

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07430

研究課題名(和文) リン脂質誘導性ムチン小胞の分泌現象を利用した胃粘液増強食に関する研究

研究課題名(英文) Development of gastroprotective food based on phospholipid-induced mucin production

研究代表者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・准教授

研究者番号：90258301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子様の脂質メディエーター、リゾホスファチジン酸(LPA)作用による非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)潰瘍予防食の開発を目指した。胃内腔液に含まれるLPAは2-3 μ Mであった。この濃度のLPAはヒト胃由来培養細胞MKN74において、2型LPA受容体依存的に、粘膜保護因子のプロスタグランジンE2産生の促進、細胞死抑制、細胞増殖を誘導した。植物素材について調べた結果、ソバやコメの種皮部分やシャクヤク根にはLPAとその前駆体のホスファチジン酸が豊富に含まれることがわかった。これらの素材の脂質抽出液はマウスモデルにおいて抗NSAIDs潰瘍効果を示したことより、潰瘍予防食素材に挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Mucosal injury in gastrointestinal (GI) tract is frequently observed in chronic user of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Here, we developed a functional food for prevention of NSAIDs-induced stomach ulcer based on a biological action of lysophosphatidic acid (LPA). We found that concentration of LPA in stomach fluid is 2-3 microM, and that LPA around the physiological concentration enhances production of PGE2 and proliferation of stomach cells. Among examined, brans of rice and buckwheat, roots of Syakuyaku herb were found to contain abundant LPA and PA, a precursor of LPA. The lipid extracts from these plant materials prevented aspirin- or indomethacin-induced stomach ulcer in mice. It will be possible to develop functional foods for prevention of side effect of NSAIDs using these LPA- or PA-rich plant materials.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質 胃潰瘍 胃粘膜増強 リゾホスファチジン酸 食品 生薬

1. 研究開始当初の背景

アスピリンなど非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は解熱・鎮痛に使用される馴染み深い薬である。また、アスピリンが血液凝固を阻害することから、血栓予防に毎日服用する人も多い。NSAIDs 使用における問題は副作用の消化管障害である。NSAID 服用者の 1/3 は消化管の粘膜損傷を抱えているといわれ、胃薬と共に処方されることが多い。これは「多すぎる薬」の原因となっている。また、血栓予防が目的の場合、NSAIDs による粘膜障害が判明しても、投薬の中止は血栓リスクを高める可能性があり、簡単に中止できない。このように NSAIDs は広く使用されている一方で、厄介な問題も引き起こしている。

リゾホスファチジン酸 (LPA) は血液や唾液など我々の体液中に存在し、特異的受容体を介して細胞増殖、遊走、抗アポトーシスなどバイタルシグナル的に作用する脂質メディエーターである。以前、我々は胃腸障害に効くと言われるキャベツや大根などの野菜に LPA が多く含まれること [1]、ヒトやマウスの胃には消化管の管腔側に 2 型 LPA 受容体が発現すること [2]、この受容体の活性化はシクロオキシゲナーゼ (COX)₂ のアップレギュレーションを介して胃粘膜増強因子のプロスタグランジン (PG)E₂ の産生を促進することを見出していた [2]。また、我々は LPA をヒト胃由来細胞に作用させると形質膜がフィロポディア様に運動することから、LPA が何らかの分泌現象を誘導する可能性を見出していた。

2. 研究の目的

NSAIDs の副作用の消化管障害を食品で解消できれば、安全に NSAIDs 服用を継続でき、医療費の抑制にも繋がる。これまでの我々の研究は食品中の LPA やその前駆体であるホスファチジン酸 (PA) が胃粘膜を増強する可能性を示唆している [3]。本研究では PA や LPA の作用機序を明確にし、この作用機序に基づいた NSAIDs 潰瘍予防食の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試薬と実験材料

本研究に用いた食材は徳島市内のスーパーマーケットや通信販売により入手した。また、生薬は生薬専門店から通信販売により入手した。標準品リン脂質は Avanti polar lipids (Alabaster AL) より購入した。百日咳毒素とカルシウムイオノフォア A23187 は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis MO) より購入した。PGE₂ 測定キットは Cayman Chemical 社 (Ann Arbor MI) より購入した。BrdU ELISA キットは Roch 社 (Mannheim, Germany) より購入した。

(2) 脂質の抽出

食品や生薬からの脂質の抽出、LPA および PA の単離は既報に従って行った [4]。これら

の定量はリン・モリブデン・マラカイトグリーン法にて定量した。既報に従い、質量分析にて質量数を確認することによって LPA や PA の分子種を決定した [3]。

(3) NSAIDs 潰瘍モデルの作成

アスピリンおよびインドメタシン誘導性の胃潰瘍マウスは以前報告した方法に従って作成した [3]。簡単に記載すると、アスピリンおよびインドメタシンをそれぞれ、300mg/kg 体重および 23mg/kg 体重となるように 3% カルボキシメチルセルロース液に懸濁し、ゾンデ針を用いて絶食したマウスに経口投与した。3-4 時間後、開腹し、胃を単離後食道側と十二指腸側を結紮し、一定量のホルマリン溶液を封入した。この胃を切開し、胃体部のシワに沿って形成される線上の胃潰瘍の長さを測定した。この潰瘍長の総和を指標に胃潰瘍形成抑制効果を数値化した。

(4) 培養胃細胞を用いた LPA 効果の解析

ヒト胃由来培養細胞 MKN74 細胞を理研セルバンク (つくば) より入手し、解析を行った。この細胞が発現する LPA 受容体はこの細胞から調製した cDNA を鋳型とし、それぞれの受容体に対応したプライマーから PCR によって増幅されるバンドの有無により判別した [2]。また、アラキドン酸を取り込ませた MKN74 細胞を LPA やこれを含む脂質抽出物で処理後、カルシウムイオノフォアで刺激し、上清に遊離される PGE₂ を ELISA 法で測定することで PGE₂ 産生促進を調べた。一晚無血清においた MKN74 細胞に LPA を処理し、一定時間後に細胞数を計測することで細胞増殖効果を調べた。また、LPA 処理後の細胞に BrdU を加え、4 時間インキュベートすることでこれを取り込ませ、その取り込み量から DNA 合成活性を指標に細胞増殖の程度を判別した。

(5) マウス胃洗浄液中の LPA 濃度の測定

一晚絶食したマウスより胃を単離し、緩衝液で内部を洗浄した。この洗浄液を回収し、以前、報告した方法に従って LC/MS にて LPA を測定した [5]。マウス胃粘液の厚さを 0.2mm、面積を 400mm² として胃粘液の体積を算出し、LPA の濃度を求めた。

4. 研究成果

(1) NSAIDs 潰瘍予防食の素材探索

ヒトにとって穀類は頻繁かつ大量に摂取する食品素材である。もし、穀類に抗胃潰瘍成分の PA が存在するならば、食事の度に摂取できる。そこで、コメ、ムギ、ソバ、トウモロコシの PA 含量を調べた。その結果、コムギやコメは 10mg/100g 以下であったが、ソバやコーンミールは 20-40mg/100g 程度の PA を有していることがわかった。この値はこれまで PA-rich 食品として我々が見出していた大豆やキャベツの 50 mg/100g に匹敵する量であった。また、種子の部位別に PA 含量を調べた結果、PA は糠 (コメ)、ふすま (ムギ) および甘皮 (ソバ) といった種皮や果皮の部分に多く含まれることがわかった。特にソバ

の甘皮の PA は 200mg/100g と、これまで調べた食品素材の中で最も PA-rich な食品素材であった。また、PA は総リン脂質の 20% を占める成分であり、この部位では他の部位よりも PA 純度が高いことも明らかになった。

キャベツなどの生野菜を磨り潰すと、液胞から酵素(ホスホリパーゼ D)が遊離して膜リン脂質に豊富なホスファチジルコリンを PA に変換することがわかっている[1]。従って、キャベツが PA-rich なのは、もともと多いのではなく、ホモジネートにすることで活性化された酵素作用で多くなるというのが正確である。実際、煮沸したキャベツは酵素が不活性化されるため、PA 含量は 1/10 になってしまう[1]。煮沸したソバの甘皮や米糠の PA 含量を調べた結果、いずれも煮沸の前後で変化はなかった。従って、これらの素材では抽出操作の過程で活性化する酵素で PA が生じるのではなく、もともと PA が多く存在していることがわかった。熱処理の影響を受けないことは調理方法によらず PA 含量が高いことを意味しており、効率的に PA を摂取できる好適な食品素材である。

(2)ソバ甘皮由来脂質画分の抗アスピリン潰瘍効果

ソバの甘皮やコメ糠の脂質抽出物の抗アスピリン潰瘍効果を調べた(図1)。その結果、甘皮脂質の経口投与は用量依存的にアスピリン誘導性の胃潰瘍を抑制し、約 6mg/kg 体重の経口投与で潰瘍長をコントロールの 50% に抑制することがわかった。一方、標準品 PA の経口投与は約 4mg/kg の経口投与で同程度の効果が得られた。従って、脂質抽出物の効果はその中に含まれる PA のみではその活性全体を説明できないものの、食事として摂取可能な量で抗 NSAIDs 効果を示すことが確認された。

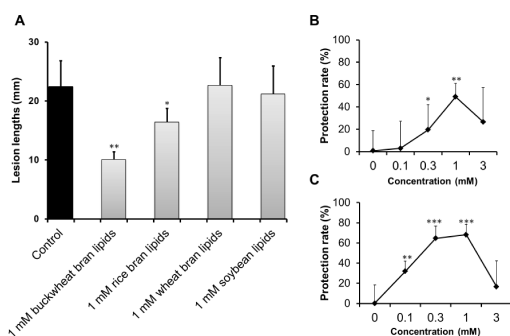


図 1

(3)胃における LPA 産生

単離したマウスの胃でソバの甘皮脂質を 30 分間インキュベートし、脂質組成の変化を調べた。その結果、インキュベート前に約 100nmol あった PA は 20nmol にまで減少し、代わって LPA が数 nmol から約 20nmol にまで増加していた。このことは PA が胃の中で LPA に変換されることを意味しており、PA-rich 食の摂取が胃内で LPA をもたらし、管腔側に

存在する LPA2 に作用しうることを示唆している。

(4)生薬からの NSAIDs 潰瘍予防食素材の探索

PA や LPA が胃粘膜に対して保護的に作用すること、植物素材には PA や LPA を豊富に有しているものがあること[1-4]などから胃腸障害に効くとされる生薬には PA や LPA を有効成分に持つものがあるのではないかと考えた。そこで、胃腸障害に効くとされる生薬 21 種類についてその PA および LPA 含量を調べることとした(図 2)。

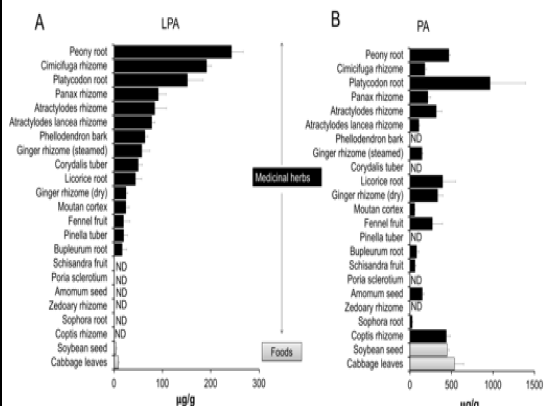


図 2

その結果、生薬(粉末)に含まれる PA 含量は多いものでも 100mg/100g と、これまでに調べた PA-rich 穀類であるソバ甘皮の半分程度であったが、LPA を多く含む生薬が見出された。芍薬(根)および桔梗(根)はいずれも胃痛に効くとされる生薬であるが、それらの LPA 含量は 20mg/100g とキャベツや大豆の LPA 含量の 30-50 倍であった。また、シャクヤク(根)の LPA は総リン脂質の 11% を占める成分で、他の素材と比べると LPA 純度の高い素材であった。

(5)シャクヤク脂質の抗胃潰瘍効果とそのメカニズム

シャクヤク根由来の脂質抽出物のインドメタシン潰瘍に対する効果を調べた。その結果、合成 LPA 2.8 mg/kg 体重の経口投与がコントロールの約 50% に潰瘍長を抑制する条件下、シャクヤク脂質の 5.7mg/kg 体重の経口投与は同等の効果を示すことがわかった。更に、シャクヤク粉末では 2g/kg 体重の経口投与が同等の効果を示した。この粉末 2g には脂質が 5-6 mg が含まれている計算であり、シャクヤク粉末の効果はその脂質の抗胃潰瘍効果から説明可能であった。

