

氏名	さかもと だいすけ 坂本 大輔
学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1880号
学位授与の日付	令和3年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	Lactobacillus plantarum D2905 株による Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 福岡大学 教授 鹿志毛 信広 (副査) 福岡大学 教授 藤岡 稔大 福岡大学 教授 本田 伸一郎

内容の要旨

【緒言】

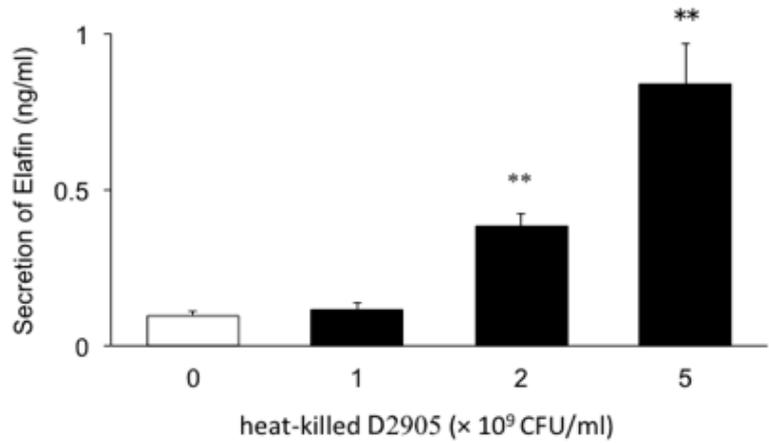
乳酸菌はヒトに対して有益な効果を持ち、整腸作用の他にも様々な生理活性作用を有している。乳酸菌の生理活性作用を担う成分として生きた乳酸菌だけでなく、乳酸菌の代謝産物や細胞壁成分、ゲノム DNA などの菌体成分の関与も明らかにされている。

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) は腸管内で慢性的な炎症を繰り返す難病指定の疾患である。これまでに乳酸菌の抗炎症作用を持つ成分に着目した IBD 治療の研究が行われている。近年、IBD の病態に関する研究でプロテアーゼ阻害剤が着目されている。elafin は、健常人の腸管粘膜で分泌されるエラスターゼ阻害剤もその1つであり、腸管内の炎症に対して保護作用を示すことが分かっている【1】。

Lactobacillus plantarum D2905 株はクルマエビの腸管から単離された乳酸菌であり、低温増殖能や抗菌活性作用、菌体外多糖類 (Exopolysaccharide: EPS) 高産生能といった特徴的な性状を有している。本研究ではこの D2905 株の菌体成分 (ゲノム DNA、ゲノム DNA 由来のオリゴ DNA (ODN) および EPS) の elafin 産生促進作用について、ヒト結腸癌由来細胞株の Caco-2 細胞を用いて検討を行った。

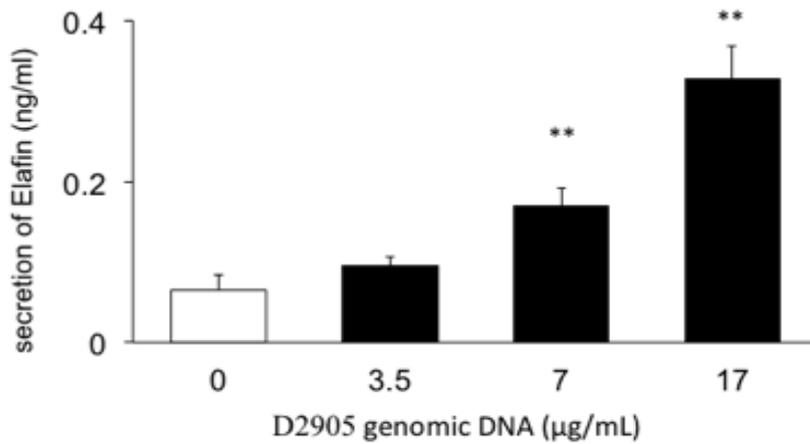
1. D2905 株のゲノム DNA の elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株の生菌体と熱処理（65°C、10分）した死菌体を Caco-2 細胞に曝露して elafin の分泌を ELISA 法を用いて測定したところ、死菌体の場合に elafin の分泌を有意に促進した（図 1）。D2905 株の死菌体の elafin 分泌促進作用に、熱処理の過程で細胞外に漏出した DNA が関与しているのではないかと予想し、D2905 株から抽出したゲノム DNA を Caco-2 細胞に曝露したところ elafin の分泌を時間および濃度依存的に促進した（図 2-1, 2）。



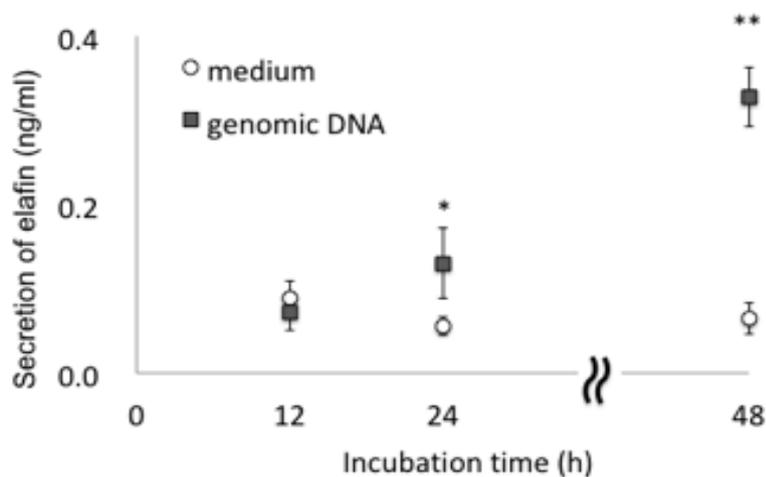
**P<0.01 [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 1. D2905 株の死菌体と elafin 分泌促進作用の関係



**P<0.01 [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 2-1. D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞に対する elafin 分泌促進作用



*P<0.05, **P<0.01 vs medium [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

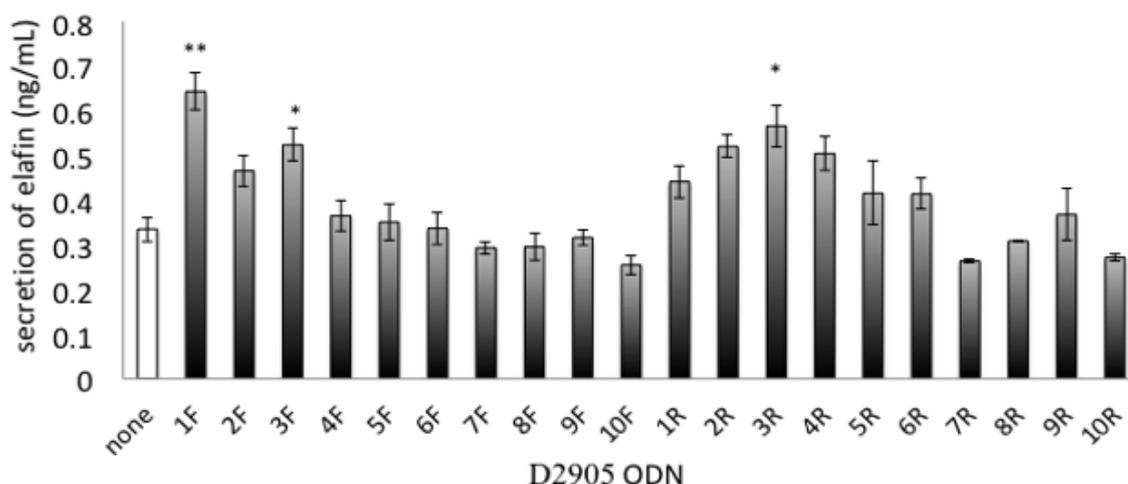
図 2-2. D2905 株ゲノム DNA の曝露時間と elafin 分泌促進作用の関係

2. D2905 株のゲノム DNA に含まれる elafin 分泌促進作用を持つ ODN の特定

D2905 株からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *Sau3AI* で 100~1,000 bp の長さに断片化し、プラスミド pUC19 にクローニングして 100 個のゲノム DNA ライブラリーを作製した。作製した 100 個のプラスミド DNA を Caco-2 細胞に曝露し、elafin の分泌作用を比較したところ、9 種類のプラスミドに促進作用が見つかった。これらのプラスミド上のゲノム由来 DNA 部位の塩基配列を決定し、その塩基配列から 7-8 塩基の共通配列 20 個 (1~10F, R) を ODN 候補として選出した (表. 1)。この 20 個の ODN 候補のうち 3 個の ODN (1F, 3F, 3R) が、有意に elafin の分泌促進作用を示した (図 3)。

表 1. elafin 分泌誘導作用を示す ODN 候補

ODN	Sequence (5'→3')	ODN	Sequence (5'→3')
1F	GAAGGTAA	1R	TTACCTTC
2F	GGTTGCG	2R	CGCAACC
3F	ATTTGCT	3R	AGCAAAT
4F	TATAAAT	4R	ATTTATA
5F	TATTTGTT	5R	AACAAATA
6F	ATTGGTTG	6R	CAACCAAT
7F	GTTGCGC	7R	GCGCAAC
8F	CTTCTTGT	8R	ACAAGAAG
9F	GAAACGG	9R	CCGTTTC
10F	AATTGTT	10R	AACAATT

