

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11807

研究課題名(和文) 腸内で酢酸を生成するトリアセチンの炎症性腸疾患に対する有効性の評価

研究課題名(英文) Evaluation of the efficacy of triacetin intake, which produces acetic acid in the gut, in inflammatory bowel disease.

研究代表者

吉村 征浩 (Yoshimura, Yukihiro)

神戸学院大学・栄養学部・准教授

研究者番号：60455566

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)：炎症性腸疾患患者数は増加の一途を辿っており、患者のQOL改善や医療費増大抑制の観点から、安全性の高い予防法の確立は喫緊の課題である。本研究では、小腸内で酢酸を遊離するトリアセチン(Tri)に注目し、ラットにおけるTri摂取のDSS誘導性大腸炎に対する予防効果の検証及びメカニズム解明を目的とした。本研究により摂取したTriは、上部小腸管腔で完全分解され、酢酸として門脈を経由し体内へ吸収されていることが確認され、Triの事前摂取によりDSS誘導性大腸炎の症状が緩和することが判明した。さらに、その緩和効果のメカニズムは、腸管バリア機能の維持によりDSSによる炎症を予防することであると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性大腸炎の治療に用いられている5-アミノサリチル酸やステロイドには、アレルギー様症状や易感染性、骨粗鬆症、高血糖等の数多くの副作用を起こす可能性があり、大腸炎を予防、緩和するより安全な食事療法が望まれる。酢酸は、抗炎症作用を発揮し、大腸炎を抑制することが知られているが、刺激性や毒性が強いことから多くの摂取が難しく、より安全性の高い物質が求められる。そのため、本研究において確認された食品添加物として安全性が担保されているTriによる炎症性大腸炎モデル動物の大腸炎予防効果は、より安全性の高い予防法確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As the number of patients with inflammatory bowel disease continues to increase, the development of safe preventive methods is an urgent issue from aspects of improving the quality of life of patients and reducing the increase in medical costs. In this study, we focused on triacetin (Tri), which releases acetic acid in the small intestine, to verify the preventive effect of Tri intake on DSS-induced colitis in rats and to investigate the mechanism. The present study confirmed that ingested Tri was completely degraded in the upper small intestinal lumen and absorbed into the body via the portal vein as acetic acid, and that the symptoms of DSS-induced colitis were alleviated by prior Tri ingestion. Furthermore, the mechanism of the alleviation effect was assumed to be the prevention of DSS-induced inflammation by maintaining the intestinal barrier function.

研究分野：食品機能学、生化学、発生学

キーワード：酢酸 炎症性大腸炎 短鎖トリグリセリド

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、長期にわたり消化管に炎症、潰瘍を生じ、出血、下痢、体重減少、発熱などの症状をおこす病気のうち、感染症など原因がわかっているものを除いた炎症性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's Disease: CD) のことを指し、どちらも厚生労働省の指定難病に登録されている (指定難病 96 及び 97)。UC は大腸粘膜に連続的に炎症が生じることで、びらんや潰瘍を生じ、腹痛、下痢、血便、発熱、体重減少等の症状が見られる。CD は口腔から肛門までの消化管のどの部位にも非連続的に炎症や潰瘍を生じるが、中でも大腸と小腸に好発し、腹痛、下痢、血便、体重減少等の症状を来す。どちらも我が国で食生活の欧米化がみられ始めた 1980 年代から患者数が増加の一途を辿っており、最新の統計では、UC 約 22 万人、CD 約 7 万人と報告されている。我が国の UC 患者数は、日本の指定難病の中で最多であり、世界においては米国について第 2 位である。IBD 患者の増加は、医療費の増大につながり、下痢や血便等の症状は、患者の QOL の著しい低下を招く。さらに、IBD における腸粘膜の慢性的炎症は、発がんリスクを顕著に増加させることがわかっており、IBD の長期罹患による慢性炎症が原因で発症する大腸癌 (Colitis cancer) の発症率が、UC の場合発症後 10 年で 1.6%、20 年で 8.0%、30 年になると 18.0% に上昇するという報告もあることから、IBD 予防・治療法の確立が喫緊の課題と考えられる。しかし、発症メカニズム等不明な点が多いことから、現時点で「完治」させる治療法はなく、寛解導入・維持を目的とした治療が行われている。

