

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11148

研究課題名(和文)柿タンニンによる炎症性腸疾患の病態改善機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathological improvement mechanism of inflammatory bowel disease with persimmon tannin

研究代表者

松村 羊子 (Yoko, Matsumura)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：80412154

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)：炎症性腸疾患は寛解と再燃を繰り返す慢性炎症性疾患であり、患者数が増加している。根治的な治療はなく、主に炎症を緩和する対症療法である。

本研究では、炎症抑制効果を有する柿タンニンを炎症性腸疾患マウスに摂取させたところ、大腸炎の病態が改善した。さらに炎症反応の抑制と糞便中の細菌叢の変化がみられ、タンニン摂取によりBacteroides属が増加し、Enterobacteriaceae科などの潜在的病原性細菌の増殖が抑制され大腸炎の改善につながることを示唆された。その効果の発現については高分子の柿タンニンが消化管内で低分子化し、生体内に吸収され効果を発揮した可能性がHPLC分析により示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎を主とする炎症性腸疾患は、消化管に慢性炎症を引き起こす疾患である。特定の原因は解明されておらず、消化管の免疫バランスが崩れることによって発症すると考えられており、腸内細菌叢との関係が注目されている。

本研究では、柿タンニン含有飼料をDSS誘導性大腸炎マウスに投与したところ、大腸炎の病態が改善し、大腸の組織学的治癒の傾向も観察された。また、大腸炎による腸内細菌叢の構成異常が改善していた。これらの結果より、難治性の炎症性腸疾患の予防や治療ならびに寛解維持に、天然の植物から抽出された安全性の高い食品由来の成分が寄与することを示しており、学術的にも社会的にも意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disease that repeats remission and relapse, and the number of patients has been increasing in recent years. There is no curative treatment, and the treatment for patients is aimed at relieving symptoms of inflammation. In this study, we focused on persimmon tannin, which has the effect of inflammatory suppression. We examined the effect of persimmon tannin on the DSS-induced colitis mice, and dietary supplementation of persimmon tannin ameliorates colitis. Furthermore, suppression of the inflammatory response and changes in the composition of the fecal microbial flora were observed. These suggest that increased Bacteroides by dietary supplementation of tannin suppresses with the expansion of Enterobacteriaceae, which ameliorate colitis. It was also suggested that macromolecule such as condensed tannin has degraded in the digestive tract and might be absorbed and be exerted its effect in vivo on the basis of HPLC analysis.

研究分野：栄養機能科学

キーワード：炎症性腸疾患 柿タンニン 潰瘍性大腸炎 腸内細菌叢 DSS誘導性大腸炎

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1)柿は渋み成分のタンニンを含む、タンニンには抗菌作用、脂質低下作用、粘膜保護作用、抗酸化作用など多種多様な機能を持つことが報告されている。一方、柿タンニンは縮合型タンニンで複雑な構造をもち溶解性が悪く、タンパク質に吸着する性質をもち、消化吸収されないとわれてきた。しかし我々は、タンニンがラットの消化管内において低分子化し、血中の抗酸化活性を上昇させることを見出した。さらに柿由来タンニン含有飼料の摂食により、慢性肺感染症である非結核性抗酸菌症モデルマウスの肺の炎症を抑制し、病態の改善が認められることを明らかにした。
- (2)一方、炎症性腸疾患は主に潰瘍性大腸炎とクローン病に大別され、発症原因不明の免疫異常によるいわゆる「難病」である。治療には、ステロイド剤、5-アミノサリチル酸製剤や抗TNF- $\alpha$ 抗体などが用いられ、炎症のコントロールによって寛解をめざす対症療法が主となっている。また再燃例も少なくなく、新規治療法、寛解の維持方法の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

先行研究では柿タンニンには多くの生理活性があると報告され、人々は様々な用途に利用してきた。我々は、さらに慢性の肺感染症の病態改善に柿由来タンニンが効果を発揮し、炎症抑制や抗菌性に効果がある結果を得ていたことから、慢性の炎症性腸疾患にも効果を発揮するのではという着想にいたった。天然の植物由来の柿タンニンが慢性の炎症性疾患に有効であると予想し、予防や治療に大きく寄与するものと考え、炎症性腸疾患に対する柿由来タンニンの有効性を明らかにすることを目的とした。また、生体内でタンニンが機能を発揮するためには、加水分解し低分子化されることが必要であり、低分子化タンニンの構造変化を評価することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)動物実験

7週令のBALB/cマウスをまず2群に分け、一方にはコントロール食、もう一方には2%柿タンニン含有飼料を4週間事前投与した。柿タンニンは、特許にもとづく手法によって高濃度に精製されたタンニン粉末を石井物産株式会社(奈良県)より供与された。4週間の事前投与期間後、それぞれの飼料グループのマウスをさらに2群に分け、一方には3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)水溶液を5日間与え潰瘍性大腸炎を惹起させたのち、飲料水は水道水に戻した(図1-a)。DSS投与開始時を0日とし、7日間糞を採取し、7日後解剖し、大腸を採取した。0日から7日目まで、毎日体重や疾患活動性指数(DAI)で評価した。糞便の16S rRNA解析によって腸内細菌叢解析を行った。

#### (2)マウスより採取した大腸の解析

大腸はHE染色を行い、組織学的評価を行った。さらに、RNAを抽出し、TaqManプローブ法で定量的リアルタイムPCRをおこなった。

#### (3)マクロファージの分化と刺激に対する柿タンニンの影響

マウスの骨髄細胞からマクロファージを分化させ、タンニン加水分解物で2時間前処理後、TLR-9リガンドのCpGで4時間刺激した。刺激したマクロファージからmRNAを抽出し、定量的リアルタイムPCRで解析した。

#### (4)タンニンの低分子化の評価

タンニンの低分子化を評価するために、酸加水分解後HPLCによる解析を行ったが、再現性が低く、安定した結果を得られずにいる。よって未だ有効ピークを捉えきれておらず、現在も継続して解析を行っている。

### 4. 研究成果

#### (1)DSS誘導性大腸炎モデルマウスの柿タンニン摂取による病態の改善

図1にDSS誘導性大腸炎モデルマウスの柿タンニン含有飼料の摂食による病態の改善を示す。大腸炎による体重減少、DAI、結腸全長の短縮、近位結腸の炎症はすべて柿タンニン含有飼料の摂食によって改善をみせた。

#### (2)大腸の遺伝子発現に対する柿タンニンの影響

DSS誘導性大腸炎モデルマウスの大腸における炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、およびTNF- $\alpha$ )とケモカイン(CXCL1、CCL2)、炎症により誘導されるiNOS遺伝子(Nos2)の発現は、タンニン食群で大幅に減少した(図2)。また結腸の内外粘膜層の主成分である粘液MUC2の分泌がタンニン食群で有意に増加し、大腸組織を保護していた。

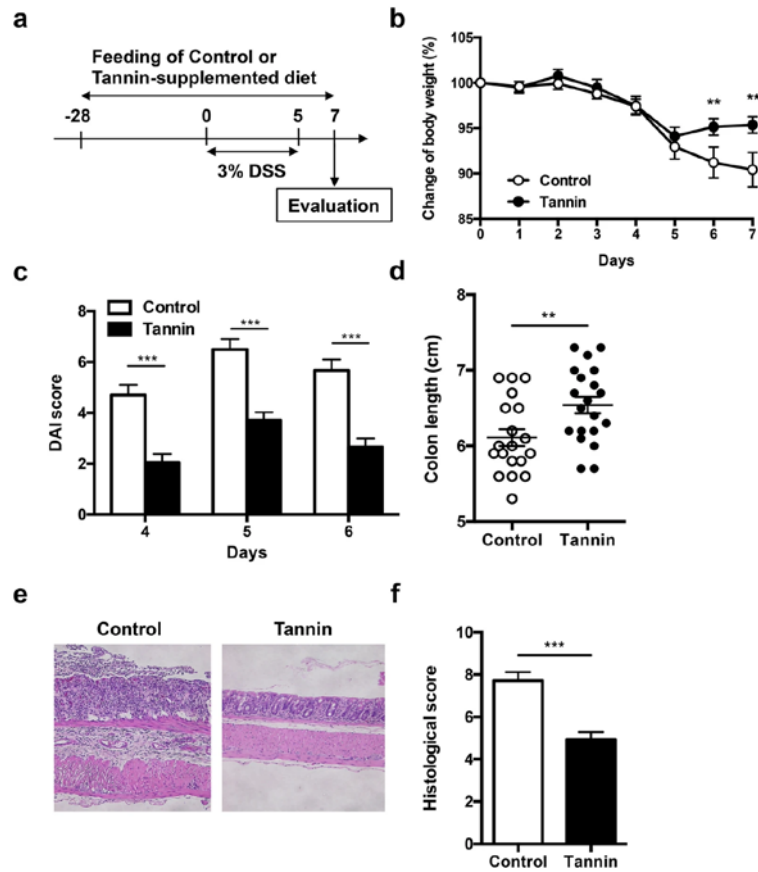


図 1. 柿タンニンの摂食による DSS 誘導性大腸炎の病態改善

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

(a)動物実験の実験デザイン

(b,c)DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの体重変化(b)と DAI(c)

