

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660101

研究課題名(和文) 杯細胞から探る新しい腸管粘膜免疫機構と食物繊維によるその制御

研究課題名(英文) Potential of immune modulatory effect of dietary fiber through goblet cell proliferation

研究代表者

森田 達也 (Morita, Tatsuya)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90332692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食物繊維を添加した半精製飼料または低残渣の成分栄養剤を調製し、ラットに摂取させた際の小腸杯細胞数と腸管透過性を測定した。食物繊維を添加した飼料では杯細胞数は同程度増加し、これと同時に腸管透過性も食物繊維の摂取により上昇することが明らかとなった。また、食物繊維摂取時の小腸でのサイトカイン発現量について解析を行った結果、IFN-g, TNF-aおよびIL-17発現量が上昇することが明らかとなった。これらの結果は、食物繊維摂取により腸管透過性の増加と腸管免疫系の修飾が起こることを示しているが、これらの現象と杯細胞数の増加との関係性についてはさらなる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：First, rats were fed a semipurified diet or a elemental diet with or without dietary fiber. After feeding, intestinal permeability and the number of goblet cells in the small intestine was examined. Ingestion of dietary fiber increased the number of small intestinal goblet cell number and the intestinal permeability. Second, we found that ingestion of dietary fiber increased cytokine expression such as TNF-a, IFN-g and IL-17 in the small intestine. These data suggested that ingestion of dietary fiber modulate intestinal permeability and intestinal immune systems. However, to clarify the interaction between the number of goblet cells and these phenomina, we need futher experiments.

研究分野：栄養化学

キーワード：食物繊維 杯細胞

1. 研究開始当初の背景

外来抗原の刺激を常に受ける腸管粘膜は過剰な免疫応答を制御する機構を持つが、その誘導機構の詳細は不明である。最近、制御性T細胞やIgA産生の誘導に関わるCD103<sup>+</sup>樹状細胞への外来抗原の輸送・提示に杯細胞が積極的に関与することが示唆された (McDole *et al. Nature*, 2012)。一方、申請者は食物繊維 (DF) の摂取が小腸杯細胞数の増加を誘導することを見いだしている (Hino *et al. J Nutr*, 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、小腸杯細胞数の増加が腸管免疫系に及ぼす影響を解析することで、これまで注目されていなかった杯細胞の腸管免疫系への関与を明らかにするとともにDF摂取によるその制御の可能性を探った。

3. 研究の方法

(1) 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析

6週齢のSD系雄ラット(1群6匹)を用い、AIN-76 飼料 (AIN), AIN に8%の発泡スチロール粉末 (PSF) を添加した AIN+PSF 飼料, 経腸成分栄養剤 (ED) または ED に8%のPSFを添加した ED+PSF 飼料を調製し、各飼料を6日間自由摂取させた。ラットを18時間絶食させた後、FITC-dextran 溶液 (4kDa, 300 mg/mL) を体重100gあたり0.25 mLの用量で経口投与した (750 mg/kg BW)。投与後30minの尾静脈血を採取した。FITC-dextran を投与しないラットからも尾静脈血を採取し、これをサンプルブランクとした。血液採取後、解剖を行った。小腸各部位(空腸中央部, 回腸中央部, 回腸末端部)における杯細胞数の測定を行った。

(2) 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析

6週齢のSD系雄ラット(1群6匹)を用い、中心静脈栄養 (TPN) 群, TPN 管理下で小麦フスマ (WB) を摂取させた TPN+WB 群を設け7日間飼育した。栄養輸液には高カロリー輸液用の糖・電解質・アミノ酸液に微量元素, ビタミンを混注したものをを用いた。TPN は頸静脈にカテーテルを挿入し、皮下経路で背部から出したカテーテルに輸液ポンプをつなぎ一定量の輸液が流れるよう調整した。輸液投与群は順化のため、最初の2日間は低カロリー輸液 (0.56 kcal/mL) を用い、次いで高カロリー輸液 (0.76 kcal/mL) に交換した。輸液投与速度は、最初の2日間は2.50 mL/h, 次いで2.75 mL/hへと切り換えた。なお, WB はスクロースとの等量混合物として, 1日2gを与えた。これらラットに(1)と同様の方法でFITC-dextranを経口投与し、投与後30, 60, 120分後に尾静脈血から採血を行った。また、採血終了後に小腸組織を採取し、回腸中央部の杯細胞数の測定を行った。

(3) 食物繊維摂取が小腸サイトカイン発現量に及ぼす影響

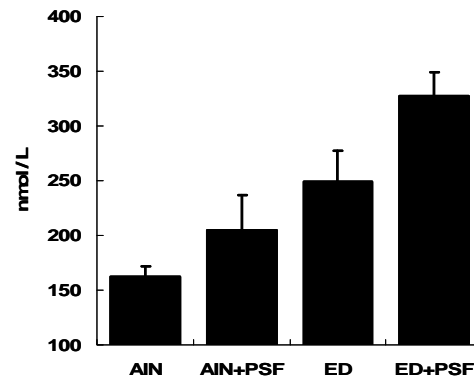
4週齢のWistar系雄ラットに8%の小麦フスマ(WB)を含む飼料を摂取するWB群, 4%のグアガム(GG)を含む飼料を摂取するGG群ならびに食物繊維を含まない飼料を摂取させる対照群を設け、2週および8週後に解剖を行った。小腸各部位(空腸中央部, 回腸中央部, 会腸末端部)における杯細胞数の測定およびサイトカイン発現量の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析

AIN 飼料, ED ともに PSF 摂取群では PSF 非摂取群と比べ有意に小腸杯細胞数が増加した。また, FITC 標識デキストラン経口投与30分後の、血漿中FITC 標識デキストラン濃度はPSF 摂取群で PSF 非摂取群と比べ上昇することが明らかとなった (図1)。

図1 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析



(2) 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析

TPN+WB 群では、回腸中央部の杯細胞数がTPN 群と比べ有意に増加した (図2)。また、血漿中 FITC 標識デキストラン濃度は0分を除くすべての時間で TPN+WB 群が TPN 群と比べ高い濃度を示した (図3)。

図2 食物繊維の摂取が杯細胞数に及ぼす影響の解析

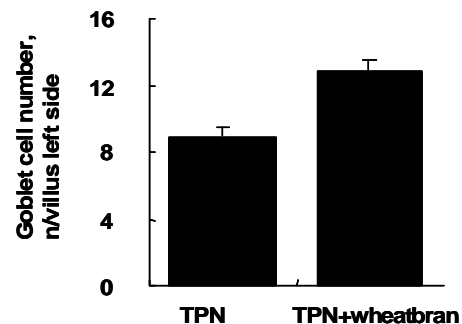
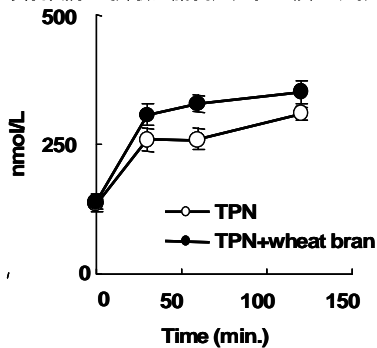


図3 食物繊維の摂取が腸管透過性に及ぼす影響の解析



(3) 食物繊維摂取が小腸サイトカイン発現量に及ぼす影響

WB 群および GG 群の小腸杯細胞数は測定したすべての部位で対照群と比べ有意に増加した。サイトカイン発現量では, WB 摂取群では対照群と比べ, 2週では IL-17 発現量が上昇し, 8週では IFN-g および IL-17 が上昇した。GG 群では対照群と比べ, 2週では IFN-g, TNF-a および IL-17 発現量が上昇し, 8週では IFN-g, TNF-a, TGF-b1 および IL-17 発現量が上昇した。これらのサイトカイン発現量の変化は小腸各部位でいずれも同様であった。(表 1)