現在 IBD の治療に用いられている方法としては、軽症から中等症患者への 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) 製剤による寛解導入・維持療法が第一選択薬とされており、5-ASA 製剤でのコントロールができない中等症から重症の活動期の患者にはステロイド薬での免疫抑制による寛解導入が主流となっている。これらの治療は非常に効果が高く、有用な治療法ではあるが、5-ASA 製剤はアレルギー様症状、ステロイドは易感染性、骨粗鬆症、高血糖等の数多くの副作用を起こす可能性があることから、より安全性の高い物質による治療が求められる。

IBD 患者数増加の背景として、食の欧米化とともに患者数が増加していることから、遺伝的要因による免疫系の異常に加えて、食生活やストレス等様々な因子が重なり、腸内細菌叢が乱れることで腸管免疫の恒常性が破綻することが要因の一つとして考えられており、UC・CD 患者において、多様性の低下や (1)、Proteobacteria 門の増加、そして Firmicutes 門の減少が報告されており、いわゆる「善玉菌」とされている *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属が減少することが知られている (2)。さらに、腸管バリア機能も IBD との関連が強いことが分かっている。IBD 患者の腸管ではディフェンシン等の抗菌ペプチドや粘液産生が減少している。

近年、腸内細菌叢の研究が盛んに行われており、腸内細菌叢が多糖類を分解して生成する酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸 (short chain fatty acid: SCFA) が腸管上皮細胞のエネルギー源となる他にも、様々なメカニズムで腸管及び全身の免疫系を制御する上で重要な役割を担っていることが数多く報告されており、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によって誘発された UC モデルマウスにおいて、酢酸ナトリウム (酢酸 Na) の摂取が、UC の病態指標である体重減少、大腸長の短縮、糞便の形状や血便症状を改善させることが報告されている (3)。このことから、酢酸を経口摂取することで、UC の予防・治療効果が期待できるが、酢酸は刺激性や毒性が強く大量摂取は難しいこと、また酢酸 Na は Na も同時に摂取することになり、高血圧を招く可能性があることが問題点として挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、より安全性が高く、体内で酢酸を生成する食品成分を探索し、食品添加物として認可されており、グリセロール骨格にアセチル基が 3 つ結合した「トリアセチン (Tri)」に着目した。Tri は小腸でリパーゼの作用によって酢酸を 3 分子生成し、酢酸として門脈経路で吸収されると考えられる。このことから、Tri 摂取によっても、酢酸と同様に IBD を予防・治療できる可能性がある。そこで、Tri 摂取がラット DSS 誘導性大腸炎の症状にどのような影響を及ぼすか評価し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、UC に対する新たな予防法の確立を目的とし、次の 3 点について検討を行った。

### (1) Tri の消化吸収過程

長鎖あるいは中鎖トリグリセリドの消化吸収過程は良く知られているが、短鎖トリグリセリドである Tri がどのように消化され、体内に吸収されるかは現在まで明らかではない。そこで、門脈に canulation を施したラットに麻酔下にて、2 mmol の Tri を胃ゾンデにて摂取させ、一定時間ごとに門脈より採血を行い、血清を調整した。血清中の酢酸濃度を F-キット酢酸によって定量し、一定時間に門脈を通過する酢酸の量を計算した。

## (2) Tri 摂取が DSS 誘導性大腸炎に与える影響

F344 ラットを用いて、DSS により大腸炎を誘発し、66.7 mmol/L 及び 133 mmol/L の Tri 及び 200 mmol/L の酢酸 Na を飲水により与え、体重減少、大腸長、糞便形状、血便症状、血漿リポ多糖（内毒素、LPS）濃度を観察・測定することで大腸炎の予防効果を検討した。

## (3) Tri 摂取が DSS 誘導性大腸炎症状を抑制するメカニズムの解明

さらに、Tri の UC 予防効果のメカニズムを検討するために、解剖時に採取した大腸組織サンプルを用いてリアルタイム PCR を行い、免疫関連遺伝子や上皮細胞接着因子等の遺伝子発現を解析した。また、ウェスタンブロットによって大腸組織中のタンパク質発現を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) Tri の消化吸收過程

