

Grape Seed Extract Eliminates Visceral Allodynia and Colonic Hyperpermeability
Induced by Repeated Water Avoidance Stress in Rats
（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）

有江 秀行

（野津 司、宮岸 沙織、井田 正幸、出雲 貴幸、柴田 浩志）

研究目的

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的胃腸障害である¹。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^{2,3}。

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⁴。我々は最近、IL-6、IL-1 β 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^{5,6}。

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⁷。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^{8,9}。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^{10,11}。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。

材料・方法

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

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⁶。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⁵。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。

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。

結果・考察

これまでの研究と同様に、WASを繰り返し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^{5,6}。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¹²⁻¹⁵。実際に今回の研究でも反復WASによりIL-6、IL-1 β 及びTLR4の発現上昇が認められた。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ことが知られている¹⁶。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。そこで、TJ構造において腸管バリア保護作用を示すマーカーclaudin-3、claudin-7、ZO-1及び腸管バリア破綻に関与するマーカーclaudin-2の大腸でのタンパク質の発現を評価

した。その結果、反復WASによりclaudin-2は増加し、claudin-3は減少した。さらに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ことが示唆される。

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^{17,18}、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¹²。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⁵。

GSEは抗炎症作用を有することが広く知られており⁷、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。鈴木ら¹⁶により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確認されている。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関与すると考えられる。

またGSEが腸管上皮細胞のTJタンパク質の発現に直接影響する可能性を、Caco-2細胞単層上皮を用いて検討した。サイトカイン刺激により細胞間透過性が増加し、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はこれらの変化を顕著に改善した。

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報告されている¹⁹。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とから²⁰、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つとして想定される。しかしながら、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は反復WASにより誘導される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効能評価が期待される。

引用文献

1. Mearin, F., Lacy, B.E., Chang, L., Chey, W.D., Lembo, A.J., Simren, M., Spiller, R. Bowel Disorders. *Gastroenterology* 2016;150:1393–1407.
2. Kanazawa, M., Hongo, M., Fukudo, S. Visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;26 (Suppl. 3):119–121.
3. Tache, Y., Kiank, C., Stengel, A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2009;11:270–277.
4. Larauche M., Mulak A., Tache Y. Stress and visceral pain: From animal models to clinical therapies. *Exp. Neurol.* 2012;233:49–67.
5. 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.
6. 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
 7. Fine, A.M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.* 2000;5:144–151.
 8. Wang, H., Xue, Y., Zhang, H., Huang, Y., Yang, G., Du, M., Zhu, M.J. Dietary grape seed extract ameliorates symptoms of inflammatory bowel disease in IL10-deficient mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013;57:2253–2257.
 9. Yang, G., Xue, Y., Zhang, H., Du, M., Zhu, M.J. Favourable effects of grape seed extract on intestinal epithelial differentiation and barrier function in IL10-deficient mice. *Br. J. Nutr.* 2015;114:15–23.
 10. Liu, W., Zhao, S., Wang, J., Shi, J., Sun, Y., Wang, W., Ning, G., Hong, J., Liu, R. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates inflammation and adiposity by modulating gut microbiota in high-fat diet mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017;61:1601082.
 11. Gil-Cardoso, K., Gines, I., Pinent, M., Ardevol, A., Arola, L., Blay, M., Terra, X. Chronic supplementation with dietary proanthocyanidins protects from diet-induced intestinal alterations in obese rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017;61:1601039.
 12. Dlugosz, A., Nowak, P., D'Amato, M., Mohammadian Kermani, G., Nystrom, J., Abdurahman, S., Lindberg, G. Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2015;27:1747–1754.
 13. Scully, P., McKernan, D.P., Keohane, J., Groeger, D., Shanahan, F., Dinan, T.G., Quigley, E.M. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105:2235–2243.
 14. Dinan, T.G., Quigley, E.M., Ahmed, S.M., Scully, P., O'Brien, S., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Shanahan, F., Keeling, P.W. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: Plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006;130:304–311.
 15. Ortiz-Lucas, M., Saz-Peiro, P., Sebastian-Domingo, J.J. Irritable bowel syndrome immune hypothesis. Part two: The role of cytokines. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2010;102:711–717.
 16. Suzuki, T., Yoshinaga, N., Tanabe, S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 2011;286:31263–31271.
 17. Nagpal, R., Yadav, H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann. Nutr. Metab.* 2017;71 (Suppl. 1):11–16.
 18. Fukui, H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflamm. Intest. Dis.* 2016;1:135–145.
 19. Wang, Y.H., Ge, B., Yang, X.L., Zhai, J., Yang, L.N., Wang, X.X., Liu, X., Shi, J.C., Wu, Y.J. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *Int. Immunopharmacol.* 2011;11: 1620–1627.
 20. Yamakoshi, J., Tokutate, S., Kikuchi, M., Kubota, Y., Konishi, H., Mitsuoka, T. Effect of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on human fecal flora and fecal odor. *Microb. Ecol.*

Health Dis. 2001;13:25–31.