

食事性グルコシルセラミドによる皮膚バリア機能の改善と 大腸炎の緩和・抑制

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者名	川田,実生 浅沼,成人
発行元	明治大学農学部
巻/号	65巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 83-93
発行年月	2016年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



食事性グルコシルセラミドによる 皮膚バリア機能の改善と大腸炎の緩和・抑制

川田 実生・浅沼 成人*

(2015年12月1日受理)

Effects of dietary glucosylceramide on the improvement of skin barrier function and the alleviation of experimental bowel inflammation

Misho KAWATA and Narito ASANUMA*

Abstract

Many common foods contain sphingolipids (SLs) mainly as glucosylceramide (GluCer) from plants and sphingomyelin (SM) from animals. The metabolic intermediates of these SLs are suggested to mediate various cell functions. Dietary SM and GluCer are thought to be partially digested and absorbed in the intestine. However, GluCer in particular has been reported to be poorly absorbed, because the degradation by enzymes in the intestinal mucosa is extremely low. On the other hand, there are many reports suggesting that dietary SM and GluCer exerted beneficial effects on experimental animals. For example, oral administration of GluCer suppressed the development of skin inflammation, as evaluated by the visual characteristics of the skin surface and histological analysis. This effect is consistent with results that showed dietary GluCer induced the suppression of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, which may reduce infiltration of leukocytes. In addition, dietary GluCer increased the mRNA expression of ceramide synthases and the genes associated with tight junction and cornified envelope formation, which may in part explain the recovery of damaged skin barrier functions. In cell culture experiments, the sphingoid bases produced by the degradation of GluCer were shown to affect the expression of the above-mentioned genes, but GluCer itself had no effects. Moreover, investigations on the effects of dietary SL on experimental bowel inflammation showed that dietary GluCer had an anti-inflammatory effect, whereas dietary SM had a pro-inflammatory effect. These contradictory results might be due to differences in the ceramide structure (sphingoid bases and fatty acids) of GluCer and SM. Therefore, in order to augment the bioactivity of dietary GluCer, and to examine the biological function of ceramide in more detail, it is desirable to enhance the efficiency of GluCer hydrolysis. The novel GluCer-hydrolyzing bacteria we have isolated in our laboratory will be beneficial in these types of studies.

要 約 スフィンゴ脂質 (SL) の代謝中間体については、様々な生理活性を持つことが報告されている。我々が口にする食品素材にも SL は含まれていることから、それらの生理効果が期待されるが、その可能性は低いと考えられている。なぜなら、食事成分として摂取した SL は、消化管内で加水分解された後に、上皮細胞

に取り込まれる必要があるが、消化管粘膜の消化酵素の活性が低いからである。しかし、食事性 SL が種々の生理効果をもたらすことも報告されている。例えば、皮膚炎マウスに植物性の SL であるグルコシルセラミド (GluCer) を経口投与したところ、炎症が外見的にも組織学的にも軽減されたという。この理由としては、炎症性サイトカインの生成が遺伝子レベルで抑制されたことによると説明されている。また、セラミド合成酵素や角質細胞の接着や構造に関する遺伝子などの発現も調節を受けることが示されており、このことが皮膚のバリア機能を改善した一因と考えられている。しかし、遺伝子発現を調節するためには、GluCer が加水分解されスフィンゴイド塩基になる必要があるため、やはりその活性を高める必要があると考えられる。また、実験的大腸炎に関する影響も調べられている。GluCer を経口投与した場合には腸炎の症状が緩和されたと報告されているが、動物性の SL であるスフィンゴミエリン (SM) を投与した場合には、逆効果で大腸炎を促進したという報告が多い。この理由としては、SM と GluCer では、分解されて生じるセラミドの構造の違いが影響するものと思われる。食事性 GluCer の生理効果を更に高めるためにも、また、セラミドの機能を更に広汎に評価するためにも、新規分離菌の活用等により GluCer からセラミドへの水解を増強する必要があると考えられた。

キーワード：スフィンゴ脂質，グルコシルセラミド，スフィンゴミエリン，皮膚炎，大腸炎

真核生物の細胞膜構成成分であるスフィンゴ脂質 (Sphingolipid; SL) は、動物性のスフィンゴミエリン (Sphingomyelin; SM) と植物性のグルコシルセラミド (Glucosylceramide; GluCer) が代表的であるが (図 1)、それらの代謝中間体 (合成および分解の過程で生成される物質) は細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーなどの機能を有し、生命機能の制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある (Dany & Ogretmen 2015; Galadari ら 2015; Harvald ら 2015; Ueda 2015)。SL の代謝中間体としては、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸などがあり

(図 2)、これらの中間代謝物が、アポトーシス、細胞増殖、細胞分化、ストレス応答等の生物反応を調節することが示唆されている (Spiegel & Merrill 1996; El Alwami ら 2006; Zheng ら 2006; Nixon 2009)。特にセラミドは、皮膚表皮における角質層の細胞間脂質の約 50% も占め (Eilas & Menon 1991; Feingold 2007)、皮膚の保湿機能とバリア機能において重要な役割を担っていることから (Wertz & Downing 1982; Imokawa ら 1991)、化粧品などに配合される美容成分の一つとしても注目を集めている。

食品中の SL として、主として動物の SM と植物の GluCer が摂取されているが、SM は肉、魚、乳、鶏卵などに、一方の GluCer は米や麦などの穀類、大豆などの豆類、こんにゃくなどの根菜類、りんごなどの果実類など多様な植物中に多く含まれる (Vesper ら 1999; Takakuwa ら 2005; Aida 2007; Ogawa ら 2014)。動物性食品素材における SM の含量は、畜肉で 25-40 mg/100 g であり、鶏卵で 80-170 mg/100 g である (Blank ら 1992; Vesper ら 1999)。また、植物性食品素材である穀類や豆類における GluCer 含量は 10-40 mg/100 g であり (Sugawara & Miyazawa 1999)、我々は種々の食品素材から SL を日常的に摂取していることが伺える。しかし、SL の起源の違いにより、それらの摂取により期待される生理効果が異なる可能性があるため、各 SL については個別に考え

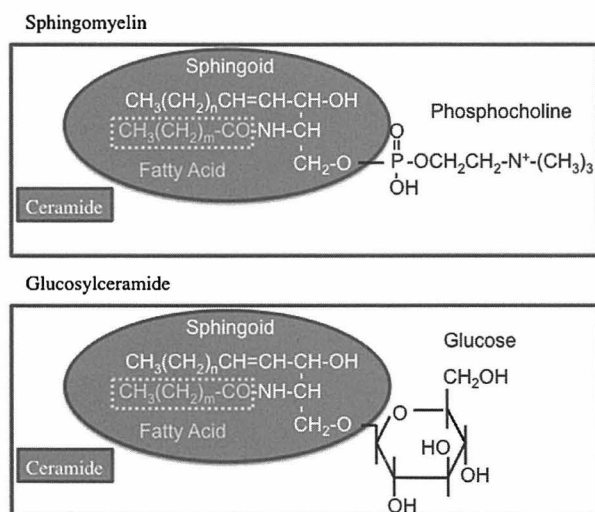


Fig. 1 Structure of sphingomyelin and ceramide

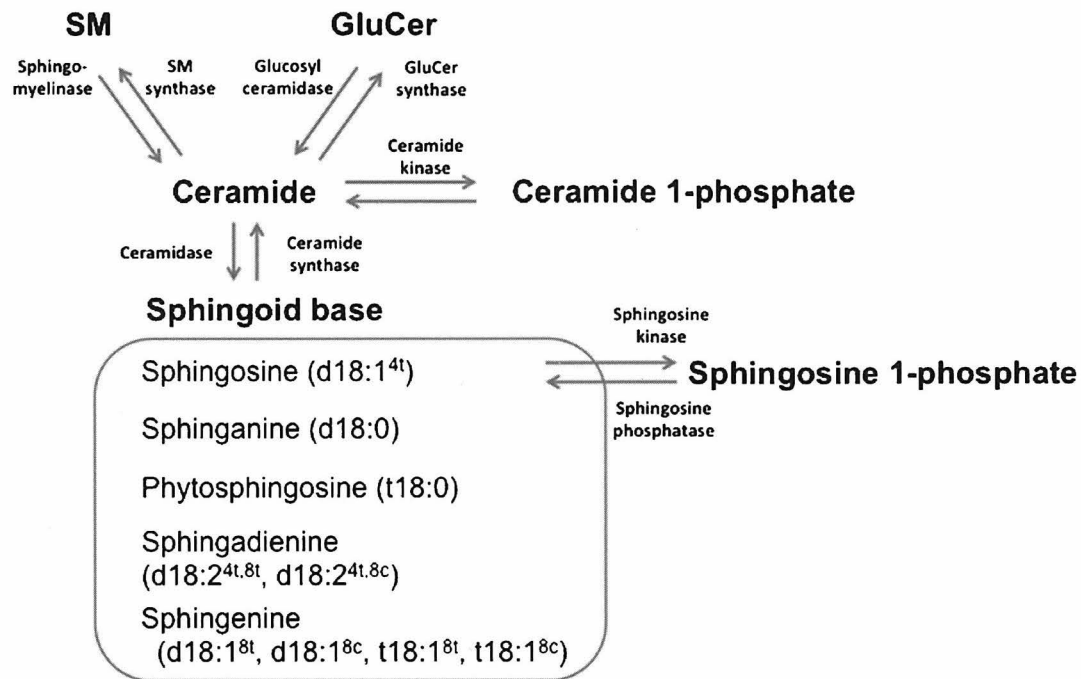


Fig. 2 Metabolic pathways of sphingomyelin and ceramide
SM; sphingomyelin, GluCer; glucosylceramide

る必要があると思われる。動物由来のものと植物由来のものでは、そのスフィンゴイド塩基の構造が大きく異なっており、生理作用が異なる可能性があるが (Sperling & Heinz 2003), その詳細については研究されていない。動物由来のものとしては、スフィンゴシン (trans-4-スフィンゲニン, d18:1^{4t}) が約80%を占め、その他にスフィンガニン (ジヒドロスフィンゴシン, d18:0) とフィトスフィンゴシン (4-ヒドロキシスフィンゲニン, t18:0) が存在する (Hannun & Linardic 1993)。植物由来のものとしては、動物由来のものに加え、trans-8-スフィンゲニン (d18:1^{8t}), cis-8-スフィンゲニン (d18:1^{8c}), trans-4, trans-8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8t}), trans-4, cis-8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8c}), 4-ヒドロキシ-trans-8-スフィンゲニン (t18:1^{8t}), 4-ヒドロキシ-cis-8-スフィンゲニン (t18:1^{8c}) と実に多様である (Aida 2007)。一方、構成脂肪酸の組成も SM と GluCer で異なり、一般的に SM よりも GluCer の方が鎖長が長く、不飽和度も高い (Bohn ら2001)。また、GluCer では植物種による差異が大きい。従って、SM と GluCer が分解されて生じるセラミド (図1) は一様ではなく、その起源の違いにより構造が異なるのであ

