

恒常的な乳製品の摂取による栄養素の消化管吸収変化の可能性

日本薬科大学 薬学科 臨床薬剤学分野
瀧沢 裕輔

1. 研究の目的と背景

ヒトは生後直後の母乳から始まり、幼児期以降は牛乳やヨーグルト等を摂取するため、消化管粘膜は一生涯を通して乳製品に接触し続けることになる。栄養素は消化管上皮細胞を介して吸収されるが、消化管上皮細胞は異物を排除するための特有のバリア機能を有している。腸管上皮細胞の管腔側表面を覆う水溶性粘液多糖からなる粘液層は外界との接触面であり、腸管上皮近傍において非かく拌水層 (unstirred water layer: UWL) を形成し、外界からの異物の体内侵入に対する物理的バリア機能 (特に脂溶性物質に対する) を果たしている¹。物質の上皮細胞透過経路には、細胞と細胞の間の密着結合 (tight junction) を介する細胞間隙経路 (paracellular route) と、細胞内を透過する細胞内経路 (transcellular route) に大別されるが、非かく拌水層は transcellular route を介して膜透過する薬物の障害となっている。

ムコ多糖タンパク質分子であるムチンが非かく拌水層の主要構成成分であり²、現在、ヒトのムチン分子は約 20 種類ほどが同定されており、消化管には約 13 種類の発現が確認されている³。ムチンは線細胞から産生される分泌型 (gel-forming type: MUC2, 5AC, 5B, 6) と上皮細胞膜に結合した状態で存在する膜結合型 (transmembrane type: MUC1, 3A, 3B, 4, 12, 13, 16, 17) に分類され、これらムチン分子がジスルフィド結合などの分子間相互作用によって複雑な網目状の分子ネットワークを形成し、糖鎖を介して大量の水分を保持することによって粘液層を構成しており、膜結合型ムチンである MUC1 や MUC16 と糖鎖結合タンパク質である galectin-3 との相互作用により粘膜バリア機能が安定化されていることが明らかにされている⁴。一方で、乳製品に含有され、食品添加物としても汎用されている乳糖 (Lactose) が、mucin-galectin 間の相互作用を阻害することも知られており⁵、それに伴うバリア機能の低下が懸念されている。

そこで本研究ではこの機構を詳細に検討し、恒常的な乳製品の摂取、すなわち乳糖水和物による栄養素および薬物の消化管吸収への影響の有無を検討することで、栄養素を効率的に吸収させる技術の開発のための基礎的データの収集を目的とした。

2. 研究の方法

2-1. 使用物質

乳糖水和物原末「マルイシ」(丸石製薬株式会社)、Dithiothreitol (Sigma), Rose bengal (FUJIFILM Wako Chemicals), 5-Carboxyfluorescein (5-CF; Sigma), β -naphthol (FUJIFILM Wako Chemicals), その他の物質は試薬特級以上のグレードのものを使用した。

2-2. 培養細胞

理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) から、物質の消化管膜透過性のスクリーニングに汎用されているヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を購入し、5% CO₂ を含む 37℃ の加湿インキュベーターにて培養した。Caco-2 細胞は、10% FBS, 1% 非必須アミノ酸, 100 U/ml ペニシリン, および 100 mg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM-高グルコース (FUJIFILM Wako Chemicals) で維持し、9-18 継代間で使用した。

2-3. 使用動物

本実験では、7 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC) を用いた。飼料と水は自由に与え、恒温 (23 ± 1℃), 恒湿 (55 ± 5%), 定時照明 (12 時間明所 7:00 ~ 19:00, 12 時間暗所 19:00 ~ 7:00) の人工環境下で飼育した。動物の飼育、実験操作は動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 法律第 105 号), 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 環境省告示第 88 号), 日本薬科大学動物実験規程 (平成 28 年 日本薬科大学学長) に則って行った。

2-4. 細胞内取り込み実験

12 well plate に Caco-2 細胞を 2×10^5 cells/well で播種し、コンフルエントになるまで培養を行った。各濃度の乳糖水和物含有培地を所定の時間作用させ、その後 0.1% の Rose bengal 溶液に置換し、Rose bengal の取り込み実験を行った。

2-5. 透過実験 (細胞)

Transwell insert (Corning) に Caco-2 細胞を 2×10^5 cells/well で播種し、1 週間インキュベーター内で培養を

行った。8日目以降は2日に1度、培地交換を繰り返し、21日間培養を行った。経上皮膜間抵抗 (TEER) が $400 \Omega \times \text{cm}^2$ 以上であることを確認し、膜透過実験に用いた。Paracellular marker として 5-CF を、transcellular marker として β -naphthol を選択し、apical 側に薬液を添加し、basal 側からサンプリングを行い、吸収方向の膜透過性について評価した。5-CF の測定はプレートリーダー、 β -naphthol の測定は HPLC により行った。

