

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660109

研究課題名(和文) 難消化性食品成分の腸管食細胞による非酵素的細胞内消化の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological significance of enterophagocyte non-enzymatic intracellular digestion of indigestible food components

研究代表者

松田 幹 (Matsuda, Tsukasa)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20144131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食品中には植物や微生物の細胞壁成分などの多様な難消化性成分が含まれる。これらは食物繊維と総称され、腸内細菌叢の変動を介した大腸生理への作用の研究がなされてきた。一方、腸粘膜上皮から体内に取込まれるという観点での研究はほとんど無かった。本研究では、カドラン(グルカン)、ザイモザン(酵母細胞壁)およびビフィズス菌を難消化性食品成分モデルとしてマクロファージ細胞株による細胞内消化と再放出に関する実験を行い、難消化性食品成分の一部は腸管粘膜のマクロファージのような食細胞に取込まれ細胞内で非酵素的に断片化されて再放出され、この分解断片が周辺の腸管免疫細胞群をさらに活性化することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Food contains a variety of indigestible components such as cell walls of plants and microbes. Such indigestible components are called dietary fiber in general, and many researches have been conducted in terms of effects via intestinal bacterial flora on the large bowel physiology. However, no many researches have been done from a viewpoint of intestinal uptake of such indigestible components. In the present study, Uptake, intracellular degradation and release of some indigestible components such as curdlan, zymosan, and Bifidobacteria were investigated using a macrophage cell line, and it was demonstrated that such indigestible components taken up by the cell were degraded non-enzymatically and that the degraded fragments were release again and stimulated enteric immune cells in a paracrine manner.

研究分野：食品科学

キーワード：難消化性食品成分 非酵素的細胞内消化 腸管食細胞

1. 研究開始当初の背景

食品難消化成分と腸内微生物とは密接な関係がある。植物性食品の細胞壁成分や発酵食品微生物の細胞壁成分にはヒトの消化酵素では加水分解されない難消化性成分が含まれる。未分解のまま大腸まで到達して腸内微生物によって酵素的に分解され利用され、腸内微生物叢の形成や変動に関与する。難消化性成分は一般に腸管から体内には吸収されず、一部が腸内細菌に利用され、残りは便とともに排泄される。難消化性食品成分が腸内微生物による代謝を経ないで直接生体に作用することは理論的には考えにくいという定説がある一方で、一部の高分子や微粒子は未分解のまま腸管粘膜上皮細胞やパイエル板の M 細胞に取り込まれて体内に移行(経細胞輸送)されることも事実である(村地、化学と生物 1981 19(1)37-43、McDole1, JR et al., Nature 2012 483, 345-350)。体内に移行した高分子成分は粘膜固有層のマクロファージや樹状細胞などの食細胞に貪食されると推定される。さらに上皮細胞の間隙から腸管腔内に仮足を伸ばした樹状細胞は、腸管腔内の抗原を直接貪食する(Coombes JL, Powrie F Nat Rev Immunol 2008 8(6):435-46)。マクロファージや樹状細胞のような貪食細胞は、取り込んだ成分を酵素的あるいは非酵素的に分解、低分子化するが、後者については未知の課題が多い。細胞内に取込まれた後の難消化性食品成分の細胞内動態や細胞内消化・代謝に関する先行研究は限定的である(Kinchen JM, et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2008 781-795)。

本申請者は、特異抗体や可溶性受容体を高感度プローブとして食品高分子の腸管吸収や細胞内動態を解析し、腸上皮細胞に取り込まれたタンパク質のリソソームプロテアーゼに消化と未分解成分の放出(Matsubara T et al, 2012, J Biochem; Akiyama, Y et al 2013, J Biochem) また、マクロファージに貪食された難消化性多糖の非酵素的分解と放出(Hino S et al, 2012, Biochem Biophys Res Commun) に関して、タンパク質や多糖などの高分子成分が細胞内で分解され、低分子分解産物が細胞外へ放出される現象を見つけた。これらの最近の研究成果から、消化酵素やリソソーム酵素などのヒトの酵素では分解されない難消化性食品成分の分解と代謝に興味を持ち、この現象の生理的意義を明らかにする研究を企画した。

2. 研究の目的

難消化性食品成分が細胞内での非酵素的分解により代謝され、その分解産物が生理作用を発揮することが実証されれば、難消化性食品成分の生体への生理作用における新たな概念を提唱し、食品機能研究に新しい方向性を示すことになる、と考えた。そこで「難消化性食品成分は、腸管マクロファージにより非酵素的に低分子化されて再放出され、そ

の低分子化産物はパラクリン的に周辺の腸管細胞群に作用する。」という作業仮説をたて、その実証を目指した。そのために、以下の項目を目標として研究を進めた。(1) マクロファージに取り込まれた難消化性成分の細胞内動態と断片化機構：真菌・植物細胞壁成分である 1-3 グルカンおよび酵母細胞壁(ザイモザン) さらに腸内細菌を培養マクロファージに貪食させ、特異的なプローブや抗体を用いて細胞内での局在や経時的变化を観察して細胞内での分解機構の一旦を明らかにする。(2) 細胞外に再放出される分解断片の構造と性質：培養マクロファージに難消化性食品成分として 1-3 グルカンを貪食させ、培地を交換した後しばらく培養を続け、その間に培地に放出される 1-3 グルカンを特異的プローブにより検出しその特性を明らかにする。(3) 難消化性食品成分およびマクロファージから放出された分解断片の細胞生理作用：マクロファージが難消化性食品成分を貪食した際に分泌するサイトカイン、ケモカイン類を同定および定量し、周囲のマクロファージ、樹状細胞や腸上皮細胞などの腸管細胞群に及ぼすパラクリン生理作用を考察する。

3. 研究の方法

(1) 難消化性成分あるいは複合体(菌体)の細胞内での分解動態の解析

-グルカンの分析には受容体である Dectin-1 の細胞外ドメインをプローブとして免疫化学的に解析した。細菌菌体については、菌体を抗原としてマウス抗血清を独自に作製してプローブとした。この抗抗体抗体は他の細菌が存在する個体組織の解析には交差反応のため不向きであるが、培養細胞系での単一菌株での実験には有効である。難消化性成分を細胞培地中に溶液あるいは微粒子のけん濁液として添加し、細胞を培養し、食作用あるいは Dectin-1 などの受容体介在エンドサイトーシスにより細胞内に取込ませた。その後、培地を除去し十分に洗浄した後、一定時間培養を続けた。この間、経時的に細胞を固定あるいは溶解して回収し、培養上清も回収した。細胞内に残存する難消化性食品成分を、各プローブを用いて蛍光免疫染色し、常法により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞溶解液および培養上清に含まれる推定分解産物を Dectin-1-based ELISA 法により半定量的に解析した。

(2) 細胞に取り込まれ細胞内分解された後に再放出された分解産物の構造解析

無血清培地を用いても微量の血清タンパク質成分(アルブミン)が残存し後の質量分析の障害となるため、膜濾過による前処理をして血清由来タンパク質を除去し、さらに ODS スピニングカラムを通して、吸着と素通り画分に分離した。各画分を MALDI-TOF 質量分析装置を用いて分析し、分解断片のサイズ

分布を推定した。質量分析の比較対照としてカードランの酸加水分解物およびラミナリンオリゴ糖を用いた。高分子あるいは微粒子状の分解物については段階的超遠心分離により分画して回収し、それらについて Dectin-1 との結合活性を測定した。

(3) 難消化性成分およびその分解産物に対するマクロファージの応答

難消化性成分を貪食させたマクロファージの培養上清を分離し、分解産物を含む馴化培地として、また、馴化培地から異なる遠心分離条件により難消化性成分分解産物を分画した。これらを、マウスマクロファージ細胞株の無血清培地に添加して一定期間培養し、培養上清を回収して培地中に分泌されたサイトカイン、ケモカインを測定した。培地を濃縮し、得られたタンパク質を還元アルキル化処理し、LC-トリプル四重極型質量分析計により同定および定量解析を行った。また、細胞を回収して RNA を抽出し、RT-PCR / 電気泳動および qPCR によりサイトカインの mRNA を分析した。

4. 研究成果

(1) マクロファージに取込まれた難消化性食品成分の細胞内動態

マウスのマクロファージ細胞株に、難消化性食品成分のモデルとしてカードラン(難消化性多糖)、ザイモザン(酵母細胞壁成分)、ピフィズ菌(腸内共生細菌)を貪食させ、細胞内でどのような過程と機構で消化・分解されるかを解析した。まず、グルカンの受容体として同定された Dectin-1 を特異的プローブとして利用するために細胞外領域をコードする cDNA 断片を昆虫細胞での発現ベクターに組み込み、タグを付加した組換え型可溶性 Dectin-1 を一過性の発現により培養上清に分泌発現させた。抗タグ抗体を用いた免疫プロット法により培養上清に型可溶性 Dectin-1 が期待される分子量のタンパク質として分泌されていることを確認した。

Dectin-1 は真菌、酵母、植物細胞壁の 1-3 グルカンを特異的に認識するが、ピフィズ菌のような細菌細胞壁は認識しないため、マウスを免疫することによりピフィズ菌に対する抗体を調製した。同時に、マクロファージに貪食させるためのピフィズ菌を培養し菌体を調製した。ピフィズ菌は嫌気性菌であるため生育には脱酸素や窒素置換などの特殊な条件を必要とし、良好な生育を得るための培養条件について種々検討し、再現性良く生育し菌体が回収できる最適条件を設定した。

カードラン、ザイモザンおよびピフィズ菌を培養マクロファージに貪食させ、培地を交換して洗浄したのち、継続して培養した。その間、細胞を固定して上記プローブを用いて蛍光抗体染色し、細胞内の難消化性成分を

観察し、鈍食後の細胞内動態を観察した。いずれの難消化性成分も貪食直後にそれぞれの特異的プローブで細胞内に斑点状に観察された。これらのリガンドあるいは抗原は、48 および 76 時間の培養後にも残存しており、僅かにシグナル強度が低下したように感じられたものの、細胞内においても難消化であり、比較的長期間細胞内に保持されるものと推定された。おそらく、その間に少量ずつ非酵素的に分解され細胞外に再放出されるものと推定され、腸管等の組織においては、近傍の他の免疫細胞を分解断片リガンドにより継続的に刺激するものと考えられる。

(2) 細胞に取込まれ細胞内分解された後に再放出された分解産物の構造解析

貪食細胞によって細胞内消化を受け、細胞外に再放出される難消化性食品成分を定量的に解析するために、微粒子状あるいは可溶性 グルカンの高感度検出系を確立し、また、細胞壁多糖の分解産物であるオリゴ糖を質量分析で分析可能かを検証した。グルカンに関しては可溶性受容体であるデクチン1に異なるタグを付加した2種の組換えタンパク質を調製して、これらを 2-site ELISA 検出系のプローブとして用いてグルカンを高感度に定量する条件を設定した。

カードランおよびザイモザンをマクロファージに貪食させ、洗浄後に継続して培養を続け、経時的に培地を分離して放出された Dectin-1 結合性のグルカンを定量した。グルカンは水に不溶性であり、溶液中の濃度という定義を当てはめることができなしたため、遠心分離後の上清に残存する、粒子状のカードランを調製して、この濃度定量し、それを標準グルカンとして定量した。培地中に再放出されたカードランおよびザイモザンの分解産物を遠心分離し、上清と沈殿に分け、それぞれのグルカンを定量した。カードランを貪食させたマクロファージから回収した培地の上清画分(微粒子状)では、培養時間に伴ってグルカン濃度が上昇し24時間ではほぼ横ばいとなった。一方、ザイモザンを貪食させたマクロファージから回収した培地の上清画分(微粒子状)ではグルカンはほとんど検出されなかった。また、培地の沈殿画分には不溶性の粒子状の難消化性成分分解物が含まれると推測し、アルカリ処理によって一旦可溶性し、ポリスチレンプレートに結合させ固相化し、アルカリを除去し洗浄した後に Dectin-1 と反応させ、グルカンを半定量した。この方法により、ザイモザンを貪食させたマクロファージから回収した培地の上清画分(微粒子状)から僅かに、また、沈殿画分からは相当量のグルカンが検出され、培養時間とともに増加する結果が得られた。これらの結果から、カードランもザイモザンもマクロファージに貪食された後、非酵素的に分解され、微粒子あるいは微粒子状の分解産物として再放出されること

が明らかとなった。また、グルカン単体であるカードランは、マンナンやキチンなどの他の多糖やタンパク質を含む複合体であるザイモザンに比べて細胞内での非酵素的分解速度が早く、より小さい粒子としてより早く細胞外に放出されることが示唆された。

一方、グルカン以外の細胞壁成分などは特異的検出用プローブがないため、MALDI-TOF MS によって、グルカン糖鎖を検出・同定できるかを検証した。カードラン加水分解物を用いて質量分析を行ったところ、グルコース1単位ずつことなる質量を持つ複数のピークとして検出され、低分子まで分解されたグルカン分解物の分析には質量分析計を用いることが可能であることが示された。

(3) 難消化性成分およびその分解産物に対するマクロファージの応答

貪食細胞に細菌由来グルカンを貪食させ、培地中に再放出された微粒子状グルカンを定量的に解析し、種々の培養条件下で再放出された微粒子状グルカンを含む培養上清(馴化培地)がナイーブな貪食細胞に及ぼす影響を調べた。グルカンを貪食したマクロファージの培養上清はナイーブなマクロファージを活性化し種々のサイトカイン、ケモカインの分泌を誘導した。貪食後の培養時間が異なるマクロファージの培養上清を用いてナイーブなマクロファージに対するサイトカイン発現誘導を qPCR により調べた結果、時間経過とともに馴化培地のサイトカイン発現誘導能は上昇し、48時間程度で一定値となった。また、馴化培地の遠心分離により得られた上清(微粒子状)および沈殿(粒子状)のいずれにもナイーブマクロファージへのサイトカイン発現誘導能は見られたが、上清画分にやや高い誘導能が見られた。このようなサイトカイン発現誘導能が、再放出された微粒子状グルカンの寄与のみによるものかを明確にするために、この馴化培地を加熱処理しても活性が残存するかを検討した。サイトカインの種類によって加熱処理後も発現誘導能に有意な変化が見られないものと、6-7割程度まで低下するものがあり、全てのサイトカインではないものの、この馴化培地のサイトカイン発現誘導能ではグルカンの分産物が主要因と考えられ、タンパク質因子の寄与をある程度否定できた。

次に、可溶性組換え Dectin-1 を添加してマクロファージ活性化の抑制を調べたが、明確な結論は得られなかった。添加した Dectin-1 の量が不十分であったと推測している。さらに、グルカン、ザイモザンを貪食したマクロファージから分泌されるタンパク質を質量分析により解析し、種々の条件検討を経て、いくつかのサイトカイン、ケモカインの同定に成功した。これにより特異抗体による ELISA を用いることなく、難消化性食品成分を貪食した活性化マクロファージ

から分泌される培養上清中の液性因子を同定、解析することが可能となった。

(4) まとめと今後の展望

本研究課題における作業仮説「難消化性食品成分が腸管吸収され細胞内消化後に再放出されて生理作用を発揮する」は、食物繊維などの難消化性食品成分は大腸まで到達して腸内微生物によって分解され利用されるか、あるいは未分解のまま排泄されるという、これまでの食品科学・栄養科学の概念には当てはまらないものであった。関連する先行研究がほとんど無く、「腸管吸収は微量であり生理的には意味がない」という可能性もあり、斬新であると同時にチャレンジングな研究でもあった。しかし、一方で、グルカンやペクチンなどの難消化性多糖や、ある種の乳酸菌やビフィズス菌の菌体の摂取によって免疫系や代謝系が変動することを示唆する研究成果が蓄積されつつあり、このような生理的な変動には、現在の定説(腸内微生物が介在)では説明がつかない現象も多くあると思われる。

難消化性という語句は、一般に、消化酵素では分解されないという定義で用いられている。食品成分の細胞内消化に関しては、そもそも高分子成分が未分解のまま吸収され、さらに細胞内に取込まれることは想定されていなかったため、本申請者の知る限りでは、これまでは研究対象にはなり得なかった。多糖やタンパク質などの食品高分子成分が、未分解のまま生理的に意味のある量で体内に取込まれることが明らかになりつつある状況を踏まえ、難消化性食品成分が体内に取込まれた後の次の段階である食細胞による食作用と細胞内消化を着想し本研究課題を遂行した。

腸管の食細胞は腸管粘膜直下の粘膜固有層に常在し、腸管粘膜上皮から体内に侵入してきた病原微生物を貪食し細胞内で殺菌して分解し、免疫細胞に提示するなどの感染を防御する働きと、感染や炎症などで死んだ自己の細胞や残骸を貪食して分解する働きを持つ。貪食により細胞内に取込まれた病原体や死細胞はリソソームに含まれる種々の加水分解酵素により破壊・分解される。しかし、リソソーム酵素による消化は、通常のタンパク質やデンプンなどの消化性多糖に限定され、酵母や細菌の細胞壁成分(主に多糖成分)である結合を持つ難消化性多糖や D-アミノ酸を含むペプチドグリカンオリゴペプチドなどは酵素的には分解されないはずである。このような難消化性成分の細胞内消化・分解については未知な部分が多い。本申請者らの成果も含め、限定的な先行研究から、おそらくマクロファージなどの食細胞が産生し、その殺菌作用が知られている活性酸素種(ROS)により化学的(非酵素的)に分解、断片化されるものと想定される。細胞内消化により微粒子化あるいは可溶化された分解

産物が腸管マクロファージから再度放出され、周囲に拡散することで、他の食細胞や腸上皮細胞、さらにはリンパ球などを刺激するという作用機序は、難消化性食品成分の代謝と機能発現の機構の一つと考えることもできる。本研究課題により一端が解明されたこのような現象と機構を端緒として、難消化性食品成分の腸管内での動態や変遷および腸管粘膜免疫系との相互作用の理解に向けた研究の展開を模索している。

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)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔図書〕(計 2件)

(1) Oshima K., Yasueda T., Nishio S. and Matsuda T. MFG-E8: Origin, Structure, Expression, Functions and Regulation, In MFG-E8 and Inflammation, P. Wang ed., Springer Science+Business Media, Dordrecht, 1-32, 2014

(2) 平野可奈、松田 幹：動物を使ったアレルギー性の評価:アレルギー感作能と即時型症状誘発能、「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」、森山達哉、穂山浩監修、株式会社シーエムシー出版(2015) pp159-162

〔その他〕

ホームページ等

所属研究室ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molreg00/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 幹 (MATSUDA, Tsukasa)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：20144131