

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11068

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸の腸管への作用による生体防御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the biological defense mechanism of chondroitin sulfate on the intestinal tract

研究代表者

中村 敏也 (Nakamura, Toshiya)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00155847

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)：サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン標品からプロテオグリカンを精製し、これをマウスに経口投与して小腸内容物のプロテオグリカン消化産物の構造を調べたところ、プロテオグリカンのコアタンパク質は分解されたがコンドロイチン硫酸(ChS)糖鎖の糖鎖長や硫酸基は変化していなかった。次に、ヒト結腸癌由来細胞Caco-2による小腸および大腸モデルを培養系で確立し、これらへの市販ChSによる細胞応答を種々検討したところ、ChSが腫瘍壊死因子-1により誘導されるインターロイキン-6の遺伝子発現を抑制することが示された。このことは、プロテオグリカンの経口摂取により腸管の抗炎症効果が期待できる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸による腸管上皮細胞への直接影響について生体防御の観点からの研究はこれまでに報告がなく、同類の多糖鎖の機能としてはヒアルロン酸に続く新たな機能の発見となる。このプロテオグリカンの経口摂取による腸管の抗炎症効果の可能性が示唆されたことより、プロテオグリカンおよびコンドロイチン硫酸の食品への応用のしやすさ(水に溶けやすい、中性条件で熱に強い、無味無臭である、等)も相まって、幼児から高齢者に至る国民の健康維持への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We purified PG from a proteoglycan (PG) sample derived from salmon nasal cartilage and administered it orally to mice to investigate the structure of PG digestion products in the small intestinal contents. The results showed that the core protein of PG was degraded, but the chain length and sulfate groups of chondroitin sulfate (ChS) glycans were not changed. Next, we established small and large intestine models of human colon carcinoma-derived Caco-2 cells in a culture system, and examined the cellular response to commercial ChS in these models. The results showed that ChS suppressed the gene expression of interleukin-6 induced by tumor necrosis factor-1. This suggests that oral intake of PG may have an anti-inflammatory effect on the intestinal tract.

研究分野：生化学，多糖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 プロテオグリカン 経口投与 腸管上皮 IL6 機能性食品

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) プロテオグリカンは、生体内にくまなく分布する糖タンパク質の一種である。特に軟骨のプロテオグリカンは、そのタンパク質部分(コアタンパク質と呼ばれる)に100本前後のコンドロイチン硫酸(直鎖上多糖で硫酸基をおよそ二糖に1つの割合で有する)の結合した分子であり(下記<プロテオグリカンのイメージ図>), コラーゲンとともに軟骨組織の主要な構成成分であるため、近年、単体のコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸を超える有効成分として機能性食品にも用いられている。しかし、紫外線による皮膚の炎症抑制効果などの報告はあるものの、その消化管からの吸収の有無を含めた多くの主張の科学的検証は十分とは言えない現状にあり、これらを科学的に明らかにすることは、コマーシャリズムにかかわらない大学研究者の責務と思われる。



(2) 申請者らはプレリナリーにサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンをBALB/cマウスに投与し、小腸内容物から消化産物を抽出してその構造を調べたところ、コアタンパク質は消化されたことと推定されたのに対して、プロテオグリカンの糖鎖部分すなわち多糖であるコンドロイチン硫酸はまったく消化されていない可能性が示唆された。このことは、プロテオグリカンは消化吸収の実態さえ明らかでないまま利用され、何らかの有効性が示されてきたものの、実はその糖鎖部分(コンドロイチン硫酸)は消化管から吸収されている可能性が極めて低いことを意味するのかもしれない。

### 2. 研究の目的

(1) マウス小腸において、投与したプロテオグリカンの糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸の構造変化がないとすれば、これが吸収されずに腸管内に留まっている間に何らかの効果を及ぼしている可能性が極めて高いと考えられる。一方、コンドロイチン硫酸と構造的類似性を有するヒアルロン酸については、これが消化管上皮細胞の抗菌ペプチドを誘導することが最近報告された。そこで本研究では、プロテオグリカンおよび種々のコンドロイチン硫酸の腸管への直接的な作用を、生体防御の観点から解析することとした。

(2) プロテオグリカンを経口摂取したマウスの腸内フローラの変化についてはすでに報告されているが、上述したヒアルロン酸に見られるような腸管への直接作用の解析についてはこれまで報告がない。そこで本研究では、コンドロイチン硫酸が腸管に与える影響について生体防御の観点から明らかにする。高齢者が病原性大腸菌やサルモネラなどによる腸管感染症を発症しやすく重症化しやすいのは、腸管における抗菌ペプチドが加齢と共に減少することがその一因であると考えられており、プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸の摂取によりディフェンシン等の抗菌ペプチドの発現を誘導できれば、抵抗力の弱い幼児を含めた国民の健康保持に貢献できるからである。

