

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31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780115

研究課題名（和文） 食品因子による腸管上皮受容体型転写因子を介した消化器疾患予防・改善作用の解析

研究課題名（英文） The analysis of prevention of gastrointestinal disease via intestinal epithelial receptor/transcriptional factor by food factor

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

食品因子が腸管上皮受容体型転写因子及びそれに関連する消化器疾患に対して及ぼす影響を解析した。薬物受容体であり大腸がん発症抑制に関与する aryl hydrocarbon receptor (AhR) をブロッコリースプラウト熱水抽出物が活性化することを見出し、実際に大腸前がんモデルマウスに前投与することによって前がん病変である大腸異常腺窩巢の形成が抑制された。また大豆イソフラボン代謝物であるエクオールは、核内受容体であり抗炎症作用を有する pregnane X receptor (PXR) を活性化し、大腸炎モデルマウスにおける炎症反応を顕著に抑制することが見出された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the effect of food factors on the intestinal epithelial receptor/transcriptional factor and its related gastrointestinal disease. We found that hot water extracts of broccoli sprout significantly activated aryl hydrocarbon receptor (AhR) and further suppressed the formation of aberrant crypt foci in azoxymethane-induced colon cancer mouse model. We also found that equol, a soy isoflavone metabolite, could activate pregnane X receptor (PXR) which is one of the nuclear receptors and known to have anti-inflammatory effect. We further revealed that equol suppressed inflammatory response in dextran sulfate sodium-induced colitis of mouse. These results strongly suggest that food factors could prevent gastrointestinal diseases via activation of intestinal epithelial receptor/transcriptional factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：食品機能

1. 研究開始当初の背景

消化管の最前線に位置する腸管上皮細胞は食品成分などによって最も高頻度かつ高濃度に曝されることから、その機能が食品因子などにより制御・調節を受けることが考えられる。腸管上皮細胞の主要な機能としては、(1) 食品栄養素の吸収機能、(2) 生体異物の侵入を妨げるバリアー機能、(3) 外来刺激を受容して生体内へ伝達するシグナル変換機能、などが挙げられる。研究代表者らはこれらの腸管上皮機能が多様な食品因子によって制御・調節されることをこれまで報告してきた。中でも外来異物の侵入に対するバリアー機能を司る解毒排出酵素の発現をある種の食品因子が亢進することを見出し、その活性化には aryl hydrocarbon receptor (AhR) や pregnane X receptor (PXR) といった腸管上皮に発現する受容体型転写因子が関与していることを見出してきた。従ってこれまで AhR や PXR は主として解毒排出酵素の発現を制御する転写因子として認識されている。

しかしながら近年になって、AhR や PXR は単なる解毒排出酵素の発現制御のみを担っているのではないことが明らかになりつつある。例えば PXR は炎症反応のマスターレギュレーターであり腸管においては腸炎の発症に関与することが知られている転写因子 NFκB を抑制することが報告されている。また AhR は E3 ユビキチンリガーゼ活性を有し大腸がん発症に関わるβ-カテニンの分解に関与することで大腸がんを抑制する作用があることが報告されている。このように腸管上皮に発現する受容体型転写因子は、従来の解毒排出酵素発現制御に加えて多様な生理機能を有していることが明らかになってきている。

一方近年では消化管における疾患が急増している。特に大腸がんの罹患数は、2001年に10万人を超えて以来年々増加している。また潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患 (IBD) の患者数もここ20年でおおよそ30倍に増大し、今後もその増加が懸念されている。また IBD は大腸がんのリスクファクターであることから、大腸がんを予防する意味でも IBD の予防・治療は重要であると考えられる。

このような背景から本研究では、特に AhR と PXR に注目し、AhR/PXR 活性化能評価系を構築して AhR/PXR を活性化する食品因子を探索し、さらに実際に消化器疾患予防・改善作用がみられるかどうか疾患モデル動物 (AhR: 大腸前がんモデル、PXR: 大腸炎モデル) を用いて検討することとした。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では以下

の具体的な目標を持っておこなうこととする。

(1) 腸管上皮細胞に発現する受容体型転写因子である AhR 及び PXR を活性化する食品成分の探索評価系を構築し、様々な食品成分を用いてスクリーニングをおこなう。

(2) 上記で見出された食品因子が大腸がん発症に関わる分子を抑制 (AhR) あるいは炎症シグナルを抑制 (PXR) するかどうか、細胞レベルで検討する。

(3) 見出された食品因子が *in vivo* においても消化器疾患を予防・改善するかどうかを、大腸前がんモデル動物、大腸炎モデル動物を用いてそれぞれ検証する。

