

## 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23日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300276

研究課題名（和文） インビトロ腸炎モデルの構築とそれを利用した抗炎症性食品因子の探索と抑制機構の解明

研究課題名（英文） Establishment of in vitro gut inflammatory model and search and mechanism of food factor possessing anti-inflammatory activity

研究代表者

水野 雅史（MASASHI MIZUNO）

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00212233

研究成果の概要（和文）：マクロファージ様 RAW264.7 細胞と小腸上皮様 Caco-2 細胞を共存培養し、基底膜側へリポ多糖 (LPS) を処理することでインビトロ腸炎モデル系を構築した。この系を用いて抗炎症性を示す食品因子を検索したところ、ポリフェノール類としてクルクミンとルテオリン、多糖類としてフコイダンおよびレンチナンに活性が認められた。これらのうち、フコイダンに関しては小腸上皮細胞との相互反応によって発生する過酸化水素が重要であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：A system for assessing the anti-inflammatory effect of food factors has been developed by establishing a co-culture system with intestinal epithelial Caco-2 cells (apical side) and macrophage RAW264.7 cells (basolateral side) stimulated with lipopolysaccharide. Curcumin and luteolin as polyphenols, fucoidan and lentinan as polysaccharide shows the anti-inflammatory activity in this system. Particularly, it was demonstrated that fucoidan indicated its activity by producing hydrogen peroxide from Caco-2 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

## 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国における炎症性腸疾患 (IBD) は若年者に好発しており、その数は増加の一途をたどっている。クローン病や潰瘍性大腸炎といった IBD は腹痛・血便・下痢などの症状を伴うが病因不明のため難病指定されている。現在のところ特定の原因は同定されていないが、食事や腸内細菌などの環境因子が

免疫異常を引き起こすために消化管内での慢性炎症が持続するなど、その病態についても解明されつつある。特に、免疫担当細胞やサイトカイン異常については遺伝子操作動物炎症モデルで詳しく検討されてきており、マクロファージをはじめとする異物を処理する細胞やある種のリンパ球が何らかの抗原に対して異常反応することがその成因と

想定されている。一方、我々の身体には、本来体と接触する多数の抗原に対して過剰に免疫反応を起こさせない仕組み、すなわち、免疫寛容という機構が備わっている。従って、通常は腸管内には管腔内微生物抗原や食餌由来抗原に対する情報伝達および免疫制御機構が備わっており、非病原性因子に対しては免疫寛容を誘導し病原性因子に対しては防御的免疫応答を誘導しているのに対して、IBD 患者では、宿主の腸管内細菌性抗原に対する免疫寛容が破綻した結果発症していると考えられる。つまり、IBD では、破綻した粘膜より腸内細菌が常に侵入し、菌体成分による直接的な刺激またはマクロファージから産生される炎症性サイトカインなどの刺激により、粘膜下に存在する抗原提示細胞が慢性的に活性化した状態と考えることが出来る。したがって、食生活を改善することによって粘膜およびその直下に存在する抗原提示細胞を適切に制御できれば、抗原提示細胞による慢性的活性化を抑制でき、IBD 改善に寄与できると考えられる。

## 2. 研究の目的

日々摂取する食品の量的・質的コントロールによって、食品因子→腸内菌叢→免疫システム→腸神経系の機構的連結を統制することが可能であることが明らかとなってきた。すなわち、食品因子による生体の恒常性維持や免疫生体防御を有益な方向に統制する方法やこれに基づく応用技術を開発することで、免疫応答の異常が引き金となっている IBD を治療あるいは予防することが出来ると考えられる。本研究では、小腸上皮様培養細胞とマクロファージ様培養細胞を用いた IBD を模倣した新規共培養系モデルを開発し、免疫応答の異常によって過剰に産生される炎症性サイトカイン産生を抑制する食品因子の探索および腸管細胞を介した免疫細胞への情報伝達の解明を行う。それをもとに、難病指定されている IBD の発症メカニズムの解明と食品因子による予防に貢献することを目的としている。

## 3. 研究の方法

IBD プロトタイプ腸管モデルや実験動物を用いて免疫応答を抑制する食品因子の探索とその抑制機構を明らかにすることによって、食品因子による生体の恒常性維持や免疫生体防御を有益な方向に統制する方法を確立し、食生活の改善による IBD 抑制と予防を実現するために以下の実験を行う。

