

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07737

研究課題名（和文）消化管バリア損傷・修復の分子基盤の解明と高齢化社会に対応した消化管保護食品の創製

研究課題名（英文）Regulation of intestinal barrier by food factors

研究代表者

鈴木 卓弥（suzuki, takuya）

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：30526695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：加齢による消化管のバリア損傷と修復の分子基盤を解明するとともに、タイトジャンクション（TJ）バリアを増強・保護しうる食品成分を見出すことを目的とした。老齢マウスの腸管において、TJ分子のClaudin-3と-7が低下し、腸管バリアが損傷していることが確認された。また、老化の要因として知られる酸化ストレスによる腸管バリア損傷を軽減する機能性素材として、ポリフェノールのケルセチンが見出され、その作用機序の一部が明らかとなった。さらに、加齢とともに罹患リスクが増大する慢性腎不全のモデルマウスは、腸管バリアの損傷と腸内細菌叢のディスバイオーシスを起こしたが、食物繊維の摂取はこれらの異常を軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管は外来異物の体内への侵入を防ぐバリア機能を持ち、その制御が崩れることは、炎症を基盤とした様々な疾病に繋がる。消化管バリアは加齢によっても脆弱化し、高齢者の疾病発症に深く関わる。その中で本研究は、加齢に伴う消化管バリア損傷の分子基盤の一部を明らかにし、さらにそれを軽減しうる食品素材を提案した。高齢化社会の進展が世界規模で問題とされるなか、加齢に伴う疾病を予防・軽減しうる高機能性食品の開発は、生産年齢人口の維持、持続的な経済成長の促進につながり、超高齢化社会を迎える現代において、社会的貢献度も極めて大きい。

研究成果の概要（英文）： The present study investigated the regulation of the intestinal barrier by aging and explored the food factors, which could reduce the aging-related barrier defect. The aged mice exhibited the reduction of tight junction (TJ) molecules such as claudin-3 and claudin-7, indicating barrier defect. The oxidative stress, which is associated with the age-related disorders, disrupted the intestinal TJ barrier, however, quercetin, one of the polyphenols, protected the TJ barrier against oxidants. A murine model of chronic kidney disease showed the impaired TJ barrier and microflora in the colon, however, supplemental feeding with dietary fibers reduced these abnormalities. Thus, polyphenols and dietary fibers may have potentials to prevent the age-related disorders.

研究分野：食品科学

キーワード：腸管バリア 食物繊維 タイトジャンクション 加齢 慢性腎不全

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

1. 研究開始当初の背景

消化管は消化・吸収の役割を担うのみならず、外来異物の体内への侵入を防ぐバリア機能を併せ持ち、その制御が崩れることは、侵入異物による炎症を基盤とした様々な疾病に繋がる。消化管バリアは、加齢によっても脆弱化し、それに続く全身性の慢性炎症状態は高齢者の健康状態に関連することが最近報告された (Physiological Reports, 2, 4, e00281, 2014)。しかし、その加齢変化の分子基盤については研究が始まったばかりで、さらにそれを食品成分で制御しようとする研究は皆無である。高齢化社会の進展が世界規模で問題とされるなか、高齢者の健康を増進する手段の開発は、健康寿命の延伸と日本の持続的経済成長のために、早急に対応すべき課題である。

消化管のバリアにおいて、上皮細胞間の異物の通過を制御するタイトジャンクション (TJ) 構造は、極めて重要な役割を持つ。ゆえに、消化管上皮の TJ バリアを増強あるいは保護できる食品成分は、加齢によって引き起こされる慢性炎症を軽減し、高齢者の健康増進に寄与しうると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、加齢による消化管のバリア損傷と修復の分子基盤を解明するとともに、消化管 TJ バリアを増強・保護しうる食品成分を見出すことを目的とした。また、加齢とともに罹患リスクが高くなる慢性腎不全にも着目し、高齢化社会の進展に対応する新たな消化管保護食品の創製を目指した。

