

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660106

研究課題名(和文) 消化管内分泌細胞の分化制御に着目した生活習慣病予防素材の探索

研究課題名(英文) Regulation of enteroendocrine cell lineages by dietary food factors.

研究代表者

鈴木 卓弥 (Takuya, Suzuki)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30526695

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)：L-cellへの最終分化を決定する転写因子Pax6のレポータープラスミドをCaco-2細胞に導入し、376種類の天然化合物を試験したところ、36種類の化合物に活性上昇作用が認められ、さらにそのうちのEmodinはプログルカゴン遺伝子発現も強く高めた。高脂肪食摂取マウスに、0.1、0.3%のEmodinを摂取させたところ、耐糖能と小腸下部のプログルカゴン発現量を増加させる傾向を示したが、これらのマウスは軟便状態や若干の消化管炎症状態を引き起こしていた。Emodinは生活習慣病の改善に対する新たな選択肢の可能性を提案したが、高用量では安全性への配慮が必要なことも示された。

研究成果の概要(英文)：Human intestinal Caco-2 cells were transfected with a Pax6 promoter plasmid and effects of 376 natural compounds on the promoter activity were examined. We found that 36 compounds increased the Pax6 promoter activity. Among them, Emodin strongly increased the proglucagon mRNA level, too. Feeding emodin enhanced the glucose tolerance and intestinal proglucagon levels in the high fat loaded mice, but these mice slightly showed softer feces and intestinal inflammation. Taken together, supplemental emodin could be a novel therapeutic approach against metabolic disorders, but the side-effects should be considered in future studies.

研究分野：食品機能学

キーワード：インクレチン メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

我が国において、メタボリックシンドローム患者やその予備軍の割合は、約 30%に達し(平成 22 年 国民健康・栄養調査報告)その予防・改善を目指す機能性食品が多く研究開発されている。しかし、その患者数は増加の一途を辿り、予防・改善法の新たな選択肢の開発が期待されている。

メタボリックシンドロームの主要因の 1 つが高血糖・糖尿病であり、近年、この要因の 1 つとして、すい臓からのインスリン分泌を刺激する消化管ホルモン、インクレチンの分泌不足が提案され、インクレチンの 1 つの GLP-1 は、創薬のターゲットにもなっている。GLP-1 は、消化管上皮に点在する L-cell から分泌されるため、この L-cell 数を増加させれば、GLP-1 分泌の増強、血糖の適切なコントロールに繋がると考えられる。

消化管上皮細胞の分化は、Notch や Wnt を中心とした細胞間・細胞内シグナルによって制御される (Marc V. et al. Gastroenterology, 2011)。近年、私たちは、ストレスが Notch シグナルを介して杯細胞数を減少させることを報告した (Shigeshiro M et al. Brain Behavior Immun, 2012)。この結果は内分泌細胞に関する内容ではないが、外部からの各種刺激により上皮細胞の分化を修飾できることを示唆している。しかしながら、食品成分により消化管内分泌細胞の数を制御しようとする試みはほとんどない。

2. 研究の目的

本研究は、消化管上皮の Notch シグナルを修飾して L-cell を増加させる天然化合物を探査し、生活習慣病を予防する新たな機能性食品の創出を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Pax6 プロモーター活性を指標とした第一スクリーニング

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた。ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞に Pax6 のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入した。この細胞に約 376 種類の天然化合物を作用させ、Pax6 プロモーター活性を指標としてスクリーニングした。天然化合物は、理化学研究所の天然化合物ライブラリーから入手した。

(2) プログルカゴン遺伝子発現を指標とした第二スクリーニング

(1)にて選抜された候補化合物による L-cell 分化誘導能を、プログルカゴン遺伝子発現を指標にして評価し、2 段階目のスクリーニングを実施した。Caco-2 細胞に 36 種類の候補化合物を作用させ、リアルタイム PCR にてプログルカゴン遺伝子の発現を解析した。

(3) Emodin による耐糖能改善作用と GLP-1 分泌増大作用の検証

(1)、(2)にて選抜された候補化合物 Emodin をマウス(ICR、オス、7 週齢)に摂取させ(0.1、0.3%の混餌飼料)、グルコース負荷に対する耐糖能と GLP-1 分泌増大を解析した。

(4) 高脂肪食摂取マウスにおける Emodin の耐糖能、GLP-1 分泌増大作用の検証

高脂肪食に Emodin を添加し、マウス(ICR、オス、7 週齢)に摂取させた(0.1、0.3%の混餌飼料)、グルコース負荷に対する耐糖能と GLP-1 分泌を解析した。