### (1) IBD を反映した共培養系モデル (IBD プロトタイプ腸管モデル) の構築

IBD を発症した患者の腸管上皮細胞においては、活性化したマクロファージや樹状細胞が観察される。これらの免疫担当細胞からは

主要な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などが過剰産生され、腸管上皮細胞やその他の免疫担当細胞である T 細胞などを刺激し、最終的には腸上皮細胞は更なる炎症性サイトカインや IL-8 に代表される白血球遊走因子のケモカインを産生する。その結果、自身が構成する腸管上皮単層膜の崩壊が起こり腸管腔内に存在する異物の透過性が増大するなどして炎症状態の増幅が生じている。これまで、我々はキノコ多糖類が免疫細胞をどのように活性化するのかを明らかにするために、腸管腔側に小腸様上皮培養細胞である Caco-2 細胞を、基底膜側にマクロファージ様培養細胞である RAW264.7 をトランスウェル膜で仕切ることによって腸管モデルを確立する。

### ① IBD プロトタイプ腸管モデルの構築

マクロファージを活性化する因子としてリポポリサッカライド (LPS) を基底膜側から加えてマクロファージを活性化させ、炎症性サイトカインを分泌させる。このようにして内膜側に炎症を起こさせた状態で、IBD 患者に見られる TNF- $\alpha$  産生、腸管上皮単層膜の崩壊、白血球遊走因子のケモカインである IL-8 産生を調べる。この際、TNF- $\alpha$  および IL-8 産生量を測定する。次に、マクロファージからの TNF- $\alpha$  が本当に IL-8 産生に関与しているかを確認するため、あらかじめ基底膜側に中和抗体として抗 TNF- $\alpha$  抗体を添加しておき、マクロファージから産生される TNF- $\alpha$  の作用を阻止した系において、IL-8 産生が抑制されるか否かで確認する。腸管上皮単層膜の崩壊については、Millicell-Epithelial Resistance System を用いて電気抵抗値を測定することにより判断する。さらに IBD 治療薬として用いられているブデソニドを腸管腔側から添加した際に、基底膜側の IL-8 産生量が抑制されるかを調べることで、IBD プロトタイプ腸管モデルが構築されているかを確認する。

### (2) 免疫抑制を惹起する食品の検索

構築した IBD プロトタイプ腸管モデルを用いて、基底膜側の IL-8 産生量を比較することで免疫抑制を惹起する食品を探索する。

#### ① 食品因子の検索

Caco-2 細胞を供試材料で処理すると同時に RAW264.7 細胞を LPS で刺激してマクロファージからの TNF- $\alpha$  産生を誘導し、TNF- $\alpha$  によって刺激を受けた Caco-2 細胞から分泌される IL-8 産生量を、供試材料未処理の Caco-2 細胞からの IL-8 産生量と比較する。供試材料としては、これまでに我々の研究室で免疫賦活能を有していることがわかっているキノコやコンブあるいは腸内細菌叢の一つであり特定健康食品として許可されておりプロバイオティック作用がある乳酸菌やビフィズス菌を用いる。IBD プロトタイプ腸管モ

デルで免疫抑制効果が認められた食品因子については、IBD モデルとして知られるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導型急性腸炎マウスモデルを用いて炎症抑制効果を確認する。C57BL/6 マウスに 2% DSS (Molecular weight : 36,000-50,000) を 7 日間自由飲水させ、その後、通常の蒸留水に変更する方法を用いて、インビボでの効果を確認する。測定項目としては、マウスの臨床的变化 (便性状、体重) を毎日観察する。また、DSS 投与 15 日目にそれぞれのマウス群より大腸組織を採取し、腸炎評価システムによる病理組織学的変化、好中球に代表される炎症細胞浸潤のマーカーであるミクロペルオキシダーゼ活性の測定を行う。また、大腸組織より mRNA を抽出し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12p40、さらに好中球の遊走を促進するケモカインである MIP-2 (ヒト IL-8 のマウスにおけるホモログ) や ENA-78 について、その発現量をリアルタイム PCR で定量する。

#### 4. 研究成果

In vitro において簡便な腸管炎症モデルとして、トランズウェルメンブレン上に腸管上皮培養細胞である Caco-2 細胞を、基底膜側にマクロファージの培養細胞である理によってマクロファージの活性化を誘導して炎症状態を誘発させたモデル系を作りだした。この系が抗腸管炎症効果を簡便に評価できるモデルであるかを検討するため、Caco-2 細胞単層膜における細胞間透過性を制限する機構であるタイトジャンクションの機能変動を経上皮電気抵抗値 (TEER) 値の経時的変化を検討した。その結果、TEER 値は、36 時間後に低下開始が見られ 48 時間後においては著しく減少するという結果が得られた。このことから、本モデルにおいても IBD 患者同様、腸上皮単層膜の物理的バリア機能の損傷が生じていること明らかとなった。次に、Caco-2 細胞と RAW264.7 細胞を共培養状態で基底膜側に LPS を処理した後、Caco-2 細胞における好中球遊走因子である IL-8 mRNA 発現の経時的変化を RT-PCR 法により観察した。その結果、IL-8 mRNA 発現は LPS 刺激によって増加すること、またその発現程度は経時的実験から、3 時間でピークを迎えることが分かった。一般に IBD 患者の治療薬としては炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の中和抗体やステロイド剤であるブデソニドが用いられている。TNF- $\alpha$  の中和抗体を基底膜側に添加することによって、Caco-2 細胞からの IL-8 mRNA 発現は有意に抑制された。一方、経口薬であるブデソニドを管腔側から添加すると、中和抗体の場合と同様 IL-8 mRNA 発現は有意に抑制された。これらの結果から、本研究で構築したインビトロ腸炎モデル系が、

