

食品因子の腸管吸収とその機能性・安全性に関する分子栄養学的研究

薩 秀 夫

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教

はじめに

腸管は体の中にありながら外界と広く接している器官であることから“内なる外”とも呼ばれ、外界と生体内を隔てる場かつやりとりする場として極めて重要な働きをしている。特に食品の吸収の場である小腸はその長さがヒトでは約6 mとされており、その内壁には0.5-1.5 mm程度の絨毛が存在する。この絨毛の大部分は腸管上皮細胞に覆われており、腸管上皮細胞の大多数を占める吸収上皮細胞の管腔側表面にはさらに1 μm程度の微絨毛が存在している。したがって腸管内壁の表面積は200 mm²（テニスコート1面分）にも及ぶとされ、食品因子を効率的に吸収できる構造となっている¹⁾。この腸管の最前線に位置する腸管上皮細胞は、多様な生理機能を有することが知られている。すなわち、(1) 栄養素をはじめとする食品因子の吸収機能、(2) 食品中に混入する外来異物の侵入を防御するバリアー機能、(3) 食品因子などの外来刺激を受容して液性因子を分泌し生体内へシグナルを伝達するシグナル変換機能、などが中心的な機能として知られている（図1）。一方で腸管上皮細胞は食品因子に最も高頻度かつ高濃度に曝されることから、腸管上皮の各種機能が食品因子によって制御・調

節されることは十分に起こりうると考えられる。

そこで本研究では、食品因子の腸管上皮吸収機構および腸管上皮細胞機能に対する生理作用について、主にヒト腸管上皮モデル細胞を用いて分子・細胞レベルで解析を進めた。また食品中に混入する外来異物が腸管上皮細胞機能に及ぼす影響についても検討した。

腸管上皮細胞における食品因子の吸収・透過機構解析

食品因子の腸管上皮吸収経路は、主として次の4つに大別される。すなわち(1) トランスポーターを介した経路、(2) 細胞間隙を透過する細胞間経路、(3) トランスサイトーシスを介したエネルギー依存的細胞内輸送経路、(4) 細胞内単純拡散経路、となる²⁾。そこで腸管上皮モデル Caco-2 細胞を用いて、様々な機能性食品因子の腸管上皮吸収機構を解析することとした。その結果、β-アミノ酸の一種であるタウリンはNa⁺およびCl⁻共輸送型かつβ-アミノ酸特異的なタウリントランスポーター (TAUT; SLC6A6) によって腸管上皮細胞内に取り込まれることが明らかとなった。また TAUT についてはその発現制御についても検討を進め、細胞外

