

LPS炎症モデルマウスにおける全粒穀物の炎症抑制効果に関する研究

Suppressive effect of whole-grain cereals on inflammatory status
of organs in LPS-induced inflammation model mice

蓼沼 夏希

Natsuki Tadenuma

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード：全粒穀物，炎症，食物繊維

Key words：Whole-grains, Inflammation, Dietary-fiber

1. 研究目的

肥満，糖尿病，NASH や動脈硬化性疾患などの生活習慣病の共通する基礎病態として慢性炎症があげられる[1]。急性炎症では傷害要因に対して血管と白血球が急速に応答し，傷害要因を排除するように働き比較的短期間に収束する[1]。一方で慢性炎症は急性炎症に特徴的な細胞や組織の応答もみられるが，長期に渡る低レベルのストレス応答のため炎症反応が遷延化し適応が破綻することで臓器の機能不全をもたらす[2]。しかし，慢性炎症の抑制効果を研究するにあたり，炎症誘発物質を投与した慢性炎症モデルの先行研究は少なく急性炎症モデルの研究が多い。

発酵性食物繊維の摂取により腸管内の短鎖脂肪酸濃度が上昇するという報告はマウス，ヒトそれぞれで報告されており[3]，中でも酪酸は制御性 T 細胞の誘導やマクロファージの極性化に関与して炎症・免疫反応に関わっていることが報告されている[4][5]。本研究では，全粒穀物の慢性炎症抑制効果について明らかとすることを目的とし，水溶性食物繊維に富む大麦，オーツ麦，ライ麦の 3 種類を試料に選定した。Lipopolysaccharide (LPS) を既報を参考に飲水中に混ぜ，慢性炎症モデルとして実験を行った。また，慢性炎症モデルとして適する投与方法と評価指標も併せて検討した。最後に，腸内発酵が最も顕著であった全粒大麦に着目し，炎症抑制効果の評価に適する慢性炎症モデルとして腹腔内インターバル投与を選定し有効性を検証した。

2. 研究実施内容

2.1. 実験 1 方法

〈LPS 飲水投与による全粒穀物の評価〉

4 週齢の C57/BL6J 雄マウスを用い，LPS を投与しない Std 群 4 匹，試験群 1 群 8 匹の 4 群に群分けした。AIN-93G 組成を基本として脂肪エネルギー比が 50% の高脂肪食を調製し，セルロースで総食物繊維量を合わせた (Table1)。飲水に LPS (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日) を混ぜ 4 週間自由摂取させ，その後高脂肪食を与え慢性炎症を継続させた。12 週間の飼育期間中は調製飼料と飲水を自由摂取させた。解剖当日は 8 時間絶食後イソフルラン/ CO_2 吸引下で安楽死させ，心臓より採血し，各臓器重量を計測した。盲腸より短鎖脂肪酸，肝臓，回腸より炎症マーカー mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で分析した。

Table 1 飼料組成 (g/kg diet)

	CO 群	BA 群	OA 群	RY 群
コーンスターチ	197.5	79.1	49.7	45.6
α -コーンスターチ	132.0	132	132	132
ミルクカゼイン	200.0	172.4	173.7	179.3
ショ糖	100.0	100	100	100
大豆油	70.0	70	70	70
ラード	200.0	189.3	183.9	195.5
セルロース	50.0	0.0	33.5	20.5
全粒穀物	-	206.7	206.7	206.7
ミネラルミックス	35.0	35	35	35
ビタミンミックス	10.0	10	10	10
L-シスチン	3.0	3	3	3
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5

2.2. 実験1 結果

全粒大麦摂取群で盲腸中短鎖脂肪酸の増加が確認された。炎症マーカーにおいて LPS 投与群と非投与群で有意差が無かったことから LPS の経口投与では炎症は誘発されないことが明らかとなった。

2.3. 実験2 方法

〈LPS 飲水投与と腹腔内投与の比較〉

LPS を用いた炎症モデルの再検討のため、C57/BL6J 雄成熟マウスに LPS (0.5, 1.0, 5.0mg/kg 体重) を濃度別で胃内と腹腔内に投与し 2 時間後に解剖を行った。また、LPS 誘発の炎症持続時間を検討するため LPS (1.0mg/kg 体重) を腹腔内投与し 24 時間、48 時間、72 時間と経時的に解剖を実施した。肝臓炎症マーカーをリアルタイム PCR 法、血清 TNF- α を ELISA 法で分析した。

