

上皮タイトジャンクション制御に立脚した 消化管保護食品の創製

鈴木卓弥

広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授

1. 緒言

外来異物に常に暴露されている消化管は、異物に対する寛容と排除応答の平衡バランスを維持し、その恒常性を守っている。換言すれば、消化管はその平衡バランスを乱すリスクを常に内包し、日常的なストレスや体調不良などによっても軽微な炎症を引き起こし、疾患の引き金になりうると考えられる。なかでも炎症性腸疾患は、消化管に原因不明の炎症をおこす慢性疾患の総称であり、近年、日本を含めた先進国において、その罹患者数は増加の一途をたどり、その予防法の開発は、医学的・社会的な課題の1つとなっている。

消化管の恒常性を守る最も重要な因子の1つは、異物の侵入を制限する消化管バリア機能である。消化管バリアが損傷すると、異物の侵入が容易となり、炎症を引き起こすリスクが増大する。これまでに我々は、消化管バリアの主要構造であるタイトジャンクション(TJ)を制御する食品成分の役割とその分子機構を探索してきた。なかでも、ポリフェノール類の一部がTJバリア機能を強く増強することを世界に先駆けて報告し、さらに、ケルセチンやナリンゲニンが炎症性腸疾患に予防的に作用することも見出した¹⁻³⁾。しかしながら、消化管バリアの損傷や炎症の回復におけるポリフェノールの役割は全く不明であり、具体的な臨床応用や機能性食品の創製を遅らせている要因となっている。

そこで本研究は、消化管のバリア損傷と炎症の回復におけるポリフェノールの役割を明らかにすることを目的とした。予備的な検討により、ケルセチンとナリンゲニンの作用を解析したところ、ナリンゲニンにより明確な作用が観察されたため、特にナリンゲニンとその配糖体ナリンギンに着目して研究を進めた。

2. 実験方法

2.1. 大腸炎マウスの回復におけるナリンゲニン類の役割の解析

Balb/Cマウス(7週齢、オス、 $n=6$)にデキストラン硫酸ナトリウム(DSS、2%)を6日間飲水させ、実験的大腸炎を発症させた。その後、すべてのマウスに蒸留水を与え、11日間の回復期間を設けた。回復期間中、マウスには通常食、ナリンゲニン添加食(0.3%)、ナリンギン添加食(アグリコン換算で0.3%)を与えた。またDSSを飲水させず、通常食を摂取させた正常対照群も設けた。試験期間中は、体重と大腸炎クリニカルスコア(下痢、血便の状態から算出)を記録した。試験期間終了後、大腸を採取し、大腸長、ウェスタンブロット法によるTJタンパク質発現量、定量PCR法によるサイトカイン発現量の解析を実施した。

2.2. 大腸炎マウスの組織培養法を用いたナリンゲニンによる回復作用の解析

Balb/Cマウス(7週齢、オス、 $n=6$)にDSS(2%)を6日間飲水させ、実験的大腸炎を発症させた。エーテル麻酔下にて大腸組織を摘出し、内容物を生理的食塩水で洗浄後、大腸をシート上に開いた。約5mm片の長さで細断し、24ウェルプレートにて37℃、5%二酸化炭素存在下で24時間培養した(ダルベッコ改変イーグル培地、10%牛胎児血清)。このとき培養液中に0、100、200 μ Mのナリンゲニンを添加した。ウェスタンブロット法によるTJタンパク質発現量、定量PCR法によるサイトカイン発現量の解析を実施した。

2.3. マウス大腸内のナリンゲニン代謝物の解析

Balb/Cマウス(7週齢、オス、 $n=6$)にDSS(2%)を6日間飲水させ、このときナリンゲニン添加食(0.3%)、ナリンギン添加食(アグリコン換算で0.3%)を与えた。また、DSSを飲水しない組み合わせも行っ

