

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19347

研究課題名(和文)高脂肪食とクローン病感受性遺伝子LRRK2の相互作用によるIBD発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of inflammatory bowel disease caused by interaction of high-fat diet and LRRK2, a susceptibility gene of IBD

研究代表者

川上 文貴 (Kawakami, Fumitaka)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：50511896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性腸疾患のリスク遺伝子であるLRRK2と高脂肪食の相互作用による腸炎発症メカニズムを解析した。消化管におけるLRRK2の発現分布を解析したところ、LRRK2はおもに大腸の粘膜固有層および筋層間神経叢に局在することが分かった。次に、腸管透過性を比較した結果、高脂肪食摂取群とLRRK2ノックアウトマウス(LRRK2-KO)で腸管透過性が有意に低くなった。さらに、DSSとTNBSによる大腸炎を比較したところ、高脂肪食摂取群で炎が軽減される傾向にあり、LRRK2-KOではDSS腸炎が悪化した。これらのことから、LRRK2は腸管自然免疫に関与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of IBD caused by the interaction of LRRK2, a risk gene for inflammatory bowel disease and high fat diet. In analysis of the expression profile of LRRK2 in the gastrointestinal tract revealed that LRRK2 was mainly localized in the mucosal lamina propria of the colon and in the auerbach-plexus. Next, intestinal permeability was significantly lowered in the high-fat diet intake group and the LRRK2 knockout mice (LRRK2-KO). Furthermore, comparison of colitis by DSS and TNBS showed that the inflammation was abrogated in the high-fat diet group, on the other hand, DSS colitis was exacerbated in LRRK2-KO. From these results, it was suggested that LRRK2 is involved in intestinal innate immunity.

研究分野：病態生化学

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は原因不明な長期にわたる消化管粘膜における慢性疾患である。IBD の発症メカニズムとして、遺伝的素因と環境因子の相互作用で消化管の粘膜防御システムを破綻させて発症に至ると考えられる。しかし、環境因子と遺伝的素因の相互作用による腸炎誘発メカニズムは未だに明らかになっていない。LRRK2 はクローン病患者において高頻度に突然変異を持つことが報告されている。LRRK2 は炎症性サイトカインの産生を抑制するプロテインキナーゼであり、LRRK2 の IBD 関連変異は LRRK2 の細胞内での発現量を低下させることが報告されている。また、IBD は欧米先進諸国に多く、その理由の一つに食生活の関与が考えられている。長期的な高脂肪食摂取により LRRK2 の発現が減少し、IBD 発症のリスクが増大するのではないかと予測を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、環境因子である食生活の欧米化が、消化管における IBD 疾患感受性遺伝子の機能に影響することで腸管粘膜防御機構を破綻させるのではないかと考え、消化管における IBD 疾患感受性遺伝子 LRRK2 の遺伝子発現と腸管の粘膜防御機構に対する長期的な高脂肪食摂取の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LRRK2 の腸管における発現分布はウエスタンブロッティング法と免疫組織化学染色法により解析した。

12 週齢の雄性 C57BL/6J 野生型マウス (WT) と LRRK2 ノックアウトマウス (LRRK2-KO) に、通常食 (脂肪分 18%) と高脂肪食 (脂肪分 60%) を自由摂食させた。

腸管透過性の解析は、一晩絶水させたマウスに、100mg/mL に調整した FITC-Dextran を体重あたり 44mg/100g の投与量で経口投与し、4 時間後の血中の FITC-Dextran の蛍光強度を測定して行った。大腸における mRNA の発現解析は、各マウスの大腸から抽出した total RNA をもとに作成した cDNA を用いて real-time PCR 法により解析した。

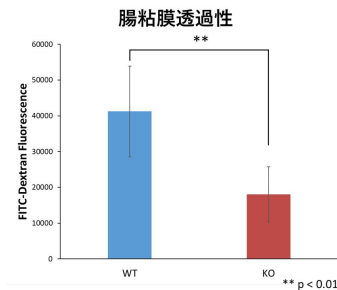
デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎モデルは、2% DSS 溶液をマウスに 7 日間自由飲水させて作成した。

TNBS 誘発性大腸炎モデルは 2% のトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を含む 40% EtOH 溶液をゾンデにより大腸に直接投与して作成した。腸炎の程度は、体重の増減、便の性状、大腸の長さ、脾臓重量などを計測して比較した。さらに、腸管の組織切片を作成し、H&E 染色により炎症スコアをつけ病理学的な腸炎の程度も比較した。

