

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780135
 研究課題名（和文） ストレス誘導型の消化管バリア機能異常に対するフラボノイドの役割に関する研究
 研究課題名（英文） Protective role of flavonoids in the stress-induced intestinal barrier dysfunction
 研究代表者
 鈴木 卓弥（Suzuki Takuya）
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授
 研究者番号：30526695

研究成果の概要（和文）：

動物個体、培養細胞を用いて、ストレスによる消化管バリア機能の損傷を軽減するフラボノイドを探索し、有効なフラボノイドとして、ケルセチンとヘスペレチンを見出した。これらフラボノイドは、バリア機能に重要な役割を持つタイトジャンクションの構成タンパク質の発現量や局在を調節することが明らかとなった。これら成果は、フラボノイド類の新たな生理機能を提案するとともに、人の健康に大きく寄与しうるものである。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the ameliorative effects of flavonoids on the stress-induced intestinal barrier defect. Two flavonoids, quercetin and hesperetin, affect the expression and distribution of tight junction proteins, resulting in the increased integrity of intestinal barrier. These findings indicate the novel function of dietary flavonoids and could contribute to the intestinal health.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：フラボノイド、ストレス、消化管バリア

1. 研究開始当初の背景

「ストレス社会」という言葉が示すように、現代では多くの人々が様々なストレスに曝されながら生活を送っている。ストレスに係る疾病の患者数は増加の一途を辿り、なかでも消化管は、ストレス感受性の高い器官であり、潰瘍、腸過敏性症候群、炎症性腸疾患など多数のストレス誘導型疾患が知られている。これら疾患の病因は未だ明らかではないが、近年、その要因の1つとして、消化管バリア機能の破たんが提案されている（Ohman L et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 7, 163, 2010）。脳がストレスを受けたとき、組織間シグナルを介して消化管のバリア機能が低

下し、管腔内異物の侵入が消化器炎症・疾患の引き金となると推測されている。このような観点から、食品成分により、消化管バリア機能を正常に維持することは、ストレス誘導型の消化器系疾患の予防・軽減に有効な手段となると考えられる。

消化管バリア機能を担う、最も重要な因子の1つが、上皮細胞間の透過性を制御するタイトジャンクション（TJ）である。この TJ バリア機能低下には、いくつかのサイトカインが重要な役割を担うことが知られており、精神的ストレスを受けたときにも消化管周辺のサイトカインバランスが崩れることから（Joel et al., Gastroenterology, 131, 410,

2006)、バリア機能低下との関わりが推測される。さらに細胞、分子レベルでの TJ 機能調節には、様々な細胞内シグナル分子が関与するとともに、TJ タンパク質のリン酸化制御が中心的な役割を持つ。しかしながら、そのリン酸化機能解析は始まったばかりで、TJ バリア機能の低下、増強、保護作用におけるリン酸化の役割を理解することは、ポストゲノム研究の観点からも重要である。ごく最近、申請者らは、TJ タンパク質オクルディンの機能制御に関わるリン酸化部位（スレオニン、チロシン残基）を世界で初めて同定し、それらリン酸化が TJ バリア機能を正・負に制御することを報告した。

消化管バリア機能調節における食品成分の役割に関する研究は、一部のアミノ酸やペプチド、脂肪酸などの報告があるものの (Amasheh et al., Ann N Y Acad Sci, 1165, 267, 2009)、極めて未熟な領域である。申請者らは、難消化性糖類、短鎖脂肪酸やフラボノイドなどに TJ 機能調節作用を報告し、なかでもフラボノイド類のケルセチンやケンフェロールが固有のメカニズムで TJ バリア機能を増強することを、世界に先駆けて見出した。しかしながら、フラボノイド類には多様な種類が存在すること、またこれまでは培養細胞を中心に研究を進めてきたことから、多様なフラボノイド類の広範的解析、動物を用いた試験への展開も必要である。近年、消化管バリアと疾病との関わり合いが明らかとなりつつあり、食品成分と消化管バリア機能に関する研究は、今後さらなる注目を集めると考えられる。

このような背景を踏まえ、申請者は、精神的ストレスが惹起する消化器疾患の病因を消化管バリア機能に着目して究明するとともに、それを軽減できる食品成分フラボノイドの役割を探索することに着想した。