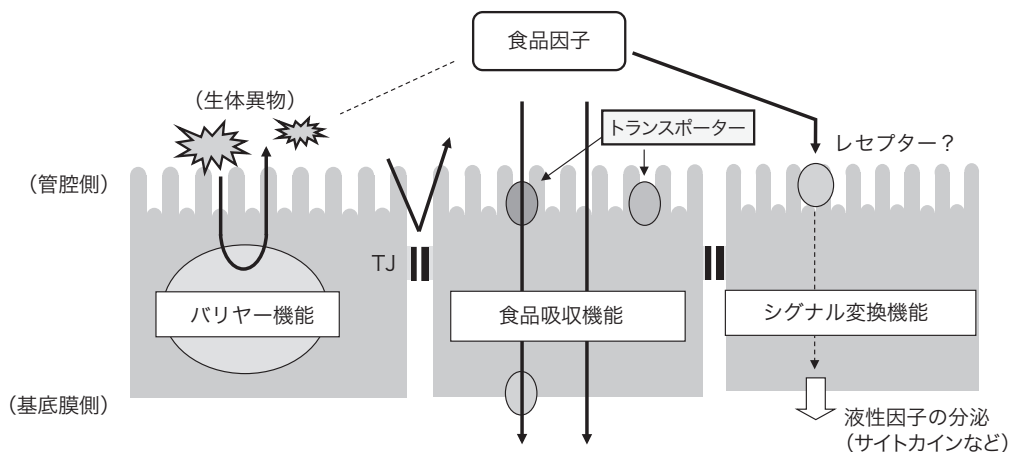


図1 腸管上皮細胞の主要な機能

タウリン濃度³⁾や高浸透圧条件^{4,5)}、さらに炎症性サイトカインであるTNF- α などによって制御されることを明らかにした^{6,7)}。

次に糖尿病の治療薬であり近年機能性食品の素材として注目されている α -リポ酸について検討したところ、 α -リポ酸はプロトン共輸送型の未だ同定されていない中鎖脂肪酸トランスポーターによって吸収されること、またその一部は腸管上皮細胞内にてグルタチオンレダクターゼによってより抗酸化能の強い還元型のデヒドロリポ酸へと変換されることが明らかとなった⁸⁾。またヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸は、いずれも低分子化することによってCaco-2細胞層の細胞間隙経路を介して透過することが見出された^{9,10)}。以上より、機能性食品因子は様々な透過経路を介して腸管上皮細胞にて吸収・透過されることが示された。

食品因子による腸管上皮トランスポーターの制御

次に腸管上皮トランスポーター活性を制御・調節する食品因子の解析を進めることとした。その結果、腸管上皮でのグルコース吸収を司る主要なトランスポーターであるSGLT1 (SLC5A1) 活性が緑茶抽出物によって阻害されることを見出し、その主要な阻害因子の一つがエピ

カテキングレート (ECg) であることを明らかにした¹¹⁾。さらに同じガレート基を有するエピガロカテキングレートも同様にSGLT1活性を阻害する一方で、カテキンやエピカテキンといったガレート基を有さないカテキン類は阻害活性を示さず、カテキン類によるSGLT1活性阻害にはガレート基が必要であることが示された (図2)。さらにECgは膜に結合するもののSGLT1の基質とはならず、SGLT1に対してアンタゴニスト様に作用することが示唆された。またタウリンの吸収に関わるTAUT活性を調節する食品因子を探索した結果、黒ゴマ抽出物中にTAUT活性を特異的に阻害する活性が見出され、その阻害因子の一つはリゾフォスファチジルコリンであることを明らかにした^{12,13)}。また疎水性異物を基質として管腔側に排出する異物排出トランスポーターであるMDR1 (P糖タンパク質とも呼ばれる) 活性を制御する食品因子を探索したところ、ニガウリの40%エタノール抽出物に強い阻害活性がみられ、阻害因子の一つが1-モノパルミチンであることを同定した¹⁴⁾。これより、腸管上皮トランスポーターは食品因子によってその活性が制御・調節を受けることが示唆された。

