

令和元年6月18日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04920

研究課題名(和文)食物繊維摂取時のムチン分泌促進機序の全容解明と腸管バリア機能増強への応用

研究課題名(英文)Enhanced mucin secretory by dietary fibers and its application to maintain gut barrier functions

研究代表者

森田 達也(Morita, Tatsuya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食物繊維摂取による消化管ムチン分泌の修飾機序とこれが腸管恒常性に与える影響を明らかにすることを目的として、動物および培養細胞試験を行い以下の成果を得た。難消化性オリゴ糖の摂取は一過性に盲腸ムチン層の崩壊に伴い透過性が亢進し軽度な粘膜炎症を惹起する。消化管に分泌されたムチンは潤滑剤として機能することで糞便排泄を促進する可能性を見出した。小腸でのムチン分泌を促進する素材として新規にペクチン加水分解物を調製し、*in vitro*ではペクチンに比べ数十倍の活性を示すことを明らかにした。食物繊維の摂取により増加したムチンは短鎖脂肪酸に効率的に変換されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、代謝疾患を含む様々な疾患の発症およびその促進因子として消化管バリア機能の低下や腸内細菌叢との関連が挙げられている。本研究では、食物繊維摂取によって変動するムチンが消化管でどのような影響を及ぼすのかについて多面的に解析を行うことで公衆栄養的な食物繊維摂取の意義について再考するとともに、消化管ムチンの機能性について明らかにしようとした。食物繊維の摂取は、それ自身が腸内細菌の発酵基質となり腸管機能に影響を与えることに加え、ムチン分泌を修飾することで間接的にも影響を与える可能性を示した点に学術的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of enhanced mucin secretion by dietary fiber intake on intestinal homeostasis, especially the barrier function. The following results were obtained. (1) The intestinal permeability in rats fed indigestible oligosaccharides revealed that short term ingestion of indigestible oligosaccharides reduced gut permeability and destroyed the cecal mucin layer. But the changes was canceled by long-term ingestion. These temporal changes in rats fed indigestible oligosaccharides seems to be related to the fermentation pattern by intestinal bacteria. (2) We found that mucin secreted in the digestive tract may promote fecal excretion by functioning as a lubricant in rats fed phyllium. (3) Pectin hydrolyzates were newly prepared as a material to promote mucin secretion in the small intestine. *In vitro* studies revealed that pectin hydrolyzates have 10-100 times greater mucin secretory effects compared to pectin.

研究分野：栄養化学

キーワード：食物繊維

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管バリア機能の破綻は、粘膜免疫系の制御異常を引き起こし、炎症性腸疾患、食物アレルギー、経粘膜感染症など多種多様な疾患の発症や進展に関わることが指摘されている。腸上皮の杯細胞は、糖タンパクであるムチンを主成分とする粘液を産生・分泌する。この粘液は、腸上皮を覆って非特異的バリアの役割を果たすとともに、IgA の貯留層としても機能し、食事抗原や病原菌の侵入を妨げる。したがって、粘液量の変化と腸管バリアの健全性との間には密接な関係がある (Sheng et al. J Gastroenterol Hepatol, 2012)。

研究代表者は、これまで DF の小腸および大腸ムチン分泌促進作用について実験動物 (ラットおよびマウス) を用い、以下の知見を得ている。

・ DF の摂取は、小腸管腔内での嵩 (不溶性 DF) または粘性 (水溶性 DF) に比例して、腸上皮細胞の代謝回転と連動した杯細胞の増加をもたらすことで、小腸ムチン分泌量を増大させる。つまり基礎分泌を亢進する (Tanabe et al. J Nutr, 2005; Morita et al. J Nutr, 2006; Ito et al. J Nutr, 2009)。

・ ペクチンは、上記の法則性において例外的で、物性 (粘性) に関わらず、杯細胞数の変動とは無関係に小腸ムチン分泌量を増加させ、空腸 Muc2 発現量の顕著な上昇をもたらす。つまり制御性分泌を亢進する。このペクチンの作用は培養細胞 (HT-29MTX 杯細胞株) でも認められる (Hino et al. J Nutr, 2012; Hino et al. J Nutr, 2013)。

