

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11120

研究課題名(和文) 高脂肪食摂取と精神的ストレスによる腸管再生機能障害の機序解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation and application to treatment of the mechanism of intestinal regeneration dysfunction caused by high-fat diet intake and psychological stress and its application to treatment

研究代表者

野村 さやか (Nomura, Sayaka)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・薬理学・助教)

研究者番号：20791651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞においてインフラマソームの活性化を抑制するLXRアゴニストは腸管幹細胞でのインフラマソーム活性化や腸管上皮細胞への分化には影響を与えなかった。一方、酸化ストレスはインフラマソーム活性化を促進することが知られている。酸化ストレスを抑える分子状水素の投与は高脂肪飼料を摂取した老化促進マウスの腸管再生機能を改善させることにより、腸管障害を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施前に予測していたLXRアゴニストによるインフラマソーム活性化抑制による腸管再生機能の改善作用は確認できなかった。しかし、インフラマソーム活性化を促進する酸化ストレスを抑制する分子状水素の投与は腸管再生機能を回復させ腸管障害を抑制させることが明らかになった。高脂肪食摂取による腸管再生機能障害とそれに伴う炎症性腸疾患の増悪への酸化ストレスの関与が明らかになり、分子状水素を含めた抗酸化治療の有効性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Treatment with LXR agonists in intestinal stem cells affected neither inflammasome activation nor differentiation into intestinal epithelial cells. It has been revealed that oxidative stress induces inflammasome activation. Treatment with molecular hydrogen, a potent antioxidant, improved intestinal regeneration and suppressed gut injury in high fat diet-loaded senescence-accelerated mice prone 8 (SAMP8 mice).

研究分野：総合領域

キーワード：腸管再生 脳炎症 インフラマソーム IL-6 分子状水素 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患における腸管再生機能の低下

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患において、抗 TNF 抗体等の抗サイトカイン薬は一定の治療効果が得られているが、治療に反応しない症例や長期連用による効果の減弱も報告されている(Macdonald et al., *Inflamm Bowel Dis* 2012)。一方、近年、炎症性腸疾患の病変組織における腸管幹細胞の数や機能の低下が報告されており(Ratanasirintraud & Israsena, *J Neurogastroenterol Motil* 2016)、上記のような難治性病態への腸管再生機能障害の関与が示唆されている。

腸管再生機能障害へのインフラマソームの過剰な活性化の関与

インフラマソームは炎症応答において中心的な役割を果たす細胞内蛋白質複合体であるが、過剰な活性化により IL-1 や IL-18 を介した炎症の遷延化や炎症性細胞死(パイロトーシス)を惹起し組織障害をもたらすことが指摘されている(Beyaz et al. *Nature* 2016)。高脂肪食摂取および精神的ストレスは、腸管幹細胞のインフラマソームを過剰に活性化し腸管上皮細胞への分化を低下させ腸管再生機能障害を惹起している可能性が予想される。しかし、これまで、炎症性腸疾患での腸管幹細胞におけるインフラマソームの活性化は明らかでなく、腸管幹細胞のインフラマソーム活性化や細胞機能に与える高脂肪食摂取および精神的ストレスの影響に関して不明であった。

腸管機能再生障害と脳内炎症の相互作用的關係

高脂肪食摂取や精神的ストレスが炎症性腸疾患の活動性を高める可能性が以前より指摘されており、炎症性腸疾患の腸管再生機能障害にも直接的に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、高脂肪食摂取や精神的ストレスによる腸内細菌叢の乱れは、脳内炎症を惹起することから、ミクログリアにおけるインフラマソーム活性化と腸管機能再生障害は互いに影響を及ぼしている可能性が考えられるが、詳細な機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、インフラマソームの活性化により腸管幹細胞の機能低下がみられる可能性を予想し、高脂肪食摂取および精神的ストレスによる腸管再生機能障害とそれに伴う炎症性腸疾患の増悪機構を解明することを目的とした。また、Liver X receptor (LXR)アゴニスト等のインフラマソーム活性化抑制効果が期待できる新規物質、あるいはインフラマソームを活性化させる酸化ストレスを抑える分子状水素にも着目し、腸管幹細胞あるいは腸管障害モデルへの作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウスの株化ミクログリア(6-3細胞)を 5.0×10^5 cells/mLで播種し24時間培養した。LPSを添加して3時間刺激した後、種々のLXRアゴニストで30分前処理を行ってから、インフラマソーム活性化薬であるATPを添加し45分培養した。培養上清と細胞溶解液を採取し、ELISA法やウェスタンブロット法にてインフラマソーム構成蛋白質やIL-1の発現を解析した。また、LXRアゴニストで30分前処理後NLRP3インフラマソーム活性化薬であるMSUを添加し18時間培養し、上記と同様の解析を行った。

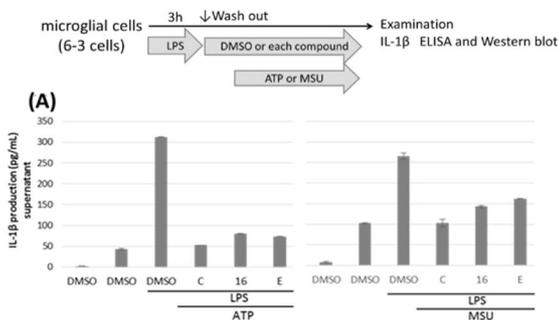
(2) ヒトiPS細胞をフィーダー細胞培養液で約1週間培養した後、ActivinA (20 ng/mL), BMP-4 (10 ng/mL), bFGF (20 ng/mL), LY294002 (10 μ M)を添加して胚様体を形成させた。4日後にさらにWnt3a (10 μ M)を添加して、腸管上皮細胞への分化誘導を行った。Wnt3a刺激時にLXRアゴニストを前添加し、インフラマソーム活性化および腸管上皮細胞への分化に与える影響を検討した。

(3) 8週齢のC57BL/6Jマウスに2.5~3% (wt/vol) デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を給水瓶に入れ、9日間マウスに与えた。DSS投与の2日前から高濃度水素含有ゼリー(対照群には空気入りゼリー)を与え、DSS投与後も継続して摂取させた。最終投与の翌日に、開腹して胃下3~9cmの腸管組織を採取した。同時に下大静脈より血液を採取し、ヘパリン血漿を解析に用いた。オルガノイドの発生率は小腸の再生の指標となることから、採取した腸管をPBSで洗浄した後、腸管オルガノイド作成キット(STEMCELL)を用いてオルガノイドを作成し、5% CO₂存在下で培養を行った。さらに、採取した組織をパラフィン包埋により標本化し、HE染色を行った。

(4) 6週齢の老化促進モデルSAMP8マウスあるいは対照のSAMR1マウスに高脂肪飼料(総カロリー比60%の脂肪含量)あるいは通常飼料(総カロリー比11%の脂肪含量)を与え14週間飼育した。16週齢以降、高濃度水素含有ゼリー(対照群には空気入りゼリー)を4週間与えた。(3)同様、開腹して胃下3~9cmの腸管組織を採取した。パラフィン固定後にHE染色と免疫組織蛍光染色を行った。また、腸管オルガノイド作成キットによるオルガノイド作成を行った。

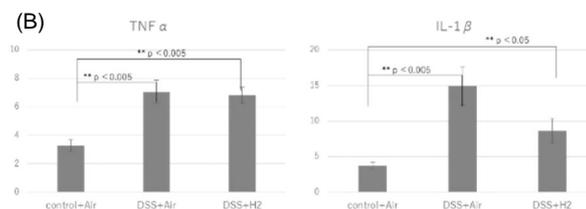
4. 研究成果

(1) LPS で活性化したマウスミクログリアにおいて、ATP、MSU はいずれも IL-1 の細胞外分泌 (図 A)、細胞内における pro-IL-1, NLRP3, ASC の発現量を増加させた。また合成 LXR アゴニスト T0901317(C)、LXR trans-repression 選択的リガンド M2-76(16)、LXR 選択的リガンドである化合物 E (E) は、IL-1 の細胞外分泌、ミクログリアにおける pro-IL-1, NLRP3, ASC の発現量を減少させたことから、インフラマソームの活性化を抑制することが示唆された。

