

<設立 30 周年記念研究助成 (平成 27 年度助成)>

## 消化管で食品機能性を媒介する未知因子の解明

村上 明

(兵庫県立大学 環境人間学部)

### 研究目的

ポリフェノールに代表されるファイトケミカルは、抗発がん作用や抗肥満作用など様々な生理機能性を有することが古くから知られている。その一方で、ファイトケミカルの作用機構は薬剤などに比べると不透明な部分が多い。本研究では、ファイトケミカルが吸収されにくい反面、血中でも効果を示す点に着目し、ファイトケミカルによって消化管から何らかの未知のメディエーターが分泌され、機能性を媒介しているという仮説を立て、その実証を目的とした。具体的なメディエーター候補としては、細胞外小胞 (extracellular vesicles, 以下 EV と記す) に焦点を当てた。

EV は、20-200 nm の球状のリン脂質二重層膜小胞で、種々の外界ストレスを受けると分泌される。EV 内には分泌細胞の形質を反映するストレス応答性の防御タンパク質、例えば種々の熱ショックタンパク質 (Heat shock proteins, HSPs) や miRNA が数百種類内包されている。

### 実験方法および結果

#### (1) 培養細胞およびラット血清中 EV の精製法の確立

生体試料からの EV の回収・精製法にはいまだ決定的なものはなく、高比重タンパク質の混入などが問題となっている。本研究課題を遂行するにあたり、簡便で効率の良い EV 調製法は極めて重要であることから、まずその検討を実施した。

#### (a) 培養細胞からの調製

HT29 細胞 (ヒト結腸がん細胞、 $3.0 \times 10^7$  cells) を DMEM 中で前培養した。培地を捨て PBS で洗浄後、ウシ胎児血清を含まない DMEM 中で 48 時間培養した後、培地を回収し、1,600 g で 1 分間遠心分離した。上清を回収し、再び 100,000 g で 60 分間遠心分離した。上清を捨て PBS でペレットを懸濁し、再び上記と同じ方法で遠心分離した。DMEM でペレットを懸濁し、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ウエスタンブロット法によって、EV 特異的マーカーである CD9 および CD63 さらに細胞質マーカーとして  $\alpha$ -tubulin の検出を試みた。その結果、EV マーカーである CD9 および CD63 は EV 画分で、細胞質マーカーである  $\alpha$ -tubulin は細胞質画分 (cell lysate, CL) でそれぞれ選択的に検出された。

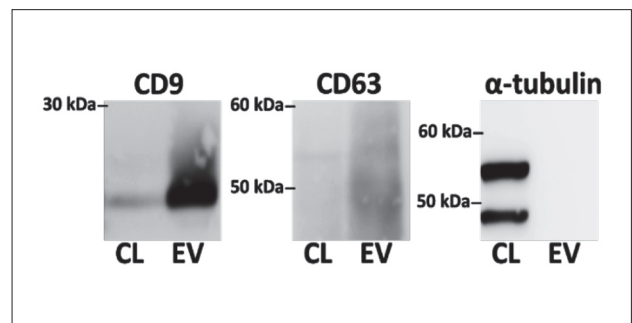


図1 細胞質および EV マーカーの確認  
EV マーカー: CD9、CD63; 細胞質マーカー:  $\alpha$ -tubulin; 解析タンパク質量:  $14 \mu\text{g}/\text{lane}$ ; CL: 細胞溶解液 (cell lysate)

#### (b) ラット血清からの EV 試料の調製

SD ラット血清から EV 試料を調製するに際し、①分画法 (qEV カラム, 市販)、②超遠心法、および③濃縮回収法 (Total Exosome Isolation 試薬, 市販) を用いて、それぞれにおける EV の純度比較を行った。また、使用した血清量は①  $500 \mu\text{L}$ 、②  $500 \mu\text{L}$ 、

③ 1 mL とし、CD9 と血清アルブミンをウエスタンブロット法で検出した（予備実験により CD63 は検出されないことを確認している）。

Murota らは、ケルセチン代謝物はアルブミンに結合すると報告している<sup>1)</sup>ため、EV 画分からアルブミンを除去する必要がある。CD9 に関しては、方法①-8、9、方法②、方法③で顕著に検出された。しかし、方法②、方法③では、アルブミンが混入していた。一方、方法①では、EV が顕著に検出された画分ではアルブミンは検出されなかった。したがって、qEV カラムを用いることで、純度の高い EV 画分が回収できることが明らかとなった。

