

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21204

研究課題名（和文）糖尿病サイトカインストームモデルの構築および病態重症化を抑制しうる食品因子の探索

研究課題名（英文）Establishment of a diabetes cytokine storm model and search for food factors that may inhibit the severity of the disease

研究代表者

石山 詩織 (ISHIYAMA, Shiori)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30964811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：胚環境・栄養環境操作による糖尿病自然発症MEMマウスへ炎症惹起物質LPSを低濃度で投与すると、投与後48時間以内の死亡率が約30%上昇すること、血中IL1BやMCP1などの炎症性サイトカイン発現の遺伝子発現増大が確認され、サイトカインストーム動物モデルであることを確認した。EPAを前投与された後に低濃度LPSを投与されたMEMマウスでは、LPS投与後48時間の死亡率は0であり、下痢などの症状は48時間後で回復していることが観察された。さらに、炎症性サイトカインの遺伝子発現が、末梢血や肝臓においてs100a10、肝臓では、I1b, I118がEPA非投与群と比較して減弱したことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胚環境・栄養環境操作による糖尿病自然発症モデルMEMマウスへ炎症惹起物質LPSを低濃度で投与することで、サイトカインストームを発症する動物モデルになることを確認した。さらに、このモデル動物に予め魚油であるエイコサペンタエン酸（EPA）を投与した後にLPSを投与すると、血中だけでなく肝臓においても炎症性サイトカイン発現が低減することが明らかになったことから、魚油EPAの感染刺激前の予防的な摂取は、血中および肝臓におけるサイトカインストームを抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：When the inflammation-inducing substance LPS was administered at low concentrations to spontaneously diabetic MEM mice by manipulating the embryonic and nutritional environments, the mortality rate increased by approximately 30% within 48 hours after administration, and increased gene expression of inflammatory cytokines such as IL1B and MCP1 in the blood was confirmed, indicating that the mice are a cytokine storm animal model. In MEM mice that received EPA pre-administration followed by low-concentration LPS, it was observed that the mortality rate was zero at 48 hours after LPS administration, and symptoms such as diarrhea were recovered after 48 hours. Furthermore, gene expression of inflammatory cytokines, s100a10 in peripheral blood and liver, and I1b and I118 in the liver, were reduced compared to the non-EPA-treated group.

研究分野：栄養学

キーワード：MEMマウス DOHaD サイトカインストーム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血糖による慢性代謝疾患は、下記のように推進されると考えられている。

高血糖は、血中の好中球や単球などの自然免疫系の白血球を活性化し、IL-1B や TNF-A などの炎症性サイトカインを分泌し、単球を動員する(Hotamisligil GS. Nature. 2006)。

動員された活性化単球は血管内皮内へ移行し、マクロファージへと分化する。

分化したマクロファージは各臓器(肝臓・腎臓)へ浸潤し、糖尿病に付随する炎症性合併症(脂肪肝、腎系球体硬化症等)を促進する。

これまで、先行研究によって、以下が報告されている。

1. 生活習慣病など基礎疾患患者は、COVID-19 に罹患した際にサイトカインストームを引き起こし合併症が悪化しやすく、COVID-19 の重症化において、糖尿病病態が見られる臓器(肝臓：脂肪肝、腎臓：腎症)が障害を受ける (Wu Z. JAMA. 2020)。

2. 日本人は COVID-19 による死亡率が欧米人と比較して低い(国立国際医療研究センター)。これらは、日本人の生活習慣が COVID-19 の重症化を抑制している可能性を示唆している。

以上の背景より、次の学術的「問い」が生まれた。

1. 感染性急性炎症は、サイトカインストームを介して糖尿病に付随する炎症性合併症を悪化させるか？

2. 日本人の感染症が重篤化しにくい要因に、日本食があるか？

2. 研究の目的

1. 感染性急性炎症による糖尿病および炎症性合併症重症化機構の解明

2. 日本食食品因子(大麦、エイコサペンタエン酸(EPA; ω -3系不飽和脂肪酸)による感染性の炎症性合併症の抑制効果

3. 研究の方法

すでに、2ヶ月間高脂肪食を投与した ICR マウスに 5, 10 mg/kg BW の LPS を投与すると、投与後 48 時間における死亡率および外観的炎症増大(下痢、眼球周囲の炎症)が、通常食群と比較して顕著に高い知見を得ているため、5 mg/kg BW 以下の濃度で以下の実験を行った。

1. MEM マウスにおける LPS 濃度検討：

2 細胞期胚を α MEM 培地にて曝露し出生したマウス(MEM マウス)に LPS(2.5 mg/kg BW, 5 mg/kg BW 等)を投与し、過剰な炎症反応によるサイトカインストームを発症するかの点に着目し LPS 濃度を検討した。

2-1. MEM マウスにおけるサイトカインストームの食品因子(大麦)による抑制：

MEM マウスおよび対照群として 2 細胞期胚を通常培地(KSOM)に暴露した ICR マウス(以下対照マウス)に高脂肪・高シヨ糖食を 1-2 ヶ月程投与した後に、MEM マウスおよび対照マウスを各 2 群に分け、片方に対照食(高脂肪・高米粉食)、もう片方に大麦食(高脂肪・高大麦粉食)を与える。試験食投与開始から 1-2 ヶ月後に、感染時に炎症を誘導する LPS1(リポ多糖; 1.25 mg/g BW)を投与し、感染-糖尿病性サイトカインストームモデルを作成し、投与後 48 時間の感染症と臓器障害および大麦投与による抑制効果を検討する。

2-2. MEM マウスにおけるサイトカインストームの食品因子(EPA)による抑制：

MEM マウスに青魚の脂肪酸 EPA(エイコサペンタエン酸)を 1 週間経口投与した。EPA 群には 5%アラビアゴム溶液に 1000 mg/kg BW の EPA を加えた溶液、対照群には 5%アラビアゴム溶液を毎日経口投与した。その後、実験 1 で検討した濃度にて LPS を腹腔内投与し、投与後 6、24、48 時間にて尾静脈および断頭採血をする。LPS 投与前の EPA 投与は、サイトカインストームを抑制するか、また、サイトカインストーム抑制に伴った肝臓などの臓器障害を抑制するかを調べた。

4. 研究成果

本研究では、1) 感染による急性炎症は、サイトカインストームを介して炎症性合併症を悪化させるか、2) 日本食食品因子(大麦、EPA)は、糖尿病-感染性サイトカインストームによる炎症性合併症の悪化を抑制するかについて、胚環境操作モデル MEM マウスを用いて研究を行った。

1) では、MEM マウスへの LPS 投与後 48 時間以内の死亡率は、LPS 非投与群と比較して約

30% (vs. 0%)であることが確認され、眼病変においては通常培地 KSOM 培地由来の対照群と比較して、約 55%の病変(vs. 36%)が観察された。また、胚環境・栄養環境操作による糖尿病自然発症モデル MEM マウスへ炎症惹起物質 LPS を低濃度で投与することで、血中 IL1B や MCP1 などの炎症性サイトカイン発現の遺伝子発現増大が確認され、サイトカインストームを発症する動物モデルになることを確認した。

2) では、1)で決定した低濃度 LPS を用いて行った。

2-1) LPS 投与後 21 時間において、MEM マウスでは、眼球異常が 20%、下痢が 30%観察された。また、LPS 投与後 48 時間で、KSOM マウス、MEM マウス、ともに米粉食群（対照）において死亡が観察された。今回のマウスでは、対照 KSOM マウスと MEM マウスとの間で血糖値の差が大きくなかったため、病変率や死亡率に差が観察されなかったことが考えられる。LPS 投与後 6 時間の MEM マウスの末梢血では、炎症性サイトカイン *Tnfa* やマクロファージ *Cd68* の遺伝子発現量が、米粉食群（対照）より大麦食群において低い傾向であった。LPS 投与後 6 時間という急激な炎症反応においても、感染する前段階において大麦を摂取している状態であると炎症反応としての炎症性サイトカインの発現の増大を抑制することができることが示唆された。LPS 投与後 48 時間の MEM マウスの肝臓では、ROS 産生酵素 *Nox2* 遺伝子発現や炎症性サイトカインである *Cox1*、線維化メディエーターである *Tgfb1* の遺伝子発現量は米粉食群（対照）より大麦食群で低下傾向を示した。これは、肝臓といった臓器にまで広がった感染後の炎症反応においても、感染前に大麦を摂取していることで炎症性サイトカインの発現が抑制される可能性があることが示唆されたことを示す。また、炎症性サイトカインの *Cox1* や ROS 産生酵素 *Nox2* の遺伝子発現においては、KSOM マウスでも同様に、対照の米粉食群よりも大麦食群において発現量の低下傾向が観察された。このことから、糖尿病を発症している状態だけでなく、健常な状態においても感染前の大麦食摂取は感染後の臓器における炎症性サイトカインの発現を抑制する可能性が示唆された。

