

# ストレスが惹起する消化管バリア機能の破綻に対する、 フラボノイド類の防御作用

鈴木 卓 弥

広島大学大学院生物圏科学研究科 講師

## 緒 言

現代社会では、「ストレス社会」という言葉が示すように、多くの人が様々なストレスに曝されながら生活を送っている。適度なストレスは、医学的には問題にならないが、慢性的あるいは過度のストレスは、身体的、精神的不調を引き起こす。なかでも消化管は、ストレス感受性の高い組織であり、ストレスが関与する疾患として、潰瘍、腸過敏性症候群、炎症性腸疾患など多数知られている。近年、これらの精神的ストレスに起因する消化器系疾患の発症メカニズムとして、消化管バリア機能の破たんが提案されている。我々の消化管は、管腔内の異物(腸内細菌由来のエンドトキシン、食事由来抗原など)を体内に侵入させないバリア機能を有しているが、脳が精神的ストレスを感じたとき、主に視床下部-下垂体-副腎軸を介し、バリア機能を破たんさせ、それによる管腔内異物の侵入が消化管や各種臓器の炎症、免疫システムの攪乱を引き起こすと考えられている<sup>1)</sup>。

消化管バリア機能とは、複数のバリア因子によって統合されるシステムの総称であり、なかでも上皮細胞間の物質の通過を制御するタイトジャンクション(TJ)は最も重要な因子の1つである<sup>2)</sup>。TJは、膜貫通型タンパク質のオクルディンやクローディン、そしてZOタンパク質などの細胞内裏打ちタンパク質によって構成される複合タンパク質群である。精神的ストレスによるTJバリア機能破たんの分子機序は完全には解明されていないものの、ストレス負荷によって上昇するサイトカインが、TJ分子の発現や局在を攪乱することが報告されている。

これらの知見を基盤に、我々は食品成分による消化管バリア機能保護作用を通じた、疾病の予防・改善に注目している。これまでに、いくつかの食品因子(短鎖脂肪酸、フラボノイドなど)にTJ機能調節作用を見出してきた<sup>3,4)</sup>。なかでもフラボノイド類は、上皮細胞内シグナル系を修飾してTJバリア機能を高めることが証明され、消化管バリア機能の破たとそれに係る疾病を予防・

改善する機能が強く期待される。本研究は、精神的ストレスが誘導する消化管バリア機能の破たん、それに続く消化管の炎症に対する、フラボノイドの軽減作用とその分子機序を探ることを目的とし、以下の研究を実施した。

- (1) 消化管 TJ バリア機能活性作用を有するポリフェノールのスクリーニング
- (2) 精神的ストレスモデル動物における消化管の TJ バリア機能の破たん、炎症を軽減するフラボノイドの探索
- (3) ストレスが誘導する炎症性サイトカインによる TJ バリア機能低下に対するポリフェノールの改善作用の探索

## 実験方法

### 1. 消化管 TJ バリア機能活性作用を有する ポリフェノールのスクリーニング

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞を用いて、消化管 TJ バリア機能亢進活性を有するポリフェノール類(フラボノイド類を含む)を探索した。方法として、トランズウェルシステムに培養した Caco-2 細胞の粘膜側に各種のポリフェノール類(100  $\mu$ M)を添加し、48 時間までの TJ バリア機能を評価した。ポリフェノール類として、アピゲニン、クルクミン、ミリセチン、ヘスペレチン、ケルセチン、モリンを用いた。TJ バリア機能の評価として、経上皮電気抵抗値(TER)を測定した。TJ バリア機能が強化されると、TER は上昇し、逆に TJ バリア機能が低下すると、TER が低下する。

### 2. フラボノイドによる TJ バリア機能活性作用の 分子メカニズムの探索

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞を用いて、ポリフェノール類による TJ バリア機能活性作用の分子メカニズムを探索した。方法として、トランズウェルシステムに培養した Caco-2 細胞の粘膜側に各種のポリフェノール類(100  $\mu$ M)を添加し、48 時間後に細胞抽出液から細胞骨格画分を調製した。イムノプロット法により、各

種の TJ タンパク質 (ZO-1、ZO-2、JAM-1、Occludin、Claudin-1/3/4) の細胞骨格結合量を定量した。

### 3. ストレスが引き起こす消化管バリア機能低下と 消化管炎症におよぼすポリフェノール摂取の影響

1 および 2 において、ケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンに消化管 TJ タンパク質調節作用が認められたため、拘束ストレスラットを用いて、消化管バリア機能低下と消化管炎症に対するケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンによる改善作用を探索した。Wistar 系、雄性、7 週齢のラット (日本 SLC 株式会社) を AIN-93G 準拠の基本飼料で 1 週間予備飼育した後、次の 5 群すなわち、対照群 (ストレスなし / 基本食群)、ストレス / 基本食群、ストレス / ケルセチン食群、ストレス / ヘスペレチン群、ストレス / クルクミン群に群分けした。その後、それぞれの試験食で 5 日間飼育した。ポリフェノール添加量は 0.3% とし、飼料および水は自由摂取とした。試験期間

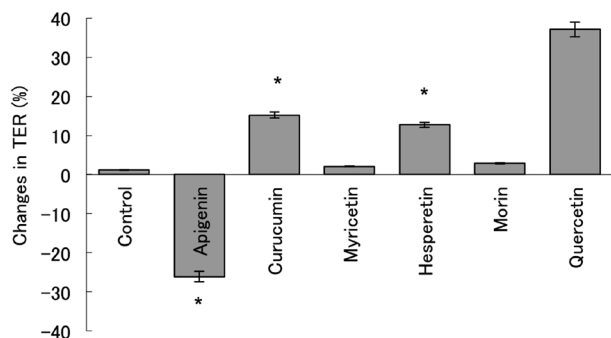


図1 消化管上皮 Caco-2 細胞における経上皮電気抵抗値 (TER) Caco-2 細胞に各種ポリフェノールを作用させ、6 時間後の TER を測定した。平均値±標準誤差 (\*P<0.05)。

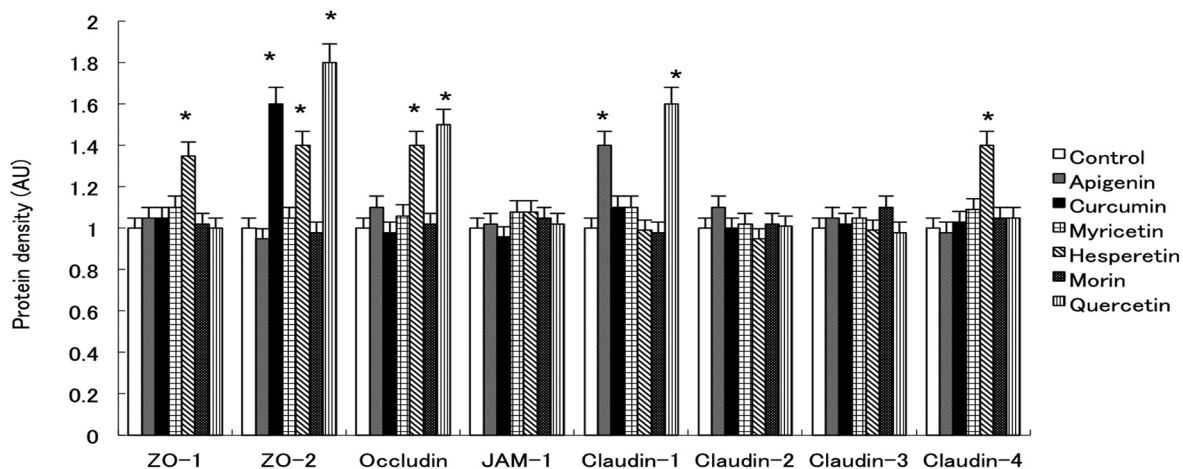


図2 消化管上皮 Caco-2 細胞における TJ タンパク質の細胞骨格結合量

Caco-2 細胞に各種ポリフェノールを作用させ、6 時間後の TJ タンパク質の細胞骨格結合量をイムノプロット法により解析した。平均値±標準誤差 (\*P<0.05)。

最終日に、ラットに 3 時間の拘束ストレスを負荷し、直ちに解剖を実施した。小腸と大腸を用いた腸管反転サック法により、消化管バリア機能を評価した (FITC- デキストラン透過速度を指標として)。消化管炎症の指標として、小腸と大腸の Myeloperoxidase (MPO) 活性を解析した。また小腸組織の Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

### 4. 炎症性サイトカインによる TJ バリア機能低下に対するポリフェノールの影響

3 において、ストレス負荷が小腸組織の TNF- $\alpha$  発現量を誘導し、ケルセチンとヘスペレチンがストレス誘導型の消化管バリア機能低下を軽減したため、消化管上皮 Caco-2 細胞において、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$ ) による TJ バリア機能低下に対する、ケルセチンとヘスペレチンの改善作用を探索した。ただし、クルクミンは大腸透過性を高めたため、本試験には含まなかった。方法として、Caco-2 細胞の粘膜側へケルセチンとヘスペレチン (~ 100  $\mu$ M) を、漿膜側へ TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) を添加後、48 時間後の TJ バリア機能 (TER) を評価した。また、イムノプロット法により TJ タンパク質の発現量を解析した。

## 結 果

### 1. 消化管 TJ バリア機能活性作用を有する フラボノイドのスクリーニング

図 1 に、Caco-2 細胞にアピゲニン、クルクミン、ミ

リセチン、ヘスペレチン、ケルセチン、モリンを作用させたときの、経上皮電気抵抗値 (TER) の変化 (6 時間後) を示した。各種ポリフェノールは、それぞれ TER に異なる影響を与えたが、ケルセチン、クルクミン、ヘスペレチンを作用させたとき、それら TER は対照群よりも高値を示し、TJ バリア機能の強化が確認された。一方で、アピゲニンを作用させた Caco-2 細胞では、TER が対照群よりも低値を示し、TJ バリア機能の低下が確認された。ミリセチンとモリンを作用させた Caco-2 細胞の TER は、対照群と大きな差は認められなかった。

## 2. フラボノイドによる TJ バリア機能活性作用の分子メカニズムの探索

ポリフェノール類 (フラボノイドを含む) による TJ バ

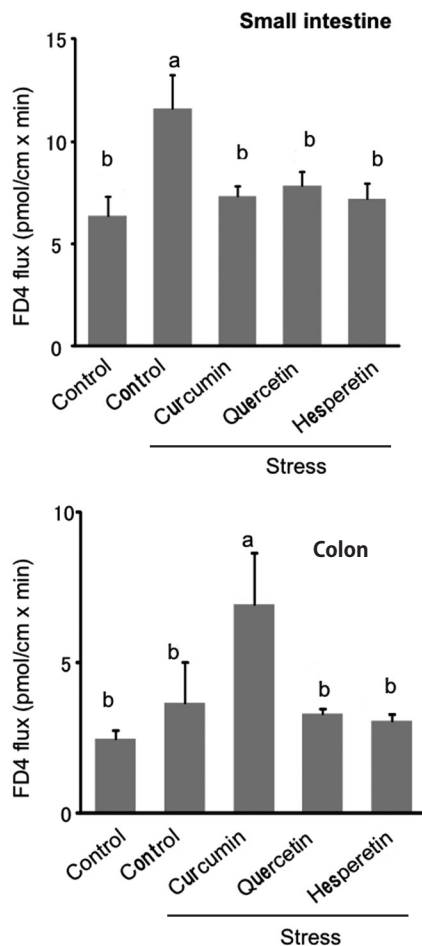


図3 ストレス負荷ラットにおける小腸、大腸の FITC- デキストラン透過性

ラットに 5 日間ポリフェノールを含む、あるいは含まない食餌を摂取させた後、3 時間の拘束ストレスを負荷した。腸管反転サック法にて、消化管透過性を評価した。平均値±標準誤差 (異なるアルファベット:  $P < 0.05$ )。

