

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	嘉島 伸
<p>学位論文題目</p> <p>腸内細菌由来の生理活性物質ポリリン酸による腸管炎症と線維化の 改善効果に関する研究</p> <p>北海道医学雑誌 89巻 平成26年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases; IBDs) は原因不明の慢性腸炎で、反復する炎症や潰瘍によって高度な線維化をきたし、高頻度に腸管狭窄を生じる。このような病態に対して腸管切除や腸管形成術などの外科手術以外の有効な予防法や治療薬はない。腸管線維化には、TGF-β1シグナルの活性化による線維芽細胞からのコラーゲン産生の誘導や、connective tissue growth factor (CTGF)による線維化形成および維持作用が関与して難治性の線維化を誘導することが知られている。</p> <p>一方、IBD患者では健常人と大きく異なる腸内細菌叢を形成し、腸内細菌の異常とIBD病態との関連性が示唆されている¹⁾。また、腸内に存在する様々な菌群の中で、宿主に有益な効果をもたらす細菌はprobioticsと総称され、病原菌に対する抗菌作用や腸管保護作用を有することが知られているが、probiotics摂取によるIBD病態改善の機序については不明な点が多かった。我々の研究室では、probioticsの一種であるBacillus subtilisの培養上清から、菌由来の腸管保護活性物質competence and sporulation factor (CSF)を同定し²⁾、菌由来物質を介した新しい宿主腸管 - 細菌の相互作用の存在を明らかにした。引き続き、Lactobacillus brevisの培養上清から腸管保護活性物質ポリリン酸を同定した。これらの菌由来活性物質には腸管のバリア機能を増強する作用や急性腸炎モデルの腸管障害が改善する作用があることを示してきた²⁾³⁾。</p> <p>以上の研究結果から、CSFやポリリン酸のようなprobiotics由来の腸管保護活性物質が急性腸管障害を改善することは明らかにしえたが、IBDのような慢性炎症に伴う腸管障害や線維化を改善させるか否かについては不明である。そこで、本研究では、慢性腸炎モデルの腸管障害や線維化に対するポリリン酸の治療効果を検討し、その作用機序や標的細胞を明らかにすることとした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. ポリリン酸の合成

50mM Tris-HCl(pH7.4), 40mM ammonium sulfate, 4mM MgCl₂, 40mM creatine phosphate, 20ng/ml creatine kinase, 1mM ATP(pH7.2)の混合液に1Uのpolyphosphate kinaseを加え, 16時間反応させてポリリン酸を合成した.

2. Dextran sodium sulfate (DSS)慢性腸炎モデル

C57Bl/6マウスに3%DSS溶液を5日間, その後通常の水を20日間自由飲水させ, DSS慢性腸炎モデルを作成した. 実験開始25日目より10日間連日100 µgのポリリン酸またはPBSを注腸投与し, 35日目に大腸粘膜の一部から蛋白とRNAを回収後, 残り的大腸組織をホルマリン固定した.

3. 細胞株

Caco2bbe細胞 (ヒト腸管上皮由来細胞株), THP-1細胞(ヒトマクロファージ様細胞), CCD18-co細胞(ヒト腸管筋線維芽細胞由来細胞株)を用いた. phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)によりTHP-1細胞をマクロファージへと分化させた.

4. Lipopolysaccharide (LPS)およびTGF-β1の投与

Caco2bbe細胞とTHP-1細胞にEscherichia coli由来LPS(1µg/ml)を投与し, 炎症および線維化関連因子の発現について検討した. CCD18-co細胞にTGF-β1(100ng/ml)を投与し, コラーゲンmRNAの発現について検討した.

5. Western blotting

回収した蛋白を12.5% SDS-PAGEにて泳動し, ニトロセルロース膜に転写した. その後, 線維化関連分子の各種一次抗体(抗TGF-β1抗体, 抗CTGF抗体, 抗Smad4抗体, 抗コラーゲンIV抗体, 抗p-Akt抗体, 抗erbb2抗体)と4°Cで16時間反応させた. その後, 特異的二次抗体と1時間反応させ, Super-Signal West Picoを用いて発色させた. アクチンの発現量を内部コントロールとして, それぞれの蛋白発現量を標準化した.

6. Real-time PCR

マウス腸管上皮および細胞株から抽出したRNAをランダムプライマーを用いて逆転写し, 炎症関連サイトカイン(TNFα, IL-1β, IFNγ, IL-4, IL-6, IL-10), 線維化関連分子(TGF-β1, コラーゲンI, コラーゲンIV)の特異的プライマーを用いてPCRを行いmRNAの発現を検出した. 18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した.

7. DSS慢性腸炎モデルにおける病理学的重症度と線維化の評価

病理学的重症度はBerg's score, 腸管線維化はマッソントリクローム染色にて評価した.

8. 蛍光免疫染色

コラーゲンIVの発現を染色部位の蛍光強度を測定し評価した.

9. 統計処理

Student's t-test, Mann-Whitney U検定を用い, p<0.05を統計学的有意差ありと判断した

成 績

1. ポリリン酸投与によるDSS慢性腸炎モデルの体重, 腸管長, 組織学的重症度の変化

実験開始35日目の体重は, 対照群, DSS+PBS群, DSS+ポリリン酸群で差がなかった. 腸管長は, 対照群と比べ, DSS+PBS群では有意に短縮し, ポリリン酸投与で腸管の短縮が有意に軽減した. 組織学的重症度は, 対照群と比べ, DSS+PBS群で有意に高度であり, ポリリン酸投与で有意に改善した(n=4).

2. ポリリン酸投与によるDSS慢性腸炎モデルの腸管線維化の変化

マッソントリクローム染色では, 対照群と比べ, DSS+PBS群で有意に膠原線維が増加し, ポリリン酸投与で有意に改善した. 蛍光免疫染色では, DSS+PBS群では対照群と比べ, コラーゲンIVの発現が有意に増加し, ポリリン酸投与により有意に減少した. Western blottingでも同様に, コラーゲンIVの発現は対照群と比べ, DSS+PBS群で有意に増加し, ポリリン酸の投与により有意に低下した(n=4).

3. ポリリン酸投与によるDSS慢性腸炎モデルの腸管組織中の炎症関連サイトカインの

発現変化

対照群と比べ、DSS+PBS群ではIL-1 β 、TNF α 、IFN γ 、IL-10のmRNAの発現は有意に亢進し、ポリリン酸投与により、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ の発現増加が有意に抑制された(n=4).

4. ポリリン酸投与によるDSS慢性腸炎モデルの線維化関連分子の変化

DSS+PBS群では、対照群と比べTGF- β 1、Smad4、CTGFは有意に増加したが、erbb2とリン酸化Aktは変化がなかった。ポリリン酸投与により有意にTGF- β 1、Smad4、CTGFが低下した(n=4).

5. LPSおよびTGF- β 1投与下の炎症・線維化関連分子の発現とポリリン酸投与の影響

Caco2bbe 細胞ではLPS刺激によりTGF- β 1、IL-1 β 、TNF α の発現が有意に増加した。ポリリン酸投与によりTGF- β 1、IL-1 β の発現増加が有意に抑制された(n=4)。THP-1 細胞ではLPS刺激によりIL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF α の発現は有意に亢進し、ポリリン酸投与によりTNF α の発現増加が有意に抑制された(n=4)。CCD18-co細胞ではTGF- β 1刺激により、対照群と比べ有意にコラーゲンの発現は増加し、ポリリン酸投与によっても変化がなかった(n=4)。

考 案

本研究によって、ポリリン酸には慢性腸炎モデルにおける腸管障害や線維化の改善効果があることを初めて証明した。ポリリン酸の線維化改善作用の機序は、腸管上皮からのTGF- β 1産生の抑制と、それに続く線維芽細胞からのコラーゲン産生の減少によるものと考えられた。IBD患者ではTGF- β 1の発現が亢進していること、TGF- β 1の遺伝子多型がIBDの腸管狭窄と関連があることが明らかにされている。TGF- β 1の過剰発現の抑制効果を持つポリリン酸は、IBD患者の腸管線維化治療に有用であると考えられる。

また、ポリリン酸による慢性腸炎モデルの腸管短縮や腸管組織障害に対する改善作用は、炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β)産生の抑制が関与していることを明らかにした。細胞株を用いた検討から、ポリリン酸は腸管上皮細胞のIL-1 β 産生およびマクロファージのTNF α 産生を抑制することが明らかになり、それぞれの細胞に対して異なる効果を発揮して、腸管炎症を抑制することが示唆された。今後その作用メカニズムをさらに詳細に解明することでポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発が期待される。

結 論

乳酸菌由来ポリリン酸はマウス慢性腸炎モデルにおける腸管障害や線維化を改善した。その機序は、腸管上皮およびマクロファージに過剰発現した炎症性サイトカインIL-1 β やTNF α 、および線維化促進分子TGF- β 1、CTGFの産生抑制であると考えられた。今後ポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発が期待される。




引用文献

1. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
2. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, et al. 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, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 2011;6:e23278.

参考論文

1. Kashima S, Nata T, Fujiya M, et al. Obscure gastrointestinal bleeding occurring 50 years after an appendectomy. *Gut*. 2011 60(10):1344
2. Watari J, Moriichi K, Kashima S, et al. Biomarkers predicting development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection: an analysis of molecular pathology of *Helicobacter pylori* eradication. *Int J Cancer*. 2012 130(10):2349-58

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	嘉島 伸
審査委員長 <u>若宮 伸隆</u> 			
審査委員 <u>高後 裕</u> 			
審査委員 <u>奥村 利陽</u> 			
学 位 論 文 題 目			
腸内細菌由来の生理活性物質ポリリン酸による腸管炎症と線維化の改善効果に関する研究			
<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、プロバイオティクスの <i>Bacillus subtilis</i> 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、さらに近年、麦芽乳酸菌 (<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8803) の腸管保護効果がポリリン酸に基づくことが報告されている。本研究では、このポリリン酸が IBD などの慢性炎症モデルでどのような効果をもつかを、細胞、個体レベルで検討した。 </p> <p> 検討は、人工的にポリリン酸を合成しそれを用いて行われた。動物実験の慢性腸炎モデルは、C57BL/6 マウスに、5 日間 3% DSS 投与し、その後通常の水を 20 日間自由飲水させ作成した。このマウスに 25 日目より 10 日間連日 100 μg のポリリン酸または PBS を注腸投与し、粘膜組織を組織染色し、一部タンパク質と mRNA の定量を行った。次に、細胞実験では、ヒト大腸上皮細胞由来の Caco 2-BBE 細胞、PMA でマクロファージに分化させた THP-1 細胞に、LPS と TGF-β1 の投与による、炎症と線維化関連因子の発現を検討した。また、回収したタンパク質を 12% </p>			

SDS-PAGEにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、各種抗体にて、タンパク質発現量を測定した。また、マウス腸管上皮および細胞株から得た mRNA を real-time PCRにて、mRNA 定量を行った。DSS 慢性腸炎モデルにおける病理学所見は、重症度スコアである Berg score で、腸管線維化はマッソンのクローム染色で評価し、コラーゲン IV 発現は、抗体染色の蛍光強度を測定し評価した。

結果として、ポリリン酸投与により、DSS 慢性腸炎モデルマウスでは体重、腸管長、組織学的重症度が、改善した。また、組織染色実験では、ポリリン酸投与により、腸管線維化の目安となるコラーゲン繊維の増加の改善が見られた。組織における炎症性サイトカイン mRNA の比較では、ポリリン酸投与により、炎症による増加が優位に抑制された。また、線維化関連分子の増加も改善していた。細胞株での検討では、Caco2 細胞では、LPS 添加により TGF- β 1、IL-1 β 、TNF α 発現の亢進が見られ、ポリリン酸添加により TGF- β 1、IL-1 β 発現の抑制が観察された。THP-1 細胞では、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF α の発現亢進が見られ、ポリリン酸投与で、TNF α 発現の抑制が見られた。腸管線維芽細胞 CCD18-co 細胞では、TGF- β 1 刺激により、コラーゲン発現の増加を観察したが、ポリリン酸添加による抑制が見られなかった。

以上のことから、慢性腸炎モデルマウスにおいて、ポリリン酸が炎症病態である腸管障害や線維化の改善効果を示すことが明らかになった。そのメカニズムとしては、ポリリン酸投与による腸管上皮の TGF- β 1 産生抑制とそれに続く腸管線維芽細胞からのコラーゲン産生減少による効果が推測された。

本研究は、慢性腸炎モデルにおいての、ポリリン酸の効果とその作用機序を明らかにしたものである。実際の IBD 患者では、通常 TGF- β 1 の発現が亢進していることと、TGF- β 1 の遺伝的異常による腸管狭窄の臨床的事実から、ポリリン酸の IBD 患者における治療薬の可能性が示唆された。得られた知見は今後、慢性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。