(d) DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの 7 日目における結腸全長

(e)近位結腸の HE 染色

(f)炎症部分の厚さ、上皮損傷、病変範囲から算出した炎症の組織学的スコア

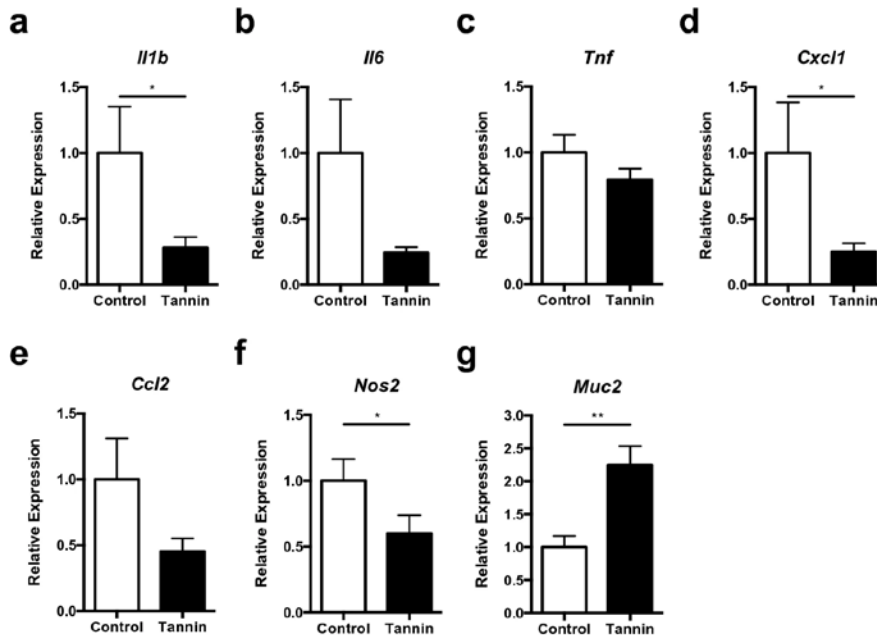


図 2. DSS 誘導性大腸炎マウスの結腸における遺伝子発現に対する柿タンニンの摂食による影響

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの結腸の遺伝子発現を定量的 PCR によって測定し、対照食群に対するタンニン食群の相対的発現量を示した (GAPDH で標準化)。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

(a) IL-1 $\beta$ , (b) IL-6, (c) TNF- $\alpha$ , (d) CXCL1, (e) CCL2, (f) iNOS, (g) MUC2

(3)マクロファージの炎症性遺伝子発現の誘導に対する柿タンニン酸加水分解物の影響

柿由来タンニンが、CpG 刺激で惹起した炎症状態の抗炎症効果があるかどうかを調べたところ、CpG 刺激によって誘導された炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、および TNF- $\alpha$ ) および iNOS の遺伝子発現は、タンニン加水分解物処理によって濃度依存的に顕著に抑制され、過度の先天性炎症反応の調節を促進していると考えられた (図 3)。

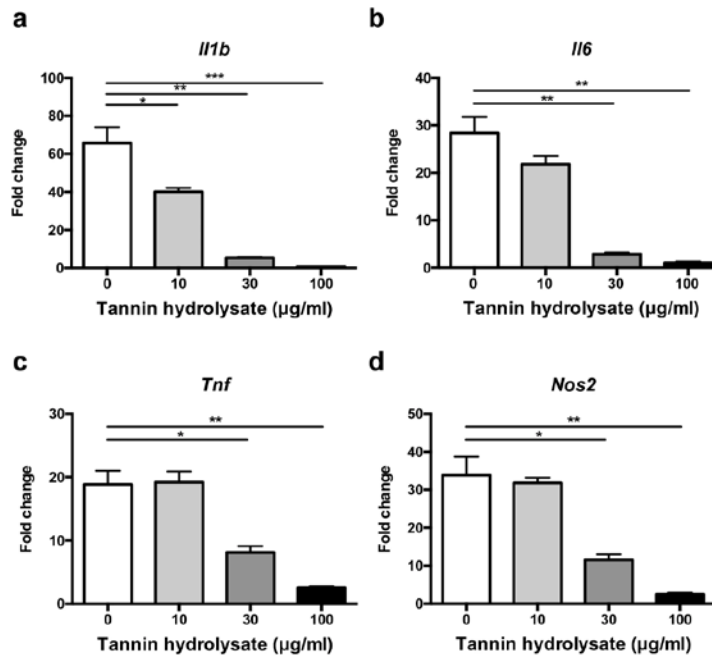


図 3. 柿タンニン酸加水分解物による *in vitro* での CpG 刺激マクロファージの炎症性遺伝子発現の誘導抑制

マウスの骨髄細胞から分化させたマクロファージに柿タンニン酸加水分解物を 0-100 $\mu$ g/mL と濃度を変えて 2 時間前処理し、TLR-9 リガンドの CpG で 4 時間刺激し、炎症性の遺伝子発現を定量的 PCR で測定した。(a) IL-1 $\beta$ , (b) IL-6, (c) TNF- $\alpha$ , (d) iNOS

