

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05936

研究課題名（和文）大麦若葉由来葉緑体チラコイド膜糖脂質の炎症性腸疾患抑制作用の解析

研究課題名（英文）Inhibitory Effect of Chloroplast Thylakoid Membrane Glycolipids from Young Barley Leaves on Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

奥 和之（Oku, Kazuyuki）

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：40549797

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）：本研究では、大麦若葉由来糖脂質（YBLP-GL）の腸管炎症抑制効果を培養細胞を用いた腸管炎症モデルによる検討をした。

腸上皮様細胞（Caco-2細胞）を用いた炎症モデルにおいて、YBLP-GL添加による細胞障害性抑制と炎症性サイトカイン分泌抑制を確認した。次に、腸管マクロファージ様細胞（THP-1細胞）を用いた炎症モデルにて、YBLP-GL添加により炎症性サイトカイン分泌抑制と抗炎症性サイトカインIL-10分泌が確認された。炎症性腸疾患モデルとしてTHP-1細胞とCaco-2細胞の共培養系でのYBLP-GLの炎症誘導抑制作用を確認し、大麦若葉由来糖脂質は腸管炎症抑制作用を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患（IBD：inflammatory bowel disease）は、ストレスなど外的因子に対する腸管自律神経あるいは腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介した腸管の炎症によると考えられる。本研究の結果から、腸の炎症を抑制する食品成分の作用を明らかにすることにより、薬剤に対する依存度をできるだけ少なくし、新しいエビデンスの構築と食事療法のあり方を明らかにした。本研究の意義は、未だ根本的な治療法のないIBDに対して解決の糸口を提示するだけでなく、副作用がなく抗炎症作用が期待される食品素材の開発によって、栄養学的側面から患者のQOLを上げ、また医療費の削減にもつなげられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of barley grass-derived glycolipids (YBLP-GL) on intestinal inflammation in an intestinal inflammation model using cultured cells. In an inflammation model using intestinal epithelial-like cells (Caco-2 cells), we confirmed that the addition of YBLP-GL inhibited cytotoxicity and inflammatory cytokine secretion. Next, in an inflammation model using intestinal macrophage-like cells (THP-1 cells), YBLP-GL addition inhibited inflammatory cytokine secretion and anti-inflammatory cytokine IL-10 secretion. YBLP-GL inhibited inflammation in a co-culture system of THP-1 cells and Caco-2 cells as a model of inflammatory bowel disease, suggesting that barley grass-derived glycolipids have an inhibitory effect on intestinal inflammation.

研究分野：食品機能科学, 生化学

キーワード：炎症性腸疾患 腸上皮細胞炎症モデル 腸管マクロファージ 炎症性サイトカイン 抗炎症性サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD: inflammatory bowel disease) は、主に若年層を中心にその罹患率が急激に増加している疾患である。IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病が含まれるが、いずれもストレスなどの外的因子に対する腸管自律神経あるいは腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介した腸管の微小循環障害・組織破壊によると考えられる。すなわち異常亢進した腸管マクロファージなどが産生する tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β) といった炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はこれらの刺激によってさらに好中球の遊走に關与する interleukin-8 (IL-8) を分泌する。その結果、腸管粘膜組織に好中球が浸潤・集積し腸管上皮に細胞傷害をもたらすことによって、腸炎症状が進展する。光合成をする微生物や高等植物の葉緑体チラコイド膜には、特有の糖脂質が含まれている。特にホウレン草由来のチラコイド糖脂質には、DNA 合成酵素阻害による抗ガン作用や消化管粘液の増加による腸バリア機能の増強作用が報告されている。本研究に用いる大麦若葉末は、イネ科オオムギ属に属するオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の若葉部を乾燥、粉碎したものであり、食物繊維を豊富に含んでいるほか、脂質 (脂質・糖脂質) を乾燥粉末あたり約 20% 含有しており、炎症性腸疾患の治癒・予防に効果が期待される。研究代表者らは、大麦若葉末投与が実験的大腸疾患モデル (大腸ガン、炎症性腸疾患、過敏性大腸炎) を抑制することを確認した。特に、大麦若葉末投与が炎症性腸疾患モデルマウスの症状を強く抑制することを発見した。さらに、サイトカインプロファイル調べたところ、炎症メディエーターの抑制と抗炎症性サイトカインインターロイキン 10 (IL-10) 誘導に關与することを確認し、大腸疾患の治癒・予防に効果が期待される (日本食物繊維学会で発表、2013)。

