

## 腸内細菌を介した大腸アクアポリンの機能解析

今 理紗子

星薬科大学 生体分子薬理学研究室

## Functional analysis of colonic aquaporin via gut microbiota

Risako KON

Department of Biomolecular Pharmacology, Hoshi University

## はじめに

水はヒトの構成成分の約3分の2を占めており、生命を維持する上で必須の分子である。水は細胞内外を自由に行き来しているが、この水の移動は細胞膜に発現する水チャネルアクアポリン (aquaporin; AQP) を介して効率よく行われている。AQP は AQP0-AQP12 までの13種類の異なるサブタイプが全身の様々な細胞に発現しており (図1)<sup>1)</sup>、この AQP の異常によって脳浮腫<sup>2)</sup>や腎性尿崩症<sup>3)</sup>などの種々の疾病が生じることが明らかとなっている。したがって、AQP の発現や機能をコントロールし、水の恒常性を維持することは、ヒトが健康を維持する上で、非常に重要なことといえる。

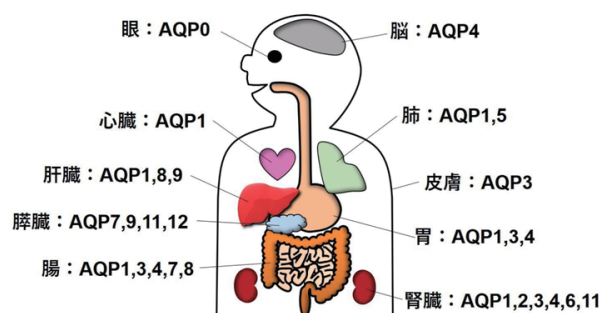


図1. ヒトにおける AQP の発現分布

ヒトは、食べ物や飲料などから約2 L/day の水分を摂取し、腸管から吸収された後、腎臓を介して尿として排泄する。こうした体内の水のダイナミックな移動に関して、腎臓における AQP の役割については多くの研究がなされているものの<sup>4-6)</sup>、腸管における報告は少ない。特に、強固なタイトジャンクションが形成されている大腸においては、細胞を経由した水の移動が盛んに行われているものと推察されてきたが、その詳細は不明であった。

このような中、著者は、大腸における水の移動と AQP との関係性を明らかにするため、種々の検討を行い、以下に示す知見を得た。ラットの大腸粘膜上皮細胞には13種類のサブタイプのうち AQP3 が優位に発現しており、これはヒトの大腸における AQP3 の発現部位と同様であった (図2)<sup>7-9)</sup>。腸管内の内容物と直接触れ合う粘膜上皮細胞に AQP3 が強く発現していたことから、便の水分調節機構において AQP3 が重要な役割を担っていることが推察された。そこで、このことを確かめる目的で、便の水分量を劇的に変化させる下剤をラットに投与したところ、下痢の発症に伴って大腸 AQP3 の発現量が著明に低下することがわかった<sup>7,8,10)</sup>。また、ラットに便秘誘発剤を投与した際には、糞中水分量が低下し便秘が発症するとともに、大腸 AQP3 の発現量の増加が認められた (図3下段)<sup>11)</sup>。以上の知見から、生理的条件下の大腸では、水は AQP3 を介して、浸透圧の低い管腔側から浸透圧の

