000; 137: 785-793.
- [17] Walton KD, Freddo AM, Wang S, Gumucio DL. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development.* 2016; 143: 2261-2272.
- [18] Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology.* 2016; 151: 616-632.
- [19] Mammen JMV, Matthews JB. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med.* 2003; 31: S532-S537.
- [20] Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* 2007; 87: 545-564.
- [21] Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2005; 40: 925-931.
- [22] Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis.* 2001; 7: 68-77.

- [23] Iizuka M, Konno S. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 2161-2171.
- [24] Karrasch T, Jobin C. Wound healing responses at the gastrointestinal epithelium: a close look at novel regulatory factors and investigative approaches. *Z Gastroenterol*. 2009; 47: 1221-1229.
- [25] Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 348-353.
- [26] Lacy ER. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol*. 1988; 10: S72-S77.
- [27] Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009; 1: 97-115.
- [28] Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*. 1997; 15: 82-93.
- [29] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 3: 495-516.
- [30] Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005; 37: 719-727.
- [31] Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 615: 13-23.
- [32] Brancatelli G, Dalcanale E, Pinalli R, Geremia S. Probing the structural determinants of amino acid recognition: X-ray studies of crystalline ditopic host-guest complexes of the positively charged amino acids, Arg, Lys, and His with a cavitand molecule. *Molecules*. 2018; 23: 3368.

- [33] Watford M, Wu G. Protein. *Adv Nutr*. 2018; 9: 651-653.
- [34] Alifano P, Fani R, Liò P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev*. 1996; 60: 44-69.
- [35] Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J*. 2003; 373: 1-18.
- [36] Kriengsinyos W, Rafii M, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Long-term effects of histidine depletion on whole-body protein metabolism in healthy adults. *J Nutr*. 2002; 132: 3340-3348.
- [37] Kopple JD, Swendseid ME. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *J Clin Invest*. 1975; 55: 881-891.
- [38] Elias PM. Stratum corneum acidification: how and why? *Exp Dermatol*. 2015; 24: 179-180.
- [39] Huang H, Li Y, Liang J, Finkelman FD. Molecular regulation of histamine synthesis. *Front Immunol*. 2018; 9: 1392.
- [40] Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol*. 2006; 147: S127-S135.
- [41] Kwiatkowski S, Kiersztan A, Drozak J. Biosynthesis of carnosine and related dipeptides in vertebrates. *Curr Protein Pept Sci*. 2018; 19: 771-789.
- [42] Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013; 93: 1803-1845.

- [43] Tomlinson C, Rafii M, Ball RO, Pencharz P. Arginine synthesis from enteral glutamine in healthy adults in the fed state. *J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301: E267-E273.
- [44] Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr.* 1986; 10: 227-238.
- [45] Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Meininger CJ, Spencer TE, Yin YL. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci.* 2007; 112: 8-22.
- [46] McCormack SA, Johnson LR. Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1991; 260: G795-G806.
- [47] Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1996; 270: G225-G237.
- [48] Fischer JE. Nutrition and metabolism in the surgical patient. *Ann Surg.* 1996; 226: 663.
- [49] Rhoads J, Wu G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids.* 2009; 37: 111-122.
- [50] Rhoads JM, Niu X, Odle J, Graves LM. Role of mTOR signaling in intestinal cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: G510-G517.
- [51] Rhoads JM, Chen W, Gookin J, Wu GY, Fu Q, Blikslager AT, Rippe RA, Argenzio RA, Cance WG, Weaver EM, Romer LH. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut.* 2004; 53: 514-522.
- [52] Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1409-1416.

