

# 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

山梨大学大学院総合研究部

助教 石山詩織

## 【研究テーマ】

大麦によるサイトカインストーム抑制を介した呼吸器感染症の重症化予防

## 【背景】

代謝が低下した高齢者や生活習慣病など基礎疾患を有する患者は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化率が高いことが報告されている (Williamson E. J. et al., Nature. 2020)。日本を含めた多くの国が、重症化患者の増加による医療崩壊を防ぐために、ロックダウンや緊急事態宣言を実施した。しかし、緊急事態宣言等による人々の行動制限は、大きな社会的損失を被ることとなる。また、ワクチン接種に関しても、開発期間、変異種等の出現による抗原性の低下等の問題がある。それゆえ、今後新たな呼吸器感染症が蔓延したとしても、食習慣の改善等による重症化させない身体作り、といった価値観の転換やそのためのイノベーションが必要である。

このような背景の中、申請者は、以下を明らかにした。

1. 胚発生初期 (2 細胞期) に MEM 培地で体外培養したマウス (対照は KSOM 培地) は、生後に高脂肪食を摂取させると、「炎症性サイトカイン」を高分泌する (Ishiyama S. et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2021)。
2. 2 型糖尿病や合併症 (脂肪肝、腎臓病) を呈すること、これらは食後高血糖の改善および腸内細菌を改善する作用を有する大麦投与によって改善する (Ishiyama S. et al., Biochemistry and Biophysics Reports. 2021) (Ishiyama S. et al., Frontiers in Endocrinology. 2021.)。
3. MEM マウスに感染性炎症惹起物質であるリポ多糖 (LPS) を投与すると、KSOM 非糖尿病マウスと比較して、死亡率が顕著に高い (未発表データ)。

これまでの研究によって 2 型糖尿病と COVID-19 重症化の主要因は共に、炎症性サイトカイン過剰分泌 (サイトカインストーム) が関与すると推定されている。上記の知見は、代謝性疾患と COVID-19 などの呼吸器感染症により相乗・相加的

に炎症性サイトカインの分泌が多くなり、呼吸器系感染症の重症化に繋がると考えられるが、その明確な根拠は未だない。

そこで、本研究では、申請者が開発した炎症性サイトカインを高発現する2型糖尿病 MEM マウスに、感染性炎症惹起物質 LPS を投与して、「感染-糖尿病性サイトカインストームによる感染症の重症化メカニズム機構」を明らかにすることを目的とする。さらに、「食後高血糖および腸内細菌叢の改善により炎症性サイトカインの発現を抑制しうる大麦が感染症による急性炎症誘導時の重症化を抑制できるか」を検証するものである。

### 【方法】

MEM マウスおよび対照群として2細胞期胚を通常培地 (KSOM) に暴露した ICR マウス (以下対照マウス) に高脂肪・高シヨ糖食を1-2ヶ月程投与した後に、MEM マウスおよび対照マウスを各2群に分け、片方に対照食 (高脂肪・高米粉食)、もう片方に大麦食 (高脂肪・高大麦粉食) を与える。試験食投与開始から1-2ヶ月後に、感染時に炎症を誘導する LPS<sup>1)</sup> (リポ多糖; 1.25 mg/g Body Weight) を投与し、感染-糖尿病性サイトカインストームモデルを作成し、投与後48時間の感染症と臓器障害および大麦投与による抑制効果を検討する。

<sup>1)</sup> LPS: COVID-19 においても障害を受けた肺等から侵入し、炎症反応を増強させるグラム陰性菌の膜成分

### 【結果および考察】

以下に MEM マウスおよび KSOM マウスへの LPS 投与後における病変率 (図1) および死亡率を示す (図2)