2. 研究の目的

精神的ストレスが引き起こす消化器疾患の発症要因として、消化管バリア機能の脆弱化が提案されている。申請研究は、精神的ストレスが引き起こす、消化管バリア機能異常を究明するとともに、それを軽減できる食品成分として、フラボノイドの役割を探索する。計画している具体的な研究項目は、①消化管バリア機能活性化作用を有するフラボノイドのスクリーニング、②精神的ストレスが引き起こす消化管バリア機能異常のメカニズム解明、③ストレス誘導型の消化管バリア機能異常に対する、フラボノイドによる保護作用のメカニズム解明、④精神的ストレスとフラボノイドの作用に関わるタイトジャンクションタンパク質のリン酸化機能解析、の4つである。

3. 研究の方法

① 消化管 TJ バリア機能を高めるフラボノイド類の広範的スクリーニング解析

多様なフラボノイド類から、消化管 TJ バリア機能活性化作用を有するものを選抜する。スクリーニング解析は、ヒト消化管上皮細胞株 Caco-2 にて実施する。フラボノイドの主要カテゴリーから、代表的な 20-30 種を選び、消化管 TJ 機能亢進活性を探索する。TJ 機能の評価方法として、電気生理学的手法と、TJ 経路通過マーカーの透過速度の測定を実施する。また、免疫学的手法 (ウェスタンブロット法、蛍光免疫染色法) による TJ タンパク質の発現、局在の解析を実施し、各フラボノイドの作用強度に加え、作用の特性も解析する。

② 精神的ストレス動物モデルにおける、消化管 TJ バリア機能の低下に対するフラボノイドの軽減作用の解析とその低下メカニズムの解析

精神的ストレス動物モデルとして、ラット拘束ストレスモデルを用いる。①の結果に基づいて選抜されたフラボノイド類をラットに摂取させ、TJ バリア機能保護作用を解析する。TJ バリア機能の評価は、拡散チャンバースystemを用い、TJ タンパク質 (Occludin, Claudin など) の発現量と局在の変化を免疫学的手法により解析する。また、バリア機能の破たんに関わりうるサイトカイン、消化管炎症の解析、フローサイトメーターによる免疫細胞の解析も実施し、TJ バリア機能の破たんの要因も特定する。

③ 精神的ストレス培養細胞モデルの構築とそのメカニズム解明

②のストレス動物モデルの特性に基づき、Caco-2 細胞を用いて、ストレス誘導型のバリア機能破たん培養細胞モデルを構築し、その破たんのメカニズムを探る。同時に、フラボノイドによる TJ バリア機能保護作用の分子機序の解明へつなげる (④以降)。②の結果を元にして、バリア機能に関わりうるサイトカイン類 (TNF- α 、IL-18、IL-6 など) によるバリア機能への影響を解析することを起点に、バリア機能低下に関わる TJ タンパク質の変化 (免疫学的手法などを用いる)、関連する細胞内シグナル経路 (阻害剤、siRNA などを用いる) を解明する。

④ フラボノイドによる TJ バリア機能保護作用の分子メカニズムの解明

②のストレス動物モデルで TJ 機能保護作用が認められたフラボノイド類について、③で構築した培養細胞モデルを用いて、保護作用の分子メカニズムを解明する。TJ タンパク質の量・質的動態を免疫学的手法にて解析する。量的変動が認められた TJ タンパク質に

については、関連する転写因子を、質的変化(細胞内分布の変化)が認められた TJ タンパク質については、そのリン酸化動態を解析する。また、上皮細胞におけるフラボノイドの作用点も含め、作用に関連する細胞内シグナル経路を特定する(シグナル阻害剤、siRNA、強制発現系による試験)。

⑤ 精神的ストレスとフラボノイドの作用に関わる TJ タンパク質のリン酸化プロテオーム解析

④にて質的およびリン酸化の変動が認められた TJ タンパク質について、そのリン酸化部位を同定する。リン酸化 TJ タンパク質濃縮画分の二次元電気泳動サンプル、あるいは TJ タンパク質の免疫沈降物を用いて、LC/MS/MS によりリン酸化部位を網羅的に同定する。

⑥ 精神的ストレスとフラボノイドの作用に関わるリン酸化 TJ タンパク質の細胞生理学的解析

⑤にて同定された、TJ タンパク質のリン酸化の細胞生理学的役割を解明する。TJ タンパク質のリン酸化部位の変異発現ベクターおよび組み換え体発現ベクターを構築する。組み換えタンパク質を調製し、⑤にて特定されたシグナル経路を元に、リン酸化の責任キナーゼを同定する。また、Caco-2 細胞に変異タンパク質を発現させ、細胞内動態、リン酸化、フラボノイドへの感受性の変化を解析する。

