慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	カテコラミンによる腸管免疫機構の修飾 : 腸内細菌叢への効果と機序の解明
Sub Title	Effects of catecholamine on gut immune systems
Author	森崎, 浩(Morisaki, Hiroshi) 鈴木, 武志(Suzuki, Takeshi)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 「急性期重症患者で過剰に分泌されている内因性カテコラミンが腸管免疫機構及び腸内細菌叢を修飾する」との仮説を基に実験を行い, 高濃度ノルエピネフリン存在下において臨床検体由来の大腸菌及び表皮ブドウ球菌の増殖能が亢進傾向を認めたが, 侵襲下で腸管内腔に過剰に分泌された内因性カテコラミン濃度程度では腸内細菌叢及び腸管免疫機構へ与える影響はごくわずかであることを見出した。 Although the present study demonstrated that high concentoration of norepinephrine stimulated bacterial proliferation of Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis from clinical specimen, the concentrations of catecholamine in gut lumen were relatively low in sepsis. These datas suggest that endgenous catecholamine has little effects to modify intestinal badterial flora and gut immune systems.
Notes	研究種目 : 基盤研究(B)(一般) 研究期間 : 2013～2015 課題番号 : 25293367 研究分野 : 麻酔学・集中治療医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25293367seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(B)（一般）
研究期間：　2013～2015
課題番号：　２５２９３３６７

研究課題名（和文）カテコラミンによる腸管免疫機構の修飾：腸内細菌叢への効果と機序の解明

研究課題名（英文）Effects of catecholamine on gut immune systems.

研究代表者
森崎　浩（MORISAKI, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：６０１８２２２６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「急性期重症患者で過剰に分泌されている内因性カテコラミンが腸管免疫機構及び腸内細菌叢を修飾する」との仮説を基に実験を行い、高濃度ノルエピネフリン存在下において臨床検体由来の大腸菌及び表皮ブドウ球菌の増殖能が亢進傾向を認めたが、侵襲下で腸管内腔に過剰に分泌された内因性カテコラミン濃度程度では腸内細菌叢及び腸管免疫機構へ与える影響はごくわずかであることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Although the present study demonstrated that high concentoration of norepinephrine stimulated bacterial proliferation of Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis from clinical specimen, the concentrations of catecholamine in gut lumen were relatively low in sepsis. These datas suggest that endgenous catecholamine has little effects to modify intestinal badterial flora and gut immune systems.

研究分野：　麻酔学・集中治療医学

キーワード：　カテコラミン　敗血症　腸内細菌　腸管免疫機構

１．研究開始当初の背景

重度敗血症あるいは敗血症性ショック患者の死亡率は徐々に低下傾向にある一方、罹患率はむしろ増加し、敗血症に伴う死亡者数は減少していない(N Engl J Med 2003;348:1546)。敗血症は感染に伴う早期からの過度の交感神経緊張と炎症反応、続発する免疫応答低下を特徴としている(Nature 2002;420:885)。交感神経系賦活化に伴うカテコラミンの過剰分泌と tumor necrosis factor-α等の炎症性サイトカインにより、早期から心臓を含む臓器機能傷害を来たし(Crit Care Med 1999;27:1309, J Signal Transduct 2011;2011:179057)、また腸管壁防御機構も傷害される (Crit Care Med 2009;37:1024)。敗血症晩期にはリンパ球等の免疫担当細胞がアポトーシスとなり免疫不全状態に陥る(Contrib Microbiol 2011;17:125)。一方、持続的なカテコラミン刺激は心筋細胞のアポトーシスを通じ心機能傷害を来たすと共に(Jpn Heart J 2000;41:385, Cardiovasc Res 2000;45:713)、腸管粘膜を構成する細胞のみならず粘膜固有粘膜層に多数存在するリンパ球もアポトーシスに陥る(Crit Care Med 1999;27:1230)。さらに敗血症では、腸管上皮細胞やパネート細胞から分泌されるディフェンシン等の抗菌物質分泌量が減少する(World Emerg Med 2010;1:138)。腸管内腔には約 100 兆個の腸内細菌が生息し(Nat Rev Immunol 2004;4:478)、宿主は全身の 7 割に及ぶリンパ球を腸管周囲に配置し強固な腸管免疫機構を構築している。ひとたび腸管免疫機構が破綻すると生体内への細菌移行(bacterial translocation)が誘発され、腸管関連リンパ組織(Gut associated lymphoid tissue; GULT)を刺激し、炎症反応を賦活化する(Ann Surg 1998;228:518)。申請者らは、”the canary of the body”と称され、急性期重症患者の治療標的臓器と認知された腸管壁防御機能にかねてより着目し、制御機構破綻の機序解明と対策を検討してきた(Crit Care Med 2009;37:1024, Shock2007;28:101, Anesth Analg 2005;101;265, Anesthesiology 2003;98:1407, Anesthesiology 2001;94:263,)。

