

# マウスの腸内代謝を介した各種食品成分の慢性炎症抑制メカニズムの研究

Study of inhibitory mechanism of the chronic inflammation by modification of intestinal metabolism in mice fed several food components

青江 誠一郎<sup>1</sup>, 山中 千恵美<sup>2,3</sup>, 山岸 あづみ<sup>2,3</sup>, 加藤 美智子<sup>3</sup>

大妻女子大学家政学部<sup>1</sup>, 大妻女子大学大学院人間文化研究科<sup>2</sup>, 大妻女子大学人間生活文化研究所<sup>3</sup>

Seiichiro Aoe<sup>1</sup>, Chiemi Yamanaka<sup>2,3</sup>, Azumi Yamagishi<sup>2,3</sup>, and Michiko Kato<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

<sup>2</sup>Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

<sup>3</sup>Institute of Human Culture Studies, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：マウス，慢性炎症，食事成分

Key words : Mouse, Chronic inflammation, Food component

## 抄録

高β-グルカン大麦，軟化处理してアルギン酸の生体利用性を向上させた昆布，およびミセル性リン酸カルシウムを飼料に配合してC57BL/6JまたはKK/Taマウスに給餌し，組織中の炎症マーカーの遺伝子発現を調べた。

その結果，腸内発酵を誘導する大麦および軟化昆布は，腹腔内脂肪の蓄積を抑制し，脂肪組織の炎症を抑制することが認められた。一方，発酵性のないミセル性リン酸カルシウムの実験においては膵臓細胞内で別の炎症マーカーの発現を抑制し，異なるメカニズムで抗炎症作用を有する可能性が示唆された。

以上の結果，マウスの腸内代謝を介した慢性炎症抑制メカニズムはミネラルなどの直接的な炎症抑制作用とは異なることが示された。

## 1. 研究の目的

近年，食生活の乱れや運動不足，さらにはストレスなどにより若年から中高年にいたるまで肥満が問題となっている。肥満は特に糖尿病や動脈硬化発症の前駆状態と位置づけられており，いわゆるメタボリックシンドロームとの関連が深い病態である。また，肥満は一種の慢性炎症状態であるとの考え方もあり，エネルギー過多により肥大化した脂肪細胞にマクロファージが集まり，マクロファージによって産生されたTNF-α，IL-6などの炎症性サイトカインがストレスシグナルの活性化を介して慢性炎症を惹起することが明らかになっている<sup>[1]</sup>。軽度ではあるが，長期に亘る慢性炎症は，インスリンの作用を抑制し，インスリン抵抗性の一因と考えられている<sup>[2]</sup>。このような炎症の過程において産生されるサイトカインは炎症性サ

イトカインと呼ばれる。したがって，糖尿病をはじめとしたメタボリックシンドロームの治療には炎症性シグナルの抑制がターゲットとなる。

軽度慢性炎症を予防する食品成分についてはポリフェノールを中心に抗酸化作用を期待した研究が先行してきた<sup>[3]</sup>。しかし，腸内細菌が産生する腸内毒素による炎症ストレス，カルシウム不足による臓器の炎症ストレスなどを抑制する食品成分の研究は，評価系もあまりなかったことから実施されてこなかった。また，近年になって腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸が脂肪組織の受容体に認識され炎症を調節しているとの報告があり，この分野の研究に注目が集められている。

本研究では，これまで基礎的知見を蓄積した食品成分について，肥満における慢性炎症を抑制するメカニズムを腸内代謝の変動から検証すること

を目的とした。本資料では、以下の3種の素材の効果を報告する。

1) 大麦  $\beta$ -グルカンの効果：発酵性食物繊維である  $\beta$ -グルカンに富む大麦の抗炎症作用を  $\beta$ -グルカン欠損大麦と比較する。

2) 昆布アルギン酸の効果：発酵性食物繊維であるアルギン酸の利用性に富む軟化昆布の抗炎症効果を調べる。

3) ミセル性リン酸カルシウムの効果：ミセル性リン酸カルシウムの膵臓機能に及ぼす影響として、膵臓の炎症マーカーを調べる。

また、腸内細菌叢の変化をファーミキューテス門（肥満型）とバクテロイデス門（やせ型）の占有率から評価すること、および盲腸内短鎖脂肪酸量の変動を測定する系を確立することも本プロジェクトの目的とした。

