

卵殻膜粉末摂取による炎症性腸疾患抑制効果の 作用機構の総合的解析

東京大学総括プロジェクト機構・特任教授 加藤 久典

■ 目 的

炎症性腸疾患(IBD)は、腸管に炎症を引き起こす慢性持続性の非特異性疾患であり、潰瘍性大腸炎とクローン病に分類される。日本における IBD 患者数は増加し続けており、また厚生労働省により難病に指定され、研究が推進されている。それにも関わらず、根本的な治療法はなく対症療法にとどまり、またその副作用の存在も問題視されている。IBD の発症要因には遺伝因子のほか、粘膜免疫の機構の破綻が起り、腸内細菌や食餌などの管腔抗原に対する過剰な免疫反応が生じることなどの複数の要因が関わり合っている。

卵殻膜は、卵殻と卵白の間にある不溶性の二重膜であり、発生中の胚の保護や卵殻形成の足場としての役目を果たす。卵殻膜は古くから創傷治療に使用されていたが、近年の研究により卵殻膜粉末摂取による抗炎症作用が示唆されており、卵殻膜の抗炎症効果をもつ食品素材としての期待が高まっている。

本研究では、食品素材を用いた IBD の予防、治療法の提示および卵殻膜の抗炎症作用をもつ食品としての利用の推進を目指し、卵殻膜摂取の IBD 抑制効果の検証およびその作用機構の探索を行うことを目的とし、オミクス技術を用いることで、卵殻膜による IBD に対する効果を正確にかつ総合的に把握することを目指した。そのため、卵殻膜粉末摂取による DSS 誘導大腸炎モデルマウスの疾患抑制効果を検討し、採取した組織および血漿を用いた各種オミクス解析により卵殻膜粉末摂取の影響を網羅的に解析した。また卵殻膜粉末摂取による免疫組織の Th17 発現への影響および卵殻膜粉末が腸上皮細胞に及ぼす影響を評価した。

■ 方 法

IBD モデルマウスとしてデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導潰瘍性大腸炎モデルマウス(7 週齢の雄性 C57BL/6J)を用い、通常飼料および滅菌水道水を与える群(CON 群)、通常飼料および 1.5% DSS(M.W. 36000-50000)水を与える群(DSS 群)、卵殻膜粉末を 8% 添加した飼料および 1.5% DSS 水を与える群(D-ESM8 群)の 3 群に分けた。各飼料を 7 日間給餌した後 DSS 水投与を開始し、以後 9 日間、体重、摂食量、飲水量および大腸炎の重症度の指標である DAI をモニタリングした。なお、通常飼料は AIN-93G を基本組成とする粉末飼料とした。卵殻膜粉末添加飼料は、当研究室で以前行われた実験から算出された卵殻膜の消化率(46.2%)をもとに、吸収窒素量が同等となるよう作成した(Table 1)。動物実験は東京大学動物実験専門委員会により承認を受け、東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。

血中炎症マーカーである IL-6 および大腸の好中球の浸潤指標となる myeloperoxidase 活性値を ILISA キットを用いて測定した。種々の生体応答に対する卵殻膜粉末の作用機序解明の一端として、解剖時に採取した大腸、肝臓、血漿を用いて各種オミクス技術(トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム)を利用し、mRNA 発現、タンパク質発現、代謝物量の統合的な解析を試みた。また、全身性の免疫組織として脾臓に、また炎症局所である腸管の免疫組織として炎症性腸疾患の病態形成への関与が知られる Th17 の細胞数をフローサイトメトリにより測定した。

さらに、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用い、腸上皮細胞バリア機能への影響として、卵殻膜粉末および可溶性加水分解卵殻膜の細胞増殖への影響を評価した。すなわち、細胞を 5.0×10^3 cells/well となるように 96well プレートに播種し、2 日間培養した後、加水分解卵殻膜粉末を 1mg/mL、2mg/mL または卵殻膜粉末を 1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL となるよう添加した DMEM 培養液で 24 時間培養した。その後、LPS を 1mg/mL となるよう添加した DMEM 培養液で 24 時間培養し、10% WST-8 (Cell Counting Kit-8, DOJINDO)を含む DMEM 培養液でさらに 2 時間培養した。培養液の上清における吸光度(A450)および参照波長として 650nm における吸光度(A650)を測定し、細胞生存率を算出した。加水分解卵殻膜のタイトジャンクション構成タンパク質 Claudin-1 発現量への影響について、細胞中のタンパク質の抽出後、ウェスタンブロッティング法で測定した。なお、1 次抗体として anti-Claudin-1 antibody(mouse monoclonal)および anti-GAPDH antibody(goat polyclonal)、2 次抗体として