2-6. 透過実験 (動物)

実験前日より絶食したラットから麻酔下にて小腸を摘出し、ビーカーとガラス管を用いた *in vitro sac* 法による膜透過実験を行った。薬物は腸管腔側に添加し、吸収方向の膜透過性について評価した。両透過経路の基質薬物および測定方法は上述の透過実験 (細胞) と同様に行った。

2-7. タンパク質発現解析

Caco-2 細胞および擦過したラット小腸粘膜を超音波粉碎後 SDS-PAGE 用のサンプルとして調製した。SDS-PAGE 法および Western blotting 法によりタンパク質発現解析を行った。

3. 研究内容

本研究ではまず、培養細胞である Caco-2 細胞を用いて、乳糖水和物による galectin-3 の引き抜き効果の検討を行い、それに伴う物質の膜透過性の変化に関する検討を行った。しかしながら、培養細胞系の検討において乳糖水和物の暴露による galectin-3 の引き抜き効果およびバリ

ア機能の低下現象が認められなかったことから、実験動物を用いた検討に変更し、ラット小腸を用いて乳糖水和物暴露による薬物の腸管膜透過性への影響を検討した。

4. 研究の実施経過

本研究では物質の消化管吸収における mucin-galectin 間の相互作用によるバリア機能の影響の評価を目的とし検討を行った。先行論文において、Caco-2 細胞を用いて乳糖水和物暴露によるバリア機能の低下の可能性が報告されていることから⁶、本研究でも物質の消化管吸収のモデル細胞として汎用されている Caco-2 細胞による検討を行った。

まず、乳糖水和物暴露による細胞毒性がないことを確認し、さらに Caco-2 細胞における MUC および galectin-3 のタンパク発現の確認を行った (data not shown)。

続いて、乳糖水和物 (Lactose hydrate; LH) を 0.01 ~ 0.2 M、粘液除去剤である dithiothreitol (DTT) を 0.4, 10, 50 mM の濃度で 1 時間作用させ (乳糖水和物あるいは DTT を含有する flesh な培地で 15 分毎に培地交換)、Western blotting により galectin-3 および MUC1 の発現量を評価したが、乳糖水和物による galectin-3 の引き抜き効果は確認することができなかった。しかしながら、DTT 暴露条件においても同様に、galectin-3 の引き抜き効果を確認することができなかったため、Caco-2 細胞は本モデルの評価に不適である可能性が示された (Figure 1)。

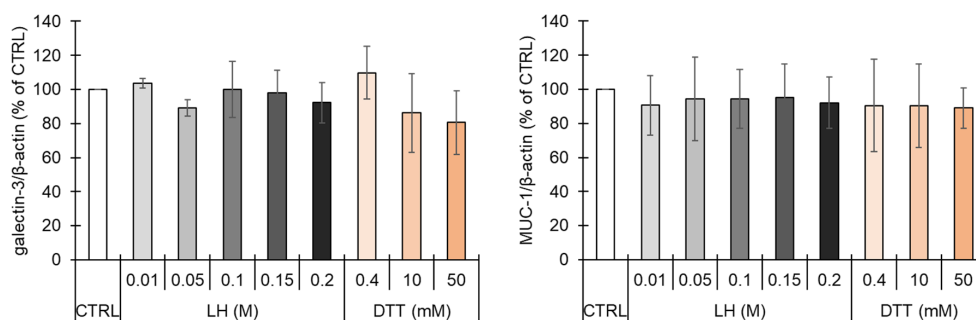


Figure 1. Effect of Lactose hydrate and DTT on protein expression level of galectin-3 (left) and IMUC-1 (right) in Caco-2 cell. Data represent means and \pm S.D. (n=3)

さらに、Caco-2 細胞における Rose bengal の細胞内取り込みおよび両透過経路を介した膜透過に対する影響を確認したが、galectin-3 タンパク発現量の結果と同様に、乳糖水和物暴露による細胞内取り込み・膜透過亢進効果は認められなかったことから (Figure 2, 3)、本検討において Caco-2 細胞を不適切であると判断し、ラット小腸を用いた検討を試みた。

ラット小腸を上部 (空腸) と下部 (回腸) に分けて検討を行った。Caco-2 細胞の検討結果と同様に、乳糖水和物の暴露による galectin-3 の引き抜き効果は空腸・回腸共に認められなかったが (Figure 4)、乳糖水和物を暴露させた小腸を用いて、paracellular marker である 5-CF と transcellular marker である β -naphthol の透過実験を行ったところ、水溶性薬物である 5-CF の透過性には変

