

令和元年6月28日現在

機関番号：34439

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2018

課題番号：25750064

研究課題名(和文)カルシウム吸収を促進する精油の探索 - 腸管上皮培養細胞を用いた解析

研究課題名(英文) Screening for essential oils that modulate the intestinal calcium absorption by using a human intestinal cell line, Caco-2.

研究代表者

小林 優子 (Kobayashi, Yuko)

千里金蘭大学・生活科学部・講師

研究者番号：10393208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養素の吸収の第一段階をになう腸管上皮細胞に対して、カルシウムの吸収促進効果を持つ機能性成分を探索することを目的として、スクリーニング系の構築と、この系を利用したスクリーニングを実施した。機能性成分の候補として、植物由来の精油を用いた。カルシウムが腸管上皮細胞から吸収される2つの経路である経細胞輸送経路、ならびに細胞間隙輸送経路を対象として、腸管上皮培養細胞であるCaco-2を用いて、それぞれの経路の活性化をスクリーニングできる条件を検討した。細胞間隙輸送経路を調節する精油を探索した結果、サンダルウッド精油が、細胞間隙の透過性を強く抑制する効果を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンダルウッド精油が細胞間隙の透過性を抑制するという作用は、カルシウムの吸収促進という観点からは逆の効果となるが、細胞間隙の透過性を抑制することは、腸管バリア機能を高める意味を持つことから、生体防御の点から重要である。腸管バリアとは、食物に含まれる有害な成分が体内へ侵入することを防ぐ、腸管上皮細胞が有する機能であり、炎症やストレスにより腸管バリア機能が低下すると、外来性抗原が腸管粘膜を通過して体内に入り、食物アレルギーなどの疾患の原因となると考えられている。サンダルウッド精油の有効成分を解析することで、腸管バリア機能を高める新規の機能性成分として利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to explore the functional essential oils that promote intestinal calcium (Ca²⁺) absorption by using monolayer-cultured human intestinal Caco-2 cells. Ca²⁺ absorption in the small intestine proceeds by two routes, an active transcellular transport and a passive paracellular transport. The screening for the transcellular and paracellular pathway modulators was done by intracellular Ca²⁺ imaging and measurement of the transepithelial electrical resistance (TER) value of the cell monolayers as an indicator, respectively. TER is usually used as an indicator of the paracellular permeability. The effects of 15 essential oils were tested, and it was found that essential oil derived from sandalwood (Santalum album) significantly increased TER of Caco-2 cell monolayers. Elevated TER value means the promotion in intestinal tight junction integrity. This result suggests that sandalwood essential oil has an effect to enhance the intestinal barrier function.

研究分野：細胞生理学

キーワード：腸管上皮細胞 精油 Caco-2 腸管バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民健康・栄養調査によると、近年の日本人の平均カルシウム摂取量は食事摂取基準栄養所要量の目標値を満たしていない状況が続いている。カルシウムが不足すると、骨の発育不良や骨粗鬆症の発症など、身体に悪影響を及ぼすことはよく知られている。この現状を改善するためには、カルシウムを含む食品を多く摂取するよう心がけることが第一であるが、カルシウムは腸管での吸収効率が低いことから、摂取したカルシウムの吸収効率を高めることも重要な要素であると考えられる。カルシウム吸収を促進する効果を持つ物質として、活性型ビタミン D がよく知られている。脂溶性物質である活性型ビタミン D は、腸管上皮細胞の細胞膜を透過し、細胞内のビタミン D レセプターを介して、カルシウムの取り込みおよび輸送に関連するタンパク質遺伝子の発現量を増加させることで、カルシウム吸収効率を高めると考えられている。このような背景から、活性型ビタミン D のような効果を持つ物質が他にもあるのではないかと考え、その候補として、ビタミン D と同様の脂溶性化合物を豊富に含む精油 (エッセンシャルオイル) に着目し、研究を行うこととした。

精油は、植物の葉や花、果実などから抽出される微量成分であり、特有の芳香を持つのが特徴である。古来より香料や治療薬として使用され、現代ではアロマセラピーに広く利用されている。精油は、その種類に応じて消炎や鎮静、抗菌、免疫系の活性化など、生体に対してさまざまな効果を持つことが経験的に知られている。しかしながら、その機能性成分や作用メカニズムについて細胞生物学的に明らかにされているものはまだ少ない。そこで、本研究では、腸管上皮培養細胞を用いてカルシウム吸収を測定する簡便なスクリーニング系を構築し、その系を利用してカルシウム吸収促進効果を持つ精油を探索し、精油の機能性を細胞レベルで検討することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、カルシウム吸収の第一段階をになう腸管上皮細胞を用いて、カルシウム吸収促進効果を簡便に判定するスクリーニング系を構築すること、そしてこの系を利用して、腸管に作用してカルシウム吸収を促進する新たな機能性成分を見出すことを目標とする。

食品由来のカルシウムの吸収には、腸管上皮細胞内を能動輸送によって通過する「経細胞輸送経路」、腸管上皮細胞の間隙を受動拡散によって通過する「細胞間輸送経路」の2経路が存在する。活性型ビタミン D は、の経路に作用してカルシウム吸収量を増加させることが以前より知られているが、の経路にも作用して細胞間隙の透過性を高めることで、カルシウム吸収を亢進させることも明らかにされてきた。そこで、本研究では、腸管上皮培養細胞 Caco-2 を用いて、およびの経路それぞれの活性化を検出するスクリーニング系を構築する。の経路の活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇を指標として、の経路の活性化は、細胞間隙を透過する蛍光色素の量および経上皮電気抵抗 (TER) 値を指標としてモニターできる系とする。活性型ビタミン D をポジティブコントロールとして系の条件設定を行った後に、精油サンプルを使用したスクリーニングを実施し、活性型ビタミン D 様の作用を持つ精油を探索することを目標とする。活性が見出された精油については、腸管上皮細胞に対する作用機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内カルシウム濃度変化を指標とした、経細胞輸送経路活性化因子のスクリーニング系の構築

腸管上皮培養細胞であるヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を、コラーゲンコートしたウェルプレート上で培養し、小腸上皮様に分化させる。

で準備した細胞に、カルシウム蛍光指示薬を負荷し、細胞外液にカルシウムを添加することにより惹起される細胞内カルシウム濃度変化を蛍光プレートリーダーにより測定する。ポジティブコントロールとして活性型ビタミン D を用い、Caco-2 細胞の培養液に事前に添加した場合とそうでない場合の細胞内カルシウム濃度変化を比較し、サンプルの有無で有意に差が出る条件を決定する。

(2) 蛍光色素透過量と TER (経上皮電気抵抗) 測定による、細胞間輸送経路活性化因子のスクリーニング系の構築

Caco-2 細胞を、コラーゲンコートした透過性膜を持つインサート上で培養し、小腸上皮様に分化させる。透過性膜は、細胞は通さないが輸送物質等は透過するサイズの孔の空いたフィルターであり、この上に細胞を培養することで、Caco-2 細胞の管腔側と基底膜側を区別することができる実験系である。

蛍光色素透過量の測定：分化した Caco-2 細胞の入ったインサートに、蛍光色素溶液を添加する。下部のプレートには、溶媒のみを添加する。一定時間インキュベートした後、下部のプレートに移動した蛍光色素の量を蛍光プレートリーダーにより測定し、物質透過量として算出する。蛍光色素には、小腸上皮細胞の経細胞経路では輸送されない Lucifer Yellow を用いて、細胞間隙の透過マーカーとする。

TER (経上皮電気抵抗) の測定：TER は、上皮細胞層の管腔側と基底膜側との間のイオン透過性の制限により発生する電気抵抗のことで、主に細胞間隙のイオン透過性の状態

変化を反映する指標として頻用される。測定電極を、分化した Caco-2 細胞の入ったインサートの内側（管腔側）と下部プレート（基底膜側）に挿入することで測定する。

、の測定において、ポジティブコントロールとして活性型ビタミン D を用い、インサート内に事前に添加した場合とそうでない場合の測定値を比較する。活性型ビタミン D の有無で有意に差が出る条件を決定し、カルシウム吸収効率判定の指標とする。

(3) 精油が腸管上皮細胞に与える影響の検討

精油をスクリーニングのサンプルとして使用するにあたり、Caco-2 細胞に悪影響を与えない濃度を事前に検討する。さまざまな濃度に希釈した精油を Caco-2 細胞の培養液に添加し、細胞の増殖活性ならびに生存率を、ミトコンドリアの酵素活性によって評価する手法である MTT アッセイ法を用いて検証する。

(4) 精油の作用メカニズムの解明

(1)および(2)の実験系の条件設定が終わり次第、精油サンプルを用いたスクリーニング実験を行う。効果が見られた精油については、Caco-2 細胞内でカルシウム輸送に関連するタンパク質の発現にどのような変化が起こっているかをウェスタンブロッティングにより解析し、精油の作用メカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1) 細胞内カルシウム濃度変化を指標とした、経細胞輸送経路活性化因子のスクリーニング系の構築

まず、Caco-2 細胞に負荷するカルシウム蛍光指示薬の種類や負荷の方法について検討した結果、蛍光指示薬 Fluo-4 が測定に適していると判断した。Fluo-4 を負荷した Caco-2 細胞の蛍光変化を、蛍光顕微鏡観察ならびに蛍光プレートリーダーによって解析した。その結果、カルシウムイオンを細胞内に流入させるイオノフォアである ionomycin で処理した場合、細胞内の蛍光強度の変化が蛍光顕微鏡ならびに蛍光プレートリーダーのいずれにおいても観察され、細胞内カルシウムの濃度変化を蛍光によって検出できる実験条件が設定できたと考えられた。しかしながら、あらかじめ培養液に活性型ビタミン D を添加して培養した Caco-2 細胞と、そうでない細胞の間では、カルシウム蛍光強度の変化が観察されなかった。ポジティブコントロールの設定について、さらに条件の検討が必要である。

(2) 蛍光色素透過量と TER（経上皮電気抵抗）測定による、細胞間輸送経路活性化因子のスクリーニング系の構築

透過性膜インサート上で 20 日間培養し、小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に対し、Lucifer Yellow を用いた細胞間隙透過性の測定と、TER 値の測定条件の設定を行った。培養液に活性型ビタミン D を添加して培養した Caco-2 細胞では、透過性の変化は測定できなかった。そこで、Caco-2 細胞の細胞間隙の透過性を亢進する化合物として報告されているカプリン酸ナトリウムをポジティブコントロールとして用い、細胞間隙の透過性を測定したところ、Lucifer Yellow の透過性の亢進ならびに TER 値の低下が観測でき、Lucifer Yellow の透過量と TER 値に相関がみられたことから、実験条件が設定できたと考えられた。

(3) 精油が腸管上皮細胞に与える影響の検討

スクリーニングサンプルとして用いる精油の添加濃度を検討するため、精油が Caco-2 細胞の生存に与える影響を調べた。14 種類の精油について、0.01%の濃度で Caco-2 細胞の培養液に添加し、5 時間培養した場合の細胞の生存率を調べた結果を図 1 に示す。この結果より、クラリセージ精油やセージ精油など、細胞の生存率を上昇させる、すなわち細胞増殖を促進する効果を持つものや、生存率に影響を与えないもの、生存率を低下させるものなど、精油の種類によって細胞に対する効果が異なっていることが分かった。0.01%以外の濃度でも生存率の検証を行い、スクリーニング実験を行う際には、細胞の生存に影響を与えない濃度で各種精油を添加することとした。

