

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06692

研究課題名（和文）グルタミンおよびグルタミン酸の難治性消化管疾患の治療における応用

研究課題名（英文）Application of glutamine and glutamate in the treatment of inflammatory intestinal disorders

研究代表者

天ヶ瀬 紀久子（Amagase, Kikuko）

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：60278447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん化学療法剤による下痢の重篤化や体重減少、組織学的に小腸絨毛の短縮や腺窩の破壊を特徴とする腸炎に対する予防・治療法の確立を目指した研究である。食事から摂取でき、また生体内でも合成されるグルタミン酸が、抗がん剤により増加する炎症性サイトカインの発現を抑制し、また小腸粘膜組織における炎症の予防に有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非必須アミノ酸のグルタミン酸は、生体内でも合成され、神経伝達などに関与していることが知られている。消化管粘膜の機能調節・維持にグルタミン酸は関与しているものと考えられている。グルタミン酸が大腸において細菌叢バランスを是正すること、またポリグルタミン酸（グルタミン酸のポリマー）の摂取により、善玉菌が増えるという知見もあり、グルタミン酸の消化管における役割の解明は、消化管疾患の治療に応用する新たな可能性を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：This study aims to establish a preventive and therapeutic effect for intestinal mucositis. That is characterized by aggravation of diarrhea and body weight loss due to cancer chemotherapy agents, histological shortening of small intestinal villi and destruction of crypts. It has been known that glutamate, which can be taken from the diet and synthesized in the body, inhibited the expression of inflammatory cytokines increased by anticancer drugs, and may be useful for preventing intestinal inflammation.

研究分野：消化器薬理学

キーワード：グルタミン酸 小腸炎 抗がん剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は食餌性タンパク質の中で最も多く含有される非必須アミノ酸であり、生体内でも合成され、神経伝達などに関与していることが知られている。一方、グルタミン酸はわが国では古来より昆布などのうま味成分として知られており、食品添加物としても広く使用されている。グルタミン酸は最も血中移行量が少ないアミノ酸であり、食餌中の含有量が多いにもかかわらず、食餌の摂取によりグルタミン酸の血中濃度は変動しない。これはグルタミン酸が血中への移行前に消化管内でその大部分が利用されているためであり、実際、ブタを用いた検討において、食餌由来のグルタミン酸の95%以上が消化管粘膜上皮での代謝エネルギー産生や他のアミノ酸およびタンパク質の合成に利用されることが確認されている。したがって、グルタミン酸は消化管粘膜局所において、その機能の調節・維持に関与しているものと推察される。これまでの消化管機能との関連における基礎研究において、グルタミン酸が胃酸分泌を亢進すること、胃の迷走神経を活性化すること、また十二指腸粘液分泌を亢進することにより粘液層の厚さを増大させることなどが報告されている [Akiba Y et al. *Am J Physiol.*, 297:G781-791, 2009]。しかし、グルタミン酸の消化管粘膜傷害に対する保護作用のメカニズムの詳細については明らかではない。近年は、グルタミンによる免疫増強作用や、腸内細菌叢バランスに影響を与えるという報告もあり、これらの作用が消化管疾患において有用である可能性が高い。そこで本研究課題では、グルタミン/グルタミン酸による消化管における新たな役割を解明し、難治性消化器疾患の治療に応用可能かを検討した。

2. 研究の目的

グルタミン/グルタミン酸の消化管に対する作用を解析し、消化管疾患の新たな治療ターゲット分子を提案することを目的とした。特に、抗がん剤誘起性小腸炎の病態に対するグルタミン酸の役割について解析した。

3. 研究の方法

(1) 使用動物および薬物

雄性 C57BL/6N マウス (20~25 g) を使用した。抗がん剤として 5-フルオロウラシル (5-FU) を使用した。5-FU は生理食塩水に、グルタミン酸ナトリウムは滅菌水に溶解して使用した。どちらも使用直前に調製し、0.1mL/10g の容量で腹腔内または経口投与した。