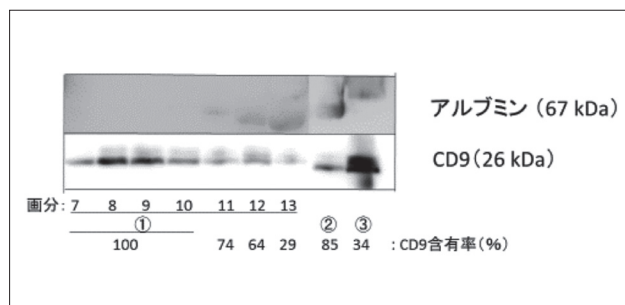


図2 ラット血清由来 EV 画分のウエスタンブロット解析

## (2) ケルセチン処理した細胞由来 EV における機能性分子の発現解析

HT29 ヒト大腸がん細胞 ( $1 \times 10^7$  cells/10 mL on 100 mm dish を 3 枚分) を前培養し、無血清 DMEM へ置換後、ケルセチン (100  $\mu$ M) で 1 時間処理した。細胞を PBS で洗浄後、細胞培地中のケルセチンを除去し、さらに 24 時間培養した。EV 試料は (1) に記した方法で調製した。

まず、細胞溶解液試料 (①および②) では  $\alpha$ -tubulin のバンドが明確に認められ、その一方で、EV マーカーである CD9 と CD63 については検出されなかった。それとは対照的に、EV 試料 (③および④) では完全に逆の結果が得られたことから、EV 試料の調製に問題がないことが確認できた。

また、非常に興味深いことにケルセチン処理した細胞由来の EV では、HSP40 および HSP70 の発現レベルが顕著に増加していた。HSP タンパク質の誘導に代表される熱ショック応答 (heat shock response)

においては、炎症関連遺伝子の鍵転写因子である nuclear factor kappaB (NF $\kappa$ B) の活性化などが抑制されることが知られている<sup>2,3)</sup>。従って、ケルセチン処理によって細胞から分泌される EV 中における HSP の発現量が増加するという事実は、これを介したケルセチンの新しい抗炎症機構を強く示唆するものであると考えている。

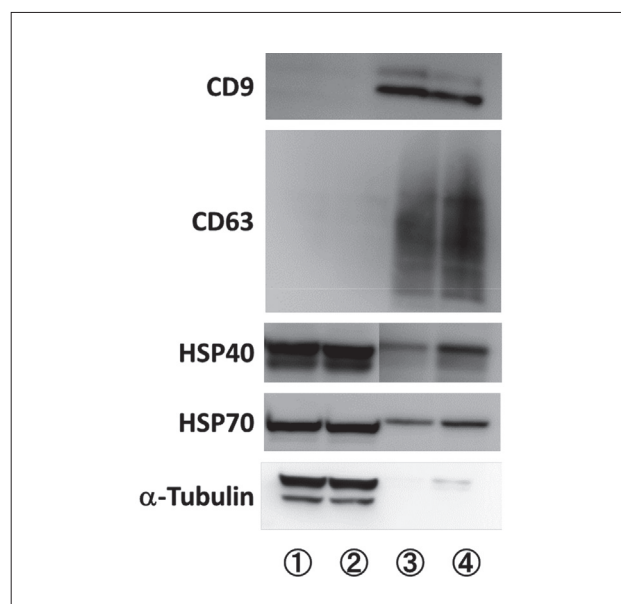


図3 ケルセチン処理した HT29 細胞およびその EV 試料におけるマーカー解析

- ①コントロールの細胞試料、②ケルセチン処理した細胞試料
  - ③コントロールの EV 試料、④ケルセチン処理した細胞由来の EV 試料
- CD9 と CD63 は EV マーカー、 $\alpha$ -tubulin は細胞質マーカー

