

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20248013

研究課題名（和文）消化管におけるストレス応答とその食品因子による制御の分子基盤解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of intestinal stress induction and regulation of the stress by food factors

研究代表者

清水 誠（SHIMIZU MAKOTO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30114507

研究成果の概要（和文）：

各種ストレスで誘導される腸管の炎症反応を、腸管上皮細胞と免疫系細胞の相互作用という視点から、細胞培養実験系を用いて解析するとともに、腸管炎症を抑制する食品成分を探索した。活性化したマクロファージやマスト細胞は上皮細胞の傷害を引き起こし、逆に上皮細胞はマスト細胞の機能の活性化を誘導するなどの相互作用が観察された。また、細胞間相互作用を担う分子や抗炎症作用を示す食品因子を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：

Inflammatory reactions induced by various stresses in the intestinal epithelium were investigated from the viewpoint of cell-cell interaction. Interaction between intestinal epithelial cells and immune cells was analyzed using *in vitro* cell culture model systems newly constructed in this study. Food substances that could suppress inflammatory reactions were also searched using these systems. Activated macrophages and mast cells induced damage to epithelial cells, whereas epithelial cells induced differentiation and functional activation of mast cells. Certain molecules responsible for the cell-cell interactions and food factors with anti-inflammatory functions were successfully found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2009年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

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：腸管上皮細胞、炎症モデル、複合培養、抗ストレス作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管は摂取した食品成分が直接接触し作用し得る器官であるために、食品の影響を

受けやすい。現在認可されている特定保健用食品の7割以上が消化管内でその機能を発現していることを考えても、食品の機能発現に

おける消化管の重要性は明らかである。逆に、消化管で起こる疾病や障害を予防し改善する上でも食品が果たす役割は大きい。

(2) 腸管に関わる疾病、体調不良の急増が問題になっている。腸管関連の最も一般的な障害は便秘・下痢などの排便障害である。これらは重篤な疾病とは言えないが QOL には大きく関わってくる。一方、食中毒菌やウイルスによる感染性腸炎、アレルギー性腸炎に加えて、炎症性腸疾患 (IBD: クロウン病や潰瘍性大腸炎) の患者数がこのところ急増しており、前者は 2 万人、後者は 8 万人と報告されるに至った。さらに、過敏性腸症候群 (IBS) に関しては、国際的な診断基準 (Rome II) が明確化された結果、我が国では国民の 10-20% が罹患しているとの報告がある (三浦、日医報、2002)。IBS は IBD のような重篤な難病とは認められていないが、QOL を著しく低下させるために、その予防治療法の開発は社会の強い要請になっている (東山ら、総合臨床、2005)。

(3) IBD、IBS は免疫系、脳神経系・腸管神経系などが関わる複雑な腸障害とされ、その発症メカニズムには不明な部分が多い。しかしいずれも発症の場合は腸管であり、「多様なストレス因子に対する腸管の応答～炎症反応」が発症に関わっていることは疑いない。また、そこには免疫・神経系細胞と腸管上皮細胞間の相互作用の形成、細胞の過剰な応答・活性化が誘導されていることも徐々に明らかになってきた (Barbara ら、Gastroenterology、2004)。脳神経系や免疫系に発するこれらの機能性消化器障害の最下流に位置する腸管上皮での炎症反応の部分で培養細胞系を用いて再現できれば、炎症プロセスの詳細な解析や、IBS、IBD の予防改善に役立つ食品因子の探索・解析に資するところが大きいと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 第 1 の目的は、腸管上皮細胞におよぼす免疫系・神経細胞の作用を観察するための *in vitro* 実験系を構築し、腸管に存在する免疫系細胞 (マスト細胞、マクロファージ、樹状細胞など) や神経系細胞が、腸管上皮細胞とどのような相互作用をしているのかを明らかにすることである。そのために、我々のグループが得意とする複合培養の手法を用いて新規 *in vitro* 実験系を構築する。

(2) 第 2 の目的は、各種ストレス (酸化ストレス、菌体ストレス、炎症サイトカイン等に由来するストレスなど) に対して上記細胞群が示す応答性の観察と評価することである。上