3. 研究の方法

(1) 老齢マウスにおける消化管バリアの解析

若齢マウス (3 カ月齢) と老齢マウス (18 カ月齢) のマウスの小腸と結腸から上皮細胞を単離した。ウエスタンブロット法によりタイトジャンクション (TJ) タンパク質発現量を解析した。

(2) 酸化ストレスによる消化管バリア損傷を軽減する食品成分の探索

老化の要因として知られる酸化ストレスによる腸管バリア損傷に対するポリフェノールの役割を探索した。ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞に酸化ストレスを負荷し、上皮 TJ バリアを損傷した。このときポリフェノール類 (ケンフェロール、ケルセチンなど) を同時に作用させ、TJ バリアへの影響を探索した。

(3) 慢性腎不全とその消化管バリア損傷を軽減する食品成分の探索

加齢とともに罹患リスクが増大する慢性腎臓病における腸管バリア損傷に対する食物繊維摂取の影響を探索した。アデニン誘導性の慢性腎不全モデルマウスを用いた。慢性腎不全の誘導後、水溶性食物繊維を摂取させ、腎臓機能、消化管バリア、腸内細菌叢などの解析を実施した。

(4) 硫化水素による消化管バリア損傷の解析

慢性腎不全モデルマウスの腸内細菌叢のなかで、硫酸還元細菌である Desulfovibrionaceae 科の増加が認められた。硫酸還元細菌は、硫化水素を産生する細菌であるとともに、Desulfovibrionaceae 科は尿素をアンモニアに分解するウレアーゼを保有するため、硫化水素とアンモニアによる消化管上皮細胞への影響を探索した。消化管上皮 Caco-2 細胞に硫化水素ドナーあるいはアンモニアを作用させ、TJ バリアの解析を実施した。また硫化水素による作用を網羅的に解析するため、Caco-2 細胞から RNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 老齢マウスにおける消化管バリアの解析

消化管の TJ 分子のうち、ZO や Occludin、JAM-A には差が認められなかったが、いくつかの Claudin の発現量が老齢マウスで顕著に減少し、老化による腸管バリア機能低下の分子メカニズムの 1 つとして提案された。今後、加齢による消化管バリア損傷を軽減する実験モデルとして有用であることが考えられた。

(2) 酸化ストレスによる消化管バリア損傷を軽減する食品成分の探索

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞に酸化ストレスを負荷したところ、大きく TJ バリア機能の低下が認められた。このとき Occludin や ZO-1 などの TJ タンパク質の発現と局在の損傷も同時に認められた。一方で、ポリフェノールの 1 つのケルセチンを酸化ストレス負荷に先だって細胞に作用させておくと、これらの TJ バリア損傷がほぼ消失し、ケルセチンに酸化ストレスによる腸管 TJ バリア損傷を保護する役割が示された。さらに酸化ストレスとケルセチンによるバリア制御に関わる細胞内シグナルを探索したところ、酸化ストレスにより MEK-ERK 経路が大きく活性化され、その活性化はケルセチンにより減弱された。またケルセチンと構造が類似するポリ

フェノールであるケンフェロールには同様の作用が認められず、ケルセチンの構造特異的な作用であることが示された。これらの結果から、老化による腸管 TJ バリアの損傷メカニズムの一端が明らかになるとともに、それを予防的に制御しうるポリフェノールが提案された。

