

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 25 日現在

機関番号：13801

研究種目：「基盤研究（C）」

研究期間：2009～2011

課題番号：21580136

研究課題名（和文） 食物繊維による小腸ムチン分泌促進機序の解析とその新たな栄養生理意義の探索

研究課題名（英文） RESEARCH FOR THE MECHANISM OF MUCIN SECRETORY EFFECTS BY DIETARY FIBER AND ITS PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE

研究代表者

森田 達也（MORITA TATSUYA）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332692

研究成果の概要（和文）：腸管粘膜は表皮と同様に、機械的、化学的刺激や無数の外来抗原、細菌等の異物に曝されている。そのため、腸管粘膜は厚い粘液層で覆われている。この粘液の主成分がムチンである。食物繊維（DF）の摂取が小腸ムチン分泌量に及ぼす影響を解析した。DFは水溶性と不溶性に大別されるが、摂取した DF は水溶性では消化管内での粘性に、不溶性では嵩に比例してムチン分泌細胞である杯細胞を増加させ、その結果、小腸内ムチン量を増加させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mucin is a key component of the gut barrier that prevents potential pathogens and antigens from gaining access to the underlying epithelium. The study examined physicochemical properties of dietary fiber (DF) that determine small intestinal mucin secretion. It turned out that small intestinal mucins were secreted in proportion to the settling volume in water (bulk-forming properties) of water-insoluble DF or the viscosity of water-soluble DF. The stimulatory effects of both soluble and insoluble DF on mucin secretion appear to be linked to the subsequent increase in goblet cell number.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

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：栄養化学，食物繊維，ムチン

1. 研究開始当初の背景

従来の研究から食物繊維（DF）には多彩な生理作用が知られているが、これらの作用は同時に摂取した DF と栄養素との消化管内における相互作用（栄養素の利用速度を介した脂質および糖質代謝の修飾）を反映した結果であった。一方、DF 自体の消化管に対する作用を研究した例は国内外ともに限られてい

る。以前から、ある種の DF の摂取は小腸内ムチン量を増加させることが知られていたが、どのような DF が、どのような機序で小腸ムチン分泌促進作用を発現し、どのような栄養生理意義を持つのか未解明である。

本研究では、水溶性食物繊維（SDF）についてもムチン分泌促進の要因を特定し、ムチン分泌を促進する IDF と SDF に共通する消化

管内挙動の特性からムチン分泌促進作用機序の解明を試みる。また、ムチンペプチド骨格の 1/3 は必須アミノ酸であるスレオニン (Thr) によって構成されるが、外分泌されたムチン由来の Thr は腸管で回収されない。しかし、DF 摂取時のムチン分泌亢進状態が必須アミノ酸栄養にもたらす影響は、現在のところ検討されていない。

