

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：37502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26560074

研究課題名(和文) 核酸系旨味物質によるAMPK活性化は炎症性腸疾患の病状を緩和するか

研究課題名(英文) Does activation of AMPK by an umami nucleotide ameliorate symptoms of chronic colitis induced by DSS in mice?

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は核酸系旨味物質であるアデノシン-5'-リン酸(AMP)の投与がデキストラン硫酸ナトリウム誘導慢性大腸炎マウスにおいて病状が緩和されるかを調べた。

AMPの投与は下痢及び血便などIBDマウスの臨床症状を軽減し、大腸組織の潰瘍病変の程度も改善した。さらに大腸組織のAMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化及び炎症性サイトカインレベルの減少が確認された。AMPは慢性大腸炎マウスの症状改善に有効であることがわかった。その症状改善にAMPKの活性化が関与する可能性が示唆された。また、これらの結果の一部はイノシン-5'-リン酸投与においても確認された。

研究成果の概要(英文)：We tested whether oral 5'-adenosine monophosphate (AMP), an umami substance in taste related to a nucleotide, administration alleviates symptoms of chronic colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in mice. AMP administration significantly reduced the severity of colitis, such as watery and bloody diarrhea in mice and attenuated mucosal tissue damages in the colon. Furthermore, mice given AMP had higher expression of phosphorylated AMP-activated protein kinase and lower levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , INF- γ , and IL-17A) in the colon tissues.

Collectively, these findings suggested that oral AMP administration improves the severity of DSS-induced chronic colitis in mice via the activation of AMPK. Interestingly, 5'-inosine monophosphate also had similar anti-inflammatory effects, but not 5'-guanosine monophosphate. However, the mechanisms of anti-inflammatory effects with the umami nucleotides remain to be elucidated.

研究分野：栄養/腸管生理学

キーワード：核酸系旨味物質 炎症性腸疾患 AMPK 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞のエネルギーセンサーである AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化がエネルギー代謝の調節のみならず免疫機能の調節にも関与することが明らかになり、免疫異常を主徴とする疾患の治療に注目されつつある。研究者はその AMPK の免疫調節機能に着目し、肝臓や腎臓 AMPK を活性化することが認められているアデノシン-5' -リン酸 (AMP) (J Agric Food Chem, 59, 13238, 2011) を IgA 腎症マウスに与え、腎症の改善に有効であるかを検討しており、腎臓炎症性サイトカインレベルの低下など腎症の改善に対する AMP の有効性を示す結果を得ている (未発表データ)。このように AMP による組織 AMPK の活性化は抗炎症作用が期待できることから、研究者はさらに免疫異常に起因する Inflammatory Bowel Disease (IBD) の病状緩和に対しても AMP 投与が有効ではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

細胞内の糖及び脂質代謝に密接に関連し、エネルギー代謝の恒常性に重要な役割を担う AMPK が免疫機能の調節に関与することがわかっている。AICAR などの AMPK 賦活剤投与による大腸組織の AMPK 活性化は大腸組織炎症性サイトカインの産生抑制を介して IBD マウスの症状改善に寄与することが報告されている。一方、研究者は AMP の経口投与がマウスの肝臓や腎臓 AMPK を活性化することを確認しており、AMP 経口投与が大腸組織の AMPK 活性化を介して IBD の症状緩和にも応用できるのではないかと仮説を立てた。

そこで、本研究は核酸系旨味物質である AMP の経口投与が大腸組織 AMPK の活性化を介してデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により惹起した慢性 IBD マウスの病状を緩和するかを調べた。

3. 研究の方法

4 週齢 C57BL/6 雌マウスを日本チャールスリバー(株)より購入した。マウスは、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 及び、12 時間の明暗サイクル (明期 7:00~19:00) の環境下でプラスチックケージにて 5 匹ずつの群飼とした。1 週間環境に順化させた後、マウスを DSS+AMP 群及び DSS 群の 2 群に分け、各群のマウスはプラスチックケージにて個別飼育した。実験期間中は、DSS+AMP 群には AMP (アデノシン-5' -リン酸二ナトリウム塩、オリエンタル酵母工業(株)) を 0.3%、AIN93G 精製粉末飼料に添加して 24 日間投与した。DSS 群には AIN93G 精製粉末飼料のみを与えた。マウスに DSS (分子量: 36~50 kD, MP Biolaboratory, USA) を 3% 含む飲料水を 0~6 日目、13~15 日目、21 及び 22 日目に自由摂取させ、慢性 IBD を惹起した。DSS 投与期間以外の期間は水道水を自由摂取させた。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、下痢及び血便の程度をスコア化した。下痢スコアは正常 0、軟便 1、下痢 2、水様性下痢 3 とし、血便スコアは正常 0、部分的血便 1、全体的血便 2、肛門から出血 3 とした。さらに体重減少率、下痢及び血便スコアを平均し、疾患活動指標 (DAI) を求めた。慢性 IBD マウスは実験開始 24 日目にイソフルラン吸入麻酔下で開腹して下大静脈より採血し脱血死させた。直ちに大腸を取り出して内容物を氷冷生理食塩水にて洗浄し大腸の長さとし湿重量を測定したのち、病理組織検査のために大腸の一部を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で浸漬固定した。残りの大腸は液体窒素で迅速凍結した。大腸病理組織検査では、大腸組織をパラフィン包埋後、厚さ $3 \mu\text{m}$ の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。凍結した大腸組織は SDS-PAGE 及びイムノブロッティング法による AMPK 及びリン酸化 AMPK (p-AMPK) の検出及び ELISA 法による炎症性サイトカイン濃度 (TNF- α 、INF- γ 及び IL-17A) の測定に供した。また、大腸の形態 (長さ・湿重量)、大腸組織炎症性サイトカイン濃度及び病理組織検査の正常参考データを得るため大腸炎を惹起しない無処置対照群 (Control 群) も設けた。

4. 研究成果

AMP 投与による慢性 IBD マウスの摂餌量及び終体重に変化は認められなかった。大腸の湿重量にも AMP 投与による影響はみられなかったが、大腸の長さは、Control 群が $5.1 \pm 0.3 \text{ cm}$ 、DSS 群が $4.0 \pm 0.2 \text{ cm}$ 、DSS+AMP 群が $4.5 \pm 0.2 \text{ cm}$ で、DSS 群マウスの大腸の長さは Control 群及び DSS+AMP 群に比べ有意に短かった ($p < 0.05$)。しかし、DSS+AMP 群と Control 群の両群間に有意な差は認められなかった。このように AMP 投与は IBD マウスで見られる大腸長の短縮を抑制した。

AMP 投与により慢性 IBD マウスの下痢及び血便症状は有意に軽減され、DAI も DSS 群に比べ低値で推移し有意に改善された ($P < 0.05$) (図 1)。

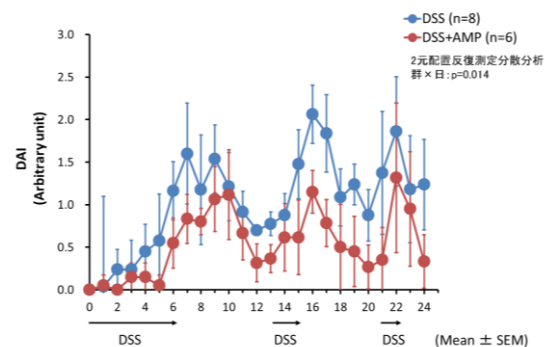


図1. AMPを投与した慢性IBDマウスのDAIの経日変化

大腸病理組織検査の代表例の組織像を図 2 に示した。Control 群マウスの大腸組織像と比べて、DSS 群マウスの大腸組織では潰瘍が広範囲に形成されており (矢印)、その下部

領域に著しい炎症性細胞の浸潤が認められた(黒丸)。一方、DSS+AMP 群マウスでは、粘膜の欠損が一部に見られたが、粘膜固有層及び粘膜下組織の炎症性細胞浸潤の程度は DSS 群マウスに比べ軽度であった(黒丸)。DSS+AMP 群マウスではより Control 群マウスの大腸粘膜組織に近い状態が保持されていた。

イムノブロッティング法により大腸組織の AMPK 及び p-AMPK 発現を調べた。検出された p-AMPK は AMPK の α サブユニットの Thr172 がリン酸化されたもので AMPK が活性化されていることを示す。図 3 にその代表例の結果を示した。Control 群マウスでは AMPK 及び p-AMPK の両方が発現していた。また、DSS+AMP 群マウス及び DSS 群マウスともに AMPK が検出された。一方、p-AMPK は DSS 群マウスでは検出されなかったのに対し、DSS+AMP 群マウスでは p-AMPK が Control 群マウスと同程度発現していた。

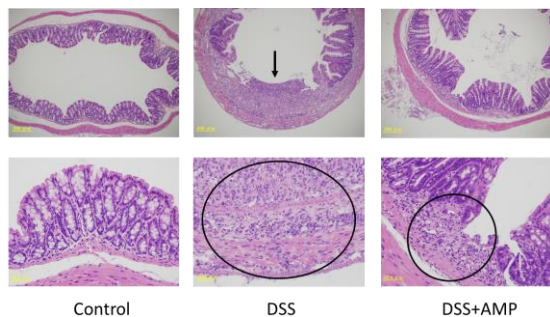


図2. AMPを投与した慢性IBDマウスの大腸病理組織像

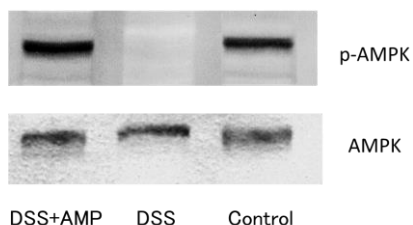


図3. AMPを投与した慢性IBDマウスの大腸組織AMPK及びリン酸化AMPK発現

そのときの大腸組織の炎症性サイトカイン TNF- α 濃度、INF- γ 濃度及び IL-17A 濃度をそれぞれ図 4、図 5、図 6 に示した。DSS 群マウスの TNF- α 濃度は Control 群マウスに比べ約 2.7 倍の有意な高値を示した ($p < 0.05$)。ところがその上昇は AMP 投与 (DSS+AMP 群) により Control 群マウスの 1.6 倍までに減少した。さらに DSS+AMP 群マウスの TNF- α 濃度は DSS 群に比べ有意に低かった ($p < 0.05$) (図 4)。大腸組織 INF- γ 濃度の結果も TNF- α 濃度の結果と同様のパターンを示し、DSS 群マウスの INF- γ 濃度は Control 群マウスの約 3.2 倍まで有意に上昇した ($p < 0.05$)。一方、AMP の投与は INF- γ 濃度をほぼ Control 群マウスのレベルにまで低下させた。さらに DSS+AMP 群マウスの INF- γ 濃度は DSS 群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$) (図 5)。大腸組織 IL-17A 濃度は Control 群マウスの 5

匹中 4 個体で検出限界以下であった。そのため、データの比較は DSS 群と DSS+AMP 群の 2 群間のみで行った。大腸組織 IL-17A 濃度は DSS 群に比べ DSS+AMP 群において低値傾向が認められた ($p = 0.06$) (図 6)。

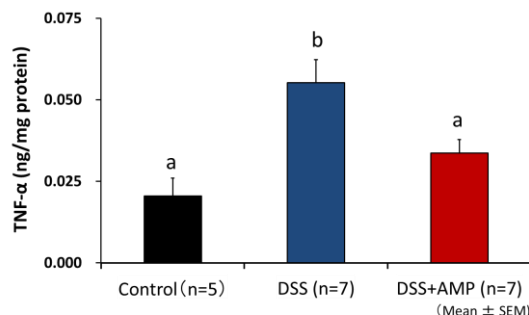


図4. AMPを投与した慢性IBDマウスの大腸組織TNF- α 濃度統計解析は一元配置分散分析後、Tukey HSD testにより行った。異なるアルファベットの平均値は $p < 0.05$ で有意差あり。

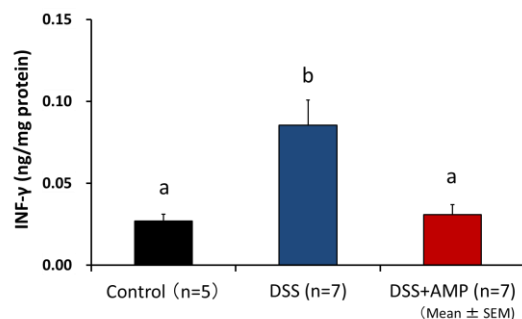


図5. AMPを投与した慢性IBDマウスの大腸組織INF- γ 濃度統計解析は一元配置分散分析後、Tukey HSD testにより行った。異なるアルファベットの平均値は $p < 0.05$ で有意差あり。

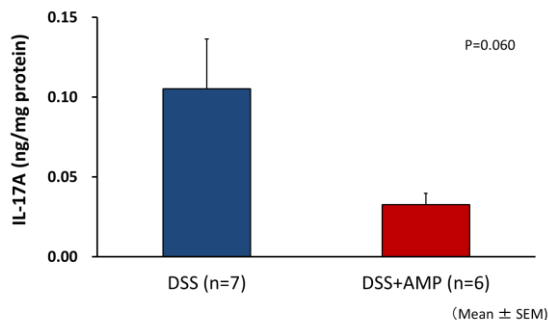


図6. AMPを投与した慢性IBDマウスの大腸組織IL-17A濃度統計解析はStudent's t-testにより行った。

引き続き被検物を AMP からイノシン-5' - リン酸 (IMP) 及びグアノシン-5' - リン酸 (GMP) に置き換えて同様の実験を実施したところ、IMP には AMP と同様、慢性 IBD マウスの下痢・血便の症状を軽減し、DAI の有意な改善作用が認められた(データ非表示)。また、大腸病理組織検査においても潰瘍の程度(矢印)と、粘膜固有層及び粘膜下組織への炎症性細胞浸潤の軽減が認められた(黒丸)(図 7)。さらに IMP の投与は AMPK を活性化させることも AMP 投与の結果と類似していた(図 8)。一方、GMP には AMP 及び IMP で確認された慢性 IBD 症状の軽減作用は認められなかった(データ非表示)。

次に AMP による抗炎症作用のメカニズムを探索するため、慢性 IBD マウスの大腸粘膜固

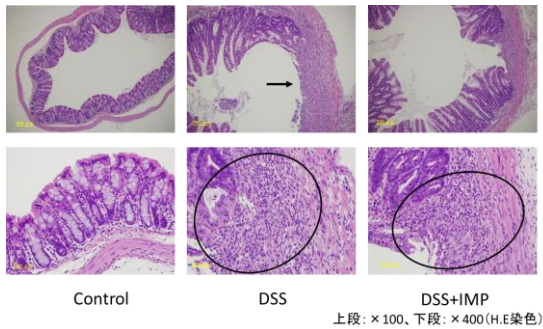


図7. IMPを投与した慢性IBDマウスの大腸病理組織像

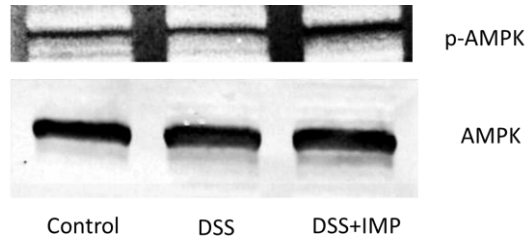


図8. IMPを投与した慢性IBDマウスの大腸組織AMPK及びリン酸化AMPK発現

有層に浸潤した炎症関連免疫細胞 (Th1 細胞、Th17 細胞及び制御性 T 細胞) をフローサイトメトリー法により計測、分取してそれぞれの免疫細胞のマーカーサイトカインの測定と AMPK の発現状態を確認しようと試みたが、大腸粘膜固有層からの細胞は採取できたものの、再現性に乏しく、本研究期間にて結果を導き出すところまで到達することができなかった。

以上の結果より、1) 慢性 IBD マウスの下痢、血便の症状及び DAI は AMP 及び IMP の投与により有意な改善が認められた。2) AMP 及び IMP 投与は大腸組織の炎症の程度を軽減した。3) AMP 及び IMP 投与は大腸組織リン酸化 AMPK 発現を増加した。しかし、GMP 投与は AMP 及び IMP 投与とは異なり、慢性 IBD マウスの症状を顕著に改善しなかった。これら 3 種の核酸系旨味物質は構造が非常に類似しているにもかかわらず GMP のみに慢性 IBD の軽減作用が認められなかった。その理由は現在のところ不明である。

結語

AMP 及び IMP は慢性 IBD マウスの病状改善に有効であることがわかった。さらにその病状改善には大腸組織 AMPK の活性化の関与が示唆された。このように一部の核酸系旨味物質に AMPK 活性化を介して大腸炎を抑制する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ①木村靖浩. 核酸系旨味物質による抗炎症作用について-慢性大腸炎マウスにおける核酸系旨味物質投与の効果-. 第 12 回九州栄養研究会、2015 年 11 月 14 日、別府亀の井ホテル
- ②川上凌人、木村靖浩. DSS 誘導性慢性大腸炎マウスにおけるイノシン酸及びグアニル酸投与の効果. 第 3 回日本栄養改善学会九州・沖縄支部学術総会、2015 年 8 月 22 日、別府大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<https://www.beppu-u.ac.jp/>

<https://kaken.nii.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし