

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292074

研究課題名(和文) 腸管における炎症に深く関わる免疫細胞の機能解析と腸管保護食品創製への展開

研究課題名(英文) Analyses of the immune cells involving intestinal inflammation and its application for development of foods with intestinal barrier-protecting activity

研究代表者

田辺 創一 (Soichi, TANABE)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90272624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主として、腸内細菌代謝産物の腸管バリア回復効果をTNF- $\alpha$ 処理したCaco-2細胞およびDSS腸炎マウスを用いて評価した。腸内細菌のリノール酸初期代謝物である10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA)は、TNF- $\alpha$ あるいはDSSによるタイトジャンクション関連因子の発現変化を抑制するとともに、TNF receptor 2発現を抑制した。HYAはGPR40発現を上昇させたが、GPR40アンタゴニストの添加によりHYAのバリア保護効果は消失した。一方、炭素鎖12位に二重結合をもたないオレイン酸初期代謝物には本活性が見られず、GPR40発現も低下させた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effects of gut microbial metabolites on tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced barrier impairment in Caco-2 cells and dextran sulfate sodium-induced colitis in mice were evaluated. 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA), a gut microbial metabolite of linoleic acid, suppressed TNF- $\alpha$  and dextran sulfate sodium-induced changes in the expression of tight junction-related molecules. HYA also suppressed the expression of TNF receptor 2 (TNFR2) in Caco-2 cells and colonic tissue. Furthermore, HYA significantly up-regulated G protein-coupled receptor (GPR) 40 expression in Caco-2 cells. The barrier-recovering effects of HYA were abrogated by a GPR40 antagonist. Conversely, 10-hydroxyoctadecanoic acid, which is a gut microbial metabolite of oleic acid and lacks 12 carbon-carbon double bond, did not show these tight junction-restoring activities and down-regulated GPR40 expression. Therefore, HYA modulates TNFR2 expression, at least in part, by GPR40 pathway.

研究分野：食品機能学

キーワード：Caco-2 CD40 colitis tight junction bacterial metabolite lactic acid bacteria bidifobacteria

## 1. 研究開始当初の背景

腸管は、大量の異物が体内に到達する入り口として極めて重要である。外来物質に対し過剰に反応しないよう「寛容」状態となっているが、その制御が崩れ炎症が惹起されることは種々の疾病に繋がる。本研究では、乳酸菌・ビフィズス菌による腸管上皮の炎症回復効果に着目し、研究に着手した。

## 2. 研究の目的

腸炎時の状態、すなわち

A) 腸管上皮バリア (タイトジャンクション) 損傷時、  
B) 共刺激分子の異常発現時、  
C) 低酸素環境  
において、乳酸菌・ビフィズス菌およびその代謝産物による腸管上皮の炎症回復効果を、in vitro (Caco-2 細胞) および in vivo (DSS 腸炎マウス) で明らかにすることを目的とした。

本報告では A) について、腸内細菌のリノール酸代謝物である

10-hydroxy-c12-octadecenoic acid (HYA) および、オレイン酸代謝物である

10-hydroxyoctadecanoic acid (HYB) の効果について詳述する。なお、HYA および HYB は小川順教授 (京都大学) から分与された (図 1)。



図 1. HYA および HYB の構造

## 3. 研究の方法

### (3-1) in vitro (Caco-2 細胞)

二層式の培養装置 (Transwell) で培養した Caco-2 細胞に HYA あるいは HYB を各 50  $\mu$ M ずつ添加し、24 時間後、基底膜側に interferon (IFN)- $\gamma$  を添加した。24 時間後新鮮な培地に交換し、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  添加によってタイトジャンクション損傷を誘導した。腸管バリア保護効果および炎症回復効果は、経上皮電気抵抗値 (TER)、透過性およびタイトジャンクション関連因子 (occludin, zonula occludens-1, myosin light chain kinase) および TNF receptor 2 (TNFR2) の mRNA (real-time PCR)・タンパク質発現 (western) により評価した。また、長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 および GPR120 についても解析を行った。

### (3-2) in vivo (DSS 腸炎マウス)

マウスに 5 日間 3.5% dextran sulfate

sodium (DSS) 溶液を自由飲水させることにより、急性腸炎を誘導した。本マウスに HYA あるいは HYB (各 100 nmol/日) を、DSS 投与 5 日前から 10 日間経口投与した。試験期間中、体重測定および炎症スコア評価を実施した。試験期間終了後、解剖し、in vitro 同様の解析を行った。全ての動物実験は、広島大学動物実験等規則に従って行った。

## 4. 研究成果

### (4-1) in vitro (Caco-2 細胞)

TNF- $\alpha$  処理によって Caco-2 細胞の TER 低下、透過性亢進、タイトジャンクション関連因子の発現異常が見られたが、HYA の前処理によってこれらが有意に回復した。一方、HYB には回復効果が認められなかった (図 2)。

