

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18702

研究課題名(和文) 食事制限による炎症性腸疾患の予防・改善メカニズムの解明と応用に向けた研究

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of prevention and amelioration of inflammatory bowel disease by dietary restriction

研究代表者

田中 沙智 (TANAKA, Sachi)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90633032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カロリー制限飼料を摂取させたマウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を飲水させることにより大腸炎を誘発させたところ、DSS誘発大腸炎による体重の減少や摂取カロリーの減少がカロリー制限で軽減した。また、大腸炎による大腸の萎縮および損傷がカロリー制限により軽減した。大腸における炎症性サイトカインのmRNA発現はカロリー制限で低下し、大腸に浸潤するキラーT細胞、樹状細胞、B細胞の割合が有意に低下した。以上の結果より、カロリー制限は大腸への免疫細胞の浸潤および炎症性サイトカイン産生を抑制することで大腸炎軽減効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of Caloric restriction (CR) on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Eight-week-old male C57BL/6J mice were fed control (CON) diet or 40% calorie-restricted (CR) diet. After feeding for 2 weeks, acute colitis was induced in CON and CR mice by administration of 3% DSS. CON mice showed the significant body weight loss and decreased calorie intake, but CR mice recovered body weight loss and caloric intake on 14 days after DSS administration. In addition, CR significantly inhibited the colonic atrophy and decreased histological score compared with CON mice. Furthermore, CR suppressed expression of inflammatory cytokines and decreased the proportion of immune cells, such as killer T cells, dendritic cells, and B cells in the colon. These results suggest that CR ameliorates DSS-induced colitis and inhibits the migration of immune cells into the colonic mucosa by suppressing cytokine expression in the colon.

研究分野：食品免疫学

キーワード：食事制限 炎症性腸疾患 免疫細胞 炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

今日の日本は「飽食の時代」と言われるほど食が豊かで栄養状態も良くなり、世界一の長寿国になった。その反面、カロリーの過剰摂取や食生活の乱れなどにより、生活習慣病は増加の一途を辿っている。そのため、適切に摂取カロリーをコントロールして、栄養バランスの取れた食事をするのが、健康な生活を営む上で重要である。アカゲザルを用いた研究では、カロリー制限により、老化関連疾患（糖尿病、心血管疾患、悪性腫瘍、認知症）の発生頻度が減少し、老化関連死の減少も確認された (Colman et al., Science, 2009)。適切な食事制限は、2 型糖尿病や心臓血管疾患、高血圧、がんの発症を予防し、健康寿命が延長するなどの健康効果をもたらすことがヒトの疫学調査や臨床試験によって示されている (Rizza et al., Aging Research Reviews, 2014)。一方、カロリー制限による免疫機能への影響については、一致した見解が得られていない。例えば、免疫老化の遅延、炎症抑制、がん抑制などの老化に伴う免疫機能を改善させる効果が示されているが、ウイルス感染や二次応答時の抗体産生能が低下することも報告されている (Speakman et al., Molecular Aspects of Medicine, 2011)。また、食事制限をすると、肝細胞や筋肉細胞において AMPK 活性化による mTOR の抑制、PI3/Akt/mTOR の抑制、サーチュインの発現増加などのシグナル伝達に変化することが知られている (Wang et al., Diabetes & Metabolism Journal, 2014) が、これらのシグナルの免疫系への関与については未だ報告が少なく、特に炎症性腸疾患に対する効果については不明である。

研究代表者はこれまでに、食品由来生理活性物質が免疫バランスを制御することを証明し、その免疫調節機能のメカニズムの解明を行ってきた (Tanaka et al., Cellular Immunology, 2011)。また、マウスに対してカロリー制限をさせる実験系をすでに確立しており、食事制限により変化するマイクロ RNA を解析している。また、カロリー制限により免疫細胞の中でも特にマクロファージと樹状細胞の割合が低下し、ヘルパー T 細胞の割合が増加するなど、免疫状態に変化が起ることをすでに確認している。このようなカロリー制限による免疫系の変化が炎症性腸疾患に対してどのような影響を及ぼすか、その詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

カロリー制限下で大腸炎を引き起こし、その病態の解析と改善のメカニズムを明らかにする。さらに、病態の改善に必須な制御因子を探索し、食事制限による炎症性腸疾患の予防法を確立することを目的とする (図 1)。

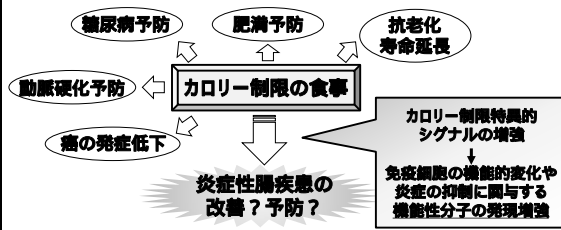


図1. 本研究の背景
カロリー制限による健康効果と炎症性腸疾患の改善メカニズムの仮説

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス (雄) をランダムに 2 群に分け、コントロール飼料摂取群 (CON) には AIN-93M を毎日約 4 g (13.2 kcal) /mouse 摂取させ、カロリー制限食摂取群 (CR) には AIN-93M の 40% をカロリーカットした飼料を毎日約 4 g (7.92 kcal) /mouse 摂取させた。摂取期間は 28 日間とした。

