

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：20104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11048

研究課題名(和文) 真の大腸粘液増大に貢献する難消化性糖質とその核心的な要因

研究課題名(英文) Indigestible carbohydrates which contribute to increasing true large bowel mucus and its a decisive factor.

研究代表者

田邊 宏基 (Tanabe, Hiroki)

名寄市立大学・保健福祉学部・講師

研究者番号：60573920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ビートファイバーの摂取はラット盲腸内ムチン量を有意に増加させた。盲腸内pHは低下せず、菌によるムチン分解活性も増加している状況で盲腸粘膜におけるMuc遺伝子発現量が増加していることから、ムチン分解抑制ではなく、ムチン合成量の増加によって粘液量を増加させていることが明らかになった。有機溶媒抽出により盲腸内で増加した7画分を得たが、いずれもムチン合成促進能を持たなかった。盲腸内で増加した菌はRuminococcus、Oscillospira、Lactobacillus、Bacteroidesであったが、いずれかの菌が直接的もしくは分泌される物質によって間接的にムチン合成を促進させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に潰瘍、糜爛を形成する原因不明の非特異性炎症疾患であり、クローン病とともに難病指定されている。O'Connellらは大腸粘液量の低下および質の変化と潰瘍性大腸炎発症との関係を示唆している。クローン病もJoossensらが同様の指摘をしている。これらの報告は大腸粘液を正常に分泌し続けることの重要性を示している。食物繊維は粘液分泌を促進するが、粘膜への物理的刺激や低pH刺激によるものが多く、腸管を傷めることなく粘液量を増大させる食物繊維はビートファイバーなどに限られている。本研究はこの機序を明らかにし、潰瘍性大腸炎およびクローン病の発症を低減させることに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rat cecal mucus was significantly increased in beet fiber intake. Muc gene expression in the cecal mucosa increased while the pH in the cecum did not decrease and the mucin degradation by the bacteria increased, indicating that the mucus volume was increased by increasing mucin synthesis rather than by suppressing mucin degradation. Organic solvent extraction yielded seven fractions that increased in the cecum, but none of them had the ability to promote mucin synthesis. The bacteria that increased in the cecum after ingestion of beet fiber were Ruminococcus, Oscillospira, Lactobacillus, and Bacteroides, and any of these bacteria may promote mucin synthesis directly or indirectly through substances secreted by the bacteria.

研究分野：栄養化学

キーワード：ビートファイバー ムチン 腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、大腸粘膜に潰瘍、糜爛を形成する原因不明の非特異性炎症疾患であり、クローン病とともに厚生労働省により難病指定されている。O'Connell のグループでは大腸粘液量の低下および質の変化と潰瘍性大腸炎発症との間に関連性があることを提案している (Earley et al. *PLOS ONE* 10: e0135280, 2015)。また、クローン病においても同様の指摘がある (Joossens et al. *Gut* 60: 631-637, 2011)。これらの報告は大腸粘液を正常に分泌し続けることの重要性を示している。

粘液の主成分はムチンと呼ばれ、糖鎖が O グリコシド結合でコアタンパク質に結合したタワシのような構造である。粘液の量はムチン合成量と比例し、粘液の質はムチンのコアタンパク質の種類や結合する糖鎖の種類に由来する。我々はこれまでにいくつかの難消化性糖質で大腸内のムチン量が増加することを明らかにしてきた (Tanabe et al. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1188-1194, 2006)。しかしながら、発酵しない難消化性糖質によるムチン分泌は傷害された上皮細胞のカウンターであることも明らかにした (Tanabe et al. *J Nutr.* 135: 2431-2437, 2005)。また、発酵性の難消化性糖質による大腸内ムチン量の増加は腸内に基質が流れ込んだ際の腸内細菌叢の移行期に起こる一過性のものであり、基質流入に慣れて腸内細菌叢が安定するとムチンは再び難消化性糖質投与前の量に戻るとの報告もある (Komura et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 78: 1592-1602, 2014)。しかしながら、我々は発酵性のビートファイバーがムチン分解酵素の活性とムチン合成酵素の遺伝子発現をともに上昇させ、大腸内ムチン量を増加している事実を確認している。潰瘍性大腸炎およびクローン病の発症を低減するためには、腸管を傷つけることなくムチンの合成量を増大させることが必須である。しかしながら、該当する難消化性糖質はビートファイバーしか発見できておらず、その要因も不明なため普遍化されていない。

