

マイクロアレイ解析を用いたラット小腸における サラシア属植物エキスの免疫亢進機能の発見

小田 由里子*, 植田 文教*, 柿沼 千早**, 中村 孝昭**, 中村 善貞*

Investigation by microarray analysis of the immunostimulatory function of an extract of the genus plant Salacia in the small intestine of rats

Yuriko ODA*, Fumitaka UEDA*, Chihaya KAKINUMA**,
Takaaki NAKAMURA**, and Yoshisada NAKAMURA*

Abstract

In our previous studies, Salacia extracts demonstrated beneficial effects on the enteric environment of the rat, as represented by decrease in ammonia and other products decomposed by enteric microorganism. In the present study, we showed that the expression of immunologically relevant genes increased in the epithelium of the small intestine from the rat orally dosed with Salacia extracts. T-RFLP analysis (Nagashima method) revealed altered composition of intestinal flora. Salacia extracts reportedly inhibit enzymatic degradation of polysaccharides, hence blocking the intestinal absorption of polysaccharides. These results taken together suggested that unabsorbed polysaccharides may affect the intestinal flora environment through the enteric immune system of the rat.

1. 緒言

サラシア属植物（サラシアレティキュラータ，サラシアオブロンガなど）エキスに含まれる全成分の同定はできていないが¹⁾，サラシノール，コタラノール，マンジフェリン，カテキンを始めとする多くの成分が含まれていることが明らかになっている。

サラシア属植物から抽出されるサラシノールとコタラノールは*in vitro*の実験において α -グルコシダーゼの働きを阻害することが知られており，糖負荷ラットの血糖値上昇を抑制する効果を有していることが明らかにされている²⁾。また，サラシア属植物エキスは，糖尿病患者や糖尿病モデルマウスにおいて症状を改善する作用があることが証明されている³⁾。

α -グルコシダーゼが分泌されている小腸は，異物の排除や栄養成分の取り込み，免疫機能を司る生体にとつ

て非常に重要な器官であり，サラシア属植物エキスの作用部位であると考えられている。しかし，腸管においてサラシア属植物成分がどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。

また，サラシア属植物エキスに含まれるカテキン，マンジフェリンなどの成分は，抗肥満作用を持つことでも知られている⁴⁾。さらに，サラシア属植物に関する新発見も続々と明らかにされている^{5), 6)}。しかし，現在までのところサラシア属植物エキスの糖尿病や肥満以外の効果や生体での作用機序に関する知見は乏しく，サラシア属植物エキスに含まれる複数成分が及ぼしている作用についても不明確なままである。

本研究は，糖吸収阻害の作用部位であり，吸収，異物の排除など多様な機能を示す小腸におけるサラシア属植物の生理機能解明を目的とした。実験では，サラシア属植物エキスをラットに投与し，マイクロアレイ法による

本誌投稿論文（受理2009年11月20日）

*富士フイルム（株）R&D統括本部

ライフサイエンス研究所

〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

*Life Science Research Laboratories

Research & Development Management Headquarters

FUJIFILM Corporation

Ushijima, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa

258-8577, Japan

**富士フイルム（株）R&D統括本部

医薬品研究所

〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

**Drug Discovery Research Laboratories

Research & Development Management Headquarters

FUJIFILM Corporation

Ushijima, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa

258-8577, Japan

遺伝子発現解析とT-RFLP法による腸内細菌叢のプロファイリングを行なった。その結果、サラシア属植物エキスの摂取は、小腸下部において複数の免疫関連遺伝子、特に細胞性免疫を示すTh1関連遺伝子の発現上昇をもたらした。大腸では、免疫機能を有する菌の増加など、腸内細菌叢の変化を引き起こすことを明らかにした。

2. 実験

2.1 サラシア属植物エキス粉末の作製

スリランカで生育したサラシア属植物 (*Salacia reticulata*) の幹と根の部分乾燥させて、チップ状にした。十分に乾燥させた後、チップを熱水にて1時間抽出した。チップを濾過して除去した後、液体を冷却し、スプレードライヤー ADL-310 (Yamato Science Co., Ltd., Tokyo, Japan) にてエキスを粉末化し、4℃で保存した。

2.2 動物

生後6週齢のオスのSprague Dawleyラット (SDラット) (CLEA Japan, Inc., Shizuoka, Japan) を購入し、1週間の検疫馴化を行なった。飼育条件は室温 23 ± 2 ℃、相対湿度 50 ± 10 %、喚起回数15回/時間、人工照明1日12時間に設定して飼育を行なった。試験動物には飼料として放射線滅菌済みの固形飼料CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を自由摂取させ、飲水には、水道法水質基準に適合した水道水をフィルター濾過 ($50 \mu\text{m}$ and $5 \mu\text{m}$) (AION Co., Ltd., Osaka, Japan) 後、紫外線照射により殺菌したものを自動給水ノズルで与え、自由摂取とした。飼育1週間後、ラットをランダムに10匹ごとの群に分けた。サラシア属植物エキス粉末を80mg/mlの濃度となるように注射用水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に溶解し、金属性胃ゾンデを用いてサラシアエキス粉末重量にして20mg/kgになるように強制経口胃内投与した。また、対照群に対しては、注射用水のみ投与した。1日1回13週間反復投与を行ない、投与最終日の夕刻から、16時間の絶食を行ない、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血を行なった後、放血により安楽死させた。解剖では各臓器の重量測定および状態観察を行なった。ラットの回腸を摘出し、上皮細胞を剥離し、ISOGEN (NIPPON GENE Co., Ltd., Tokyo, Japan) 中で保存した。また、大腸下部から便を採取し、ドライアイスにて凍結保存した。

解剖時に後大静脈から採取した血液は、EDTA-2Kを抗凝固剤として添加した後、生化学的検査を行なった。

血液検査の項目は、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、網赤血球率 (Reti)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、総蛋白濃度 (TP)、アルブミン濃度 (ALB)、A/G、トリグリセライド (TG)、

総コレステロール (T-CHO)、尿素窒素濃度 (BUN)、クレアチン (Cre)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、AST活性 (AST)、ALT活性 (ALT)、CPK活性 (CPK)、総ビリルビン (T-BIL)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl) である。WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, Retiに関しては、総合血液学検査装置XT-2000iV (Sysmex Co., Ltd., Hyogo, Japan) を用いて測定した。また、PT, APTTは全自動血液凝固線溶測定装置STAコンパクト (Roche Diagnostics K.K. Tokyo, Japan) を用い、TP, ALB, A/G, Glu, TG, T-CHO, BUN, Cre, Ca, IP, AST, ALT, GGT, ALP, CPK, T-Bil, Na, K, Clは血液生化学自動分析装置H7070 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) にて測定した。

各群の体重、臓器重量 (絶対重量および相対重量) データ、血液生化学的検査データに関しては以下の検定を行なった。

最初にF検定で等分散検定を行ない、Student's t-testにより結果の有意差を確認した。組織は、10%中性緩衝ホルマリン液中で保存、固定を行ない、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を施し、光学顕微鏡による観察を行なった。一般状態、病理解剖学的検査結果、病理組織学的検査結果については、検定を行なわなかった。

なお、すべての動物実験は、富士フィルム動物実験委員会の審査、承認を得て行なった。

2.3 RNA抽出およびDNA Microarray Analysis

保存しておいたラットの回腸細胞からISOGENの定法に従いtotal RNAを抽出した後に、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で、total RNAの精製を行なった。サラシア属植物エキス投与群および対照群からそれぞれ体重が平均値に近い順に4個体を選び、その回腸由来のtotal RNAからcDNAの合成、cRNAの合成および標識化、標識cRNAの断片化はAffymetrixのKitを用い、Affymetrixのプロトコルに従って行なった。また、RNAの質のチェックには、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用い、cRNAの伸張が十分であることを確認した。断片化したcRNAはHybridization Oven 640 (Affymetrix Inc., CA, USA) を用いてGeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc., CA, USA) に45℃で16時間ハイブリダイズし、洗浄、GeneChip Fluidics Station 450を行ない、GeneChip Scanner 3000でスキャンし、遺伝子発現量の測定を行なった。得られたデータをR version 2.7.2とBioconductor version 2.2にてDistribution Free Weighted method (DFW法) で正規化した後、二群間比較にはRankProductを実行し、発現変動が顕著なプローブセットとして、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを抽出した^{7), 8), 9), 10), 11)}。

抽出したプローブセットを、機能ごとの階層構造として示すために、Gene Ontology (Bingo 2.3 (cytoscape 2.6) (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/index.htm>))

を参考に生物学的機能に応じて分類した^{12), 13)}。

2.4 腸内細菌叢解析 (T-RFLP 法)

ラット糞便を用いた腸内細菌叢解析は TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd. (Shizuoka, Japan) に委託し、T-RFLP 解析 (Nagashima 法) を用いた¹⁴⁾。以下に参考文献からの改変部分を記載する。

凍結された便を、GTC Buffer (100mM Tris-HCl [pH 9.0], 40mM Tris-EDTA [pH 8.0], 4M Guanidine Thiocyanate) に懸濁した。液中に添加した糞便をジルコニアビーズにより破碎し (5m/s, 5分間, FastPrep FP100A Instrument (MP Biomedicals, CA, USA), 100 μ l の懸濁液から自動核酸抽出装置 (Precision System Science, Chiba, Japan) を用いて DNA 抽出を行なった。自動核酸抽出時の試薬は GC series Genomic DNA whole blood (Precision System Science, Chiba, Japan) を使用した。PCR に用いたプライマーは、516F の標識を参考文献に用いられていた HEX から FAM に変更した。PCR 産物の精製には、MultiScreen PCR μ 96 plate (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。

フラグメント解析は、ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) で行ない、解析ソフトウェアは Gene mapper (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。なお、サイズスタンダードマーカーには、MapMarkerR X-Rhodamine Labeled 50-1000bp (BIOVENTURES, TN, USA) を使用した。総面積ピークに対する各 OTU におけるピーク面積の比率を用い、階層的クラスター解析 (pvclust 関数を用いた) を行ない、菌叢パターンの類似性比較を行なった。

3. 結果

3.1 生化学的検査値

今回、サラシア属植物エキス投与群 (20mg/kg) と対照群において、13週間連続投与後の両群における体重 (541.2 \pm 47.8g vs 578.2 \pm 76.0g), 血液生化学的検査 (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT,

Reti, TP, ALB, A/G, Glu, TG, T-CHO, BUN, Cre, Ca, IP, AST, ALT, GGT, ALP, CPK, T-Bil, Na, K, Cl) に大きな差異は認められなかった。また全個体において、解剖時に脳、下垂体、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺 (腹葉) の重量測定をした後、肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定し、薄片標本にヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施し、光学顕微鏡により観察を行なった。

以上の試験の結果、今回の検討条件においては毒性と判断されるような変化は観察されなかった。

3.2 マイクロアレイ解析

毒性を示す所見がないことを確認後、それぞれの群から、体重が平均値に近い順に 4 個体を選択し、マイクロアレイ解析を行なった。その結果、コントロール群に対し、サラシア群で発現が増加した 237、減少した 111 のプローブセットを抽出した。

3.2.1 発現増加した遺伝子

前述の解析によって得られた Gene Ontology の結果を見ていくと、Oligopeptide transport, defense response, response to nutrient levels, antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II に関わる遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。発現増加遺伝子を詳細に見ていくと、多数の免疫関連遺伝子を含む生体防御関連遺伝子と、輸送や代謝に関わる遺伝子が多く発現増加していた (Fig. 1)。

抗原認識を行なう MHC class II 関連の遺伝子としては、Cathepsin E (Ctse), RT1 class II, locus Ba (RT1-Ba), HLA class II histocompatibility antigen, DM beta chain precursor (MHC class II antigen DMb, Hla-dmb) の発現が上昇している¹⁵⁾。

また、生体防御 (免疫) に関連する遺伝子としては、tumor necrosis factor alpha (Tnfa), Clusterin (Clu), Chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5, Rantes), Adenosine deaminase (Ada), Apolipoprotein A-IV (Apoa5), Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4), Apolipoprotein H (ApoH), Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (Ms4a1), Dipeptidyl-

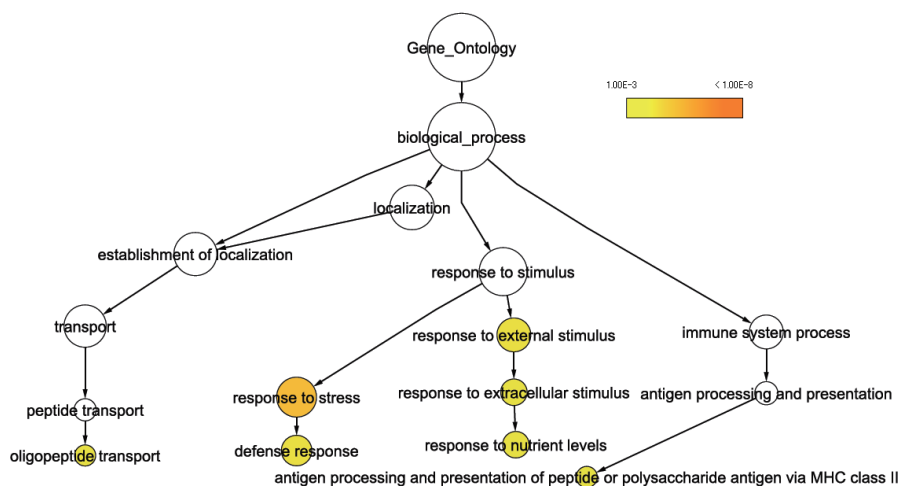


Fig. 1 Significant gene ontology categories ($P < 0.001$) were extracted from 237 genes showing increased expression.

peptidase 4 (Dpp4, Cd26), Protein tyrosine phosphatase (Ptpcr, Cd45), T cell receptor beta locus (Tcrb), Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf1)などが変動していた。

コレステロール、ケトン体代謝系では3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2), 輸送系ではSolute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1 (Slc5a1)が発現増加していた (Table 1)。

Table 1 Genes showing increased expression (P < 0.001, Gene ontology categories extracted using BiNGO).