る。このことが、後述のような生理効果の違いを生み出す可能性がある。

食事成分として摂取した SM や GluCer は、消化管内で加水分解された後に、上皮細胞に取り込まれると考えられている (Nilsson 1968; Nilsson 1969a; Nilsson 1969b)。すなわち、小腸でスフィンゴミエリナーゼやグリコシルセラミダーゼの作用を受け、極性基が切断されてセラミドとなる (図2)。セラミドも吸収され得ると思われるが、さらにセラミダーゼによりスフィンゴイド塩基と遊離脂肪酸となつてからの方が吸収され易いと考えられている。また、これらの分解酵素が小腸粘膜に存在することが報告されている (Brady ら 1965; Nilsson 1969b; Duan ら 2003; Wu ら 2005)。

SL の消化管吸収についての知見は限られているが、近年になり、食事成分として摂取したスフィンゴ脂質は消化管ではほとんど吸収されないということが報告されている (Sugawara ら 2010)。その理由の一つとしては、消化管内におけるスフィンゴイド塩基までの分解が少ないこと、すなわち、スフィンゴミエリナーゼ、グリコシルセラミダーゼ、セラミダーゼの活性がそれほど高くないことが考えられる (Schmelz ら

1994; Nyberg ら 1997)。また、植物由来のスフィンゴイド塩基の方が、動物由来のスフィンゴシンよりも吸収されにくいことも報告されている (Sugawara ら 2003; Sugawara ら 2010)。その理由としては、スフィンゴシン以外のスフィンゴイド塩基は P-糖タンパク質による排出を受けやすく、その吸収が容易でないことが一因であると考えられている (Sugawara ら 2004)。

それにもかかわらず、食事性 SL が種々の生理効果をもたらすことも多数報告されている。特に GluCer については、美容面での注目が高いこともあり、その摂取が皮膚のバリア機能にどう影響するかが調べられている。そこで本稿では、食事性 SL, 特に GluCer に着目し、それを食事成分として摂取した場合の生理効果についての報告をまとめ、機能性食品成分としての GluCer の価値を考える。

1. 接触性皮膚炎モデルマウスに及ぼす食事性 GluCer の効果

接触性皮膚炎のモデルとしては、マウスに薬剤を感作させ、炎症を誘発させたものが多い。このようなモデルマウスに GluCer を経口投与することで、皮膚のバリア機能に及ぼす影響を調べた研究がある。1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (2,4-Dinitro-1-fluorobenzene; DNFB) を感作させ、接触性皮膚炎を誘発するまでの 6 日間の間、5 mg のトウモロコシ由来の GluCer を毎日経口投与し、その後 DNFB を耳に塗布し皮膚炎を誘発したところ、誘発後 6 時間での耳炎症部の肥厚化が有為に軽減し、炎症部位への白血球の浸潤も軽減したことが報告されている (Duan ら 2011)。この場合、GluCer の経口投与が炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor; TNF- α) の発現を抑制したことから、TNF- α の低下が血管透過性を低下させ、炎症性細胞の浸潤を低下させた結果、症状が軽減したと説明された。それ故、GluCer の摂取による抗炎症効果が期待される。

作用機作の異なる試薬を用いて接触性皮膚炎を誘発した場合についての報告もある。オキサゾロンを感作

させた後に、耳に繰返し塗布することで炎症度合いを深めたマウスに大豆由来の GluCer を 100 mg/マウス体重 kg の量で経口的に経口投与することにより、耳炎症部の肥厚化及び水分含量の低下、耳介リンパ節重量の増加、炎症部位への肥満細胞や好中球の浸潤等のオキサゾロンによる炎症症状が有為に低下したことが報告されている (Yeom ら 2012)。GluCer の投与量を 200 mg/マウス体重 kg に増加させたところ、軽減効果が更に増加したことから、この範囲内では食事性 GluCer による効果は用量依存的であると考えられる。また、GluCer の投与により炎症性サイトカインである IL-1 β と IL-6 をコードする遺伝子の耳損傷部における転写が低下したことも報告されている (Yeom ら 2012)。観察されたサイトカイン種は異なるが、Duan ら (2011) と Yeom ら (2012) の両報告から、GluCer の摂取は炎症性サイトカインの生成を抑制すると考えられる。このことは、GluCer の摂取は接触性皮膚炎のみならず、他のアレルギー疾患の緩和にも効果がある可能性を示唆している。更に、GluCer の投与はアクアポリン-3 をコードする遺伝子の転写とその発現を増加させたことも報告されている (Yeom ら 2012)。アクアポリン-3 は細胞内に水分子のみを選択的に通過させるように機能することから、これが皮膚の保湿作用を向上させ、バリア機能の改善に寄与した可能性も考えられる。すなわち、GluCer の摂取は炎症性サイトカインの生成を制御するだけでなく、皮膚のバリア機能の改善も期待できる可能性がある。(後者への効果は次章で述べる)

Duan ら (2011) と Yeom ら (2012) の報告では、GluCer の投与量が大きく異なっており、これではどの程度の GluCer を摂取すれば効果を持つかが推測できない。おそらく、皮膚炎を発症させるために用いた薬剤の違い、その投与期間の違いも大きく影響するであろう。また、異なった植物種由来の GluCer を用いているため、GluCer の構造が異なることが影響している可能性もある。トウモロコシ由来の GluCer の主成分は trans-4, cis-8-スフィンガジエニン (d18: 2^{4t,8c})、2-ヒドロキシアラキドン酸、及びグルコースから形成される GluCer であり、大豆由来の GluCer

では trans-4, trans-8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8t}), 2-ヒドロキシパルミチン酸, 及びグルコースから形成される GluCer であり, スフィンゴイド骨格と脂肪酸側鎖が異なる (Sperling & Heinz 2003; Aida 2007)。これらの構造の違いが炎症性サイトカイン生成にどのような影響を及ぼすか等は, 今後検討する必要がある。

2. 食事性 GluCer が皮膚バリア機能に関する遺伝子の発現に及ぼす影響

GluCer の摂取が皮膚のバリア機能に及ぼす影響については, ヘアレスマウスを用いても調べられている。ヘアレスマウスにマグネシウムを欠乏させた特殊飼料 (HR-AD) を給餌することでアトピー性皮膚炎を誘発させることができる。辻らは, ヘアレスマウスに HR-AD を10週間給餌することでアトピー性皮膚炎を誘発させ, 飼料を通常食に切り替えて4週間飼育することで皮膚炎からの回復効果を調べた (Tsuji ら 2006)。その結果, 通常食飼料に0.1% (w/w) の GluCer (米ぬか及び胚芽由来) を混合して自由摂取させたところ, 経皮水分蒸散量から見積もった回復時期が無添加の場合よりも早くなったことから, 彼等は GluCer の摂取が皮膚のバリア機能を向上させたと考えしている。米ぬか由来の GluCer をトウモロコシ由来のものに変更した場合でも経皮水分蒸散量の回復が観察された (Duan ら 2012)。また, GluCer をブタの脳由来の SM に変更した場合でも, 経皮水分蒸散量の低下が見られた (Duan ら 2012)。テープストリッピング法による角質層破壊モデルにおいても, GluCer や SM の給餌により経皮水分蒸散量が低下することが確認されており, これらの食事性 SL が起源にかかわらず, 皮膚バリア機能改善効果を持つことが示されている (Tsuji ら 2006; Duan ら 2012)。

更に, GluCer や SM の給与時には, 表皮におけるセラミド合成酵素 3 と 4 の mRNA 量が 2 倍近くに増加したという (Duan ら 2012)。そこで, ヒト表皮角化細胞 (Normal human foreskin keratinocytes; NHFK) にスフィンゴイド塩であるスフィンゴシン (d18:1^{4t}), スフィンガニン (d18:0), 及び trans-4,

cis-8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8c}) を0.001から 10 μ M の濃度で添加して培養した時, いずれのスフィンゴイド塩基の添加でも, セラミド合成酵素 2, 3 と 4 の mRNA 量の増加が見られた (Duan ら 2012)。これらの結果から, 経口摂取した GluCer や SM が消化管内でスフィンゴイド塩基にまで分解・吸収されれば, そのまま表皮における細胞間脂質の合成の原料として用いられるだけでなく, セラミド合成酵素の発現を高めるなどの代謝系に作用することで, セラミド合成を増加させる可能性がある。

スフィンゴイド塩基がセラミド合成系に影響することを裏付けるデータは, 培養細胞を用いた試験により集まりつつある。コンニャク由来の GluCer を酸加水分解することで調製した 4,8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8c} と d18:2^{4t,8t}) と 4-ヒドロキシ-8-スフィンガニン (t18:1^{8c} と t18:1^{8t}) を NHFK に添加して培養したところ, やはりセラミド合成酵素 2, 3 と 4 の mRNA 量の増加が見られた (Shirakura ら 2012)。また, 3 次元ヒト皮膚モデル細胞を用いた試験では, スフィンゴイド塩基の添加により, 細胞内のセラミド含量自体が増加することも示されている (Shirakura ら 2012)。更に, 長鎖脂肪酸の炭素鎖伸長酵素のアイソザイムの幾つかの mRNA 量もこれらのスフィンゴイド塩基の添加により増加した。更に興味深いことに, 細胞内の代謝と分化に影響するペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (Peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) の β/δ と γ の mRNA 量もスフィンゴイド塩基の添加により増加した (Shirakura ら 2012)。従って, これらのスフィンゴイド塩基は, セラミド合成だけでなく, 糖代謝や長鎖脂肪酸の合成にも影響する可能性があり (Evans ら 2004), 総じて角化細胞(ケラチノサイト)の分化が促進され, ダメージを受けた皮膚の回復が早くなると思われる。しかし, スフィンゴイド塩基の代わりにその給源である GluCer を添加してもこれらの効果は見られず (Shirakura ら 2012), 転写を制御するには, やはりスフィンゴイド塩基にまで分解される必要があると考えられる。また, 動物性食品由来のスフィンゴイド塩基であるスフィンゴシン (d18:1^{4t}) を添加してもセ

ラミド合成酵素や PPAR の転写制御には効果が見られなかった (Shirakura ら 2012)。この結果は、先の報告とは異なるものであり、スフィンゴシンがセラミド合成酵素の合成を促進するか否かについては、再検討の必要があろう。また、酵母や真菌に多く含まれるフィトスフィンゴシンが PPAR γ の転写活性を促進することも報告されている (Tsuiji ら 2009; Murakami ら 2011)。フィトスフィンゴシンをマウスに経口投与した場合には、グルコース負荷試験における血糖値の急激な上昇が緩和され、肥満が改善されたとの報告があるが、これはフィトスフィンゴシンの吸収により PPAR γ が増加し、糖代謝が影響を受けたことによると解される (Evans ら 2004)。スフィンゴイド塩基による PPAR の転写制御に、その構造の違いが影響を及ぼす可能性が示唆された。

食事性 GluCer による遺伝子発現の調節については、マイクロアレイを用いた網羅的解析も行われている。ヘアレスマウスを SDS で処理することで皮膚にダメージを与え、コンニャク由来の GluCer を経口投与したところ、角質細胞の接着や構造に影響する密着結合 (tight junction) と周辺帯 (cornified envelope) の形成に関する複数の遺伝子の転写量の増加が皮膚組織で見られた (Ideta ら 2011)。しかし、その変化量はさほど大きいものではなく (2 倍以下)、程度は小さくても複数種の遺伝子に幅広く影響することで皮膚のバリア機能向上に影響していると Ideta ら (2011) は考察している。また、ヘアレスマウスに HR-AD を 4 週間給餌し、その後に 0.1% (w/w) のトウモロコシ由来の GluCer を混合した通常食を 4 週間飼育したところ、通常食のみを給餌した場合に比べ、97 個の遺伝子の発現が 1.5 倍以上増加した (Takatori ら 2013)。その中には、皮膚の再生に必要なケラチン合成に関する遺伝子だけでなく、先の報告にあった密着結合と周辺帯の形成に関する遺伝子も含まれていた。一方で、1.5 倍以上発現が減少した遺伝子は 135 個であった。その中には脂質代謝に関わる遺伝子が 14 個も含まれていた。特に表皮層では、細胞の脂質構成がバリア機能に影響することから、それらの遺伝子の発現の減少はバリア機能の回復という結果とは矛盾するこ

とになるが、現在のところは、皮膚バリア機能が回復したために、脂質代謝を増加させる必要がなくなり、低下調節 (downregulation) されたものと説明されている。これらの結果は、食事性 GluCer がセラミド合成系以外の複数の遺伝子の発現調節にも影響することを示している。しかし、消化吸収された GluCer がどのようにこれらの遺伝子の発現を制御するかは明らかになっておらず、今後の解明が待たれる。いずれにせよ、皮膚組織におけるセラミド合成酵素の活性低下による表皮セラミド量の低下は、乾燥肌、アトピー性皮膚炎、乾癬等の皮膚病を引き起こすと報告されているので (Imokawa ら 1991; Motta ら 1993; Motta ら 1994; Jensen ら 2004)、食事性 GluCer によりセラミド合成を促進させることは、皮膚病の予防や治療に役立つと考えられる。

3. 食事性 SL が実験的大腸炎に及ぼす影響

食事性 SM による大腸炎抑制効果については、デキストラン硫酸 Na (Dextran sulfate sodium salt; DSS) を投与して腸炎を発症させたマウスを用いて調べられているが、大腸炎を抑制するという報告もあれば (Furuya ら 2008)、促進するという報告もあり (Ahn & Schroeder 2002; Sakata ら 2007a; Sakata ら 2007b; Fischbeck ら 2011)、その効果には一貫性が見られない。Furuya ら (2008) の報告では、0.1% (w/w) の SM 市販品を添加した飼料を 10 日間給与することにより、腸炎の重篤度が低下し、炎症により増加した腸管組織のミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase; MPO) 活性が低下することが観察されている (Furuya ら 2008)。これらの結果は、食事性 SM が大腸炎抑制効果があることを示すものである。また、SM のアナログ (スフィンゴミエリナーゼの拮抗阻害剤) を経口投与したところ、スフィンゴミエリナーゼの活性が低下し、その結果セラミドシグナリングが低下して、腸上皮細胞からのインターロイキン-8 や他の炎症性サイトカインの生成が低下することで腸炎の重篤度が低下したという報告もある (Sakata ら 2007b)。また、食事性 SM が腸管内で分解されることにより生じたセラミドは、腸管上皮細胞のカテプシ

ンDの発現を誘導して、アポトーシスを促進したという報告もある (Fischbeck ら 2011)。Fischbeck ら (2011) は、その結果として腸粘膜上皮細胞の更新 (turnover) が速くなり、生理的に未成熟な細胞が増えて、腸粘膜の重要な機能である障壁、防御、栄養物の吸収などが不十分となると述べており、このことは炎症の増悪につながる可能性があるとして推測している。食事性 SM による影響が異なる理由は、現時点では不明であるが、SM の起源となる動物種や抽出した組織部位の違い、マウスへの給与方法の違い、または使用したマウスの系統の違い等により、SM の効果が異なることも考えられる。

SM に比べ、食事性 GluCer による大腸炎抑制効果についての報告例は少なく、Arai ら (2015) の報告のみである。その中では、DSS を用いて腸炎を発症させたマウスに、市販の高濃度 GluCer 調製品 (純度 >80%, トウモロコシ由来) を 0.1% (w/w) の割合で混合した飼料を給与したところ、DSS により誘導された大腸絨毛への傷害が軽減されており、組織学的に腸炎が緩和されることが示されている (Arai ら 2015)。更に、炎症の指標となる MPO 活性も GluCer の給与により低下しており、このことも食事性 GluCer が腸炎症状を緩和するということを裏付けている。給与方法は異なるが、trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いて腸炎を誘発したマウスに GluCer を腹腔内投与した場合には、NKT 細胞を調節することで腸炎の症状が組織学的に緩和されることが報告されている (Zigmond ら 2007)。給与方法の違いにかかわらず、GluCer は腸炎症状を緩和するという事は一致するものであった。我々も食事性 GluCer の大腸炎緩和効果を DSS による実験的大腸炎マウスで調べた (未発表)。しかし、Arai ら (2015) と同様に市販の高純度の GluCer 調製品 (純度 >90%, トウモロコシ由来) を 0.1% (w/w) の割合で混合した飼料を給与したが、血便や軟便の改善程度はわずかであり、DSS による体重低下の改善も見られなかった。(ちなみに、Arai ら (2015) の報告でも、組織学的な腸炎緩和兆候は観察されているものの、体重低下の改善には至っていない) 食事性 GluCer によ

る実験的大腸炎の抑制効果の程度については再検討する必要があるが、トウモロコシ GluCer を水解して調製したセラミドを GluCer に代えて実験的大腸炎マウスに給与した場合には、DSS による体重低下が改善され、DSS を投与しなかった場合に近い形で体重が推移した (未発表)。また、血便や軟便の改善程度は GluCer 給与時よりも大きく、DSS による MPO 活性の増加も GluCer よりも大きく抑制されていた。このことは、食事性 GluCer よりも食事性セラミドの方が生理効果が高いことを示している。食事性 SM の効果は、SM 自体というよりも分解されて生じたセラミドやスフィンゴイド塩基によるものと考えられており (Fischbeck ら 2011)、GluCer もスフィンゴイド塩基にまで分解され腸管から吸収されてから、生体内で生理活性を持つものと思われるので、より分解された形であるセラミドの方が生理効果が高いと推測される。そうであれば、食事性セラミドの方が食事性 GluCer よりも効果が高かったということは、消化管内での GluCer からセラミドへの水解反応に改善の余地があることを意味しており、この反応を増強することで、食事性 GluCer がもたらす生理効果を増大させることができると考えられる。我々は、GluCer を含む植物性食品 (穀類や果物) は常時摂取しているので、消化管内でのセラミドへの水解反応を増強するだけで、その生理効果が増大するかもしれない。先の食事性 GluCer の効果が不明瞭であった理由としても、使用したマウスの系統の違いや、保持する腸内細菌叢の違いにより、消化管内での GluCer 水解活性が異なり、生じたセラミド量が異なっていたことが可能性の一つとして考えられる。

また、報告例の多さから食事性 SM は大腸炎を促進すると解釈した場合には、食事性 GluCer とは実験的大腸炎に及ぼす効果が全く異なることになる。この違いの原因の一つとして、SM と GluCer とで、構成するスフィンゴイド塩基が異なることが考えられる。また、それに結合する脂肪酸の鎖長や二重結合の数や位置も影響すると考えられる。すなわち、SM と GluCer では、分解されて生じるセラミドの構造の違いにより効果が異なるという可能性が考えられる。し

かし、前章の皮膚炎モデルにおいては、食事性 SM と GluCer のどちらもセラミド合成酵素の活性を増加させ、皮膚炎を緩和するという報告があり、必ずしも効果が異なるとは限らない。その生理効果は、臓器や組織部位によりセラミドやスフィンゴイド塩基が影響する遺伝子群が異なるのかもしれない。

いずれにせよ、大腸炎を抑制するためには、GluCer を摂取するのが望ましいが、そのままではセラミドへの水解反応が弱いので、食事性 GluCer の生理効果を増大するためには、セラミドへの水解反応を増加させる必要があると考えられる。動物の消化管粘膜上皮自体でのセラミドへの水解能が低いことは前述の通りであり、改良を加えるのは極めて困難である。それを解決する方策の一つとして、腸内細菌による GluCer の水解を増強することに期待が寄せられる。そこで、次章では腸内細菌の GluCer の水解について考察する。

4. 腸内細菌による GluCer の水解

腸内細菌による GluCer の水解についての研究報告は数少ない。ヒトの腸内細菌やラットの盲腸内細菌の中にグルコシルセラミダーゼ活性を持つものが存在することが報告されていることから (Larson ら 1988; Sugawara ら 2003)、腸内細菌の中には GluCer 水解能を持つ菌が存在すると考えられているが、まだ単離されておらず、個体数も不明である。我々が調べた限りでは、ヒトやラットの消化管内に GluCer 水解菌が必ずしも存在することはなく (未発表)、これはイヌ、ネコ、ブタ、ウシ等の他の動物でも同様であった。むしろ、消化管内に GluCer 水解菌を保有する個体の方が希少であった (未発表)。このことは、食事性 GluCer がほとんど分解や吸収を受けずに糞中に排泄されるという結果と一致する (Nilsson 1969b)。動物の糞便より単離された GluCer 水解菌としては、我々が発見した *Blautia glucerasei* が最初である (Furuya ら 2010)。イヌの糞便より単離された本菌は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析では、*Clostridium* クラスター XIVa に属する芽胞形成菌であった。それ以外に *Paenibacillus* sp. と *Rhodococcus*

sp. という 2 種の GluCer 水解菌の存在が報告されているが、いずれも土壌菌であり (Ito & Yamagata 1986; Ito & Yamagata 1989; Sumida ら 2002; Ishibashi ら 2007)、一般的には消化管内に生息するとは考え難い。また、土壌菌の GluCer 水解活性は極めて低いことから、たとえ腸管内に入ってきたとしても一過性であると推測されるので、GluCer 水解には貢献しないと考えられる。一方、腸内菌である *B. glucerasei* の GluCer 水解活性は高く、土壌菌と異なり、短鎖のみならず長鎖のアシル基を持つ GluCer も水解することができた (Furuya ら 2010)。植物由来の GluCer のほとんどが、長鎖のアシル基を持つことから (Bohn ら 2001)、本菌は消化管内においても食事性 GluCer を水解するものと思われる。また、我々は *B. glucerasei* とは異なる未同定の GluCer 水解菌も見つけており (未発表)、動物個体によっては複数種の GluCer 水解菌が消化管内に生息すると推測される。我々が単離したいずれの菌も、GluCer からセラミドへの水解は行ったが、セラミドからスフィンゴイドへの分解は行わなかった (未発表)。また、グルコシルスフィンゴシン、ラクトシルセラミドやモノシアログングリオシド GM3 等の類似化合物は水解せず、そのグルコシルセラミダーゼは GluCer に特異的であると考えられた (Furuya ら 2010)。このような GluCer 水解菌を腸管内で増やすことができれば、前章に記載したように、消化管内での GluCer からのセラミド産生を増加させられると考えられるので、食事性 GluCer の生理効果の増大が期待出来る。これらの菌の安全性が確認されれば、プロバイオティクスやプレバイオティクスによりその存在数を増加させることも手段の一つになると思われる。まだ検証中ではあるが、食事性 GluCer を給与したマウスに *B. glucerasei* の生菌を 1 日あたり 10^{10} 個/マウス個体で経口投与した場合に、糞中に排泄される GluCer 量が低下することが観察されており (未発表)、GluCer 水解菌をプロバイオティクスとして使用することで、GluCer 利用量が増加すると考えられ、今後はその機能を応用することが期待される。その場合には、本稿で紹介した食事性 GluCer の皮膚バリア効果や大腸炎緩和効果をよ

り高めることができるであろう。今回は省略したが、大腸癌との関連も検討すべき重要事項である。また、我々が単離した GluCer 水解菌の特性を活かして調製したセラミドを用いることで、セラミドの機能を更に広汎に評価することも可能となると思われる。

引用文献

- Ahn EH, Schroeder JJ. (2002): Sphingoid bases and ceramide induce apoptosis in HT-29 and HCT-116 human colon cancer cells. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 227: 345-353.
- Aida K. (2007): Food functionality of plant glucose -prevention of aberrant crypt foci formation by dietary plant and fungal glucoses in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice-. *Oleoscience*, 7: 141-149.
- Arai K, Mizobuchi Y, Tokuji Y, Aida K, Yamashita S, Ohnishi M, Kinoshita M. (2015): Effects of dietary plant-origin glucose on bowel inflammation in DSS-treated mice. *Journal of Oleo Science*, 64: 737-742.
- Blank ML, Cress EA, Smith ZL, Snyder F. (1992) : Meats and fish consumed in the American diet contain substantial amounts of ether-linked phospholipids. *The Journal of Nutrition*, 122: 1656-1661.
- Brady RO, Kanfer J, Shapiro D. (1965): The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 39-43.
- Bohn M, Heinz E, Luthje S. (2001): Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387: 35-40.
- Dany M, Ogretmen B. (2015): Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853: 2834-2845.
- Duan J, Sugawara T, Aida K, Hirose M, Sakai S, Fujii A, Hirata T. (2012): Dietary sphingolipids improve skin barrier function via up-regulation of ceramide synthases in the epidermis. *Experimental Dermatology*, 21: 448-452.
- Duan J, Sugawara T, Sakai S, Aida K, Hirata T. (2011): Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF-alpha levels and leukocyte infiltration. *Lipids*, 46: 505-512.
- Duan RD, Bergman T, Xu N, Wu J, Cheng Y, Duan J, Nelander S, Palmberg C, Nilsson Å. (2003): Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ectoenzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 38528-38536.
- El Alwani M, Wu BX, Obeid LM, Hannun YA. (2006): Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacology & Therapeutics*, 112: 171-183.
- Elias PM, Menon GK. (1991): Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in Lipid Research*, 24: 1-26.
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. (2004): PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, 10: 355-361.
- Feingold KR. (2007) : Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 48: 2531-2546.
- Fischbeck A, Leucht K, Frey-Wagner I, Bentz S, Pesch T, Kellermeier S, Krebs M, Fried M, Rogler G, Hausmann M, Humpf HU. (2011): Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis. *Gut*, 60: 55-65.
- Furuya H, Ide Y, Hamamoto M, Asanuma N, Hino T. (2010): Isolation of a novel bacterium, *Blautia glucerasesi* sp. nov., hydrolyzing plant glucose to ceramide. *Archives of Microbiology*, 192: 365-372.
- Furuya H, Ohkawara S, Nagashima K, Asanuma N, Hino T. (2008): Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78: 41-49.
- Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. (2015): Tumor suppressive functions of ceramide: evidence and mechanisms. *Apoptosis*, 20: 689-711.
- Hannun YA, Linares CM. (1993): Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154: 223-236.
- Harvald EB, Olsen AS, Faergeman NJ. (2015): Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis*, 20: 658-670.
- Ideta R, Sakuta T, Nakano Y, Uchiyama T. (2011): Orally administered glucosylceramide improves the skin barrier function by upregulating genes associated with the tight junction and cornified envelope formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75: 1516-1523.
- Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. (1991): Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *The Journal of Investigative Dermatology*, 96: 523-526.
- Ishibashi Y, Nakasone T, Kiyohara M, Horibata Y, Sakaguchi K, Hijikata A, Ichinose S, Omori A, Yasui Y, Imamura A, Ishida H, Kiso M, Okino N, Ito M. (2007): A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 11386-11396.
- Ito M, Yamagata T. (1986): A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 14278-14282.
- Ito M, Yamagata T. (1989): Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidases) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. Evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 9510-9519.
- Jensen JM, Folster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schutze S, Proksch E. (2004): Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 122: 1423-1431.
- Larson G, Falk P, Hoskins LC. (1988): Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. *The*

- Journal of Biological Chemistry, 263: 10790–10798.
- Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. (1993): Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1182: 147–151.
- Motta S, Sesana S, Monti M, Giuliani A, Caputo R. (1994): Inter-lamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum.*, 186: 131–132.
- Murakami I, Wakasa Y, Yamashita S, Kurihara T, Zama K, Kobayashi N, Mizutani Y, Mitsutake S, Shigyo T, Igarashi Y. (2011): Phytoceramide and sphingoid bases derived from brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* activate peroxisome proliferator-activated receptors. *Lipids in Health and Disease*, 10: 150–160.
- Nilsson Å. (1968): Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 164: 575–84.
- Nilsson Å. (1969a): The presence of sphingomyelin- and ceramide-cleaving enzymes in the small intestinal tract. *Biochimica et Biophysica Acta*, 176: 339–347.
- Nilsson Å. (1969b): Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 187: 113–121.
- Nixon GF. (2009): Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 158: 982–993.
- Nyberg L, Nilsson Å, Lundgren P, Duan RD. (1997): Localization and capacity of sphingomyelin digestion in the rat intestinal tract. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8: 112–118.
- Ogawa T, Migita H, Shimada S, Ichida J, Osada K. (2014): The structure and level of glucose in apple pomace. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 61: 251–257.
- Sakata A, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, Toda A, Eyanagi R, Soeda S. (2007a): Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide-mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against disease pathology in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Immunology*, 122: 54–64.
- Sakata A, Yasuda K, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, Soeda S. (2007b): Inhibition of lipopolysaccharide-induced release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells by SMA, a novel inhibitor of sphingomyelinase and its therapeutic effect on dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Cellular Immunology*, 245: 24–31.
- Schmelz EM, Crall KJ, Larocque R, Dillehay DL, Merrill AH Jr. (1994): Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *The Journal of Nutrition*, 124: 702–712.
- Shirakura Y, Kikuchi K, Matsumura K, Mukai K, Mitsutake S, Igarashi Y. (2012): 4,8-sphingadienine and 4-hydroxy-8-sphingenine activate ceramide production in the skin. *Lipids in Health and Disease*, 11: 108–116.
- Sperling P, Heinz E. (2003): Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1632: 1–15.
- Spiegel S, Merrill AH Jr (1996): Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 10: 1388–1397.
- Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Nagata J, Saito M. (2003): Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 133: 2777–2782.
- Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Tsuzuki T, Miyazawa T, Nagata J, Hirata T, Saito M. (2004): Efflux of sphingoid bases by P-glycoprotein in human intestinal Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68: 2541–2546.
- Sugawara T, Miyazawa T. (1999): Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids*, 34: 1231–1237.
- Sugawara T, Tsuduki T, Yano S, Hirose M, Duan J, Aida K, Ikeda I, Hirata T. (2010): Intestinal absorption of dietary maize glucosylceramide in lymphatic duct cannulated rats. *Journal of Lipid Research*, 51: 1761–1769.
- Sumida T, Sueyoshi N, Ito M. (2002): Molecular cloning and characterization of a novel glucocerebrosidase of *Paenibacillus* sp. TS12. *Journal of Biochemistry*, 132: 237–243.
- Takakuwa N, Saito K, Ohnishi M, Oda Y. (2005): Determination of glucose contents in crop tissues and by-products from their processing. *Bioresource Technology*, 96: 1089–1092.
- Takatori R, Le Vu P, Iwamoto T, Satsu H, Totsuka M, Chida K, Shimizu M. (2013): Effects of oral administration of glucosylceramide on gene expression changes in hairless mouse skin: comparison of whole skin, epidermis, and dermis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77: 1882–1887.
- Tsuji K, Mitsutake S, Ishikawa J, Takagi Y, Akiyama M, Shimizu H, Tomiyama T, Igarashi Y. (2006): Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice. *Journal of Dermatological Science*, 44: 101–107.
- Tsuji K, Satoh S, Mitsutake S, Murakami I, Park JJ, Li Q, Chang YT, Chung SK, Igarashi Y. (2009): Evaluation of synthetic sphingolipid analogs as ligands for peroxisome proliferator-activated receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19: 1643–1646.
- Ueda N. (2015): Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 5076–5124.
- Vesper H, Schmelz EM, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill AH Jr. (1999): Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *The Journal of Nutrition*, 129: 1239–1250.
- Wertz PW, Downing DT. (1982): Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Science*, 217: 1261–1262.
- Wu J, Cheng Y, Palmberg C, Bergman T, Nilsson Å, Duan RD. (2005): Cloning of alkaline sphingomyelinase from rat intestinal mucosa and adjusting of the hypothetical protein XP_221184 in GenBank. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1687: 94–102.
- Yeom M, Kim SH, Lee B, Han JJ, Chung GH, Choi HD, Lee H, Hahm DH. (2012): Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. *Journal of Dermatological Science*, 67: 101–110.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang

E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH Jr. (2006): Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1864–1884.

Zigmond E, Preston S, Pappo O, Lalazar G, Margalit M, Shalev Z, Zolotarov L, Friedman D, Alper R, Ilan Y. (2007): Beta-glucosylceramide: a novel method for enhancement of natural killer T lymphocyte plasticity in murine models of immune-mediated disorders. *Gut*, 56: 82–89.