

シバタ タカヒロ
柴田 貴広

共同研究者

井上 飛鳥
(東北大学大学院薬学研究科 准教授)

略 歴

2001年 3月 名古屋大学農学部 卒業
2003年 3月 名古屋大学大学院
生命農学研究科博士前期課程
修了
2006年 3月 名古屋大学大学院
生命農学研究科博士後期課程
修了
2006年 4月 同志社大学医工学研究センター
特別研究員
2007年 1月 名古屋大学大学院
生命農学研究科 助手
2007年 4月 名古屋大学大学院
生命農学研究科 助教
2013年 4月 JST さきかけ研究者 (兼任)
(2017年3月まで)
2016年 1月 名古屋大学大学院
生命農学研究科 准教授
2018年 10月 名古屋大学未来社会創造機構
ナノライフシステム研究所 兼任
2021年 1月 名古屋大学大学院
生命農学研究科 教授
2021年 1月 名古屋大学
糖鎖生命コア研究所 兼任
現在に至る

炎症性腸疾患の予防効果を示す食品成分の探索研究

炎症性腸疾患は消化管における炎症反応が関与する原因不明の慢性疾患であり、その根本的な治療法は確立されておらず、厚生労働省から難病に指定されている。そのため、炎症性腸疾患の予防や治療は患者のQOLを高める上でも極めて重要であり、社会的要求が高くなっている。近年、栄養素由来代謝物などにより活性化されるGタンパク質共役型受容体(GPCR)の存在が明らかにされてきた。中でもGPR35は、炎症性腸疾患に関連する一塩基多型が明らかにされただけでなく、GPR35ノックアウトマウスやGPR35合成アゴニストを用いた研究報告から、炎症性腸疾患の予防に関与する可能性が示唆されている。こうした背景から本研究では、GPR35を活性化する食品成分が炎症性腸疾患の予防に効果を示すのではないかと仮説を立て、GPR35に対するアゴニスト活性を示す食品成分の探索と、動物実験による検証を行うこととした。

培養細胞を用いたGPR35アッセイ系を用いてスクリーニングを行ったところ、アントシアニン類の一種であるシアニンに強い活性を見出した。また、様々なアントシアニン類の活性を評価したところ、イチゴやラズベリーなどに含まれ、特徴的な橙色を示すアントシアニン類の一種であるペラルゴニンに

最も強い GPR35 活性化能を見出した。そこでペラルゴニジンを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液により誘導される炎症性腸疾患モデルマウスに対する影響を検討した。その結果、ペラルゴニジン処理により体重減少や腸萎縮を抑制する傾向がみられた。これらの結果から、ペラルゴニジンなどの食品由来 GPR35 アゴニストは、炎症性腸疾患の予防に資する食品成分としての応用が期待される。

1. 背景および目的

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases, IBDs) は、免疫機構が破綻し免疫細胞が腸の細胞を攻撃することにより炎症応答を引き起こす疾患であり、慢性的な下痢や血便、腹痛などの症状を伴う。IBDs は主にクローン病と潰瘍性大腸炎の 2 種類に大別することができるが、クローン病は消化管のほぼすべての部位で起こりうるのに対し、潰瘍性大腸炎は大腸で主に起こる疾患とされている。IBDs は、北米やヨーロッパなどの先進国で発症率が高く、わが国においても登録患者数は計 20 万人を超えている。またその根本的な治療法は確立されておらず、生涯にわたっての治療が必要となる場合が多いことから、厚生労働省より難病に指定されている。こうした背景から、IBDs の予防や治療法の確立が社会的にも強く求められているというのが現状である。

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は、三量体 G タンパク質と結合して細胞内に外界からのシグナルを伝達する 7 回膜貫通型受容体であり、ヒトゲノム中に約 800 種類の GPCR 遺伝子が存在する。現在市販されている医薬品の半数近くは、GPCR に作用するものと推定されており、創薬の重要なターゲットとなっている一方で、いまだにリガンドが同定されていないオーファン GPCR も多数存在する¹⁾。これらの受容体に対していくつかの代謝産物がアゴニストとして作用することが示唆され、代謝物感受性 GPCR の存在が明らかになった。栄養素から、あるいは腸内細菌叢によって生成されるこれらの代謝産物は、主に肝臓や腸内分泌細胞、神経細胞および免疫細胞に発現している GPCR を標的とし、様々な作用を引き起こす。例えば、短鎖脂肪酸受容体として知られている GPR41 や GPR43 といった代謝物感受性 GPCR が免疫制御に関与しているという報告や^{2, 3)}、長鎖脂肪酸受容体である GPR40 や GPR120 が腸管ホルモン分泌に寄与することなどが報告されている^{4, 5)}。また、GPCR を活性化する食品由来成分も知られている。柑橘系果物に含まれる成分であるノミリンは、小腸に多く発現する胆汁酸受容体 TGR5 の新たなアゴニストとして作用し、肥満やインスリン抵抗性の予防に効果を示すことが報告されている⁶⁾。さらに、うま味成分としても知られるコハク酸は、GPR91 のリガンドであることが報告されおり、血圧の制御に関与することが報告されている⁷⁾。このように代謝物感受性 GPCR は、代謝性のシグナル伝達に関する研究や、特定の疾患に対する新規治療標的として注目が集まっている⁸⁾。

1998 年にオーファン GPCR として同定された GPR35 は代謝物感受性 GPCR のひとつであり⁹⁾、腸管、脾臓、泌尿器系、肝臓、胸腺、免疫細胞などで高度に発現していることが知られている^{10, 11)}。Genome-wide association study (GWAS) 解析において、潰瘍性大腸炎の早期発症に関連する GPR35 の一塩基多型 (SNP) が特定されている^{12, 13)}。また、Faroop らは、GPR35 ノックアウトマウスはコントロールマウスと比較して、薬剤誘導性の腸炎が増悪化することを報告している¹⁴⁾。さらに、腸炎モデルマウスに GPR35 の合成アゴニストであるパモ酸を投与すると、腸炎が抑制され、

腸における炎症性サイトカイン産生量が減少することも報告されていることから¹⁵⁾、GPR35は大腸炎の抑制に関与しているものと考えられる。

こうした背景から本研究では、GPR35を活性化する食品成分が炎症性腸疾患の予防に効果を示すのではないかと仮説を立て、GPR35に対するアゴニスト活性を示す食品成分の探索と、動物実験による検証を行うこととした(図1)。

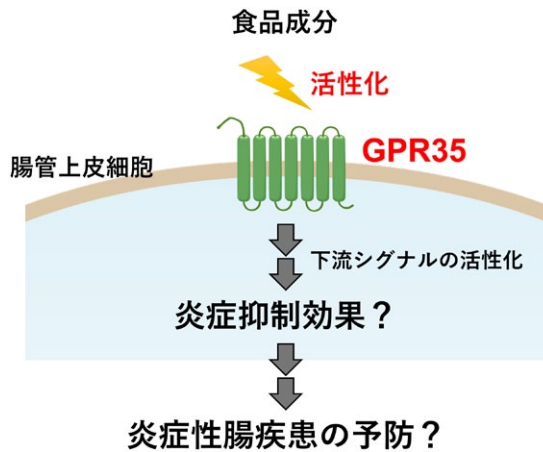


図1: 本研究の概念図

2. 実験方法

TGF α shedding assay

GPR35に対するアゴニスト活性の評価は、トランスフォーミング増殖因子 α 切断アッセイ (TGF α shedding assay) により行った¹⁶⁾。これは、GPCRの活性化に伴って活性化されるTNF α 変換酵素 (TACE)がTGF α をエクストドメインで切断するという現象を利用したアッセイ方法であり、細胞に導入したアルカリホスファターゼ融合TGF α (AP-TGF α)がTACEによって切断されることで培養上清中に遊離するAP量を測定することによりGPCRの活性化を評価する方法である(図2)。

