

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	磯崎 翔太郎
学 位 論 文 題 目 Probiotic-derived polyphosphate accelerates intestinal epithelia wound healing through inducing platelet-derived mediators (乳酸菌由来長鎖ポリリン酸は血小板活性化を介して腸管上皮の創傷治癒を促進する) 共 著 者 名 小西弘晃, 藤谷幹浩, 田中宏樹, 村上雄紀, 嘉島 伸, 安藤勝祥, 上野伸展, 盛一健太郎, 奥村利勝 Mediators of Inflammation, 2021巻, 論文番号5582943, 令和3年 研 究 目 的 プロバイオティクスは適正量を摂取した際に宿主に有益な作用をもたらす微生物群であり、これまでに抗炎症作用や抗アレルギー作用などを発揮することが明らかにされている(引用文献1,2)。我々はプロバイオティクスが産生する生理活性物質に着目し、麦芽乳酸菌 <i>Lactobacillus brevis</i> SBL88が産生する長鎖ポリリン酸(poly-P)に強い腸上皮間バリア増強作用があることを明らかにした。しかし、腸上皮の欠損を伴うような組織障害において、poly-Pがどのような作用を発揮するかは明らかではない。我々は予備的検討からpoly-Pを処置することで薬剤誘発腸管炎症モデルの炎症組織に血小板が集積していることを見出した。 本研究では、宿主血小板の活性化を介したpoly-Pの組織修復作用及びその分子生物学的機序を明らかにすることを目的とした。 材 料 ・ 方 法 1. DSS腸炎モデルマウスの作成とpoly-Pの腸炎改善効果の検討 BALB/cマウスに2.5%のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を自由飲水させることより腸炎モデルマウスを作成した。治療群としてpoly-Pを7日間連日経口投与し、未治療群及び陰性対照群と比較しその改善効果を検討した。検討項目は結腸の腸管長、組織学的炎症反応スコア、RT-qPCRによる腸管内の炎症性サイトカインのmRNA量 (IL-1β, TNF, IL-6, IFN-γ) とした。血小板表面抗原CD61の免疫組織染色により、腸管組織の血小板の集簇を評価した。			

2. poly-Pの血小板凝集能の評価

旭川医科大学倫理委員会の承認を得た上で成人から多血小板血漿(PRP)を採取した。PRPをpoly-Pで処理し、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて血小板の形態学的評価を行い、透過光法で凝集能を評価した。

3. SRBアッセイによる細胞増殖能の評価

成人から採取したPRPにpoly-Pを反応させ、分子量カットオフカラムを用いて凝固因子を除去することでpoly-P処理PRPの上清を得た。ヒト結腸由来細胞HCEC-1CTを96-well plate上に播種した後にpoly-P処理PRPの上清で処置し、スルフォロータミンB (SRB) アッセイにより細胞の増殖効果を評価した。

4. Ki-67の蛍光免疫染色

HCEC-1CTを12-well plate上に播種し、その後poly-P処理PRPの上清で6時間処置した後Ki-67の抗体を用いて免疫細胞染色を実施し、Ki-67の陽性率 (%) を算出した。

5. *in vitro*創傷治癒アッセイによるpoly-P処理PRPの創傷治癒促進効果の評価

HCEC-1CT及びラット腸管由来細胞IEC-18を12-well plate上に播種し、マイクロチップで創を作成し、poly-P処理PRPの上清で処置した。24時間後、創閉鎖率を算出し、創傷治癒促進効果を評価した。

6. ウェスタンブロットによるpoly-P処理PRPによるMAPKシグナル伝達活性化の評価

IEC-18を12-well plate上に播種し、poly-P処理PRPの上清で24時間処置後にタンパク質を回収した。ウェスタンブロットによりMAPK関連タンパク質であるERK, p38, JNK, 及び AKTのリン酸化を評価した。次に各タンパク質の阻害剤をpoly-P処理PRPの上清と同時に処置し創傷治癒アッセイを行い、創傷治癒促進効果への影響を評価した。

成 績

1. モデルマウスにおけるpoly-Pの腸炎改善効果と上皮血小板の集簇

腸炎モデルマウスへのpoly-P投与により、腸管長・組織学的炎症反応スコア・炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF, IL-6) はいずれも有意に改善し、poly-P投与による腸炎改善効果が認められた。摘出した腸管のCD61免疫染色ではpoly-P投与群が他の2群と比較し有意に血小板集簇を認めた。

2. poly-Pの血小板凝集に対する影響

SEMを用いた形態学的評価では、poly-P処理により凝集した血小板塊を観察することができた。透過光法による検討でも、poly-P処理により経時的な吸光度減少を認め、poly-Pには血小板凝集作用があることが明らかとなった。

3. poly-P処理血小板は上皮細胞のERKリン酸化の亢進を介して創傷治癒を促進する

SRBアッセイにより、poly-P処理PRPの上清は未反応の上清と比較して有意に結腸上皮由来細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。Ki-67の蛍光免疫染色ではpoly-P処

理PRPの上清の処置により有意に陽性細胞率が上昇した。創傷治癒アッセイでもpoly-P処理PRPの上清の処置により有意に創閉鎖率が上昇し、創傷治癒の促進効果が認められた。ウェスタンブロットではERK、AKT、p38、JNKのリン酸化がpoly-P処理PRPの上清処置により有意に亢進し、阻害剤を用いた検討ではERKの阻害により創傷治癒促進効果の減弱が認められ、ERKのリン酸化が創傷治癒促進効果を担う主要な経路であることが明らかとなった。

考 案

本研究によりpoly-Pは宿主血小板を活性化し、腸上皮の創傷治癒を促進するというユニークな宿主-微生物間相互作用が明らかになった。その機序として腸上皮ERKの活性化による細胞増殖能の促進が関与していた。これまで我々はpoly-Pが腸上皮間バリアを増強することを証明してきたが（引用文献3）、今回の成果からpoly-Pは上皮欠損を伴う腸管障害に対しても治療効果を発揮することが明らかとなり、炎症性腸疾患のような重度の腸管障害に対する治療薬として臨床応用の可能性が示唆された。

結 論

長鎖ポリリン酸は宿主血小板を活性化し、腸管上皮のERK活性化を介して腸上皮障害を改善することを明らかにした。これは微生物由来生理活性物質と宿主血液細胞を介した新規の宿主-微生物間相互作用である。

引 用 文 献

1. Pace F, Pace M, Quartarone G.F., *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* (2015), 61(4):273-92.
2. Park MS, Song NE, Baik SH, Pae HO, Park SH., *Experimental and Therapeutic Medicine* (2017), 14(1):635-641
3. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y., *PloS one* (2011), 6(8):e23278.

参 考 論 文

1. Konishi H, Isozaki S, Kashima S, Moriichi K, Ichikawa S, Yamamoto K, Yamamura C, Ando K, Ueno N, Akutsu H, Ogawa N, Fujiya M., *Scientific Reports* (2021), 11:11070.
2. Murakami Y, Fujiya M, Konishi H, Isozaki S, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Sasaki T, Kunogi T, Takahashi K, Ando K, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Tanabe H, Okumura T., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (2021), 44(4):564-570.
3. Takauji S, Konishi H, Fujiya M, Ueno N, Tanaka H, Sato H, Isozaki S, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Okumura T., *Digestive Diseases and Sciences* (2021), 66(11):3872-3884.
4. Horioka K, Tanaka H, Isozaki S, Konishi H, Addo L, Takauji S, Druid H., *Thrombosis Research* (2020), 195:114-119.
5. Horioka K, Tanaka H, Isozaki S, Konishi H, Addo L, Takauji S, Druid H., *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2020), 526(1):239-245.

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	磯崎 翔太郎
審査委員長 川辺 淳一 			
審 査 委 員 谷野 美智枝 			
審 査 委 員 入部 玄太郎 			
学 位 論 文 題 目 Probiotic-derived polyphosphate accelerates intestinal epithelia wound healing through inducing platelet-derived mediators. (乳酸菌由来長鎖ポリリン酸は血小板活性化を介して腸管上皮の創傷治癒を促進する) 掲載雑誌: Mediators of Inflammation, 2021, 5582943, 2021 (審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)			
磯崎氏は、腸炎マウスモデルでポリリン酸処理された腸管上皮において血小板が集積していることを見出し、この現象が、ポリリン酸の腸潰瘍治癒促進効果に関連していないか検討した。 血液から調整した血小板濃縮液においてポリリン酸は血小板凝集効果をしめし、その「上澄み液」は腸管上皮細胞に対する増殖促進効果やスクラッチ創傷回復効果を明らかにした。「血小板濃縮後の上澄み液」による同創傷回復効果は、Raf-MEK-ERK系を介するが、血小板由来の既知のPDGFやVEGFなどのペプチド増殖因子によるものでなく、分子量3 kDa以下の小さな粒子が、その作用を担っていることを明らかにした。 以上、ポリリン酸は、腸炎の腸管上皮部に血小板凝集を誘導させ、凝集血小板から放出する未知の活性因子によって、腸粘膜修復作用を発揮することを明らかにした。本研究成果は、ポリリン酸の臨床応用の展開性を広げるだけでなく、今後、この未知の腸管修復を誘導する生理活性物質の同定は、難治性炎症性腸疾患やそのほかの上皮潰瘍疾患などへの応用など期待できる。 先日、上記研究成果は、すでにMediators of Inflammationに掲載されており、先の論文発表会で、ポリリン酸の作用機序から臨床応用に関する様々な質問に対して、的確な回答がなされた。本研究が優れた成果であることに加え、磯崎氏は、臨床だけでなく基礎医学的にも広く深い見識を有し、本学の医学博士学位に値することが認められた。			