・ 大腸において DF は、腸内細菌の発酵産物である短鎖脂肪酸、特に酪酸を介して杯細胞数とは無関係にムチン分泌を促進する。従来、in situ 条件下 (結腸灌流実験) で報告されていた現象が、in vivo でも観察されることを見出した (Ito et al. J Food Sci, 2008)。

・ 研究代表者らは、上記の結果を受け、さらに効果的に大腸への酪酸送達を可能とする食品素材として酪酸エステル化レジスタントスターチ (RS) を完成し、大腸で酪酸を高濃度に制御することを可能とした (Furusawa et al., Nature, 2013)。

2. 研究の目的

DF の作用は多様性に富み、消化管内での物性を介した杯細胞増加 (基礎分泌の亢進) や腸上皮による化学受容 (制御性分泌の亢進) を介してムチン分泌を促進する。本研究では、動物および培養細胞実験により、DF の新たな栄養生理的意義として、「ムチン分泌量の増大を介し腸管向上性の維持に寄与する」ことを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

難消化性オリゴ糖の摂取が腸管透過性に与える影響の解析：発酵と盲腸ムチン層との関連性について

難消化性オリゴ糖として最も普及しているフラクトオリゴ糖 (FOS) をモデルとしてラットへの給餌試験を行った。飼育期間は1週または8週とし、飼育終了時に Cr-EDTA の尿中排泄を指標とした腸管透過性ならびに盲腸組織や内容物中の各種パラメータについて測定を行った。

物性の異なる食物繊維素材が糞便排泄量に与える影響：結腸ムチンとの関連性について
本邦において糞便排泄促進作用が報告されているサイリウム (PS)、小麦ふすま (WB) および FOS をモデル素材としてラットへの給餌試験を行った。また、便秘モデルとしてロペラミド投与ラットモデルを構築し、便秘時における効果についても解析を行った。飼育期間中は腸管内容物移動速度を測定するとともに糞便について各種分析を行った。また、解剖時には盲腸及び結腸を採取し、各種パラメータについて測定を行った。

小腸で分泌されたムチンが大腸腸内細菌叢およびその発酵パターンに与える影響の解析
回・直腸吻合ラットを作製し、このラットの糞便 (小腸通過物) からラットにおいて大腸へと流入するムチン量を推定した。続いて、通常のラットに大腸へと流入するムチン量が自身が分泌するものも含めて 2-3 倍となるように飼料中へ精製したブタ胃粘膜ムチンを添加し、このときの大腸腸内細菌叢およびその発酵パターンについて解析を行った。

小腸ムチン分泌促進作用を持つ新規食物素材の調製とその評価

ペクチンを酵素処理することによりペクチン加水分解物を得た。培養細胞で高いムチン分泌促進作用が認められたことから、大量調製を行い、ラットへの給餌試験を行った。

4. 研究成果

FOS 摂取初期(3,7日間)の盲腸 IgA 濃度は、対照に比べ 10~20 倍上昇したが、盲腸粘膜の IgA 形質細胞数と pIgR タンパク質の増加が認められたのは7日目で、3日目では pIgR タンパク質の増加のみ有意であった。サイトカイン発現量は、3日目で IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β が、7日目ではこれらに加え IL-10、12、17 の有意な上昇を示した。FOS 摂取7日目には、尿中 Cr-EDTA 排泄量の有意な増加、MLN への細菌透過の顕在化、盲腸組織 MPO 活性の有意な上昇が認められた。一方、FOS 摂取 56 日目の盲腸 IgA 濃度は対照と差がなく、FOS 摂取初期に認められた一連の応答はすべてキャンセルされた。明らかに、FOS 摂取初期の IgA 分泌促進作用には軽度な粘膜炎症が関与する。この粘膜炎症は、盲腸粘膜の密接結合関連タンパク質の変動や、盲腸内容物自由水が Caco2 細胞バリア機能に及ぼす影響の違いから説明することが出来なかった。一方、FOS 摂取7日目では、盲腸上皮組織と内容物を隔てる明確なムチン層が観察されないことが明らかになった(図1)。現在のところ、このムチン層の崩壊が上皮組織への細菌の接触頻度を高め、粘膜炎症を惹起すると考えている。

