

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11395

研究課題名(和文) 経腸栄養欠如時の多臓器免疫機能不全機序の解明とその対策法探索のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for elucidation of the mechanism of multi-organ immune dysfunction in the lack of enteral nutrition

研究代表者

村越 智 (MURAKOSHI, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10647407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：経腸栄養欠如による腸管や肝免疫の低下機序を解明するためにマウスを用いた栄養管理モデルを使用して基礎研究を施行した。

検討の結果、以下の知見を得た。腸管免疫低下は腸管免疫維持に重要である腸管リンパ装置でのリンパ球数の変化や腸内サイトカイン環境の変化などの要因により惹起されていることが示唆された。また、肝免疫低下は肝免疫維持に重要な肝単核球のサイトカイン産生機能の変化や肝単核球の多くを占めるクッパー細胞の貪食能低下により惹起されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養療法は患者管理の基盤である。生理的な栄養管理法である経腸(経口)栄養が不可能な場合、栄養管理は完全静脈栄養に依存するが感染性合併症の発生率上昇や予後の悪化をまねく。その原因として腸管を中心とした粘膜免疫だけでなく、肝臓の免疫も低下する多臓器免疫不全の惹起が指摘されている。しかし、その機序は複雑で不明な点が多く、有効な対策法の開発を難しくしている。

本研究では経腸栄養欠如による腸管や肝免疫の低下機序について検討しその要因を明らかにできた。この結果は、経腸栄養が欠如しても腸管免疫や肝免疫の維持が可能となる栄養管理法開発につながり、重症患者の栄養管理技術の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed the basic study to elucidate the mechanism of intestinal and hepatic immunodeficiency in the lack of enteral nutrition with mouse nutrition management model. As a result of the examination, it was suggested that the intestinal immunodeficiency was caused by changes in the number of lymphocytes of the gut-associated lymphoid tissue and changes in the intestinal cytokine environment. It was also suggested that the hepatic immunodeficiency was due to the functional changes of hepatic mononuclear cells.

研究分野：外科代謝栄養学

キーワード：静脈栄養 腸管免疫 肝免疫 サイトカイン 肝単核球 クッパー細胞 腸管リンパ装置 経腸栄養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症患者や腸管を栄養吸収の場には使用できない患者など経腸(経口)栄養が不可能な場合、完全静脈栄養(TPN)による栄養管理が必須となる。しかしTPNは経腸栄養と比較して感染性合併症の発生率が高く、予後の悪化さらには医療費の増大につながる(Dellinger RP et al. Crit Care Med 2012)。TPN下では腸管免疫や肝免疫の低下が起こるために感染性合併症が増加すると考えられているがその機序については未だ不明な点も多い。

経腸栄養による栄養管理ができない患者はなお多く存在する。したがって経腸栄養欠如時に惹起される多臓器免疫不全状態を防止し、感染性合併症の発生リスクを改善する栄養管理法の開発は喫緊の課題であり、医療経済という観点からみても重要なテーマと考える。

経腸栄養欠如時に腸管免疫維持効果を持つと報告された物質の一部は臨床で使用されているが、その適応範囲は著しく狭く、ごく一部でしか使用されていない。また、これらの物質の腸管免疫に対する効果は限定的で、肝免疫の低下には効果が認められない。このことは肝免疫の低下は腸管免疫低下が原因で続発して起こるのではなく、両者の免疫低下がそれぞれ独立した異なる機序によって起きていることを示唆している。したがって、腸管、肝免疫両者の低下機序を基礎研究によって解明することにより、経腸栄養欠如時の腸管・肝免疫不全の改善につなげる新たな治療戦略を探索していくことが必要と考え、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

経腸栄養の欠如による腸管や肝免疫の低下機序を詳細に解析し、TPN施行時においても腸管を中心とした粘膜免疫・肝免疫の維持が可能となる栄養管理法の開発のための基礎研究を行い、臨床研究につなげることを目的とする

### 3. 研究の方法

マウス栄養管理モデルを使用し研究を施行した。すなわち、ICRマウス(オス)の頸静脈にカテーテルを挿入、2日間の回復期間においてTPN製剤を投与する群(PN群)と通常食餌を摂取する群(Control群)の2群をそれぞれ5日間栄養管理した後、犠死せしめ検体を採取し研究に供した(図1)。