4. 研究成果

最初に、ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞を用いて、消化管バリア機能強化作用を有するフラボノイド類をスクリーニングした。結果として、10 種類のフラボノイド類のうち、ケルセチンとヘスペレチンに強いバリア機能強化作用が見出された。次に、精神的ストレスモデルラットを用いて、これらフラボノイド類による消化管バリア機能保護作用、抗炎症作用を探索した。ストレス負荷は、ラット小腸のデキストラン透過性を高め、バリア機能の低下を誘導したが、ケルセチンとヘスペレチンを予め摂食したラットでは、そのバリア機能低下が抑制された。さらにストレス負荷は、小腸組織の炎症性サイトカイン TNF- α 発現量を高める傾向を示したが、これらフラボノイド類の摂取により抑制された。続いて、Caco-2 細胞を用いて、ケルセチンとヘスペレチンによる消化管バリア機能保護作用の分子機序を探索した。TNF- α は、タイトジャンクション (TJ) タンパク質 Occludin の発現低下を引き起こし、バリア機能を損傷させた。このとき、ケルセチンを予め作用させた Caco-2 細胞では、TNF- α によるバリア機能の低下が抑制され、その作用機序として

Occludin の発現低下抑制と Claudin-4 の発現増加が提案された。しかしながら、ヘスペレチンは TNF- α に対する抑制作用を示さず、ケルセチンとは異なる機序で消化管バリア機能を保護することが推測された。

続いて、フラボノイドによるタイトジャンクション (TJ) バリア機能保護・強化作用の分子メカニズムを探索した。ヒト消化管上皮細胞 Caco-2 にケルセチンとヘスペレチンを作用させたところ、バリア機能の指標である経上皮電気抵抗値が上昇し、バリア機能の増強が認められた。またケルセチンによる作用には、TJ タンパク質、Claudin-4 の発現量の増加、ZO-2、Occludin、Claudin-1 の局在変化が関連することが示唆された。ヘスペレチンは、Occludin と Claudin-4 の発現量の増加、Claudin-1 と Claudin-3 の局在の変化を引き起こした。ヘスペレチンに比較し、ケルセチンの作用がより顕著であったことから、以降の研究ではケルセチンに注目した。Occludin のリン酸化解析を実施したところ、ケルセチンによるバリア機能増強作用において、そのリン酸化上昇が引き金となっていることが明らかとなった。また、Claudin-4 レポーターアッセイを実施したところ、ケルセチンは、Claudin-4 の転写活性を上昇させ、さらに転写開始点から 200bp のプロモーター領域がその上昇作用に重要な役割を持つことが明らかとなった。これら研究結果から、ヘスペレチン、ケルセチンによる消化管バリア機能保護・増強作用の分子メカニズムが部分的に解明された。研究全体を通して、ストレスによる消化管バリア機能損傷を保護するフラボノイドが見出され、部分的ではあるが分子メカニズムも明らかにされた。これら成果は、フラボノイド類の新規の生理機能を提案するとともに、申請時の研究計画を概ね達成したと考えられる。

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 14 件)

1. Kouguchi T, Ohmori T, Shimizu M, Takahata Y, Maeyama Y, Suzuki T, Morimatsu F and Tanabe S. The Effects of chicken collagen hydrolysate on the circulatory system in subjects with mild hypertension or high-normal blood pressure. *Biosci Biotechnol Biochem*. In press. (査読有)
2. 河口 友美, 岩井 浩二, 清水 宗茂, 大森 丘, 高畑 能久, 鈴木 卓弥, 森松 文毅, 田辺 創一. 市販コラーゲンペプチド摂取による自然発症性高血圧ラットの血圧上昇抑制作用の比較. *食品科学工学*

