

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05503

研究課題名(和文) ヒトの食品吸収効率評価法と食品摂取時の腸管免疫機能変化の唾液を用いた解析法の開発

研究課題名(英文) Development of the methods for evaluating the ability of absorption in human jejunum and for assessing the absorptive substance-mediated changes in gut immunity

研究代表者

前島 大輔 (Maejima, Daisuke)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：20715130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コロナの為、ヒトでの臨床研究を中止せざるを得なかった。代わりに、動物実験を行った。(1)ラットに水分摂取を行うと空腸の線維芽細胞からATPが分泌して、粘膜下組織の周囲に多量のpodoplaninが発現する事を見出した。(2)podoplaninで形成された高膠質浸透圧によって水分、アルブミン、アルブミンに結合したIL-22が腸リンパに多量流出することを確認した。(3)水分摂取によって、空腸のenterochromaffin細胞からセロトニンが分泌され、ILC-3細胞のIL-22産生を制御している事を発見した。(4)予備実験で健康なヒトの唾液ではIL-22の測定が困難である事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロナの問題でヒトの臨床研究から動物実験に研究手法を変更した。江戸時代の養生訓で言われてきた「水分摂取」の健康法についてその科学的根拠を明確にするために本研究を実施した。水分を摂取したラットは空腸粘膜下組織に壁内の線維芽細胞からATPの分泌を促し、ポドプランリンを組織周囲に発現し、腸リンパへの水分吸収とそのリンパ液への自然免疫を担うIL-22輸送を誘導する事を発見した。併せて水分摂取は空腸壁のenterochromaffin細胞からセロトニン分泌亢進とセロトニンによるIL-22の遺伝子発現を増強する事を確認した。以上、水分摂取の健康維持の科学的根拠を明確にした点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：We investigated effects of water intake on podoplanin and IL-22 expressions in rat jejunal villi. Water intake accelerated podoplanin and IL-22 levels. ATP increased IL-22 mRNA expression in ILC-3. Hence, water intake may regulate the mucosal immunity. We investigated the roles of water intake in serotonin production and release in rat jejunum. Water intake increased serotonin concentration in the portal vein, but not in the mesenteric lymph vessel. The flux of serotonin through the portal vein was significantly larger than that through the mesenteric lymph vessel. Water intake decreased the density of granules of serotonin in the enterochromaffin cells in the jejunal villi. The intravenous administration of serotonin increased significantly mesenteric lymph flow and the concentrations of albumin and IL-22. Serotonin released from enterochromaffin cells by water intake was mainly transported through the portal vein, which increased mesenteric lymph formation.

研究分野：消化管生理学、消化器内科学、栄養科学

キーワード：水分摂取 養生訓 podoplanin IL-22 自然免疫 enterochromaffin細胞 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

江戸時代の養生訓で言われてきた「朝起きたらお茶一杯、食事のたびに茶碗の米粒を洗うが如くお茶一杯」健康法の科学的根拠を明確にするために本研究を企画立案した。私共は最近、水分摂取の腸管粘膜機能への作用について動物実験を用いて解析した結果、水分摂取したラットは飲水後直ちに、腸リンパが増加し、そのリンパ液中のアルブミン、 ω 3, 6, 9 を含む長鎖脂肪酸の総量が時間と共に増量する事を発見した。併せて、そのリンパ液内に innate lymphoid cells (ILC)-3 由来サイトカイン IL-22 の著明に増加する事と ILC-3 の空腸上部への局在をも証明した (Nagashio S et al., Am J Physiol, 316: G155-G165, 2019)。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では上記で説明したこれまでの研究成果を動物実験とヒトの臨床研究を用いて発展させ、まず初めに、ヒトの乳び槽のリンパの流れを刺激する腹式呼吸を用いて、水分を含む食品の吸収能力を食品組成成分の血液濃度変化からヒトの食品吸収能力を評価する方法を開発する事を第一の研究目的とした。水分摂取がヒトの健康増進に繋がる医学的根拠を確立する事を最終目的とした。
- (2) 第2の研究目的として、水分を含む食品摂取によって、IL-22、IL-23 などの腸管免疫に依存したサイトカイン濃度変化を唾液、汗などを用いて測定し、食品摂取による自然免疫機能の変化を客観的に評価する方法を開発する事を企画した。
- (3) コロナ問題の為、ヒトでの臨床研究は中止せざるを得ない状況に陥った。そこでヒトでの臨床研究を裏付ける動物実験を企画、立案して実施した。
- (4) ラットに胃内腔から水分負荷を行ない空腸の粘膜下組織の食品吸収環境の変化を、環境内のアルブミン濃度、腸管免疫の主要な制御因子の ATP 濃度、podoplanin の発現様式、腸リンパ内の IL-22 濃度などから評価した。
- (5) 次に、ラットに胃内腔から水分負荷を行った際の空腸壁に存在する enterochromaffin 細胞からのセロトニンが分泌様式とセロトニンによる空腸粘膜下組織に存在する ILC-3 細胞の IL-22 発現様式と腸管免疫への影響を評価した。

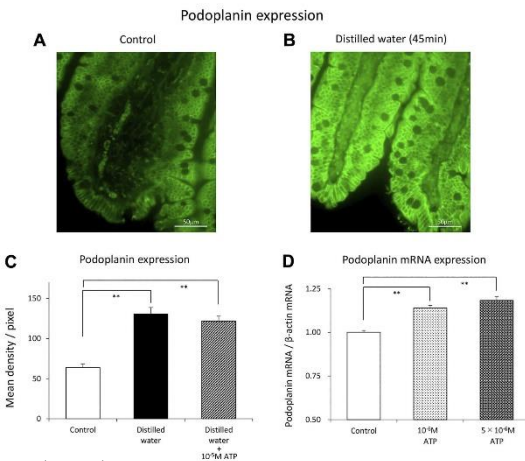
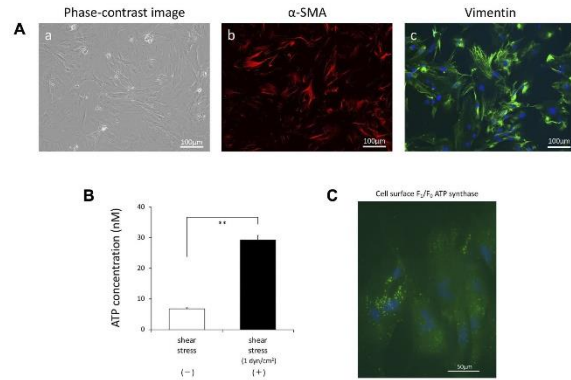
3. 研究の方法

- (1) 生後数日のラット12指腸壁から線維芽細胞を分離、培養し、 1 dyn/cm^2 の低張り応力刺激を行い、培養液に分泌した ATP 濃度を測定した。同時に、培養線維芽細胞表面の F_1/F_0 ATP synthase 発現様式を免疫組織化学的手法によって検討した。
- (2) 培養した腸管上皮細胞に ATP を負荷し、培養細胞に発現する podoplanin を免疫組織化学的手法によって評価した。併せて、非特異的 ATP 受容体阻害薬 suramin の処置の影響を検討した。
- (3) 上記の実験で、培養細胞の podoplanin mRNA の発現様式を合わせて解析した。
- (4) ATP を含んだ水分負荷をラットに行い、空腸絨毛壁の podoplanin mRNA と podoplanin 組織化学活性発現を定量評価した。
- (5) 空腸粘膜下組織の細胞群から ROR γ t, CD127 陽性の ILC-3 をフローサイトメトリー法によって分離し、IL-22mRNA 発現に対する ATP 作用の影響を解析した。
- (6) ATP あるいは suramin を含有した水分負荷をラット胃内腔に行い、空腸絨毛組織の IL-22 発現様式を免疫組織化学的手法によって検討した。
- (7) ラット胃内腔に水分負荷した空腸絨毛組織のセロトニン、セロトニン産生律速酵素 Tph-1, enterochromaffin 細胞の顆粒状態を組織化学的手法によって解析した。
- (8) ラット胃内腔に水分負荷した門脈、腸リンパの流量、セロトニン濃度を経時的に検討した。

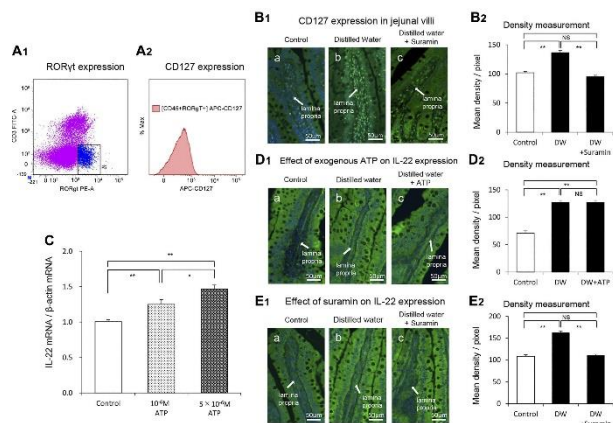
- (9) ラット静脈内のセロトニンを静注し、腸リンパ流量、腸リンパ液内のアルブミン、IL-22濃度を経時的に解析した。併せて、5-HT₂ 受容体阻害薬 ketanserin 前処置の影響を評価した。
- (10) 空腸粘膜下組織からフローサイトメトリー法で分離した ILC-3 に対してセロトニンを処置して IL-22mRNA の発現様式を解析した。

4. 研究成果

- (1) 図1は小腸壁から分離培養した細胞が線維芽細胞である事をαアクチンとビメンチンの存在で確認した。この細胞に1 dyn/cm²のずり応力刺激を加えると細胞表面のF₁/F₀ATPsynthaseを刺激してATPが分泌して来ることを確認した(図1)。
- (2) 培養した筋上皮CaCO₂細胞にATPを作用するとpodoplanin mRNAと免疫組織反応が増強する事を見出した。この両反応はATP受容体拮抗薬のスラミンの前処置によって完全に抑制された。
- (3) ATPを含有した蒸留水をラット胃内腔に投与すると、45分後に空腸粘膜下組織のpodoplanin mRNAと免疫組織反応が著明に出現した(図2)。
- (4) 空腸粘膜下組織の細胞群からRORγt, CD127陽性のILC-3をフローサイトメトリー法によって分離した(図3A)。
- (5) 空腸絨毛組織から分離したILC-3細胞にATPを作用すると用量依存的にIL-22mRNAが発現した(図3C)。
- (6) 水分負荷をラット胃内腔に行うと、空腸絨毛組織のIL-22免疫組織活性が増強した(図3D)。
- (7) 水分胃内腔に投与による空腸絨毛組織のIL-22免疫組織活性は、ATPを水分に添加しても変化なかったが、スラミンの添加によって明らかに抑制された(図3D, E)。



(図2)



(図3)

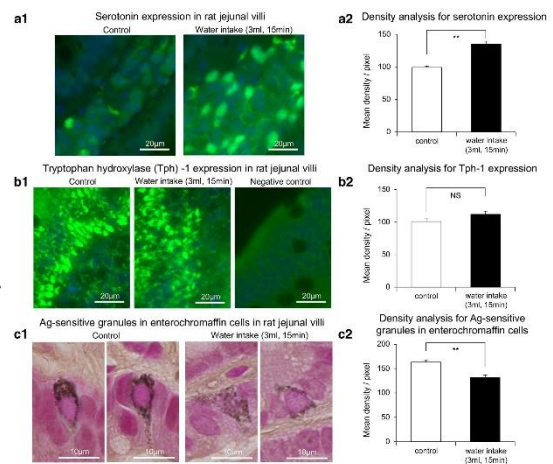
- (8) ラット胃内腔に水分負荷を行なうと、空腸絨毛組織のセロトニン免疫組織活性が明らかに増強した(図4a)。それに対して、セロトニン産生律速酵素 Tph-1 の免疫組織活性は変化が見られなかった(図4b)。
- (9) ラット胃内腔に水分負荷を行なうと、空腸絨毛組織の enterochromaffin 細胞の顆粒は明らかに放出され減少した(図4c)。

(10) ラット胃内腔に水分負荷した門脈のセロトニン濃度、血流量は負荷15分後に著明に増加した。

(11) それに対して腸リンパの流量は負荷15分後に増加したが、リンパ液内のセロトニン濃度は変化が見られなかった。

(12) ラット静脈内にセロトニンを静注すると、腸リンパ流量、リンパ液内のアルブミン並びに IL-22 濃度の増加が静注後1時間くらい認められた。このいずれもの増加も5-HT₂受容体阻害薬 ketanserin 前処置によって完全に抑制された。

(13) 空腸粘膜下組織からフローサイトメトリー法で分離した ILC-3 に対してセロトニンを処置すると IL-22 mRNA の発現が優位に増加した。



(図4)

結論

- (1) 水分摂取によって空腸壁の線維芽細胞から podoplanin が分泌され、血漿から漏出したアルブミンの濃度を維持して、吸収した水分と粘膜下組織に分泌された IL-22 の腸リンパへの移動を容易にしている事が判明した。
- (2) 水分摂取によって空腸壁の enterochromaffin 細胞からセロトニンが分泌され、門脈を通過して全身循環に流出している事が判明した。血液中の微量なセロトニンは腸リンパ産生と ILC-3 細胞の IL-22 発現を制御している事が明らかになった。
- (3) 飲水摂取による健康維持の科学的根拠が明確になった。