リア機能調節 (活性化を含む) の分子メカニズムを解明するため、各種 TJ タンパク質の細胞骨格結合量を解析した (図 2)。TER を増加させたケルセチンは、ZO-2、Occludin、Claudin-1、ヘスペレチンは、ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-4、クルクミンは、ZO-2 の細胞骨格結合量を増加させた。一方で、TER を低下させたアピゲニンは、Claudin-1 の細胞骨格結合量を増加させ、TER を変動させなかったミリセチンとモリンは、TJ タンパク質の細胞骨格結合量にも顕著な影響を与えなかった。

## 3. ストレスが引き起こす消化管バリア機能低下と消化管炎症におよぼすポリフェノール摂取の影響

ラットの体重、摂食量には群間差は認められなかった (データ省略)。反転サック法による消化管バリア機能の評価において、ストレス負荷は大腸のバリア機能には影響しなかったが、小腸の FITC- デキストラン透過性を上昇させ、バリア機能の低下を誘導した (図 3)。このとき、ヘスペレチン、ケルセチン、クルクミンを摂取したラットでは、ストレスが引き起こした透過性の上昇が抑制された。しかしながら、クルクミンの摂取は、大腸の透過性を上昇させた。小腸組織の TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は、ストレスにより上昇したが、ヘスペレチン、ケルセチン、クルクミンの摂取により部分的に回復した (図 4)。小腸と大腸組織の MPO 活性には群間差は認められなかった (データ省略)。

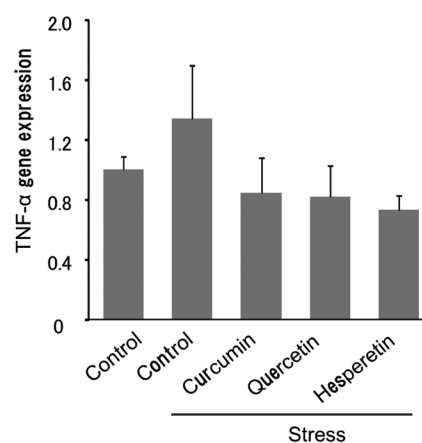


図4 ストレス負荷ラットにおける小腸の Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  mRNA 発現量

ラットに 5 日間ポリフェノールを含む、あるいは含まない食餌を摂取させた後、3 時間の拘束ストレスを負荷した。リアルタイム RT-PCR 法により、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現量を解析した。平均値±標準誤差 (異なるアルファベット:  $P < 0.05$ )。

#### 4. ストレスが誘導する炎症性サイトカインによる TJ バリア機能低下に対するポリフェノールの改善作用の探索

Caco-2 細胞において、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  刺激時にケルセチンを作用させたときの TER (48 時間後) を図 5 に示した。TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  は、Caco-2 細胞の TER を低下させ、TJ バリア機能の低下を誘導した。ケルセチンはサイトカインによる TER 低下を濃度依存的に回復したが、ヘスペレチンには回復作用は認められなかった(データ省略)。さらに、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  は TJ タンパク質 Occludin の発現量の低下を引き起こしたが、ケルセチンを作用させた Caco-2 細胞では、Occludin の減少が回復した。さらに、炎症性サイトカインの刺激にかかわ

らず、ケルセチンは Claudin-4 の発現を誘導した。

#### 考 察

ストレスが引き起こす消化管バリア機能の低下は、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患など、多くの消化器系疾患の発症や増悪に関与していることが提案されている。本研究は、ポリフェノール類が持つ消化管バリア機能調節作用に着目し、まず培養細胞を用いたバリア機能活性化作用のスクリーニングを実施し、活性の高いポリフェノールとして、ケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンを選抜した。続いて、ストレス負荷ラットにおいて、消化管バリア機能改善作用を探索したところ、ケルセチンとヘスペレチンに改善作用が確認された。さらに、培養

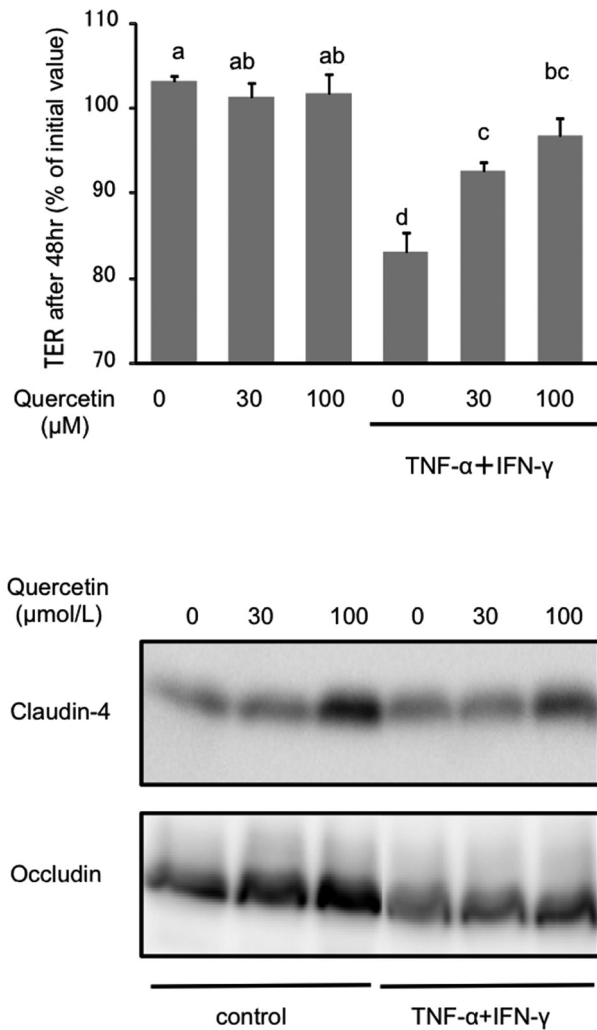


図 5 炎症性サイトカインによる消化管バリア機能低下に対するケルセチンの改善作用

消化管上皮 Caco-2 細胞の粘膜側にケルセチンを、漿膜側に TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  を作用させ、48 時間後の TJ バリア機能(経上皮電気抵抗値: TER) と TJ タンパク質発現量 (Occludin と Claudin-4) を解析した。平均値 $\pm$ 標準誤差 (異なるアルファベット:  $P < 0.05$ )。

細胞において炎症性サイトカインが引き起こす消化管バリア機能破綻に対するヘスペレチンとケルセチンの作用を探索したところ、ケルセチンに改善作用が観察された。また、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  による Caco-2 細胞の TJ バリア機能の低下を軽減したのはケルセチンのみであったが、これらの結果は、ケルセチンとヘスペレチンが消化管バリア機能の低下や攪乱によって引き起こされる各種疾病を予防・軽減する可能性を示唆するものである。

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞を用いた試験において、様々なポリフェノール類が TJ バリア機能を修飾（調節）することが示唆された。なかでもケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンは、TJ バリア機能を顕著に強化する作用が認められ、消化管バリア機能の低下によって引き起こされる疾病に対する予防・軽減作用が期待できることが提案された。TJ 透過性は、複数の TJ タンパク質の機能・局在によって総合的に決定される。この TJ タンパク質複合体はアクチン細胞骨格に結合して機能することが知られ、過去の報告によれば、その細胞骨格結合量が TJ バリア機能・透過性を強く反映する（図 5）。ケルセチンは、ZO-2、Occludin、Claudin-1、ヘスペレチンは、ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-4、クルクミンは、ZO-2 の細胞骨格結合量を増加させ、これら TJ タンパク質の局在変化がバリア機能強化の要因であることが示された。膜貫通型タンパク質の Occludin と Claudin は、TJ バリア（透過性）を決定する重要な分子の 1 つであり、裏打ちタンパク質である ZO-1、ZO-2 は、TJ 複合体をアクチン細胞骨格に安定的に結合させたり、適切に局在させるのに重要な役割を持つことが知られている。一方で、アピゲニンは TER を減少させて、TJ バリア機能を低下させたが、Claudin-1 の細胞骨格結合量を高めた。これは、やや矛盾的な結果を示すものであり、アピゲニンの作用についてはさらなる試験による解明が必要であると考えられた。

Caco-2 細胞におけるスクリーニング試験の結果から、TJ バリア機能活性化作用を示したケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンを選抜し、ストレス負荷ラットにおいて、疾病改善作用を確認したところ、ケルセチンとヘスペレチンがストレス誘導型の小腸バリア機能低下を部分的に改善し、これらが動物個体においても消化管 TJ バリア機能を保護・強化することが示された。同時に、ケルセチンとヘスペレチンは、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の発現量を低下させ、ストレスによるバリア機能低下によって引き起こされる消化管炎症も抑制すること

が示された。

また、Caco-2 細胞において、ケルセチンは TNF- $\alpha$  による TJ バリア機能低下を改善し、これがケルセチンによるバリア機能保護作用のメカニズムの 1 つであることが提案された。一方で、ヘスペレチンは TNF- $\alpha$  による TJ バリア機能低下を軽減せず、バリア機能保護作用においてケルセチンとは異なる作用を持つことが示された。

本研究は、様々なポリフェノール類に消化管バリア機能を調節する機能があることを明らかにした。その作用は、ポリフェノールの種類によって特徴的なものであり、バリア機能強化作用を示すヘスペレチンとケルセチンは、ストレス負荷ラットにおいて消化管バリア機能の低下を軽減する作用も確認された。ケルセチンとヘスペレチンには、ストレスが引き起こす消化管バリア機能の低下に関連する疾患を予防・軽減する機能性食品成分への応用が期待できると提案されるが、その作用メカニズムの詳細の解明にはさらなる研究が必要である。また、他のポリフェノール類についても、消化管バリア機能調節作用を通じた有益な効果が期待できると考えられる。

## 要 約

消化管は、管腔内の異物を体内に侵入させないバリア機能を持ち、そのバリア機能の低下は様々な疾患につながる事が知られている。このバリア機能の最も重要な因子の 1 つが、タイトジャンクション (TJ) 構造が知られ、TJ は上皮細胞間の物質の通過を制御する役割を持つ。本研究は、消化管上皮細胞とストレス負荷ラットを用いて、ポリフェノール類（フラボノイドを含む）のもつ消化管 TJ バリア機能強化・保護作用を探索し、その機能を基盤としたバリア機能保護食品の開発を目指した。最初に、ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞に様々なポリフェノールを作用させ、TJ バリア機能への影響を解析した。使用したポリフェノールは、TJ バリア機能へ各々特徴的な作用を示した。ケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンは、TJ バリア機能を強化し、一方でアピゲニンは TJ バリア機能を弱めた。続いて、ストレス負荷ラットを用いて、ケルセチン、ヘスペレチン、クルクミンによる消化管バリア機能の保護作用を探索した。ストレスは、小腸透過性と炎症性サイトカイン Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  遺伝子発現の上昇を誘導した。3 種のポリフェノール摂取は、これらの異常を部分的に回復し、消化管バリア機能保護作用と炎症軽減作用を示した。ま

た Caco-2 細胞において、ケルセチンは TNF- $\alpha$  による TJ バリア機能低下を回復した。これら結果は、ケルセチンやヘスペレチンがストレスによる消化管バリア機能の低下に関連する疾患を予防・軽減する機能性食品成分への応用が期待できること、他のポリフェノール類についても、消化管バリア機能調節作用を通じた有益な効果が期待できることを提案するものである。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記

念財団による研究助成を賜りました。同財団関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Turner, J. R. *Nat Rev Immunol* **9**, 799-809, 2009
- 2) Gonzalez-Mariscal, L. et al. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 1-44, 2003
- 3) Suzuki, T. et al. *Br J Nutr* **100**, 297-305, 2008
- 4) Suzuki, T., and Hara, H. *J Nutr* **139**, 965-974, 2009
- 5) Rao, R. K. et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G332-340, 2000