2. 研究の目的

本研究では、大麦若葉由来糖脂質 (YBL-GL) に注目し、以下に示す ~ の実験を行い、炎症性腸疾患の予防・治療に有用な知見を得るとともに、炎症性腸疾患抑制メカニズムを解明することを目的とした。

- (1) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた腸管炎症モデルによる炎症抑制を示す食品成分のスクリーニング
- (2) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた YBL-GL の腸管免疫炎症メディエーターの作用抑制機構の解明
- (3) 腸管マクロファージ (M ϕ) の炎症誘導に及ぼす YBL-GL 添加の影響
- (4) 腸管炎症モデル (Caco-2 細胞由来小腸上皮細胞 / THP-1 株由来 M ϕ の重層共培養系) での YBL-GL の炎症抑制機構の解析

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた腸管炎症モデルによる炎症抑制を示す食品成分のスクリーニング

大麦若葉末、ホウレン草、小松菜、キャベツ、桑の葉、杜仲茶葉の 75% エタノール抽出液を乾固して試料を調製した。ヒト小腸上皮様細胞 Caco-2 細胞を用いて、TNF- α を炎症メディエーターとした炎症モデルにより、各エタノール抽出物の炎症抑制作用を検討した。試料の添加は TNF- α 処理の前培養とし、各エタノール抽出物を終濃度 10mg/mL になるよう少量のエタノールで溶解後 PBS (-) で希釈して添加した。添加後、CO $_2$ インキュベーターで 37 $^{\circ}$ C、2 日間培養した。培養後、TNF- α 10ng/mL になるよう添加し、37 $^{\circ}$ C、3 日間培養した。細胞障害性の評価は、培養液中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) により判断した。また、培養液中に分泌された炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) を ELISA 法により測定した。

- (2) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた YBL-GL の腸管免疫炎症メディエーターの作用抑制機構の解明

大麦若葉由来糖脂質 (YBL-GL) の調製は、大麦若葉末の 75% エタノール抽出液を強カチオンイオン交換樹脂 HP-20 カラムクロマトグラフィーに供し 95% エタノール抽出画分を、糖脂質画分 (YBL-GL) とした。YBL-GL 画分を用いて、大麦若葉末、ホウレン草、小松菜、キャベツ、桑の葉、杜仲茶葉の 75% エタノール抽出液を強カチオンイオン交換樹脂 HP-20 カラムクロマトグラフィーに供し 95% エタノール抽出画分を、糖脂質画分とした。

大麦若葉由来糖脂質 (YBL-GL) 画分を用いて、腸管免疫炎症メディエーターの作用抑制機構の解析を行った。24well 培養プレートに培養された Caco-2 細胞 (1×10^5 cell/well) に YBL-GL を終濃度 10 μ g/mL になる様添加して 3 時間培養後、TNF- α 10ng/mL になるよう添加し 37 $^{\circ}$ C、24 時間培養した。培養後、培養液を回収し、培養液中に分泌された炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 濃度を ELISA 法により測定した。また、培養後の細胞を回収し細胞溶解液処理後、炎症性サイトカイン遺伝子の発現を RT-PCR 法にて調べた。さらに細胞溶解液中の炎症性サイ

トカイン遺伝子発現の転写因子活性型 NF- κ B (p-p65) 濃度を ELISA 法により測定した。

(3) 腸管マクロファージ (M Φ) の炎症誘導に及ぼす YBL-GL 添加の影響

培養細胞は、THP-1 細胞 (ヒト骨髄性白血病細胞由来、ATCC TIB-202 株) の凍結保存品を用いた。THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導は、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を用いた。培養した THP-1 細胞の培地を D-MEM 培地に置換後、コラーゲン type 1 をコーティングした 24well 培養プレートに 1×10^5 cell/well になるよう分注し (1mL) 37 $^{\circ}$ C \cdot 5% CO $_2$ 下で 48 時間接着培養した。培養後 PMA を 100ng/mL-DMSO を 50 μ L (1well あたり 5ng) に添加し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5% CO $_2$ 下で 24 時間培養して M Φ 様細胞に分化させた。LPS を炎症メディエーターとした腸管炎症モデルを用いて、YBL-GL 添加の影響を検討した。M Φ 様細胞に分化させた THP-1 細胞培養プレート (24well プレート) 凍結乾燥した YBL-GL を、終濃度 10 μ g/well となるよう DMSO に溶解して添加した。また、ポジティブコントロールとして、抗炎症性を示す M Φ への分化を誘導する IL-4 終濃度 10ng/well 添加区を設けた。次に、炎症メディエーターとして LPS (E.coli O50 由来) を 200 μ g/mL-PBS(-) を 50 μ L (1well あたり 10 μ g) に添加し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5% CO $_2$ 下で、活性型 NF- κ B 測定用は 8 時間培養後細胞を回収、サイトカイン量測定用は 24 時間培養し培養上清を回収した。培養上清中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TGF β) および抗炎症性サイトカイン IL-10) 分泌量を ELISA 法にて測定した。また回収した細胞を細胞溶解液で溶解後、活性型 NF- κ B (pp-65) を ELISA 法にて、サイトカイン遺伝子発現を RT-PCR 法にて測定した。