2. 研究の目的

(1) 「水溶性食物繊維のムチン分泌促進作用をその物理化学的性質から解析すると同時に、杯細胞への分化誘導の観点から食物繊維によるムチン分泌促進機序を解明する」

著者らはこれまで、小腸において不溶性食物繊維 (IDF) は水中沈定体積 (SV) に応じてムチン分泌を促進し、villus 当たりの杯細胞数を増加させることを明らかにした。一方、SDF では、分子量の異なるグルコマンナン (GM) をラットに摂取させた場合、小腸ムチン分泌量は摂取した GM の分子量に比例し、セルラーゼの同時摂取で消失する現象を観察している。また、高分子 GM の摂取は、SV 値の高い IDF を摂取した時と同様に杯細胞数を増加させる。高分子多糖の水溶液中粘度は大まかには分子量に比例する。そこで、「SDF の小腸ムチン分泌促進作用は摂取する SDF の粘性または粘弾性に比例する」との仮説を立て、それを証明する。また、IDF と SDF は異なる物理化学的性質を持つが、双方とも杯細胞数と小腸ムチン分泌量を増加させることから、申請者は SV 値の高い IDF と粘性の高い SDF に共通する消化管内挙動として、蠕動運動に特徴的な「push-through 運送」に伴って生じる腸管内腔圧の上昇を推定している。DF 摂取により内腔圧の影響を強く受けるのはクリプトである。クリプトには未分化の幹細胞が存在し、notch シグナルと下流の Hes-1、Math-1 や NGN-3 gene の制御によって吸収上皮、内分泌、杯、およびパネート細胞へ分化する (Endocrinology, 145: 2639, 2004)。そこで、「DF 摂取は腸管内腔圧を上昇させ、クリプトの圧受容体、もしくは幹細胞の細胞骨格の変化を介して杯細胞への分化を促進する」という仮説を立て、それを検証する。解析には、局所的に腸管内腔圧を上げるモデルを作成し、notch シグナルの変動を分子生化学的手法で解析する。作用が局所的であれば、圧受容体が存在する可能性が高いと考えている

(2) 「食物繊維 (DF) 摂取によるムチン分泌促進を介した内因性スレオニン (Thr) ロスを定量解析する」

ムチンのペプチド骨格を構成するアミノ酸の 1/3 は Thr であり、一方、経口摂取した Thr は他のアミノ酸 (15-30%) と異なり、実に 60% が上皮細胞によって消費される (Am J

Clin Nutr, 59: 70, 1994)。しかし、分泌されたムチン由来の Thr は大腸で腸内細菌に酸化され、結果、宿主には回収されず内因性の Thr ロスとなる。定常状態または DF によるムチン分泌促進状態において、ムチン由来の Thr が「必須アミノ酸としての Thr 要求量」のうち、どれほどの割合を占めるのか不明である。また、申請者は DF 摂取による小腸ムチン分泌量の増加が、同時に摂取する食餌タンパク質で異なり、大豆タンパク (カゼインにくらべ Thr 含量が 15% 低い) では認められないことを観察している (未発表)。そこで本研究では、「ムチン由来の Thr ロスを定量解析すると同時に、DF によるムチン分泌促進状態における Thr 要求量の変動を解析する」ことを目的とする。解析には、回腸-直腸バイパスラットを用いる。本ラットの糞では、小腸で分泌されたムチンとムチン由来 Thr を定量的に回収できるからである

3. 研究の方法

(1)-① 「粘度の異なる各種 SDF 摂取時の小腸内ムチン分泌量、杯細胞数の変動を解析する」

実験には、SDF として平均分子量が 1000~2000、1000、15 Kda のグルコマンナンおよびグアガム (200~300 Kda)、サイリウム、低分子化グアガム (~50 Kda)、アルギン酸 Na (~100 Kda) および低メトキシペクチン (~60 Kda) を用いる。対照飼料 (25%カゼインをタンパク質源とする) に加え、上記の各種 SDF を 5% 含む試験飼料を調製し、2 週間、ラットに摂取させ一晩の絶食後、小腸内容物を回収し、次いで、空腸および回腸末端 5cm を組織標本のため中性ホルマリン中に回収する。既報に従い (Tanabe et al., J Nutr, 135: 2431, 2005)、小腸内容物からムチン画分を調製し、これを適宜希釈 (1000-5000 倍) して α -結合性糖鎖当量の測定 (ムチン指標) と申請者らが新たに開発した ELISA (Tanabe et al., Biosci Biotechnol Biochem, 71: 575, 2007) の両方でムチンを定量する。腸組織切片は PAS 染色を施した後、villus あたりの総杯細胞数を計測する。

