

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：37502

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19941

研究課題名(和文)核酸系旨味物質によるAMPK活性化を介した抗炎症作用機構の探索

研究課題名(英文)A search for anti-inflammatory mechanisms via AMPK activation by an oral nucleotide related umami compound.

研究代表者

木村 靖浩(Kimura, Yasuhiro)

別府大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号：90549792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアデノシン一リン酸(AMP)によるAMPK活性化を介した抗炎症作用メカニズムを探索するため、慢性大腸炎(IBD)マウスの大腸粘膜固有層に浸潤したTh1、Th17細胞及びTregの比率をフローサイトメトリーにより調べた。AMP投与はIBDマウスの下痢と血便の症状を顕著に改善した。また、フローサイトメトリー分析では各群の例数が少なかったため、明らかな差を検出することができなかったが、AMPの投与はTh1及びTreg細胞の大腸組織への浸潤を抑制する傾向があった。このことは大腸免疫組織化学染色においてAMP群においてTreg細胞の浸潤が抑制されることから支持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患(IBD)は、寛解と再燃を繰り返す難治性疾患で、未だ発症原因も不明であり、治療の中心は薬物による対症療法で、決定的な根治療法は確立されていない。研究者は動物実験ではあるが、核酸系旨味物質のAMPによるAMPKの活性化を介してIBDの病状が抑えられることを発見している。本研究では、AMPの投与により炎症をコントロールする免疫細胞の大腸組織への浸潤が抑制される可能性を示唆するデータを得ることができた。今後、核酸系旨味物質をIBD治療へ応用することを目標にさらに作用メカニズムの探索を進め将来的に臨床応用につなげたい。

研究成果の概要(英文)：We tested the proportions of Th1, Th17, and Treg cells in the lamina propria of the colon in DSS-induced IBD mice fed the diet with AMP using a flow cytometry in understanding mechanisms of the anti-inflammatory effects via AMPK activation by an oral adenosine-5'-monophosphate (AMP) administration.

The mice fed the diet with AMP had greater improvement of severity of the colitis as watery and bloody diarrhea. The flow cytometry analysis indicated that AMP administration had lower tendencies in proportions of pro-inflammatory Th1 and anti-inflammatory Treg cells in the lamina propria as compared to those of IBD mice fed the diet without AMP, but not significantly different. The results of the immunohistochemistry analysis showed that AMP was likely to elicit mild infiltration of Treg cells to the colon tissues compared to those in IBD mice fed the diet without AMP. Take together, AMP may have an effect for attenuating infiltration of T helper cells into inflamed tissues of the colon.

研究分野：食品機能学、栄養・腸管生理学

キーワード：核酸系旨味物質 AMP AMPK 炎症性大腸疾患 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される慢性大腸炎(Inflammatory Bowel Disease、IBD)は、寛解と再燃を繰り返す難治性疾患で、未だ発症原因も不明であり、治療の中心は低残渣食やステロイド・免疫抑制剤などの薬物による対症療法で、決定的な根治療法は確立されていない。

細胞のエネルギーセンサーとして機能することが知られている AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が細胞のエネルギー代謝の調節のみならず、免疫機能を抑制的に調節することが明らかになってきており、マクロファージの活性化、Th1 及び Th17 細胞の免疫応答異常を特徴とする IBD の治療へ AMPK 賦活剤 (AICAR) 投与による組織・細胞 AMPK 活性化の有効性が動物実験レベルで報告されている^{1,2)}。研究者は、それらの研究結果にヒントを得て食品成分にも AMPK を活性化する成分がないかと探索していたところ、アデノシン-リン酸 (AMP) の経口投与が肝臓 AMPK を活性化するという報告を見つけた³⁾。それらの知見をもとに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) で慢性大腸炎を惹起したマウスに AMP を含む食餌を与えたところ、体重減少、下痢・血便の程度が改善され、病理組織検査では炎症症状の軽減が観察された。また、大腸組織 AMPK の活性化と、炎症性サイトカイン濃度の減少が認められた(未発表データ)。このように AMP に AMPK 活性化を介した抗炎症作用があることが示唆された。核酸系旨味物質による AMPK の活性化を介して IBD の病状が抑えられることを作用メカニズムも含め確認することができれば、核酸系旨味物質を IBD の新たな対症療法へ応用することが期待できる。しかも食習慣のある核酸系旨味物質の利用は安全性も高い。将来的にヒトへの応用につなげるためにも作用メカニズムを探索することが重要と考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

