

## 一般演題 A-1

レンチナンは腸管上皮細胞のTNFR1の発現制御によって  
腸管炎症を抑制するLentinan Inhibits Gut Inflammation through Modulation of  
TNFR1 Expression in Intestinal Epithelial Cells○西谷洋輔<sup>1</sup>, 水野雅史<sup>2</sup><sup>1</sup>神戸大学自然科学系先端融合研究環, <sup>2</sup>農学研究科

【目的】レンチナンはシイタケ由来の $\beta$ -1,3-1,6-グルカンである。これまでに我々は、DSS誘導性腸炎マウスモデルにおけるレンチナンの炎症抑制効果を明らかにしている。さらに、マクロファージ様RAW264.7細胞と小腸上皮様Caco-2細胞の共培養により確立した*in vitro*腸炎モデルにおいて、レンチナンの管腔側への前処理が、RAW264.7細胞からのTNF- $\alpha$ 産生に影響を与えることなくCaco-2細胞のIL-8 mRNA発現およびNF- $\kappa$ Bの核内移行を抑制することを見出した。また、ウェスタンブロット、定量的RT-PCR, および免疫染色を用いた解析から、レンチナン処理によりCaco-2細胞においてTNFR1の発現抑制および局在変化が引き起こされることを見出した。また、TNFR1の細胞内局在変化は $\beta$ -グルカンの構造のうち $\beta$ -1,6分岐が必要であること、さらにエンドサイトーシス阻害剤を用いた検討からクラスリン依存性のエンドサイトーシスが関係していることを明らかにしている。しかしながら、レンチナン処理による*in vivo*におけるTNFR1発現への影響は明らかとなっていない。そこで本研究では、レンチナンによるTNFR1の発現制御について*in vivo*実験系を用いて検討した。

【方法】*in vivo*での腸管上皮細胞におけるレンチナンの影響を調べるために、マウス小腸を用いたloop assayを行った (n = 3)。麻酔下のマウス回腸に2箇所の子結紮部位を設け、レンチナン溶液 (1 mg/ml) または滅菌蒸留水を100  $\mu$ l注入した。1時間静置した後、屠殺して結紮部位を採取し、上皮を剥離してtotal RNAの抽出を行った。TNFR1 mRNA発現は定量的RT-PCR法にて調べた。

【結果】マウス腸管上皮細胞におけるTNFR1 mRNA発現は、滅菌蒸留水を処理したときと比較してレンチナン処理によって有意に低下した (p < 0.01)。また、その阻害率はおよそ30%であった。

【考察】本研究により、*in vitro*腸炎モデルでこれまでに得られたレンチナンのTNFR1発現抑制作用が、*in vivo*においても同様に確認された。今後は、レンチナンがどのように腸管上皮細胞に認識されているのかについて研究を行う。

## 一般演題 A-2

ヒト腸管モデルを用いた *Bacillus subtilis* C-3102 株が  
腸内菌叢に与える影響の評価Evaluation of Spore Forming *Bacillus subtilis* C-3102 on Microbiota  
in a Dynamic Model of Gastrointestinal Tract Simulating Human Conditions○畑中美咲<sup>1</sup>, 中村康則<sup>1</sup>, Koen Venema<sup>2</sup>, Annet J.H. Maathuis<sup>2</sup>, 室田一也<sup>1</sup>, 山本直之<sup>1</sup><sup>1</sup>カルピス株式会社 発酵応用研究所,<sup>2</sup>Research group Pharmacokinetics & Human Studies, TNO Earth,  
Environmental and Life Sciences, The Netherlands

【目的】これまでの我々の検討から, *Bacillus subtilis* C-3102株の芽胞を動物に投与することで, 有用菌が増加するなどの腸内菌叢の変化, 増体効果などのさまざまな有用性が確認されている. 一方, ヒトの腸管内での変化や腸内菌叢に与える影響に関しては未解明な点が多く, 今後のヒトへの利用を考える際には基礎的知見の蓄積が必要である. 一般に, *Bacillus*属の芽胞は増殖に適した環境下では発芽し, 栄養細胞に変化する. その際, 様々な有用物質を分泌することが示唆されており, 本試験では, 今後ヒトでのC-3102株の働きを解明することを念頭におき, ヒト腸管モデルを用いてヒト体内での挙動と腸内菌叢に与える影響についての可能性を評価した.