- 会誌: 印刷中. (査読有)
3. Kouguchi T, Ito A, Iwai K, Shimizu M, Takahata Y, Suzuki T, Morimatsu F, and Tanabe S. Chicken collagen hydrolysate-derived peptides inhibit tumor necrosis factor- α -induced inflammatory response in endothelial cells. *Food Sci Technol Res*: In press. (査読有)
 4. Shigeshiro M, Tanabe S, and Suzuki T. Repeated exposure to water immersion stress reduces the Muc2 gene level in the rat colon via two distinct mechanisms. *Brain Behav Immun* **26**: 1061-1065, (2012). (査読有)
 5. Noda S, Tanabe S, and Suzuki T. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* **60**: 4628-4633, (2012). (査読有)
 6. Miyauchi E, Morita M, Rossi M, Morita H, Suzuki T, and 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* **76**: 283-288, (2012). (査読有)
 7. Ishizuka S, Shiwaku M, Hagio M, Suzuki T, Hira T, and Hara H. Glycochenodeoxycholic acid promotes proliferation of intestinal epithelia via reduction of cyclic AMP and increase in H2AX phosphorylation after exposure to gamma-rays. *Biomed Res* **33**: 159-165, (2012). (査読有)
 8. Suzuki T, Tanabe S, and Hara H. Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells. *J Nutr* **141**: 87-94, (2011). (査読有)
 9. Suzuki T, Yoshinaga N, and Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* **286**: 31263-31271, (2011). (査読有)
 10. Jain S, Suzuki T, Seth A, Samak G, and Rao RK. Protein kinase Czeta phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem J* **437**: 289-299, (2011). (査読有)
 11. Aggarwal S, Suzuki T, Taylor WL, Bhargava A, and Rao RK. Contrasting effects of ERK on tight junction integrity in differentiated and under-differentiated Caco-2 cell monolayers. *Biochem J* **433**: 51-63, (2011). (査読有)
 12. Ishizuka S, Saito K, Suzuki T, Lee J, and Hara H. A partially degraded product of phytate suppresses the proliferation of HCT116 colorectal cancer cells. *Food Chemistry* **125**: 1219-1225, (2011). (査読有)
 13. Ogita T, Nakashima M, Morita H, Saito Y, Suzuki T, and Tanabe S. *Streptococcus thermophilus* ST28 ameliorates colitis in mice partially by suppression of inflammatory Th17 cells. *J Biomed Biotechnol*: 378417, (2011). (査読有)
 14. Ogita T, Tani Y, Morita H, Suzuki T, and Tanabe S. Suppression of Th17 response by *Streptococcus thermophilus* ST28 through induction of IFN- γ . *Int J Mol Med* **28**: 817-822, (2011). (査読有)
- [学会発表] (計 5 件)
1. Suzuki T. Intestinal barrier regulation by dietary polyphenols. International society nutraceuticals and food factors 2012 annual conference. 2012.12. Kona, USA.
 2. 野田咲乃、田辺創一、鈴木卓弥、ナリングゲニンは、タイトジャンクションタンパク質の局在と発現調節を介して、消化管上皮 Caco-2 細胞のバリア機能を高める。第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012.5、東北大学
 3. 東知世、重白みづき、田辺創一、鈴木卓弥、ナリングゲニンによる大腸バリア機能保護作用と炎症抑制作用の相互解析。第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012.5、東北大学
- [図書] (計 5 件)
1. 鈴木卓弥, 生命・食・環境のサイエンス, 第 5 章 3 節 食べものによる病気の予防, 監修 江坂宗治, 共立出版, 161-164, (2011)
 2. Suzuki T. Handbook on Flavonoids: Dietary Sources, Properties and Health Benefits. Regulation of intestinal barrier function by dietary flavonoids. Editors: Kazuya Yamane and Yuudai Kato. Nova Science Publishers, Inc. 461-476, (2011).
 3. Suzuki T. Quercetin: Dietary Sources, Functions and Health Benefits. Suppressive effect of quercetin on

intestinal tight junction permeability.
Editors: Taiki Chikamatsu and
Yuudai Hida. Nova Science
Publishers, Inc. 295-306, (2011).

4. 鈴木卓弥. 食品機能学, 第2章1節 ミ
ネラルの吸収促進成分, 第2章2節
血糖上昇抑制成分, 編者: 森田英利, 三
共出版, 印刷中.
5. Suzuki T. Kaempferol: Chemistry,
Natural Occurrences and Health
Benefits. Suppressive effect of
kaempferol on the intestinal
permeability. Editor: Jennifer
Ramirez, Nova Science Publishers,
Inc. In press.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/douri/Suzuki%20group/Top%20page.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 卓弥 (Suzuki Takuya)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教
授
研究者番号: 30526695

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし