

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18982

研究課題名(和文) 摂食コントロールによる新しい炎症性腸疾患治療

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach for inflammatory bowel disease by dietary intervention

研究代表者

岡田 俊彦 (Okada, Toshihiko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70505924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸炎モデルマウスを絶食 再摂食させて炎症の回復過程を検証したところ、絶食マウスは非絶食マウスよりも腸炎からの回復が早く、食物繊維を含まない餌(非線維食)で再摂食させると回復が遅れた。腸炎からの回復が遅れる非線維食で再摂食させたマウスに有機酸を注腸で加えると、乳酸、酪酸を加えたマウスで腸炎からの回復が促された。通常食で再摂食させたマウスの腸内細菌叢では、乳酸菌の比率が増加し、糞便中の乳酸濃度も上昇していた。以上から、絶食 再摂食することにより増殖する乳酸菌が産生する乳酸が、腸炎からの回復に重要な役割を果たしていることが示唆された。この結果は腸炎の治療に新たな可能性を与えてくれるものである。

研究成果の概要(英文)：Colitis model mice were re-fed after starvation and were examined recovery from colonic inflammation. Starved mice got recovery faster than non-starved mice, although non-fiber diet re-fed mice did not. Non-fiber diet re-fed mice that have late recovery from inflammation were administrated lactate by enema improved its recovery, and increase abundance ratio of Lactobacillus in colonic microbacterial flora and concentration of lactate in their feces. These results suggested that lactate produced by overgrown Lactobacillus plays an important role for recovery from colitis. This provides novel insights into treatment of colitis, especially inflammatory bowel disease.

研究分野：消化器内科学(下部消化管)

キーワード：絶食 再摂食 乳酸 腸内細菌 大腸炎 大腸上皮細胞 栄養シグナル

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性疾患に対する一時的な絶食、カロリー制限、たんぱく制限などの摂食調節の効果が話題となっている。例えば、実験脳炎動物モデルでは、カロリー制限をすると炎症性サイトカイン産生低下を介して病勢が抑えられ、給餌制限をすると発病が抑えられる。また、絶食すると癌発生が抑制され、骨塩濃度の低下を遅らせるという報告がある。さらに絶食は、コルチコステロンや制御性 T 細胞数を増やし、炎症性サイトカインやヘルパー T 細胞数を減らすことでマウス脳炎の脱髄や症状を改善する。ヒトでは絶食が慢性関節リウマチ患者の炎症や痛みを減らす。感染性腸炎マウスモデルではカロリー制限をすると生存率が増し、デキストラン硫酸 (DSS) 誘発腸炎マウスでは高タンパク食が炎症を悪化させる。栄養状態のセンサーと細胞代謝の調節因子である mTOR は免疫・炎症反応を制御することが知られているが、DSS 腸炎マウスに mTOR 阻害剤を投与すると、白血球遊走や炎症性サイトカイン発現が抑えられることで腸炎が改善する。これらの知見は、摂食が引き起こす変化が癌や免疫・炎症性疾患と密接に関与していることを示している。

2. 研究の目的

上記を背景に、我々はこれまでにマウスモデルで絶食-再摂食のサイクルが大腸上皮細胞分裂の一過性停止と過剰増殖を引き起こすことを見出した。すなわち、大腸上皮細胞回転は絶食時に完全に停止するが、再摂食時には自由摂食マウスに比べて3倍に過剰亢進する。この現象は発癌に影響を与え、自由摂食マウスを発癌物質に暴露させると大腸に前癌病変が誘導されるが、発癌物質に暴露された後に絶食-再摂食させると前癌病変はほぼ生じなくなる。我々はこの現象が、乳酸菌が食物繊維を代謝して産生する乳酸によって誘導されることを解明した。そこで我々は、絶食時の大腸上皮細胞回転の停止が炎症組織のダメージを軽減し、再摂食時の過剰亢進が効率的な組織修復を促すのではないかと考えた。本研究の目的は、大腸炎において、摂食コントロールがその炎症からの回復へ貢献できるかどうか検証することである。

3. 研究の方法

(1) 7週齢の雄性 C57BL/6 マウスに 3.5% DSS を day0 から 5 日間飲水投与した。day6 の午後 8 時から 36 時間の絶食の後、day8 の午前 8 時から再摂食させ、day9 に大腸組織を採取した。再摂食には通常餌の他に、食物繊維の影響を除くために、経口補水塩の組成 (塩化ナトリウム 2.6g、クエン酸ナトリウム 2.9g、塩化カリウム 1.5g、グルコース 13.5g) に基づいた粉末餌 (ORS) を使用した。

(2) 注腸実験では、day6~8 まで絶食させた DSS 腸炎マウスに ORS で再摂食させるのと同時に 3 時間ごと 5 回に分けて吸入麻醉下で有機酸を注腸した。有機酸は乳酸 200mM、酢酸 600mM、酪酸 200mM を用いた。

