

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：20104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750045

研究課題名(和文) CD8陽性T細胞を介した大腸発酵水素の抗炎症作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the anti-inflammatory effect of hydrogen fermented in the large intestine which mediated a CD8+ T cell

研究代表者

田邊 宏基 (Tanabe, Hiroki)

名寄市立大学・保健福祉学部・講師

研究者番号：60573920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難消化性糖質による大腸H<sub>2</sub>の脂肪組織への蓄積が、脂肪組織中IL6 mRNA量を減少させる。これは大腸H<sub>2</sub>が脂肪組織の炎症の軽減を示唆している。脂肪組織で活性化T細胞から分泌されたIL6は炎症を増悪することから、大腸H<sub>2</sub>の脂肪組織炎症に与える影響を調べた。FOS摂取マウスの脂肪H<sub>2</sub>濃度はコントロール食群に比べ4倍以上高い値を示した。しかし、血液と脂肪組織のCD4陽性、CD8陽性、FOXP3陽性およびROR $\gamma$ T陽性のT細胞サブセットに有意な変化はなかった。以上の結果より、FOS由来の大腸H<sub>2</sub>は脂肪組織に移行し、IL6分泌量を低下させ、この変化にT細胞サブセットが関与していないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Colonic hydrogen (H<sub>2</sub>) generated derived from nondigestible saccharides transferred into the adipose tissue and reduced adipose mRNA abundance of IL6, suggesting that colonic H<sub>2</sub> would alleviate adipose inflammation due to reduced oxidative stress. Elevated IL6 secretion from activated T-cells exacerbates the inflammation. We examined the effect of colonic H<sub>2</sub> on adipose IL6 secretion and T-cell subsets in obese model animals fed fructooligosaccharides (FOS). Adipose H<sub>2</sub> concentration in the OF group was 330% of that in the OC group. However, adipose T-cell subsets did not differ between the OC and OF groups. Colonic H<sub>2</sub> generated from FOS decreases adipose IL6 secretion, and then decreases adipose IL6 secretion independent of adipose T-cell subsets.

研究分野：栄養化学

キーワード：大腸発酵 水素ガス CD8陽性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Ohsawa らが、H<sub>2</sub> ガスの吸入によってラット脳虚血-再灌流時の酸化ストレスが軽減し、脳梗塞巣が減少する (*Nature Medicine*, 13, 688-694, 2007) ことを明らかにして以降、国内外の様々なグループから H<sub>2</sub> ガスや H<sub>2</sub> 含有水の投与によって同様の効果を示すことが多数報告されている。さらに、生体内 H<sub>2</sub> の抗酸化能力は肝臓、腎臓、膀胱、小腸など多くの組織の炎症を抑えることも多数報告されている。

申請者らはこれまでに外部から H<sub>2</sub> を供給するまでもなく、発酵基質の摂取によって門脈 H<sub>2</sub> 濃度が 10 μM に到達することをラットで確認した。これは H<sub>2</sub> ガス吸入時に見られる血中濃度に匹敵した。また、このようなラットで肝虚血-再灌流酸化障害が軽減されることも明らかにした (Nishimura et al. *Br J Nutr*, 2012)。H<sub>2</sub> の直接投与にくらべ、大腸発酵による H<sub>2</sub> 供給は大腸内に基質が存在する限り体内の高 H<sub>2</sub> 濃度を長時間維持できる。また、費用は H<sub>2</sub> ガス吸入や H<sub>2</sub> 含有水投与にくらべ抑えられる。このように、利用する人々の生活習慣に大きな負担をかけずに過度な酸化ストレスによる QOL の低下を抑制できる点は大変有利である。また、申請者らは近年大腸発酵由来 H<sub>2</sub> が全身の多くの組織、特に脂肪組織に供給されることを発見した (Nishimura et al. *J Nutr*, 2013)。このことは大腸発酵 H<sub>2</sub> が脂肪組織を中心に広く全身の酸化ストレスおよび炎症を軽減する可能性を示唆する。

また、抗酸化物質による生体内還元力の増加が酸化ストレスによるリンパ球サブセットの変化を改善するという報告がある (*J Nutr*, 130, 2932-2937, 2000)。生体内還元力の増加がリンパ球サブセットの変化を改善するのであれば、大腸発酵 H<sub>2</sub> によっても十分に改善効果が得られると考えられる。一方、脂肪組織における CD8 陽性 T 細胞の活性化および増殖が炎症性マクロファージの浸潤を引き起こし、脂肪組織の炎症に寄与することが示唆された (*Nature Medicine*, 15, 914-920, 2009)。つまり、CD8 陽性 T 細胞の異常をトリガーとする局所的な免疫異常が、脂肪組織の炎症を引き起こしていることが示された。このことは CD8 陽性 T 細胞の活性化および増殖の抑制が脂肪組織の炎症の抑制に有効であることを示す。このような背景から、申請者らは肥満脂肪組織に供給された大腸発酵由来 H<sub>2</sub> は CD8 陽性 T 細胞の活性化および増殖を抑制し、肥満による全身の炎症を軽減するという着想に至った。このような肥満症の異常な脂肪組織におけるリンパ球サブセットの改善による全身および肥満脂肪組織の炎症の軽減を目的とした生体内への恒常的な H<sub>2</sub> の供給に関する研究は申請者の調べ限り国内外に報告されていない。

## 2. 研究の目的

前述の背景および着想をもとに本研究では生体内 H<sub>2</sub> が CD8 陽性 T 細胞の活性化および増殖を抑制することを明らかにするとともに、大腸発酵 H<sub>2</sub> がリンパ球サブセットの改善を介して全身および肥満脂肪組織の炎症の軽減に有効であることを明らかにする。そのために、研究期間内に以下のことを明らかにする。

- 1) CD8 陽性 T 細胞をはじめとするリンパ球の活性化および増殖に対して H<sub>2</sub> の還元力が抑制的に作用することを明らかにする。
- 2) 肥満モデルラットに発酵基質を投与し全身および肥満脂肪組織に対する発酵由来 H<sub>2</sub> の効果を組織別に明らかにする。全身および肥満脂肪組織における H<sub>2</sub> の濃度とリンパ球サブセットの変化との関係を明らかにする。
- 3) 生理機能を有する発酵産物として代表的な短鎖脂肪酸と H<sub>2</sub> との効果の比較を行い、本効果に対する両者の寄与率を算出する。

## 3. 研究の方法

- (1) 高スクロース高脂肪コントロール (HSFC) 食で肥満を誘導したラットに、HSFC 食および HSFC+5%FOS 食 (HSFF) を 4 週間与えた。HSFC 食ラットの一部に飽和水素水を飲水投与した (HSFH)。試験 3 週後に腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) を実施した。次に 13 週齢の *ob/ob* マウスに標準脂肪 (C) 食および C+5% FOS (F) 食を 2 週間与えた。試験最終日に腎周囲脂肪 H<sub>2</sub> 濃度を測定した。血液中および脂肪組織から分泌された IL6、TNFα および CCL2 量、T 細胞サブセットを分析した。
- (2) 5 週齢の *ob/ob* マウスおよびその野生型を用い、対照食または難消化性糖質の一種であるフラクトオリゴ糖 (FOS) の 5% 添加食で 28 日間飼育した。飼育期間中 7 日ごとに (呼気+放屁) H<sub>2</sub> 排出量を測定する。同時に尾静脈より採血し、血清中 C 反応性タンパク濃度および血糖を測定し、炎症および血糖の状態を把握する。飼育最終日に解剖を行い、腸管膜脂肪、精巣上体周囲脂肪、腎周囲脂肪、門脈血および末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いてリンパ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8+, Foxp3+, CD19+) を解析する。また、血中および脂肪組織中の H<sub>2</sub> 濃度を測定し、組織中 H<sub>2</sub> 濃度とリンパ球サブセットの変化との関係を解明する。

## 4. 研究成果

- (1) 試験開始前 4 週間は対照食 (NC) と高糖質高脂肪食 (HSFC) 食で飼育した (表 1 試験開始時の NC 群と HSFC 群の特徴

	NC	HSF-C	P value
Energy intake (MJ/28d)	9.8	10.8	0.0521
Perirenal fat weight (g/kg)	19.6	26.2	<b>0.0088</b>
H <sub>2</sub> excretion (μmol/5 min)	0.206	0.115	0.3251
Portal H <sub>2</sub> (μmol/L)	0.685	0.471	0.5577
Perirenal fat H <sub>2</sub> (μmol/kg)	0.312	0.451	0.7298
Plasma glucose (mmol/L)	8.94	9.58	0.0738

- 1)。その後の試験期間中の体重増加量とエネルギー摂取量に差はみられなかった。IPGTT における血糖値の AUC<sub>0-2h</sub> は、HSFF 群で HSFC 群の 83%、HSFH 群で 85%だった (図 1)。HSFF 群の脂肪 H<sub>2</sub> 濃