- [53] Larson SD, Li J, Chung DH, Evers BM. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G1262-G1271.
- [54] Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Graves LM, Licato LL, Blikslager AT, Smith J, Gatzky J, Brenner DA. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. *Gastroenterology.* 2000; 118: 90-100.
- [55] Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD, Berschneider HM, Brenner DA. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997; 272: G943-G953.
- [56] Rhoads JM, Liu Y, Niu X, Surendran S, Wu G. Arginine stimulates cdx2-transformed intestinal epithelial cell migration via a mechanism requiring both nitric oxide and phosphorylation of p70 S6 kinase. *J Nutr.* 2008; 138: 1652-1657.
- [57] Nakajo T, Yamatsuji T, Ban H, Shigemitsu K, Haisa M, Motoki T, Noma K, Nobuhisa T, Matsuoka J, Gunduz M, Yonezawa K, Tanaka N, Naomoto Y. Glutamine is a key regulator for amino acid-controlled cell growth through the mTOR signaling pathway in rat intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 326: 174-180.
- [58] Walsh MF, Ampasala DR, Rishi AK, Basson MD. TGF- $\beta_1$  modulates focal adhesion kinase expression in rat intestinal epithelial IEC-6 cells via stimulatory and inhibitory Smad binding elements. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1789: 88-98.
- [59] Bonkobara M, Boonrit T, Onda K, Matsuki N, Inaba M, Ono K. Effects of epidermal growth factor on maternal and fetal serum amino acid levels in rats. *J Vet Med Sci.* 1997; 59: 1053-1056.

- [60] Watanabe R, Iizuka T, Kokawa K, Yamamoto A, Ishibashi T. Quick responses of plasma amino acid concentration to changes in dietary amino acid levels in rats. *Exp Anim.* 1998; 47: 37-42.
- [61] Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* 2009; 19: 128–139.
- [62] Suer S, Ampasala D, Walsh MF, Basson MD. Role of ERK/mTOR signaling in TGF-beta-modulated focal adhesion kinase mRNA stability and protein synthesis in cultured rat IEC-6 intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2009; 336: 213-223.
- [63] De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. Integrin traffic - the update. *J Cell Sci.* 2015; 128: 839-852.
- [64] Miyake K, Kimura S, Nakanishi M, Hisada A, Hasegawa M, Nagao S, Abe Y. Transforming growth factor-beta1 stimulates contraction of human glioblastoma cell-mediated collagen lattice through enhanced alpha2 integrin expression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59: 18-28.
- [65] Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Transforming growth factor-beta1 modulates expression of adhesion and cytoskeletal proteins in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril.* 2002; 78: 154-161.
- [66] Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, Basson MD. Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms. *Am J Pathol.* 2008; 173: 385-399.
- [67] Noiri E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou WF, Peunova N, Goligorsky MS. Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996; 270: C794-C802.
- [68] Gibson PR. Apoptosis or necrosis--colonic epithelial cell survival. *Novartis Found Symp.* 2004; 263: 133-145.



- [69] Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 2013; 62: 1062-1071.
- [70] Deng L, Hong T, Lin J, Ding S, Huang Z, Chen J, Jia J, Zou Y, Wang TC, Yang X, Ge J. Histamine deficiency exacerbates myocardial injury in acute myocardial infarction through impaired macrophage infiltration and increased cardiomyocyte apoptosis. *Sci Rep*. 2015; 5: 13131.
- [71] Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol*. 1979; 80: 248-265.
- [72] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003; 8: 115-128.
- [73] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011; 351: 41-58.
- [74] Pradelli LA, Bénéteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 1589-1597.
- [75] Lv B, Liu Z, Wang S, Liu F, Yang X, Hou J, Hou Z, Chen B. MiR-29a promotes intestinal epithelial apoptosis in ulcerative colitis by down-regulating Mcl-1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 8542-8552.
- [76] Li JM, Zhou H, Cai Q, Xiao GX. Role of mitochondrial dysfunction in hydrogen peroxide-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 562-567.
- [77] Son DO, Satsu H, Shimizu M. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*. 2005; 579: 4671-4677.

- [78] Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M. Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine*. 2008; 42: 265-276.
- [79] Zhang K, Hornef MW, Dupont A. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell Microbiol*. 2015; 17: 1561-1569.
- [80] Kagnoff MF. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2841-2843.
- [81] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14: 141-153.
- [82] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9: 799-809.