

卵殻膜ペプチドの抗炎症作用の腸管炎症に対する効果の解析

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科・教授 高橋 信之

■ 緒 言

メタボリックシンドロームの要因である糖尿病や脂質異常症の発症には糖質や脂質の代謝異常が関与するが、そのような代謝異常の惹起には、肥満などに伴う慢性炎症が寄与していることが知られている。そのため申請者は、これまでに抗炎症作用を有する食品成分の同定と代謝異常に対するそれら食品成分の機能解析を行ってきた。昨年度の本研究助成課題において、卵加工品製造過程で廃棄となる卵殻に付着する卵殻膜タンパク質由来のペプチドに着目し、その卵殻膜ペプチドに抗炎症作用があることを明らかにした。しかし、活性ペプチドの同定までには至らなかったため、卵殻膜ペプチドが抗炎症作用を保持したまま生体内に吸収されるのかを明らかにすることができなかった。

そこで本申請研究では、ペプチドが活性を保持したまま吸収されなくても抗炎症作用を示すことが想定される腸管上皮細胞における炎症を卵殻膜ペプチドが抑えうるかどうかを、新しい評価系を構築することで明らかにすることを目的とする。加えて、腸管上皮細胞初代培養である腸管オルガノイドを平面培養した培養系を用いて、炎症により変化する腸管上皮細胞間の透過性を評価し、近年、注目されているリーキーガット症候群に対する卵殻膜ペプチドの効果を検討する。さらに昨年度に引き続き、卵殻膜ペプチドの抗炎症作用を持つ活性ペプチドの同定も試みる。

■ 方 法

1. 腸管上皮培養細胞を用いた抗炎症作用評価系の確立

まず、炎症反応で活性化される転写因子 NF- κ B の応答配列の下流にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼをつなげたレポータープラスミドを腸管上皮由来の培養細胞株 IEC-6 細胞に安定導入し、レポーター細胞を構築する。次に、このレポーター細胞を用いて、炎症誘導物質である LPS 添加などの炎症刺激を行なった際にルシフェラーゼの活性が上昇する実験条件を確立する。このとき、LPS 添加によって上昇したルシフェラーゼ活性を抑えることをもって抗炎症作用とする。

本申請研究の計画段階では、IEC-6 レポーター細胞を用いた抗炎症作用の評価の後、腸管上皮幹細胞から作製する腸管オルガノイドをトランスウェルで平面培養し、頂端膜側の培地に LPS を加えることで基底膜側の培地にどの程度 LPS が透過するかを、LPS 刺激で活性化される NF- κ B の活性を評価できるレポータープラスミドを安定導入したマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を基底膜側で共培養しておき、ルシフェラーゼ活性を定量することで評価する予定であった(図 1A)。しかし、腸管オルガノイドの培養が高コストであること、ならびにトランスウェルを用いた腸管上皮細胞とマクロファージの共培養が想定以上に手間がかかることが判明したため、研究計画を次のように変更した(図 1B)。

まず、腸管オルガノイド平面培養と同様に、バリア機能を有するヒト結腸癌由来の腸管上皮細胞モデルである Caco-2 細胞を用いて、LPS による炎症反応を評価するための条件検討を行う。条件が確定された後、腸管オルガノイド平面培養系を用いて、Caco-2 細胞と同様の条件で、卵殻膜ペプチドの抗炎症反応を評価する。また炎症反応の評価は、基底膜側で共培養したマクロファージ RAW264.7 の NF- κ B レポーター細胞を用いるのではなく、LPS の頂端膜側から基底膜側への透過量を反映すると考えられる腸管上皮組織の透過性の指標である、経上皮電気抵抗値(TEER)の測定によるものとした。TEER は、専用の電極付測定装置を用いて、トランスウェルの頂端膜側と基底膜側との間で生じる電気抵抗値である(図 2)。この TEER の値が高いほどタイトジャンクションによるバリア機能が高く、一方、腸管上皮細胞で炎症反応が起こると、タイトジャンクションの機能が阻害され、リーキーガット状態となり、TEER が低下する。したがって、TEER を測定することで、腸管上皮細胞での炎症反応、ならびにリーキーガット状態を評価することができる。

具体的には、Caco-2 細胞をトランスウェルで培養し、コンフルエントになった後、さらに 2 週間培養することで、吸収上皮細胞へと分化させ、タイトジャンクションの形成を誘導する。その後、TEER 測定装置の 2 つの電極を、トランスウェルの頂端膜側と基底膜側それぞれの培地に挿入し、Caco-2 細胞が形成するタイトジャンクションを介した電気抵抗値(TEER)を測定する。このとき、頂

端膜側もしくは基底膜側のいずれかに、炎症誘導剤である LPS ならびに卵殻膜ペプチドを添加し、LPS による炎症反応で TEER が低下するか、そしてその低下を卵殻膜ペプチドが回復させるかを検討する。

2. 腸管オルガノイド平面培養を用いた抗炎症作用評価系の確立

上記 Caco-2 細胞を用いた評価系を構築した後、Caco-2 細胞の代わりにマウス腸管上皮組織から調製したオルガノイドを用いて、平面培養を行う。この腸管オルガノイド平面培養系については、同じ学科に所属する岩槻健教授のサポートを受けて実施する。腸管オルガノイド平面培養系において、上記 Caco-2 細胞を用いた評価系と同様の条件で、LPS による炎症反応に対する卵殻膜ペプチドの抗炎症作用を評価する。

3. 卵殻膜ペプチドサンプル中の活性ペプチドの同定

卵殻膜ペプチドサンプルを HPLC で分画し、各分画の抗炎症作用を NF- κ B レポーター RAW 細胞で評価する。活性画分を MALDI-TOF/MS で分析し、活性ペプチドを同定する。

■ 結 果

1. 腸管上皮培養細胞を用いた抗炎症作用評価系の確立

まず、腸管上皮由来 IEC-6 細胞に、NF- κ B 応答配列の下流にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼをつなげたレポータープラスミドをトランスフェクションし、薬剤選択を行うことで、安定導入した細胞を構築した。次に、このレポーター細胞を用いて、炎症誘導物質である LPS 添加などの炎症刺激を行なった際にルシフェラーゼの活性が上昇する実験条件を確立する。このとき、LPS 添加によって上昇したルシフェラーゼ活性を抑えることをもって抗炎症作用とする。ルシフェラーゼアッセイの条件検討と並行して、卵殻膜ペプチドの IEC-6 細胞に対する毒性試験を行い、アッセイに用いる卵殻膜ペプチドの濃度を決定した。毒性試験の結果、2,000 mg/ μ L (2 mg/mL) 以下では細胞毒性が認められないことから、その濃度以下でルシフェラーゼアッセイを行った結果、卵殻膜ペプチドは、濃度依存的に LPS による NF- κ B 活性化を抑制し、抗炎症作用を持つことが示唆された(図 3)。そこで実際に、卵殻膜ペプチドが IEC-6 細胞での炎症を抑えるかどうか確認するため、LPS により誘導される炎症性サイトカインの mRNA 発現を定量的 PCR 法にて検討した。その結果、卵殻膜ペプチドは、LPS により増加した炎症性サイトカインの mRNA 発現を抑制することが明らかとなった(図 4)。これらの結果より、卵殻膜ペプチドは、昨年度の助成研究で示したマクロファージだけでなく、腸管上皮細胞でも炎症を抑える抗炎症作用を持つことが示された。