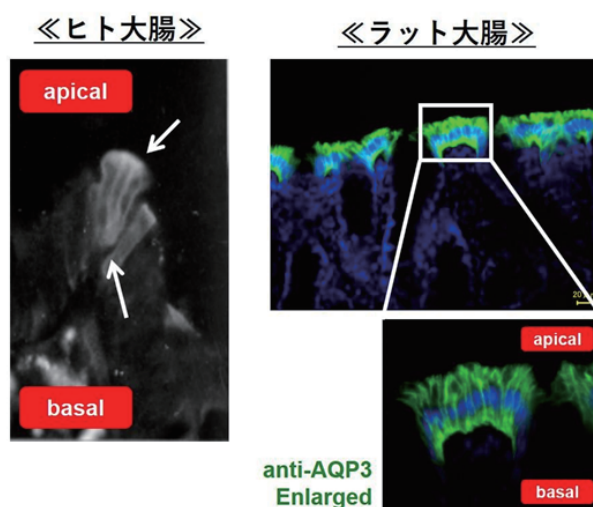


図2. ラット大腸およびヒト大腸における AQP3 の発現部位  
緑; AQP3、青; 核を示している。文献 7-9 一部改変。

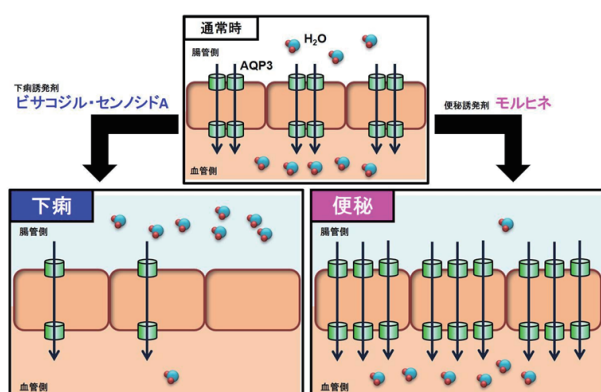


図 3. 大腸における AQP3 の役割および下痢・便秘との関係

高い血管側へ吸収方向に移動し、便が濃縮されていることが示唆された (図 3 上段)<sup>12)</sup>。その一方で、大腸における AQP3 の生理的意義やその発現制御メカニズムについてはいまだ不明な点が多く残っていた。特に、大腸には腸内細菌が多く存在すること、ならびに腸内細菌叢の異常により下痢や便秘が引き起こされることを考えると、大腸の AQP と腸内細菌との間には密接な関係があるものと推察されるが、その詳細についてはこれまで全くわかっていなかった。本稿では、腸内細菌が大腸 AQP3 の発現に及ぼす影響について種々検討を行ったので、その成果について報告する。

#### Germ-free ラットにおける大腸 AQP3 の発現量の解析

ヒトの腸内には、約1000種類、約100兆個にも及ぶ膨大な細菌群が存在し、腸内細菌叢として大きなシステム系が構築されている。特に、大腸においては多くの細菌が生息し、胃や空腸では $10^1 \sim 10^4$  cfu/g であるのに対して、大腸では $10^{11} \sim 10^{12}$  cfu/g もの細菌が存在する。これら腸内細菌は、難消化性多糖の分解、生体内・生体外成分の代謝、ビタミンなどの必須栄養素の産生、免疫系の成熟などをはじめ、様々な生理機能を有していることが明らかになっている。一方、近年、環境や食事、薬物の使用など様々な原因により、腸内細菌の種類や菌叢パターンが変化することが報告され、腸内細菌が種々の疾患の原因になり得るものと考えられている。例えば、花粉症や肥満症などが発症した際には腸内細菌叢が変動していることが見出されている<sup>13, 14)</sup>。また、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome; IBS) では、便秘型・下痢型・混合型のいずれのタイプによっても腸内細菌のプロファイルが異なること<sup>15)</sup>、また、潰瘍性大腸炎や慢性便秘症の発症においても腸内細菌の関わりが報告されている<sup>16, 17)</sup>。このように、腸内細菌と下痢と便秘の発症には密接な関係があるものと考えられるが、その詳細は不明な点が多く、特に、腸内細菌がどのようにして大腸における水の移動を変化させるのかについてはほとんどわかっていなかった。

