

## 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 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580141

研究課題名（和文） 食品の消化に伴って生じる消化管粘膜維持因子に関する研究

研究課題名（英文） Studies on gastrointestinal mucosa-maintaining factors produced during digestion of foods

研究代表者

田中 保 (TANAKA TAMOTSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：90258301

研究成果の概要（和文）：消化管粘膜保護作用を有する脂溶性食品成分あるいはその消化物について調べた。調べた中では植物性食品に多く含まれるホスファチジン酸(PA)がアスピリン惹起性の胃潰瘍を抑制することが明らかになった。この PA の抗潰瘍作用には PA が胃で消化されることによって生じるリゾホスファチジン酸とその特異的受容体が関わっている可能性が見出された。また、キャベツ脂質に存在する抗アポトーシス成分として、フィトセラミド-1-リン酸が見出された。

研究成果の概要（英文）：Studies on gastrointestinal mucosa-maintaining factors in foods and digested foods were conducted. We found that phosphatidic acid (PA), a characteristic phospholipid in plant foodstuffs, effectively ameliorates aspirin-induced stomach ulcer. The lysophosphatidic acid produced by the hydrolysis of the PA was involved in the ulcer-ameliorating activity of PA. We also identified phytoceramide-1-phosphate as a novel sphingophospholipid with anti-apoptotic activity in cabbage leaves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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，消化管粘膜保護，ホスファチジン酸，抗潰瘍，リン脂質，セラミド 1-リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

消化管が食物と接触しない状態が長く続くと、消化管粘膜の萎縮やバリアー機能の低下が起こり、栄養吸収障害や腸内細菌の体内侵入によるエンドトキシンショックが現れ

る。これは経静脈栄養法を受けた患者にしばしばみられる合併症であるが、消化管粘膜は食物やその消化物との相互作用を通してその機能を維持している可能性を示している。

リゾホスファチジン酸 (LPA) はその特異的受容体を介して細胞増殖・遊走などの応答を誘導する増殖因子様リン脂質である。LPA の役割の1つは創傷治癒と考えられており、消化管において粘膜上皮細胞の増殖・遊走・抗アポトーシスなどの効果が確認

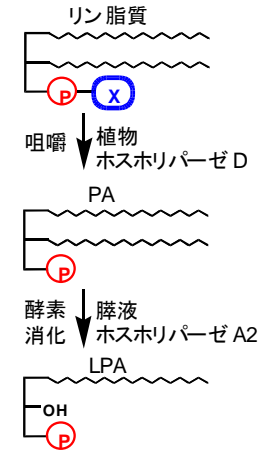


図 1 消化管で生成するリン脂質

されている。著者らは LPA の定量法を開発し (Tanaka, *et al.*, J. Lipid Res. 2004)、食品に含まれる LPA を調べた。その結果、肉類よりも野菜、特にキャベツに多くの LPA が含まれること、この LPA はキャベツを咀嚼する際に生じること、咀嚼により生じたホスファチジン酸 (PA) の膵液酵素作用によって LPA は追加供給されることなどを明らかにしてきた (Tanaka, *et al.*, Biosci. Biotech., Biochem. 2009)。LPA は食物に存在するリン脂質の消化産物とも見なせる (図 1)。その LPA に対する特異的受容体が小腸の管腔側に存在する (Li, *et al.*, J. Exp. Med. 2005) ことから、粘膜は消化物由来の LPA を感知する機構を備えていると解釈でき、LPA が消化管粘膜維持に貢献しているとの仮説を立てるに至った。

本研究開始当初、著者らは胃由来の培養細胞株の遊走を指標として食物やその消化物由来の脂質の生理活性を調べていた。その過程で植物性食品由来の脂質には LPA の他に胃上皮細胞を遊走させる因子が含まれていることを突き止めていた。これらのことから、我々は食品の消化に伴って生成する粘膜維持因子は LPA だけでなく、複数存在すると考えた。本研究ではアスピリン潰瘍の抑制、培養細胞の遊走・増殖といった生物検定系を利用して、消化管粘膜維持に効く因子の同定を目指して本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は食物やその消化物中に存在する粘膜維持因子の同定を目指す。活性の指標は粘膜上皮細胞および線維芽細胞に対する増殖・抗アポトーシスおよび遊走活性とする。さらに、これらの因子やその前駆物質が消化管潰瘍の治癒促進や予防に効く可能性を培養細胞と動物モデルで試験する。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞を用いたバイオアッセイ

培養細胞には線維芽細胞様の Swiss 3T3 細胞、胃由来細胞株 KatoIII 細胞および HGC-27 細胞を用いた。まず、細胞を静止期においた後、コンフルエントになったディッシュ表面に尖った棒状のゴムを押しつけるようにして、直径 0.5mm 程度の円状の傷を作った。その後、血清飢餓培地においた状態で試験液を添加し、顕微鏡下で傷の様子を経時的に撮影した。傷の周りの細胞が遊走して傷が縮小する様子を画像解析によって縮小率として数値化し、活性の強弱を判定した。UV 照射によるアポトーシス誘導は培養ディッシュを UV ランプ下に 30 秒間曝すことによっても行った。試験脂質を添加して 16-24 時間後、生存する細胞数を顕微鏡下で計測することによって抗アポトーシス活性を評価した。

### (2) 抗アスピリン潰瘍試験

24 時間絶食させたマウスにアスピリン (300 mg/kg 体重) をカルボキシメチルセルロース (CMC) 懸濁液として経口投与した。投与後 3 時間にてマウスの胃を単離し、ホルマリン処理を行い、胃壁に生じた潰瘍 (びらん) を顕微鏡下で観察した。総潰瘍長を計測することで障害の程度とし、抗潰瘍効果を比較した。試験する脂質は CMC 溶液としてアスピリン投与の前、同時、後にゾンデ針を用いて経口投与した。

### (3) リン脂質消化実験

胃洗浄液を用いる場合・・・24 時間絶食したマウスより胃を単離し、この内腔を少量の生理食塩水で洗浄した。この洗浄液の遠心上清を酵素源として、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性を調べた。アッセイは基質 300nmol、pH7.4、塩化カルシウム 0.01M の存在下で行った。アッセイ系にデオキシコール酸を添加する場合の添加量は 600nmol とした。一定時間インキュベート (37°C) した後、脂質を抽出し、TLC を用いて生じたリゾリン脂質を単離、定量し、分解率を求めた。

単離した胃を用いる場合・・・24 時間絶食したマウスより胃を単離し、食道側と十二指腸側を結紮した。この中に CMC に懸濁した PA (300 nmol) 液を容れ、結紮し直して 37°C でインキュベートした。内容物を別の容器に移し、脂質を抽出後、TLC にて生じた LPA を単離し、定量した。

### 胃内容物および餌の分析

絶食したマウスに 15-30 分間餌を食べさせた後、胃内容物を取り出し、脂質を抽出した。また、ペレット状の餌を粉碎し、脂質を抽出した。それぞれの脂質抽出液の総リン脂質含量、PA 含量および LPA 含量を調べた。

(4) フィトセラミド-1-リン酸(PC1P)の構造解析  
 キャベツより単離したフィトセラミド-1-リン酸を Phos-tag 複合体として、マトリックス支援レーザーイオン化脱離-飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を用いて解析を行った(Morishige *et al.*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010)。また、PC1PのN-アシル基の解析は脂肪酸メチルエステルとしてガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 標準リン脂質の消化物による細胞遊走活性

LPAがPAのホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)消化によって生成するようにホスファチジルコリン(PC)からリゾホスファチジルコリン(LPC)が、ホスファチジルイノシトール(PI)からはリゾホスファチジルイノシトール(LPI)が生じる。これらのリゾ型リン脂質に対するSwiss 3T3細胞に対する遊走促進効果を比較した。その結果、LPCおよびLPIに有意な細胞遊走促進効果が観察された。有効濃度は10 μM程度で、LPAのそれの10倍高い濃度であった。

##### (2) 種々の脂質の抗アスピリン潰瘍効果

アスピリン潰瘍モデルをマウスにて作成し、潰瘍抑制作用を指標として、種々の脂質の抗アスピリン潰瘍効果を比較した。その結果、トリグリセリド、遊離脂肪酸およびLPCには抗潰瘍効果は観察されなかったのに対し、PC、PAおよびLPAに抗アスピリン潰瘍効果が観察された。中でも、PAの効果は高く、PCおよびLPAが5.7 μmol/kg体重未満で無効であったのに対し、PAは0.57 μMでもコントロールの50%程度に潰瘍形成を減弱させていた。