(2) 5-FU 誘起腸炎の作製

マウスに 5-FU (50 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内に 6 日間 (day 0-5) 投与し作製した。グルタミン酸ナトリウム (500 および 1000 mg/kg) は、1 日 2 回、5-FU 投与 0.5 時間前と 8 時間後に経口投与した。5-FU の投与期間中、体重および下痢の程度を経日的に測定した。下痢の程度は 0: 正常な便、1: 軟便、2: 重度の軟便、3: 下痢、4: 酷い下痢の 5 段階で評価した。5-FU 最終投与 24 時間後にマウスを炭酸ガスで安楽死させた後、ただちに小腸を摘出し、2%ホルマリン溶液を小腸内に 2ml 注入し、小腸ごと 2%ホルマリン溶液に 10 分間浸し組織を軽く固定した。その後、10%ホルマリン溶液にて組織を固定後、パラフィン包埋して 4 μ m の薄切片を作製し、組織学的な評価を行った。すなわち、ヘマトキシリン & エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で小腸組織を観察し絨毛の長さや腺窩数および腺窩中の細胞数を計測した。

(3) ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定

5-FU 最終投与 24 時間後にマウスを炭酸ガスで安楽死させた後、ただちに小腸を摘出した。氷冷した生理食塩水で小腸組織を洗浄した後 0.5% の臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム液 (pH 6.0) を含む 50 mM リン酸緩衝液中でホモジナイズし、凍結融解を 3 回繰り返した後、遠心分離後の上清をサンプルとし、o-ジアニジジン法で測定した。サンプルのタンパク質含量は Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。MPO 活性は次式に従って算出した。MPO activity (nmol H₂O₂/min mg protein) = (OD/min) / (OD/min H₂O₂) × mg protein

(4) アポトーシスは TUNEL アッセイにより、また TNF- α mRNA 発現はリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

(5) 細胞生存率の測定

ヒト腸管由来培養細胞株である Caco-2 および小腸上皮細胞株 IEC-6 を用いた。5.0 × 10³/well で 96well プレートに細胞を播種し、5-FU とグルタミン酸を 24 および 48 時間処置した後、細胞生存率を WST-8 アッセイ法により測定した。

4. 研究成果

(1) 5-FU による体重および下痢の程度の変化に対するグルタミン酸の効果

5-FU 投与開始 4 日目から体重が徐々に減少した。グルタミン酸ナトリウム (500 および 1000 mg/kg) を併用投与した場合においても、5-FU 投与開始 4 日目から体重が徐々に減

少し対照群と比較して差はみられなかった。また 5-FU 投与により下痢の増悪が認められたが、グルタミン酸の併用投与による有意な改善は認められなかった。

(2) 5-FU による組織学的変化に対するグルタミン酸の効果

5-FU 投与により小腸絨毛の長さは、無処置のマウスの絨毛丈に比較して約 50%短縮していた。グルタミン酸ナトリウムを併用投与した場合、5-FU 投与開始 7 日目において、グルタミン酸ナトリウム投与群の小腸絨毛丈は、5-FU 単独投与による短縮を有意に改善していた (図 1)。

5-FU 投与 24 時間後には TUNEL 陽性細胞が発現するが、これをグルタミン酸の 3 日間投与は抑制する傾向が見られた。

(3) 5-FU による MPO 活性の増大に対するグルタミン酸の効果

炎症の程度を示す MPO 活性は、5-FU (50 mg/kg) 最終投与 24 時間後に増大した。一方、グルタミン酸ナトリウムを併用投与した場合、有意ではないものの MPO 活性の増大を抑制した (図 2)。

(4) グルタミン酸の細胞生存率に及ぼす影響

IEC-6 細胞にグルタミン酸を単独処置したが細胞増殖能に影響はなかった。一方、IEC-6 細胞に 5-FU を処置した場合、5-FU の濃度依存的に細胞増殖を抑制した。またリアルタイム PCR 法により TNF- α mRNA の発現量を検討したところ、5-FU 処置時間および濃度依存的に、TNF- α mRNA の発現は増加した。

Caco-2 細胞にグルタミン酸を単独処置したが、IEC-6 細胞を用いた検討と同様、細胞増殖能に影響はなく、5-FU による TNF- α mRNA の増加をグルタミン酸の前処置は抑制した。