### 2. 研究の目的

背景で記述したようなビートファイバーの有用性をもたらすメカニズムを明らかにすることは潰瘍性大腸炎およびクローン病の発症を低減させることに大きく貢献すると考えられる。ビートファイバーが他の食物繊維と異なる経路を介して作用すると予想すれば、腸内細菌を経由したメカニズムが考えられる。そこで本研究の目的は、「ビートファイバーを利用する腸内細菌から分泌される物質が大腸の粘液合成を促進する」という仮説を証明し、大腸の防御機能増強を意図してこの物質を積極的に制御できるようにすることである。

### 3. 研究の方法

6週齢のSD系雄性ラットを用い、対照食または5%ビートファイバー添加食で14日間飼育した。飲水は水道水を自由飲水させた。この間、飼料摂取量、体重の推移を記録した。最終日に安楽死させ、盲腸を摘出した。盲腸組織から盲腸壁の組織学的観察と上皮組織のムチン合成酵素遺伝子発現量を解析した。盲腸内容物は2つに分け、一方はCO<sub>2</sub>雰囲気下で希釈液を用いて1/10に希釈し、30 xgで2分間遠心分離した。上層に終濃度10%となるようにグリセリンを加え、総細菌叢サンプルとして-80°Cで保存した。他方は総細菌数をqPCR法で測定し、細菌叢構成パターンをメタ16S rRNA遺伝子解析により明らかにした。

5%ビートファイバー飼料を14日間摂取させたラットから盲腸内容物を回収し、等量の蒸留水で希釈し、37°Cで1時間インキュベートした。これに内容物と等量のヘキサンを加え37°Cで1時間インキュベートした。これを3度繰り返し、ヘキサン抽出画分を得た。続いて水層に内容物と等量の酢酸エチルを加え37°Cで1時間インキュベートした。これを3度繰り返し、酢酸エ

チル抽出画分を得た。続いて水層に内容物と等量のブタノールを加え 37 で 1 時間インキュベートした。これを 3 度繰り返し、ブタノール抽出画分を得た。残りの水層は 3000 xg で 30 分間遠心分離し、水抽出画分と残渣分けた。盲腸内容物の有機溶媒抽出画分を薄層クロマトグラフィーの 2 次元展開によって更に分画した。プレート担体にはシリカゲルを、1 次展開溶媒には酢酸エチル/メタノール/28%アンモニア水混液 (85:10:2) を、二次展開溶媒にはシクロヘキサン/トルエン/25%アンモニア水混液 (65:25:10) を用いた。スポットの検出は紫外線照射 (254 nm) ヨウ素蒸気およびニンヒドリン試薬 (60 ,5min) で順次処理した。

ヒト結腸上皮細胞株 HCoEpiC (1x10<sup>6</sup> cells/mL) を 24-well plate に播種し、5%CO<sub>2</sub> 下 37 で 48 時間培養した。その後先に分画した 7 つの盲腸内容物画分を 5μL 添加し、24 時間培養した。コラゲナーゼを用いて接着細胞を剥離し、RNA を抽出した。RT-PCR を用いて細胞内ムチン合成酵素 (*Muc2*、*Muc3*) 発現量測定して、これを上昇させる物質の特定を行った。

#### 4 . 研究成果

試験期間中の体重増加量および飼料摂取量は群間で有意な差がなかった。ビートファイバー群の盲腸組織重量および盲腸内容物重量は対照群にくらべ有意に増加した。他の発酵性食物繊維と同様にビートファイバーの摂取でも盲腸の肥大化が確認された。Table 1 には盲腸内ムチン量および盲腸粘膜における *Muc2* および *Muc3* 遺伝子発現量を示した。巨大な糖たんぱく質であるムチンのモル質量を求めることは困難であるため、ムチンのコアタンパク質と糖鎖の結合が他の糖タンパク質と異なり O-結合であることに着目して O-結合性糖鎖量を測定し、ムチン量とした。ビートファイバー群のムチン量は対照群にくらべ有意に増加した。*Muc2* 遺伝子発現量はビートファイバー群で C 群にくらべ有意に増加した。*Muc3* 遺伝子発現量もビートファイバーの摂取によって増加したが有意な差はなかった。

Table 1. Mucin, *Muc2* and 3 expression in rat cecum fed control or 5% beet fiber diet for 14 days.

|           | Mucin<br>(mmol/Cec.) | <i>Muc2</i><br>(expression level) | <i>Muc3</i><br>(expression level) |
|-----------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Control   | 1.147±0.173          | 1.000±0.242                       | 1.000±0.150                       |
| Beetfiber | 3.027±0.230*         | 1.675±0.843                       | 1.620±0.302*                      |

