

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10563

研究課題名(和文)短腸症におけるポリアミンの有効性機序解明 IgA産生促進機構と腸内細菌叢変化

研究課題名(英文)Dietary spermidine and spermine intake strengthen intestine barrier and prevent hepatocyte lipid droplet deposition in rodent short bowel syndrome model

研究代表者

笠原 尚哉 (Kasahara, Naoya)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382891

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)：小腸が大量切除されると栄養吸収が不十分となり(短腸症)長期間の完全経静脈栄養が必要となる。完全経静脈栄養では小腸不全関連肝障害やカテーテル関連の合併症により致命的になることがある。症例によっては小腸移植が行われるが免疫学的な制御が困難で成績は良好とはいえない。残存小腸の機能を賦活化することで手術をせずに完全経静脈栄養から離脱、致命的な合併症を回避して生存率を改善する新しい短腸症の治療法を開発することを目的とした。ラット短腸症モデルを作成、ポリアミン投与によりIgAやムチン、タイトジャンクションの発現が増強した。短腸症に伴う肝細胞の脂肪蓄積も改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット短腸症モデルでポリアミン(PA)経口摂取によりIgAやムチン、タイトジャンクションが増強した。PA摂取により血清GLP-2やDAOは変動しなかった。また、PA摂取による腸内細菌叢変化はみられなかった。PAは既知のものとは異なる機序で粘膜防御を増強することが示唆された。PA無添加の食餌で組織学的に肝細胞への脂肪滴蓄積がみられたがPA添加で改善した。小腸不全関連肝障害はNASH類似の組織像を示すことが知られている。NASHの病態進展にかかわるSREBP-1の遺伝子発現が食餌PA濃度と逆相関しており、PAがSREBP-1を介して脂肪滴蓄積抑制効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dietary polyamine increase spermidine and spermine in intestine and blood in rodent model of short bowel syndrome. Additionally, in parallel with the concentration of dietary polyamines, progression of villous height, crypt depth and IgA elevation in whole blood and feces are confirmed. Also increased fecal mucin content and Claudin-3 protein expression was observed in the same manner. Furthermore, histological findings revealed hepatocyte lipid droplet deposition was decreased by dietary polyamines. Oral polyamine intake may have a prevention effect in steatotic change of liver, which develop as a late complication of short bowel syndrome known as intestinal failure-associated liver disease.

研究分野：消化器外科学

キーワード：短腸症 ポリアミン IgA タイトジャンクション 腸管不全関連肝障害

1. 研究開始当初の背景

小腸が先天的要因や炎症、虚血に伴う壊死で外科的に大量切除されると吸収不良・蠕動障害をきたすことが知られている。成人では残存長が 1m 未満になると栄養吸収が不十分となり長期間の完全経静脈栄養が必要となる可能性が高くなる(短腸症)。完全経静脈栄養では肝障害(小腸不全関連肝障害: IFALD)や中心静脈挿入部の血栓症、カテーテル関連の敗血症などの合併症が高率に発生する。これらの合併症により完全経静脈栄養施行患者は 2-5 年の間に 38% が死に至るとの報告もあり、合併症の程度や背景疾患・年齢などによって小腸移植の適応となる。

小腸はもともと体内の 80% の免疫細胞が存在する臓器であり、移植によりドナーの免疫細胞はレシピエントの体内にグラフトとともに移植されることとなる。また、小腸上皮は大部分がドナー由来のままとなることもあり免疫原性が高く他の固形臓器と比較して免疫制御は困難で依然として最適な免疫抑制療法は見つかっていない。小腸移植の成績は良好とはいえ実施施設も少ないため、在宅静脈栄養に頼り合併症の危険と隣り合わせで生活を送っている患者が世界中に存在する。

残存小腸の機能を賦活化することで手術をせずに完全経静脈栄養から離脱して致死的な合併症を回避し生存率を改善する、まったく新しい短腸症の治療法を開発することを目的に先行研究を行った。

先行研究では短腸症におけるポリアミン(PA)の治療効果を検討する目的で短腸症モデルラットを作成した。標的組織である残存空腸、残存回腸、肝臓、全血で投与 PA 濃度依存性に PA 含有濃度が増加する、小腸絨毛高・陰窩の深さが増加する、糞便・血清の IgA 濃度が同様に食餌 PA 濃度依存性に増加するという結果が得られた。さらに、PA0%食餌への切り替えにより腸内細菌叢が変化する現象を発見した。また、肝組織像では 0%PA 摂取群で肝細胞への脂肪滴蓄積と風船様腫大をみとめた(炎症細胞浸潤は明らかではなかった)。一方、PA 添加食餌摂取群では正常肝組織と比較して変化はみとめなかった。肝細胞の脂肪滴蓄積は IFALD の初期像とも考えられ PA 投与が抑制効果を有すると考えられた。(図 1)

