

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861226

研究課題名(和文) 全身炎症反応症候群に対するアスタキサンチンの効果に対する研究

研究課題名(英文) The therapeutic effect of Astaxanthin for Systemic Inflammatory Response Syndrome

研究代表者

武部 真理子 (TAKEBE, Mariko)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：10725401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：全身性炎症反応症候群(SIRS)に対するアスタキサンチンの効果を調べるために、5-FU誘導腸炎モデルマウスおよびヒト結腸癌細胞由来の細胞株であるCaco-2、HCT116を用いた実験を行った。5-FU誘発性腸炎モデルにおいて、アスタキサンチンが炎症性サイトカインの発現を抑制する作用およびアポトーシスを抑制する作用があることが明らかになった。しかし、細胞実験においてはアスタキサンチンの炎症性サイトカイン発現抑制作用は顕著ではなく、抗酸化作用が主たる効果として確認された。腸炎モデルにおいて、アスタキサンチンの抗酸化作用が直接アポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is the leading cause of death intensive care units. Oxidative stress plays an important role in SIRS. The aim of this study was to evaluate the effects of Astaxanthin, that is one of antioxidants, in SIRS. In 5-FU induced enteritis mice, the number of intestinal crypt cells was decreased and apoptotic cells was increased. Both in enteritis mice and TNF-alfa stimulated HCT 116 cells, expression of inflammatory cytokines and ROS (reactive oxygen species) increased. In contrast, in Astaxanthin + 5-FU group, the number of intestinal crypt cells was increased and apoptotic cells was less than 5-FU group, and expression of inflammatory cytokine reduced. In Astaxanthin + TNF-alfa group, expression of ROS was less than TNF-alfa stimulated HCT 116 cells group. The protective effects of Astaxanthin are likely attributable to the decrease in oxidative stress.

研究分野：敗血症

キーワード：アスタキサンチン 敗血症 全身炎症反応症候群 抗酸化作用 酸化ストレス 5-FU誘発腸炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身炎症反応症候群 (SIRS) の病態

全身炎症反応症候群 (SIRS) では急性肺傷害 (ALI) や腎障害、などの多臓器不全を高率に合併し、重篤な状態となることが多い。現在の治療は循環維持や人工呼吸器管理などの対症療法であり、臨床で有効とされる特異的な治療薬は発見されていない。

また ROS (活性酸素種) は SIRS の病態において好中球や単球、それ以外の種々の細胞から産生され、NADPH オキシダーゼ (NOX) が ROS 産生の中心を担っている。NOX1 や NOX2 の遺伝子プロモーター領域には、NF- κ B および AP-1 結合領域があるため、スーパーオキシド (O_2^-) や H_2O_2 などの ROS が過剰産生される。この過剰産生された ROS が近傍の細胞へも拡散して転写因子を活性化させさらにケモカイン、接着分子、炎症性物質の転写を高めるといった悪循環が生じる。すなわち、抗酸化作用を有する物質は SIRS の有用な治療薬となる可能性が高い。

(2) アスタキサンチン

アスタキサンチンはカロテノイドの一種であり、脂質酸化に対する抗酸化力ではビタミン E の 1000 倍といわれる強力な抗酸化作用がある。アスタキサンチンの主な特長としては 1. 生体膜保護作用、2. ミトコンドリア機能向上、3. 酸化ストレスからの DNA 保護効果、4. 抗炎症作用、5. 抗酸化ネットワークの増強が挙げられる。

(3) これまでの研究成果との関連および着想に至る背景

申請者らの教室では、これまで SIRS および敗血症性急性肺傷害を制御する方法を探ることに力を入れ、敗血症に対する HDAC 阻害剤の抗炎症および抗アポトーシス効果についての研究を行い、敗血症病態において HDAC 阻害薬が抗アポトーシス効果をもたらすことを明らかにした。

当教室と研究協力体制にある富山大学分

子医科薬理学教室ですでに確立した腸炎モデルを用いて全身炎症反応に及ぼすアスタキサンチンの抗炎症および抗アポトーシス効果について検討を行うことが可能である。このことから、申請者は SIRS の新たな治療方法の開発につながる可能性の高い本研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 腸炎モデル動物にアスタキサンチンを前投与することで炎症性サイトカインの産生を抑制し、組織傷害とアポトーシスを改善することを明らかにする。また、モデル動物においてアスタキサンチンの効果により NF- κ B や AP-1 などの転写因子が抑制されるかを検討し、炎症物質の産生が抑制されるカスケードについて明らかにする。

(2) *in vitro* の実験として、ヒト結腸癌細胞由来の細胞株である Caco-2、HCT116 を TNF 刺激することで生じる炎症応答に対して、アスタキサンチンを作用させることで炎症性サイトカインの発現と活性酸素種 (ROS) の産生が減少するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸炎モデル (*in vivo*)