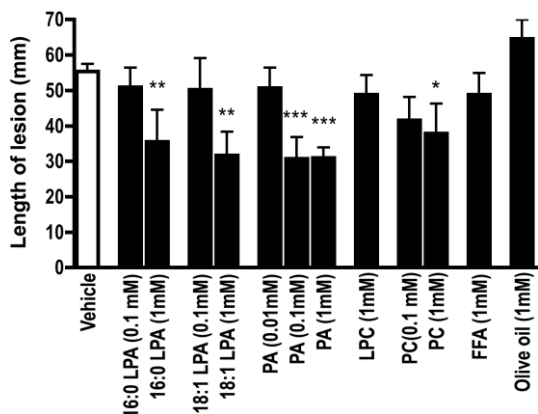


図2 種々の脂質の抗アスピリン潰瘍効果

投与するPAをアスピリンの前投与(30分)、アスピリンと同時に投与、アスピリンの後投与(30分)とし、投与タイミングによる効果の違いを調べた結果、同時投与および後投与では無効であるのに対し、PAの前投与は有意に潰瘍形成を抑制した。

##### (3) 胃におけるリン脂質の消化

マウスより単離した胃の内腔を生理食塩水で洗浄し、この胃洗浄液に含まれるホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性について基質特異性を調べた。その結果、反応系にデオキシコール酸を添加した場合、加えたPCの約45%がLPCへと変換されたのに対し、加えない場合ではわずか5%がLPCに変換されるに留まった。これに対し、PAはデオキシコール酸の存在下で70%、非存在下でも45%がLPAへと変換され、調べた中(PC, PA, ホスファチジルセリン, ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルイノシトール)で最も効率よく消化されるリン脂質であった。

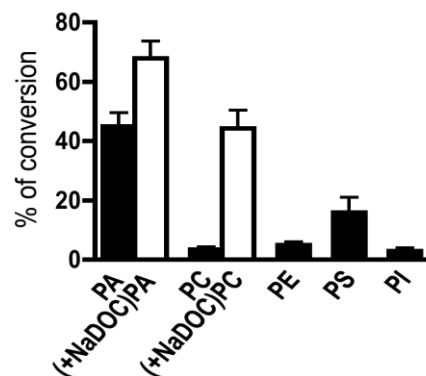


図3 胃PLA<sub>2</sub>の基質特異性

次に、PAを基質に用いてpH依存性を調べた結果、胃洗浄液のPLA<sub>2</sub>は食物消化時の胃内pHであるpH3になると、きわめて低い活性しか示さなかったが、単離したマウス胃の中でPAをインキュベートした場合、PAは徐々に分解されてLPAを生じ、30分で26%のPAがLPAになった。さらに24時間の絶食を行ったマウスに15-30分間の給餌を行い、胃内容物のリン脂質組成を固形飼料のそれと比較した。その結果、固形飼料中では全リン脂質中に占めるPAおよびLPAの割合はそれぞれ15%および1.5%であるのに対し、胃内容物におけるそれらの値はそれぞれ、4.5%および4.2%となっており、固形試料に含まれるPAが胃内でLPAへと変換されていることが

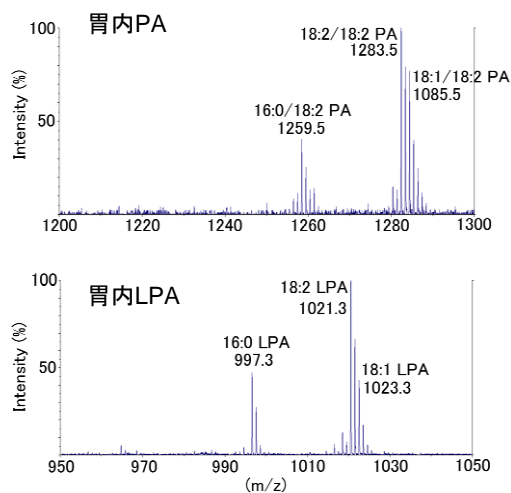


図4 胃内容物中のPAおよびLPAのMALDI-TOF MS (Phos-tag複合体)

示唆された。また、このPAおよびLPAをPhos-tag複合体としてMALDI-TOF MSにて解析を行った。その結果、PAのPLA<sub>2</sub>分解に由来すると思われるLPA分子種が生じていることも明らかになった。

#### (4) キャベツ脂質に見出されたフィトセラミド 1-リン酸の構造決定と生物作用

キャベツ脂質の細胞遊走促進活性を調べた結果、キャベツ脂質にはLPA以外の活性脂質が存在する可能性が示唆された。そこで、キャベツ脂質に存在する微量成分について構造と生理作用を解析した。その結果、二次元 TLC 上でLPAとよく似た挙動を示すリン脂質の存在を認めた。この脂質について、質量分析を駆使して解析を行った結果、N アシル基として $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸 (16:0, 22:0, 24:0, 24:1) を有するフィトセラミド-1-リン酸 (PC1P) であることが判明した。この新規スフィンゴリン脂質の3 $\mu$ MをSwiss 3T3 細胞に作用させると、遊走を促進するこ

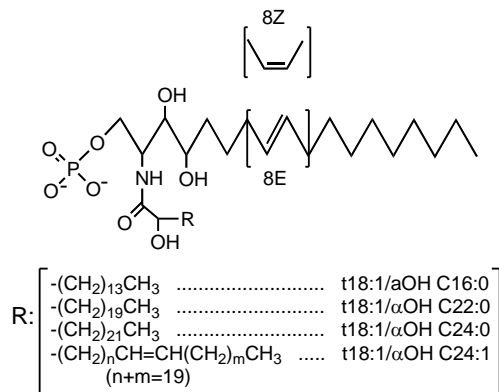


図5 キャベツ葉に見出されたフィトセラミド-1-リン酸

とが確認された。さらに、PC1Pは1-3 $\mu$ Mにて血清飢餓あるいはUV照射によって誘導されるSwiss 3T3の細胞死を抑制することを出した。

#### 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4件)

- ①. Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using TLC-imaging technique  
T. Tanaka, A. Kassai, M. Ohmoto, K. Morito, Y. Kashiwada, Y. Takaiishi, M. Urikura, J. Morishige, K. Satouchi & A. Tokumura  
*J. Agric. Food Chem.*, 査読有り, in press. DOI: 10.1021/jf300147y.
- ②. Intragastrically administered lysophosphatidic acid protect against gastric ulcer in rats under water-immersion restraint stress  
M. Adachi, G. Horiuchi, N. Ikematsu, T. Tanaka, J. Terao, K. Satouchi, A. Tokumura *Dig. Dis. Sci.*, 査読有り, **56**, 2252-2261 (2011) DOI: 10.1007/s10620-011-1595-0
- ③. A clean-up technology for the simultaneous determination of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, Phos-tag  
J. Morishige, M. Urikura, H. Takagi, K. Hirano, T. Koike, T. Tanaka & K. Satouchi *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 査読有り, **24**, 1075-1084 (2010) DOI: 10.1002/rcm.4484
- ④. Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves  
T. Tanaka, G. Horiuchi, M. Matsuoka, K. Hirano, A. Tokumura, T. Koike & K. Satouchi  
*Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有り,

[学会発表] (計 19 件)

- ①. キャベツ葉中に見出されたフィトセラミド-1-リン酸の生合成経路と生理作用  
田中保, 喜田孝史, 盛重純一, 安藤千恵, 山下量平, 里内 清, 今井博之, 長野 稔, 西迫寛隆, 川添和義, 徳村彰  
第 84 回 日本生化学会大会, プログラム号, p90, 125, 2011 年 9 月 22 日 京都 (京都国際会館)
- ②. 種々の食材中の創傷治癒性リン脂質含量  
葛西彩香, 木下正文, 足立美佳, 盛重純一, 瓜倉真衣, 里内清, 柏田良樹, 今林潔, 高石喜久, 田中保, 徳村彰  
日本農芸化学会中四国支部第 29 回講演会, 講演要旨集 p28, 2011 年 1 月 22 日 徳島・徳島大学薬学部
- ③. Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves  
Tamotsu Tanaka, Jun-ichi Morishige, Hiroki Kondo, Masafumi Kinoshita, Mika Adachi, Mai Urikura, Kiyoshi Satouchi, Akira Tokumura  
Keystone Symposia, Bioactive lipids: Biochemistry and Diseases, Abstract book p105, 2010 年 6 月 9 日 京都 (ウエスティン都ホテル 京都)

[図書] (計 1 件)

- ①. 胃腸障害に効く野菜のリン脂質  
田中保  
化学と生物 **49**, 187-192 (2011) 公益社団法人 日本農芸化学会  
<http://dx.doi.org/10.1271/kagakuto-seibutsu.49.187>

[その他]

- ① 今晚はこの食材できまり “キャベツ”  
日経ヘルス No. 146, p128-131 (2010)  
日経 BP

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 保 (TANAKA TAMOTSU)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号: 90258301

(2) 研究分担者

徳村 彰 (TOKUMURA AKIRA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 00035560