



Astilbin from Engelhardtia chrysolepis Enhances Intestinal Barrier Functions in Caco-2 Cell Monolayers

中原, 達雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6977号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006977>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Astilbin from *Engelhardtia chrysolepis* Enhances Intestinal Barrier Functions in Caco-2 Cell Monolayers

Caco-2 細胞における *Engelhardtia chrysolepis* 由来アスチルビンの腸管バリア機能の増強

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
消化器内科学
(指導教員：東 健教授)

中 原 達 雄

【諸言・目的】

アスチルビンは、フラボノイド配糖体の1種で黄杞(クルミ科: *Engelhardtia chrysolepis*) やオトギリソウ(オトギリソウ科: *Hypericum perforatum*) などの植物に含有されている。このアスチルビンには、抗酸化活性、リボプロテインリパーゼ活性、膀胱機能不全改善作用、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、及びIL-10に対する抗炎症作用などがあることが報告されている。

腸の上皮細胞は、外部からの病原体、毒素、アレルギーなどの侵入を防御する機能を有しており、この上皮細胞間の接着において、タイトジャンクション(TJ)タンパク質がバリアを形成するとともに物質の輸送や維持にも関与しているといわれている。これらTJにはクローディンやオクルディンのように、膜貫通型タンパク質やゾヌラオクルディン(ZO)のような細胞膜裏打ちタンパク質が存在している。

これまでの研究で、アスチルビンのアグリコン部であるタキシフォリンの様なフラボノイド類にはTJの機能を増強することが知られているが、アスチルビンなどフラボノイド(ジヒドロフラボノール)配糖体では、TJを含む腸上皮細胞機能向上に関わる報告はされていない。そこで、本研究では、フラボノイド配糖体であるアスチルビンがTJ機能を増強できるか否かについて検討した。

【方法・結果】

アスチルビンの調製は以下のように行った。中国産黄杞の葉を50%エタノール溶液で抽出した後、多孔性吸着樹脂、シリカゲルクロマトグラフィー、リサイクリングHPLCを使用して繰り返し、分離、精製を行い、アスチルビンを単離した。単離したアスチルビンの構造はNMRデータを文献値と比較し決定した。また、純度はNMRデータの積分値とHPLC分析の結果から95%と算出した。

最初にアスチルビンの添加によって、TJ機能の増強を確認するためにCaco-2細胞(ヒト結腸腺癌細胞)を用い、アスチルビンを添加した場合と添加していない場合の電気抵抗値を測定した。なお、Caco-2細胞の培養にはダルベッコ改変イーグル培地を使用し、トランスウェルで13~14日培養した細胞を用いて試験を行った。電気抵抗値の結果は、アスチルビン添加12.5及び50 μ Mにおいて、1時間後には電気抵抗値が上昇し、3時間後には最大となった。

続いて、TJに関連する遺伝子発現を確認するため、リアルタイムPCRを用いて各種TJ類(クローディン-1、クローディン-4、オクルディン、ZO-1、ZO-2)の遺伝子発現を測定した。Caco-2細胞の培養は上述と同じ方法を用い、測定時間は試料添加30分後に行った。その結果、アスチルビン50 μ Mにおいて、クローディン-1及びZO-2に有意な増加が認められた。

遺伝子発現を行った結果、有意に増加するタンパクが認められたため、ウェスタンブロッティング法を行いタンパク発現を確認することとした。方法としては、上述の培地及び培養器を用いてCaco-2細胞を培養し、各種TJ類(クローディン-1、オクルディン、ZO-1、ZO-2)の0~24時間の経時的タンパク解析を行った。その結果、オクルディンに関してはサンプル

添加 24 時間後、ZO-2 に関しては 3~6 時間後に有意な増加が認められた。

次にアスチルビンには既に抗炎症効果が知られているため、炎症性サイトカインである TNF- α 及び INF- γ を Caco-2 細胞に添加し 72 時間後、アスチルビン (50 μ M) を添加した場合と添加してない場合の電気抵抗値を測定した。その結果、炎症性サイトカインもアスチルビンも添加していないコントロールと比較して、炎症性サイトカインを添加した際に電気抵抗値は約 62% 減少したが、炎症性サイトカインとアスチルビンを添加した場合は約 72% の減少に留まった。

また、炎症性サイトカインを添加した場合のタンパク発現の変化を確認するため、各種 TJ 類 (クローディン-1、オクルディン、ZO-2) のタンパク解析をウェスタンブロットティング法で行った。その結果、オクルディンのタンパク発現はコントロールと比較して炎症性サイトカインを添加した際に約 75% 減少したが、炎症性サイトカインとアスチルビンを添加した場合は約 94% の減少に留まった。

【考察・結論】

アスチルビンは、クルミ科の植物に主成分として含有されているフラボノイド配糖体 1 種で、その生理機能は既に報告されている。近年、フラボノイドが Caco-2 細胞のバリア機能を増強する報告がなされているが、アスチルビンはフラボノイド配糖体であるため、我々はアスチルビンに着目し、本化合物が腸管バリア機能の増強作用を有するかどうかの研究を行った。