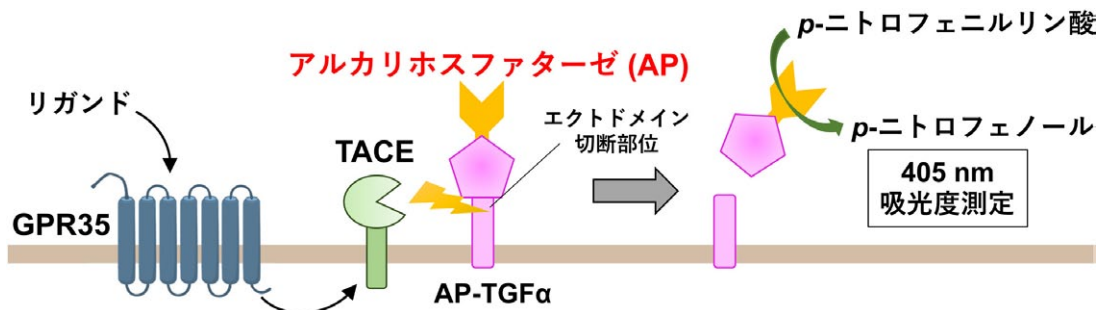


図2: GPR35活性測定方法の概略図

GPR35の活性化に伴ってTACEが活性化し、AP-TGF α を切断することにより、APが培養上清中に遊離する。このAP量を測定することによりGPR35活性化の程度を評価する。

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に対し、Polyethylenimine (PEI, ナカライテスク社) を用いて AP-TGF α 、ヒト GPR35 および G タンパク質 (Gaq/i1) の各発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞を懸濁し、96 ウェルプレートに播種した。CO₂ インキュベーター内で 30 分静置後、試料を各ウェルに添加し、さらに 1 時間培養した。1 時間後、培養上清と細胞とを分け、それぞれに基質である *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*-NPP) を加え、添加直後および添加 1 時間後の波長 405nm における吸光度をプレートリーダーにより測定した。GPR35 の活性化は、AP-TGF α の切断量 (AP-TGF α release (%)) によって評価した。基質添加直後から 1 時間インキュベーションの間の吸光度の変化量 (Δ OD₄₀₅) を各ウェルの AP 活性とし、また細胞と培養上清の各の合計を 100 % としたとき、切断されて培養上清に遊離した AP-TGF α release (%) は、次式のように求めた。

$$\text{AP-TGF}\alpha \text{ release (\%)} = \frac{\text{培養上清の}\Delta \text{OD}_{405}}{\text{培養上清の}\Delta \text{OD}_{405} + \text{細胞の}\Delta \text{OD}_{405}} \times 100$$

GPR35 アゴニスト活性を示す食品成分のスクリーニングでは、特に植物由来の生理活性物質に注目し、各成分を終濃度がそれぞれ 1 μ M になるように添加した。また阻害剤を用いた実験では、アゴニストを投与する 1 時間前に阻害剤を処理した。

動物実験

IBDs の実験モデルは、腸炎を誘導するドデシル硫酸ナトリウム (DSS) を溶解した飲水の自由摂水により誘導する系を用いた。C57BL6 マウス (オス 8 週齢) を日本クレアより入手した。1 週間予備飼育して馴化させたのち、10mg/kg body weight のペラルゴニジン溶液あるいはコントロールとしてコーンオイルを、ゾンデを用いて毎日胃内強制投与した。投与 3 日後から、飲水を 2.5 % ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に交換し、自由飲水により摂取させた。ペラルゴニジン投与後から毎日、体重を測定した。大腸炎の病状の評価は、糞便の状態により、0 ~ 6 の 7 段階で毎日評価した。また 11 日後には、マウスを安楽死させたのち、大腸を摘出しその長さを測定した (図 3)。本動物実験は、名古屋大学大学院生命農学研究科動物実験委員会の承認を得たのちに実施した。

