

## 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25年5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380076

研究課題名（和文） 腸管バリア損傷・修復機構の多面的解析とその制御による腸管バリア保護食品の開発

研究課題名（英文） Analysis of impairment and recovery mechanism of intestinal barrier and its application for design of foods with barrier-protecting activity

研究代表者

田辺 創一（SOICHI TANABE）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90272624

研究成果の概要（和文）：ヒト腸管モデルとして Caco-2 細胞を用い、サイトカインで刺激をしてタイトジャンクション（TJ）に損傷を起こした。本系に乳カゼインペプチド（NPWDQ）を添加すると、TJ タンパク質のうちオクルディンの発現が上昇し、損傷が軽減された。本ペプチド以外に、乳酸菌・ビフィズス菌もバリア回復能を有した。乳酸菌（*Streptococcus thermophilus*）の細胞壁に含まれる D-alanine（D-Ala）量を増やすと、バリア回復能が増強したことから、バリア保護を意図した発酵食品製造へ応用することができると考えられた。また、ビフィズス菌（*Bifidobacterium longum*）を腸炎マウスに投与したところ、腸炎軽減作用が認められた。

研究成果の概要（英文）：Caco-2 cells were used as a human intestinal model. Tight-junction (TJ) of the cells was impaired by the addition of cytokine (TNF-alpha). A milk casein-derived peptide, NPWDQ, recovered the impairment by, at least in part, increasing the expression of occludin, one of TJ proteins. Some lactic acid bacteria and bifidobacteria also exerted the barrier-recovering activity. It was found that D-alanine in bacterial cell wall played an important role in the barrier-protecting effects of *Streptococcus thermophilus* in Caco-2 cells. This finding would be applicable for design of foods with barrier-protecting activity. In addition, *Bifidobacterium longum* ameliorated colitis in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：腸管食品機能学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管バリア・タイトジャンクション・Th17・乳酸菌・ビフィズス菌・D-アラニン

## 1. 研究開始当初の背景

腸管は外来異物が大量に入ってくる場であるので、生命活動を営む上で、腸管バリアは好ましくないものの侵入を厳密に制限す

るために極めて重要である。バリア機能の低下は、日常的な精神的ストレスや消化管ストレスによっても起こり、それが慢性的に重症化しバリアが破綻すると、腸炎などの消化器

系疾患へと繋がってしまう。バリア機能を担う機構の1つがタイトジャンクション (TJ) 構造であり、このような観点から、食物による TJ 機能制御が期待され、研究がはじまったところである。

国内では、一部のアミノ酸やフラボノイド類などによる TJ 増強作用が検討され、国外では、これらに加え乳酸菌による TJ 増強・保護効果も研究対象となっている。乳酸菌については、その腸炎抑制効果が臨床現場で確認されているにもかかわらず、詳細な腸管バリア保護・回復効果は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、炎症・免疫異常による腸管バリア損傷、および乳酸菌・ビフィズス菌などの食品成分による同バリア修復メカニズムを解析するとともに、バリア保護に優れる食品の開発をめざすものである。

## 3. 研究の方法

(1) 腸管上皮モデル細胞として、ヒト結腸癌由来株化細胞である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 をトランズウェル上で培養し、NPWDQ 添加後の経上皮電気抵抗値を測定した。添加 24 時間後に細胞から RNA を抽出し、Caco-2 遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR により解析した。また、タンパク質発現変化をウェスタンブロッティングにより解析した。

(2) 上記(1)と同様に培養した Caco-2 細胞に、*Streptococcus thermophilus* を添加し、さらに炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を加え細胞を刺激した。腸管バリア機能の指標として、経上皮電気抵抗値および上清中 IL-8 濃度を測定した。また、さまざまな条件で *Streptococcus thermophilus* を培養した時のテイコ酸 D-Ala 量を HPCL で定量し、本菌の腸管バリア回復効果も検討した。

(3) Balb/c マウスに 3.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 5 日間飲用させ、急性大腸炎を誘導した。DSS 摂取開始 2 日目から 3 日間、*Bifidobacterium longum* を経口投与した。大腸炎を、体重減少および大腸萎縮により評価した。さらに、*Bifidobacterium longum* の抗炎症メカニズムについても解析した。

## 4. 研究成果

(1) 経上皮電気抵抗値は、NPWDQ 濃度依存的に上昇した。DNA マイクロアレイの結果、NPWDQ 添加により occludin の発現上昇が見られた。また、real-time PCR およびウェスタンブロッティングにより occludin の mRNA・タンパク質発現上昇も確認された。一方、claudin-1 や zonula occluden-1 (ZO-1) の

mRNA・タンパク質発現には影響をおよぼさなかった。従って、NPWDQ は主として occludin の発現を上昇させることにより TJ バリアを強固にしていると結論した。

(2) TNF- $\alpha$  刺激により経上皮電気抵抗値の減少および IL-8 産生の亢進が見られたが、*Streptococcus thermophilus* の添加によりそれぞれ有意に抑制された。*Streptococcus thermophilus* のテイコ酸 D-Ala 量を HPCL で定量した結果、D-Ala 量は菌の増殖期および培養温度に依存して変化した。MgSO<sub>4</sub> によりテイコ酸 D-Ala 修飾に関わる *dlt* 遺伝子群を抑制した場合、*Streptococcus thermophilus* の腸管バリア保護効果が減少した。また、菌培養に用いる M17 培地は 4.25% から基本濃度で「あるか」、2% または 10% 培地にて *Streptococcus thermophilus* を培養した場合、テイコ酸 D-Ala 量は培地濃度依存的に増加した (図 1)。

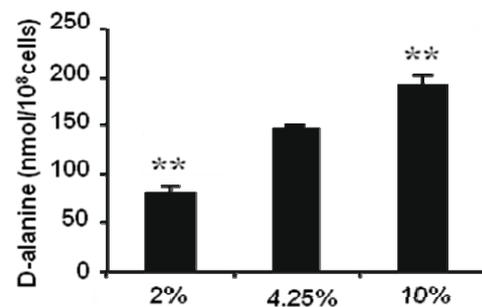


図 1 異なる培地濃度で *Streptococcus thermophilus* を培養した時のテイコ酸 D-Ala 量の変化 (\*\*, 4.25% 培養の時に比べ 1% 有意)

さらに、腸管バリア保護効果はテイコ酸 D-Ala 量とよく相関し、テイコ酸 D-Ala 量を増加させることにより、*Streptococcus thermophilus* の腸管バリア保護効果が高まることを見出した (図 2)。

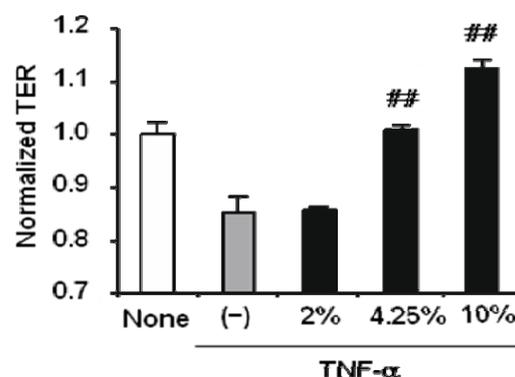


図 2 異なる培地濃度で *Streptococcus thermophilus* を培養した時の経上皮電気抵抗 (TER) 値の変化 (##, 2% 培養の時に比べ 1% 有意)

このことから、菌の培養条件を最適化することにより、*Streptococcus thermophilus* の腸管バリア保護効果を高めることができると考えられた。

(3) DSS 摂取により、マウスの体重減少および大腸萎縮が確認された。これに対し、*Bifidobacterium longum* 投与は、有意な体重減少と大腸萎縮の抑制効果を示した (図3)。

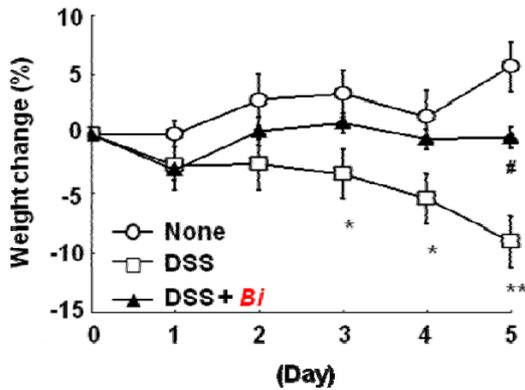


図3 DSS 腸炎時の体重減少に対する *Bifidobacterium longum* 投与の回復効果 (#, 非投与群 (□) に比べて5%有意、\*および\*\*, 健常コントロール (○) と比較して5あるいは1%有意)

さらに、*Bifidobacterium longum* は腸管の Th1/Th17 活性化を抑制することによって大腸炎を緩和することを示した。DSS マウスの大腸上皮細胞は、CD80 や CD40 などの共刺激分子を高発現しており、抗原提示細胞のごとく CD4<sup>+</sup>T 細胞と相互作用し、Th1/Th17 細胞の分化を誘導することが明らかになった。*Bifidobacterium longum* はこれらの共刺激分子の発現増加を抑制し (図4)、Th1/Th17 活性化を抑制することが示唆された。

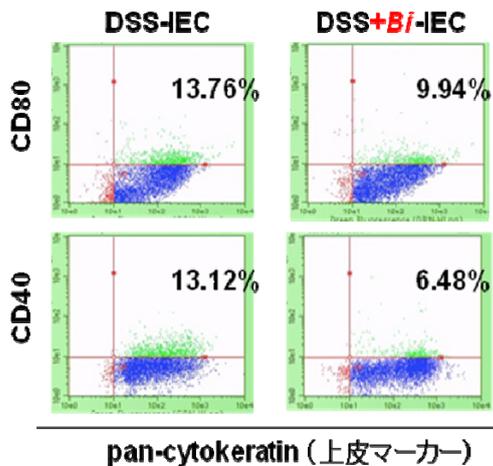


図4 *Bifidobacterium longum* による CD80 および CD40 発現抑制

すなわち、*Bifidobacterium longum* は免疫細胞に直接作用するのみならず、大腸上皮細胞に作用することで Th1/Th17 細胞を抑制するという、新たな免疫調節作用機序を見出した (図5)。

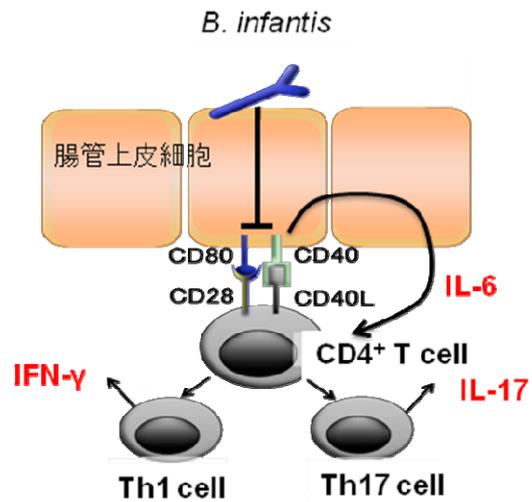


図5 *Bifidobacterium longum* による新たな免疫調節メカニズム

#### 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6件)

1. Miyachi E, Morita M, Rossi M, Morita H, Suzuki T, Tanabe S, Effect of D-alanine in teichoic acid from the *Streptococcus thermophilus* cell wall on the barrier-protection of intestinal epithelial cells, Biosci Biotechnol Biochem, 査読有, 76, 2012, 283-288.
2. Tanabe S, Short peptide modules for enforcing intestinal barrier, Current Pharmaceutical Design, 査読有, 18, 2012, 776-781.
3. Ogita T, Tanii Y, Morita H, Suzuki T, Tanabe S, Suppression of Th17 response by *Streptococcus thermophilus* ST28 through induction of IFN- $\gamma$ , Int J Mol Med, 査読有, 28, 2011, 817-822.
4. Ogita T, Nakashima M, Morita H, Saito Y, Suzuki T, Tanabe S, *Streptococcus thermophilus* ST28 ameliorates colitis in mice partially by suppression of inflammatory Th17 cells, J Biomed Biotechnol, 査読有, 2011, e378417.
5. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S, Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium, J Biol Chem, 査読有, 286, 2011, 1263-1271.

6. Yasumatsu H, Tanabe S, The casein peptide NPWDQ enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells, Br J Nutr, 査読有, 104, 2010, 951-956.

〔学会発表〕(計5件)

1. 田辺 創一, 粘膜バリア保護素材の開発的研究, 日本食品免疫学会第5回シンポジウム(招待講演), 2012年6月7日, 東京.
2. 田辺 創一, 腸管バリア調節機能を有するミルクペプチド, 第32回機能性食品用ペプチド研究会(招待講演), 2011年12月19日, 大阪.
3. Tanabe S, *Streptococcus thermophilus* ST28 ameliorates colitis in mice by suppression of inflammatory Th17 cells, 4th International Symposium of Lactic Acid Bacteria(招待講演), 2011年12月2日, プサン(韓国).
4. Nagashio Y, Suzuki T, Tanabe S, A citrus flavonoid hesperidin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice via modulating Treg/Th17 balance, International Conference on Regulatory T Cells and Th17 Cells and Clinical Application in Human Diseases, 2010年7月17日, 上海(中国).
5. Tanabe S, Lipoteichoic acid of lactic acid bacteria ameliorates intestinal barrier impairment and inflammation, Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy(招待講演), 2010年5月15日, 北京(中国).

〔図書〕(計2件)

1. Miyauchi E, Xiao J, Tanabe S, Caister Academic Press, *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*, 2010, pp. 145-162.
2. 田辺 創一, 建帛社, *ルミナコイド研究のフロンティア*, 2010, pp.115-132.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田辺 創一 (SOICHI TANABE)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：90272624

### (2) 研究分担者

鈴木 卓弥 (TAKUYA SUZUKI)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師  
研究者番号：30526695

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：