

令和5年度 奈良女子大学研究推進プロジェクト経費研究報告書

奈良女子大学長 殿

研究代表者 菅 尚子
 所属・職 研究院生活環境科学系・助教
 氏 名 菅 尚子

本年度の交付を受けた研究推進プロジェクト経費について、下記のとおり報告いたします。

申請区分	<input type="checkbox"/> (A) 多様な人材の協働による研究
	<input checked="" type="checkbox"/> (B) 一般研究
研究課題	NAFLD/NASH発症・進展モデルにおける腸管バリアの破綻抑制を介したプロバイオティクスの効果検証

1. プロジェクトの成果

【研究背景・目的】

近年、NAFLD/NASH患者における腸管の炎症や腸管透過性の顕著な増加が示されており、腸管バリア機能の低下とNAFLD/NASH発症・進展との関連性が注目されつつある。すなわち、腸管バリアの機能維持や是正はNAFLD/NASHの新たな治療ターゲットとして考えられている。一方、NAFLD/NASHの治療において、プロバイオティクスの投与による有効性が臨床試験で示されている。そこで、本研究では「NAFLD/NASH発症・進展モデルにおける腸管バリアの破綻抑制を介したプロバイオティクスの効果」を明らかにすることを目的として検討を進めた。

【研究結果1：細胞実験】

ヒト結腸癌由来細胞株（Caco-2）をTranswellプレートに播種し、21日間培養することで腸管上皮様に分化させた。Transwellの内外の間の電気抵抗値を測定し、腸管バリア機能の評価を行った。腸管バリアの機能低下はCaco-2細胞の培養上清に病原体の成分であるリポ多糖（LPS）を添加することにより惹起させる予定であったが、細胞毒性が生じない濃度において顕著な電気抵抗値の変化は認められなかった。そこで、Poly I:C、TNF- α 、INF- γ 、IL-1 β 等のサイトカイン、遊離脂肪酸を用いて、腸管バリア機能の低下が生じるいくつかの系を構築した。また、FITC-dextran 4の透過率を測定することでもバリア機能の評価を行った。

予備試験として*Lactobacillus plantarum*（1種）の生菌、加熱殺菌体、培養上清を用いて腸管バリア機能の低下の抑制を評価した。電気抵抗値については、*Lactobacillus plantarum* およびサイトカインを処理後、いずれも12時間後までの抑制効果を確認したが24時間後以降では抑制効果は認められなかった。一方で、透過性については、*Lactobacillus plantarum*を処理した細胞では、48時間後までサイトカインによる上昇を抑制した。

【研究結果2：動物実験】

細胞実験において有用なプロバイオティクスを選定し、動物実験に用いる予定であったが、予定を変更し、本研究室においてすでに抗酸化作用等が確認された果実から分離した菌を実験に使用した。

Fig. 1に示す通り、コントロール食を給餌させた群 (Ct)、高脂肪食 (HF) を給餌させ、かつ免疫を活性化させる Poly I:Cを投与する群、それらに果実由来細菌 (Bact A, Bact B) を与える群に分け13週間飼育した。解剖1週間前に、マウスにLactuloseとMannitolをマウスに経口投与し、代謝ケージを用いて尿を採取した。(尿中のLactulose/Mannitol比を求めることで、腸管バリア機能を評価する予定であるが、まだ結果は得られていない。) 飼育期間中、マウスの摂餌量を測定した。13週間後、安楽死させたマウスを解剖し、NASH/NAFLDの進展指標となるAST・ALT、血清コレステロール濃度、血清中性脂肪濃度について、測定した。また、肝臓・脾臓・腎臓重量を測定するとともに、肝臓コレステロール量についても評価した。

各群で体重量の有意な差は認められなかった。血清中のAST・ALT値についても、有意差はなかったものの、Bact A・B投与群では抑制傾向にあった (Fig 2A, 2B)。

細胞実験については、評価モデルの構築の段階にとどまっている為、引き続き、腸管バリア機能の低下抑制効果を有するプロバイオティクスの探索と機序解明を行う予定である。また、動物実験においては腸の透過性評価が行えていないため、引き続き解析を行い、顕著な結果が認められた場合には再現性を確認する予定である。

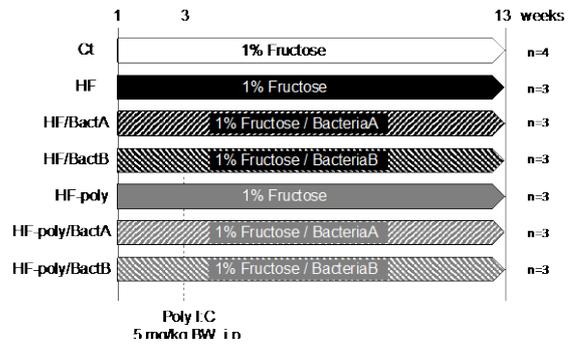


Fig. 1 動物実験の群分けおよびスケジュール

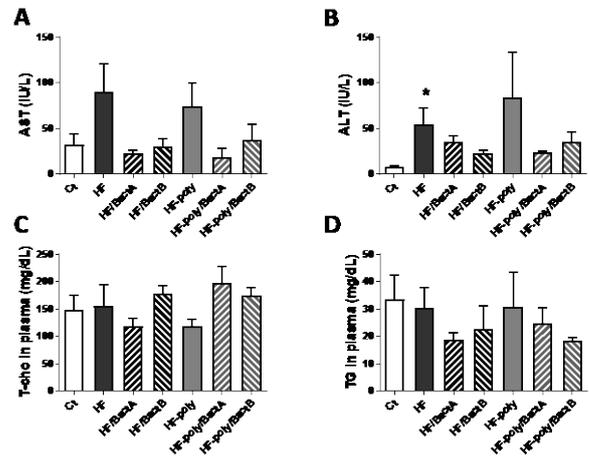


Fig. 2 血清中のマウス肝障害パラメータ

2. プロジェクト成果の発表

(論文名, 発表者, 発表雑誌等, 巻・号, 発表年等)

なし

令和6年度、学会発表および論文発表を計画している。

3. 支 出 内 訳						
備 品 費		消耗品費	旅 費	謝金等	その他	計
品 名	金 額					
代謝ケージ 試薬等 インキュベータ修繕	191,301円	566,333円			40,590円	798,224円