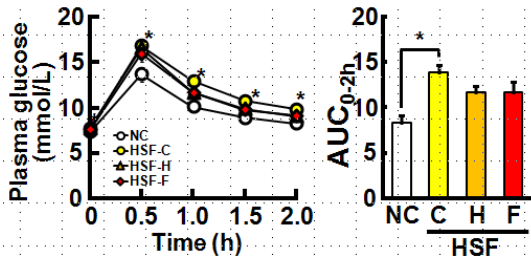


図 1 FOS および飽和水素水投与による耐糖能の改善

度は HSFC 群と HSFH 群に比べ有意に高かった。このことから、大腸 H<sub>2</sub> による肥満ラットの耐糖能改善傾向が示唆された。HSFC 群に比べ、脂肪細胞からの IL6 分泌量は、HSFF 群で有意に低く、HSFH 群で低い傾向を示した。TNFα および CCL2 分泌量に群間差はみられなかった (図 2)。

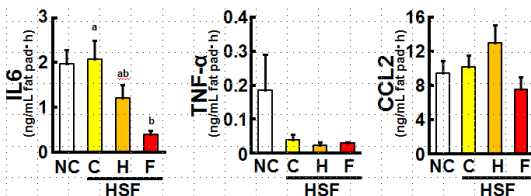


図 2 ラット後腹壁脂肪から分泌されたアディポカイン

- (2) 野生型マウスでは呼気水素排出量が C 食群に比べわずかに F 食群で増加するものの、後腹壁脂肪に滞留する水素には差がなかった。ob/ob マウスでは FOS 摂取により呼気水素排出量、後腹壁脂肪 H<sub>2</sub> 濃度のいずれもコントロール食群に比べ 4 倍以上高い値を示した (図 3)。しかし、血

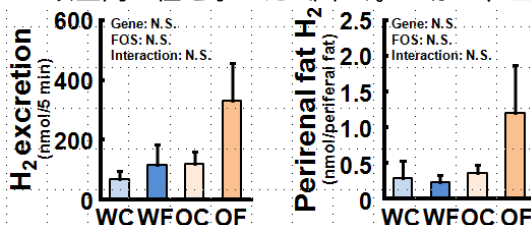


図 3 各食を摂取させた遺伝型の異なるマウスの呼気水素排出量と後腹壁脂肪水素

液と脂肪組織の CD4 陽性、CD8 陽性、FOXP3 陽性および RORγT 陽性の T 細胞サブセットに有意な変化はなかった (図 4)。

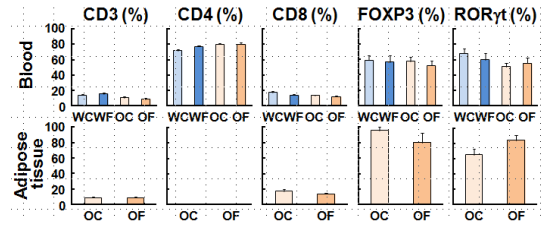


図 4 各食を摂取させた野生型と変異型マウスのリンパ球サブセット

また、CD8 陽性 T 細胞のグランザイムも測定し、その活性も検討したが、こちらも差が認められなかった。以上の結果より、FOS 由来の大腸 H<sub>2</sub> は脂肪組織に移行し、IL6 分泌量を低下させ、この変化に T 細胞サブセットが関与していないことがわかった。

## 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 1 件)

- (1) 西村直道、田邊宏基、山本達朗、Isomaltodextrin, a highly branched α-glucan, increases rat colonic H<sub>2</sub> production as well as indigestible dextrin、*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80** (3) 554-563. 2016.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 田邊宏基、松村野乃花、山本達朗、西村直道、Colonic hydrogen derived from fructooligosaccharides reduces secretion of adipocytokines in obese rats and mice、12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition、2015 年 5 月 14-18 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (2) 田邊宏基、山本達朗、西村直道、多分岐 α-グルカンであるイソマルトデキストリンはラット大腸水素生成を促進する、第 20 回日本食物繊維学会学術集会、2015 年 11 月 28-29 日、かんてんぱぱホール (長野県)
- (3) 田邊宏基、宍戸彩加、山本達朗、西村直道、フラクトオリゴ糖による大腸 H<sub>2</sub> 生成は肥満マウスで顕著かもしれない、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 13-15 日、武庫川女子大学 (兵庫県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田邊宏基 (TANABE Hiroki)  
名寄市立大学・保健福祉学部・講師  
研究者番号：60573920

##### (3) 連携研究者

西村直道 (NISHIMURA Naomichi)  
静岡大学学術院・農学領域・教授  
研究者番号：10341679