(1)-② 「IDF および SDF 摂取時の小腸上皮細胞の Turn-Over Rate を解析する」

IDF に発泡スチロール粉末 (PSF; SV 値 12mL/g)、SDF にはグルコマンナン (GM; 分子量 2000Kda) を用いる。対照飼料に加えて、PSF または GM を 5% 含む試験飼料を調製し、2 週間、ラットに摂取させた後、非絶食下で 50 mg/kg の bromo-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、18 時間後に解剖を行ない上記と同様の腸管部位を中性ホルマリン中に回収する。組織切片を調製した後、常法に従いマウス抗 BrdU 抗体と反応させ、酵素抗体法 (ペルオキシダーゼ系) による BrdU 染色細胞の

検出を行なう。顕微鏡下で、villus height、villus 当たりの全細胞数、およびクリプトから BrdU を取り込んだ細胞の到達位置までの細胞数を計測する。

(2) 「食物繊維によるムチン分泌促進状態における Thr 要求量の変動を解析する」

25%のカゼイン (CAS) または大豆タンパク質 (SPI) をタンパク質源とした飼料に加え、それぞれに 5% PSF を添加した CAS/PSF、SPI/PSF 飼料、さらに 0.15%の Thr を添加した CAS/PSF/Thr および SPI/PSF/Thr 飼料を摂取する計 6 群を設け、10 日間ラットを飼育した後、小腸内ムチン分泌量を測定し、両タンパク質間でのムチン分泌促進状態に対する応答の相違が飼料中 Thr 濃度の違いによることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 「水溶性食物繊維のムチン分泌促進作用をその物理化学的性質から解析すると同時に、杯細胞への分化誘導の観点から食物繊維によるムチン分泌促進機序を解明する」

食物繊維 (DF) に代表されるルミナコイド (luminacoids) には多種多様の生理作用が知られているが、それらの作用は同時に摂取した DF と栄養素との消化管内における相互作用 (栄養素の利用速度を介した脂質・糖質代謝の調節) を反映したものであった。一方、DF 自体の消化管に対する作用を研究した例は限られている。ここでは、演者らが DF 摂取時の小腸ムチン分泌促進機構について DF の物理化学的性質から解析を試みた結果を報告する。

不溶性食物繊維 (IDF) の解析には種々の物理化学的性質を除外し、嵩の効果のみを評価できるモデル素材として発泡スチロール粉末 (PSF 粉末) を用いた。PSF は発泡度を調節することで、嵩のみを変化させることができる。IDF の嵩効果は水中沈定体積 (SV) として数値化した。その結果、SV 値の異なる PSF を添加した飼料を摂取させたとき、ラットの腸ムチン量は SV 値の上昇に比例して増加し、この法則性は SV 値の異なる天然の IDF にも適用できることが明らかになった。次いで、嵩効果による小腸ムチン量および腸上皮の杯細胞 (ムチン分泌細胞) 数の変動を慎重に測定し、PSF 摂取の有無によるムチン分泌促進作用の発現と消失はともに 3-5 日目で起こることを見出した。嵩効果は腸上皮細胞の turnover と連動すると考えられる。

一方、水溶性食物繊維 (SDF) の溶液中粘度は同一種内ならほぼ分子量に比例する。コンニャクマンナン (KM) 添加飼料では、小腸ムチン量および杯細胞数は KM の分子量に応じて増加し、これらの変化はセルラーゼの同時摂取で完全に消失した。そこで、グアガム、サイリウムなど数種の SDF について 1%

水溶液の粘度を測定し、ズレ速度 50~500s の粘度カーブ下面積 (LogAUC) を算出したところ、これらの SDF 摂取時の小腸ムチン量および杯細胞数は LogAUC と強い正の相関を示した。このように SDF では粘度上昇がムチン分泌を促進する。ところが、PSF や KM を摂取したラットの腸上皮細胞を採取し、小腸ムチンの主要分子種である Muc2、Muc3 の mRNA 発現量を測定しても有意な変化は認められず、Muc3 ではむしろ低下する結果が得られた。したがって、IDF や SDF 摂取時のムチン分泌促進作用は杯細胞への分化促進を介した基礎分泌量の増大によると考えられる。