3. 研究の方法

(1) AhR 及び PXR 活性化能安定評価系の構築

ヒト AhR 発現ベクター及び AhR 結合配列である XRE をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを構築し、培養細胞株に遺伝子導入した。抗生物質で選択し安定に組み込まれた細胞株の中から最も応答性の高い細胞株を選抜し、AhR を活性化する食品因子のスクリーニングに用いた。

PXR についても同様にヒト PXR 発現ベクターと PXR 結合配列である DR4 をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを構築し、これらを用いて安定応答株を作成した。

(2) ヒト結腸がんモデル細胞を用いたβ-カテニン発現量の解析

ヒト結腸がんモデル細胞として Caco-2 細胞を用いた。増殖期の Caco-2 細胞より核内抽出物を調製し、核内β-カテニン量をウェスタンブロット法にて解析した。

(3) 大腸前がんモデルマウスを用いた *in vivo* 解析

BALB/c マウスに化学発がん物質であるアゾキシメタン (AOM) を1週間に一度腹腔に投与することを3週間おこなった。投与終了後さらに3週間飼育した。解剖後、大腸組織をメチレンブルーにて染色し、大腸異型腺窩巢 (aberrant crypt foci; ACF) の形成数を数えた。また結腸より核内抽出物を抽出し、核内β-カテニン量をウェスタンブロット法にて定量した。

(4) ヒト腸管上皮細胞を用いた PXR の抗炎症作用の解析

ヒト腸管上皮モデル細胞として LS180 細胞を用いた。NFκB の応答配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に含むレポーターベクターを LS180 に遺伝子導入した後 TNFα を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定することで NFκB 依存的転写活性を測定した。また NFκB 標的遺伝子として COX-2、IL-8 を選

び、その mRNA 発現量変化を real-time PCR 法を用いて解析した。

(5)DSS 誘導大腸炎モデルマウスを用いた解析

C57BL/6 マウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 3%含む水を 1 週間程度自由飲水させることで大腸炎を誘発させた。大腸炎症状と相関のある体重を毎日計測し、さらに解剖後に結腸の長さの測定 (炎症時に短縮がみられる) や大腸粘膜における炎症マーカーの mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸前がんに対する食品因子の AhR を介した作用解析

ヒト AhR 発現ベクターと AhR の応答配列である XRE 配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを構築した。それらをヒト由来培養細胞である HepG2、HEK293、LS180 などに一過的に遺伝子導入し、AhR 既知リガンドである 3-methylcholanthrene を添加して応答性を比較した。その結果 HepG2 細胞が最も応答性が良かったため、HepG2 細胞を用いて 2 つのベクターを安定に発現する AhR 安定応答発現株を構築した。

構築した安定応答株を用いて、AhR を活性化する食品成分をスクリーニングしたところ、ブロッコリースプラウトの熱水抽出物に強い AhR 活性化作用が認められ、特に発芽 3 日後が最も強い活性を示すことを見出した (図 1)。またさらに解析を進め、その活性化成分の一部はケルセチンやケンフェロールなどのフラボノイド類であることが示唆された。

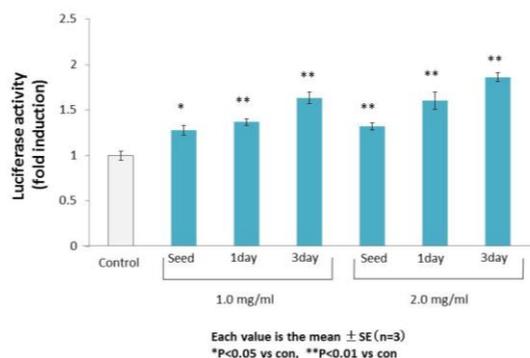


図 1 ブロッコリー熱水抽出物 (Seed, 1 day, 3 day) が AhR 転写活性に与える影響

AhR は大腸がん発症に関わる β -カテニンの分解を誘導することから、ヒト結腸がんモデル Caco-2 細胞の β -カテニン発現に対するブロッコリースプラウト熱水抽出物の作用を検討した。その結果 Caco-2 細胞の核内 β -

カテニン量は、ブロッコリースプラウト熱水抽出物添加によって濃度依存的に減少した。

そこで AOM 投与によって誘発する大腸前がんマウスモデル系を構築し、それに対するブロッコリースプラウト熱水抽出物の作用を検討した。その結果、アゾキシメタン (AOM) 投与による大腸前がんモデルマウスにブロッコリースプラウト熱水抽出物を前もって投与したところ、AOM のみを投与した群では大腸前がんの指標である ACF が大腸全体に発生していたが、ブロッコリーを投与した群では有意な ACF 形成抑制効果がみられた。また大腸粘膜の核内 β -カテニンの発現量を解析した結果、ブロッコリー熱水抽出物を投与した群では核内 β -カテニン量の減少がみられた。これより、ブロッコリースプラウト熱水抽出物は AhR を活性化することで β -カテニンを分解し大腸前がん病変形成を抑制することが示唆された。