次に、炎症による TEER 低下に対する卵殻膜ペプチドの作用を検討するため、Caco-2 細胞を用いて、実験条件の検討を行った。初めに、LPS を頂端膜側の培地に加えて、経時的に TEER を測定したが、TEER の低下が認められなかった(データ未記載)。そこで、LPS を基底膜側の培地に加えたところ、12～24 時間添加することで TEER の有意な低下が認められた。そこで、卵殻膜ペプチド(500 μ g/mL)を LPS と同時に基底膜側へ添加したところ、LPS による TEER の低下が回復した(図 5A)。実際に、LPS 添加により、タイトジャンクションの機能低下が起こった結果、リーキーガット状態を回復させるかどうか検討するため、蛍光ラベルされたデキストランの透過量を測定した。この蛍光デキストランは、デキストランそのものの分子量を調整することで、頂端膜側に添加しても、正常なバリア機能を発揮している条件下では基底膜側へ透過しないが、リーキーガット状態になると基底膜側へ透過するという性質がある。そこで、TEER 測定実験と同様の条件下で、蛍光デキストランを頂端膜側の培地に添加し、24 時間後に基底膜側の培地の蛍光強度を測定すると、増加傾向が認められたが、卵殻膜ペプチド(500 μ g/mL)を LPS と共添加しておくと、その増加が消失した(図 5B)。以上の結果より、卵殻膜ペプチドは、炎症により誘導されるリーキーガット状態を回復させる作用を有することが示された。

2. 腸管オルガノイド平面培養を用いた抗炎症作用評価系の確立

Caco-2 細胞を用いて、卵殻膜ペプチドがリーキーガット状態を回復しうることが明らかとなったため、より生体に近い性質を維持している腸管オルガノイド平面培養を用いて、同様の検討を行った。まず、マウス腸管オルガノイドの平面培養系を構築する必要があるが、これについては、同じ東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科の岩槻健教授に技術供与してもらい、腸管オルガノイド平面培養系を研究室にて起ち上げた。その上で、TEER や蛍光デキストラン透過量の測定が可能な実験条件を検討し、Caco-2 細胞と同様の実験を行った。

その結果、腸管オルガノイド平面培養系においても、LPS 添加により TEER は低下し、その低下は卵殻膜ペプチドの共添加によって回復した(図 6B)。また、同じ条件下で、蛍光デキストランを頂端膜

側の培地に添加し、基底膜側の培地への透過量を蛍光強度によって測定したところ、LPS 添加で増加傾向を示した蛍光強度が、卵殻膜ペプチドの共添加によって減少した(図 6B)。以上の結果より、卵殻膜ペプチドのリーキーガット状態回復作用は、Caco-2 細胞だけでなく、より生体に近い性質を有する腸管オルガノイド平面培養系においても認められた。

3. 卵殻膜ペプチドサンプル中の活性ペプチドの同定

昨年度の助成研究で行った、卵殻膜ペプチドの HPLC による分画を引き続き実施した。しかし、分画後の画分に認められる抗炎症作用が、分画前の卵殻膜ペプチドサンプルに比べて、きわめて弱く、複数の HPLC 条件を試みても同様であったため、再分画するステップまで進めることが出来なかった。

■ 考 察

IEC-6 細胞を用いた実験(図 3 および 4)において、LPS 刺激による NF- κ B 活性化および炎症性サイトカインの発現誘導を卵殻膜ペプチドが抑制したため、卵殻膜ペプチドには、昨年度の助成研究で示したマクロファージでの炎症を抑えるだけでなく、腸管上皮細胞での炎症も抑えるという抗炎症作用があることが示された。腸管上皮組織は、腸内細菌や食物分子といった異物に常にさらされており、免疫学的に重要な境界領域となっている。そのため、腸管上皮組織での過度な炎症反応は、様々な機能障害をもたらすことが知られており、その点において、卵殻膜ペプチドが腸管上皮細胞での炎症反応を抑えることができるという事実は、卵殻膜ペプチドの生体への応用を考える際に大きな意義があると思われる。

また、Caco-2 細胞や腸管オルガノイド平面培養系を用いた実験(図 5 および 6)において、LPS 刺激による TEER の低下や傾向デキストランの透過量増加が、卵殻膜ペプチドの共添加によって、回復することが示された。炎症反応により生じる腸管上皮組織の機能阻害の中でも、タイトジャンクションの機能阻害に起因するリーキーガット状態の誘導は、生物学的にも臨床的にも重要である。なぜなら、このリーキーガット状態が引き起こされると、通常は腸管上皮組織を透過しない LPS のような炎症誘導物質が基底膜側へ移行し、腸管炎症をさらに増悪化すると考えられるため、いかにリーキーガット状態を予防し回復させるかが、様々な疾病の発症に関わるからである。卵殻膜ペプチドの添加により、TEER 低下や蛍光デキストラン透過性増加が正常値に回復したことは、卵殻膜ペプチドが生体内でリーキーガット状態を回復させることができることを意味しており、卵殻膜ペプチドの臨床的な応用の可能性を示唆している。ただし、本研究では、LPS を腸管上皮細胞層の頂端膜側に添加してもリーキーガット状態を再現することができず、基底膜側に添加して実験を行った。そのため、何らかの原因でリーキーガット状態が起こり、その結果、基底膜側へ移行した LPS によるリーキーガット状態の「増悪化」に対する作用を検討したこととなる。現在、予備的検討において、長鎖飽和脂肪酸であり、食用油に多く含まれているパルミチン酸を頂端膜側に添加することで、リーキーガット状態が惹起され、頂端膜側に同時に添加した LPS が基底膜側へと移行する結果を得ている。この結果は、高脂肪食を摂取することで腸管炎症が惹起され、リーキーガット状態になるという多くの報告と整合性があり、パルミチン酸がリーキーガットのトリガー因子であることを示唆している。今後、そのようなリーキーガット状態惹起のトリガー因子を含めた実験条件を確定し、卵殻膜ペプチドの抗炎症作用を評価する必要がある。

最後に、卵殻膜ペプチドの活性分子の同定について、昨年度の助成研究から引き続き、HPLC 分画法を用いて試みたものの、同定に至らなかった。当初、ペプチドの分離・分析は、手法的に確立されており、当研究室においても比較的、容易に行うことが出来ると考えていたが、今後は、ペプチド分析などを専門に行っている研究室と共同研究することで、同定を試みる必要があると考えられる。

■ 要 約

本研究において、卵殻膜ペプチドには、マクロファージでの炎症反応だけでなく、腸管上皮細胞での炎症反応も抑える抗炎症作用があることが明らかとなった。また腸管炎症により惹起されるリーキーガット状態を回復させる作用も見出された。今後、リーキーガット状態の評価系をさらに改良し、どのようなメカニズムで卵殻膜ペプチドが腸管炎症ならびにリーキーガット状態を改善するのかを明らかにすることが期待される。

図1A 計画段階での評価系

図1B 実際に構築した評価系

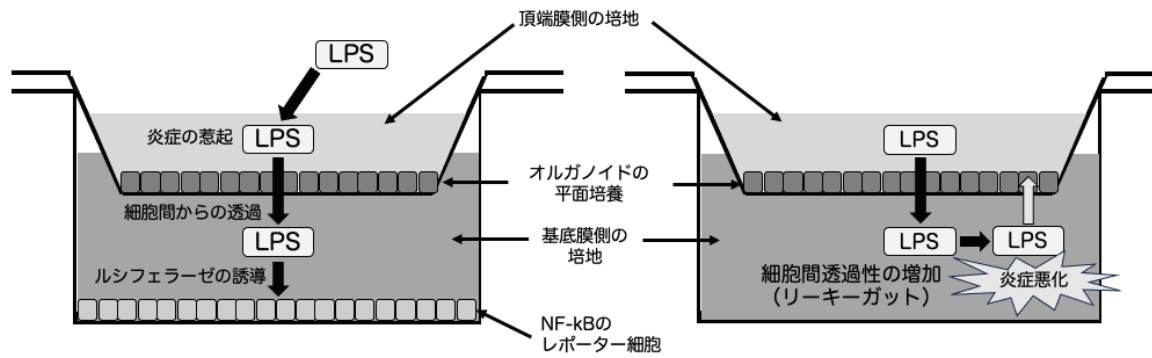


図1 腸管上皮細胞を用いた抗炎症作用評価系の確立

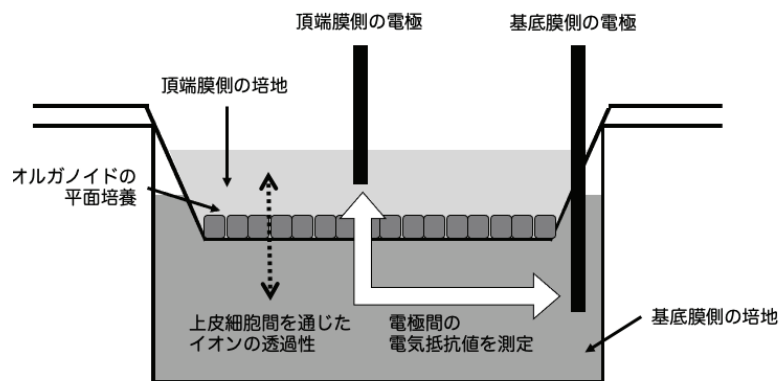


図2 経上皮電気抵抗値 (TEER) の測定原理

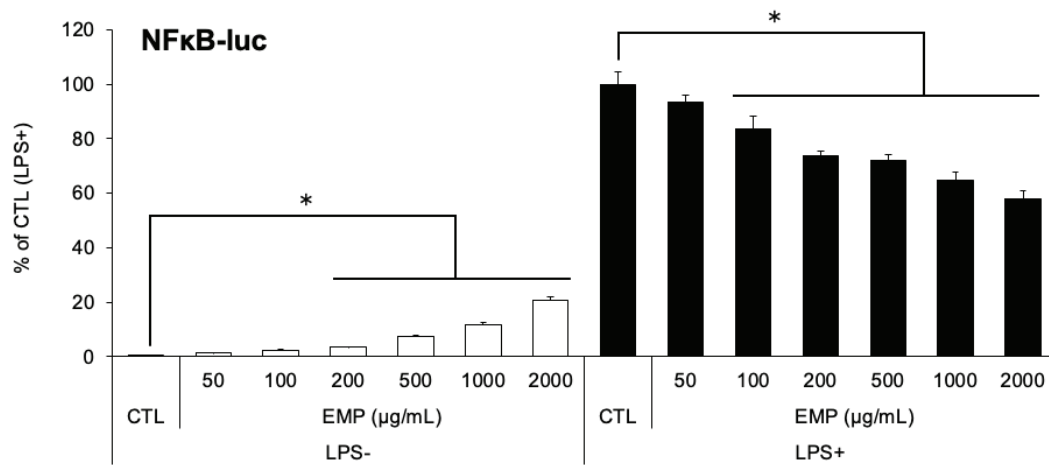


図3 IEC-6/NFκB-lucレポータ細胞を用いた卵殻膜ペプチド（EMP）の抗炎症作用の評価

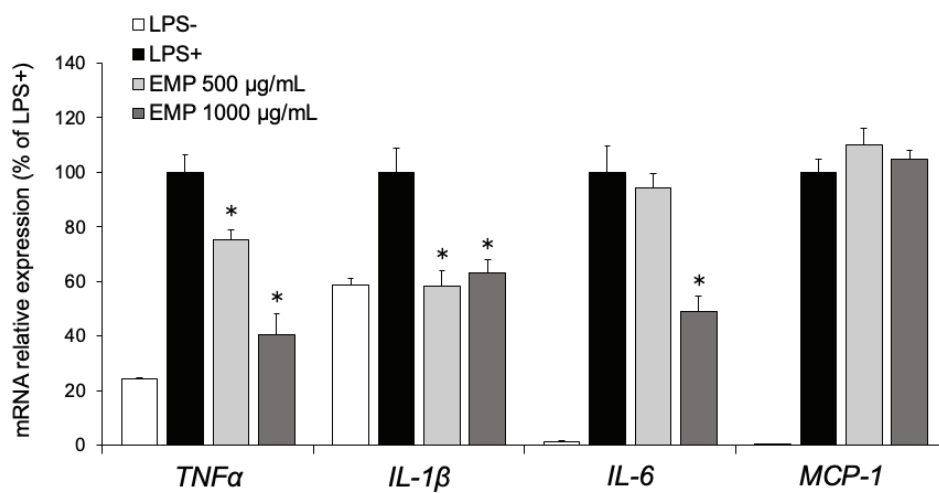


図4 IEC-6細胞における炎症性サイトカインmRNA発現を指標とした卵殻膜ペプチド（EMP）の抗炎症作用の評価

図5A 経上皮電気抵抗値 (Caco-2細胞)

