

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02155

研究課題名(和文) ODSラットを活用したビタミンCの抗炎症機能の実証と分子機構の解明

研究課題名(英文) Establishment and molecular mechanism of antiinflammatory action of vitamin C by using ODS rats.

研究代表者

堀尾 文彦 (Horio, Fumihiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンC(VC)生合成不能のODSラットにおいて、VC欠乏時には炎症マーカーであるC反応性タンパク質(CRP)の血中濃度が上昇し肝臓で遺伝子発現が増加して炎症様反応が起こる。このCRP発現上昇は腸内細菌のエンドトキシンの腸管から血中への流入により起こるのかを検証するために無菌ODSラットでVC欠乏を引き起こしたところ、通常ラット同様にCRP発現が増加することを明らかにした。さらに、この肝臓のCRP発現の上昇は炎症性サイトカインであるインターロイキン-6(IL-6)の腸管での発現がVC欠乏により上昇して、産生されたIL-6が門脈を介して肝臓に作用することにより起こることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VC欠乏による炎症性マーカーであるCRPの発現上昇と血中濃度上昇はODSラットとヒトとで共通したVCの生理作用であり、この現象が起こる機構において腸内細菌が介在しないことを本研究で初めて明らかにできた。本研究は無菌動物においてVCの生理機能を探求した国内外で初めての例であり、VCの生理機能の新たな側面を発掘し学術的意義は大きい。さらに、VC欠乏は腸管(空腸や回腸)に鋭敏に作用して炎症性サイトカインの産生を誘発することが初めて明らかとなり、腸管での炎症を抑えるためにはVCの十分な摂取が有効であるという社会的な波及効果がある。

研究成果の概要(英文)：In ODS rats unable to synthesize vitamin C (VC), we have demonstrated that VC deficiency elevates serum concentration of C-reactive protein (CRP) and stimulate hepatic CRP gene expression. As CRP is an inflammatory marker, VC deficiency causes inflammatory changes in liver. To examine the possibility that enterobacterium endotoxin incorporated into blood stream may stimulate hepatic CRP expression, we investigated in this study whether VC deficiency caused the stimulation of hepatic CRP expression or not in germ-free ODS rats. As a result, VC deficiency significantly provoked the stimulation of hepatic CRP expression in germ-free (endotoxin-free) ODS rats. Moreover, we clarified that VC deficiency induced the intestinal interleukin-6 production and suggested that interleukin-6 produced in the intestine stimulated the hepatic expression of CRP in VC deficiency.

研究分野：栄養生化学

キーワード：ビタミンC 抗炎症作用 炎症性サイトカイン エンドトキシン ODSラット

1. 研究開始当初の背景

VC は免疫機能に関与し抗酸化能があることから、抗炎症作用を持つことが推定されてきたがその実証例は乏しい。最近になって初めて、ヒトでの大規模横断研究で、VC が不足すると代表的炎症マーカーの C 反応性タンパク質(C-reactive protein、CRP)の血中濃度が上昇することが報告され(*Brit.J. Nutr.*,116:1256(2016))、その機構の解明が待たれている。申請者は VC 生合成不能の ODS ラットの VC 不足時には、ヒトと同様に血中 CRP 濃度が上昇することを見出している(図 1、図 2(C)) (*Nutrition*,31:373(2015))。この現象はマウスでは起こらないことから(*BBA*,1840:2289(2014))、動物モデルでは ODS ラットでのみこの機構を解明できる。近年、高脂肪食摂取が腸管の物質透過性を増大させ、グラム陰性菌外膜成分のエンドトキシンの門脈血への流入を増加させて、肝臓での CRP 発現上昇や全身性炎症を誘発することが報告された(*Diabetologia*, 55:2823 (2012))。申請者は VC 欠乏で門脈血エンドトキシン濃度が上昇する予備的知見を得ており、VC 欠乏の場合にも上述の機構が合致すると考えられる。