2.4. 実験2 結果

LPS 胃内投与群では生理食塩水投与群と有意差が無かったことから LPS の経口投与は炎症惹起しないことが再確認された。一方腹腔内投与群では肝臓炎症マーカーが高値を示し、消失時間は 2~3 日であることが分かった。炎症性サイトカインは急激に増加し 72 時間値では生理食塩水群より低値を示したが、マクロファージのマーカー、NADPH オキシダーゼのマーカーは、72 時間値においても生理食塩水投与群より高値を示したことから生体内への炎症が持続的であると捉え、慢性炎症を比較するマーカーに選定した。また、LPS 投与により、炎症性 M1 マクロファージ、炎症抑制性 M2 マクロファージ共に発現の増加が確認された。

2.5. 実験3 方法

〈LPS 腹腔内投与による全粒大麦の評価〉

4 週齢の C57/BL6J 雄マウスを用い、生理食塩水投与 (CO 群)、LPS 投与 (LP-C 群)、LPS 投与し全粒大麦を摂取する (LP-B 群) 各 8 匹の 3 群に群分けした。解剖、分析は実験 1 と同様の手順で実施した。

2.6. 実験3 結果

肝臓炎症マーカーにおいて炎症促進性 M1 マクロファージのマーカーである STAT4 において、CO 群と比較し LP-C 群で有意に高値を示し炎症が確認された。LP-B 群は CO 群と有意差が見られな

かったことから炎症の上昇抑制が確認された。NADPH オキシダーゼのマーカーでは、活性化のスイッチとされる p47^{phox} において LP-B 群が LP-C 群と比較し有意に低値を示し、全粒大麦の摂取が NADPH オキシダーゼの活性化を抑制した可能性が示唆された。盲腸中短鎖脂肪酸では LP-B 群が LP-C 群と比較し、短鎖脂肪酸、有機酸が有意に増加した。STAT3, STAT4, p47^{phox} でそれぞれ正の相関が確認され、炎症反応として M1, M2 どちらも LPS 投与により亢進することが示された。盲腸中の酢酸と酪酸は肝臓中の STAT3 と負の相関関係が確認された。STAT3 は M2 マクロファージであり炎症制御性に働く遺伝子だが、STAT3 と STAT4 において正の相関があったことから、本研究のみでは直接的な効果は明らかではないが炎症抑制に寄与した可能性が考えられる。また、STAT3 を抑制したメカニズムとして短鎖脂肪酸のマクロファージにおける NF- κ B 経路の阻害が考えられる。P47^{phox} は酪酸と負の相関関係があり、NADPH オキシダーゼの活性化抑制には酪酸の増加が寄与していると示唆された。

3. まとめと今後の課題

LPS の経口投与では炎症は惹起されず、慢性炎症モデルには LPS (1.0mg/kg 体重) を週 2 回腹腔内投与することが有効であった。また、炎症マーカーにはマクロファージと NADPH オキシダーゼのマーカーで比較することが有用であった。

全粒大麦の摂取によって STAT 4 の上昇抑制が確認され炎症抑制効果が示唆された。また、短鎖脂肪酸と肝臓炎症マーカーにおいて負の相関が確認されたことから全粒大麦摂取による短鎖脂肪酸の増加が炎症抑制に寄与した可能性が考えられる。今回比較したのは遺伝子発現であるため、結果として得られる反応については今後代謝産物等を併せて検討していく必要がある。

主要参考文献

- [1] 小川佳宏:疾患発症のニッチに潜む慢性炎症の分子プロセス. 実験医学, Vol.28 No.11, 羊土社, 2010.
- [2] Gökhan S. Hotamisligil:Inflammation and metabolic disorders. Nature, 444, 860-867, 2006.
- [3] Gijs den Besten: The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J Lipid Res, 54(9), 2325-40, 2013.

[4] Sanchez HN: B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids. *Nature Communications*, 60, 2020.

[5] Jian Ji: Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. *Scientific Reports*, 6, 24838, 2016.

付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所の研究助成 (DB2114) 「LPS 炎症モデルマウスにおける全粒穀物の炎症抑制効果に関する研究」を受けたものです。