

《様式B》

研究テーマ 「細胞間タイト結合分子を標的とした炎症性腸疾患の下痢予防食品の開発」		
研究責任者	所属機関名	岐阜薬科大学
	官職又は役職	副学長 兼 教授
	氏 名	五十里 彰 メールアドレス ikari@gifu-pu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	一丸ファルコス株式会社
	官職又は役職	研究員
	氏 名	高橋 達治、岡本 知也
共同研究者	所属機関名	湘南医療大学
	官職又は役職	教授
	氏 名	石川 吉伸
共同研究者	所属機関名	岐阜薬科大学
	官職又は役職	講師
	氏 名	吉野 雄太

(令和4年度募集) 第35回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願（予定も含む）の有無についてもご記載ください。

現代社会はストレス社会ともいわれ、ストレスに起因する炎症性腸疾患（IBD）の患者数が世界的に増加している。IBD の予防薬や根治薬は未開発であり、炎症を抑制するために 5-アミノサリチル酸製剤やステロイド製剤などを用いた対症療法が行われる。しかし、多くの患者は再燃と寛解を繰り返すために生活の質（QOL）が低い。近年、細胞間タイト結合分子のクローディン-2（CLDN2）が IBD 患者で高発現し、バリア機能の低下と下痢発症に関係することが報告され、予防・治療標的としての有用性が指摘されている。本研究では、生化学、病態生理学、分子生物学などの研究手法を用いて、CLDN2 を標的とした新タイプの IBD 予防食品の開発を検討した。

IBD の下痢予防効果をもつ機能性食品を同定するため、CLDN2 発現に対する炎症性サイトカインの影響を検討し、その阻害作用をもつ食品素材を探索した。その結果、炎症性サイトカインのインターロイキン-6（IL-6）が Stat3 のリン酸化を介して CLDN2 発現を増加させることを見出した。IL-6 は、上皮膜間電気抵抗値（TER、

電解質イオンに対するバリア機能の指標) を低下させたが、細胞間低分子透過性の指標となるルシファーアイエローの透過性を変化させなかつた。そのため、IL-6 は細胞間タイト結合の構造を維持したまま、細胞間イオン透過性を亢進することが示唆された。IL-6 による CLDN2 の発現増加に対し、食品成分 C1 (化合物名は未公開とする) が阻害効果をもつことを解明した。C1 は、IL-6 による TER の低下を阻害した。次に、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起 IBD モデルマウスを用いて、C1 の機能評価を行つた。IBD 病態の指標として、体重、便潜血、下痢症状、大腸組織の外観を評価した。その結果、2.5% DSS 投与による体重の減少、便潜血の増加、大腸組織の損傷に対し、C1 は改善効果を示さなかつた。今後、DSS や C1 の投与濃度や投与期間などの実験条件を見直し、再検証する予定である。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、 5 ページ以内)

CLDN2 発現に対する炎症性サイトカインの影響

炎症性腸疾患 (IBD) モデル動物の腸管において、クローディン-2 (CLDN2) の発現量が増加することが報告されている。炎症性サイトカインの関与が示唆されているため、正常マウス腸管由来 MCE301 細胞を用いて作用機序を検討した。炎症性サイトカインの tumor necrosis factor α (TNF α)、インターロイキン-6 (IL-6)、IL-13 を処理したところ、IL-6 により CLDN2 mRNA とタンパク質の発現が増加した (図 1)。一方、TNF α と IL-13 は CLDN2 mRNA 量を変化させなかった。蛍光免疫染色法で CLDN2 の細胞局在を調べたところ、無刺激状態で CLDN2 は細胞間タイト結合 (タイトジャンクション) の裏打ちタンパク質である ZO-1 とともに細胞の隣接部位に分布していた。IL-6 処理後に CLDN2 の緑色の蛍光強度が増大したが、CLDN2 と ZO-1 の細胞局在は変化しなかった。

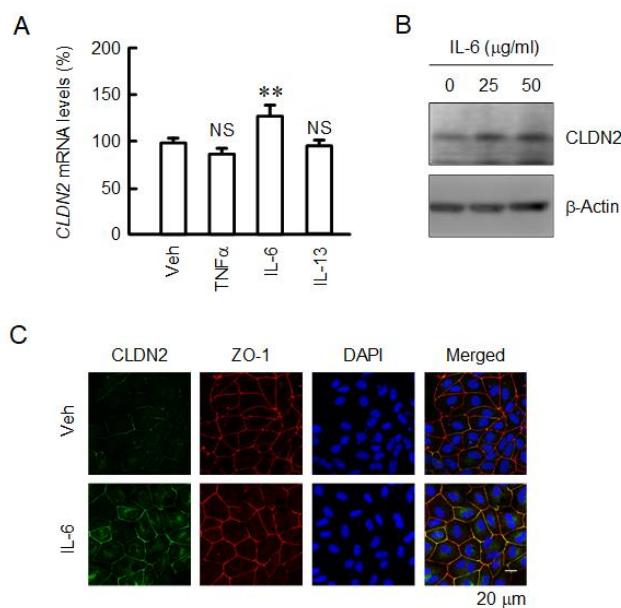


図 1 CLDN2 の発現と細胞局在に対する炎症性サイトカインの影響

(A) MCE301 細胞を TNF α 、IL-6、IL-13 で 6 時間処理後、リアルタイム PCR 法で CLDN2 mRNA 量を測定した。(B) MCE301 細胞を各濃度の IL-6 で 24 時間処理後、ウェスタンブロット法で CLDN2 タンパク質量を測定した。(C) MCE301 細胞を IL-6 で 24 時間処理後、蛍光免疫染色法で CLDN2 と ZO-1 の細胞局在を測定した。

細胞間バリア機能に対する IL-6 の影響

細胞間バリア機能を評価するため、MCE301 細胞をトランスウェルに培養し、上皮膜間電気抵抗値 (TER) と水溶性蛍光マーカーであるルシフェーイエロー (LY) の透過性を測定した。無刺激状態で $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ の TER が観察されたため、MCE301 細胞は十分な細胞間バリアを形成することが示された (図 2)。IL-6 の濃度に依存して TER が低下したため、細胞間イオン透過性が亢進することが明らかになった。一方、LY 透過性は

有意に変化しなかった。図 1 に示したように、IL-6 処理後も ZO-1 はタイトジャンクションに分布したため、IL-6 はタイトジャンクションの構造を破壊しないことが示唆された。これまでに腎尿細管上皮細胞を用いた解析において、CLDN2 は Na^+ ポアを形成することが報告されている。IL-6 による TER の低下には、CLDN2 発現と Na^+ 透過性の増加が関与することが示唆された。

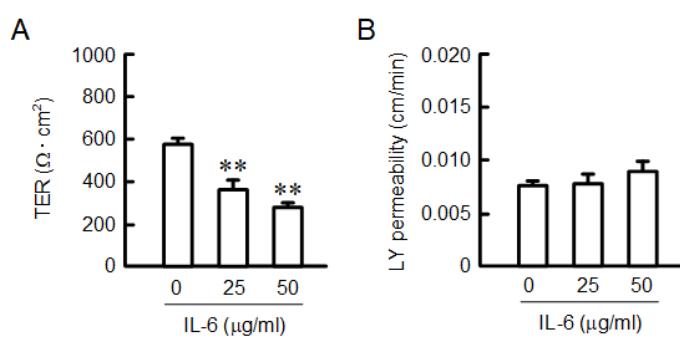


図 2 細胞間バリア機能に対する IL-6 の影響

(A) MCE301 細胞をトランスウェルに培養後、各濃度の IL-6 を 24 時間処理した。Volt ohm メーターを用いて TER を測定した。(B) トランスウェルの上層に LY 溶液を添加し、1 時間後に下層の溶液を回収した。蛍光プレートリーダーを用いて LY の蛍光強度を測定し、透過性を算出した。

IL-6 による CLDN2 の発現増加に対して阻害作用をもつ食品素材の探索

IL-6 による CLDN2 の発現増加が下痢の一因になると考えられるため、CLDN2 の発現低下作用をもつ食品素材を探索した。当研究室に所有の 10 種類程度の食品成分の効果を検討したところ、成分 C1 (化合物名は未公開とする) が IL-6 による CLDN2 mRNA 量とタンパク質量の増加を阻害した。一方、C1 処理により ZO-1 mRNA 量は変化しなかった。IL-6 は細胞内シグナル伝達因子である Stat3 のリン酸化を増加した。C1 は IL-6 による Stat3 のリン酸化を阻害したため、IL-6 受容体または Stat3 に作用することが示唆された。

