

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05879

研究課題名(和文) 腸管免疫細胞による食物繊維由来多糖の認識機構の解明

研究課題名(英文) Recognition mechanism of dietary fiber-derived polysaccharides by intestinal immune cells.

研究代表者

北口 公司 (Kitaguchi, Kohji)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50508372

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)：水溶性食物繊維の一種であるペクチンが腸管を構成する細胞に作用し、炎症性疾患に対して保護的に働いていることを明らかにした。このペクチンの疾患予防効果は、ペクチンの化学構造(中性糖側鎖含量やメチルエステル基の数や分布)に大きく依存することが明らかとなった。この成果は、腸内細菌叢には依存しない食物繊維の新たな保健効果が存在することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫学研究により食物繊維の摂取と疾病の予防効果に相関があることが見出されてきたが、「どのような食物繊維(種類・質)をどのくらい(量)食べれば、どのような疾患を予防できるのか」を示す科学的根拠に乏しいのが現状である。本研究成果は、保健効果の発揮に寄与する食物繊維の質の一端を明らかにし、新たな機能性食品の創出や疾病時の食事介入に関する重要な基盤情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We found that pectin, a soluble dietary fiber, act on intestinal cells to protect against inflammatory diseases. This protective effects of pectin depend on its chemical structure (content of neutral sugar side chains and/or number and distribution of methyl ester groups). These results suggest the existence of a novel health-beneficial effect of dietary fiber that is independent of the intestinal microbiota.

研究分野：食品免疫学

キーワード：食物繊維 ペクチン 炎症 病原性大腸菌 大腸

1. 研究開始当初の背景

食物繊維の摂取が、糖尿病や肥満などの代謝性疾患のみならず、喘息やアレルギー、炎症性腸疾患などの免疫疾患に対しても効果的であることが示唆されている。近年、腸内細菌が様々な疾病の発症や増悪化に関与することが報告され、食物繊維が腸内細菌により資化された結果生じる短鎖脂肪酸などの代謝産物を介して保健機能を示すこと（プレバイオティクス作用）が明らかとされつつある。一方で、特定の食物繊維が、腸管構成細胞に直接作用し、その生理的な機能を制御している可能性も示唆されている¹⁾。我々は、水溶性食物繊維の一種であるペクチンを経口投与すると、小腸パイエル板の CD11c 陽性細胞に作用し、全身性の炎症応答であるエンドトキシンショックが緩和できることを報告した²⁾。さらに、この抗炎症作用を発揮するためには、ペクチンに付加した中性糖からなる側鎖が必要不可欠であることも見出している。

ペクチンは、陸生植物の細胞壁を構成する複合多糖類であり、その主要骨格は、D-ガラクトuron酸が α -1,4結合によって直鎖状に結合した重合体である。6位のカルボキシ基の一部はメチルエステル化されており、L-ラムノース、D-アラビノースやD-ガラクトースといった13個の異なる単糖から構成される数種類の構造領域が付加している。ペクチン主鎖のメチルエステル化度が腸内発酵や Toll-like receptor との結合力と相関する可能性も示唆されている。しかしながら、疾患予防効果を示すペクチンの活性構造に関しては不明な点が多く、ペクチンが相互作用する分子も同定されていない。

2. 研究の目的

本研究では、食物繊維ペクチンによる腸内細菌非依存性の新たな疾患予防効果とペクチンの化学構造との活性相関を明らかにし、腸管免疫系におけるペクチン認識機構とその生理的な意義を明らかにすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ペクチンは由来植物種により構造が異なることが知られており、オレンジペクチンには、シトラスペクチンよりも中性糖側鎖が多く含まれていることが知られている。大腸におけるペクチン側鎖を介した直接的な抗炎症作用を調査する為に、シトラス由来ペクチンもしくはオレンジ由来ペクチンをそれぞれ5%ずつ含有する飼料を大腸炎モデルマウス (TNBS および DSS 誘導大腸炎) に給餌し、その病態を比較した。さらに、粘膜固有層のヘルパーT細胞亜集団の割合や大腸組織中の炎症性サイトカイン濃度をそれぞれフローサイトメトリーと ELISA 法により測定した。