記の複合培養系に各種ストレスを与え、各細胞における炎症性サイトカイン、増殖因子の産生、解毒代謝系の変化、小胞体機能の変化などを指標に、細胞が示すストレス応答性を評価する手法を確立する。例えば、腸管上皮細胞 Caco-2 はケモカインや NGF を産生する (Satsu ら、Cytotechnology 2001, BBB 2003)。ケモカインは好中球やマスト細胞を誘引し、NGF はマスト細胞を刺激して脱顆粒を促し、それが上皮細胞の機能を障害し、アポトーシスを誘導する。このような細胞間相互作用のプロセスの存在を分子レベルで証明する。

(3) 第 3 の目的は、腸管での各種ストレス誘発性障害を予防、軽減する機能を持つ食品因子を探索することである。本研究で構築される、腸管での「ストレス→刺激・応答」プロセス観察のための新規実験系を応用して、食品中から機能性腸障害を抑制する作用を持つ機能成分を探索し、有用成分についてはその同定と作用機構の分子レベルでの解析を進める。

(4) 現在 IBS に関しては、その原因の一つがマスト細胞の活性化であると推定されているが (Barreau ら、Gut、2004)、本研究を進めることにより、例えば、それがどのように上皮細胞の障害 (炎症) に関わるかについての細胞レベル、分子レベルでの情報が得られ、「IBS に際して起こる腸管での細胞間相互作用」の一端が明らかになるものと考えられる。また、ここで構築されるモデル実験系を用いれば、腸管上皮での炎症を抑制する食品成分、炎症を加速する食品成分などの 1 次スクリーニングが可能になることから、これを用いて有用食品因子を見出し、その作用機構の解明や *in vivo* での有効性試験を進めることが容易になる。さらに、その新規機能性食品素材としての利用を企業とともに推進することを視野に入れて研究を展開していく。基礎研究としての意義に加えて、腸管での各種ストレス誘導性障害に対する有用な食品素材が見出されれば、新たな機能性食品開発につながる。IBS などの疾病が急増していることを考慮すると、本研究は社会的にも大きな貢献をし得ると考えている。

3. 研究の方法

(1) ヒト腸管上皮細胞としては Caco-2, T84, HT29 細胞、マウスの場合は戸塚准教授 (連携研究者) のグループが樹立した Mos13 細胞などを用いたが、主にプレート上や透過性膜上に単層培養したヒト株化細胞 Caco-2 を中心に研究を進めることにし、その培養条件等を再確認した。

(2) IBD に関わる炎症反応の解析のためには、マクロファージ様に分化させたヒト単球由来 THP-1 細胞を 24 ウェルあるいは 6 ウェルプレート上に培養し、これを上記の腸管上皮細胞単層と co-culture する系を用いた。THP-1 との co-culture によって障害が誘導された Caco-2 細胞内に起こる変化について DNA マイクロアレイの手法を用いて解析した。発現変動がみられた遺伝子については real-time RT-PCR で確認し、特に注目した遺伝子についてはノックダウン細胞を作製するなどして、その機能解析を進めた。

(3) IBS に関わる炎症反応の解析には、主としてヒトマスト細胞モデルである HMC-1 細胞あるいは ラット好塩基球由来 RBL-2H3 細胞を用いた。それらの機能の評価は、FCεR1 のような抗体受容体の発現、β-tryptase のような脱顆粒成分の分泌、TNF-α、IL-1βなどのサイトカイン類の発現 (real-time RT-PCR で測定) や分泌量 (ELISA 法) の測定により行なった。また細胞の形態観察や細胞内 LDH の放出量の測定により細胞の損傷等を評価することにした。さらに、インテグリン類などの細胞接着因子の発現量変化を測定するとともに、HMC 細胞の走化性を、多孔性膜を解した細胞遊走性試験により解析した。マスト細胞におけるこれらの指標が、Caco-2 細胞と co-culture することにより、あるいは Caco-2 細胞の培養上清を加えて培養することによってどのように変動するかを観察した。

(4) Co-culture によりマスト細胞からの刺激を受けた上皮細胞側のストレス応答は、ケモカイン (IL-8) の発現変化、炎症関連の転写因子 (NFκB) の活性変化や発現量変化、細胞層の電気抵抗値 (TER) を測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) 腸管上皮細胞とマクロファージの相互作用に関する知見

