

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	有江 秀行
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Grape Seed Extract Eliminates Visceral Allodynia and Colonic Hyperpermeability Induced by Repeated Water Avoidance Stress in Rats</p> <p>(ブドウ種子抽出物は、慢性水回避ストレスによる内臓知覚過敏及び腸管透過性亢進を阻止する)</p> <p>野津 司、宮岸 沙織、井田 正幸、出雲 貴幸、柴田 浩志</p> <p>Nutrients 2019, 11(11), 2646</p> <p>研 究 目 的</p> <p>過敏性腸症候群(IBS)は、排便習慣の変化を伴う慢性腹痛を特徴とする機能性胃腸障害である。内臓知覚過敏と腸管透過性の亢進がIBSの主要病態の一つとして捉えられている。</p> <p>水回避ストレス(WAS)は、内臓知覚過敏と腸管透過性の亢進を誘導することが知られており、IBSの動物モデルを作製する方法として一般的に受け入れられている¹。我々は最近、IL-6、IL-1βとTLR4がこれらの腸管機能変化に関与することを明らかにし、TLR4-サイトカインシグナルがIBSにおいて重要な因子であることを示した^{2,3}。</p> <p>ブドウ種子抽出物(GSE)は、ワインなどの副産物として生成され、その中には抗酸化及び抗炎症作用を有するプロアントシアニジンが多く含まれている。IL-10欠損大腸炎モデルの研究において、GSEは腸における炎症性サイトカインの発現を阻害することが報告されている。さらに、肥満モデルにおいて、GSEは炎症抑制及びタイトジャンクション(TJ)構造を維持し、腸管バリア保護作用を有することが示されている。これらのことから、GSEはTLR4-サイトカインシグナルを抑制し、内臓知覚過敏と腸管透過性の亢進を阻止すると想定し、検討を試みた。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p><u>1. 反復WAS処置による内臓知覚過敏及び腸管透過性亢進に対するGSEの作用の検討</u></p> <p>体重約300 gの雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。WASは周囲に水を満たした中央のプラットフォームにラットを1時間置くことで処置し、3日間連続で実施した。WASの最終処置の1日後、内臓知覚は、ラットの大腸に伸展バルーンを挿入し、伸展時の痛みに伴う腹筋収縮を筋電図で測定することで評価した。腸管透過性は、麻酔下に、近位大腸の2カ所(約4cm間隔)を結紮し、腸管ループを作成、これに1.5%エバンスブルー1 mLを注入し、15分間に大腸に取り込まれた量を定量することで評価した。また、サイトカイン及びTJタンパク質の評価のため、肛門側の結紮部位より下の組織を1 cm採取した。GSEの投与はWAS処置の1週間前から開始し、内臓知覚過敏評価の当日まで実施した。</p>			

2. Caco-2単層上皮細胞におけるサイトカイン処置による透過性亢進に対するGSEの作用の検討

Caco-2単層上皮細胞において、IL-6とIL-1 β を処置し細胞間透過性の増加を誘導した。GSEはサイトカインと同時に処置した。また細胞を回収し、TJタンパク質の発現を評価した。

成 績

1. ブドウ種子抽出物は、WAS誘発性の内臓知覚過敏及び腸管透過性の亢進を阻止した

WASにより内臓知覚過敏が誘導され、GSEはこの反応を抑制した。さらにGSEはWASによる腸管透過性の亢進を抑制した。

2. ブドウ種子抽出物は、大腸の炎症性サイトカインとTLR4の増加を抑制し、TJタンパク質の発現を改善させた

IL-6、IL-1 β の大腸での産生量はWASにより増加し、TLR4の発現量も増加した。GSE処置により、IL-6とTLR4の発現は抑制された。

TJ構造は腸管バリア機能において重要な役割を果たし、構成因子であるclaudin-3、claudin-7、ZO-1は腸管バリア保護作用を示すマーカー、claudin-2は腸管バリア破綻に関与するマーカーとして知られている。WASによりclaudin-2は増加し、claudin-3は減少した。GSEはclaudin-2の発現増加を顕著に抑制した。ZO-1、claudin-7の発現はWASにより有意な変化はなかった。

さらに腸管透過性とその他パラメーター間の関係性を評価した。以前の報告と一致して、腸管透過性と内臓知覚過敏に関連が認められた。興味深いことに、腸管透過性はIL-6、IL-1 β 、TLR4及びclaudin-2と正の相関があった。

3. ブドウ種子抽出物は、Caco-2細胞単層上皮における、サイトカイン誘導の透過性亢進を軽減した

我々は大腸におけるIL-6とIL-1 β の産生増加が、WASによる腸管透過性の亢進を促進したのではないかと考え、Caco-2細胞単層上皮でのそれらのサイトカインの影響を検討した。その結果、サイトカイン刺激により細胞間透過性が増加した。さらに、claudin-2の発現増加、及びclaudin-3とclaudin-7の発現減少が認められた。GSEは上述した変化を有意に改善した。

考 案

これまでの研究と同様に、WASを繰り返シラットに処置すると、内臓知覚過敏と大腸の透過性が亢進することを確認した。過去の知見から、TLR4-サイトカインシグナルが大腸の機能変化を引き起こしていると考えられている。実際に今回の研究でもサイトカインの上昇が認められた。またサイトカインはTJタンパク質の発現を変化させ、細胞間透過性を高めると報告されている。このことが今回のIBS動物モデルにおける腸管バリア機能の破綻を説明するかもしれない。実際にWASによりclaudin-2の発現が増加し、claudin-3の発現が減少した。中でもclaudin-2の発現は腸管透過性と正の相関があった。したがって反復WAS誘導IBSモデルにおける腸管透過性の亢進には、特にclaudin-2の発現変化が関与している可能性がある。

腸管バリア機能が弱まることで、腸内細菌などの体内への移行が増加し、腸管での炎症が誘導さ

れ、この過程でLPSが放出されTLR4と結合し、サイトカインの産生が促進される。このことがTLR4-サイトカインシグナルの増強になり、症状の悪循環につながっていると思われる。

GSEは抗炎症作用を有することが広く知られており、今回の研究においてもGSEはストレス処置後のIL-6とTLR4の発現増加を抑制した。IL-6はclaudin-2の発現を増加させることにより腸管透過性を増加させることが報告されている。GSEがWASによるclaudin-2の上昇を抑制する根底のメカニズムの1つとして、サイトカイン産生阻害が寄与すると考えられる。またCaco-2細胞単層上皮での検討から、GSEがサイトカインによる細胞間透過性の亢進を阻止し、claudin-2の発現増加、及びclaudin-3とclaudin-7の発現減少を阻害することを明らかにした。したがって我々の検討により、GSEは炎症性サイトカインの放出の抑制、及びサイトカインによるTJタンパク質の発現変化の阻害により、IBSの特徴的な症状である内臓知覚過敏及び腸管バリアの破綻を阻止することが示唆される。

GSEの作用機序は今回の研究では十分に明らかにすることはできなかった。薬物誘発性大腸炎モデルにおいて、ブドウ種子から抽出された純度95%以上のプロアントシアニジンは、大腸のサイトカイン遺伝子の発現とNFκBシグナルを阻害し、組織障害を改善することが知られている。また今回使用したGSEには80%以上のプロアントシアニジンが含有されている。これらのことから、プロアントシアニジンによるNFκBシグナルの抑制が作用機序の候補の1つとして考えられるが、これを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

結 論

GSEは慢性的なWASによって誘発されるTLR4-サイトカインシグナルを阻害し、TJ構造を維持することにより、内臓知覚過敏と大腸の透過性亢進を阻止した。このことから、GSEはIBSの治療に役立つ可能性があり、今後の臨床研究での有効性評価が期待される。

引 用 文 献

1. Larauche M., Mulak A., Tache Y. Stress and visceral pain: From animal models to clinical therapies. *Exp. Neurol.* 2012;233:49–67.
2. Nozu T., Miyagishi S., Nozu R., Takakusaki K., Toshikatsu O. Altered colonic sensory and barrier functions by CRF: Roles of TLR4 and IL-1. *J. Endocrinol.* 2018;239:241–252.
3. Nozu T., Miyagishi S., Nozu R., Takakusaki K., Okumura T. Repeated water avoidance stress induces visceral hypersensitivity: Role of interleukin-1, interleukin-6, and peripheral corticotropin-releasing factor. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;32:1958–1965

参 考 论 文

1. Zeng Y., Zhang H., Zong L., Tsao R., Arie H., Izumo T., Shibata H., Mine Y. *Lactobacillus pentosus* S-PT84 prevents LPS-induced low-grade chronic inflammation in a C57BL/6J mouse model. *J. Funct. Foods.* 2019;62:103526.
2. Sakai Y, Arie H, Ni Y, Zhuge F, Xu L, Chen G, Nagata N, Suzuki T, Kaneko S, Ota T, Nagashimada M. *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 improves steatohepatitis by maintaining gut permeability. *J. Endocrinol.* 2020;247:169–181.