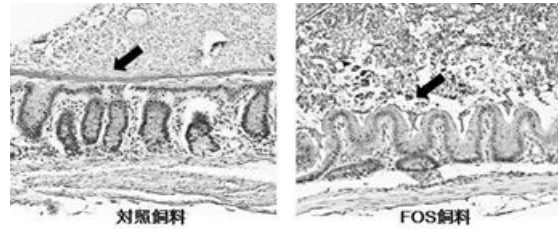


図1 FOS 摂取1週目におけるアルシアンブルー染色

試験1(通常ラット)；糞便の重量、個数、体積は対照に比べ PS, WB で有意に増加した。また、ムチン解析において、遠位結腸のムチン層、杯細胞数および Muc2 発現量に群間で差はなかったが、ムチン排泄量は対照に比べ PS, WB で有意に増加した。糞便の重量、個数、体積およびムチン排泄量は MRT と有意な相関を示し、最も強い相関は糞便体積で得られた(図2)。盲腸内容物の短鎖脂肪酸量は対照に比べ PS, FOS で、ビフィズス菌数は FOS でのみ有意に増加したが、MRT との関連性は認められなかった。乾燥糞便の抱水能(mL/g)は、対照(2.2)に比べ PS(8.5), WB(3.6)で有意に高く、FOS では対照と差がなかった。

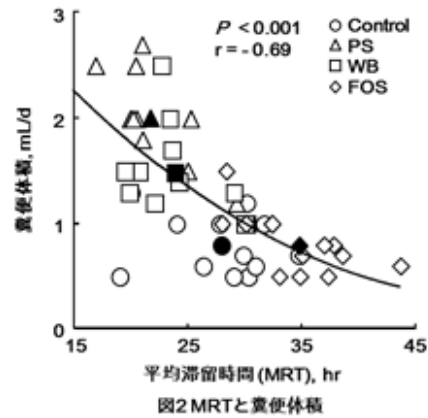


図2 MRTと糞便体積

試験2(便秘ラット)；図3に示すように、ロペラミド(LP)投与直後に糞便量は極端に減少するが、その後 LP 投与期間中でも徐々に回復する傾向を示した。LP 投与前(d12, 13, 14)とLP投与後の回復期(d16, 17, 18)の糞便量を比較すると、対照, FOS では回復率が40-50%であるのに対し、PS(90%)とWB(80%)では有意に高い回復率を示した。便秘ではムチン分泌が低下するとの報告がある。本試験でも LP 投与時、対照の結腸 Muc2 発現量は未処置群の50%にまで低下した。一方、強い嵩効果を持つ PS の Muc2 発現量は未処置群と同等であり、PS のムチン排泄量は LP 投与期間中でも投与前と同等であった。また、結腸粘膜組織におけるムチン層の厚みは PS 群で他の群に比べ薄い傾向を示した。現在のところ、PS 摂取によりムチン分泌が維持されることで、そのムチンが潤滑剤として機能し、PS 群では便秘モデルにおいても排便が維持されるのではないかと考えている。

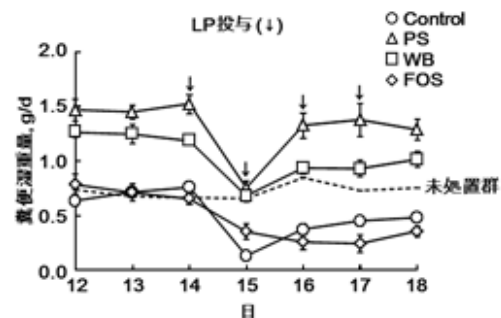


図3 LP投与前後の糞便重量

消化管部位別のムチン分泌量：ラットの全消化管で分泌されるムチンは 136 mg/日、小腸で分泌されるムチン量は 106 mg/日であることから、大腸で分泌されたムチンは 30 mg/日であると推定された。加えて、通常ラットの糞中ムチン量が 56 mg/日であったことから、大腸では1日当り 80 mg (136 - 56) のムチンが腸内細菌に資化されると推定された。ムチンの in vivo 資化性：上記の結果を踏まえ、ラット盲腸へのムチン供給量が通常の2倍(0.6% PM)または3倍(1.2% PM)となる飼料を与えたところ、対照群と比べ 1.2% PM 群では盲腸内容物中 SCFA 量が 1.4 倍、酢酸および n-酪酸量がそれぞれ 1.8 倍にまで有意に増加した。この時、新鮮便ムシナーゼ活性は飼育開始2日目で変わらず、12日目で有意に上昇した。また、有意差は認められなかったが、PM 添加飼料では総菌数も増加した。一連の応答は PM 添加量に比例していた。また、群間の盲腸ムチン量には差がなく、添加したムチンはすべて資化されたと考えられた。また、菌叢解析の結果酪酸産生菌である

