

令和元年5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08388

研究課題名(和文) 食品成分の -ディフェンシン分泌促進作用による小腸移植後感染症の予防戦略

研究課題名(英文) Prevention strategy for infections after small intestinal transplantation by food ingredient induced alpha defensin secretion

研究代表者

井関 健 (Iseki, Ken)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40203062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小腸虚血再還流(I/R)後のalpha-defensin (Defa)5産生量の変動、Defa5産生促進物質の探索、食品成分のDefa5産生促進作用による小腸I/R予防効果の3点について行ってきた。最初の検討により小腸I/R処置において小腸絨毛の顕著な脱落と炎症性マーカーの上昇を確認し、本条件下においてDefa5 mRNA量が有意に低下することを見出した。一方で一部の食品成分がDefa5 mRNA量を増大させることを明らかとした。最後に本食品成分をI/R前に前投与することで、I/Rによる腸管免疫低下ならびに絨毛の脱落を軽減させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では一部の食品成分が小腸移植のモデルとして用いた小腸虚血再灌流によるalpha-defensin (Defa) 5の低下と絨毛の脱落を軽減させることを見出した。したがってこれらの食品成分が小腸移植後感染に対して防御的な効果を持つ可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the effects of intestinal ischemia reperfusion (I/R) on innate immunity such as rat alpha-defensin (Defa) 5 expression, and to identify the food ingredient of prevention effect against intestinal I/R-induced innate immunity alteration. This study summarizes our findings:1)At first, intestinal I/R led to damage to the crypt and a significant decrease in mRNA levels of Defa5. 2) Some food ingredients increased the mRNA levels of Defa5 and superoxide dismutase (Sod). 3) Administration of these food ingredients before I/R had a significant protective effect against I/R-induced reduction of Defa5 mRNA level. We therefore suggest that the protective effect of these food ingredients on I/R induced injury can be caused by inducing an antioxidant enzyme such as Sods and a direct immuno-stimulatory activity.

研究分野：医療薬学

キーワード：小腸移植後感染症 ディフェンシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸は 虚血再還流 (I/R) 障害を受けやすい、免疫能が高く拒絶反応が強い、腸内細菌による感染症のリスクが高いため、他の臓器に比べて移植が難しい。拒絶反応は免疫抑制薬タクロリムスの上市・小腸移植への適応承認により改善し、I/R 障害についてもアロプリノール等の抗酸化物質を用いることで一定の予防効果を実現している。しかしながら、移植後感染症は未だ解決せず、小腸移植後の死亡原因の 60% が感染症とされる [日本小腸移植研究会, 移植. 49, 298-302 (2014)]。

α -defensin (Defa) 5 は腸管パネート細胞から産生され、小腸管腔内で機能する代表的な抗菌ペプチドであり、非自己認識機能を持たないことから、移植片に影響しない生体防御機構と言える。また Defa5 は非常に広範な抗菌スペクトルを示す一方、腸内フローラを形成する常在性の細菌にはほとんど抗菌作用を示さない。このため、様々な疾患治療・予防への応用が期待され、Defa5 の産生亢進によりクローン病、潰瘍性大腸炎に対する予防効果が実験動物レベルで明らかとなっている。さらに移植片対宿主病 (GVHD) 時には Defa5 が減少することも知られている。

しかしながら、Defa5 は経口投与しても期待された抗菌効果を示さない [J Innate Immun. 2, 66-76 (2010)] ことから、Defa5 を用いた感染症予防には、その産生を亢進させる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では小腸移植後の感染予防法の確立を目的として、比較的安全性の高い機能性食品成分に着目し、これらの成分の Defa5 産生亢進作用が虚血障害時の小腸免疫能に及ぼす効果を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

小腸 I/R モデルラットの作成は、過去の報告に準拠した [Life Sci. 82, 1242-8 (2008)]。虚血は側副血行路を上流より結索するとともに、動物実験用ディスポーザブルクリップを用いて上腸管膜動脈 (superior mesenteric artery; SMA) をクリッピングすることにより行った。再灌流は SMA のクリップを取り外すことにより行った。虚血時間は 30 min、再灌流時間は 60 分とした。

ラット小腸から ISOGEN[®] (Nippon Gene) を用いて、total RNA を調製した。調製した total RNA 1 μ g を ReverTraAce (TOYOBO) を用いて逆転写し、Single-stranded cDNA を得た。Real-time PCR は、KAPA SYBR Fast qPCR kit (NIPPON Genetics) を用いて行った。反応および検出には、LightCycler 480 II System (Roche Diagnostics) を使用した。

4 . 研究成果

本研究では小腸移植後の感染予防法の確立を目指し、機能性食品成分の Defa5 産生亢進作用の解析、小腸移植後感染症に対する有効性を評価すべく下記の項目について種々検討を行った。