(4) 腸管炎症モデル (Caco-2 細胞由来小腸上皮細胞 / THP-1 株由来 M Φ の重層共培養系) での YBL-GL の炎症抑制機構の解析

炎症性腸疾患モデルとして THP-1 マクロファージと Caco-2 細胞の重層共培養系での YBL-GL の炎症誘導抑制作用を検討した。24well トランスウェル培養プレートを用い、培養プレート側に Caco-2 細胞を、トランスウェルに PMA 処理した THP-1 細胞をそれぞれ 1×10^5 cell/well になるよう分注し (1ml) 1 週間培養した。重層培養前に YBL-GL を終濃度 10 μ g/well となるよう DMSO に溶解して添加し 3 時間前培養した。その後 Caco-2 細胞培養プレートの各 well に THP-1 M Φ を培養したトランスウェルをセットした。セット後、トランスウェル側に YBL-GL と LPS を添加して 24 時間培養した。培養後、培養 well 側の培地を回収し LDH 活性を測定して Caco-2 細胞障害性を調べた。また THP-1 細胞および Caco-2 細胞をそれぞれ回収し溶解後サイトカイン遺伝子発現量を RT-PCR 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた腸管炎症モデルによる炎症抑制を示す食品成分のスクリーニング

いずれの各エタノール抽出物 (10mg/mL) 添加により、培養液中に分泌された LDH 活性は低下し TNF- α 処理による細胞障害を抑制することが確認された。その作用は大麦若葉末およびホウレン草抽出物添加で顕著であった。培養液への炎症性サイトカイン分泌量は YBLP 抽出物添加により顕著に低下し、次いでホウレン草抽出物添加区であった。大麦若葉末-75% にエタノール抽出物には、糖脂質の他にポリフェノール類なども含まれている。そこで、以降本研究では、炎症食品成分として大麦若葉末を選択し、75% エタノール抽出物から HP-20 カラムクロマトグラフィーで大麦若葉由来糖脂質 (YBL-GL) 画分を分画して研究に用いた。

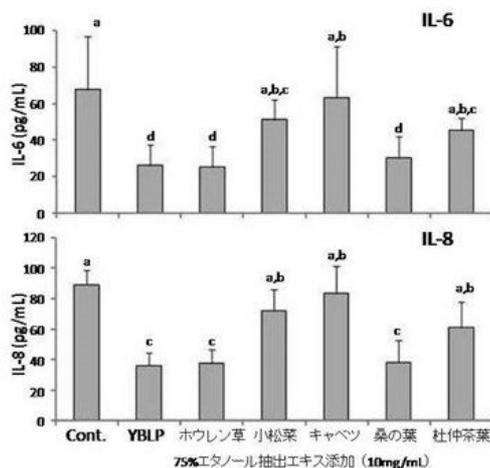
TNF- α 添加による細胞障害性 (LDH 活性)

	LDH活性 (u/mL)
コントロール	61.9 \pm 4.51
大麦若葉末 10mg/mL	21.0 \pm 2.73 ^b
1mg/mL	46.0 \pm 6.08 ^b
0.1mg/mL	54.9 \pm 4.73 ^a
ホウレン草 10mg/mL	29.7 \pm 3.27 ^b
小松菜 10mg/mL	55.5 \pm 4.44 ^a
キャベツ 10mg/mL	60.4 \pm 4.19
桑の葉 10mg/mL	38.4 \pm 2.24 ^b
杜仲茶葉 10mg/mL	49.8 \pm 8.59 ^a