表1 食物繊維摂取が小腸サイトカイン発現量に及ぼす影響

	2 wk			8 wk		
	Control	8% WB	4% GG	Control	8% WB	4% GG
<b>Jejunum</b>						
<i>Ifnγ</i>	1.0±0.1	1.2±0.6	2.3±0.7*	1.0±0.1a	2.4±0.3b	6.3±2.0b
<i>Il4</i>	1.0±0.1	1.1±0.4	0.6±0.1	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.1
<i>Il17</i>	1.0±0.2a	4.7±0.9b	8.7±3.1b	1.0±0.1a	2.2±0.4b	5.3±2.0c
<i>Il10</i>	1.0±0.2	1.1±0.2	1.5±0.3	1.0±0.3	1.9±0.4	1.7±0.2
<i>Il13</i>	1.0±0.1	0.9±0.3	0.8±0.2	1.0±0.2	2.3±0.5	1.7±0.4
<i>Tnf</i>	1.0±0.1a	0.6±0.1a	2.4±0.9b	1.0±0.1a	0.9±0.1a	6.9±1.5b
<i>Tgfb1</i>	1.0±0.2	0.8±0.2	0.9±0.1	1.0±0.1	1.3±0.2	1.3±0.2
<b>Ileum</b>						
<i>Ifnγ</i>	1.0±0.1a	1.0±0.2a	2.3±0.3b	1.0±0.2a	1.6±0.3ab	3.5±0.9b
<i>Il4</i>	1.0±0.1	0.7±0.2	0.6±0.2	1.0±0.1	1.3±0.3	0.9±0.3
<i>Il17</i>	1.0±0.3a	3.3±0.6b	2.8±0.7b	1.0±0.3a	1.6±0.1ab	4.0±0.9b
<i>Il10</i>	1.0±0.1a	1.6±0.3ab	2.7±0.7b	1.0±0.1	1.1±0.1	1.4±0.1
<i>Il13</i>	1.0±0.3	0.6±0.1	1.0±0.2	1.0±0.2	0.7±0.1	0.9±0.2
<i>Tnf</i>	1.0±0.2a	0.8±0.1a	3.0±1.0b	1.0±0.1a	0.8±0.1a	3.6±0.5b
<i>Tgfb1</i>	1.0±0.3	0.8±0.1	0.6±0.2	1.0±0.1	0.9±0.2	1.2±0.1
<b>Terminal ileum</b>						
<i>Ifnγ</i>	1.0±0.1	1.1±0.4	1.3±0.6	1.0±0.2a	2.3±0.5b	3.3±0.7b
<i>Il4</i>	1.0±0.2	1.0±0.2	0.8±0.2	1.0±0.2	2.1±0.5	2.2±0.5
<i>Il17</i>	1.0±0.3a	2.0±0.5b	1.9±0.5b	1.0±0.2a	3.0±1.3b	8.7±1.7c
<i>Il10</i>	1.0±0.1	1.2±0.2	1.2±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	0.8±0.2
<i>Il13</i>	1.0±0.5	0.8±0.3	0.5±0.2	1.0±0.2	1.4±0.4	0.9±0.2
<i>Tnf</i>	1.0±0.4	0.3±0.1	0.7±0.3	1.0±0.3a	1.9±0.2b	3.8±0.7b
<i>Tgfb1</i>	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.2a	1.1±0.1a	1.8±0.2b

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

S Hino, A Ito, T Kondo, T Morita, Elemental diet induces the proliferation of sialomucin goblet cells in the rat duodenum and jejunum, *Biosci Biotechnol Biochem*, 79(6) 992-996 (2015) (査読有)

Yukihiro Furusawa, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Takaho A Endo, Gaku Nakato, Daisuke Takahashi, Yumiko Nakanishi, Chikako Uetake, Keiko Kato, Tamotsu Kato, Masumi Takahashi, Noriko N Fukuda, Shinnosuke Murakami, Eiji Miyauchi, Shingo Hino, Koji Atarashi, Satoshi Onawa, Yumiko Fujimura, Trevor Lockett, Julie M Clarke, David L Topping, Masaru Tomita, Shohei Hori, Osamu Ohara, Tatsuya Morita, Haruhiko Koseki, Jun Kikuchi, Kenya Honda, Koji Hase, Hiroshi Ohno, Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells, *Nature*, 504 (7480), 446-450 (2013) (査読有)

S Hino, H Saita, T Morita, Non-Effect of an Antibiotic Treatment on Dietary Fiber-Induced Goblet Cell Proliferation in the Ileum of Rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(8) 1782-1784 (2013) (査読有)

〔学会発表〕(計 17 件)

源田知美, 佐々木優太, 日野真吾, 園山慶, 森田達也, フラクトオリゴ糖摂取によるラット盲腸 IgA 分泌促進作用には生理的炎症を伴う, 日本食物繊維学会第 19 回学術集会, 2014 年 11 月 30 日, 大妻女子大学(東京都千代田区)

日野真吾, 近藤位旨, 森田達也, 難消化性デキストリンのラット消化管内動態を解析する, 日本食物繊維学会第 19 回学術集会, 2014 年 11 月 29 日, 大妻女子大学(東京都千代田区)

源田知美, 佐々木優太, 日野真吾, 園山慶, 森田達也, フラクトオリゴ糖摂取時の盲腸 IgA 分泌応答と腸管透過性との関連性について, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 31 日, 酪農学園大学(北海道江別市)

日野真吾, 食物繊維のムチン分泌促進作用, 第 16 回「応用糖質科学ワークショップ」, 2014 年 5 月 22 日, 東京大学(東京都文京区)

日野真吾, 伊藤文乃, 森田達也, 成分栄養剤摂取時の小腸杯細胞応答: 空腸ムチン糖鎖種の変動, 第 67 回日本栄養・食糧学会, 2013 年 5 月 26 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/morita\\_t/index.html](http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/morita_t/index.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

森田 達也 (Morita, Tatsuya)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90332692

### (2)研究分担者

日野 真吾 (HINO, Shingo)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70547025