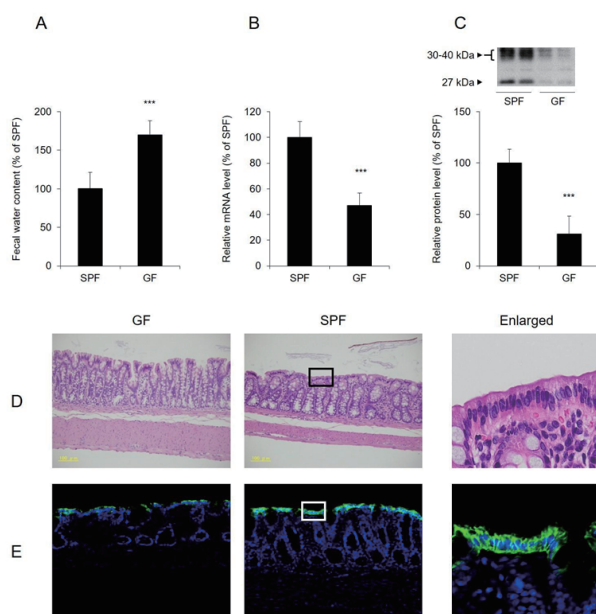


図 4. GF ラットおよび SPF ラットにおける糞中水分量および大腸 AQP3 の発現変化

GF ラットおよび SPF ラットの糞便を採取し、糞中水分量を測定した (A)。また、大腸を摘出し、AQP3 の mRNA 発現量 (B) およびタンパク質発現量を解析した (C) (平均値 ± 標準偏差, n=6, Student's *t*-test: \*\*\* $p < 0.001$  vs. SPF)。さらに、GF ラットおよび SPF ラットの大腸を HE 染色するとともに (D)、免疫組織化学染色により AQP3 の発現部位を確認した (E)。

た。

上述のように、大腸の粘膜上皮細胞には AQP3 が優位に発現しており、便の水分調節に重要な役割を担っていることが知られている。そこで、下痢や便秘の発症と腸内細菌ならびに大腸 AQP3 との関係を明らかにする目的で、まず、腸内細菌あるいはその代謝物の存在が大腸 AQP にどのような影響を及ぼすのかについて調べた。具体的には、腸内細菌が存在しない germ-free (GF) 無菌ラットあるいは腸内細菌が存在する通常の specific pathogen-free (SPF) 有菌ラットの排便状況および大腸 AQP の発現量を解析することにより、腸内細菌が便秘および AQP の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、GF ラットの糞中水分量は SPF ラットに比べて有意に高いことがわかった (図 4A)。一方、GF ラットの大腸 AQP3 のタンパク質発現量は、SPF ラットの約 40% であり、この発現低下は粘膜上皮細胞全体で認められた (図 4C, 4E)。このとき、GF ラットの大腸において器質的な変化はみられなかった (図 4D)。以上のことから、腸内細菌が存在しない GF ラットでは、大腸における AQP3 の発現量が低下しているため濃縮機構の働きが弱く、糞中水分量が増加したものと考えられた。本結果は、便の濃縮に関与する大腸 AQP3 の発現制御機構に腸

内細菌あるいはその代謝物が関与していることを示唆するものであり、非常に重要な基礎データであると考えられた。

#### Antibiotic associated diarrhea 発症時における大腸 AQP3 の役割の検討

感染症などに罹患すると抗菌薬が処方されるが、抗菌薬の副作用として下痢や軟便などが生じることが知られている。これは抗菌薬関連下痢症 (antibiotic associated diarrhea; AAD) と呼ばれ、患者の QOL を低下させ、服用薬のコンプライアンスの低下に直結するばかりではなく、薬剤耐性菌の増殖や偽膜性大腸炎などの合併症を招くこともあり注意を要する<sup>18)</sup>。これまで AAD の発生メカニズムについては、腸内細菌叢の変動に起因していることが推察されてきたが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く残っていた。一方、先述した GF ラットおよび SPF ラットを用いた試験の結果から、腸内細菌の有無が大腸 AQP3 の発現量および便の性状に影響を及ぼすことがわかった (図 4)。そこで著者は、AAD 発症時には、大腸 AQP3 の発現低下を介して下痢が発症するのではないかと仮説を立て、検証した。具体的には、ラットに抗菌薬シプロフロキサシンを 6 日間連続投与し、糞中水分量と大腸 AQP3 の発現量を解析した。その結果、ラットにシプロフロキサシンを処置した

際の糞中水分量は、投与 1 日目から増加し、投与 3 日目では投与前の約 2 倍となり、投与期間中は持続することがわかった (図 5A)。このとき、排便回数および排便総質量も有意に増加した (data not shown)。このことから、ラットにシプロフロキサシンを処置すると、下痢が生じることがわかり、AAD モデルラットを構築することができた。

次に、このシプロフロキサシンによる下痢が、大腸 AQP3 の発現変化によるものであるかについて調べた。その結果、大腸 AQP3 の mRNA 発現量は、シプロフロキサシン投与 1 日目から有意に低下し、この低下は投与期間中は持続していることがわかった (図 5B)。また、シプロフロキサシン投与後の大腸における AQP3 のタンパク質発現量を解析したところ、mRNA 発現量と同様に、シプロフロキサシン投与 1 日目から有意に低下し、投与 3 日目においては投与前の約 40% であった (図 5C)。これらのことから、抗菌薬シプロフロキサシンを投与し下痢が生じた際には、大腸 AQP3 の発現量が低下することが明らかとなり、これが AAD 発症メカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。

#### AAD 発症時の大腸における AQP3 発現低下要因の探索

続いて、シプロフロキサシンによって誘発された下痢において、大腸 AQP3 の発現低下がどのようなメカニズムで生じたかについて調べた。

まず始めに、シプロフロキサシン投与時の大腸 AQP3 の発現低下が、大腸粘膜上皮細胞に対するシプロフロキサシンの直接作用によるものかを調べた。その結果、結腸癌由来 HT-29 細胞にシプロフロキサシンを添加した際の AQP3 mRNA 発現量は、添加 72 時間後までコントロール群と比べて変化は認められなかった (図 6)。したがって、シプロフロキサシンが大腸粘膜上皮細胞に直接作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性は低いものと考えられた。

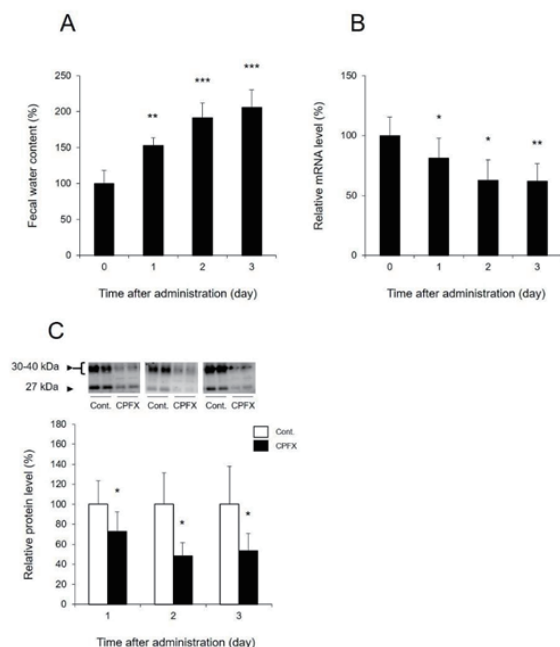


図 5. シプロフロキサシンをラットに処置した際の糞中水分量および大腸 AQP3 の発現変化

ラットにシプロフロキサシン 200 mg/kg を経口投与し、糞中水分量を経時的に測定した (A)。(平均値±標準偏差、n=6、Dunnett's test: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. 0 day.) また、このときの大腸を摘出し、大腸 AQP3 の mRNA 発現量 (B) およびタンパク質発現量を解析した (C)。(平均値±標準偏差、n=6、Dunnett's test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , vs. 0 day or Control.)

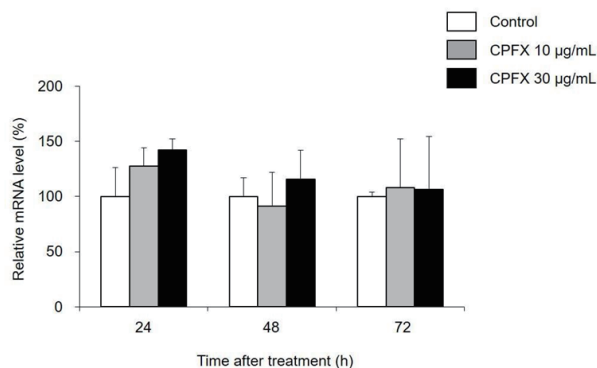


図 6. AQP3 の発現に及ぼすシプロフロキサシンの影響

HT-29 細胞にシプロフロキサシン (CPFX; 10 µg/mL、30 µg/mL) を添加し、72 時間後までの AQP3 の mRNA 発現量を解析した (平均値±標準偏差、n=6)。