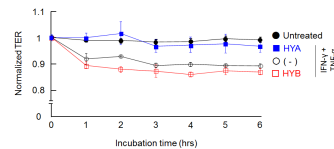


図 2. TNF- $\alpha$  による TER 低下に対する HYA の効果

HYA の Caco-2 細胞バリア保護効果メカニズムを解析するために、炎症時に誘導される TNFR2 の発現を検討した。IFN- $\gamma$  で刺激した Caco-2 細胞では TNFR2 mRNA 発現が上昇したが、HYA を前処理した Caco-2 細胞では有意に低下した。一方、HYB には効果が認められなかった (図 3)。

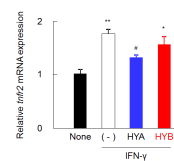


図 3. IFN- $\gamma$  による TNFR2 発現上昇に対する HYA の効果

\*\* p < 0.01 and \* p < 0.05 vs None  
# p < 0.05 vs (-)

次に、HYA を認識あるいは受容する候補分子として、長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 および GPR120 に着目し解析を行った。GPR40 は膵臓細胞に高発現し、インスリン分泌を制御することが報告されていたが、大腸における役割については未解明であった。Caco-2 細胞に HYA を添加すると、GPR40 の発現が増加した (図 4)。

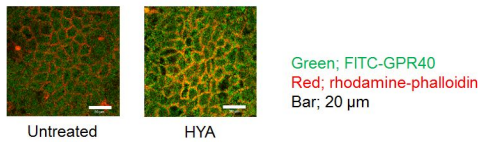


図 4. HYA による GPR40 発現上昇

GPR40 アンタゴニストである GW1100 の添加により、HYA の Caco-2 細胞バリア保護効果は消失した。また、GPR40 を発現させた HEK293 細胞において、HYA は濃度依存的に  $[Ca^{2+}]_i$  を誘導した。この活性は、内因性リガンドであるリノール酸よりも高いものであった。一方、HYB には本活性が見られなかった。

以上のことから、HYA は GPR40 に受容され、Caco-2 細胞に発現する TNFR2 を制御することで、TNF- $\alpha$  が誘導するタイトジャンクション関連因子の発現異常を回復すると考えられた。

#### (4-2) in vivo (DSS 腸炎マウス)

HYA の経口投与が DSS 腸炎マウスの症状を回復するか否か検討した。HYA の経口投与は体重減少の抑制や大腸長の維持に効果的であった (図 5 上)。DSS 処理は上皮細胞の損傷およびクリプトの減少を顕著に誘導したが、HYA を経口投与したマウスでは組織損傷が回復した。一方、HYB には回復効果が観察されなかった (図 5 下)。

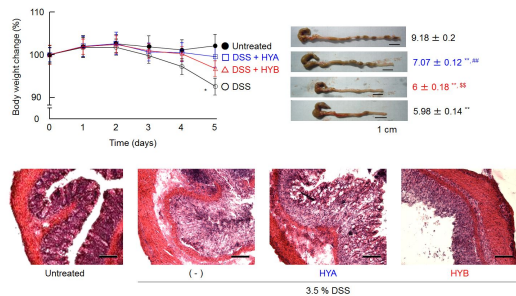


図 5. HYA の経口投与による DSS 腸炎抑制効果

\*\* p < 0.01 and \* p < 0.05 vs None  
 ## p < 0.01 vs (-)  
 §§ p < 0.01 vs HYA

また、DSS 負荷によりタイトジャンクション関連因子の発現異常および TNFR2 発現上昇が見られたが、HYA を経口投与したマウスでは有意に回復していた。HYA を経口投与したマウスでは、GPR40 発現が有意に上昇した。一方、HYB の経口投与は、HYA のような発現変化を誘導しなかった。

(4-1), (4-2) で認められた HYA と HYB の効果の差は、HYA と HYB の構造上の違い (炭素

鎖 12 位の二重結合の有無) によると推察された (図 6)。

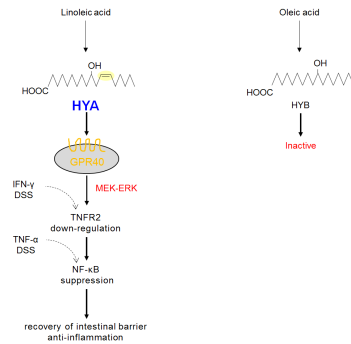


図 6. HYA の腸管バリア回復効果 (概略図)

#### 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 8 件)

Kikuchi Y, Yoshida H, Ogita T, Okita K, Fukudome S, Suzuki T, Tanabe S. In vivo dose response and in vitro mechanistic analysis of enhanced immunoglobulin A production by *Lactobacillus plantarum* AYA. Biosci Microbiota Food Health. 査読有 2015;34(3):53-58. doi: 10.12938/bmfh.2014-016.