## 2. 研究方法

実験1では、5週齢雄の C57BL/6J マウス（日本チャールス・リバー株式会社）を16匹用いた。固形飼料（NMF;オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、1週間の予備飼育後、体重が均一になるように1群8匹ずつ群分けした。

飼料組成を Table1 に示した。

	$\beta$ -グルカン欠損大麦	高 $\beta$ -グルカン大麦
アルファ化コーンスターチ	42.3	58.2
ミルクカゼイン	139.2	140.8
ショ糖	100	100
大豆油	70	70
ラード	185.3	183.7
セルロースパウダー	15.9	-
$\beta$ -グルカン欠損大麦	396.8	-
高 $\beta$ -グルカン大麦	-	396.8
AIN-93Gミネラル混合	35	35
AIN-93ビタミン混合	10	10
L-システチン	3	3
重酒石酸コリン	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

大麦は、 $\beta$ -グルカン欠損大麦（関東裸 84 号 bgl）および高  $\beta$ -グルカン大麦（キラリモチ）の全粒粉を用いた。高  $\beta$ -グルカン大麦の総食物繊維量が 5.0%になるように添加し、 $\beta$ -グルカン欠損大麦も同量添加した。不足分はセルロースで調整し、両群のたんぱく質、脂質量が等しくなるようにカゼイン、ラードで調製した。

抽出した副睾丸周辺脂肪の炎症マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量した。Total RNA を抽出し、抽出した RNA に含まれる mRNA を逆転写反応（RT-PCR）によって相補的

DNA（cDNA）を調整した。mRNA 発現量は、SYBR Green 法にて、内部標準として用いた 36B4 との相対比より求めた。なお、分析装置は Applied Biosystems の 7300 Real-Time PCR System を用いた。

total RNA は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit（株式会社 Qiagen）のプロトコールに従い抽出した。副睾丸周辺脂肪組織をキアゾールに入れて、ホモジナイザー（PRO サイエントフィック社）でホモジナイズした。クロロホルムを添加し、8600rpm、4°Cで15分間遠心後、上層にある水層を採取し、1容量（1200  $\mu$ l）の70%エタノールを添加した。形成した沈殿物も含め700  $\mu$ lのサンプルを2mlのコレクションチューブにセットした RNeasy Mini Spin Column に入れ吸着させた後、洗浄して、RNA 抽出液を調製した。RNA 濃度は、260nm の吸光度で測定した。10mM dNTPs（TOYOBO 株式会社）、0.3  $\mu$ g/ml Random primer（ライフテクノロジージャパン）、5 $\times$ Rever Tra ace Buffer, Rever Tra ace（TOYOBO 株式会社）を混合し、Mixture を5  $\mu$ g RNA/11.5  $\mu$ l DEPC 処理水に加え、緩やかにピペティングした（Total 20  $\mu$ l）。RT-PCR（逆転写反応）にて、30°Cで10分、42°Cで60分、99°Cで5分間反応を行った。サンプルを DEPC 処理水で20倍に希釈し、相補的 DNA（cDNA）テンプレートとし、mRNA 発現量の測定に用いた。

mRNA 発現量の測定の使用試薬は、Master Mix ( $\times 2$ ) (Power SYBR Green, ABI 社), Primer Fw (45  $\mu$  M), Primer Rv (45  $\mu$  M), RNA 濃度フリー水を混合し、Mixture とした。Micro Amp (96-well) に Template (cDNA) と Mixture を入れ、振盪混合後、リアルタイム PCR にて、mRNA 発現量の測定を行った。測定項目とプライマー配列を以下に示す<sup>[4]</sup>。

<36B4>リファレンス遺伝子

Fw:GGCCCTGCACTCTCGCTTTT

Rv:TGCCAGGACGCGCTTGT

<p40phox>炎症マーカー-NADPH オキシダーゼサブユニット

Fw:CAGCCAACATCGCTGACATC

Rv:CAAAGTGGCTGGTGAAGCCT

<p47phox>炎症マーカー-NADPH オキシダーゼサブユニット

Fw:ACTTCACTGAATACTTCAACG

Rv:TCATCAGGCCGCACTTT

<p67phox>炎症マーカーNADPH オキシダーゼサブユニット

Fw:AAGCAAAAAGAGCCCAAGGAA  
Rv:CATGTAAGGCATAGGCACGCT

<TNF- $\alpha$ > 炎症性サイトカイン

Fw:ACCCTCACACTCAGATCATCTTC  
Rv:TGGTGGTTTGCTACGACGT

<IL-6> 炎症性サイトカイン

Fw:ACAACCACGGCCTTCCCTACTT  
Rv:CATGTAAGGCATAGGCACGCT

<MCP-1> 炎症性サイトカイン

Fw:CCACTCACCTGCTGCTACTCAT  
Rv:TGGTGATCCTCTTGCTAGCTCTCC

<F4/80> マクロファージ

Fw:CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC  
Rv:GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG

実験2では、5週齢雄のKK/Taマウス（日本クレア株式会社）を用いた。1群8匹として3群に分けた。軟化昆布は、乾燥昆布を10mMシユウ酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社）溶液で煮沸した後、蒸留水で洗浄し、凍結乾燥して作成した。対照群（Control；以下CO群）の飼料は脂肪エネルギー比が50%になるようにラードを20%添加し、食物繊維として5%セルロースを加えた。試験群は未処理の乾燥昆布群（Intact Kombu；以下、IN群）および軟化处理昆布群（Softened Kombu；以下、SO群）とした。抗酸化性物質であるフコキサンチンの影響を除去するため、アセトン抽出により脱フコキサンチン処理した。IN群は総食物繊維量が5%になるように乾燥昆布を添加した。SO群はIN群の昆布添加量に軟化处理による残存率を乗じて求めた量を添加し、不足分をセルロースで調整した。飼料組成をTable2に示した。マウスには実験飼料と水を68日間自由摂取させ、飼料摂取量および体重の測定を行った。

Table2 飼料組成 (g/kg)

	対照	乾燥昆布	軟化昆布
カゼイン	200	200	200
レーシステイン	3	3	3
$\alpha$ -コーンスターチ	197.5	97.1	157.7
$\beta$ -コーンスターチ	132	132	132
グラニュー糖	100	100	100
大豆油	70	70	70
ラード	200	200	200
セルロース	50		10.7
乾燥昆布		148.2	
軟化昆布			79.2
AIN-93G ミネラルミックス	35	35	35
AIN-93G ビタミンミックス	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
トピチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014

マウスは実験最終日に飼料摂取量、体重を測定した後、6時間絶食させた。イソフルラン/炭酸ガス麻酔下で開腹し、心臓より血液の採取を行い、肝臓、盲腸、後腹壁脂肪、副睾丸周辺脂肪、腸間膜脂肪を摘出して重量を測定した。摘出した副睾丸周辺脂肪の炎症マーカーのmRNA発現量をリアルタイムPCRで実験1と同様の方法で定量した。

実験3では、5週齢雄のC57BL/6Jマウス（日本チャールス・リバー株式会社）にミセル性リン酸カルシウムを配合した脂肪エネルギー比25%食を、10週間飼育した。コントロール（Control）群の飼料は炭酸カルシウムをカルシウム源とした。レンネットカゼインから分離調製したミセル性リン酸カルシウム（MCP-PP）は、コントロール群のカルシウムと同じになるように添加した。

Tbale 3 飼料組成 (g/kg)

	Control	MCP-PP
カゼイン	200.0	141.1
レーシステイン	3	3
コーンスターチ	321.5	330.5
$\alpha$ コーンスターチ	132	132
ショ糖	100	100
大豆油	70	70
ラード	40	40
セルロース	50	50
AIN-93G特殊ミネラル混合	35	35
MCP-PP複合体	-	67.6
CaCO <sub>3</sub>	12.50	0
MgO	0.8	0.84
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18.5	6.73
KCL	4.2	10.7
AIN-93ビタミン混合	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5
トピチルヒドロキノン	0.014	0.014

解剖当日は8:00より6時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で開腹し、心臓より採血、膵臓を摘出した。摘出した膵臓の炎症マーカーのmRNA発現量をリアルタイムPCRで実験1と同様の方法で定量した。追加したプライマーの配列は以下の通り。

<IL-1 $\beta$ >炎症性サイトカイン

Fw:CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC  
Rv:TGTCCTCATCCTGGAAGGTCCACG

<If- $\gamma$ > インターフェロン  $\gamma$

Fw : GCATCTTGGCTTTGCAGCT  
Rv : CCTTTTTTCGCCTTGCTGTTG

すべての測定結果は平均±標準偏差で示した。平均値の比較は2群の比較は対応のないt検定、3

群以上では Tukey-Kramer の多重比較法を用いた。有意水準は 5% とした。正規性の確認と Bartlett の等分散検定を行い、不等分散の場合は、Welch の検定、3 群以上の多重比較は、Steel-Dwass の検定を用いた。統計解析は JMP10.0.0 (SAS Institute 社) を用いた。