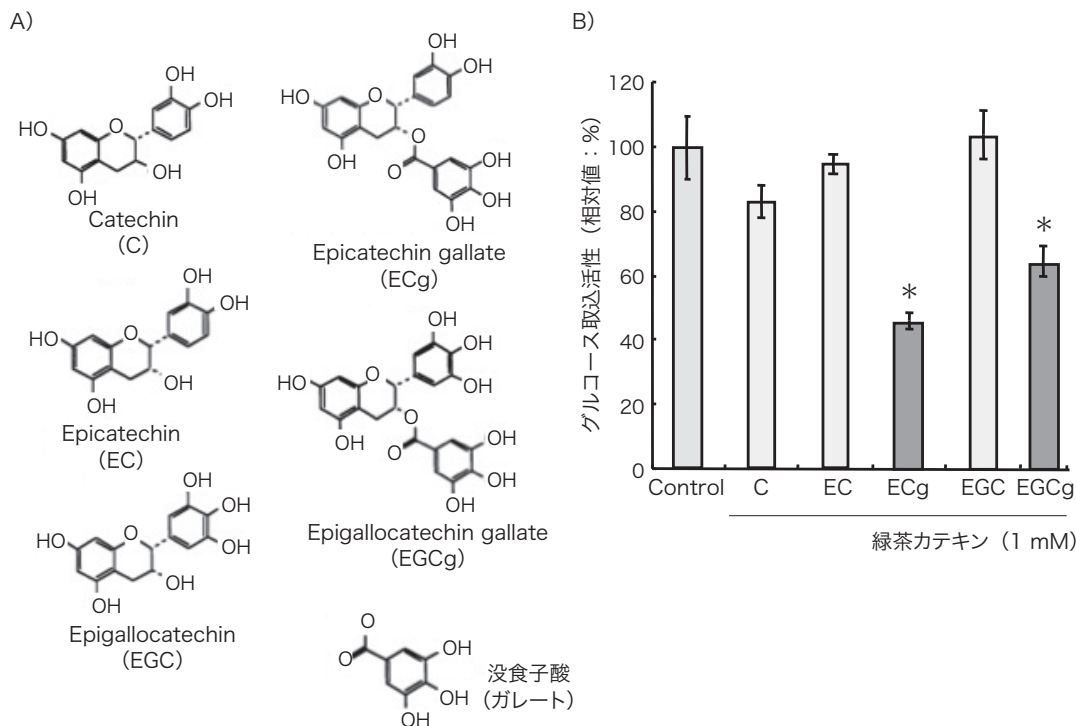


図2 緑茶カテキン類の構造 (A) およびウサギ小腸刷子縁膜小胞におけるSGLT1を介したグルコース取込活性に対するカテキン類の作用 (B)

腸炎症に対する食品因子の作用解析

近年消化管における疾患が増加しており、特に炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease; IBD）は患者数がかここ 20 年で数十倍に急増しており、今後もその増加が懸念されている。IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される原因不明の難病であるが腸管免疫系の破綻に起因するとされ、特に異常亢進したマクロファージが過剰な炎症性サイトカインを分泌し腸管上皮細胞層に傷害を引き起こすことが報告されている¹⁵⁾。そこで腸管上皮細胞と活性化マクロファージの共培養系を構築し、その相互作用を解析するとともに IBD を予防・改善する食品因子の探索評価系への応用を試みた。透過性膜上に培養した腸管上皮モデル Caco-2 細胞とプレート上に培養した活性化マクロファージモデル THP-1 細胞を同一容器内に培養し共培養を開始したところ、Caco-2 細胞は主として THP-1 が分泌する TNF- α によって細胞傷害を受け、アポトーシスとネクローシスの両方が誘導されていることが観察された（図 3）¹⁶⁾。またこの共培養系に IBD 治療薬である 5-アミノサリチル酸および抗 TNF- α 中和抗体（Infliximab）を添加したところ、いずれも Caco-2 細胞傷害を顕著に抑制した。そこで本共培養系を腸炎症の状態を一部反映した *in vitro* IBD モデル系として用いることとし、THP-1 による Caco-2 細胞傷害を抑制する食品因子の探索を行った。その結果カフェインおよびタウリンが Caco-2 細胞傷害を抑制することが見出された。そこでデキストラン硫酸ナトリウム（Dextran sulfate sodium; DSS）の自由飲水による大腸炎モデルマウスを用いてタウリンの作用を *in vivo* でも解析した結果、タウリンを前投与しておくことにより

DSS による腸炎症状が有意に軽減されることが見出された¹⁷⁾。本結果より大腸炎予防・改善作用というタウリンの新たな生理機能が見出されたとともに、本共培養系が腸炎症を予防・改善する食品因子探索評価系として有用であることが実証された。

並行して、腸管上皮細胞は酸化ストレスや炎症性サイトカインなどの炎症刺激によってインターロイキン 8（IL-8）などの液性因子を分泌し、分泌された IL-8 は好中球を腸管上皮細胞層下に誘因・活性化し、腸炎症状をさらに悪化させる（炎症ループと呼ばれる）ことが知られている。そこで Caco-2 細胞を H₂O₂ および TNF- α で共刺激した際の IL-8 分泌亢進を抑制する食品因子を探索・解析した。その結果、ポリフェノールの一種であるクロロゲン酸や大豆イソフラボン、乳由来ラクトペルオキシダーゼなど様々な食品因子によって IL-8 産生が有意に抑制された¹⁸⁻²¹⁾。特にクロロゲン酸については、DSS 誘導大腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* 解析でも有意な腸炎症改善作用が確認された。

食品因子による解毒排出系の制御

腸管上皮細胞では肝臓と同様に様々な解毒排出（薬物代謝）酵素が発現しており、食品中に混入する外来異物の解毒排出などに関与している。そこでこの異物の侵入に対するバリアー能を高めることを目的として、解毒排出酵素の発現・活性を亢進する食品因子の探索をおこなった。多くの解毒排出酵素の発現は核内受容体である pregnane X receptor（PXR）によって制御されることから、レポーターアッセイを用いて PXR を活性化させる食品因子の探索評価系を構築しスクリーニングを

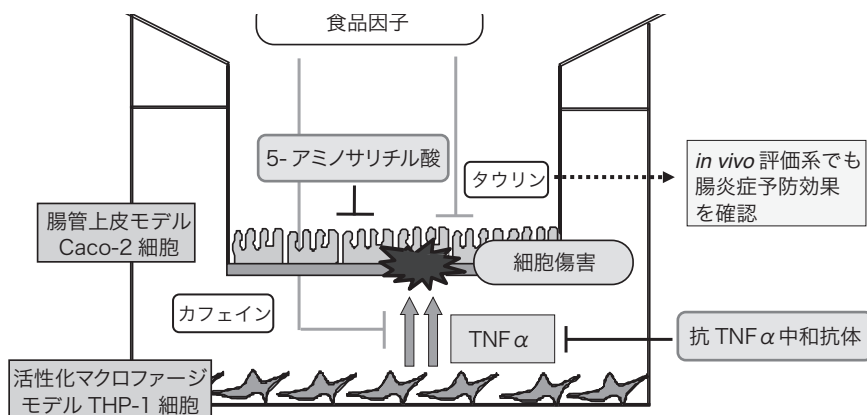


図 3 腸管上皮モデル Caco-2 細胞と活性化マクロファージモデル THP-1 細胞の共培養系を用いた *in vitro* 炎症性腸疾患（IBD）モデル系

おこなった。その結果、イチヨウ葉エキスに含まれるギンコライド A/B などが PXR 依存的な転写活性を亢進し、さらに MDR1 など PXR 標的遺伝子の発現および活性を亢進することが示された²²⁾。並行して、キノン類の代謝に関わる第二相解毒排出酵素である NAD (P) H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の発現を亢進する食品因子を探索したところ、アミノ酸の一種であるシステインが NQO1 の発現および活性を顕著に亢進することが見出され、その制御には転写因子 Nrf-2 が関与していることが明らかとなった (図 4)²³⁾。これより、ある種の食品因子は腸管上皮に発現する様々な転写因子を介して解毒排出酵素を活性化し外来異物の侵入に対する

バリアー機能を増強しうることが示唆された。

食品中に含まれる外来異物と腸管上皮細胞との相互作用

食品中には有用な食品因子だけでなく生体にとって有害な外来異物が混入しており、社会問題にもなった内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) などがその例として挙げられる。そこでこれら外来異物が腸管上皮細胞に及ぼす作用 (毒性発現) について解析することとした。

重金属の一種であり米などへの汚染が懸念されるカドミウムが腸管上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、IL-8 の mRNA 発現が有意に亢進することが見出された。そこでカドミウムによる IL-8 発現亢進を詳細に解