(2) 大腸炎に対する食品因子の PXR を介した作用解析

ヒト PXR 発現ベクターと PXR の応答配列である DR4 配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを構築した。それらをヒト由来培養細胞である HepG2、HEK293、LS180 などに一過的に遺伝子導入し、PXR 既知リガンドである rifampicin を添加して応答性を比較した。その結果 HepG2 細胞が最も応答性が良かったため、HepG2 細胞を用いてこれら 2 つのベクターを安定に導入した PXR 安定応答発現株を構築した。

これを用いて PXR を活性化する食品成分をスクリーニングしたところ、大豆イソフラボンの代謝物であるエクオールに強い PXR 活性化能が見出された (図 2)。

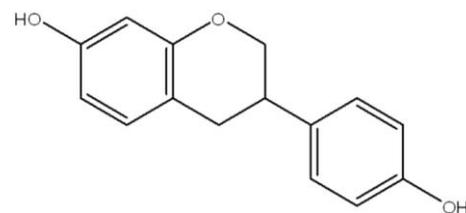


図 2 エクオールの化学構造

次にエクオールが PXR 活性化を介して、炎症のマスターレギュレーターである NF κ B を阻害するか検討した。その結果、TNF α による NF κ B 転写活性及び NF κ B 標的遺伝子である COX-2 や IL-8 mRNA 発現量の増加に対して、エクオールは PXR 強発現下で顕著な抑制作用を示した。これよりエクオールは PXR を介して抗炎症作用を示すことが *in vitro* で示された。

さらにマウスを用いて、DSS 自由飲水による *in vivo* 大腸炎モデルを構築することとし、条件検討の結果 3%DSS を含む水を 8 日間程度自由飲水させることで、体重の減少、結腸の短縮、NF κ B の標的遺伝子である炎症性メディエーターの発現亢進など大腸炎症状が誘導されることを確認した。そこで DSS 自由飲水による大腸炎モデルマウスにエクオールを前もって投与した結果、体重の減少(図 3) や下痢・血便、また大腸炎にみられる結腸の短縮がエクオール投与群ではいずれも有意に軽減された。また大腸粘膜における炎症メディエーターである COX-2、MIP-2 などの mRNA 発現は DSS 群では顕著に増加したが、エクオール投与によっていずれも有意に抑制された。これより、エクオールは PXR 活性化を介して大腸炎を抑制することが示唆された。

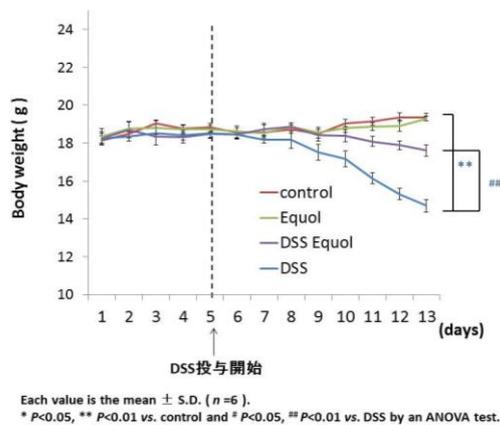


図 3 DSS 誘導大腸炎モデルマウスの体重変化に対するエクオールの影響

以上本研究より、ブロッコリー熱水抽出物やエクオールといった食品因子はそれぞれ AhR や PXR など腸管上皮

受容体型転写因子を介して、大腸前がんあるいは大腸炎といった消化器疾患を予防・改善しうることが示唆された。

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 11 件)

- ① Satsu, H., Chidachi, E., Hiura, Y., Ogiwara, H., Gondo, Y., and Shimizu, M., Induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 expression by cysteine via Nrf2 activation in human intestinal epithelial LS180 cells. *Amino Acids*, in press, 査読有, 10.1007/s00726-012-1230-1.
- ② Wang, H.K. Yeh, C.H., Iwamoto, T., Satsu, H., Shimizu, M., and Totsuka, M., Dietary

Flavonoid Naringenin induces Regulatory T cells via an Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)-mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 60(9), 2171-2178 (2012), 査読有, 10.1021/jf204625y.

