

ブルーベリー葉による腸管バリア構造保護効果を介した アルコール障害抑制効果

宮崎大学 農学部 応用生物科学科
山崎 正夫

1. 研究の目的と背景

飲酒は食事とともにある楽しみやコミュニケーションツールとしても日々の生活に根付いている存在である。飲酒はある一定量までは健康を害することはなく、有益であるとする報告もあるが、過剰になると有害となることは言を俟たない。一時的な過剰摂取は急性肝障害や二日酔いなどの悪影響をもたらす他、慢性的な飲酒も多くの疾患と関連することが報告されている。例えば、アルコール肝障害 (ALD: Alcohol liver disease) は過度な飲酒を継続することで発症し、アルコール性脂肪肝、アルコール性肝炎、アルコール性線維症、アルコール性肝硬変へと病状が進行し、次第に病態は不可逆的かつ致死性が高くなる。この要因としては、エタノールの肝細胞へ対する直接的な作用が考えられており、エタノールから Cyp2E1 を介したアセトアルデヒドへの代謝において産生する活性酸素の細胞障害が関与することが報告されている。さらに、エタノールやアセトアルデヒドが腸管において酸化ストレスを誘発する作用が近年注目されている。腸管上皮細胞はタイトジャンクションによって細胞間に強固なバリア構造が形成され、管腔側からの異物の侵入を防いでいる。腸管における酸化ストレスの誘発はタイトジャンクションの損傷とそれに伴う腸内細菌由来リポ多糖 (LPS) の体内への流入を引き起こし、肝臓における炎症反応の誘発が引き起こされる。実際に ALD 患者や慢性的エタノール投与による ALD モデル動物において、エンドトキシン血症が認められている。これらの背景から、腸管において酸化ストレス抑制作用を持つ物質が結果的に ALD の予防効果を持つことが期待される。

本研究ではブルーベリー葉に着目した。ブルーベリー葉は宮崎県地域結集型共同研究事業において多様な効果が見出された高機能性素材で、現在では宮崎県内で葉を収穫対象とした栽培普及も進んでいる。この事業内では、C 型肝炎のウイルス複製抑制作用が発見され、その活性本体として重合度 8 程度のプロアントシアニジンが同定され、脂肪肝抑制作用、肝臓保護作用、アルコール代謝亢進作用なども明らかとなってきた。興味深いことに、飲酒後に血中のエタノールやアセトアルデヒド濃度の上昇を抑制する効果も見出されており、アルコール代謝に対する有益な作用

が期待されている。これらの作用機序ははっきりしていないが、ブルーベリー葉は DPPH ラジカル消去能を指標とした抗酸化活性が緑茶に匹敵する程度で非常に高く、それはプロアントシアニジンを始めとするポリフェノール類によるものと考えられている。従って、酸化ストレスが関与する疾患の治療に対して有効であると考えられている。そこで、本研究ではラットを用いて、エタノール投与による大腸バリア機能への影響を評価する。さらに、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を用いてアルコール性腸管障害を評価するためのモデル構築を試みた。

2. 研究の方法

2-1. 実験動物

7 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを 1 週間の予備飼育後に、アルコール非投与、投与群 (NLD, ALD) に分けた。それぞれの群にはブルーベリー葉熱水抽出物 (BLEx) の添加群を設定した。BLEx は備前化成株式会社より提供された。調製法としては、乾燥ブルーベリー葉粉末に 16 倍量の熱水 (95-100 °C) を添加し、30 分 2 回抽出を行ったものをスプレードライで乾燥させた。食餌組成は Table 1 に示すが、Lieber-DeCarli 液体飼料を基本として調製し、BLEx 群には重量比で 3% の BLEx が含有している。なお ALD 群においては、動物をエタノール含有食に慣らすため、試験開始 1 ~ 4 日目は 1% エタノール、5 ~ 8 日目は 3% エタノール、9 日目以降に 5% エタノール含有食を投与した。摂食期間終了時に、体重を測定し、塩酸メデトミジン、ミタゾラム、酒石酸プトルフェノールを腹腔内注射し麻酔をかけた。その後、心採血により屠殺し、各種臓器を摘出した。血液からは血清を調製し、分析までは -30 °C にて保存した。血清エンドトキシン濃度は Limulus Color KY Test Wako を用いて測定した (Wako, Osaka, Japan)。本実験は宮崎大学動物実験規則に従い、実施した。

Table 1 食餌の組成

Component (g/L)	NLD	ALD	NLD + BLEx	ALD + BLEx
Casein sodium	41.4	41.4	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5	8.5	8.5
Olive oil	28.4	28.4	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7	2.7	2.7
AIN-93 Vitamin mix	2.5	2.5	2.5	2.5
AIN-93G Mineral mix	8.75	8.75	8.75	8.75
Dextrin	115.2	25.6	108.5	21.6
Cellulose	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline hydrogen tartrate	0.53	0.53	0.53	0.53
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
Ethanol	-	50.0	-	50.0
BLEx	-	-	6.6534	3.9654

2-2. カルボニル化タンパク質の測定

大腸から内容物を洗浄後 100 mg を量り取り、プロテアーゼ阻害剤 (Nacalai, Kyoto, Japan) 含有 PBS 1 ml に 0.5 φ ガラスビーズ, 5.5 φ ステンレスビーズを加え、Micro Smash TM MS-100R (TOMY, Tokyo, Japan) で 4 °C, 4,000 rpm, 240 秒間ホモジナイズした。4 °C, 12,000 × g, 20 分間遠心分離し、タンパク質濃度を定量 (Pierce® BCA protein Assay) の後、上清を解析に用いた。タンパク質濃度が 1 mg/ml になるように調整したサンプル 500 μl に対し、10 mM DNPH 含有 2N HCl を 100 ml 添加後、60 分間室温、暗所で放置した。氷上で冷やした 20% トリクロロ酢酸を 600 μl 添加したのち 15 分間氷冷し、4 °C, 10,000 × g, 5 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた。上清除去後に 20% トリクロロ酢酸を 500 μl 加え、ペレットを洗浄した。上清除去後に 1 : 1 (v/v) エタノール : 酢酸エチルで 2 回洗浄した。0.2 % SDS 含有 20 mM Tris-HCl (pH6.8) を 250 μl を添加し、ボルテックス後に 95 °C で 10 分間加熱した。DNPH 誘導体化後のサンプルは -30 °C で保存した。10 mg タンパク質相当のサンプルを 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF 膜に転写し、0.1% Tween20 含有 Tris buffered saline (T-TBS) で洗浄後、5% スキムミルク含有 0.1% T-TBS で 1 時間ブロッキングを行った。その後、anti-dinitrophenyl-KLH (Thermo, 4000 倍希釈) を室温で 2 時間、Goat anti-Rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 10000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。最後に、ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) でカルボニルタンパク質を検出した。

2.3 ウェスタンブロットによるタイトジャンクション関連タンパク質の解析

大腸から内容物を洗浄後 100 mg を量り取り、細胞溶解液 (2% プロテアーゼ阻害剤含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, and 30 mM Na₄P₂O₇ 溶液) 1 mL に ガラスビーズ, ステンレスビーズを添加して、2.2 と同様にホモジナイズ液を回収した。Caco-2 細胞の実験においては細胞溶解液で氷上 30 分間処理を行った。SDS-PAGE およびブロッティングは 2.2 と同様の方法で実施した。1 次抗体として NOS2 (Santa Cruz, 500 倍希釈), Occludin (OC-3F10; Thermo, 1000 倍希釈), CYP2E1 (Proteintech, 1000 倍希釈), β-Actin (AC-15, Sigma, 2000 倍希釈) を用い、2 次抗体には Goat anti-mouse IgG-HRP あるいは Goat anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling, 10000 倍希釈) を用いた。

2.4 腸管上皮細胞のタイトジャンクション形成への作用

Caco-2 細胞を 10% 牛胎児血清含有 DMEM 培地で培養した。2.0 × 10⁴ cells/cm² で Cell Culture Inserts in Multi-well Plate (Nunc) に播種した細胞を、1 日おきに培地交換しながら 24 日間培養し、腸管バリア構造を形成させた。エタノールは各図に示す条件で処理した。経上皮電気抵抗 (TER) は Millicell® ERS-2 (Merk Millipore) を用い測定した。TER 測定により得られた数値に有効培養面積 (0.47 cm²) の積値を TER 値とし、0 分時点の値との比率を TER 変化とした。物質透過性試験において得られた蛍光強度より 0 分時点の値との比率を算出し透過性変化の結果とした。実質的な低分子透過試験として、4 kDa FITC-Dextran (Chondrex, Inc.) を 1 mg/mL と なるように添加し、Culture Insert の basel 側で検出される蛍光強度 (Ex 490 nm/Em 520 nm) を Varioskan Flash マルチスペクトルマイクロプレートリーダーで測定した。

タイトジャンクション関連タンパク質は免疫蛍光染色法で観察した。図に示すエタノール濃度で3時間培養後にPBS洗浄し4% Paraformaldehyde含有PBSを用いて、室温15分間細胞を固定した。さらにPBS洗浄後、0.2% Triton X-100含有PBSで透過処理後に3% BSA含有PBSで30分間Blockingした。上清除去後に3% BSA含有PBSに希釈したZO-1抗体(Thermo, 50倍希釈)およびOccludin抗体(Thermo, 250倍希釈)で1時間室温にて反応させた。2次抗体にはAlexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG [H+L], Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG [H+L](Thermo, 1000倍希釈)を用いた。核はHoechst 33342で染色し、共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS LSM700)で観察、撮影した。

3. 結果および考察

血中エンドトキシンレベルは図1に示した。エタノールの摂取により、エタノールは直接的にあるいは代謝物であるアセトアルデヒドとして腸管損傷作用をもたらすことが報告されている。この損傷は腸管上皮細胞間のタイト

ジャンクションの破壊をもたらし、結果的には腸内細菌由来のエンドトキシン(LPS)の血中への流入をもたらす。本試験においては5%エタノール食を5週間投与しているが、ALD群においては緩やかな血清エンドトキシンレベルの増加が認められ、NLD群との間には有意差は認められなかった。従って、本試験におけるエタノール投与は緩やかな条件であったと考えられる。また、ALD+BLEx群においてはALD群に比べて有意に低値を示しており、BLExによって血中へのLPS流入抑制効果があることが示唆された。タンパク質カルボニル化は、タンパク質の酸化修飾の結果生じるものであり、事実エタノールの摂取により、肝臓や腸管でカルボニルタンパク質が増加することが報告されている^[1, 2]。本試験では大腸でカルボニルタンパク質の定量を行なったが、ALD群では3倍近くに増加しており(図2)、エタノール摂取に対して鋭敏に動くパラメーターであると考えられた。以前の報告で、今回と同様下で肝臓のカルボニルタンパク質を測定したところ、エタノール摂取の影響はなかったことから、腸管の方がカルボニルタンパク質が蓄積しやすいと考えられる^[3]。

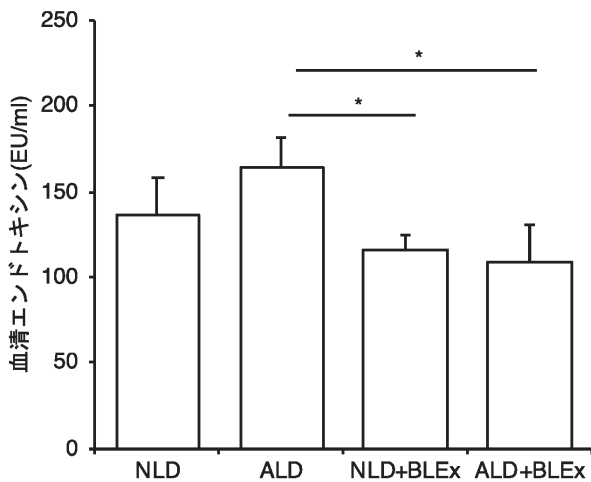


図1; エタノール投与後の血清エンドトキシンレベルに及ぼすBLEの効果

Data are means ± SD(n=5), **p* < 0.05 compared with ALD group

カルボニルタンパク質の産生につながる一酸化窒素(NO)の合成が誘導型NO合成酵素であるiNOSの発現誘導によってもたらされることが報告されており^[4]、本試験でも図3に示す通りiNOSの発現を評価した。ALD群での増加はNLD群の4倍程度であり、これも極めて鋭敏であった(図3)。図4にはoccludinの発現レベルを示した。ALDによって緩やかに低下したものの、有意差を

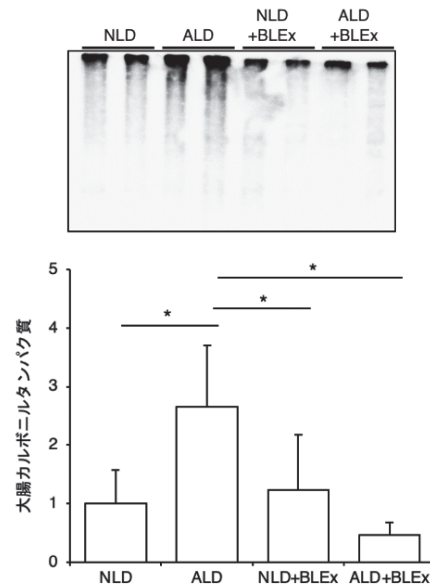


図2; エタノール投与後の大腸カルボニル化タンパク質レベルに及ぼすBLEの効果

Data are means ± SD(n=5), **p* < 0.05 compared with ALD group

認めなかった。また、ALD + BLEx群ではALD群における緩やかな低下が緩和されていた。従って、iNOSやカルボニル化タンパク質などの酸化ストレスマーカーはエタノール摂取に鋭敏に反応するものの、体内でのエンドトキシンレベルやタイトジャンクションの構造はある程度の酸化ストレスまでは保持されることが推察された。

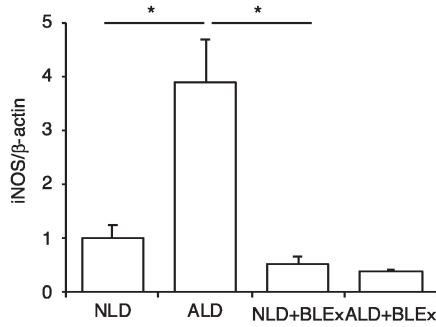


図 3 ; エタノール投与後の大腸 iNOS 発現レベルに及ぼす BLE の効果に及ぼす BLE の効果

Data are means ± SD(n=5). *p<0.05 compared with ALD group

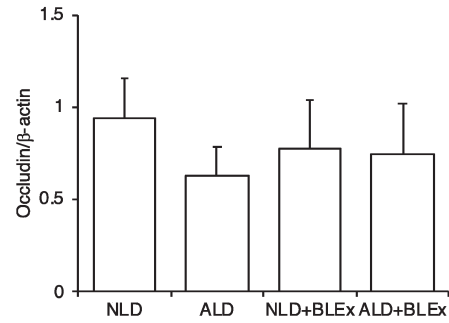


図 4 ; エタノール投与後の大腸 occludin 発現レベル

Data are means ± SD(n=5). *p<0.05 compared with ALD group

次にエタノールの腸管損傷作用を *in vitro* で再現し、食品機能性評価に利用するための実験系の構築を試みた。この試験において用いた Caco-2 細胞は 28 日程度の培養によって、単層の腸管シート様構造を形成することが知られ、食品成分の吸収性を評価するために汎用されている。本試験においても、シート様構造を形成させた後、エタノールによる処理を行った。iNOS 発現量にはエタノール添加による有意な影響は認められなかったものの、400 mM 添加では約 4 倍の増加が認められた。また、occludin レベルは 40 mM でも有意に低下しており、エタノールの影響に濃度依存性は確認できなかった。また、誘導型のエタノール代謝酵素である Cyp2E1 はエタノール濃度依存的に増加しており、Caco-2 細胞がエタノール添加に反応していることが確認できる (図 5)。また、免疫染色法で

occludin および ZO-1 を検出したところ、明瞭なタイトジャンクションの形成が確認でき、400 mM エタノール処理区ではタイトジャンクション構造が途切れている部分を確認することができた。実質的なタイトジャンクションのバリア機能を評価するため、TER と Dextran FITC の透過性を確認したところ、いずれも有意差は認められなかったが 1087 mM (5%) エタノール処理によって前者の低下と後者の増加傾向が認められ、エタノールによるバリア構造の破壊に伴う透過性亢進作用が示唆された。これらの結果から、400 mM から 1 M 程度のエタノール添加により、酸化ストレス誘発に伴うタイトジャンクションの破壊と実質的な物質透過亢進が誘導され、エタノールによるこれらの影響に対する抑制物質を探索するためのスクリーニング法として有用であることが示唆された。