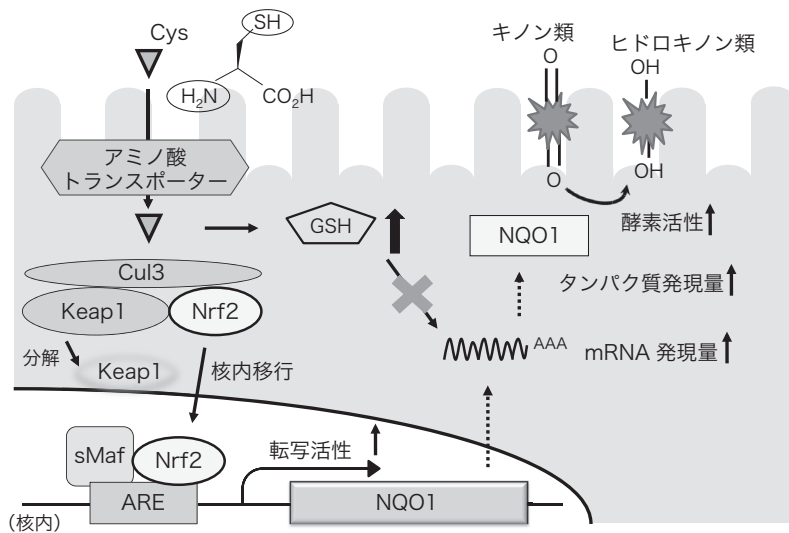


図 4 腸管上皮におけるシステインによる NQO1 発現亢進の推定メカニズム

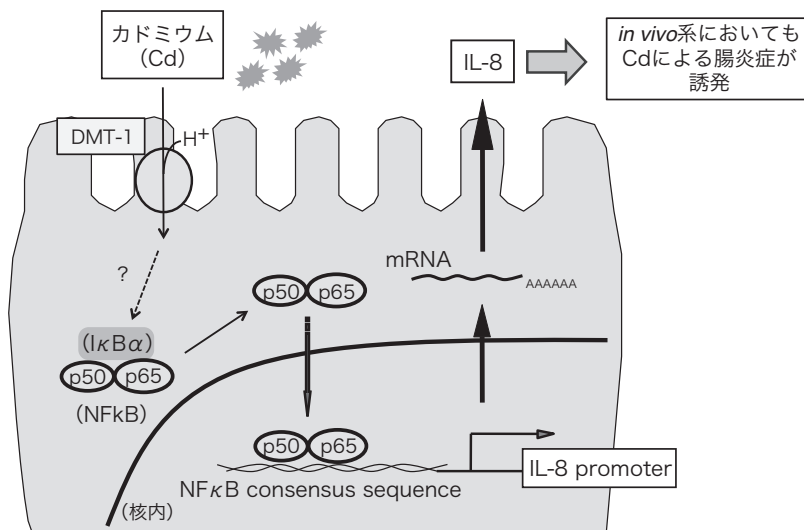


図 5 腸管上皮におけるカドミウムによる IL-8 発現亢進の推定メカニズム

析したところ、カドミウムは2価鉄のトランスポーターであるDMT-1によって細胞内に取り込まれた後炎症を誘導する転写因子NF κ Bを活性化することでIL-8を転写レベルで亢進することが示され、本現象は*in vivo*においても確認された^{24,25)}(図5)。また環境ホルモンとして知られるトリブチルスズ(TBT)について検討したところ、TBTは細胞内単純拡散で腸管上皮細胞層を透過する一方、タイトジャンクションの形成を抑制することで単層形成を阻害することが見出された²⁶⁾。さらに社会問題にもなったダイオキシン類に注目し、ダイオキシン類が転写因子AhRを活性化することで毒性を発現することを応用して、レポーターアッセイを用いてダイオキシン類によるAhR活性化を抑制するフィトケミカルの探索を行った。その結果、タンジェレチンなどある種のフラボノイドがダイオキシン類の毒性発現を抑制することを見出した²⁷⁾。一方でダイオキシン類は、Caco-2細胞のCYP1A1の発現・活性を亢進させることでガラングンのケンフェロールへの代謝を促進するなど腸管上皮におけるフラボノイドの代謝系を攪乱する現象も見出された²⁸⁾。以上より食品中に混入する一部の外来異物について、腸管上皮吸収機構および腸管上皮機能に対する毒性作用の一端を明らかにすることができた。

おわりに

以上本研究では、食品因子の腸管上皮細胞透過機構について分子・細胞レベルで解析するとともに、腸管上皮における細胞機能、すなわちトランスポーターを介した吸収機能、サイトカイン産生などを中心とする免疫機能、解毒排出系を介したバリアー機能、に対する食品因子の生理作用についてそれぞれ分子・細胞レベルでの新たな知見を得るに至った。また一部の外来異物について腸管上皮細胞への作用に関する新知見を得ることができた。今後さらに、食品因子とそれを受容・認識する生体側(腸管上皮細胞側)の分子との相互作用などを中心により詳細な分子レベルでの解析を進め、腸管における食品因子の生理作用に関する科学的エビデンスを深めることに貢献してゆきたい。

要 約

食品因子の腸管上皮吸収機構および腸管上皮細胞に対する作用を主に細胞レベルで解析した。食品因子はトランスポーターや細胞間隙経路など様々な経路を介して腸管上皮細胞にて吸収・透過すること、一方で腸管上皮ト