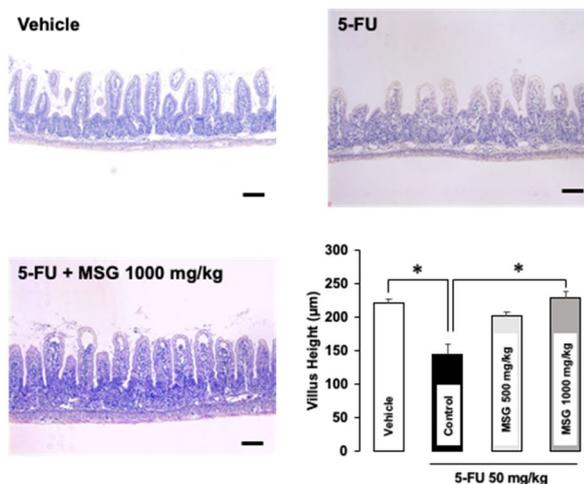


図 1. 5-FU およびグルタミン酸ナトリウム (MSG) 投与による組織学的変化。

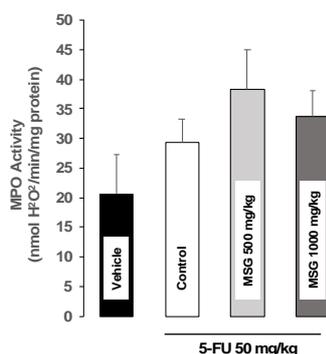


図 2. 5-FU による炎症の増大に対するグルタミン酸の効果。

以上より、グルタミン酸が 5-FU 誘起性小腸炎の病態改善に関与することが示唆された。体重減少や下痢に対して影響は与えないが、粘膜組織の変化に対して明らかな改善効果が認められたことから、グルタミン酸による腸炎の保護作用は小腸組織のバリア機能に関わっていると考えられる。これは、グルタミン酸が生体内に多く存在する非必須アミノ酸であり、消化管粘膜上皮での代謝エネルギー産生やタンパク質合成に利用されることから推察される。この機構を明らかにすることで抗がん剤治療における生活の質 (QOL) 向上を目指した予防・治療法の新たな手段を提供できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsumoto Y, Matsuya Y, Kano N, Amagase K, Saeki K, Matsumoto K, Yokomizo T, Kato S	4. 巻 373
2. 論文標題 Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) accelerates the healing of intestinal lesions by promoting epithelial cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.119.263145	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kikuko Amagase, Yoshitaro Kano, Yuriko Kosaka, Kenjiro Matsumoto, Shinichi Kato
2. 発表標題 Ameliorative Effect of Gultamate against Helicobacter pylori-Induced Gastritis in Mice
3. 学会等名 10th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天ヶ瀬紀久子、松本 唯、山中勇人、松本健次郎、佐伯和子、横溝岳彦、加藤伸一
2. 発表標題 腸粘膜傷害の修復・治癒におけるロイコトリエン受容体タイプ2 (BLT2) の役割
3. 学会等名 第47回日本潰瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤大輔、増田侑哉、ハモウダナハラ、加藤伸一、天ヶ瀬紀久子
2. 発表標題 グルタミン酸の抗がん剤起因性腸炎に対する効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kikuko Amagase, Nahla Hamouda, Yuya Masuda, Daisuke Kato, Kenjiro Matsumoto, Shinichi Kato
2. 発表標題 NEW THERAPEUTIC STRATEGY FOR AMINO ACID: PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC EFFECT OF MONOSODIUM GLUTAMATE AGAINST GASTROINTESTINAL INFLAMMATION
3. 学会等名 American Gastroenterological Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上南静佳、加藤大輔、増田侑哉、Nahla Hamouda、岩田和実、天ヶ瀬紀久子
2. 発表標題 がん化学療法剤誘起腸炎におけるグルタミン酸の役割
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shizuka Jonan, Nahla Hamouda, Daisuke Kato, Yuya masuda, Kikuko Amagase
2. 発表標題 Role of glutamate against 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in mice
3. 学会等名 1stAASP young scientist conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ハモウダナハラ、増田侑哉、加藤大輔、上南静佳、加藤伸一、天ヶ瀬紀久子
2. 発表標題 グルタミン酸のがん化学療法剤起因性腸炎における有用性
3. 学会等名 第48回日本潰瘍学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	ハモウダ ナハラ (Hamouda Nahla)	立命館大学・総合科学技術研究機構・客員研究員 (34315)	
研究協力者	上南 静佳 (Jonan Shizuka)	立命館大学・薬学研究科・博士課程大学院生 (34315)	

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