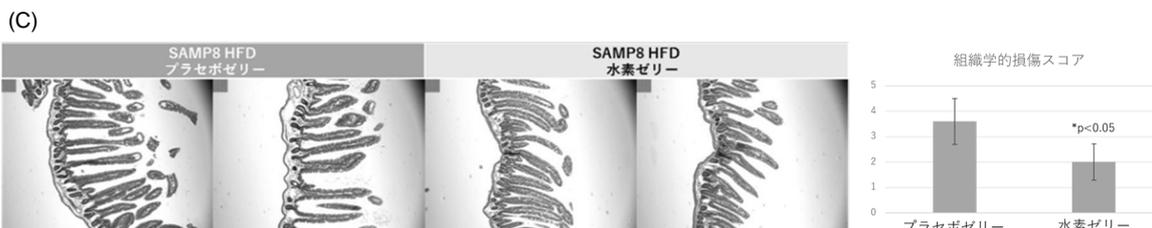


(2) ヒト iPS 細胞由来腸管幹細胞への TNF および LPS 刺激時に LXR アゴニストを前添加し、インフラマソーム活性化および腸管上皮細胞への分化に与える影響を検討した。TNF および LPS の刺激はヒト腸管幹細胞でのインフラマソーム活性化の指標である cleaved caspase-1, IL-1, IL-18 の発現を増加させた。一方、合成 LXR アゴニスト T0901317(C)、LXR trans-repression 選択的リガンド M2-76(16)、LXR 選択的リガンドである化合物 E (E) の前添加は TNF および LPS の刺激によるインフラマソーム活性化促進に有意な影響を与えなかった。また、CDX2 発現量を変化させなかったことから、胚様体からの腸管上皮細胞分化にも影響を及ぼさなかった。これより、LXR アゴニストは腸管幹細胞でのインフラマソーム活性化や腸管上皮細胞への分化に有意な影響を与えないことが示唆された。

(3) 酸化ストレスはインフラマソーム活性化を促進させることが知られている (Abass et al., Antioxid Redox Signal 2015)。また、酸化ストレスは腸管再生を抑制し腸管障害を増悪させることが報告されている (Li et al., Free Radic Res 2019)。そこで、DSS 腸炎に対して、抗酸化作用が期待できる分子状水素投与の効果を検討した。DSS 腸炎マウスでの小腸の長さを比較した結果、DSS 投与群では非投与群に比し有意に腸管の短縮がみられたが、高濃度水素含有ゼリー群での改善はみられなかった。絨毛陰窩比、クリプト数を HE 染色の組織解析により比較したが、それぞれの群で有意な差はみられなかった。また、血漿中の TNF、IL-1 は DSS 投与群で有意に増加したが、高濃度水素ゼリー投与は DSS 投与による IL-1 増加を減少させた (図 B)。さらに、採取した腸管からオルガノイドを作成した結果、DSS 投与群でオルガノイドの発生率が増加したが、高濃度水素ゼリー投与は有意な影響を与えなかった。