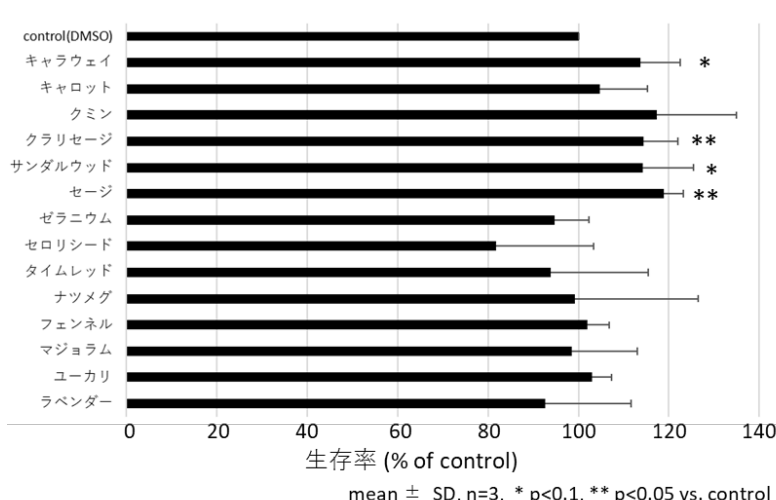


図 1 精油が Caco-2 細胞の生存に与える影響

(4) 精油サンプルを用いたスクリーニングと精油の作用メカニズムの解明

(2)により設定した、細胞間輸送経路活性化因子のスクリーニング系を用いて、細胞間輸送経路を変化させる精油の探索を開始した。

透過性膜インサート上で20日間培養して分化させたCaco-2細胞のインサート側の培養液に、15種類の精油を添加してTER値の変化を調べた。使用した精油の内訳は、イランイラン、オレンジ、カルダモン、キャラウェイ、クミン、クローブ、サンダルウッド、セージ、ディル、パチュリ、ペパーミント、マジヨラム、ユーカリ、ラベンダー、レモングラスである。その結果、クローブ精油とペパーミント精油にTER値を低下させる傾向が観察されたが、有意差を検出するまでには至らなかった。一方、スクリーニングを進める過程で、TER値を上昇させる、すなわち細胞間隙の透過性を低下させる精油が見出された。これらの、細胞間隙の透過性に影響を与える精油について解析を進めたところ、サンダルウッド精油がTER値を上昇させる強い効果を持っていることが明らかになったので、その詳細を検討した。

透過性膜インサート上で20日間培養したCaco-2細胞のインサート側の培養液に、サンダルウッド精油を0.01%ならびに0.02%の濃度で添加し、TER値の変化を解析した。その結果、添加の1.5時間後からTER値の上昇が見られ始め、0.01%の精油を添加した場合には6時間後で添加前の1.1倍、24時間後には1.25倍に達し、いずれもcontrolに比べて有意な差を示した。0.02%の精油を添加した場合にはさらに効果が高く、6時間後で添加前の1.2倍、24時間後には1.6倍、30時間後には1.5倍の数値を示し、いずれもcontrolに比べて有意な差を示した(図2)。0.02%の精油は、さらに培養4日後においても添加前の1.5倍の数値を維持した。これらの精油の添加後、インサートの培養液を精油を含まない培養液に交換すると、TER値はcontrolと同等の元に戻ることを確認された。また、透過性膜インサート上の細胞を顕微鏡で観察し、精油の添加によって細胞数や細胞の形状に影響がないことも確認している。以上の結果より、サンダルウッド精油にはCaco-2細胞のTER値を上昇させる、すなわち細胞間隙の透過性を抑制する強い効果があることが明らかになった。

サンダルウッド精油が示した効果は、研究開始当初の、細胞間隙の透過性を高める成分を探索するという目的とは逆であるが、細胞間隙の透過性を抑制することは、腸管バリア機能を高め、生体防御の観点から重要であることから、サンダルウッド精油の作用機序について調べることにした。