以上、IDF と SDF は異なる物理化学的性質を示すにもかかわらず、腸上皮に対して共通の作用を示す。これについて演者らは、SV 値の高い IDF と粘性の高い SDF に共通する作用は、腸管の蠕動運動に特徴的な「push-through 移送」に伴って生じる腸管内腔圧の上昇に基づくものと推定している。DF 摂取により腸内腔圧の影響を強く受けるのはクリプトである。クリプトには未分化の幹細胞が存在し、notch シグナルの制御によって吸収上皮、内分泌および杯細胞などへ分化する。事実、IDF や SDF の摂取はともに腸上皮細胞での Hes-1 発現量の減少と Math-1 発現量の増加をもたらす。現在、演者らは「DF 摂取は腸管内腔圧を上昇させ、クリプトの圧受容体を介して杯細胞への分化を促進する」と考え、その検証に取り組んでいる。ところで、小腸ムチン分泌を制御する DF の法則性には例外がある。ペクチンはその粘性や杯細胞の増加とは無関係に小腸ムチン量を増加させた。これにはペクチン分子中のガラクトースと腸上皮ガレクチンの相互認識が一定のシグナルを発しムチン分泌を促進している可能性が高い。

(2) 「食物繊維 (DF) 摂取によるムチン分泌促進を介した内因性スレオニン (Thr) ロスを定量解析する」

SPI 群の飼料摂取量は SPI+PSF 群に比べ、また SPI 群の体重増加量は CAS 群に比べ有意に低い値を示したが、他の群間で差は認められなかった。O-結合性糖鎖当量として測定した小腸内容物中ムチン量 (以下、小腸ムチン量) は CAS 群に比べ CAS+PSF 群では有意な増加を示したが、SPI と SPI+PSF 群間に差は認められなかった。一方、ムチン画分中のシアル酸含量は食事タンパク質に係わらず、PSF 添加により有意な増加を示した。

PAS 陽性の杯細胞数は CAS+PSF 群でのみ有意な増加を示し、SPI+PSF 群では杯細胞数の増加は認められなかった。ムチンは遺伝子コード以外に、それらの構成糖の特徴から中性ムチン、sialo-mucin (AB 陽性) および sulfo-mucin (HID 陽性) に分類されるが、PSF の摂取は食事タンパク質に係わらず AB 陽性

杯細胞を有意に増加させ、逆に HID 陽性杯細胞を有意に減少させた。CAS+PSF 群では AB 陽性杯細胞の増加 (171% vs. CAS) が HID 陽性杯細胞の減少 (-46% vs. CAS) を上回るため、PAS 染色による総杯細胞数は CAS 群に比べ有意な増加を示したと考えられる。

ムチン関連遺伝子はヒト同様ラットでも小腸・大腸では分泌型ムチンである Muc2 と膜結合型ムチンである Muc3 が主であり、杯細胞 (Muc2, Muc3) および吸収上皮細胞 (Muc3) で発現している (10)。PSF 摂取は CAS, SPI に係わらず Muc2 発現量を増加させ、逆に Muc3 では減少させる傾向を示したが有意な変化ではなかった。一方、ムチン糖鎖の修飾に関する sialyltransferase および sulfotransferase をコードする Siat4c および Gal3ST4 は、PSF の要因により Siat4c では有意な増加を、Gal3ST4 では減少を示した。

食物繊維摂取による小腸ムチン分泌促進作用は、必ずしも Muc2 の発現上昇を伴わず Muc3 ではむしろ低下することから、その分泌促進作用は杯細胞への分化促進を介した基礎分泌量の増大によると考えられている。本試験でも CAS+PSF 群では CAS 群に比べ小腸ムチン量 (0-結合性糖鎖当量) の有意な上昇が観察されたが、食事タンパク質を SPI としたとき食物繊維摂取時のムチン分泌促進作用は認められなかった。一方、回腸粘膜の総杯細胞数 (PAS 陽性) も SPI と SPI+PSF 群間に差は認められなかったが、AB 陽性杯細胞は SPI+PSF 群でも CAS+PSF 群と同程度に増加していた。この結果はムチン画分中のシアル酸含量や回腸粘膜の Siat4c 発現量の変動に呼応していた。以上、本試験で観察された SPI と CAS での応答性の相違が Thr 含量の差に、あるいは Met をはじめとする必須アミノ酸パタンの相違に起因するものか、今後はアミノ酸の補足試験をとおして検討を行う予定である。