sheep anti-mouse IgG, Horseradish および donkey anti-goat IgG-HRP を使用した。

測定値は平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析後、Dunnett 法を用いて有意差 ($P<0.05$) を検定した。

■ 結 果

【実験動物を用いた卵殻膜の炎症性腸疾患抑制効果の検証】

卵殻膜粉末摂取により、大腸炎の重症度の指標である disease activity index (DAI) の上昇が抑制され、大腸炎の症状として観察される大腸長の短縮が軽減された。また卵殻膜粉末摂取により血中炎症マーカーである IL-6 濃度は減少し、好中球の浸潤の指標となる myeloperoxidase 活性値の上昇も抑制される傾向にあった (Fig.1)。これらの結果から卵殻膜粉末摂取は、大腸粘膜への好中球の浸潤を抑制したことが示唆された。DSS 誘導大腸炎モデルマウスの疾患症状を抑制することが示された。

【統合オミクス解析】

トランスクリプトーム解析の結果、大腸においては、各種免疫細胞の遊走を誘導するケモカインの発現が卵殻膜粉末摂取により抑制されていること、細胞外マトリクスの分解に関わる *Mmp*、*Timp* の発現変動の傾向から、卵殻膜粉末摂取により細胞外マトリクスの分解を抑制する方向に遺伝子発現が変動していることが分かった (Fig.2)。また肝臓においてはリポ多糖 (LPS) に応答する遺伝子である *Lbp* (LPS binding protein)、*Cd14* (CD14 antigen) の発現が減少していることが明らかとなった (Fig.3)。プロテオーム解析の結果、エネルギー代謝に関わるパスウェイに変動が認められ、卵殻膜粉末摂取によりミトコンドリアの電子伝達系および酸化的リン酸化に関わるタンパク質発現が増加し、また解糖系および TCA 回路が亢進していることが示唆された。メタボローム解析の結果からは、血中における TCA 回路中間体や数種のアミノ酸が卵殻膜粉末摂取により増加していること、また肝臓において TCA 回路中間体の減少傾向が示された (Fig.4)。この結果から、DSS により引き起こされた高エネルギー需要状態が、卵殻膜粉末摂取により改善されたことが示唆された。以上の結果から、卵殻膜粉末摂取は、大腸において免疫細胞遊走の抑制により炎症を軽減すること、腸上皮細胞からの肝臓への LPS 流入を抑制している可能性があること、また肝臓において電子伝達系、酸化的リン酸化や TCA 回路を亢進することが示唆された。

【脾臓および腸間膜リンパ節における Th17 発現】

IBD の発症への関与が知られる Th17 の細胞数をフローサイトメトリにより測定した結果、腸間膜リンパ節において、卵殻膜粉末摂取は Th17 の増加を抑制することが示唆された。卵殻膜粉末摂取による IL17a の発現減少の傾向が確認でき、卵殻膜粉末摂取により MLN での Th17 分化が抑制され、大腸でのサイトカイン IL17a 分泌の低減、炎症反応の抑制が起こったことが示唆された。また、腸間膜リンパ節から分離した細胞の培養上清中 IL-6 濃度の減少傾向も認められた (Fig.5)。これにより卵殻膜粉末の大腸炎抑制機構に関して MLN において Th17 分化誘導の抑制が寄与していること、およびそれが IL-6 の減少に起因する可能性があることが示唆された。なお、脾臓ではこのような効果はなかった。