① DNA マイクロアレイ解析の結果、IBD のモデル系として構築した腸管上皮細胞 (Caco-2) とマクロファージ細胞 (THP-1) の co-culture 系において、Caco-2 細胞側で免疫、アポトーシスおよびタンパク質キナーゼカスケードに関与する遺伝子の発現の上昇が確認された。最も早く応答し、かつ発現量変動の大きいものとして転写因子 IEX-1 が見出された(論文リスト③④)。

② IEX-1 が腸管上皮の炎症反応の鍵分子である可能性について検討した。レンチウィルスの系を用いて IEX-1 を高発現あるいはノックダウンさせた Caco-2 細胞の特性を調べ

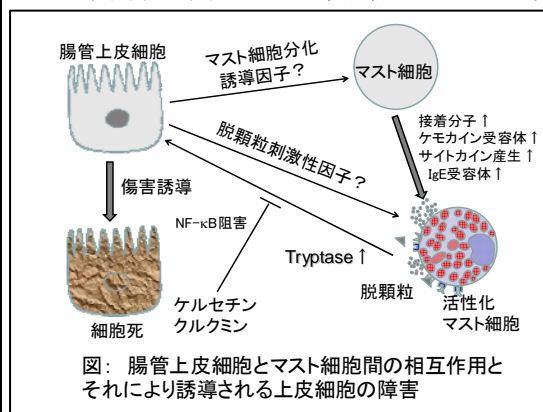
た結果、IEX-1 は腸管上皮細胞のアポトーシス誘導を抑制する分子として、ストレス条件下での細胞保護に寄与することが示唆された(論文リスト②)。また、傷害の誘導には TNF-α 受容体の発現変化が関わる可能性が示された。

(2) 腸管上皮細胞とマスト細胞の相互作用に関する知見

① マスト細胞として RBL-2H3 を使い、この細胞が産生する炎症性サイトカイン TNF-α の分泌量が Caco-2 細胞の培養上清 (Caco-2-CM) を添加することで変動するかどうかを検討した。その結果、Caco-2-CM は IgE で刺激した RBL-2H3 のサイトカイン産生亢進を抑制する傾向が見られた。ただし、RBL-2H3 細胞は性質が安定しないことから、それ以上の解析を断念した。

② 引き続き、ヒト由来細胞株 HMC-1 を用いて実験を行なった。まず HMC-1 に適用できる培養条件を検討した後、Caco-2 細胞と co-culture した結果、48 時間後に Caco-2 細胞の顕著な傷害が起こっていることが見出された。また HMC-1 細胞では、数時間の co-culture によって脱顆粒が起こっていることが見出された ((学会発表リスト①③④))。

③ Caco-2-CM を加えて HMC-1 を培養したところ、HMC-1 の FCεR1 や β-tryptase の発現量が、コントロールに比べて顕著に上昇することが見出された。また細胞の形態がわずかに変化するとともに、インテグリン類の一部 (α6、β7、ad など) の発現量が顕著に上昇した。フィブロネクチンでコーティングしたプレートへの HMC-1 の接着性も上昇した。孔径 8 μm の多孔性ファイターを介した細胞の遊走性試験でも、Caco-2-CM 存在下で培養した HMC-1 細胞の遊走性は上昇しており、さらに細胞表面のケモカイン受容体 CXCR2 等の発現量も上昇していることが観察された。このように、腸管上皮細胞は何らかの因子を細胞外に放出し、それによって、遊走してきたマスト細胞が分化~活性化し、腸管近傍に定着すること、定着したマスト細胞が放出する因子により、腸管上皮細胞が傷



害を起し、炎症反応が誘導されるといった一連の相互作用が起こっていることが示唆された(図参照)。

(3) 腸管上皮での炎症反応等に影響を及ぼす食品因子の探索

① マクロファージ様細胞により誘導される腸管上皮細胞の炎症反応において、IEX-1のようなタンパク質が抑制的に関わるが見出された。一方、各種ストレス刺激による腸管上皮細胞の炎症反応誘導を抑制するには、クロロゲン酸のようなフェノールカルボン酸が有用であることが見出された。クロロゲン酸の抗炎症反応の作用メカニズムやDSS 炎症モデルを用いたマウスでの抗炎症効果についても検討し、その効果を明らかにしつつある(論文リスト①)。さらに大豆イソフラボンおよびタウリンに関しても同様の抗炎症作用を見出している(論文リスト⑨および⑥)。