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 17 件)

- ① Hino, S., Ito, H., Bito, H., Kawagishi, H., Morita, T.: Ameliorating effects of short-chain inulin-like fructans on the healing stage of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, in press. (査読あり)
- ② Ito, H., Takemura, N., Sonoyama, K., Kawagishi, H., Topping, D.L., Conlon, M.A., Morita, T.: Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin A

secretion in the rat cecum. *J Agric Food Chem*, 59, 5771-5778 (2011). (査読あり)

- ③ Sonoyama, K., Ogasawara, T., Goto, H., Yoshida, T., Takemura, N., Fujiwara, R., Watanabe, J., Ito, H., Morita, T., Tokunaga, Y., Yanagihara, T.: Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice. *Brit J Nutr*, 103: 218-226 (2010). (査読あり)
- ④ 伊藤弘幸、加藤俊彦、河田伊織、尾藤寛之、河岸洋和、桐山修八、森田達也: トリニトロヘンセンスルホン酸を用いた再発大腸炎モデルの免疫学的解析. *日本食物繊維学会誌*, 14: 33-44 (2010). (査読あり)
- ⑤ Takemura, N., Hagio, M., Ishizuka, S., Ito, H., Morita, T., Sonoyama, K.: Inulin prolongs survival of intragastrically administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the gut of mice fed a high-fat diet. *J Nutr*, 141: 1963-1969 (2010). (査読あり)
- ⑥ Goto, H., Takemura, N., Ogasawara, T., Sasajima, N., Watanabe, J., Ito, H., Morita, T., Sonoyama, K.: Effects of fructo-oligosaccharide on DSS-induced colitis differ in mice fed non-purified and purified diets. *J Nutr*, 140: 2121-2127 (2010). (査読あり)
- ⑦ Ito, H., Tanabe, H., Kawagishi, H., Wada, T., Sugiyama, K., Kiriya, S., Morita, T.: Short-chain inulin-like fructans reduce endotoxin and bacterial translocations and attenuate the development of TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*, 54: 2100-2108 (2009). (査読あり)
- ⑧ Ito, H., Eiko, A., Sugiyama, K., Sonoyama, K., Kiriya, S., Morita, T.: Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *J Nutr*, 139: 1640-1647, (2009). (査読あり)
- ⑨ Sonoyama, K., Fujiwara, R., Takemura, N., Ogasawara, T., Watanabe, J., Ito, H., Morita, T.: Response of Gut Microbiota to Fasting and Hibernation in Syrian Hamsters. *J Applied and Environmental Microbiology*, 75: (20), 6451-6456, (2009). (査読あり)
- ⑩ 伊藤弘幸、加藤俊彦、河田伊織、森田達也、桐山修八: ルミナコイトの嵩形成能および発酵性カラット小腸および盲腸でのムチン分泌に及ぼす影響. *日本食物繊維学会誌*, 13: 107-117 (2009). (査読あり)

[学会発表] (計 30 件)

- ① 伊藤文乃、土井彩友美、河田伊織、日野真吾、森田達也: 食物繊維による杯細胞増加

作用は中心静脈栄養、経管（胃瘻）栄養時にも観察される、第 16 回日本食物繊維学会、講演要旨集 pp40-41、国立健康栄養研究所、2012 年 11 月 26 日。