[引用文献]

1. Nagashio S et al, Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: new concept of absorption in jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 316: G155-G165, 2019.
2. Hayashi M, et al., Evaluating lymph flow through the thoracic duct using urine osmolarity in human subjects. *Lymphatic Res Biol*, 18 : 351-356, 2020.
- Ohhashi T et al., Current topics of physiology and pharmacology in the lymphatic system. *Pharmacol Ther* 1065: 165-188, 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagashio S, Ajima K, Maejima D, Sanjo H, Kajihara R, Hayashi M, Watanabe-Asaka T, Kaidoh M, Yokoyama Y, Taki S, Kawai Y, Ohhashi T	4. 巻 316
2. 論文標題 Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: New concept of absorption in jejunum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G155-G165
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Moyuru, Watanabe-Asaka Tomomi, Maejima Daisuke, Nagashio Sachiho, Kajihara Ryo, Amari Kei, Yokoyama Yumiko, Kaidoh Maki, Sugano Mitsutoshi, Honda Takayuki, Kawai Yoshiko, Ohhashi Toshio	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluating Lymph Flow Through the Thoracic Duct Using Urine Osmolarity in Human Participants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 351-356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2019.0054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Moyuru, Watanabe-Asaka Tomomi, Nagashio Sachiho, Kaidoh Maki, Yokoyama Yumiko, Maejima Daisuke, Kajihara Ryo, Amari Kei, Arai Nariaki, Kawai Yoshiko, Ohhashi Toshio	4. 巻 320
2. 論文標題 Water intake accelerates ATP release from myofibroblast cells in rats: ATP-mediated podoplanin-dependent control for physiological function and immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G54-G65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00303.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kajihara Ryo, Amari Kei, Arai Nariaki, Nagashio Sachiho, Hayashi Moyuru, Watanabe-Asaka Tomomi, Kaidoh Maki, Yokoyama Yumiko, Maejima Daisuke, Kawai Yoshiko, Ohhashi Toshio	4. 巻 in press
2. 論文標題 Water intake releases serotonin from enterochromaffin cells in rat jejunal villi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02569-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ohhashi T, Kawai Y
2. 発表標題 Water intake accelerates mesenteric lymph flow and the total flux of long-chain fatty acids in rats.
3. 学会等名 Lymphatic Forum 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawai Y, Hayashi M, Watanabe-Asaka T, Ohhashi T
2. 発表標題 Proposed new lymphology combined with lymphatic physiology, innate immunology, and oncology: From lymph flow points of view
3. 学会等名 Lymphatic Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Watanabe-Asaka, Daisuke Maejima, Moyuru Hayashi, Yoshiko Kawai, Toshio Ohhashi
2. 発表標題 Physiological evidence that mesenteric lymph has been called as white blood
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林もゆる
2. 発表標題 ヒト胸管リンパ流量を尿浸透圧変化から推定する測定法の開発：リンパ浮腫療法士の実技試験への応用
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林もゆる、浅香智美、前島大輔、河合佳子、大橋俊夫
2. 発表標題 飲水により空腸より分泌されたATPがIL-22依存性の自然免疫を調節する
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合佳子、浅香智美、林もゆる
2. 発表標題 流れ刺激がリンパ管の機能におよぼす影響について
3. 学会等名 第61回日本脈管学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Natsugoe S ed	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 358
3. 書名 Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 ヒトの胸管リンパ液の流れの評価方法および評価具	発明者 大橋俊夫、河合佳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、185169	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リンパ液流動性向上剤およびリンパ液流動性向上方法	発明者 大橋俊夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、203481	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リンパ液流動性向上のための飲食品	発明者 大橋俊夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、203487	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	河合 佳子 (Kawai Yoshiko) (10362112)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	
研究分担者	林 もゆる (Hayashi Moyuru) (60548147)	信州大学・医学部・特任助教 (13601)	
研究分担者	大橋 俊夫 (Ohhashi Toshio) (80020832)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	

	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
研究協力者	瀧 伸介 (Taki Shinsuke)	信州大学・学術研究院医学系・教授	
研究協力者	山条 秀樹 (Sanjo Hideki)	信州大学・学術研究院医学系・准教授	
研究協力者	山口 昌樹 (Yamaguchi Masaki)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授	

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
---------	---------