

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：15K18699

研究課題名(和文) Development and application of a cell based assay to assess the intestinal absorption of phytochemicals in the presence of mucus layer

研究課題名(英文) Development and application of a cell based assay to assess the intestinal absorption of phytochemicals in the presence of mucus layer

研究代表者

YONEKURA LINA (Yonekura, Lina)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：20741391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品中の機能性成分の機能性を評価するに当たって、機能性物質の吸収性を明らかにする必要があり、機能性食品の開発や認定には重要な情報である。実験動物を使用せず、より生理的に細胞培養系で機能性成分等の吸収評価するに当たって、小腸表面に存在する粘液層を再現出来る細胞モデルを確立し、カロテノイドをモデル物質として吸収評価を行い、その吸収に対する粘液層の影響を調べた。走査電子顕微鏡(SEM)、蛍光顕微鏡等でCaco-2/HT29-MTX混合膜の表面に粘液層が確認できた。粘液層存在下でカロテン吸収が抑制され、キャリアーとして使用した混合ミセルが大きいほどその吸収が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although Caco-2 cell-based permeation assays are used to predict the oral absorption of drugs and phytochemicals in humans, they lack an important feature of the human intestine: the mucus layer on the luminal surface. We have developed mucus-layered cell model using Caco-2 combined with the mucus-secreting HT29-MTX cell-line. We confirmed the presence of a mucus layer on top of Caco-2/HT29-MTX monolayers by scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. β -carotene uptake in the mucus-layered Caco-2/HT29-MTX model was clearly lower than in the standard model when β -carotene was carried by larger micelles, but not when carried by very small PC micelles, suggesting that the mucus layer inhibited β -carotene uptake by intestinal cells, probably by slowing the permeation of larger mixed micelles. The new mucus-layered model could also effectively detect the enhancement of β -carotene absorption by certain phospholipids.

研究分野：食品科学

キーワード：Caco-2 HT29-MTX permeability assay mucus layer carotenoids

1. 研究開始当初の背景

経口吸収実験の目的は、医薬品等の吸収の大小を判定し、吸収の機構を解明することにより、薬物の有用性を判断することにある。食品中の機能性成分に関して、どの成分がどの程度生体に取り込まれて機能性を発揮するのかを明らかにする必要があり、機能性食品の開発や認定には重要な情報である。

経口吸収実験にはラットなどの動物に経口投与し、血中濃度、体内蓄積量、尿中排泄量などを測定して吸収率を測定する方法が挙げられる。しかし、これらの実験法は倫理面の問題から容易に行うことができない。

細胞培養系で医薬品や機能性物質の吸収性を消化管由来 Caco-2 細胞を用いて評価するが、これでは本来の小腸表面に存在する粘液層を再現できない。粘液層形成に関わる杯細胞 HT29-MTX を Caco-2 細胞と混合培養することで、粘液層が存在する腸管細胞膜モデルを作成可能であるが、食品機能性成分の吸収性評価に応用されていない。

2. 研究の目的

粘液層が存在する状態と存在しない状態の腸管細胞膜モデルを作成して吸収評価を行い、粘液層が吸収にどのように関わるのかを考察する。また目的物質は小腸で吸収される際に粘液層の影響を受けやすい脂溶性物質として β -カロテンを用いた。粘液層が存在する小腸上皮粘膜を再現し、より生理的状態での食品機能性成分の吸収を評価モデルを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

Caco-2 細胞単独と Caco-2/HT29-MTX 8:2 比で多孔性メンブレン上又はマイクロプレートのウェル底面で3週間培養し使用した。

(1) 粘液層形成確認

酸性ムコ物質と結合する Alcian Blue と Nuclear fast red 核染色、Acridine orange 蛍光染色、および走査電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。

(2) 粘液層の有無によるカロテノイド吸収への影響 (図 1)

カロテノイドは、消化管内で分散され、胆汁酸、脂質の消化物及びリン脂質で形成される混合ミセルとして可溶化される。リン脂質についてはホスファチジルコリン (PC) とリゾホスファチジルコリン (LPC) の2種類を用い、PC、LPC をそれぞれ単独で加えたミセル、両方加えたミセル (LPC+PC)、リン脂質無添加ミセル (NPL) の4種類の混合ミセルを作製した。それぞれの溶液を多孔性メンブレン上とマイクロプレートで21日間培養された Caco-2 と Caco-2/HT29-MTX 混合膜で透過試験 (多孔性メンブレン) と取り込み試験 (マイクロウェル) を行った。 β カロテンの細胞内取り込み量と透過量を HPLC で定量を行った。

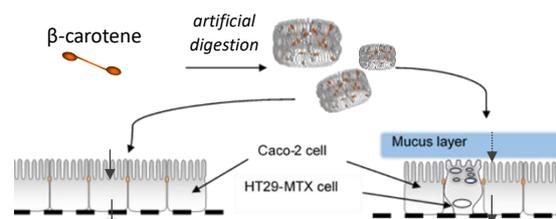


図 1. Diagram of the experimental protocols using Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell co-culture.