② 日野真吾、最田裕善、森田達也：除菌ラットにおける食物繊維摂取時の杯細胞数増加作用；エンドトキシン関与の解析、第 16 回日本食物繊維学会、講演要旨集 pp34-35、国立健康栄養研究所、2012 年 11 月 26 日。

③ 尾藤寛之、日野真吾、園山慶、森田達也：ペクチンの化学情報は、杯細胞からのムチン分泌を促進すると同時に、腸間膜リンパ節の Th-1/Th-2 バランスを修飾する、第 16 回日本食物繊維学会、講演要旨集 pp42-43、国立健康栄養研究所、2012 年 11 月 26 日。

④ 半田 圭、尾藤寛之、伊藤弘幸、日野真吾、森田達也：キトサン摂取は杯細胞数の変動とは無関係に小腸ムチン分泌量を増加させる。65 回日本栄養・食糧学会大会、要旨集 p217、東京、お茶の水女子大学、2011 年 5 月 15 日。

⑤ 河田伊織、福田智紀、伊藤弘幸、日野真吾、森田達也：高体積・高粘度食物繊維の摂取による小腸杯細胞応答は期間非依存的なシアロムチン分泌型の増加による。65 回日本栄養・食糧学会大会、要旨集 p219、東京、お茶の水女子大学、2011 年 5 月 15 日。

⑥ 伊藤弘幸、福田智紀、森田明雄、河岸洋和、森田達也、桐山修八：食事タンパク質の相違が食物繊維摂取時の小腸内ムチン分泌促進作用に及ぼす影響。P74-75。第 15 回日本食物繊維学会・学術集会、札幌、2010 年 11 月 26 日。

⑦ 河田伊織、土井彩友美、伊藤弘幸、森田明雄、河岸洋和、森田達也、桐山修八：高体積・高粘度食物繊維の摂取による小腸杯細胞応答は期間非依存的なシアロムチン分泌型の増加による。P72-73。第 15 回日本食物繊維学会・学術集会、札幌、2010 年 11 月 26 日。

⑧ 齋藤大輔、伊藤弘幸、杉山公男、桐山修八、森田達也：低メトキシペクチン摂取時の小腸ムチン分泌量の増加には胃、空腸における Muc2 発現量の上昇を伴う。P84、第 64 回日本栄養・食糧学会、徳島、徳島大学、2010 年 5 月 21 日。

⑨ 伊藤弘幸、加藤俊彦、河田伊織、森田明雄、杉山公男、森田達也：フルクタン摂取時の盲腸ムチン濃度は重合度により異なる、p84、第 64 回日本栄養・食糧学会、徳島、徳島大学、2010 年 5 月 21 日。

⑩ 加藤俊彦、伊藤弘幸、杉山公男、森田達也、武村直紀、園山慶、桐山修八：フルクタン摂取の大腸生理機能に及ぼす影響は重合度により異なる、第 63 回日本栄養食糧学会大会 講演要旨集、p126、長崎、長崎シーボルト大学、2009 年 5 月 21 日。

⑪ 伊藤弘幸、河田伊織、杉山公男、桐山修八、森田達也：食物繊維の嵩と発酵性は腸管ムチン分泌を促進する要因となるが、それら

の作用様式は発現部位によって異なる、第 63 回日本栄養・食糧学会大会 講演要旨集、p126、長崎、長崎シーボルト大学、2009 年 5 月 21 日。

〔図書〕（計 2 件）

森田達也：レジスタントプロテインの生理作用、「消化管の栄養・生理と腸内細菌」（HindGut Club Japan 編）、pp303-309、日本メディア社（2011 年 1 月）

森田達也：ルミナコイド研究の展望（序章）、pp1-3 小腸ムチン分泌を支配する物性と化学情報（第一編 第一章）、pp7-30、「ルミナコイド研究のフロンティア」、日本栄養・食糧学会 監修、海老原 清、早川享志、奥 恒行 責任編集、建帛社、2010 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 達也（モリタ タツヤ）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332692