最近の研究によると、ノルエピネフリンやエピネフリン等のカテコラミンが腸管内腔にも分泌され、腸内細菌叢の恒常性や毒性を制御している(Nat Rev Microbiol 2008;6:111-120, PNAS 2006;103:10420)。例えば、緑膿菌はノルエピネフリン刺激により毒性を増し(Appl Microbiol Biotechnol 2009;84:763)、また腸管内腔のノルエピネフリン濃度増加はグラム陽性菌・陰性菌の発育を制御している(Trends Microbiol 2008;16:55)。重症患者では、交感神経系賦活化により自ずと血中カテコラミン濃度は高値となり、腸管内腔のカテコラミン高値が生体免疫機構と密接な関係にある腸内細菌叢の制御に関与している可能性が高い。当研究室では、これまで敗血症モデルにおけるβ遮断薬の効果を検討し、β遮断薬持続投与がラット敗血症心筋のβ1 受容体密度を保ち、摘出灌流心標本において心仕事量と心筋酸素利用効率を健常心筋と同程度に維持することを明らかにした(Crit Care Med 2005;33:2294)。本稿は米国集中治療医学会機関誌の Editorial において、敗血症治療における発想の大胆さから「β-blocker during sepsis: Inspired or insane?」とのタイトルでの論評を受けている。さらに、□遮断薬持続投与が敗血症ラットモデルの死亡率を改善し、その機序として感染源である腹腔内炎症反応と腸管壁粘膜傷害を抑えることを見出した(Intensive Care Med 2011;37:1849)。これまでの当研究室が発信してきた腸管壁防御機構に関する研究とβ遮断薬の臓器保護に関する研究成果を基に、本研究では”カテコラミン”をキーワードに敗血症におけるカテコラミン過剰分泌が腸管免疫機構と腸内細菌叢へ及ぼす影響を明らにし、カテコラミン受容体遮断薬（特にβ遮断薬）による腸内細菌叢制御と腸管免疫機構への保護効果ならびに生体免疫を担うリンパ球のアポトーシスとの関係を探求する。

２．研究の目的

生体に侵襲が加わると交感神経系の賦活化に伴い、分泌された内因性カテコラミンはαあるいはβ受容体を刺激し、心血管系のみならず生体免疫能をも修飾する。腸管には生体免疫に重要なリンパ球の約 7 割が存在し、100 兆個にも及ぶ腸内細菌の生体内侵入を未然に防ぐ複雑な腸管壁防御機構を構築している。申請者らは「敗血症患者をはじめとする急性期重症患者で過剰に分泌されている内因性カテコラミンが直接あるいは間接的に、生体免疫機構の根幹をなす腸管免疫機構及び腸内細菌叢を修飾する」との仮説を立て、心臓を含む臓器機能保護効果が期待されるカテコラミン受容体遮断薬（βブロッカー）が腸管免疫機構の保護ならびに腸内細菌叢変化の制御し、重症患者擬似モデルの生体免疫機構を堅持することを明らかにする研究計画を立案した。

３．研究の方法

（１）カテコラミン刺激による腸管免疫機構への修飾を探求する。具体的には in vitro の系（培養下）において、CD4+T リンパ球サブセットのカテコラミン刺激における機能的変化をサイトカインプロファイリングで同定し、これら細胞におけるアポトーシス誘導を検討する。その上で、腸管上皮細胞、パネート細胞からの生理的抗菌物質（ディフェンシン等）への効果を細胞内 mRNA ならびに蛋白レベルの変化で検討する。