腸炎モデルマウスは 5-FU 投与により腸炎を惹起した。Nox1 ノックアウトマウスおよび wild type マウスを vehicle 群、アスタキサンチン投与群、vehicle+5-FU 投与群、アスタキサンチン+5-FU 投与群に分類する。・にはアスタキサンチンの溶媒 (オリーブオイル)、・にはアスタキサンチンを 14 日間連日強制経口投与し、その後・には 5-FU を連日腹腔内投与した。

炎症性サイトカインについては 5-FU 投与開始翌日の腸組織で、腸の組織学的変化については 5-FU 投与開始から 5 日後の大腸・小腸の組織標本で評価した。サイトカインは TNF、IL-6、IL-17 等を、qPCR 法を用いて定量的に評価した。また組織学的変化は絨毛

の長さや陰窩細胞の増殖について H-E 染色・Ki67 染色により、アポトーシスについて terminal deoxynucleotidyl transferase dUNP-mediated nick-end labeling(TUNEL)染色および cleaved caspase 3 免疫染色により検討した。

(2) 細胞株における実験 (in vitro)

当初の計画では、ヒト結腸癌細胞由来の細胞株である Caco-2、HCT116 をプレートに播種し、5-FU を添加してサイトカイン発現を測定する予定であった。しかし、5-FU 添加ではサイトカイン発現の有意な上昇が得られなかった。5-FU 投与による腸腺窩のアポトーシス誘導には、TNF- α や IL-1 などのサイトカインの関与が明らかになっているため、細胞株における実験では TNF- α 添加による刺激を行った。アスタキサンチンは TNF- α と同時に添加した。モデルマウスと同様 qPCR 法でサイトカイン測定を行った。及び活性酸素種 (ROS) の測定は、qPCR 法を用いた iNOS の測定および SOD 活性測定キットを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 腸炎モデル (in vivo)

腸炎モデルマウスの腸組織における検討では、vehicle+5-FU 投与群において、陰窩細胞の減少を認めた。5-FU 誘発性腸炎のもう一つの特徴である絨毛丈の短縮は顕著ではなかった。vehicle+5-FU 投与群と比較して、アスタキサンチン投与群およびアスタキサンチン+5-FU 投与群において陰窩細胞の増殖が亢進する傾向があった。この傾向は大腸でも見られたが、特に小腸で顕著であった。

アポトーシスに関しても、vehicle+5-FU 投与群で陰窩部に TUNEL 陽性細胞および cleaved caspase 3 陽性細胞数の増加を認め、アポトーシスの誘導が確認された。vehicle+5-FU 投与群と比較して、アスタ

キサンチン+5-FU 投与群では TUNEL 陽性細胞および cleaved caspase 3 陽性細胞数が少ない傾向にあり、炎症によって誘導されるアポトーシスがアスタキサンチン投与によって抑制されることが示唆された。こちらの結果も特に小腸で顕著であった。

炎症性サイトカインに関しては、vehicle+5-FU 投与群において、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 mRNA 発現が増加し、アスタキサンチン+5-FU 投与群では減少した。しかし、炎症性腸炎の病態形成に関与し IL-6 誘導能があるとされる IL-17 はアスタキサンチン投与によって変化しなかった。

これらの結果から、腸炎モデルマウスにおいて、アスタキサンチンは陰窩細胞の増加すなわち炎症による組織学的変化からの回復を促進し、アポトーシスを阻害する効果があることが示唆された。また、一部の炎症性サイトカインにおいてその発現を抑制することが明らかになった。

(2) 細胞株における実験 (in vitro)

HCT116 において、TNF- α 刺激により IL-8、TNF- α 、iNOS mRNA の発現は増加したが、IL-6 の発現には有意な変化がなかった。また Caco-2 においては有意な炎症応答が認められなかった。

HCT116 において、TNF- α 投与群と TNF- α アスタキサンチン同時投与群の IL-8、TNF- α mRNA の発現に有意な差はなかった。iNOS mRNA のみアスタキサンチン投与群で減少する傾向があった。このため、SOD 活性測定キットを用いて TNF- α 群とアスタキサンチン投与群の SOD 活性を測定したが、やはりアスタキサンチン投与群で SOD 活性が減弱する傾向にあった。

(1) および (2) の実験により、5-FU 誘発性腸炎モデルにおいて、アスタキサンチンが炎症性サイトカインの発現を抑制する作用

およびアポトーシスを抑制する作用があることが明らかになった。しかし、細胞実験においてはアスタキサンチンの炎症性サイトカイン発現抑制作用は顕著ではなく、抗酸化作用が主たる効果として確認された。モデル動物と細胞実験でサイトカインに対する結果が異なることに関して解明はできなかったが、アスタキサンチンの抗酸化作用が直接アポトーシスそのものを抑制している可能性も含めて、分子メカニズムの解明を続ける予定である。

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 0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

武部 真理子 (TAKEBE, Mariko)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号：10725401

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

服部 瑞樹 (HATTORI, Mizuki)
富山大学・附属病院・助教