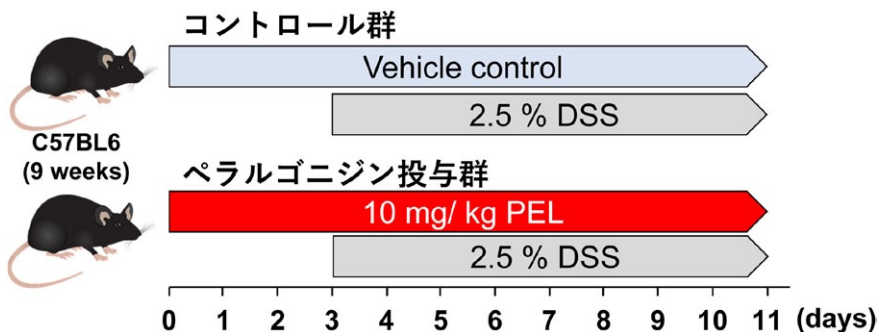


図3：動物実験のスキーム図

3. 結果

GPR35を活性化する食品成分のスクリーニング

様々な種類の食品成分（28種類）を終濃度 $1\mu\text{M}$ になるように投与し、TGF α shedding assayにより評価した。その結果、スクリーニングに供したほとんどの食品成分では顕著な活性化が認められなかったが、アントシアニン類の一種であるシアニン投与においてのみ、GPR35を活性化することが明らかとなった（図4）。

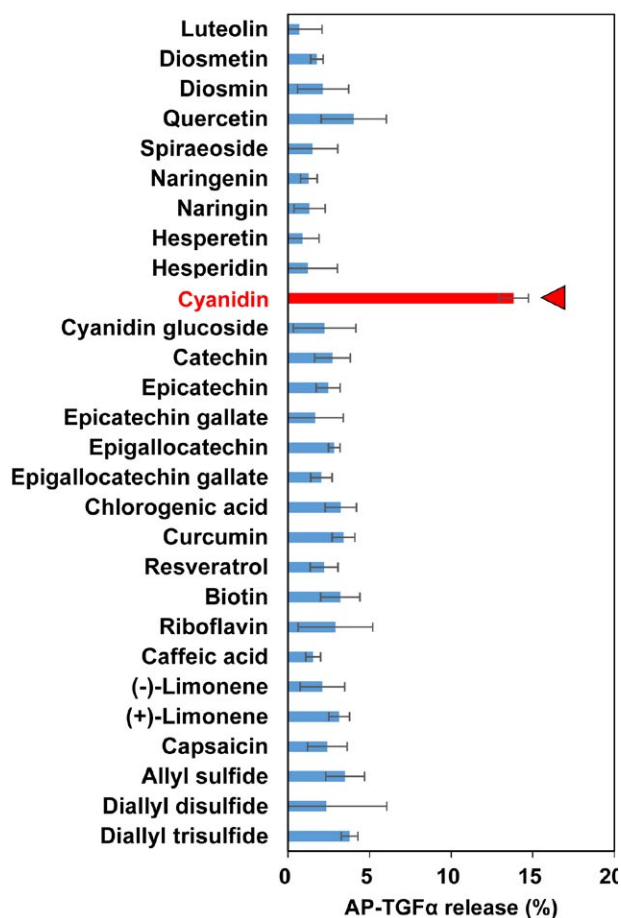


図4：GPR35を活性化する食品成分のスクリーニング
各食品成分を終濃度 $1\mu\text{M}$ になるように投与し、GPR35活性化を評価した。

天然には様々なアントシアニン類が存在する。シアニンと比較して、B環上の水酸基の数が異なるもの、B環上の水酸基がメチル化されたもの、C環に水酸基を持たないもの、などが知られている（図5）。そこで、様々なシアニン類縁体によるGPR35活性化能を評価した。その結果、シアニンと比べてB環の水酸基がひとつ少ないペラルゴニンに、シアニンよりも強い活性が認められた。一方で、B環の水酸基がひとつメチル化されたペオニンではその活性が大きく減弱することが分かった（図6）。これらの結果から、今回アッセイしたアントシアニン類の中でも、ペラルゴニンが最も強い活性を示すことが明らかになったため、以降の実験はペラルゴニンを用いることとした。

