

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 腸内細菌代謝産物の腸管保護作用に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学 専攻

学生番号 D142212

氏 名 宮本 潤基

第1章では本研究の背景、関連する研究のレビュー、および本研究の目的を記述した。

我々の腸管は「内なる外」とも呼ばれ、食品の消化吸收を司ると同時に食品抗原や細菌などに常に暴露されていることから、生体最大の免疫器官としても機能している。また、近年では、「腸内細菌学」の発展によって、腸管内での腸内細菌叢の全容とその機能性が明らかとなり、腸内細菌叢の変化が種々の疾患の発症・増悪（炎症性疾患、代謝性疾患や自己免疫疾患など）に寄与することが明らかになりつつある。しかしながら、このような腸内細菌叢の破綻が宿主側にどのように寄与しているのか、すなわち、宿主と腸内細菌との相互作用の分子メカニズムまでは不明なままであった。

遊離脂肪酸（短鎖、中鎖、長鎖）をリガンドとする細胞膜上の受容体として、新たな G タンパク質共役型受容体ファミリーが同定され、食事由来脂肪酸が単なるエネルギー源としてだけでなく、宿主に対するシグナル伝達物質として機能することが明らかとなった。食用油で不飽和脂肪酸に属する必須脂肪酸のリノール酸 (ω -6) や α -リノレン酸 (ω -3)、そして魚油の EPA (ω -3) や DHA (ω -3) のような長鎖脂肪酸は、長鎖脂肪酸受容体である GPR40 や GPR120 のリガンドとして作用することも明らかとなっている。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、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や腸管ホルモン分泌による代謝改善作用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、腸管ホルモン分泌に寄与することや皮膚炎症状の緩和作用など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。一方、このような食事脂質においても、 ω -6 脂肪酸の過剰摂取は炎症応答の促進やアレルギー応答の惹起に寄与することも示されている。興味深いことに、このような食事脂質に対して、腸内細菌が独自に有する代謝酵素により食事由来リノール酸から変換される新規脂肪酸代謝産物が見出され、その機能性・生理的意義の解明が期待されている。

本研究では、腸内細菌代謝産物群の一つである HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid) が GPR40-MEK-ERK 経路を介して腸管バリア保護作用を発揮することを明らかにした。本論文は、腸管上皮様株化細胞を用いた *in vitro* 試験と腸炎モデル動物を用いた *in vivo* 試験を行った研究をまとめたものである。

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述べた (Figure)。

腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用を検討するためにヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞を Transwell system に培養することで検討した。Caco-2 細胞を炎症性サイトカインである interferon- γ (IFN- γ)と tumor necrosis factor- α (TNF- α)で刺激することでバリア損傷を誘導した。腸管バリア機能の指標は、経上皮電気抵抗 (TER)、FITC-dextran 透過量および培養上清中の interleukin-8 (IL-8)の濃度で評価した。IFN- γ および TNF- α 刺激により TER の減少、FITC-dextran の透過量亢進および IL-8 産生の亢進が見られたが、HYA の添加によりそれぞれ有意に抑制された。一方、他の腸内細菌代謝産物群には、改善作用は確認されなかった。HYA の腸管バリア作用のメカニズムを解明するため、タイトジャンクション関連因子の発現量を解析した。その結果、炎症性サイトカインによって Occludin, Claudin-1 および MLCK 発現に変化が確認されたが、HYA はそれらを正常レベルにまで改善した。従って、HYA は腸管バリア保護作用を有することが示された。

第 3 章では、HYA の腸管バリア保護作用におけるシグナル解析について記述した。

HYA の腸管バリア保護作用のメカニズムをさらに検討するために、炎症促進シグナルである NF- κ B に着目した。その結果、炎症性サイトカインによって、NF- κ B p65 の発現量と I κ B α (NF- κ B の阻害タンパク質) のリン酸化がそれぞれ亢進したが、HYA の添加によってそれらが正常レベルにまで改善した。また、IFN- γ を Caco-2 細胞に作用させることで、TNF- α の受容体である TNF 受容体 (TNF receptors; TNFRs)の発現増加を誘導することが知られており、実際に、TNFR1 と TNFR2 の発現の増加を確認した。一方、HYA は TNFRs (特に、TNFR2) の発現を有意に改善した。従って、HYA は腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御し、NF- κ B 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唆された。

