

機関番号：15401
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780117
 研究課題名 (和文) メタボリックシンドロームにおける消化管バリア機能低下とそれを防ぐ食品成分の探索
 研究課題名 (英文) Characterization of intestinal barrier defect in metabolic syndrome and the ameliorative effect of food factors
 研究代表者
 鈴木 卓弥 (Suzuki Takuya)
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師
 研究者番号：30526695

研究成果の概要 (和文)：

メタボリックシンドロームにおける、消化管バリア機能低下の要因を究明するため、動物モデルと培養細胞を用いて研究を実施した。メタボリックシンドロームモデルラットでは、小腸でタイトジャンクションタンパク質の発現低下に伴い、消化管バリア機能の低下が引き起こされた。これは、肥満のものではなく、食事由来の過剰な脂質とそれに伴う胆汁の分泌の増加によることが証明された。

研究成果の概要 (英文)：

Studies using animal and cell culture models were conducted to investigate the mechanism(s) underlying the intestinal barrier defects in metabolic syndrome. The barrier defect was induced in the small intestines of the diet-induced obese rats, which was associated with the decreases in the tight junction protein expression. The experiment using the cultured intestinal cells showed that the barrier defect was induced by excessive dietary lipid and subsequent bile juice secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：栄養科学

1. 研究開始当初の背景

心血管障害の高リスクであるメタボリックシンドロームの該当者は、我が国でも940万人の多数にのぼり、その発症と進展のメカニズムの解明、それを予防・改善しうる効果的な手段の探索は急務である。近年、当該疾病における軽度の全身慢性炎症反応が注目されており、特に病態の中核をなす内臓脂肪

組織の炎症性変化の病態生理的意義が注目されている。一方で、種々の炎症性疾患においてエンドトキシン血症が認められることが報告され、これらの病態における消化管透過性の上昇（消化管バリア機能の低下）が指摘されている。近年我々は、アルコール性肝疾患における消化管バリア機能低下機序に関する研究を報告し、また食餌誘導性メタボ

リックシンドロームモデルラットで消化管バリア機能が低下することを見出した（未発表データ）。我々は、この原因の1つとして内臓脂肪組織が解剖学的に消化管に隣接することから、その炎症性変化が消化管バリア機能に影響し、さらにそのバリア機能低下によるエンドトキシンの流入が病態を悪化させると推測している。アルコール性肝疾患で消化管バリア機能が低下することは古くから知られているが、メタリックシンドロームと消化管バリア機能を関連づける研究に着手しているのは、国内外問わず、申請者らを除いては知られていない。

消化管バリア機能の低下によって血液中に流入するエンドトキシンは、我々の消化管（特に大腸）に由来し、その侵入は消化管バリア機能によって制限されている。消化管バリア機能を制御するタイトジャンクション（TJ）は、4つの膜貫通型タンパク質（Occludin, Claudins, Tricellulin, JAMs）とそれらの裏打ちタンパク質に構成され、その機能は生体内の液性因子、消化管内の一部の栄養素や食品因子による影響を受けることが知られている。我々は、腸内微生物の代謝産物である短鎖脂肪酸（SCFA、特に酢酸とプロピオン酸）が消化管バリア機能を高めること、そして一方で、高発酵性の難消化性糖類（大腸内でSCFAを生成する）が、メタリックシンドロームの病態を軽減することを報告した。これらの実験的事実は、難消化性糖類の摂取が消化管バリア機能の改善を通して、メタリックシンドロームを改善すること、消化管バリア機能が共生する腸内微生物による調節を受けることを提案している。難消化性糖類の摂取により、そのプロファイルが大きく変化する常在腸内微生物は、直接的あるいは間接的に（分泌タンパク質、代謝産物を介して）、宿主の生理機能を調節することが報告されている。しかしながら、それらの消化管バリア機能への影響はほとんど知られておらず、我々が報告した短鎖脂肪酸に加えて、微生物自身やその分泌タンパク質に関する、さらなる探索と解析が必要である（「正」・「負」の両方向の作用）。

2. 研究の目的

申請課題は、メタリックシンドロームに関わる消化管バリア機能の低下を解析し、当該現象における内臓脂肪組織の炎症性変化と腸内微生物の関わり合いを探索する。併せて、難消化性糖類にバリア機能亢進作用という新たな生理機能を提案し、その作用機序の解明を目指す。続いて、難消化性糖類によるバリア機能亢進作用の活性本体と考えられる、腸内微生物あるいはその分泌タンパク質を利用した食品因子の開発につなげる。以下に、本研究期間内に明らかにしようとする5

つの具体的課題を示し、それらへの取り組みについての説明を加える。

(1)メタリックシンドロームにおける消化管バリア機能低下の解析と位置づけ

メタリックシンドローム発症ラットを用い、個体レベルにて、消化管バリア機能低下をその病態の1つとして位置づける。また、バリア機能の低下を認める消化管部位を特定するとともに、その低下に関与する TJ 分子を同定する。

(2)消化管バリア機能の低下と腸間膜脂肪組織の炎症性変化、腸内微生物の相互作用の解析

メタリックシンドローム発症ラットの大腸内環境の多角的解析、腸間膜脂肪組織と血液中のサイトカインの解析に基づき、消化管バリア機能の低下、調節に関わる消化管内因子・血液内因子を推定同定する。

(3)消化管バリア機能の低下に関与する、消化管内因子・血液内因子の相互作用と作用メカニズムの探索

in vivo 系[(1), (2)]の解析結果を基に、消化管上皮培養細胞を用いて、メタリックシンドロームにおける消化管バリア機能低下の作用点、作用機序を明らかにする。消化管バリア機能の低下に関わる因子（腸内微生物、代謝産物、サイトカインなど）の直接的証拠を獲得し、TJ 分子の質的・量的動態、細胞内シグナル経路を同定する。

(4)メタリックシンドロームの改善・予防における難消化性糖類の役割とその作用機序の探索

難消化性糖類をメタリックシンドローム発症ラットに摂取させ、消化管バリア機能の改善作用メカニズムを探索する[病態の改善作用も含め、(1)~(3)で同定された TJ 分子、消化管内・血液内因子を中心に解析]。さらに、腸内微生物とその分泌タンパク質の解析から、消化管バリア機能に「正」に作用する因子を探索する。

(5)腸内微生物に着目した、消化管バリア機能亢進因子の探索

(4)の成果を基に、消化管上皮細胞を用いて、消化管バリア機能を亢進する因子を単離・同定する。消化管バリア機能の改善を介して疾病予防を可能にする、新たな高機能食品成分の開発に着手する。

3. 研究の方法

食餌誘導性および遺伝性メタリックシンドローム動物（ラット）を用いて、個体レベルでの消化管バリア機能の評価、各消化管部位のバリア機能の解析を実施する。続いて、消化管バリア機能の低下に関わるタイトジャンクション(TJ)分子を同定するとともに、それを誘導する消化管内因子（腸内微生物、代謝産物など）と血液内因子（サイトカイン

など)を推定同定した後、ヒト消化管上皮細胞 Caco-2 を用いて、その作用機序を解明する。

(1) 食餌誘導性メタボリックシンドロームモデル(高脂肪食摂取)に、遺伝的メタボリックシンドロームモデル(OLETFラット、対照ラットLETO)を組み合わせ、MSにおける消化管バリア機能の変化、およびその要因を探索した。LETOおよびOLETFラットに標準食、あるいは高脂肪食を16週間摂取させ、消化管バリア機能の解析を実施した(2 x 2 = 4群)。バリア機能マーカーの透過性試験と血液中エンドトキシン濃度測定、摘出した消化管とユッシングチャンバーシステムを用いた、各消化管部位のバリア機能の解析を実施した。またメタボリックシンドローム発症の指標として、飼育期間2、8、15週目に耐糖能試験を実施した。

(2) (1)にて、バリア機能の低下が認められた消化管部位について、TJ分子(Occludin, Claudins など)の発現・細胞内局在を免疫学的手法(ウェスタンブロット、免疫染色など)により解析し、バリア機能低下に関わる分子を同定した。

(3) ヒト消化管上皮細胞 Caco-2 を用い、過剰な食餌性脂質、胆汁による消化管バリア機能への直接的影響を解析した。具体的には、Caco-2細胞を2層式のTranswellシステムに培養し、その刷子縁膜側から脂質エマルジョン(0.1-1.0%大豆油)、胆汁(2.5-20%)を作用させた。胆汁は、高脂肪食を摂取させたラットの胆管から採取した。消化管バリア機能の評価として、透過性の指標である経上皮電気抵抗値(TER)、Lucifer yellow (LY)透過速度を測定し、またImmunoblot法により各種タイトジャンクション(TJ)タンパク質発現量を解析した。

4. 研究成果

OLETFラットは、対照のLETOラットに比べて、顕著な肥満を呈した。高脂肪食の摂取も、両ラット系統において体重増加を誘導した。併せて、OLETFラットおよび高脂肪食摂取ラットは、メタボリックシンドロームに特徴的な耐糖能異常を引き起こした(図1)。両ラット系統において、高脂肪食の摂取は消化管バリア機能の低下を誘導し、それは小腸のタイトジャンクション(TJ)タンパク質Occludin, Claudin-1, Claudin-3, JAM-1の発現量の低下と相関した(大腸での差異は認められなかった、図2と3)。一方、標準食を摂取したOLETFラットの消化管バリア機能は、対照LETOラット(標準食群)と同程度であり、消化管TJタンパク質発現量(小腸、大腸)にも系統間の差異は認められなかった。これら結果は、蛍光免疫染色法によっても確認された(図4)。また高脂肪食摂取は、血

液中の総胆汁酸濃度を上昇させ、消化管内への胆汁分泌が上昇していることを示唆していた。

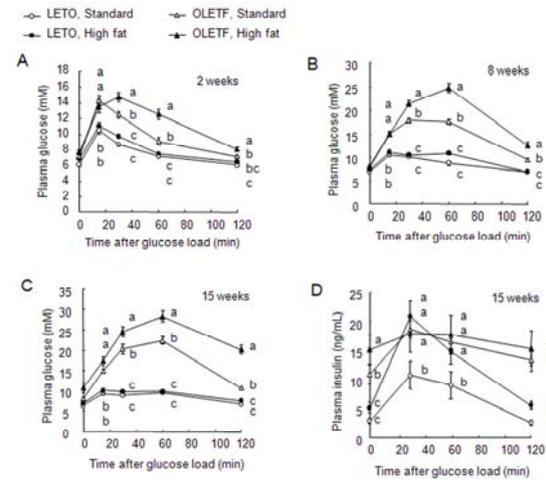


図1. 食餌性、遺伝性メタボリックシンドロームラットにおける耐糖能

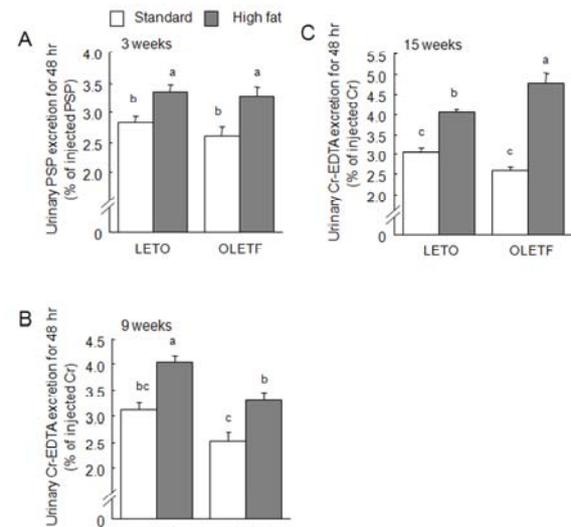


図2. 食餌性、遺伝性メタボリックシンドロームラットにおける消化管透過性

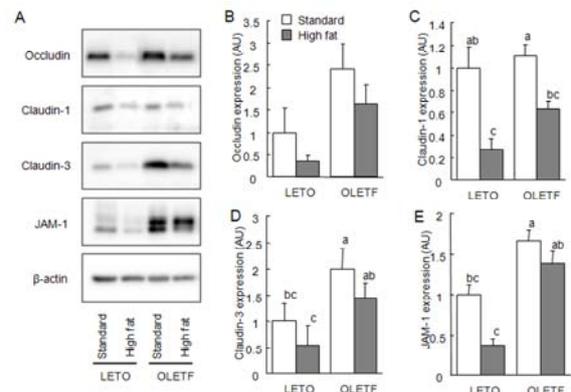


図3. 小腸におけるタイトジャンクションタンパク質発現量(ウェスタンブロット法)

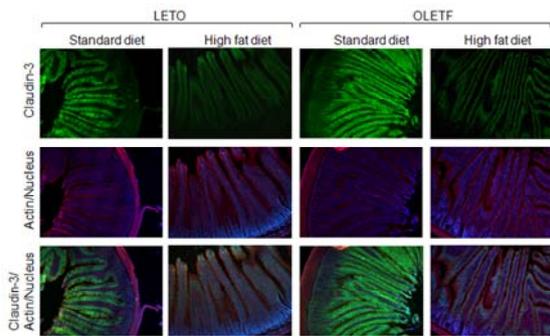


図4. 小腸におけるタイトジャンクションタンパク質発現量（蛍光免疫染色法）

動物試験の結果を総括すると、MSでは大腸ではなく、小腸においてバリア機能低下が認められ、それは肥満自体ではなく、消化管内に流入する脂質の増加、それによる胆汁流入量の増加に起因することが示唆された。すなわち、過剰な脂質、胆汁が小腸上皮細胞のTJタンパク質の発現量を低下させ、小腸の透過性を高めていることが推測された。

消化管上皮細胞モデル Caco-2 において、ラット胆汁と過剰な脂質は、それぞれ濃度依存的にLY透過速度の上昇、TER上昇の低下を引き起こし、消化管バリア機能を低下させた（図5）。また、それらの相加効果も認められた。このとき、Occludinを除く、TJタンパク質（Claudin-1、Claudin-3、JAM-1）の発現量の低下が認められた（図6）。

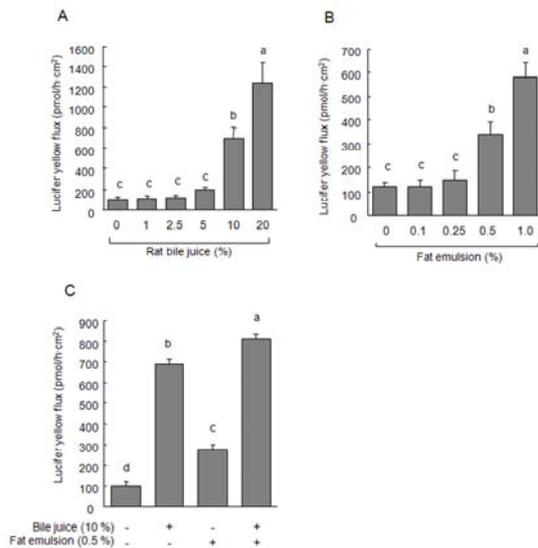


図5. 消化管上皮 Caco-2 細胞のバリア機能

これら結果は、メタボリックシンドロームにおいて、脂質を高く含む食事の摂取が、管腔内脂質、胆汁濃度の上昇を引き起こし、消化管（特に小腸）の透過性を上昇させる一因であることを提案している。本研究成果は、

メタボリックシンドロームの新たな病態を明確にできたとともに、消化管バリア機能に着目した、新たなメタボリックシンドローム予防食品成分の可能性を提案するものである。

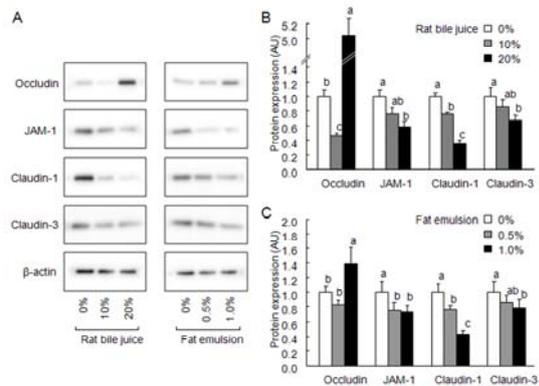


図6. 消化管上皮 Caco-2 細胞のタイトジャンクションタンパク質発現量

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1件）

1. Takuya Suzuki and Hiroshi Hara, Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats, *Nutrition and Metabolism*, 査読有り, 2010, 12, pp7-19

〔学会発表〕（計1件）

1. 鈴木 卓弥、原博、高脂肪食は、小腸タイトジャンクション透過性を上昇させるが、遺伝的肥満は消化管透過性を上昇させない、2009年度 日本栄養食糧学会、2010. 5. 23、徳島

〔その他〕

研究室 HP URL:

http://home.hiroshima-u.ac.jp/douri/Suzuki_group/Top_page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 卓弥 (Suzuki Takuya)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師

研究者番号：30526695

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし