

## 論文審査の結果の要旨

|   |                   |    |       |
|---|-------------------|----|-------|
| 博士の専攻分野の名称  | 博 士 (医 学)         | 氏名 | 永井 健太 |
| 学位授与の条件   | 学位規則第 4 条第①・2 項該当 |    |       |
| 論 文 題 目   |                   |    |       |
| <p>Polysaccharides derived from <i>Ganoderma lucidum</i> fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages</p> <p>(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)</p>   |                   |    |       |
| 論文審査担当者   |                   |    |       |
| 主 査 教 授   | 坂 口 剛 正           | 印  |       |
| 審査委員 教 授  | 檜 山 英 三           |    |       |
| 審査委員 講 師  | 恵 木 浩 之           |    |       |
| 〔論文審査の結果の要旨〕  |                   |    |       |
| <p>近年、小腸内視鏡の普及により、非ステロイド性抗炎症薬 (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、これまで著者は MAK がマウストリニトロベンゼン・スルホン酸 (TNBS) 誘発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。</p> <p>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ン 10 mg/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 10 ml のリン酸緩衝生理食塩水を用いて PMs を採取し、<i>in vitro</i> 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 (<math>P &lt; 0.05</math>; コント</p> |                   |    |       |

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 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で小腸、腹腔内リンパ節、大腸、脾臓及び肝臓を評価した。炎症が誘発されている小腸で、PKH26 でラベルした PMs が最も集積していた。

このように 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ため、MAK に含まれる polysaccharides の防御効果を確かめる目的で、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。その結果、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。

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製造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。著者は、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に 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。さらに MAK を pectinase で処理することで、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た。

以上の結果から、本論文は 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有し、GM-CSF がその作用に関わっていることを示し、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ことを明らかにした点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

|   |                |    |       |
|---|----------------|----|-------|
| 博士の専攻分野の名称  | 博士(医学)         | 氏名 | 永井 健太 |
| 学位授与の条件   | 学位規則第4条第①・2項該当 |    |       |
| 論文題目  |                |    |       |
| <p>Polysaccharides derived from <i>Ganoderma lucidum</i> fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages</p> <p>(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)</p> |                |    |       |
| 最終試験担当者   |                |    |       |
| 主査教授  | 坂口 剛正          | 印  |       |
| 審査委員 教授   | 檜山 英三          |    |       |
| 審査委員 講師   | 恵木 浩之          |    |       |
| 〔最終試験の結果の要旨〕  |                |    |       |
| 判定合格  |                |    |       |
| <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年1月4日の第72回広島大学研究科発表会(医学)及び平成29年12月26日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p>   |                |    |       |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1 Indomethacin による小腸特異的粘膜障害の部位と発生機序</li> <li>2 GM-CSF の粘膜障害予防のメカニズム</li> <li>3 MAK の有する polysaccharide と抗炎症作用との関連</li> <li>4 MAK 刺激 macrophage の炎症部位集積のメカニズム</li> <li>5 MAK の臨床応用の可能性</li> </ol>                             |                |    |       |
| <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>   |                |    |       |