

# 博士論文

腸内細菌代謝産物の腸管保護作用に関する研究

平成 29 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

宮本 潤基

# 博士論文

腸内細菌代謝産物の腸管保護作用に関する研究

平成 29 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

宮本 潤基

## 目次

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 略記                         | 1  |
| 第1章 緒言                     |    |
| 1 腸内細菌叢と宿主恒常性              | 2  |
| 1.1 腸管免疫と腸内細菌叢             | 2  |
| 1.2 腸内細菌と代謝産物              | 3  |
| 2 腸管バリア                    |    |
| 2.1 Tight junction         | 4  |
| 2.2 Tight junction の破綻と疾患  | 4  |
| 3 G タンパク質共役型受容体            | 5  |
| 4 本研究の目的および本論文の構成          | 6  |
| 第2章 腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用     |    |
| 1 序論                       | 14 |
| 2 材料および方法                  | 14 |
| 2.1 腸内細菌代謝産物               | 14 |
| 2.2 Caco-2 細胞培養            | 14 |
| 2.3 腸管バリア保護作用の評価           | 15 |
| 2.4 real-time RT-PCR       | 16 |
| 2.5 Immunoblotting         | 16 |
| 2.6 統計処理                   | 17 |
| 3 結果および考察                  | 17 |
| 3.1 腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用の比較 | 17 |
| 3.2 HYA の TJ 関連因子の発現制御     | 18 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 4 要約                                | 19 |
| 第3章 HYA の腸管バリア保護作用におけるシグナル解析        |    |
| 1 序論                                | 28 |
| 2 材料および方法                           | 28 |
| 2.1 腸内細菌代謝産物                        | 28 |
| 2.2 Caco-2 細胞培養                     | 28 |
| 2.3 腸管バリア保護作用の評価                    | 28 |
| 2.4 Real-time RT-PCR                | 28 |
| 2.5 Immunoblotting                  | 28 |
| 2.6 免疫蛍光染色                          | 29 |
| 2.7 GPR40 functional activity assay | 29 |
| 2.8 統計処理                            | 29 |
| 3 結果および考察                           | 30 |
| 3.2 HYA の NF- $\kappa$ B 経路制御機構     | 30 |
| 3.2 GPR40 に対する HYA の親和性評価           | 30 |
| 3.3 GPR40 antagonist 存在下での腸管バリア保護作用 | 31 |
| 3.4 HYA の MAPK 経路リン酸化評価             | 32 |
| 3.5 MEK inhibitor 存在下での腸管バリア保護作用    | 32 |
| 4 要約                                | 32 |

|     |                         |    |
|-----|-------------------------|----|
| 第4章 | HYAの腸炎改善作用              |    |
| 1   | 序論                      | 51 |
| 2   | 材料および方法                 | 51 |
| 2.1 | 動物実験                    | 51 |
| 2.2 | Real-time RT-PCR        | 51 |
| 2.3 | 免疫蛍光染色                  | 52 |
| 2.4 | マウス腸管上皮細胞 (IECs)の単離     | 52 |
| 2.5 | フローサイトメトリー              | 52 |
| 2.6 | 統計処理                    | 53 |
| 3   | 結果および考察                 | 53 |
| 3.1 | HYAの腸炎改善評価              | 53 |
| 3.2 | TJ関連因子の発現制御             | 53 |
| 3.3 | 腸管上皮細胞のTNFR発現制御         | 54 |
| 4   | 要約                      | 55 |
| 第5章 | 総括                      |    |
| 1   | 腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用(第2章) | 68 |
| 2   | 腸内細菌代謝産物HYAの分子メカニズム     | 69 |
| 2-1 | TNFR発現制御                | 69 |
| 2-2 | GPR40を介した腸管バリア保護メカニズム   | 69 |
| 3   | 腸内細菌代謝産物HYAによる腸炎改善作用    | 71 |
| 4   | まとめおよび今後の展望             | 72 |
|     | 参考文献                    | 75 |
|     | 謝辞                      | 85 |

## 略記

ATCC; American type culture collection

DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DHA; docosahexaenoic acid

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

DSS; dextran sulfate sodium

DTT; dithiothreitol

EPA; eicosapentaenoic acid

ERK; extracellular signal-regulated kinase

FITC; fluorescein isothiocyanate

GALT; gut-associated lymphoid tissue

GPCRs; G protein-coupled receptors

HBSS; Hank's balanced salt solution

HDAC; histone deacetylase

HYA; 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid

HYB; 10-hydroxy octadecanoic acid

IECs; intestinal epithelial cells

I $\kappa$ B; inhibitor  $\kappa$ B

IFN; interferon

IL; interleukin

JNK; c-jun N-terminal kinase

KetoA; 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid

KetoB; 10-oxo-octadecanoic acid

KetoC; 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid

MAPK; mitogen-activated protein kinase

MEK; MAPK kinase

MLCK; myosin light chain kinase

NF- $\kappa$ B; nuclear factor-kappa B

PBS; phosphate buffered saline

PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor

PUFAs; polyunsaturated fatty acids

SFB; segmented filamentous bacteria

TER; transepithelial electric resistance

Th17 cells; T helper 17 cells

TJ; tight junction

TNF; tumor necrosis factor

TNFRs; TNF receptors

Treg cells; regulatory T cells

ZO; zonula occludens

# 第1章

## 緒言

### 1 腸内細菌叢と宿主恒常性

近年、オミクス解析技術の発展によって、腸内細菌の遺伝子とその代謝産物の網羅的解析が可能となり、腸管における腸内細菌叢の全容とその機能性が明らかとなってきた。その結果、腸内細菌叢の変化が種々の疾患の発症・増悪（炎症性疾患 (Huttenhower *et al.*, 2014)、代謝性疾患 (Sonnenburg & Bäckhed, 2016; Winer *et al.*, 2016)や自己免疫疾患 (Zhernakova *et al.*, 2013.)など) に寄与することが明らかになりつつある。すなわち、腸内細菌が宿主の免疫・代謝機能に重要な役割を果たしており、医学・生物学において最も重要な領域として認識され始めている。

#### 1.1 腸管免疫と腸内細菌叢

腸管は、摂取した食物の消化・吸収を司る器官であると同時に、食物抗原や腸内細菌などの「異物」に常に暴露される器官であるため、腸管には全免疫細胞の約60%が集中し、生体最大の防御システムとして腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT)を形成している (Pearson *et al.*, 2012) (Figure 1-1)。GALTはパイエル板や腸管孤立リンパ小節などのリンパ節に加え、腸管上皮間リンパ球や粘膜固有層リンパ球などの腸管特異的な免疫細胞で構成されている。この組織には、食物抗原や腸内細菌を認識する樹状細胞やマクロファージといった自然免疫担当細胞と、T細胞やB細胞を含む獲得免疫担当細胞が含まれる。このような、膨大な数の「異物」と「免疫細胞」が共存する腸管において、その恒常性維持に腸管上皮細胞が重要な役割を果たしている。腸管上皮細胞は、腸管腔内の異物と免疫細胞を隔てる物理的バリアとして機能し、異物の侵入を防いでいる。また、上皮細胞はムチンや抗菌ペプチドを産生するなど、生物学的バリアとしても機能している。さらに近年の研究では、上皮細胞はケモカインやサイトカインを分泌、あるいは共刺激分子を発現することで、免疫細胞の局在、活性化に寄与することも報告されている。

一方、我々の腸管には、1000 種類以上、100 兆個もの腸内細菌が存在し、それぞれがバランスを保ちながら共存している。近年、この腸内細菌のバランスが何らかの刺激で破綻すると、宿主の恒常性に影響を及ぼすことが明らかとなった (Verdu *et al.*, 2015)。すなわち、我々の恒常性を維持するために、腸内細菌のバランスを保つことが非常に重要である。また、宿主の恒常性維持において、腸内細菌が腸管粘膜免疫システムの制御に寄与することと、その分子メカニズムが明らかになりつつある。例えば、腸内細菌の一種であるセグメント細菌 (segmented filamentous bacteria; SFB)は炎症応答に関与するインターロイキン 17 産生性ヘルパーT 細胞 (T helper 17 cells; Th17 cells)の分化・誘導に関与することや (Ivanov *et al.*, 2009; Atarashi *et al.*, 2015)、クロストリジウム目細菌群が制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg cells)の分化・誘導に寄与することが明らかとなった (Atarashi *et al.*, 2011; Atarashi *et al.*, 2013; Smith & Garrett, 2011) (Figure 1-2)。

## 1.2 腸内細菌と代謝産物

近年、難消化性多糖類（食物繊維）は腸内細菌の重要な栄養源として利用され、その代謝産物として生成された短鎖脂肪酸が、宿主の免疫・代謝系に重要なシグナル分子として役割を果たすことが明らかになりつつある。例えば、短鎖脂肪酸の一つである酢酸は、病原性大腸菌 O157 の感染を予防することや腸管バリア機能を向上させることが明らかになっており (Fukuda *et al.*, 2011.)、また酪酸はエピジェネティック (histone deacetylase inhibition; HDAC inhibition)に作用し、Treg 細胞の転写因子である FoxP3 の発現を制御することで大腸炎を改善することも報告されている (Furusawa *et al.*, 2013; Zeng & Chi, 2015) (Figure 1-3)。この他にも、細胞膜上の G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptors; GPCRs)である短鎖脂肪酸受容体を介した作用なども報告されている。

さらに、腸内細菌が生化学的な水酸化反応を介して、食事由来の不飽和脂肪酸から水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、共役脂肪酸および部分的に飽和された非メチル化脂肪酸を産生することが報告され、マウスの組織においても、これら独特な脂肪酸の存在が明らかになっている (Kishino *et al.*, 2013) (Figure 1-4)。このような不飽和脂肪酸由来の腸内

細菌代謝産物群は、脂質代謝制御 (Goto *et al.*, 2015)、脂肪酸合成 (Nanthirudjanar *et al.*, 2015)あるいは、免疫制御 (Bergamo *et al.*, 2014)などの機能性に寄与することが見出されており、腸内細菌の不飽和脂肪酸代謝に依存して、腸管内に生成する脂肪酸がシグナル分子として、宿主の健康に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆している。

## 2 腸管バリア

### 2.1 Tight junction

腸管上皮細胞は、栄養素の吸収に関与すると同時に、食品や腸内細菌などの抗原の無秩序な侵入を物理的・化学的に制御するバリア機能を担うことが知られている。そのうち、最も重要なものが物理的バリア、即ち tight junction (TJ)による物質透過性の制御である。隣接する上皮細胞同士は、TJによって強固に結合しており、栄養素、イオン、水分の透過を制御し、さらに微生物などの異物の侵入を防いでいる (Turner, 2009; Turner *et al.*, 2014)。TJは50種類以上のタンパク質から構成され、occludin や claudin ファミリーなどの膜貫通タンパク質が zonula occludens-1 (ZO-1) などの裏打ちタンパク質を介してアクチン細胞骨格と結合している (Fanning *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999) (Figure 1-5)。近年の研究により、腸管管腔内の最前線に局在することから、食品成分 (Miyachi *et al.*, 2012; Azuma *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Hung & Suzuki, 2016)、腸内細菌を含めた微生物 (Ulluwishewa *et al.*, 2011; Berkes *et al.*, 2003)、サイトカイン (Al-Sadi *et al.*, 2009)など、種々の因子が TJ の機能に影響を与えることが明らかになってきている。このように、TJ による物質透過制御は種々の因子から影響を受け変化することから、TJ 構造を正常に保つことが、腸管恒常性維持において重要であると考えられる。

### 2.2 Tight junction の破綻と疾患

腸管バリア機能の異常による物質透過性の亢進は、炎症性腸疾患 (Salim & Soderholm 2011)や過敏性腸症候群 (Piche *et al.*, 2009)、さらには、食物アレルギー (Perrier & Cortes, 2011)、アトピー性皮膚炎 (Wesemann & Nagler, 2016)など、あらゆる疾患患者や疾患モデルにおいて確認されている。特に近年、炎症性腸疾患に関する研究は盛んに行われており、モデル動物を用いた研究などにより、腸管バリア機能の異常が炎症性腸疾患の病

因の一つであることが示されている (Khor *et al.*, 2011) (Figure 1-6)。実際、炎症性腸疾患患者の腸管において、TJ 構成タンパク質の発現・異常が多数報告され (Chen *et al.*, 2015; Vivinus-Nébot *et al.*, 2014; Poritz *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2008)、さらに、物質透過性の増加は、炎症性腸疾患の重篤度と相関し、炎症再発の兆候として観察される (Mankertz & Schulzke, 2007)。炎症性腸疾患患者や炎症性腸疾患モデル動物の腸管において、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-6 および IL-17 などの炎症性サイトカインの過剰産生が報告されており (Sandborn *et al.*, 2007; Jarry *et al.*, 2015; Powell *et al.*, 2015; Miyauchi *et al.*, 2013)、これらの炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、TJ 構成タンパク質の発現・局在異常を惹起する (Juuti-Uusitalo *et al.*, 2011; Al-Sadi *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2011)。従って、これらの炎症性サイトカインによるバリア機能の低下を抑制することは、炎症性腸疾患発症予防・緩和に有効であると考えられる。

### 3 G タンパク質共役型受容体

GPCRs は、ホルモンや神経伝達物質のようなシグナル伝達分子を感知するために生理学的に重要な膜タンパク質であり、様々な疾患に対する治療・創薬ターゲットとなっている (Venkatakrisnan *et al.*, 2013)。腸内細菌代謝産物の短鎖脂肪酸は、GPR41, GPR43, GPR109a や Olf78 などに対するリガンドとして同定されており、宿主の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。例えば、GPR41 はエネルギー制御 (Kimura *et al.*, 2011)や免疫制御 (Trompette *et al.*, 2014)が報告されており、GPR43 も同様に、代謝疾患 (Kimura *et al.*, 2013)や免疫疾患 (Maslowski *et al.*, 2009)などに関与することが明らかとなっている。また、GPR109a は免疫制御 (Macia *et al.*, 2015)を、Olf78 は血圧調節 (Pluznick *et al.*, 2013)をそれぞれ担うことが報告されている。このように、宿主の栄養源として捉えられていた食品由来の短鎖脂肪酸が、GPCRs を介することでシグナル分子として作用し、宿主の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Figure 1-7)。

一方、長鎖脂肪酸受容体である GPR40 や GPR120 にも様々な機能が報告されている。例えば、GPR120 は脂肪組織や免疫細胞に高発現することが明らかにされており、

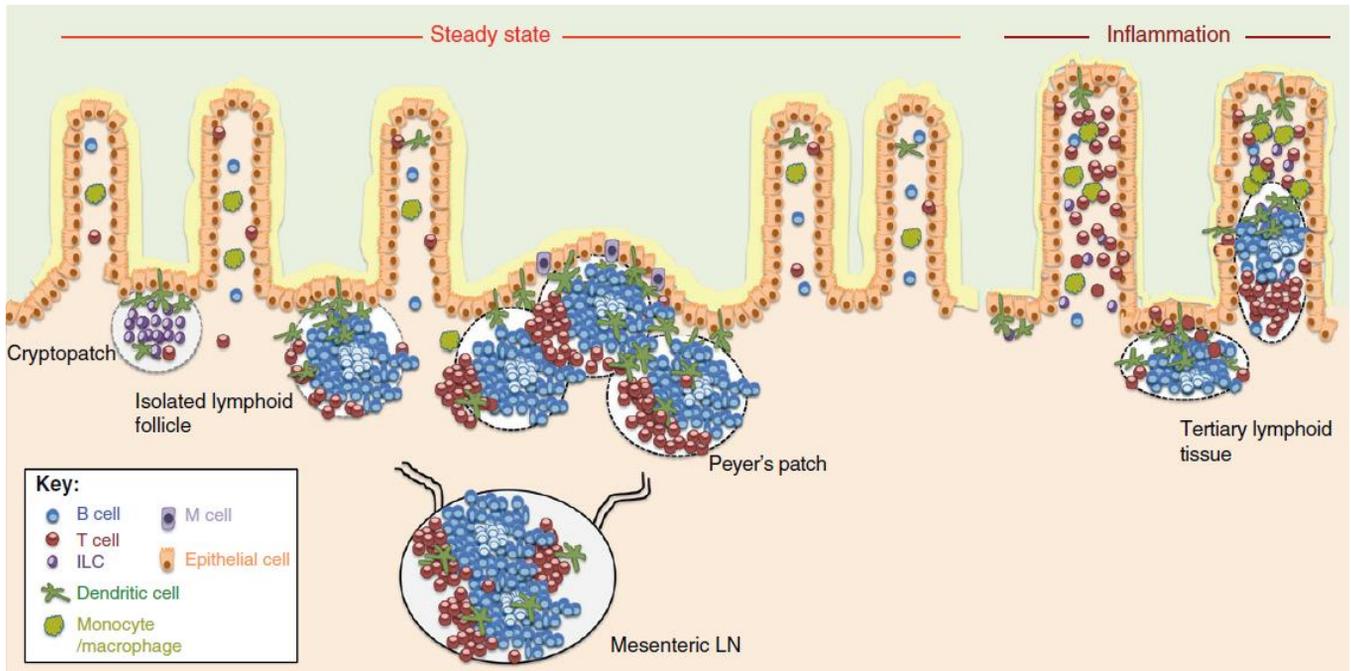
食事性肥満の原因遺伝子の一つであること (Ichimura *et al.*, 2012)、マクロファージにおける炎症抑制性シグナルを誘導すること (Oh *et al.*, 2010)や腸管ホルモン分泌による代謝改善作用 (Hirasawa *et al.*, 2005)などが報告されている。さらに、GPR40 は膵β細胞のインスリン分泌を促進すること (Itoh *et al.*, 2003)や、腸管ホルモン分泌に寄与する (Edfalk *et al.*, 2008)ことが明らかにされている。実際に、2型糖尿病治療薬 TAK-875 の GPR40 を介したインスリン分泌促進作用と、血糖低下作用を期待した臨床試験も検討されている (Burant *et al.*, 2012)。このように、種々の GPCRs は栄養性センサーとして、免疫系・代謝系を始めとした宿主の恒常性維持に重要な因子として作用していることが明らかとなっている (Figure 1-7)。

#### 4 本研究の目的および本論文の構成

上記に示したように、近年、腸内細菌叢-代謝産物-宿主 (GPCRs) 連関が生体恒常性維持に非常に重要であることが示唆されている。しかしながら、その作用機序は多岐に渡り、詳細な分子メカニズムまでは明らかにされていない。

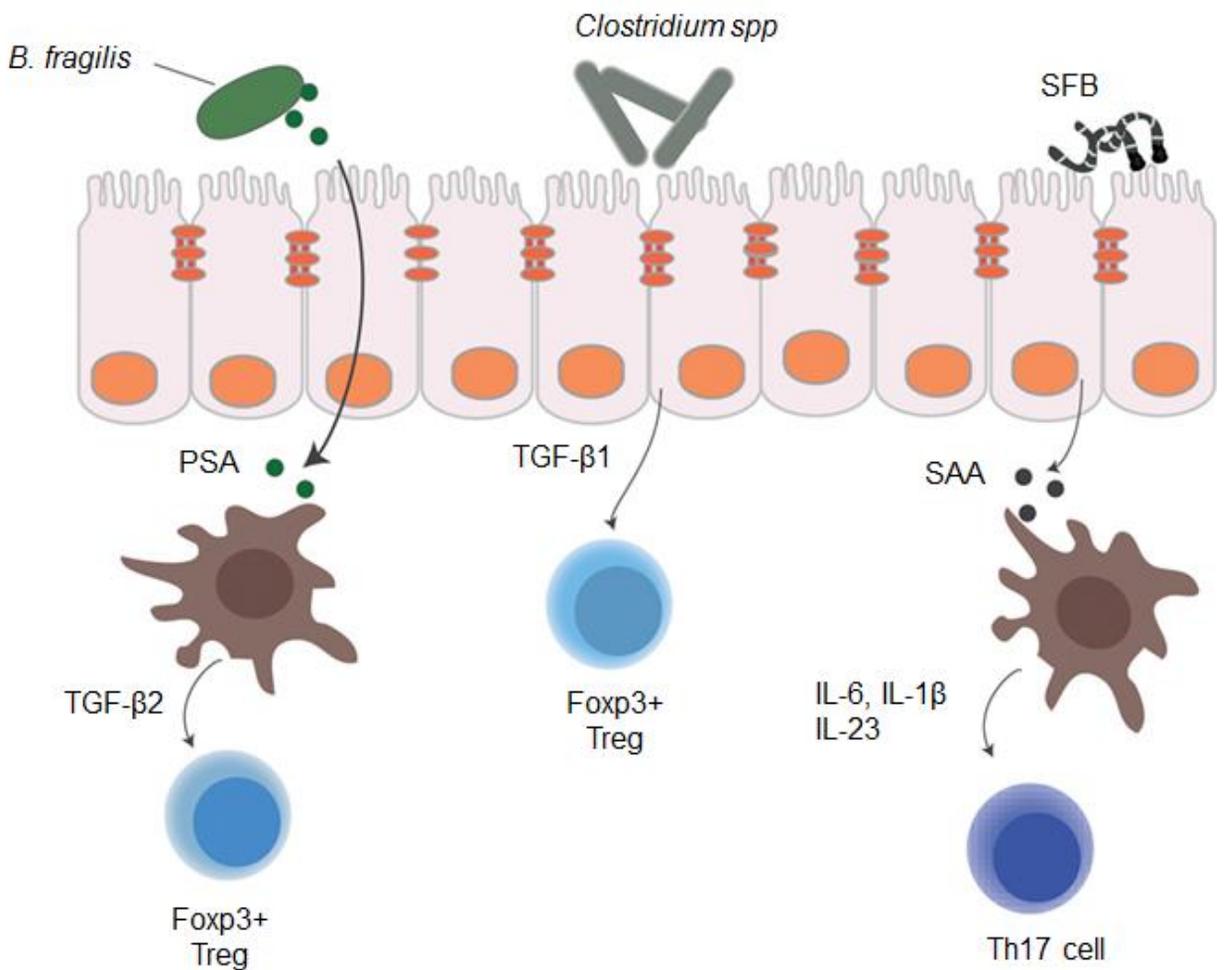
そこで、本件研究では、腸内細菌代謝産物による腸管恒常性維持機構を明らかにするために、栄養性センサーとしての GPCRs を介した腸管バリア保護メカニズムを明らかにすることを目的とした。

第2章では、腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用についてスクリーニング評価を実施した。第3章では、腸内細菌代謝産物群のうち、最も強い活性を示した 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が GPR40 の新規リガンドとなり、MEK-ERK 経路を介して Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 2 発現を制御することで、腸管バリア保護作用に寄与することを明らかにした。第4章では、HYA のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデルマウスに対する作用と、TNFR2 発現制御を介した腸管バリア保護作用を検証した。そして最後に、第5章で本研究を総括した。なお、本研究の内容は、*Journal of Biological Chemistry* (Vol. 290, No. 5, pp. 2902-2918, 2015) に掲載されたことを付記する。



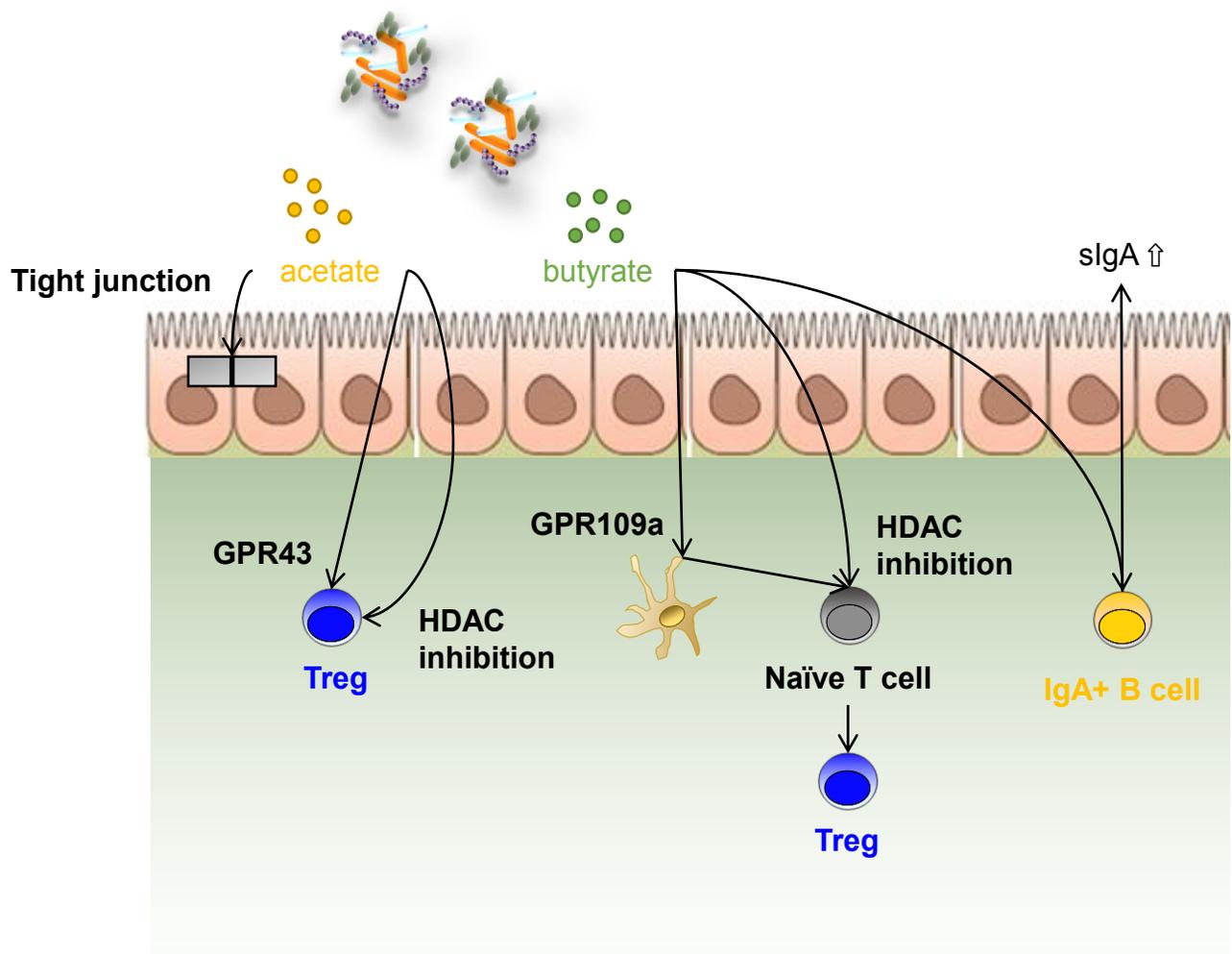
**Figure 1-1. Gut lymphoid microenvironment in health and disease (cited from Pearson *et al.*, *Trends Immunol.* 2012).**

Lymphoid tissue of the small intestine and colon. CPs are small structures consisting mainly of ILCs and DCs. These can mature into ILFs that contain B cell zones and germinal centres. PPs are aggregated lymphoid follicles with organised T and B cell areas. During inflammation, tertiary lymphoid structures can also form that resemble ILFs. GALT-associated epithelium lacks goblet cells and has reduced mucus layer thickness. The epithelial layer contains specialised 'microfold' (M) cells as well as intraepithelial and interdigitating transepithelial DCs. Both M cells as well as DCs can sample luminal content and present it to tissue-resident GALT lymphocytes, or, in the case of DCs, possibly migrate the mLNs to present antigen there.

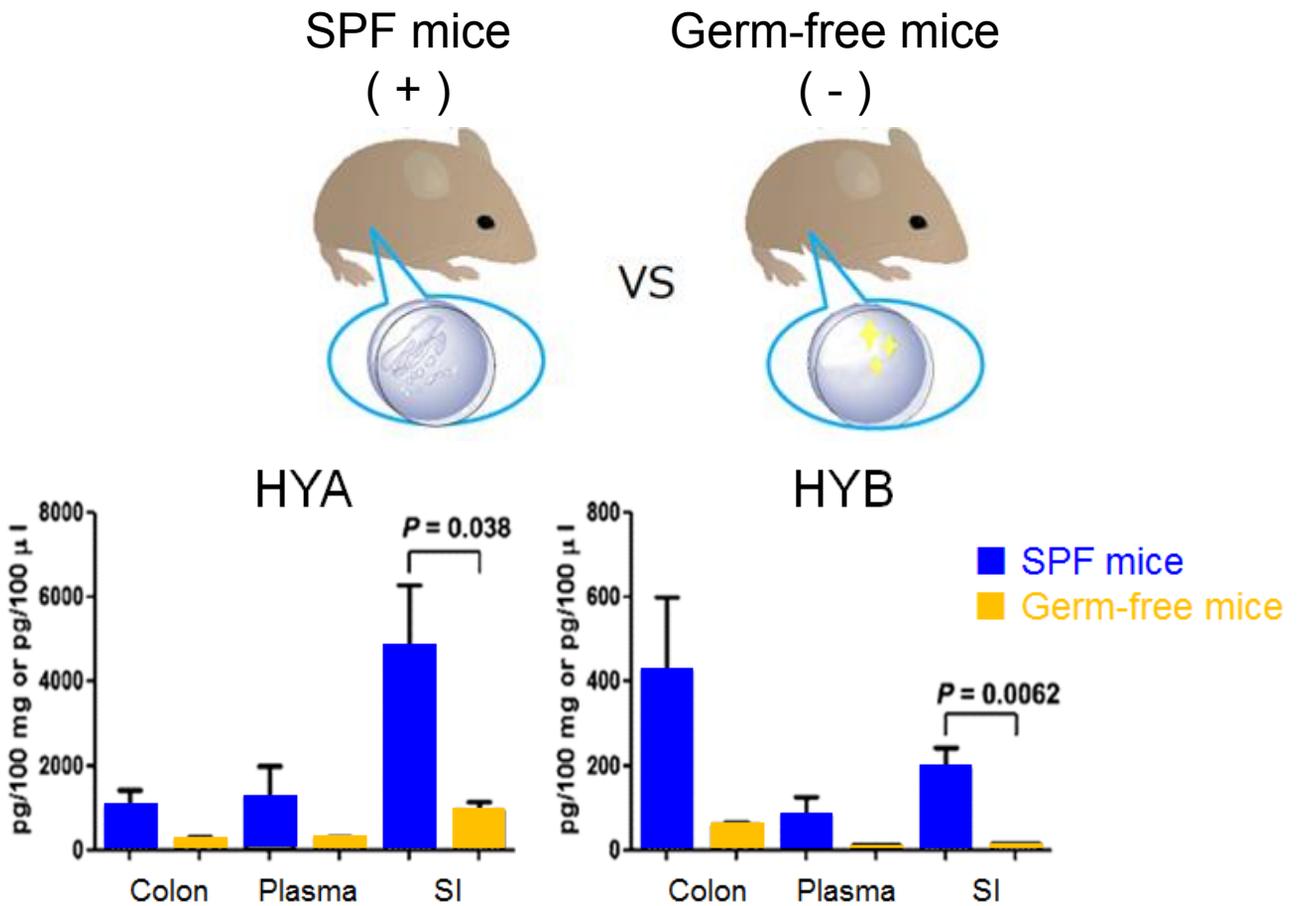


**Figure 1-2. Immunomodulatory members of the gut microbiota that regulate lamina propria CD4 T cell subsets (cited from ref. Smith and Garrett, *Front. Microbiol.* 2011). *Bacteroides fragilis*, segmented filamentous bacteria, and *Clostridium spp.* (from *Clostridium Clusters III, IV, and XIVa*) are depicted along with the mechanisms by which they influence lamina propria CD4 T cell subsets.**

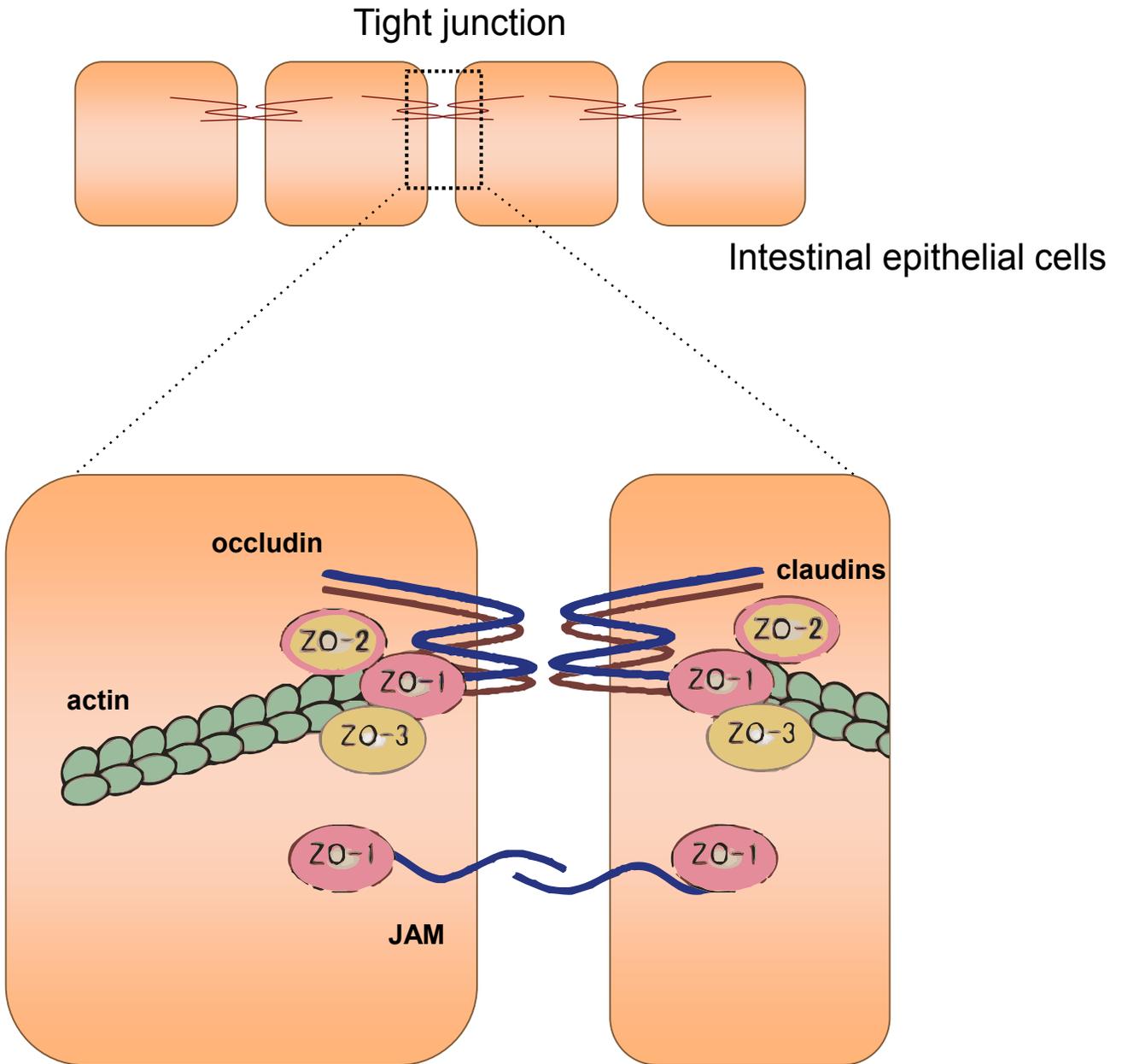
SFB; segmented filamentous bacteria, PSA: polysaccharide A, SAA: serum amyloid A



**Figure 1-3. Commensal microbial metabolism gut homeostasis in the colon (cited from Zeng and Chi, *Trends Immunol.* 2015).** Short-chain fatty acids (SCFAs), metabolites produced through bacteria fermentation of dietary fiber, promote Treg expansion and de novo generation. SCFAs also induce IgA, promote epithelial barrier integrity, and prevent pathogen colonization.



**Figure 1-4. Detection and quantitative analyses of polyunsaturated fatty acid-saturation metabolism intermediates in mice (cited from Kishino *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013).** Lipids extracted from colon (100 mg), intestine (100 mg), or plasma (100 μL) of SPF or germ-free (GF) mice were analyzed by LC-MS/MS-based lipidomics as described in Materials and Methods. Data are presented as means ± SEM (n = 8).



**Figure 1-5. Structure of intestinal barrier, tight junction.**

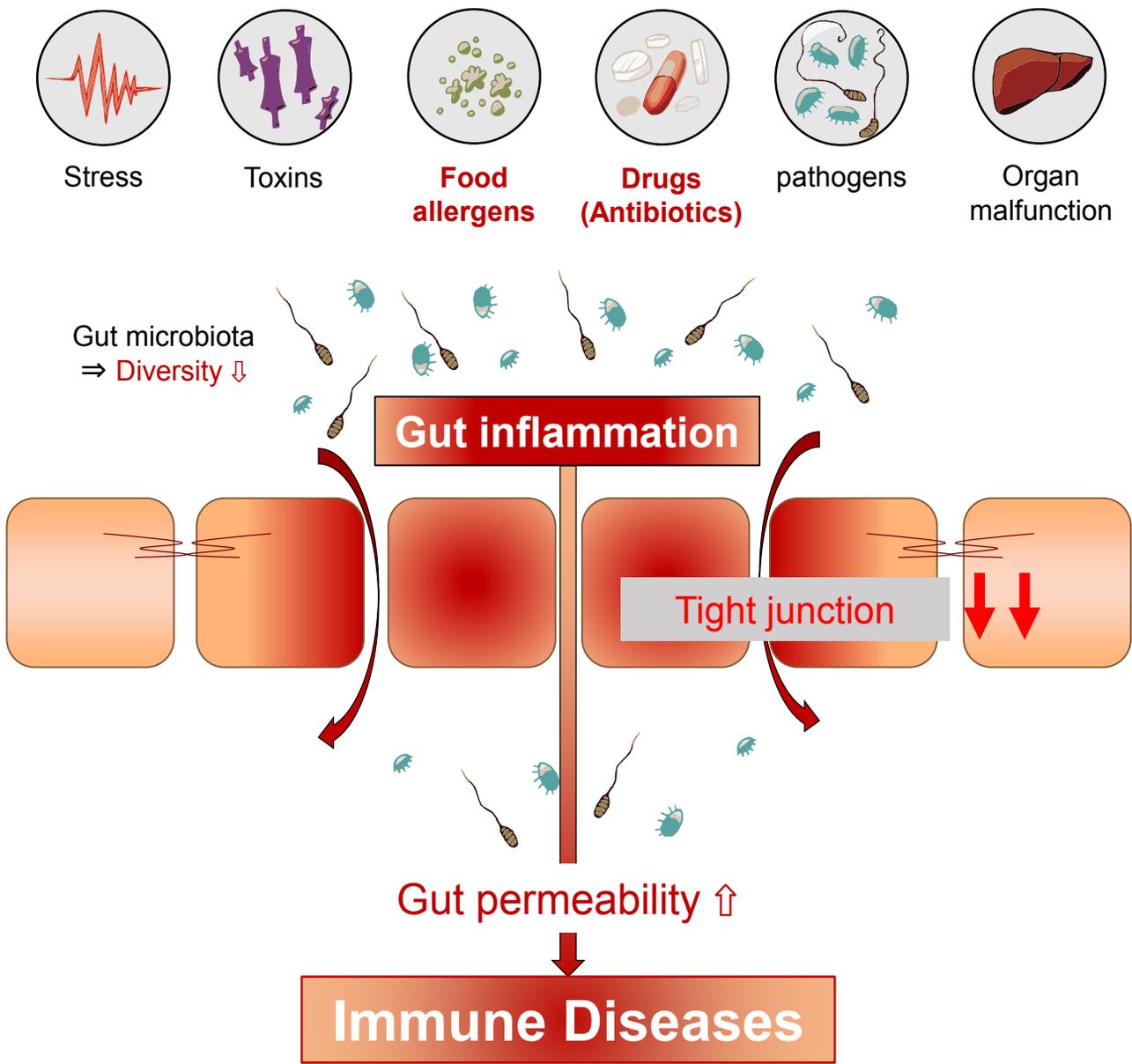


Figure 1-6. Dysfunction of tight junction and immune diseases.

## 長鎖脂肪酸受容体

## 短鎖脂肪酸受容体

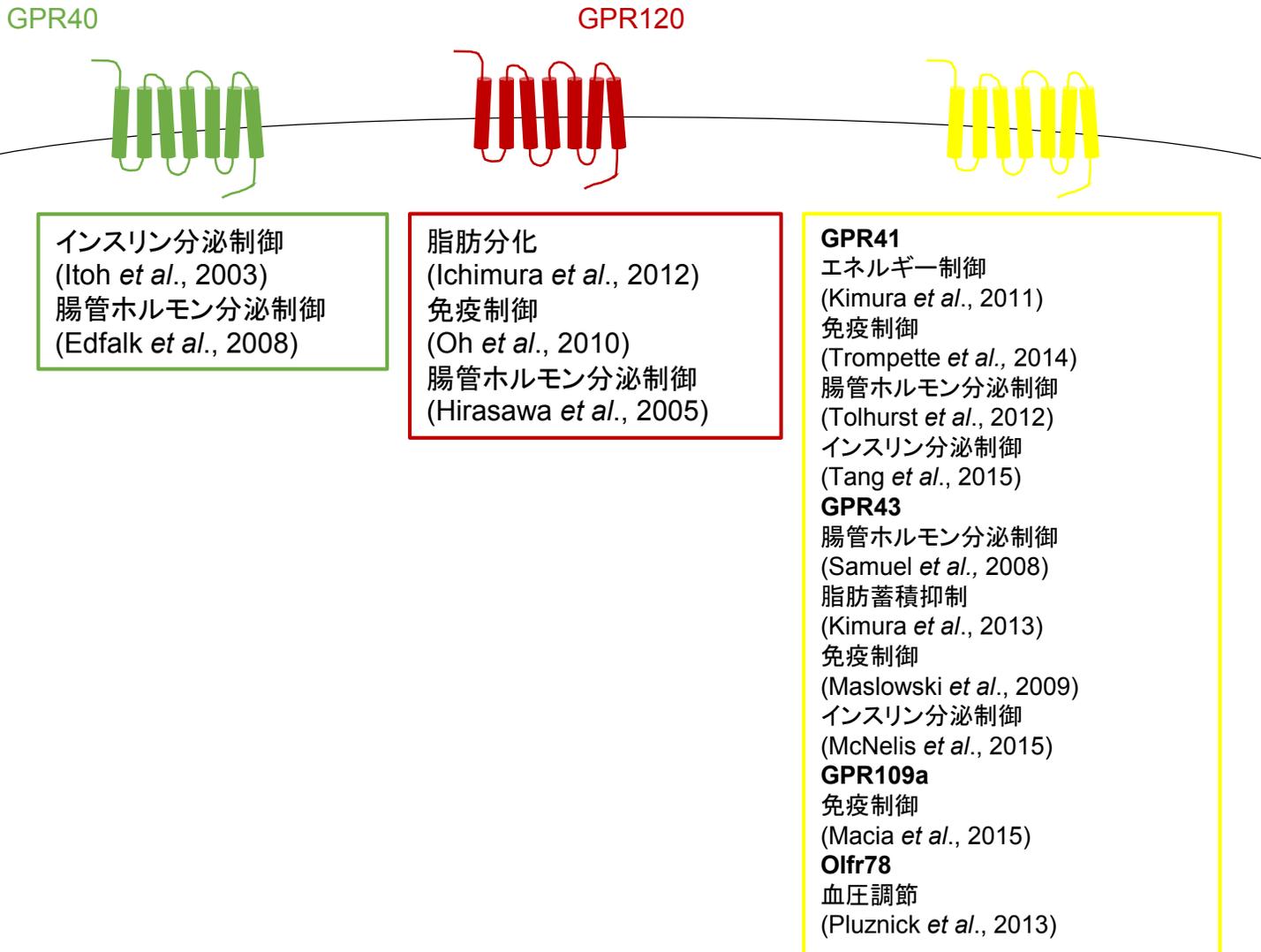


Figure 1-7. Physiological functions of free fatty acid receptors.

## 第2章

### 腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用の解析

#### 1 序論

食事脂質中に多量に含まれるリノール酸 ( $\omega$ -6 脂肪酸) は、我々が生命を維持するために摂取する必要がある必須脂肪酸であるが、その摂取量が過剰になると炎症やアレルギー反応を惹起することも知られている (Kunisawa *et al.*, 2015)。近年では、消費者の食事脂質への関心も高まり、亜麻仁油の  $\alpha$ -リノレン酸や魚油のドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA)、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) などの  $\omega$ -3 脂肪酸の機能が期待されている (Zhang *et al.*, 2016; Oh & Olefsky, 2012; Yan *et al.*, 2013)。一方、食事脂質中のリノール酸が腸内細菌によって代謝されることが明らかとなり、宿主にとって有害となる過剰なリノール酸を代謝することで、このような腸内細菌代謝産物が様々な生理活性を示すことが期待されている (Kishino *et al.*, 2013)。そこで、我々は腸内細菌のリノール酸初期代謝産物である HYA の生理機能を明らかにするために、腸管バリアへの影響を検証した。

本章では、腸管バリアの指標として経上皮電気抵抗 (transepithelial electric resistance; TER)、FITC-dextran 透過量および IL-8 産生量を測定することにより、腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用を *in vitro* 試験で比較した。また、タイトジャンクション関連因子の発現変化を解析することにより、HYA の腸管バリア保護メカニズムの解明を試みた。

#### 2 材料および方法

##### 2.1 腸内細菌代謝産物

本研究で使用したリノール酸およびリノール酸由来腸内細菌代謝産物の構造を Figure 2-1 に示した。これらは、京都大学 応用微生物学講座 発酵生理及び醸造学研究室において合成・供与された (Kishino *et al.*, 2013)。

##### 2.2 Caco-2 細胞培養

ヒト消化管上皮様細胞株である Caco-2 細胞 (ATCC HTB-37, American Type Culture Collection; ATCC)を用いた。細胞培養培地として、10% ウシ胎児血清 (ICN Biochemicals, Osaka, Japan)、1% 非必須アミノ酸 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)および抗生物質 (100 units/mL penicillin - 100 mg/mL streptomycin および 50 mg/mL gentamycin (Life Technologies, Foster City, CA, USA))を含有するダルベッコ改変イーグル(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM, Life Technologies) 培地を用いた。Caco-2 細胞は 75 cm<sup>2</sup> 組織培養フラスコで約 80%コンフルエントまで培養後、12穴トランズウェル (Transwell, Corning Coster, Cambridge, MA, USA) (直径 12 mm、孔径 0.4 μm) に 2×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 14 日間培養した。各ウェルをクラスタプレート上に設置し、basal 側 (1.5 mL)と apical 側 (0.5 mL)に DMEM 培地を満たした。Caco-2 細胞は 2 日毎に新鮮な培地に交換して培養した。

### 2.3 腸管バリア保護作用の評価

14 日間の培養後、Caco-2 細胞をリノール酸および各腸内細菌代謝産物群 (HYA, HYB, KetoA, KetoB and KetoC; 50 μmol/L)で apical 側から 24 時間、処理した。次に、IFN-γ (50 ng/mL)を basal 側に添加し、Caco-2 細胞を 24 時間インキュベートした。その後、basal 側の培地のみを除去し、TNF-α (50 ng/mL)を basal 側に添加し、Caco-2 細胞を 6 時間刺激した。

腸管 TJ バリア機能は、経時的な TER の変化および apical 側から basal 側への FITC-dextran (分子量 4000, Sigma Aldrich)の透過量の測定によって評価した。TER 値は Millicell-ERS system (Millipore, Billerica, MA, USA)によって、TNF-α 添加前と、添加後 1 時間毎に測定した。FITC-dextran (100 μmol/L)は TNF-α 添加と同時に apical 側に添加し、6 時間後の basal 側への透過量を測定した。basal 側の FITC-dextran 濃度は励起波長 492 nm と蛍光波長 535 nm で検出した (ARVOx4; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)。

TNF-α 刺激 6 時間後、basal 側の培養上清中の IL-8 濃度を ELISA (DuoSet, R&D Systems, Abingdon, UK)によって測定した。すなわち、捕捉抗体 (mouse anti-human IL-8, 4.0 μg/ml)を PBS に溶解し、96 well プレートに 100 μL ずつ添加し、室温で一晩静置した。一晩静

置後、0.05 % Tween 20 含有 PBS を各 well に 400  $\mu$ L ずつ添加し洗浄する過程を、3 回繰り返した。洗浄後、1 % BSA 含有 PBS を各 well に 300  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 1 時間静置した。1 時間静置後、洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、回収した培養上清を各 well に 100  $\mu$ L 添加した。また、スタンダード (recombinant human IL-8, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.4, 15.6, 0 pg/ml) は、各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加した。添加後、室温で 2 時間静置した。1 % BSA 含有 PBS に溶解した検出抗体 (biotinylated goat anti-human IL-8, 20 ng/ml) を各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 2 時間静置した。2 時間静置後、洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、1 % BSA 含有 PBS に溶解した streptavidin-HRP を各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 20 分間静置した。20 分間静置後、洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、0.2 M クエン酸バッファー (過酸化水素含有, pH 8.1) に 41 mmol/L tetramethylbenzidine (TMB) 溶液を混合し、各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加し、遮光して、室温で、15 分間静置した。15 分間静置後、2 mol/L 硫酸を各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加した。添加後、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により 450 nm の吸光値を測定した。

## 2.4 Real-time RT-PCR

Caco-2 細胞からの total RNA 抽出には TRIzol (Life Technologies) を使用した。Total RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) の添付プロトコールに従って、cDNA に合成した。合成した cDNA を用いて、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) の添付プロトコールに従い、real-time PCR を行った。Crossing Point 法により得られる Ct 値から  $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて遺伝子発現解析を行った。なお、本章で使用したプライマー配列を Table 2-1 に示す。

## 2.5 Immunoblotting

TNF- $\alpha$  添加 6 時間後、細胞を冷 PBS (-) で 3 回洗浄し、1 % protease inhibitor と 1 % phosphatase inhibitor を含む RIPA Lysis buffer (アトー, Tokyo, Japan) で回収した。細胞は 4  $^{\circ}$ C、30 分、14,000g で遠心分離し、上清のタンパク質量を BCA protein assay kit (Thermo scientific, Rockford, USA) を用いて測定した。その後、上清と Laemmli sample buffer (3 $\times$

concentrated; 4 % SDS, 10 % glycerol, 10 %  $\beta$ -mercaptoethanol および 0.04 % bromophenol blue を含む 125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)を混合し、95 °C で 10 分間反応させ、SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、泳動用緩衝液 (192 mmol/L グリシンおよび 1 % SDS を含む 25 mmol/L Tris-HCl) 中で 10 %アクリルアミドゲルに 20 mA の電流をかけて 90 分間電気泳動を行った。泳動後、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore)に転写した。即ち、陽極側から、ブロッキング用ろ紙 4 枚、PVDF 膜、ゲル、ブロッキング用ろ紙 4 枚の順に重ねて、0.2 % SDS を含む Tris-HCl (pH 8.3)に浸し、ゲルに対して 0.75 mA/cm<sup>2</sup> の電流をかけて 3 時間行った。転写後、5 % スキムミルクで室温、1 時間で振とうしながらブロッキングを行い、4 °C、オーバーナイトで一次抗体 (rabbit anti-Occludin, mouse anti-MLCK (myosin light chain kinase), rabbit anti-ZO-1, and mouse anti- $\beta$ -actin)と反応させた。0.1 % Tween-20/TBS で 5 分、3 回洗浄し、二次抗体 (HRP-conjugated anti-mouse あるいは anti-rabbit immunoglobulin antibodies, DAKO, Glostrup, Denmark)を用いて、室温で 1 時間反応した。再び、洗浄を 3 回を行い、バンドを ECL 試薬 (Perkin-Elmer) により発色し、検出した。定量は Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて行った。

## 2.6 統計処理

結果は全て平均値  $\pm$  標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVA により行い、post-hoc test には Tukey-Kramer 法を用いた。 $p$  値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

## 3 結果および考察

### 3.1 腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用の比較

腸管上皮様 Caco-2 細胞を IFN- $\gamma$  で 24 時間処理し、その後、TNF- $\alpha$  で 6 時間刺激することで、有意な TER の減少を誘導した。TNF- $\alpha$  の誘導した TER の変化に対する腸内細菌代謝産物群の作用を検討したところ、HYA は TER の有意な改善作用を示した (Figure 2-2)。一方、他の腸内細菌代謝産物群に TER の回復効果は見られなかった (Figure 2-2)。

以降の実験では、HYA のさらなる機能性を明らかにすることを目的とし、比較対象として、構造的に類似した HYB を用いて検討を行った (Figure 2-1)。

TER の変化は主に細胞間隙のイオン透過性の亢進を反映している (Günzel *et al.*, 2012)。したがって、炎症性サイトカインによる TER の低下は、Caco-2 細胞の腸管バリア機能の低下と正相関すると考えられる。HYA の作用活性を評価するために、前駆体であるリノール酸との腸管バリア保護作用に対する影響を検討した。その結果、リノール酸も腸管バリア保護作用を示したが、その作用は HYA も弱く、HYB と同程度であった (Figure 2-3A)。また、HYA の TER の改善作用は濃度依存的であることも示された (Figure 2-3B)。加えて、細胞間隙透過性の指標となる FITC-dextran 透過量もまた、炎症性サイトカインの刺激によって増加しており、Caco-2 細胞における腸管バリア機能の低下が確認された。一方、HYA を添加した場合、FITC-dextran 透過量の増加が有意に抑制され、その活性は濃度依存的であった (Figure 2-3C)。さらに、リノール酸にも、FITC-dextran 透過量の増加を抑制する作用が確認された (Figure 2-3C)。HYB は、炎症性サイトカインによる FITC-dextran 透過量の増加に影響を及ぼさなかった (Figure 2-3C)。

また、炎症性サイトカインの添加により、Caco-2 細胞の IL-8 産生量は顕著に増加した (Figure 2-3D)。IL-8 は好中球などを組織へ誘導するケモカインであり、IL-8 濃度が上昇することにより、組織への好中球の浸潤が促進される (Struyf *et al.*, 2005)。組織へ浸潤した好中球は、酵素や活性酸素を産生、放出する。そのため、過剰な好中球の浸潤は組織に障害を与え、腸管バリア機能低下を誘導すると考えられる。HYA は炎症性サイトカインによる IL-8 産生増加を有意に抑制し、リノール酸や HYB にも IL-8 産生抑制効果を示した (Figure 2-3D)。

### 3.2 HYA の TJ 関連因子の発現制御

HYA による腸管バリア保護メカニズムを解明するために、TJ 関連因子の発現を解析した。炎症性サイトカインで刺激した Caco-2 細胞では、TJ 関連因子の Claudin-1, 3、Occludin、MLCK および ZO-1, 2 に mRNA レベルでの発現異常が観察された (Figure 2-4)。TER の低下や FITC-dextran 透過量の増加を改善した HYA は、Claudin-1、Occludin、

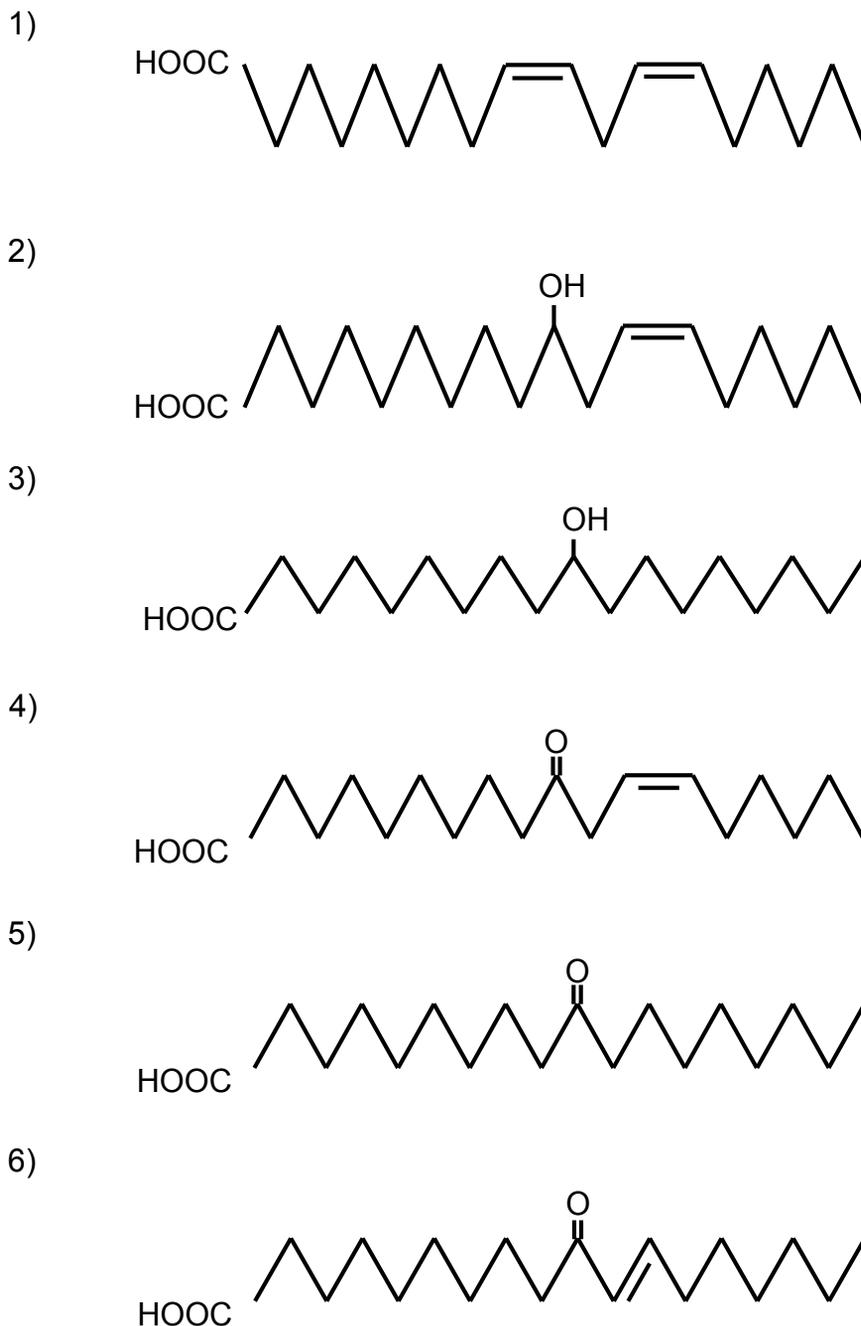
MLCK および ZO-1 の発現異常を改善した (Figure 2-4)。一方、HYB は、これらの TJ 関連因子の発現異常を改善しなかった。さらに、HYA が特に発現異常を改善した Occludin、MLCK および ZO-1 に関して、immunoblotting によるタンパク質発現解析も検討した。その結果、mRNA 発現と同様に、炎症性サイトカインの刺激によって、Occludin、MLCK および ZO-1 に有意な発現異常が観察されたが、HYA はそれらを有意に改善した (Figure 2-5)。一方、mRNA 発現解析と同様、HYB には TJ 関連因子の発現異常を改善する作用は観察されなかった。これらの結果から、HYA の腸管バリア透過性増加の抑制メカニズムとして、少なくとも一つは、Occludin、MLCK および ZO-1 の発現制御が関与していることが示唆された。occludin などの膜貫通タンパク質は ZO-1 を介してアクチン細胞骨格と連結しており、これにより、膜貫通タンパク質は TJ に局在することができる。これらのことから、ZO-1 の発現減少は、他の TJ 構成因子の局在変化、さらにはバリア機能低下に直接寄与すると考えられる。また、炎症性サイトカインの刺激により MLCK 発現が増加した。MLCK は細胞骨格であるアクチン/ミオシンフィラメントを収縮させる酵素であり、MLCK の活性化により TJ 透過性が亢進する (Jin & Blikslager, 2016; Suzuki *et al.*, 2014)。従って、MLCK 発現の増加は、炎症性サイトカイン刺激による TER 低下に直接寄与すると考えられる。

#### 4 要約

腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いた検討によって、腸内細菌代謝産物群のうち、リノール酸の初期代謝産物である HYA に強い腸管バリア保護作用を見出した。また、その作用はリノール酸よりも顕著で、TJ 関連因子の発現を制御することで、腸管バリア機能の低下を改善していることが示唆された。

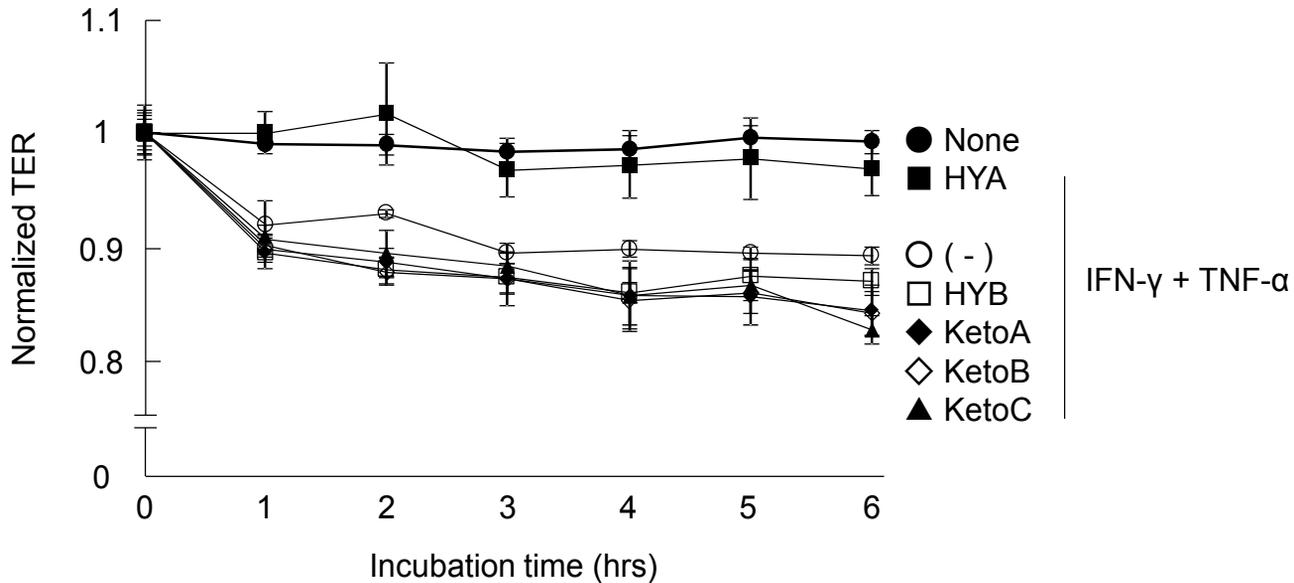
Table 2-1. 第2章で使用したプライマー配列

| Gene             |         | Sequence                         |
|------------------|---------|----------------------------------|
| <i>claudin-1</i> | Forward | 5'-CCCTATGACCCCAGTCAAATG-3'      |
|                  | Reverse | 5'-AAGGCAGAGAGAAGCAGCAG-3'       |
| <i>claudin-3</i> | Forward | 5'-AAGGTGTACGACTCGCTGCT-3'       |
|                  | Reverse | 5'-GAAGTCCCGGATAATGGTGTT-3'      |
| <i>claudin-4</i> | Forward | 5'-TATGGATGAACTGCGTGGTG-3'       |
|                  | Reverse | 5'-CCACGATGATGCTGATGATG-3'       |
| <i>occludin</i>  | Forward | 5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAAC-3' |
|                  | Reverse | 5'-ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG-3'   |
| <i>MLCK</i>      | Forward | 5'-AACGAGATCAACATCATGAACCA-3'    |
|                  | Reverse | 5'-CAGCTGTGCTTGCTCTCGAA-3'       |
| <i>ZO-1</i>      | Forward | 5'-TCCGTGTTGTGGATACCTTG-3'       |
|                  | Reverse | 5'-GGATGATGCCTCGTTCTACC-3'       |
| <i>ZO-2</i>      | Forward | 5'-AAAGCAGAGCGAACGAAGAG-3'       |
|                  | Reverse | 5'-TTTAGTTGCCAGACCCGTTTC-3'      |
| <i>β-actin</i>   | Forward | 5'-TTTTAGGATGGCAAGGGACTT-3'      |
|                  | Reverse | 5'-GATGAGTTGGCATGGCTTTA-3'       |



**Figure 2-1. Structure of fatty acids used in this study.**

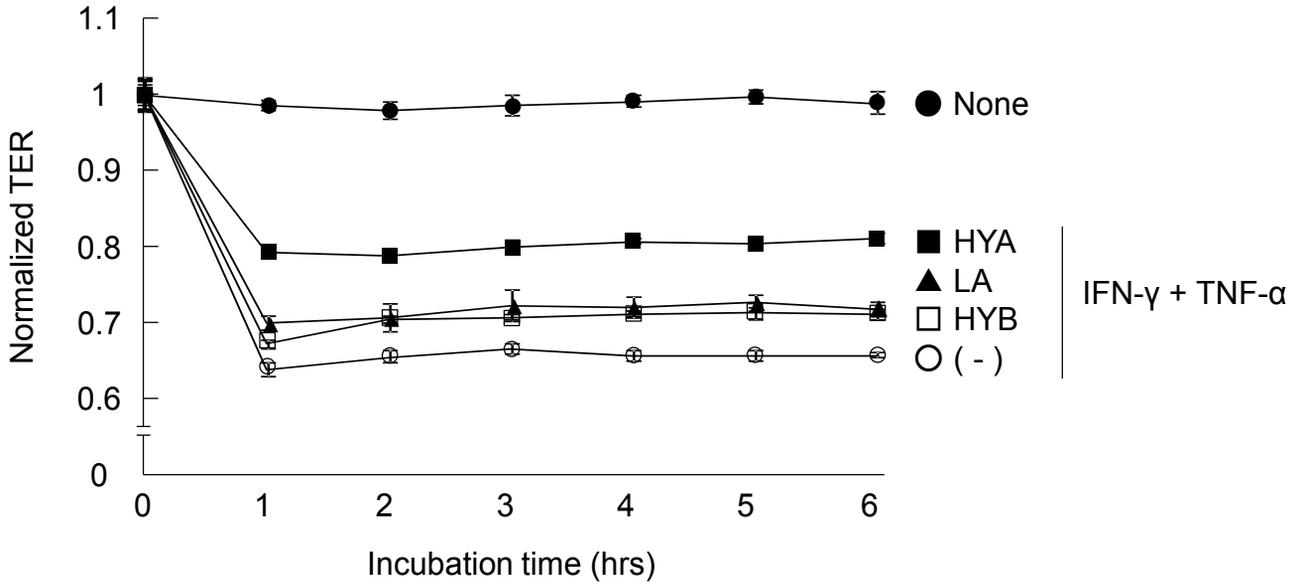
1) linoleic acid, 2) 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA), 3) 10-hydroxy octadecanoic acid (HYB), 4) 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA), 5) 10-oxo-octadecanoic acid (KetoB) and 6) 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid (KetoC). These fatty acids were synthesized by previous method (Kishino *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013).



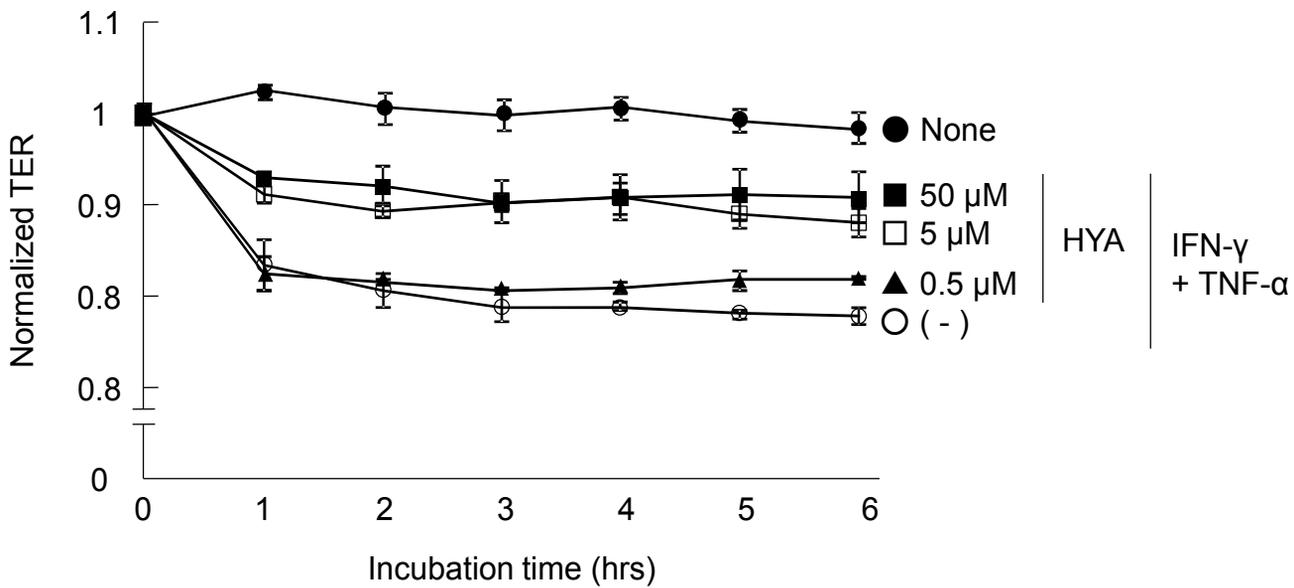
**Figure 2-2. Effects of gut microbial metabolites of linoleic acid on IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ -induced barrier impairment in Caco-2 cells.**

Caco-2 cells were treated with the fatty acids (50  $\mu\text{mol/L}$  each) for 24 h, and then stimulated with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ . Time-course changes in TER were monitored ( $n = 3$ ). ●, None; ○, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  (-); ■, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + HYA; □, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + HYB; ◆, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + KetoA; ◇, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + KetoB; ▲, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + KetoC.

A)

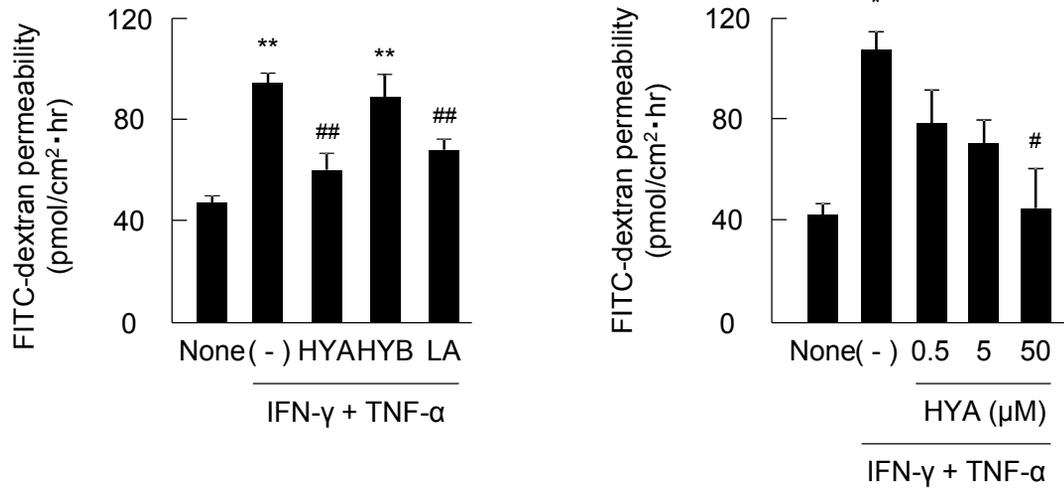


B)

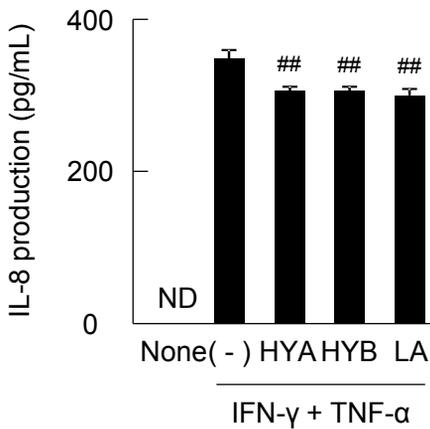


Continued (1/2)

C)

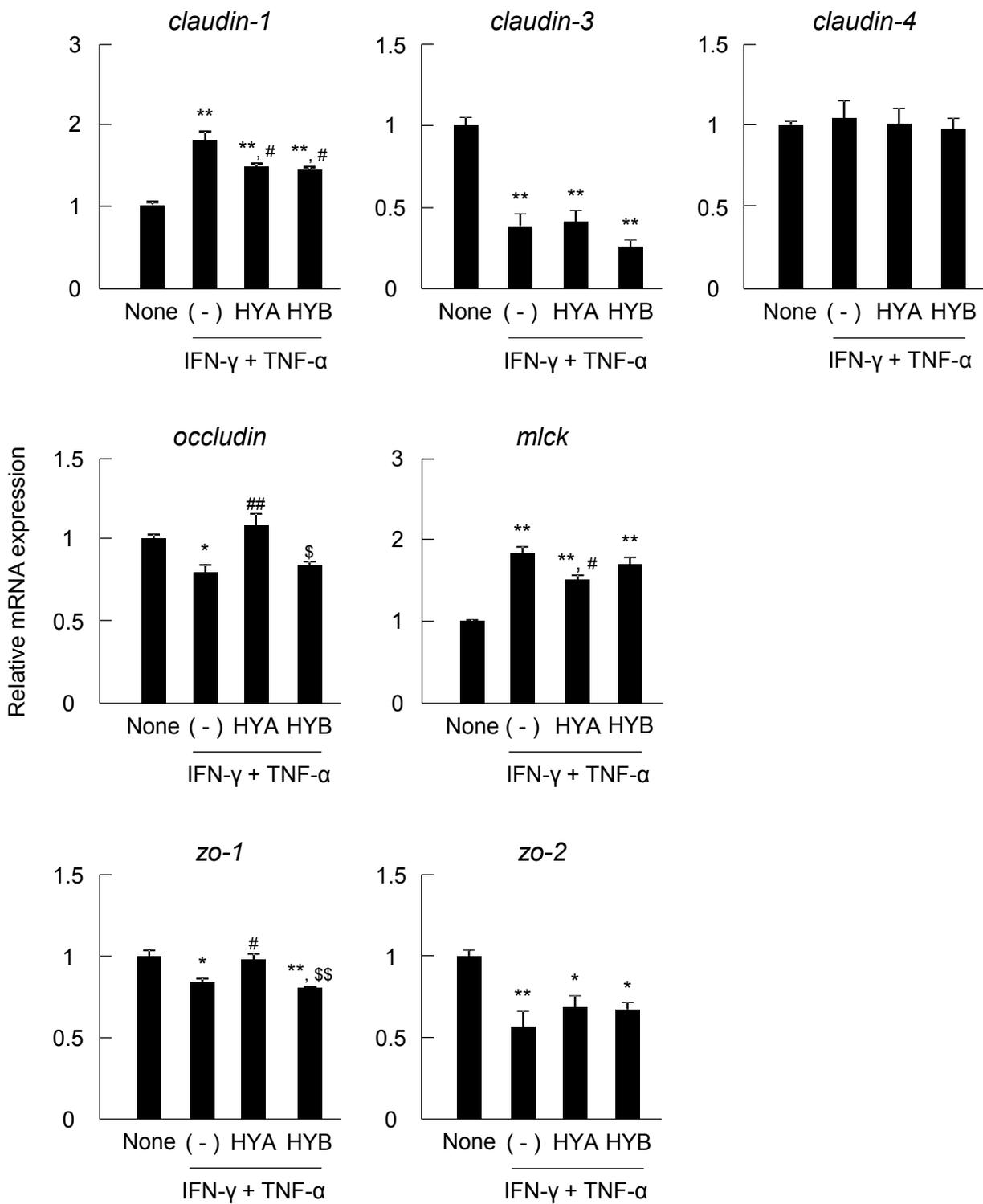


D)



**Figure 2-3. Effects of HYA and HYB on IFN-γ + TNF-α-induced barrier impairment in Caco-2 cells.**

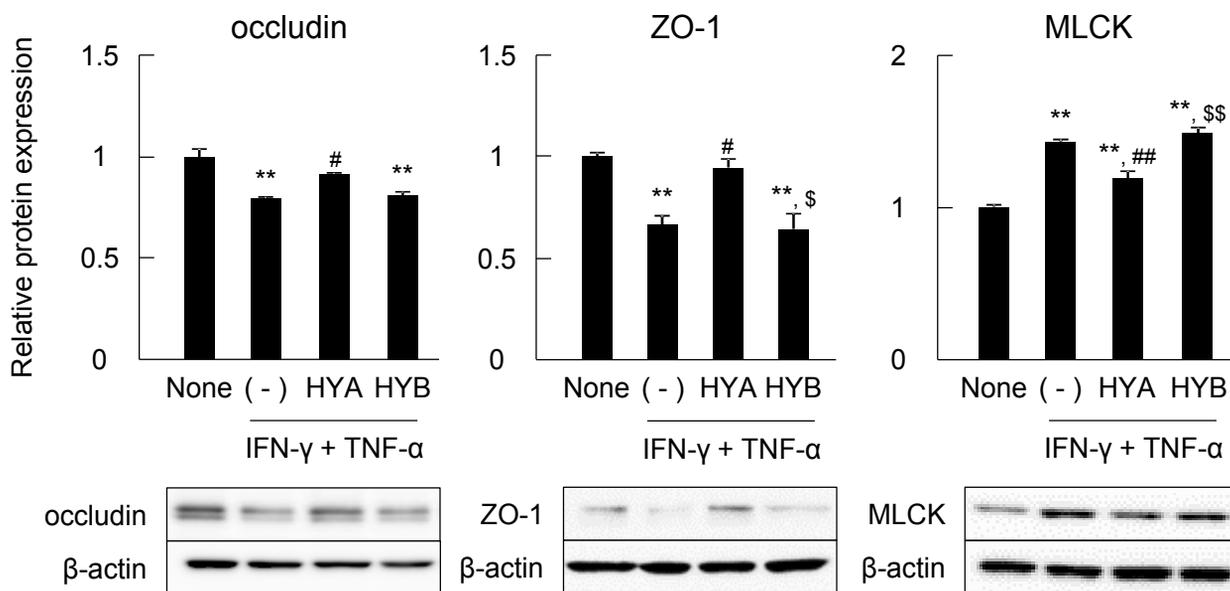
(A) Caco-2 cells were treated with the fatty acids (50 μmol/L each) for 24 h, and then stimulated with IFN-γ + TNF-α. Time-course changes in TER were monitored (n = 4). ●, None; ○, IFN-γ + TNF-α (-); ■, IFN-γ + TNF-α + HYA; □, IFN-γ + TNF-α + HYB. (B) Caco-2 cells were treated with HYA for 24 h, and then stimulated with IFN-γ + TNF-α. Time-course changes in TER were monitored (n = 4). ●, None; ○, IFN-γ + TNF-α (-); ■, IFN-γ + TNF-α + 50 μmol/L HYA; □, IFN-γ + TNF-α + 5 μmol/L HYA; ▲, IFN-γ + TNF-α + 0.5 μmol/L HYA. (C) FITC-dextran permeability into the basal wells was assessed for 6 h (n = 4). (D) , After TER measurement at 6 h, the basal medium was collected and the IL-8 concentration determined (n = 4, \*, p < 0.05, and \*\*, p < 0.01, compared with None; ##, p < 0.01, compared with IFN-γ + TNF-α; \$, p < 0.05, and \$\$, p < 0.01, compared with HYA (Tukey-Kramer). Results are expressed as means ± S.E.



Continued (1/2)

**Figure 2-4. Effects of HYA and HYB on IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ -induced the dysfunction of TJ-related molecules in Caco-2 cells.**

Total RNA was extracted from Caco-2 cells at 6 h, and mRNA expression was examined by real time RT-PCR. Data are presented as the fold change in gene expression from the control (None), after normalization to the  $\beta$ -actin gene (n = 3). \*,  $p < 0.05$ , and \*\*,  $p < 0.01$ , compared with None; ##,  $p < 0.01$ , compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ; \$,  $p < 0.05$ , and \$\$,  $p < 0.01$ , compared with HYA (Tukey-Kramer). Results are expressed as means  $\pm$  S.E.



**Figure 2-5. Effects of HYA and HYB on IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ -induced the dysfunction of TJ-related molecules in Caco-2 cells.**

Protein was extracted from Caco-2 cells at 6 h, and protein expression was examined by immunoblotting. Data are presented as the fold change in gene expression from the control (None), after normalization to the  $\beta$ -actin ( $n = 3$ ). \*,  $p < 0.05$ , and \*\*,  $p < 0.01$ , compared with None; ##,  $p < 0.01$ , compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ; \$,  $p < 0.05$ , and \$\$,  $p < 0.01$ , compared with HYA (Tukey-Kramer). Results are expressed as means  $\pm$  S.E.

## 第3章

### HYA の腸管バリア保護作用におけるシグナル解析

#### 1 序論

第2章では、Caco-2細胞を用いた *in vitro* 評価系で腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護効果を示した。特に HYA の腸管バリア保護作用の活性はリノール酸より強いことが明らかとなり、その分子メカニズムを明らかにすることが重要である。そこで本章では、腸内細菌代謝産物による腸管バリア保護作用の分子メカニズムの解明を目的とした。

#### 2 材料および方法

##### 2.1 腸内細菌代謝産物

第2章で使用した腸内細菌代謝産物を使用した (Figure 2-1)。

##### 2.2 Caco-2 細胞培養

第2章の方法に準じて、Caco-2細胞の培養を行った。

##### 2.3 腸管バリア保護作用の評価

第2章の方法に準じて、Caco-2細胞を刺激した。なお、TNF受容体 (TNFRs)発現解析の実験系では、IFN- $\gamma$ 刺激24時間後に細胞を回収した。また、阻害剤実験では、腸内細菌代謝産物添加30分前にCaco-2細胞に添加し (GPR40 antagonist; GW1100, MEK inhibitor; U0126)、第2章と同様の刺激方法で検討を行った。

##### 2.4 Real-time RT-PCR

第2章の方法に準じて、real-time RT-PCRを行った。なお、本章で使用したプライマー配列を Table 3-1 に示す。

##### 2.5 Immunoblotting

第2章の方法に準じて、Immunoblottingを行った。なお、本章で用いた一次抗体は、mouse anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , mouse anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65, rabbit anti-GPR40, rabbit anti-ERK, rabbit anti-phospho-ERK, rabbit anti-p38, rabbit anti-phospho-p38, rabbit anti-JNK (c-jun N-terminal kinase), rabbit anti-phospho-JNK, rabbit anti-TNFR2, and mouse anti- $\beta$ -actin

である。

## 2.6 免疫蛍光染色

Transwell 上で培養した Caco-2 細胞を、PBS で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、その後、0.2% Triton X-100 で 5 分間の透過処理を行った。Caco-2 細胞を 4% スキムミルク (Wako pure chemical industries) で 30 分ブロッキングし、一次抗体の rabbit anti-GPR40 を 4 °C, オーバーナイトでインキュベートした。洗浄後、二次抗体の goat FITC-conjugated anti-rabbit IgG で 1 時間インキュベートし、同時に、4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) と Rhodamine-phalloidin を添加した。1 時間後、洗浄を行い、Caco-2 細胞をスライドグラスに乗せ、50% グリセロールで封入した。蛍光ラベルした一次抗体を、蛍光顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) によって検出した。

## 2.7 GPR40 functional activity assay

ヒト GPR40 を発現する HEK293 細胞を作製した。Lipofectamine (Invitrogen) によって、Flp-In T-REx HEK293 細胞へマウスの FLAG-GPR40 cDNA / pcDNA5/FRT/TO と pOG44 の混合物を、トランスフェクションした。48 時間後、安定発現細胞の培地を、200 µg/mL hygromycin B を含む培地に交換した。耐性細胞取得し、1 µg/mL doxycycline によって、Flp-In からの GPR40 発現を 48 時間誘導した。GPR40 の発現は、FLAG-tag を用いて、RT-PCR とフローサイトメトリー (BD Biosciences) によって確認した。

GPR40 発現細胞をコラーゲンコーティングした 96 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、37 °C で 21 時間インキュベートした。次に、Calcium Assay Kit Component A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を含む培地 (Hank's balanced salt solution; HBSS) 中、室温で 1 時間インキュベートした。HYA, HYB およびリノール酸 (対照) を 1% エタノールを含む HBSS で溶解し、別の 96 穴プレートに準備した。このプレートを Functional Drug Screening System (FDSS; 浜松ホトニクス) 上にセットし、リガンドを作用させることで  $[Ca^{2+}]_i$  の流動を引き起こした (励起波長 485 nm / 測定波長 525 nm)。データ解析には、Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) を用いた。

## 2.8 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVA により行い、post-hoc test には Tukey-Kramer 法を用いた。p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

## 3 結果および考察

### 3.1 HYA の NF- $\kappa$ B 経路制御機構

HYA の腸管バリア保護メカニズムを明らかにするために、炎症促進性シグナルの NF- $\kappa$ B 経路に着目した。NF- $\kappa$ B は免疫応答や細胞の生存など様々な生命現象に関与していることが知られており、不活状態では I $\kappa$ B $\alpha$  などの阻害タンパク質と結合して細胞質に局在している。しかしながら、TNF- $\alpha$  などの刺激によって I $\kappa$ B $\alpha$  がリン酸化され、プロテアソームによる分解が惹起されると、NF- $\kappa$ B の核移行によってシグナルが活性化する。本研究では、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化レベルと、NF- $\kappa$ B p65 の発現増加レベルを確認することで、NF- $\kappa$ B シグナルの活性レベルを評価した。その結果、TNF- $\alpha$  の刺激で、有意な I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と NF- $\kappa$ B p65 の発現増加を確認した (Figure 3-1A)。一方、HYA は NF- $\kappa$ B 経路の活性化を有意に抑制したが、HYB は刺激群と同程度であった (Figure 3-1A)。さらに、TNF- $\alpha$  の誘導した NF- $\kappa$ B 経路の上流を検討するために、TNF 受容体の一つである TNFR2 に着目して検討を行った。恒常的に発現する TNFR1 に対し、TNFR2 は、炎症状態などの限られた環境下において発現が誘導されるユニークな受容体で、実際に、腸炎疾患に代表される炎症性腸疾患患者の腸管組織では、TNFR2 が高発現することが報告されている (Mizoguchi *et al.*, 2002)。IFN- $\gamma$  刺激した Caco-2 細胞は TNFR2 を過剰に発現することが知られており (Wang *et al.*, 2006)、実際に、本試験系でも IFN- $\gamma$  誘導性の TNFRs 発現が亢進した (Figure 3-1B)。一方、HYA は TNFR2 の発現を正常レベルにまで改善した (Figure 3-1B) (TNFR1 発現は改善傾向)。

### 3.2 GPR40 に対する HYA の親和性評価

HYA の受容体を探索するために、Caco-2 細胞における脂肪酸受容体の発現を解析した (Figure 3-2A ; 長鎖脂肪酸受容体、3-2B ; 中鎖脂肪酸受容体、3-2C ; 短鎖脂肪酸およ

び乳酸受容体)。その結果、HYA は長鎖脂肪酸受容体である GPR40 の発現に影響を与える可能性が示唆され、その作用はタンパク質レベルでも確認された (Figure 3-2D)。さらに、Caco-2 細胞における GPR40 の局在を検討した結果、apical 側 (管腔側) に強く発現していることが示唆された (Figure 3-2E, F)。

HYA が GPR40 に結合するか否か明らかにするために、GPR40 リガンドアッセイを行った。GPR40 は、ヘテロ 3 量体の G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットとして Gq に結合し、細胞内カルシウム  $[Ca^{2+}]_i$  を流入することが報告されている (Itoh & Yurimoto, 2003)。Caco-2 細胞における細胞内カルシウム  $[Ca^{2+}]_i$  の流入を確認したところ、HYA で最も顕著に高く、リノール酸にも  $[Ca^{2+}]_i$  の流入を促進する作用が確認された (Figure 3-3A)。次に、ヒト GPR40 を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、同様の検討を行った。その結果、HYA やリノール酸は  $[Ca^{2+}]_i$  の流入を顕著に促進したが、GPR40 antagonist である GW1100 存在下ではその作用が消失した (Figure 3-3B)。さらに、同様の細胞を用いて、濃度依存的な腸内細菌代謝産物の GPR40 に対する親和性を検討した。その結果、HYA は用量依存的に  $[Ca^{2+}]_i$  の流入を促進した。さらに、その活性は内因性アゴニストの一つであるリノール酸よりも高いことが示された (EC50; リノール酸  $11.3 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ , HYA  $6.0 \pm 2.8 \mu\text{mol/L}$ )。一方、HYB は全く活性を示さないことが明らかとなった (Figure 3-3C)。すなわち、腸内細菌代謝産物である HYA は GPR40 の新規アゴニストとして作用する可能性が示唆された。

### 3.3 GPR40 antagonist 存在下での腸管バリア保護作用

GPR40 シグナルが HYA の腸管バリア保護作用に寄与するか否かを検討するために、GPR40 antagonist (GW1100) を用いて検討した。Caco-2 細胞に対する GW1100 の単独添加は、TER、FITC-dextran 透過量、IL-8 産生量および IFN- $\gamma$  誘導性の TNFR2 発現に影響を与えなかった (Figure 3-4)。第 2 章と同様に、炎症性サイトカインによる TER の低下、FITC-dextran 透過量の増加および IL-8 産生量の増加が確認されたが、HYA はそれらを有意に改善した。一方、GW1100 存在下では、HYA の腸管バリア保護作用が消失し (Figure 3-4A-C)、さらに、GW1100 存在下で IFN- $\gamma$  誘導性の TNFR2 発現の抑制作用が減

弱したことから (Figure 3-4D)、HYA が少なくとも部分的に GPR40 シグナリングを介して TNFR2 発現を抑制し、腸管バリア保護作用に寄与することが示唆された。

### 3.4 HYA の MAPK 経路リン酸化評価

GPR40 の腸管バリアに対するさらなるメカニズムを検討するために、MEK-ERK 経路に着目した。Gq タンパク質と共役した GPCRs は、 $[Ca^{2+}]_i$  の流入による MEK-ERK 経路の活性化が知られている (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007)。実際に、GPR40 の新規アゴニストである HYA は Caco-2 細胞の ERK のリン酸化を促進しており、その作用は GW1100 存在下では減弱したことから、HYA は GPR40 を介して ERK のリン酸化を促進していることが示された (Figure 3-5A)。一方、p38 や JNK の経路には影響を及ぼさなかった (Figure 3-5B, C)。

### 3.5 MEK inhibitor 存在下での腸管バリア保護作用

HYA の腸管バリア保護作用が MEK-ERK 経路の介しているか否かを検討するために、MEK inhibitor である U0126 存在下での HYA の腸管バリア保護作用を検討した。Caco-2 細胞に対する U0126 の単独添加は、TER、FITC-dextran 透過量、IL-8 産生量および IFN- $\gamma$  誘導性の TNFR2 発現に影響を与えなかった (Figure 3-6)。第 2 章と同様に、炎症性サイトカインによる TER の低下、FITC-dextran 透過量の増加および IL-8 産生量の増加が確認され、HYA はそれらを有意に改善したが、U0126 存在下では、HYA の腸管バリア保護作用が部分的に消失した (Figure 3-6A-F)。さらに、HYA は U0126 存在下で IFN- $\gamma$  誘導性の TNFR2 発現の抑制作用が減弱したことから (Figure 3-6G, H)、腸内細菌によるリノール酸の初期代謝産物である HYA は、長鎖脂肪酸受容体の GPR40 を介して、MEK-ERK 経路を活性化し、腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御することで腸管バリア保護作用を示すことが示唆された。

## 4 要約

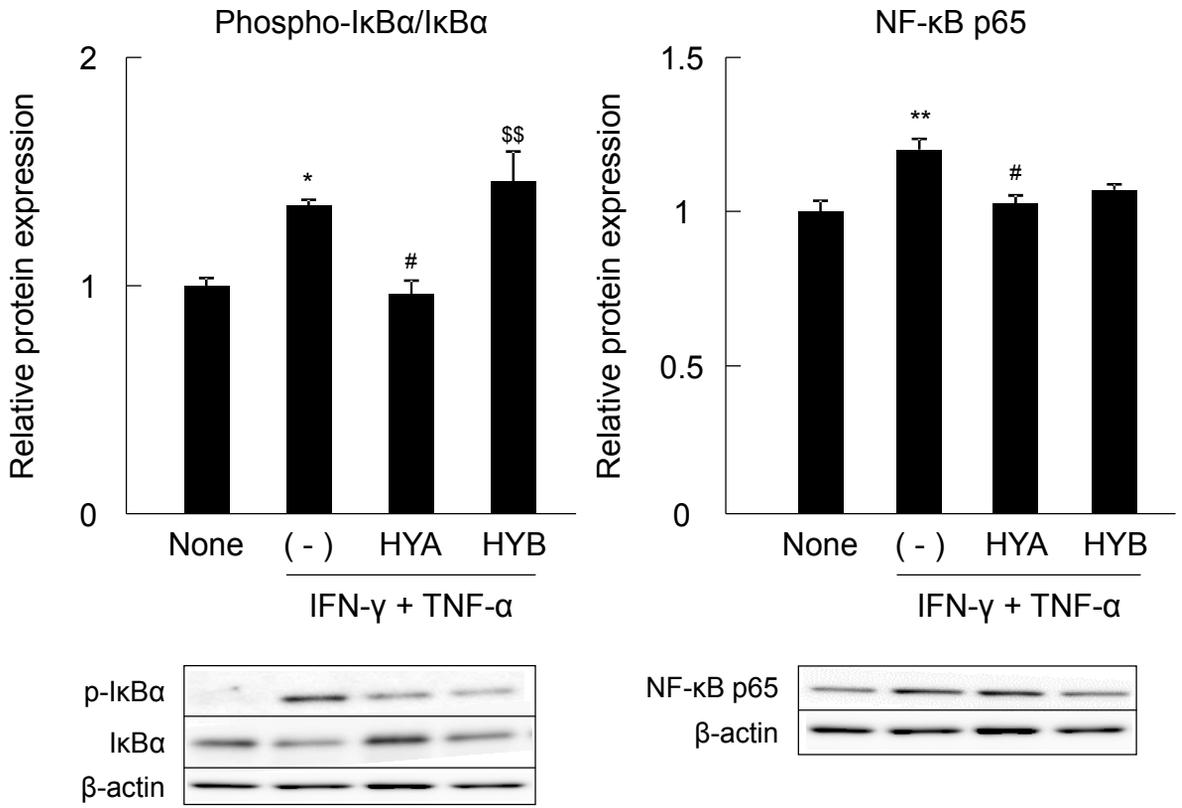
腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いた検討によって、腸内細菌代謝産物である HYA は腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御することで NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制することで腸管バリア保護作用を発揮することが示された。また、HYA は GPR40 に対する親和性が内因

性リガンドであるリノール酸よりも高いことが明らかとなり、GPR40 antagonist 存在下で腸管バリア保護作用が消失した。また、MEK-ERK 経路も活性化しており、MEK inhibitor 存在下においても、HYA の腸管バリア保護作用が部分的に消失した。すなわち、HYA は GPR40 を介して、MEK-ERK 経路を活性化することで、腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御し、腸管バリア保護作用に寄与することが明らかとなった。

Table 3-1. 第3章で使用したプライマー配列

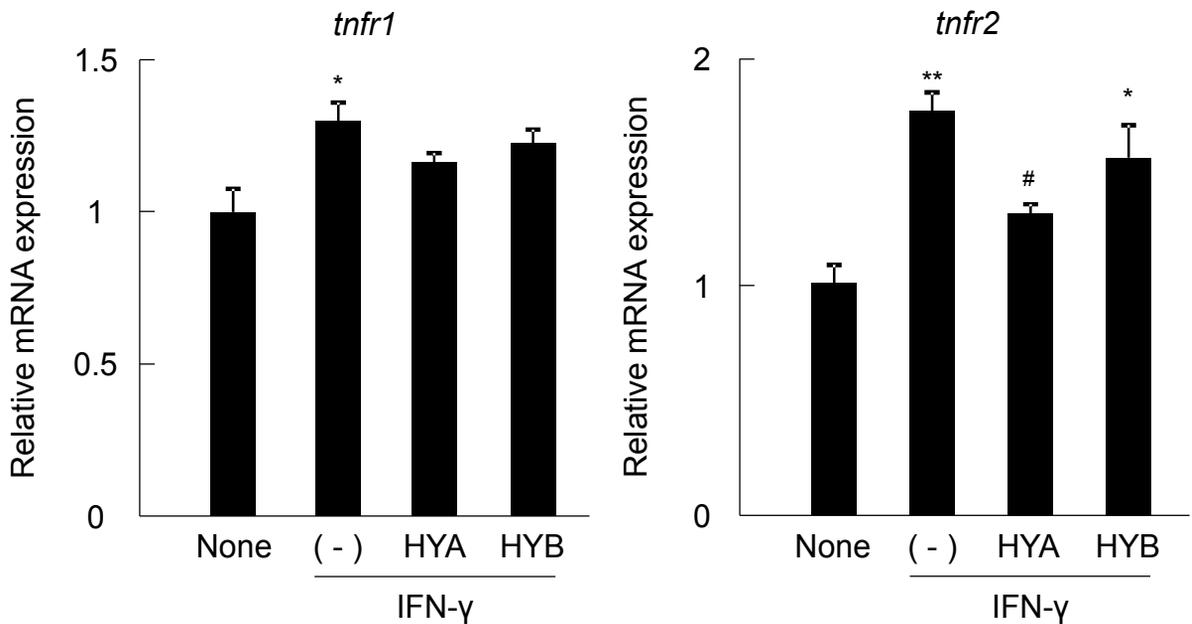
| Gene                            |         | Sequence                    |
|---------------------------------|---------|-----------------------------|
| <i>TNFR1</i>                    | Forward | 5'-CTGCCAGGAGAAACAGAACAC-3' |
|                                 | Reverse | 5'-AGGGATAAAAGGCAAAGACCA-3' |
| <i>TNFR2</i>                    | Forward | 5'-TTCCAGAAAACCCCAGCA-3'    |
|                                 | Reverse | 5'-TGGCCTGAGGTGATGCTT-3'    |
| <i>GPR40</i>                    | Forward | 5'-GCCCACTTCTTCCCACTCT-3'   |
|                                 | Reverse | 5'-ACCAGACCCAGGTGACACA-3'   |
| <i>GPR120</i>                   | Forward | 5'-TCTCGTGGGATGTCTCTTTTG-3' |
|                                 | Reverse | 5'-CTTACCGTGAGCCTCTTCCTT-3' |
| <i>PPAR<math>\gamma</math></i>  | Forward | 5'-ATGGAGCCCAAGTTTGAGTTT-3' |
|                                 | Reverse | 5'-TGTCTGAGGTCCGTCATTTTC-3' |
| <i>GPR84</i>                    | Forward | 5'-TTTCAGTGCCAAGGGGATAG-3'  |
|                                 | Reverse | 5'-GAAGATGCCAACACTGCTGA-3'  |
| <i>GPR41</i>                    | Forward | 5'-CTTCATCCTCTGCCCACTCTC-3' |
|                                 | Reverse | 5'-CGCAGATATAGCCCACGACAT-3' |
| <i>GPR43</i>                    | Forward | 5'-ACGCAGAGGCAAAGACACA-3'   |
|                                 | Reverse | 5'-TCTGTGCTAGGCTGGAGT-3'    |
| <i>GPR81</i>                    | Forward | 5'-GTGGCTGCGGACAGGTATT-3'   |
|                                 | Reverse | 5'-TGAGTGTCCCTGGCTGCTTG-3'  |
| <i><math>\beta</math>-actin</i> | Forward | 5'-TTTTAGGATGGCAAGGGACTT-3' |
|                                 | Reverse | 5'-GATGAGTTGGCATGGCTTTA-3'  |

A)



Continued (1/2)

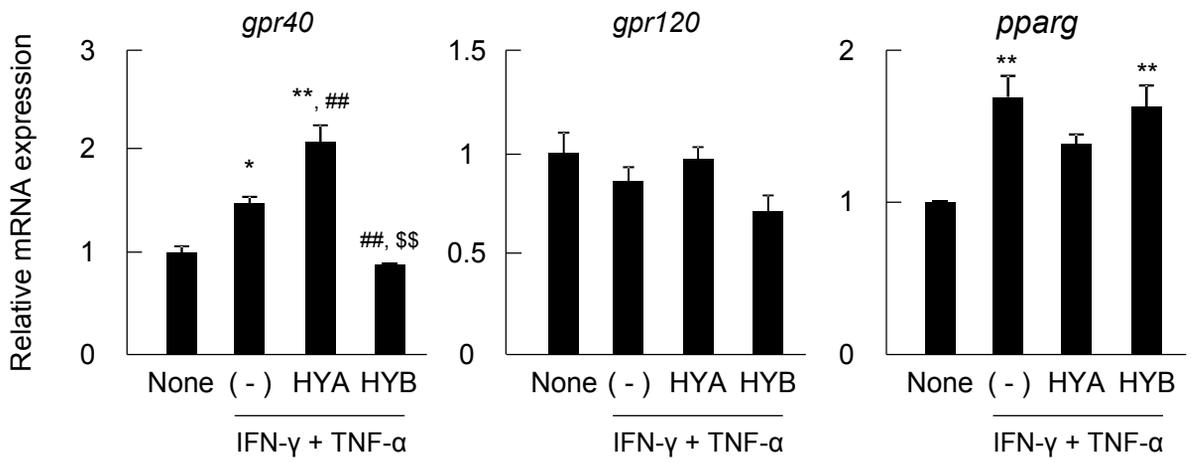
B)



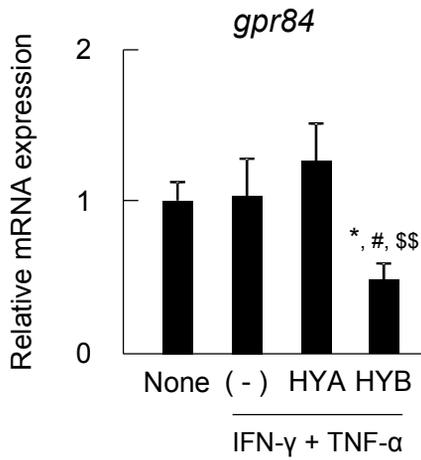
**Figure 3-1. Effects of HYA and HYB on TNFRs – NF- $\kappa$ B signaling.**

Caco-2 cells were treated with the fatty acids (50  $\mu$ M each) for 24 h, and then stimulated with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ . (A) After stimulation with TNF- $\alpha$  for 6 h, Protein was extracted from Caco-2 cells and protein expression of phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  / I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 were examined by immunoblotting (n = 3). (B) After stimulation with IFN- $\gamma$  for 24 h, total RNA was extracted from Caco-2 cells and the mRNA expression of TNFRs examined by real-time RT-PCR (n = 3). Results are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$ , compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) (-); \$\$  $p < 0.01$ , compared with HYA (Tukey–Kramer). Each data (A, B) is representative of three independent similar experiments.

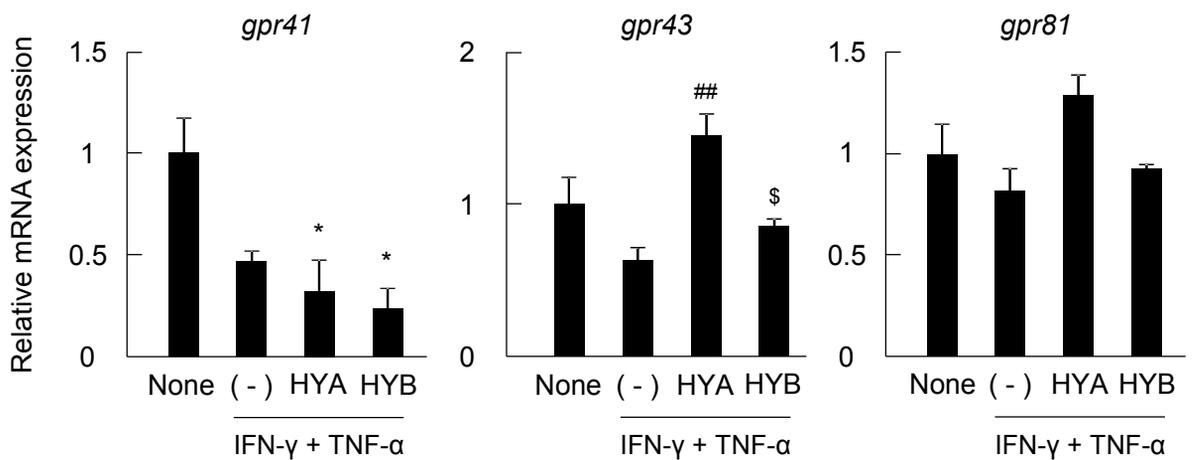
A)



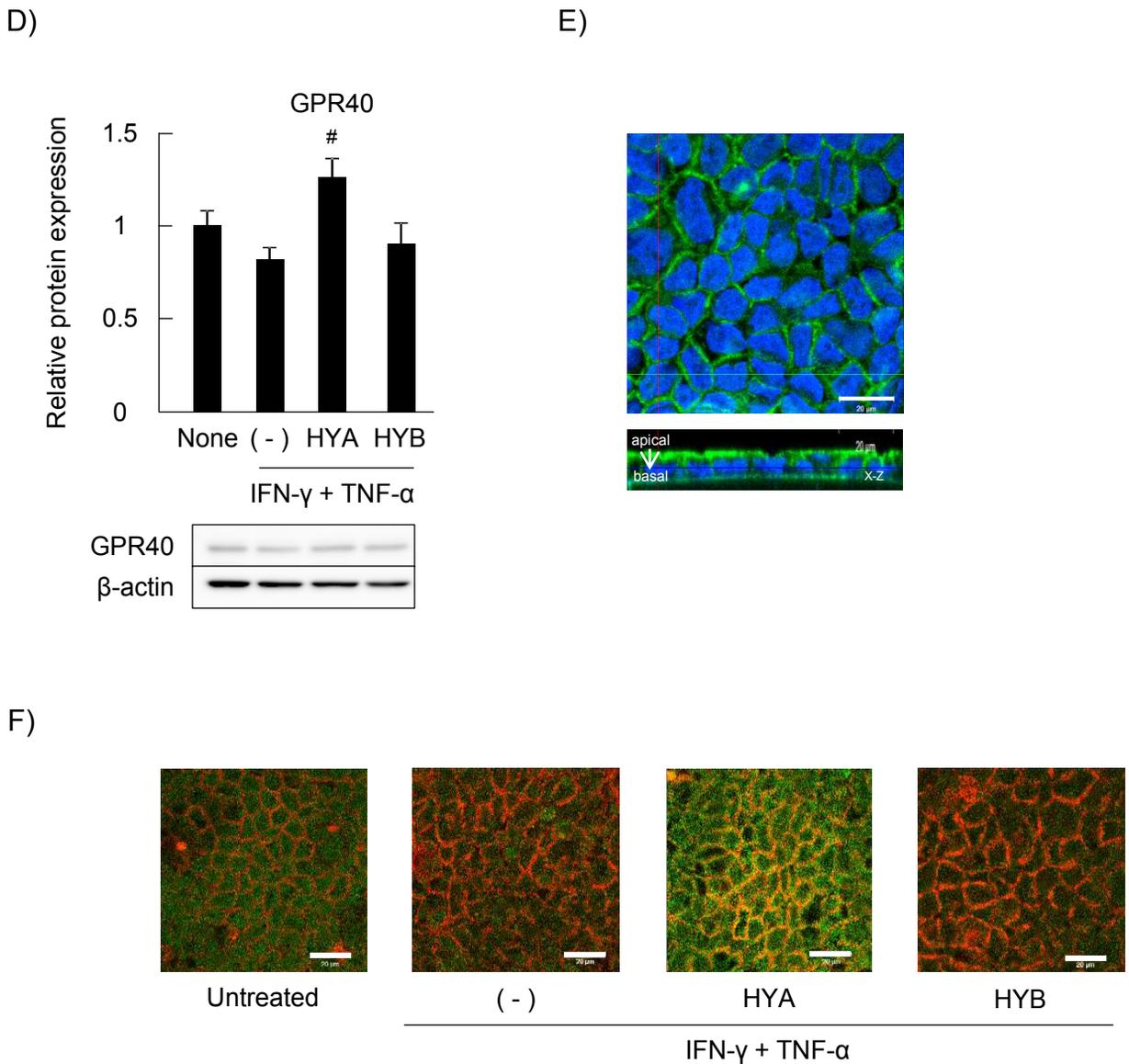
B)



C)



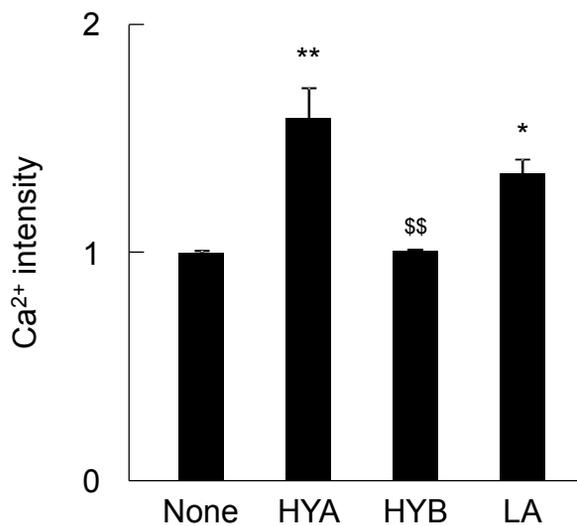
Continued (1/2)



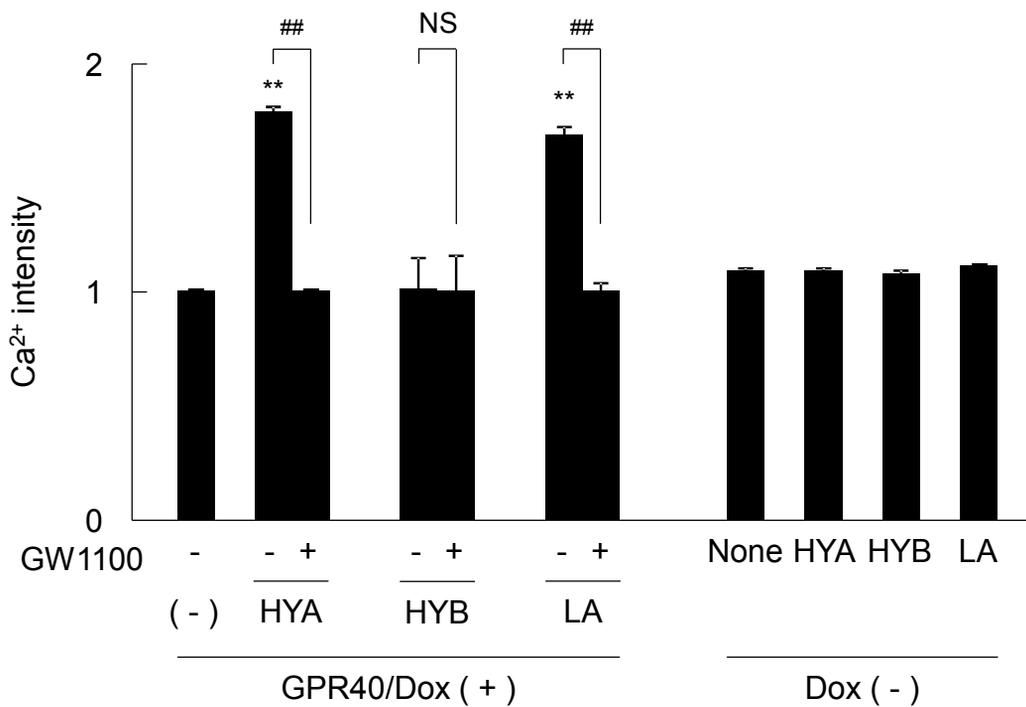
**Figure 3-2. Effects of HYA and HYB on the expression of free fatty acid receptors.**

After stimulation with TNF- $\alpha$  for 6 h, total RNA was extracted from Caco-2 cells and the mRNA expression of fatty acid receptors for (A) GPR40, GPR120 and PPAR $\gamma$ , (B) GPR84, (C) GPR41, GPR43 and GPR81 was examined by real-time RT-PCR (n = 3). (D) Protein was extracted from Caco-2 cells (n = 3), and expression of GPR40 was examined by immunoblotting. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01, compared with Untreated; # p < 0.05 and ## p < 0.01, compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  (-); \$ p < 0.05 and \$\$ p < 0.01, compared with HYA (Tukey-Kramer). Each result (A, B) is representative of three independent similar experiments. (E, F) After stimulation with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ , Caco-2 cells were labeled for GPR40 (green) and DAPI (blue) (E), or GPR40 (green) and Rhodamine-Phalloidin (red) (F). The x-z as well as x-y fluorescence images of HYA-treated cells were obtained (E). Scale bars represent 20  $\mu$ m. Each image (E, F) is representative of two independent similar experiments.

A)

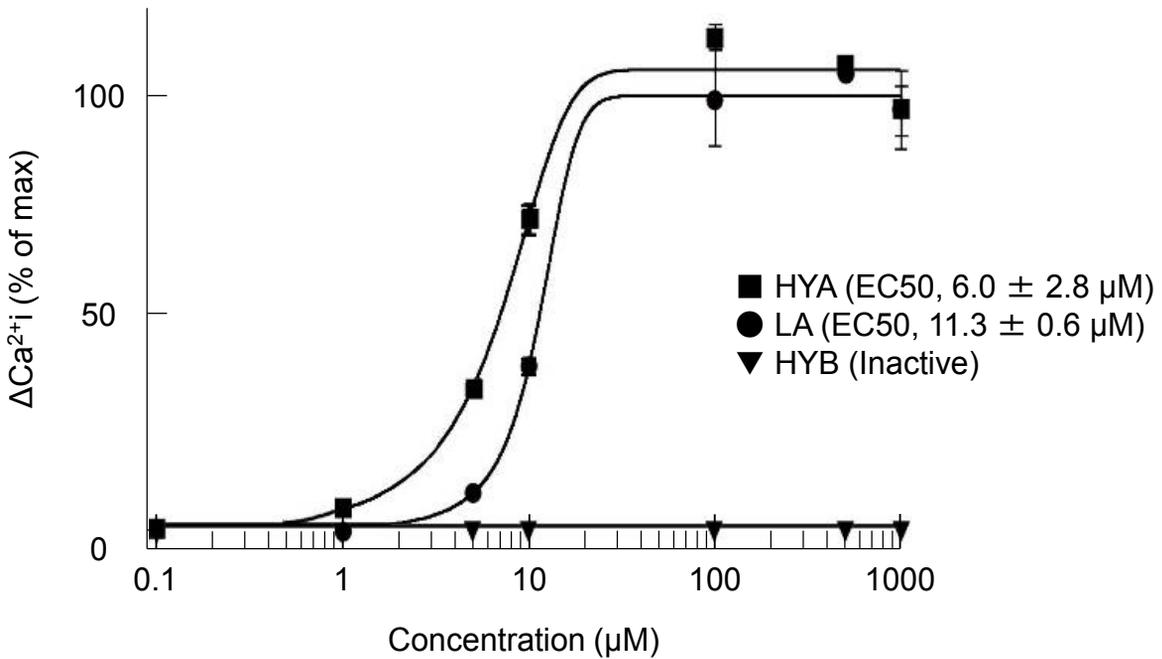


B)



Continued (1/2)

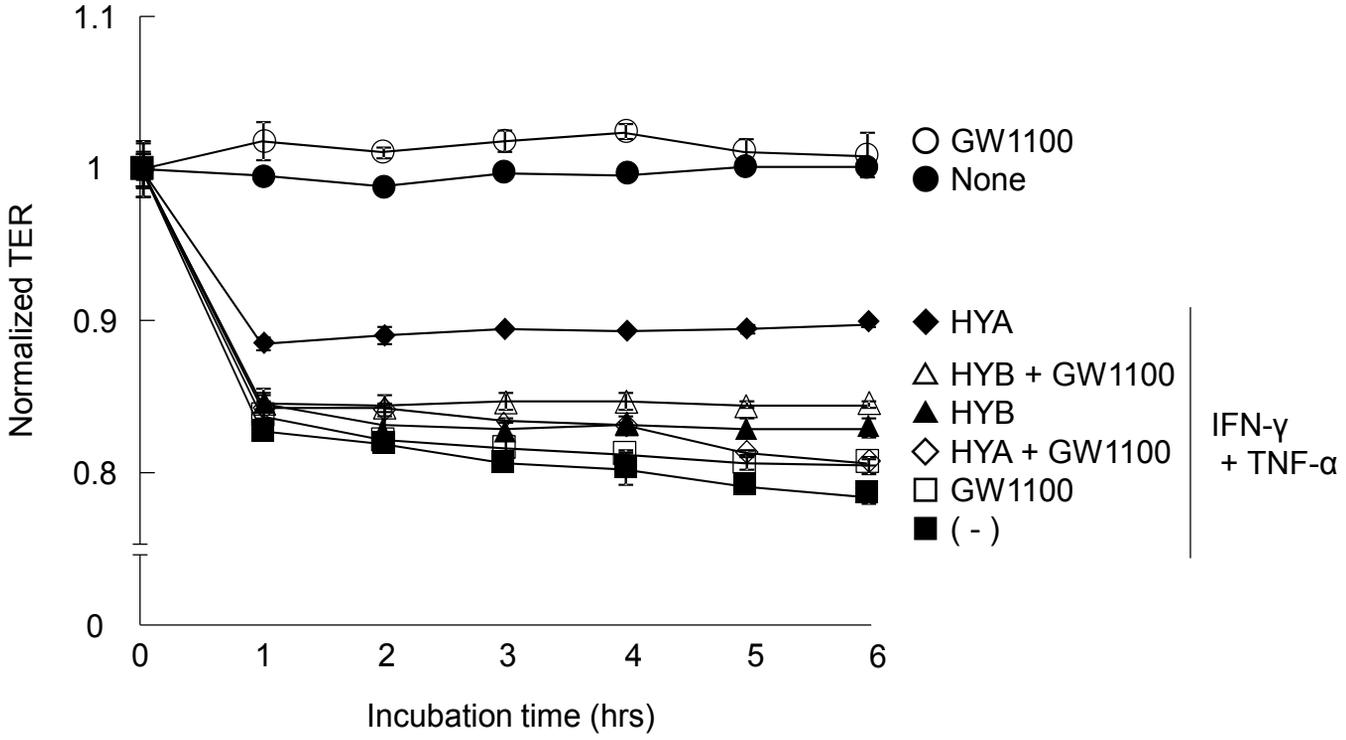
C)



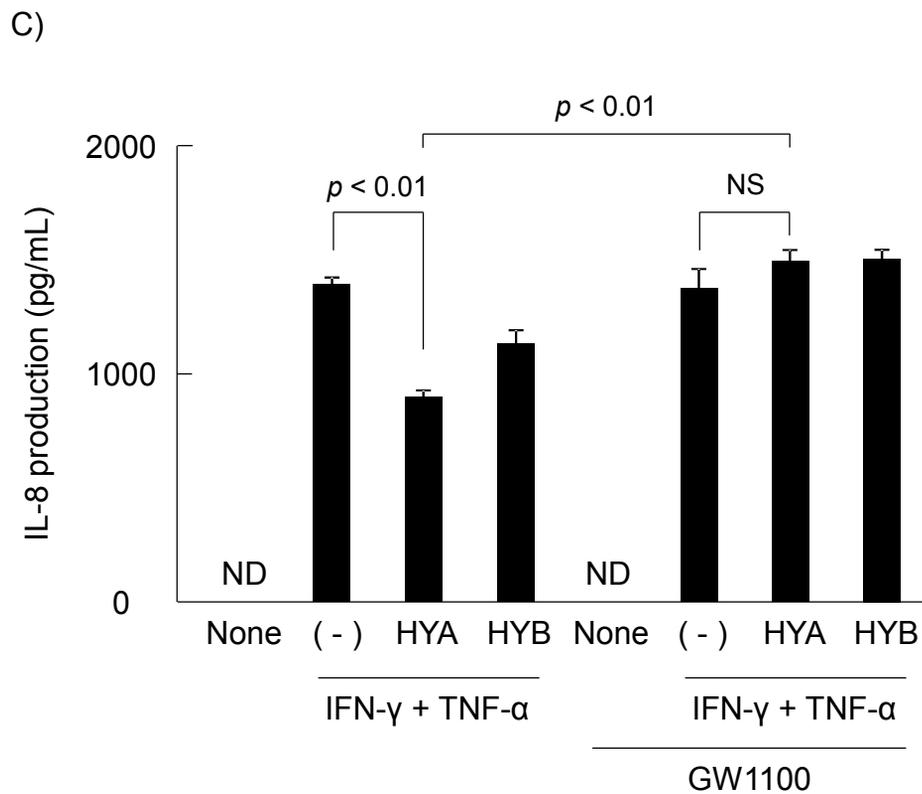
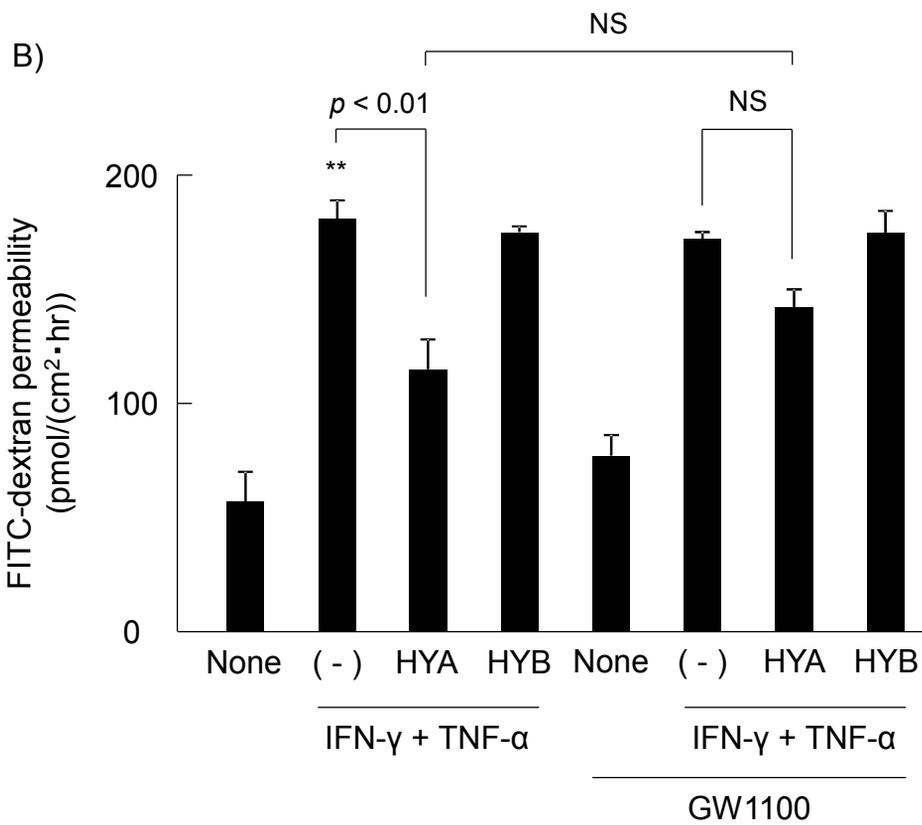
**Figure 3-3. Induction of  $[Ca^{2+}]_i$  rise by HYA in Caco-2 cells and HEK293 cells expressing human GPR40.**

(A) The mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by HYA, HYB and linoleic acid (100  $\mu M$  each) was monitored in Caco-2 cells, and data are presented as relative  $Ca^{2+}$  intensity ( $n = 3$ ). LA, linoleic acid. \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  vs. Untreated. \$\$  $p < 0.01$  vs. HYA (Tukey–Kramer). (B) The mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by HYA, HYB and LA (10  $\mu M$  each) was monitored in GPR40-expressing HEK293 cells. The cells were pretreated with or without the GPR40 antagonist GW1100 for 15 min prior to the addition of the fatty acids. HEK293 cells not expressing GPR40 were used as negative controls (Dox (-)) ( $n = 3$ ). \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  vs. Untreated. ##  $p < 0.01$  vs. GW1100 (+). NS; not significant (Tukey–Kramer). C, Representative dose-response curve of HYA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise in HEK293-hGPR40 cells ( $n = 3$ ). ●, LA; ■, HYA; ▼, HYB. Inactive, no response at 1,000  $\mu M$ . EC50 indicates the concentration of a sample that produces 50% of the maximal response, and was calculated from dose-response curves. Results are expressed as means  $\pm$  SE. Each result (A–C) is representative of three similar experiments.

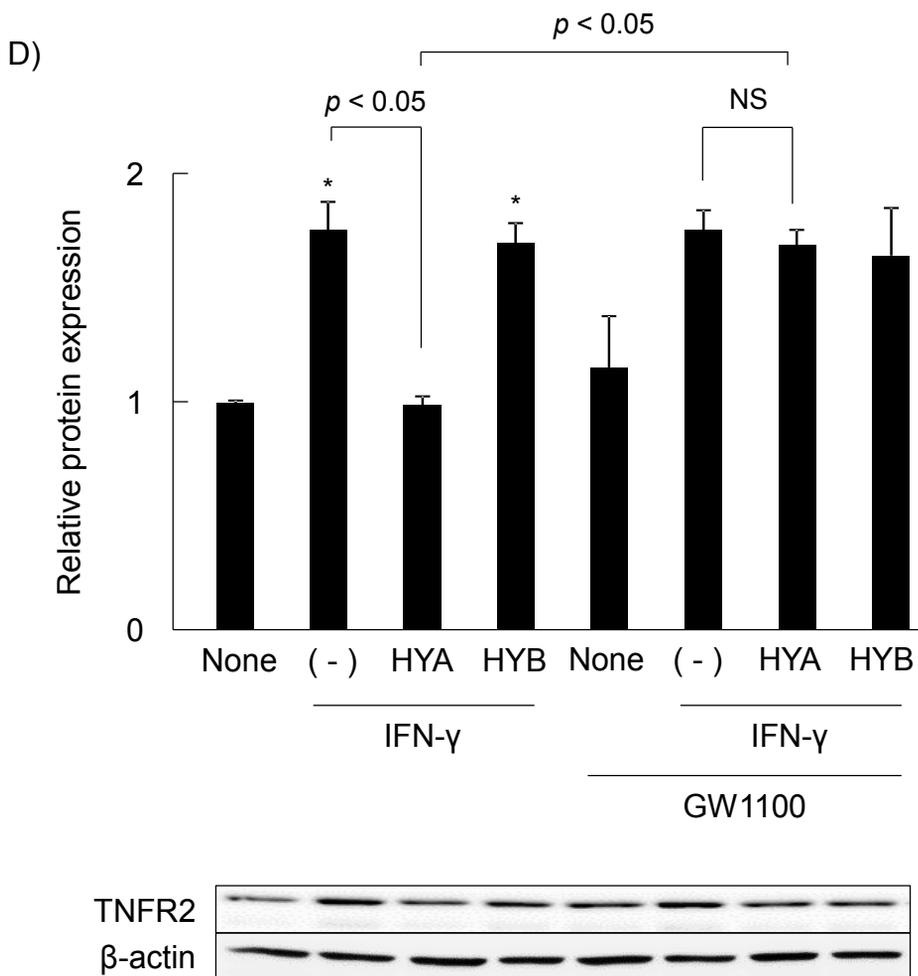
A)



*Continued (1/3)*

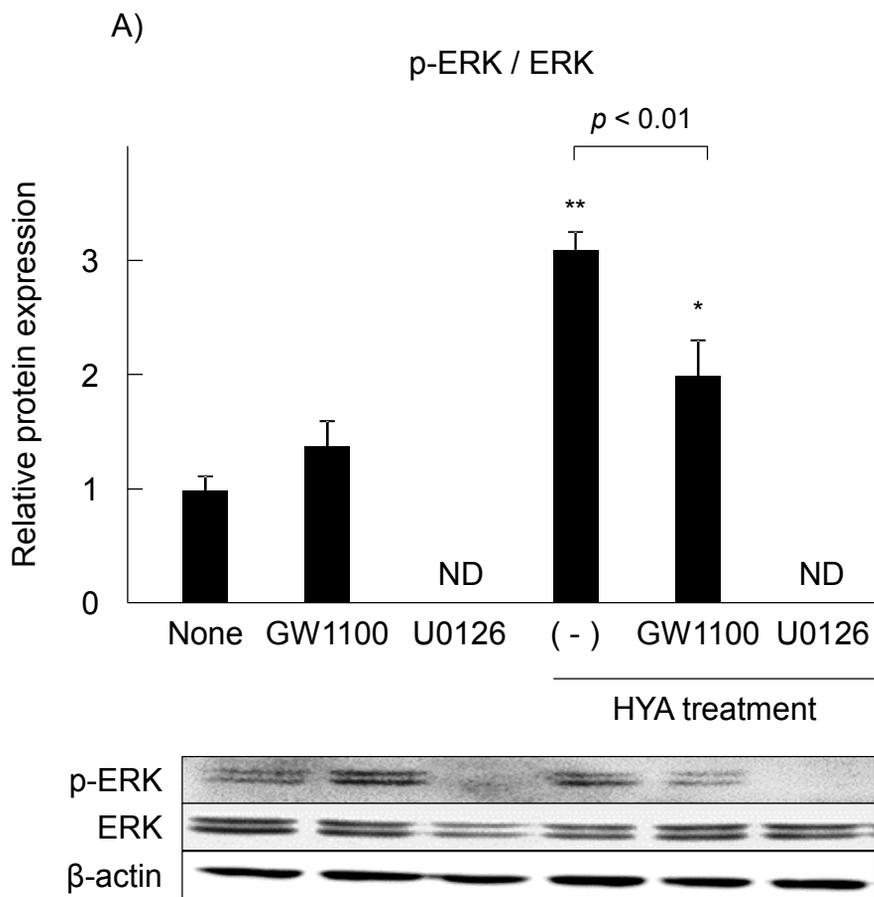


Continued (2/3)

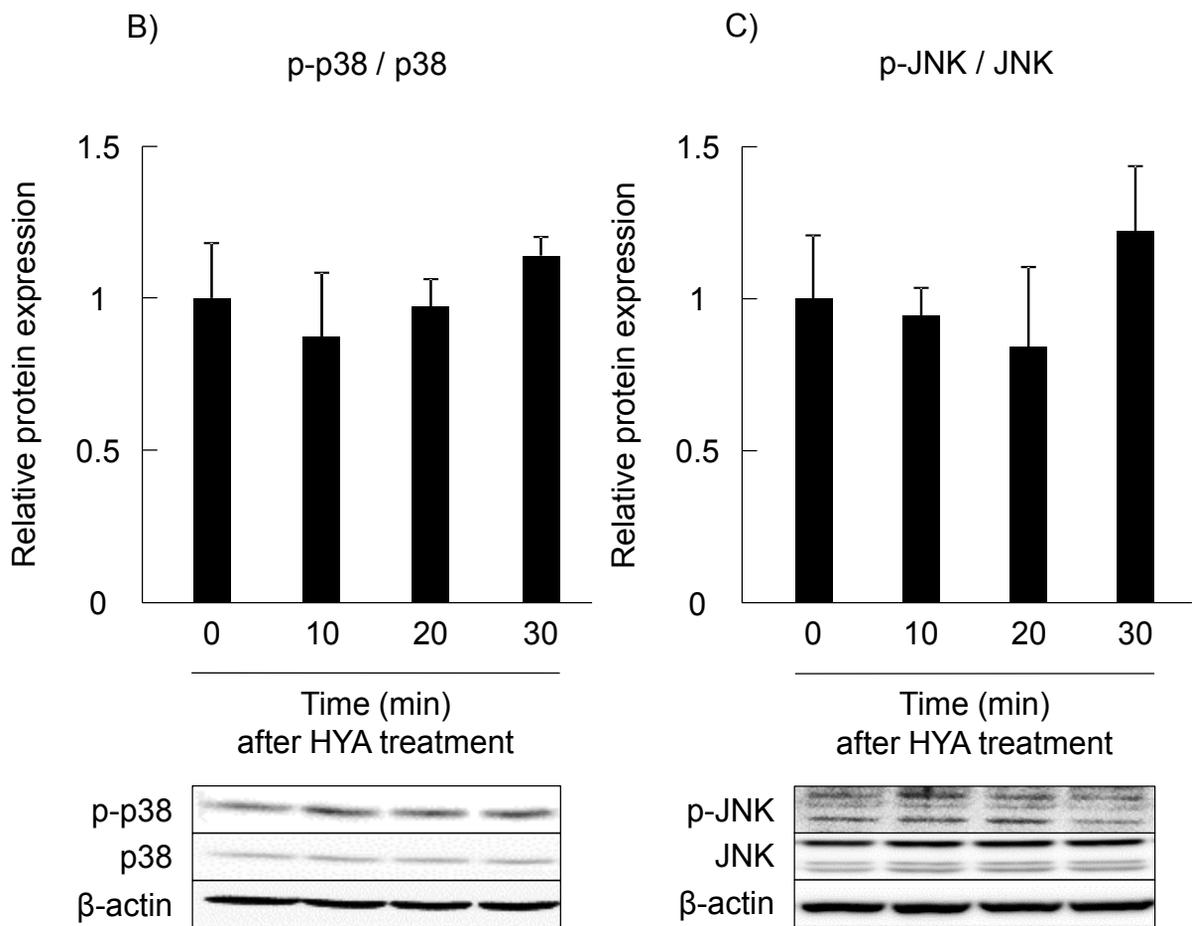


**Figure 3-4. The inhibitory effects of a GPR40 antagonist on the barrier-recovering and TNFR2- suppressive activity of HYA.**

Caco-2 cells were pretreated with the GPR40 antagonist, GW1100, for 30 min, and then the barrier-recovering effects of HYA were evaluated. (A) Time course of changes in TER. Open symbols are values from cells without GW1100 treatment, and closed symbols are with GW1100 treatment (left).  $\circ$  and  $\bullet$ , untreated;  $\square$  and  $\blacksquare$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ;  $\triangle$  and  $\blacktriangle$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + HYA. The data on TER at 6 h is shown (right). (B-C), Evaluation of FITC-dextran permeability and IL-8 concentration. (D) The effects of HYA on TNFR2 expression were evaluated by immunoblotting. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  (-) or IFN- $\gamma$  (-); \$  $p < 0.05$  and \$\$  $p < 0.01$ , compared with HYA (Tukey-Kramer). ND, not detected. NS, not significant. Data represent the means  $\pm$  SE. Each result (A-D) is representative of three independent similar experiments.



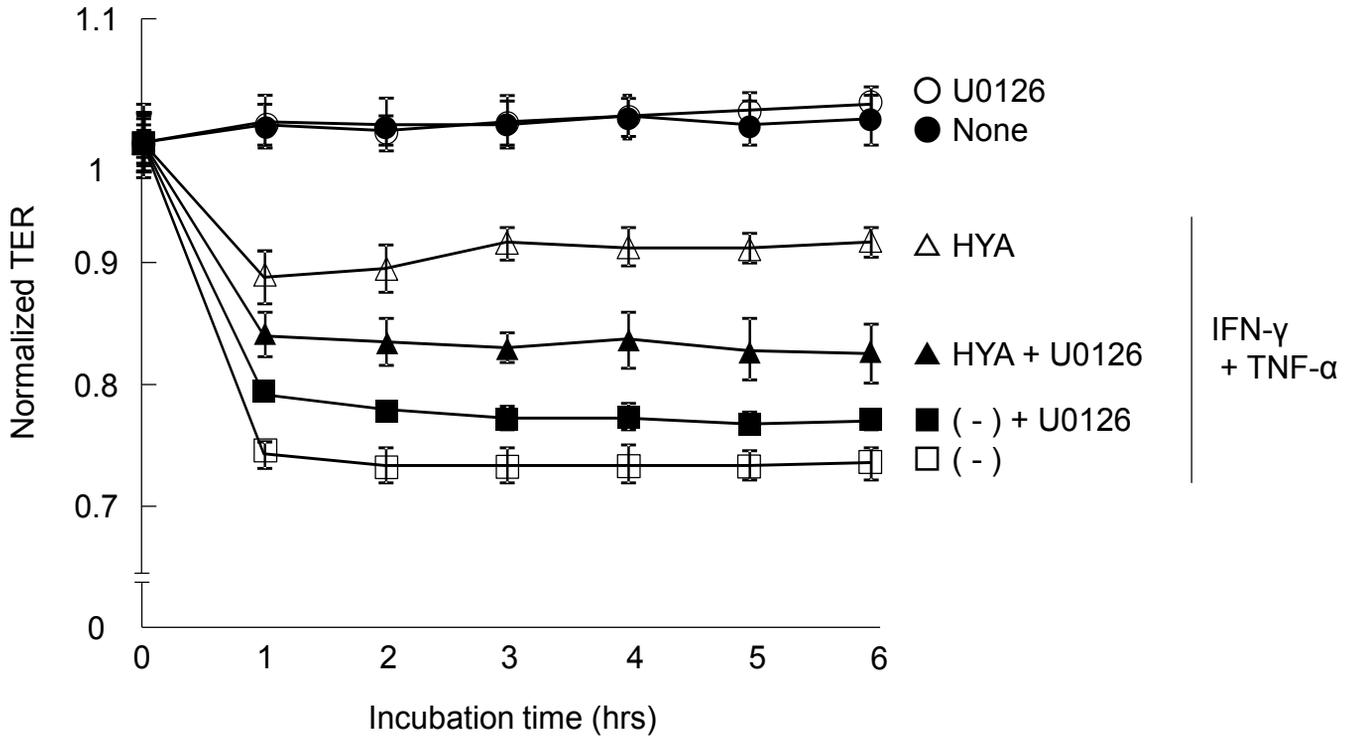
*Continued (1/2)*



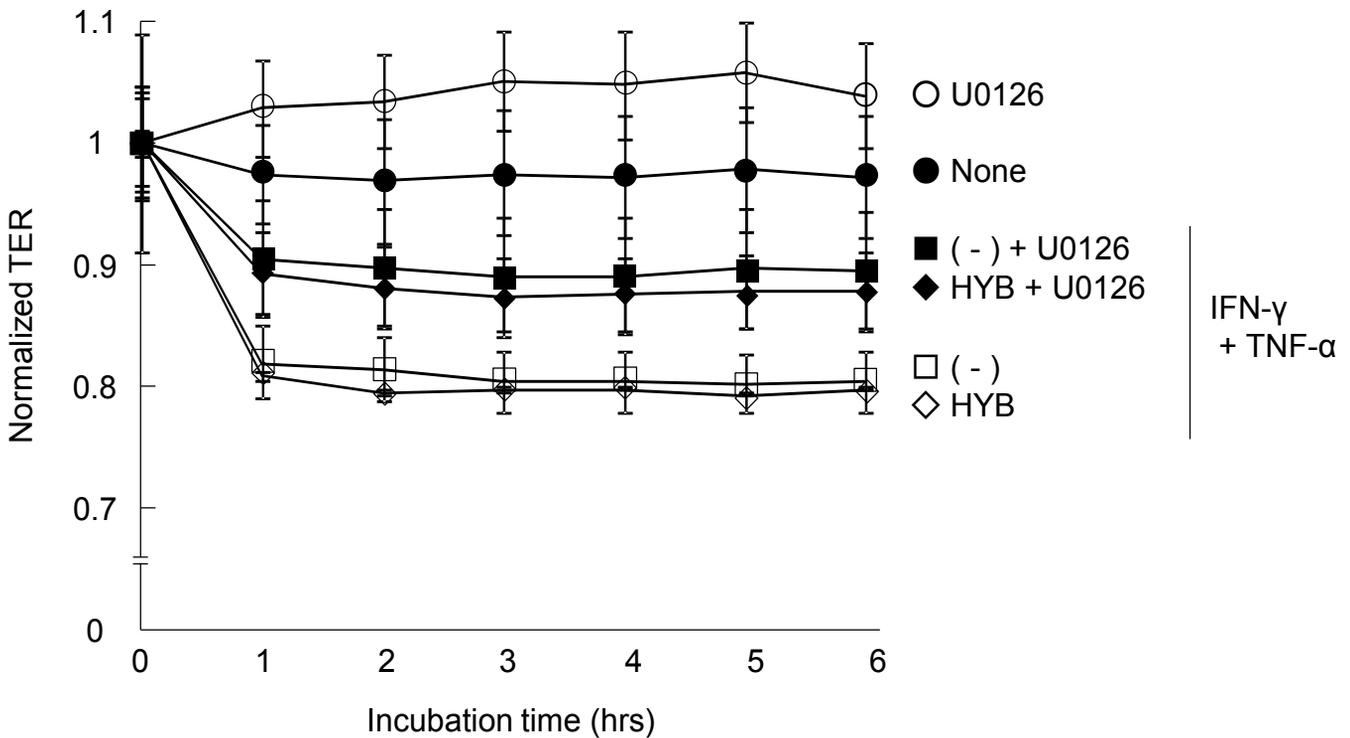
**Figure 3-5. The effect of HYA on the phosphorylation of MAPK.**

Caco-2 cells were treated with HYA (50  $\mu$ M) for 0–30 min (p38 and JNK) or 20 min (ERK). Also, some cells were pretreated with the GPR40 antagonist GW1100 or the MEK inhibitor U0126 for 30 min (ERK). Protein was extracted from Caco-2 cells and phosphorylated and total protein expression of ERK, p38 and JNK were examined by immunoblotting (n = 3). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated (Tukey–Kramer). Each result is representative of two similar experiments.

A)

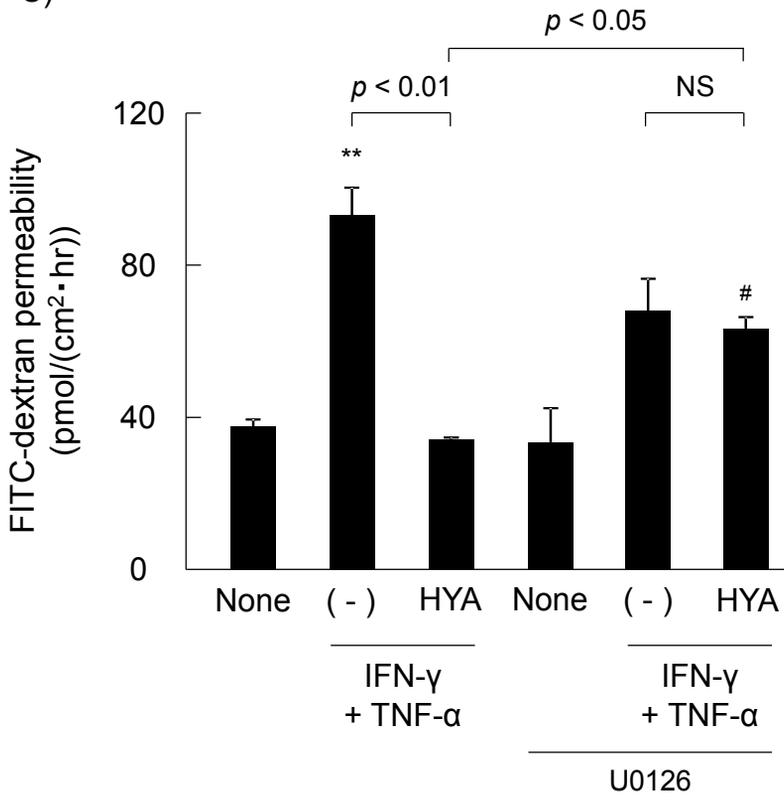


B)

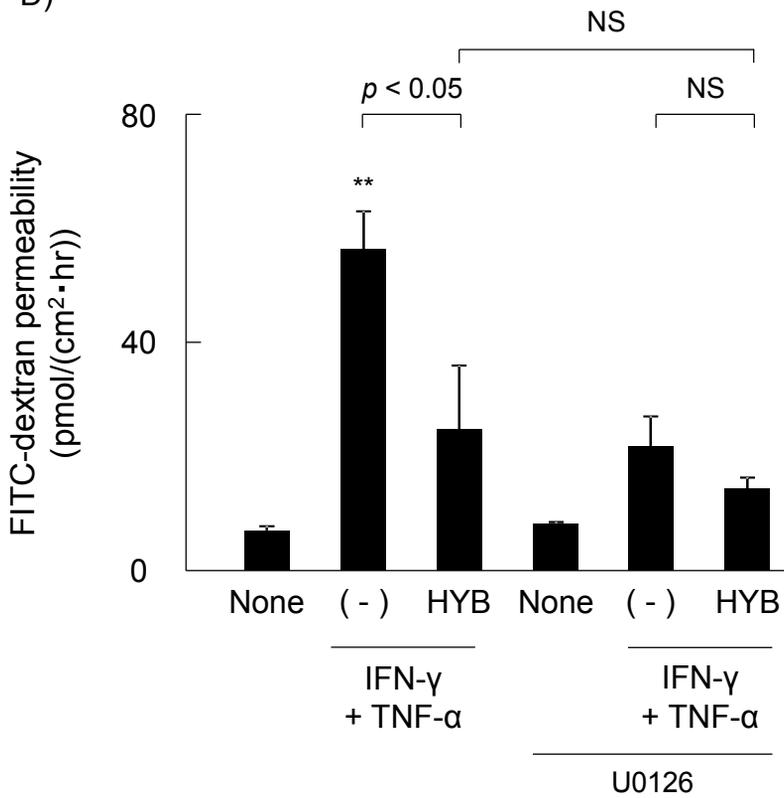


Continued (1/5)

C)

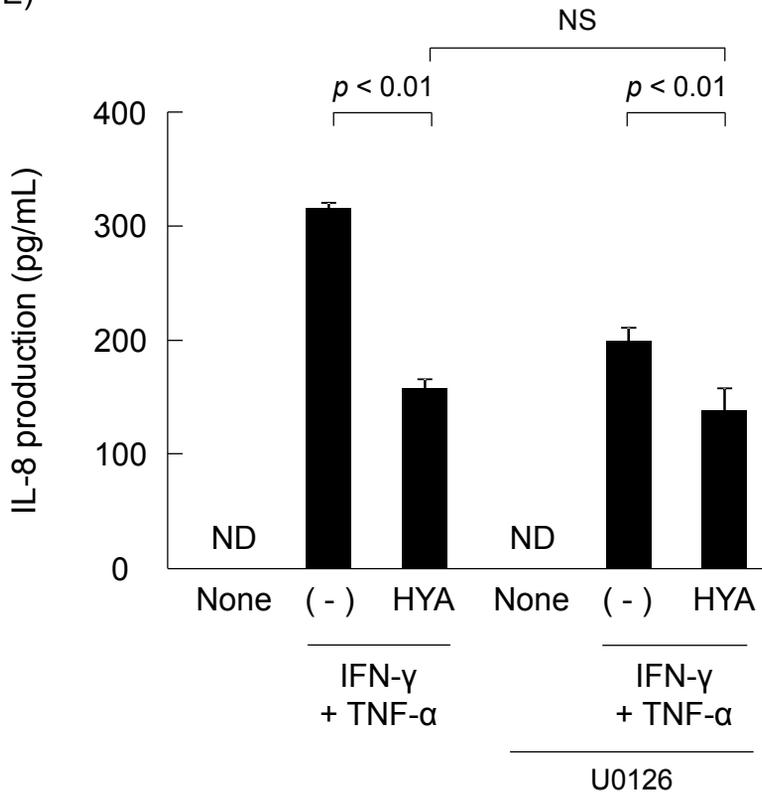


D)

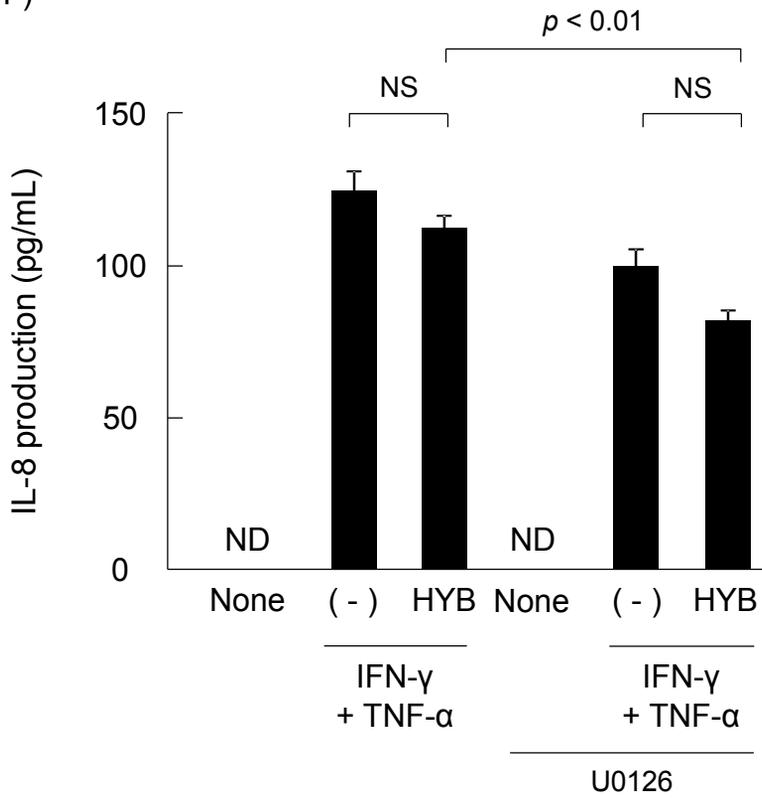


Continued (2/5)

E)

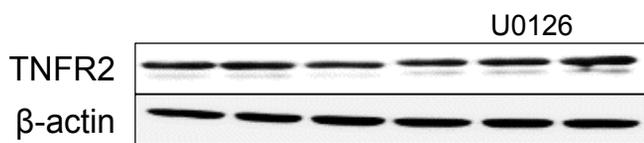
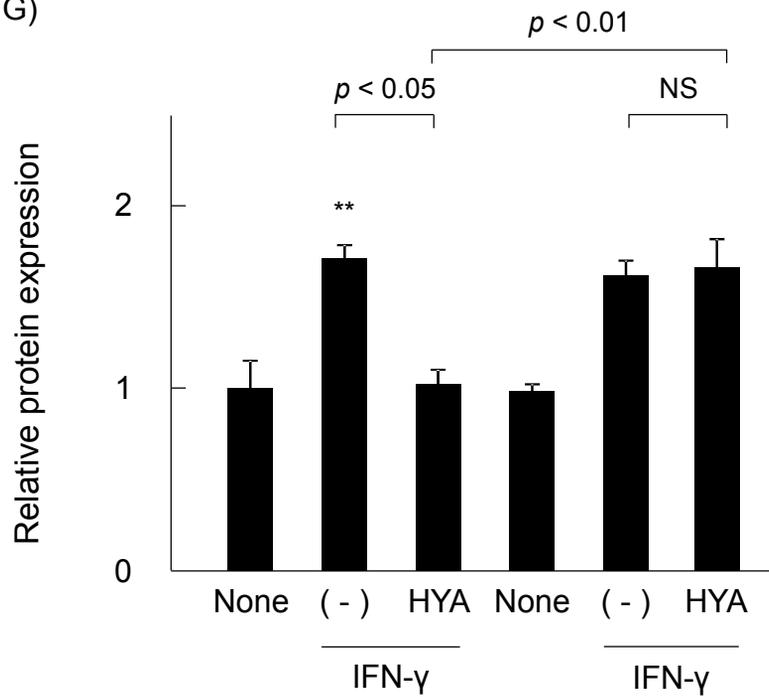


F)

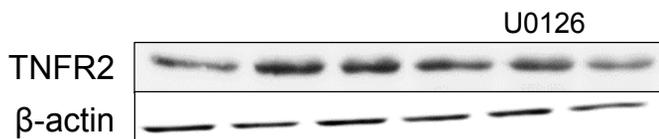
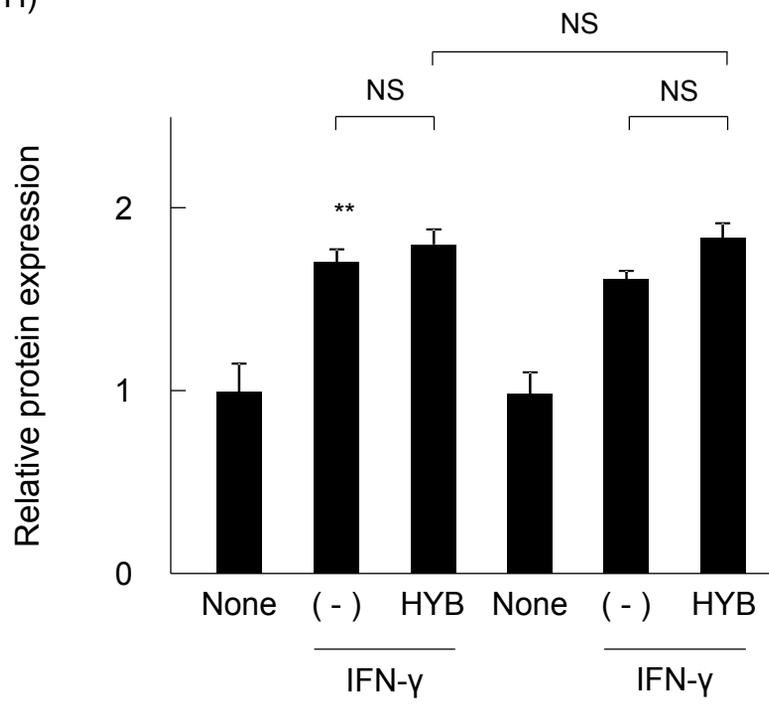


Continued (3/5)

G)



H)



Continued (4/5)

**Figure 3-6. The inhibitory effects of a MEK inhibitor on the barrier-recovering activity of HYA.** Caco-2 cells were pretreated with the MEK inhibitor U0126 for 30 min, then the barrier-recovering effects of HYA and TNFR2 expression were evaluated. (A-B) Time course of changes in TER. Open symbols are values from cells without U0126 treatment, and closed symbols are with U0126 treatment. ○ and ●, None; □ and ■, IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ;  $\Delta$  and  $\blacktriangle$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + HYA or HYB. (C-H), Evaluation of FITC-dextran permeability, IL-8 concentration, and TNFR2 expression (n = 3). \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  with or without U0126 ( - ); \$  $p < 0.05$  and \$\$  $p < 0.01$ , compared with HYA (or HYB) without U0126 (Tukey–Kramer). ND, not detected. NS, not significant. Results are expressed as means  $\pm$  SE. Each result (A–C) is representative of two similar experiments.

## 第4章

### HYAの腸炎改善作用

#### 1 序論

第2章および第3章で、腸内細菌代謝産物であるHYAが腸管バリア保護作用に寄与することと、その分子メカニズムの一端を明らかにした。腸炎疾患と腸管バリアの破綻は密接に関係しており、腸管バリアを維持することが一つの治療法になり得ることが期待されている (Khor *et al.*, 2011)。

そこで、本章では、Caco-2細胞での評価系で最も腸管バリア保護作用を発揮したHYAを、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS)誘導性腸炎モデルマウスに経口投与で与えることで、HYAの腸炎改善作用を検討した。

#### 2 材料および方法

##### 2.1 動物実験

BALB/cマウス(メス、6週齢)はCharles River Japan (Kanagawa, Japan)から購入し、全ての実験計画は広島大学動物実験等規則に従って行った (No. C10-17)。急性大腸炎は3.5% (w/v) DSS (分子量36000–50000; MP Biomedicals, Aurora, OH, USA)を5日間、自由飲水させることにより誘導した (Wirtz *et al.*, 2007.)。HYAおよびHYBの大腸に対する効果を評価するために、マウスにHYAあるいはHYB (100 nmol / mouse / day)の懸濁液100  $\mu$ Lずつ経口投与した。この投与はDSS投与前5日間と投与開始後5日間の全10日間、毎日行った。大腸炎の症状評価は、体重減少、糞便の状態および肛門からの出血によって毎日評価した (Miyachi *et al.*, 2013)。5日間のDSS投与後、屠殺し、大腸長を測定した。また、大腸組織の凍結切片 (7  $\mu$ m)を作成し、Hematoxylin-Eosin (H&E)染色によって、組織化学的評価を行った。

##### 2.2 Real-time RT-PCR

マウス腸管組織からのRNA抽出にはRNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, MD, USA)を使用した。以降は、第二章の方法に準じて、実施した。なお、使用したプライマーはTable 4-1に示す。

### 2.3 免疫蛍光染色

マウスの大腸組織を OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)に包埋し、クリオスタットで凍結切片 (7  $\mu\text{m}$ )を作成し、スライドガラス上に準備した。切片を 3 % パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。切片を 5 % 正常ヤギ血清 (Wako pure chemical industries)で 30 分ブロッキングし、一次抗体 (rabbit anti-occludin, rabbit anti-ZO-1, mouse anti-MLCK, rabbit anti-TNFR2, rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65, and phycoerythrin-conjugated anti-CD326)を 4  $^{\circ}\text{C}$ , オーバーナイトでインキュベートした。その後、二次抗体で 1 時間インキュベートし、同時に、4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Dojindo Laboratories, Kumamoto, JAPAN)を添加した。1 時間後、切片を 50 % グリセロールで封入した。蛍光ラベルした一次抗体を、蛍光顕微鏡 (Leica FW4000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)によって検出した。

### 2.4 マウス腸管上皮細胞 (IECs)の単離

マウスの大腸組織を冷 PBS (-)で洗浄し、1 mmol/L dithiothreitol (DTT, Wako pure chemical industries)を含む PBS 中で 10 分間、室温で振盪した。次に、組織を 30 mmol/L ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EDTA)を含む PBS 中で 10 分間、37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。1 分間のボルテックス後、剥離した IECs を 2 mg/ml dispase (Life Technologies)と 50 mg/ml DNase I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を含む PBS に懸濁し、1 時間、37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。この時、5 分おきにボルテックスした。得られた IECs を 20 % Percoll (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)に再懸濁し、40 % Percoll 上に重層後、600g で 15 分間遠心分離した。20 %と 40 % Percoll の界面から、精製した IECs を回収した。

### 2.5 フローサイトメトリー

IECs を 30 分間、4  $^{\circ}\text{C}$  で PE-anti-TNFR2 (BioLegend, San Diego, CA, USA)抗体とインキュベートした。上皮細胞特異的なマーカーであるサイトケラチン染色の場合には、IECs を Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences, California, USA)を用いて透過および固定の処理をマニュアル通りに行い、30 分間、4  $^{\circ}\text{C}$  で anti-pancytokeratin-FITC (Sigma Aldrich)

抗体とインキュベートした。また、各抗体の isotype-matched antibodies を用いてコントロール染色した。細胞割合を Guava EasyCyte flow cytometry system (Millipore)によって測定し、同時に、IECs の生存率および純度もそれぞれ測定した。なお、IECs の割合 (pan-cytokeratin positive cells)は 80 %以上、また、IECs のうちの生細胞割合は 70 %以上 (ViaCount (Millipore)による)であった (data not shown)。

## 2.6 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVA により行い、post-hoc test には Tukey-Kramer 法を用いた。p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

## 3 結果および考察

### 3.1 HYA の腸炎改善評価

DSS 誘導性腸炎モデルマウスは、最も広く用いられている炎症性腸疾患の動物モデルの一つである (Wirtz *et al.*, 2007.)。DSS が腸炎を誘導するメカニズムとして、自然免疫系の異常・マクロファージの活性化 (You *et al.*, 2016.)、腸管透過性の亢進 (Azuma *et al.*, 2013.)、腸内細菌叢の変化 (Nakanishi *et al.*, 2015.)などが考えられている。

DSS 投与により、DSS 投与群では、顕著な腸炎症状 (体重減少, 大腸長の委縮, 糞便スコアや上皮損傷) が観察された (Figure 4-1)。これらの症状は、DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける代表的な腸炎重症度の指標として汎用されている (Wirtz *et al.*, 2007.)。

HYA の継続的な投与は、これら腸炎症状の悪化を有意に抑制した (Figure 4-1)。特に、糞便スコアや大腸長の改善が認められた。一方、HYB 投与群では、腸炎症状を改善する作用は観察されなかった (Figure 4-1)。なお、HYA や HYB 単独投与群 (DSS 投与なし) には、このような腸炎症状は観察されなかったことから、HYA 投与による腸炎改善作用は腸炎の発症や悪化を改善したものと考えられる。

### 3.2 TJ 関連因子の発現制御

Caco-2 細胞において、HYA は炎症性サイトカインの誘導した TJ 関連因子の発現異常

を改善した。そこで、DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける HYA の腸炎改善作用のメカニズムを明らかにするために、TJ 関連因子の発現・局在を検討した。

DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおいて、TJ 関連因子である occludin, ZO-1, -2, Claudin-1, -3, -4 および MLCK の mRNA 発現を解析した (Figure 4-2A)。その結果、occludin, ZO-1, -2, claudin-1, -3 および claudin-4 に有意な発現異常が観察された (MLCK は増加傾向)。DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける腸炎症状の悪化に少なくとも、これら TJ 関連因子の発現異常が関与していることが示唆された。腸炎症状を改善した HYA 投与群では、occludin, claudin-1 および MLCK に有意な改善作用が認められた (Figure 4-2A)。また、ZO-1, -2 および claudin-3 においても、改善傾向が観察できたことから、HYA の腸炎症状改善作用の少なくとも一部に、TJ 関連因子の発現調節を介していることが示唆された。一方、HYB 投与群には、TJ 関連因子の発現を調節するような作用は観察されなかった (Figure 4-2A)。

DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおいて、MLCK の mRNA 発現異常が確認されたことから、TJ 関連因子の局在が変化することも考えられる (Clayburgh *et al.*, 2004.)。局在の変化もまた、異常な腸管透過性に寄与することから、膜貫通型タンパク質の occludin と裏打ちタンパク質である ZO-1 の局在を検討した。健常マウスにおいて、occludin や ZO-1 は上皮細胞で観察されたが、DSS 誘導性腸炎モデルマウスでは occludin の局在が不明瞭であった。一方、HYA 投与群では、わずかに局在の変化を改善した (Figure 4-2B, C)。興味深いことに、HYA 単独投与群では、occludin や ZO-1 の発現が強く観察された。また、MLCK に関しても同様に、健常マウスでほとんど検出されなかった MLCK が、DSS 誘導性腸炎モデルマウスでは上皮細胞に顕著に確認されたが、HYA 投与群ではその検出が抑制された (Figure 4-2D)。すなわち、HYA の DSS 誘導性腸炎モデルマウスの症状改善作用は、occludin および MLCK の発現・局在制御が関与していることが示唆された。

### 3.3 腸管上皮細胞の TNFR 発現制御

HYA の TJ 関連因子の発現制御メカニズムを明らかにするために、腸管組織における

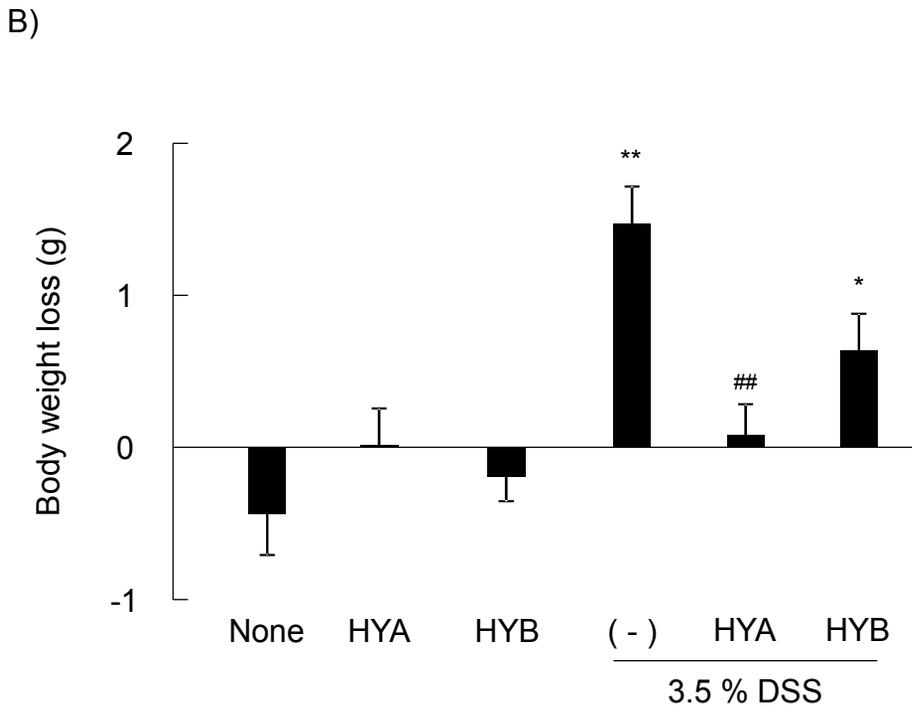
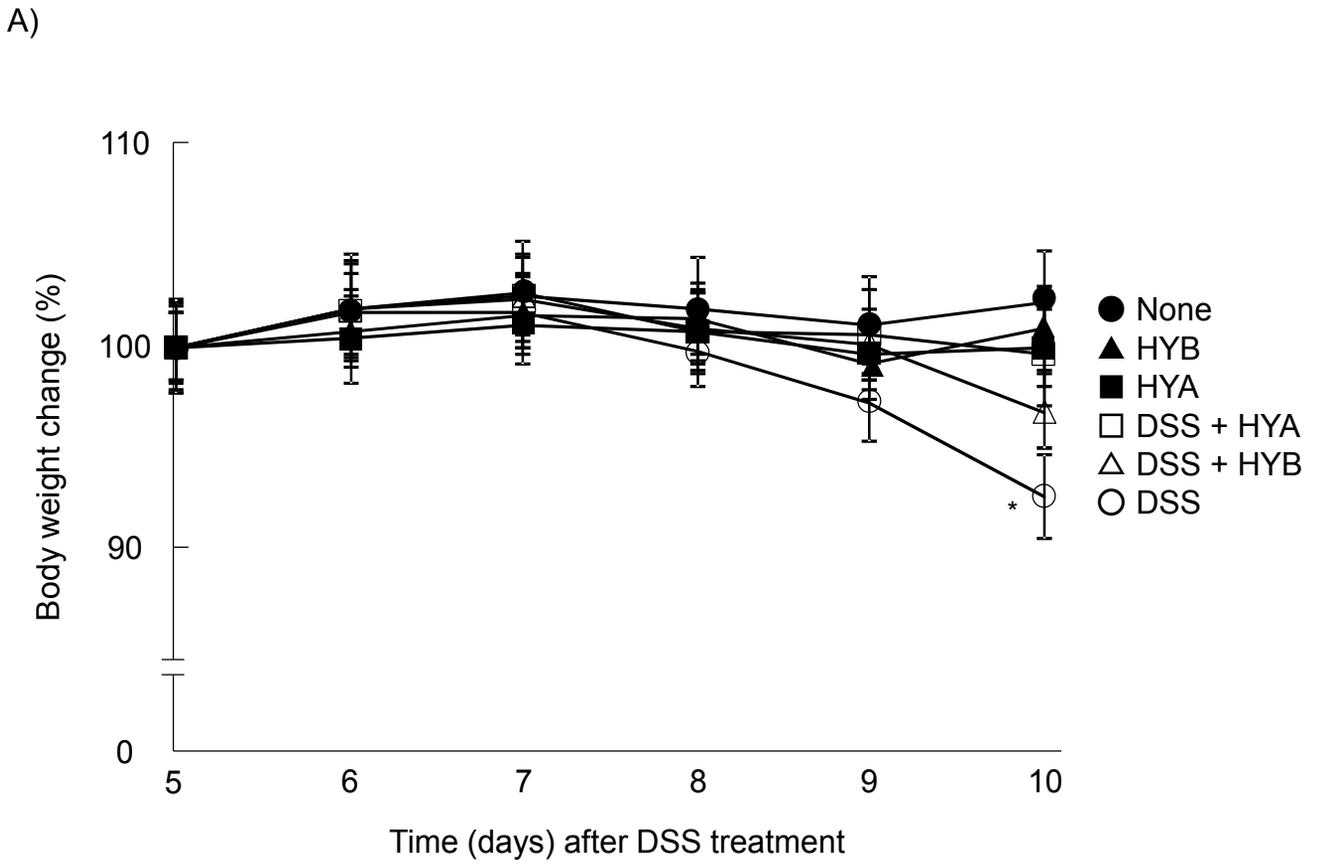
TNFRs に着目して検討を行った。腸管組織における TNFRs の mRNA 発現は、TNFR1 および TNFR2 共に DSS 投与群で顕著に増加した (Figure 4-3A)。特に、炎症状態で発現が増加する TNFR2 は、TNFR1 よりも強く発現した。TNFR1 の発現制御は、HYA および HYB の投与によって観察されたが、HYA は TNFR2 発現も顕著に抑制した (Figure 4-3A)。TNFR2 は T 細胞、B 細胞、マクロファージや上皮細胞など、様々な細胞サブセットに発現していることも知られている (Chong *et al.*, 2014; Venkatesh *et al.*, 2013; Atreya *et al.*, 2011)。そこで、腸管における TNFR2 発現がどの細胞に強く発現しているかを検討するために、免疫蛍光染色で TNFR2 の検出を試みた。健常マウスや HYA・HYB 単独投与マウスでは TNFR2 陽性細胞はほとんど観察されなかった (Figure 4-3B)。一方、DSS 投与群では、TNFR2 陽性細胞が確認され、特に腸管上皮細胞と共発現する細胞が確認されたが、HYA 投与でそれらが減少した。また、HYB 投与群では DSS 投与群と同程度であった (Figure 4-3B)。DSS 腸炎モデルマウスの腸管組織における TNFR2 の mRNA 発現増加は、腸管上皮細胞であることが示唆されたため、腸管上皮細胞を単離し、TNFR2 陽性腸管上皮細胞の検出をフローサイトメトリーで検討した。その結果、健常マウスや HYA・HYB 単独投与マウスでは、同程度の TNFR2 陽性腸管上皮細胞が検出された。一方、DSS 投与群では、有意な TNFR2 陽性上皮細胞が検出されたが、HYA 投与によって、その割合が有意に減少した (Figure 4-3C)。DSS 誘導性腸炎モデルマウスに対する HYA の腸炎症状緩和作用に、TNFR2 発現を制御していることが示唆されたため、TNF- $\alpha$ -TNFR2 シグナルの下流である NF- $\kappa$ B 経路への関与を検討した。NF- $\kappa$ B p65 で腸管組織を染色した結果、健常マウスや HYA 単独投与マウスではわずかに検出されたが、DSS 誘導性腸炎モデルマウスではその検出割合が増加した。また、HYA 投与群では、NF- $\kappa$ B p65 陽性細胞の割合が健常マウスと同程度まで抑制されたことから、HYA の投与によって、NF- $\kappa$ B 経路の活性化が抑制されたことが示唆された (Figure 4-3D)。一方、HYB 単独投与では NF- $\kappa$ B p65 は健常マウスと同程度であったが、DSS 誘導性腸炎モデルマウスへの HYB 投与ではその割合に変化は観察されなかった (Figure 4-3D)。

#### 4 要約

DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* 評価系によって、HYA の投与が腸炎症状を改善することが示唆された。また、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 評価系と同様に、TJ 関連因子の発現を制御することが明らかとなった。さらに、腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御し、その下流の NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制することで、TJ 関連因子の発現調節や、腸炎症状の緩和に寄与していることが示唆された。

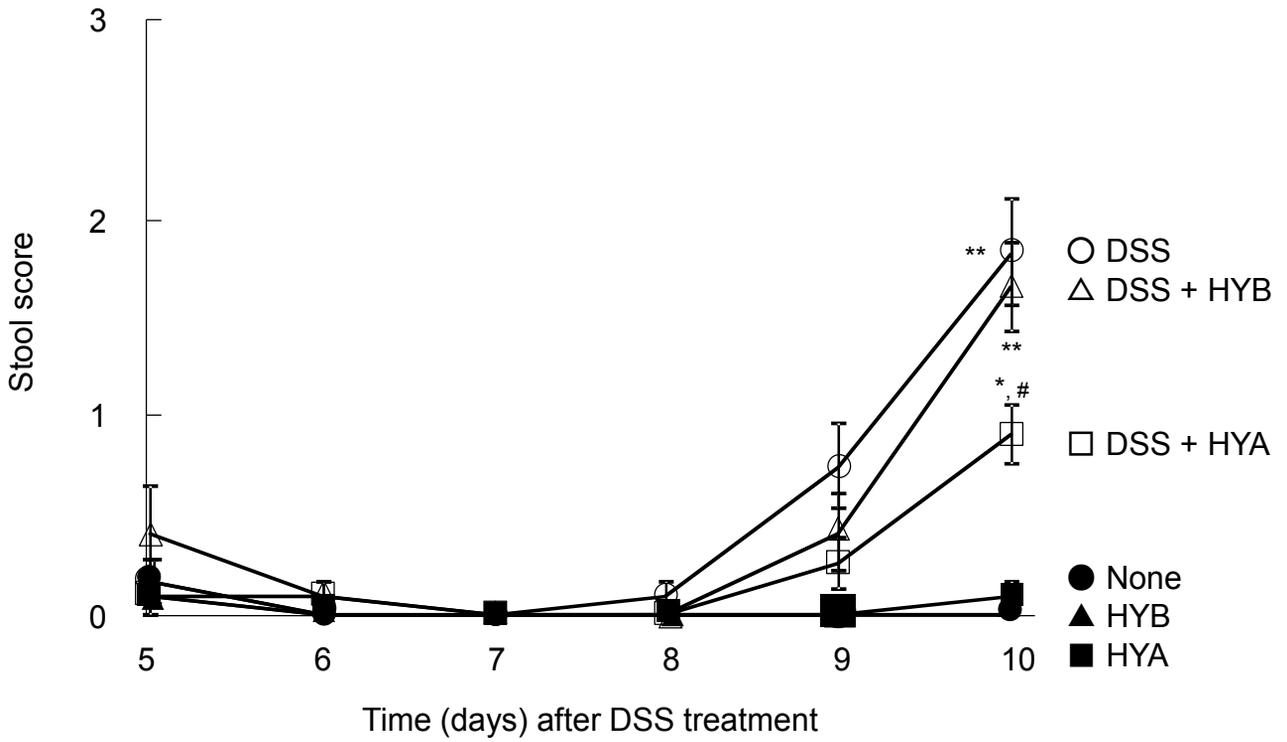
Table 4-1. 第4章で使用したプライマー配列

| Gene             |         | Sequence                       |
|------------------|---------|--------------------------------|
| <i>claudin-1</i> | Forward | 5'-GATGTGGATGGCTGTCATTG-3'     |
|                  | Reverse | 5'-CCTGGCCAAATTCATACCTG-3'     |
| <i>claudin-3</i> | Forward | 5'-ACCTGCGTACAAGACGAGACG-3'    |
|                  | Reverse | 5'-ATCCTGATGATGGTGTGG-3'       |
| <i>claudin-4</i> | Forward | 5'-CTGGAGTGGATGTCCTCATGT-3'    |
|                  | Reverse | 5'-GAGTAGCGCTGGAGTAACGTG-3'    |
| <i>occludin</i>  | Forward | 5'-CACACTTGCTTGGGACAGAG-3'     |
|                  | Reverse | 5'-TAGCCATAGCCTCCATAGCC-3'     |
| <i>MLCK</i>      | Forward | 5'-GCGTGATCAGCCTGTTCTTTCTAA-3' |
|                  | Reverse | 5'-GCCCCATCTGCCCTTCTTTGACC-3'  |
| <i>ZO-1</i>      | Forward | 5'-CTTCTCTTGCTGGCCCTAAAC-3'    |
|                  | Reverse | 5'-TGGCTTCACTTGAGGTTTCTG-3'    |
| <i>ZO-2</i>      | Forward | 5'-AACGGATGCTCGGAAGTTAAT-3'    |
|                  | Reverse | 5'-TGTGCTTGCTGTCTCTCAACA-3'    |
| <i>TNFR1</i>     | Forward | 5'-AAAGGTCTCTAAGGGGAAGG-3'     |
|                  | Reverse | 5'-CAAGTGGGCACCAGATACATT-3'    |
| <i>TNFR2</i>     | Forward | 5'-GCCATCCCAAGGACACTCTA-3'     |
|                  | Reverse | 5'-AGGGCTTCTTTTTCCTCTGC-3'     |
| <i>GAPDH</i>     | Forward | 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'     |
|                  | Reverse | 5'-AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'    |

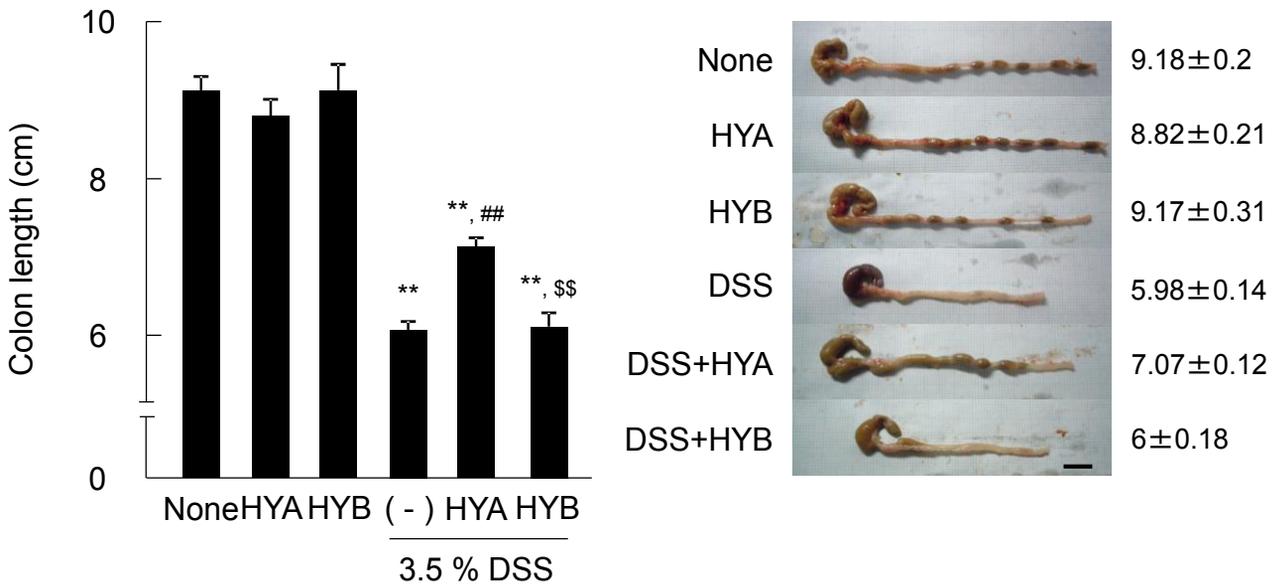


Continued (1/3)

C)

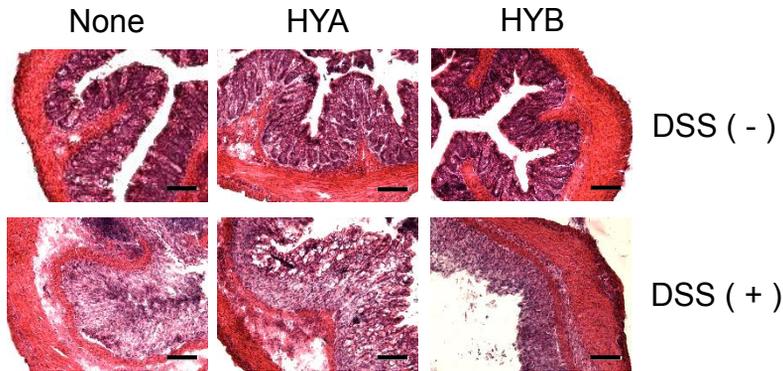


D)

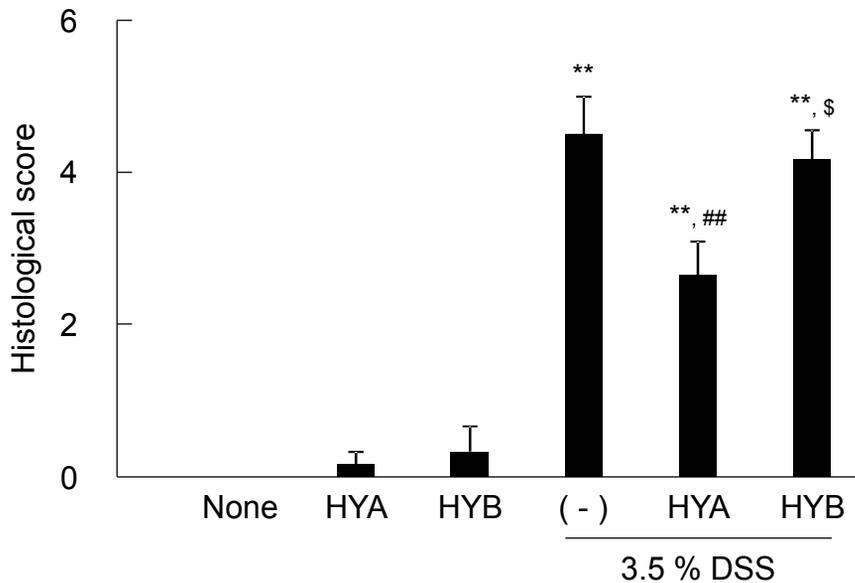


Continued (2/3)

E)



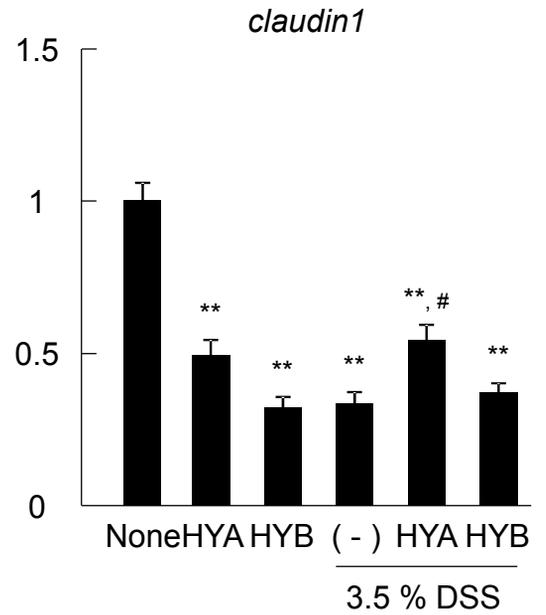
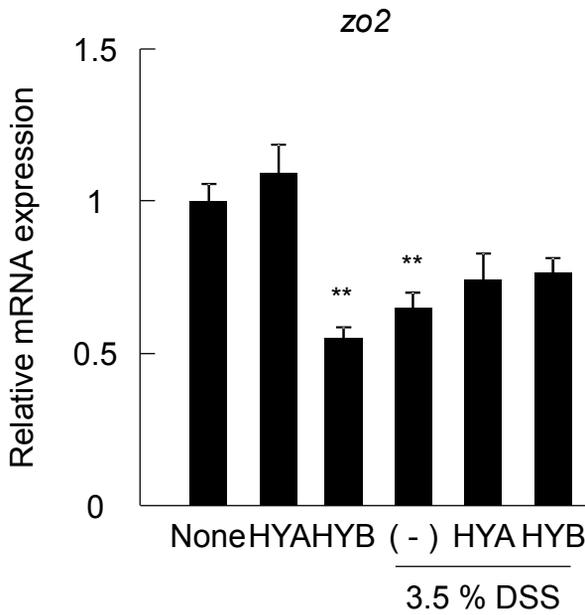
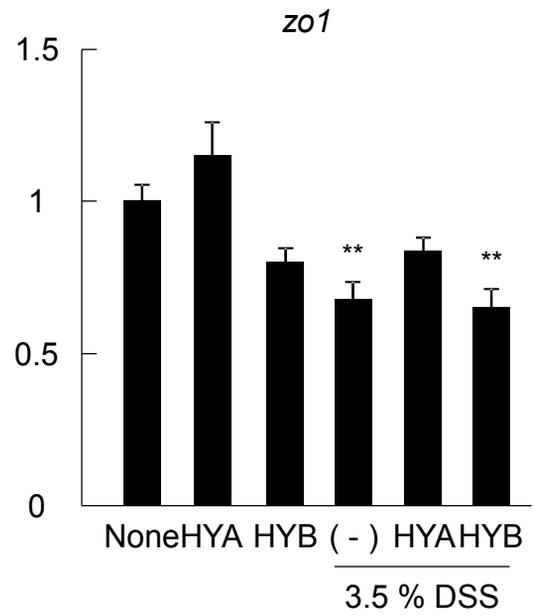
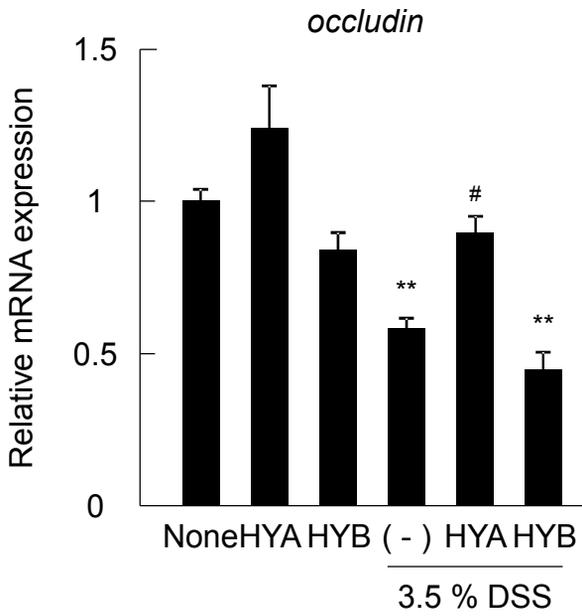
F)



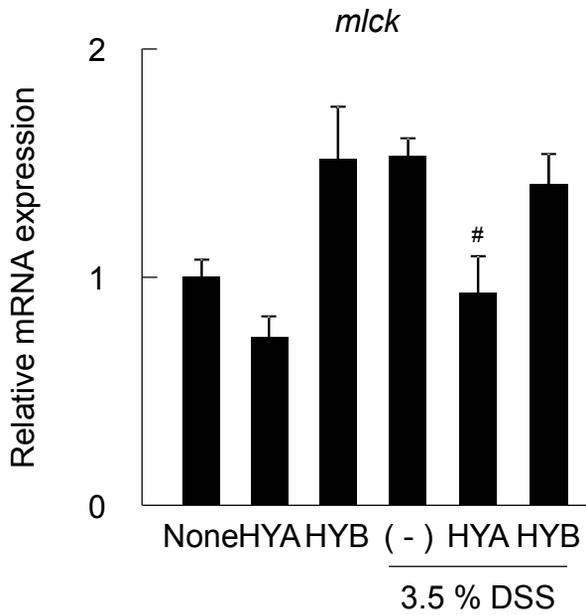
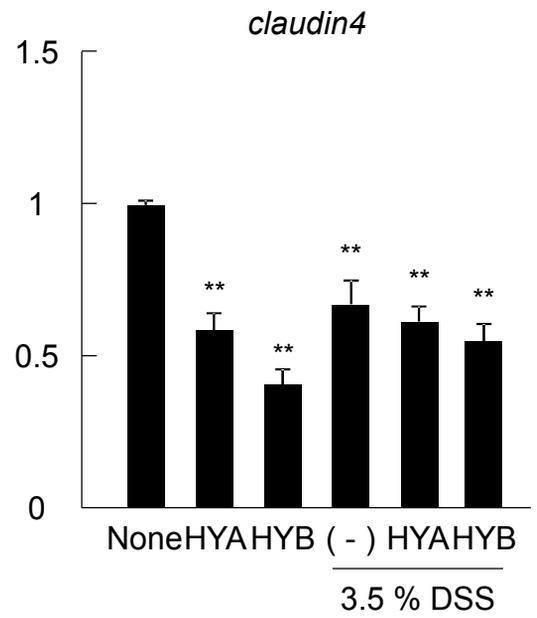
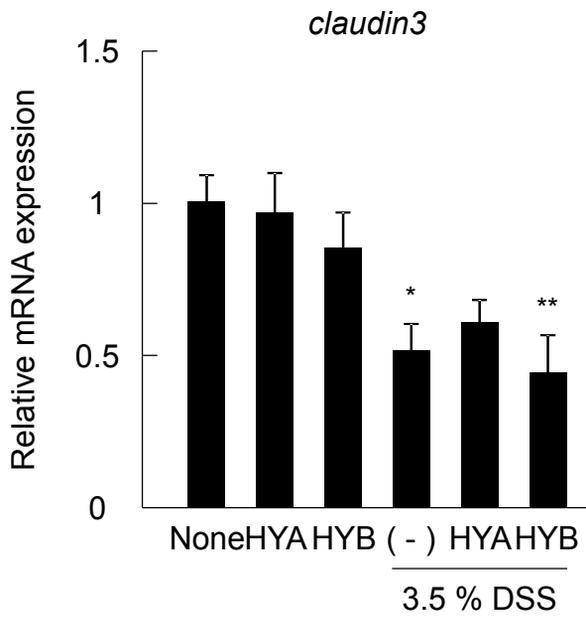
**Figure 4-1. Anti-inflammatory effects of HYA in DSS-induced colitis mice.**

(A-C) Mice were monitored daily for weight (A) and stool score (C). The data from the last 5 days of the experimental period are shown. ●, Untreated; ■, HYA administration; ▲ HYB administration ○, DSS-treated mice; □, DSS-treated mice with HYA administration and △, DSS-treated mice with HYB administration (n = 6). Weight loss was calculated (B) and the colon length was measured on day 10. Scale bars represent 1 cm (D). (E, F) Colonic tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Scale bars represent 100 μm. Histological examination was performed by assigning a score for epithelial damage and leukocyte infiltration on microscopic cross-sections of the colon in each mice. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with DSS-treated mice without HYA and HYB administration (-); \$  $p < 0.05$ , compared with DSS+HYA (Tukey–Kramer). Each result (A–E) is representative of two independent similar experiments.

A)

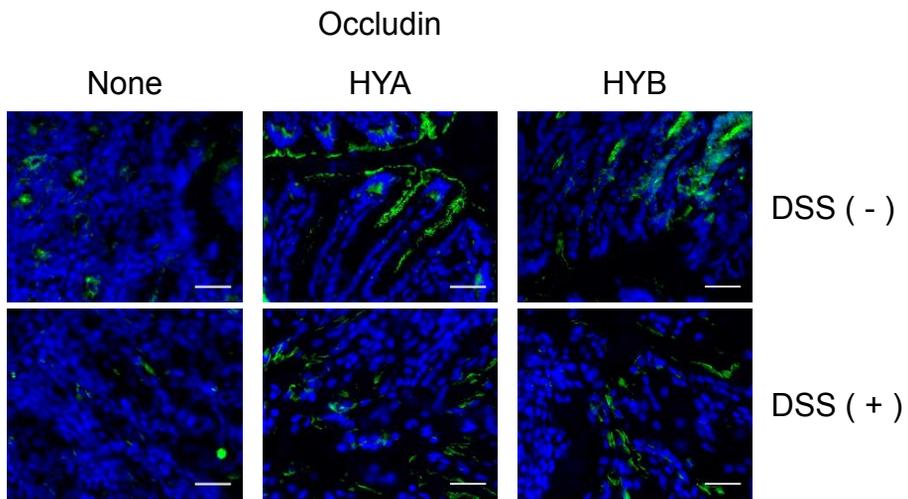


Continued (1/4)

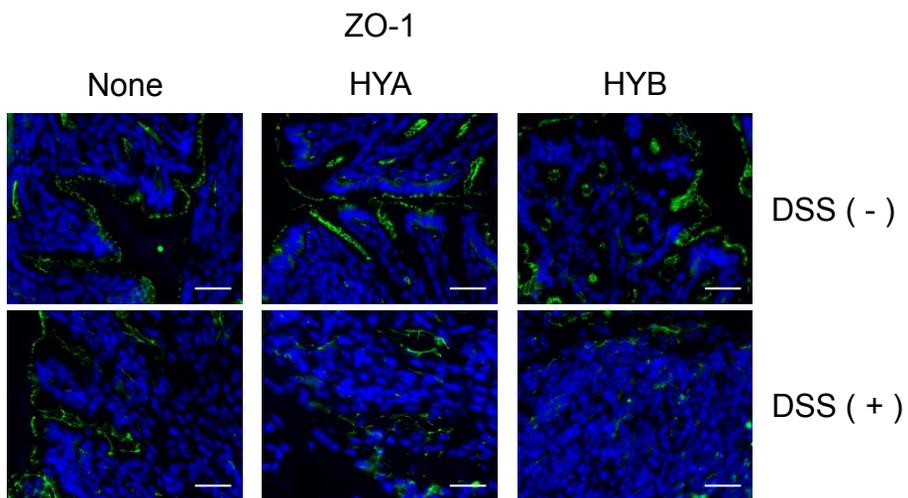


Continued (2/4)

B)

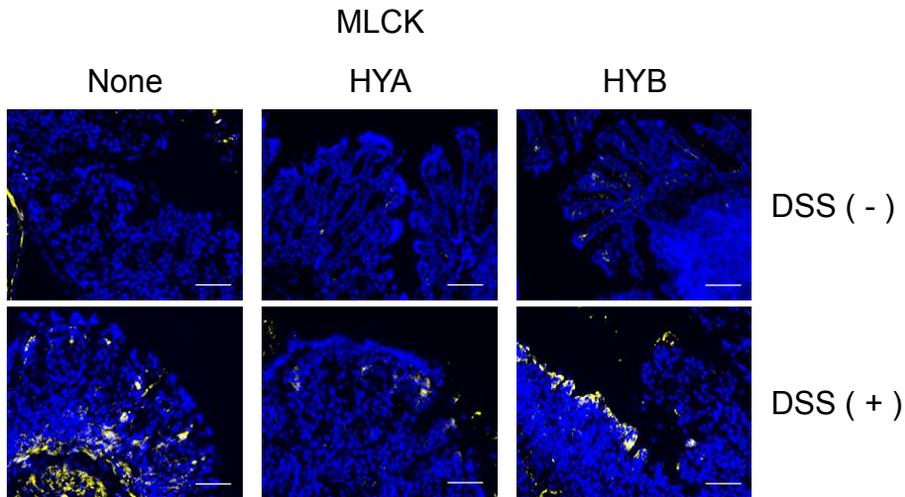


C)



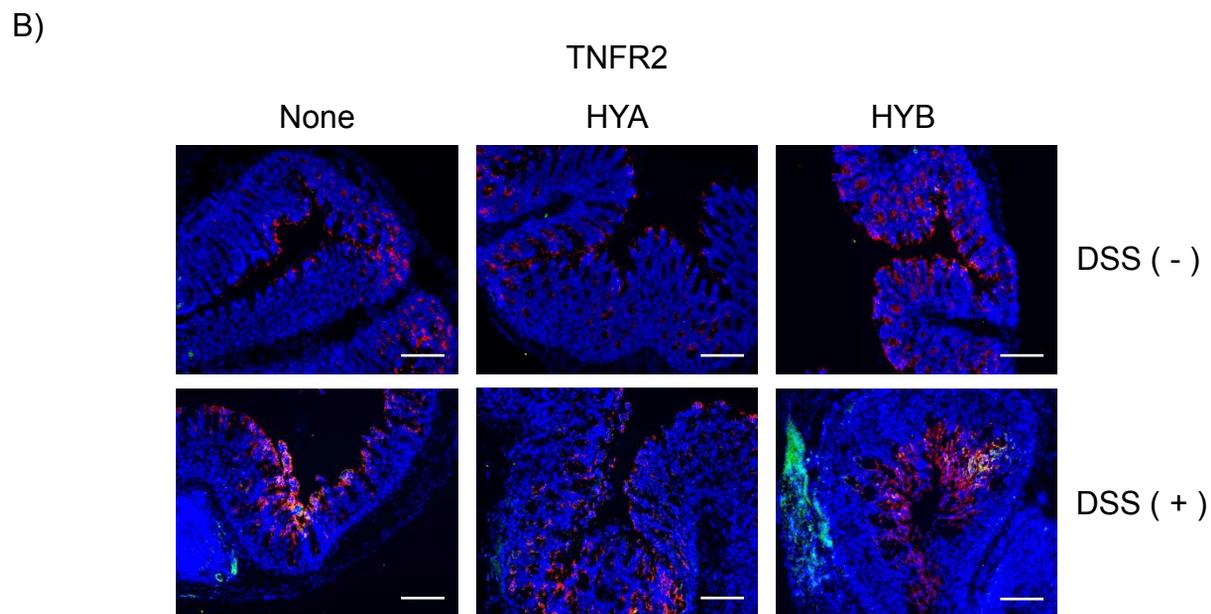
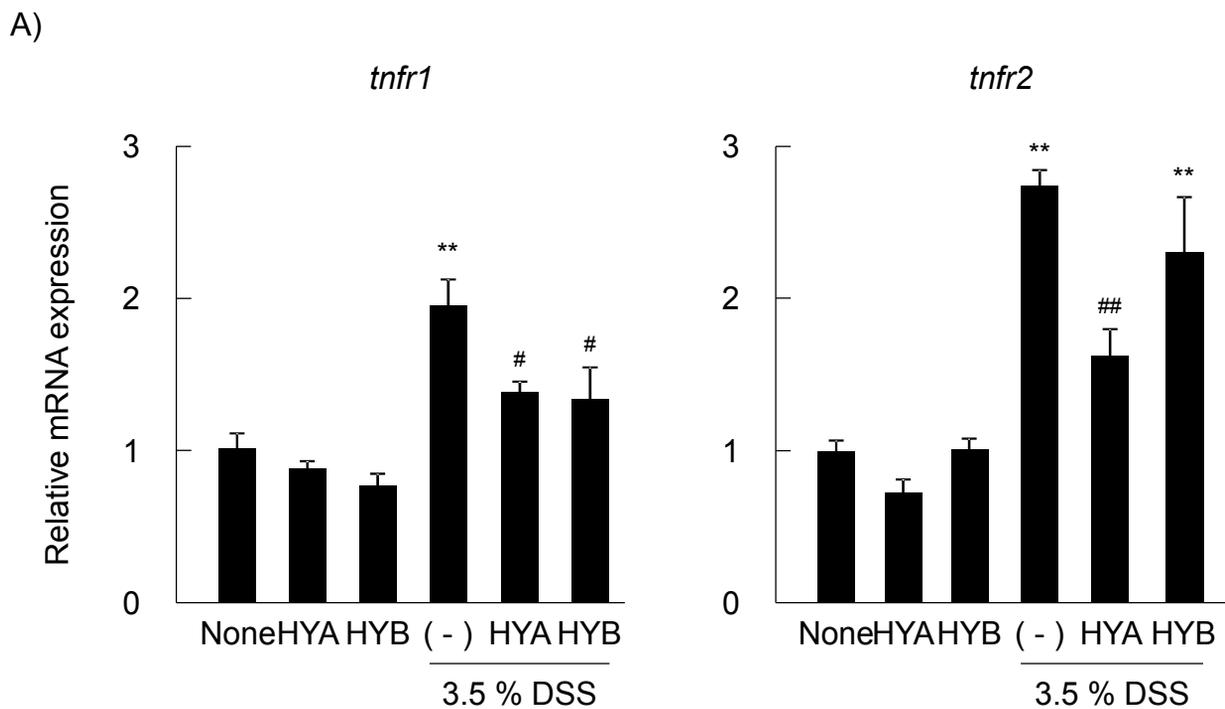
*Continued (3/4)*

D)

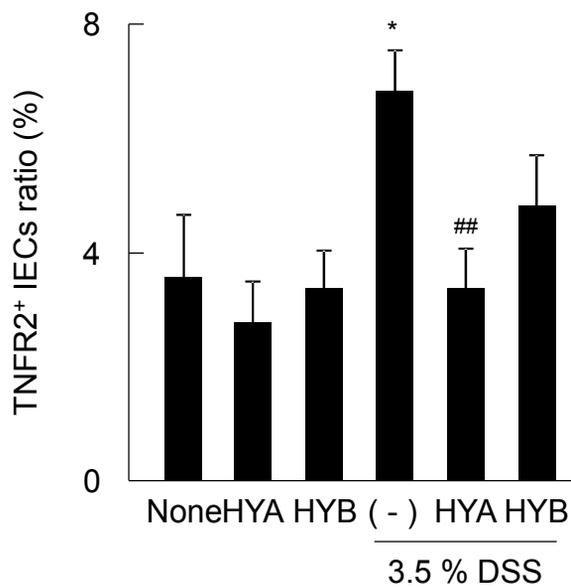
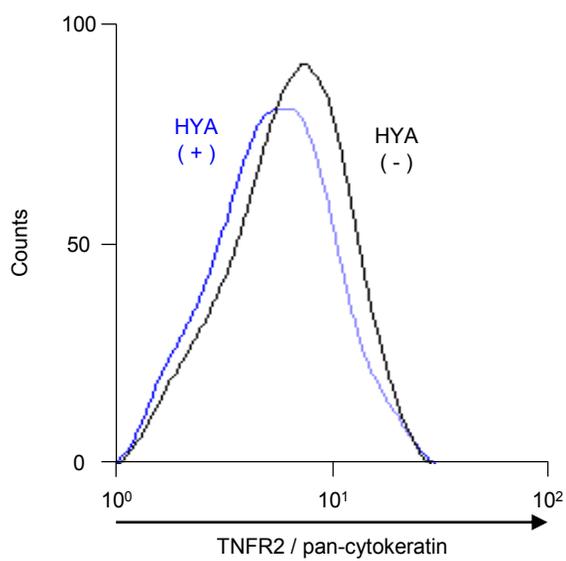


**Figure 4-2. The recovering effects of HYA on DSS-induced TJ impairment.**

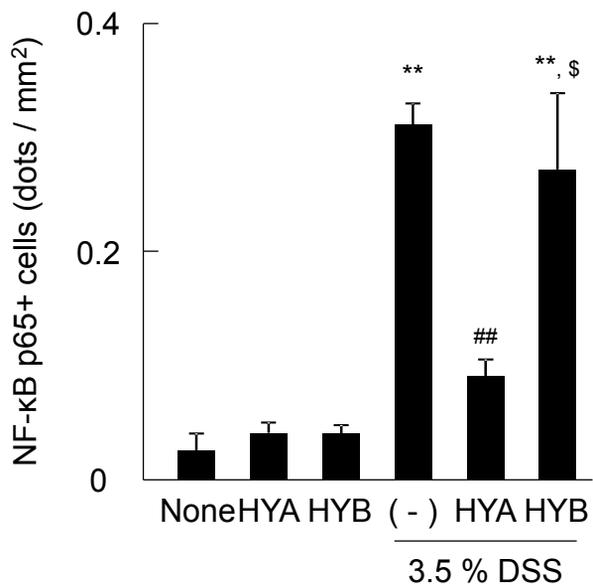
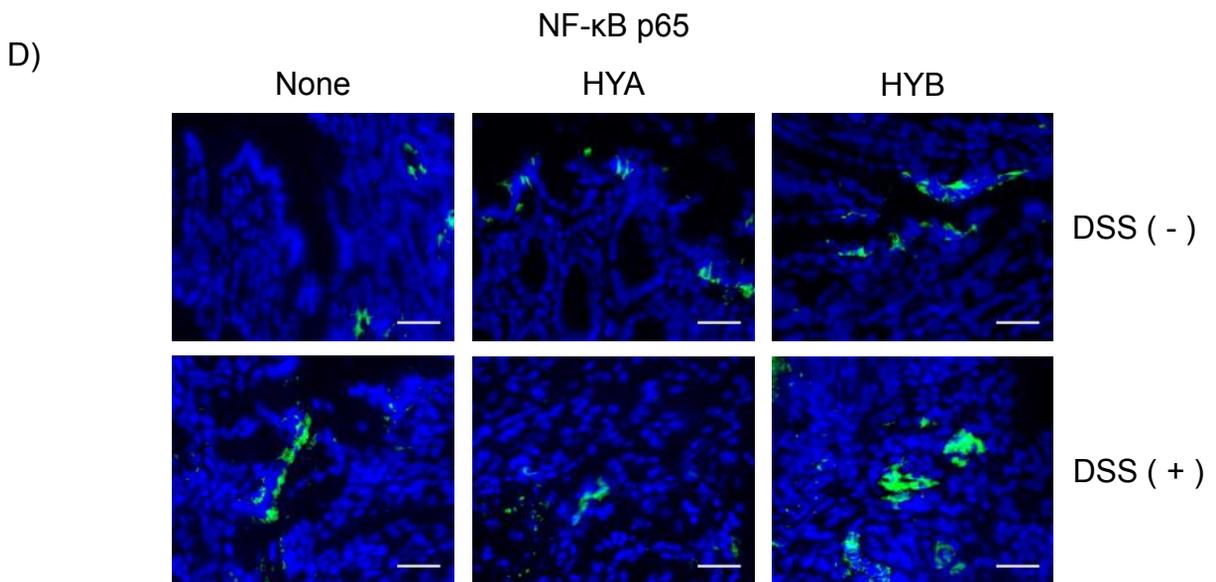
(A) Total RNA was extracted from colonic tissue of DSS-induced colitis mice and the mRNA expression of TJ-related molecules examined by real-time RT-PCR. Data are presented as the fold change in gene expression from the control (None), after normalization to the GAPDH gene ( $n = 6$ ). (B-D) Cryosections of colonic tissue were immunolabeled for occludin (green) (B), ZO-1 (green) (C) or MLCK (yellow) (D), and DAPI (blue). Scale bars represent  $50 \mu\text{m}$  (B-C) or  $100 \mu\text{m}$  (D). Results are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with DSS-treated mice without HYA and HYB administration (-) (Tukey-Kramer). Each result (A-C) is representative of two independent similar experiments.



C)



*Continued (2/3)*



**Figure 4-3. Effects of HYA on the TNFRs expression in DSS-induced colitis mice.**

(A) Total RNA was extracted from colonic tissue of DSS-induced colitis mice and the mRNA expression of TNFRs examined by real-time RT-PCR (n = 6). (B) Cryosections of colonic tissue were immunolabeled for TNFR2 (green), DAPI (blue) and CD326 (red). Scale bars represent 100 μm. (C) Intestinal epithelial cells (IECs) were stained for pancytokeratin and TNFR2, and analyzed by flow cytometry. The representative histogram analysis and the percentage of TNFR2 positive IECs are shown. (D) Cryosections of colonic tissue were immunolabeled for NF-κB p65 (green) and DAPI (blue). Scale bars represent 50 μm. The number of NF-κB p65-positive cells were counted. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with Untreated; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with DSS-treated mice without HYA and HYB administration (-) (Tukey–Kramer). Each result (A–D) is representative of two independent similar experiments.

## 第5章

### 総括

本研究では、食事脂質由来の腸内細菌代謝産物が長鎖脂肪酸受容体である GPR40 のリガンドとなり、MEK-ERK 経路を介することで、腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御し、腸管バリア保護作用に寄与することを明らかにした。以下に、本研究で得られた知見を総括する。

#### 1 腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用（第2章）

食事脂質における生理活性は数多く報告されており、 $\omega$ -3 脂肪酸や共役リノール酸には腸管保護効果や抗炎症・抗癌作用などの作用を示すことが報告されている (Li *et al.*, 2008; Bergamo *et al.*, 2011; Martinasso *et al.*, 2010; Reifen *et al.*, 2015)。このような食事脂質に対して、腸内細菌が代謝することで産生された新規の代謝産物の存在が明らかとなったが、宿主に対する生理活性は未だ未解明なままである (Kishino *et al.*, 2013)。そこで、本研究では、リノール酸由来の腸内細菌代謝産物が腸管恒常性維持に寄与するか否かを、腸管バリア、TJに着目して検討した。

ヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞における炎症性サイトカインのバリア損傷を誘導するために、炎症性腸疾患などの腸炎患者で過剰発現が報告されている TNF- $\alpha$  を使用した (Ye *et al.*, 2006; Amasheh *et al.*, 2010)。TNF- $\alpha$  は IL-8 のような炎症促進性サイトカインの過剰産生を誘導する MAPK 経路と NF- $\kappa$ B 経路を活性化し (Weber *et al.*, 2008)、炎症応答を引き起こす (Fischer *et al.*, 2013; Piche *et al.*, 2009)。さらに、TNF- $\alpha$  は細胞外シグナル調節キナーゼの活性化によって、MLCK の発現増加や p38 活性化による ZO-1 発現減少のような TJ 関連因子の発現変化を誘導する (Petecchia *et al.*, 2012; Heller *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2012)。実際に本研究で、腸内細菌代謝産物群 (Figure 2-1)の腸管バリア保護作用について、炎症性サイトカインによる腸管バリア損傷モデルで評価し、リノール酸の初期代謝産物である HYA に最も強い腸管バリア保護作用を見出

した (Figure 2-2)。さらに、TJ 関連因子の occludin, ZO-1 および MLCK の発現変化を有意に改善した (Figure 2-4)。これらの作用は、リノール酸よりも、リノール酸の腸内細菌代謝産物である HYA に強い活性が認められたことから、食事脂質のバランスと腸内細菌の存在が腸管バリア、宿主の恒常性維持に寄与していることを示唆している。

## 2 腸内細菌代謝産物 HYA の分子メカニズム (第3章)

### 2-1 TNFR2 発現制御

HYA の腸管バリア保護メカニズムのさらなるメカニズムを解明するために、TNFRs の発現に着目した。特に、TNFR2 は炎症状態において発現が増加するユニークな受容体で、TNFR2がモデルマウスを用いた検討などによって、TNFR2 が炎症の増悪に関与することが明らかとなっている (Mizoguchi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012; Onizawa *et al.*, 2009)。TNFR2 シグナリングは 1) MLCK の活性化、2) occludin の局在変化、3) (バリア損傷依存的な) 過剰な炎症応答、4) 炎症の促進を引き起こす (Su *et al.*, 2013)。このように、TNFR2 発現の制御は、炎症性腸疾患などを含めた炎症性疾患の新規の治療ターゲットとなることが期待されている。本研究では、Wang らと同様に、IFN- $\gamma$  で Caco-2 細胞を刺激することで、TNFR2 発現を誘導したが (Wang *et al.*, 2006)、HYA はその発現を有意に抑制した (Figure 3-1B)。また、TNF- $\alpha$ -TNFR2 シグナルの下流となる NF- $\kappa$ B 経路においても、TNF- $\alpha$  の刺激によって活性化が誘導されたが、HYA はその下流においても抑制した (Figure 3-1A)。

### 2-2 GPR40 を介した腸管バリア保護メカニズム

代表的な長鎖脂肪酸受容体として、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ )、GPR40 および GPR120 などが知られており、共役リノール酸の受容体である PPAR $\gamma$  は NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制すること (Zenhom *et al.*, 2011)、DHA や EPA のような多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) の受容体である GPR120 は、TGF- $\beta$  活性化キナーゼ 1 (TAK-1) のリン酸化と NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制することで抗炎症活性を示している (Oh *et al.*, 2010)。さらに、NLRP3 活性化を制御することによる抗炎症・代謝改善作用も明らかになっており (Yan

*et al.*, 2013)、GPR120 の炎症性疾患に対する作用が期待される。一方、長鎖の飽和・不飽和脂肪酸の受容体である GPR40 は腸内分泌細胞からの GLP-1 分泌と膵島  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進することが報告されており (Edfalk *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2003)、GPR40 は代謝性疾患の病因に重要な役割を果たすと考えられている。一方、腸炎疾患における GPR40 の関与は全く報告されていないが、GPR40 agonist である GW9508 の皮膚への塗布がケモカイン産生を制御することで皮膚炎を抑制できることが報告されており (Fujita *et al.*, 2011)、GPR40 が抗炎症活性の有する可能性も示唆されている。

GPR40 の内因性のリガンドとして、リノール酸、リノレン酸あるいはオレイン酸などの長鎖脂肪酸からカプリン酸やラウリル酸などの中鎖脂肪酸まで幅広く報告されているが、最も高い親和性を示すのがリノール酸である (Briscoe *et al.*, 2003)。実際に、本研究で用いたヒト GPR40 強制発現 HEK293 細胞においても、リノール酸に対して高い親和性を示した。興味深いことに、リノール酸の腸内細菌代謝産物である HYA と HYB の GPR40 に対する親和性も検討した結果、HYA はリノール酸よりも親和性が高く、HYB は全く活性を示さなかった (Figure 3-3C)。HYA が内因性リガンドであるリノール酸よりも高い活性を示したことから、新たな GPR40 agonist としての可能性が期待される。さらに、GPR40 シグナルと腸管バリアへの寄与を GPR40 antagonist を用いて検討した結果、HYA の腸管バリア保護作用が GPR40 antagonist 存在下で消失したことから、少なくとも一部に、GPR40 シグナルが腸管バリアを制御していることが示唆された。一方、GPR40 に対して活性を示さなかった HYB に関しては、GPR40 antagonist の有無に関わらず、炎症性サイトカインの誘導した腸管バリアの損傷を改善しなかった (Figure 3-4)。すなわち、HYA と HYB の構造上の差異である炭素鎖 12 位の二重結合の有無が本活性に重要な影響を及ぼしていることが示唆された。

### 2-3 GPR40-MEK-ERK を介した腸管バリア保護メカニズム

GPR40 は Gq タンパク質と共役しており、 $[Ca^{2+}]_i$  の増加と PLC 経路の活性化によって、膵臓  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進することも明らかにされている (Fujiwara *et al.*, 2005)。また、GPR40 agonist、DHA やパルミチン酸などの GPR40 リガンドが下流

シグナルである ERK リン酸化と CREB リン酸化を活性化することも報告されている (Zamarbide *et al.*, 2014)。実際に、本研究においても、HYA の作用によって ERK のリン酸化が促進しており、その作用は GPR40 antagonist 存在下では減弱化している。また、p38 や JNK の経路には影響しないことから、GPR40 が MAPK 経路でも特に MEK-ERK 経路を特異的に活性化していることが示唆された (Figure 3-5)。そこで、GPR40-MEK-ERK 経路が腸管バリアに寄与する否かを検討した結果、MEK inhibitor 存在下で HYA の腸管バリア保護作用が消失したことから、MEK-ERK 経路が腸管バリア保護に重要なシグナル経路であることが示唆された。実際に、当研究室では、ある種の乳酸菌が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性の腸管バリア損傷モデルにおいて、ERK 経路のリン酸化を介して腸管バリア保護作用を発揮することも明らかにしている (Miyachi *et al.*, 2012)。このことは、本研究で明らかにした GPR40-MEK-ERK 経路が腸管バリアの恒常性維持に重要であることを部分的に示唆している (Figure 3-6)。すなわち、腸内細菌代謝産物である HYA は長鎖脂肪酸受容体である GPR40 のリガンドとして作用し、MEK-ERK 経路を活性化することで、腸管上皮細胞に発現した TNFR2 を制御し、腸管バリア保護作用に寄与することが明らかとなった。

### 3 腸内細菌代謝産物 HYA による腸炎改善作用 (第 4 章)

これまでに腸炎モデル動物に対する長鎖脂肪酸の作用は、DHA や EPA などのような  $\omega$ -3 脂肪酸で検討され、その改善作用は数多く報告されきた (Hudert *et al.*, 2006; Murase *et al.*, 2016)。一方、リノール酸や  $\gamma$ -リノレン酸のような  $\omega$ -6 脂肪酸は腸炎を悪化させるような作用や (Ghosh *et al.*, 2013)、その摂取を減らすことで症状が緩和されることが明らかとなっており (Nagy-Szakal *et al.*, 2015)、 $\omega$ -3 と  $\omega$ -6 脂肪酸の摂取バランスが非常に重要であることが示唆されている。また、腸炎に対する乳酸菌の作用は以前から報告されており、炎症性腸疾患に対する臨床試験がヨーロッパでは既に行われている (Joos *et al.*, 2006)。特に、lactobacilli や bifidobacteria といった乳酸菌は、プロバイオティクスとして多くの研究が行われ、当研究室においてもプロバイオティクス乳酸菌の機能性を報告してきた (Miyachi *et al.*, 2013)。しかしながら、その分子メカニズムまでは明確に明

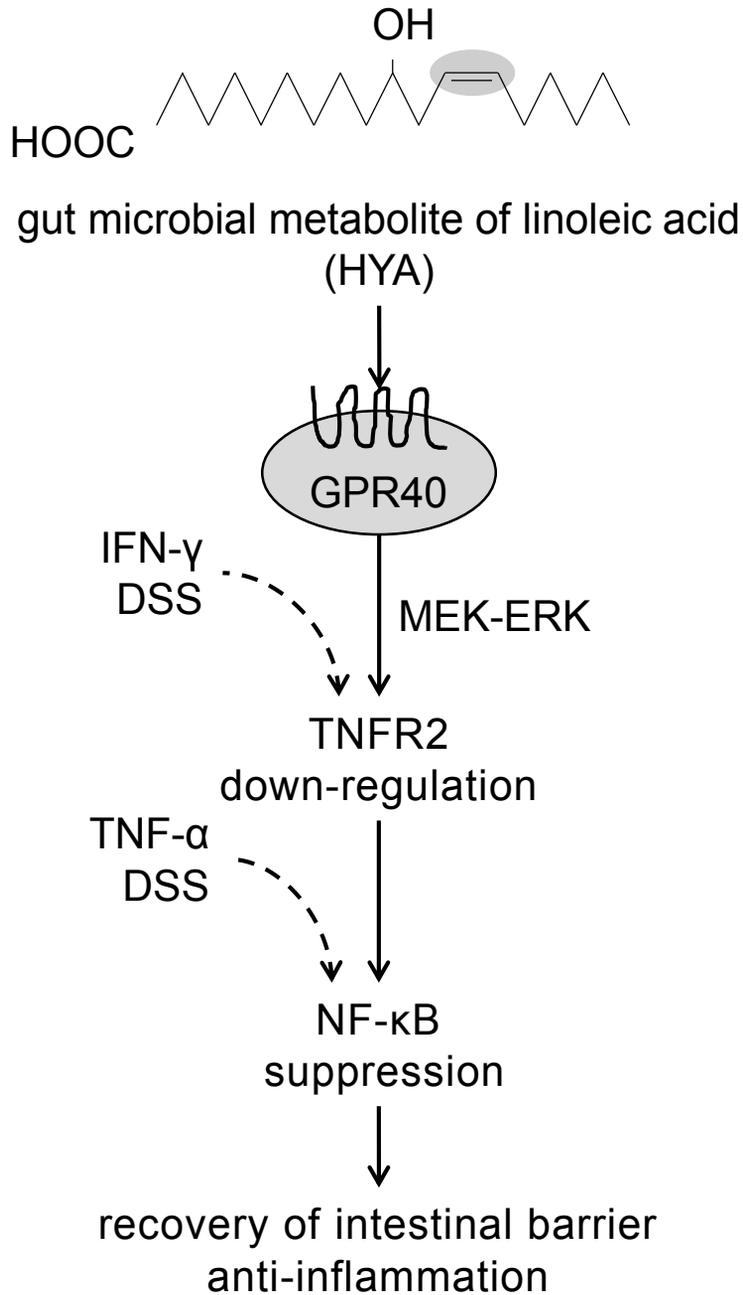
らかにされておらず、プロバイオティクス乳酸菌の作用が宿主側にどのように寄与しているのか、すなわち、宿主との相互作用までは不明なままであった。そこで、本研究では、腸内細菌代謝産物である HYA の DSS 誘導性腸炎モデルマウスに対する作用を検証した。DSS 誘導性腸炎モデルマウスに HYA を継続的に摂取させることで、種々の腸炎症状（体重減少、大腸長の委縮、糞便スコアや上皮損傷）を改善した (Figure 4-1)。さらに、Caco-2 細胞を用いた評価系で観察された TJ 関連因子の発現制御も確認できたことから、HYA は DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおいても、腸管バリアを保護する作用を有することが明らかとなった (Figure 4-2)。また、興味深いことに、DSS 誘導性腸炎モデルマウスで増加した腸管上皮細胞の TNFR2 発現も同様に制御しており、その下流である NF- $\kappa$ B 経路の活性化も抑制した (Figure 4-3, Figure 5)。炎症性腸疾患のような腸炎患者の治療薬の一つとして、TNF- $\alpha$  の中和抗体が臨床試験においても用いられており、TNF- $\alpha$  の制御が治療戦略として期待されている (Baert *et al.*, 2003)。一方、本研究における知見は、TNF- $\alpha$  産生の制御ではなく、その受容体側の発現を制御することで、過剰な炎症性シグナルの惹起を抑制しており、これまでにない新たな炎症性疾患の治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

#### 4 まとめおよび今後の展望

HYA は腸内細菌、特に乳酸菌が食事脂質を代謝して産生しているという点であり、薬剤とは異なり、継続的に摂取しても副作用などの問題も少ないことが期待される。さらに、投与した HYA の体内動態、作用組織などの解明にも着手し始めており、内因性の HYA は糞便中に大量に含まれていることも確認されている (data not shown)。また、外因性の HYA、すなわち、投与した HYA の体内動態も、小腸から大腸、そして糞便、さらには血中にも移行することも明らかにしており、全身性での作用も期待できる (data not shown)。実際に、このような HYA を含めた腸内細菌代謝産物が脂肪酸合成・脂質代謝制御 (Goto *et al.*, 2015)や自然免疫制御 (Bergamo *et al.*, 2014)に寄与することも報告されている。このように、近年、腸内細菌叢と宿主のクロストークが盛んに取り上げられており、『腸内細菌学』としての新たな分野が確立されつつある。様々な要因 (ス

ストレス、加齢、アルコール・喫煙、食生活など)で腸内細菌叢の異常 (Dysbiosis)は引き起こされるが、その結果として、腸管での炎症惹起に留まらず、アルコール性肝障害、肥満、アトピー性皮膚炎、喘息や精神疾患など全身の様々な局所・臓器で起こり得る疾患と関連することが明らかとなっている。このような疾患は、Dysbiosis に伴う腸管バリア機能の破綻、その後のエンドトキシンの体内への過剰な侵入が全身性疾患の発症や悪化に寄与しており、腸内細菌叢のバランス、腸管バリア機能および種々の疾患の発症は、密接に関連していると考えられている。今後、腸内細菌叢を解析するメタゲノミクスに留まらず、トランスクリプトミクスやメタボロミクスを統合したマルチオミクスの解析手法を活用し、腸管内を網羅的に明らかにすることが重要になると考えられる。

以上のように、本研究は、腸内細菌代謝産物というこれまでにない食品由来成分が腸炎抑制作用と、その分子メカニズムを明らかにし、さらに、食品としての付加価値を持ちつつ炎症性疾患に対する予防・治療の一助になる可能性が期待できる。また、これら代謝産物群は宿主の生体内に一定量、存在することから、食-腸内細菌叢を介した宿主の恒常性維持に(腸管バリア機能維持を含めた)何らかの生理的役割を担っており、その解明が期待される。



**Figure 5. Schematic showing the association between the barrier recovering activity of HYA and GPR40 signaling.**

## 参考文献

- Al-Sadi R, Boivin M and Ma T, Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009. **14**: 2765-2778
- Al-Sadi R, Ye D, Said HM *et al.*, Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 $\beta$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med*. 2011. **15**(4): 970-982.
- Amasheh M, Fromm A, Krug SM *et al.*, TNF $\alpha$ -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF $\kappa$ B signaling. *J Cell Sci*. 2010. **123**(Pt 23): 4145-4155.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T *et al.*, Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 2011. **331**(6015): 337-341.
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K *et al.*, Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013. **500**(7461): 232-236.
- Atarashi K, Tanoue T, Ando M *et al.*, Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell*. 2015. **163**(2): 367-380.
- Atreya R, Zimmer M, Bartsch B *et al.*, Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14<sup>+</sup> macrophages. *Gastroenterology*. 2011. **141**(6): 2026-2038.
- Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M *et al.*, Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr*. 2013. **143**(6): 827-834.
- Baert F, Noman M, Vermeire S *et al.*, Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003. **348**(7): 601-608.
- Bergamo P, Gogliettino M, Palmieri G *et al.*, Conjugated linoleic acid protects against gliadin-induced depletion of intestinal defenses. *Mol Nutr Food Res*. 2011. **55** Suppl 2: S248-S256.

- Bergamo P, Luongo D, Miyamoto J *et al.*, Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, associated with improved antioxidant/detoxifying defences. *J Funct Foods*. 2014. **11**: 192-202.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD *et al.*, Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 2003. **52**(3): 439-451.
- Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR *et al.*, Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest*. 2006. **86**(2): 191-201.
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL *et al.*, The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 2003. **278**(13): 11303-11311.
- Burant CF, Viswanathan P, Marcinek J *et al.*, TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2012. **379**(9824): 1403-1411.
- Chen Y, Zhang HS, Fong GH *et al.*, PHD3 stabilizes the tight junction protein occludin and protects intestinal epithelial barrier function. *J Biol Chem*. 2015. **290**(33): 20580-20589.
- Chong SZ, Tan KW, Wong FH *et al.*, CD8 T cells regulate allergic contact dermatitis by modulating CCR2-dependent TNF/iNOS-expressing Ly6C<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> monocytic cells. *J Invest Dermatol*. 2014. **134**(3): 666-676.
- Clayburgh DR, Rosen S, Witkowski ED *et al.*, A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability. *J Biol Chem*. **2004**. 279(53): 55506-55513.
- Dai C, Zhao DH and Jiang M, VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier *in vivo* and *in vitro* via the p38 and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2012. **29**(2): 202-208.
- Edfalk S, Steneberg P and Edlund H, Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. 2008. **57**(9): 2280-2287.

- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA *et al.*, The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 1998. **273**(45): 29745-29753.
- Fischer A, Gluth M, Pape UF *et al.*, Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- $\alpha$  on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013. **304**(11): G970-G979.
- Fujita T, Matsuoka T, Honda T *et al.*, A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. *J Invest Dermatol.* 2011. **131**(8): 1660-1667
- Fujiwara K, Maekawa F and Yada T, Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005. **289**(4): E670-E677.
- Fukuda S, Toh H, Hase K *et al.*, *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011. **469**(7331): 543-547.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S *et al.*, Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013. **504**(7480): 446-450.
- Ghosh S, DeCoffe D, Brown K *et al.*, Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One.* 2013. **8**(2): e55468.
- Goldsmith ZG and Dhanasekaran DN, G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene.* 2007. **26**(22): 3122-3142.
- Goto T, Kim YI, Furuzono T *et al.*, 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. **459**(4): 597-603.
- Günzel D, Zakrzewski SS, Schmid T *et al.*, From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci.* 2012. **1257**: 142-151.

- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T *et al.*, Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005. **11**(1): 90-94.
- Heller F, Florian P, Bojarski C *et al.*, Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005. **129**(2): 550-564.
- Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y *et al.*, Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. **103**(30): 11276-11281.
- Hung TV and Suzuki T, Dietary fermentable fiber reduces intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr.* 2016. **146**(10): 1970-1979.
- Huttenhower C, Kostic AD and Xavier RJ, Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity.* 2014. **40**(6): 843-854.
- Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O *et al.*, Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature.* 2012. **483**(7389): 350-354.
- Itoh M, Furuse M, Morita K *et al.*, Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999. **147**(6): 1351-1363.
- Itoh S and Yurimoto H, Contemporaneous formation of chondrules and refractory inclusions in the early Solar System. *Nature.* 2003. **423**(6941): 728-731.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M *et al.*, Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 2003. **422**(6928): 173-176.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N *et al.*, Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009. **139**(3): 485-498.
- Jarry A, Bossard C, Droy-Dupré L *et al.*, Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN- $\gamma$  axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease. *Lab Invest.* 2015. **95**(10): 1207-1217.

- Jin Y and Blikslager AT, Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier dysfunction via occludin endocytosis during anoxia/reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016. 311 (6): C996-C1004.
- Joos S, Rosemann T, Szecsenyi J *et al.*, Use of complementary and alternative medicine in Germany - a survey of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Complement Altern Med*. 2006. **6**: 19.
- Juuti-Uusitalo K, Klunder LJ, Sjollem KA *et al.*, Differential effects of TNF (TNFSF2) and IFN- $\gamma$  on intestinal epithelial cell morphogenesis and barrier function in three-dimensional culture. *PLoS One*. 2011. **6**(8): e22967.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ *et al.*, Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011. **474**(7351): 307-317.
- Kimura I, Inoue D, Maeda T *et al.*, Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. **108**(19): 8030-8035.
- Kimura I, Ozawa K, Inoue D *et al.*, The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013. **4**: 1829.
- Kishino S, Takeuchi M, Park SB *et al.*, Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. **110**(44): 17808-17813.
- Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T *et al.*, Dietary  $\omega$ 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep*. 2015. **5**: 9750.
- Li Q, Zhang Q, Wang M *et al.*, n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*. 2008. **45**(5): 1356-1365.

- Macia L, Tan J, Vieira AT *et al.*, Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun.* 2015. **6**: 6734.
- Mankertz J and Schulzke JD, Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007. **23**(4): 379-383.
- Martinasso G, Saracino S, Maggiora M *et al.*, Conjugated linoleic acid prevents cell growth and cytokine production induced by TPA in human keratinocytes NCTC 2544. *Cancer Lett.* 2010. **287**(1): 62-66.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A *et al.*, Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009. **461**(7268): 1282-1286.
- McNelis JC, Lee YS, Mayoral R *et al.*, GPR43 Potentiates  $\beta$ -Cell Function in Obesity. *Diabetes.* 2015. **64**(9): 3203-3217.
- Miyauchi E, O'Callaghan J, Buttó LF *et al.*, Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012. **303**(9): G1029-G1041.
- Miyauchi E, Ogita T, Miyamoto J *et al.*, *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One.* 2013. **8**(11): e79735.
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H *et al.*, Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2002. **122**(1): 134-144.
- Murase R, Sato H, Yamamoto K *et al.*, Group X Secreted Phospholipase A2 Releases  $\omega$ 3 Polyunsaturated Fatty Acids, Suppresses Colitis, and Promotes Sperm Fertility. *J Biol Chem.* 2016. **291**(13): 6895-6911.
- Nagy-Szakal D, Mir SA, Harris RA *et al.*, Loss of n-6 fatty acid induced pediatric obesity protects against acute murine colitis. *FASEB J.* 2015. **29**(8): 3151-3159.

Nakanishi Y, Sato T and Ohteki T *et al.*, Commensal gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol.* 2015. **8**(1): 152-160.

Nanthirudjanar T, Furumoto H, Zheng J *et al.*, Gut microbial fatty acid metabolites reduce triacylglycerol levels in hepatocytes. *Lipids.* 2015. **50**(11): 1093-1102.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ *et al.*, GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* 2010. **142**(5): 687-698.

Oh DY and Olefsky JM, Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab.* 2012. **15**(5): 564-565.

Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T *et al.*, Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009. **296**(4): G850-G859.

Pearson C, Uhlig HH and Powrie F, Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol.* 2012. **33**(6): 289-296.

Perrier C and Corthésy B, Gut permeability and food allergies. *Clin Exp Allergy.* 2011. **41**(1): 20-28.

Petecchia L, Sabatini F, Usai C *et al.*, Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway. *Lab Invest.* 2012. **92**(8): 1140-1148.

Piche T, Barbara G, Aubert P *et al.*, Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut.* 2009. **58**(2): 196-201.

Poritz LS, Harris LR 3rd, Kelly AA *et al.*, Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig Dis Sci.* 2011. **56**(10): 2802-2809.

Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H *et al.*, Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. **110**(11): 4410-4415.

Powell N, Lo JW, Biancheri P *et al.*, Interleukin 6 Increases Production of Cytokines by Colonic Innate Lymphoid Cells in Mice and Patients With Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology.* 2015. **149**(2): 456-467.

- Reifen R, Karlinsky A, Stark AH *et al.*,  $\alpha$ -Linolenic acid (ALA) is an anti-inflammatory agent in inflammatory bowel disease. *J Nutr Biochem.* 2015. **26**(12): 1632-1640.
- Ren W, Yin J, Wu M *et al.*, Serum amino acids profile and the beneficial effects of L-arginine or L-glutamine supplementation in dextran sulfate sodium colitis. *PLoS One.* 2014. **9**(2): e88335.
- Salim SY and Söderholm JD, Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011. **17**(1): 362-381.
- Samuel BS, Shaito A, Motoike T *et al.*, Effects of the gutmicrobiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. **105**(43): 16767-16772.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S *et al.*, Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2007. **357**(3): 228-238.
- Smith PM and Garrett WS, The gut microbiota and mucosal T cells. *Front Microbiol.* 2011. **2**: 111.
- Sonnenburg JL and Bäckhed F, Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016. **535**(7610): 56-64
- Struyf S, Gouwy M, Dillen C *et al.*, Chemokines synergize in the recruitment of circulating neutrophils into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* 2005. **35**(5): 1583-1591.
- Su L, Nalle SC, Shen L *et al.*, TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2013. **145**(2): 407-415.
- Suzuki M, Nagaishi T, Yamazaki M *et al.*, Myosin light chain kinase expression induced via tumor necrosis factor receptor 2 signaling in the epithelial cells regulates the development of colitis-associated carcinogenesis. *PLoS One.* 2014. **9**(2): e88369.
- Suzuki T, Yoshinaga N and Tanabe S, Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011. **286**(36): 31263-31271.

- Tang C, Ahmed K, Gille A *et al.*, Loss of FFA2 and FFA3 increases insulin secretion and improves glucose tolerance in type 2 diabetes. *Nat Med.* 2015. **21**(2): 173-177.
- Tolhurst G, Heffron H, Lam YS *et al.*, Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein coupled receptor FFAR2. *Diabetes.* 2012. **61**(2): 364-371.
- Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K *et al.*, Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014. **20**(2): 159-166.
- Turner JR, Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009. **9**(11): 799-809.
- Turner JR, Buschmann MM, Romero-Calvo I *et al.*, The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Semin Cell Dev Biol.* 2014. **36**: 204-212.
- Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC *et al.*, Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr.* 2011. **141**(5): 769-776.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G *et al.*, Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2013. **494**(7436): 185-194.
- Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F *et al.*, Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- $\beta$  autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity.* 2013. **38**(5): 1025-1037.
- Verdu EF, Galipeau HJ and Jabri B, Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015. **12**(9): 497-506.
- Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H *et al.*, Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut.* 2014. **63**(5): 744-752.
- Wang F, Schwarz BT, Graham WV *et al.*, IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology.* 2006. **131**(4): 1153-1163.

- Wang K, Han G, Dou Y *et al.*, Opposite role of tumor necrosis factor receptors in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *PLoS One*. 2012. **7**(12): e52924.
- Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M *et al.*, Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*. 2008. **88**(10): 1110-1120.
- Wesemann DR and Nagler CR *et al.*, The microbiome, timing, and barrier function in the context of allergic disease. *Immunity*. 2016. **44**(4): 728-738.
- Winer DA, Luck H, Tsai S *et al.*, The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. 2016, **23**(3): 413-426.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B *et al.*, Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007. **2**(3): 541-546.
- Yan Y, Jiang W, Spinetti T *et al.*, Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. 2013. **38**(6): 1154-1163.
- Ye D, Ma I and Ma TY, Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006. **290**(3): G496-504.
- You Y, Zhou C, Li D *et al.*, Sorting nexin 10 acting as a novel regulator of macrophage polarization mediates inflammatory response in experimental mouse colitis. *Sci Rep*. 2016. **6**: 20630.
- Zamarbide M, Etayo-Labiano I, Ricobaraza A *et al.*, GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. *Hippocampus*. 2014. **24**(7): 733-739.
- Zeng H and Chi H, Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol*. 2015. **1**: 3-12.

Zenhom M, Hyder A, Kraus-Stojanovic I *et al.*, PPAR $\gamma$ -dependent peptidoglycan recognition protein 3 (PGlyRP3) expression regulates proinflammatory cytokines by microbial and dietary fatty acids. *Immunobiology*. 2011. **216**(6): 715-724.

Zhang K, Chang Y, Shi Z *et al.*,  $\omega$ -3 PUFAs ameliorate liver fibrosis and inhibit hepatic stellate cells proliferation and activation by promoting YAP/TAZ degradation. *Sci Rep*. 2016. **6**: 30029.

Zhernakova A, Withoff S and Wijmenga C, Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2013. **9**(11): 646-659.

## 謝辞

本研究は、広島大学大学院生物圏科学研究科 鈴木卓弥先生の御指導のもとで遂行されました。心より厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、有益なる御指導・御助言を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 加藤範久先生、島本整先生、田辺創一先生（現、日清食品ホールディングス株式会社）、ならびに諸先生方に深く感謝致します。

また、研究協力を賜りました、木村郁夫先生（東京農工大学 大学院農学研究院）、小川順先生、岸野重信先生（京都大学 大学院農学研究科）、有田誠先生（理研 メタボローム研究チーム 兼 慶應義塾大学 薬学部）、ならびに Mauro Rossi 博士および Paolo Bergamo 博士 (National Research Council, Institute of Food Sciences, CNR)に御礼申し上げます。

さらに、日東薬品工業株式会社 研究開発本部 取締役本部長 北尾浩平様を始めとした関係者の皆様には、実験を遂行する上で、多大なる御助言を頂きましたことを、御礼申し上げます。

動物資源化学研究室の卒業生および在校生の皆様には、公私共に大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。最後に、研究生活を支えてくれた我が家族に感謝いたします。