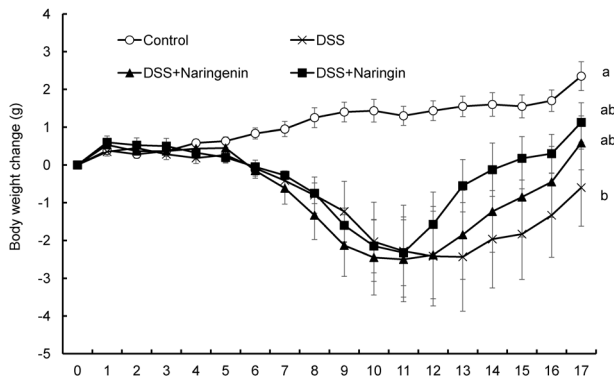


図1 大腸炎マウスの体重変化

Balb/Cマウスに2%DSSを0~6日目まで飲水させた後、7~17日目まで蒸留水を与えた。正常対照群には実験期間を通して蒸留水を与えた。0~6日目は、すべてマウスに基本飼料を与えた。7~17日目には、それぞれの試験食を与えた。体重を毎日測定し、0日目からの体重変化 (g) を示した。数値は、平均値±標準誤差で示した (同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$, Tukey-Kramer検定)。

た。大腸の内容物を採取し、ナリンゲニン、ナリンギン、その代謝物を超高速液体クロマトグラフィー質量分析 (UPLC/MS) にて解析した。解析した代謝物は、過去の報告を参考にしてEriodictyol、Phloroglucinol (PG)、4-hydroxyphenyl propionic acid (HPA)、3-phenylpropionic acid (PA)、4-hydroxybenzoic acid (HBA)、2,4,6-trihydroxybenzoic acid (TBA) とした。

2.4. マクロファージを用いたナリンゲニンおよび代謝物による TNF- α 産生抑制作用の解析

マウス由来マクロファージ RAW 264.7 細胞を用いた。24 ウェルプレートに細胞を播種し、2日間培養後に実験に用いた。炎症状態の誘導のため、LPS (10 ng/mL) により刺激し、刺激6時間後に培養上清を採取し、ELISA法により TNF- α 産生量を測定した。この LPS 刺激の1時間前にナリンゲニン、HPA (0, 50, 100 μ M) を培養液中に添加し、TNF- α 産生量への影響を評価した。

3. 結果

3.1. 大腸炎マウスの回復におけるナリンゲニンの役割の解析

DSS投与により、マウスの体重は減少したが、回復期間8日目から徐々に増加した (図1)。回復期間11日目 (最終日) において、ナリンギンとナリンゲニンを摂取した群の体重減少率は、DSS群に比べて高値傾向を示し

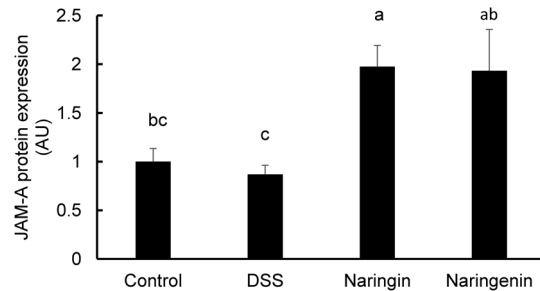
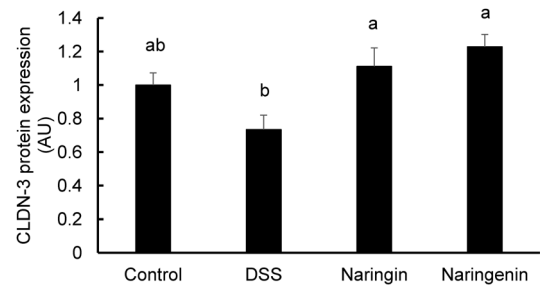


