

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500003

研究課題名(和文)生活習慣病改善作用を有する難吸収性食品因子の新規作用機序の解明

研究課題名(英文) Novel mechanisms for unabsorbable food factors with anti-life style-related diseases activities

研究代表者

三浦 豊 (MIURA, Yutaka)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10219595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管から吸収されにくいにも関わらず、生活習慣病改善作用を発揮する食品因子の作用機構を検討した。特に抗炎症作用を有するスフィンゴミエリンの作用について詳細に検討したところ、腸管透過性を亢進させることと血中エクソソームのグルコース取り込み促進作用を亢進させることが明らかとなった。これらの結果は、腸管から吸収されにくい食品因子が腸管に対する作用、または腸管を經由し血中エクソソームの組成を変化させる作用を発揮することで、生体に影響を及ぼすという新たな作用機構の存在を示唆するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Some food factors are difficult to be absorbed from an intestinal tract, although they showed clear physiological functions. To elucidate the mode of actions of such unabsorbable food factors, the effect of sphingomyelin (SPM) on the intestinal permeability and serum exosomes was investigated. SPM is shown to increase the intercellular permeability of the intestinal epithelial cells, which may be one of the mechanisms of sphingomyelin functions. Serum exosomes could increase glucose uptake by L6 myotubes and dietary SPM augmented the serum exosome functions. These results suggest novel mode of actions of SPM via intestinal tracts and serum exosomes.

研究分野：栄養化学

キーワード：スフィンゴミエリン 生活習慣病 腸管透過性 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

これまでに多くの食品因子の機能が報告されており、特に生活習慣病予防・改善作用を有する食品因子は多数報告されている。これらの食品因子は経口摂取することで、その機能を発揮しているが、それら食品因子の消化管からの吸収性についてはあまり注目されていない場合が多い。実際にいくつかの機能性食品因子は消化管からほとんど吸収されないにもかかわらず、明確な生理作用を示すことが知られており、その作用機序は不明である。一般の栄養素は消化され、吸収されてから、その生理作用を発揮するが、吸収されにくいのに生理的な効果を及ぼす食品因子の作用機構を明らかにすることは、エビデンスに基づいた機能性食品因子の開発や利用の促進に大きく貢献すると予想される。

本研究で対象としたスフィンゴミエリンについては、経口摂取することでアトピー様皮膚炎モデルマウスでの皮膚炎症状を抑制すること、また急性炎症モデルマウスにあらかじめスフィンゴミエリンを摂取させることで、炎症抑制作用が発揮されることをすでに報告している。一方、スフィンゴミエリンの腸管からの吸収を検討した研究によると、摂取したスフィンゴミエリンのわずか数パーセントしか体内に取り込まれないことが報告されており、食事性のスフィンゴミエリンがどのような機構で、上記の生理作用を発揮しているかは不明であった。

また研究代表者は、ハーブ茶に含有されるポリフェノールの抗糖尿病作用に関する研究を進める過程で、南アフリカ原産のハーブであるルイボス中の主要ポリフェノールであるアスパラチンが難吸収性であるにもかかわらず、顕著な抗糖尿病作用を示すことを見出していた。アスパラチンの腸管からの吸収率を測定した論文では、摂取した量の1パーセント以下しか吸収されないことが報告されており、にもかかわらず糖尿病モデルマウスでの検討では血糖値低下作用、膵臓保護作用が観察されている。さらにアスパラチンには皮膚炎症を抑制する作用も見出されている。

以上のように、研究代表者が取り扱ってきた機能性食品因子の中で、脂溶性のスフィンゴミエリンおよび水溶性のアスパラチンの両者が難吸収性の機能性食品因子であることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では上記の背景を元に、難吸収性の機能性食品因子であるスフィンゴミエリンとアスパラチンが、その生理作用を発揮する機構を明らかにすることを目的とした。具体的には消化管に対する作用、特に小腸上皮細胞の透過性に対する作用を検討すると同時に、これらの食品因子を摂取した際の血中エクソソームの変化を検討した。エクソソームとは直径 100 nm 程度の膜小胞の

ことであり、ほとんどすべての細胞から分泌される小胞の一つである。かつては細胞内の老廃物を捨てるための機構と考えられていたが、エクソソーム中に種々の miRNA などの機能性分子が含有されていることが明らかになるとともに新たな細胞間情報伝達因子であると考えられている。エクソソームは血中にも存在しており、細胞間・組織間の情報伝達に寄与していると予想されているが、血中エクソソームの生理的意義についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、特に食事性のスフィンゴミエリンが血中エクソソームの機能を変化させることで、その生理作用を発揮している可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 小腸上皮細胞に対する影響の検討

小腸上皮細胞のモデル細胞として Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞であり、コンフルエントになるまで培養すると腸管上皮様の細胞に分化することが知られている細胞であり、腸管上皮細胞のモデルとして良く利用されている細胞である。Caco-2 細胞をカルチャーインサート上で培養し、上皮細胞様に分化するまで培養した後に、スフィンゴミエリン(卵黄由来のものを用いた)およびアスパラチンを添加し、腸管透過性への影響を検討した。腸管透過性の指標としては、経上皮電気抵抗値 (TEER) と蛍光色素ルシファーイエロー (LY) の透過量の2つを用いた。スフィンゴミエリンは既述の通り脂溶性であるため、あらかじめミセル化してから培地に添加し、細胞に取り込ませた。また細胞毒性の検討には LDH 測定法を用いた。

(2) 血中エクソソームに対する影響の検討

経口摂取した食品因子の血中エクソソームへの影響を検討するため、スフィンゴミエリンを1週間毎日経口投与したラットより血清を調製し、血清からエクソソームを沈殿法により調製した。

調製したエクソソームを L6 筋管細胞に添加し、グルコース取り込みへの影響を検討した。対照群にはスフィンゴミエリンを溶解した緩衝液のみを投与したラットの血清から調製したエクソソームを用いた。

さらに観察された血中エクソソームの作用がエクソソームによるものであることを確認するため、エクソソームの細胞への取り込みを阻害することが知られているアネキシンを用いた検討を行った。

エクソソームに含有されているタンパク質を同定するため調製したエクソソームからタンパク質を調製し、LC-MS/MS によるタンパク質の同定も行った。

4. 研究成果

(1) 小腸上皮細胞に対する影響の検討

スフィンゴミエリンをミセル化し Caco-2 細

胞に48時間取り込ませた後にTEERを測定したところ図1Aに示したようにスフィンゴミエリン濃度依存的なTEERの有意な低下が観察された。またその際のLY透過量は図1Bに示したように有意に増加しており、スフィンゴミエリンが腸管透過性を亢進する作用を有していることが明らかとなった。

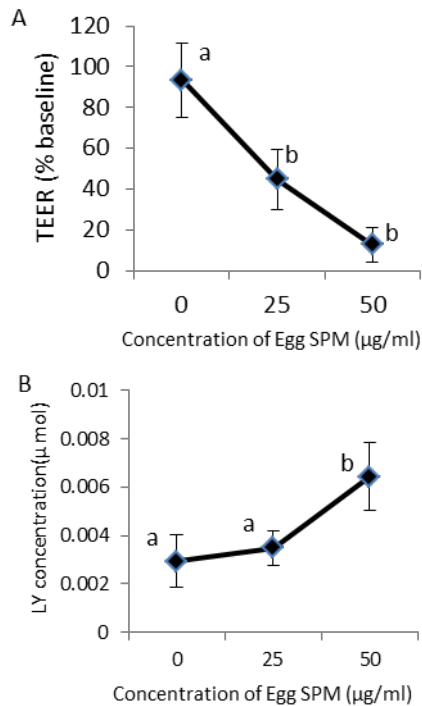


図1 スフィンゴミエリンの腸管透過性への影響

A: TEER値、B: LY透過量

図中の異なるアルファベットを付した群間には統計的な有意差があることを示す。

図1で観察された腸管透過性の亢進作用について、両親媒性であるスフィンゴミエリンの細胞毒性によるものではないことを確認するため細胞毒性の評価を行ったところ、図2に示したように1000 μg/mlのスフィンゴミエリンまで培地中のLDH濃度に変化はなく、スフィンゴミエリンは細胞毒性を示さないことが明らかとなった。

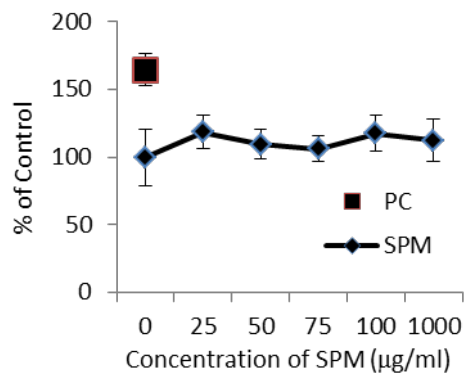


図2 スフィンゴミエリンの細胞毒性の検討
PC: ポジティブコントロール (ジギトニン)

次に、スフィンゴミエリンの細胞透過性の亢進が細胞間接着を破壊することによるものではないことを明らかにするため、TEERおよびLY透過量の経時変化を検討した。その結果、図3に示したようにスフィンゴミエリンを添加し、その後培地から除くことで、細胞間透過性への作用は徐々に回復し、6日後にはほぼ元に戻ることが確認された。この結果はスフィンゴミエリンの作用が一過性であることを示唆しており、スフィンゴミエリンは腸管の透過性を一過性に亢進することで、その生理作用を発揮している可能性を示唆している。

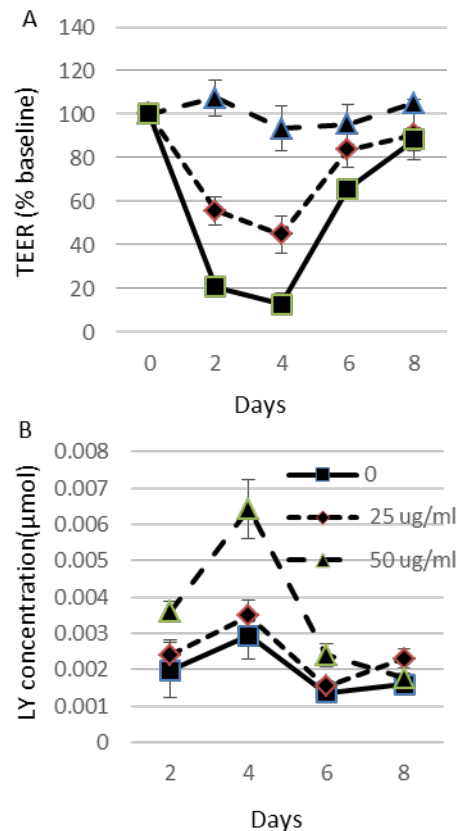


図3 スフィンゴミエリン作用の経時的変化
A: TEER値、B: LY透過量

次にアスパラチンの腸管透過性への影響を検討したところ、図4に示したように、TEER値をわずかに増加させ、細胞間透過性を低下させる可能性が明らかとなった。この作用はアスパラチン自身の吸収性の低さの原因である可能性が考えられる。

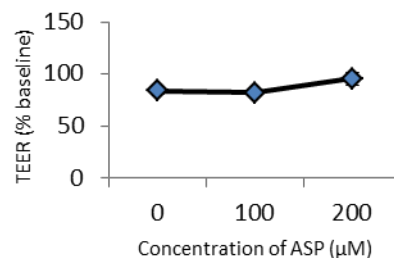


図4 アスパラチンの腸管透過異性への影響

(2) 血中エクソソームに対する影響の検討

ラット血清より調製したエクソソームは用量依存的に筋管細胞のグルコース取り込みを促進することが明らかとなった(図5)。

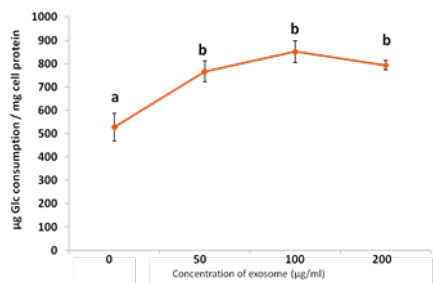


図5 血清由来エクソソームの筋管細胞におけるグルコース取り込みに対する影響

この作用がエクソソームによるものであることを確認するため、エクソソーム添加時にアネキシンを共存させ、その作用の変化を観察したところ、アネキシンによりエクソソームの作用が阻害されることが明らかとなった(図6)。この結果より、血清由来エクソソームによるグルコース取り込み促進作用は血清中の因子の混入によるものではなく、エクソソームによるものである可能性が高いと考えられた。

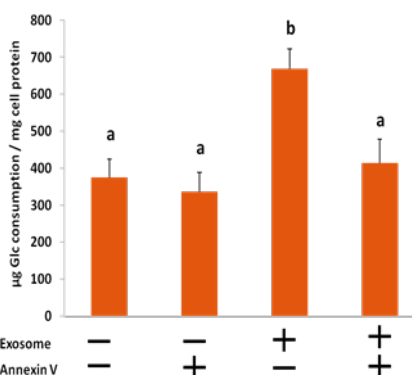


図6 血清由来エクソソームの作用に対するアネキシンの作用

次に経口投与したスフィンゴミエリンが血清由来エクソソームの作用にどのような影響を及ぼすかを検討したところ、図7に示したように、対照ラットの血清由来のエクソソームと比較して、筋管細胞のグルコース取り込みを有意に増加させることが明らかとなった(図7)。この結果は、経口投与したスフィンゴミエリンが血中のエクソソームの構成を変化させることで、その作用を発揮している可能性を示唆するものであると同時に、食品因子が血中エクソソームに影響を与える可能性を示唆する極めて興味深い結果と考えられる。

エクソソームの調製法は、これまで複数の手法が報告されているが、ここまでの実験で用いていたのはエクソソームを特異的に沈殿させる試薬を用いた沈殿法である。

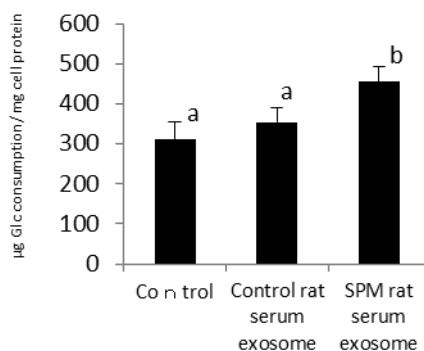


図7 血清エクソソームのグルコース取り込み促進能に対する食餌由来 SPM の影響

しかし、沈殿法によるエクソソームの調製では他の成分が混入する可能性があることも報告されている。スフィンゴミエリンがエクソソーム組成にどのような影響を与えているかを検討するにあたり、他の成分(ここでは血清成分)が混入していた場合、正確な分析が行えない可能性が考えられたので、次に調製したエクソソームのタンパク質構成を検討することとした。

LC-MS/MSによりエクソソーム中の主要なタンパク質を同定したところ、血清タンパク質(血清アルブミンなど)の存在が確認されたので、スフィンゴミエリンのエクソソーム構成に対する作用を検討する際には、超遠心法など他の手法を用いる必要性が示唆された。

