

平成 21年 5月 27日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580155

研究課題名 (和文) 野菜の消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモンによる消化管創傷修復

研究課題名 (英文) Wound repair of damaged digestive tissue by wound-healing hormone produced during digestion of vegetables

研究代表者

田中 保 (TANAKA TAMOTSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：90258301

研究成果の概要: リゾホスファチジン酸(LPA)は脂質性増殖因子で、創傷治癒に関わるとされる。これまでの研究から、キャベツのような生野菜を食べると、植物ホスホリパーゼDと膵液ホスホリパーゼA2が連続的に働き、消化管でLPAが作られる可能性が見出された。本研究ではこのプロセスで生じるLPAが胃潰瘍に効く可能性について調べた。LPAやLPAを含む野菜の脂質抽出物は胃上皮様HGC-27細胞の運動性を促進した。さらに、胃壁にはホスファチジン酸(PA)をLPAへ消化する細胞外ホスホリパーゼA2が存在する可能性があり、PAの摂取が胃潰瘍の形成を抑制する可能性が見出された。抗潰瘍や整腸作用を謳う野菜は高いPA含量やホスホリパーゼD活性を示すものが多いことも判明し、経験的に知られる緑黄色野菜の胃腸への効果にLPAが関与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

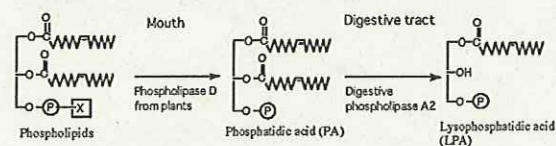
キーワード：食品機能学、消化管創傷修復、野菜、

## 1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸(LPA)はグリセロール骨格に脂肪酸1本とリン酸1個が結合した脂質性増殖因子である。LPAは血液、卵胞液、唾液といった体液に常時、有意な濃度で存在しており、特異的受容体を介して全身の細胞に生存シグナル(vital signal)を与えていると考えられている(Mills and Moolenaar, Nature Rev. 2003)。一方、血液

凝固のプロセスで、LPA産生系が活性化されること、LPAが傷の修復に重要な繊維芽細胞の運動を促進することなどから、LPAは創傷治癒に関わるとされ、実際にLPAの塗布は皮膚の傷の治癒を促進することが動物実験で確認されている(Balazs et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2001, 他)。また、コレラ毒素は小腸の粘膜上皮細胞のクロライドチャンネルを活性化し

て下痢を誘導するが、LPA 受容体の活性化はこのチャネルを阻害し、下痢をとめることも報告されている (Li et al., J. Exp. Med., 2005)。申請者は LPA を含有する食品は消化管障害に効くのではないかと考え、種々の食品の LPA 含量を調べた。その結果、野菜、特にキャベツや大根などアブラナ科の植物が LPA を含むことを明らかにした。また、市販の漢方胃腸薬にも大量の LPA が含まれていることも判明した。さらに、LPA は無傷の植物組織にはほとんど存在せず、ホモジネートにすることで生じること、これは植物組織をすり潰す際に活性化されたホスホリパーゼ D に起因することなどを明らかにした。ホスホリパーゼ D はリン脂質をホスファチジン酸 (PA) へと変換する酵素で、キャベツを咀嚼すると、LPA だけでなく、大量の PA (LPA の約 10 倍量) が生じる。この PA が消化酵素のホスホリパーゼ A2 で消化されると LPA となる。この点を検討した結果、唾液のホスホリパーゼ A2 は PA をよい基質とし、効率よく LPA を産生することもわかった。



## 2. 研究の目的

以上より、キャベツのようなホスホリパーゼ D 活性を示す食物の摂取は、咀嚼と消化のプロセスでこの酵素 D と消化酵素ホスホリパーゼ A2 の連続作用によって、消化管に LPA をもたらす可能性が考えられた。この消化プロセスで生じる LPA は徐放性製剤のように持続的に生成し、消化管の創傷修復を促進するかもしれない。粘膜上皮細胞における LPA 受容体は apical 側 (内腔側) に発現しており、消化物中の LPA は粘膜上皮に作用する可能性がある (Li et al., J. Exp. Med., 2005)。本研究ではこの新しい仮説に基づき、消化のプロセスで生じる創傷治癒ホルモン・LPA による消化管創傷修復について、特に胃潰瘍を標的疾患として検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 野菜のホモジネートが胃粘膜上皮細胞に及ぼす影響

用いた細胞株は胃ガン由来上皮様細胞の HGC-27 細胞 (理研セルバンク) とした。コンフルエントになった dish の細胞を部分的に剥がした後、試験溶液を培地に添加し、空いた部分を覆う様子をカメラ付き顕微鏡により観察し、細胞の運動性に及ぼす影響を調べた。

野菜のホモジネートあるいはその唾液消化物の脂質抽出物を 0.1% の牛血清アルブミンを含む滅菌生理食塩水に懸濁し、試験溶液とした。実験結果の表示において、試験溶液の単位は希釈度を用いた。例えば、希釈度 1 とは培養培地 1ml 当たり、素材 25 mg (湿重量) より得た脂質を含むことを意味する。

### (2) 胃潰瘍モデル動物を用いた LPA の抗潰瘍性効果

ラットを 24 時間絶食させた後、ストレスケージに入れ、胸骨が浸る程度の水位 (23°C) に沈めた。このストレス負荷後、胃を摘出し、潰瘍形成部位の長さを測定した。

### (3) 胃における LPA の生成

胃で PA から LPA が生じることを動物実験で調べた。まず、ラットより胃を摘出し、胃洗浄液を調製し、軽く遠心した後、上澄み液を酵素源に PA を基質としてホスホリパーゼ A2 活性を調べた。次に、摘出したラットの胃に PA を投与し、暫くインキュベートした後、内容物から脂質を抽出し、LPA の生成率を調べた。

### (4) ホスホリパーゼ D 活性を有する食品素材の検索

生キャベツのように、ホスホリパーゼ D 活性や PA を含む食品は消化のプロセスで LPA を作り出すので、抗消化管潰瘍効果を持つ食品の候補である。野菜類、豆類、穀類、果実類などの食品のホモジネートや消化管障害に効くと言われている薬草や生薬 (ヨモギ、アロエなど) の PA 含量とホスホリパーゼ D 活性を調べた。まず、食材をすり潰し、ホモジネートとした。この上清を酵素源とし、卵黄レシチンを基質に用い、ホスホリパーゼ D 反応を行った。生じた PA を TLC で単離後、定量した。各材料のホスホリパーゼ D 活性を mg protein 当たりあるいは食材 1g 当たりの比活性として比較した。一方、素材の持つ PA 含量は、ホモジネートより抽出した脂質から二次元 TLC を用いて PA を単離後、定量し、総リン脂質に占める PA の割合として比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 野菜のホモジネートが胃粘膜上皮細胞に及ぼす影響

胃粘膜上皮細胞に対する LPA およびキャベツ脂質の効果を試験した。試験に用いた細胞はヒト胃ガン由来の上皮様株化細胞・HGC-27 細胞で、LPA 受容体サブタイプ 1-3 の内、LPA1 と LPA3 とを発現することが確認されている (Shida et al., Exp. Cell Res., 2004)。

LPA 標準品を培養細胞に添加すると、HGC-27 細胞の運動性が刺激され、コンフルエントな培養細胞単層を剥がし取ることによってできた傷を周辺の細胞が埋めていった。この活性は LPA の濃度に依存的で、受容体の特異的アンタゴニストの Ki16425 により阻害された (図 1-E)。次に、キャベツのホモジネートより得られた脂質抽出物の効果を検討した。キャベツの葉はホモジネートにすると湿重量 1 g あたり  $22 \pm 4$  nmol の LPA を含むことが確認されている。このキャベツ由来の脂質抽出物を適当に希釈して培養液に添加したところ、標準品 LPA と同様、培養細胞を剥がし取って形成させた傷を周辺の細胞が埋めていった (図 1-A, B, F)。この活性は先のアンタゴニスト Ki16425 により阻害された (図 1-C, D, F)。このことから LPA やこれを含む脂質混合物は小腸や大腸だけでなく胃でも組織損傷の治癒を促進する可能性が示唆された。

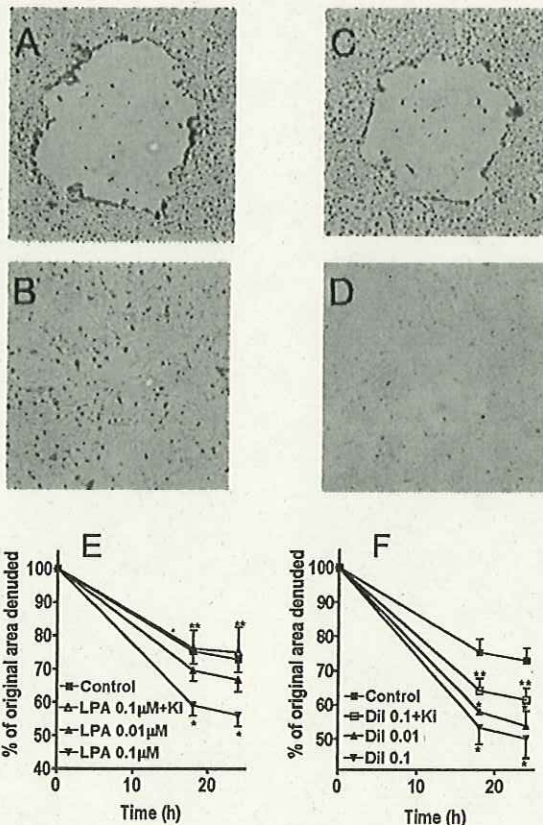


図1 HGC-27 胃上皮様細胞の運動性に及ぼすキャベツ脂質の効果

Quiescent monolayers of HGC-27 cells were pierced with a rubber-coated needle to form round wounds of approximately 0.5 mm in diameter. The cells were stimulated with cabbage lipids at the concentration of "dilution 0.1" in the absence (A and B) or presence of 1 μM

Ki16425 (C and D). The photomicrographs were taken 0 h (A and C) and 24 h (B and D) after stimulation. The time-dependent closure of each wound was determined from the photomicrographs (E and F). Agonists were used at the indicated concentration of 18:1 LPA (E) or cabbage lipids (F). At dilution 1, 1 ml of the medium contained the lipids from 25 mg of cabbage leaves (wet weight). Each value is expressed as the percentage of original area of the wound defects by the mean  $\pm$  S.D. from experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  (compared with the control). \*\* $P < 0.05$  (compared with the agonist alone).

## (2) 胃潰瘍モデル動物を用いた LPA の抗潰瘍性効果

ラットを 24 時間絶食させた後、ストレスケージに入れ、胸骨が浸る程度の水位 (23°C) に沈めた。現在、このストレス性胃潰瘍モデルで、ストレス前投与、ストレスと同時に投与、ストレス後投与について LPA 標準品の効果を試験している。現段階では実験例数も少なく、確定的な結果は得られていないが、LPA はストレスと同時に投与で潰瘍形成を抑制する傾向にある。今後、塩酸・エタノール潰瘍やアスピリン潰瘍も含め、LPA の効果や LPA 前駆体であるホスファチジン酸 (PA) の効果について調べたいと考えている。

## (3) 胃における LPA の生成

我々は *in vitro* の実験において、ホスホリパーゼ D 活性の高い野菜を咀嚼すると、活性化したホスホリパーゼ D が近傍のリン脂質に働き、大量の PA 生じること、さらに PA が腭液で消化されると腭液に含まれるホスホリパーゼ A2 活性により LPA に変換されることを確認している (Tanaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., in press)。この様式の LPA 供給は食物が腭液と混ざる十二指腸より下部で起こり得る。しかし、十二指腸より上部の胃で起こるかどうかは不明であった。胃潰瘍は本研究の標的疾患であるので、この点を調べた。24 時間絶食したラットより胃を摘出し、これをはさみで切り開いて胃壁を露出させ、この状態で生理食塩水に浸けた。この液を浸漬洗浄液とした。その後、切り開いた摘出胃を生理食塩水中で激しく攪拌させた。この液を攪拌洗浄液とした。それぞれの洗浄液を遠心し、細胞成分を沈め、上澄みの一部を酵素源として PA を基質にホスホリパーゼ A2 活性を調べた。その結果、攪拌洗浄液は浸漬洗浄液の約 80 倍の高い活性を示した。これは東城ら (Tojo et al., Eur. J. Biochem., 1993) が報告したように、胃のホ

スホリパーゼ A2 は内腔へ分泌されるのではなく、胃壁に留まっていることを示す結果と一致するが、少なくとも細胞外に存在すると解釈できる。また、攪拌洗浄液に存在したスホリパーゼ A2 は PA をよい基質とするなど、膵臓型酵素と類似して性質を示した。次に、摘出した胃の中に PA 懸濁液を投与し、LPA への消化率を調べると、インキュベート 1 時間で、加えた PA の 6% が LPA に変換されることがわかった。胃の運動がおこる状況下では消化効率はさらに高まると思われ、PA の摂取による LPA 産生は胃でも起こり得ると想定された(田中ら, 日本農芸化学会 2009 年度大会)。

#### (4) ホスホリパーゼ D 活性を有する食品素材の検索

PA の胃への供給は LPA 産生をもたらすし、LPA 投与と同様に胃粘膜上皮細胞に対して保護的に作用し、胃潰瘍を予防、治癒促進する可能性が示唆された。そこで、食品が含む PA 含量について調べてみた。

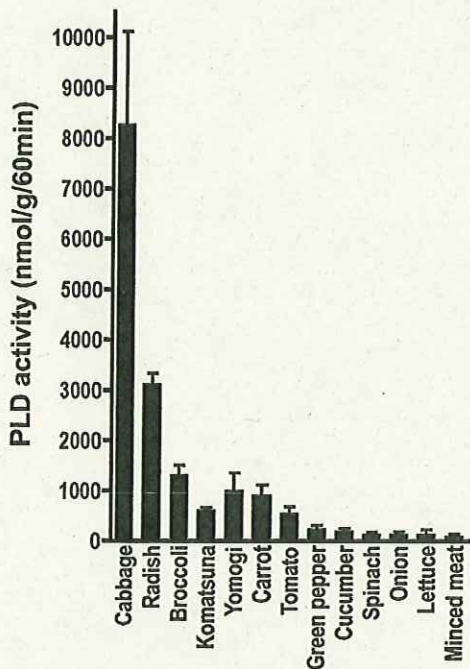


図2 種々の食品のホスホリパーゼ D 活性

Raw vegetables and minced meats were chopped and added with ice-cold water to make 25% (w/v) homogenate. The homogenate was centrifuged for 1,300 x g for 5 min. The resulting supernatant fraction was used for the enzyme assay. The assay mixture contained 167 nmol of phosphatidylcholine, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> and the supernatant fraction in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.8). The enzyme activity is shown as nmol of PA per g of original material (wet weight) per 60 min of the reaction (30 °C)

その結果、予想されたようにアブラナ科のキャベツや大根は高い PA 含量を示した。しかし、アブラナ科の植物が際だって高いわけではなく、トマトやキュウリなどナス科や瓜科の植物でもキャベツと同レベルの PA 含量を示した。一方、ミンチ肉の PA 含量は非常に低かった。このことは整腸作用や抗潰瘍性効果を謳う素材や薬膳料理は肉類よりも緑黄色野菜や根菜類を用いるものが多いという事実と関連があるのかもしれない。一方、各素材のホスホリパーゼ D 活性について調べてみると、キャベツが際だって高い活性を示した(図 2)。キャベツの抗潰瘍性成分は熱不安定因子とされ、メチルメチオニンがその実態といわれている。この酵素 D も熱不安定という条件を満足できるのは興味深い。キャベツ由来の酵素 D は強力であり、咀嚼時に酵素 D が他の食品由来のリン脂質と混合されるような状況を作り出すと単独摂取よりも多くの PA が産生されることが考えられる。

#### 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 1 件)

T. Tanaka, G. Horiuchi, M. Matsuoka, K. Hirano, A. Tokumura, T. Koike, K. Satouchi  
Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves  
Biosci. Biotechnol. Biochem., in press, 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 田中 保、近藤宏樹、新宅友則、木下正文、盛重純一、里内 清、徳村 彰  
食品の消化で生じるリゾホスファチジン酸による消化管組織修復  
日本農芸化学会 2009 年度大会  
2009 年 3 月 29 日
- ② 徳村 彰、足立美佳、稲葉真衣子、室田佳恵子、田中 保、寺尾純二  
消化器系の管腔側から作用するリゾリン脂質の生理的および病態生理的役割  
第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会  
2008 年 12 月 9 日 (神戸)
- ③ 田中 保、堀内 剛、近藤宏樹、松岡 恵、盛重純一、平野 薫、里内 清、徳村 彰、小池 透  
キャベツの消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸による消化管組織修復

日本農芸化学会 2008 年度中国四国支部大会

2008 年 9 月 13 日 (鳥取)

④里内 清、田中 保、徳村 彰

食品からのリゾホスファチジン酸による  
胃粘膜保護

第50回日本脂質生化学会

2008 年 6 月 5 日 (徳島)

⑤田中 保

消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン  
に基づいた抗胃腸傷害食の設計  
第 4 回農芸化学研究企画賞受賞者中間報告  
会

2008年3月28日 (名古屋)

⑥T. Tanaka, G. Horiuchi, K. Hirano,

K. Satouchi, J. Morishige, A. Tokumura,  
T. Koike, M. Murph, G. Mills, Y. Kikuta  
Effect of lysophosphatidic acid in

digested cabbage leaf on damaged tissue  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日  
本生化学会大会 合同大会

2007 年 12 月 14 日 (横浜)

⑦田中 保、堀内 剛、平野 薫、菊田安至、

里内 清、徳村 彰、盛重純一、小池 透、  
Mandi Murph, Gordon Mills

食品に含まれる創傷治癒ホルモン・リゾホ  
スファチジン酸

日本脂質栄養学会第 16 回大会

2007 年 9 月 1 日 (出雲)

⑧田中 保、堀内 剛、平野 薫、徳村 彰、

盛重純一、小池 透、Mandi Murph, Gordon  
Mills、里内 清

消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモ  
ン・リゾホスファチジン酸による消化管組  
織修復

第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会

2007 年 5 月 20 日 (高知)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 保 (TANAKA TAMOTSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授

研究者番号：90258301

### (2) 研究分担者

平野 薫 (HIRANO KAORU)

福山大学・生命工学部・助手

研究者番号：90299305

里内 清 (SATOUCI KIYOSHI)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：50098125

### (3) 連携研究者

なし