化はなく、脂溶性物質である β -naphthol の透過量に乳糖水和物の濃度依存的な増加傾向が認められたことから (Figure 5), transcellular route を介した膜透過性の亢

進効果, すなわち非かく拌水層のバリア機能の低下が示唆された。

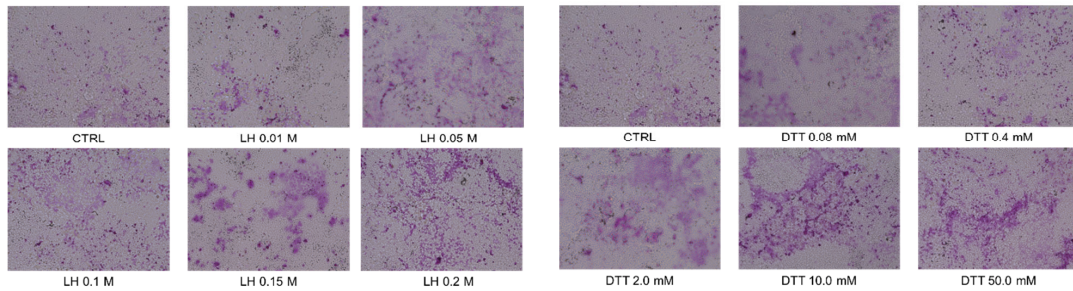


Figure 2. Effect of Lactose hydrate (Left) and DTT (Right) on uptake of Rose bengal in Caco-2 cell.

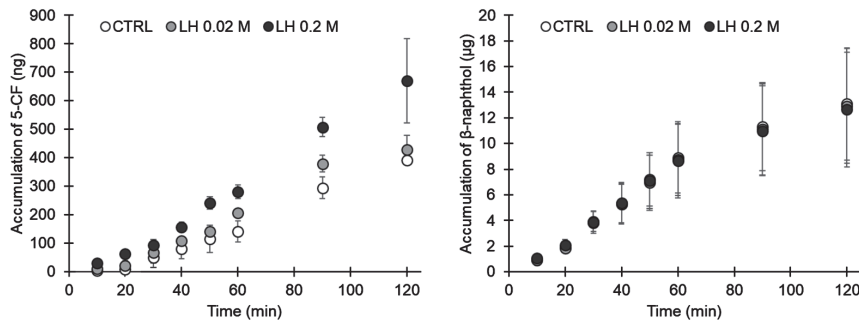


Figure 3. Effect of Lactose hydrate on membrane transport of 5-CF (paracellular marker, Left) and b-naphthol (transcellular marker, Right) in Caco-2 cell. Data represent means and \pm S.D. (n=4).

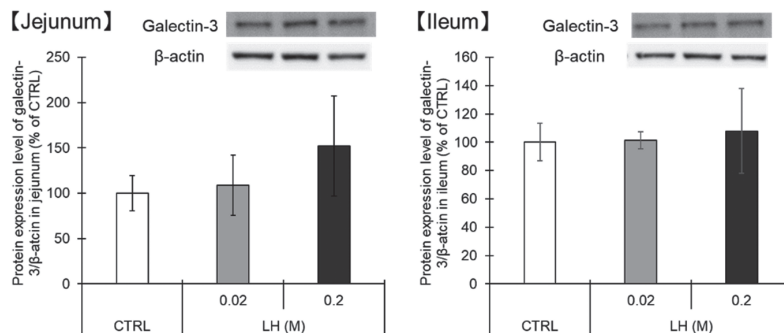


Figure 4. Effect of Lactose hydrate on protein expression level of galectin-3 in rat jejunum (Left) and ileum (Right). Data represent means and \pm S.D. (n=3).

Caco-2 細胞を用いた検討では乳糖水和物による非かく拌水層のバリア機能の低下は認められなかったが、ラット小腸にスケールアップした検討において、非かく拌水層に対する効果が示唆されたことから、乳糖水和物は脂溶性物質の膜透過を亢進させる可能性が示唆された。

一方で、Caco-2 細胞では paracellular marker である 5-CF の膜透過量に、乳糖水和物の濃度依存的な増加傾向

が認められたが、ラット小腸においては、5-CF に対する膜透過亢進効果は認められなかった (Figure 3, 5)。一方の実験系でのみの変化しか認められなかったが、乳糖水和物が paracellular route を介した透過, すなわち tight junction に影響を及ぼす可能性も考えられるため、さらなる検討が必要である。

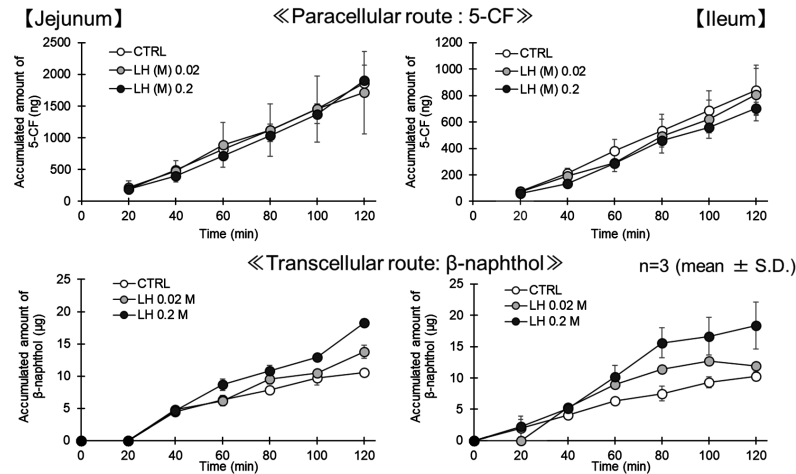


Figure 5. Effect of Lactose hydrate on membrane transport of 5-CF (Upper) and β -naphthol (Lower) in rat jejunum (Left) and ileum (Right). Data represent means and \pm S.D. (n=3).

5. 研究から得た結論・考察

本研究では、当初は Caco-2 細胞による培養細胞系を用いた実験系での検討を試みたが、培養細胞系での評価は不適であることが認められたため、動物実験での検討に変更して研究を続けた。

動物実験の結果から、乳糖水和物の暴露により galectin-3 の引き抜き効果は認められなかったが、transcellular marker に対する膜透過亢進効果が認められたことから、脂溶性物質の膜透過性亢進効果が確認された。一方で、ラット小腸では認められなかったが、Caco-2 細胞において paracellular marker に対する膜透過亢進効果が認められたことから、乳糖水和物は水溶性物質の膜透過性にも影響を及ぼす可能性が示された。

従って、本検討の結果から乳糖水和物は paracellular route および transcellular route の両経路を介した膜透過性に影響を及ぼす可能性が示されたことから、機構解明を含めたさらなる検討が望まれる。

6. 残された問題、今後の課題

本研究では、ラット小腸を用いた検討において、乳糖水和物暴露による脂溶性物質の膜透過亢進効果の可能性が認められたことから、消化管粘膜バリア機能の変動が示唆された。しかしながら、想定している機構である galectin-3 の引き抜き効果が認められていないことから、さらなる検討が必要である。仮に、乳糖水和物による galectin-3 の粘膜表面からの引き抜きが生じていたとしても、細胞内にプールされている galectin-3 量が多く、膜表面からの引き抜きが正確に評価できていない可能性が考えられる。今後は、引かれた galectin-3 を測定することで、より詳細に評価することができると考えられる。

さらに、Caco-2 細胞でのみ認められた tight junction への影響の可能性についても、乳糖水和物の濃度や暴露時間を変動させることでラット小腸においても影響が生じる可能性があるため、今回のような短時間暴露条件に加え、今後はラットの餌や飲料水に乳糖を含ませ、慢性的に摂取したモデルを用いた検討を行うことで、乳糖水和物の慢性的な暴露による消化管粘膜バリア機能の変動をより詳細に明らかにしていきたい。

乳糖水和物すなわち乳製品の慢性的な摂取により、水溶性および脂溶性物質の吸収性が変化する可能性が認められたことから、今度も本研究を継続し、乳製品摂取による物質の吸収性の変化の予測・評価法の確立に発展させていきたいと考えている。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、(公財)東洋食品研究所から多大なるご支援を戴きました。関係者の皆様に感謝致します。

8. 参考文献

- 1 Sigurdsson, Hakon H.; Kirch, Julian; Lehr, Claus-Michael: Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 2013, **453**(1), p. 56-64. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.040
- 2 Johansson, Malin E. V.; Sjövall, Henrik; Hansson, Gunnar C.: The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013, **10**(6), p. 352-361. doi: 10.1038/nrgastro.2013.35
- 3 Johansson, Malin E. V. *et al.*: Composition

- and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol. Life Sci.* 2011, **68**(22), p. 3635-3641. doi: 10.1007/s00018-011-0822-3
- 4 Piyush, Tushar *et al.*: Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. *Cell Death Differ.* 2017, **24**(11), p. 1937-1947. doi: 10.1038/cdd.2017.119.
 - 5 Tamura, Mayumi *et al.*: Potential Interaction between Galectin-2 and MUC5AC in Mouse Gastric Mucus. *Biol. Pharm. Bull.* 2020, **43**(2), p. 356-360. doi: 10.1248/bpb.b19-00705.
 - 6 Argüeso, Pablo *et al.*: Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J. Biol. Chem.* 2009, **284**(34), p. 23037-23045. doi: 10.1074/jbc.M109.033332