図2 大腸炎マウスの大腸組織タイトジャンクションタンパク質発現量

Balb/Cマウスに2%DSSを0~6日目まで飲水させた後、7~17日目まで蒸留水を与えた。正常対照群には実験期間を通して蒸留水を与えた。0~6日目は、すべてマウスに基本飼料を与えた。7~17日目には、それぞれの試験食を与えた。試験期間終了後に大腸を採取し、ウェスタンブロット法により、CLDN-3とJAM-Aの発現量を解析した。数値は、平均値±標準誤差で示した (同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$, Tukey-Kramer検定)。

た。大腸長は、DSS投与により有意に低値を示したが、ナリンゲニンとナリンギンの摂取によりDSS群に比べて高値傾向を示した。ウェスタンブロット法による TJ タンパク質発現解析では、DSS投与により、Claudin-3とJAM-Aが有意に低下したが、ナリンゲニンとナリンギンの摂取により高値また高値傾向を示した (図2)。DSS投与により、炎症性サイトカインのTNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-17Aが有意に高値または高値傾向を示したが、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6はナリンゲニンとナリンギンの摂取により低値傾向を示した (図3)。

3.2. 大腸炎マウスの組織培養法を用いたナリンゲニンによる回復作用の解析

大腸炎マウスの大腸組織を培養したところ、培養24時間後において、正常対照群に比べて、TNF- α 、IL-6が有意に高値を示し、TJタンパク質のZO-1、Occludin、JAM-A、Claudin-3は有意に低値を示した (図4)。培養液中へのナリンゲニンの添加は、TJタンパク質の発現量にはほとんど影響しなかったが、TNF- α の発現量を

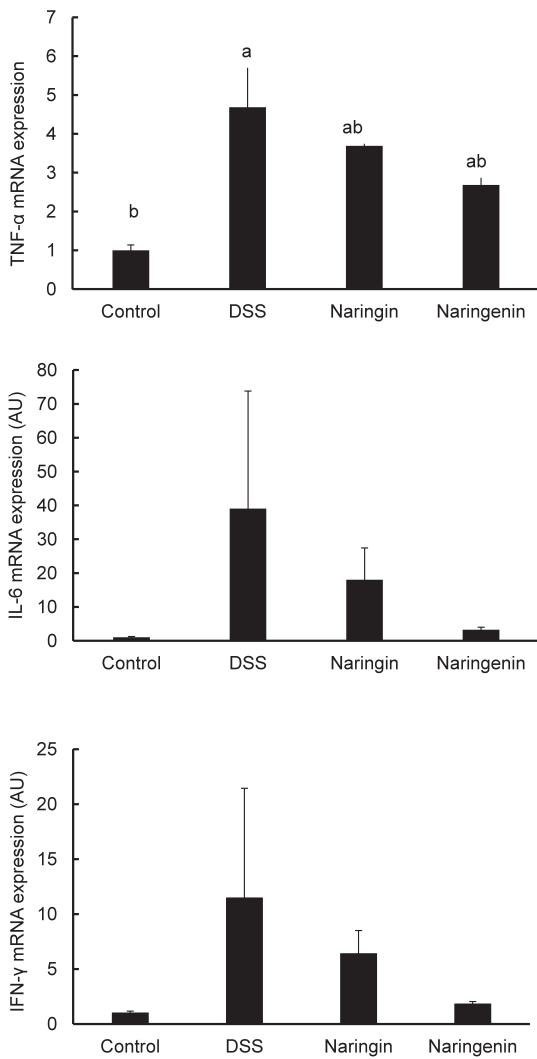


図3 大腸炎マウスの大腸組織サイトカイン発現量

Balb/Cマウスに2%DSSを0~6日目まで飲水させた後、7~17日目まで蒸留水を与えた。正常対照群には実験期間を通して蒸留水を与えた。0~6日目は、すべてマウスに基本飼料を与えた。7~17日目には、それぞれの試験食を与えた。試験期間終了後に大腸を採取し、定量PCR法により、TNF- α 、IL-6、IFN- γ の発現量を解析した。数値は、平均値±標準誤差で示した（同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$ 、Tukey-Kramer検定）。