② マスト細胞により誘導される腸管上皮細胞の炎症反応を抑制する食品因子を、本研究で構築したモデル実験系を用いて探索した。その結果、クルクミンやケルセチンを添加することにより、マスト細胞と co-culture した腸管上皮細胞の傷害が顕著に抑制されることが見出された。この抑制作用には、これらの成分による腸管上皮細胞での NF κ B の活性化の阻害が関与していることが示された。このような知見は、食品の摂取によりマスト細胞が関わる腸管の炎症(すなわち IBS のような疾病)を制御できることを示唆するものと考えられる。

③ RBL-2H3 細胞上の抗原抗体反応によって誘導される TNF- α mRNA 発現及び脱顆粒をノビレチン、ヘスペレチン、タンジェレチンのようなメトキシフラボノイドが抑制するという結果を得た。

(4) その他の知見

炎症反応の誘導に関わるサイトカインである IL-8 の腸管上皮細胞における産生に影響を及ぼす食品因子の検討を進めた結果、Toll 様受容体 (TLR) を介した微生物や菌体成分などによる刺激によって細胞に誘導される IL-8 産生のうち、TLR1, 2, 5 を介したものがカルノシンのような食品ジペプチドによって、また TLR2, 5, 7 を介したものが乳酸菌類の産生する代謝産物である酪酸によって亢進すること、TLR3 を介したものは両者によって抑制されることが見出され、菌体成分等のストレスに曝された腸管上皮における免疫応答を食品因子が制御することが示された。

また、食品中に含まれるムコ多糖であるコンドロイチン硫酸の分解物であるオリゴ糖(特に2糖類)が、マクロファージにおいて

TLR9 を介して誘導される炎症性サイトカイン分泌を抑制することを見出し、その作用機構を明らかにした(論文リスト⑤)。

(5) まとめ

腸管上皮細胞と周辺の免疫細胞間には複雑な相互作用が存在することが、本研究で構築したモデル実験系から強く示唆された。特に、腸管上皮細胞から分泌される何らかの因子によりマスト細胞の分化が亢進し、マスト細胞の産生する β -tryptase のような因子が、腸管上皮細胞の傷害を誘導するという図式は IBS の発症においても認められる可能性があることから、これらの因子の解析は、IBS の予防や症状改善に役立つ情報を提供するものと考えられる。また、腸管上皮下に存在するマスト細胞の炎症性サイトカイン発現や脱顆粒は、上皮細胞由来の生理活性物質のみならず、経口的に摂取された食品成分によっても制御されていると考えられた。

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9件)

① Shin, H. S., Zhao, Z., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M., Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide on the induction of IL-8 production in human intestinal Caco-2 cells. Inflammation, 査読有、in press

② Ishimoto, Y., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M., IEX-1 suppressed apoptotic damage in human intestinal epithelial Caco-2 cells induced by coculturing with macrophage-like THP-1 cells. Biosci. Rep., 査読有、31, 345-351 (2011)

③ Ishimoto, Y., Satsu, H., Mochizuki, T., Totsuka, M. and Shimizu, M., In vitro analysis of the interaction between human intestinal epithelial cells and macrophage-like cells. Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, 査読有、16, 231-236 (2010)

④ Ishimoto Y., Nakai, Y., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M., Transient up-regulation of immunity- and apoptosis-related genes in Caco-2 cells cocultured with THP-1 cells evaluated by DNA microarray analysis. Biosci. Biotechnol. Biochem, 査読有、74, 437-439 (2010)

⑤ Jin, M., Iwamoto, T., Yamada, K., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M., Disaccharide derived from chondroitin

sulfate A suppressed CpG-induced IL-6 secretion in macrophage-like J774.1 cells. Cytokine, 査読有, 51, 53-59 (2010)

⑥ Shimizu, M., Zhao, Z., Ishimoto, Y. and Satsu, H., Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. Advances in Experimental Medicine and Biology, 査読有, 643, 265-271 (2009)

