

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2009

課題番号：20688005

研究課題名 (和文) 腸管におけるスフィンゴ脂質の新たな生理作用の解明

研究課題名 (英文) The analysis of new physiological function of sphingolipid in the intestine

研究代表者

薩 秀夫 (SATSU HIDEO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80323484

研究成果の概要 (和文)：

腸管上皮細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝物であるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 及びその受容体の生理作用について解析した。腸管上皮細胞では、5種類の S1P 受容体のうち S1P<sub>2</sub> が高発現していることが示された。また腸管上皮細胞においてある種の Toll 様受容体を活性化した状態では、S1P はインターロイキン 6 など炎症性サイトカイン発現を S1P<sub>2</sub> 及び cAMP 経路を介して増強することが見出された。この現象はマウス腸管組織でもみられ、これより S1P 及び S1P<sub>2</sub> は腸管における炎症反応に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the physiological function of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptors in the intestinal epithelial cells. It was observed that S1P<sub>2</sub> receptor is highly expressed in the intestinal epithelial cells (IECs). Then we analyzed the effect of S1P on immune function of IECs. Treatment of mouse IEC line with S1P additionally up-regulated the mRNA expression and secretion of IL-6 induced by Pam3CSK4 (TLR1/2 ligand) and also TLR2, 5, 7 ligands. S1P and S1P<sub>2</sub> agonist induced the IL-6 secretion and mRNA expression in the Pam3CSK4-treated IEC line and this effect was completely abolished by treatment with S1P<sub>2</sub> antagonist (JTE013). Luciferase reporter assay indicated that treatment with Pam3CSK4 induced the promoter activity of the murine IL-6 gene (from -375 to +15), and additional treatment with S1P<sub>2</sub> agonist further induced the IL-6 promoter activity. cAMP responsive element (CRE: from -183 to -175) on the murine IL-6 promoter was necessary for the induction by S1P<sub>2</sub> agonist. The siRNA targeting GNAS and PKA inhibitor (H-89) abolished the enhancement of IL-6 secretion by S1P and S1P<sub>2</sub> agonist in the Pam3CSK4-treated IECs. The expression level of IL-6 mRNA in the mouse ileum induced by Pam3CSK4 was significantly blocked by treatment with JTE013. These results suggest that S1P regulates cytokine production, especially IL-6, in IECs via S1P<sub>2</sub> and cAMP signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能

## 1. 研究開始当初の背景

消化管の最前線に位置する腸管上皮細胞は食品成分などによって最も高頻度かつ高濃度に曝されることから、その機能が食品因子などにより制御・調節を受けることが考えられる。腸管上皮細胞の主要な機能としては、

(1) 食品栄養素の吸収機能、(2) 生体異物の侵入を妨げるバリアー機能、(3) 外来刺激を受容して生体内へ伝達するシグナル変換機能などであり、いずれも生体にとっても重要な働きである。しかしながら腸管上皮細胞は食品成分などによって最も高頻度かつ高濃度に曝されることから、腸管上皮機能が食品因子などによって制御・調節を受けることは十分に考えられる。しかしながら従来の食品機能研究では、アミノ酸やペプチド類、フラボノイド・カロテノイドなどのポリフェノール類、また *Bifidobacterium* などのプロバイオティクスなどを用いた研究例が大半であり、実際に申請者のグループも腸管上皮細胞に対する食品因子の作用を検討する際には、上記の食物質を用いてきた経緯がある。そこで申請者は今日新たに注目されつつある機能性食品因子として、“スフィンゴ脂質と呼ばれる生理活性脂質”に注目することとした。特にスフィンゴ脂質の中でも代表的なスフィンゴシン 1-リン酸 (Sphingosine 1-phosphate; S1P) は、現在 S1P1 から S1P5 までの 5 種類の 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor; GPCR) が存在することが明らかとなっており、これら受容体を介して免疫反応をはじめ様々な生理現象に関与することが明らかとなりつつある。S1P に関する研究はその受容体が GPCR に属し創薬のターゲットとなることからこれまで主に医学・薬学分野で研究が進められてきたが、その研究対象は心臓、肺及び脳・神経などが中心であり、消化管、特に腸管においては未だ研究に至っていないのが現状である。一方で農学・食品機能研究の観点からみても、脂質に関する研究は現在脂質代謝に多くの注目が集まっており、その機能性研究もポリフェノールなど他の食物質と比べ立ち遅れている感は否めないのが現状である。そこで本研究では、腸管上皮細胞におけるスフィンゴ脂質、特に S1P の新たな生理作用を徹底的に解明することとした。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では以下の具体的な目標を持っておこなうこととする。