(2) ペクチンのメチルエステル化度が TLR2 により誘導される炎症に及ぼす影響評価するために C57BL/6 マウスにメチルエステル化の割合や分布の異なるペクチンを7日間経口投与した後、抗癌剤 Doxorubicin 投与後の体重減少ならびに小腸組織の損傷を病理組織解析と炎症性サイトカイン産生量を測定することで調査した。

(3) 病原細菌の一部は、宿主の炎症応答を誘導することで自身の定着や増殖に有利な環境を形成することが知られている。サルモネラや病原性大腸菌感染のげっ歯類モデルである *Citrobacter rodentium* 感染に対するペクチンの効果をマウス大腸上皮細胞 CMT93 の培養細胞感染実験で調査した。

4. 研究成果

(1) 側鎖含量の高いオレンジペクチンを給餌したマウスでは大腸炎の症状が緩和したが、側鎖含量の低いシトラスペクチンの給餌はペクチン無添加飼料給餌の場合と同程度の大腸炎の症状を示した (図1)。大腸の制御性T細胞や Th17 などのヘルパーT細胞亜集団が大腸炎病態に関与することが報告されているが、ペクチン側鎖はヘルパーT細胞の分化には影響を与えなかった。しかしながら、大腸の炎症性サイトカイン産生量が側鎖含量に依存して低下しており (図2)、ペクチンが骨髄球系細胞へ作用している可能性が考えられた。さらに、側鎖含量に依存した大腸炎の保護効果は、抗生剤投与により腸内細菌を除菌した場合でも維持されていた (図3) ことから、ペクチンが側鎖を介して大腸の炎症細胞の機能を腸内細菌非依存的