アスチルビンは、Caco-2 細胞の電気抵抗値を上昇させオクルディン及び ZO-2 のタンパク発現を上昇させ、クローディン-1 のタンパク発現については増加傾向であることを示した。これらの TJ に関連した現象は、PKCs、MAPKs 及び PI3K のようなシグナル経路がコントロールしていることが知られている。しかし、これまでの研究でフラボノイドの 1 種であるケルセチンが PKC 活性を阻害することによりバリア機能を調節していることが報告されている。アスチルビンと PKC の相関関係についての報告はないが、アスチルビンは MAPK と呼ばれる JNK、ERK 及び p38 のリボポリサッカライド誘導のリン酸化を阻害していると推定した。

また、アスチルビンの作用機序については今後さらなる研究が必要と考えるが、アスチルビンは TJ の凝集の規則化とリン酸化の 2 つの異なるメカニズムにより腸管のバリア機能を増強していると考えられる。

さらに、電気抵抗値の緩やかな増加は、アスチルビン 50 μ M 添加後、15、30 及び 60 分後に認められた。この結果は、イオンチャンネルが腸管のバリア機能に関与してれば、電気抵抗値が緩やかに上昇するので、アスチルビンが腸管のイオンチャンネルにも関与指定かもしれないことを示唆している。

本研究において、アスチルビンは、サイトカインで刺激された Caco-2 細胞において腸管のバリア機能を増強することができた。アスチルビンを含む植物はいくつかの疾患改善に

おいて伝統的に利用され、アスチルビン自体が種々の有効性作用示すことも報告されている。しかし、アスチルビンの腸管細胞の TJ 機能に対する増強については知られておらず、本研究は最初の報告となる。

以上の結果から、我々は黄杞から単離した天然化合物であるアスチルビンが TJ の機能を増強することを証明した。これは、アスチルビンが腸管細胞のバリア機能に対して効果的な化合物の 1 つであることを示唆すると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2705号	氏 名	中原 達雄
論文題目 Title of Dissertation	Astilbin from <i>Engelhardtia chrysolepis</i> Enhances Intestinal Barrier Functions in Caco-2 Cell Monolayers Caco-2細胞における <i>Engelhardtia chrysolepis</i> 由来アスチルビンの腸管バリア機能の増強		
審査委員 Examiner	主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner 副 査 勾坂 敏朗 Vice-examiner 副 査 伊藤 俊樹 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

アスチルビンはフラボノイド配糖体の1種で、黄杞 (*Engelhardtia chrysolepis*) やオトギリソウ (*Hypericum perforatum*) などの植物に含有されている。アスチルビンには、抗酸化活性、リポプロテインリパーゼ活性、膀胱機能不全改善作用、抗炎症作用などがあることが報告されている。

腸の上皮細胞は、外部からの病原体、毒素、アレルギーなどの侵入を防御する機能を有しており、この上皮細胞間の接着において、タイトジャンクション (TJ) タンパク質がバリアを形成するとともに物質の輸送や維持にも関与している。

アスチルビンを含有する植物は生活習慣病や排尿障害などいくつかの疾患の予防・改善に伝統的に利用され、アスチルビンが治療効果を有することが示されている。これまでの研究から、アスチルビンのアグリコンであるタキシフォリンのようなフラボノイド類には TJ の機能を増強することが知られている。一方、アスチルビンなどフラボノイド (ジヒドロフラボノール) 配糖体の TJ を含む腸上皮細胞機能への影響は報告されていない。そこで、本研究では、アスチルビンが腸上皮細胞の TJ 機能を増強するかについて、ヒト結腸腺癌細胞株である Caco2 細胞を用いて検討した。

【方法】

アスチルビンは、中国産黄杞の葉を 50%エタノール溶液で抽出し、多孔性吸着樹脂、シリカゲルクロマトグラフィー、リサイクリング HPLC による分離と精製を繰り返して単離した。単離したアスチルビンの構造と純度は NMR データを文献値と比較し決定した。TJ 機能の指標として Caco2 細胞のシート状培養を挟んだ経上皮電気抵抗値を測定した。TJ 関連分子 (claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, ZO-2) について、mRNA 発現をリアルタイム PCR により、蛋白発現をウェスタンブロット法により測定した。

【結果】

1. アスチルビンの純度は NMR データの積分値と HPLC 分析の結果から 95%と算出した。
2. アスチルビンにより Caco2 細胞の TJ における電気抵抗値が1時間後には上昇し3時間後に最大となった。
3. アスチルビンにより Caco2 細胞のクローディン-1 と ZO-2 の mRNA 発現が増加した。
4. アスチルビンにより Caco2 細胞の ZO-2 やオクルディンの蛋白発現が増加した。
5. 炎症性サイトカインである TNF- α 及び INF- γ により Caco2 細胞の TJ における電気抵抗値は減少するが、アスチルビンの同時投与はその作用を抑制した。
6. 炎症性サイトカインにより Caco2 細胞のオクルディンのタンパク発現は減少するが、アスチルビンの同時投与はその作用を抑制した。

【結論】

本研究では、アスチルビンが Caco2 細胞の TJ 関連分子の発現を誘導し TJ 機能を増強すること、炎症性サイトカインによる Caco2 細胞の TJ 機能の破綻をアスチルビンが抑制することを示した。この成果は、アスチルビンが腸管細胞のバリア機能に対して効果的な化合物であることを示唆する。

以上、本研究は、アスチルビンの Caco2 細胞の TJ 機能および TJ 関連分子の発現への影響を調べ、フラボノイド配糖体の腸上皮細胞のバリア機能への増強作用を明らかにしたものであり、腸疾患へのアスチルビンの有用性を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。