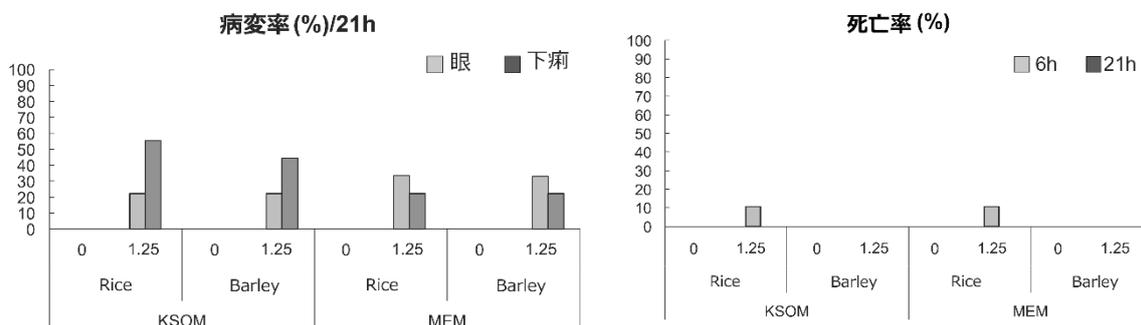


図1 LPS 投与後 21 時間時における各病変率 (%)

図2 LPS 投与後 6 時間および 21 時間時における死亡率 (%)

LPS 投与後 21 時間において、MEM マウスでは、眼球異常が 20%、下痢が 30% 観察された (図1)。また、LPS 投与後 48 時間で、KSOM マウス、MEM マウス、と

もに米粉食群（対照）において死亡が観察された（図 2）。今回のマウスでは、対照 KSOM マウスと MEM マウスとの間で血糖値の差が大きくなかったため、病変率や死亡率に差が観察されなかったことが考えられる。

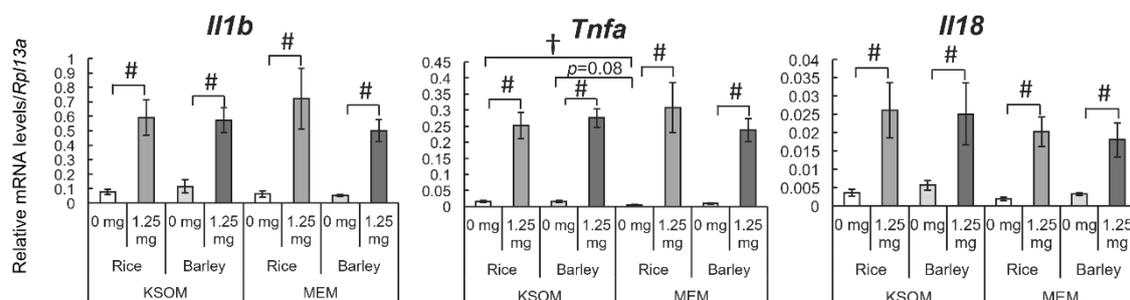


図 3 LPS 投与後 6 時間の末梢血における炎症サイトカイン遺伝子発現  
 平均値±標準誤差で示し、有意差は# $P < .05$  (vs. 0 mg)、† $P < .05$  (vs. KSOM)で示した。

LPS 投与後 6 時間の MEM マウスの末梢血では、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  やマクロファージ CD68 の遺伝子発現量が、米粉食群（対照）より大麦食群において低い傾向であった（図 3）。LPS 投与後 6 時間という急激な炎症反応においても、感染する前段階において大麦を摂取している状態であると炎症反応としての炎症性サイトカインの発現の増大を抑制することができることが示唆された。