る。

(1) 腸管上皮細胞にどのようなタイプの S1P 受容体が発現しているか、その発現パターンを解析する。

(2) 腸管上皮細胞の細胞機能及びそれに関連する発現分子 (トランスポーター、解毒排出酵素、サイトカイン、タイトジャンクション構成分子など) に対する S1P の影響を生化学的・分子生物学的手法などを用いて解析する。またその作用機序を分子・細胞レベルで詳細に解析することとする。

(3) (1)及び(2)で見出された S1P の作用が *in vivo* あるいは *ex vivo* においてもみられるかどうか実験動物を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 腸管における S1P 受容体の発現解析

腸管上皮モデル Caco-2, LS180, Mos13 細胞より RNA を抽出し cDNA を合成、RT-PCR によって 5 種類の S1P 受容体の発現を検討した。またマウス小腸上皮細胞画分を分画し、同様に RT-PCR に供した。並行してマウス腸管切片を作成し、S1P1 及び S1P2 抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。

(2) 腸管上皮細胞機能に対する S1P の機能解析

腸管上皮細胞が分泌するサイトカイン産生量は酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA 法) を用いて、mRNA 発現量は定量的 RT-PCR 法を用いてそれぞれ解析した。さらにマウス IL-6 のプロモーター領域およそ 400 bp を単離し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んでレポーターベクターを構築した。構築したベクターをリポフェクション法によって遺伝子導入し、IL-6 プロモーター活性に対する S1P の作用を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 腸管上皮細胞における S1P 受容体の発現パターン

まず 5 種類の S1P 受容体の発現パターンを RT-PCR 法にて解析したところ、腸管上皮モデルとして用いられるヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 及び LS180、マウス腸管上皮モデル細胞株 MoS13 では S1P1-S1P5 の発現が確認され、またマウス小腸上皮細胞画分では S1P1-S1P4 の発現が確認された。またこれら 5 種類の S1P 受容体の中で、いずれも S1P2 の発現が最も強かった (図 1)。そこで実際にマウス腸管の切片を作成し S1P2 及び S1P1 の抗体で免疫染色をおこなったところ、腸管上皮細胞では S1P2 が強く発現していることが確認された。

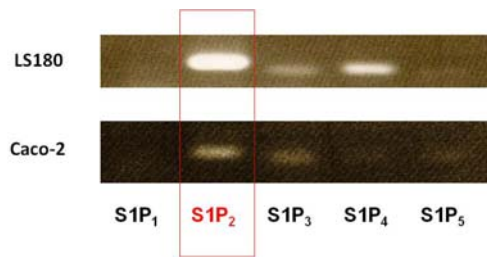


図1 腸管上皮モデル LS180 細胞及び Caco-2 細胞における S1P 受容体の発現パターン

(2) 腸管上皮細胞機能に対する S1P の生理作用解析

次に腸管上皮細胞の各種細胞機能に対する S1P の生理作用を解析した。その結果、Toll 様受容体 (TLR) の一種である TLR1/2 のリガンド (Pam3CSK) 刺激によって誘導された、炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン 6 (IL-6) 産生が S1P 添加によってさらに亢進されることが見出された (図 2)。この S1P による産生増強作用は IL-6 だけでなく MCP-1 でも観察された。

そこでこの S1P の作用に S1P1-S1P5 のどの S1P 受容体が関与しているのか検討することとし、腸管上皮で最も高い発現が確認された S1P2 の選択的アンタゴニストである JTE013 を添加したところ、JTE013 添加によって S1P の亢進作用は完全に抑制された。また S1P2 選択的アゴニストである CYM5520 によっても S1P と同様な IL-6 産生増強作用がみられ、この作用はやはり JTE013 によって抑制されたことから、S1P による TLR1/2 刺激による IL-6 産生亢進に対する増強作用は S1P2 を介していることが示唆された。