- ・小腸虚血再還流 (I/R)後の Defa5 の変動解析
- ・ Defa5 産生促進物質の探索
- ・食品成分の Defa5 産生促進作用による小腸 I/R 予防効果

小腸虚血再還流 (I/R)後の Defa5 の変動解析

Defa5 変動を解析するに先立ち、ラット空腸、回腸における Defa5 発現を確認し、ポジティブコントロールとして LPS を腹腔内投与した際の Defa5 の mRNA 量を解析した。その結果、LPS 濃度依存的に Defa5 mRNA 量の増大が認められた。また小腸酸化ストレスモデルの1つである小腸 I/R モデルは小腸移植、イレウス、壊死性腸炎によって生じる一過性の小腸部虚血・再灌流をモデル化した手法であり、我々はこれまでに抗酸化物質の投与によりその障害を抑制する事を報告してきた。本モデルの機序は活性酸素種の産生による腸管粘膜の障害を主とするが、腸管免疫に対する影響は不明である。そこで小腸 I/R が Defa5 発現に及ぼす影響を検討した。検討に先立ち I/R により上昇するマーカーを確認した結果、TNF-a や Multi drug resistance (MDR) 1b mRNA 量が上昇していることを確認した。本条件下においてラット回腸 Defa5 mRNA 量を測定した結果、Sham 群に比べ I/R 群では有意に低下した。さらにヘマトキシリン-エオシン染色 (HE 染色) の結果では Paneth 細胞に含まれる顆粒が減少し、Defa5 mRNA レベルの低下と関連することが示された。したがって小腸 I/R は腸管免疫の指標である Defa5 量を減少させることが示唆された。

Defa5 産生促進物質の探索

食品成分がラット空腸、回腸の Defa5 mRNA 量に及ぼす影響を検討した。その結果、ラット空腸において γ -アミノ酪酸(GABA)およびマンネンタケ科霊芝 (以下 Reishi) 経口投与により Defa5 mRNA 量が有意に増大することを見出した。さらにラット回腸における Defa5 mRNA 量においても同様に GABA および Reishi 経口投与により顕著な上昇が認められた。また上昇の程度は、空腸と比較して回腸で顕著であった。この理由としては空腸よりも回腸において Defa5

を産生するパネート細胞が豊富であることが知られていることから、これが要因の一つであると考えられる。

食品成分の Defa5 産生促進作用による小腸 I/R 予防効果

最後に前述の食品成分を I/R 前に投与することで、I/R による腸管免疫低下ならびに絨毛の脱落に及ぼす影響を検討した。その結果、GABA および Reishi 経口投与により、低下した Defa5 mRNA 量は有意に回復することが明らかとなった。さらに絨毛の脱落を確認したところ、食品成分併用群では絨毛の脱落が抑制され、陰窩底部に存在する Paneth 細胞も回復傾向にあることが示唆された。またこれらの軽減効果について機序を検証した結果、抗酸化作用に関わる酵素であるスーパーオキシドジスムターゼが関与することが示唆された。

以上の結果よりこれら食品成分が小腸移植後感染に対して防御的な効果を持つ可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kubota A, Kobayashi M, Sarashina S, Takeno R, Yasuda G, Narumi K, Furugen A, Takahashi-Suzuki N, Iseki K. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Attenuates Ischemia Reperfusion-Induced Alterations in Intestinal Immunity.

Biol Pharm Bull. 41:1874-1878. 2018. 査読有

DOI: 10.1248/bpb.b18-00338.

Kubota A, Kobayashi M, Sarashina S, Takeno R, Okamoto K, Narumi K, Furugen A, Suzuki Y, Takahashi N, Iseki K. Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* Modulates IgA production and alpha-defensin expression in the rat small intestine.

J Ethnopharmacol. 214:240-243. 2018. 査読有

DOI: 10.1016/j.jep.2017.12.010.

〔学会発表〕(計 2 件)

窪田篤人、小林正紀、更科壮太、保田元気、木村有希、鈴木裕治、鈴木夏子、井関健. 腸管免疫賦活作用を有する食品の探索と機序の解析.

第 14 回日本食品免疫学会学術大会 2018 年 11 月 15-16 日、

星陵会館（東京都 千代田区）

窪田篤人、小林正紀、更科壮太、保田元気、鳴海克哉、古堅彩子、鈴木夏子、井関健、GABA

はラット小腸 I/R による腸管免疫変動を抑制する。

日本薬学北海道支部第 145 回例会

2018 年 5 月 12-13 日、

札幌コンベンションセンター（北海道 札幌）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 夏子

ローマ字氏名：(SUZUKI, natsuko)

所属研究機関名：北海道科学大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60535293

研究分担者氏名：小林 正紀

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, masaki)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70431319

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。