腸管バリアとは、食物に含まれる有害な成分が体内へ侵入することを防ぐ、腸管上皮細胞が有する機能であり、炎症やストレスにより腸管バリア機能が低下すると、外来性抗原が腸管粘膜を通過して体内に入り、食物アレルギーなどの疾患の原因となると考えられている。この腸管バリア機能を担う重要な因子として、腸管上皮細胞間をシールするタイトジャンクション(TJ、密着結合)による物理的防御がある。TJは、隣り合う上皮細胞をつなぎ、細胞間隙の物質の透過を制御する構造であり、細胞膜に存在するクローディンと呼ばれるタンパク質を中心とした複合体により形成されている。そこで、サンダルウッド精油がTER値を上昇させるメカニズムについて調べるため、TJ関連のタンパク質の発現量をウェスタンブロットングにより調べた。ウェルプレートで20日間培養したCaco-2細胞の培養液にサンダルウッド精油を添加して5時間培養し、培地を交換して精油を除いたのち、サンプル添加から24時間経った時点で細胞を回収してウェスタンブロットングのサンプルとして用いた。TJを構成するタンパク質であるクローディン1、クローディン4、オクルディンについて発現量を検討した結果、サンダルウッド精油で処理した細胞において、クローディン4の発現量が増加していることが分かった。クローディン4は、腸管上皮細胞に発現するクローディンのなかでも、腸管バリア機能を強める作用を持つと報告されている。サンダルウッド精油は、Caco-2細胞のクローディン4の発現量を増加させることにより、細胞間隙の透過性を抑制していることが示唆された。以上の結果より、サンダルウッド精油が腸管バリア機能を高める新規の機能性を有する可能性が考えられた。

サンダルウッド(*Santalum album*)は、ビャクダンとも呼ばれる木本植物であり、精油は心材より水蒸気蒸留法で抽出される。サンダルウッド精油は、成分として、-サントロール、-サントロール、-ベルガモトール等を含ると報告されている。これらの成分のうちいずれかが腸管バリア機能を高める作用を持つのかについては、さらに解析を進める必要がある。

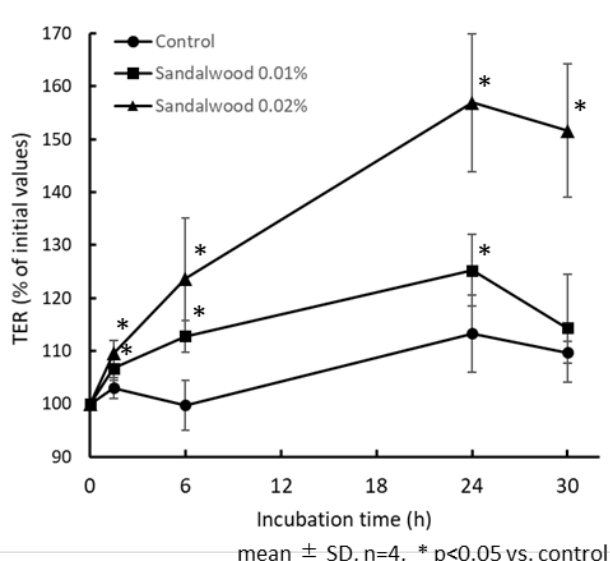


図2 サンダルウッド精油がTER値に与える影響

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kobayashi Y, Sato H, Yorita M, Nakayama H, Miyazato H, Sugimoto K, Jippo T, Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells., Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 80(6), 2016, 1172-1178.
DOI: 10.1080/09168451.2016.1148573

〔学会発表〕(計 5 件)

Kobayashi Y, Sato H, Yorita M, Nakayama H, Miyazato H, Sugimoto K, Jippo T, Inhibitory effects of geranium essential oil on the degranulation and cytokine production of mast cells., 第 12 回アジア栄養会議 (ACN2015), 2015.

小林優子、佐藤晴美、頼田美佳、中山博登、宮里博成、杉本圭一郎、実宝智子、ゼラニウム精油およびその主成分であるシトロネロールの抗アレルギー効果の検討、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016.

小林優子、佐藤晴美、中山博登、宮里博成、杉本圭一郎、実宝智子、フェネル精油とその主成分であるトランス-アネトールの抗アレルギー効果、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.

小林優子、佐藤晴美、中山博登、宮里博成、杉本圭一郎、実宝智子、フェネル精油とその主成分であるトランス-アネトールの抗アレルギー作用の検討、第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018.

小林優子、佐藤晴美、藤田有紀、中山博登、宮里博成、杉本圭一郎、実宝智子、抗アレルギー効果を持つ精油の探索と有効成分の検討、第 73 回日本栄養・食糧学会大会、2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。