(5) Emodin の安全性の検証

Emodin をマウス(ICR、オス、7 週齢)に摂取させ(0.1、0.3%の混餌飼料)、消化管の炎症状態、糞便の形状などを観察した。

4. 研究成果

(1) Pax6 プロモーター活性を指標とした第一スクリーニング

376 種類の天然化合物のうち、36 種類に Pax6 プロモーター活性の上昇作用が認められた。

(2) プログルカゴン遺伝子発現を指標とした第二スクリーニング

(1)にて選抜された 36 種類の天然化合物のうち、特に Emodin (4B-6)がプログルカゴン遺伝子発現量を増加させた(図 1)。

(3) Emodin による耐糖能改善作用と GLP-1 分泌増大作用の検証

マウスへのグルコース経口負荷は、血中グルコース濃度を上昇させた。Emodin を摂取したマウスでは、その上昇が抑制される傾向が認められた。また血中 GLP-1 濃度は、Emodin 摂取により顕著に高値を示した。

(4) 高脂肪食摂取マウスにおける Emodin の耐糖能、GLP-1 分泌増大作用の検証

高脂肪食は、体重増加、耐糖能異常を示した。Emodin 摂取は、体重増加を抑制し、さらにグルコース経口負荷後の血中グルコース濃度の上昇を抑制した。このとき血中の GLP-1 濃度は、Emodin を摂取したマウスで高かった。

(5) Emodin の安全性の検証

Emodin を摂取したマウスでは、飼育期間中に軟便が観察された。さらに解剖時の所見において、消化管が若干赤みを示し、炎症を起こしていることが観察された。

(1)から(5)の試験により、376 種類の天然化合物の中から消化管上皮の L-cell 分化を誘導する新たな食品素材候補として Emodin が見出された。メタボリックシンドロームを

予防、軽減するための多くの機能性食品が開発されているが、その効果は脂肪や糖質の消化と吸収を抑えるものや、脂肪の燃焼を促進させるものがほとんどであり、本研究の成果は、新たな機能性食品のカテゴリーを提案するものである。メタボリックシンドロームの罹患率が増加の一途をたどる現状において、本研究はその予防法の新たな選択肢の提案に繋がるものである。しかしながら、Emodinは高用量の摂取によって、消化管炎症を引き起こす可能性が認められた。今後は、Emodinの分子構造を修飾し、より活性と安全性が高い分子設計をすることにより、具体的な機能性食品素材への応用が可能と考える。

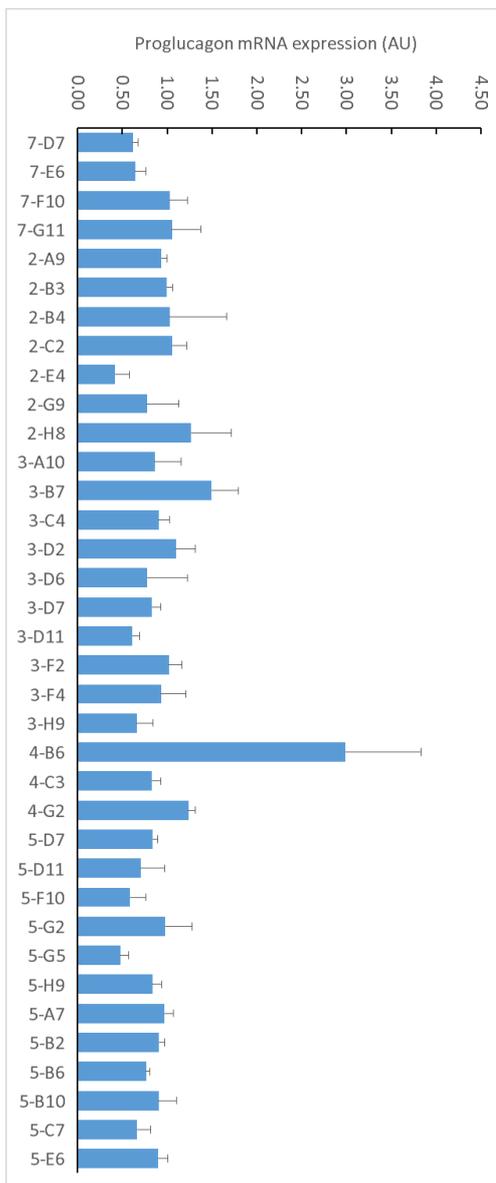


図1 . 二次スクリーニングにおけるプログルカゴン mRNA 発現量

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Murakami Y, Tanabe S and Suzuki T.

High-fat diet-induced intestinal hyperpermeability is associated with increased bile acids in the large intestine of mice. *J Food Sci* 81: H216-22, (2016). (査読あり)

2. Ogita T, Bergamo P, Maurano F, D'Arienzo R, Mazzarella G, Bozzella G, Luongo D, Sashihara T, Suzuki T, Tanabe S, and Rossi M. Modulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* OLL2838 in a mouse model of intestinal immunopathology. *Immunobiology* 220: 701-710, (2015). (査読あり)

3. Miyamoto J, Mizukure T, Park SB, Kishino S, Kimura I, Hirano K, Bergamo P, Rossi M, Suzuki T, Arita M, Ogawa J, and Tanabe S. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J Biol Chem* 290: 2902-2918, (2015). (査読あり)

