

香辛料による摂食・嚥下障害改善に関する基礎的研究

真 野 博 (城西大学薬学部医療栄養学科)

1. はじめに

摂食・嚥下障害は、誤嚥を引き起こし、高齢者の死亡原因にもなる肺炎を惹起する¹⁾。特に、自宅で肺炎を起こした高齢者の70%にみられる不顕性誤嚥は、口腔・咽頭内容物あるいは逆流した胃内容物が気道に侵入しても、自覚や他覚がないので問題である。誤嚥発生のメカニズムとして、摂食・嚥下機能及び気管からの排出機能の低下あるいは異常が考えられる。誤嚥の防止対策として、初期段階ではデンプン、ゼラチンなどでとろみをつけた食品の利用が進められ、最終的には非経口的栄養摂取法が選択されている。しかし、これらは対処療法であり、積極的な予防法・治療法はないのが現状である。我々は、摂食・嚥下障害及び誤嚥の新規の薬学的・食品学的対応方法の確立を最終目的に、まず、摂食・嚥下障害及び誤嚥の発生メカニズムの解明を試みている。

口腔、咽頭、食道組織が正常に機能することで、正常な嚥下が行われる²⁾。正常な嚥下には、神経系の関与が広く知られている。脳硬塞等で神経系の一部に障害が発生すると、嚥下が障害されることは良く知られている。このため、神経系を標的とした摂食・嚥下機構は、良く調べられている³⁾。また、摂食・嚥下障害者のためのリハビリテーションは盛んに行われている。しかしながら、それ以外の、摂食・嚥下の研究はほとんど行われていないのが現状である。とくに、口腔、咽頭の細胞レベル・遺伝子レベルの研究は、ほとんど行われていない。

本研究では、口腔、咽頭の細胞機能に着目し細胞生物学的、遺伝子工学的解析を行った。具体的には遺伝子工学的手法でマウス咽頭から新たに見出したIF5遺伝子を標的遺伝子として、*in vivo*および*in vitro*の解析を行い、口腔・咽頭の機能の解析を行った。また、香辛料は、一般に食品の味や風味(2次機能)を高めるため用いられる。さらに、香辛料には様々な3次機能つまり生理機能への影響も良く知られている⁴⁾。特に、トウガラシに含まれるカプサイシンやターメリックに含まれるクルクミンには、多彩な作用があることが知られている。カプサイシンには神経系へ作用を介した、摂食・嚥下障害改善効果も報告されている。そこで本研究では、カプサイシンやクルクミンのIF5遺伝子発現調節を調べ、香辛料の摂食・嚥下障害改善効果を解明する端緒とした。

2. 実験方法

2.1 IF5 遺伝子のクローニング

4週齢のC57BL/6Jマウスの咽頭からトリゾールを用いRNAを抽出し、SMART法でpcDNA3.1+をベクターとした発現cDNAライブラリーを構築した⁵⁾。1.5 × 10⁷の独立クローンを含む、0.6~1.8 kbのインサートを含んだcDNAライブラリーを用い、マウス咽頭に特異的に発現する遺伝子を検索した。標的遺伝子はシングルプライマーエクステンション法でシーケンスを決定した。遺伝子配列はコンピュータを用い常法に従って解析した。さらに、GenBank、EMBL、Swiss-Prot データベースを用いた検索

を行った^{6, 7)}。

2.2 IF5 遺伝子の組織特異的発現

6 週齢の C57BL/6J マウスから各組織を摘出し、トリゾールを用い RNA を抽出した。抽出した RNA を SuperScript II を用い逆転写し、常法に従って PCR を行った。IF5 プライマーはオープンリーディングフレームを含む 647 bp を含むように設計した。コントロールとして GAPDH (GAP) のオープンリーディングフレームを含む 871 bp を含むように設計した。PCR の条件は IF5 遺伝子はアニーリング温度 58℃、増幅回数 30 回、GAP 遺伝子はアニーリング温度 58℃、増幅回数 30 回で行った。PCR は AmpTaq をもちい ABI9700 で行った⁶⁾。

