

LGG 菌による腸管上皮細胞の保護作用を確認

2012年3月22～26日 日本農芸化学会 2012年度大会にて発表(※)

タカナシ乳業株式会社(本社:神奈川県 社長:高梨信芳)は、米国 Vanderbilt 大学(Fang Yan 准教授)との共同研究により、プロバイオティクス乳酸菌である LGG 菌(ラクトバチルス GG 株)の腸管上皮の保護作用について確認いたしました。これらの最新の研究結果は、日本農芸化学会 2012 年度大会(3月22～26日)で発表しております(※)。

最新結果のまとめ

1. 炎症性サイトカイン TNF- α をマウス大腸上皮由来の YAMC 細胞へ添加するとアポトーシス(細胞死、*1)が誘導されましたが、LGG 菌発酵乳の遠心上清を添加することによって TNF- α によって誘導されたアポトーシスが抑制されました。この結果より、LGG 菌発酵乳は腸管上皮の恒常性の調節に関与している可能性が示唆されました。
2. 過酸化水素水を YAMC 細胞に添加すると腸管上皮のタイトジャンクション(*2)が破壊されましたが、LGG 菌発酵乳の遠心上清を添加することによって過酸化水素水によるタイトジャンクションの破壊が抑制されました。この結果によって、LGG 菌発酵乳が腸管上皮細胞のバリア機能の破壊を防ぎ、腸管上皮を保護していることが示唆されました。

(*1) アポトーシス:細胞の死に方の一つであり、色々な仕組みで制御されている。アポトーシスによる細胞の死は、生物が生きる為に必要不可欠であるが、その制御バランスが崩れると様々な疾患へと繋がる。

(*2) タイトジャンクション: 隣り合う上皮細胞が密着して結合している部分で、細胞と細胞の間を物質が通り抜けてしまうことを防いでいる。腸管上皮のバリア機能を支える重要な構造。

腸の表面を構成する腸管上皮細胞は、栄養素の吸収だけでなく、病原菌や有害な異物の侵入を物理的に防ぐバリア機能や免疫を活性化させるための情報伝達機能など様々な役割を担っています。腸管上皮細胞の機能が損なわれると、病原菌の感染やアレルギー物質の体内への侵入が容易になり、また免疫機能がうまく働かず、結果として健康に様々な影響を及ぼします。

当社では、これまでに米国 Vanderbilt 大学 Yan 准教授との共同研究により、LGG 菌発酵乳による炎症性腸疾患の予防作用をテーマに、腸管上皮に対する LGG 菌発酵乳の作用について研究を行ってまいりました。炎症性腸疾患は、その発症メカニズムがよく分かっておりませんが、炎症性サイトカインの過剰な分泌や活性酸素によって腸管上皮の傷害が起こっており、正常な状態が失われていることが知られております。

昨年の当社の研究成果では、LGG 菌発酵乳を投与したマウスでは、DSS 誘発性大腸炎(*3)による腸管上皮のダメージが抑制されることが明らかになりました(日本農芸化学会2011年度大会)。また、LGG 菌発酵乳から遠心分離した水溶性画分を YAMC 細胞へ添加すると、上皮細胞の成長に関わる細胞内の情報伝達経路である EGF 受容体(*4)と Akt(*5)が活性化されることを確認しております。従いまして、LGG 菌発酵乳は、腸管上皮細胞の EGF 受容体や Akt の活性化というステップを踏んで、腸管上皮細胞の成長を促進し、ダメージから保護していると推測されています。

そこで、今回の研究では、LGG 菌発酵乳による腸管上皮細胞のダメージ抑制効果のメカニズムをさらに明らかにするために、YAMC 細胞を用いて炎症性サイトカインである TNF- α によって誘導されるアポトーシスの抑制と、過酸化水素水を用いた酸化に対する腸管上皮バリア機能の保護効果について検討いたしました。

- (* 3) DSS 誘発性大腸炎：界面活性剤の 1 種である DSS を用いて人為的に誘発した大腸炎。炎症性腸疾患のモデルとして、しばしば動物実験で用いられる。
- (* 4) EGF 受容体：上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) と結合する受容体タンパク質。EGF と結合すると活性化し、細胞の成長促進メカニズムが働き始める。
- (* 5) Akt：細胞の成長に関わるシグナル伝達経路に働くリン酸化酵素 (タンパク質) の一つ。

(試験 1)

LGG 菌発酵乳を遠心分離し、その遠心上清を YAMC 細胞に添加しました。さらに、細胞にアポトーシスを誘発させるために TNF- α を添加し 6 時間培養したのち、TUNEL 染色 (* 6) を行いました。通常細胞 (図 1 - ①) では、アポトーシスを起こした細胞は検出されませんでした。TNF- α で処理することによって、アポトーシスを起こした細胞 (茶色に染色) が観察されました (図 1 - ②)。LGG 菌発酵乳の遠心上清を加えた細胞では、ほとんど染色された細胞が見られないのに比べ (図 1 - ③)、LGG 菌を含まない乳 (非 LGG 菌乳) ではアポトーシスを起こした細胞が観察されました (図 1 - ④)。また、LGG 菌発酵乳のアポトーシスを抑える効果は、EGF 受容体キナーゼ阻害剤 AG1478 (* 7) を添加することによって失われました (図 1 - ⑥)。図 1 の右のグラフは、TUNEL 染色によって染まった細胞の数をグラフに表したものです。

【図 1】

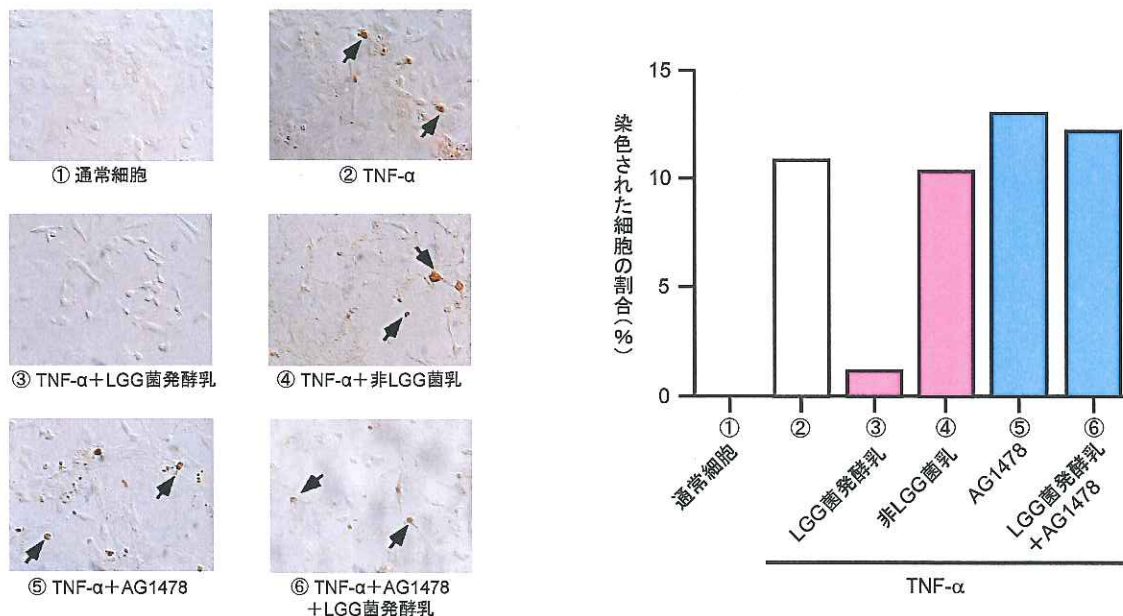


図 1. LGG 菌発酵乳による TNF- α 誘導性アポトーシスに対する抑制効果

※ 矢印:アポトーシスを起こして核が茶色に染色された細胞

- (* 6) TUNEL 染色：アポトーシスを起こした細胞を検出する方法の一つ。
- (* 7) AG1478：EGF 受容体の活性化を阻害する試薬。

(試験2)

LGG 菌発酵乳の遠心上清を YAMC 細胞に添加し、18 時間培養しました。その後、過酸化水素水を添加し、さらに 2 時間培養したのち、タイトジャンクション周辺に局在するタンパク質 ZO-1(*8)に対する抗体を用いて免疫染色を行いました。通常細胞の場合は、細胞と細胞間を繋ぐタイトジャンクションが形成されており、細胞膜周辺に ZO-1 が局在していることが分かります(赤く染色されている部分が ZO-1:黄色矢印)(図2-①)。過酸化水素で処理した細胞ではタイトジャンクションが破壊され、ZO-1 が細胞の内部へ移動(白色矢印)していることが確認できます(図2-②)。LGG 菌発酵乳の遠心上清を添加した細胞では、過酸化水素によるタイトジャンクションの破壊が抑制されており、通常細胞と同じように細胞周辺に ZO-1 が局在しています(図2-③)。しかし、非 LGG 菌乳を添加した場合(図2-④)、AG1478 を添加した場合には(図2-⑤)は、タイトジャンクションが破壊され、ZO-1 が細胞質へ移動しています。

【図2】

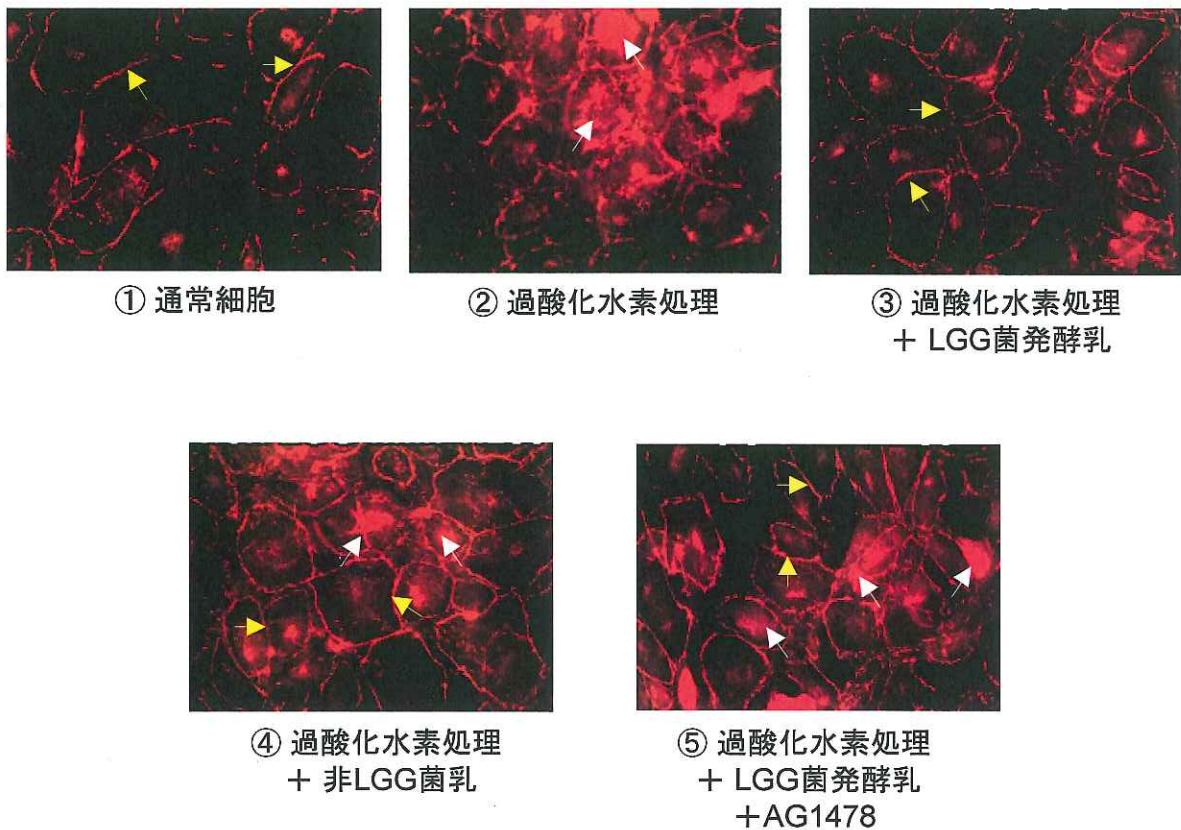


図 2. 過酸化水素水で誘導されたタイトジャンクションの破壊に対する LGG 菌発酵乳の抑制効果

- ※ 赤く染色された部分が、タイトジャンクションの裏打ちタンパク質 ZO-1 を示す。
- ※ 矢印(黄):タイトジャンクションに局在する ZO-1 が染色されている部分。
- ※ 矢印(白):タイトジャンクションの破壊によって、細胞内へ移動した ZO-1。

(*8) ZO-1: 細胞外でタイトジャンクションを形成しているタンパク質(クローニンなど)を細胞内で支える役割を担っているタンパク質。

今回、LGG 菌発酵乳を YAMC 細胞に添加することによって、TNF- α 誘導性アポトーシスや過酸化水素によるタイトジャンクションの破壊が抑制されました。また、LGG 菌を含まない非 LGG 菌乳では、これらの作用が見られていないことから、LGG 菌発酵乳中に含まれる成分が、この抑制作用に関与していると考えられました。また、EGF 受容体の活性化を AG1478 で阻害することによって、アポトーシス抑制作用やタイトジャンクションの保護作用が失われることより、EGF 受容体の活性化が重要な要因であることが示唆されました。

これらの結果は、LGG 菌発酵乳が腸管上皮の細胞の成長やアポトーシスを制御し、バリア機能を保護することによって、腸管上皮の健全性を保つことを可能にしていると考えられます。

(この研究は、米国 Vanderbilt 大学医学部 小児科 准教授 Fang Yan 博士との共同研究です。)

【LGG 菌】(*L.rhamnosus* GG) はヒト腸内から分離された乳酸菌で、胃酸・胆汁酸に対して耐性があり、整腸作用効果が報告されています。また、抗アレルギー作用についての研究が盛んにおこなわれており、近年、北欧で行われた臨床試験で小児のアトピー性皮膚炎の発症予防効果が報告されています。この乳酸菌は、アメリカで発見され、フィンランドのパリオ社により商品開発された乳酸菌です。

【お問い合わせ先】

タカナシ乳業株式会社 管理部 広報課

担当：長井

〒240-0005 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町 134

横浜ビジネスパーク テクニカルセンター1F

TEL:045(338)1828 FAX:045(338)1845

【本件ご掲載に関するお問い合わせ先】

株式会社 Kプレス

担当：赤羽

〒105-0004 東京都港区新橋1-7-11 橋善ビル4F

TEL:03(6215)6204 FAX:03(6215)6201

e-mail: akabane@kpress.co.jp