門脈カニューレレーションラットへ、胃ゾンデにより 2 mmol の Tri を投与した後、継時的に採取した門脈血中の酢酸濃度を測定したところ、投与後 30 分間で門脈血中の酢酸濃度の上昇が観察され、1 時間で最大となり、その後、低下していき、2.5 時間後には投与前の酢酸濃度と同様にまで低下していた（図 1A）。この結果は、Tri が小腸まで到達し、リパーゼによって分解され、遊離した酢酸が小腸上皮細胞に吸収された後、門脈を経由して体内に入ることを示唆している。

また、得られたグラフから多項式近似式を算出し、体重 200 g のラットの門脈血流速を 7.84 mL/min(4)として、1 分間隔で積分を行い、門脈を通過した酢酸の総量を算出した結果、6.33 mmol の酢酸が門脈を通過していることが分かった（図 1B）。算出された酢酸総量値は、2 mmol のトリアセチンが完全分解されて 6 mmol の酢酸を生成する理論値に極めて近く、摂取したトリアセチンが摂取後 2.5 時間の間に、酢酸 3 分子とグリセロールに完全分解され、酢酸として吸収されていることを示唆している。

同様に、Tri を摂取後に尾静脈より採取し調整した血清の酢酸濃度を調べたところ、摂取後 1 時間において最大となり、2 時間後には投与前の酢酸濃度に戻っていた。以上のことは、摂取した Tri は上部消化管で完全分解された後、門脈を経由し肝臓に至るが、肝臓において全ての酢酸が吸収される訳ではなく、一部の酢酸は全身の循環へと入り、末梢組織へと運ばれることを示唆している。

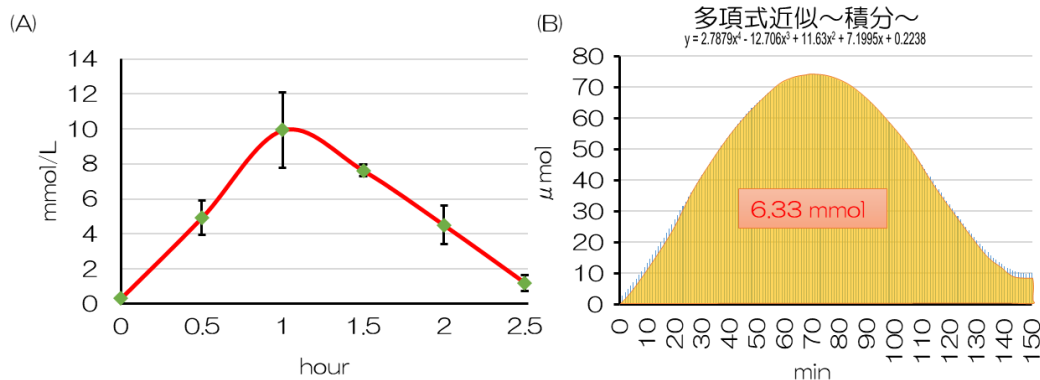


図1 2 mmolのトリアセチン投与後の門脈血中の酢酸濃度の推移

(A) 門脈血中の酢酸濃度の推移 n=3

(B) (A)のグラフから得られた多項式近似の1分間隔における積分の結果

多項式近似式を $y=2.7879x^4-12.706x^3+11.63x^2+7.1995x+0.2238$  (y:酢酸量、x:時間)とし、体重200 gのラットの門脈血流速を7.84 mL/min(33)とした。

## (2) Tri 摂取が DSS 誘導性大腸炎に与える影響

66.7 mmol/L 及び 133 mmol/L の Tri 及び 200 mmol/L の酢酸 Na を 2 週間摂取させたラットに 3%DSS を投与し観察した。その結果、133 mmol/L の Tri を摂取させた群で、最終日の体重減少が抑制される傾向が見られ、糞便の形状観察から、66.7 mmol/L あるいは 133 mmol/L の Tri を摂取させた群では、飼育水を与えたコントロール群と比較して有意に下痢症状、血便症状が抑制された。解剖時に測定した大腸長においては、飼育水を与えたコントロール群のみ大腸長の短縮が見られ、酢酸 Na、Tri 投与群では、大腸長の短縮が抑制されていることが分かった（図 2A）。大腸炎には、腸管バリア機能が深く関与していることから、各群の血清 LPS 濃度を測定した。その結果、血清 LPS 濃度は、133 mmol/L の Tri を摂取させた群で有意にコントロール群と比較して低値を示し（図 2B）、Tri の事前摂取によって腸管バリア機能が向上していることが分かった。