### 3. 研究の方法

(1) プロテオグリカンの部分精製とマウスへの経口投与

サケ鼻軟骨由来のプロテオグリカン標品(サンスター社ヒアルコPG)を、DEAE-Sepharoseによるイオン交換クロマトグラフィ及びSepharose CL-2Bによるゲル濾過クロマトグラフィにかけ、部分精製したプロテオグリカン画分を得た。精製プロテオグリカンの1%溶液をゾンデ針を用いてBALB/cマウス(オス、6週齢)一匹につき0.2~0.3 ml(2~3 mg)を経口投与し、さらに1時間の絶食後に安楽死させ、回収した小腸内容物より7 M 尿素/50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5, プロテアーゼ阻害剤を含む)による可溶画分を得た。これに含まれるプロテオグリカン消

化産物を DEAE-Sephacel により回収し, Sepharose CL-4B によるゲル濾過で分子量の変化を検討した。また, プロテオグリカン糖鎖の硫酸基の脱落の有無を知るために, 小腸内容物由来ウロン酸陽性画分およびプロテオグリカンのアクチナーゼ消化産物をコンドロイチナーゼ ABC 消化して不飽和二糖に分解し, YMC-pack Polyamine カラムを用いたイオン交換 HPLC により比較検討した。

## (2) 培養系における小腸モデルと大腸モデルの構築

ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞を小腸上皮様細胞に分化させるため必要な培養期間を決定するため, 1, 2, 3 および 4 週間培養した。設定した期間の培養後, 細胞を回収し Lowry 法により総タンパク質を定量するとともに, 小腸上皮様細胞の分化度マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

## (3) コンドロイチン硫酸による細胞応答

小腸モデルと大腸モデルに対し, コンドロイチン 4 硫酸 (Ch4S) およびコンドロイチン 6 硫酸 (Ch6S) をそれぞれ 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で培地に加えて 1 時間培養し Total RNA を回収した。これらについて cDNA を作製し 抗菌ペプチドである  $\beta$ -Defensin-1 および  $\beta$ -Defensin-2 遺伝子 (*DEFB1* と *DEFB4*), さらに IL-6 および IL-8 遺伝子 (*IL6* と *IL8*) について Taqman probe を用いたリアルタイム PCR を行い, mRNA 発現を調べた。

次に TNF- $\alpha$  刺激による *IL6* と *IL8* の発現に対するコンドロイチン硫酸の影響を調べるために, 小腸モデルおよび大腸モデルを Ch4S または Ch6S を種々の濃度で含む培地中で 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間インキュベートした後, TNF- $\alpha$  を 50 ng/ml となるよう加え, さらに 2 時間同一条件下でインキュベートした。インキュベート後に RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR を行い *IL6* と *IL8* の遺伝子発現への ChS の影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) マウス小腸においてプロテオグリカンの低分子化が認められ, そのサイズはプロテオグリカンをアクチナーゼで徹底消化したサイズと等しかったことより, 小腸においてはプロテオグリカンのコアタンパク質部分がほぼ完全に消化された一方で, 糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸の低分子化は認められなかった。また, この糖鎖はコンドロイチナーゼ ABC でほぼ完全に消化され, その消化産物である不飽和二糖については, 小腸内容物由来ウロン酸陽性画分の HPLC パターンはプロテオグリカンのアクチナーゼ消化産物のものと変化がなかった。マウス小腸における糖鎖のサイズや硫酸基の結合位置には変化が認められないことから, プロテオグリカンは小腸においてコアタンパク質部分は消化されるものの, 糖鎖部分, すなわちコンドロイチン硫酸の部分はほぼ消化されないことが明らかとなった。よって, プロテオグリカンが生体に影響を与えるとすれば, コンドロイチン硫酸が消化吸収されることによるのではなく, コンドロイチン硫酸そのものが消化管内で何らかの機能を発揮することによるものである可能性が高いと考えられた。

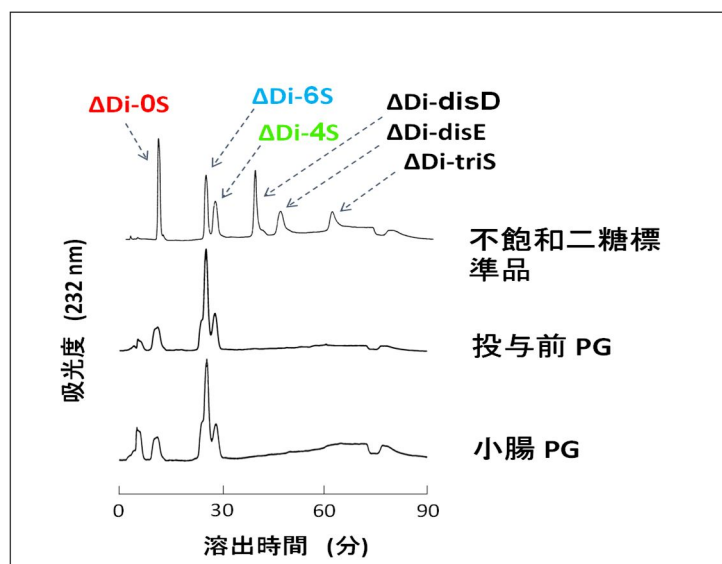


図 1 . マウス小腸におけるウロン酸陽性画分のコンドロイチナーゼ消化産物の Polyamine カラムによる HPLC

(2) Caco-2 は培養条件により小腸上皮様細胞に分化することが知られていることから、細胞を3日ごとに培地交換しながら4週間培養した。培養開始後3日、1週間、2週間、3週間、および4週間の時点で細胞を回収し、小腸上皮への分化の指標であるALP活性を測定した。その結果、細胞タンパク質あたりのALP活性は培養開始3日目から播種後21日目にかけて培養期間に依存して高値となったが、培養4週間目では低下していた。また、3日目の細胞の形態を倒立顕微鏡下で観察した結果、柵状配列や腺管構造が見られ、形態学的にも下部消化管腫瘍の細胞像と判断された。そこで培養21日目の細胞を小腸モデル、培養3日目の細胞を大腸モデルとして実験に用いることとした。

(3) ヒアルロン酸が腸管上皮細胞の $\beta$ -defensin-2の発現を誘導するという報告があることから、Caco-2細胞における $\beta$ -defensin-1および $\beta$ -defensin-2の遺伝子発現へのChSの影響について、Ch4SとCh6Sを用いて検討した。しかし、この細胞の小腸モデルにおける $\beta$ -defensin-1遺伝子DEFB1は検出以下であった。一方、 $\beta$ -defensin-2遺伝子DEFB4は検出されたが、その発現へのChSの影響は少なくとも350  $\mu$ g/mlの濃度では認められなかった。また大腸モデルについても小腸モデルの場合とほぼ同様の結果であった。

次に、TNF- $\alpha$ 刺激によるIL6とIL8の発現に対する小腸モデルへのコンドロイチン硫酸の影響では、IL8の発現へのCh4SおよびCh6Sの影響は顕著ではなく、一定の傾向は認められなかった(Fig. 10, 図中のControl -および+はTNF- $\alpha$ を含まない培地およびTNF- $\alpha$ を含む培地を用いた場合の遺伝子発現を表す)。一方、IL6の発現はCh4SおよびCh6Sいずれの場合でも、ChSを加えなかったcontrol(+)に比べて有意な発現抑制が示された(図2)。しかし、この抑制傾向に関してCh4SとCh6Sの効果の差異は認められなかった。次に、大腸モデルについても小腸モデルと同様に検討した。その結果、TNF- $\alpha$  (50 ng/ml)により大腸モデルにおいてもIL6およびIL8の発現誘導が認められ、IL8についてはその発現量へのChSの影響は観察されなかったが、IL6の遺伝子発現はCh4SとCh6Sのいずれにおいても抑制傾向が観察された。

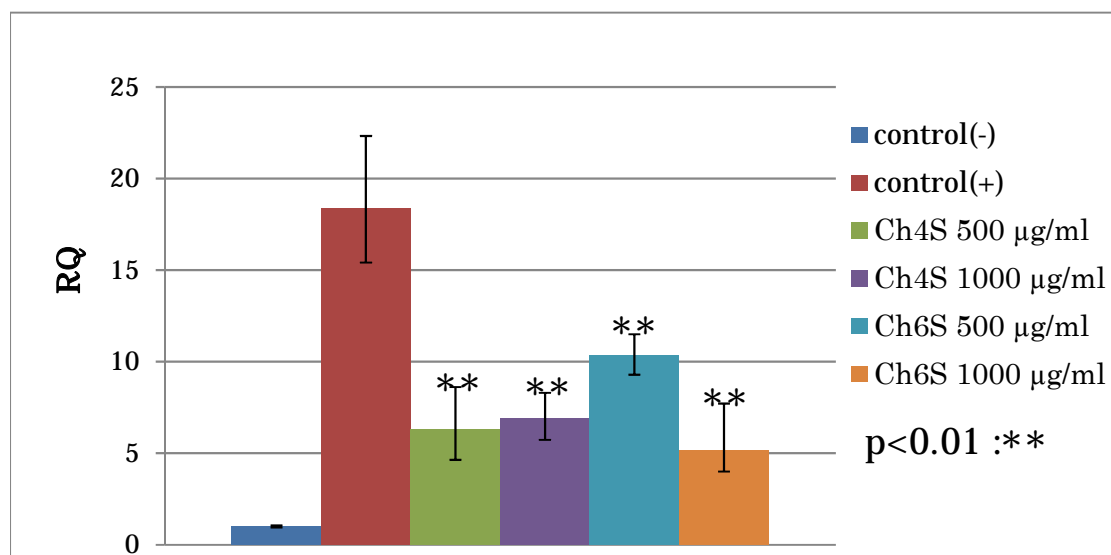


図2. 小腸モデルにおけるIL6発現へのChSの影響

本研究ではマウスに経口投与されたサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンは小腸に至るまでにコアタンパク質が消化される一方で、その糖鎖であるコンドロイチン硫酸はまったく分解されないことと、このコンドロイチン硫酸がTNF- $\alpha$ により誘導された腸管上皮細胞の炎症性サイトカインの発現を抑制する可能性が明らかにされた。このことの生理的重要性についてはなお議論の余地は残るが、本研究の結果は、プロテオグリカンの経口摂取が腸管における抗炎症作用および腸管における炎症性疾患の予防に有用である可能性を示しているのかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 495-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu10040495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saga R, Tsujiguchi T, Yamaguchi M, Fukushi Y, Fujishima Y, Matsuya Y, Oikawa J, Terashima M, Date H, Nakamura T, Hosokawa Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Meeting report on "The 4th Educational Symposium on Radiation and Health (ESRAH) by Young Scientists in 2017"	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Environment and Medicine	6. 最初と最後の頁 121-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T, Kakizaki I, Nakamura T	4. 巻 568
2. 論文標題 Proteoglycan-substrate gel zymography for the detection of chondroitin sulfate-degrading enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 51-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2018.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saga R, Hasegawa K, Murata K, Chiba M, Nakamura T, Okumura K, Tsuruga E, Hosokawa Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via the suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3555-3561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.9990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki I, Koizumi H, Kobayashi T, Nakamura T, Majima M.	4. 巻 483
2. 論文標題 Dermatan sulfate oligosaccharides having reducing end 2, 5-anhydro-d-talose inhibit bovine testicular hyaluronidase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 107754-107754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2019.107754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsujiguchi T, Kitajima M, Tomisawa T, Shiroto Y, Yamada R, Saito K, Hanada H, Jin YW, Cho MS, Jang SJ, Kim HJ, Pak MJ, Nakamura T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Lessons From a Japan-Korea Collaboration on Medical Response Training for a Nuclear or Radiological Emergency, Assuming Mass Casualty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disaster Medicine and Public Health Preparedness	6. 最初と最後の頁 431-432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/dmp.2019.88	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kasai K, Ito Y, Nitta A, Ariyoshi K, Nakamura T, Miura T.	4. 巻 104
2. 論文標題 Metal coordination by L-amino acid oxidase derived from flounder <i>Platichthys stellatus</i> is structurally essential and regulates antibacterial activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9645-9654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10914-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasai K, Kuroda Y, Takabuchi Y, Nitta A, Kobayashi T, Nozaka H, Miura T, Nakamura T.	4. 巻 533
2. 論文標題 Phosphorylation of Thr328 in hyaluronan synthase 2 is essential for hyaluronan synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 732-738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashina H, Terashima M, Oikawa J, Naijo S, Miyao T, Tachi Y, Matsuya Y, Yamaguchi M, Tsujiguchi T, Saga R, Jun H, Goh VST, Nakamura T, Hosokawa Y, Date H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Radiation Safety and Public Health for Radiological Professionals: Meeting Report on The 5th Educational Symposium on Radiation and Health (ESRAH) by Young Scientists in 2018	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation Environment and Medicine	6. 最初と最後の頁 48-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 孝、柿崎育子、中村敏也
2. 発表標題 サケ鼻軟骨プロテオグリカンを使ったコンドロイチン硫酸分解酵素の検出
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤 海, 小林 孝, 葛西宏介, 横山洸大, 作田泰宏, 中村敏也
2. 発表標題 マウスに経口投与されたプロテオグリカンの小腸における消化産物
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グリコサミノグリカン分解酵素又はその阻害物質の検出方法	発明者 中村敏也, 柿崎育子, 小林 孝	権利者 弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018 - 157686	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	七島 直樹  (Nanashima Naoki)  (80333730)	弘前大学・保健学研究科・准教授    (11101)	
連携研究者	葛西 宏介  (Kasai Kosuke)  (50400148)	弘前大学・保健学研究科・講師    (11101)	

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