2-2) EPA を前投与された後に低濃度 LPS を投与された MEM マウスにおける、LPS 投与後 48 時間以内の死亡率は 0 であり、LPS 投与後 6 時間、24 時間では病変が EPA 非投与 MEM マウスと同等レベルで見られたが、48 時間では病変率が低下し、病態が回復していることが示された。この EPA 投与 MEM マウスでは、LPS 投与後 48 時間において、末梢血の炎症性サイトカインである *s100a10* 遺伝子発現が EPA 非投与群と比較して低減することが観察された。肝臓においては、炎症性サイトカイン *Il1b*, *Il18*, *s100a10* 遺伝子発現が EPA 非投与群と比較して減弱し、*Caspase*, *s100a4*, *s100a8* 遺伝子発現は減弱傾向を示した。加えて、EPA 非投与群と比較して、ROS 産生関連遺伝子 *Nox4*, *p22phox* 発現が抑制、ROS 除去関連遺伝子 *Mpo*, *Cat* 発現が増大したことが明らかになった。

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 1件）

1. 著者名 Shiori Ishiyama, Mayu Kimura, Takao Nakagawa, Satoshi Kishigami and Kazuki Mochizuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Induction of the lipid droplet formation genes in steatohepatitis mice by embryo/postnatal nutrient environment is associated with histone acetylation around the genes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishiyama Shiori, Hayatsu Manabu, Toriumi Taku, Tsuda Hiromasa, Watanabe Keisuke, Kasai Hirotake, Kishigami Satoshi, Mochizuki Kazuki, Mikami Yoshikazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Assessing the combined impact of fatty liver-induced TGF- 1 and LPS-activated macrophages in fibrosis through a novel 3D serial section methodology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-60845-6	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 Ishiyama Shiori, Mochizuki Kazuki, Shinohara Ryoji, Miyake Kunio, Kushima Megumi, Kojima Reiji, Horiuchi Sayaka, Otawa Sanae, Yui Hideki, Ooka Tadao, Akiyama Yuka, Yokomichi Hiroshi, Yamagata Zentaro, The Japan Environment and Children's Study Group	4. 巻 14
2. 論文標題 Association of maternal leukocyte, monocyte, and neutrophil counts with hypertensive disorders of pregnancy: the Japan Environment and Children's Study (JECS)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-55623-3	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石山詩織
2. 発表標題 糖尿病-感染性サイトカインストーム動物モデルの作製
3. 学会等名 大学見本市2023～イノベーション・ジャパン
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石山詩織、岸上哲士、合田敏尚、伊東宏晃、望月和樹
2. 発表標題 エビジェネテックスを介した糖シグナル伝達機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石山詩織、中川隆生、岸上哲士、望月和樹
2. 発表標題 胚環境操作モデル脂肪肝炎MEMマウスにおける脂肪滴蓄積遺伝子Cidea、CidecおよびPlin4発現増大機構
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 27.石山詩織、中川隆生、内村幸平、岸上哲士、望月和樹
2. 発表標題 胚発生初期 2 細胞期胚への MEM培地の曝露および出生後の高脂肪食投与は産仔の脂肪肝および糖尿病性腎症を誘導する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石山詩織、葛西宏威、岸上哲士、望月和樹
2. 発表標題 高脂肪食投与マウスへのLPS投与による肝臓における線維化促進と炎症との関連
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 糖尿病合併症発症方法及び評価方法-国内優先出願（追記）	発明者 石山詩織、岸上哲士、望月和樹、葛西宏威	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-034550	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 糖尿病合併症発症方法及び評価方法-国内優先出願（追記）	発明者 石山詩織、岸上哲士、望月和樹、葛西宏威	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-034550	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 糖尿病合併症発症方法及び評価方法	発明者 石山詩織、岸上哲士、望月和樹、葛西宏威	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-201471	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------