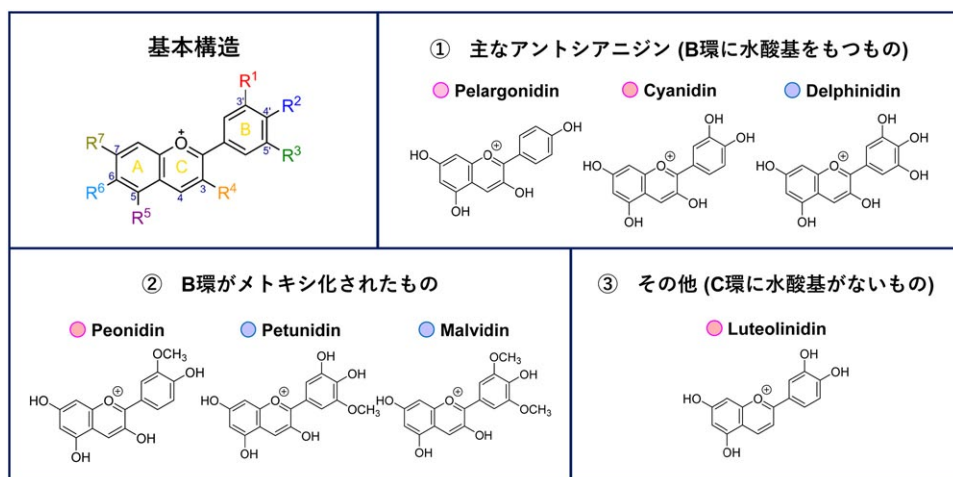


図5：アントシアニジン類の基本構造

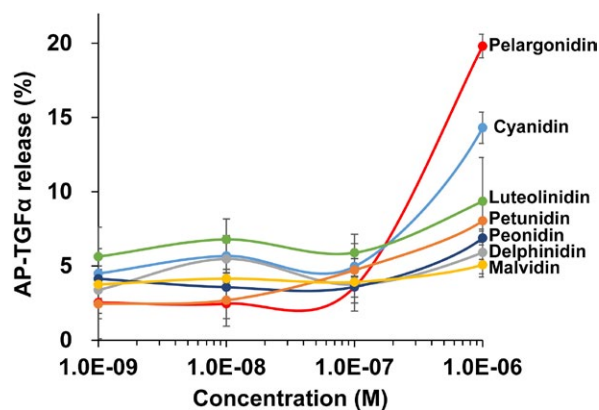


図6：アントシアニジン類によるGPR35の活性化
各濃度のアントシアニジン類を投与し、GPR35活性化能を評価した。

ペラルゴニジンによるGPR35活性化能の評価

ペラルゴニジンは、特徴的な橙色を示すアントシアニジンのひとつであり、イチゴ、ラズベリー、ブルーベリー、ザクロ、スモモ、クランベリーなどの様々な果物類に含まれていることが知られている。TGFα shedding assayを用いて、GPR35に対するペラルゴニジンの濃度依存性を評価した。その結果、ペラルゴニジンは1 μM以下の比較的低濃度でもGPR35を活性化することが確認された。また、GPR35に対する特異的阻害剤であるCID2745687を用いて解析を

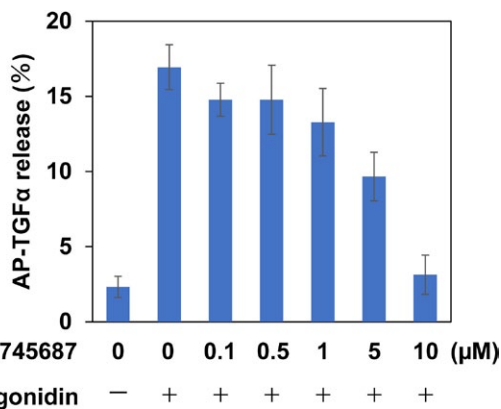


図7：ペラルゴニジンによる活性化に対するGPR35阻害剤の効果
細胞にGPR35阻害剤CID2745687を各濃度で1時間処理後、ペラルゴニジン1 μMを処理しGPR35活性を評価した。