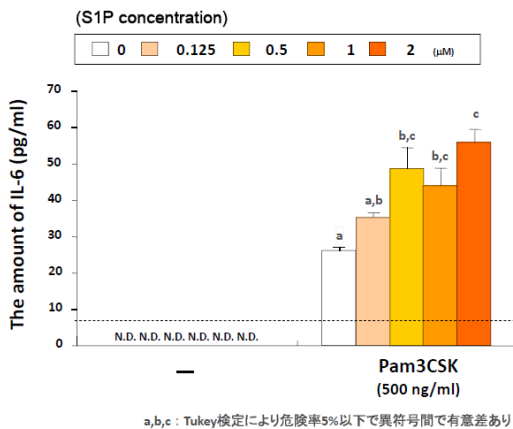


図2 腸管上皮細胞における TLR1/2 リガンド (Pam3CSK) 刺激下での S1P による濃度依存的 IL-6 産生亢進

また Pam3CSK 処理によって増加した IL-6 の mRNA 発現量は S1P 添加によってさ

らに増加し、S1P の増強作用は mRNA レベルであることが示された。さらに S1P は Pam3CSK によって増加した IL-6 転写活性をさらに増強させることが明らかとなり、その亢進には IL-6 プロモーター領域上に存在する CRE (cAMP response element) が必要であることが見出された。そこで CRE の上流に位置する PKA の阻害剤である H-89 を添加、及び PKA を活性化することが知られる G タンパク質の一種である Gs を RNA 干渉法にてノックダウンしたところ、いずれの場合も S1P による IL-6 産生亢進増強が有意に抑制された。

また本現象が *ex vivo* でもみられるかどうかマウス回腸フラグメントを用いて検討した結果、Pam3CSK による IL-6 mRNA 発現亢進は JTE013 によって有意に抑制された。これより S1P は S1P2 を介して、腸管において TLR1/2 による IL-6 などの産生増強に関与しており、S1P2 は腸炎症状に関与していることが示唆された。

上記と関連して、S1P2 が cAMP カスケードを活性化して CRE 依存的な転写活性を亢進することが見出された。そこでヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞にレンチウイルスを用いて S1P2 を遺伝子導入し高発現させたところ、S1P 添加によって CREB 標的遺伝子の一つであるグルコーストランスポーター GLUT5 の mRNA 発現の増加がみられた。今後さらに、IL-6 や GLUT5 と同様に S1P が S1P2 を介して CREB 標的遺伝子の発現に及ぼす影響を検討する予定である。

以上本研究より、腸管上皮細胞には S1P2 受容体が最も高発現していること、S1P は S1P2 受容体を介して IL-6 などある種のサイトカイン産生を制御すること、またサイトカインに加えて cAMP カスケードで制御される遺伝子群の発現を S1P が制御する可能性が見出された。これらの知見は国内外を問わず極めて新規な内容であり、今後さらに腸管における S1P2 受容体の機能的役割を明確にすると共に S1P2 受容体と食品因子の相互作用についても解析を進めたいと考えている。

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 9 件)

- ① Shin, H.S., Zhao, Z., Satsu, H., Totsuka, M., and Shimizu, M., Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide on the induction of IL-8 production in human intestinal Caco-2 cells. *Inflammation*, in press (DOI: 10.1007/s10753-010-9251-y), 査読有.
- ② Ishimoto, Y., Satsu, H., Totsuka, M., and Shimizu, M., IEX-1 suppressed apoptotic

damage in human intestinal epithelial Caco-2 cells induced by coculturing with macrophage-like THP-1 cells. *Biosci. Rep.*, 31(5), 345-351 (2011), 査読有.

- ③ Jin, M., Iwamoto, T., Yamada, K., Satsu, H., Totsuka, M., and Shimizu, M., Disaccharide derived from chondroitin sulfate A suppressed CpG-induced IL-6 secretion in macrophage-like J774.1 cells. *Cytokine*, 51(1), 53-59 (2010), 査読有.
- ④ Satsu, H., Hyun, JS, Shin, HS, and Shimizu, M., Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55(5), 442-446 (2009), 査読有.
- ⑤ Satsu, H., Hyun, JS, Shin, HS, and Shimizu, M., Cycloheximide treatment induces the uptake of neutral and dibasic amino acids via activation of system b<sup>0+</sup> in human intestinal Caco-2 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 44-51 (2009), 査読有.
- ⑥ Satsu, H., Hiura, Y.; Mochizuki, K., Hamada, M., Shimizu, M., Activation of the Pregnane X Receptor and Induction of MDR1 by Dietary Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 56(13), 5366-5373 (2008), 査読有.
- ⑦ 薩 秀夫, 清水 誠「ヒト腸管上皮細胞を用いた食品機能・安全性評価」, BIO INDUSTRY, シーエムシー出版, 27(7), 39-46(2010), 査読無(依頼総説).
- ⑧ 薩 秀夫「食品因子の腸管における抗炎症作用」, 機能性食品と薬理栄養, 6(2), 131-138(2010), 査読無(依頼総説).
- ⑨ 薩 秀夫「食品成分の腸管上皮吸収機構及びその生理機能」, 食品加工技術, 29(4), 16-26(2009), 査読無(依頼総説).