STAT3 はその活性化亢進が種々の自己免疫性や慢性炎症性の疾患の形成に関わる重要な転写因子であり(*Semin.Immunol.*,26:88(2014))、通説では血中 IL-6(Interleukin-6)濃度が上昇すると肝臓の STAT3 を活性化させてその支配下の CRP 遺伝子の発現を上昇させるとされている。一方、申請者の解析では、VC 欠乏の ODS ラットでは STAT3 活性化亢進(図 2(A))と CRP 発現上昇(図 2(B))が起こるが循環血の血中 IL-6 濃度の上昇の上昇は明確ではなく、IL-6 以外のサイトカインが STAT3 を活性化している可能性が考えられた(図 1)。そのため、IL-6 以外の分子、例えば IL-6 family サイトカインの IL-11、LIF (leukemia inhibitory factor)、CNTF (ciliary neurotrophic factor)や、IL-2、IL-7、IL-9、IL-10、IL-23 等の STAT3 活性化誘導能を持つ分子(*Immunity*,36:157 (2012))により STAT3 が活性化されている可能性が考えられた。

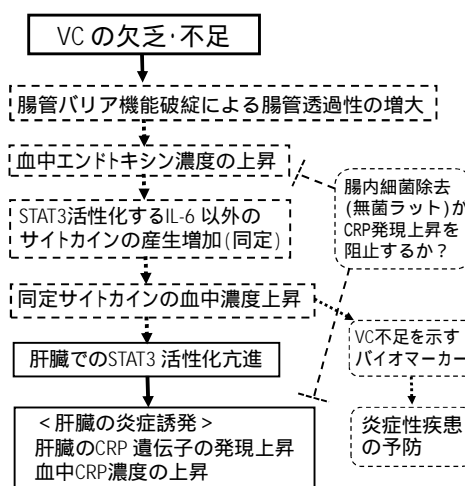


図1 本研究の流れと検討項目
(実線部は調査済み、破線部は本研究で実施)

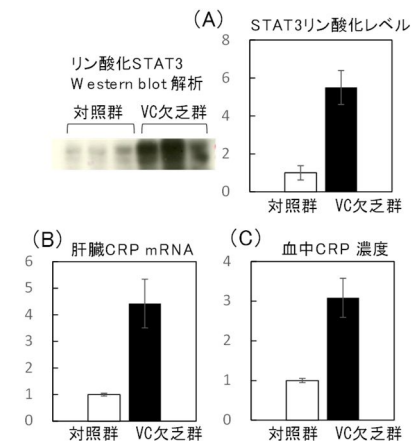


図2 肝臓のリン酸化STAT3(A)、肝臓CRP mRNA (B)、血中CRP濃度(C)

2. 研究の目的

VC 生合成不能の ODS ラットを用いて、ヒトにも共通して見られる VC 欠乏が肝臓の炎症を誘導する機構を CRP 発現を指標にして明らかにすることにより、今まで未解明の VC の抗炎症作用の機構を提唱することを目的とした。

具体的内容として第一に、VC 欠乏が腸管の透過性を増大させることによって肝臓で炎症誘導する可能性について無菌 ODS ラットを用いて明らかにすることを目的とした。第二に、VC 欠乏で CRP 発現を誘導する未知のサイトカインを同定し、VC 欠乏によるこの因子の産生上昇機構を検討した。対象として IL-6 family のサイトカイン(IL-6、IL-11、LIF、CNTF など)を有力な候補と考えた。

3. 研究の方法

(1) VC 欠乏による腸管の透過性増大と門脈血エンドトキシン濃度上昇の検証

ODS ラット(雄)に VC 無添加飼料を与える欠乏群と、VC100 mg/kg 添加飼料を与える対照群を設けて、欠乏群で肝臓 CRP 発現が上昇する 14 日間の飼育を行った。

14 日目の VC 欠乏群と対照群に FITC-デキストランを経口投与して、投与後の両群の門脈血と循環血(腹部大静脈から採血)の FITC-デキストラン濃度を経時的に測定した。