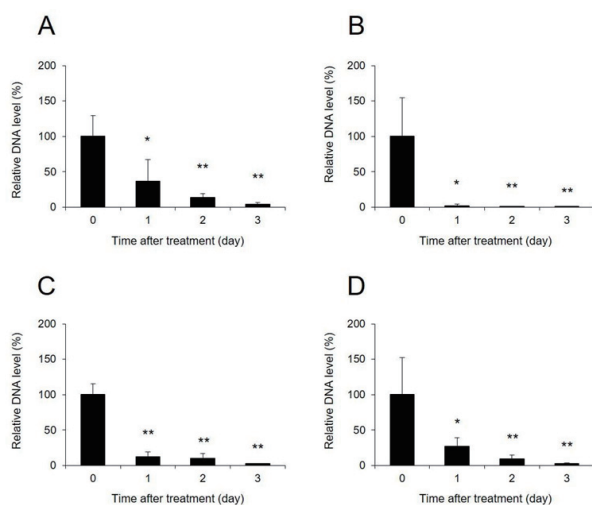


図7. ラットにシプロフロキサシンを処置した際の腸内細菌の変化

ラットにシプロフロキサシン 200 mg/kg を経口投与し、糞中の 16S rRNA (A)、*Bacteroides fragilis* (B)、*Bifidobacterium* spp. (C) および *Clostridium sordelli* (D) を解析した (平均値±標準偏差, n=6, Dunnett's test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs. 0 day.)。

次に、シプロフロキサシンの投与により腸内細菌が変動し、間接的に大腸 AQP3 の発現量が低下した可能性について調べた。解析の結果、糞便 1 g あたりの全細菌量は、シプロフロキサシン投与 1 日目から有意に低下していることがわかった (図 7A)。また、グラム陽性菌として *Clostridium sordelli* および *Bifidobacterium* spp.、グラム陰性菌として *Bacteroides fragilis* を調べたところ、いずれの菌においてもシプロフロキサシン投与 1 日目から有意に低下していることがわかった (図 7B-D)。以上のことから、抗菌薬により下痢が発症した際には、大腸 AQP3 の発現量が低下し、このとき腸内細菌量が著明に低下することが明らかとなった。

本結果は、腸内細菌が存在しない GF ラットにおいて、糞中水分量が増加し、大腸 AQP3 の発現量が低下するという結果と符合するものであり、シプロフロキサシン投与時の AQP3 の発現低下が、腸内細菌量の低下に起因する可能性が示された。加えて、腸内細菌が AQP3 の発現量を制御し、便の濃縮に影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。

#### 大腸 AQP3 の発現変化を引き起こす腸内細菌の探索

ここまでの結果から、腸内細菌叢の変化による下痢の発症に大腸 AQP3 の発現低下が関与している可能性が示された。しかしながら、どの菌種の腸内細菌が、どのようなメカニズムで AQP3 を制御しているかは全くわかっていない。そこで最後に、大腸 AQP3 の発現変動に最も強く影響を及ぼす腸内細菌を同定するに先立ち、抗菌ス

ペクトルの異なる種々の抗菌薬をラットに投与し、下痢の程度と大腸 AQP3 の発現変化について調べるとともに、腸内細菌叢の変動パターンを次世代シーケンサーにより解析した。具体的には、ラットにシプロフロキサシン、バンコマイシンあるいはクラリスロマイシンを 6 日間連続投与し、糞中水分量と大腸 AQP3 の発現量を解析した。その結果、クラリスロマイシンを投与した場合には、糞中水分量および大腸 AQP3 のタンパク質発現量に有意な差は認められなかった。一方、シプロフロキサシンおよびバンコマイシンを投与した際には、糞中水分量が有意に増加し、この際、大腸 AQP3 のタンパク質発現量も有意に低下していることがわかった (図 8)。また、これらラットの糞便中の腸内細菌叢パターンを解析したところ、抗菌薬の種類により腸内細菌叢の変動パターンが大きく異なることがわかった (図 9)。これらのことから、抗菌スペクトルの異なる抗菌薬によって、下痢や大腸 AQP3 の発現変化の程度が異なることが明らかとなり、ある特定の菌種の腸内細菌が AQP3 の発現を調節しているものと考えられた。

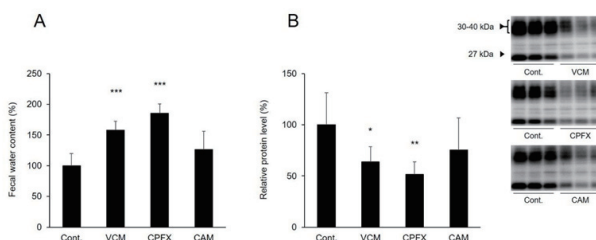


図8. 種々の抗菌薬をラットに処置した際の糞中水分量および大腸 AQP3 の発現変化

ラットにバンコマイシン 50 mg/kg、シプロフロキサシン 200 mg/kg およびクラリスロマイシン 100 mg/kg を 6 日間投与した際の排泄された糞便から、糞中水分量を測定した (A)。また、このときの大腸を摘出し、大腸 AQP3 のタンパク質発現量を解析した (B)。(平均値±標準偏差, n=6, Dunnett's test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. Cont.)