さらに 4 週齢、10 週齢、48 週齢のマウスの咽頭を用い、上記の方法で RT-PCR を行った。

2.3 DBC1.2 細胞

上皮細胞基底膜細胞株 DBC1.2 を用い研究を行った⁸⁾。37℃、5%CO₂で5%FBSを含む MCDB153 培地 (0.1 mM ethanalamine, 0.1 mM phosphoethanalamine, 10 ng/ml EGF, 5 ng/ml bFGF, 5 µg/ml insulin, 10 µg/ml bovine pituitary extract, 50 µg/ml transferrin 含有) で培養した。また、適宜細胞伸展装置 NS-300 を使用し、細胞にメカニカルストレスを与えた。コンフレントに達した細胞は、無血清培地で一昼夜培養した。その後、5、10、20 nM のクルクミンを含む培地で、2 時間培養し実験に用いた。また、2.5、5、10、20、40、80 µg/ml のカプサイシンを含む培地で、2 時間培養し実験に用いた。

各香辛料成分を作用させた細胞とコントロール (エタノール処理) の細胞からトリゾールを用い RNA を抽出後、逆転写を行い、上記の方法で RT-PCR を行った。ただし、IF5 の増幅回数のみ 38 回に変更した。

3. 結果と考察

マウス咽頭 cDNA ライブラリーから発見した遺伝子を IF5 と名づけた (Fig.1)。この遺伝子は 250 アミノ酸をコードしていた。推定分子量 28 KDa であった。またその N 端に BTG ドメインを持つことから、細胞内あるいは核内に存在する TOB/BTG ファミリーに属するタンパク質と考えられた。この遺伝子群は細胞周期を調節する因子と考えられていることから、IF5 も細胞分化や増殖を調整する因子の一つである可能性が高いと考えられた。

IF5 mRNA の発現を RT-PCR 法で調べた。6 週齢の C57BL/6J マウスの各臓器を用い RT-PCR を行った。その結果、IF5 mRNA はマウスの咽頭、喉頭などの組織に発現していた (Fig.2)。しかし、食道、腸、肝臓などの組織ではまったく発現が検出できなかった。このことから、IF5 は咽頭・喉頭の細胞の機能に深く関与している可能性が考えられた。IF5 は TOB/BTG ファミリーに属することから、これらの組織特異的に細胞分化や細胞増殖に関与する可能性が考えられた。

さらに、この遺伝子発現の咽頭における加齢による影響を調べた。マウスは 4 週齢で離乳し、10 週齢でほぼ成熟する、また 1 年から 2 年が寿命といわれている。それぞれ 4、10、48 週齢のマウス咽頭を用い RT-PCR を行った。4 週齢マウスの咽頭では高発現していた IF5 mRNA は 10 週齢から減少し、48 週齢ではほとんど発現が観察できなかった (Fig.3)。すなわち、加齢により、咽頭細胞で IF5 の発現が低下することから、IF5 の機能も低下している可能性が考えられた。ヒトにおいて摂食・嚥下障害は、加齢が一つの原因と考えられている。加齢による IF5 の発現低下が、摂食・嚥下障害の一つの原因である可能性も考えられた。

```

-222 TATGGCGGGGAAATAGGTATGGTGCAGAGTTGGCAACAAGTAGTGAGTGGCTCTCTAA -163
-162 CTTTGACCACCTTTTGTAGAGACACAGAAATCTTTCTAGCAAGTGTAATGTGTTTAA -103
-102 TTAATCTTTACTGTGCGAGTTTGTAAAGCCACATTTTCCACAGCGGCTCTCTGAAGCCT -43

+1
-42 GAATATTTAGCTCTATGTCTCTACACAGACTGCTTTGGAATCATGAGACGAAATGCA 18
      M R D E I A 6

19 ACAGCAGTTTTTTTTGTCAACAAGATTGGTGAAGAAAGCATGAGAACTGAGTACTCAACAG 78
7 T A V F F V T R L V K K H E K L S T Q Q 26

79 ATAGAAACCTTTGTCATTAAGCTGATGACCATCTTTGTAAGAAAGTACAGAGGCTCACTGG 138
27 I E T F A L K L N T I L F E K Y R G H W 46

139 CACCCGTACTGCCCTTCCAGGGGAGGCTTTAGTGATGATCAGGATAAACCAACATGAG 198
47 H P D C P S K G Q A F R C I R I N N E 66

199 AATAAGACCTGTTTGTAGAAAGGCTTTGTGCTGAGAGTAAATGTGAATTTTTCATCTG 258
67 N K D P V L E R A C A E S N V N F F H L 86

259 GGACTTCCAAAGGAGATGACCATATGGGTGATCCCTTATGAGGTGCTGCTAGTATGTT 318
87 G L P K E M T I W V D P Y E V C C R Y G 106

319 GAGAAAGACATCCCTTTACAAATGCTTCTTTTAAAGGTAGATGGGAGACTGGGAGTTG 378
107 E K K H P P T I A S F K G R W E N W E L 126

379 GCTCAGCATCTCAGCTGTGAGTTAACAAGGCCACGGAGACTGCTCTCTGCGACATCT 438
127 A Q H V S C A V N R A T G D C S S G T S 146

439 TCTGATGAAGAAGTGACAGCAGGAGGCCAGATCATCCCCAAGTGAACAACCCAAAG 498
147 S D E E S C S R E A Q I I P K V N N P K 166

499 AGCGTCTACCAAGGTTGAAATTTCAACAGCATTCAGCGCGTGGTCTGCTGCCCGCT 558
167 S V Y Q V E N F K Q S L Q P W F C C L P R 186

559 AGAAAGCATTTGCGAGATGTCGTGGGTCTCTCCGGGGGCTGCTGCGACCGAGTCCC 618
187 R K H L A D G R G F L P G A A C H P V P 206

619 AAGAGCTCTAAGTGGTGGCGGCGAGCTTCGCGCAGGGTGGACAGATATCACTGGGTCAAC 678
207 K S S K W C R P A S R R V D R Y H W V N 226

679 GCACAACCTGTCAGTGGTGCAGCAGCAGGAGAGCTGGAGAGAGGCTTTGTCTTCC 738
227 A Q L F S G Q T A P G E P G E A L S S 246

739 CTAAAGCAAAAATGAGGCTAAAGCCAAGAAATGCCCCAGTAGAAAAAATGCCTGCTTC 798
247 L K Q K * 250

799 AGGAATGTGAGCAGAGAAGGCTGCTCTGCGACGACAGCAGCACTTGACTTTTATGCTACT 858
859 TTTAATCTTATTTAAGCTTTATGTAAGAAATTTATGAACACTAGTGAATATAGTGCCCTAG 918
919 AAAGTGTATAGACAGAGATGTTGCCGTGATAAAATGAAATGAAATATAGAGAGAGAGA 978
979 CTGGAATTAATACCTCTGTGTTTAAACAAATCTAGTTCAGTTTGTGACAGAGAGT 1038
1039 TTTAAGTCTTGTGTTTAACTATGTTTAAAGTAGGTTTCAACTAAGGAAGATGATCC 1098
1099 TCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG 1130

```

Fig.1 IF5 の cDNA 配列とアミノ酸配列

上記の結果から、IF5 mRNA の発現を保ち、増加させることは、咽頭細胞の機能を維持、回復させ、摂食・嚥下障害の発生の予防・改善に役立つ可能性が考えられる。そこで、クルクミンとカプサイシンに着目し、*in vitro* の解析を行った。*In vitro* 系の試験で簡便に、実験系を行うことが可能となった。*in vitro* 系はマウス咽頭上皮細胞の性質を最も良く保存する細胞株である上皮細胞基底膜細胞 DBC1.2 を用いた (Fig.4)。まず、上皮細胞基底膜細胞 DBC1.2 にクルクミンを作用さ

せた。その結果、DBC1.2 細胞では、クルクミンが 5 nM から濃度依存的に IF5 mRNA 量を増加させた (Fig.5)。また、同様にカプサイシンも 2.5 μ g/ml から濃度依存的に DBC1.2 の IF5 mRNA 量を増加させた (Fig.6)。

クルクミンはターメリックに含まれ、細胞内シグナル伝達系 (リン酸化カスケード) に作用し、

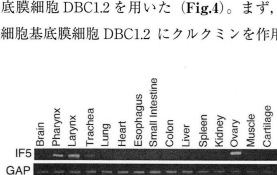


Fig.2 マウスの各組織の IF5 mRNA 発現

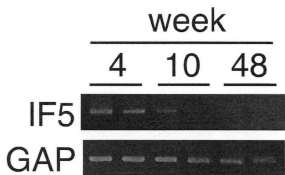


Fig.3 加齢によるマウス咽頭の IF5 mRNA 発現の減少

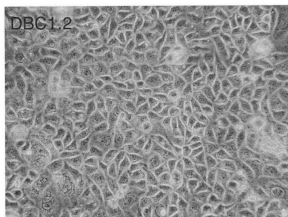


Fig.4 コンフレント状態の培養 DBC1.2細胞

細胞増殖等を制御することも知られている。また、肝臓癌の増殖を抑制するなど多彩な作用が知られている。また、カプサイシンはトウガラシに含まれ、受容体を介し、神経系を経て作用することが知られている。とくに、カプサイシンの発汗作用やエネルギー代謝に関する研究は良く検討されている。一方、カプサイシンは受容体を介さない作用機構の存在も指摘され、カプサイシンの作用の5～10%は未知の作用機構を想定しなければ説明ができないといわれている^{1, 9)}。

本研究においては、クルクミンやカプサイシン

の IF5 mRNA 誘導機構は不明である。また、*in vivo* (生体) において同様に、クルクミンやカプサイシンが IF5 遺伝子発現を誘導するかは不明である。また、実際に、*in vivo* でクルクミンやカプサイシンの摂食・嚥下への影響を解析する必要があると考えられる。今後、さらに研究を継続し、これらのことを明らかにする必要がある。

本研究において、これまでほとんど着手されることがなかった、咽頭の細胞や遺伝子に着目し研究することで、香辛料（クルクミンやカプサイシン）が摂食・嚥下障害改善能を有している可能性を示唆することができた。今後、さらなる研究の発展は、香辛料を用いた、摂食・嚥下障害の予防法や治療法の確立に役立つと期待される。また、香辛料のもつあらたな3次機能の発見により、香辛料の価値が高まった。

謝辞

本研究に対して多大な御助成を下さいました(財)浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。また、本財団の益々の御発展をお祈り申し上げます。

文献

- 1) F. J. Zeman, Clinical nutrition and dietetics. Macmillan (1992)
- 2) R. K. Mittal and D. H. Balaban, The esophagogastric junction. N. Engl. J. Med. 336, 924-932 (1997)
- 3) D. F. Rogers, *et al.* Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in guinea-pigs. Br. J. Pharmacol. 95, 1109-1116 (1988)
- 4) K. Zayasu, *et al.* Capsaicin desensitization inhibits cigarette smoke-induced increase in cytoplasmic motility of alveolar macrophages in guinea pigs. Am. Rev. Respir. Dis. 145, 197-202 (1992)
- 5) K. Takeyama, *et al.* 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. Science 277, 1827-1830 (1997)
- 6) H. Mano, *et al.* IF3, a novel cell-differentiation factor,

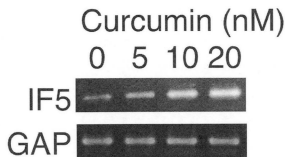


Fig.5 DBC1.2におけるクルクミンによる IF5 mRNA 発現制御

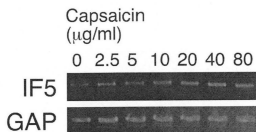


Fig.6 DBC1.2におけるカプサイシンによる IF5 mRNA 発現制御

- highly expressed in murine liver and ovary. Biochem. Biophys. Res. Commun. 297, 323-328 (2002)
- 7) H. Mano, *et al.*, Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator activated receptor δ/β in mature osteoclasts. J. Biol. Chem. 275, 8126-8132 (2000)
- 8) M. Satoh and T. Yoshida, Expression of neural properties in olfactory cytokeratin-positive basal cell line. Develop. Brain Res. 121, 219-222 (2000)
- 9) B. A. Bowman and R. M. Russell, Present knowledge in nutrition. ILSI (2001)

Effects of Spice on Swallowing Disorders

Hiroshi Mano

(Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition Faculty of Pharmaceutical Sciences Josai University)

Dysphagia (difficulty in swallowing) is a complex problem that may be classified in a variety of ways. It is the inability to swallow anything including their own saliva without aspirating. The term does not include pain. The process of swallowing involves oral, pharyngeal, and esophageal phases. The functions of cells in oral, pharyngeal, and esophageal tissues on swallowing are not well known.

In this study, IF5 gene is cloned from mouse cDNA library. IF5 is expressed in oral and pharyngeal tissues, but not other tissues. The level of IF5 mRNA is decrease during aging in mouse. Moreover, IF5 gene is expressed in DBC1.2 cell, epithelium basal cell. The gene regulation of IF5 in DBC1.2 by spice is examined. Curcumin and capsaicin up-regulate mRNA levels of IF5 in DBC1.2.

These data suggest that IF5 may one of key genes in oral and pharyngeal tissues. Moreover, some spices such as curcumin and capsaicin, may maintain oral and pharyngeal functions. These findings shed light on new functions of spice in foods.