Allobaculum や *Roseburia* 属細菌を増加させることが明らかとなった。以上の結果から、大腸内に流入したムチンは腸内細菌に資化され大腸上皮への SCFA 供給を行う endogenous fiber として機能する。宿主と腸内細菌との間にはムチンを介した相利共生関係が成立していると考えられた。

ペクチンを酵素処理・分画後、低分子化ペクチンを得た。得られた画分は酵素処理前のペクチンと比べ 30 倍強いムチン分泌促進作用を持つことをヒト杯細胞株 (HT-29MTX) で確認した。また、得られた画分は中性糖の比率がペクチンに比べ高く、ペクチン分子中の hairy region を主成分とすると考えられた。さらに、ペクチン加水分解物の *in vivo* での作用をラットで解析した。その結果、0-結合性糖鎖を指標としたムチン量は 1.5%加水分解物飼料摂取ラットにおいて対照ラットの 1.5 倍に増加した。一方、ムチン量を ELISA 法により測定した場合増加量は 1.3 倍であり優位な差には至らなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Tomomi, Genda, Takashi Kondo, Shunsaku Sugiura, Shingo Hino, Shu Shimamoto, Toshikazu Nakamura, Shizuka Ukita, Tatsuya Morita, Bacterial Fermentation of Water-Soluble Cellulose Acetate Raises Large-Bowel Acetate and Propionate and Decreases Plasma Cholesterol Concentrations in Rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66.45(2018), 11909-11916. 査読あり

Genda, T., Kondo, T., Hino, S., Sugiura, S., Nishimura, N., & Morita, T., The Impact of Fructo-Oligosaccharides on Gut Permeability and Inflammatory Responses in the Cecal Mucosa Quite Differs between Rats Fed Semi-Purified and Non-Purified Diets. *Journal of nutritional science and vitaminology* 64.5 (2018): 357-366. 査読あり

Kondo Takashi, Handa Kei, Genda Tomomi, Hino Shingo, Hamaguchi Norihisa, Morita Tatsuya Digestion-resistant dextrin derivatives are moderately digested in the small intestine and contribute more to energy production than predicted from large-bowel fermentation in rats., *The Journal of nutrition* 147.3 (2017): 330-336. 査読あり

Genda Tomomi, Sasaki Yuta, Kondo Takashi, Hino Shingo, Nishimura Naomichi, Tsukahara Takamitsu, Sonoyama Kei, Morita Tatsuya, Fructo-oligosaccharide-induced transient increases in cecal immunoglobulin A concentrations in rats are associated with mucosal inflammation in response to increased gut permeability., *The Journal of nutrition* 147.10 (2017): 1900-1908. 査読あり

Belobrajdic DP, Hino S, Kondo T, Jobling SA, Morell MK, Topping DL, Morita T, Bird AR. High wholegrain barley β -glucan lowers food intake but does not alter small intestinal macronutrient digestibility in ileorectostomised rats." *International journal of food sciences and nutrition* 67.6 (2016): 678-685. 査読あり

Firmansyah A, Chongviriyaphan N, Dillon DH, Khan NC, Morita T, Tontisirin K, Tuyen LD, Wang W, Bindels J, Deurenberg P, Ong S, Hautvast J, Meyer D, Vaughan EE, Fructans in the first 1000 days of life and beyond, and for pregnancy., *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 25.4 (2016): 652-675. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

石川愛梨, 宮田高明, 日野真吾, 森田達也, ムチン型糖タンパク質の摂取が大腸短鎖脂肪酸量および小腸ムチン糖鎖に及ぼす影響の解析, 日本栄養・食糧学会 中部支部大会, 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：日野 真吾
ローマ字氏名：HINO Shingo
所属研究機関名：静岡大学
部局名：農学部
職名：准教授
研究者番号(8桁): 70547025

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。