

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500993

研究課題名(和文)日本人の主食である炊飯米の機能に関する研究

研究課題名(英文)Study on function of the cooked rice of the Japanese staple food

研究代表者

清水 純 (Shimizu, Jun)

城西大学・薬学部・講師

研究者番号：70297597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炊飯米がマウスのDSS誘導大腸炎を改善するかどうかを明らかにすることを目的とした。我々は、炊飯米の経口投与は、マウスの体重減少、MPO活性などを大腸炎の症状を改善させることを発見した。また、DNAマイクロアレイによる大腸組織の網羅的解析から、炊飯米は細胞周期に関係する遺伝子の発現を増加させた。さらに、米由来のペプチドは、炎症を誘導した腸組織のバリア機能を維持すると考えられた。これらの結果から、炊飯米は、炎症性大腸炎の予防と改善に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated to clarify whether cooked rice (CR) improved the DSS-induced colitis of the mouse. We found that the oral CR improved a symptom of the colitis with the weight loss and MPO activity of the mouse. In addition, gene expression analysis of colon tissue by DNA microarrays, CR increased the expression of cell cycle-related genes. Furthermore, rice-derived peptides were considered to maintain the barrier function of the intestinal tissue that was induced inflammation. These results suggest that dietary CR may relieve the prevention and improvement of inflammatory bowel disease.

研究分野：食品機能学

キーワード：炊飯米 デキストラン硫酸ナトリウム 潰瘍性大腸炎 DNAマイクロアレイ 米ペプチド

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、大腸に炎症を生じる潰瘍性大腸炎と、消化管のどの部位にも激しい炎症や潰瘍が生じるクローン病の2つの総称であり、我が国の特定疾患 (公費対象) となっている。患者数は約 11.3 万人 (2009 年) で、毎年約 8,000 人の増加を続けているため、早急な対策が求められている。申請者は、IBD 患者の食事療法の開発を目的とした研究の一環から、炊飯米 (化米) 粉末の投与が、潰瘍性大腸炎モデルマウスの炎症指標を、有意に軽減することを見いだした。

IBD は再燃・再発を繰り返しやすい、多くは完治がきわめて困難である。発症年齢のピークは 10~20 歳代であり、若年期での発症率が高いため、発症後の長い人生で経験する就学、就職、結婚、出産などに大きな影響を及ぼす。治療法は従来の非ステロイド性抗炎症薬療法に加え、最近では抗ヒト TNF-中和抗体薬が有効な手段の一つとして用いられ、薬物による対症療法が中心となっている。一方で、長期間にわたり病態を安定的にコントロールし、患者の生活の質の向上に寄与できる食事療法の重要性が再認識されている。

IBD の発症原因は未だ明らかとなっていないが、遺伝的背景が近似する日本人に、近年になって患者が急増しているのは、環境因子の変化、特に食事内容の変化に原因があると推測されている。すでに米や植物性たんぱく質の摂取量と発症抑制の関連が、複数の疫学研究から指摘されている。日本人 IBD 患者の発症前の食事を調査し、食品摂取状況との関連を調べた Sakamoto らの研究では、米飯の摂取が発症リスクを減少させると報告されている (*Inflamm Bowel Dis*, 2005)。我が国の食生活は、穀類エネルギー比率が漸減を続け、特に米の摂取量減少は著しい。米の摂取量減少は、これまでの患者の増加傾向と逆相関している。

米に含まれる特徴的な成分として、Tanaka らは糞便まで消化されずに排泄される顆粒状たんぱく質のプロテインボディを見いだしている (*Agric Biol Chem*, 1975)。申請者は炊飯米の大腸への影響は、この難消化性である米たんぱく質が主体である可能性を考えている。すなわち、消化・吸収を免れ消化管下部に到達した米のたんぱく質 (またはペプチド) が、腸内細菌の影響を受け、腸内細菌や代謝産物の変化により、腸内環境を修飾したものと推測している。

本研究によって日本人が主食とする炊飯米の食品機能性を明らかにし、米 (炊飯米) を効果的に応用した臨床分野における食事療法の開発や、米の消費拡大、食品工業における利用や機能性食品の開発へ展開するためのエビデンスを得たいと考えている。

2. 研究の目的

申請者は炊飯米 (化米) 粉末を炎症性腸

疾患 (IBD) モデルマウスに投与すると、大腸炎を抑制することを見いだした。本研究は炊飯米による炎症抑制のメカニズムを明らかにし、IBD 患者の食事療法開発へ展開を図るとともに、食生活における炊飯米の重要性に関するエビデンスを得るため、基本的な食品機能性を解明することが目的である。