- ③ 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*, 34(5), 440-447 (2011), 査読有, 10.1007/s10753-010-9251-y.
- ④ Ishimoto, Y., Satsu, H., Totsuka, M., and Shimizu, M., IEX-1 suppresses apoptotic damage in human intestinal epithelial Caco-2 cells induced by co-culturing with macrophage-like THP-1 cells. *Biosci. Rep.*, 31(5), 345-351 (2011), 査読有, 10.1042/BSR20100083.
- ⑤ Hamada, M., Satsu, H., Ashida, H., Sugita-Konishi, Y., and Shimizu, M., Metabolites of galangin by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P450 1A1 in human intestinal epithelial Caco-2 cells and their antagonistic activity toward aryl hydrocarbon receptor. *J. Agric. Food Chem.*, 58(13), 8111-8118 (2010), 査読有, 10.1021/jf100778f.
- ⑥ 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*, 51(1), 53-59 (2010), 査読有, 10.1016/j.cyto.2010.03.002.
- ⑦ 薩 秀夫「腸管機能を調節する食品因子の探索評価」, BIO INDUSTRY, シーエムシー出版, 29(2), 38-44(2012), 査読無(依頼総説).
- ⑧ 薩 秀夫「食品因子の腸管吸収および生理機能の分子栄養学的研究」, 日本栄養・食糧学会誌, 64(4), 207-214(2011), 査読無(受賞依頼総説).
- ⑨ 薩 秀夫, 水上朋彦, 三久保純之, 清水誠「腸管上皮における解毒・排出酵素を制御する大豆由来成分に関する研究」, 大豆たん白質研究, 13, 79-84(2010), 査読無.
- ⑩ 薩 秀夫, 清水 誠「ヒト腸管上皮細胞を用いた食品機能・安全性評価」, BIO INDUSTRY, シーエムシー出版, 27(7), 39-46(2010), 査読無(依頼総説).
- ⑪ 薩 秀夫「食品因子の腸管における抗炎症作用」, 機能性食品と薬理栄養, 6(2), 131-138(2010), 査読無(依頼総説).

[学会発表] (計 11 件)

- ① 薩 秀夫, ブロッコリースプラウトが β -カ

- テニン発現及び大腸前がんモデルマウスに及ぼす影響、日本栄養・食糧学会 2012 年度大会、2012 年 5 月 19 日、東北大学(仙台)。
- ② 岩柳智裕、腸管におけるエクオールによる抗炎症作用の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学(京都)。
- ③ 薩 秀夫、腸管における食品因子の吸収及び機能性・安全性に関する細胞生物学的研究、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22 日、ウェスティン都ホテル京都(京都)。
- ④ Satsu, H., Induction of detoxification enzymes by equol via activation of pregnane X receptor in human intestinal epithelial cells, 5th International Conference on Food Factors, 2011.11.22, Taipei (Taiwan).
- ⑤ Yoshida, K., Effects of broccoli sprout on aryl hydrocarbon receptor activation and colonic carcinogenesis, 5th International Conference on Food Factors, 2011.11.21, Taipei (Taiwan).
- ⑥ 薩 秀夫、腸管における食品成分の抗炎症作用、日本動物細胞工学会第 25 回動物細胞工学シンポジウム、2011 年 5 月 30 日、田町キャンパスイノベーションセンター(東京)。
- ⑦ 薩 秀夫、腸管における炎症と栄養・食品、日本栄養・食糧学会 2011 年度大会、2011 年 5 月 15 日、お茶の水女子大学(東京)。
- ⑧ 岩柳智裕、食品因子による核内受容体 PXR を介した抗炎症作用の解析、日本栄養・食糧学会 2011 年度大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学(東京)。
- ⑨ 三久保絢之、ブロッコリースプラウトが AhR に及ぼす影響、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)。
- ⑩ 三久保絢之、転写因子 AhR を制御する食品成分の探索・評価系の構築及びそれを用いたブロッコリースプラウトの解析、日本栄養・食糧学会 2010 年度大会、2010 年 5 月 22 日、アスティ徳島(徳島)。
- ⑪ 薩 秀夫、「食品因子の腸管吸収及び生理機能の分子栄養学的研究、日本栄養・食糧学会 2010 年度大会、2010 年 5 月 21 日、アスティ徳島(徳島)。

[図書] (計 4 件)

- ① 薩 秀夫、丸善、「機能性食品の作用と安全性百科」(上野川修一、清水俊雄、清水誠、鈴木英毅、武田英二編)、2012 年、編集中(分担執筆)
- ② 薩 秀夫、建帛社、「機能性食品成分とトランスポーター」in「栄養・食品機能とトランスポーター」(竹谷豊、薩秀夫、伊藤美紀子、武田英二責任編集、日本栄養・食

- 糧学会監修)、2011 年、247-264 (分担執筆)。
- ③ 薩 秀夫、廣川書店、「アミノ酸」in「トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—」(金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘編)、2011 年、161-170 (分担執筆)。
- ④ 清水 誠、薩 秀夫、シーエムシー出版、「腸管の解毒機能と食の安全」in「食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて—」(東京大学 食の安全研究センター編)、2010 年、145-151 (分担執筆)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し