

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580185

研究課題名(和文)植物性リン脂質の消化管粘膜維持作用に関する研究

研究課題名(英文)Effect of plant phospholipid on integrity of gastrointestinal mucosa

研究代表者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：90258301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は消化管粘膜の健全性に植物性リン脂質やその消化物が貢献している可能性を調べている。ヒト胃由来培養細胞株を用いた解析より、リゾホスファチジン酸(LPA)はある種のムチン蛋白の転写とプロスタグランジンE2の産生を促進し、ムチンを含む粒子の分泌を誘導していることが明らかになった。これらはいずれも胃における防御因子である。また、キャベツ脂質に見出されていたフィトセラミド-1-リン酸にも小胞分泌作用があった。これらのリン脂質は肉類にはほとんど含まれず、アブラナ科野菜に多く存在するリン脂質である。アブラナ科野菜の抗胃腸障害効果にはこれらのリン脂質の作用が関与しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Effects of plant phospholipids and its digests on epithelial integrity of gastrointestinal (GI) tract were studied. We found that lysophosphatidic acid (LPA) up-regulates mRNA levels of MUC1 and cyclooxygenase 2, and enhances prostaglandin E2 (PGE2) production in human gastric cell line. We also found that LPA induces secretion of vesicles which contain cytosolic mucin. The mucin and PGE2 are known as cytoprotective factors in stomach. The newly identified sphingophospholipid in cabbage, phyto-ceramide-1-phosphate, was found to have secretion enhancing activity in gastric cells. These phospholipids are rare in meats and abundantly contained in Cruciferous vegetables. The beneficial effects of ingestion of Cruciferous vegetables on damaged GI tract may be explained by the action of these plant-derived phospholipids.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質 植物性食品 消化管 粘液分泌 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸(LPA)は特異的受容体を介し、様々な細胞応答を誘導する細胞増殖因子様リン脂質である。消化管におけるLPAの作用として、消化管内に投与されたLPAが小腸粘膜上皮のアポトーシスを回避させることや(1)、炎症性大腸炎を緩和させること(2)が知られている。我々もLPAの経口投与がストレス誘導性胃潰瘍(3)やアスピリン誘導性胃潰瘍(4)を抑制することを見出し、LPAは消化管粘膜組織の恒常性に関与している可能性が考えられる。LPAは創傷治癒ホルモンとして血液中に存在するが、唾液にも含まれており(5)、2型LPA受容体は小腸細胞の管腔側に局在する(1)。このことは消化管の粘膜上皮細胞は血液から供給されるLPAだけでなく、管腔側から侵入するLPAに反応する可能性を示唆する。我々は食物に存在するLPAの分析と消化管細胞への植物脂質の影響を調べてきた。その結果、キャベツやダイコンなど、昔から胃腸障害に効くと伝えられる薬膳料理にLPAが豊富に含まれていることが見出された(6)。一方、キャベツ総脂質のリン脂質分析の結果からは、新たなタイプのスフィンゴリン脂質の存在が明らかになった。このリン脂質はフィトセラミド-1-リン酸(PC1P)であり、我々の知る限り植物組織における存在は知られていない(7)。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究により、胃内投与したLPAが胃潰瘍などの組織障害を予防することが明らかになった。本研究では培養細胞レベルでLPAの作用を調べ、その胃粘膜保護効果のメカニズムを探る。また、新たに見出された植物由来のスフィンゴリン脂質、PC1Pの消化管組織に対する作用を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞株はヒト胃由来MKN74細胞およびKatolIII細胞を用いた。これらの細胞株に対するLPAの細胞増殖作用についてCCK-8試薬を用いて調べた。この試薬は細胞内脱水素酵素活性を反映する試薬であり、細胞毒性試験や増殖試験によく用いられる。また、これらの細胞が発現するムチンのmRNAレベル(MUC1, MUC5)およびシクロオキシゲナーゼ1/2(COX1/2)のmRNAレベルに及ぼすLPAの効果はグルタルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のmRNAレベルとの相対値で数値化し、比較した。さらにサンドイッチELISA法に基づくプロスタグランジンE2(PGE2)の定量を行い、LPAがPGE2産生を増強するかどうかについても調べた。