(1) 腸管免疫についての解析

全小腸より腸管リンパ装置(GALT)のリンパ球(パイエル板リンパ球、腸上皮間リンパ球、粘膜固有層リンパ球)を分離しそれぞれのリンパ球総数を評価した。分離したリンパ球の表面抗原についてはフローサイトメータを使用して解析した。小腸のサイトカインは小腸組織のホモジネート液中を、Immunoglobulin A (IgA)濃度については小腸内腔洗浄液をそれぞれELISA法により測定して検討した。

(2) 肝免疫についての解析

摘出した全肝臓から肝単核球を分離し、その総数を評価した。あわせて、肝単核球中のサブポピュレーション(クッパー細胞やリンパ球の割合)をフローサイトメータにより検討した。また、分離した肝単核球のサイトカイン産生能を評価するために、肝単核球をlipopolysaccharide (LPS)刺激下に培養し、その上清中のサイトカイン濃度をELISA法にて測定した。さらにクッパー細胞の貪食能の評価を目的として、分離したクッパー細胞をLPS刺激下に培養し、続いて蛍光標識マイクロビーズを投与した後にフローサイトメータを用いてクッパー細胞の蛍光強度を測定、マイクロビーズを貪食したクッパー細胞の割合を評価した(貪食能が高いクッパー細胞はマイクロビーズを貪食し蛍光強度が高くなることを利用した貪食能評価方法)。接着分子については肝臓組織のホモジネート液中の濃度をELISA法にて測定し評価した。

### 4. 研究成果

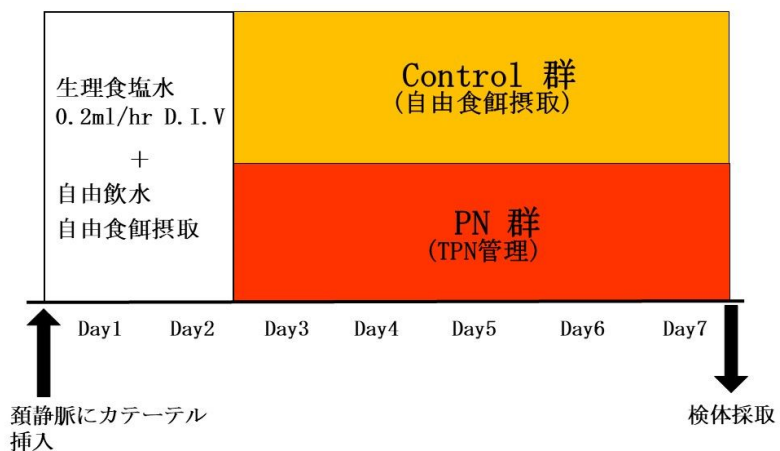
(1) 腸管免疫について

GALTのリンパ球数および表面抗原の変化

GALTのリンパ球数はパイエル板、腸上皮間、粘膜固有層のいずれにおいてもT細胞、B細胞ともに減少するのが確認された。T細胞の表面抗原に関してはTCR、TCR、CD4、CD8について評価したが、その発現状況は経腸栄養が欠如しても変化を認めなかった。

B細胞関連のサイトカイン環境の変化

リンパ球増殖や免疫グロブリン産生作用をもつInterleukin(IL)-15あるいはリンパ球増殖や



B細胞の形質細胞への分化促進作用をもつ IL-21 の腸管内濃度を検討したところ、経腸栄養欠如で低下しさらに IL-15 濃度の低下と IL-21 濃度の低下には正の相関があることを確認した。本研究では、経腸栄養欠如で GALT の B 細胞数が減少し腸管洗浄液の IgA 濃度の低下も確認されたが、この機序として腸管内の IL-15 と IL-21 の濃度低下が要因の一つであることが推定された (図 2, 3, 4)

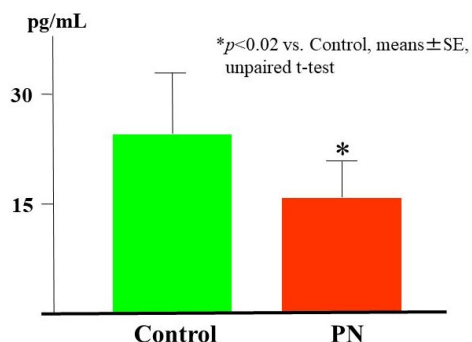


図 2. 小腸内 IL-15 濃度

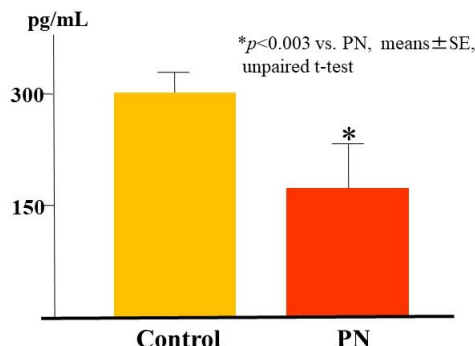


図 3. 小腸内 IL-21 濃度

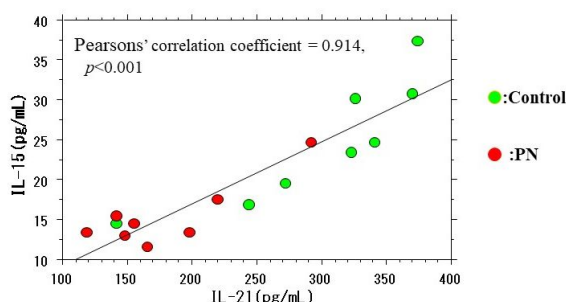


図 4. 小腸内 IL-15 および IL-21 濃度の相関

## (2) 肝免疫について

### 肝単核球数の変化

経腸栄養の欠如は、肝単核球数の減少を惹起することを確認した。一方、肝単核球中に占めるリンパ球やクッパー細胞の割合については変化を認めなかった (図 5)

### 肝単核球からの産生サイトカインの変化

肝臓より分離した肝単核球を LPS 刺激下に培養したところ、培養液上清中の Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) レベルが TPN 群にて低下することを確認した。Tumor necrosis factor- (TNF- ), IL-6 あるいは IL-10 レベルについても同様であった。経腸栄養が欠如すると炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの両者の産生能低下が惹起され肝臓内のサイトカイン環境が大きく変化することが明らかになった。

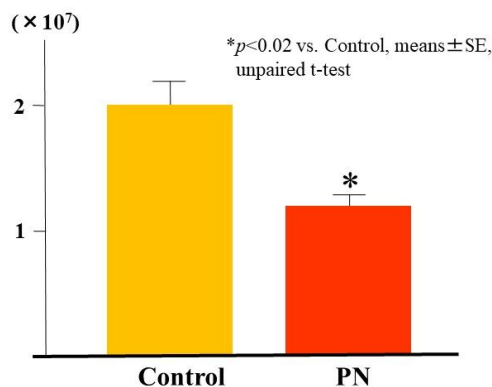


図 5. 肝単核球数 (/肝臓)

### クッパー細胞の機能への影響

肝単核球の多くを占めるクッパー細胞は表面抗原発現により機能に相違がある。CD68 陽性クッパー細胞は貪食能が活発であり、CD11b 陽性クッパー細胞はサイトカイン産性能が活発である。PN 群のクッパー細胞集団の表面抗原を解析すると CD68 あるいは CD11b 発現のいずれもが低下することが観察された。また、蛍光標識マイクロビーズの貪食能を指標にしてクッパー細胞の貪食能を検討したところ PN 群での貪食能低下を認めた。クッパー細胞の機能不全が経腸栄養欠如時の肝免疫低下の要因の一つであることが示唆された (図 6)