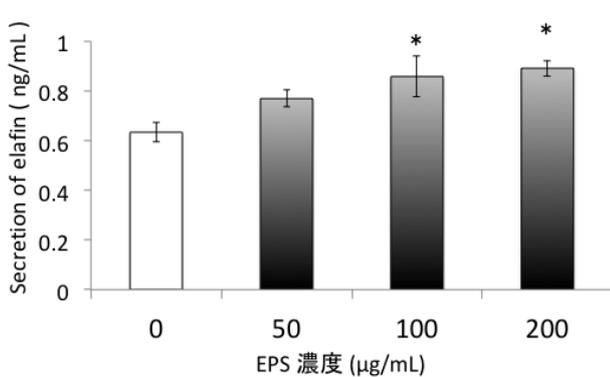


*p<0.05, **p<0.01 vs None [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

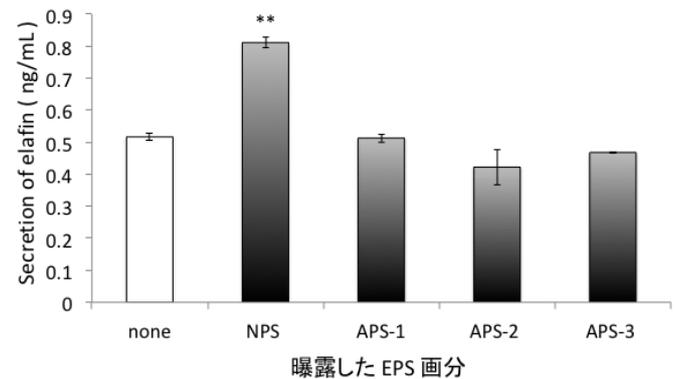
図 3. elafin 分泌作用を示す ODN

3. D2905 株が産生する EPS の elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用を検討した。D2905 株から抽出した EPS を Caco-2 細胞に曝露して elafin の分泌作用を確認したところ 100 µg/mL の濃度で elafin の分泌を有意に促進した (図 4)。D2905 株が産生する EPS を抽出および陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離・精製したところ、NPS と酸性度の異なる 3 種類の APS が存在した。分画した NPS および APS の elafin 分泌促進作用を検討したところ、NPS のみに elafin の分泌促進作用が認められた (図 5)。



* $p < 0.05$ vs control One-way ANOVA followed by Tukey's test



** $p < 0.01$ vs none [One-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 4. D2905 株が産生する EPS の elafin 分泌促進作用

図 5. 各 EPS 画分の Caco-2 細胞に対する elafin 分泌促進作用の検討

【総括】

本研究ではクルマエビの腸管から単離された乳酸菌 D2905 株の菌体成分（ゲノム DNA、ゲノム DNA 由来のオリゴ DNA (ODN) および EPS）の elafin の分泌促進作用をヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞を用いて検討した。

第 1 章では、D2905 株のゲノム DNA が、時間および濃度依存的に Caco-2 細胞から elafin の分泌を促進させることを明らかにした。さらに D2905 株のゲノム DNA に含まれている elafin の分泌を促進に関与する塩基配列を決定し、elafin の分泌を促進する 3 種類の ODN (5'-GAAGGTAA-3'、5'-ATTTGCT-3'、5'-AGCAAAT-3') を特定した。これまでも乳酸菌のゲノム DNA 由来の ODN が抗炎症作用を示す報告はあるが【2, 3】、今回、特定した ODN はそれらと異なる塩基配列を有していた。

第 2 章では、D2905 株が産生する EPS が 100 µg/mL の濃度で elafin の分泌を促進することを明らかにした。また、EPS は、1 種類の NPS と 3 種類の APS での構成が確認され、このうち、NPS のみに elafin の分泌促進作用が認められたので、NPS が EPS の elafin 分泌促進作用の本体であることを明らかにした。

以上の結果、D2905 株由来の菌体成分である 3 種類の ODN と NPS には、Caco-2 細胞において抗炎症作用を有する elafin の分泌促進作用を持つことが示された。腸管における elafin 分泌は抗炎症作用に関与するので、これらの菌体成分は、IBD などの炎症性腸疾患に対する新規抗炎症薬としての応用が期待される。