14 日目の VC 欠乏群と対照群の ODS ラットを麻酔下において開腹し、エンドトキシンの汚染を極力防ぎながら門脈にシリンジを挿入して門脈血を採取した。門脈血から血漿を採取してトキシノメーターを用いて高感度エンドトキシンアッセイ法によりエンドトキシン濃度を測定した。

(2) 腸内細菌の存在しない無菌 ODS ラットで VC 欠乏による CRP 発現上昇の有無の検証

無菌の ODS ラットを作製し(日本クレア(株)生育所にて作製)、腸内細菌非存在下では VC 欠乏による肝臓の CRP 発現上昇が起こらないかどうかを検討した。また、項目 3 で同定されるサイトカインにも着目し、腸内細菌非存在下では VC 欠乏によるこのサイトカインの組織での発現上昇と血中濃度上昇が起こるかどうかを検討した。

(3) VC 欠乏により血中で上昇する STAT3 活性化サイトカインを網羅的解析で見出し、それがどの組織で発現上昇しているかの検討

VC 欠乏群と対照群の 14 日目の循環血と門脈血の血清を用いて、高感度抗体アレイ解析(R&D systems, Cytokine Antibody Array)で約 40 種類のサイトカインの濃度を測定し、VC 欠乏で上昇するものを探索した。中には STAT3 活性化サイトカインの全てが含まれる。上昇したサイトカインの各種組織(回腸、盲腸、空腸、肝臓、抹消血単核球、脾臓など)での mRNA レベルを測定した。

4. 研究成果

(1) VC 欠乏による腸管の透過性増大と門脈血エンドトキシン濃度上昇の検証

VC 欠乏による腸管の透過性増大の可能性の検討

12 日目と 14 日目の VC 欠乏群と対照群に FITC-デキストランを経口投与して、投与後 1 時間、3 時間および 6 時間の門脈血と循環血(腹部大静脈から採血)の両群の血中の FITC-デキストラン濃度を経時的に測定した。12 日目と 14 日目の両日において、投与後 1 時間の門脈血中の FITC-デキストラン濃度は有意ではないが欠乏群で対照群よりも高い傾向は見られた。しかし、3 時間後と 6 時間後の門脈血中の FITC-デキストラン濃度は両群で有意な変化や変化の傾向は見られなかった。12 日目と 14 日目の FITC-デキストラン投与後のすべての時間の循環血中の FITC-デキストラン濃度においては、欠乏群と対照群で差は見られなかった。

当初、欠乏群の門脈血のみ、あるいは門脈血と循環血の両方において、対照群よりも高濃度の FITC-デキストラン濃度が観察できることを期待していた。すなわち、欠乏群では対照群よりも腸管の透過性が亢進していることを期待していた。しかしながら、本研究においては、FITC-デキストラン投与後の 1 時間のみにおいて欠乏群で透過性が亢進している傾向をえたが、有意な差ではなかった。よって、本研究の成果からは VC 欠乏により腸管透過性が亢進しているとは断定できなかった。今後は FITC-デキストランではなく、難吸収性の Cr(クロム)-EDTA を添加した飼料を欠乏群と対照群に数日間摂取させて尿中に排泄された Cr を測定することにより腸管透過性の差を比較するというより生理的な方法を用いて欠乏群の腸管透過性亢進の可能性を検討していくのが好ましいと考えている。

VC 欠乏による門脈血エンドトキシン濃度上昇の可能性の検討

14 日目の VC 欠乏群と対照群の門脈血と循環血(腹部大静脈から採取)の血漿中のエンドトキシン濃度を測定した結果、門脈血では欠乏群でエンドトキシン濃度は対照群に比べて有意に高かった。循環血では両群で差はなかった。この結果は、VC 欠乏群では腸管の透

過性が増大して腸内細菌由来のエンドトキシンが血中に流入していることを示唆しており、このエンドトキシンが肝臓での炎症様反応を引き起こす原因の一つである可能性を支持していた。

(2) 腸内細菌の存在しない無菌 ODS ラットで VC 欠乏による CRP 発現上昇の有無の検証

無菌の ODS ラットを作製し(日本クレア(株)生育所にて作製)、無菌環境下において VC 無添加飼料を与える欠乏群(無菌欠乏群)と、VC600 mg/kg 添加飼料を与える対照群(無菌対照群)を設けて 14 日間の飼育を行った。無菌ラットに対して通常ラットとして、従来使用してきた SPF 環境で飼育した腸内細菌を保有する ODS ラットを SPF 環境下で、VC 無添加飼料を与える欠乏群(SPF 欠乏群)と VC600 mg/kg 添加飼料を与える対照群(SPF 対照群)を設けて 14 日間飼育した。

第一に、従来の成果と一致して、SPF 欠乏群では SPF 対照群に比べて肝臓の CRP mRNA レベルが有意に上昇しており、血中 CRP 濃度の有意な上昇も確認した。つまり、飼育室や食餌中に有害な感染性微生物は存在せずに腸内細菌は各個体が保有している SPF 環境下においては、肝臓の炎症様反応が起こることが確認できた。この結果を基盤にした上で第二に、無菌 ODS ラットの無菌欠乏群では無菌対照群に比べて、肝臓の CRP mRNA レベルは有意な上昇が見られ、他の急性期タンパク質の mRNA レベルも有意に上昇していた(図 3)。そして、血中の CRP 濃度も SPF 欠乏群では SPF 対照群に比べて有意に高い値であった。これらの無菌欠乏群での変化は、SPF 環境下で従来観察されてきた SPF 欠乏群での変化と一致するものであった。

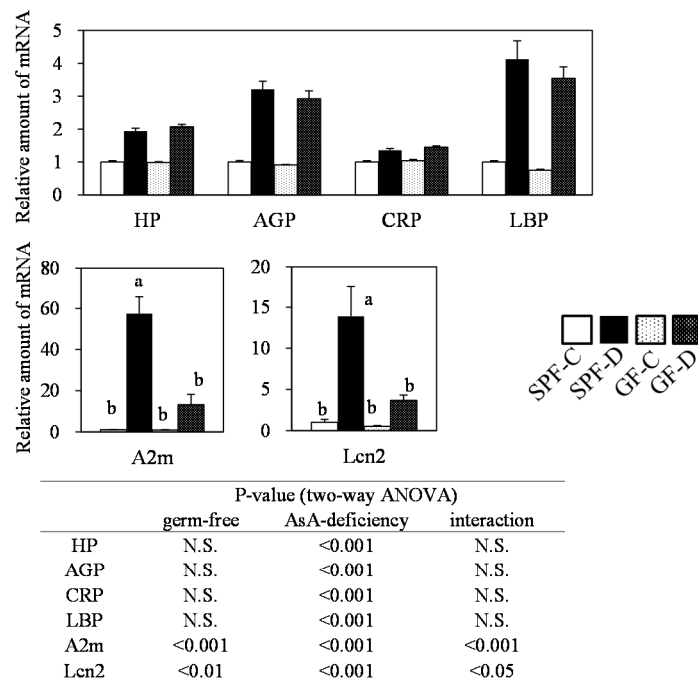


図3. 無菌ODSラットとSPF-ODSラットでのAsA欠乏による肝臓でのAPPs mRNAレベル
HP, ハプトグロビン; AGP, α1-酸性糖タンパク質; CRP, C反応性タンパク質;
LBP, LPS結合タンパク質; A2m, α2-マクログロブリン; Lcn2, リポカリン2. SPF-C群の値
を1とし、平均値±SEで示した。

主効果(germ-free、AsA-deficiency)と交互作用(interaction)はtwo-way ANOVAで評価し
(P<0.05)、有意な交互作用がある場合はTukey-Kramerテストを実施(P<0.05)。