(3)まとめ

以上、本研究により難吸収性であるスフィンゴミエリンが腸管上皮層の透過性を変化させることと血中エクソソームの構成を変化させることで、その生理作用を発揮している可能性が明らかとなった。これらの結果は腸管から吸収されないにもかかわらず、生体に影響を及ぼす食品因子の作用機序の一つとして興味深いものである。一方、スフィンゴミエリンと同様に難吸収性である機能性食品因子アスパラチンについては、腸管透過性を低下させる作用が見出された。アスパラチンについては、十分な検討が出来ていないため、今後更なる検討が必要である。

またスフィンゴミエリンに関しても、腸管透過性を亢進する機構は不明であり、また血中エクソソームの構成成分の同定もまだ不十分である。今後、エクソソーム中の miRNA パターンの変化など、さらなる検討が必要である。

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5件)

Zhou F., Furuhashi K, Son MJ, Toyozaki M, Yoshizawa F, Miura Y, and Yagasaki K.

(2017) Antidiabetic effect of enterolactone in cultured muscle cells and in type 2 diabetic model db/db mice. *Cytotechnology*. in press, doi: 10.1007/s10616-016-9965-2. 査読有

Ishikawa H., Yoshikawa H., Izumikawa K., Miura Y., Taoka M., Nobe Y., Yamauchi Y., Nakayama H., Simpson R. J., Isobe T. and Takahashi N.. (2017) Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic Acids Res.*45, 3437-3447, doi: 10.1093/nar/gkw1047. 査読有

Muller, C.J.F., Malherbe, C.J., Chellan, N., Yagasaki, K., Miura, Y., and Joubert, E. (2016) Potential of rooibos, its major flavonoid C-glucosides and Z-2-(β -D-glucopyranosyl)-3-phenylpropenoic acid in prevention of metabolic syndrome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016 Jun 15:1-20. doi: 10.1080/10408398.2016.1157568. 査読有

Yoshikawa H, Ishikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Hayano T, Isobe T, Simpson RJ, Takahashi N. (2015) Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5524-5536. doi: 10.1093/nar/gkv470. 査読有

Kamakura R, Son MJ, de Beer D, Joubert E, Miura Y, Yagasaki K. (2015) Antidiabetic effect of green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract in cultured cells and type 2 diabetic model KK-Ay mice. *Cytotechnology*. **67**, 699-710. doi: 10.1007/s10616-014-9816-y. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Yamada K, Yamada K, Takamiya N and Miura Y, Induction of hepatoma cell death by egg-derived sphingomyelin and its molecular mechanism, The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 2016年11月12日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

中溝 優、Elizabeth Joubert、Christo Muller、新井 浩司、野村 義宏、三浦 豊、抗炎症作用を有するハニーブッシュ抽出物のスクリーニングとその作用の検証、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

三崎 公平、花房 知美、橋本 康太郎、及川 洋祐、三浦 豊、細胞膜糖脂質 GM3 によるマウスメラノーマ細胞運動能制御機構の解明、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

大川 澗、野村 義宏、三浦 豊、難吸収性食品因子スフィンゴミエリンの小腸上皮細胞の細胞間透過性への影響、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

三浦 豊、食品由来スフィンゴミエリンの抗がん・抗炎症作用(招待講演)、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

吉田 佳穂里、譚 哲立、三浦 豊、スフィンゴミエリンによる培養筋管細胞における糖取り込み促進作用とその機構解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Miura Y and Yagasaki K, Screening of anti-diabetic food factors using cell cultures and animal models. 2nd Joint International Symposium on Animal Cell Technology for Asian Network-by JAACT, TCELS and MU- "Biologics and Foods: Trends in Technology, Regulation and Safety" (招待講演)、2015年11月19日、Mahidol University, Bangkok (Thailand)

山田 佳奈、高宮 奈津子、三浦 豊、スフィンゴミエリンによる肝癌細胞死誘導とその機構解析、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学(岡山県岡山市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/1/0000073/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 豊 (MIURA Yutaka)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10219595