(4) 高脂肪食の摂取は腸管の酸化ストレスを増加させることが報告されている (Li et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2019)。そこで、次に、老化促進モデル SAMP8 マウスに高脂肪食を摂取させ、分子状水素投与の効果を検討した。SAMP8 マウスの小腸陰窩の CDX2 (小腸上皮細胞マーカー) 発現は SAMR1 マウスに比し有意に低下していた。また、高脂肪飼料の摂取は SAMR1 マウスおよび SAMP8 マウスの BrdU (細胞増殖マーカー) の発現を低下させた。高脂肪飼料を摂取した SAMP8 マウスは通常飼料を摂取した SAMR1 マウスに比し、小腸の組織学的損傷スコアが有意に増加していた。一方、高濃度水素ゼリーの投与は高脂肪飼料の摂取により減少した SAMP8 マウス小腸陰窩の CDX2 発現、BrdU 発現、組織学的損傷スコアをいずれも有意に回復させた (図 C)。高濃度水素ゼリーの投与は高脂肪飼料を摂取させた SAMP8 マウスのオルガノイド発生率を有意に上昇させた。分子状水素の投与は高脂肪飼料の摂取により低下した SAMP8 マウスの腸管再生機能を改善させることにより、腸管障害を抑制している可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Toshiaki Ishizuka, Nagata Wataru, Nomura Sayaka, Yasushi Satoh	4. 巻 888
2. 論文標題 Effects of oxidized low-density lipoprotein on differentiation of mouse neural progenitor cells into neural cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 173456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 石塚 俊晶	4. 巻 155
2. 論文標題 生化学、薬理学、麻酔科学との水平・垂直統合のリレー講義の経験と課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 329～331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Satoh Y, Araki Y, Kashitani M, Nishii K, Kobayashi Y, Fujita M, Suzuki S, Morimoto Y, Tokuno S, Tsumatori G, Yamamoto T, Saitoh D, Ishizuka T.	4. 巻 77
2. 論文標題 Molecular hydrogen prevents social deficits and depression-like behaviours induced by low-intensity blast in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 827-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nly060	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 Maruta K, Watanabe C, Hozumi H, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Okada Y, Shirakabe K, Higashiyama M, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Ishizuka T, Miura S, Hokari R.	4. 巻 104
2. 論文標題 Nicotine treatment ameliorates DSS-induced colitis by suppressing MAdCAM-1 expression and leukocyte recruitment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Leukoc Biol	6. 最初と最後の頁 1013-1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JLB.3A0717-304R	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 Ishizuka T, Ozawa A, Katsuura M, Nomura S, Satoh Y.	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of muscarinic acetylcholine receptor stimulation on the differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Pharmacol Physiol	6. 最初と最後の頁 1198-1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1681.12993	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 Hirose W, Harigai M, Uchiyama T, Itoh K, Ishizuka T, Matsumoto M, Nanki T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Low body mass index and lymphocytopenia associate with Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients with rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1452334	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 石塚 俊晶
2. 発表標題 高脂肪食およびLPS投与が脳内炎症、神経新生および認知機能の及ぼす影響
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村 さやか
2. 発表標題 Transrepression作用選択的なLiver X受容体リガンドの創製とインフラマソーム活性化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石塚 俊晶
2. 発表標題 Transrepression作用選択的LXRリガンドはミクログリアや神経前駆細胞のインフラマソーム活性化を抑制する
3. 学会等名 第38回ヒト細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishizuka Toshiaki, Ozawa Ayako, Nomura Sayaka, Yasushi Satoh
2. 発表標題 Effects of inflammasomes on differentiation of neural progenitor cells into neural cells.
3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishizuka Toshiaki, Ozawa Ayako, Nomura Sayaka, Yasushi Satoh
2. 発表標題 Activation of inflammasomes in neural progenitor cells inhibits differentiation into neural cells.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nomura S, Umeda K, Makishima M, Hashimoto Y, Ishizuka T, Ishikawa M.
2. 発表標題 Development of transrepression-selective liver X receptor ligands.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村さやか、梅田香織、榎島誠、橋本祐一、石塚俊晶、石川稔
2. 発表標題 Transrepression作用選択的なLiver X受容体リガンドの創製と腸管新生作用の検討
3. 学会等名 第36回ヒト細胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishizuka T, Ozawa A, Nomura S, Satoh Y.
2. 発表標題 Effects of inflammasome activation on proliferation and differentiation of neural progenitor cells
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoh Y, Morohashi T, Hayashi Y, Itakura S, Kawaguchi M, Nakanishi H, Ishizuka T.
2. 発表標題 The role of BK channels in spinal microglia for the induction of neuropathic pain in mice.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ishizuka T (edited by Shinomiya N, Kataoka H, Xie Q)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 29-41
3. 書名 Regulation of signal transduction in human cell research. (Chapter 2: Role of the receptor-mediated signaling pathways on the proliferation and differentiation of pluripotent stem cells.)	

〔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
研究分担者	佐藤 泰司 (Sato Yasushi) (10505267)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生化学・教授 (82406)	
研究分担者	石塚 俊晶 (Ishizuka Toshiaki) (30399117)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・薬理学・教授 (82406)	

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