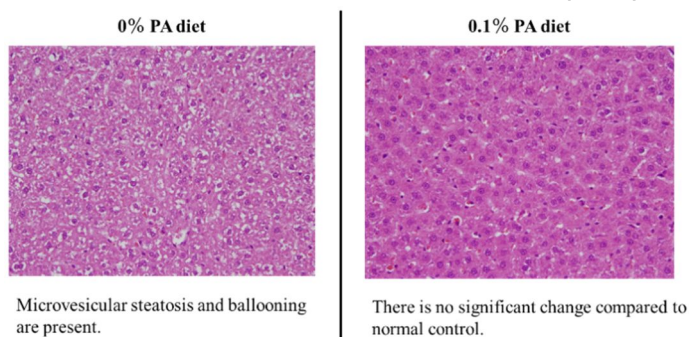


図 1 短腸症モデルで PA 欠乏食摂取により肝細胞に脂肪滴蓄積を認めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は先行研究で得られたポリアミン(PA)経口摂取による短腸症の治療効果の機序を解明することで臨床応用への道筋をつけることにある。具体的には前述の IgA 産生促進効果、小腸粘膜増殖効果は PA が腸内細菌叢の変化を促進した間接的な影響か IgA を産生する機序に直接的に働きかけた結果か明らかにすること、さらに PA による IFALD 抑制効果の機序について明らかにすることにある。

3. 研究の方法

雄性 Lewis ラットを用いて 2/3 小腸切除モデルを作成した。術後 3 週から 1 週間 0%PA 食を与え、術後 4 週から飼料中の PA 含有量(スペルミジン、スペルミンを等量ずつ添加)で 0%、0.01%(通常食と同等程度)、0.1%摂取群の 3 群と、腸管を切離するだけで再縫合(Sham 手術)して術後 3 週から 0%PA 食を摂取する群の計 4 群に分けて自由摂食させた。経時的に体重測定と糞便採取を行いさらに 4 週間後(術後 8 週間)に犠死させて血液、空腸、回腸、肝臓を採取して解析した。

(1) 腸管バリア機能、小腸粘膜増殖機能の評価

腸管は上皮細胞間のタイトジャンクション(TJ)によりシールされ、外環境と内環境とのバリアとして機能する。ジアミンオキシダーゼ(DAO)は粘膜上皮細胞でその活性が高くヒスタミン・ポリアミンの異化に加え細胞増殖の制御にも関与しており、腸粘膜の integrity や maturity の指標になるとされている。また、糞便中ムチンは腸管上皮杯細胞から分泌され細菌叢と上皮が直接接触しないようにしている。GLP-2 は小腸粘膜増殖・消化吸収の促進・粘膜バリアの維持などの腸管機能の向上に寄与する作用が知られており、実臨床でも GLP-2 アナログが海外で短腸

症患者に投与されて一定の効果あげている（国内では認可されていない）。さらに、短腸症では腸内細菌叢の乱れにより粘膜バリアが破綻していわゆる "Leaky gut syndrome" のような状態となり bacterial translocation が起きることが知られている。一方、粘膜面の感染防御の主体は IgA であり先行研究で血清・糞便中 IgA が食餌 PA 濃度依存性に増加することは判明していたが、残存小腸組織で増加しているかどうかについては確認できていなかった。

小腸粘膜の TJ に対して PA 摂取が与える影響を評価するために TJ の一種である Claudin-3 の発現量をウェスタンブロット法により定量した。血清 DAO 活性・糞便中ムチンを ELISA 法・市販の糞便中ムチン測定キットを用いて定量した。血清 GLP-2 (一晩絶食後に採取) を ELISA 法で測定した。市販のキットを用いて bacterial translocation で移行した肝臓中の腸内細菌科菌群をリアルタイム PCR で定量した。残存回腸組織中の IgA をウェスタンブロット法により定量した。

(2) 糞便中の有効代謝産物：短鎖脂肪酸の測定

腸上皮保護効果があることが知られている酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸の糞便中濃度を GC-FID 法により測定した。

(3) 次世代シーケンサーを用いた腸内細菌解析

次世代シーケンサーを用いて腸内細菌の 16S rRNA 領域を対象に網羅的な細菌叢解析を行う (メタゲノム解析) ことで短腸症モデルにおける食餌中 PA 濃度による腸内細菌叢の変化を解析した。

(4) 短腸症モデルの肝臓組織における遺伝子発現解析

進行した IFALD の肝組織像は NASH に類似することが報告されている。NASH の病態進展に寄与する可能性がある酸化ストレス、小胞体ストレス、脂質代謝関連遺伝子について mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量して比較した。

4. 研究成果

(1) 短腸症モデル 0%PA 摂取群と比較して 0.01%、0%PA 摂取群では有意に Claudin-3 が高発現していた。Sham 群 (0%PA 摂取) は同濃度摂取短腸症モデル群と比較して Claudin-3 の発現量が高かった。短腸症により Claudin-3 発現が低下するものの、PA を食餌性に添加することで発現量が回復することが示された。血清 DAO は短腸症モデル各群間で有意差を認めず。糞便中ムチン含有量は短腸症モデルで食餌 PA 濃度依存性に増加していた。血清 GLP-2 は短腸症モデル各群間で有意差を認めなかった。肝臓組織内の腸内細菌群についてリアルタイム PCR を行ったが検出されなかった。今回の短腸症モデルでは肝臓組織内まで到達するような bacterial translocation は起きていなかったことが示された。回腸組織中 IgA 含有量は食餌 PA 濃度依存性に増加していた。(図 2、3)

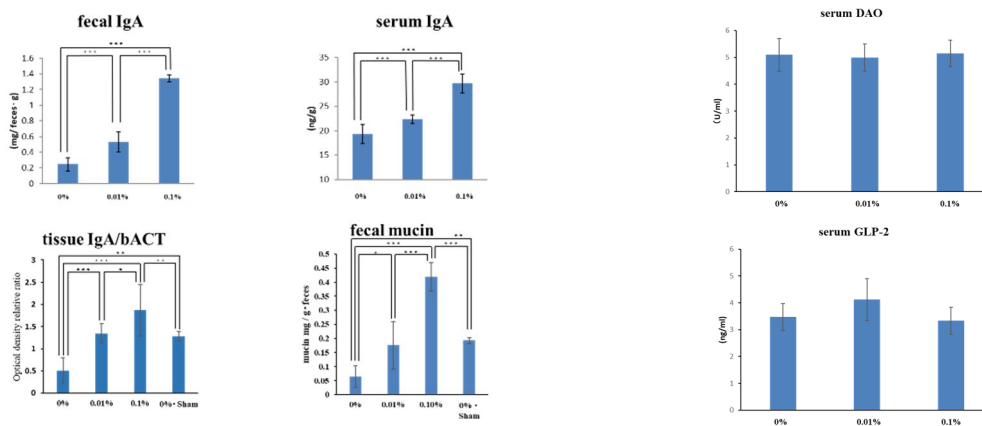


図 2 PA 摂取により粘膜防御能が向上した

図 3 DAO, GLP-2 は PA 摂取による粘膜防御能向上に関与しない

(2) 糞便中の酢酸やプロピオン酸、酪酸濃度は各濃度 PA 摂取群で有意差はみられなかった。ただし、術後 4 週間時点の各濃度 PA 振り分け前の糞便中濃度は 8 週後の各濃度 PA 摂取群と比較して有意に高値を示していた。

(3) 予備実験では術後 3 週の通常食摂取時点とその後 PA 0% 食への切り替えた 4 週時点での腸内細菌叢を比較したが、本実験では術後 8 週間時点の各 PA 濃度摂取群間で比較を行った。各群間で細菌叢に有意な変化はみとめなかった。腸内細菌は PA による治療効果には関与していないものと考えられた。

(4) 解毒作用を有する Gstm1、小胞体ストレスに関係する PERK、Foxm1、Xbp1 は Sham 群と比較して短腸症モデルで低下していたが食餌 PA 濃度依存性に発現量が増加 (回復) していた。特に Gstm1 については 0.1%PA 摂取群で Sham 群と同等の発現量であった。また、脂肪酸合成を調節する SREBP-1 は Sham 群と比較して短腸症で増加しており食餌 PA 濃度と逆相

に関して発現量が低下（抑制）されていた。短腸症における IFALD 抑制効果は PA により適切な小胞体ストレス応答が回復すること、脂肪酸合成が抑制されることによるものであることが推測された。今後、培養細胞を用いた *in vitro* で検証を行う予定である。

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 Doi Junshi, Fujimoto Yasuhiro, Teratani Takumi, Kasahara Naoya, Maeda Masashi, Tsuruyama Tatsuaki, Iida Taku, Yagi Shintaro, Uemoto Shinji	4. 巻 60
2. 論文標題 Bolus Administration of Polyamines Boosts Effects on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Regeneration in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Surgical Research	6. 最初と最後の頁 63 ~ 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000497434	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脱細胞化担体製造方法、脱細胞化担体、細胞充填方法、細胞シート作製方法、及び脱細胞化溶液キット	発明者 寺谷工、浦橋泰然、笠原尚哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2019-136011A	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ポリアミンを有効成分とする、造精機能障害を改善するための組成物	発明者 渡邊 卓巳、寺谷工、笠原 尚哉、高山達也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6842820	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	横田 真一郎 (Yokota Shinichiro) (00625551)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	岩本 禎彦 (Iwamoto Sadahiko) (10232711)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	佐久間 康成 (Sakuma Yasunaru) (10296105)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	佐田 尚宏 (Sata Naohiro) (20261977)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	寺谷 工 (Teratani Takumi) (70373404)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	望月 和樹 (Mochizuki Kazuki) (80423838)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	
研究分担者	浦橋 泰然 (Urahashi Taizen) (90277161)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

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