ランスポーター活性は他の食品因子によって制御されることを見出した。また腸管上皮モデル細胞と活性化マクロファージとの共培養系を構築し、抗腸炎症作用を有する食品因子の探索評価系への応用に成功した。並行して炎症悪化に関与するケモカインの腸管上皮からの分泌をある種の食品因子が抑制し、腸炎症を予防・改善することも示された。さらに外来異物の侵入を防御する解毒排出酵素の発現が多様な食品因子によって転写レベルで制御・亢進されることが明らかとなった。また食品中に混入する外来異物が腸管上皮機能に及ぼす影響についてもその一部を明らかにした。本研究より、腸管上皮細胞と食品因子の相互作用の一端を分子・細胞レベルで明らかにすることができたと考えられる。

謝 辞

この度は大変栄誉ある第一回三島海雲学術賞を授与されたことに対しまして、公益財団法人三島海雲記念財団の今関博理事長、上野川修一選考委員長をはじめ関係各位の諸先生方に心より感謝申し上げます。また本研究の一部は第46回(平成20年度)三島海雲記念財団学術助成によっておこなわれたものであり、研究助成金を賜りました三島海雲記念財団に重ねて感謝申し上げます。また本学術賞に御推薦頂きました日本栄養・食糧学会宮澤陽夫会長に厚く御礼申し上げます。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食糧化学研究室で行われたものです。本研究を遂行するにあたり、終始御指導頂きました清水誠先生(東京大学教授)、本研究を開始するにあたって多大な御指導御助言を賜りました荒井綜一先生(東京農業大学客員教授)に深く感謝申し上げます。また食糧化学研究室にて学生時より御指導頂きましたスタッフの諸先生方、一緒に実験を進めてくれました大学院生・学部学生をはじめとする多くの研究室メンバーに深く感謝致します。またこれまで御指導並びに御協力を賜りました非常に多くの大学をはじめとする研究機関・企業の諸先生方と共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献・引用文献

- 1) 河原克雅、佐々木克典：人体の正常構造と機能 III 消化管(坂井建雄、河原克雅総編集)、日本医事新報社、2000。
- 2) 薩秀夫：機能性食品成分とトランスポーター in 栄養・食品機能とトランスポーター(竹谷豊、薩秀夫、伊藤美紀子、武田英二責任編集)、pp.247-264、建帛社、2011。

- 3) H. Satsu, et al, : *J. Biochem.*, 121, 1082-1087, 1997.
- 4) H. Satsu, et al, : *Biochim. Biophys. Acta*, 1419, 89-96, 1999.
- 5) H. Satsu, et al, : *FEBS Lett.*, 569, 123-128, 2004.
- 6) T. Mochizuki, et al, : *FEBS Lett.*, 517, 92-96, 2002.
- 7) T. Mochizuki, et al, : *FEBS Lett.*, 579, 3069-3074, 2005.
- 8) N. Takaishi, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5253-5259, 2007.
- 9) N. Hisada, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1111-1114, 2008.
- 10) M. Jin, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1243-1249, 2010.
- 11) Y. Kobayashi, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5618-5623, 2000.
- 12) K. Ishizuka, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1166-1172, 2000.
- 13) K. Ishizuka, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 730-736, 2002.
- 14) T. Konishi, et al, : *Br. J. Pharmacol.*, 143, 379-387, 2004.
- 15) 朝倉均、本間照、杉村一仁：Overview 炎症性腸疾患 . 日本メディカルセンター、2001.
- 16) H. Satsu, et al, : *Exp. Cell Res.*, 312, 3909-3919, 2006.
- 17) Z. Zhao, et al, : *Amino Acids*, 35, 217-224, 2008.
- 18) H.S. Shin, et al, : *Inflammation*, 34, 440-447, 2011.
- 19) Z. Zhao, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3863-3868, 2008.
- 20) H. Satsu, et al, : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 442-446, 2009.
- 21) A. Matsushita, et al, : *Int. Dairy J.*, 18, 932-938, 2008.
- 22) H. Satsu, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5366-5373, 2008.
- 23) H. Satsu, et al, : *Amino Acids*, in press.
- 24) J.S. Hyun, et al, : *Cytokine*, 37, 26-34, 2007.
- 25) Z. Zhao, et al, : *Toxicol. Lett.*, 164, 144-154, 2006.
- 26) M. Tsukazaki, et al, : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 991-997, 2004.
- 27) M. Hamada, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8891-8898, 2006.
- 28) M. Hamada, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 58: 8111-8118, 2010.