前述のごとく、研究者はこれまでに魚介類や食肉類に多く含まれる核酸系旨味物質の AMP を薬剤により誘導した IBD マウスに投与したときに、大腸組織の AMPK の活性化を介して、大腸組織の炎症性サイトカイン (TNF- α 、INF- γ 、IL-17A) 産生が抑制され、下痢・血便の程度が改善して大腸の炎症症状が緩和されることを見いだしている(未発表データ)。

しかしながら、現時点では AMP 及び IMP による抗炎症作用の詳細なメカニズムは明らかになっていない。その作用メカニズムを探索することを目的とする本研究は、IBD 患者による臨床応用するための基盤研究につなげる不可欠要素となる。本研究は、研究者がこれまでに見いだしてきた魚介類や食肉類に多く含まれる AMP の AMPK 活性化を介した抗炎症作用(未発表データ)の作用メカニズムを、IBD マウスを使って慢性大腸炎組織への浸潤が考えられる炎症性及び抗炎症性免疫細胞 (Th1、Th17、Treg 細胞) の比率を調べ、さらに作用メカニズム解明への基礎データを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物、被検物、飼育及び糞便性状観察

4 週齢 C57BL/6j 雌マウスを室温 22 ± 2 、湿度 $50 \pm 10\%$ 及び 12 時間の明暗サイクル (明期 7:00 ~ 19:00) の飼育環境下に 1 週間順化させた後、AMP (アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム塩) を AIN93G 精製粉末飼料に 0.3% 添加して IBD マウス (DSS + AMP 群) に 24 日間投与した。対照 IBD マウス (DSS 群) 及び無処置対照マウス (Control 群) には AIN93G 精製粉末飼料のみを与えた。体重、摂餌量及び糞便性状 (下痢及び血便の状態) を毎日モニターし、体重減少率及び糞便性状を数値化した。下痢スコアは正常を 0、軟便を 1、下痢を 2 及び水様性下痢を 3 とした。血便スコアは正常を 0、部分的血便を 1、全体的血便を 2 及び肛門から出血を 3 とした。体重減少率スコアは減少なし、あるいは増加を 0、1~5% の減少を 1、6~10% の減少を 2、11~15% の減少を 3、15% 以上の減少を 4 とした。さらに体重減少率と糞便性状スコアを平均し、Disease Activity Index (DAI) を求めた。IBD は、Bai らの方法を改変して惹起した¹⁾。マウスに DSS (分子量 36,000~50,000) を 3% 含む飲料水を実験 0~6 日目、13~15 日目、20 及び 21 日目に自由摂取させ惹起した。DSS 投与期間以外は水道水を自由に摂取させた。実験 24 日目にマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈を切断して脱血死させ、直ちに大腸を摘出した。

(2) フローサイトメトリー

[実験 1]

マウス大腸粘膜固有層からのリンパ球の採取は、Weigmann らの方法⁴⁾に準じ、一部改変して行った。摘出した大腸の長さを測定したのち、氷冷 Phosphate Buffered Saline (PBS (-)) で

大腸内容物を洗い出し、はさみで大腸を縦に切り開いた。大腸を約 1 cm 幅に細断し 50 ml コニカルチューブに入れ、5 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール含有 Hank's Balanced Sault Solution (HBSS) を 5 ml 加えて振盪機で 37、180 rpm、20 分間、振盪した。大腸組織を回収し、新たに HBSS を加えて、再び振盪した。この操作をもう一度繰り返し大腸組織から腸上皮細胞を剥離したのちに、残存大腸組織をコラゲナーゼ、ディスパーゼ及び RNase により酵素処理した。酵素処理液を 40 μ m ナイロンセルストレーナーを通過させて粘膜固有層から単核球を 50 ml コニカルチューブに回収した。完全に大腸組織が消化されるまでさらにこの操作を 2 回繰り返し、その都度セルストレーナーを通過させた。酵素処理液は先の酵素処理液の入った 50 ml コニカルチューブに加えた。回収した酵素処理液は 20 で 500 \times g、20 分間遠心分離したのち、上清をアスピレータで吸引除去した。沈殿を氷冷 PBS に懸濁し、前述の条件で再び遠心分離して細胞を洗浄した。次いで Lympholyte[®]-M を使用した密度勾配法により酵素処理液からリンパ球画分を得た。手順は製品添付指示書の指示に従った。まず、採取した単核球を 5 ml の PBS に懸濁した。次に 5 ml の Lympholyte[®]-M を 15 ml コニカルチューブに入れてそこに単核球懸濁液を重層した。室温で 1000 \times g、20 分間遠心分離した。遠心後、中間に浮遊するリンパ球層をパスツールピペットにより回収した。リンパ球画分採取後、800 \times g、5 分間遠心分離をし、PBS を 5ml 加え、ボルテックスで攪拌洗浄し、同条件で遠心分離した。この洗浄操作をもう一度繰り返した。回収したリンパ球をヘルパー T 細胞 (Th1・Th17・制御性 T 細胞 (Treg)) に特有に発現する細胞表面抗原と細胞内タンパク質を蛍光標識抗マウス抗体、Th1 細胞は FITC-anti-CD4 と PE-anti-INF-、Th17 細胞は FITC-anti-CD4 と APC-anti-IL-17、Treg 細胞は FITC-anti-CD4 と APC-anti-Foxp3 で蛍光標識して、フローサイトメーターにより各ヘルパー T 細胞の比率を調べた。

[実験 2]

(1) フローサイトメトリー

実験 1 と同様の方法で回収したリンパ球からヘルパー T 細胞を精製するために抗 CD4 マイクロ磁気ビーズ抗体を使用しヘルパー T 細胞の表面抗原 CD4 を標識した。MACS column を磁石が装着された MACS separator にセットして標識済みの細胞を注入したのち、column を磁石から取り外し、カラムに保持されていた標識細胞を PBS で抽出した。その後、最初にヘルパー T 細胞の表面抗原である CD4 を FITC-抗 CD4 抗体で染色したのち、キットにより固定・浸透処理を行い、各ヘルパー T 細胞 (Th1・Th17・Treg) に特有に発現する細胞表面抗原と細胞内タンパク質を実験 1 と同様の方法により蛍光標識して、フローサイトメーターにより各ヘルパー T 細胞の比率を調べた。

(2) ジアミノベンジジン (DAB) 法による大腸免疫組織化学染色

マウス大腸を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定したのち、常法によりパラフィン包埋、3~4 μ m の薄切切片を作製した。スライド切片は脱パラフィン、洗浄、ブロッキングを経て、Th1、Th17 及び Treg 細胞を検出するため、それぞれのマーカーたんぱく質の T-bet、Podoplanin 及び Foxp3 一次抗体を 4 で一夜反応させた。スライド標本は洗浄後にシンプルステイン マウス MAX-PO(G) を数滴滴下し、室温で 25 分反応させた。洗浄後、スライド標本に DAB 試薬を数滴滴下して染色した。最後にヘマトキシリンにより核を染色し、鏡検に供した。

(3) 統計解析

すべての数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。下痢スコア及び血便スコアの DSS 群と DSS+AMP 群間の比較は二元配置反復測定分散分析により行った。各群の大腸長及びヘルパー T 細胞の比率の平均値の差の検定は一元配置の分散分析後、Tukey の検定により行った。危険率 5 % 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

[実験 1]

(1) 下痢・血便スコアの経日変化及び大腸の長さ

下痢スコアの経日変化を図 1 に示した。これまでの我々の先行研究の結果同様に DSS + AMP 群の下痢スコアは DSS 群に比べて低値で推移し、DSS + AMP 群マウスで下痢の症状が有意に改善された ($p=0.001$)。血便スコアの経日変化を図 2 に示した。下痢スコアの結果と同様に DSS + AMP 群の血便スコアは DSS 群に比べて低値で推移し、DSS 群マウスで血便の症状が有意な改善が認められた ($p<0.001$)。

解剖時に測定した大腸の長さは、Control 群 6.7 ± 0.1 cm、DSS 群 5.2 ± 0.4 cm 及び DSS + AMP 群 6.3 ± 0.3 cm であった。DSS 群の大腸の長さは、Control 群及び DSS + AMP 群に比べ有意に短くなったが ($p<0.05$)、Control 群及び DSS + AMP 群間に有意差は認められなかった (図 3)。このように、IBD を起こすことにより短縮する大腸の長さが AMP を投与することによって維持された。これらのことはこれまでの当研究室の先行研究の結果とも一致していた。

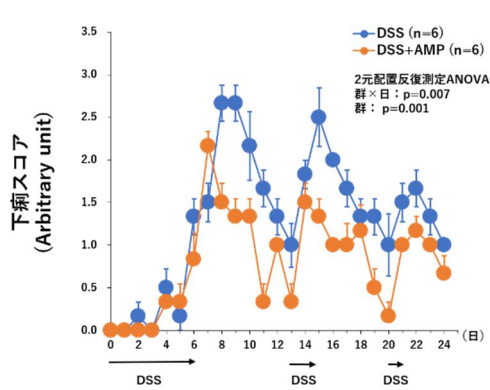


図 1. 下痢スコアの経日変化.

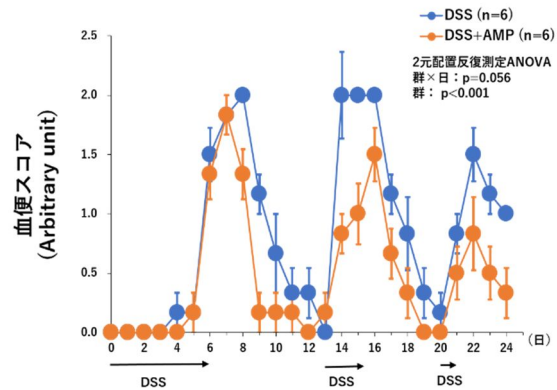


図 2. 血便スコアの経日変化.

(2) フローサイトメトリー

各群マウス 1 匹あたりの大腸粘膜固有層から少ないもので 1.0×10^6 個/ml から多いもので 7.0×10^6 個/ml のリンパ球を取り出すことができた。各ヘルパー T 細胞を蛍光標識して、解析を試みた。Th1 細胞の比率は、Control 群が $6.88 \pm 1.07\%$ (n=5)、DSS 群が $7.65 \pm 0.87\%$ (n=6) 及び DSS + AMP 群が $4.08 \pm 0.65\%$ (n=6) で、DSS+AMP 群の Th1 細胞の比率は 3 群間で最も低値を示した (ANOVA p=0.076)。Th17 細胞の比率は、Control 群が $10.21 \pm 2.95\%$ (n=4)、DSS 群が $9.72 \pm 1.12\%$ (n=5) 及び DSS + AMP 群が $8.32 \pm 1.06\%$ (n=6)、Treg 細胞の比率は、Control 群が $9.35 \pm 1.84\%$ (n=4)、DSS 群が $10.82 \pm 1.78\%$ (n=6) 及び DSS + AMP 群が $8.27 \pm 1.19\%$ (n=6) で、3 群間で有意な差は認められなかった。解析した例数が少なく、データにバラツキも見られたため、本研究ではこのような結果になったが、全体的に AMP には、測定した 3 種のヘルパー T 細胞の発現を抑制するような作用が認められた。



図 3. IBD マウスの大腸の長さ (代表例)

[実験 2]

(1) 下痢・血便スコアの経日変化及び大腸の長さ

実験 1 と同様に AMP の投与は、慢性大腸炎マウスの下痢及び血便の程度を軽減した。また、大腸の長さの計測結果も実験 1 と同様に大腸炎で短くなる大腸の長さが、AMP の投与によって維持された。このように再現性も確認できた。

(2) 抗 CD4 磁気ビーズ抗体により精製したヘルパー T 細胞のフローサイトメトリー

実験 1 と同様の方法で、大腸粘膜固有層から密度勾配法によりリンパ球画分を得た。マウス 1 匹あたり $3.3 \sim 8.5 \times 10^6$ 個/ml のリンパ球を取り出すことができた。そのリンパ球画分から抗 CD4 磁気ビーズ抗体を使用してヘルパー T 細胞を採取して、実験 1 に方法と同様に Th1、Th17 及び Treg 細胞の蛍光標識を行いフローサイトメトリーで解析を試みた。しかしながら、回収した CD4 陽性細胞数にかなりの個体によるバラツキが大きく、うまく解析できなかった。おそらく精製に使用したカラムのサイズに対して注入したリンパ球量が多すぎたのかもしれない。

参考までに各群 1 個体ずつの結果ではあるが細胞数が Th1 細胞のデータを参考例として以下に示す。各群 1 例ずつではあるが、Control 群マウスの Th1 細胞の割合は 13.58% だったのに比べて、DSS 群マウスでは 19.53% に増加したが、DSS + AMP 群マウスは 13.28% で Control 群マウスと同程度という結果となった。各群 1 匹ずつの結果ではあるが、比率は若干異なるものの実験 1 の Th1 細胞の解析結果と類似の傾向を示した。

(3) DAB 法による大腸免疫組織化学染色

各群 3 例のマウス大腸組織を使って Th1、Th17 及び Treg 細胞において、それぞれに特異な細胞タンパク質である T-bet、Podoplanin 及び Foxp3 の免疫組織化学染色を実施した。残念なことに T-bet 及び Podoplanin 染色においては、非特異的な染色が起こったため、正確に観察ができなかった。理由の詳細はわからない。

一方、Foxp3 染色においては、Control 群マウス 3 例にごく軽度の Foxp3 の発現が認められた (図 4 左、矢印は Foxp3 発現を示す)。DSS 群マウスでは、3 例中 1 例に軽度、2 例に中等度の Foxp3 発現が認められた (図 4 中央)。さらに DSS + AMP 群のマウスでは、それぞれ 1 例ずつにごく軽度、軽度、中等度の Foxp3 発現が見られ (図 4 右) DSS 群マウスに比べて Foxp3 発現の減少傾向が認められた。このように AMP 投与によって Treg 細胞の大腸粘膜固有層への浸潤が抑制傾向にあることが示唆された。これらの傾向は、実験 1 のフローサイトメトリーの結果ともよく一致する。

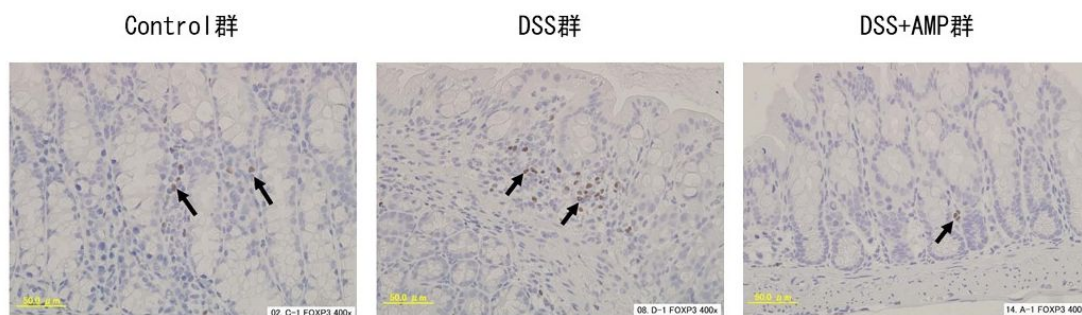


図4. IBDマウスにおける大腸粘膜固有層のFoxp3発現 (代表例)

以上の結果より、1) 核酸系旨味物質である AMP を DSS により誘発した慢性大腸炎マウスに投与したとき、下痢及び血便の症状を有意に改善した。さらに大腸炎で短縮する大腸の長さを維持した。これらの結果は我々の先行研究の結果をよく再現していた。2) それにも関わらず、大腸粘膜固有層に浸潤した IBD 発症に関連する 3 種ヘルパー T 細胞 (Th1、Th17 及び Treg) の比率に明らかな差を検出することができなかった。その理由はよくわからない。しかしながら、本研究結果から明確な結論を導くことはできないが、3) 全体的に AMP には今回調べた 3 種のヘルパー T 細胞の発現を抑制する傾向が見られた。今後は、それらの細胞内において AMPK が活性化されているのか、さらに病巣や炎症部位への免疫細胞の浸潤を調節する因子であるケモカイン発現に AMP の関与があるのかを調べる必要があると思われる。

本研究の目的は AMP による AMPK 活性化を介した抗炎症作用が炎症性及び抗炎症性ヘルパー T 細胞の活性を調節しているのではないかとの仮説のもと、大腸炎発症時に大腸粘膜固有層に浸潤するヘルパー T 細胞の比率を計測し、それら細胞内において AMPK が活性化されているかというメカニズムを調べることであったが、残念ながら本研究によりそこまで到達することができなかった。

<引用文献>

- 1) Bai A, Yong M, Ma A.G, Ma Y, Weiss CR, Guan Q, Bernstein CN, and Peng Z (2010). Novel Anti-Inflammatory Action of 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleoside with Protective Effect in Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute and Chronic Colitis. *Journal of Pharm Exp Ther*, 333(3):717-725; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.109.164954>
- 2) Bai A, Ma AG, Yong M, Weiss CR, Ma Y, Guan G, Bernstein CN, and Peng Z (2010). AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis *Biochem Pharmacol*. 80(11):1708-17. doi: 10.1016/j.bcp.2010.08.009. Epub 2010 Aug 24.
- 3) Ardiansyah, Shirakawa H, Koseki T, Hiwatashi K, Takahasi S, Akiyama Y, and Komai M (2011). Novel Effect of Adenosine 5'-Monophosphate on Ameliorating Hypertension and the Metabolism of Lipids and Glucose in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem*. 2011, 59, 24, 13238-13245. <https://doi.org/10.1021/jf203237c>
- 4) Weigmann B, Tubbe I, Seidel E, Nicolaev A, Becker C and Neurath MF(2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2:2307-2311.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------