また、この培養細胞を用いた研究の過程で、LPAが小胞を分泌させることを見出した。この作用は光学顕微鏡下で任意の視野における分泌小胞数を計測するか、培養上清に分泌された小胞をフローサイトメーターにて計測することで数値化した。さらに、分泌小胞の性質はPeriodic acid-Schiff(PAS)染色あるいはアリシアンブルー染色および形質膜の特異的染色試薬であるPKH染色によって調べた。

4. 研究成果

(1) LPAの細胞増殖および細胞形態に対する作用

ヒトおよびマウスの胃の表層粘液細胞にはLPA2受容体が発現していることが知られている。ヒト胃由来MKN74細胞およびKatolIII細胞について調べた結果、共にLPA2受容体が発現していることが確認され、これらの細胞株を用いて解析を行うことで、LPAの胃の表層胃粘液細胞への効果を推定することが可能と思われた。LPAが細胞増殖を誘導するかどうかを検討した結果、10 μ MまでのLPAはMKN74細胞に対して細胞増殖を誘導しなかった。一方、LPAはKatolIII細胞に対して、濃度依存的に細

胞死を誘導した。この作用は $1\mu\text{M}$ 程度の濃度から観察され、 $10\mu\text{M}$ の LPA を作用させた場合には細胞生存率は 50%程度までに低下した。一方、MKN74 細胞にこの濃度の LPA を曝すと、細胞死はもたらさないものの、後に示す小胞分泌作用が観察された。

(2) LPA のムチン mRNA に対する作用

ムチンは胃粘液バリアーを形成する主要な糖蛋白で、分泌増強は胃粘膜を保護することになる。そこで、分泌型ムチンとして、MUC2, MUC5AC, MUC5B および MUC6 を、膜結合型ムチンとして、MUC1 を選び、Katol III 細胞におけるこれらのムチン蛋白の mRNA レベルを調べた。その結果、Katol III ではこれらのうち、MUC1 および MUC5B の mRNA が明確なバンドとして観察され、強く発現していることが推定できた。これらのうち、MUC1 の mRNA は LPA 刺激により、有意にアップレギュレートされることがわかった。

(3) LPA のシクロオキシゲナーゼ 1 / 2 の mRNA レベルおよび PGE2 産生に対する作用

まず、MKN74 細胞および Katol III 細胞の COX1/2 の mRNA レベルを調べた。その結果、定常状態の Katol III 細胞における両 mRNA は共に低いレベルであったが、MKN74 細胞では共に高レベルを示していた。LPA で MKN74 細胞を刺激した結果、濃度依存的に COX2 の mRNA レベルが上昇した。この効果は LPC では観察されず、百日咳毒素の前処理で抑制されたことより、 G_i と共役する受容体を介した応答と思われ、LPA2 を介していることが強く示唆された。次に培養上清における PGE2 レベルについて調べたところ、LPA は濃度依存的に PGE2 産生を増強した。この効果は $0.3\mu\text{M}$ から観察され、 $10\mu\text{M}$ ではコントロールの約 4 倍となった (図 1)。

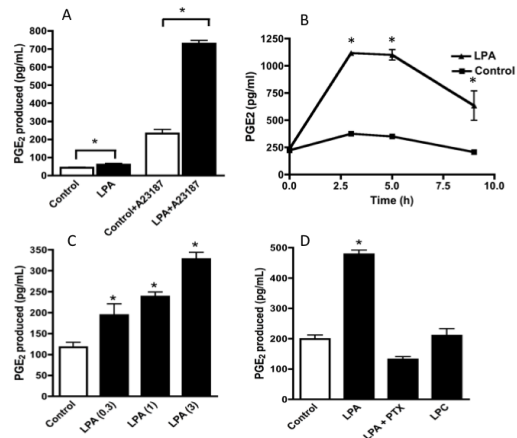


図 1 MKN74 細胞における LPA の効果

(4) MKN74 細胞に対する LPA および PC1P の小胞分泌作用

これらの実験の過程で、MKN74 細胞に LPA を作用させると、小胞が分泌される現象を観察した。この分泌小胞は PAS 染色およびアリシアンブルー染色に陽性であり、DAPI 染色陰性であったことから、アポトーシス小体ではなく、ムチンを含んだ粒子であることが推定された (図 2)。

以前、我々はキャベツ脂質に未知リン脂質の存在を認め、これをフィト型のセラミド-1-リン酸と同定した。この PC1P を MKN74 細胞に作用させた結果、LPA を作用させた場合と同様に小胞が分泌されることがわかった。この PC1P の小胞分泌促進作用は LPA よりも低濃度の $3\mu\text{M}$ で最大応答を誘導した。

まとめ

LPA 2 を発現する MKN74 細胞および Katol III 細胞を用いた解析より、LPA はこれらの細胞に作用して、MUC1 の転写を促進していること、プロスタグランジン E2 の産生を促進していること、細胞内成分であるムチンを含む粒子の分泌を促進していることが明らかになった。これらはいずれも胃に

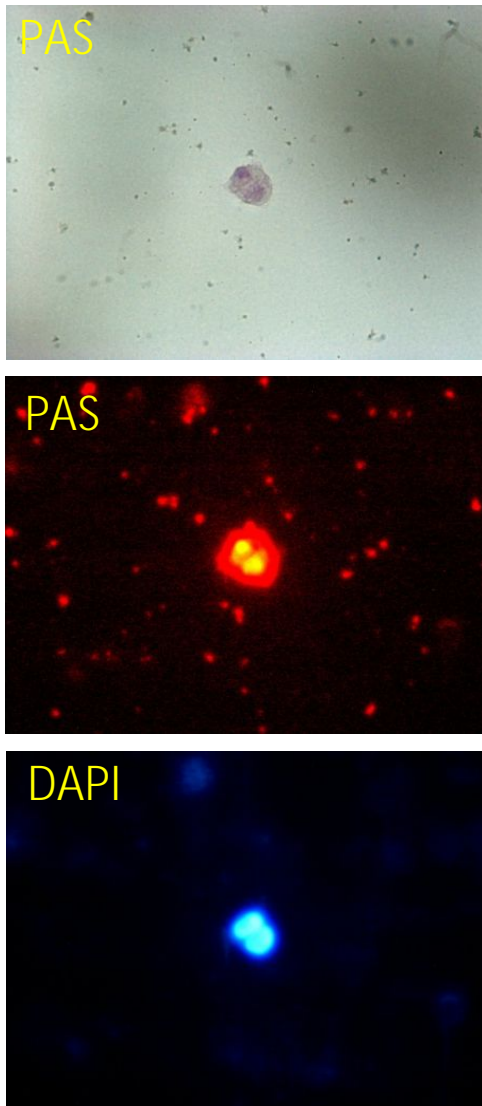


図2 LPA 誘導性小胞および MKN74 細胞の PAS 染色および DAPI 染色

おける防御因子であり、LPA や LPA 前駆体としての PA の抗アスピリン潰瘍効果のメカニズムと考えられる。興味深いことに、キャベツ脂質に見出されていた PC1P も小胞分泌促進作用を示した。PA、LPA および PC1P はいずれも肉類にはほとんど含まれず、植物に含まれるリン脂質で、特にダイコンやキャベツといったアブラナ科野菜に多い。今回見出された植物性リン脂質がこれらの野菜が示すといわれる胃腸障害に対する保護効果をもたらしている可能性もある。