### 実験スケジュール

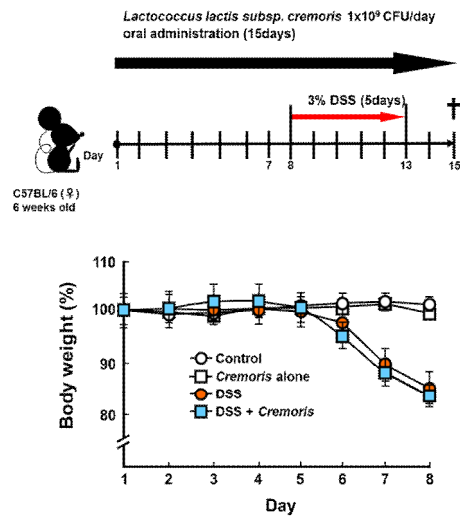
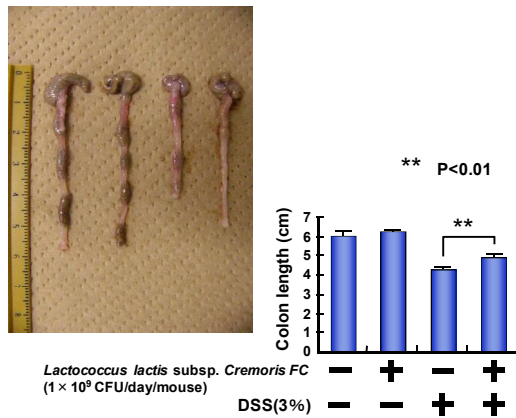


図1. クレモリス菌投与による炎症性腸疾患における体重変化

生体内の腸管炎症状態に類似していることが示唆された。

そこでこの系を用いて食品成分による腸管炎症状態を抑制できるかどうかを検討してみた。*Lactobacillus casei* 菌はチーズなどの乳製品に含まれ、潰瘍性大腸炎の症状改善、クローン病の再発予防効果を持つ VSL # 3 (腸内細菌製剤) にも含まれるプロバイオティクスであることが知られている。本実験ではこの *Lactobacillus casei* の UV 死活化菌を本モデルの管腔側から処理した。その結果、 $1 \times 10^9$  もしくは  $1 \times 10^8$  CFU/ml 処理区で、Caco-2 細胞内の IL-8 mRNA 発現の増加が抑制される傾向が得られました。このことから、本系を用いて食品成分の抗炎症効果を検討できる可能性が示唆された。この結果がインビボ系でも反映できるかを検討するためデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による腸炎誘発モデルマウスを用いた。In vitro 腸管炎症モデルに抑制効果を示した *L. lactis* subsp. *cremoris* FC を経口投与により、DSS 誘導性腸炎による体重減少の抑制効果は認められなかった (図1) が、結腸短縮の改善が認められた (図2)。また、炎症部位の組織学的検討から、炎症細胞浸潤の有意な抑制が認められた。さらに、腸管炎症部位における炎症性サイトカイン mRNA 発現の解析より、*L. lactis* subsp. *cremoris* FC の経口投与によって TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ )、IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ )、IL-6、iNOS、MIP-2 mRNA 発現の顕著な抑制が認められた。これらの結果から、*L. lactis* subsp. *cremoris* FC は腸管炎症抑制効果が期待できると考えられた。さらに、in vitro 腸管炎症モデルにおいて作用機作を検討したところ、Caco-2 細胞における IL-8 mRNA 発現



クレモリス菌による結腸短縮の抑制効果

が有意に抑制され、RAW264.7細胞においてもNF- $\kappa$ B核内移行の抑制が認められた。以上の結果より、*L. lactis* subsp. *cremoris* FCは、炎症細胞の浸潤を抑制することによりDSSによって誘導される腸炎を改善すると考えられた。