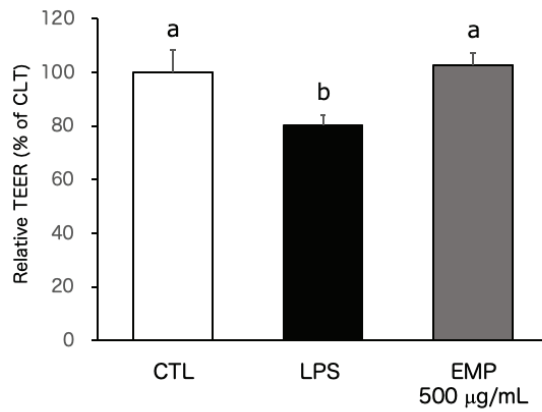


図5B 蛍光デキストラン透過量 (Caco-2細胞)

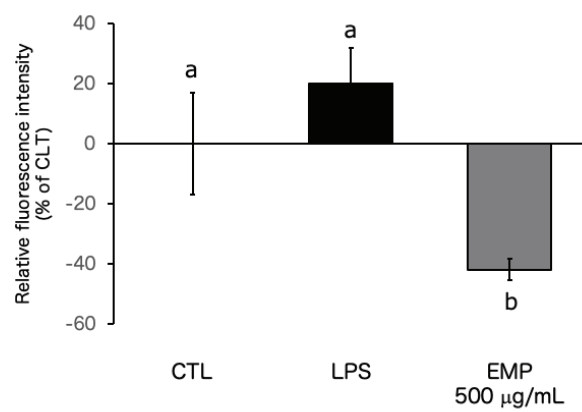


図5 Caco-2細胞を用いて測定したTEERを指標とした卵殻膜ペプチド (EMP) の抗炎症作用の評価

図6A 経上皮電気抵抗値 (オルガノイド)

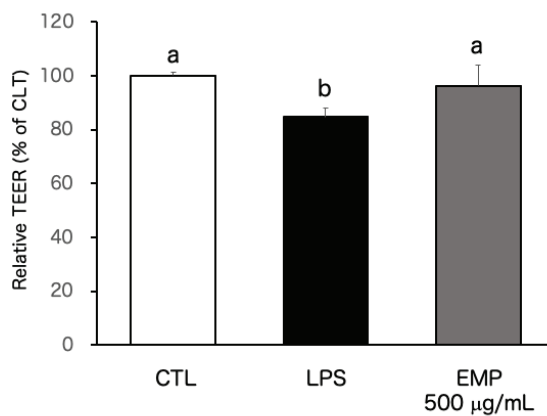


図6B 蛍光デキストラン透過量 (オルガノイド)

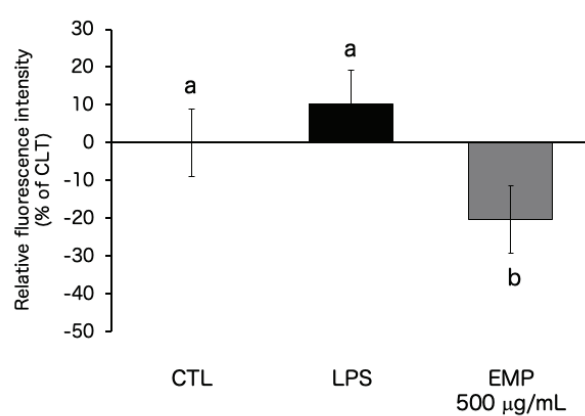


図6 腸管オルガノイド平面培養系を用いて測定したTEERを指標とした卵殻膜ペプチド (EMP) の抗炎症作用の評価