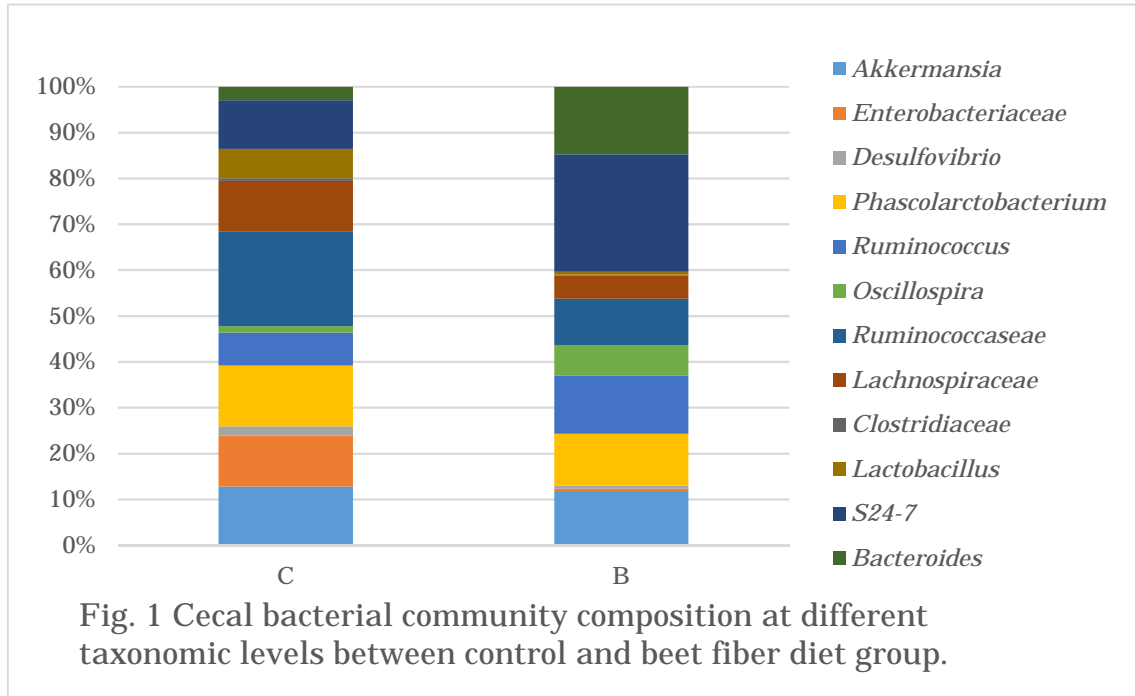
Parametric data were expressed as means ± SEM (n=8).

\*: P<0.05 vs control.

薄層クロマトグラフィーによる物質の単離作業を行った結果、7 つの主要なスポットを検出した。発酵によって産出され、大腸に有益な生理作用をもたらすと知られている短鎖脂肪酸でないことは確認した。

ヒト結腸上皮細胞株 HCoEpiC に盲腸内容物画分を添加し、ムチン合成促進能を評価した結果、いずれの盲腸内容物画分も HCoEpiC の *Muc2*、*Muc3* 発現量を増加させなかった。以上の結果から分画による効果の消失、もしくは菌の分泌物がムチン分泌を誘発させるのではなく、菌体との接触によって誘発される可能性が示唆された。そこで、盲腸内で増加した菌を確定するため、次世代シーケンサによって腸内細菌叢解析を行った。その結果、ビートファイバー群の *Ruminococcus* 属、*Oscillospira* 属、*Lactobacillus* 属、*Bacteroides* 属が対照群にくらべ有意に

増加した (Fig. 1)。いずれかの菌が、直接的もしくは分泌される物質によって間接的にムチン合成を促進させる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>田邊宏基, 嶋崎麻美, 小笠原広奈, 丸山洋介, 山本達朗              | 4. 巻<br>24          |
| 2. 論文標題<br>ビートファイバーの摂取は盲腸ムチンの合成と分解を促進させながらムチン量を増加させる | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>ルミナコイド研究                                   | 6. 最初と最後の頁<br>39-46 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難               | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田邊宏基, 嶋崎麻美, 丸山洋介, 山本達朗                 |
| 2. 発表標題<br>ビートファイバーは盲腸ムチンの合成と分解を促進させながらムチン量を増加させる |
| 3. 学会等名<br>第74回日本栄養・食糧学会大会                        |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北浦怜那, 山本達朗, 田邊宏基             |
| 2. 発表標題<br>発酵性食物繊維の投与によるラット盲腸内変化の経時的な追跡 |
| 3. 学会等名<br>日本栄養・食糧学会北海道支部会              |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田邊宏基, 北浦怜那, 丸山洋介, 山本達朗              |
| 2. 発表標題<br>資化速度の異なる難消化性糖質の投与によるラット盲腸内変化の経時的な追跡 |
| 3. 学会等名<br>日本栄養・食糧学会                           |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|