4. 研究成果

(1) 粘液層形成確認

Nuclear fast red により Caco-2 細胞単独培養と Caco-2/HT29-MTX 混合培養の両方でメンブレン上に単層膜を形成していることが確認できた。しかし、Alcian blue によって染色される粘液層は確認できなかった。消化管には多種類のムチンが存在するが、大きく分けて分泌型と膜結合型ムチンの2つに分類され、小腸に多い分泌型の Muc2 は細胞固定やパラフィン包埋などの過程で細胞表面から取り除かれた可能性が高い。

固定せずに染色可能な Acridine Orange を用いて Caco-2 と Caco-2/HT29-MTX 混合培養両方で緑蛍光染色された細胞核が見られた。さらに、Caco-2/HT29-MTX 混合培養の細胞では Caco-2 よりも赤く染色された箇所が見られ、これが粘液層だと考えられた。

走査電子顕微鏡 (SEM) による観察の結果、Caco-2 単独培養の場合は細胞表面に微絨毛のような凹凸が見られ、断面の写真からも同じく細胞の凹凸が見られた (図 2)。また、Caco-2/HT29-MTX 混合培養の細胞表面には Caco-2 単独培養時に見られなかったムチン顆粒が確認でき、更に断面の写真からも細胞表面を全体的に覆うようなものが確認できた (図 2)。これらの実験の結果から Caco-2/HT29-MTX 8:2 比で混合培養することで Caco-2 細胞単独培養の際には見られなかった粘液層を形成することが明確になった。

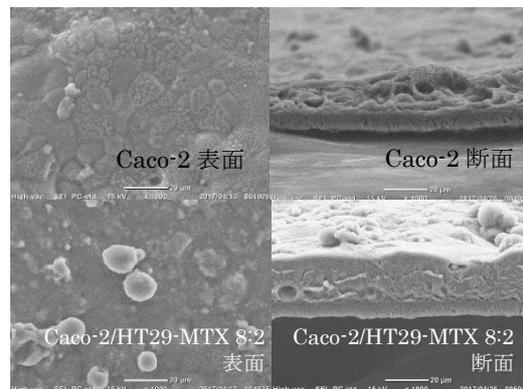


図 2. Scanning electron micrographs (SEM) of the top (left) and cross-sections (right) of Caco-2 and 8:2 Caco-2/HT29-MTX co-culture monolayers at 21d culture.

(2) 粘液層の有無によるカロテノイド吸収への影響

多孔性メンブレン上で培養された Caco-2

細胞で見られた LPC と PC+LPC による β カロテン取り込み促進効果は Caco-2/HT29-MTX 混合培養でも確認が出来た。透過性に関しても Caco-2 と Caco-2/HT29-MTX 混合培養両方に PC 及び LPC+PC による透過促進効果が見られた。医薬品の吸収促進剤として使用されるリン脂質の効果が粘液層存在下でも確認できたとは言え、細胞取り込みと透過性は Caco-2/HT29-MTX 混合培養の場合は全体的に高く (図 3)、粘液層の存在にも関わらず Caco-2/HT29-MTX の特徴であるタイトジャンクションの機能低下が主要な要因で β カロテン透過量が増えたと考えられる。

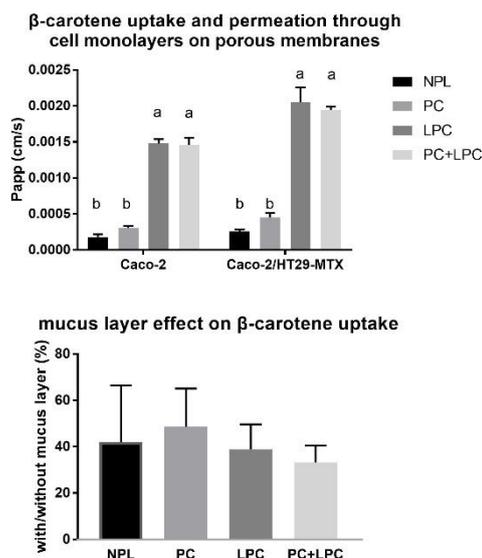


図 3. β -carotene uptake and permeation by Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX monolayers and the mucus layer effect on cells cultured on porous membranes.

そこで、タイトジャンクションの機能性の影響を少なくするため細胞間からの物質透過がない条件下として通常のプレート底面で培養した細胞で再び吸収評価を行った。粘液層存在下で β -カロテンの細胞への吸収量が減少するという結果を得ることができた。ミセルの種類別に結果を観察すると、粒径が最も小さい PC ミセルで可溶化された β カロテンは粘液層の有無に影響されず、Caco-2/HT29-MTX 混合培養の β カロテン取り込み量は Caco-2 と同様であった (図 4)。粒径が約 4 倍大きい PC と NPL ミセルの場合は Caco-2/HT29-MTX への β カロテン取り込み量の 40-60% 減少が見られた (図 4)。更に、上述したように LPC が β -カロテンの取り込みに関与していることが Caco-2/HT29-MTX 混合培養系で再確認できた。