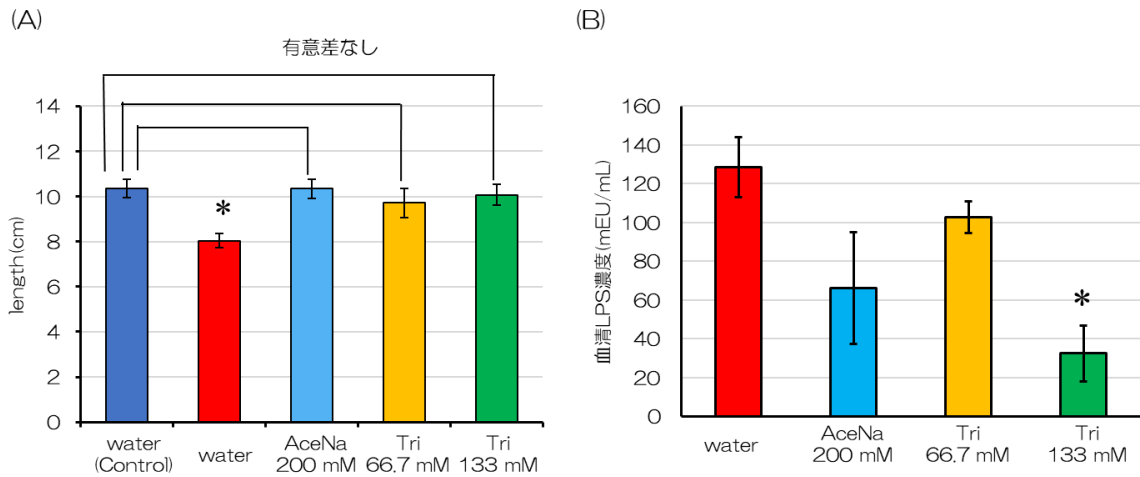


図2 各群の大腸長および血清LPS濃度の比較

(A) 各群の大腸長の比較

(B) 血清LPS濃度

water(Control):n=8, water:n=8,Ace 200 mM:n=7, Tri 66.3 mM:n=7, Tri 133 mM:n=8

\*は、water(Control)群との統計的有意差を示す( $p < 0.05$ , Dunnett's method)。

### (3) Tri 摂取がDSS誘導性大腸炎症状を抑制するメカニズム

Tri 摂取がDSS誘導性大腸炎症状を抑制するメカニズムとして、酢酸Naによって大腸炎症状を抑制した先行研究と同様、短鎖脂肪酸受容体であるGPR43/FFAR2を介して好中球のアポトーシスが促進し、過剰な免疫反応が抑制されて発揮された可能性や(3)、腸管粘膜におけるTreg細胞の増加を介して過剰な免疫反応が抑制され発揮された可能性が考えられる(5)。そこで、各運の大腸組織におけるTreg細胞に特徴的な転写因子およびサイトカインである*Foxp3*遺伝子、*IL-10*遺伝子の発現を解析したところ、酢酸Naを摂取させた群で*Foxp3*発現がコントロール群と比較して増加し、Tri 66.7 mM群及びTri 133 mM群の両群でコントロール群と比較して発現上昇はみられなかった(図3A)。また、Treg細胞が産生する抗炎症性サイトカインである*IL-10*の遺伝子発現量も*Foxp3*同様、酢酸Naを摂取させた群でコントロール群と比較して増加し、Tri摂取群では発現上昇は確認できなかった(図3B)。これらの結果から、酢酸NaおよびTriの大腸炎予防効果の作用機序は異なることが示唆され、酢酸Na摂取ではTreg細胞の関与が、Tri摂取においては酢酸Na摂取とは異なり、Treg細胞非依存的な機構が働いていることが示唆された。

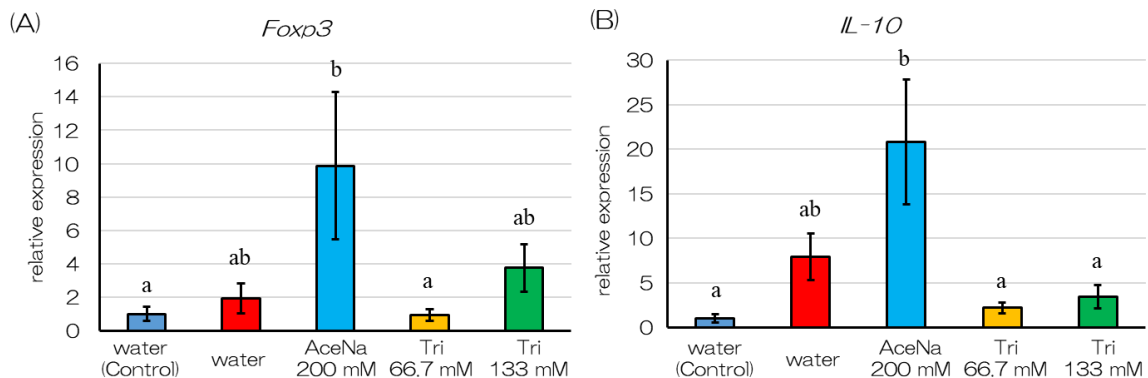


図3 大腸における制御性T細胞及び抗炎症性サイトカイン遺伝子発現の比較

(A) *Foxp3*発現量

(B) *IL-10*発現量

異なる文字は群間における統計的有意差を示す( $p < 0.05$ , Tukey's method)。

酢酸の摂取によってAMPKが活性化することが知られている(6)。一方で、Tri由来の酢酸は大腸まで到達していないことが示されたが(図1)、腸内細菌による影響など、何らかの形で大腸AMPKに影響している可能性も考えられた。また、先行研究においてAMPKの活性化と不活性化のいずれも腸管バリア機能の維持に働くことが報告されている(7,8)。そこで、Tri摂取による大腸組織AMPKの変化を調べるために、Western blotによって大腸組織のAMPK及び活性化型であ

る pAMPK のタンパク質発現比率を解析した。その結果、water 群と比較して Tri 133 mM 群で pAMPK/AMPK が低下傾向を示した (図 4A)。先行研究で、ヒト結腸上皮細胞株である T84 細胞を IFN- $\gamma$  で処理することにより、AMPK が活性化され、Occludin 及び ZO-1 の発現が減少することで腸管バリア機能が低下することが報告されている (8, 9)。それと一致するように、図 4B に示した大腸組織における IFN- $\gamma$  遺伝子発現量は、Tri 摂取群で低下傾向にあった。このことから、Tri 摂取によって大腸における IFN- $\gamma$  産生が抑制され、それに伴い AMPK 活性化が抑制された結果、腸管バリア機能が維持されている可能性が考えられた。

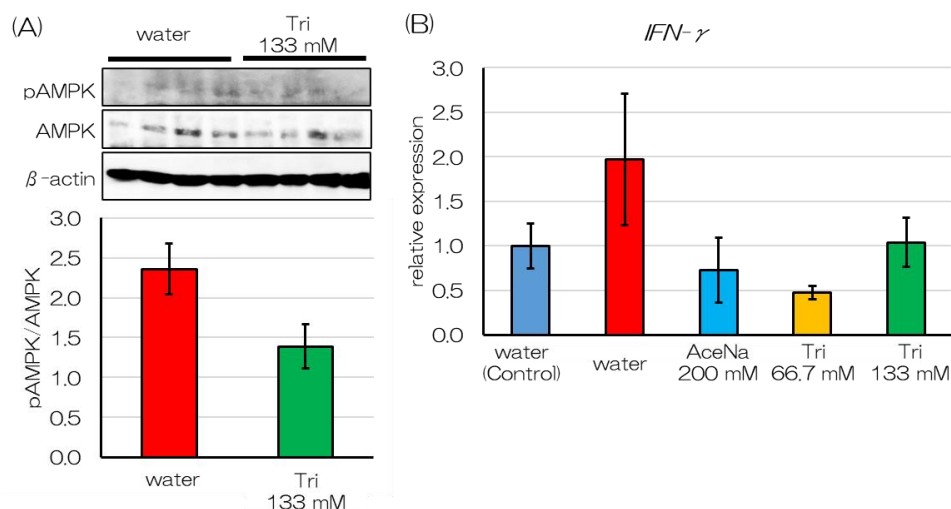


図4 トリアセチン摂取が大腸組織におけるAMPK活性化およびIFN- $\gamma$ 発現量に与える影響

(A) pAMPK/AMPK

(B) 大腸組織におけるIFN- $\gamma$ 遺伝子の発現量比較

以上の結果より、Tri の摂取は、腸管バリア機能の維持、向上につながり、その結果としてDSS自体の大腸組織への取り込みが減少することで、炎症自体が抑制されている可能性が示唆された。Tri は小腸で消化・吸収が完了しているにも関わらず大腸に効果をもたらす要因として、Tri による小腸や盲腸内の変化が何らかの形で大腸に影響し、IFN- $\gamma$  産生のような免疫反応を抑制している可能性が考えられたが、今後この小腸で起こる変化が大腸での炎症症状に影響を及ぼす機序を明らかにする必要がある。現在 IBD の治療法に用いられている 5-ASA 製剤やステロイド薬は、IBD に対して絶大な効果をもたらすが、副作用の点で問題がある。また、酢酸は日本において伝統的に摂取されてきた食品成分であり、その酢酸によって IBD の予防が可能となるのは非常に魅力的なことであるが、酢酸は刺激性や毒性が強いことから多くの摂取が難しく、より安全性の高い物質が求められる。そのため、本研究で用いた、食品添加物としても安全性が担保されているトリアセチンによる IBD モデル動物の大腸炎予防効果およびメカニズムの解明は、より安全性の高い IBD 予防法確立の一助となることが期待される。

#### 参考文献

1. Sommer, F. et al. Nat Rev Microbiol 15. 630-638, 2017
2. Macfarlane, S. et al. Clin Infect Dis 38. 1690-1699, 2004
3. Maslowski, K. et al. Nature 461. 1282-1286, 2009
4. Davies, B. et al. Pharm Res 10. 1093-1095, 1993
5. Smith, P. M. et al. Science 341. 569-573, 2013
6. Yamashita, H. et al. Biosci Biotechnol Biochem 71. 1236-1243, 2007
7. Sun, X. et al. Cell Death Differ 24. 819-831, 2017
8. Scharl, M. et al. J Biol Chem 284. 27952-27963, 2009
9. Chen, L. et al. Front Pharmacol 9. 761, 2018

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto-Inoue Naoko, Yoshimura Yukihiro, Zaima Nobuhiro	4. 巻 2nd edition
2. 論文標題 Applications of imaging techniques in food science	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Analysis of Food (Second Edition) Techniques and Applications	6. 最初と最後の頁 553 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-813266-1.00012-7	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 Yoshimura Yukihiro, Zaima Nobuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of Mass Spectrometry Imaging for Visualizing Food Components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 575 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods9050575	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 金子 なぎさ, 吉村 征浩	4. 巻 46
2. 論文標題 Reevaluation of food additives as compounds that can ameliorate inflammatory bowel disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MEdical science digest	6. 最初と最後の頁 75-77
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 無
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 金子 なぎさ, 吉村 征浩	4. 巻 22
2. 論文標題 Application of food additives to prevent inflammatory bowel disease via anti-inflammatory effects of acetic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 87-89
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 無
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 Yukihiro Yoshimura, Nobuhiro Zaima	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of Mass Spectrometry Imaging for Visualizing Food Components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods9050575	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金子 なぎさ, 吉村 征浩
2. 発表標題 トリアセチン摂取はラットDSS誘導性大腸炎の症状を緩和する
3. 学会等名 第67回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野瀬 萌菜美、松居 知香、金子 なぎさ、吉村 征浩
2. 発表標題 短鎖トリグリセリドの消化・吸収
3. 学会等名 第67回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村征浩、金子なぎさ、松本怜奈、井上里佳子
2. 発表標題 短鎖トリグリセリド摂取がラットの腸内細菌叢構成に与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 井上里佳子、小川亜紀、吉村征浩、平松智子、綾部誠也、入江康至
2. 発表標題 サルコペニア患者の腸内細菌構成に着目した検討
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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