【腸管上皮細胞のバリア機能に及ぼす影響の検討 *in vitro*】

細胞生存率測定の結果 (Fig.6)、LPS 添加条件において、卵殻膜粉末添加は 2mg/mL、3mg/mL において LPS 群に比べ有意に生存率を上昇させたことが示された。この結果から、卵殻膜粉末は LPS による細胞死を抑制することが示唆された。今回用いた細胞生存率の評価は、細胞の産生する NADH、NADPH による還元力を評価しており、従って生細胞数を反映している。卵殻膜粉末を添加した時点での細胞は対数増殖期にあり、LPS 非添加条件でのこの結果により、卵殻膜粉末は生存率というよりむしろ細胞増殖を促進し、傷害を受けた細胞の治癒を早める可能性が示唆された。一方、LPS 刺激後の Claudin-1 発現量は加水分解卵殻膜の影響は認められなかった。

卵殻膜粉末が細胞増殖を促進したことにに関して、これは動物実験において観察された大腸炎症状の抑制に寄与しているのではないかと考えられた。トランスクリプトーム解析結果から、腸上皮において LPS 流入が抑制された可能性が示唆されたが、これは、卵殻膜が腸管上皮細胞において細胞増殖を促進することで腸管腔からの細菌等異物の侵入を軽減し、また腸管に引き起こされた潰瘍の治癒を早め、疾患の改善に寄与している可能性があると考えられた。

卵殻膜の細胞増殖促進作用には、コラーゲン由来ペプチドの関与が考えられる。コラーゲン分解

産物には Proline-Hydroxyproline、Proline-Hydroxyproline-Glycine をはじめとするペプチドが多く認められ、特にコラーゲンペプチド摂取後の血中 Proline-Hydroxyproline ジペプチドは顕著に増加することが報告されている¹⁾。またこのジペプチドに関して、線維芽細胞の細胞増殖を促進することが報告されている²⁾。本実験において、卵殻膜は腸管上皮細胞 Caco-2 の細胞増殖を促進することが示され、また加水分解卵殻膜では細胞生存率に対する影響が見られなかったことから、この細胞増殖の促進作用は、卵殻膜中のタンパク質あるいはペプチドによるものであることが示唆された。

■ 要 約

卵殻膜粉末摂取による大腸炎症状の抑制効果が示され、その作用機構として、腸上皮細胞増殖の促進等による抗原流入の低減と大腸におけるケモカイン遺伝子発現の減少による免疫反応の抑制や、それに伴う腸間膜リンパ節の Th17 発現減少、また肝臓におけるエネルギー産生活動の亢進が関与していることが示唆された。

本研究により、卵殻膜による IBD 予防、治療の可能性を提示することができた。卵殻膜による IBD の予防および治療は、副作用がないと考えられるため、患者の QOL を上げ、また医療費の削減にもつながると考えられる。加えて卵殻膜は、食品業界では卵製品の製造過程で生じる産業廃棄物であることから、その利用の推進は環境問題対策にもつながることが期待される。

■ 文 献

1. Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005, 53(16):6531-6536.
2. Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, et al. Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 57(2):444-449.

Table.1 Diet composition

% (w/w)	Control diet	8% ESM diet
Casein	20.0	16.3
β -corn starch	39.8	35.4
α -corn starch	13.2	13.2
Soybean oil	10.3	10.3
Sucrose	7.0	7.0
Cellulose	5.0	5.0
Vitamin mixture (AIN93G-MX)	3.5	3.5
Mineral mixture (AIN93G-MX)	1.0	1.0
L-cystine	0.30	0.30
ESM powder	0.0	8.0