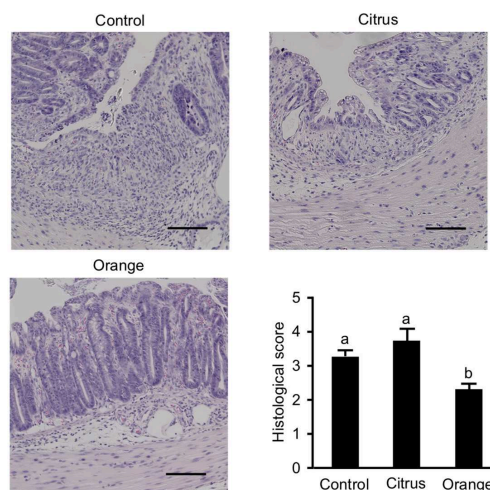


図1 ペクチン給餌マウスにおける大腸組織画像と病理スコア

に制御している可能性が示唆された³⁾。

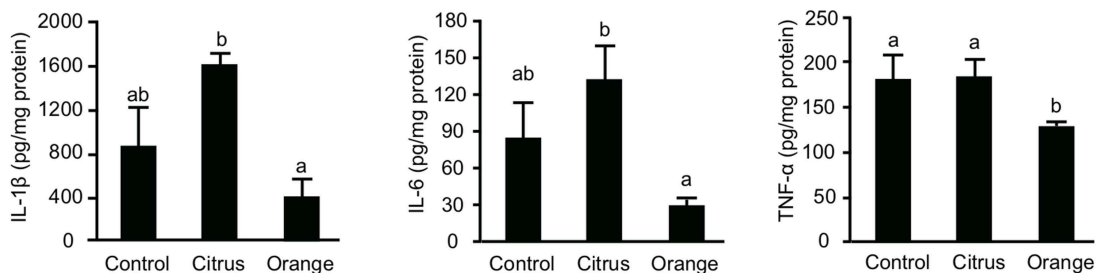


図2 大腸組織中の炎症性サイトカイン濃度

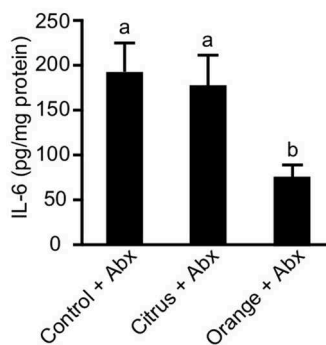


図3 抗生剤投与マウスにおける大腸組織中 IL-6 濃度

(2) 低メトキシシルペクチンの経口投与により、Doxorubicin 投与に伴う小腸アポトーシス細胞数が有意に低下した。さらに、メトキシ化度の高いペクチンの経口投与でもメトキシ基の分布が異なるとアポトーシス抑制作用に大きな違いが観察された(図4)。したがって、Doxorubicin 投与による小腸の炎症緩和には、ペクチンのメチルエステル基の数のみならず、分布も影響することが示唆された⁴⁾。

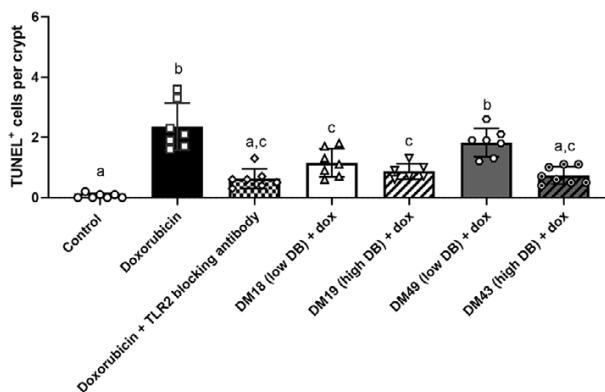


図4 Doxorubicin 投与マウス小腸における TUNEL 陽性細胞数

(3) ペクチン投与により *C. rodentium* 感染に伴う腸管バリア機能の低下が改善し、*C. rodentium* と上皮細胞との結合が抑制されることを発見した(図5)。この感染阻害作用は、ペクチンのメチルエステル化度には依存しなかった。さらに、ペクチンが、腸管上皮細胞ではなく *C. rodentium* に優先的に結合し、増殖を阻害することで感染を抑制していることも判明した(図6)。興味深いことに、この増殖阻害活性は、ペクチンの主鎖のみあるいは側鎖のみの投与では観察されず、ペクチン全分子が必要不可欠であった。本成果は、ペクチンが特定の病原性細菌に優先的に結合し、その増殖を抑制していることを示している⁵⁾。

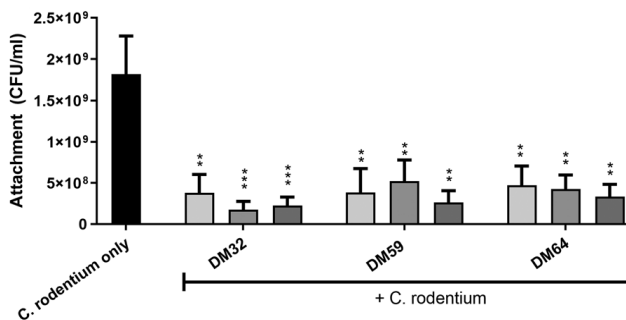


図5 CMT93 細胞に感染した *C. rodentium* の数

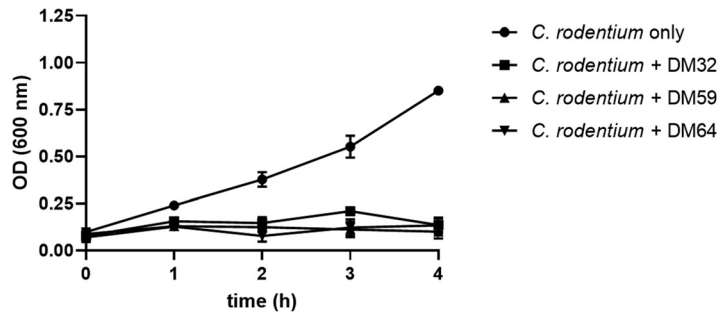


図6 ペクチン添加時の *C. rodentium* の増殖

以上の成果より、ペクチンは腸管マクロファージや上皮細胞に作用し、その化学構造に依存した疾患保護効果を示すことが明らかとなった。

<引用文献>

- 1) Kitaguchi K & Yabe T: Dietary fiber pectin is recognized in a structure-specific manner by intestinal cells. *Trends Glycosci. Glycotech.* 2019; 31: E91-E97.
- 2) Ishisono K, Yabe T, Kitaguchi K: Citrus pectin attenuates endotoxin shock via suppression of Toll-like receptor signaling in Peyer's patch myeloid cells. *J. Nutr. Biochem.* 2017; 50: 38-45.
- 3) Ishisono K, Mano T, Yabe T, Kitaguchi K: Dietary fiber pectin ameliorates experimental colitis in a neutral sugar side chain-dependent manner. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2979.
- 4) Beukema M, Jermendi É, Koster T, Kitaguchi K, de Haan BJ, van den Berg MA, Faas MM, Schols HA, de Vos P: Attenuation of doxorubicin-induced small intestinal mucositis by pectins is dependent on pectin's methyl-ester number and distribution. *Mol. Nutr. Food Res.* 2021; 65: 2100222.
- 5) Beukema M, Ishisono K, de Waard J, Faas MM, de Vos P, Kitaguchi K: Pectin limits epithelial barrier disruption by *Citrobacter rodentium* through anti-microbial effects. *Food Funct.* 2021; 12: 881-891.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Beukema M, Jermendi E, Koster T, Kitaguchi K, de Haan BJ, van den Berg MA, Faas MM, Schols HA, de Vos P	4. 巻 65
2. 論文標題 Attenuation of doxorubicin-induced small intestinal mucositis by pectins is dependent on pectin's methyl-ester number and distribution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Nutr. Food Res.	6. 最初と最後の頁 2100222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mnfr.202100222	査読の有無 無
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 Beukema M, Ishisono K, de Waard J, Faas M M, de Vos P, Kitaguchi K	4. 巻 12
2. 論文標題 Pectin limits epithelial barrier disruption by Citrobacter rodentium through anti-microbial effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Funct.	6. 最初と最後の頁 881-891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0fo02605k	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 北口公司	4. 巻 10
2. 論文標題 ペクチン摂取による生理機能制御と疾病予防効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 230-236
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishisono K, Mano T, Yabe T, Kitaguchi K	4. 巻 10
2. 論文標題 Dietary fiber pectin ameliorates experimental colitis in a neutral sugar side chain-dependent manner.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02979	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 Kitaguchi K, Yabe T	4. 巻 31
2. 論文標題 Dietary fiber pectin is recognized in a structure-specific manner by intestinal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E91-E97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1402.1E	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 後藤咲季, 伊藤賢一, 大野真貴, 北口公司, 矢部富雄
2. 発表標題 柿由来ペクチンによる小腸絨毛形態変化と栄養吸収への影響.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会 (第69回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内博規, 山下昇悟, 矢部富雄, 北口公司
2. 発表標題 ペクチンが腸管マスト細胞へ及ぼす影響の解析.
3. 学会等名 2020年度日本食品科学工学会中部支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohji Kitaguchi, Keita Ishisono, Toshiyuki Mano, Tomio Yabe
2. 発表標題 Dietary fiber pectin mitigates experimental colitis in a side chain-dependent manner.
3. 学会等名 The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	矢部 富雄 (Yabe Tomio)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

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		
オランダ	University Medical Center Groningen		