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  はタンニン酸加水分解物非処理との比較

(4)糞便中の細菌叢構成と多様性に対する柿タンニン摂取による影響

腸内の細菌叢の構成を反映する糞便中の細菌叢構成とその多様性を評価した (図 4)。腸内細菌叢を主座標分析したところ (図 4-a,b) いずれもタンニン食群において、細菌叢の構成が大きく異なっており、柿タンニンの摂取が細菌叢の構成を変化させ、DSS 処理マウスによる細菌叢の変化が柿タンニンの摂取に影響を受けていることが示唆された。他の多様性指標に関しても、対照食群は DSS 処理によって細菌叢の多様性は大幅に低下したが、タンニン食群においては、DSS 非処理マウスに迫るほど大きく多様性が高くなっていた (図 4-c-f)。

(5)糞便中の細菌叢構成に柿タンニン摂取が及ぼす影響

腸内の細菌叢の構成を門レベルで分類し相対存在量をグラフ化した (図 5)。各群の棒グラフの本数は、マウスの匹数に相当する。対照食群では、DSS 処理を行うことによって、大幅に *Bacteroidetes* 門が減少し *Proteobacteria* 門が増加しているが、タンニン食群ではその変化が抑制されていた。また、DSS 非処理群において、タンニン食群は対照食群よりも *Bacteroidetes* 門の存在量が顕著に高かった。さらに DSS 処理による *Proteobacteria* 門の増加を柿タンニン摂取が顕著に抑制していた。すなわち柿タンニン摂取によって潜在的病原性細菌の増殖を抑制または競合しており、そのことが大腸炎を改善することを示唆している。

また、図示はしていないが、DSS 非処理群においては、柿タンニン摂取によってビフィズス菌の増加は観察されなかったが、DSS 処理によるビフィズス菌の大幅な減少をタンニン摂取によって存在量が増加していた。ビフィズス菌は、ヒトの腸内細菌叢の主要な構成要素の 1 つであり、アレルギー性疾患や炎症性腸疾患のプロバイオティクス候補として特徴付けられているので、柿タンニンの有効性のポテンシャルは高いと考えられる。

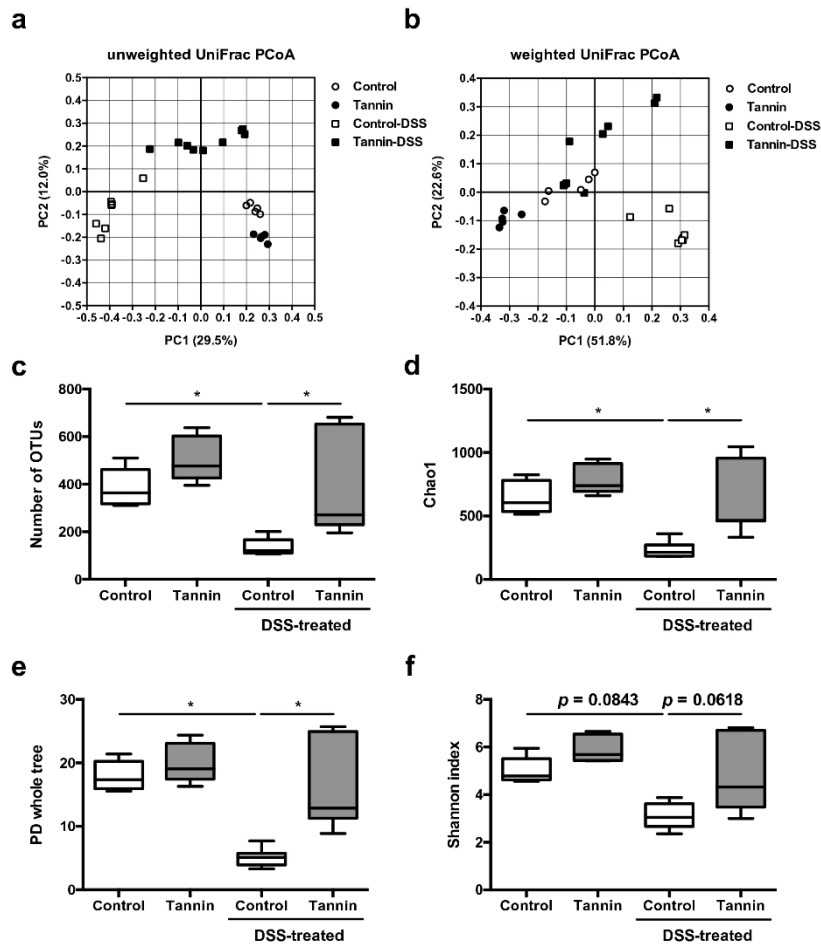


図 4. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの糞便中の細菌叢の構成と多様性に対する柿タンニン摂食による影響

対照食群および柿タンニン食群それぞれ DSS 非処理マウスおよび DSS 処理マウスの糞便から得られた 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析による細菌叢構成

(a,b) 定性的(a)および定量的(b) UniFrac 距離の主座標分析

(c-f)  $\alpha$ -多様性指標の比較 (c) OTU 数 (d) Chao1 (e) PD whole tree (f) Shannon index

\*  $p < 0.05$

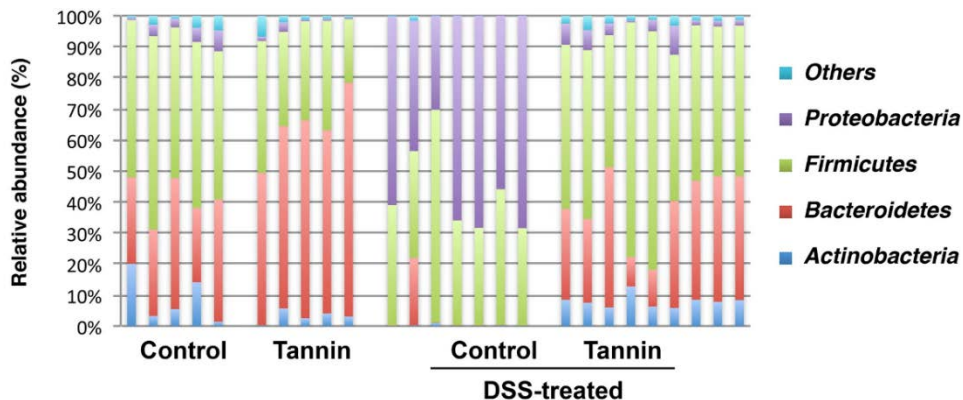


図 5. マウス 糞便中の門レベルの細菌叢構成に対する柿タンニン摂食の影響

対照食群および柿タンニン食群それぞれ DSS 非処理マウスおよび DSS 処理マウスの糞便から得られた 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析による細菌叢構成から門レベルの相対存在量をグラフ化した。

本研究では、柿由来タンニンの摂取が、炎症反応の抑制と糞便中の細菌叢の変化、特に腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) の *Proteobacteria* 門の増殖の抑制により、DSS 誘発性大腸炎の病態を改善することを明確に示した。柿由来タンニンは、天然の植物から抽出された安全性の高い製品であり、炎症性腸疾患の治療法の貴重な候補となる可能性がある。しかしながら、タンニンの有効成分の同定にはいたっていないため、さらなる研究の継続が必要である。

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 1件）

1. 著者名 Kitabatake Masahiro, Matsumura Yoko, Ouji-Sageshima Noriko, Nishioka Tatsuki, Hara Atsushi, Kayano Shin-ichi, Ito Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Persimmon-derived tannin ameliorates the pathogenesis of ulcerative colitis in a murine model through inhibition of the inflammatory response and alteration of microbiota	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86608-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiro Kitabatake, Yoko Matsumura, Noriko Ouji-Sageshima, and Toshihiro Ito
2. 発表標題 Persimmon-derived tannin attenuates the murine model of ulcerative colitis through the alteration of gut environment
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	栢野 新市  (Kayano Shin-ichi)  (40412150)	畿央大学・健康科学部・教授    (34605)	
研究分担者	伊藤 利洋  (Ito Toshihiro)  (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	
研究分担者	北畠 正大  (Kitabatake Masahiro)  (60457588)	奈良県立医科大学・医学部・講師    (24601)	

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
連携研究者	矢野 寿一  (Yano Hisakazu)  (20374944)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	
連携研究者	菊崎 泰枝  (Kikuzaki Hiroe)  (60291598)	奈良女子大学・生活環境学部・教授    (14602)	

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