細胞間バリア機能に対する C1 の影響

蛍光免疫染色法で CLDN2 と ZO-1 の細胞局在を調べたところ、IL-6 による CLDN2 の蛍光強度の増加が C1 の共処理によって阻害された。一方、ZO-1 の蛍光強度と細胞局在は C1 によって変化しなかった。また、IL-6 による TER の低下は、C1 の共処理によって阻害された。以上の結果から、IL-6 による CLDN2 の発現増加と細胞間バリア機能の低下に対し、C1 は阻害効果をもつことが示唆された。細胞間バリア機能に対する IL-6 と C1 の作用機序を、図 3 に示す。

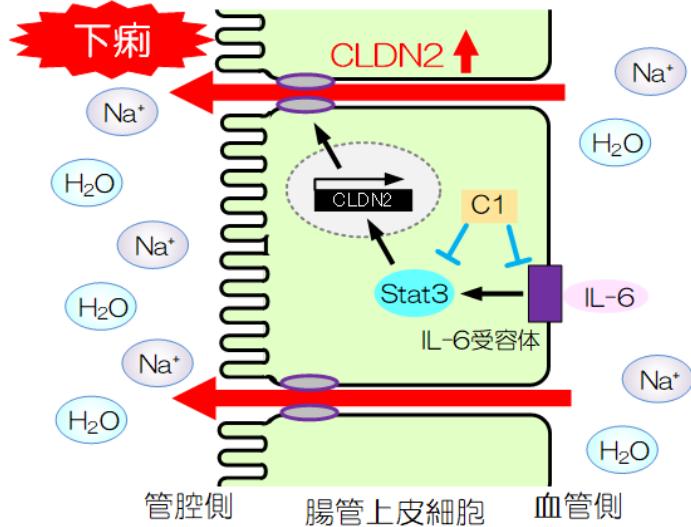


図 3 IL-6 による細胞間バリア機能の低下と C1 の効果

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起 IBD モデルマウスを用いた性状解析

C57BL/6J (雄性、8 週齢) に 2.5% DSS を飲水投与し、IBD モデルマウスを作製した。DSS 投与により、4 日目から飲水量と摂餌量の減少、5 日目から体重の減少が観察された。DSS 投与の 3 日前から C1 混合飼料を投与したところ、DSS による飲水量、摂餌量、体重の減少は改善しなかった。

大腸組織を摘出して長さを比較したところ、DSS 投与群で大腸が短縮し、この効果は C1 投与によって改善しなかった (図 4)。また、DSS 投与群で下痢症状と便潜血のスコアが増大し、これらも C1 投与によって改善しなかった。

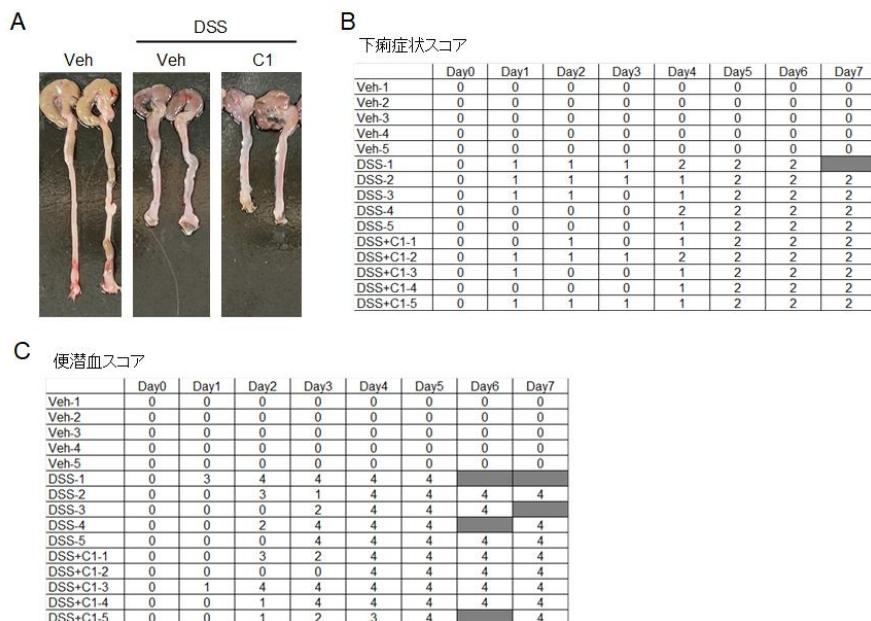


図 4 IBD の症状に対する C1 の影響

(A) マウスから大腸組織を摘出後、長さを比較した。
(B, C) 1 日に 1 回、便を回収後、下痢の程度と便潜血を評価した。

DSS 誘起 IBD モデルマウスの腸管における CLDN2 発現の変化

コントロール、DSS 投与、DSS+C1 投与マウスの腸管組織を摘出後、ヘマトキシリシ・エオジン (HE) 染色により、大腸組織の形態を観察した。コントロールマウスでは、大腸の陰窩とよばれる凹みの構造が観察された (図 5)。一方、DSS や C1 の投与群では、陰窩が破壊されていた。蛍光免疫染色法で CLDN2 と ZO-1 の局在を調べたところ、CLDN2 の蛍光は陰窩の下部で検出された。DSS 投与群では、C1 処理の有無にかかわらず CLDN2 の蛍光が消失した。ZO-1 の蛍光は陰窩の全領域で検出され、DSS 投与によって消失した。リアルタイム PCR 法で CLDN2 と ZO-1 の mRNA 量を調べたところ、両発現が DSS 投与によって減少し、C1 の投与によって改善しなかった。以上の結果から、DSS 誘起大腸炎に対し、本研究で使用した条件下の C1 では予防効果がないことが明らかになった。図 1 に示したように、IBD の炎症反応を模倣した細胞実験では CLDN2 発現が増加したため、DSS 誘起 IBD モデル動物では逆の結果になった。さらに、細胞実験では ZO-1 の発現が変化しなかったが、DSS 誘起 IBD モデル動物では発現が低下した。HE 染色における形態変化の結果も考慮すると、本実験条件では DSS 投与によりタイトジャンクションの構造が破壊されるほど、大きな障害を受けたと示唆された。

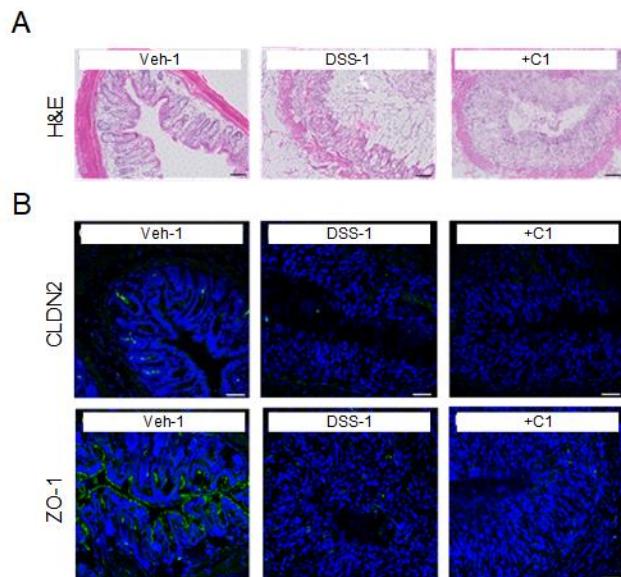


図 5 大腸の損傷と CLDN2 発現に対する DSS

と C1 の影響

(A) 大腸を摘出後、顕微鏡下で HE 染色法により陰窩の構造を調べた。(B) 蛍光免疫染色法により、CLDN2 と ZO-1 の細胞局在を解析した。

まとめ

正常マウス大腸由来 MCE301 細胞を用いた解析において、IL-6 が CLDN2 の発現増加を介して、細胞間イオン透過性を亢進することが明らかになった。IL-6 による CLDN2 の発現増加には、Stat3 の関与が示唆された。DSS 誘起 IBD モデルマウスを用いた解析に

において、DSS による下痢や陰窩の破壊に対し、C1 は改善効果を示さなかった。IBD モデル動物で C1 の効果がみられなかった原因として、DSS による組織損傷の程度が強すぎることが示唆された。今後、DSS や C1 の処理条件を最適化し、C1 による IBD 予防効果を検証することにより、CLDN2 を標的とした新たな IBD 予防食品の開発につなげていきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、多大なるご支援をいただきました一般財団法人東海産業技術振興財団様、並びに関係者の皆様には深く感謝を申し上げます。また、共同研究者の一丸ファルコス株式会社の高橋達治様、岡本知也様、湘南医療大学の石川吉伸先生、岐阜薬科大学の吉野雄太先生、MCE301 細胞を供与いただいた富山大学田渕圭章先生にも感謝申し上げます。