



消化管のタイトジャンクション機能を制御する食品成分・生体内因子に関する基礎的研究

広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻 准教授 鈴木卓弥

はじめに

消化管の上皮細胞は、外界と生体内を隔てるために極めて重要であり、多様な生理機能を有している。その1つとして、上皮細胞が形成する間隙(細胞間経路)は、カルシウム(Ca)などの栄養素の吸収に必須であるとともに、外来異物の侵入(透過)を制限するバリア機能の観点からも重要である。この上皮細胞間の選択透過性を制御する構造が細胞間接着構造タイトジャンクション(TJ)である。TJは、occludinやclaudinなどの複数の分子から構成される巨大なタンパク質複合体であり、その構成分子の局在や機能が細胞間の物質の通過(吸収・透過)を制御する。このTJの機能制御には、生体内の液性因子が中心的な役割を持つ一方で、消化管の上皮細胞は高頻度に管腔内の食品成分に曝されることから、食品成分による調節も受けることが十分に考えられる。本研究は、動物個体および消化管上皮細胞を用いて、消化管のTJ機能を制御する食品成分および生体内因子に関する研究を進めた。その成果として、消化管のCa吸収を高める難消化性糖類、消化管のバリア機能を増強・保護するポリフェノール、消化管のバリア機能調節における上皮増殖因子(EGF)とインターロイキン-6(IL-6)の役割を明らかにし、それらの作用機構を解明した。以下に概要を紹介する。

1. 消化管カルシウム吸収を促進する難消化性糖類に関する研究

ダイフラクトースアンハイドライド(DFA) IIIは、フラクトース2分子が環状に結合したユニークな構造を持つ難消化性二糖であり、チコリなどに含まれるイヌリンをフラクシルトランスフェラーゼ処理することにより調製される(図1)。このDFAIIIをラットに摂取させると、小腸と大腸の両方でCa吸収を強く促進することが観察された。大腸でのCa吸収促進作用は、腸内細菌による発酵産物の有機酸を介するものであり、

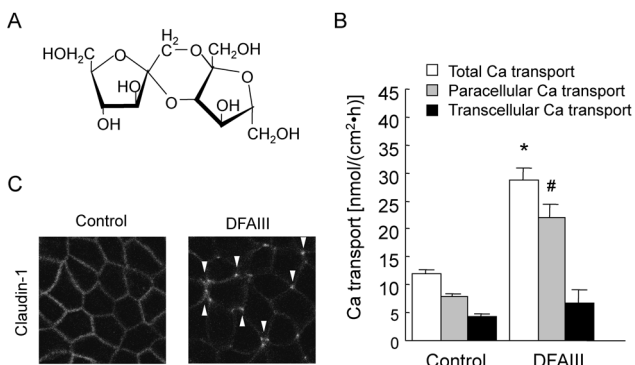


図1 DFAIIIによるカルシウム(Ca)吸収促進作用
A. DFAIIIの化学構造。B. 消化管上皮Caco-2細胞のCa吸収速度。DFAIIIは、細胞内経路ではなく細胞間経路のCa吸収を促進する。C. Caco-2細胞のclaudin-1の免疫染色像。DFAIIIは、claudin-1の局在変化を引き起こす。

発酵性の難消化性糖類に由来から知られている作用であった。一方、小腸では、DFAIIIは消化も吸収もされず、ラット小腸やヒト消化管上皮Caco-2細胞を用いた試験により、DFAIIIは上皮細胞に直接的に作用して、細胞間TJ経路のCa吸収を促進することが証明された。またDFAIIIを作用させた上皮細胞では、TJタンパク質claudin-1の局在変化、さらにclaudin-1の局在制御に関わるアクチン繊維の収縮変化が確認された。一連の研究により、DFAIIIによる消化管TJ経路のCa吸収促進作用の分子機構が明らかとなり、難消化性糖類の新たな生理機能を提案することができた。

2. 消化管バリア機能を増強・保護するポリフェノールに関する研究

植物界に広く分布するポリフェノール類は、生体内シグナル分子に相互作用し、多彩な生体調節機能を示すことが知られている。消化管上皮のTJバリア機能も種々の細胞内シグナルによる制御を受けることから、ポリフェノール類などの食品成分がTJバリア機能を調節しようと推測した。ヒト消化管上皮Caco-2細胞やマウスを用いた実験により、ポリフェノールなどの食品成分の一部に消化管TJバリア調節作用が確認され、なかでもタマネギ等に多く含まれるポリフェノールのケルセチンに強いバリア機能増強・保護作用が見出された(図2)。ケルセチンを摂取したラットにおいても、小腸と大腸での細胞間透過マーカーの透過速度が低下し、TJバリア機能が高まった。このケルセチンによるバリア機能増強作用は、TJタンパク質ZO-2, occludin, claudin-1のTJへの局在促進とclaudin-4の発現増加によることが明らかになった。また、この作用にはoccludin自体のリン酸化上昇が重要であること(詳細について

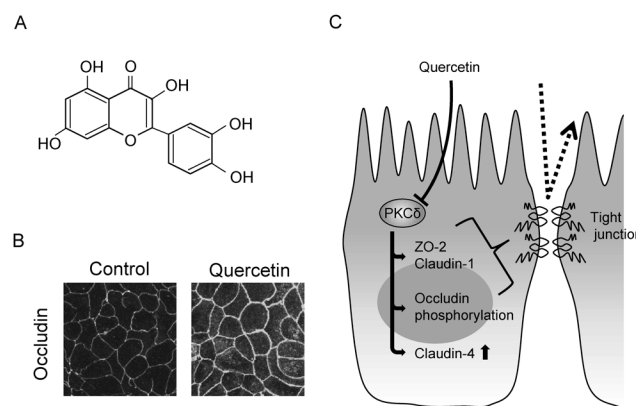


図2 ケルセチンによる消化管バリア機能増強作用
A. ケルセチンの化学構造。B. Caco-2細胞のOccludinの免疫染色像。ケルセチンは、OccludinのTJへの局在を強める。C. ケルセチンは、PKCδの活性を直接的に抑制し、ZO-2, claudin-1, occludinの局在促進、claudin-4の発現を誘導する。このときoccludinのリン酸化も重要な役割を持つ。

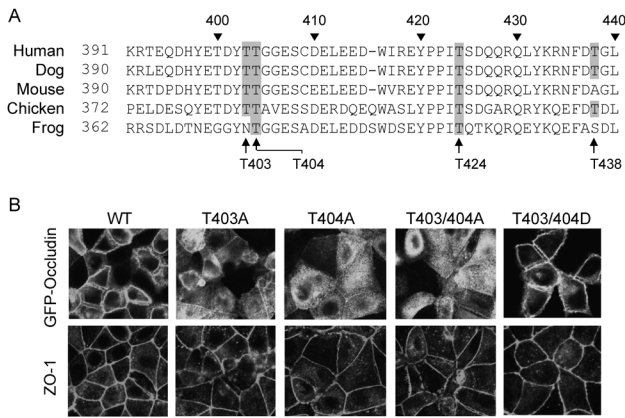


図3 TJタンパク質occludinのリン酸化機能解析
 A. 新たに同定されたoccludinのリン酸化部位。種間で保存性の高い403, 404, 424, 438番目のスレオニンがリン酸化される。B. 403, 404番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体は、野生型に比べてTJへの移行が遅延する。さらにリン酸化をミミックしたアスパラギン酸への変異体は野生型と同様の局在を示す(424, 438のスレオニンも同様の結果)。

は次項に記載), ケルセチンが上皮細胞内でprotein kinase C δ (PKC δ) 活性を直接的に抑制して発揮されることも示された。さらに、実験的大腸炎マウスにケルセチンを摂取させると、大腸TJバリアの保護、および大腸炎症状の緩和が認められた。一連の研究により、消化管TJバリアを調節する新たな食品成分が見出され、なかでもケルセチンによる消化管バリアの増強・保護作用の分子機構が解明された。

3. TJタンパク質occludinのリン酸化制御機構に関する研究

TJタンパク質occludinは、上皮細胞内でリン酸化を受けることが知られていたが、そのリン酸化の部位や機能については不明であった。また上記2の研究において、ケルセチンによるTJバリア機能増強作用がoccludinのリン酸化上昇を伴うことが示されたため、私たちはoccludinのリン酸化制御に関する研究を進めた。まず、occludinのリン酸化部位を同定するため、MALDI-TOF-LC/MS/MSを用いたリン酸化解析を行ったところ、種間で保存性の高い403, 404, 424, 438番目のスレオニンがリン酸化部位として同定された(図3)。RNAi, シグナル阻害剤, キナーゼアッセイなどを組み合わせた試験により、occludinのリン酸化責任キナーゼとしてPKC η とPKC ζ が同定された。さらに、PKC η はoccludinの403, 404番目のスレオニン、PKC ζ はそれらに加えて424, 438番目のスレオニンをリン酸化することが示された。これらスレオニンをアラニンに変異したoccludin変異体をCaco-2細胞に発現させたところ、変異体はTJへの移行が遅延し、TJバリアの維持・形成におけるoccludinリン酸化の重要性が明らかになった。一連の研究により、occludinのリン酸化制御を介したTJ調節の分子機構、およびその制御が関与するポリフェノールのバリア機能増強効果の作用機構が明らかとなった。

4. 消化管バリア機能を調節する生体内因子(EGFおよびIL-6)に関する研究

消化管のバリア機能は、様々な生体内因子によって正・負に

制御され、消化管の恒常性の維持や疾患の発症に関わる。一例として、アルコール代謝物のアセトアルデヒドは消化管バリアを損傷し、アルコール性肝障害の要因の1つと考えられている。消化管上皮Caco-2細胞において、EGFはアセトアルデヒドによるバリア損傷、およびoccludinとZO-1の局在異常を軽減した。またEGFによる作用は、EGF受容体-phospholipase-C γ を介したPKC β IとPKC ϵ の活性化により発現することが明らかとなった。一方で、サイトカインIL-6は炎症性腸疾患の病変部位で高発現することが知られているが、消化管バリア機能への作用は知られていなかった。Caco-2細胞において、IL-6はポリア形成アイソフォームのclaudin-2の発現を高め、消化管TJバリアを損傷した。IL-6は、gp130分子と会合した受容体に認識された後、extracellular-signal-regulated kinase (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)を介して、claudin-2の発現制御に関わる転写因子cdx-2を増加した。さらに、マウスにIL-6を投与したところ、消化管のclaudin-2発現が増加し、個体レベルでもIL-6によるバリア損傷作用が確認された。一連の研究により、消化管TJバリアを調節する新たな生体内因子が見出され、EGFによる消化管TJバリアの保護作用、IL-6による消化管TJバリアの損傷作用の分子機構が解明された。

おわりに

本研究は、動物個体や培養細胞を用いた試験を連携することにより、消化管上皮における栄養素の吸収、異物の侵入防御の役割を担うTJ機能を調節する新たな食品成分と生体内因子を見出し、その分子作用機序の一部を明らかにすることができた。DFAIIIにおける成果は、既に産学連携事業による商品化に結実し、人々の健康維持に貢献している。ポリフェノールによるバリア保護・増強作用については、ヒト試験での評価も含めて具体的な応用を目指した研究も進行中である。EGFとIL-6の知見は、消化管バリアの普遍的な制御の理解、およびバリア機能の低下が関連する疾病の病因解明に寄与するものである。今後も、食品成分の新たな生理機能、および消化管機能の制御機構を探索し、人の健康維持に貢献できる基礎的研究に取り組んでいきたいと考えている。

謝辞 本研究は、広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻動物資源化学研究室、北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻食品栄養学研究室、米国University of Tennessee Health Science Center (UTHSC), College of Medicine, Department of Physiologyにおいて行われたものです。研究を遂行するにあたりご指導ご鞭撻を賜りました原博先生、松井博和先生(北海道大学)、Radhakrishna K Rao先生(UTHSC)に厚く御礼申し上げます。また本研究の継続にあたり、田辺創一先生(広島大学)には多くのご助言と励ましを賜りました。深く感謝いたします。本研究の成果は、多くの共同研究者ならびに研究室メンバーのご協力によって達成されました。すべての方々のお名前を挙げることはできませんが、本研究に携わった皆様方に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました、広島大学大学院生物圏科学研究科、江坂宗春先生に厚く御礼申し上げます。