具体的な研究項目は、IBD モデルマウスを用いた炊飯米の投与時期の影響、炊飯米の持つ食品機能解明、マクロファージと腸管上皮様細胞の機能に与える米たんぱく質 (ペプチド) の影響である。

3. 研究の方法

(1) IBD モデル動物を用いた炊飯米の投与時期の解明

炎症性大腸炎モデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲用させたマウスを用いて検討を行う。これまでの研究では全飼育期間で炊飯米をマウスに投与していた。そのため、どの期間に炊飯米が効果を発揮していたか不明であった。そこで炊飯米の投与を全期間、DSS 投与前の 1 週間のみ、DSS 投与期間中のみ、DSS 投与後から、として検討した。大腸炎モデルは、C57BL/6J 系雌マウスに、2.5%DSS 水溶液を飲水として 5 日間与え、その後 7 日間は回復期間とするスケジュールとした。大腸炎の評価は、病態スコア (Disease activity index, DAI) 及び大腸のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性、炎症関連遺伝子発現 (リアルタイム PCR) から行う。

(2) 炊飯米に含まれる機能性成分を明らかにする

本研究で扱う炊飯米 (化米) の基本的な食品機能を明らかにするため、炊飯米を投与したマウスの大腸粘膜と肝臓をサンプルとして、DNA マイクロアレイ解析システムによりゲノミクス解析を行った。また、DSS を投与したマウスも同時に測定を行った。

飼育中の糞を採取し、16s rRNA をターゲットとした菌種特異的プライマーと、リアルタイム PCR を用いた腸内フローラ解析を行い、腸内環境の変化を探った。

(3) 培養細胞を用いた炎症抑制メカニズムの解明

炊飯米の炎症抑制メカニズム解明のため、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系で検討を行った。サンプルは米からタンパク質をアルカリ抽出し、微生物由来プロテアーゼで処理した米ペプチドを用いた。消化吸収を免れたたんぱく質 (主にプロテインボディ) は、下部消化管で腸内細菌に分解され、ペプチドなどを生成していると考えられるためである。この米ペプチドは、トリペプチドを主体とし、含有量が 80% 以上のものを用いた。

マクロファージ様細胞株を用いた炊飯米成分の炎症抑制メカニズムの解明

炎症性腸疾患では腸管粘膜のバリア機能の破綻により、腸管内のグラム陰性細菌など

の腸管粘膜内に侵入により、免疫細胞の過剰な免疫応答が誘導され、炎症が亢進する。この状態のモデル実験系として、マクロファージ様細胞株 J774.1 を用い、グラム陰性菌外膜の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を作用させる。LPS により活性化された細胞から産生放出され、炎症を引き起こす一酸化窒素 (iNOS)、TNF- α など種々の生理活性物質や、炎症関連遺伝子の遺伝子発現をマーカーとして評価した。

腸上皮様細胞株を用いた炊飯米成分の腸管バリア機能への影響を調べる

ヒト由来の Caco-2 細胞株を、透過性膜上でシート状に単層培養すると、腸管上皮様に細胞が分化し、*in vitro* の腸管モデルとして使用できる。一方、炎症性腸疾患の病態において、TNF- α は重要な役割を担うサイトカインであることが多くの研究から報告されている。シート状の培養細胞の基底膜側 (basolateral 側) に TNF- α を作用させ、腸管に炎症が誘導された状態を再現した。管腔側 (apical 側) には米ペプチドを入れて作用させ、TNF- α の刺激による経上皮電気抵抗値 (TEER) の変化や、IL-8 などのケモカインの分泌、タイトジャンクション関連遺伝子の発現を指標とした。

4. 研究成果

(1) 炊飯米投与時期の影響

病態スコア (Disease activity index, DAI) は対象群に比べ、炊飯米を投与したすべての群で抑制傾向を示し、炊飯米の大腸炎抑制効果が確認された (Figure)。全期間を通して炊飯米を投与した群は、DAI は最も低値を示した。また、DSS 投与後に炊飯米を与えた群は、DAI の上昇は他群と同様であるが、炊飯米の投与後は低下が早く、大腸炎の回復に効果があると認められた。炎症の指標である MPO 活性や、TNF- α 、IL-1 などの遺伝子発現では、炊飯米を投与した群は対照群に対し、有意に低値を示した。しかし、炊飯米を投与した群の間では、大きな差は認められなかった。