引用文献

- 1) Li, C., Dandridge, K. S., Di, A., Marrs, K. L., Harris, E. L., et al. (2005) *J Exp Med.* 202, 975-986.
- 2) Sturm, A., Sudermann, T., Schulte, K-M., Goebell, H., Dignass, A. U. (1999) *Gastroenterology.* 117, 368-377.
- 3) Adachi, M., Horiuchi, G., Ikematsu, N., Tanaka, T., Terao, J., et al. (2011) *Dig. Dis. Sci.* 56, 2252-2261.
- 4) Tanaka, T., Morito, K., Kinoshita, M., Ohmoto, M., Urikura, M., et al. (2013) *Dig. Dis. Sci.* 58, 950-958.
- 5) Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 2049-2055.
- 6) Tanaka, T., Horiuchi, G., Matsuoka, M., Hirano, K., Tokumura, A., et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1293-1300.
- 7) Tanaka, T., Kida, T., Imai, H., Morishige, J., Yamashita, R., et al. (2013) *FEBS J.*, 280, 3797-3809.

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 4 件)

1. Type 2 lysophosphatidic acid receptor in gastric surface mucous cells: Possible implication of prostaglandin E₂ production.

Tamotsu Tanaka, Mayumi Ohmoto,

Katsuya Morito, Hiroki Kondo, Mai Urikura, Kiyoshi Satouchi and Akira Tokumura

BioFactors, **40**, 355-361 (2014) 査読有り

2. Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves.

Tamotsu Tanaka, Takashi Kida, Hiroyuki Imai, Jun-ichi Morishige, Ryouhei Yamashita, Hisatsugu Matsuoka, Sachika Uozumi, Kiyoshi Satouchi, Minoru Nagano and Akira Tokumura

FEBS J., **280**, 3797-3809 (2013) 査読有り

3. Orally administered phosphatidic acids and lysophosphatidic acids ameliorate aspirin-induced stomach mucosal injury in mice.

Tamotsu Tanaka, Katsuya Morito, Masafumi Kinoshita, Mayumi Ohmoto, Mai Urikura, Kiyoshi Satouchi and Akira Tokumura

Dig. Dis. Sci., **58**, 950-958 (2013) 査読有り

4. Phosphatidic acid production in the processing of cabbage leaves.

Mai Urikura, Jun-ichi Morishige, Tamotsu Tanaka and Kiyoshi Satouchi

J. Agric. Food Chem., **60**, 11359-11365 (2012) 査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

1. ホスファチジン酸(PA)の抗消化性潰瘍効果と穀類における PA 含量

田中保, 生駒照, 森戸克弥, 徳村彰, 南利夫

日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会, 講演要旨集 p24

2014 年 1 月 25 日 香川大学農学部(香川県・三木町)

2. リゾホスファチジン酸による胃粘膜保護のメカニズム

森戸克弥, 大本真弓, 生駒照, 木下正文, 近藤宏樹, 瓜倉真衣, 里内清, 田中保, 徳村彰

第 86 回 日本生化学会大会, プログラム号, p108(1P-055, 1T10a-14)

2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

3. 消化管におけるリゾホスファチジン酸産生とその生理的意義

田中保

第 55 回 日本脂質生化学会, シンポジウム講演要旨集, p14

2013 年 6 月 6 日 ホテル松島大観荘(宮城県・松島町)

4. キャベツ葉に見出されたフィトセラミド-1-リン酸の生合成経路

喜田孝史, 盛重純一, 山下量平, 松岡久嗣, 魚住幸加, 里内清, 今井博之, 長野稔, 吉村好之, 田中保, 徳村彰

第 85 回 日本生化学会大会, プログラム号, p86(2P-089)

2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：90258301

(2) 研究分担者

徳村 彰 (TOKUMURA, Akira)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：00035560
(H24、H25)

(3) 連携研究者

なし()
研究者番号：