行ったところ、この阻害剤の処理濃度依存的に AP-TGF α release (%) が減少することから、ペラルゴニンによる活性化は GPR35 依存的事であることが分かった (図7)。

GPR35 と相同性の高い GPR55 に対するアゴニスト活性を評価したところ、ペラルゴニンは活性を示さなかったことから、ペラルゴニンのアゴニスト活性は GPR35 に対して特異性が高いことが示唆された。

動物実験

ペラルゴニンが炎症性腸疾患の抑制活性を有するかどうかを検討した。ペラルゴニンを 10 mg/kg body weight になるよう、1日1回、ゾンデを用いて胃内強制投与した。ペラルゴニン投与3日後から、2.5%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (DSS) を自由飲水により摂取させた。マウスの体重は、DSS 投与6日目から減少し始めたが、コーンオイルを投与したコントロール群と比較して、ペラルゴニン摂取群において体重減少が抑制された。また、糞便の状態をスコア化して評価したところ、ペラルゴニンの投与によって改善傾向が認められた。ペラルゴニン投与から11日後に、マウスを解剖し、大腸の長さを評価したところ、ペラルゴニン投与により大腸萎縮の改善傾向が認められた。

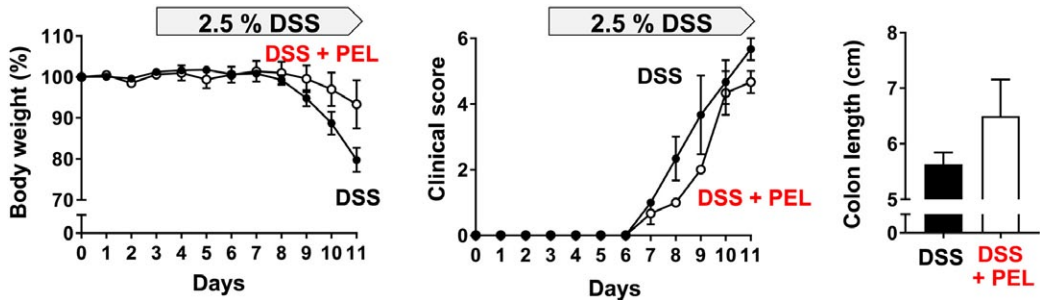


図8：DSS誘導性大腸炎モデルマウスに対するペラルゴニンの影響
体重 (左図)、糞便の状態 (中央図)、大腸の長さ (右図) に対して、ペラルゴニンの影響を評価した。

4. 考察・今後の課題や展望

今回 TGF α shedding assay を用いて、GPR35 アゴニスト活性を示す食品成分のスクリーニングを行った結果、アントシアニン類に強い活性を見出した。これまでに GPR35 を活性化する食品成分に関する報告はあまりなされていない。Jenkins らは、GPR35 を活性化する食品成分としてケルセチンやルテオリンを見出しているが、彼らの実験系では EC₅₀ はおよそ 5 μ M 程度と報告している¹⁷⁾。本研究でも、スクリーニングした食品成分の中にケルセチンおよびルテオリンが含まれていたが、いずれも 1 μ M では全く活性が認められなかった。こうしたことから、ケルセチンやルテオリンは低濃度では効果を示さない可能性が高く、食品に含まれる GPR35 アゴニストとしてはアントシアニン類の方がより重要であると考えられる。

7種類のアントシアニン類に関する GPR35 アゴニスト活性を評価したところ、ペラルゴニンが最も強い活性を示した。B 環状の水酸基の数が 1 個 (ペラルゴニン)、2 個 (シアニン)、3 個 (デルフィニン) と増えるにしたがってアゴニスト活性が低下することが分かった。また、C 環の水酸基がないもの (ルテオリニン) や B 環の水酸基がメトキシ化されたもの (ペオニン) も活性が低下する傾向に

あることが判明した。これらの結果から、GPR35によるアントシアニン類の認識には、B環およびC環部分が関与している可能性が示唆された。また、シアニン配糖体は大きく活性が低下することから、アグリコンの状態でないと活性を示さないものと考えられる。食による疾患予防を考える上でも、今後はヒト腸内細菌や代謝酵素による代謝物の活性も考慮しつつ、アントシアニン類の機能性を考えていく必要がある。

本研究では、GPR35の活性化を基軸としたIBDsに予防効果を示す食品成分の探索を行い、アントシアニン類にその活性を見出した。また動物実験の結果からも、*in vivo*でもその効果を示す可能性が示唆された。今後さらに動物を用いた解析を行うことにより、アントシアニン類を用いた食によるIBDs予防効果を実証できるものと期待される。

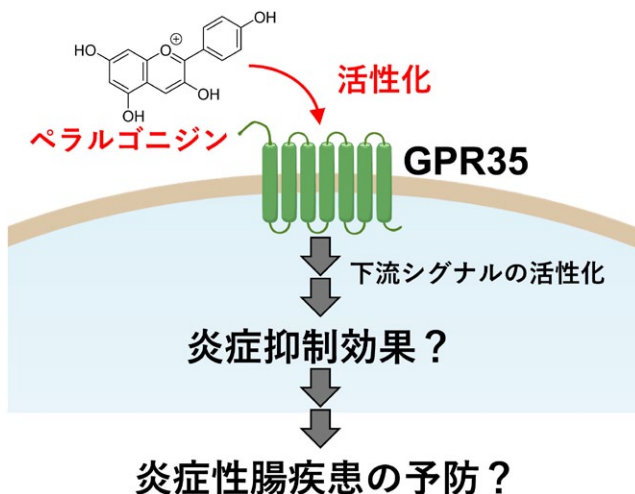


図9：本研究のまとめ

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人アサヒグループ学術振興財団に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. Filmore, D. (2004) It's a GPCR world. *Mod. Drug Discov.* 7, 24-27
2. Trompette, A. et al. (2014) Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159-166
3. Maslowski, K. M. et al. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282-1286
4. Edfalk, S. et al. (2008) Gpr40 is Expressed in Enteroendocrine Cells and Mediates Free Fatty Acid Stimulation of Incretin Secretion. *Diabetes* 57, 2280-2287

5. Hirasawa, A. et al. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90-94
6. Ono, E. et al. (2011) Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 677-681
7. He, W. et al. (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 429, 188-193
8. Husted, A. S. et al. (2017) GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metab.* 25, 777-796
9. O'Dowd, B. F. et al. (1998) Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 47, 310-313
10. Wang, J. et al. (2006) Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* 281, 22021-22028
11. Barth, M. C. et al. (2009) Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J. Biol. Chem.* 284, 19189-19195
12. Imielinski, M. et al. (2009) Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 41, 1335-1340
13. Ellinghaus, D. et al. (2013) Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. *Hepatology* 58, 1074-1083
14. Farooq, S. M. et al. (2018) Disruption of GPR35 Exacerbates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Dig. Dis. Sci.* 63, 2910-2922
15. Tsukahara T. et al. (2017) G protein-coupled receptor 35 contributes to mucosal repair in mice via migration of colonic epithelial cells. *Pharmacol. Res.* 123, 27-39
16. Inoue A. et al. (2012) TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods.* 9, 1021-1029
17. Jenkins, L. et al. (2010) Identification of novel species-selective agonists of the G-protein-coupled receptor GPR35 that promote recruitment of β -arrestin-2 and activate G α 13. *Biochem. J.* 432, 451-459.