

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660105

研究課題名(和文)食品コロイド分散系の流動特性が消化管内細胞に与える物理的刺激に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the mechanoreception of the gastrointestinal cells in response to fluid shear stress produced by food hydrocolloids

研究代表者

谷 史人(Tani, Fumito)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70212040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生物が普遍的にもつ物理的感覚受容に関する研究の一環として、消化管内でのずり応力に対する生体応答について検討した。まず、典型的な血流のずり応力感知の仕組みを利用して、イオンチャネル型プリンヌクレオチド受容体であるP2X4遺伝子を過剰発現させたHEK293細胞(P2X4/HEK)のカルシウム応答を指標にしたずり応力を感知できる実験系を構築した。次に、数種類の消化管組織由来細胞のP2X4遺伝子発現量を調べた結果、ヒト結腸腺由来のHT29-MTX、咽頭由来のDetroit562に対してP2X4遺伝子の発現が認められ、ずり応力試験を行ったところ、いずれの細胞においても僅かながら蛍光上昇が観察された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the physiological responses of the gastrointestinal epithelial cells to a fluid shear stress. To complete the experimental design, we constructed a typical flow chamber system which is equipped with a micro-flow path under a microscopic observation, in which HEK293 cells overexpressed with P2X4 purinoreceptor were cultured on a slide glass at the bottom of the flow chamber, and the fluorescence of the transfectants can be detected with an oscillation of intracellular calcium in response to a fluid shear stress. Using this flow chamber system, we successfully observed that a fluid shear stress produced the calcium-induced fluorescence for both human colon adenocarcinoma HT29-MTX and pharyngeal carcinoma Detroit562 cell lines. Taken together the mRNA expression by quantitative RT-PCR for both types of cells, we suggest the possibility that the gastrointestinal epithelial cells can sense a fluid shear stress of luminal contents to regulate physiological functions of the gut.

研究分野：食品科学

キーワード：物理的感覚受容 ずり応力 血管内皮細胞 消化管上皮細胞 カルシウム応答 プリンヌクレオチド受容体 P2X4 食品バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの感覚器で知覚され得る食品の物理的な属性を食品テクスチャーと定義している。テクスチャー刺激の主要な力学的特性には、レオロジー特性としての粘性と弾性がある。レオロジーの測定は、食品を粘弾性体として取り扱い、静的または動的な手法で行われ、テクスチャーの把握に利用されてきた。食品の表面特性や粒子特性も重要な性質であり、麺類のつるつる感や飲み物の喉越しなどに関係している。従来までは、食品の粘弾性体としてのレオロジー特性の解析に主眼が置かれ、物理的刺激に対する生体側の受容機構についてはあまり明らかにされてこなかった。テクスチャーは、主としてそれ自体には化学的な味やにおいのないタンパク質や多糖類などの高分子物質が形成する食品の骨格構造によって決められる。しかしながら、生体の口腔や消化管内の細胞が食品高分子やヒドロコロイドをどのように感知しているのかについては不明な点が多い。また、タンパク質や多糖類のヒドロコロイドは食品のテクスチャーを変化させるが、テクスチャーが変化することによって感じられる化学的な味の強さも変化することは古くから知られている。しかし、このような食品がもつ物理的刺激と化学的刺激の受容機構の相互関係についてもまた未だに解明されていない。そこで本研究では、食品コロイド分散系の流動特性や幾何学的特性が口腔から腸管内の細胞に対して及ぼす影響について明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

我々が食べ物を摂取するとき、味やにおいといった化学的な刺激で食べ物を評価すると同時に、硬さ、凝集性や粘性の力学的特性や粒子径や形の幾何学的特性などを含めた物理的刺激も感じている。これまで、食品の化学的刺激やその受容機構については精力的に研究されてきたが、物理的刺激については、粘弾性体としての食品のレオロジー特性の解析に主眼が置かれ、物理的特性の受容機構については未解明のところが多かった。本研究では、食品コロイド分散系の流動特性を生体側はどのように認識し応答しているのかという物理的刺激の受容機構を細胞レベルで解明することを目的としている。血流のずり応力応答を扱う血管生物学に着目し、バイオメカニクス的手法を導入して、“食品バイオレオロジー”という新たな学問領域の開拓に挑戦する。

3. 研究の方法

食品コロイド分散系の粘性流動や幾何学的特性の物理的刺激が消化管内にてどのように受容されるのかについて細胞レベルにおいて明らかにする。

(1) 血流のずり応力に血管内皮細胞が応答する現象をモデルに、食品からの物理的刺

激に応じる細胞応答を評価できるフローチャンバー流路系を構築する。

(2) 口腔や咽頭から大腸に至るまでの消化管や内分泌細胞由来の細胞を流路系に単層培養し、培地のフローに伴うずり応力を負荷し、細胞内カルシウム応答の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) フローチャンバー流路系を用いたバイオレオロジー評価系の構築

フローに伴うずり応力を細胞に負荷し、細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光変化として顕微鏡観察にて捉える評価系を構築した(図1)。倒立型蛍光顕微鏡の観察テーブルに、細胞を灌流できる平行平板型フローチャンバー流路系のデバイスを設置し、流路系および対物レンズを一定の温度(37°C)にする恒温装置を備え付けた。

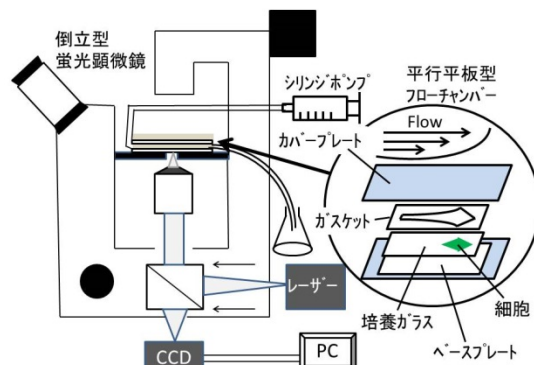


図1 フローチャンバー流路系を用いた細胞応答の観察

図1 フローチャンバー流路系を用いた細胞応答の観察

シリンジポンプにて送液し、細胞のフローに対する様子は CCD カメラを通して観察し、細胞内の蛍光変化はコンピュータにデータを取り込み、画像処理にて評価した。

まず、フローに伴うずり応力のみに対して応答する評価系であるか否かを調べた。血管内皮細胞はずり応力に対して細胞内カルシウム動員を起こすことが知られている。そのずり応力を感知する受容体の一つに P2X4 プリンヌクレオチド作動性受容体がある (①, ②)。ヒト由来 HEK293 細胞は付着性の細胞であるが、フローに伴うずり応力に対しては応答をあまり示さない。そこで、山本・安藤らより提供していただいた P2X4 受容体を発現させた HEK293 のトランスフェクタントを用いて細胞応答の特性を調べ、無処理の HEK293 細胞とのフローに対する応答を比較した。

リアルタイム PCR により定量したところ、実験に用いた P2X4 遺伝子を過剰発現させた HEK293 細胞 (以下 P2X4/HEK) では通常の HEK293 細胞に比べて、P2X4 遺伝子の発現が約 180 倍であった。ずり応力 3.42 dyne/cm<sup>2</sup> を与えたときの蛍光強度の上昇率は、

P2X4/HEK のほうが親株より 5.4 倍大きかった。この P2X4/HEK 細胞に対してずり応力刺激を段階的に上昇させていった結果、上昇に伴い有意な上昇が見られた一方、その上昇はずり応力  $3.42 \text{ dyne/cm}^2$  を最大に減少に転じた (図 2)。

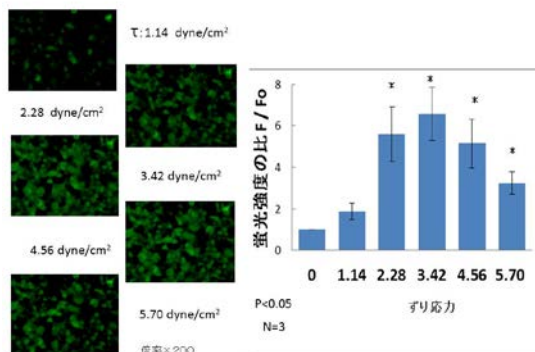


図 2 P2X4/HEK 細胞ずり応力を負荷する前の蛍光を 1 としたときのずり応力を段階的に上昇させていったときの蛍光上昇率

また、その蛍光の上昇は P2X4 受容体アンタゴニストである 5-BDBD 存在下では消失したことから P2X4 受容体を介したずり応力刺激への応答というのが示唆された。次に、ずり応力刺激に際し、カルシウムキレート剤である EGTA を添加した溶液の存在下では蛍光の上昇が消失した。さらに、初代培養であるヒト肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)においても、この実験系によってずり応力刺激を与えることで細胞のカルシウム応答が有意に観察できた。この応答が、EGTA 存在下において消失するか否かを指標に細胞応答の特異性を評価する。

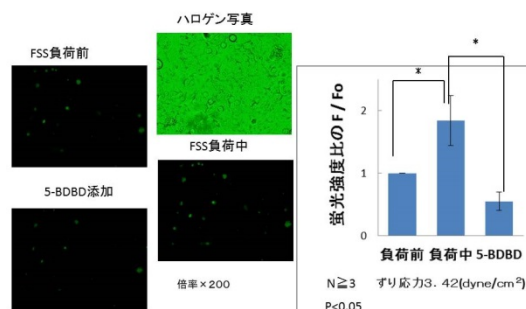
このように、フローチャンバーストリー系を用いて、ずり応力に対する細胞応答をカルシウム蛍光を通して観察できるバイオレオロジー評価系を構築した。

## (2)消化器系組織由来細胞での物理的刺激に対する細胞応答の解析

血流のずり応力に対する血管内皮細胞の実験からは、これまで内皮細胞が物理的刺激を受容する機構には数種類の候補が考えられてきている。例えば、イオンチャネル、チロシンキナーゼ受容体、G-タンパク質共役型受容体(GPCRs)、カベオラ、接着タンパク質、骨格構造の変形、糖衣や線毛などが報告されている。候補となるこのような構造体は消化管内の細胞には普通に観察されるものである。消化管内での物質の移動速度や粘性などを上皮細胞や腸管内分泌細胞が感知している可能性は少なくないと予想される。そこで、消化器系組織由来の株化細胞を用いて物理的刺激への応答を調べた。

ヒト口腔内から大腸に至るまでの組織由来の株化細胞を用いて、イオンチャネル型

P2X4 遺伝子の発現ならびにフローチャンバーストリー系によるずり応力に対する細胞応答を観察した。その結果、P2X4 の遺伝子発現は、ヒト肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)における発現を 1 とすると、ヒト顎下腺由来の A253 細胞では 0.12、ヒト咽頭由来の Detroit562 細胞では 0.30、ヒト結腸由来の Caco-2 細胞では 0.49、ヒト結腸腺由来の HT29-MTX 細胞では 0.64 と定量された。これらの細胞の中から、ヒト結腸腺由来 HT29-MTX 細胞をフローチャンバーストリー系に培養し、ずり応力を変化させたときの細胞内カルシウム変動を解析した。fluo-8 を負荷させた結腸腺由来の HT29-MTX 細胞に対して ATP  $100 \mu\text{M}$  の HBSS 溶液を用いてずり応力  $3.42 \text{ dyne/cm}^2$  を与えた結果、有意な蛍光の上昇が確認された。また、この上昇が確認された細胞に対して P2X4 受容体アンタゴニストである 5-BDBD を添加した溶液を用いてずり応力刺激を与えた結果、蛍光の上昇が有意に減少し、ずり応力の負荷前と同様かそれ以下のレベルの



蛍光強度に低下した (図 3)。

図 3 HT29-MTX 細胞に対してずり応力を負荷したときのカルシウム蛍光の応答。負荷前の蛍光を 1 としたときの蛍光強度比率として表している。

これらの結果は、ヒト結腸腺由来の HT29-MTX 細胞のような消化管組織由来の細胞においてもずり応力に対して応答を起こすことを指摘している。

以上のように、本研究を通して、フローチャンバーストリー系を用いることで、カルシウム蛍光を指標にずり応力に対する細胞応答を観察できるバイオレオロジー評価系を構築したこと、および、物理的刺激への消化器系組織由来の細胞応答を観察できた。

本研究では、方法論として、血管生物学で用いられるフローチャンバーストリー系を用いた実験系を導入して、物理的感覚受容機構を細胞レベルで捉えることに焦点を当てた。食品がもつ力学的特性はレオロジー特性として測定する工学的手法が、感覚特性としてのテクスチャーの把握には筋電図の測定などの生理学的手法が利用されている。これら両者の手法を連結するアプローチと

して生物学的応答を細胞レベルで捉え、ひいては分子レベルでの解明につなげることに期待している。また、細胞レベルにおいて物理的感覚受容を測定できるようになれば、食品の物性を評価する現在の工学的手法を補完する革新的な官能評価法の確立につながると期待できる。例えば、現在の日本が抱える高齢化社会において高齢者のための流動食の開発などでは、よりヒューマンイズムに近づけた食品の官能評価が可能となり社会的にも波及効果は大きい。

#### <引用文献>

- ① Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A. & Ando, J., "Fluid shear stress activates Ca<sup>2+</sup> influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors." *Circ. Res.* **87**, 385–391(2000).
- ② Yamamoto, K., et al., "Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice." *Nat. Med.* **12**, 133-137 (2006).

#### 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 0件)

[学会発表] (計 4件)

- ① 二村健太、阿部賢太郎、榊田哲哉、松宮健太郎、南部優子、松村康生、矢野浩之、谷 史人「非可食部由来の不溶性多糖類の物性解析と消化管内挙動」日本食品科学工学会第60回大会(実践女子大学、東京)、2013年8月29日～31日
- ② Nimura K., Abe K., Masuda T., Matsumiya K., Nanbu Y., Matsumura Y., Yano H. & Tani E.\* "Functional modification of insoluble polysaccharides by the application of nano-fibrillation process." Food Structure and Functionality Forum Symposium 2014, 30 May to 2 Apr., Amsterdam The Netherlands.
- ③ 二村健太、阿部賢太郎、榊田哲哉、松宮健太郎、南部優子、松村康生、矢野浩之、谷 史人「非可食部に由来する不溶性多糖類ナノファイバーの物性解析」日本食品科学工学会第61回大会(中村学園大学、福岡)、2014年8月28日～30日
- ④ 谷 史人「セルロースナノファイバーの用途拡大に向けて：ソフトマターへの新展開」Nanocellulose Symposium 2015 (京都テルサ、京都)、2015年3月20日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等： 準備中

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷 史人 (TANI, Fumito)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70212040