LDH活性1u:1分間に1 μ molのNADHを消費する酵素量

a: コントロールに対して p<0.05 で有意差あり

b: コントロールに対して p<0.01 で有意差あり



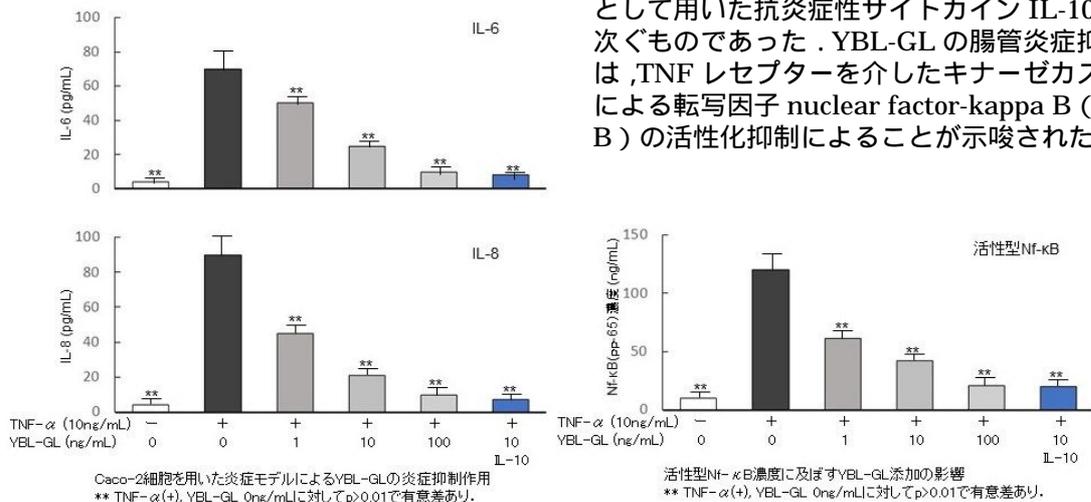
培養上清に放出された炎症性サイトカイン濃度

YBLP: 大麦若葉末懸濁液添加

異なるアルファベット間有意差あり (p<0.05)

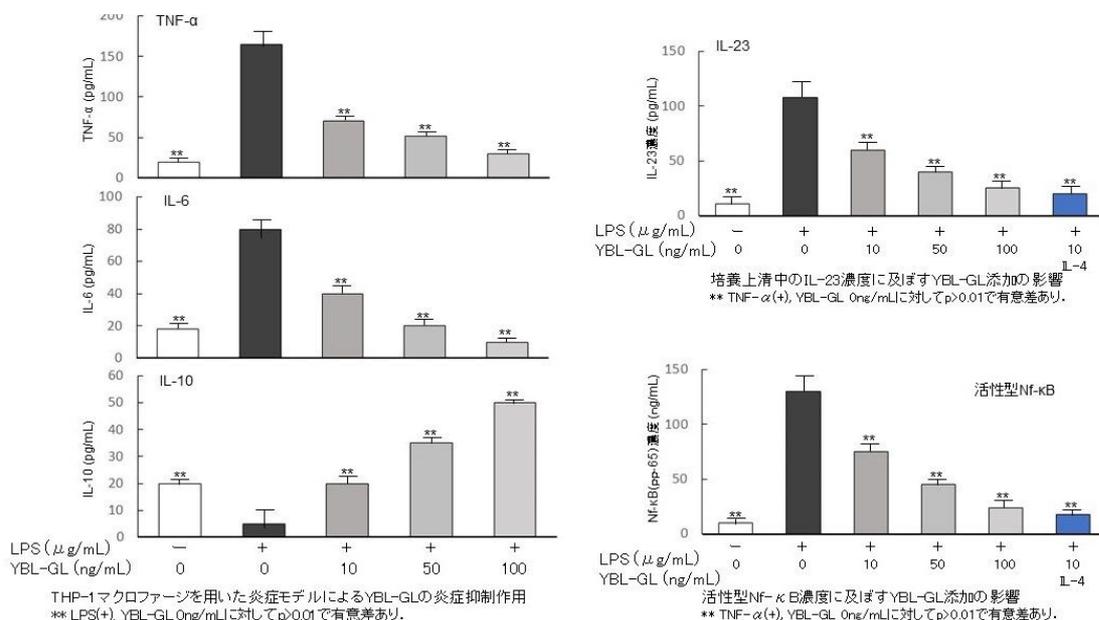
(2) 培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた YBL-GL の腸管免疫炎症メディエーターの作用抑制機構の解明

大麦若葉由来糖脂質 (YBL-GL) の炎症抑制作用を *in vitro* モデルとして TNF- α を炎症メディエーターとしたヒト消化管上皮様細胞 (Caco-2) モデルを使用して検討した。低濃度の YBL-GL 添加により炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) や単球の遊走性に関するケモカインである IL-8 の分泌抑制をタンパク質レベルならびに遺伝子発現レベルで確認した。YBL-GL 添加により活性化型 NF- κ B (p-p65) レベルが有意に低下し、ポジティブコントロールとして用いた抗炎症性サイトカイン IL-10 添加に次ぐものであった。YBL-GL の腸管炎症抑制作用は、TNF レセプターを介したキナーゼカスケードによる転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化抑制によることが示唆された。



(3) 腸管マクロファージ (M ϕ) の炎症誘導に及ぼす YBL-GL 添加の影響

腸管 M ϕ モデルとして PMA 処理した THP-1 細胞を用いて、YBL-GL の炎症抑制効果を検討した。炎症性サイトカイン IL-6 濃度は、YBL-GL 添加でコントロールの 12.5% (p<0.001) と有意に低下した。単球の遊走性に関するケモカインである IL-8 の分泌抑制も確認され、その作用はポジティブコントロールの IL-4 10 μ g/mL 添加と同レベルであった。その他の炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- α) でも同様の結果を示した。また、炎症性サイトカイン遺伝子発現の転写因子転写因子 NF- κ B の活性化抑制も確認した。さらに炎症反応のシグナル伝達を促進する炎症性サイトカイン IL-23 の分泌も YBL-GL 添加で抑制した。IL-23 は、Th17 細胞の維持と増殖に重要なサイトカインである。その分泌抑制は炎症性腸疾患における炎症増悪を抑制することが示唆される。一方、抗炎症サイトカイン IL-10 濃度は、コントロール (LPS 添加) と比べ、YBL-GL 添加により増加した。その作用はサイトカイン遺伝子発現でも確認された。この THP-1-M ϕ は、炎症性、抗原提示性を示す M1 type M ϕ や抗炎症性、細胞修復性を示す M2 type M ϕ に分化することが知られており、YBL-GL 処理により M2-M ϕ への分化・誘導が処理後のサイトカインプロファイルから推定された。



(4) 腸管炎症モデル (Caco-2 細胞由来小腸上皮細胞 / THP-1 株由来 M₂ の重層共培養系) での YBL-GL の炎症抑制機構の解析

炎症性腸疾患モデルとして THP-1 マクロファージ (THP-1 M₂) と Caco-2 細胞の重層共培養系での YBL-GL の炎症誘導抑制作用を検討した。

Caco-2 細胞側培養液中の LDH 濃度が YBL-GL 添加により無添加に比べて低値であり, 腸管炎症による細胞障害作用を抑制することがわかった。また, トランスウェル側の THP-1 M₂ のサイトカイン遺伝子発現量を調べたところ, YBL-GL 添加により低下した。一方, 抗炎症性サイトカイン IL-10 遺伝子発現は促進されており, YBL-GL 添加による腸管マクロファージの抗炎症性マクロファージ (M₂ マクロファージ) への分化・誘導が炎症性腸疾患モデルにおいても示された。示唆された。

TNF- α 添加による細胞障害性(LDH活性)

	62.8 \pm 3.25
コントロール	62.8 \pm 3.25
YBL-GL	
100 ng/mL	12.5 \pm 4.17b
50 ng/mL	24.1 \pm 3.23b
10 ng/mL	42.4 \pm 2.11a

以上の結果より, 大麦若葉由来糖脂質は, 腸管マクロファージの分化・誘導をコントロールすることにより炎症メディエーターによる腸管炎症を抑制することが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 奥和之、宮田富弘、三浦紀称嗣。山口大貴	4. 巻 30
2. 論文標題 抗炎症作用を示す食品成分の検索と解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 川崎医療福祉学会誌	6. 最初と最後の頁 279-283
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦紀称嗣、宮田恵多、奥和之、宮田富弘
2. 発表標題 大麦若葉由来脂溶性画分の抗細胞障害作用
3. 学会等名 日本食物繊維学会
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
研究分担者	宮田 富弘 (miyada timihiro) (00200189)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授 (35309)	
研究分担者	宮田 恵多 (miyata keita) (90736290)	山梨学院大学・健康栄養学部・准教授 (33402)	

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
---------	---------