審査の結果の要旨

乳酸菌は自然界に広く分布し、宿主に有益な作用を持つことから医薬品や発酵食品などとして幅広く利用されてきた。近年、乳酸菌の生理活性作用が着目され、乳酸菌の生菌体のみでなく死菌体も生理活性作用を示し、さらに乳酸菌の菌体成分や代謝産物も生理活性作用を有することが明らかになっている。乳酸菌が示す生理活性作用の1つに抗炎症作用があり、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) といった腸内の炎症疾患に乳酸菌を利用する研究の報告もある。本論文の研究で使用されている *Lactobacillus plantarum* D2905 株(以下、D2905 株) はクルマエビの腸管から単離された乳酸菌であり、海洋生物の腸管に生息しているため、低温増殖能を有するほか、抗菌活性能や菌体外多糖類 (Exopolysaccharide: EPS) 高産生能などの特徴的な性状を有している。EPS は主に菌体を周辺環境のストレスから自身を守る働きをしており、菌体に付着、もしくは遊離した状態で存在している。近年、乳酸菌の産生する EPS 自体の生理活性作用に着目した研究が行われており、例えば、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株が、中性多糖 (NPS) と酸性多糖 (APS) を菌体外に産生し、そのうち APS がマウスの脾臓細胞およびパイエル板細胞の分裂促進作用を示すことや、さらに IFN- γ の産生を促進してナチュラルキラー細胞を活性化することで抗インフルエンザウイルス作用を示すことが報告されている。EPS を産生する乳酸菌株は数多く存在するが、菌株によって産生する EPS の特徴や生理活性作用が異なっている。しかし、D2905 株が産生する EPS の生理活性作用については未だ解明されていない。

近年、プロテアーゼやその阻害剤が IBD の病態に関与するという報告がなされており、健康人の腸粘膜で産生されるエラスターゼ阻害剤の elafin もその1つである。elafin は抗炎症作用、抗菌作用を有しており、炎症から腸管内を保護する働きを持っている。また、IBD 患者の腸管内では elafin の分泌が減少しているとの報告もあり、この elafin の分泌が IBD の治療に応用できる可能性がある。しかし、乳酸菌による腸管粘膜からの elafin 分泌促進作用の報告は未だなされていない。

以上のような背景から、本論文では、クルマエビの腸管から単離された乳酸菌 D2905 株菌体とそのゲノム DNA および D2905 株が産生する EPS を用いて Caco-2 細胞からの抗炎症性ペプチドである elafin の分泌促進作用の検討を行うことで、乳酸菌およびその菌体成分を IBD の予防・治療薬へ応用するための基礎研究を展開させている。

第1章では、D2905 株による Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を検討した結果、65°C、10 分間の熱処理で死滅させた死菌体のみで elafin 分泌促進作用を確認し、その原因の1つが熱処理により菌体外に漏出した D2905 株のゲノム DNA であることを菌体の DNase I 処理によって明らかにしている。また、ゲノム DNA によるその作用がパターン認識受容体の1つである TLR9 を介して生じていることを RNAi 法により明らかにしている。また、elafin 分泌促進作用に関与する D2905 株ゲノム DNA 由来のデオキシリボシクレオチド (ODN) の特定を行い、D2905 株のゲノム DNA 上に存在する 3 種類の ODN (5' -

GAAGGTAA-3'、5' - ATTTGCT-3'、5' - AGCAAAT-3') の存在を明らかにし、実際に、この ODN が elafin 分泌促進作用を有することを明らかにしている。

第 2 章では、D2905 株が産生する EPS の elafin の分泌促進作用の検討を行っている。まず D2905 株の培養菌体から EPS の精製を行い、精製した EPS を用いて Caco-2 細胞から elafin 分泌促進作用を検討して EPS に elafin の分泌促進作用があることを明らかにしている。次に EPS を陰イオン交換樹脂を用いて分画精製し、D2905 株が産生する EPS が、1 種類の NPS と 3 種類の APS から構成されていること明らかにしている。また、分画した NPS 画分と APS 画分の elafin の分泌促進作用の検討を行った結果、NPS のみが Caco-2 細胞からの elafin の分泌を促進することを明らかにしている。

本論文で特定された D2905 株ゲノム DNA 由来の 3 種類の ODN (5' - GAAGGTAA-3'、5' - ATTTGCT-3'、5' - AGCAAAT-3') および D2905 株が産生する NPS は、腸管粘膜内で産生され、腸管内の炎症の防御に関与している抗炎症ペプチドの 1 つである elafin の分泌促進作用により腸管内炎症を抑える新たな IBD 治療薬の開発へと応用できると期待される。

以上、今後、詳細な elafin 分泌促進作用のメカニズムの解明は必要であるが、本論文の結果は新しい知見を含み、今後の医薬品開発に貢献できることが期待され、薬学領域の博士学位論文として十分に評価できる。また、論文業績および公聴会における申請者の質疑応答能力も十分であったので、本論文は、博士（薬学）の学位を授与するのに適切であると判定された。