

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	上 野 伸 展
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Heat-killed body of <i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803 contributes to maintain intestinal homeostasis and improve intestinal injury in a murine model of colitis via the enhancement of the intestinal barrier function and the down-regulation of pro-inflammatory cytokines.</p> <p>(麦芽乳酸菌(<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803)死菌は腸管防御機構を強化し、炎症性サイトカインを抑制することで腸炎モデルマウスの腸管損傷の改善及び、腸管ホメオスタシス維持に寄与する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>藤谷 幹浩, 瀬川 修一, 奈田 利恵, 盛一 健太郎, 田邊 裕貴, 水上 祐輔, 小林 直之, 伊藤 一敏, 高後 裕</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>哺乳類の腸管内には数百種類の細菌が腸内細菌叢を形成して宿主と共生し、腸管の恒常性維持に寄与している(1)。また“適正な量を摂取したときに宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物”はプロバイオティクスと呼ばれ、炎症性腸疾患や抗生剤起因性腸炎、壊死性腸炎などの消化器疾患の治療にも臨床応用されているが、その有効性に関して一定の見解は得られていない。安定した効果を持つプロバイオティクス治療法を確立するには、それぞれの菌における特徴的な生理作用と、その作用機序を明らかにしていく必要がある。我々は、プロバイオティクス的一种である <i>Bacillus subtilis</i> から分泌された Competence and sporulation factor が腸管上皮細胞内に取り込まれ、細胞防御蛋白 heat shock protein (以下 Hsp) を誘導し、腸管上皮のバリア機能を増強することを明らかにした(2)。</p> <p>一方、新規のプロバイオティクスである麦芽乳酸菌 <i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803 (以下 <i>L. brevis</i> SBC8803) はビール酵母中から分離された Gram 陽性桿菌で、その死菌の経口投与が、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎症状を軽減すること、アルコール性肝障害モデルマウスの肝障害を抑制することが報告されている (3)。本研究では、<i>L. brevis</i> SBC8803 死菌の哺乳動物腸管における炎症抑制効果や細胞保護作用を検討するとともに、本死菌が腸管炎症モデルで治療効果があるか否かを解析し、新規腸管炎症治療としての可能性を検討した。</p> <p>方 法</p> <p>1. <i>L. brevis</i> SBC8803 死菌による Hsp 発現誘導および細胞内シグナル伝達系活性化の検討(<i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i>).</p>			

L. brevis SBC8803を121℃にて20分間加熱処理し、凍結乾燥した粉末死菌体(以下死菌)を作成した。ヒト大腸癌由来細胞株Caco-2_{bbe} cellを10-14日間培養し、0%から0.1%(w/v)の*L. brevis* SBC8803死菌を加えて24時間培養後、細胞を可溶化し、Hsp 27, Heat shock cognate protein (Hsc70)の発現をwestern blotsにて検討した(*in vitro*)。

6~10週齢のオスのC57Bl/6マウスから全小腸を摘出し、0%~0.1%(w/v)の各濃度の*L. brevis* SBC8803死菌を充填する。培養液中で2時間培養後、小腸粘膜を回収、細胞を可溶化し、Hsp 25, Hsp70, Hsc70の発現をWestern blotsにて検討した。また同様の方法でマウス小腸を5~60分間培養後、p38-MAPK, Erk, JNK, Aktのリン酸化についてwestern blotsにて検討した(*ex vivo*)。

2. *L. brevis* SBC8803 死菌による腸管バリア機能の変化に関する検討(*ex vivo*)。

1. の *ex vivo*の実験と同様に、0%~0.1%の*L. brevis* SBC8803死菌を小腸に充填し2時間培養した後、0.3mMモノクロラミン(NH₂Cl)を用いて腸管に酸化ストレスをかける。それぞれに1μCi/ml ³H標識マンニトールを注入して、15分後、30分後に腸管外へ漏出した標識マンニトールの量を測定し腸管バリア機能を評価した。

3. p38-MAPK阻害剤投与によるHsp誘導、腸管バリア機能増強の変化に関する検討(*in vitro*)。

1. の *in vitro*実験と同様に調整したCaco-2_{bbe} cellに、*L. brevis* SBC8803死菌および30μMのp38-MAPK阻害剤SB203580を添加して24時間培養した後、Hsp 27, Hsc70の発現の変化をwestern blotsにて検討した。また、トランスウエル(膜孔径0.04μm)に培養したCaco-2_{bbe} cellを、0.1%(w/v)の*L. brevis* SBC8803死菌とともに30μMのSB203580で24時間処理した後、1μCi/ml ³H標識マンニトールを添加し、ウエル外に漏出した標識マンニトールの量を測定し腸管バリア機能を評価した。

4. Dextran Sulfate Sodium(DSS)腸炎モデルマウスにおける*L. brevis* SBC8803 死菌投与による抗炎症効果、延命効果の検討。

6週齢のC57Bl/6マウスに3%DSSを5日間自由飲水させマウス急性腸炎モデルを作成した。PBSあるいは0.1%死菌を連日注腸投与し、体重変化、腸管長、病理学的組織所見、炎症性サイトカインの発現について比較検討した。また、6週齢のC57Bl/6マウスに4%DSSを自由飲水させマウス致死的腸炎モデルを作成した。PBSあるいは0.1%死菌を連日注腸投与し、体重変化、累積生存率について比較検討を行った。

尚、全ての実験は旭川医科大学動物実験施設の承認の下に行った。統計学的処理にはt検定、Mann-Whitney U検定を用い、生存曲線の解析にはKaplan-meyer法、Breslow-Gehan-Wilcoxon検定を用いた。p<0.05をもって統計学的有意差ありと判断した。

成 績

(1) 0.01%, 0.1%濃度の*L. brevis* SBC8803 死菌は、腸管上皮細胞株 Caco-2_{bbe} cell に Hsp27 を、マウス腸管に Hsp25, Hsp70 を誘導した。また 0.1%濃度の*L. brevis* SBC8803 死菌は p38 MAPK 経路を活性化したが、Erk, JNK および Akt 経路には影響しなかった。

- (2) 0.1%の *L.brevis* SBC8803 死菌は、モノクロラミン酸化ストレスによる細胞障害に伴う ^3H 標識マンニトールの腸管外漏出を有意に抑制した。
- (3) *L.brevis* SBC8803 死菌による Hsp 誘導作用、腸管バリア機能増強効果は、p38-MAPK 阻害剤 SB203580 によって有意に減弱した。
- (4) 急性炎症モデルマウスの実験において、死菌注腸群は、PBS 注腸群に比較して腸管短縮は軽度で、病理学的組織所見の有意な改善を認めた。また、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 の発現を有意に抑制した。致死的腸炎マウスにおいて、死菌注腸群は、PBS 注腸群に比較し有意に体重減少を抑制し、累積生存率を有意に延長させた。

考 案

本研究によって、*L.brevis* SBC8803死菌は、p38 MAPKの活性化を介してHspを腸管上皮に発現させ、酸化ストレスに対する腸管防御機構を増強することが示された。さらに、急性腸炎モデルマウスにおいて、炎症性サイトカインTNF- α 、IL-1 β 、IL-12の発現を抑制すること、腸管短縮を軽減し組織学的炎症を改善させること、致死的腸炎マウスの累積生存率を延長させることが明らかにされた。すなわち、*L.brevis* SBC8803死菌は、①p38 MAPKの活性化、Hsp誘導を介した腸管バリア機能の増強作用、②炎症性サイトカイン抑制を介した抗炎症作用、のふたつの生理活性を有し、哺乳動物の腸管炎症を改善することが証明された。