減少させる傾向を示した。

3.3. マウス大腸内のナリンゲニン代謝物の解析

ナリンゲニンとナリンギンを摂取させたマウスの大腸内には、Eriodictyol以外のいずれの代謝物も検出されなかった。なかでもHPAはDSSの飲水に関わらず、高濃度に蓄積していた（300~1000 $\mu\text{mol/kg}$ 内容物、図5）。

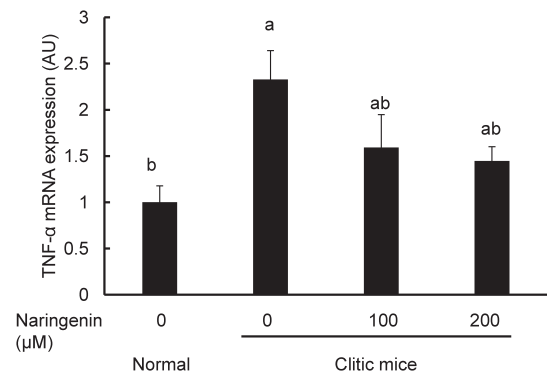


図4 培養したマウス大腸組織のサイトカイン発現量

Balb/Cマウスに2%DSSを6日間飲水させた後、大腸組織を採取した。組織片をナリンゲニン（0、100、200 μM ）を含む培養液で培養後、定量PCR法によりTNF- α 遺伝子発現量を解析した。数値は、平均値±標準誤差で示した（同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$ 、Tukey-Kramer検定）。

3.4. マクロファージを用いたナリンゲニンおよび代謝物によるTNF- α 産生抑制作用の解析

Raw264.7細胞へのLPS刺激は、TNF- α 産生量を約500倍程度上昇させた。HPA添加は、このTNF- α 上昇にほとんど影響しなかったが、ナリンゲニンは約3割程度減少させた（図6）。

4. 考 察

本研究では、ナリンゲニンとナリンギンは、大腸炎によって損傷した上皮TJバリア、上昇したサイトカインを正常状態に戻すことを促進することにより、大腸炎の回復を早めたことが提案された。しかしながら、大腸炎マウスの組織培養法においては、TJタンパク質へのナリンゲニンの作用はほとんど認められず、TNF- α のみが抑制された。これは、培養時間が24時間であり、摂食試験に比べると短時間であったことが原因の1つと考えられるが、ナリンゲニンとナリンギンがより速やかにTNF- α 抑制作用を発揮することも示唆された。一方で、摂食されたナリンゲニンやナリンギンは、腸内細菌による代謝を受け、種々の代謝物に変換されることが知られている。マウスの大腸内にHPAが高濃度で検出されたため、Raw264.7細胞において、ナリンゲニンとHPAの影響も解析したところ、ナリンゲニンはLSPによるTNF- α 産生を抑制したが、HPAには作用が認められなかった。新たな消化管保護食品の創成および臨床応用のためには、今後ヒトにおける効果の検証が必要である。