4. Kikuchi Y, Yoshida H, Ogita T, Okita K, Fukudome S, Suzuki T, and Tanabe S. In vivo dose response and in vitro mechanistic analysis of enhanced immunoglobulin a production by *Lactobacillus plantarum* AYA. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 34: 53-58, (2015). (査読あり)

5. Murakami Y, Tanabe S, Matsui H, Mori H, Saburi W, and Suzuki T. Supplemental epilactose prevents metabolic disorders through UCP-1 induction in skeletal muscle of mice fed high-fat diets. *Br J Nutr* 114: 1774-1783, (2015). (査読あり)

6. Noda S, Tanabe S, and Suzuki T. Quercetin increases claudin-4 expression through multiple transcription factors in intestinal Caco-2 cells. *J Functional Foods* 10: 112-116, (2014). (査読あり)

7. Phuamongkolwivat P, Suzuki T, Hira T, and Hara H. Fructooligosaccharide augments benefits of quercetin-3-O- β -glucoside on insulin sensitivity and plasma total cholesterol with promotion of flavonoid absorption in sucrose-fed rats. *Eur J Nutr* 53: 457-468, (2014). (査読あり)

8. Tanabe S, Suzuki T, Wasano Y, Nakajima F, Kawasaki H, Tsuda T, Nagamine N, Tsurumachi T, Sugaya K, Akita H, Takagi M, Takagi K, Inoue Y, Asai Y, and Morita H. Anti-inflammatory and intestinal

barrier-protective activities of commensal lactobacilli and bifidobacteria in thoroughbreds: role of probiotics in diarrhea prevention in neonatal thoroughbreds. J Equine Sci 25: 37-43, (2014).(査読あり)

〔学会発表〕(計 12件)

1. 溝口菜美、鈴木卓弥、過酸化水素による消化管タイトジャンクションバリア損傷に対するケルセチンとケンフェロールの保護作用、2016.5.14、武庫川女子大(兵庫県神戸市)
2. 三吉優香、鈴木卓弥、細胞内亜鉛による消化管上皮タイトジャンクション発現制御の分子機序の解析、2016.5.14、武庫川女子大(兵庫県神戸市)
3. 小方美幸、田里博之、荒川輝晃、鈴木卓弥、サイリウムの摂取は Heat Shock Protein25 発現を誘導し、実験的大腸炎を軽減する、2016.5.14、武庫川女子大(兵庫県神戸市)
4. 畑堀翔、久景子、米島靖記、鈴木卓弥、Leuconostoc mesenteroides NTM048 が産生する菌体外多糖の摂取は乾癬を予防・軽減する、2016 年度農芸化学学会大会、2016.3.29、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
5. 西向めぐみ、鈴木卓弥、山崎裕也、小池誠治、アトピー性皮膚炎モデル NC/Nga マウスにおけるアルキルリン脂質摂取による症状改善効果、2016.3.29、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
6. 宮本潤基、水呉太一、Park Si-Bum、岸野重信、小川順、木村郁夫、鈴木卓弥、田辺創一、代表的な腸内細菌である乳酸菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid は GPR40/MEK-ERK を介して腸管バリア保護効果を発揮する、2015 年度農芸化学学会大会、2015.3.27、岡山大学(岡山県岡山市)
7. 竹之下柳一郎、趙澄澄、久景子、米島靖記、鈴木卓弥、田辺創一、Leuconostoc mesenteroides NTM048 が産生する菌体がいいた棟は炎症性 TH17 反応を抑制する、2015 年度農芸化学学会大会、2015.3.27、岡山大学(岡山県岡山市)
8. 三吉優香、田辺創一、鈴木卓弥、細胞内亜鉛による消化管上皮バリアの恒常性の維持 - タイトジャンクションタンパク質の発現調節の分子機構 -、第 68 回日本栄養食糧学会、2014.5.30、酪農学園大学(北海道江別市)
9. 村上祐紀、佐分利亘、森春英、松井博和、

田辺創一、鈴木卓弥、難消化性二糖エピラクトースによる高メタボリックシンドローム作用の解析、第 68 回日本栄養食糧学会、2014.5.30、酪農学園大学(北海道江別市)

10. 東知世、田辺創一、鈴木卓弥、ケンフェロールによる大腸の炎症抑制およびバリア機能保護作用の解析、第 68 回日本栄養食糧学会、2014.5.30、酪農学園大学(北海道江別市)

11. 宮本潤基、水呉太一、Park Si-Bum、岸野重信、小川順、鈴木卓弥、田辺創一、腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid はマウス腸管上皮細胞における TNFR2 発現を抑制し腸炎を緩和する、2014 年度農芸化学学会大会、2014.3.29、明治大学(神奈川県川崎市)

12. 宮本潤基、水呉太一、Park Si-Bum、岸野重信、小川順、鈴木卓弥、田辺創一、腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid は GPR40 シグナルを介して Caco-2 細胞における腸管上皮バリアの損傷を回復する、2014 年度農芸化学学会大会、2014.3.29、明治大学(神奈川県川崎市)

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