

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02347

研究課題名(和文)セリアック病の発症メカニズムの解明と食品成分による抑制

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenic mechanism of celiac disease and its suppression by food ingredients

研究代表者

高杉 美佳子 (Takasugi, Mikako)

九州産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60305802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：セリアック病の発症メカニズムの解明および食品成分による症状緩和を最終目的として、グリアジン未消化ペプチド (PTG) の腸管透過性亢進作用およびケルセチンによる改善効果を検討した。PTGは小腸上皮様細胞に分化させたCaco-2の腸管透過性を亢進させ、それはMEK/ERK1/2経路を活性化による可能性が示された。さらに、ケルセチン前処理により、PTGの腸管透過性亢進作用は緩和された。この結果はケルセチンなどの食品成分がセリアック病の症状を緩和する可能性を示唆するものであり、さらにTJ構成タンパク質発現への影響やシグナル伝達への影響を調べ、作用メカニズムを解明していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、セリアック病の発症メカニズムにグリアジン未消化ペプチド (PTG) によるERK1/2シグナル伝達経路の活性化およびそれに続く腸管透過性亢進作用が関わっていることを明らかにした。さらに、ポリフェノール的一种であるケルセチンがPTGによる腸管透過性亢進作用を抑制することを明らかにした。これらの研究成果は、日本で罹患率が増加しているとされるセリアック病の発症メカニズムの一部を解明するもので、セリアック病の対症療法の一つである低グルテン食摂取以外にもポリフェノール等の食品成分を積極的に摂取することでセリアック病の症状緩和が期待できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the pathogenic mechanism of celiac disease and to alleviate its symptoms with food ingredients, we investigated the effects of gliadin undigested peptide (PTG) on intestinal permeability and quercetin on the improvement of the intestinal permeability enhancing effect by PTG.

PTG enhanced the intestinal permeability of Caco-2 differentiated into small intestinal epithelial-like cells, possibly by activating the MEK/ERK1/2 pathway. Furthermore, quercetin pretreatment alleviated the intestinal permeability-enhancing effect of PTG. These results suggest that food components such as quercetin may alleviate symptoms of celiac disease. Further studies are needed to elucidate the mechanism of action by investigating effects on TJ component protein expression and signal transduction.

研究分野：食品機能学

キーワード：セリアック病 グリアジン ケルセチン 腸管透過性

1. 研究開始当初の背景

セリアック病は、何らかの理由によってグリアジンの未消化ペプチド (PTG) が腸管上皮を通過し、PTG に対する免疫反応が誘導されることで小腸上皮組織への炎症や組織傷害が起こり、慢性の下痢、栄養吸収障害による貧血、骨粗鬆症などを引き起こす遺伝性の自己免疫疾患である。グリアジンは、小麦製品の粘弾性など食感に関わるタンパク質・グルテンの構成成分で、小麦を主食とする欧米諸国では、セリアック病の患者数が増加傾向にあり、近年注目されている。一方、わが国の有症率は、これまで比較的低いと考えられていたが、食の欧米化に伴う小麦消費量の上昇に伴い、患者数が増加傾向にあり、セリアック病への対応が今後必要になってくると考えられる。

腸管には、上皮細胞間の物質透過を制御する細胞間密着結合 (タイトジャンクション; TJ) などで形成されるバリア機能がある。バリア機能が正常な場合には、必要な物質だけが体内に取り込まれ、不要な物質は侵入しないようになっているが、TJ が傷害を受けてバリア機能が損なわれると、本来取り込まれるべきでないペプチドや細菌などが体内に流入し (腸管透過性の亢進)、免疫・炎症反応を引き起こす。セリアック病の炎症反応には PTG による腸管透過性の亢進が関与している可能性があるが、その詳細なメカニズムは不明である。

現在のセリアック病患者への対応はグルテン除去食 (グルテンフリー食) である。しかし、グルテンは、小麦製品だけでなく、とろみ付けやつなぎなどにも幅広く使われている上に、わが国のグルテンフリーに対する認識は十分でなく、欧米諸国に比べてグルテンフリーの表示やメニューが少ないため、グルテンフリー食を完全に実行することは困難である。また、グルテンフリーの小麦代替食品の開発なども進められているが、パンや麺類など食品ごとに、かつ代替穀類ごとに研究・開発が必要となっている。

2. 研究の目的

(1) PTG が腸管上皮細胞の TJ に及ぼす影響

腸管上皮細胞間に存在する TJ に PTG が影響を及ぼすことで細胞間隙の透過性を亢進する、との仮説をヒト結腸癌由来細胞株 (Caco-2) を用いて検証する。これにより、セリアック病の発症メカニズムの一部を明らかにする。

(2) 食品成分による PTG の腸管透過性亢進作用の抑制

PTG による腸管透過性亢進作用を抑制する食品成分を探索し、その作用メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PTG の腸管透過性への影響

Caco-2 をコンフルエントの状態ですべて 2~3 週間培養し、小腸上皮様細胞に分化させた。PTG を終濃度 1 mg/mL で添加し、経時的に細胞間透過性の変化を細胞膜電気抵抗値 (Trans Epithelial Electric Resistance; TEER) または FITC-Dextran (FITC-Dex) の透過度を測定し、PTG が細胞間透過性にどのような影響を及ぼすか調べた。

(2) PTG の Caco-2 細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

小腸上皮様細胞に分化させた Caco-2 に PTG を終濃度 1 mg/mL 添加した後に細胞を回収・可溶化し、ERK1/2 経路 (ERK1/2 および MEK) の活性化 (リン酸化) の程度をウエスタンブロットティングで検出した。

(3) PTG による腸管透過性亢進作用を抑制する成分の探索

PTG 添加 30 分前にケルセチンを終濃度 50 μ M で加え、PTG の腸管上皮透過性亢進作用を抑制するかについて検討した。

4. 研究成果

(1) PTG の腸管透過性への影響

小腸上皮様細胞に分化させた Caco-2 に PTG を終濃度 1 mg/mL となるように添加し、0.5~3 時間後まで TEER 値を経時的に測定した。その結果、PTG は添加 30 分後より TEER 値が減少しており、腸管透過性を亢進させることが明らかとなった。これに対し、ペプチド無添加またはウシ血清アルブミン未消化ペプチド (PTB) 添加では、TEER 値はほとんど変化がなかった (図 1)。また、PTG 添加 3 時間の FITC-Dex 透過量は、ペプチド無添加あるいは PTB 添加の FITC-Dex 透過量よりも多かった (図 2)。これらの結果は、PTG が小腸上皮様細胞の透過性を亢進させることを示している。

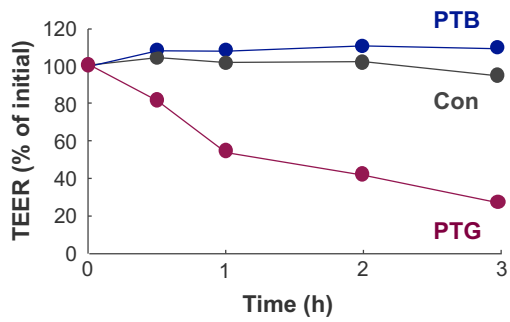


図 1 PTG が TEER 値に及ぼす影響

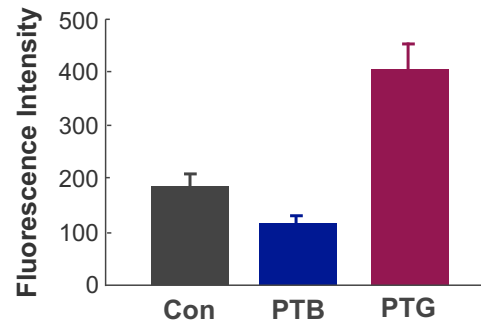


図 2 PTG が FITC-Dextran 透過に及ぼす影響

(2) PTG の Caco-2 細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

小腸上皮様細胞に分化させた Caco-2 に PTG または PTB を終濃度 1 mg/mL で 1~3 時間インキュベートした時の ERK1/2 および ERK 上流のシグナル分子である MEK のリン酸化をウエスタンブロットで検出した。その結果、PTG は ERK1/2 (図 3A) および MEK (図 3B) のリン酸化を促進することが明らかとなった。これらの結果は、PTG が MEK/ERK1/2 経路を活性化することで腸管透過性を亢進させていることを示唆している。

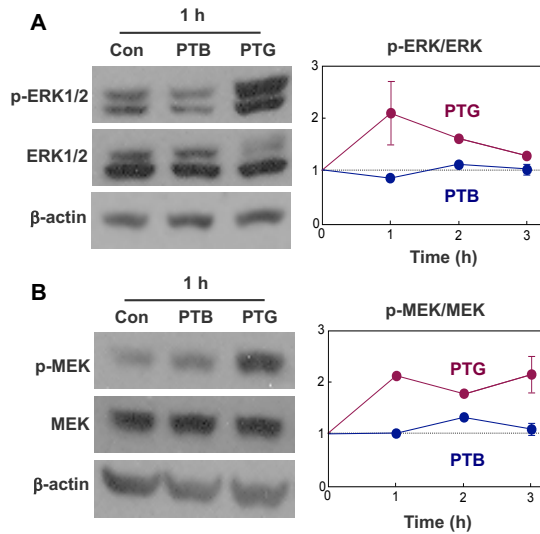


図 3 PTG が Caco-2 の ERK1/2 シグナル経路に及ぼす影響

(3) PTG による腸管透過性亢進作用抑制成分の探索

PTG が Caco-2 の腸管透過性を亢進させることが明らかとなったため、食品成分による制御の可能性を探索した。終濃度 50 μ M ケルセチン (Q) で 30 分間前処理した Caco-2 に PTG を終濃度 1 mg/mL 加え、腸管透過性を 3 時間の FITC-Dex 透過量で評価した。その結果、PTG 添加により透過量が増加した FITC-Dex は、ケルセチンの前処理により、コントロールと近いレベルにまでなっていた (図 4)。この結果は、PTG による腸管透過性亢進作用がケルセチンを共存させることで緩和できることを示しており、ケルセチンなどの食品成分がセリアック病の症状を緩和する可能性を示唆するものである。

今後は、TJ 構成タンパク質発現への影響やシグナル伝達への影響を調べ、作用メカニズムを解明していく必要がある。

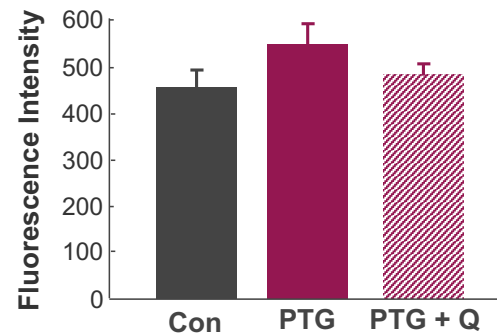


図 4 ケルセチンが PTG の腸管透過性亢進に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	新井 博文 (Arai Hirofumi) (70295848)	北見工業大学・工学部・教授 (10106)	

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