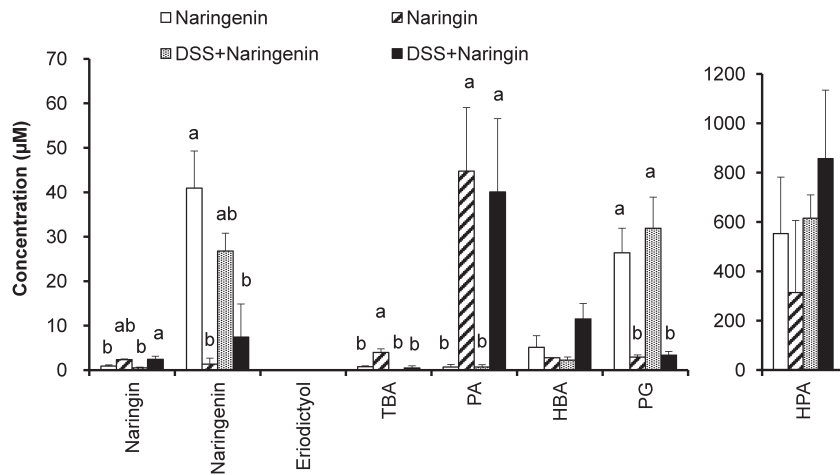


図5 マウス大腸内容物中のナリンゲニンおよび代謝物の濃度

Balb/Cマウスに2%DSSを6日間飲水させた後、大腸内容物組織を採取した。マウスには、ナリンゲニンあるいはナリンギンを含む飼料を与えた。大腸内容物中のナリンゲニン、その代謝物を超高速液体クロマトグラフィー質量分析計により解析した。数値は、平均値±標準誤差で示した（同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$ 、Tukey-Kramer検定）。

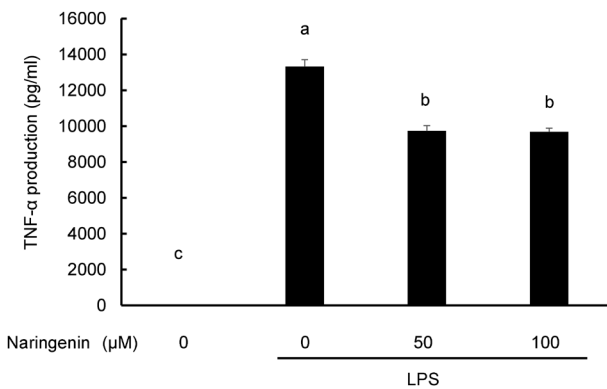


図6 マウスマクロファージRaw264.7細胞のTNF- α 産生量

Raw264.7細胞をLPS (10 ng/mL) で刺激したのち、6時間後に培養上清を採取し、ELISA法にてTNF- α 産生量を測定した。LPS刺激の1時間前に、培地中にナリンゲニン (0、50、100 μ M) を添加した。数値は、平均値±標準誤差で示した（同一のアルファベットを共有しない群間に有意差あり、 $p < 0.05$ 、Tukey-Kramer検定）。

5. 要 約

本研究は、大腸炎時の上皮バリア損傷と炎症の回復におけるナリンゲニン類の役割を探索することを目的とした。大腸炎マウスの回復期にナリンゲニン、ナリンギンを摂取させたところ、体重と大腸長の回復が認められ、これらナリゲニン類は大腸炎の回復を早めることが示唆された。このときTJタンパク質のClaudin-3とJAM-Aの回復、TNF- α やIL-6の抑制も認められた。大腸炎マ

ウスの大腸組織培養では、ナリンゲニンはTJタンパク質よりもTNF- α 発現量をより明確に調節した。超高速液体クロマトグラフィー質量分析計により、マウス大腸内のナリンゲニン代謝物を解析したところ、ナリンゲニンそのものに加えて、HPAが腸内に多く蓄積することが示された。マウスマクロファージRaw264.7細胞をLPS刺激した炎症モデルでは、HPAはほとんど影響がなかったが、ナリンゲニンが明確にTNF- α 産生を抑制した。以上の結果から、ナリンゲニン類は大腸炎の回復に一定の役割を持ち、その作用機序は上皮TJバリア損傷の回復とマクロファージなどの免疫細胞におけるTNF- α 産生抑制に関わることが提案された。また、TJバリアの回復に比べて、TNF- α 抑制作用はより短時間で発揮されることが示された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りました。同財団関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) S. Noda, et al.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 2019–2028, 2013.
- 2) S. Noda, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 4628–4633, 2012.
- 3) T. Azuma, et al.: *J. Nutr.*, **143**, 827–834, 2013.