

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岡本 耕太郎
学位論文題目			
Competence and sporulation factor derived from <i>Bacillus subtilis</i> improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection			
(Bacillus subtilis菌由来のCompetence and sporulation factor(CSF)は免疫調節作用や細胞保護作用を介して腸管炎症における粘膜上皮細胞障害を改善する)			
共著者名			
Mikihiro Fujiya, Toshie Nata, Nobuhiro Ueno, Yuhei Inaba, Chisato Ishikawa, Takahiro Ito, Kentaro Moriichi, Hiroki Tanabe, Yusuke Mizukami, Eugene B Chang, Yutaka Kohgo			
未公表			
研究目的			
<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必須の存在である。これらの菌の中には健康上有益な効果を有する様々な菌が存在し、プロバイオティクスと呼ばれている(1)。これらプロバイオティクスには炎症性腸疾患、抗生剤起因性腸炎、壊死性腸炎などの疾患に対し治療効果があることが報告されている。その効果は菌体成分のみならずその培養上清にも認められることから、プロバイオティクスが分泌する何らかの有効成分を介していると考えられている。しかし、宿主の健康に寄与するプロバイオティクス由来の特異的分子はほとんど知られていなかった。最近、我々はプロバイオティクス的一种である<i>Bacillus subtilis</i> (<i>B. subtilis</i>)に腸管保護作用があることを発見し、その生理活性を仲介する菌由来ペプチド、competence and sporulation factor (CSF)の同定に成功した(2)。本研究では、炎症下における腸管上皮障害に対するCSFの治療効果を明らかにすることを目的とした。</p>			
材料・方法			

1. ヒト大腸上皮細胞由来の細胞株 Caco2/_{bbE} 細胞を 10^5 cells/ cm^2 に調整し10-14日間培養した後、FBS freeの環境下においた。PBS, 100ng/ml TNF- α , 10nM, CSF, TNF- α +CSFをそれぞれ添加し、48時間後に各々の培養上清を回収、炎症性サイトカインの発現についてHuman Cytokine Antibody Array V (RayBiotech, GA)を用いて検討した。また、同様の方法でTNF- α 、CSFを添加したCaco2/_{bbE} 細胞におけるHeat shock proteinの発現をウエスタンブロットにより解析した。一次抗体は抗ヒトHsp27抗体 (Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada)を用いた。

2. C57/B16マウスに2%DSSを6日間自由飲水させ腸炎モデルを作製した後、10 nM CSFを注腸投与し、注腸24時間後にマウスをと殺して体重・大腸長を測定した。さらに、大腸組織のHE標本を作製し組織学的検討を行った。マウスDSS腸炎モデルにおける組織学的検討はBergらのhistological scoreを用いて、炎症の程度を0-4に数値化し評価した。

3. 致死量である4%DSSを自由飲水させたマウスに10nM CSFを注腸投与し、累積生存率について検討を行った。

尚、本実験は旭川医科大学動物実験施設の承認のもとに行った。統計学的処理については、組織学的スコアの解析はMann-Whitney U test、生存曲線の解析はKaplan-Meyer法、Breslow-Gehan-Wilcoxon testを用い、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありと判断した。

成 績

1. CSF は、TNF- α に誘導された炎症性 mediator、IL-4, -6, -7, CXCL-1 の分泌を抑制し、免疫抑制サイトカインである IL-10 の分泌を促進した。また、CSF は上皮細胞における代表的な細胞防御因子である Hsp 27 の発現を誘導した。特に、10nM の濃度の CSF が最も強く Hsp 27 を誘導した。以上から CSF は炎症性 mediator の分泌抑制と抗炎症サイトカインの分泌促進および細胞防御蛋白の発現誘導により抗炎症作用、細胞防御作用を発揮する可能性が示唆された。

2. マウスに2%DSSを6日間経口投与した後にPBSおよびCSF注腸を行い、体重と大腸長を計測した。両群において体重に差は認められなかったが、大腸長はCSFを注腸した群において有意に長かった。また、CSFはマウスDSS腸炎モデルにおける腸管炎症スコアを有意に低下させた。この結果から *in vivo* の腸炎モデルにおけるCSFの抗炎症作用が示唆された。

3. 致死量である 4%DSS を経口投与したマウスの累積生存率を解析した結果、PBS 投与群の 50%生存期間が 9 日間だったのに対し、CSF 投与群の 50%生存期間は 11 日間であった。CSF 投与群では PBS 投与群よりも累積生存率が有意に高率であった。このことから CSF が重症腸炎を生じたマウスの生存能を改善することが示唆された。

考 案

今回の検討から、*B. subtilis*由来の活性ペプチドである CSF が腸管炎症下における上皮細胞の障害を軽減し、致死性腸炎を発症したマウスの生存率を改善することが示された。このことは、CSF が *B. subtilis* の腸管保護作用を仲介しており、CSF が腸管炎症の治療に有効である可能性を示唆している。*Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*B. subtilis* といったプロバイオティクスは抗生剤起因性腸炎、壊死性腸炎、潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患の治療に有用であるとされるが、その治療効果は安定しない。なぜなら、現在用いられているプロバイオティクスの生菌が宿主腸管において生理作用を発揮するためには、腸管内に生着・増殖し、その活動性を維持しなければならないからである。しかし、病原微生物や薬剤の影響などにより、多くの腸疾患患者の腸管内環境は種々の異常を抱えており、プロバイオティクスの生菌が十分に生着し増殖することはしばしば困難である。そこで我々は、生着・増殖のプロセスが必要ない菌由来の有効成分を用いることで、複雑な腸管内環境においても安定した効果が得られると考え、*B. subtilis* 由来の活性ペプチドである CSF を本検討に用いた。その結果、菌体そのものを用いなくても菌由来の特異的活性物質により腸管炎症の制御が可能であることを明らかになった。

Caco2/_{bb6} 細胞の培養上清に関する解析から、TNF- α に誘導される IL-4, -6, -7, CXCL-1 といった腸管上皮由来の炎症性 mediator の分泌を CSF が抑制することが明らかとなった。プロバイオティクスやその培養上清が、上皮細胞から放出される炎症関連物質を調節することは以前知られていたが(3)、本研究により炎症関連物質の発現を制御する細菌由来の特異的物質が初めて同定された。CSF が炎症性 mediator の制御のみならず、炎症抑制サイトカイン IL-10 の発現を誘導することは注目される。IL-10 は炎症の制御に必須の液性因子であり、その欠損マウスは難治性炎症性腸疾患であるクローン病類似の Th-1 優位な腸炎を自然発症することが知られている。したがって、CSF による IL-10 誘導は腸管炎症の制御に効果的であると考えられる。さらに今回の検討から、CSF は腸管上皮の代表的な防御蛋白である Hsp 27 を

誘導することが明らかになった。CSFは免疫調節作用と細胞保護作用の両者を介して腸管炎症における上皮細胞障害を改善することが示唆され、新しい炎症性腸疾患治療への応用が期待される。今後さらに、CSFの免疫担当細胞に対する作用を解析することで、CSFが有する腸管細胞保護作用の機序がより詳しく解明されるであろう。

腸管上皮におけるCSFを介したバリア機能の増強は、細胞膜トランスポーターであるOCTN2によるCSF取り込みに依存する(2)。OCTNsの遺伝子多型がクローン病の疾患感受性に関与していることから、OCTN2の機能不全がCSFをはじめとするプロバイオティクス由来活性物質の上皮細胞への取り込みを低下させ、その結果腸管上皮におけるバリア機能の消失や制御不能な炎症を引き起こしている可能性がある。今後IL-10欠損マウスやT細胞受容体変異マウスなどの他の炎症モデルやOCTN2欠損マウスを用いた検討により、プロバイオティクス由来活性物質と腸管炎症との関連性を明らかにしていくことが重要である。

結 論

B. subtilis由来のCSFが腸管炎症による上皮障害を改善することが判明した。その作用機序に、腸管上皮における炎症性mediatorの制御と抗炎症サイトカインIL-10の誘導、および細胞保護蛋白Hsp27の誘導が関係していると考えられた。今後、CSFをはじめとするプロバイオティクス由来の活性物質による新しい腸管炎症治療の開発が期待される。

引 用 文 献

- 1) Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-84.
- 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 Jun 14;1(4):299-308.
- 3) Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology*. 2004; 127(5): 1474-87.

参 考 論 文

- 1) Hiroki Tanabe, Tokiyoshi Ayabe, Atsuo Maemoto, Chisato Ishikawa, Yuhei Inaba, Ryu Sato, Kentaro moriichi, Kotaro Okamoto, Jiro Watari, Toru Kono, Toshifumi Ashida, Yutaka Kohgo. Denatured human α -defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358;349-355, 2007
- 2) 伊藤貴博, 綾部時芳, 上野伸展, 金野陽高, 石川千里, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 藤谷幹浩, 河野 透, 蘆田知史, 高後 裕. ヒトPaneth細胞分泌物による炎症反応の制御. *消化器と免疫* 45;34-38, 2008

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	岡本 耕太郎
審査委員長 若宮 伸隆			
審査委員 高後 裕			
審査委員 鳥本 悦宏			
学位論文題目			
Competence and sporulation factor derived from <i>Bacillus subtilis</i> improves epithelial injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection (<i>Bacillus subtilis</i> 菌由来の Competence and sporulation factor (CSF) は免疫調節作用や細胞保護作用を介して腸管炎症における粘膜冗費細胞障害を改善する)			
<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、CSF による、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、細胞レベルでは、ヒト大腸上皮細胞由来の Caco 2-BBE 細胞で炎症性サイトカイン添加時の CSF 効果の解析、動物レベルでは、C57BL/6 マウスで DSS 誘発腸炎モデルにおける、CSF 腸内投与による炎症改善効果に対する検討を行った。</p> <p>結果として、Caco 2-BBE 細胞では、TNF 添加時において、炎症性 mediator IL-4, 6, 7, $GR\alpha$ などの分泌を抑制し、免疫抑制サイトカインである IL-10 の分泌を促進した。また、CSF は、同じ細胞において、細胞保護作用のある Hsp27 の発現誘導を促すことが認められた。つぎに、マウスにおける検討では、2%DSS 投与による、炎症性腸炎モデルで、CSF 注腸投与により、腸炎スコアの改善と大腸の長さの短縮を防止する効</p>			

果が認められ、マウス腸での抗炎症作用を有することを認めた。

さらに、4%DSS 投与による重症腸炎モデルでも、CSF 投与群において、生存日数の延長による、生存率改善効果を認めた。

以上のことから、*Bacillus subtilis* 由来の活性ペプチドである CSF が、腸管炎症状態における上皮細胞の障害を軽減し、致死性腸炎を発症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、*Bacillus subtilis* の腸炎保護作用を、CSF が担っており、CSF 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、*Bacillus subtilis* 由来 CSF 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 mediator の制御と抗炎症性サイトカインの誘導を惹起し、細胞保護作用をもつ Hsp27 誘導が関与する可能性を明らかにした最初の報告である。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。