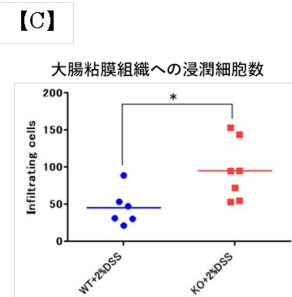
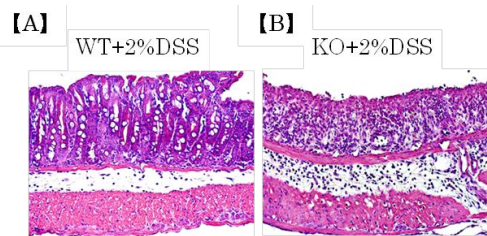
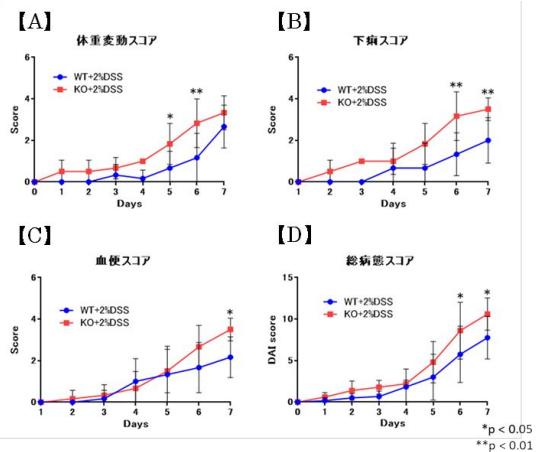
4. 研究成果

腸管における LRRK2 の発現分布を解析した結果、LRRK2 は主に大腸に発現していることが確認された。また、組織内分布の解析によって LRRK2 は大腸の腸管粘膜固有層および筋層

管神経叢に発現していることが明らかになった。次に、腸粘膜透過性を評価したところ、LRRK2-KO マウスでは WT マウスと比べて腸管粘膜の透過性が有意に低く、粘膜バリア機構が強固であることが分かった。



DSS 誘発性大腸炎モデルの総病態スコアを比較すると、LRRK2-KO マウスが WT マウスと比較して増悪化していることが確認された。



一方、TNBS 誘発性大腸炎モデルにおいては顕著な差は認められなかった。

次に、通常食摂取と高脂肪食摂取の腸管透過性に対する影響を解析したところ、高脂肪食を 5 か月間摂取させたマウスの大腸長が有意に長くなった。また、高脂肪食摂取群の方が腸管の透過性が有意に低くなった。次に、糞便の色調を比較した結果、通常食群では黄土色で、高脂肪食摂取群では白色だったが、高脂肪食摂取マウスを一晩絶水させることで糞便の色が黄土色に戻った。さらに、タイ

トジャンクション関連分子や各種炎症関連分子の mRNA 発現においては通常食と高脂肪食間で有意な差は見られなかった。DSS と TNBS による腸炎モデルを用いた解析では、腸炎を誘導するとマウスの大腸長がコントロールよりも短くなったが、通常食と高脂肪食間では有意な差は認められなかった。TNBS を投与したマウスでは大腸の長さが高脂肪食の方が長くなったのに対し、DSS では長さが短くなっていた。脾臓の重量は TNBS と DSS ともに高脂肪食の方が重くなっていた。H&E 染色の炎症病理スコアの測定では高脂肪食と通常食に大きな差異は見られなかった。以上の結果から、大腸炎モデルの病態スコアの結果から、DSS 誘発性大腸炎モデルと TNBS 誘発性大腸炎モデルで病態に変化が出たことから、Th1 優位な免疫応答と、Th2 優位な免疫応答で LRRK2 の生理的機能が異なることが考えられた。また、LRRK2-KO マウスにおいて腸管粘膜バリアが強固であることが確認されたことから、LRRK は、腸管粘膜バリアに影響を及ぼす可能性が示唆された。また、腸管の透過性の実験と高脂肪食摂取による糞便の色調変化の結果から、過剰な脂肪摂取によって小腸での胆汁消費が増加し、大腸内の胆汁量が低下したことで腸管透過性が低下したのではないかと考えられた。また、高脂肪食摂取によって腸管透過性が低下したことによって DSS による腸炎が高脂肪食群で軽減した可能性が考えられた。以上のことから、胆汁に含まれる胆汁酸が腸管のバリア機能の制御に深く関与することが示唆されたことから、今後、高脂肪食摂取による腸管内の胆汁酸量の変動とそれに起因する腸管バリア機構の変化について検討する必要がある。

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 8 件)

1. Maruyama H., Kawakami F., Thet-Thet Lein, Imai M., Shamsa F. Biochemical Characterization of Ferulic Acid and Caffeic Acid Which Effectively Inhibit Melanin Synthesis via Different Mechanisms in B16 Melanoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 806-810 (2018). 査読有
2. Kurosaki Y, Imoto A, Kawakami F., Yokoba M, Takenaka T, Ichikawa T, Katagiri M, Ishii N. Oxidative stress increases megalin expression in the renal proximal tubules during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 314, F462-F470 (2018). 査読有
3. Uchiyama Y, Watanabe R, Kurotaki T, Kuniya S, Kimura S, Sawamura Y, Ohtsuki T, Kikuchi Y, Matsuzawa H, Uchiyama K,

Itakura M, Kawakami F., and Maruyama H. Maintaining of the Green Fluorescence Emission of 9-Aminoanthracene for Bioimaging Applications. *ACS Omega*, 2 (7), 371-3379 (2017). 査読有

4. Maekawa T., Shimayama H., Tsushima H., Kawakami F., Kubo M., Ichikawa T.: LRRK2: an emerging new molecule in the enteric neuronal system that quantitatively regulates neuronal peptides and IgA in the gut. *Dig. Dis. Sci.* 62(4) 903-912 (2017). 査読有
5. Ichikawa T., Saegusa Y., Nakano M., Kawashima R., Kawakami F., Maekawa T., Sugawara S., Ishihara K.. Influence of H2-receptor antagonists on intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in rats. *Cancer Research Frontiers.* 2(1) 33-42 (2016). 査読有
6. 川上 文貴, 市川 尊文: パーキンソン病原因分子 LRRK2 による Tau の異常リン酸化機構. 生化学 88, 248-252, (2016). 査読無
7. Kawakami F., Ichikawa T.: The role of α -synuclein and LRRK2 in Tau Phosphorylation. *Parkinson's Dis.* 2015:734746. (2015). 査読有
8. Maruyama H, Tamauchi H, Kawakami F., Yoshinaga K, Nakano T.: Suppressive Effect of Dietary Fucoidan on Proinflammatory Immune Response and MMP-1 Expression in UVB-Irradiated Mouse Skin. *Planta Med.* 81, 1370-1374 (2015). 査読有
9. Kawashima R, Kawakami F., Maekawa T, Yamamoto H, Koizumi W, Ichikawa T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 76, 269-277 (2015). 査読有
10. Kagiya G, Ogawa R, Choudhuri R, Cook JA, Hatashita M, Tanaka Y, Koda K, Yamashita K, Kubo M, Kawakami F., Mitchell JB. Selective enhancement of hypoxic cell killing by tempol-regulated suicide gene expression. *Oncol Rep.* 34, 1065-1073 (2015). 査読有

[学会発表](計 18 件)

1. 川上文貴, 山下真裕佳, 石川勇太, 寄元映見, 井阪勇輝, 市川尊文, 「高脂肪食摂取マウスにおける腸管粘膜バリア機能の変化」第 138 年会日本薬学会、(金沢市), 2018 年 3 月
2. 川上文貴, 山下真裕佳, 石川勇太, 寄元映見, 井阪勇輝, 市川尊文, 「消化管粘膜バリア機構に対する高脂肪食摂取の影響に関する解析」第 88 回日本衛生学会、(品川), 2018 年 3 月

3. Imai M., Kawakami F., Hisanao A, Keiko Y, Takashi K, Hiroko M, 「Seaweed extract inhibit phosphorylation of tau in human tau stable expressed HEK293 cells」 the 46th Myanmar Health Research Congress, (Yangon, Myanmar), 2018年1月
4. 川上文貴, 井阪勇輝, 水邊慧子, 石川勇太, 山下真裕佳, 川島麗, 前川達則, 市川尊文, 「消化管粘膜バリア機構におけるLRRK2の機能解析」第90回日本生化学会大会, (神戸市), 2017年12月
5. 井阪勇輝, 川上文貴, 石川勇太, 丸山弘子, 川島麗, 前川達則, 市川尊文, 「脂肪組織におけるLRRK2の機能解析」第90回日本生化学会大会, (神戸市), 2017年12月
6. Motoki I, Fumitaka K, Hisanao A, Keiko Y, Takashi K, Hiroko M, 「Seaweed reduces on phosphorylation of tau protein in olfactory bulb」Nuroscience 2017, (Washington DC, USA), 2017年11月
7. T.T. Win-Shwe, Imai M., N.C. Nway, T.T. Lwin, O. Mar, Maruyama H., Kawakami F., Watanabe H. 「Alteration of social behavior and glutamic acid decarboxylase level in the valproic acid-induced autism rat model」10th world congress Developmental Origins of Health and Disease, (Rotterdam, Netherland), 2017年10月
8. 今井基貴, 川上文貴, 吉永恵子, 加原卓, 丸山弘子, 「ワカメ長期摂取がマウスの肝臓に与える影響の検討」第71回日本・栄養食糧学会, 2017年5月
9. 今井基貴, 川上文貴, 吉永恵子, 加原卓, 丸山弘子, 「ワカメ成分による糖代謝促進機構の検討」第16回日本応用藻類学会, (東京), 2017年5月
10. 川上文貴, 渡辺望, 湯原ひかる, 丸山弘子, 川島麗, 前川達則, 市川尊文, DSS誘発性腸炎に対する高脂肪食の影響, 第137回薬学会年会, (仙台), 2017年, 3月
11. 川上文貴, 渡辺望, 湯原ひかる, 丸山弘子, 川島麗, 前川達則, 市川尊文, 「消化管粘膜防御機構に対する高脂肪食摂取の影響」, 第89回日本生化学会, (仙台), 2016年, 9月
12. 津島博道, 前川達則, 川上文貴, 川島麗, 市川尊文, 「ストレス性消化管運動障害に関わる新規分子の解析」, 第89回日本生化学会, (仙台), 2016年, 9月
13. 川島麗, 香渡優, 川上文貴, 前川達則, 菅原節子, 石原和彦, 五艘行信, 市川尊文, 「放射線照射モデルを用いたH2受容体拮抗薬の効果」, 第89回日本生化学会, (仙台), 2016年, 9月
14. 今井基貴, 川上文貴, 千葉むつみ, 渡辺希, 吉永恵子, 加原卓, 丸山弘子, 「ワカメは高脂肪食摂取マウスの耐糖能異常を抑制する」, 第89回日本生化学会, (仙台), 2016年, 9月
15. 川上文貴, 川島麗, 前川達則, 市川尊文, 「パーキンソン病原因分子LRRK2とp53の相互作用とリン酸化」, 第88回日本生化学会, (神戸), 2015年, 12月
16. 津島博道, 前川達則, 山下博徳, 雲井利亮, 川上文貴, 川島麗, 市川尊文, 「消化管運動におけるLRRK2の機能解析」, 第88回日本生化学会, (神戸), 2015年, 12月
17. 山下博徳, 前川達則, 津島博道, 雲井利亮, 川上文貴, 川島麗, 市川尊文, 「神経細胞LRRK2を介する腸管上皮細胞調節機構の解析」, 第88回日本生化学会, (神戸), 2015年, 12月
18. 丸山弘子, 渡邊栄美子, 呉谷奈央子, 圓子侑希, 鈴木麻耶, 川上文貴, 「真コンブ摂取による高脂肪摂食マウスの耐糖能に及ぼす影響」, 第88回日本生化学会(神戸), 2015年, 12月
- 〔図書〕(計 1件)
1. 川上文貴: 情報(シグナル)伝達と受容体, ホルモン, 川上浩, 太田正人編 ヒトの基礎生化学. アイ・ケイ・コーポレーション 東京, pp223-243, 2016
〔産業財産権〕
- 出願状況(計 1件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計 1件)
- 名称: 酸素検出剤
発明者: 内山洋介, 丸山弘子, 川上文貴, 沢村維宏
権利者: 学校法人北里研究所
種類:
番号: 特願 2016-096349
取得年月日: 平成30年1月19日
国内外の別: 国内
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
- (1)研究代表者 ()
川上 文貴 (Kawakami, Fumitaka)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 50511896
- (2)研究分担者 ()
研究者番号:
- (3)連携研究者

研究者番号： ()
(4)研究協力者 ()