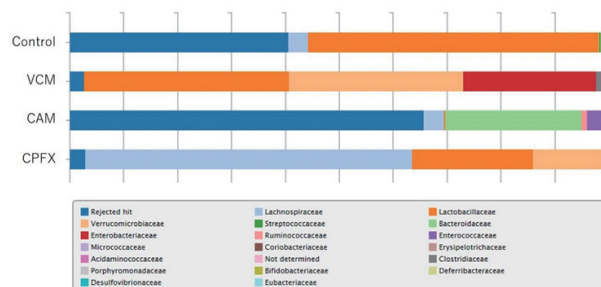


図9. ラットに種々の抗菌薬を処置した際の腸内細菌叢パターンの変化

ラットにバンコマイシン 50 mg/kg、シプロフロキサシン 200 mg/kg およびクラリスロマイシン 100 mg/kg を 6 日間投与した際の、腸内細菌叢パターンを次世代シーケンサーにより解析した。

## おわりに

本研究では、腸内細菌が大腸 AQP3 の発現に及ぼす影響について解析した。その結果、GF ラットでは SPF ラットと比べて、糞中水分量が高く、この際、大腸 AQP3 の発現量が低下することがわかった。また、抗菌薬を処置した AAD モデルラットにおいて、腸内細菌量が低下し、この際、下痢および大腸 AQP3 の発現低下が認められた。これらのことから、腸内細菌あるいはその代謝物が大腸 AQP3 の発現量を制御し、便の濃縮に影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。

近年、腸内細菌叢の異常が様々な疾患の発症・重症化に関与していることが示され、腸内環境を整えることが疾病治療の一つとして提唱され始めている。このような背景のなか、腸内環境を整える手段の一つとして、種々のプロバイオティクスが医療従事者ばかりではなく、一般消費者からも高い注目を集めている。プロバイオティクスは、腸内細菌叢のバランスを是正し、宿主に有益な作用をもたらす細菌の一種であり、ビオフェルミンやビオスリーなどの医薬品ばかりではなく、ヨーグルトやカルピスなどの嗜好品や健康食品としても多く上市されている。しかしながら、これらプロバイオティクスの健康効果については臨床研究により評価されているものの、プロバイオティクスがどのようにして腸内環境を整えるのか、そのメカニズム解析はいまだ十分なものではなく、プロバイオティクスの特徴や効力の違いなどについて明

らかにした基礎研究は少ない。今後、腸内細菌による大腸 AQP3 の発現制御メカニズムを詳細に解析することにより、AQP を一つのバイオマーカーとして、未だ解明されていないプロバイオティクスの有効性や特徴を科学的に明らかにできる可能性がある。本成果は、消費者個々の症状にあったプロバイオティクスを選択する、いわゆる『プロバイオティクスのオーダーメイド化』を実現するための基盤研究として、重要な情報であるものと考えている。

## 謝辞

本研究にあたり、平成 30 年度星薬科大学大谷記念研究奨励金を賜りました。大谷卓男理事長ならびに研究助成金運営委員会の委員長である田中隆治学長に深く感謝申し上げます。また、本研究は JSPS 科研費（研究活動スタート支援：16H07253）および公益財団法人ロッテ財団「ロッテ重光学術賞」の助成を受け遂行されました。本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導を賜りました星薬科大学生体分子薬理学研究室の亀井淳三教授に心より御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたり、ご指導・ご協力いただきました酒井寛泰准教授、五十嵐信智講師ならびに生体分子薬理学研究室の皆様へ感謝いたします。