当初は無菌 ODS ラットにおいては、腸内細菌を保有する ODS ラットで見出してきた VC 欠乏群での肝臓の炎症様変化の惹起は起こらない可能性を想定してきたが、この想定とは異なり、本研究によってこの炎症用変化は腸内細菌由来のエンドトキシンが血中に流入して肝臓に作用して引き起こされるものではないことが初めて示された。よって、肝臓の炎症様変化は VC 欠乏が腸内細菌の有無にかかわらず特有の生理機能によって引き起こされるものであることが判明した。国内外において無菌動物での VC 欠乏症状を解析した例は本研究が

最初であり、成果の独創性は高い。

(3) VC 欠乏により血中で上昇する STAT3 活性化サイトカインを網羅的解析で見出し、それがどの組織で発現上昇しているかの検討

VC 欠乏群と対照群の 14 日目の循環血と門脈血の血清を用いて、高感度抗体アレイ解析 (R&D systems, Cytokine Antibody Array) で約 40 種類のサイトカインの濃度を測定した。循環血中では VC 欠乏群で有意に上昇したのは IL-1 であった。STAT3 活性化サイトカインのほぼ全てについて循環血中の濃度の測定を試みたが、IL-6、LIF を含む濃度が測定できたものの中で、VC 欠乏群で上昇するサイトカインを見出すことはできなかった。

この結果を踏まえて、腸管の空腸、回腸、盲腸、結腸の炎症性サイトカインの mRNA レベルを欠乏群と対照群で測定し比較した。STAT3 を活性化するサイトカインについては、IL-6 mRNA レベルが空腸と回腸とにおいて、LIF mRNA は空腸において、IL-7 mRNA レベルは空腸において欠乏群で有意に上昇していた。また、STAT3 は活性化しない炎症性サイトカインである IL-1 の mRNA レベルは空腸と回腸とにおいて欠乏群で上昇していた。そして、門脈血中の IL-6 濃度は欠乏群で対照群に比べて有意に上昇したが、IL-1 濃度と IL-7 濃度は欠乏群と対照群の間で差はなかった。これらの結果より、VC 欠乏群では IL-6 の腸管 (空腸および回腸) での産生が上昇して門脈血中の IL-6 濃度が上昇して肝臓に作用して STAT3 を活性化して CRP の発現を上昇させることが示唆された (図 4)。VC 欠乏が腸管での IL-6 発現を増加させることにより門脈血中の IL-6 濃度を上昇させることが初めて明らかとなった。VC 欠乏は腸管に早い時期に作用することにより肝臓の炎症様反応の惹起に貢献していることが推定された。