(3) 慢性腎不全とその消化管バリア損傷を軽減する食品成分の探索

慢性腎不全マウスは、血中 LPS 結合タンパク質濃度の上昇、結腸上皮の TJ 発現の低下を引き起こし、腎臓機能の障害とともに消化管バリアが損傷していた (図 1)。水溶性食物繊維のグァーガムとその部分加水分解物を摂取したマウスでは、これらバリア損傷が軽減していた。このとき慢性腎臓病マウスでは、糞中の短鎖脂肪酸の減少、アンモニアの増加が引き起こされていたが、食物繊維の摂取はこれら変化を正常化した。また、慢性腎臓病モデルマウスの腸内細菌叢を解析したところ、対象マウスに比べて *Akkermansia* 属の低下と *Desulfovibrionaceae* 科の増加が認められたが、食物繊維の摂取はこれらを正常化した。さらに、慢性腎不全マウスの糞中のアンモニアと硫化水素の濃度は、対照群に比べて高値を示したが、水溶性食物繊維の摂取はこれらを有意抑えた。これら結果から、水溶性の食物繊維の摂取は、消化管バリアの損傷と腸内細菌叢の異常を抑制することにより、慢性腎臓病を軽減することが示唆された。さらに慢性腎不全の消化管バリア損傷には、アンモニアや硫化水素の蓄積が関与している可能性が考えられた。

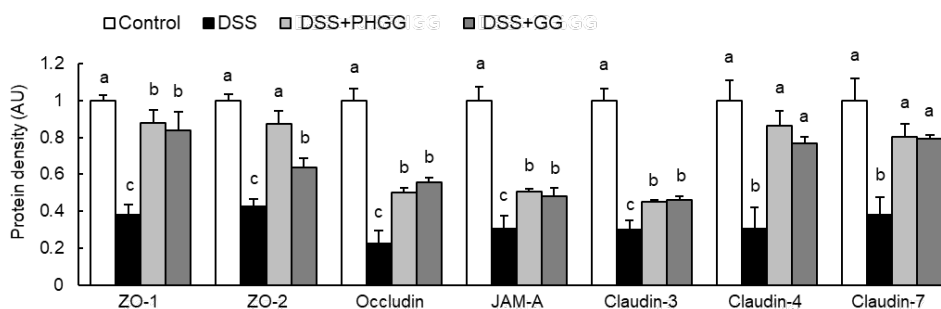


図 1. 慢性腎不全マウスの結腸上皮の TJ 分子の発現

(4) 硫化水素による消化管バリア損傷の解析

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞にアンモニアを作用させたところ、複数の TJ 分子の細胞膜からの脱落を誘導し、上皮バリアを損傷した。また、硫化水素ドナーを作用させた Caco-2 細胞では、TJ 分子のうち ZO-1 の発現が低下したが、上皮バリア損傷は軽微と考えられた。一方で、硫化水素ドナーは顕著に上皮細胞の増殖を抑制し、上皮の恒常性を損傷している可能性が考えられた。DNA マイクロアレイ解析の結果、硫化水素ドナーはいくつかのサイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼの低下が確認され、細胞周期の進行を遅延させていた。これらの結果により、慢性腎不全における消化管バリアの損傷には、*Desulfovibrionaceae* 科が産生する硫化水素やアンモニアが部分的にかかわること、食物繊維から産生される短鎖脂肪酸が保護的にはたらくことが示された。

研究期間全体を通じて、加齢や加齢とともにリスクが高まる慢性腎不全において、消化管バリア機能が損傷することが示されるとともに、食物繊維やポリフェノール類がそれらを軽減する食品素材であることが提案された。今後はさらなる分子機序の解明が必要である。

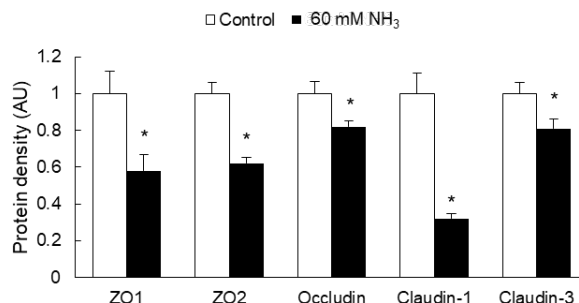


図 2. アンモニアによる消化管上皮 TJ 分子への影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21 件)

1. Kurose, Y., J. Minami, A. Sen, N. Iwabuchi, F. Abe, J. Xiao, and T. Suzuki. 2019. Bioactive factors

- secreted by Bifidobacterium breve B-3 enhance barrier function in human intestinal Caco-2 cells. *Benef Microbes* 10: 89-100. (査読あり)
2. Hung, T., J. Wanatanbe, Y. Yonejima, K. Hisa, Y. Yamamoto, and T. Suzuki. 2019. Exopolysaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* attenuate chronic kidney disease in mice by protecting the intestinal barrier. *Journal of Functional Foods* 52: 276 - 283. (査読あり)
 3. Kobayashi, K., Y. Yatsukawa, M. Tanaka, S. Tanabe, and T. Suzuki. 2019. Establishment of a method for determining the origin of glutamic acid in processed food based on carbon and nitrogen stable isotope ratios. *Heliyon* 5: e01169. (査読あり)
 4. Abdel-Hamid, M., E. Romeih, R. Gamba, E. Nagai, T. Suzuki, T. Koyanagi, and T. Enomoto. 2019. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal* 91: 1 - 8. (査読あり)
 5. Hung, T. V., and T. Suzuki. 2018. Dietary Fermentable Fibers Attenuate Chronic Kidney Disease in Mice by Protecting the Intestinal Barrier. *J Nutr* 148: 552-561. (査読あり)
 6. Kawabata, A., T. Van Hung, Y. Nagata, N. Fukuda, and T. Suzuki. 2018. Citrus kawachiensis Peel Powder Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice. *J Agric Food Chem* 66: 10991-10999. (査読あり)
 7. Kobayashi, K., M. Tanaka, S. Tanabe, Y. Yatsukawa, and T. Suzuki. 2018. Distinguishing glutamic acid in foodstuffs and monosodium glutamate used as seasoning by stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Heliyon* 4: e00800. (査読あり)
 8. Manda, B., H. Mir, R. Gangwar, A. S. Meena, S. Amin, P. K. Shukla, K. Dalal, T. Suzuki, and R. Rao. 2018. Phosphorylation hotspot in the C-terminal domain of occludin regulates the dynamics of epithelial junctional complexes. *J Cell Sci* 131. (査読あり)
 9. Mayangsari, Y., and T. Suzuki. 2018. Resveratrol Ameliorates Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice and Intestinal Cells. *J Agric Food Chem*. 66(48):12666-12674 (査読あり)
 10. Watanabe, N., T. Suzuki, Y. Yamazaki, K. Sugiyama, S. Koike, and M. Nishimukai. 2018. Supplemental feeding of phospholipid-enriched alkyl phospholipid from krill relieves spontaneous atopic dermatitis and strengthens skin intercellular lipid barriers in NC/Nga mice. *Biosci Biotechnol Biochem*: 1-11. (査読あり)
 11. Mayangsari, Y., and T. Suzuki. 2018. Resveratrol enhances intestinal barrier function by ameliorating barrier disruption in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Functional Foods* 51: 39 - 46. (査読あり)
 12. Hung, T. V., and T. Suzuki. 2018. Short-Chain Fatty Acids Suppress Inflammatory Reactions in Caco-2 Cells and Mouse Colons. *J Agric Food Chem* 66: 108-117. (査読あり)
 13. Yang, G., S. Bibi, M. Du, T. Suzuki, and M. J. Zhu. 2017. Regulation of the intestinal tight junction by natural polyphenols: A mechanistic perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57: 3830-3839. (査読あり)
 14. Ogata, M., T. Van Hung, H. Tari, T. Arakawa, and T. Suzuki. 2017. Dietary psyllium fiber increases intestinal heat shock protein 25 expression in mice. *Nutr Res* 39: 25-33. (査読あり)
 15. Ogata, M., T. Ogata, H. Tari, T. Arakawa, and T. Suzuki. 2017. Supplemental psyllium fibre regulates the intestinal barrier and inflammation in normal and colitic mice. *Br J Nutr* 118: 661-672. (査読あり)
 16. Van Hung, T., and T. Suzuki. 2017. Guar gum fiber increases suppressor of cytokine signaling-1 expression via toll-like receptor 2 and dectin-1 pathways, regulating inflammatory response in small intestinal epithelial cells. *Mol Nutr Food Res* 61. (査読あり)
 17. Kaikiri, H., J. Miyamoto, T. Kawakami, S. B. Park, N. Kitamura, S. Kishino, Y. Yonejima, K. Hisa, J. Watanabe, T. Ogata, J. Ogawa, S. Tanabe, and T. Suzuki. 2017. Supplemental feeding of a gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, alleviates spontaneous atopic dermatitis and modulates intestinal microbiota in NC/nga mice. *Int J Food Sci Nutr*: 1-11. (査読あり)
 18. Oyama, M., T. V. Hung, K. Yoda, F. He, and T. Suzuki. 2017. A novel whey tetrapeptide IPAV reduces interleukin-8 production induced by TNF- α in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods* 35: 376-383. (査読あり)
 19. Miyoshi, Y., S. Tanabe, and T. Suzuki. 2016. Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G105-116. (査読あり)
 20. Murakami, Y., S. Tanabe, and T. Suzuki. 2016. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *J Food Sci* 81: H216-222.
 21. Hung, T. V., and T. Suzuki. 2016. Dietary Fermentable Fiber Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice. *J Nutr* 146: 1970-1979. (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

1. 赤谷俊亮、山本祥也、鈴木卓弥、慢性腎臓病における腸管バリア損傷の作用機序の探索、日本農芸化学会 2019 年度東京大会、2019

2. 中野智裕、山本祥也、鈴木卓弥、乾癬モデルマウスは腸管のバリア損傷と炎症を引き起こす、日本農芸化学会 2019 年度東京大会、2019
3. 御手洗綾、山本祥也、鈴木卓弥、水溶性食物繊維グァーガムによる SOCS1 の上昇銘菓ニズムは、小腸と大腸で異なる、ハインドガットクラブジャパン、2019
4. 赤谷俊亮、山本祥也、鈴木卓弥、慢性腎臓病における腸管バリア損傷の作用機序の探索、ハインドガットクラブジャパン、2019
5. 井上友里、鈴木卓弥、ケルセチンは酸化ストレスによる腸管バリア損傷を抑制する、日本農芸化学会中四国支部大会、2018
6. 黒瀬友紀、南淳一、清水金忠、鈴木卓弥、Bifidobacterium breve の培養情勢は、Claudin-4 の発現誘導を介して腸管バリアを増強する、ハインドガットクラブジャパン、2017
7. 清水祐希、鈴木卓弥、プロポリスエタノール抽出物の摂取は、Th17 細胞分化を抑制して実験的大腸炎を軽減する、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017
8. 松尾樹、神戸大朋、鈴木卓弥、消化管上皮の亜鉛トランスポーターZIP5 の発現抑制解析と消化管バリア機能への役割、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017
9. Hung Tran Van, Takuya Suzuki, Feeding exopolysaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 reduces chronic kidney diseases through protection of intestinal tight junction barrier in mice、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017
10. 小方美幸、鈴木卓弥、サイリウムの摂取は Heat shock protein25 発現を誘導し、実験的大腸炎を軽減する、第 70 回日本栄養食糧学会、2016
11. 溝口菜美、鈴木卓弥、過酸化水素による消化管タイトジャンクションバリア損傷に対するケルセチンとケンフェロールの保護作用、第 70 回日本栄養食糧学会、2016
12. 三吉由香、鈴木卓弥、細胞内亜鉛による消化管上皮タイトジャンクション発現制御の分子機序の解析、第 70 回日本栄養食糧学会、2016
13. Yuka Miyoshi, Takuya Suzuki, Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via regulation of claudin-3 and occludin expression, United European Gastroenterology Week 2016, 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. 鈴木卓弥、建帛社、腸内細菌 宿主のクロストークと食事要因 第 3 章食物繊維による腸管タイトジャンクションバリアへの作用、P58-70、2019