Ogita T, Bergamo P, Maurano F, D'Arienzo R, Mazzarella G, Bozzella G, Luongo D, Sashihara T, Suzuki T, Tanabe S, Rossi M. Modulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* OLL2838 in a mouse model of intestinal immunopathology. Immunobiology. 査読有 2015;220(6):701-710. doi: 10.1016/j.imbio.2015.01.004.

Miyamoto J, Mizukure T, Park SB, Kishino S, Kimura I, Hirano K, Bergamo P, Rossi M, Suzuki T, Arita M, Ogawa J, Tanabe S. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. J Biol Chem. 査読有 2015;290(5):2902-2918. doi: 10.1074/jbc.M114.610733.

Bergamo P, Luongo D, Miyamoto J, Cocca E, Kishino S, Ogawa J, Tanabe S, Rossi M

Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated to improved antioxidant/detoxifying defences. *J Funct Foods*. 査読有  
2014;11:192-202.  
doi: 10.1016/j.jff.2014.10.007

Luongo D, Miyamoto J, Bergamo P, Nazzaro F, Baruzzi F, Sashihara T, Tanabe S, Rossi M.  
Differential modulation of innate immunity in vitro by probiotic strains of *Lactobacillus gasseri*. *BMC Microbiol*. 査読有  
2013;13:298.  
doi: 10.1186/1471-2180-13-298.

Miyauchi E, Ogita T, Miyamoto J, Kawamoto S, Morita H, Ohno H, Suzuki T, Tanabe S.  
*Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One*. 査読有  
2013;8(11):e79735.  
doi: 10.1371/journal.pone.0079735.  
eCollection 2013.

Nagashio Y, Matsuura Y, Miyamoto J, Kometani T, Suzuki T, Tanabe S.  
Hesperidin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesion in NC/Nga mice by suppressing Th17 activity. *J Funct Foods*. 査読有  
2013;5:1633-1641.  
doi: 10.1016/j.jff.2013.07.005.

Tanabe S.  
The effect of probiotics and gut microbiota on Th17 cells. *Int Rev Immunol*. 査読有  
2013;32(5-6):511-525.  
doi: 10.3109/08830185.2013.839665.

〔学会発表〕(計 8 件)

田辺創一.  
食品産業における乳酸菌研究の展開.  
日本食品機械研究会シンポジウム  
2015年9月5日(大阪)

Tanabe S.  
Future perspective of R&D on lactic acid bacteria in the food industry. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015年5月15日(横浜)

宮本潤基、水呉太一、PARK Si-Bum、岸野重信、小川順、木村郁夫、鈴木卓也、田辺創一.  
代表的な腸内細菌である乳酸菌のリノール酸代謝産物 10-hydroxy-c12-octadecenoic acid は GPR40/MEK-ERK を介して腸管バリア保護効果を発揮する.  
日本農芸化学会 2015 年度大会  
2015年3月27日(岡山)

Miyamoto J, Park SB, Kishino S, Ogawa J, Suzuki T, Tanabe S.  
A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, recovers the intestinal epithelial barrier impairment in Caco-2 cells partially via GPR40 signaling. 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria. 2014年9月2日(オランダ)

Miyauchi E, Miyamoto J, Suzuki T, Ohno H, Tanabe S.  
*Bifidobacterium longum* Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Suppressing IL-17A Response: Involvement of Intestinal Epithelial Costimulatory Molecules. 3rd International Conference and Exhibition on Probiotic, Functional & Baby Foods. 2014年9月25日(イタリア)

宮本潤基、水呉太一、PARK Si-Bum、岸野重信、小川順、鈴木卓也、田辺創一.  
腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-hydroxy-c12-octadecenoic acid はマウス腸管上皮細胞における TNFR2 発現を抑制し腸炎を緩和する.  
日本農芸化学会 2014 年度大会  
2014年3月28日(神奈川)

荻田佑、鈴木卓也、田辺創一.  
低酸素および再酸素暴露が腸管関連免疫組織におよぼす影響.  
日本食品免疫学会第9回学術大会  
2013年10月17日(東京)

竹之下柳一郎、荻田佑、鈴木卓也、田辺創一.  
アドレナリン過剰が腸管関連免疫組織におよぼす影響.  
日本食品免疫学会第9回学術大会  
2013年10月17日(東京)

〔図書〕(計 1 件)  
森田英利、田辺創一(編著).  
「わかりやすい食品機能学(三共出版)」  
2014年、総ページ数 166.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田辺 創一 (TANABE Soichi)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：90272624

### (2)研究分担者

河本 正次 (KAWAMOTO Seiji)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授  
研究者番号：90294537  
木村 郁夫 (KIMURA, Ikuo)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：80433689