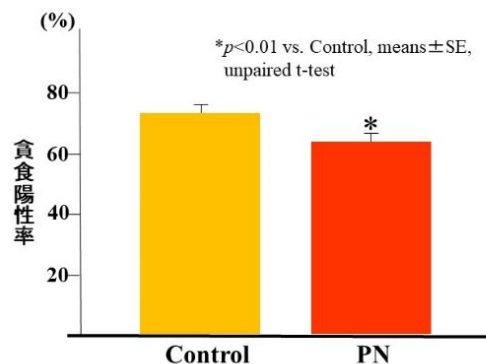


図 6. マイクロビーズを貪食しているクッパー細胞の割合

### 接着分子への影響

経腸栄養が欠如すると肝臓の接着分子の発現低下により、免疫担当細胞が局所へと有効に集積できなく

なり肝免疫が低下を引き起こしている可能性があると考え、肝臓内の接着分子発現について評価した。その結果、endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) の発現減弱が肝臓にて起こることを確認した。これが肝免疫低下の一因となっていることが示唆された。なお、肝類洞内の構成細胞を単離して接着分子低下がどの細胞が原因で生じているのか検討を進めたが明らかにはできなかった。

本研究では経腸栄養欠如によって引き起こされる腸管免疫や肝免疫の低下機序について検討した。その結果、複数の要因が相互干渉し免疫低下が起こっていることを明らかにできた。この研究で得られた成果は経腸栄養欠如時においても腸管免疫や肝免疫の維持が可能である栄養管理法開発の基盤となり、今後の臨床現場において重症患者の栄養管理技術の向上に寄与することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Higashizono Kazuya, Fukatsu Kazuhiko, Watkins Ayako, Watanabe Tomoki, Noguchi Midori, Ri Motonari, Murakoshi Satoshi, Yasuhara Hiroshi, Seto Yasuyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Influences of Short Term Fasting and Carbohydrate Supplementation on Gut Immunity and Mucosal Morphology in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Parenteral and Enteral Nutrition	6. 最初と最後の頁 516 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jpen.1446	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 Miyakuni Taiki, Fukatsu Kazuhiko, Ri Motonari, Murakoshi Satoshi, Inoue Yoshiko, Kurihara Shigekazu, Takayama Tadatoshi, Yasuhara Hiroshi	4. 巻 73
2. 論文標題 Cystine and Theanine Improve Survival after Gut Ischemia-Reperfusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 131 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489825	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 Ri Motonari, Fukatsu Kazuhiko, Miyakuni Taiki, Yanagawa Masashi, Murakoshi Satoshi, Yasuhara Hiroshi, Seto Yasuyuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Influences of Vagotomy on Gut Ischemia-Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SHOCK	6. 最初と最後の頁 646 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000000783	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Satoshi Murakoshi
2. 発表標題 Influences of aging on expression of lipopolysaccharide receptor of Kupffer cells in mice
3. 学会等名 ESPEN CONGRESS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Murakoshi
2. 発表標題 Influences of aging on the phagocytic activity of Kupffer cells in mice
3. 学会等名 ESPEN CONGRESS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Murakoshi
2. 発表標題 Influences of aging on Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production of hepatic mononuclear cells in mice
3. 学会等名 ASPEN 2018 Nutrition Science & Practice Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Murakoshi
2. 発表標題 Influences of nutritional route on Kupffer cell phagocytic function
3. 学会等名 ESPEN CONGRESS 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村越智
2. 発表標題 栄養投与ルートの相違が侵襲時の肝単核球機能におよぼす影響
3. 学会等名 JDDW 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村越智
2. 発表標題 感染予防に役立つ栄養の力～投与ルートからみたそのパワーの考察～
3. 学会等名 第35回日本臨床栄養代謝学会学術集会
4. 発表年 2020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	守屋 智之  (MORIYA Tomoyuki)		
研究協力者	東園 和哉  (HIGASHIZONO Kazuya)		
研究協力者	李 基成  (LI Motonari)		
研究協力者	宮国 泰己  (MIYAKUNI Taiki)		
連携研究者	齋藤 祐平  (SAITO Yuhe)  (90422295)	東京大学・医学部附属病院・助教    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	深柄 和彦 (FUKATSU Kazuhiko) (70323590)	東京大学・医学部附属病院・准教授  (12601)	
連携研究者	安原 洋 (YASUHARA Hiroshi) (50251252)	東京大学・医学部附属病院・教授  (12601)	