これらの結果により、粘液層は上皮細胞の頂端膜を介した吸収を減少させる作用があることを確認できた。つまり、粘液層が β -カロテンミセルと細胞表面の間でバリアのような役割を果たし β -カロテンの吸収を減少させ、 β カロテンミセルが大きいほどその吸収が抑制されることが示唆された (図 5)。腸管細胞膜における吸収の増減につ

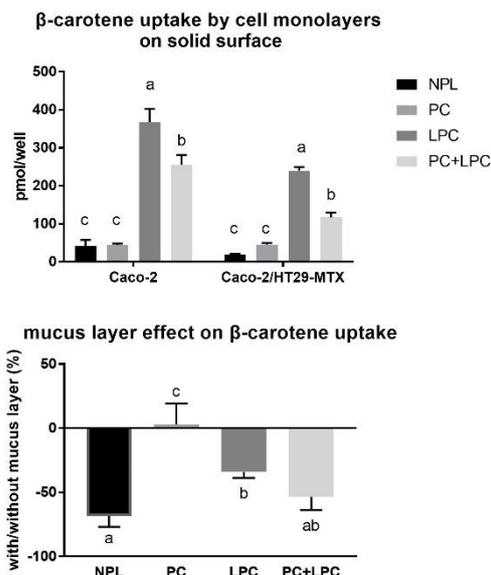


図 4. β -carotene uptake by Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX monolayers and the mucus layer effect on cells cultured on solid surface.

いて細胞間のタイトジャンクションの機能性も重要な要因になっており、LPC はタイトジャンクションの機能性を低下させることで β -カロテンの腸管細胞膜における吸収と透過を増大させることが示唆された。

ヒト小腸と同様のタイトジャンクションの機能性を持つ細胞単組膜に粘液層がある条件下で吸収評価モデルを確立し、より生理的に吸収評価に繋がる。しかし、Caco-2/HT29-MTX 混合培養で得られた粘液層の厚さは $1.34 \pm 0.09 \mu\text{m}$ でありヒト小腸の約 1/10 の薄さとなり、今後の課題として残されている。

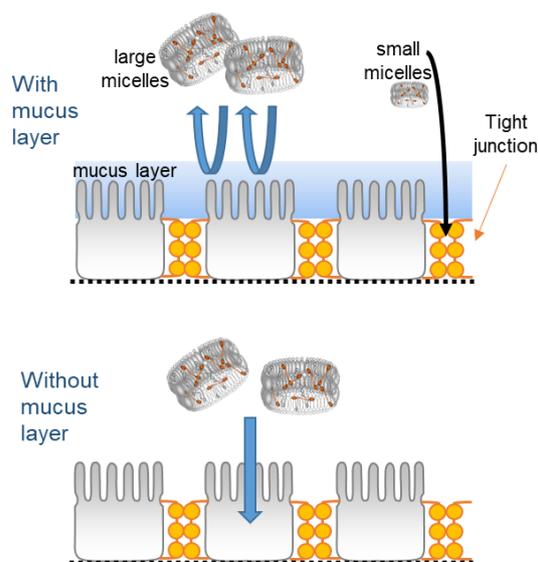


図 5. Image of the effect of mucus layer on β -carotene uptake by intestinal cell monolayers.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Soukoulis, C., Tsevdou, M., Andre, C. M., Cambier, S., Yonekura, L., Taoukis, P. S., & Hoffmann, L. (2017). Modulation of chemical stability and in vitro bioaccessibility of beta-carotene loaded in kappa-carrageenan oil-in-gel emulsions. Food Chemistry, 査読有, 220, 208-218.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.175>
- ② Soukoulis, C., Tsevdou, M., Yonekura, L., Cambier, S., Taoukis, P. S., & Hoffmann, L. (2017). Does kappa-carrageenan thermoreversible gelation affect β -carotene oxidative degradation and bioaccessibility in o/w emulsions? Carbohydrate Polymers, 査読有, 167, 259-269.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.007>

[学会発表] (計 1 件)

- ① 井手上奈央, 田中直孝, 米倉リナ, 松本由樹. Goblet cell population modulated by Schizosaccharomyces pombe particles. 2017 年度日本畜産学会第 123 回大会

[図書] (計 1 件)

- ① Yonekura, L., Marinho, H. A., Alencar, F. H., & Yuyama, L. K. O. (2016). Vitamina A (retinol) e carotenoides In S. M. F. Cozzolino (Ed.), Biodisponibilidade de Nutrientes (5a EDIÇÃO revisada e atualizada) (pp. 293-340). Barueri: Manole.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

YONEKURA LINA (YONEKURA, Lina)
香川大学・農学部・助教
研究者番号: 20741391

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

田村 啓敏 (TAMURA, Hirotooshi)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 00188442

合谷 祥一 (GOHTANI, Shoichi)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 00153742

松本 由樹 (MATSUMOTO, Yoshiki)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号: 90335844

(4) 研究協力者

難波 剛 (NAMBA, Go)
井手上 奈央 (IDEGAMI, Nao)