

# 論文内容要旨

Polysaccharides derived from *Ganoderma lucidum* fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages

(霊芝菌糸体培養基熱水抽出物 (MAK) 由来 Polysaccharides はマクロファージから GM-CSF を誘導しマウスインドメサシン小腸炎を改善する)

Cellular Immunology, 2017, in press.

主指導教員：茶山 一彰 教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：田妻 進 教授

(広島大学病院 総合診療医学)

永井 健太

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

近年、小腸内視鏡の普及により、NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害が注目されているが、その病態及び予防方法については不明であり、その対応が課題となっている。霊芝菌糸体培養基熱水抽出物である MAK は様々な成分から成る発酵食品として我が国で販売されており、抗腫瘍免疫効果を増強するという報告がある。また、これまで我々は MAK がマウス TNBS 腸炎を改善することを報告している。しかしながら、これまでインドメサシン (NSIADs) 誘発マウス小腸粘膜傷害モデルに対する有効性に関する報告はない。著者は、マウスのインドメサシン誘発小腸粘膜傷害における MAK の予防効果及びその免疫学的機能について検討を行い、さらにその抗炎症成分について検討した。

最初にインドメサシン誘発小腸粘膜炎症モデルの作成を行った。C57BL/6 マウスにインドメサシン 10mg/kg を経口投与し 24 時間後の小腸の腸管長、潰瘍数及び透過性について検討した。インドメサシン投与が小腸の腸管長の短縮、潰瘍の発生及び粘膜透過性亢進をきたすことを確認した。さらに、これまで MAK は自然免疫を活性化することが報告されており、腹腔内マクロファージ (PMs) の養子移入モデルの確立を行った。C57BL/6 マウスから 10ml の PBS を用いて PMs を採取し、*in vitro* で MAK にて刺激した PMs を C57BL/6 マウスの腹腔内に養子移入し、同時にインドメサシンを経口投与した。24 時間後に屠殺し、小腸の粘膜傷害を評価したところ、インドメサシン誘発による小腸粘膜傷害 (小腸の腸管長、潰瘍数及び透過性) は有意差をもって抑制された ( $P < 0.05$ ; コントロール群 vs MAK 刺激 PMs 移入群)。In vitro で MAK 刺激された PMs からは GM-CSF が誘導されたため、抗 GM-CSF 抗体の前投与を行い、小腸炎に対する予防効果に与える影響を検討したところ、MAK の小腸粘膜傷害予防効果はキャンセルされた。

次に養子移入した PMs の遊走を確認するために、PKH26 で PMs をラベルし養子移入した。移入 12 時間後に蛍光電子顕微鏡で小腸、腹腔内リンパ節、大腸及、脾臓及び肝臓を評価した。炎症が誘発されている小腸で最も PKH26 でラベルした PMs が集積していた。

MAK 刺激された PMs の養子移入によりインドメサシン誘発マウス小腸炎に対する予防効果が示唆された。MAK に含まれる polysaccharides の防御効果を確認するために、MAK 特異的 polysaccharides 分解能をもつ pectinase を *in vitro* で処理した MAK により刺激された PMs を養子移入し、インドメサシン誘発小腸粘膜傷害の評価を行った。pectinase 処理された MAK による刺激を受けた PMs 移入による抗炎症効果は、pectinase 処理により減弱した。

## 考察

MAK は野田食菌工業により霊芝菌の菌糸体をバガスと米糠の熟成培地ごと熱水処理して作成された発酵食品で自然免疫活性化作用を有している。これまで MAK が TNBS 腸炎を減弱させることが報告されている。筆者は、MAK 刺激されたマウスの腹腔内マクロファージ養子移入モデルを確立し、インドメサシン誘発小腸粘膜傷害の予防効果を有することを示した。さらにこの粘膜傷害抑制効果が GM-CSF の中和により消失することを明らかにした。移入したマクロファージは炎症部位に特異的に集積していたことから、炎症局所での内因性 GM-CSF の誘導が炎症改善に関与している可能性を示した。養子モデルの確立は、免疫学的機能の検討及びその抗炎症成分を検討するためであった。MAK 特異的 polysaccharides 分解能をもつ pectinase を使用し MAK 処理することで、MAK のインドメサシン誘発小腸粘膜傷害の予防効果は減弱しており、MAK に含まれる polysaccharides が GM-CSF を誘導し抗炎症効果を発揮している可能性が示唆された。今後 MAK に含まれる他の成分の関与や、MAK 特異的 polysaccharides のみを抽出し GM-CSF 誘導の解明を追求する必要があるが、本研究により腸管局所内因性 GM-CSF 誘導がインドメサン小腸粘膜傷害 (NSAIDs 腸炎) の治療戦略の一つになる可能性が示唆され、その誘導には MAK 特異的 polysaccharides が関与している可能性が示唆された。

## まとめ

MAK 刺激された PMs 移入はインドメサシン誘発小腸粘膜傷害に対して抗炎症効果を示し、GM-CSF がその作用に関わっていることが示唆された。さらに MAK に含まれる polysaccharides がその抗炎症効果の成分のひとつである可能性が推測された。