飼料摂取開始から 14 日後において、CON マウスおよび CR マウスに 3% (w/v) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲み水に混合させた DSS 水を 7 日間自由飲水させ、急性大腸炎を発症させた。CON マウスと CR マウスに DSS を飲水させてから 14 日後にマウスの解剖を行った。実験期間中において、毎日、マウスの体重および飼料摂取量を測定し、便形状を記録した。マウスの解剖時において、摘出した大腸の外観および長さを測定した。

大腸組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後、H&E 染色標本作製し、光学顕微鏡による組織学的観察に供した。その後、2 項目 (上皮の損傷・炎症性細胞の浸潤: 各 0~4 点) の合計スコア (0~8 点) について 2 群間で評価した。上皮の損傷は正常所見を 0 点、杯細胞のわずかな減少が認められる場合を 1 点、杯細胞の広範囲にわたる減少が認められる場合を 2 点、腸陰窩のわずかな減少と杯細胞の広範囲にわたる減少が認められる場合を 3 点、腸陰窩の広範囲にわたる減少が認められる場合を 4 点とした。また、炎症性細胞の浸潤は正常所見を 0 点、腸陰窩層周辺への浸潤が認められる場合を 1 点、粘膜への浸潤が認められる場合を 2 点、粘膜への浮腫を伴う広範囲にわたる浸潤が認められる場合を 3 点、粘膜下層への浸潤が認められる場合を 4 点とした。

大腸でのサイトカイン mRNA 発現を解析するために、total RNA を ISOGEN (NipponGene, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。逆転写反応では、oligo dT をプライマーとして Super Script Reverse Transcriptase を用いて逆転写酵素反応を行い、cDNA を合成した。その後、リアルタイム PCR にて IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 の mRNA 発現を解析した。遺伝子発現量の定量化のため、GAPDH をハウスキーピング遺伝子とし、比較 Ct (Ct) 法を用いて相対的定量で解析した。

DSS 飲水から 14 日後に大腸を採取し、細

胞を単離した。まず、大腸組織を 0.5 cm 片に切断し、上皮細胞を除去するために、1 mM EDTA を含む HBSS (-) 中で 37 °C、20 分間振とう培養した。遠心分離後、0.5 mg/ml DNase I、0.5 mg/ml collagenase type を含む 10% FBS/RPMI-1640 培地で、37 °C、30 分間培養した。遠心分離後、10% FBS/RPMI-1640 培地で懸濁し、100 µm セルストレーナーに通し、細胞を得た。

フローサイトメトリー解析では、死細胞を 7-AAD で染色し、Fc レセプターを Purified anti-mouse CD16/32 mAb (93) でブロックした。次に、FITC 標識抗 CD4 抗体 (GK1.5)、PE 標識抗 CD8 抗体 (53-6.7)、APC 標識抗 TCR 抗体 (H57-597)、FITC 標識抗 CD11c 抗体 (N418)、PE 標識抗 CD19 抗体 (6D5)、APC 標識抗 F4/80 抗体 (BM8) で染色し、大腸の細胞をフローサイトメーターで 100,000 個取り込み、ヘルパー T 細胞、キラー T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージの割合を解析した。

実験は 3 回以上独立して行い、それぞれの実験結果より平均値と標準偏差を算出した。有意差検定は、Student の *t* 検定を行った。

4. 研究成果

カロリー制限開始から 14 日後に、両群に 3% (w/v) DSS を 7 日間自由飲水させ急性大腸炎を誘導した結果、所見観察では、両群で DSS 飲水 3 日目から血便が確認され、大腸炎を発症していることが確認できた。

実験期間中、体重を毎日測定した結果、CON マウスに比べ CR マウスの体重は飼料摂取 4 日目から 21 日目まで有意に低値を示した。また、DSS 飲水後、CON マウスは DSS 飲水 5 日目から体重が減少し実験終了まで体重が回復しなかったが、CR マウスは DSS 飲水 5 日目からわずかに体重が減少したものの、DSS 飲水 10 日目以降、体重が回復した。一日の摂取カロリーを解析したところ、CON マウスに比べ CR マウスでは 40% のカロリー制限が維持されていた。また、DSS 飲水後、CON マウスはカロリー摂取量が減少したが、CR マウスでは摂取カロリー減少が抑制され、摂取カロリーが回復した。以上のことから、カロリー制限飼料摂取は大腸炎を軽減する作用があることが示された。

大腸炎の重症度を評価するために実験最終日に大腸を摘出し、大腸の外観を観察した結果、個体差がみられるものの、CR マウスに比べ CON マウスで大腸が委縮し、大腸内部に血便が確認できた。また、大腸の長さを測定した結果、CON マウスに比べ CR マウスで有意に高値を示した。