#### 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 Xu, X. J., Yasuda, M., Tsuruta, S., Mizuno, M., and Ashida, H.  $\beta$ -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, 871-878, 2012.
- ② Masuda, Y., Takahashi, T., Yoshida, K., Nishitani, Y., Mizuno, M. and Mizoguchi, H., TLR ligands of *Lactobacillus sakei* LK-117 isolated from seed mash for brewing sake are potent inducers of IL-12, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 112, 363-368, 2011.
- ③ Bouike, G., Nishitani, Y., Shiomi, H., Yoshida, M., Azuma, T., Hashimoto, T., Kanazawa, K. and Mizuno, M., Oral treatment with extract of *Agaricus blazei* Murill enhanced Th1 response through intestinal epithelial cells and suppressed OVA-sensitized allergy in mice, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 査読有, Volume 2011, Article ID 532180, 11 pages doi:10.1155/2011/532180.
- ④ Nishitani, Y. and Mizuno, M., Anti-inflammatory activities of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC in *in vitro* and *in vivo* gut inflammation, *Biosci. Microflora*, 査読有, 29, 169-178, 2010.
- ⑤ Nagasato, C., Inoue, A., Mizuno, M.,

Kanazawa, K., Ojima, T., Okuda, K. and Motomura, T., Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae), *Planta*, 査読有, 232, 287-298, 2010.

- ⑥ Kure, I., Nishiumi, S., Nishitani, Y., Tanoue, T., Ishida, T., Mizuno, M., Fujita, T., Kutsumi, H., Arita, M., Azuma, T. and Yoshida, M., Lipoxin A4 reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and intestinal epithelial cells through inhibition of NF- $\kappa$ B activation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 査読有, 332, 541-548, 2010.
- ⑦ Mizuno, M., Nishitani, Y., Hashimoto, T. and Kanazawa, K., Different suppressive effects of fucoidan and lentinan on IL-8 mRNA expression in *in vitro* gut inflammation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 73, 2324-2325, 2009.
- ⑧ Nishitani, Y., Tanoue, T., Yamada, K., Ishida, T., Yoshida, M., Azuma, T. and Mizuno, M., *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice, *Int. Immunopharmacol.*, 査読有, 9, 1444-1451, 2009.
- ⑨ Hashimoto, T., Ozaki, Y., Taminato, M., Das, S. K., Mizuno, M., Yoshimura, K., Maoka, T. and Kanazawa, K., The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral-administration in mice, *Br. J. Nutr.*, 査読有, 102, 242-248, 2009.
- ⑩ Takizawa, R., Nishitani, Y., Mizuno, M. and Osawa, R., Anti-inflammatory effect of Bifidobacterium longum on macrophage-like THP-1 cells via epithelial cell Caco-2, *Biosci. Microflora*, 査読有, 28, 45-48, 2009.
- ⑪ Mizuno, M., Nishitani, Y., Tanoue, T., Matoba, Y., Ojima, T., Hashimoto, T. and Kanazawa, K., Quantitation and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 73, 335-338, 2009.

[学会発表] (計3件) (総計21件)

- ① 水野雅史、レンチナンの腸管炎症抑制機構：小腸上皮様Caco-2細胞のTNFR1の局在性に及ぼす影響について、日本農芸化学会平成24年度大会、京都、2012年3月24日
- ② Masashi Mizuno, Gut anti-inflammatory

activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial-like Caco-2 cells, 16th European Carbohydrate Symposium, 2011, July 4th, Sorrento, Italy.

- ③ 水野雅史、*In vitro* 腸炎モデルにおけるレンチナンの炎症抑制機構の検討、日本農芸化学会平成 23 年度大会、京都、2011 年 3 月 27 日

[図書] (計 3 件) (総計 4 件)

- ① 西谷洋輔、水野雅史、シーエムシー出版、プロバイオティクスの炎症性腸疾患抑制作用、免疫機能性食品の基礎と応用、上野川修一監修、2010、pp. 134-144.
- ② 水野雅史、シーエムシー出版、 $\beta$  グルカン高含有食品素材の免疫賦活活性、 $\beta$  グルカンの基礎と応用—感染、抗がん、ならびに機能性食品への  $\beta$  グルカンの関与—大野尚仁監修、2010、pp. 127-132、
- ③ Mizuno, M., Humana Press, *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory and anti-allergic effects of *Agaricus blazei* Murill, In Dietary Components and Immune Function, (Watson, R.R., Zibadi, S. and Preedy, V.R., eds), 2010, pp. 387-394.

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-gl-yco-chain/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 雅史 (MIZUNO MASASHI)  
神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：00212233

### (2) 研究分担者

西谷 洋輔 (NISHITANI YOSUKE)  
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点  
研究部・助教  
研究者番号：80457093