

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	田中 一之
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway (腸上皮エンドサイトーシスによる細菌由来ポリリン酸の取り込みを介した 腸管バリア機能増強作用の研究)</p> <p style="text-align: center;">共著者名</p> <p style="text-align: center;">藤谷幹浩, 小西弘晃, 上野伸展, 嘉島伸, 笹島順平, 盛一健太郎, 生田克哉, 田邊裕貴, 高後裕</p> <p style="text-align: center;">Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 467, Issue 3, Pages 541-548 平成27年</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>腸管内には1000種を超える腸内細菌が存在し、宿主との相互作用により腸管の恒常性を保つと同時に、多くの消化器疾患の病態に強く関連することが示唆されている。腸管上皮における腸内細菌の認識機構として、Toll like receptors (TLRs) やNodsなどのパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) が発見されており、主に病原菌の菌体成分などを認識し腸管炎症を惹起する。</p> <p>一方、宿主に有益な菌 (プロバイオティクス) に対する認識機構については、その一部が病原菌と同様にPRRsを介する経路であることが知られているが、残りの大部分の菌では認識機構が不明である。我々の研究室では、プロバイオティクスであるバシラス菌由来の competence and sporulation factor (CSF) が、腸管上皮の有機体トランスポーターによって上皮内に取り込まれることで認識され、腸管保護作用を発揮することを明らかにした。引き続き、乳酸菌から分泌される腸管保護物質ポリリン酸を同定し、これが腸管炎症や線維化を改善することを突きとめた。この菌由来ポリリン酸は腸管上皮の integrin <math>\beta 1</math> に結合して作用を発揮することも明らかになり、PRRsとは異なる経路で腸管上皮細胞に認識され作用を発揮することが示唆されたが、その詳細なメカニズムは不明である。</p> <p>本研究では、ポリリン酸が腸管上皮 integrin <math>\beta 1</math> に認識された後の腸管上皮との相互作用について明らかにする。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. ポリリン酸の合成

混合液(50mM Tris -HCl(pH7.4), 40mM ammonium sulfate, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM creatine phosphate, 20ng/ml creatine kinase, 1mM ATP(pH7.2), 1Uのpolyphosphate kinase (PPK)を反応させポリリン酸を合成した。

### 2. 細胞株

Caco2/bbe 細胞(ヒト腸管上皮由来細胞株)を用いた

### 3. sh RNAの導入

レンチウイルス発現ベクターを用いてCaco2bbe細胞にintegrin B1, caveolin-1のshRNAを導入した。ノックダウン効率はReal-time PCRおよびWestern blottingにて確認した。

### 4. マンニトール漏出試験

トランスウエルにCaco2/bbe 細胞を培養しポリリン酸およびPBSを投与する。1, 2, 3時間後に<sup>3</sup>H標識マンニトールを上部wellに投与し, 下wellへ漏出したマンニトールを測定することにより腸管バリア機能を評価した。

### 5. <sup>32</sup>P ポリリン酸の動態試験

<sup>32</sup>P標識ATPを用いて上記1.と同様の方法で<sup>32</sup>P標識ポリリン酸を作製した。Caco2/bbe 細胞に<sup>32</sup>P標識ポリリン酸を投与し, 細胞内外のポリリン酸の分布を評価した。

### 6. Western blotting

解析対象の細胞から蛋白を精製しSDS-PAGEにて電気泳動を行った。ニトロセルロースメンブレンへ転写し下記に示す一次抗体を用いて特異的な蛋白を検出し, 画像解析ソフトimage Jで発現量を評価した。用いた一次抗体は、リン酸化p38 MAPK, HSP27, tumor necrosis factor alpha-induced protein 3(TNFAIP3), thymosin beta 4(TMSB4)に対する単クローン抗体である。

### 7. Real-time PCR

解析対象の細胞からRNAを分離し, 逆転写にてcDNAを作製した。これをテンプレートとしてintegrin B1, caveolin-1, TNFAIP3, TMSB4, dual specificity phosphatase 2(DUSP2)のcDNA配列に特異的な配列を持つプライマーを用いてPCRを行った。

### 8. High-throughput sequencing

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸およびPBSを投与し24時間後にRNAを分離した。これをテンプレートとして発現量に変化するmRNAを網羅的に解析した。

### 9. 蛍光免疫染色

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸を加え、ポリリン酸結合蛋白およびこの蛋白の単クローン抗体を用いて腸管上皮内外のポリリン酸の動態を評価した。

### 10. 統計処理

有意差検定にはStudent's t-testを用い, p<0.05を統計学的有意差ありと判断した。

## 成 績

### 1. ポリリン酸の細胞内への取り込み

<sup>32</sup>P標識ポリリン酸は1時間後に細胞内へ取り込まれ, その後時間経過とともに細胞外へ移行し、48時間にはほとんどが細胞外へと排出された。蛍光免疫染色でも同様の細胞内外の移動を認めたが, integrin B1発現抑制によりポリリン酸の細胞への集積は有意に低下した。integrin B1は上皮細胞膜上の脂質ラフトを形成するcaveolin-1との相互作用があることから, ポリリン酸がcaveolin-1依存性のエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれると仮定し, 検討を行った。免疫沈降western blottingを行った結果, ポリリン酸がCaco2/bbe細胞株においてcaveolin-1との複合体を形成することが明らかになった。この複合体はintegrin B1発現抑制により形成が有意に低下した。<sup>32</sup>P標識ポリリン酸の細胞内取り込みもcaveolin-1発現抑制によって有意に減少した。

### 2. ポリリン酸の細胞保護作用

Western blottingにて細胞保護蛋白Hsp27およびリン酸化p38 MAPKの発現を検討した結果, ポリリン酸投与に両者とも有意に発現が誘導された。この作用はintegrin B1, caveolin-1発現抑制により有意に抑制された。マンニトール漏出試験で腸管バリア機能を

検討した結果、ポリリン酸投与により腸管バリア機能の増強が認められたが、その作用は integrin  $\beta$ 1, caveolin-1発現抑制により有意に抑制された。

### 3. ポリリン酸投与によるTNFAIP3の発現誘導

high-throughput sequencing解析にてポリリン酸投与により有意に発現量が増加する遺伝子を抽出し、バリア機能増強作用に関連するTNFAIP3, TMSB4, DUSP2を候補分子として同定した。そのうち、細胞株へのポリリン酸投与によりmRNA, タンパク発現量ともに有意に発現が増加した分子はTNFAIP3のみであった。

## 考 案

本研究によって、細菌由来のポリリン酸がintegrin-caveolin依存性のエンドサイトーシスにより腸管上皮細胞に取り込まれ、p38 MAPKとHsp27の活性化により細胞保護作用を発揮するという新たな宿主-細菌相互作用メカニズムが明らかになった。以前我々はバシラス菌由来の分子が細胞膜トランスポーターによる取り込みを介して認識されることも明らかにしており、プロバイオティクスの認識にはPPRsを介さない経路が存在すると考えられる。

また、high-throughput sequencing解析によりポリリン酸投与によって発現量が増加する主な分子がTNFAIP3であることを突き止めた。TNFAIP3はTNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ Bシグナルを強力に抑制すること、腸管バリア機能を増強することが知られており、ポリリン酸はTNFAIP3の発現誘導を介して腸炎改善や腸管バリア機能の回復などの有益な作用を発揮すると考えられる。

この新規の宿主-細菌間の相互作用がさらに解明されることで、PPRsに限定されない種を超えた宿主-細菌間クロストーク解明に向けた新分野の創設が期待される。さらには、細菌由来の物質の認識や取り込み機構に着目し、消化器疾患の新たな治療標的の開発が期待される。

## 結 論

乳酸菌由来ポリリン酸はcaveolin依存性のエンドサイトーシスにより腸管上皮細胞に取り込まれ、細胞保護作用を有するTNFAIP3の発現を誘導し、腸管上皮バリア機能を増強する。

本研究により、細菌由来物質を宿主細胞が取り込むという、新しい宿主-細菌の相互作用メカニズムが明らかになった。今後ポリリン酸を用いた新規消化器疾患治療薬の開発が期待される。




#### 引用文献

1. 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.
2. 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.
3. Kashima S, Fujiya M, Konishi H, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Transl Res.* 2015;166:163-75.

#### 参考文献

1. Fujiya M, Tanaka K, Dokoshi T, et al. Efficacy and adverse events of EMR and endoscopic submucosal dissection for the treatment of colon neoplasms: a meta-analysis of studies comparing EMR and endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc.* 2015;81:583-95.
2. 田中一之, 安藤勝祥, 上野伸展, 他 空腸憩室からの大量出血に対してダブルバルーン内視鏡により完全止血し得た1例. *日本内科学会雑誌* 2013;102:2050-52

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	田中 一之
<p>審査委員長 <u>菅宮伸隆</u> </p> <p>審査委員 <u>三田 勝計</u> </p> <p>審査委員 <u>山本明美</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway (腸上皮エンドサイトーシスによる細菌由来ポリリン酸の取り込みを介した腸管バリア機能増強作用の研究)</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、藤谷らは、腸疾患におけるプロバイオティクスの効果について、<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し、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している。本研究では、ポリリン酸が腸管上皮 integrin <math>\beta 1</math> に認識された後の腸管上皮における作用について、細胞レベルで検討を行った。</p> <p>今回、申請者は、ポリリン酸を合成し、腸管上皮細胞株として Caco2/bbe 細胞を用い、細胞を integrin <math>\beta 1</math> と caveolin-1 をノックダウンし、ポリリン酸刺激後における細胞の変化を解析した。細胞の変化については、①マンニトール漏出テストによる腸管バリア機能解析、②ポリリン酸の細胞内外の動態観察、③Western blot、real-time PCR、High-through put sequencing による変化する、mRNA や各種反応</p>			

タンパク質の解析を行った。

その結果として①ポリリン酸は、1時間で細胞内に取り込まれ、48時間で細胞外へ排出された。また、この移動は、integrin  $\beta 1$  と caveolin-1 の発現抑制により、阻害された。細胞内での取り込みには、ポリリン酸と caveolin-1 とが複合体を形成することが明らかになった。②ポリリン酸の細胞保護作用では、ポリリン酸処理により、Hsp27, p38 MAPK の発現誘導が認められ、その作用は、integrin  $\beta 1$  と caveolin-1 依存性であった。また、マンニトール漏出テストによる腸管バリア機能においても、バリア機能の増強が認められ、同様に integrin  $\beta 1$  と caveolin-1 依存性であった。③ポリリン酸による、発現 mRNA 亢進を探索する網羅的な解析では、候補分子として TNFAIP3 が明らかになった。

以上のことから、申請者は、腸管上皮細胞 Caco2/bbe において、ポリリン酸は integrin  $\beta 1$ —caveolin-1 依存性にエンドサイトーシスを受け、細胞保護作用を有する Hsp27, p38 MAPK の活性化を促し、新たな宿主保護作用を惹起する可能性を明らかにした。また、High-through put sequencing により、ポリリン酸が誘導する新たな細胞保護作用を有する候補として TNFAIP3 を明らかにした。

本研究で明らかにされたポリリン酸の作用経路は、以前共同研究者らが、*Bacillus subtilis* の抗菌ペプチド Competence and sporulation factor (CSF) における細胞トランスポーターによる作用とは異なる、新しい細胞保護の経路の存在をあきらかにしたものである。この発見は、プロバイオティクスの効果の解明ばかりでなく、消化管疾患の新規治療薬開発へも期待され、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。