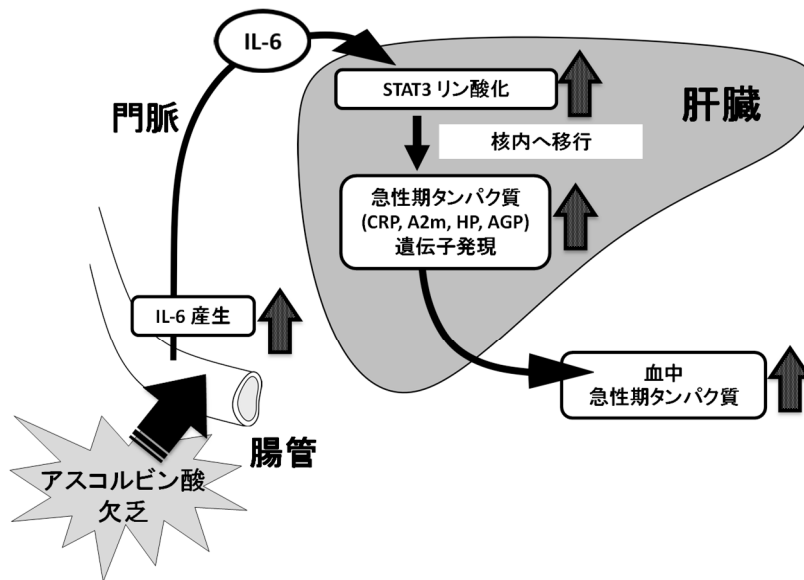


図4 アスコルビン酸欠乏により誘導される肝臓と腸管での炎症様変化の概要
CRP, C反応性タンパク質; A2m, α2-マクログロブリン;
HP, ハプトグロビン; AGP, α1-酸性糖タンパク質.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 川出野絵、村井篤嗣、鈴木若奈、竹内健三郎、近藤誠、小林美里、堀尾文彦	4. 巻 93
2. 論文標題 アスコルビン酸欠乏は腸内細菌の存在の有無にかかわらず肝臓と腸管で炎症関連遺伝子の発現を誘導する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 81-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawade, N., Murai, A., Suzuki, W., Takeuchi, K., Kondo, M., Kobayashi, M. and Horio, F.	4. 巻 86
2. 論文標題 Ascorbic acid deficiency induces hepatic and intestinal expression of inflammation-related genes irrespective of the presence or absence of gut microbiota in ODS rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J.Nutr.Biochem.	6. 最初と最後の頁 108485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2020.108485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 堀尾文彦、川出野絵	4. 巻 94
2. 論文標題 ビタミンCの疾患に関わる生理機能の解析 - 抗炎症作用を中心にして -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 443-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawade, N., Murai, A., Suzuki, W., Tokuda, Y., Kobayashi, M. and Horio, F.	4. 巻 70
2. 論文標題 Ascorbic acid deficiency increases hepatic expression of acute phase proteins through the intestine-derived IL-6 and hepatic STT3 pathway in ODS rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J.Nutr.Biochem.	6. 最初と最後の頁 116-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2019.04012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita, N., Kawade, N., Suzuki, W., Hara, S., Horio, F. and Ichinose, H.	4. 巻 715
2. 論文標題 Deficiency of ascorbic acid decreases the contents of tetrahydrobiopterin in the liver and the brain of ODS rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 134656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.134656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川出野絵、村井篤嗣、鈴木若奈、徳田優希、小林美里、堀尾文彦	4. 巻 93
2. 論文標題 アスコルビン酸欠乏は、腸管でのIL-6産生を上昇させて肝臓のSTAT3を活性化することにより急性期タンパク質の発現を上昇させる	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 485-487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawade, N., Tokuda, Y., Tsujino, S., Aoyama, H., Kobayashi, M., Murai, A. and Horio, H.	4. 巻 64
2. 論文標題 Dietary Intake of Ascorbic Acid Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Sepsis and Septic Inflammation in ODS Rat.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J.Nutr.Sci.Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 404-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 堀尾文彦	4. 巻 71
2. 論文標題 糖・脂質代謝異常症の遺伝因子と食事因子に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本栄養・食糧学会誌	6. 最初と最後の頁 267-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川出野絵、村井篤嗣、鈴木若奈、竹内健三郎、小林美里、堀尾文彦
2. 発表標題 無菌ODSラットにおけるアスコルビン酸欠乏による腸管と肝臓での炎症様変化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川出野絵、鈴木若奈、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏による肝臓でのサイトカイン発現の上昇
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出野絵、鈴木若奈、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏による腸管での炎症様変化と肝臓での急性期タンパク質発現の上昇
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木若奈、川出野絵、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏による腸管での網羅的な遺伝子発現変動の解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出野絵、村井篤嗣、鈴木若奈、竹内健三郎、小林美里、堀尾文彦
2. 発表標題 無菌ODSラットにおけるアスコルビン酸欠乏による腸管と肝臓での炎症様変化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷祥也、川出野絵、鈴木若奈、辻野祥伍、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 ビタミンCの末梢血単核球におけるLPS誘発性TNF- α 産生抑制効果
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川出野絵、鈴木若奈、大谷祥也、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏および不足による肝臓と腸管での炎症関連因子の発現誘導の解析
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川出野絵、鈴木若奈、大谷祥也、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏時の肝臓でのSTAT3活性化と腸管でのサイトカイン発現の上昇
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大野 民生 (Ohno Tamio) (90293620)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------