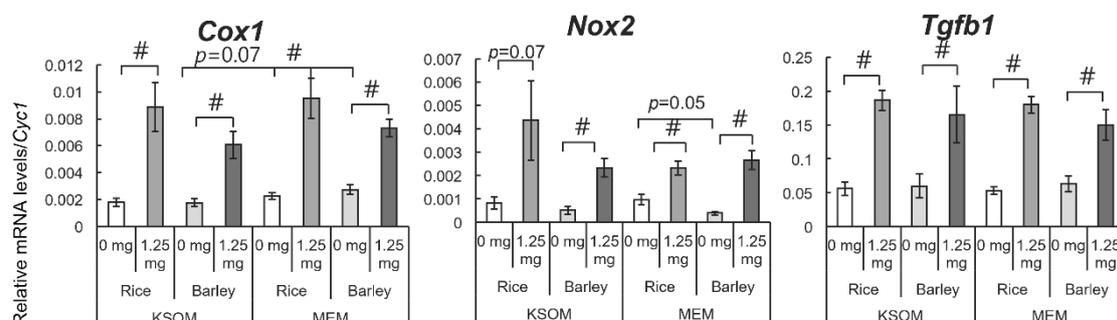


図 4 LPS 投与後 48 時間の肝臓における炎症サイトカイン(COX1)、酸化ストレス関連因子(NOX2)および線維化関連因子(TGFB1)の遺伝子発現  
 平均値±標準誤差で示し、有意差は# $P < .05$  (vs. 0 mg)で示した。

LPS 投与後 48 時間の MEM マウスの肝臓では、ROS 産生酵素 *Nox2* 遺伝子発現や炎症性サイトカインである *Cox1*、線維化メディエーターである *Tgfb1* の遺伝子発現量は米粉食群（対照）より大麦食群で低下傾向を示した（図 4）。これは、肝臓といった臓器にまで広がった感染後の炎症反応においても、感染前に大麦を摂取していることで炎症性サイトカインの発現が抑制される可能性があることが示唆されたことを示す。また、炎症性サイトカインの *Cox1* や ROS 産生酵素

*Nox2* の遺伝子発現においては、KSOM マウスでも同様に、対照の米粉食群よりも大麦食群において発現量の低下傾向が観察された。このことから、糖尿病を発症している状態だけでなく、健常な状態においても感染前的大麦食摂取は感染後の臓器における炎症性サイトカインの発現を抑制する可能性が示唆された。

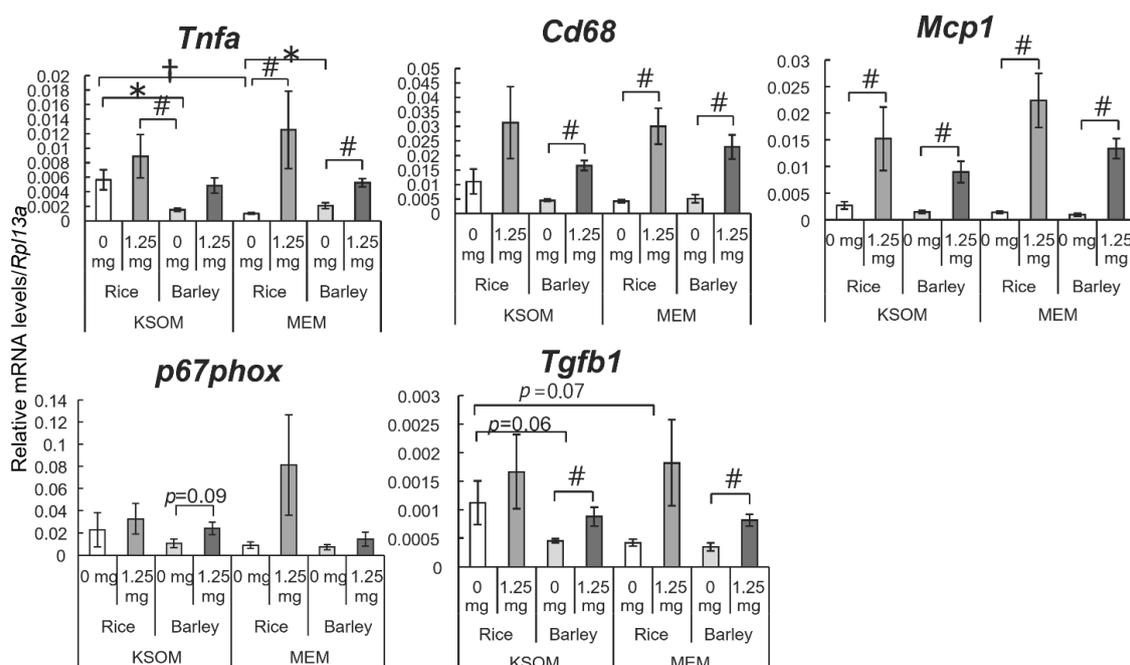


図5 LPS投与後48時間の腎臓における炎症サイトカイン( $TNF\alpha$ , CD68, MCP1)、酸化ストレス関連因子(*p67phox*)および線維化関連因子(*TGFB1*)の遺伝子発現平均値±標準誤差で示し、有意差は\* $P < 0.05$  (vs. Rice)、# $P < 0.05$  (vs. 0 mg)、+ $P < 0.05$  (vs. KSOM)で示した。

LPS投与後48時間のMEMマウスの腎臓では、炎症性サイトカインである *TNF $\alpha$* 、*Cd68* や ROS 産生酵素 *p67phox* や線維化メディエーター *Tgfb1* の遺伝子発現量は米粉食群(対照)より大麦食群で低下傾向を示した(図5)。またKSOMマウスでも同様に、対照の米粉食群よりも大麦食群において、炎症性サイトカイン *TNF $\alpha$*  や線維化メディエーター *Tgfb1* の遺伝子発現量の低下あるいは低下傾向が観察された。これらの結果も肝臓と同様に、腎臓にまで広がった感染後の炎症反応において、感染前の日常的な大麦摂取は炎症性サイトカインの発現を抑制される可能性があること、また糖尿病を発症していない状態においても感染前的大麦食摂取は感染後の腎臓炎症性サイトカインの発現を抑制する可能性が示唆された。特にCD68は、単球とマクロファージ系細胞に幅広く発現する膜糖タンパク質であり、臓器においては血中からのマクロファージ浸潤を示すマーカーとなる。このCD68の遺伝子発現が腎臓において、有意差は観察されなかったものの、対照の米粉食群よりも大麦食群において低下傾向が観察され

たことから、腎臓へのマクロファージ浸潤が大麦摂取によって抑制されている可能性が考えられ、病理解析において評価していく必要がある。

以上の結果より、感染症を発症する前の段階から日常的に大麦を摂取していることで、感染直後の急激な炎症反応においても、また、感染後の慢性的な臓器における炎症反応においても、炎症反応としての炎症性サイトカインの発現増大が抑制（サイトカインストームの抑制）されることが示唆された。COVID-19では重症化の一つとして臓器障害、中でも肝臓や腎臓で障害がみられることが報告されており、本研究の成果はこれらの炎症反応増大による重症化を抑制する可能性として肝臓や腎臓における炎症性サイトカイン発現の抑制の可能性が見出されたと考えられる。限界点としては、本研究では、大麦投与期間が2ヶ月ほどと食品投与実験においては比較的短かったため、顕著な抑制効果が観察されなかったと考える。今後は3-4ヶ月など大麦投与期間を延長した上で、さらに臓器障害の解析などを中心に研究を進めていきたい。また他の食品因子を使用して、感染前の日常的な摂取が感染後のサイトカインストームを抑制するかについて検討していき、研究成果を深めていきたい。

#### 【今後の展望】

本研究成果は、感染症の重症化を食い止められる身体づくりとして、予防的に日本食の食品因子を摂取することが、免疫健全化の予防策になり得ることを示唆する可能性が示された。この研究をより一層深めていくことによって、将来的な感染症対策としてワクチン接種のみならず、感染症重症化に対する予防的な食事摂取の科学的根拠を提供できる礎となれるよう、研究を積み重ねていきたい。