(3) 採取した大腸は長軸に開き、ロール状に巻いて瞬間凍結させ、凍結切片を作成のうえ HE で染色した。異なる視野から最低 3 枚の写真を撮り、陰窩数を数え、それを粘膜面積で標準化した。1 匹のマウスから得られた平均値を各マウスの代表値として解析に用いた。総潰瘍長は大腸上皮が欠落した粘膜の長さを合計して算出した。

(4) 各マウスから採取した大腸を瞬間凍結して全 RNA を抽出し、IL-1 β 、IL-17、IL-6、TNF α の mRNA 発現レベルを定量的 PCR で測定した。

(5) 大腸を開かずに取り出し、ゾンデを用いて生理食塩水で管腔内の糞便を押し出すように採取し、一部を腸内細菌叢の解析に、一部を有機酸分析に供した。腸内細菌叢解析は糞便から抽出した 16S rRNA をもとに T-RFLP 法を用いて行い、有機酸分析は pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 腸炎回復期の一時的な絶食は陰窩再生を促し、炎症性サイトカイン産生を抑制する
 ① DSS 腸炎誘導後の回復期に通常餌で再摂食させたマウス (F+CE2) は、自由摂食マウス (Ad lib) や ORS で再摂食させたマウス (F+Glu) よりも体重の回復が早かった (図 1A)。

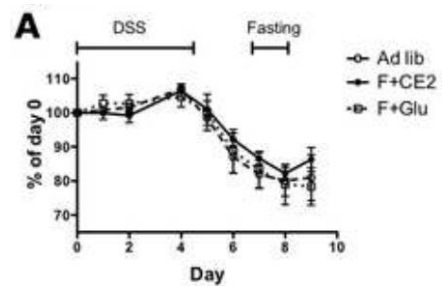


図 1A

② DSS 腸炎は陰窩数の減少が組織学的な特徴であるが、自由摂食 (非絶食) マウス (Ad lib) と ORS で再摂食させたマウス (F+Glu) では陰窩数の減少が見られたのに対して、通常餌での再摂食マウス (F+CE2) では陰窩数減少が有意に抑えられていた (図 1B, 1C)。

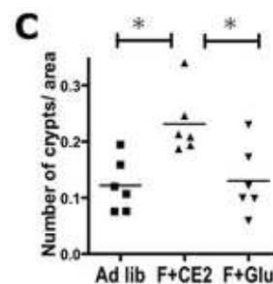


図 1B, 1C

③ 自由摂食マウス (Ad lib) では大腸組織中の IL-1 β 、IL-17 発現が顕著に上昇していたのに対して、通常餌で再摂食させたマウス (F+CE2) ではこれらのサイトカイン発現が非腸炎マウスと同レベルに抑えられていた。ORS で再摂食させたマウス (F+Glu) でも抑制傾向は見られたが、自由摂食マウスとの間に有意差は認めなかった。

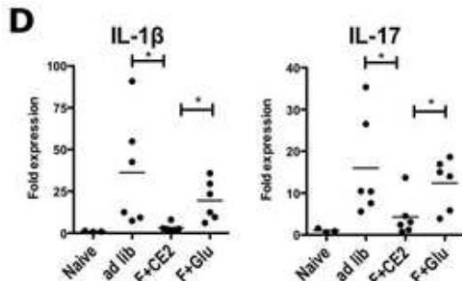


図 1D

(2) 大腸内に乳酸を供給すると腸炎は改善する

ORS で再摂食させるマウスに、再摂食と同時に乳酸、酢酸、酪酸を注腸すると、乳酸、酪酸を用いたマウスで、陰窩数の減少が有意に抑制された (図 2)。

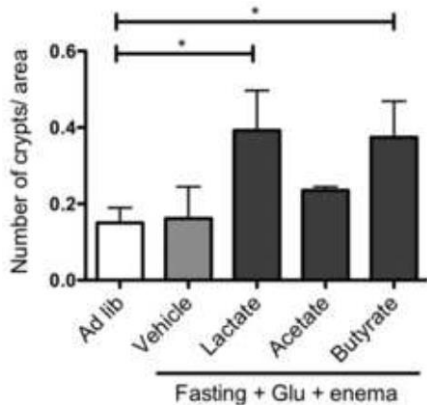


図 2

(3) 乳酸菌の増殖がもたらす大腸内の乳酸濃度上昇が腸炎を改善する

① T-RFLP 解析を用いて各マウスの腸内細菌叢を分析すると、通常餌での再摂食マウス (F+CE2) で乳酸菌群の存在比率が増加していたのに対して、自由摂食マウス (Ad lib) や ORS で再摂食させたマウス (F+Glu) では増加は認めなかった (図 3)。

② 糞便中の有機酸濃度を分析すると、通常餌での再摂食マウス (F+CE2) でのみ糞便中の乳酸濃度の上昇が見られた。

本研究から我々は、回復期の一時的な絶食が腸炎を改善することを見出した。TNF α ではなく IL-1 β 、IL-17、IL-6 が増加する炎症性サイトカインの発現パターンから考察すると、IL-1 β が指標であるインフラマソームの活性化がこの腸炎の主体であり、絶食はこ

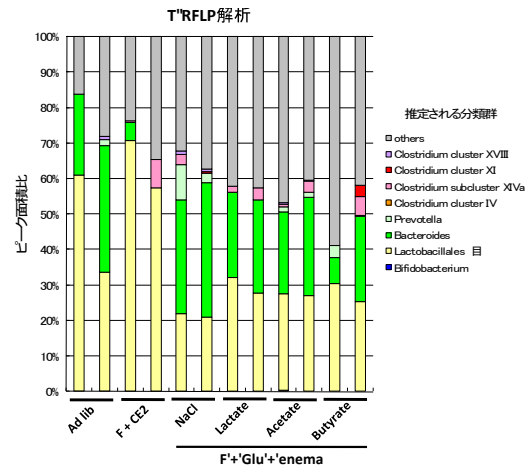


図 3

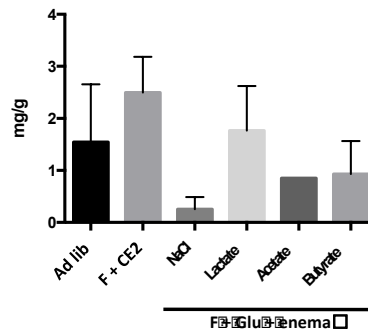


図 4

の経路を抑えていると思われる。最近の報告を加味すると、一時的な絶食が nTOR をはじめとした栄養シグナルを変化させることで、活性化したインフラマソーム由来の IL-1 β を抑え、Th17 細胞の産生を減少させることが示唆される。

一方で、ORS で再摂食させたマウスで腸炎を改善させる効果が見られなかったことから、腸炎の回復には絶食だけではなく、適切な再摂食が重要であることが分かった。我々はこれまでの研究で、高線維餌で再摂食させたときのみ起こる大腸上皮細胞の一過性増殖は、乳酸菌が食物繊維を分解して作られる乳酸に依存していることを見出しており、栄養シグナルの低下による炎症の抑制に加え、乳酸が大腸上皮細胞の再生を助けることが腸炎を改善させることが示唆され、これは乳酸の注腸実験で証明された (図 2)。また腸内細菌やその代謝物も重要であり、これまで酪酸が潰瘍性大腸炎や DSS 腸炎で治療効果を持つことが報告されているが、我々は乳酸も同等の効果をもつことを示した。

我々は本研究で、一時的な絶食とそれに続く再摂食が腸炎を改善し、その機序に乳酸が重要な役割を果たしていることを見出した。これは新規の知見であり、さらなる機序の解明や安全性の確認が必要ではあるものの、炎症性疾患の新しい治療法の開発に光明を与えてくれるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

① Toshihiko Okada, Takeshi Otsubo, Teruki Hagiwara, Fumika Inazuka, Eiko Kobayashi, Shinji Fukuda, Takuya Inoue, Kazuhide Higuchi, Yuki I Kawamura, Taeko Dohi, Intermittent fasting prompted recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, 印刷中

〔学会発表〕(計2件)

① 岡田俊彦, 光林永子, 原あずさ, 遠見雄二郎, 中 悠, 川口真平, 高橋良明, 平田好正, 小嶋融一, 柿本一城, 能田貞治, 川上 研, 竹内利寿, 井上拓也, 樋口和秀, 摂食コントロールによるマウス DSS 腸炎に対する治療促進効果の検討, 日本消化器病学会, 2016年4月23日, 京王プラザホテル(東京都)

① 岡田俊彦, 井上拓也, 樋口和秀, 摂食コントロールによるマウス DSS 腸炎に対する治療効果についての検討, 日本消化管学会, 2016年2月26日, 京王プラザホテル(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 俊彦 (Okada Toshihiko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70505924

(2) 研究協力者

大坪 武史 (Otsubo Takeshi)
萩原 輝記 (Hagiwara Teruki)
稲塚 歩佳 (Inazuka Fumika)
光林 永子 (Kobayashi Eiko)
福田 真嗣 (Fukuda Shinji)
井上 拓也 (Inoue Takuya)
樋口 和秀 (Higuchi Kazuhide)
河村 由紀 (Kawamura Yuki)
土肥 多恵子 (Dohi Taeko)