次なる検討として、HYA の受容体を明らかにすることを目的に解析を行った。長鎖脂肪酸受容体として同定されている GPR40、GPR120 や PPAR γ 、あるいは短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸の受容体の発現を解析した結果、HYA を処理することで GPR40 の発現量が亢進することが明らかとなった。GPR40 はヘテロ 3 量体の G タンパク質の α サブユニットとして Gq に結合し、細胞内カルシウム[Ca²⁺]_iを流入するため、Caco-2 細胞にリノール酸、HYA あるいは HYB を作用さようさせることで[Ca²⁺]_iを確認した。その結果、リノール酸と HYA で[Ca²⁺]_iの流入が確認され、その作用は HYA の強いことが示された。そこで、GPR40 強制発現 HEK293 細胞を用いて[Ca²⁺]_i アッセイを検討結果、HYA は GPR40 に対して高い親和性を示し、その作用は内因性リガンドであるリノール酸よりも顕著であった。また、GPR40 の腸管バリアへの影響を検討するために、GPR40 antagonist である GW1100 を用いて検討した。その結果、GW1100 存在下では、HYA の腸管バリア機能改善作用が消失し、TNFR2 発現制御作用も消失した。さらに、GPR40 シグナルの腸管バリアへの寄与を明らかにするために、MEK-ERK 経路に着目した。Gq タンパク質と共役した GPCRs は、[Ca²⁺]_iの流入による MEK-ERK 経路を活性化する。HYA は濃度依存的、処理時間依存的に ERK のリン酸化を促進しており、そのリン酸化レベルは、GW1100 あるいは MEK inhibitor である U0126 存在下で消失した。加えて、U0126 存在下でも、HYA の腸管バリア保護作用および TNFR2 発現制御作用も消失した。すなわち、HYA は腸管上皮細胞における GPR40-MEK-ERK 経路を介して、TNFR2 発現を制御することで、腸管バリア保護作用を発揮することが示された。

第 4 章では、HYA の腸炎改善作用について述べた。

BALB/c マウスに 3.5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS)を 5 日間自由飲水させ、腸炎モデルマウスを作製した。DSS 投与開始 5 日前から解剖までの全 10 日間、毎日 HYA (100 nmol/mouse/day)を経口投与で与えた。腸炎症状は、体重減少、糞便スコア、大腸萎縮および組織学的スコアにより評価した。DSS 投与群では、マウスの体重減少、糞便スコアの悪化、大腸の顕著な萎縮および大腸上皮の損傷が確認された。一方、HYA 投与群ではこれらの症状を有意に改善した。また、タイトジャンクション関連因子の発現を検討した結果、DSS 投与群で観察された Occludin, Claudin-1 および MLCK の発現異常を、HYA 投与群は有意に改善した。ま

た、腸管における TNF 受容体の発現を解析した結果、DSS 投与群で増加した TNF 受容体の発現を、HYA 投与群は有意に正常レベルにまで改善した（特に TNFR2）。さらに、フローサイトメトリーにて腸管上皮細胞に発現する TNFR2 の割合を検討した結果、HYA 投与群で TNFR2 陽性腸管上皮細胞の割合も減少していた。さらに、免疫蛍光染色で、腸管組織の NF- κ B p65 陽性細胞を検出した結果、DSS 投与群で増加した NF- κ B p65 陽性細胞の割合を、HYA 投与群は有意に改善した。すなわち、HYA は腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御することで、腸管バリア保護作用を発揮し、DSS 誘導性腸炎モデルマウスの症状を改善することが示された。

最後に第 5 章では、本研究を総括し、今後の展望について述べた。

本研究では、新規の腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用とそのメカニズムを明らかにした。本成果は、腸炎疾患のみならず、腸管バリア破綻に起因する様々な疾患の予防・緩和に寄与する有用な機能性食品の開発に繋がると考えられる。また、GPR40 は腸管ホルモン分泌やインスリン分泌などの代謝改善作用に関する報告が主であったが、腸管バリアに寄与する新たな知見を提供した。今後、*in vivo* における GPR40 の腸管バリアへの影響を検討するとともに、HYA の生理学的役割を検討する必要がある。

以上のように、本研究は腸内細菌代謝産物の腸炎抑制メカニズムを解明したのみにとどまらず、将来的には腸管バリアの破綻に起因する疾患の予防・治療に寄与すると考えられる。

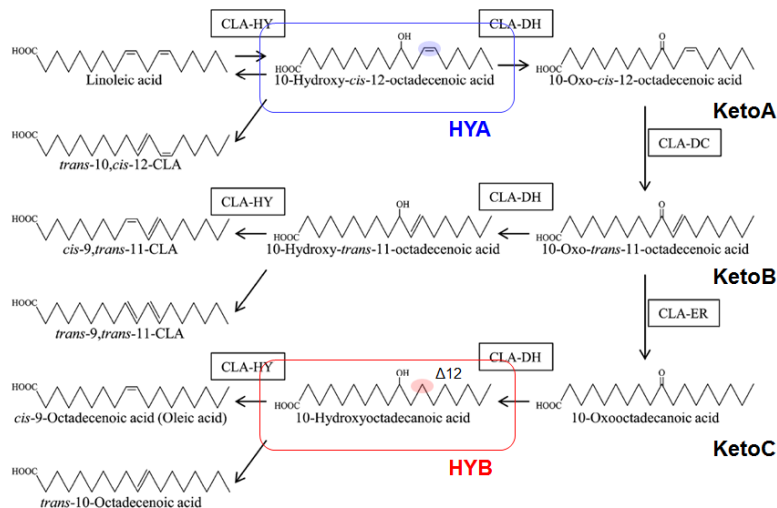


Figure. Polyunsaturated fatty acid-metabolism pathway (cited from Kishino *et al.*, 2013).