[学会発表] (計 12 件)

- ① 薩 秀夫, スフィンゴシン-1-リン酸 2 型受容体に対する選択的アゴニストのハイスループットスクリーニングを用いた解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学 (京都).
- ② 岩本 拓, TLR リガンドにより誘導される腸管上皮サイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用解析, 第 6 回日本食品免疫学会学術大会, 2010 年 6 月 1 日, 東大安田講堂 (東京).
- ③ 薩 秀夫, 機能性食品因子による腸管上皮トランスポーターの制御・調節, 日本栄養・食糧学会 2010 年度大会, 2010 年 5 月 23 日, アスティとくしま (徳島).
- ④ 岩柳 智裕, 腸管上皮細胞におけるスフィンゴシン 1 リン酸受容体の発現解

析, 日本栄養・食糧学会 2010 年度大会, 2010 年 5 月 22 日, アスティとくしま (徳島).

- ⑤ 薩 秀夫, 食品因子の腸管吸収及び生理機能の分子栄養学的研究, 日本栄養・食糧学会 2010 年度大会, 2010 年 5 月 21 日, アスティとくしま (徳島).
- ⑥ 薩 秀夫, 腸管上皮における食品因子による解毒代謝酵素の発現制御, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 30 日, 東大駒場キャンパス(東京).
- ⑦ 岩本 拓, 腸管上皮細胞において TLR リガンドで誘導されるサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用とその機構解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 29 日, 東大駒場キャンパス(東京).
- ⑧ 石田 淳也, 植物性グルコシルセラミドの腸管上皮透過特性及びその生理機能解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 28 日, 東大駒場キャンパス(東京).
- ⑨ 一本松 悠, S1P 受容体を制御する食品因子探索評価系の構築, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 29 日, 東大駒場キャンパス(東京).
- ⑩ 岩本 拓, 腸管上皮細胞のサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用, 日本セラミド研究会, 2009 年 11 月 6 日, 北大学術交流会館(北海道).
- ⑪ 薩 秀夫, 腸管上皮細胞におけるスフィンゴシン 1 リン酸及びその受容体の解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 29 日, マリンメッセ福岡(福岡).
- ⑫ 薩 秀夫, 腸管上皮における食品機能性因子の吸収・代謝・生理作用, 第 13 回日本フードファクター学会, 2008 年 11 月 18 日, タワーホール船堀(東京).

[図書] (計 5 件)

- ① 薩 秀夫, 「機能性食品成分とトランスポーター」 in 「栄養・食品機能とトランスポーター」 (竹谷豊, 薩 秀夫, 伊藤美紀子, 武田英二責任編集, 日本栄養・食糧学会監修), 建帛社, 2011 年, 247-264.
- ② 薩 秀夫, 「アミノ酸」 (3-2 栄養と代謝物のトランスポーター, 3 章 トランスポーター) in 「トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—」 (金井好克, 竹島浩, 森泰生, 久保義弘編), 廣川書店, 2011 年, 161-170.
- ③ Ishimoto, Y., Satsu, H., Mochizuki, T., Totsuka, M. and Shimizu, M., In vitro analysis of the interaction between human intestinal epithelial cells and macrophage-like cells. *Animal Cell Technol.*, Springer, 2010 年, 231-236.

- ④ 清水 誠、薩 秀夫「腸管の解毒機能と食の安全」 in 「食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて—」(東京大学 食の安全研究センター編)、シーエムシー出版、2010年、145-151.
- ⑤ Shimizu, M., Zhao, Z., Ishimoto, Y., and Satsu, H., Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer, 2009年、643:265-271.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

薩 秀夫 (SATSU HIDEO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80323484

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し