【実験 1】カテコラミン刺激による腸管内

CD4+T リンパ球サブセットのサイトカイン分泌能、分化及びアポトーシス誘導性の検討
腸管内の代表的な CD4+T リンパ球サブセット (helper T 1 cell (Th1), helper T 2 cell (Th2), Helper T 17 cell (Th17), regulatory T cell (Treg)におけるカテコラミン刺激の影響を検討する。
① サイトカイン分泌能の評価：
健常マウスの小腸及び大腸を採取後、腸管粘膜固有層に存在する T リンパ球を採取する。EDTA 及びコラゲナーゼの各種酵素処理後、遠心分離により細胞塊を得る。次に Nylon wool カラムを用いて、T リンパ球のみを抽出する。この方法で採取された細胞の 90%以上が T リンパ球となる。単離 T リンパ球にそれぞれドパミン、エピネフリン、ノルエピネフリンのカテコラミン 3 分画を実験 1 と同様に濃度別 (0, 5, 50, 100, 200, 500μM)に添加し 24-48 時間培養する。培養後、培養上清を回収し各種サイトカイン濃度を ELISA 法にて測定し分泌能を評価する。
② CD4+T リンパ球サブセット分化への影響
カテコラミン刺激による CD4+T リンパ球サブセットへの分化への影響を検討する。具体的には、前述の方法で T リンパ球単離後、RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN)を用いたカラム法により mRNA を溶出し、各サブセット特異的なマスター遺伝子を標的とした real time PCR 法にて分化の量的変化を測定する。増幅用プライマーの標的遺伝子には、Th1 は T-bet、Th2 は GATA-3、Th17 は RORc、Treg は FOXP3 を予定している。

【実験 2】カテコラミン刺激による腸管内生理的抗菌物質の分泌能への影響の検討
腸管は健常状態でも腸内細菌の増殖や生体内侵入を防ぐ目的で、その内腔に生理的抗菌物質を分泌している(Nature Immunology 2000;1:113)。本研究ではカテコラミン刺激における生理的抗菌物質分泌能への影響を探求する。具体的には、小腸ならびに大腸から EDTA 試薬による細胞接着破壊によりパネート細胞を含む小嚢腺をナイロン膜ろ過法により単離する。ドパミン、エピネフリン、ノルエピネフリンのカテコラミン 3 分画を濃度別(0, 5, 50, 100, 200, 500 μM)に添加、24-48 時間培養する。培養後、培養上清を回収した後、液体中の抗菌物質の濃度を ELISA 法にて測定し分泌能を評価する。

【実験 3】カテコラミン刺激による T リンパ球アポトーシス誘導の検討
カテコラミン刺激と T リンパ球ならびに小嚢腺のアポトーシス誘導の関連性を明らかにするため、カテコラミン刺激による腸管免疫機構修飾の機序を解明する。具体的には、前述の方法により腸管粘膜固有層 T リンパ球ならびに小嚢腺を単離後、ドパミン、エピネフリン、ノルエピネフリンのカテコラミン 3 分画を濃度別に添加し 24-48 時間培養する。その後、T リンパ球及び小嚢腺のアポトーシスをフローサイトメトリーにて評価する。早期アポトーシスの検出には AnnexinV を用い、晩期アポトーシスの検出には Popidium Iodine を用いる予定である。

（2）カテコラミン刺激による腸内細菌叢への影響を検討する。具体的には腸内細菌叢の優位菌種に対し生体外実験系でカテコラミン添加後、その増殖能及び走化性を評価する。

【実験 1】増殖能の評価：培養後、対照群、カテコラミン群の嫌気的及び好気的培養標本を採取し 16s ribosomal RNA を標的とした細菌特異的プライマーを用いた real time PCR 法で量的な細菌構成の解析を行い、各群を比較しカテコラミンによる増殖能への影響を検討する。

【実験 2】細菌走化性の評価：Escherichia coli や Pseudomonas aerginosa 等の一部細菌種は鞭毛等を駆使し移動する走化性
を有するが、細菌走化性の亢進は生体への侵入を促進し種々の感染症と関連している (Nat Rev Microbiol. 2010;8:634)。本研究ではカテコラミン刺激による細菌走化性について、CTC 試薬を用いた蛍光染色で評価する。CTC は生細菌に取り込まれ還元されることで蛍光性を生成する。具体的には、上記条件下で培養後、標本をリン酸緩衝液に懸濁し CTC 試薬を添加 37℃で 30 分インキュベートする。その後、対照群、カテコラミン群に割り付け、細菌を液体培地に懸濁し 24 穴マイクロプレートに 1ml 程度滴下後、カテコラミン 3 分画を濃度別に添加する。最後に各穴に液体培地を入れた膜フィルター内蔵カップを重層する。走化性を有する細菌種はこの膜を通過可能なため、継時的に蛍光強度を測定し走化性を評価できる。

【実験 3】細菌カテコラミン様受容体の量的変化の評価：最近の研究により、細菌がカテコラミン様受容体 QseC sensor kinase 及び QseE sensor kinase を有することが指摘され、カテコラミンが細菌の受容体に結合して様々な影響を与えることが明らかとなった (Infection and Immunity 2012;80:688)。本研究ではカテコラミン刺激による細菌受容体 QseC 及び QseE sensor kinase の発現変化を検討する。具体的には、培養下でカテコラミン濃度別に刺激した細菌種を採取、mRNA 溶出後、各 sensor kinase 特異的な配列プライマーによる real-time PCR 法によって検討し、カテコラミン様受容体の発現の量的変化を評価検証する。

（3）カテコラミン刺激による腸管免疫能ならびに腸内細菌叢への影響を明らかにした後、αならびにβ遮断薬の効果と有用性を検討する。具体的には培養系において□遮断薬

（選択的α1 遮断薬、選択的α2 遮断薬、非選択性α遮断薬）ならびにβ遮断薬（選択的β1 遮断薬、非選択性β遮断薬）を添加し、腸管免疫及び腸内細菌叢に対するカテコラミン受容体の特異性を明らかにする。

（４）腹膜炎惹起敗血症モデル動物を用いて腸管内へのカテコラミン分泌への影響を検討し、同時にαならびにβ遮断薬の CD4+T リンパ球サブセットへのアポトーシス誘導、生理的抗菌物質の腸管内腔への分泌能を評価すると共に、腸内細菌叢への修飾を in vivo 実験系で探求する。

【実験 1】腹膜炎惹起敗血症動物における腸管内カテコラミン 3 分画の測定：敗血症における腸管内腔へのカテコラミン分泌を確認する。具体的には敗血症惹起後 24-48 時間の時点で小腸内容物を採取、遠心分離により上清を得る。上清中のカテコラミン 3 分画を ELISA 法により定量解析する。

【実験 2】カテコラミン遮断薬の腸管免疫機構保護効果の検討：本研究計画の総括として、各種遮断薬（□□選択的遮断薬を想定）の腸管免疫機構保護効果を、①腸内細菌叢の変化、②腸管内 CD4+T リンパ球サブセットのサイトカイン分泌能と分化能およびアポトーシス、③生理的抗菌物質の分泌能、④腸管粘膜細胞のアポトーシス（免疫染色により同定）の点から評価する。

４．研究成果

本研究では、「敗血症患者をはじめとする急性期重症患者で過剰に分泌されている内因性カテコラミンが直接あるいは間接的に、生体免疫機構の根幹をなす腸管免疫機構及び腸内細菌叢を修飾する」との仮説を基に、その機序とカテコラミン受容体遮断薬による腸内細菌叢と腸管免疫機構への保護効果を検討してきた。最終年度である平成 27 年度は前年度に引き続き、敗血症患者で高頻度に検出される菌種のうち大腸菌・表皮ブドウ球菌に焦点を当て、臨床検体由来の菌株を用いてカテコラミン添加による細菌増殖能を生体外実験系において探求した。ノルエピネフリン添加によりこれらの増殖能の亢進傾向を認めたが、その際に用いたノルエピネフリンが実際に侵襲時に腸管内腔に存在するとされる濃度では変化せず、非常に高濃度が必要なことを見出した。次の段階として、カテコラミン刺激による腸管内生理的抗菌物質の分泌能への影響を小腸ならびに大腸から単離したパネート細胞を含む小嚢腺を用いて検討した。mRNA レベルにおいて抗菌物質（リポカリン 2、ディフェンシン）は内毒素との共培養により増幅することを見出した一方、カテコラミン添加による効果は一定の傾向を見出すことができなかった。また、カテコラミン刺激による腸管免疫への影響をＣＤ４Ｔリンパ球サブセットに焦点を当て検討を行った。健常マウスの小腸および大腸より腸管粘膜固有層に存在するリンパ球を採取し、採取したリンパ球にカテコラミン 3 分画とカテコラミン遮断薬を加え培養を行い、48 時間培養後の情勢中のサイトカインの評価を行った。カテコラミン無添加対照群においても培養中に細胞死に至る割合が高く、サイトカイン分泌も微量であったことからカテコラミンの影響は十分探索することが困難であった。当初の計画においては、これらの細胞外実験系の結果を基に、カテコラミン遮断薬の効果を生体内実験系で探求する計画であったが、生体内実験系において侵襲時に腸管内に存在する濃度においては腸内細菌叢及び腸管免疫機構を修飾する基礎データが不十分となり、その計画に着手できていない。総括として、一連の研究により仮説に反して、侵襲下で腸管内腔に過剰に分泌された内因性カテコラミンが腸管免疫機構及び腸内細菌叢へ与える影響はごくわずかであり、これまでに報告されているカテコラミン遮断薬による予後改善はこれらを介した機序によるものではないことが強く示唆された。現在までの研究データを取りまとめ、国際学会ならびに国際誌での公表を準備している。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　０件）

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）

○取得状況（計　０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
森﨑　浩（MORISAKI, Hiroshi）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60182226

(2)研究分担者
鈴木　武志（SUZUKI, Takeshi）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号： 80327600

(3)連携研究者
なし