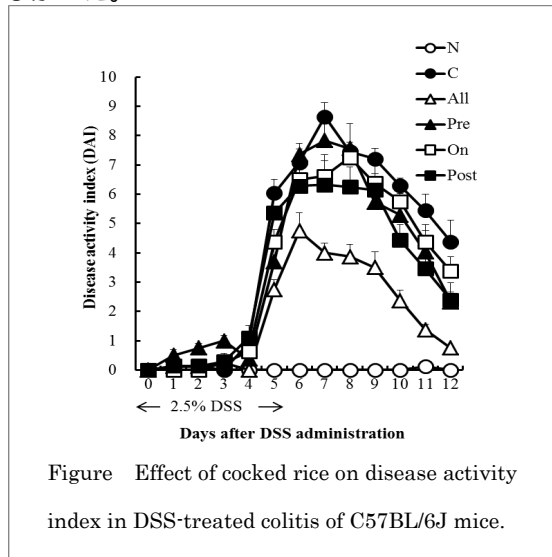


Figure Effect of cooked rice on disease activity index in DSS-treated colitis of C57BL/6J mice.

(2) ゲノミクス解析と腸内細菌

遺伝子変動の概要を抽出するため、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いてデータ解析を行った。肝臓では、DSS 投与にかかわらず、炊飯米の投与により、抗原結合や免疫グロブリンに関する遺伝子の発現が上昇していた。大腸では、DSS 非投与で、各種の免疫グロブリンに関連する遺伝子が見られた。一方、DSS 投与では、細胞周期に関連する遺伝子の発現上昇が見られた。炊飯米の投与により、免疫系を賦活していると考えられた。また、大腸の炎症状態では、細胞周期に影響を与え、組織損傷時の修復を早めていると推察された。

炊飯米の投与により、総菌数に対する割合は、*Lactobacillus* 属は有意に増加し、*Bifidobacterium* 属は増加傾向が認められた。炊飯米の影響は、腸内細菌叢を修飾することにより、代謝産物の変動が、大腸炎の軽減に影響している可能性が考えられた。

(3) *in vitro* における検討

培地中の NO と TNF- α の濃度は、PEP 0.5mg/mL ではわずかに高くなり、PEP 1mg/mL では、低下を示したが、有意差は認められなかった。リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量の測定では、TNF- α 、IL-18 などの炎症関連遺伝子の遺伝子発現量は、対照群と比べ、PEP 0.25mg/mL ではむしろ高くなり、PEP 0.5, 1.0mg/mL では低下傾向が見られた。これらの結果から、PEP の炎症抑制作用には、低濃度では効果が無く、ある程度の濃度が必要であることが示唆された。

TEER は、TNF- α を作用させた 24 時間後には、None (TNF- α 非添加) に比べ、TNF- α を添加した 3 群で有意に低下した。48 時間後には、対照に比べ PEP の 2 群で高値を示したが、有意な差ではなかった。基底膜側の IL-8 濃度は、対照に比べ PEP 1.0mg/mL で有意に低値を示した。組織のバリア機能に関係する ZO-1、Claudin-1 の遺伝子発現量測定では、対照群との間に有意差は見られなかった。これらの結果から、PEP は炎症の抑制よりも、(腸管) 組織の機能維持に寄与していることが推察された。

(4) まとめ

上記(1)から(3)の結果から、炊飯米(化米粉末)は、マウス DSS 誘導大腸炎の発症、および回復に効果が認められ、炊飯米の新たな機能性として、腸管に対し保護作用や機能維持の効果を有することが示唆された。このメカニズムとして、免疫機能と細胞周期、さらには腸内細菌叢の修飾が関与している可能性が示された。機能性成分として(トリ)ペプチドの可能性を想定したが、最近、prolamin が炎症抑制効果を発揮するとの報告 (*Clin Exp Immunol*, 2014) があり、大きな分子量の成分が関与している可能性がある。米の有効性成分については、今後、さら

なる探索と検討が必要と考えられる。

研究者番号：

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 1件)

清水 純, 紙谷ひとみ, 大竹一男, 内田博之, 小林 順, 真野 博、デキストラン硫酸ナトリウム誘導大腸炎モデルマウスに与えるセルロース粉末の影響、日本食物繊維学会誌、査読有、16(2),71-79, 2012.

〔学会発表〕(計 1件)

紙谷ひとみ, 小倉香名, 清水 純, 真野 博、DSS 誘導大腸炎マウスにおける水溶性/不溶性食物繊維の影響、第 16 回日本食物繊維学会学術集会、2011 年 11 月、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

清水 純 (SHIMIZU, Jun)

城西大学・薬学部・医療栄養学科・講師

研究者番号：70297597

(2) 研究分担者

該当無し()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し()