## 【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

## 参考文献

- 1) King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 687-698 (2004).
- 2) Iacovetta C, Rudloff E, Kirby R. The role of aquaporin 4 in the brain. *Vet Clin Pathol.* **41**, 32-44 (2012).
- 3) Yang B, Zhao D, Qian L, Verkman AS. Mouse model of inducible nephrogenic diabetes insipidus produced by floxed aquaporin-2 gene deletion. *Am J Physiol Renal Physiol.* **291**, F465-472 (2006).
- 4) Kwon TH, Frokiaer J, Nielsen S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. *Kidney Res Clin Pract.* **32**, 96-102 (2013).
- 5) Flamenco P, Galizia L, Rivaola V, Fernandez J, Ford P, Capurro C. Role of AQP2 during apoptosis in cortical collecting duct cells. *Biol. Cell.*, **101**, 237-250 (2009).
- 6) Verkman AS. Dissecting the roles of aquaporins in renal pathophysiology using transgenic mice. *Semin. Nephrol.*, **28**, 217-226 (2008).
- 7) Ikarashi N, Baba K, Ushiki T, Kon R, Mimura A, Toda T, Ishii M, Ochiai W, Sugiyama K. The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **301**, G887-895 (2011).
- 8) Ikarashi N, Ushiki T, Mochizuki T, Toda T, Kudo T, Baba K, Ishii M, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 238-242 (2011).
- 9) Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 1303-1313 (1999).
- 10) Kon R, Ikarashi N, Nagoya C, Takayama T, Kusunoki Y, Ishii M, Ueda H, Ochiai W, Machida Y, Sugita K, Sugiyama K. Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract. *J. Ethnopharmacol.*, **152**, 190-200 (2014).
- 11) Kon R, Ikarashi N, Hayakawa A, Haga Y, Fueki A, Kusunoki Y, Tajima M, Ochiai W, Machida Y, Sugiyama K. Morphine-Induced Constipation Develops With Increased Aquaporin-3 Expression in the Colon via Increased Serotonin Secretion. *Toxicol. Sci.*, **145**, 337-347 (2015).

- 12) Ikarashi N, Kon R, Sugiyama K. Aquaporins in the Colon as a New Therapeutic Target in Diarrhea and Constipation. *Int J Mol Sci.* **17**, (2016).
- 13) Wise SK, Lin SY, Toskala E, Orlandi RR, Akdis CA, Alt JA, Azar A, Baroody FM, Bachert C, Canonica GW, Chacko T, Cingi C, Ciprandi G, Corey J, Cox LS, Creticos PS, Custovic A, Damask C, DeConde A, DelGaudio JM, Ebert CS, Eloy JA, Flanagan CE, Fokkens WJ, Franzese C, Gosepath J, Halderman A, Hamilton RG, Hoffman HJ, Hohlfeld JM, Houser SM, Hwang PH, Incorvaia C, Jarvis D, Khalid AN, Kilpelainen M, Kingdom TT, Krouse H, Larenas-Linnemann D, Laury AM, Lee SE, Levy JM, Luong AU, Marple BF, McCoul ED, McMains KC, Melen E, Mims JW, Moscato G, Mullol J, Nelson HS, Patadia M, Pawankar R, Pfaar O, Platt MP, Reisacher W, Rondon C, Rudmik L, Ryan M, Sastre J, Schlosser RJ, Settipane RA, Sharma HP, Sheikh A, Smith TL, Tantilipikorn P, Tversky JR, Veling MC, Wang Y, Westman M, Wickman M, Zacharek M. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* **8**, 108-352 (2018).
- 14) Gerard P. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 147-162 (2016).
- 15) Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Makivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, Apajalahti J, Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology.* **133**, 24-33 (2007).
- 16) Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology.* **152**, 327-339 e324 (2017).
- 17) Zhu L, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Bard JE, Quigley EM, Baker SS. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol Genomics.* **46**, 679-686 (2014).
- 18) Silverman MA, Konnikova L, Gerber JS. Impact of Antibiotics on Necrotizing Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **46**, 61-76 (2017).

#### Functional analysis of colonic aquaporin via gut microbiota

Risako KON

*Department of Biomolecular Pharmacology, Hoshi University*

Aquaporins (AQP) are membrane proteins that transport water within the human body. In this study, I researched the relationship between colonic AQP3 and gut microbiota. I investigated the degree of diarrhea and AQP3 expression level in the colon using germ-free (GF) rat and specific pathogen-free (SPF) rat. As a result, the fecal water content increased in GF rat and the expression level of AQP3 was lower in GF rat than that in SPF rat. In antibiotics associated diarrhea model rat, AQP3 expression level in rat colon decreased with changes in gut microbiota. From these results, it was suggested that gut microbiota might regulate the AQP3 expression level and play an important role in regulation of stool consistency.