LPA2 と LPA5 を主に発現する MKN74 ヒト胃細胞を用いた作用機序の解析を行った。合成 LPA とシャクヤク由来 LPA は濃度依存的に PGE₂ 産生を促進することがわかった。最大活性を誘導する濃度はいずれの LPA でも 3 µM であった。一方、シャクヤク脂質も同様に PGE₂ 産生を誘導したが、その最大活性は LPA のそれよりも高くなった。これらの効果はいずれ

も Gi を阻害する百日咳毒素で完全に阻害されることから LPA2 を介した細胞応答である可能性が高いと考えられた。LPA は PGE₂ 産生の他にもインドメタシンによる直接的細胞障害を軽減し、細胞膜を強化することで細胞死を抑制することや細胞増殖を誘導した。この効果も百日咳毒素で阻害されることから LPA2 を介した作用であると考えられた(図3)。

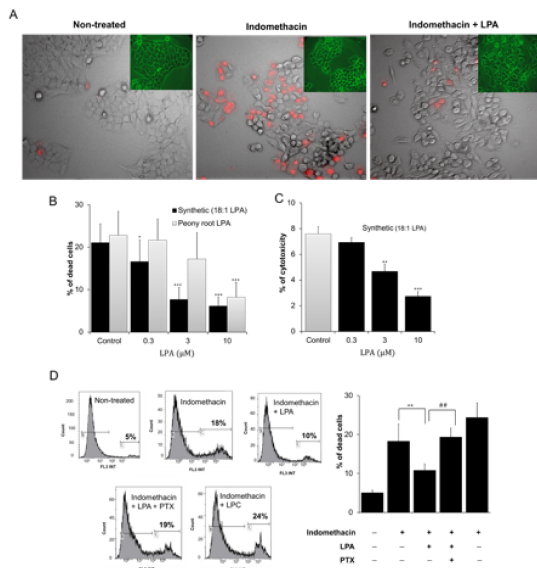


図 3

(6) LPA の膜運動促進効果

MKN74 ヒト胃細胞における LPA の効果を調べる過程で MKN74 細胞の形質膜がフィロポディア様に活発に運動する現象が観察された。当初、この現象はムチン分泌を伴う現象ではないか、と考えていたが、その後の解析でこの現象はムチン分泌を伴っていないことがわかった。LPA がムチンを誘導するかどうかは現在のところ不明のままである。しかし、LPA が胃細胞に対して細胞膜運動を活性化すること、この突起上には小胞様の構造体も観察されることなど興味深い現象である。この現象は LPA がエクソソームの分泌に関わる可能性もあり今後の解析が必要である(図4)。

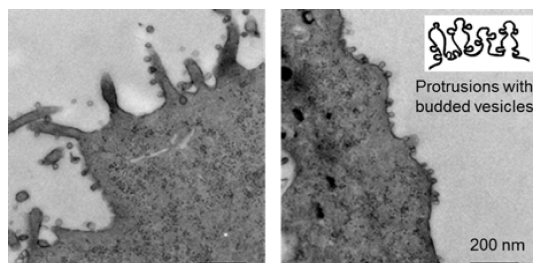


図 4

(7) 胃粘液における LPA 濃度

絶食したマウスから胃粘液を採取し、その中に含まれる LPA 濃度を LC/MS にて定量した。その結果、胃粘液には飽和型 LPA を中心に 2-3 μM の LPA が存在することがわかった(図5)。この濃度は先の MKN74 胃細胞を用いた解析で PGE₂ 産生、細胞死抑制、細胞増殖を示す

濃度であり、定常状態においても LPA は消化管管腔に分泌され特異的受容体に作用して粘膜を保護している可能性が考えられた。

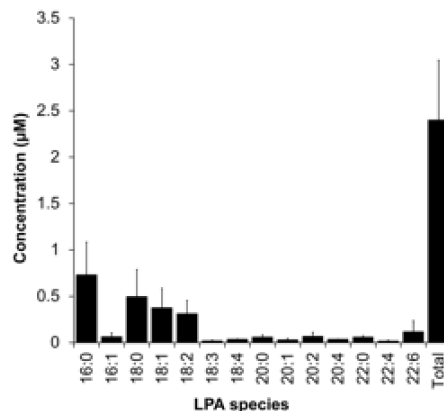


図 5

(8) まとめ

胃内腔液には LPA が含まれており、その濃度は 2-3 μM であった。この濃度の LPA は 2 型 LPA 受容体を介し、粘膜保護因子のプロスタグランジン E₂ の産生促進、細胞死抑制、細胞増殖を誘導する。従って、食事の有無や種類にかかわらず、胃粘膜は常に LPA による胃粘膜保護刺激を受けていると思われる。本研究からソバやコメの種皮部分やシャクヤク根に LPA とその前駆体の PA が豊富に含まれ、その脂質抽出物は NSAIDs 潰瘍を抑制することがわかった。これらの素材は何らかの要因で胃粘膜保護機能が低下した際、LPA を増強することで胃粘膜を丈夫にするかもしれない。食事による NSAIDs 潰瘍抑制は可能と考えられる。

< 引用文献 >

- [1] T. Tanaka, G. Horiuchi, M. Matsuoka, K. Hirano, A. Tokumura, T. Koike, K. Satouchi, Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 巻 2009, 1293-1300.
- [2] T. Tanaka, M. Ohmoto, K. Morito, H. Kondo, M. Urikura, K. Satouchi, A. Tokumura, Type 2 lysophosphatidic acid receptor in gastric surface mucous cells: possible implication of prostaglandin E₂ production, *Biofactors*, 40 巻 2014, 355-361.
- [3] T. Tanaka, K. Morito, M. Kinoshita, M. Ohmoto, M. Urikura, K. Satouchi, A. Tokumura, Orally administered phosphatidic acid and lysophosphatidic acids ameliorate aspirin-induced stomach mucosal injury in mice, *Dig. Dis. Sci.*, 58 巻 2013, 950-958.
- [4] T. Tanaka, A. Kassai, M. Ohmoto, K. Morito, Y. Kashiwada, Y. Takaishi, M. Urikura, J. Morishige, K. Satouchi, A.

Tokumura, Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *J. Agric. Food Chem.*, 60 巻 2012, 4156-4161.

- [5] K. Tsuboi, Y. Okamoto, N. Ikematsu, M. Inoue, Y. Shimizu, T. Uyama, J. Wang, D. G. Deutsch, M. P. Burns, N. M. Ulloa, A. Tokumura, N. Ueda, Enzymatic formation of N-acylethanolamines from N-acylethanolamine plasmalogen through N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways, *Biochim. Biophys. Acta*, 1811 巻 2011, 565-577.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Sheuli Afroz, Ayano Yagi, Kouki Fujikawa, M. Motiur Rahman, Katsuya Morito, Tatsuya Fukuta, Shiro Watanabe, Emi Kiyokage, Kazunori Toida, Taro Shimizu, Tatsuhiro Ishida, Kentaro Kogure, Akira Tokumura and Tamotsu Tanaka, Lysophosphatidic acid in medicinal herbs enhances prostaglandin E₂ and protects against indomethacin-induced gastric cell damage *in vivo* and *in vitro*, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 査読有, 135 巻, 2018, 36-44 doi:org/10.1016/j.prostaglandins.2018.01.003

Takashi Kida, Aoi Itoh, Akari Kimura, Hisatsugu Matsuoka, Hiroyuki Imai, Kentaro Kogure, Akira Tokumura and Tamotsu Tanaka, Distribution of glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity in plants, *J. Biochem.*, 査読有, 161 巻, 2017, 187-195

doi:10.1093/jb/mvw060

Junpei Yamamoto, Midori Omura, Koichiro Tsuchiya, Mayumi Hidaka, Akira Kuwahara, Minoru Irahara, Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura, Preferable existence of polyunsaturated lysophosphatidic acids in human follicular fluid from patients programmed with *in vitro* fertilization, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 査読有, 126 巻, 2016, 16-23

http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.07.008

Sheuli Afroz, Teru Ikoma, Ayano Yagi, Kentaro Kogure, Akira Tokumura and Tamotsu Tanaka, Concentrated

phosphatidic acid in cereal brans as potential protective agents against indomethacin-induced stomach ulcers. *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 64 巻, 2016, 6950-6957

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02884

Toshihiko Tsutsumi, Yoko Okamoto, Syougo Yamakawa, Cheng Bingjun, Akira Ishihara, Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura, Reduced rat plasma lysophosphatidylglycerol or lysophosphatidic acid-induced renal and adipose dysfunctions, *Life Sci.*, 査読有, 157 巻, 2016, 208-216

https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.003

Ryouhei Yamashita, Yumika Tabata, Erina Iga, Michiyasu Nakao, Shigeki Sano, Kentarou Kogure, Akira Tokumura and Tamotsu Tanaka, Analysis of molecular species profiles of ceramide-1-phosphate and sphingomyelin using MALDI-TOF mass spectrometry, *Lipids*, 査読有, 51 巻, 2016, 263-270 DOI: 10.1007/s11745-015-4082-0

〔学会発表〕(計7件)

Antiulcer effect of lysophosphatidic acid-rich medicinal herbs and its mechanism, Sheuli Afroz, Katsuya Morito, Kouki Fujikawa, Ayano Yagi, Kazunori Toida, Emi Kiyokage, Kentaro Kogure, Shiro Watanabe, Akira Tokumura, Tamotsu Tanaka, 第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会 プログラム p439, 2017年12月6-9日, 神戸(神戸ポートアイランド)

Phosphatidic acid-rich cereals as anti-ulcer foods and their mechanisms of action, Sheuli Afroz, Katsuya Morito, Kouki Fujikawa, Ayano Yagi, Teru Ikoma, Emi Kiyokage, Kazunori Toida, Kentaro Kogure, Tamotsu Tanaka, 日本脂質栄養学会第26回大会 予稿集 p200, 2017年9月22-23日、東京都千代田区(学術総合センター)

Ameliorative effect of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in herbs against NSAIDs-induced stomach ulcer. Sheuli Afroz, MD. Motiur Rahman, Kentaro Kogure, Shiro Watanabe, Kimio Takeda and Tamotsu Tanaka, 日本農芸化学会中四国支部第47回公演会 要旨集 p35, 2017年1月28日 松江市(島根大学)

Effect of phosphatidic acid on NSAIDs-induced stomach ulcer and its content in cereals. Sheuli Afroz, Teru Ikoma, Ayano Yagi, Shiro Watanabe, Akira Tokumura and Tamotsu Tanaka, 日

本農芸化学会中四国支部第 44 回公演会
要旨集 p33, 2016 年 1 月 23 日 岡山県
立大学

Effect of phosphatidic acid on
indomethacin-induced stomach ulcer and
its content in plant sources

Afroz Sheuli、生駒照、屋宜彩乃、徳村彰、
田中保, 第 88 回日本生化学会大会 プロ
グラム p288, 2015 年 12 月 1 日、神戸ポ
ートアイランド

ヒト胃由来培養細胞におけるリゾホスフ
ァチジン酸誘導性小胞分泌現象の解析

藤川昂樹, 生駒照、森戸克弥, 生駒照, 清
蔭恵美, 徳田一徳, 清水太郎, 石田竜弘,
徳村彰, 田中保, 第 88 回日本生化学会大
会 プログラム p288, 2015 年 12 月 1 日、
神戸ポートアイランド

リゾホスファチジン酸が誘導する小胞分
泌現象の解析, 田中保, 藤川昂樹, 森戸
克弥, 清蔭恵美, 樋田一徳, 清水太郎,
石田竜弘, 徳村彰, 第 57 回日本脂質生
化学会, 講演要旨集 p100-101, 2015 年 5 月
28 日, 一橋大学

〔図書〕(計 2 件)

A cleanup method for mass
spectrometric analysis of
sphingosine-1-phosphate and
ceramide-1-phosphate in blood and
solid tissues using a phosphate
capture molecule (revised version),
Jun-ichi Morishige, Ryouhei
Yamashita, Tamotsu Tanaka, Kiyoshi
Satouchi, *in* Methods in Molecular
Biology. ed. by A. Pebay and K.
Turksen, Springer, 1697 巻, 2017, 15
ペルオキシソームにおける脂肪酸代謝と
疾患 (総説)

田中保, 下澤伸行, 生化学, 90 巻, 第 1
号, 2018, 7

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/esi/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (薬学
域)・准教授

研究者番号 : 90258301