## (3) ケルセチン処理細胞 EV 由来の代謝産物の解析

一方、摂取したファイトケミカルが EV 中に内包され、それが血中へ放出される可能性も検証した。HT29 細胞をケルセチン (100  $\mu$ M) で 1 時間処理した後、細胞外のケルセチンを洗浄除去し、24 時間培養した。その後、EV を回収、ケルセチンおよびその代謝物をメタノールで抽出し、真空デシケーターで濃縮乾固した。また、ケルセチン除去後の細胞内ケルセチン量に対する 24 時間後の EV 内、細胞内、培地中のケルセチン量の比率を算出するため、各画分について上記と同様の方法で抽出および濃縮乾固操作を行った。濃縮乾固した各試料を 100  $\mu$ l のメタノールで溶解し、四重極型 liquid

chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)にてケルセチンおよびその代謝物の検出を試みた。また、試料回収時に、ケルセチン-3-グルコシドあるいはケンフェロールを内部標準として用いた。

その結果、細胞洗浄後に細胞内に存在していたケルセチンを100%とした場合、EV画分ではケルセチン自体が $0.0434 \pm 0.0294\%$ 、そのメチル化代謝産物であるイソラムネチンも $1.30 \pm 1.21\%$ 検出できた。一方、イソラムネチン以外の既知の代謝物(ケルセチン-3-グルクロニド、ケルセチン-3'-サルフェート、ケルセチン-4'-サルフェート)の検出も試みたが、全て検出限界以下であった。また、細胞中ではケルセチンが $1.90 \pm 2.46\%$ 、イソラムネチンが $11.0 \pm 2.10\%$ 、培地中ではケルセチンが $5.93 \pm 10.4\%$ 、イソラムネチンが $2.96 \pm 9.87\%$ 検出された。

以上の結果から、ケルセチン処理したHT29細胞からはケルセチンとそのメチル化代謝産物であるイソラムネチンを放出していることが明らかとなった。これはファイトケミカル処理細胞由来のEVにそのファイトケミカルが内包されていることを明らかにした初めての例である。

## 考察と今後の展望

本研究課題は、EVを介した、ファイトケミカルの新しい作用メカニズムの存在を提唱することを目的とした。代表的なファイトケミカルの1種であるケルセチンで処理した培養細胞から放出される、EV中における抗炎症性分子(HSP40およびHSP70)が増加することを見いだした。また、放出EV中にケルセチンやそのメチル化体が存在することを示唆したが、EVが血中で安定性が高い、あるいは脳関門を通過できるという事実を考慮すると、EVを介した末梢組織への新しい送達機構としての可能性も想定できる。今後は、EVの機能性について広く精査し、また*in vivo*での同様な機構の検証が必要になると考えている。

## 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、多大な援助を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Murota K, *et al.*, Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *J Med Invest.* 2007;54:370-374.
- 2) Heneka MT, *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:800-11.
- 3) Feinstein DL, *et al.*, *J Biol Chem.* 1996;271:17724-32.

## **Identification of unknown factor(s) mediating food functionality in the gastrointestinal tract**

**Akira MURAKAMI**

*Department of Food Science & Nutrition, School of Human Science & Environment,  
University of Hyogo*

Dietary phytochemicals, including polyphenols, have been shown to exhibit pronounced and versatile bioactivities, including anti-oxidation and anti-inflammation effects. However, it should be mentioned that the mechanisms of action underlying such bioactivities have not yet been fully elucidated. For instance, while the anti-oxidant effects of natural polyphenols have long attracted the attention of an untold number of food scientists, their roles in and contribution to their bioactivities are controversial due to their poor bioavailability, which results in extremely low concentrations in the blood stream. Meanwhile, extracellular vesicles (EV) have recently emerged as important and essential signal mediators released from many types of cells. In this study, the possibility was explored that phytochemicals exhibit their physiological functions via EV release from gastrointestinal cells, which are exposed to phytochemicals. As a result, this study uncovered that quercetin-exposed HT29 human adenocarcinoma cells release EVs in which the levels of anti-inflammatory proteins (*i.e.*, HSP40 and HSP70) are markedly increased, compared to those from vehicle-treated cells. Moreover, the EV from quercetin-treated cells contained quercetin and its methylated metabolite, isorhamnetin, as semi-quantified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The half-lives of biomolecules (proteins, RNA, DNA, *etc.*) contained in EVs in the blood stream have been reported to be much longer than those of EV-free forms, and they are also able to penetrate the blood-brain barrier. Thus, the present results propose a novel delivery system for phytochemicals from the gastrointestinal tract to peripheral tissues, as well as a unique mechanism underlying their bioactivities.