Hspは分子シャペロンとして働く細胞防御蛋白の一種であり、腸管の恒常性維持に重要である。このHspの発現には様々な細胞内シグナル伝達経路が関連しており、p38 MAPKもHsp発現に関係する経路であることが報告されている。今回、*L.brevis* SBC8803死菌が、p38 MAPK 活性化を介してHspを誘導することが証明されたが、同様の作用は他の乳酸菌にも認められている。すなわち、このp38 MAPK 活性化を介したHsp誘導機構は乳酸菌属が有する共通の作用メカニズムである可能性が示唆された。また、炎症性腸疾患患者ではHsp発現が著しく低下し、その病態に強く関係していることが報告されていることから、*L.brevis* SBC8803死菌によるHsp誘導作用を応用した、新しい炎症性腸疾患治療法の開発が期待される。

TNF- α やIL-1 β は局所及び全身性の炎症に関与し、急性期炎症を促進する代表的サイトカインである。また、IL-12はT細胞の分化誘導に関与することが知られている。これら炎症性サイトカインの過剰発現は過度の炎症反応を惹起し、組織破壊を助長するため、炎症性サイトカインを標的とした抗体療法(抗TNF α 抗体療法)が臨床応用されている。今回 *L.brevis* SBC8803死菌の作用のひとつとして、炎症性サイトカインの発現抑制が明らかにされた。同様の効果は、他の乳酸菌や一部のビフィズス菌にも認められているが、その標的サイトカインは菌種によって様々である。従って、各々の菌に特徴的なサイトカイン制御作用を明らかにし、各種疾患の病態に合わせて菌種を使い分けることができれば、高い有効性を持つプロバイオティクス治療が確立されると考えられる。

現状の生菌を用いたプロバイオティクス治療の効果が安定しない理由のひとつとして、病的腸内環境における菌活性の低下が挙げられている。すなわち、生菌を用いた場合、効果を発揮するには菌体が生きのまま腸管内に到達し、一定時間十分な活性を維持し続ける必要があるが、病的腸内環境においては菌の活性維持は困難であり治療効果が安定しない可能性が強い。一方、*L.brevis* SBC8803のように死菌で生理作用がある場合には、菌の生死に関係なく治療効果が発揮されることにより、より安定したが効果が得られるものと考えられ、新しいプロバイオティクスの投与方法として、今後の臨床応用が期待される。

結 論

麦芽乳酸菌 *L.brevis* SBC8803 死菌が、腸管炎症による上皮障害を改善させることを明らかにした。その作用機序は、p38-MAPK活性化によるHsp誘導を介した腸管バリア機能の増強と、炎症性サイトカイン抑制であることを証明した。今後、*L.brevis* SBC8803 死菌を用いた、新規の腸管炎症治療法開発が期待される。




引 用 文 献

- (1) Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG and Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-4.
- (2) Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind O, Jabri B, Chang EB. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe*. 2007; 1: 299-308.
- (3) Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int J Food Microbiol*. 2008;128:371-7.

参 考 論 文

- (1) Sato R, Watari J, Tanabe J, Fujiya M, Ueno N, Konno Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Okamoto K, Maemoto A, Chisaka K, Kitano Y, Matsumoto K, Ashida T, Kono T, Kohgo Y. Transnasal ultrathin endoscopy for placement of a long intestinal tube in patients with intestinal obstruction. *Gastrointest Endosc* 2008;67: 953-957.
- (2) 石川千里, 渡二郎, 上野伸展, 金野陽高, 佐藤龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 徳差良彦, 三代川齊之, 高後裕. 胃弓窿部の粘膜筋板由来と考えられる gastrointestinal stromal tumor による ball valve syndrome の 1 例. *日本消化器病学会誌*. 2008;105;1337-1343.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	上野 伸展
<p>審査委員長 若宮 伸隆 </p> <p>審査委員 高後 裕 </p> <p>審査委員 奥村 弘樹 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p>			
<p>Heat-killed body of <i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803 contributes to maintain intestinal homeostasis and improve intestinal injury in a murine model of colitis via the enhancement of the intestinal barrier function and the down-regulation of pro-inflammatory cytokines.</p> <p>(麦芽乳酸菌 (<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803) 死菌は腸管防御機構を強化し、炎症性サイトカインを制御することで腸炎モデルマウスの腸管損傷の改善及び、腸管ホメオスターシス維持に寄与する)</p>			
<p>ほ乳類の腸管には、多くの腸内常在菌が存在し、栄養素の代謝や腸管防御機構の増強、嫌気性代謝、血管新生、腸管のリンパ組織の発達などに不可欠の存在であると考えられている。これらの腸内常在菌のなかに、健康上有益な効果をしめすと考えられる菌の存在が指摘され、プロバイオティクスと呼ばれている。プロバイオティクスは、炎症性腸炎、抗生剤起因性腸炎、炎症性腸炎などの腸疾患やアレルギーなどの改善に効果があるといわれている。特に、腸疾患におけるプロバイオティクスの効果について、近年プロバイオティクス的一种である <i>Bacillus subtilis</i> では、その効果が、抗菌ペプチドである Competence and sporulation factor (CSF) に由来することが報告されている。本研究では、麦芽乳酸菌 (<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803) 死菌を用いて、腸炎症状態での腸管上皮障害に関する治療効果についての検討を行った。</p> <p>検討は2つの方法で行われた。まず、<i>L. brevis</i> SBC8803 死菌の効果としては、</p>			

細胞レベルでは、ヒト大腸上皮細胞由来の Caco 2-BBE 細胞で heat shock protein (Hsp) の発現誘導の検証を行い、動物レベルでは、C57BL/6 マウスで、heat shock protein の発現誘導の検証や p38-MAPK のシグナル誘導の検証を行った。さらに、モノクロラミン酸化ストレスによる細胞障害抑制効果の検証や DSS 誘発腸炎モデルにおける、*L. brevis* SBC8803 死菌腸内投与による炎症改善効果に対する検討を行った。

結果として、*L. brevis* SBC8803 死菌は、Caco 2-BBE 細胞では、Hsp 27 を、マウスでは、Hsp 25, Hsp70 を発現誘導した。また、*L. brevis* SBC8803 死菌は、p38-MAPK シグナルを活性化した。また、モノクロラミン酸化ストレスによる細胞障害においても抑制効果を認めた。上記の *L. brevis* SBC8803 死菌による Hsp 誘導・腸管バリア機能増強効果は、p38-MAPK 阻害剤によって有意に減弱した。急性炎症モデルマウス実験では、3%DSS 投与による、炎症性腸炎モデルで、*L. brevis* SBC8803 死菌注腸投与により、腸炎の改善と大腸の長さの短縮を防止する効果が認められ、炎症性サイトカイン TNF, IL-1 β , IL-12 の発現抑制を認めた。さらに、4%DSS 投与による重症腸炎モデルでも、*L. brevis* SBC8803 死菌投与群において、体重減少の抑制と生存率改善効果を認めた。

以上のことから、*L. brevis* SBC8803 死菌が、腸管損傷状態における上皮細胞の障害を軽減し、致死性腸炎を発祥したマウスの生存率を改善することが明らかになった。これらの研究結果は、*L. brevis* SBC8803 死菌の腸炎保護作用を、明らかにしたもので、*L. brevis* SBC8803 死菌が腸炎の治療に有効である可能性を示唆している。

本研究は、*L. brevis* SBC8803 死菌が、腸管炎症による上皮細胞の障害を軽減すること、さらにその作用において炎症性サイトカインの誘導を抑制し、細胞保護作用をもつ Hsp 誘導に関与する可能性を明らかにした報告である。得られた知見は今後、腸炎の新しい治療法開発に役立つ可能性があり臨床的にも意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。