⑦ Natsume, Y., Ito, S., Satsu, H. and Shimizu, M., Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells. Toxicology, 査読有, 258, 164-175 (2009)

⑧ 清水 誠、腸管上皮の炎症抑制作用を持つアミノ酸・ペプチド、Functional Food, 査読無, 3, 95-99 (2009)

⑨ Satsu, H., Hyun, J. S., Shin, H. S. and Shimizu, M., Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 査読有, 55, 442-446 (2009)

[学会発表] (計 16 件)

① 田中大季、望月鉄之祐、清水 誠、複合培養系を用いたマスト細胞と腸管上皮細胞の相互作用解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 25 日-28 日、京都女子大学 (京都)

② 申 喜淳、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠、クロロゲン酸及びコーヒー酸による抗炎症作用とその機構解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 25 日-28 日、京都女子大学 (京都)

③ 望月鉄之祐、田中大季、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠、「腸管上皮細胞とマスト細胞の in vitro における相互作用の解析」、日本農芸化学会関東支部 2010 年度大会、2010 年 10 月 9 日、千葉大学 (千葉)

④ Tanaka, D., Mochizuki, T., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M., Construction of a co-culture model to analyze the interaction between human mast cells (HMC-1) and intestinal epithelial cells (Caco-2), International Meeting of Japanese Association of Animal Cell Technology (JAACT2010), 2010 年 9 月 1-4 日、北海道大学 (札幌)

⑤ 松川あゆみ、吉田綾子、清水 誠、戸塚 護、ストレスが誘導するアレルギー性の腸炎症モデルの構築、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)

⑥ 岩本 拓、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫、腸管上皮細胞においてTLRリガンドで誘導

されるサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用とその機構解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)

⑦ 石本容子、薩 秀夫、望月鉄之祐、戸塚 護、清水 誠、マクロファージ様細胞との複合培養により腸管上皮細胞が受ける障害の機構解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)

⑧ 尾形 悠、岩本 拓、伊東秀之、波多野 力、清水 誠、戸塚 護、ゲラニインがマウス小腸上皮細胞株のToll様受容体リガンド刺激で誘導されるインターロイキン6産生に与える影響、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)

⑨ 清水 誠、腸管上皮細胞における炎症と食品成分によるその制御 (特別講演)、金沢大学薬学シンポジウム、2010 年 2 月 12 日、金沢大学 (金沢)

⑩ 清水 誠、食品による腸管機能の制御と機能性食品 (特別講演)、第 3 回食品薬学シンポジウム、2009 年 11 月 12 日、近畿大学 (大阪)

⑪ 岩本 拓、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫、腸管上皮細胞のサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用、セラミド研究会、2009 年 11 月 6 日、北海道大学 (札幌)

⑫ 申 喜淳、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠、炎症刺激による腸管上皮IL-8産生亢進に対するクロロゲン酸およびコーヒー酸の抑制作用機構の解析、日本農芸化学会関東支部 2009 年度大会、2009 年 10 月 31 日、玉川大学 (東京)

⑬ Shimizu M., Role of functional food factors for intestinal immune function (invited lecture), 2nd Italy-Japan Symposium on Food and Health: past, present and future, 2009 年 10 月 22 日、日伊会館 (東京)

⑭ 丸山裕美、孫 動玉、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠、Toll様受容体刺激した腸管上皮細胞からのIL-8産生に対するカルノシンの産生調節作用、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、マリンメッセ福岡 (福岡)

⑮ Ishimoto, Y., Satsu, H., Mochizuki, T., Totsuka, M. and Shimizu M., In vitro analysis of the interaction between human intestinal epithelial cells and macrophage-like cells, 2008 International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2008)、2008 年 11 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑯ 申 喜淳、趙 朝輝、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠、炎症刺激による腸管上皮IL-8産生亢進に対するクロロゲン酸の抑制作用-機

構解析と構造活性相関、日本食品免疫学会第
4回学術会議(JAFI2008)、2008年5月13日、
こまばエミナース（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 誠 (SHIMIZU MAKOTO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教
授
研究者番号：30114507

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

戸塚 護 (TOTSUKA MAMORU)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授
研究者番号：70227601

薩 秀夫 (SATSU HIDEO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号：80323484