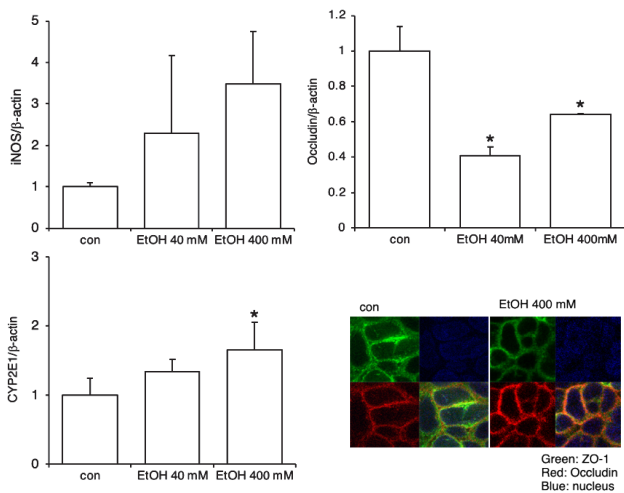


図 5 ; Caco-2 腸管上皮モデルにおけるエタノールによる障害の誘導

Data are means ± SD(n=5). *p<0.05 compared with con group

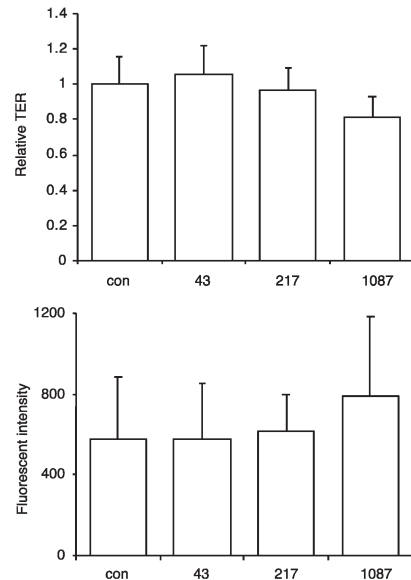


図 6 ; Caco-2 腸管上皮モデルにおけるエタノールによる物質透過性の変化

Data are means ± SD(n=3).

4. 残された問題、今後の課題

本研究ではブルーベリー葉熱水抽出物の飲酒による腸管バリア構造の損傷抑制作用を示唆した。ブルーベリー葉は当初、C型肝炎ウイルスの複製抑制効果^[5]が発見されて以来、多様な生理機能が報告されたが、抗酸化活性の強さは注目に値する^[6]。ブルーベリー葉熱水抽出物で最も主要な成分はプロアントシアニジンであり^[7]、おそらく抗酸化活性への貢献度も高いと推定される。一方で、プロアントシアニジン類は腸管吸収性が低く、3量体を超えるとはほぼ吸収性は期待できない。従って、今回示した消化管上皮での作用はブルーベリー葉の機能性を生かす有用な手段であると考えられる。飲酒による健康障害は肝臓に留まらず、腎機能や脳機能にも影響する。腸管タイトジャンクションの損傷とエタノールによる抑うつ症状との関連も指摘されており^[8]、エタノールによる実質的な影響をブルーベリー葉熱水抽出物でどれだけ抑制できるかが期待される。

5. 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。

6. 参考文献

- [1] Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, 2009, **43**(2), p.163-172. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.12.009
- [2] Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, Banan A, Fields JZ. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Hepatol*, 2009, **50**(3), p.538-547, 2009. doi: 10.1016/j.hep.2008.10.028
- [3] Yamasaki K, Sugamoto K, Arakawa T, Nishiyama K, Yamasaki M. Chronic intake of high-dose of blueberry leaf extract does not augment the harmful effects of ethanol in rats. *PeerJ*, 2019, 7:e6989. doi:10.7717/peerj.6989
- [4] Farhadi A, Keshavarzian A, Ranjbaran Z, Fields JZ, Banan A. The role of protein kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, **316**(1), p.1-7. doi:10.1124/jpet.105.085449
- [5] Takeshita, M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. 2009, *J. Biol. Chem.*, **284**, 21165-21176. doi: 10.1074/jbc.M109.004945
- [6] 松浦靖, 宮崎県におけるブルーベリー葉の機能性研究と事業化への取組, 食品と容器, 2018, **59**, 148-153.
- [7] Matsuo Y, Fujita Y, Ohnishi S, Tanaka T, Hirabaru H, Kai T, Sakaida H, Nishizono S, Kouno I. Chemical constituents of the leaves of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and characterization of polymeric proanthocyanidins containing phenylpropanoid units and A-type linkages. *Food Chem.*, 2010, **121**, 1073-1079. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.052
- [8] Maes M, Kubera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2008, **29**(1), 117-124.