| [response to stress] | | |
|----------------------|--|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Tnf | tumor necrosis factor | Rn.2275 |
| Aldob | aldolase B | Rn.98207 |
| Clu | clusterin | Rn.1780 |
| Atp6v1g2 | ATPase | Rn.158467 |
| Abhd2 | abhydrolase domain containing 2 | Rn.136811 |
| Sfn | stratifin | Rn.145079 |
| RT1-Ba | RT1 class II, locus Ba | Rn.25717 |
| Ccl5 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | Rn.8019 |
| Hla-dmb | major histocompatibility complex | Rn.5892 |
| Ada | adenosine deaminase | Rn.12689 |
| RT1-Aw2 | RT1 class II, locus Aw2 | Rn.40130 |
| Apoa4 | apolipoprotein A-IV | Rn.15739 |
| RatNP-3b | rat neutrophil peptide-1 | Rn.114810 |
| Alb | albumin | Rn.202968 |
| Cxcr4 | chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | Rn.44431 |
| Gen | gelsolin | Rn.103770 |
| ApoH | apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) | Rn.1824 |
| Ms4a1 | membrane-spanning 4-domains | Rn.18385 |
| Creb3l3 | cAMP responsive element binding protein 3-like 3 | Rn.20059 |
| Cfd | complement factor D (adipsin) | Rn.16172 |
| Dpp4 | dipeptidyl-peptidase 4 (CD26) | Rn.91364 |
| Car3 | carbonic anhydrase 3 | Rn.1647 |
| Ptpcr | protein tyrosine phosphatase | Rn.90166 |
| Bmp2 | bone morphogenetic protein 2 | Rn.90931 |
| Si | sucrase-isomaltase | Rn.10057 |
| Ephx2 | Epoxide hydrolase2 | Rn.54495 |
| Tcrb | T cell receptor beta locus | Rn.34871 |
| Adipoq | adiponectin, C1Q and collagen domain containing | Rn.24299 |
| Defa-rs1 | defensin alpha-related sequence 1 | Rn.122020 |
| Cyp4f5 | cytochrome P450 4F5 | Rn.10171 |
| Abcc2 | ATP-binding cassette | Rn.10285 |
| Apaf1 | apoptotic peptidase activating factor 1 | Rn.64522 |
| Prnp | prion protein | Rn.3936 |
| Ta4ef4 | transmembrane 4 L six family member 4 | Rn.13425 |

3.2.2 発現減少した遺伝子

次に、発現減少した遺伝子には、Urea cycle, Lipid metabolic processが含まれていた。尿素サイクル関連の遺伝子はArginase, type II (Arg2), Ornithine carbamoyltransferase (Otc), carbamoyl-phosphate synthase 1 (Cps1), 脂質の輸送や代謝に関わる peroxiredoxin 6 (Prdx6) や Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Ppar γ) が発現減少していた (Fig. 2, Table 2)。

| [defense response] | | |
|--------------------|---|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Ptpcr | protein tyrosine phosphatase | Rn.90166 |
| Bmp2 | bone morphogenetic protein 2 | Rn.90931 |
| Tnf | tumor necrosis factor | Rn.2275 |
| Ephx2 | Epoxide hydrolase2 | Rn.54495 |
| Tcrb | T cell receptor beta locus | Rn.34871 |
| RT1-Ba | RT1 class II, locus Ba | Rn.25717 |
| Ccl5 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | Rn.8019 |
| Hla-dmb | major histocompatibility complex | Rn.5892 |
| Defa-rs1 | defensin alpha-related sequence 1 | Rn.122020 |
| Ratnp-3b | rat neutrophil peptide-1 | Rn.114810 |
| Apoa4 | apolipoprotein A-IV | Rn.15739 |
| Cyp4f5 | cytochrome P450 4F5 | Rn.10171 |
| Ms4a1 | membrane-spanning 4-domains | Rn.18385 |
| Apaf1 | apoptotic peptidase activating factor 1 | Rn.64522 |
| Cfd | complement factor D (adipsin) | Rn.16172 |

| [response to nutrient levels] | | |
|-------------------------------|--|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Apoa4 | apolipoprotein A-IV | Rn.15739 |
| Suox | sulfite oxidase | Rn.25720 |
| Bmp2 | bone morphogenetic protein 2 | Rn.90931 |
| Apoa1 | apolipoprotein A-I | Rn.10308 |
| Hmgcs2 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 | Rn.29594 |
| Gen | gelsolin | Rn.103770 |
| Alb | albumin | Rn.202968 |
| Si | sucrase-isomaltase | Rn.10057 |
| Aldob | aldolase B | Rn.98207 |
| Adipoq | adiponectin, C1Q and collagen domain containing | Rn.24299 |
| Ada | adenosine deaminase | Rn.12689 |

| [oligopeptide transport] | | |
|--------------------------|---|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Slc15a1 | solute carrier family 15 (oligopeptide transporter) | Rn.10500 |
| RT1-Ba | RT1 class II, locus Ba | Rn.25717 |
| Hla-dmb | major histocompatibility complex | Rn.5892 |

| [response to extracellular stimulus] | | |
|--------------------------------------|--|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Apoa4 | apolipoprotein A-IV | Rn.15739 |
| Suox | sulfite oxidase | Rn.25720 |
| Bmp2 | bone morphogenetic protein 2 | Rn.90931 |
| Apoa1 | apolipoprotein A-I | Rn.10308 |
| Hmgcs2 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 | Rn.29594 |
| Gen | gelsolin | Rn.103770 |
| Alb | albumin | Rn.202968 |
| Si | sucrase-isomaltase | Rn.10057 |
| Aldob | aldolase B | Rn.98207 |
| Adipoq | adiponectin, C1Q and collagen domain containing | Rn.24299 |
| Ada | adenosine deaminase | Rn.12689 |

| [antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II] | | |
|---|----------------------------------|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Otsa | cathepsin E | Rn.92738 |
| RT1-Ba | RT1 class II, locus Ba | Rn.25717 |
| Hla-dmb | major histocompatibility complex | Rn.5892 |

Table 2 Genes showing decreased expression (P < 0.001, Gene ontology categories extracted using BiNGO).

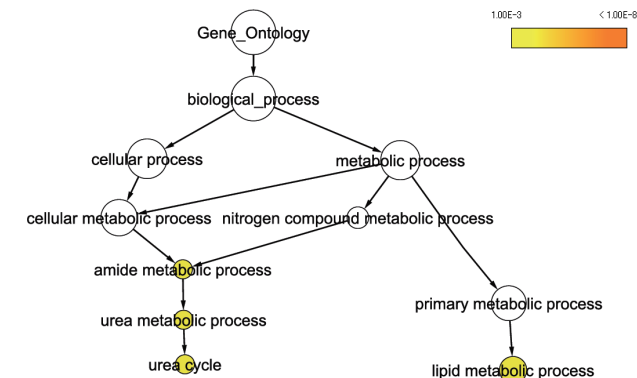


Fig. 2 Significant gene ontology categories (P < 0.001) were extracted from 113 genes showing decreased expression.

| [urea cycle] | | |
|--------------|--------------------------------|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Arg2 | arginase | Rn.11055 |
| Otc | ornithine carbamoyltransferase | Rn.2391 |
| Cps1 | carbamoyl-phosphate synthase 1 | Rn.53968 |

| [urea metabolic process] | | |
|--------------------------|--------------------------------|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Arg2 | arginase | Rn.11055 |
| Otc | ornithine carbamoyltransferase | Rn.2391 |
| Cps1 | carbamoyl-phosphate synthase 1 | Rn.53968 |

| [amide metabolic process] | | |
|---------------------------|--------------------------------|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Arg2 | arginase | Rn.11055 |
| Otc | ornithine carbamoyltransferase | Rn.2391 |
| Cps1 | carbamoyl-phosphate synthase 1 | Rn.53968 |

| [lipid metabolic process] | | |
|---------------------------|--|------------|
| Gene name | Definition | UniGene ID |
| Phlpb | phospholipase B | Rn.91079 |
| Cubn | cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor) | Rn.3236 |
| Had3b6 | hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta | Rn.109394 |
| Prdx6 | peroxiredoxin 6 | Rn.42 |
| Pparg | peroxisome proliferator-activated receptor gamma | Rn.23443 |
| Had11b2 | hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 | Rn.10186 |
| Aldh1a7 | aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7 | Rn.74044 |
| Srd5a1 | steroid-5-alpha-reductase | Rn.4620 |
| Comt | catechol-O-methyltransferase | Rn.220 |
| Pcca | propionyl Coenzyme A carboxylase | Rn.6033 |
| Pck1 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 | Rn.104376 |

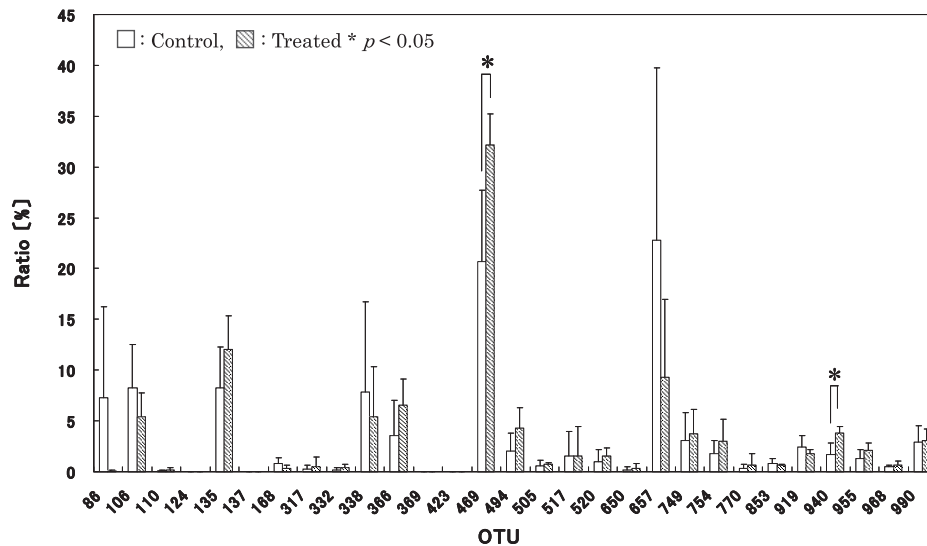


Fig. 3 Fecal specimens were analyzed by T-RFLP analysis (Nagashima method) and presented as the intestinal bacterial flora composition by OTU.

3.3 腸内細菌叢解析

遺伝子発現解析において、回腸上皮の免疫関連遺伝子発現が増加していた。そこで、腸において免疫関連遺伝子の発現に影響を与えるとされる腸内細菌叢解析もあわせて行なった。

解析には、解剖時に大腸下部から採取した糞便を用いた。大腸には培養困難な菌が多く存在するため、培養なしで腸内細菌の状態を正確に表わすことが可能な解析法であるT-RFLP法を用いて、腸内細菌叢の構成比測定を行なった。腸内細菌叢の構成比の数値を用い、『R』でクラスタリングを行ない、系統樹を作成し、菌叢パターンの類似性比較を行なった。その結果、投与群の腸内細菌叢は対照群のそれらとは異なったプロファイリングを示した (Fig. 3)。

サラシア属植物エキス粉末投与群と対照群を比較したところ、対照群の腸内細菌叢は個体ごとに大きく異なり、系統樹の距離も離れて類似性が低かったのに対し、投与群では腸内細菌叢のプロファイルが類似しており、系統樹上の距離が非常に近くなり、バラバラであった腸内細菌叢がサラシア属植物摂取により類似してくることが明らかになった (Fig. 4)。

また、菌門ごとに見ていくと、ファーミキューテス門 (OTU : 106, 110, 168, 332, 338, 369, 423, 494, 505, 517, 520, 650, 657, 749, 754, 919, 940, 955, 990) の割合が有意に減少し、バクテロイデス門 (OUT : 366, 469, 853) の割合が有意に増加していることが明らかになった (Fig. 5)。以上の結果から、サラシア属植物エキス投与により、免疫関連遺伝子の遺伝子発現だけでなく、腸内細菌叢にも変化が起きていることが明らかになった。

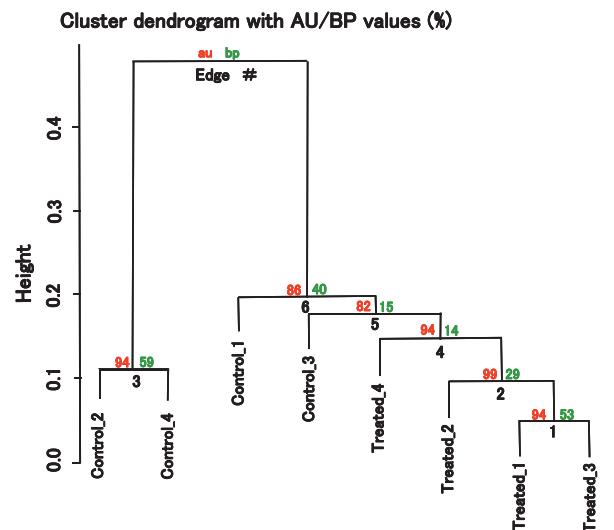


Fig. 4 Cluster analysis was performed on the intestinal bacterial flora composition data determined by T-RFLP analysis (Nagashima method) to construct a phylogenetic tree. (au=Approximately Unbiased, bp=Bootstrap Probability)

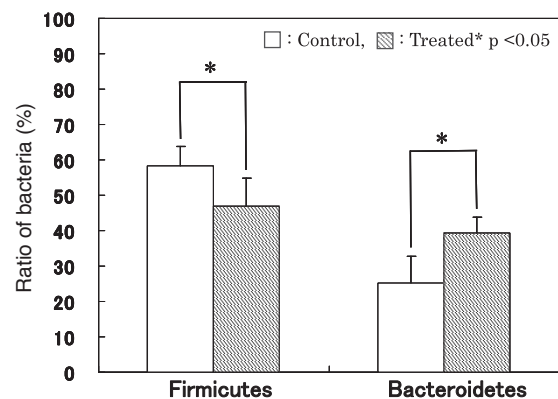


Fig. 5 Proportions of Bacteroidetes and Firmicutes relative to the entire intestinal flora population in the fecal extract administration.

4. 考察

サラシア属植物は従来から多くの機能を持つことが知られていたが、小腸におけるサラシア属植物の生理機能を解明するため、本研究を行なった。その結果、回腸上皮において多くの遺伝子の発現が変化し、サラシア属植物は腸管でも多機能を有することが明らかになった。その中でも、免疫関連の遺伝子発現量変化は、本研究により初めて示されたものであり、その作用も非常に顕著であったため、これ以降サラシアの免疫機能に着目して議論を行なう。

遺伝子発現解析の結果から得られた発現上昇した遺伝子を詳細に検討していくと、異物認識や免疫機構、生体防御に関わる遺伝子、特にTh1細胞関連遺伝子が多く含まれていることがわかった。具体的には、アレルギーなどを引き起こすIgEの産生を抑制するといわれているPtprc (Cd45)¹⁶⁾や、細胞性免疫に寄与するTh1細胞関連遺伝子Cd26 (Dpp4)¹⁷⁾、さまざまな菌やインフルエンザを含むウイルスなど病原体の進入を食い止め、アレルギー抑制作用を持つIgG2a¹⁸⁾、MHC class II関連の遺伝子であった。発現増加した遺伝子から、図のような作用がTh1細胞周辺で起きているのではないかと推測した¹⁹⁾ (Fig. 6)。

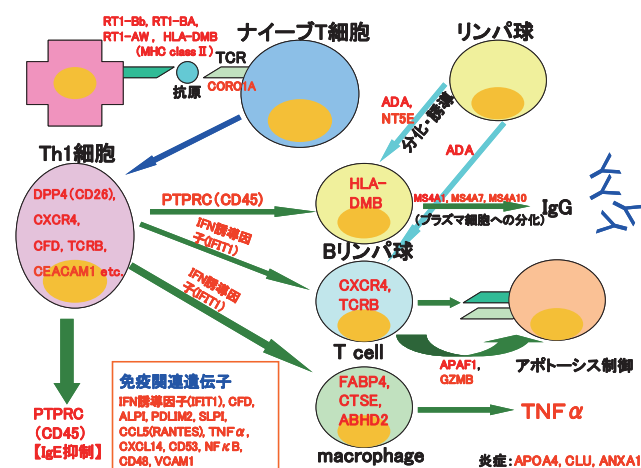


Fig. 6 Possible mechanism of action speculated from the genes identified as showing increased expression in the vicinity of the Th1 cells (genes listed in Table 1 are shown in red, genes identified among the 237 genes showing increased expression but not used in the functional categorization by BiNGO are presented in black).

また、以前、われわれが行なった検討では、サラシア属植物エキスには腸内の腐敗産物やアンモニアを減少させる効果があることが明らかになっている。つまり、サラシア属植物エキス摂取により、腸内アンモニアが減少し、小腸上皮の尿素サイクル関連遺伝子発現の減少 (Cps1, Arg2, Otc) が起こったと考えている²⁰⁾。

菌体およびその成分が、腸管免疫に深く関わるとされる腸内細菌叢の解析では、個体間でバラバラであった腸内細菌叢のパターンがサラシア属植物エキス投与により

変化し、似通ってくる傾向が得られた。菌の比率が増加したバクテロイデスは、免疫亢進作用が着目されている菌であり、従来から免疫賦活作用が指摘されてきた乳酸菌よりも強い免疫機能を示し、IgAや生体防御に関わるサイトカインの産生量を増加させることが明らかになっている^{21), 22)}。今回の実験において、特に割合増加が見られたバクテロイデスのOTU (operational taxonomic unit) が2つあったが (OTU : 366, 469)、クローニングで得られた塩基配列から相同性を検討した結果、この2つには特に免疫賦活効果の高いバクテロイデスのひとつである *Bacteroides acidofaciens* が含まれている可能性が高い。また、バクテロイデスの細胞壁に存在するLPSも免疫賦活効果が示されている²³⁾。

以上のことから、サラシア属植物エキスは、腸内細菌叢に影響を与え、変化した腸内細菌叢が、小腸下部の腸管免疫系に働きかけることが示唆された。本研究において、輸送や代謝関連の遺伝子が多く発現変化していたが、これは肝臓の働きにも連動する遺伝子であり、今後検討を行なっていきたい。

本研究は清潔な環境下で、温度や食事などを管理して飼育したラットを用いた実験であり、ヒト腸内において大量に存在するビフィズス菌も存在しないことから、一概にこの結果をヒトに置き換えることはできない²⁴⁾。しかし、われわれはヒトにおいても腸内細菌叢が変化することを確認しており、免疫機能に働きかける可能性は十分高いと考えている。今後、ヒトにおける機能も実証していきたい。

サラシア属植物はアーユルヴェーダにおいて長年使用されてきたがその機能に関しては、いまだ不明な部分が多い。しかし、腸管免疫を通じた生体調節は、サラシア属植物エキスが改善するといわれている疾病の多くに影響を与えるものであり、われわれは本研究がサラシア属植物エキスの機能の一部を明らかにしたと確信している。

われわれは、このサラシア属抽出エキスを配合した機能性食品として「メタバリア」 (Fig. 7) を2007年に上市している。今後もわれわれは、食品素材の機能性研究、さらに有用な機能性食品素材を用いた商品開発を通じて、人々のクオリティ オブ ライフ向上に寄与できるよう努力を続け、積極的な社会貢献を行なっていく。



Fig. 7 MetabARRIER.

参考文献

- 1) Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Takada, M.; Matsuda, H. *Salacia reticulata* and Its Polyphenolic Constituents with Lipase Inhibitory and Lipolytic Activities Have Mild Antiobesity Effects in Rats. *J. Nutr.*, **132** (7), 1819-1824 (2002).
- 2) Matsuura, T.; Yoshikawa, Y.; Masui, H.; Sano, M. Suppression of Glucose Absorption by Various Health Teas in Rats. *YAKUGAKU ZASSHI*, **124** (4), 217-223 (2004).
- 3) Im, R.; Mano, H.; Matsuura, T.; Nakatani, S.; Shimizu, J.; Wada, M. Mechanisms of blood glucose-lowering effect of aqueous extract from stems of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) in the mouse. *J. Ethnopharmacol.*, **121** (2), 234-240 (2009).
- 4) Nair, P. S.; Shyamala, Davi, C. S. Efficacy of mangiferin on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol induced cardiotoxicity. *Toxicology*, **228** (2-3), 135-139 (2006).
- 5) Muraoka, O.; Ying, S.; Yoshikai, K.; Matsuura, Y.; Yamada, E.; Minematsu, T.; Tanabe, G.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Synthesis of a Nitrogen Analogue of Salacinol and Its α -Glucosidase Inhibitory Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **49** (11), 1503-1535 (2001).
- 6) Im, R.; Mano, H.; Nakatani, S.; Shimizu, J.; Wada, M. Safety Evaluation of the Aqueous Extract Kothala Himbutu (*Salacia reticulata*) Stem in the Hepatic Gene Expression Profile of Normal Mice Using DNA Microarrays. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72** (12), 3075-3083 (2008).
- 7) The R Development Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2006).
- 8) Gentleman, R. C.; Carey, V. J.; Bates, D. M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J.; Hornik, K.; Hothorn, T.; Huber, W.; Iacus, S.; Irizarry, R.; Leisch, F.; Li, C.; Maechler, M.; Rossini, A. J.; Sawitzki, G.; Smith, C.; Smyth, G.; Tierney, L.; Yang, J. Y. H.; Zhang, J. Bioconductor : open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, **5** (10), R80.1-R80.16 (2004).
- 9) Chen, Z.; McGee, M.; Liu, Q.; Scheuermann, R.H. A distribution free summarization method for Affymetrix GeneChip arrays. *Bioinformatics.*, **23** (3), 321-327 (2007).
- 10) Breitling, R.; Armengaud, P.; Amtmann, A.; Herzyk, P. Rank products : a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.*, **573** (1-3), 83-92 (2004).
- 11) Motoyama, K.; Nakai, Y.; Miyashita, T.; Fukui, Y.; Morita, M.; Sanmiya, K.; Sakakibara, H.; Matsumoto, I.; Abe, K.; Yakabe, T.; Yajima, N.; Shimoi, K. Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice. *Physiol. Genomics*, **37** (4), 79-87 (2009).
- 12) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape : A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.*, **13** (11), 2498-2504 (2003).
- 13) Maere, S.; Heymans, K.; Kuiper, M. *BiNGO* : a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics.*, **21** (16), 3448-3449 (2005).
- 14) Nagashima, K.; Mochizuki, J.; Hisada, T.; Suzuki, S.; Shimomura, K. Phylogenetic Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Sequences from Human Fecal Microbiota and Improved Utility of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Biosci. Microflora.*, **25** (13), 99-107 (2006).
- 15) Renard, C.; Hart, E.; Sehra, H.; Beasley, H.; Coggill, P.; Howe, K.; Harrow, J.; Gilbert, J.; Sims, S.; Rogers, J.; Ando, A.; Shigenari, A.; Shiina, T.; Inoko, H.; Chardon, P.; Beck, S. The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. *Genomics*, **88** (1), 96-110 (2006).
- 16) Yamada, T.; Zhu, D.; Saxon, A.; Zhang, K. CD45 Controls Interleukin-4-mediated IgE Class Switch Recombination in Human B Cells through Its Function as a Janus Kinase Phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **277** (32), 28830-28835 (2002).
- 17) Hoshimoto, K.; Ohta, N.; Ohkura, T.; Inaba, N. Changes in Plasma Soluble CD26 and CD30 during Pregnancy : Markers of Th1/Th2 Balance? *Gynecol. Obstet. Invest.*, **50** (4), 260-263 (2000).
- 18) Hovden, A. -O.; Cox, R. J.; Haaheim, L. R. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.*, **62** (1), 36-44 (2005).
- 19) Umesaki, Y.; Okada, Y.; Matsumoto, S.; Imaoka, A.; Setoyama, H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol. Immunol.*, **39** (8), 555-562 (1995).

-
- 20) Mouillé, B.; Robert, V.; Blachier, F. Adaptive increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, **287** (2), G344-G351 (2004).
- 21) Tsuda, M.; Hosono, A.; Yanagibashi, T.; Hachimura, S.; Hirayama, K.; Itoh, K.; Takahashi, K.; Kaminogawa, S., Prior stimulation of antigen-presenting cells with *Lactobacillus* regulates excessive antigen-specific cytokine responses in vitro when compared with *Bacteroides*. *Cytotechnology*, **55** (2-3), 89-101 (2007).
- 22) Yanagibashi, T.; Hosono, A.; Oyama, A.; Tsuda, M.; Hachimura, S.; Takahashi, Y.; Itoh, K.; Hirayama, K.; Takahashi, K.; Kaminogawa, S. *Bacteroides* Induce Higher IgA Production Than *Lactobacillus* by Increasing Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in B Cells in Murine Peyer's Patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (2), 372-377 (2009).
- 23) Humphries, H. E.; Triantafilou, M.; Makepeace, B. L.; Heckels, J. E.; Triantafilou, K.; Christodoulides, M. Activation of human meningeal cells is modulated by lipopolysaccharide (LPS) and non-LPS components of *Neisseria meningitidis* and is independent of Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2 signalling. *Cell Microbiol.*, **7** (3), 415-430 (2005).
- 24) Bouhnik, Y.; Raskine, L.; Simoneau, G.; Paineau, D.; Bornet, F. The capacity of short-chain fructooligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria : a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr. J.*, **5**:8, 1-6 (2006).

(本報告中にある“Affymetrix”, “GeneChip”はAffymetrix, Inc.の登録商標です。“Agilent”はAgilent Technologies, Inc.の登録商標です。“MapMarker”はBio Ventures, Inc.の登録商標です。“MultiScreen”はMillipore Corp.の登録商標です。“RNeasy”はQIAGEN GMBHの登録商標です。“メタバリア”は富士フイルム(株)の登録商標です。)