H&E 染色した大腸組織を観察したところ、CON マウスでは一部腸陰窩が脱落し、粘膜固有層は浮腫を伴い炎症性細胞の浸潤と好中球の浸潤が認められた。残存した腸陰窩には杯細胞の消失が高度に観察され、組織学的スコアは高値を示した。一方、CR マウスで

は、腸陰窩が保たれており、粘膜固有層には軽度の炎症性細胞、好中球の浸潤が認められ、組織学的スコアは低値を示した。以上のことから、カロリー制限飼料摂取は大腸炎を軽減する作用があることが明らかとなった。

カロリー制限飼料の摂取が大腸の炎症性サイトカイン mRNA 発現に対する影響を調べるために、CON マウスおよび CR マウスで炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 の mRNA 発現解析を行った。その結果、CR マウスの TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 の発現量が CON マウスに比べ有意に低下した。

DSS で大腸炎を誘発したマウスの大腸における免疫担当細胞群に対するカロリー制限の影響を調べるために、CON マウスおよび CR マウスの大腸から単離した細胞を FACS 用抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて免疫担当細胞群の割合を測定した。その結果、大腸における CR マウスのヘルパー T 細胞、マクロファージの割合が CON マウスに比べ減少傾向にあり、キラー T 細胞、B 細胞、樹状細胞の割合が CON マウスに比べ有意に減少した。以上のことから、カロリー制限は大腸の免疫細胞の割合を低下させ、大腸特異的に過剰な炎症を抑制することが示された。

本実験で使用した 40% カロリー制限飼料は、コントロール飼料として用いた AIN-93M を元に、生体維持活動に必要なミネラルやビタミン、タンパク質などの含有量は変えずに、炭水化物、脂質の含有量を減らし、セルロースの含有量を増やすことで調製したものである。これまでに様々な食事成分の潰瘍性大腸炎 (UC) への影響が知られており、ヒトで高脂肪食の習慣的摂取が UC の発症リスクを高めることや、ヒトで炭水化物 (繊維を除く) の摂取が UC およびクローン病の病態を増悪させることが示唆されている。また、先行研究で若年期のマウスにセルロースをあらかじめ摂取させることで、成年期における DSS 誘発性大腸炎が軽減することが報告されている。したがって、本実験に用いたカロリー制限飼料においてセルロースの含有量の増加が、大腸炎を軽減させた可能性が考えられる。今後、本実験と同じ実験デザインを用いて、飼料中のセルロースの含有量を変えずに、カロリーを 40% カットした飼料をマウスに摂取させ、DSS 誘発性大腸炎の軽減効果を検討する必要がある。

カロリー制限による大腸炎軽減メカニズムとして、腸上皮機能の向上と腸内細菌の影響が予想された。先行研究では、カロリー制限により、パネート細胞での mTORC1 経路が阻害され、幹細胞機能を増強させる物質であるパラクリン因子 ADP-リボースを産生誘導することが報告されている。さらに、カロリー制限により陰窩のオルガノイドの形成が促進することや、電離放射線による損傷後の腸陰窩の生存と増殖を促進することが知

られている。よって、カロリー制限が大腸上皮の機能を維持し、DSS による上皮の損傷が軽減されることが推察された。また、腸内細菌の影響に関しては、一般に腸内共生細菌がヒト炎症性腸疾患（IBD）および実験性大腸炎の病因に関与することが明らかになっており、IBD 患者では、腸内細菌の多様性の減少や、特定の細菌が増加あるいは減少することが知られている。また、先行研究でカロリー制限が腸内細菌叢を変化させることが知られているため、本実験でもカロリー制限が腸内細菌叢に影響を与えることで、大腸炎軽減に寄与していることが推測された。本実験では、大腸上皮機能や腸内細菌叢に対するカロリー制限の影響を明らかにすることができなかったため、今後、詳細に検討する必要があると考えられる。

最後に、カロリー制限による腸管免疫制御の分子メカニズムを明らかにできれば、それらを標的とした治療への応用が可能となる。また、ヒトでの臨床試験を実施するにあたり、大腸炎軽減に効果のあるカロリー制限の程度や、大腸炎治療薬との併用、カロリー制限食の各栄養素の組成について検討する必要がある。将来的には、カロリー制限による大腸炎の予防・治療効果を証明することにより、IBD 患者の QOL 向上や医療費削減に大きく貢献することが期待される。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

山田和輝，古屋花暖，山本佳奈，田中沙智 カロリー制限下での CD4 陽性 T 細胞の表現型変化に関わる microRNA の探索，日本食品免疫学会第 12 回学術大会，平成 28 年

山田 和輝，古屋 花暖，山本 佳奈，田中 沙智 カロリー制限下での CD4 陽性 T 細胞の表現型変化に関わる microRNA の探索，日本食品免疫学会第 13 回学術大会，平成 29 年

Tanaka S. Caloric restriction ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. 第 46 回日本免疫学会学術集会，平成 29 年

6．研究組織

(1)研究代表者

田中 沙智 (TANAKA, Sachi)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90633032