### 3. 研究結果と考察

実験 1 では、副睾丸周辺脂肪の炎症マーカー mRNA 発現量の結果を Fig1 に示した。IL-6 および TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量では  $\beta$ -グルカン欠損大麦群と比べて高  $\beta$ -グルカン大麦群で有意に低値を示した。腸内発酵性の  $\beta$ -グルカンの有無によって炎症マーカーの応答が異なることが示された。さらに、NADPH オキシダーゼのサブユニット p40<sup>phox</sup> の発現が抑制された。NADPH オキシダーゼのサブユニットは 3 つがそろって活性化し、活性酸素を放出する。したがって、大麦中の  $\beta$ -グルカンは、脂肪組織において活性酸素を発生させる NADPH オキシダーゼを抑制することにより炎症を抑制している可能性もが示された。

肥満のごく初期から脂肪組織のマクロファージが増加し活性化され、活性化マクロファージから分泌されるサイトカインの刺激により、種々のアディポサイトカインの調節不全が起こると言われている。肥満が起きるとどのようなメカニズムでマクロファージが脂肪組織に浸潤するのかよくわかっていないが、肥満のごく初期からマクロファージの誘導・活性化の作用のある MCP-1 の発現が脂肪組織で上昇していることがわかっている。そして、活性化されたマクロファージから分泌される TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの刺激により、肥大化脂肪細胞における“守り”のアディポサイトカインの分泌低下、“攻め”のアディポサイトカインの発現および分泌が亢進して、その結果として各臓器における代謝や増殖が変化し、種々のメタボリックシンドロームの病態が誘導される。以上のことより、高  $\beta$ -グルカン大麦が脂肪蓄積を抑制し、脂肪組織の炎症を抑制することが、メタボリックシンドローム発症の抑制メカニズムである可能性が示された。

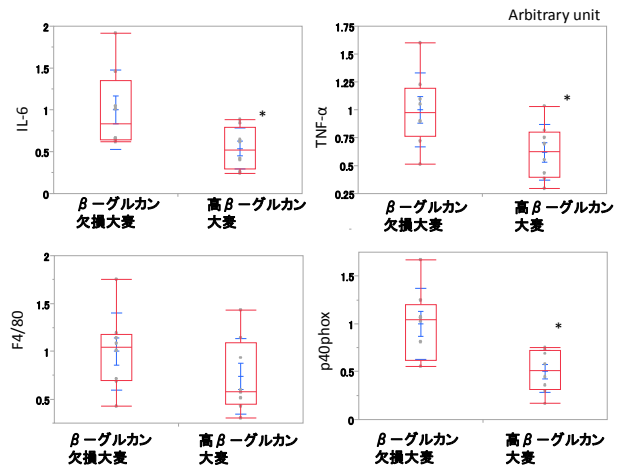


Fig1 副睾丸周辺脂肪の炎症マーカー mRNA 発現量 \*  $\beta$ -グルカン欠損大麦群に比較して有意差あり ( $p < 0.05$ ).

実験 2 においては、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は乾燥昆布群、軟化昆布群ともに低値を示した（統計的有意差はなし）。一方、IL-6 は、軟化昆布群が対照群、乾燥昆布群よりも低値を示し（統計的有意差はなし）、軟化によるアルギン酸の消化管内の溶出が関係している可能性が示唆された。大麦同様に、副睾丸周辺脂肪組織の炎症マーカーでは IL-6 の発現量が共通して差が検出された。遺伝性 2 型糖尿病モデルである KK/Ta マウスではすでに肥満と慢性炎症が急激に進行した状態であり、TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌が高まっていたため、有意な差が検出できなかった可能性がある。昆布の腸内発酵性については、文献が少なく、さらなる検討が必要である。

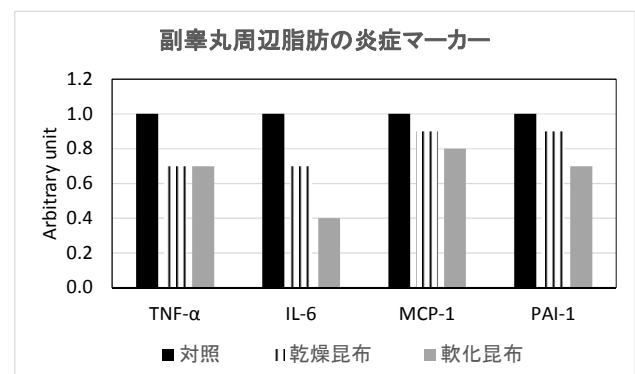


Fig2 副睾丸周辺脂肪の炎症マーカー mRNA 発現量

実験3のミセル性リン酸カルシウムの実験においては、膵臓のIL-1 $\beta$ , If- $\gamma$ のmRNA発現が有意に抑制された。したがって、ミセル性リン酸カルシウムは、膵臓において脂肪組織とは異なる炎症性マーカーを抑制することにより炎症を抑制している可能性が示唆された。本作用は、実験1および2とは異なり、カルシウムの生体利用性が関与している可能性が高く、腸内代謝とは別のメカニズムであることが示された。

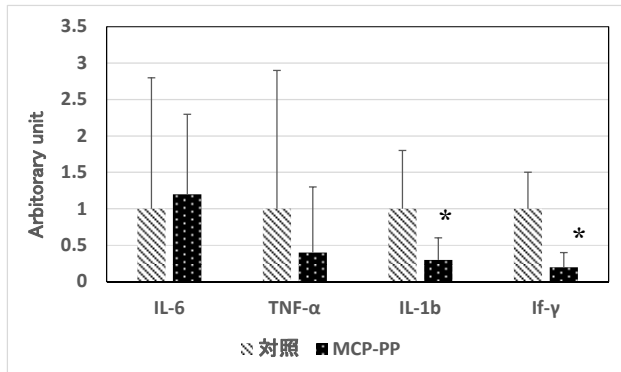


Fig3 膵臓の炎症マーカーmRNA発現量  
平均値±標準偏差を表す。

\*対照群に比較して有意差あり ( $p < 0.05$ ), Welch検定。

#### 4. まとめと展望

これまで個々に実施してきたモデルマウスを用いた慢性炎症を予防する食事成分の効果を横断的に解析し、食物繊維は腸内代謝を介した抗炎症作用を、ミセル性リン酸カルシウムはカルシウムの

生体利用性が直接膵臓に影響し、抗炎症作用を発揮することを明らかにした。特に、消化管内で効果を発揮すると考えられる発酵性食物繊維の抗炎症効果の特徴を示すことができた。本資料には記載しきれなかったが、腸内細菌叢の変化や短鎖脂肪酸の産生量増加は、食物繊維摂取により変動が確認され、腸内代謝を介したメカニズムであることを確認している。

#### 付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所の「共同研究プロジェクト」(K2701)の助成を受けたものである。

#### 引用文献

- [1] Gerner, RR et al. Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013, 91, p.867-72.
- [2] Knight, SF et al. Obesity, insulin resistance, and renal function. *Microcirculation.* 2007, 14, p.349-62.
- [3] Gupta, SC et al. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Arch Biochem Biophys.* 2014, 559, p.91-9.
- [4] Furukawa, S et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004, 114, p.1752-61.

#### Abstract

Male C57BL/6J or KK/Ta mice were fed a test diet containing high  $\beta$ -glucan barley, softened *Kombu* to increase in bioavailability of alginate in *Kombu* or milk micellar calcium complex (MCP-PP). The mRNA expression of inflammatory markers in epididymal fat cell or pancreas were measured. The mRNA expression of inflammatory markers in epididymal fat was reduced in the both of barley group and softened *Kombu* group which promote colonic fermentation compared to the control group. On the other hand, the mRNA expressions of IL-1 $\beta$  and If- $\gamma$  was significantly reduced in the non-fermentable MCP-PP group compared to the control group. These results indicated that the mechanism of anti-inflammatory effect through colonic fermentation by high  $\beta$ -glucan barley and softened *Kombu* was different from that of MCP-PP.

(受付日: 2016年6月7日, 受理日: 2016年6月16日)

青江 誠一郎（あおえ せいいちろう）

現職：大妻女子大学家政学部教授

千葉大学大学院自然科学研究科博士課程修了。

専門は食品および栄養化学。現在は肥満を予防するための食品成分の探索と作用機構の解明について研究中。特に、穀類や昆布の食物繊維の研究に注力している。

主な著書：ルミナコイド研究のフロンティアー食物繊維・オリゴ等・レジスタントスターチの最新研究動向ー（共著，建帛社）