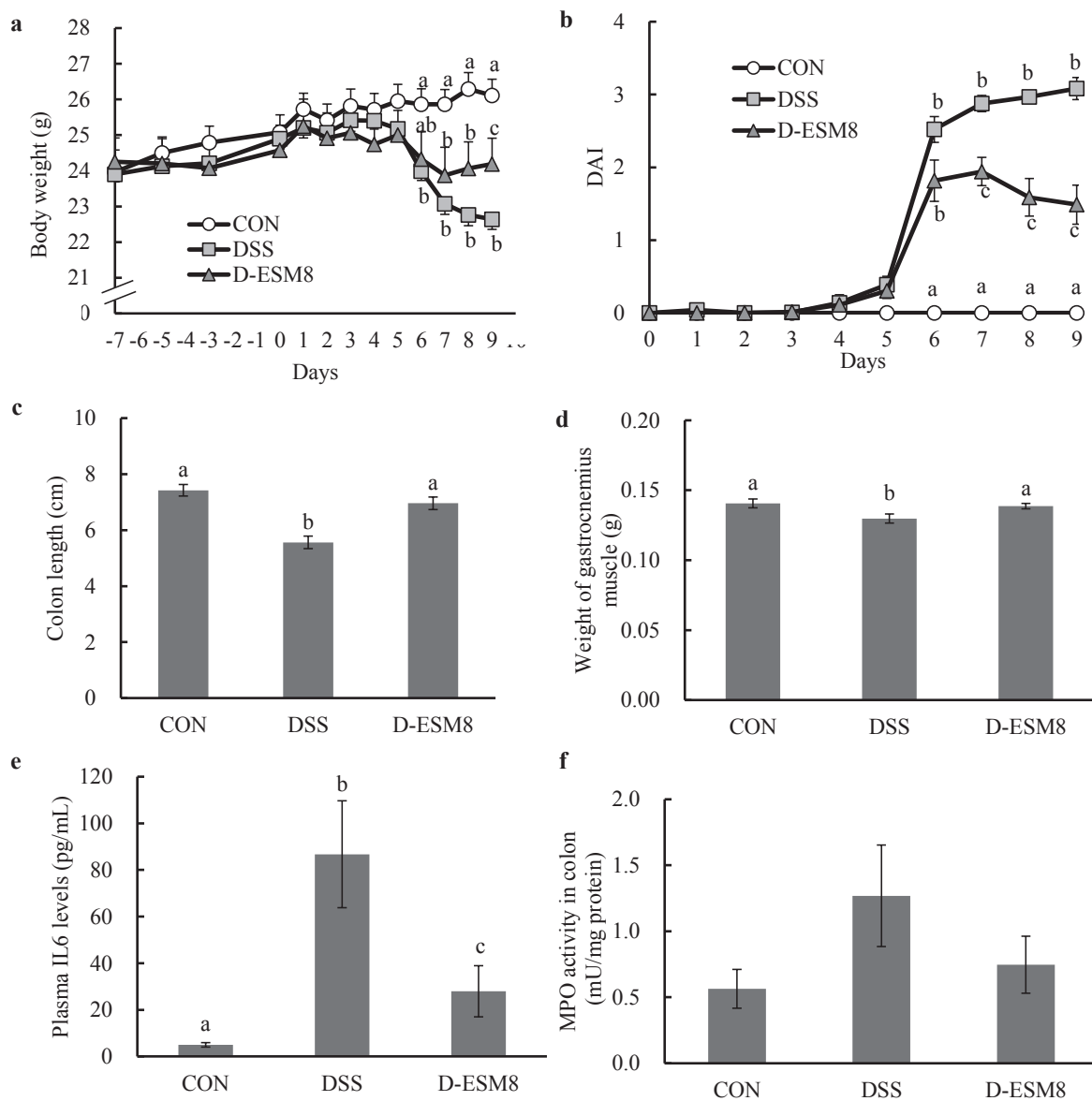


Fig.1 卵殻膜粉末の摂取による DSS 誘導した大腸炎の抑制効果

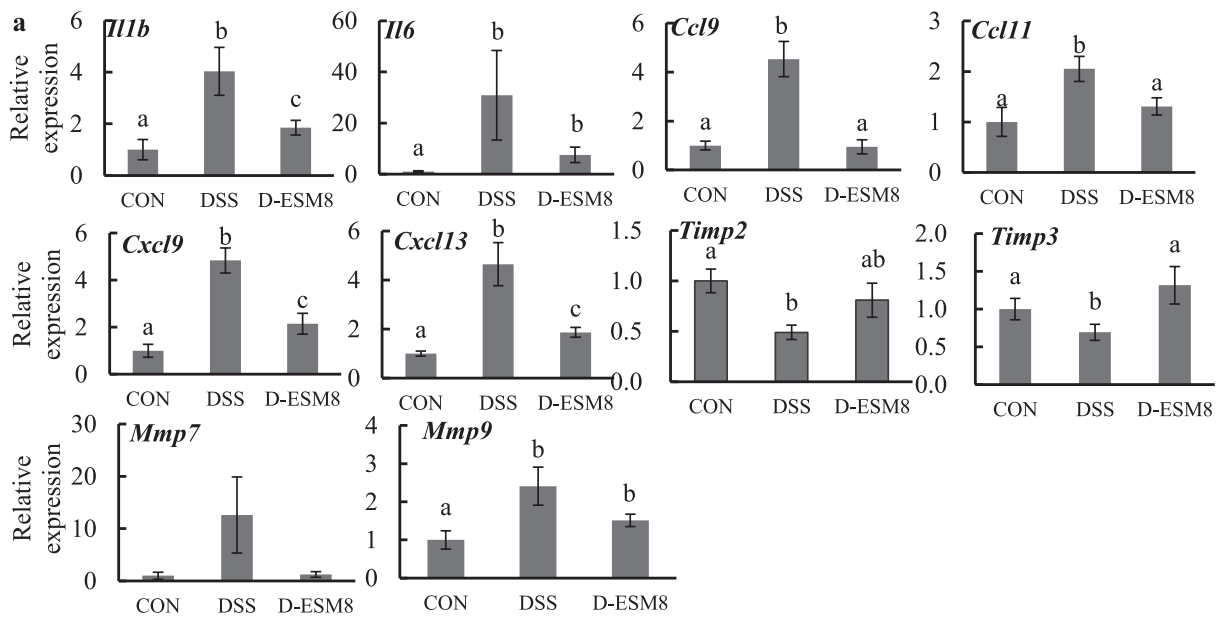


Fig.2 大腸における遺伝子発現の変化

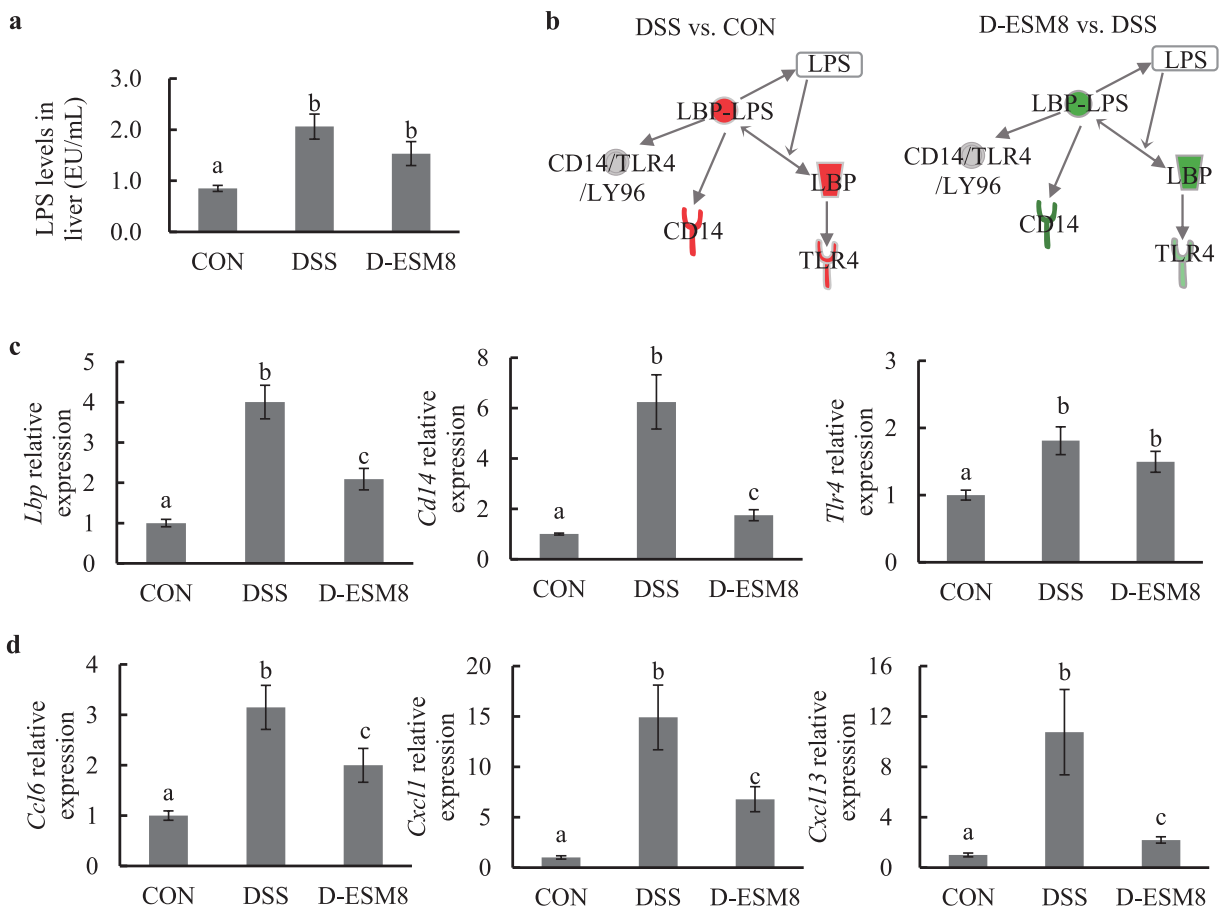


Fig.3 肝臓における遺伝子の変化

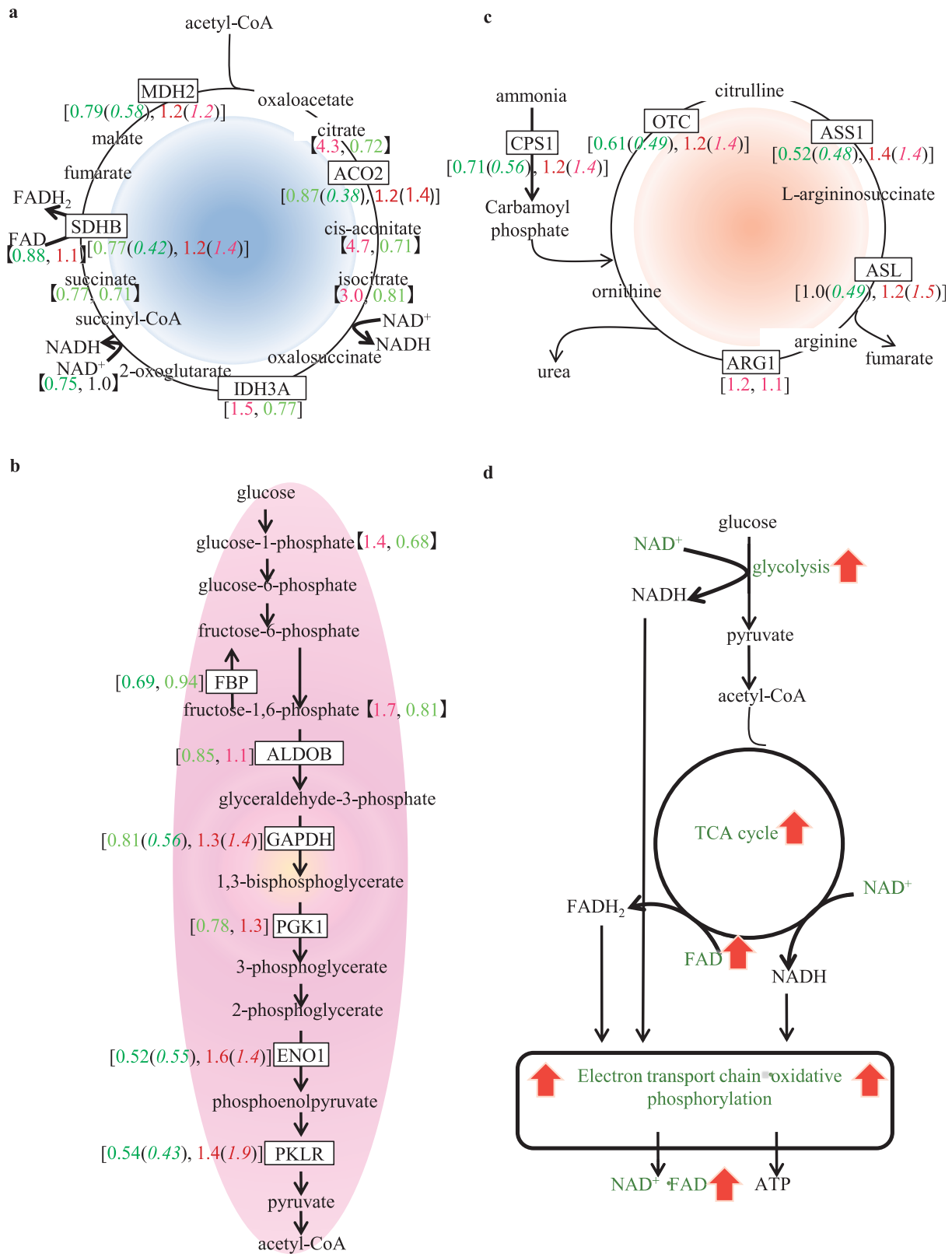


Fig. 4 統合オミクス解析によるエネルギー代謝に及ぼす影響

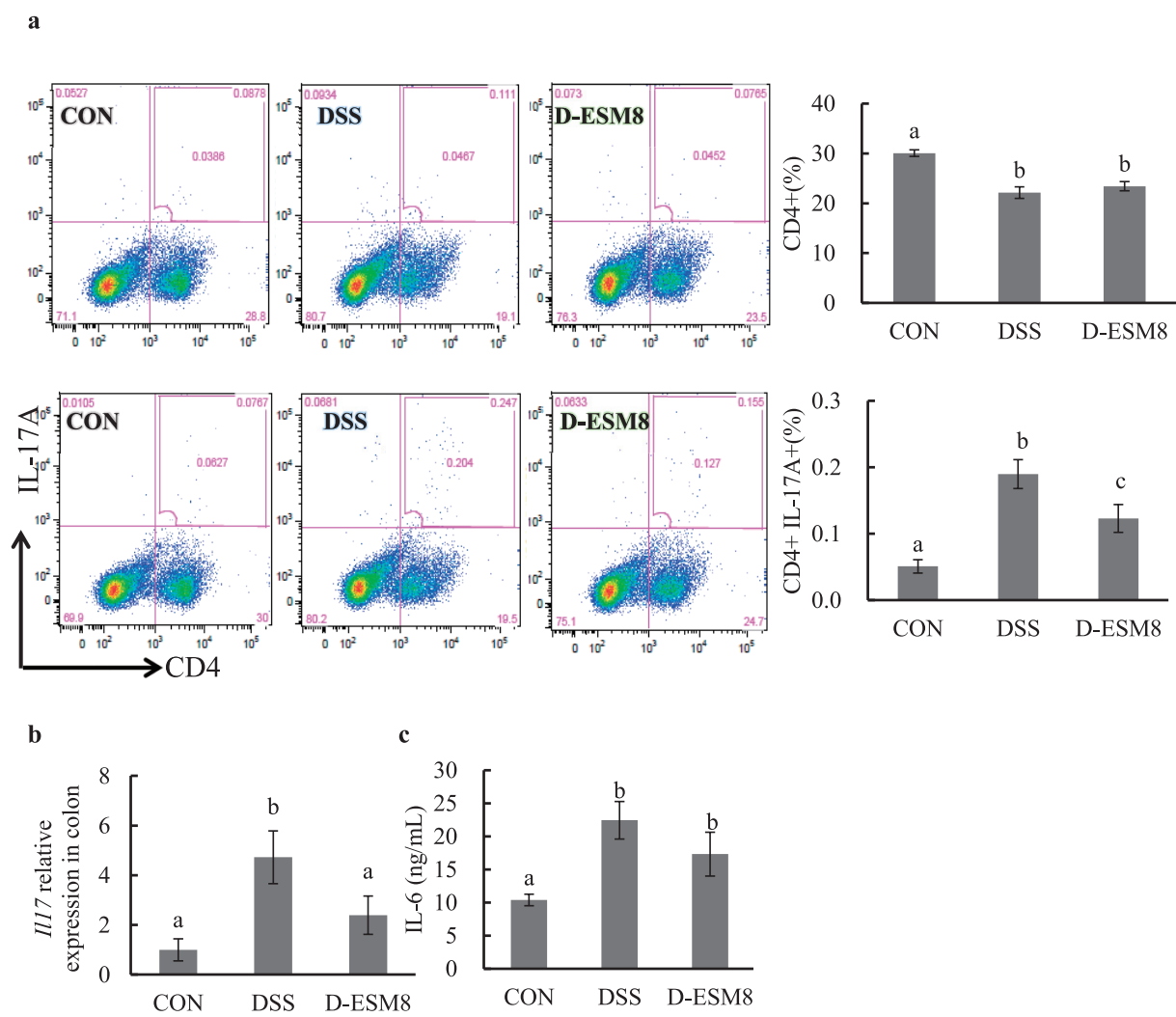


Fig. 5 腸間膜リンパ節における Th17 細胞数の変化

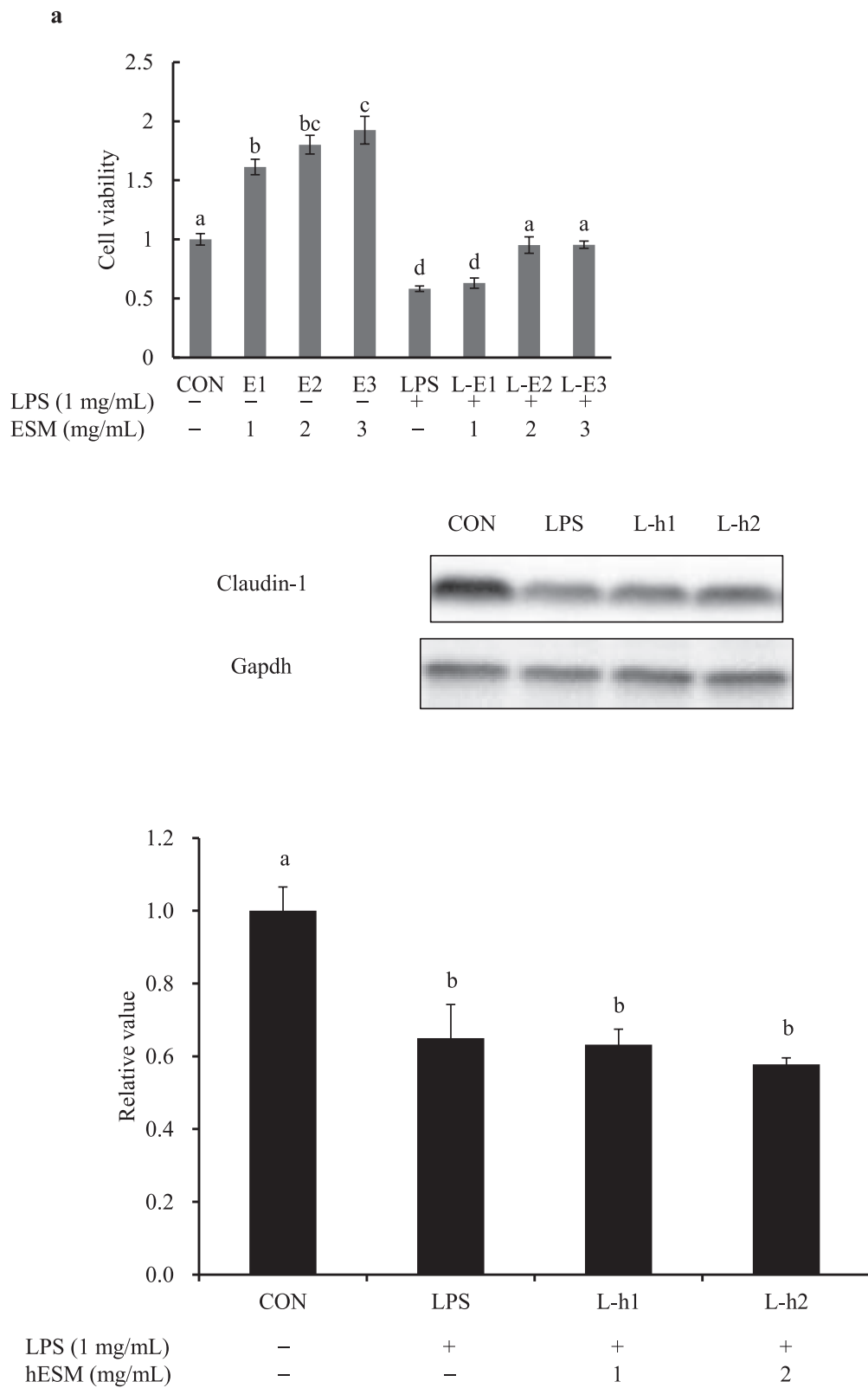


Fig.6 Caco-2 細胞における生存率および Claudin-1 発現の変化