【方法】本試験ではオランダTNOが開発した, ヒトの胃から小腸の再現モデルであるTIM-1と大腸の再現モデルであるTIM-2を用いた. なお, TIM-2モデルでは実験開始前に予めヒト糞便サンプルを前培養し, 腸内菌叢を安定維持させて本実験に使用した.

はじめに, 上部消化管でのC-3102株の発芽を評価する目的で, C-3102株芽胞を食事成分に添加し, TIM-1モデル内に導入した. モデル通過後の内容物を6時間後まで1時間ごとに採取し, C-3102株の発芽率を測定した. 次に, ここで得られたTIM-1通過内容物を大腸の再現モデルであるTIM-2モデルに導入し, 72hr培養を行った. 同様に, TIM-1未処理群としてC-3102株芽胞のみをTIM-2内に導入する群を設定した. それぞれについて, サンプル導入前後の腸内菌叢の変化をマイクロアレイ法およびReal-time PCR法を用いて解析し, C-3102株の腸内菌叢に与える影響について評価した.

【結果および考察】TIM-1を通過したC-3102株の生存率は98.8%であり, うち8%が発芽し栄養細胞に変化していた. この結果, C-3102株はヒトの胃や小腸の消化液で死滅することなく腸管を通過する可能性が示唆された. この8%発芽したC-3102株を含む内容物をTIM-2内に導入した場合の腸内菌叢の変化では, 大腸菌群が減少し, 複数の *Bifidobacterium* 属が増加した. C-3102株芽胞のみの場合でも *Bifidobacterium* 属の増加を認めた. また, C-3102株芽胞と比較すると, TIM-1通過したC-3102株を含む内容物では, 変動菌種が多くみられた. このことから, ヒトにおいてもプロバイオティクス効果を示す可能性が示唆された.

## 一般演題 A-3

## 大腸上皮細胞を用いた炎症応答抑制に関わる腸内細菌の探索

*In vitro* Screening of Prospective Bacteria Modulating the Epithelial Inflammatory Response

○松浦 諒, 大坂利文, 常田 聡

早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻

【目的】腸管粘膜免疫系と腸内細菌は親密な関係を持ちながら共存している。しかし、大多数の腸内細菌に対しては炎症反応を誘導しないが、病原性細菌を認識すると転写因子であるNF- $\kappa$ Bが核内へ移行し、各種サイトカインの発現を誘導し、炎症反応が惹起される。つまり、腸管上皮組織では炎症反応を制限したり、妨げる機構が発達していることが考えられる。現在までに、一部の常在細菌や乳酸菌において抗炎症機能が見出されてきた。しかしながら、腸内細菌の主要構成種である *Bacteroides* や *Clostridium* といった腸内常在細菌についての抗炎症能評価は不十分である。そこで本研究では、ヒト・マウス糞便から分離した様々腸内常在細菌について、腸上皮細胞株を用いて抗炎症機能を評価した。

【方法】様々な種の腸内常在細菌の抗炎症機能を、腸上皮細胞株 (HT-29) によりスクリーニングした。スクリーニングは様々な分離細菌 (分離源: 炎症性腸疾患患者や健常者, マウスの糞便) を HT-29 に接触させた後に TNF- $\alpha$  刺激により誘導される IL-8 産生量と細菌非接触時の IL-8 産生量を比較することにより行った。

【結果】系統分類学的に多岐に渡る (ex. *Bacteroides* 属, *Bifidobacterium* 属, *Clostridium* 属, *Enterococcus* 属, *Eubacterium* 属, *Lactobacillus* 属, *Staphylococcus* 属など) の分離株 (42株) について抗炎症機能 (IL-8 産生抑制能) を評価した。その結果、プロバイオティクス効果が知られる *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属に加えて、*Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium ramosum*, *Eubacterium limosum*, *Eggerthella lenta* などの計13菌株で抗炎症機能が見られた。

【考察】本研究では、健常者糞便から分離される多くの *Bacteroides* 属に抗炎症機能を見出したが、*Bacteroides* 属-腸上皮細胞間にどのような相互作用がある明らかにする必要がある。また、腸上皮様に分化し極性化する Caco-2 や T84 を用いた *in vitro* 腸上皮炎症モデル実験での検証も必要である。

## 一般演題 A-4

## パイナップル果実由来グルコシルセラミドによる乾燥肌モデルマウスの皮膚改善効果と腸管上皮細胞を介したマクロファージに与える影響

## Skin Moisturizing Effect on the Dry Skin Model Mouse and the Induction of IL-23 mRNA Expression in Macrophages through Intestinal Epithelial Cells by Glucosylceramides from Pineapple

○湯浅弘樹<sup>1</sup>, 西谷洋輔<sup>2</sup>, 野嶋 潤<sup>3</sup>, 桑原浩誠<sup>3</sup>, 水野雅史<sup>1</sup><sup>1</sup>神戸大院・農, <sup>2</sup>神戸大・自然先端, <sup>3</sup>丸善製薬株式会社・研究開発

【目的】セラミドは動植物に幅広く分布する脂質の一種である。主に保湿など皮膚のバリア機能に重要な役割を果たしていることから化粧品などに多く含まれることで知られている。しかし最近ではセラミドの経口摂取による皮膚機能改善が注目されている。本研究ではパイナップル果実より得られたグルコシルセラミド含有画分を乾燥肌モデルマウスに経口投与し、皮膚機能に与える影響を検討した。さらに *in vitro* での試験によりその作用機構を検討した。

【方法】Hos:HR-1ヘアレスマウス（雄性5週齢）を、通常飼料（N）群、乾燥肌を誘導する特殊飼料（HR-AD）を投与する対照（C）群、HR-ADにパイナップル果実由来グルコシルセラミドを0.01%または0.1%含む、PG0.01群、PG0.1群の4群に分けた。飼料投与開始後、背部皮膚の経表皮水分蒸散量（TEWL）、表皮水分量、角層水分量を測定したさらにパイナップル由来グルコシルセラミドをヒト小腸上皮様細胞Caco-2細胞とマウスマクロファージ様細胞RAW264.7細胞の共培養系に供した。サンプル処理3時間後にLPSでRAW264.7細胞を刺激後、さらに3時間培養しRAW264.7細胞の全RNAを抽出し、定量RT-PCR法でIL-23 mRNA発現量を測定した。

【結果及び考察】PG0.01群とPG0.1群は、C群で3、4週目に見られたTEWL値の上昇を有意に抑制した。同様に表皮と角質の水分量の低下、シワの形成、皮膚組織における表皮の肥厚の抑制が確認された。これらの結果からパイナップル果実由来グルコシルセラミドの経口摂取は、乾燥肌モデルマウスの皮膚バリア機能維持に有効であることが示唆された。さらに *in vitro* の試験からは、パイナップル果実由来グルコシルセラミドによってRAW264.7細胞からのIL-23 mRNA発現量が約1.25倍増加したことが確認された。この現象と皮膚バリア機能との関連性、およびグルコシルセラミドによるIL-23 mRNA発現の増加がパイナップル特有の現象なのかについては現在検討中である。

## 一般演題 A-5

## 結腸のリンパ組織における腸内共生菌に対する免疫応答

## Immunomodulatory Responses Induced by Intestinal Commensal Bacteria in the Lymphoid Tissue of Colon

○鈴木 誠<sup>1</sup>, 細野 朗<sup>1</sup>, 鴨井大樹<sup>1</sup>, 八村敏志<sup>2</sup>, 高橋宜聖<sup>3</sup>,  
百瀬愛佳<sup>4</sup>, 平山和宏<sup>4</sup>, 伊藤喜久治<sup>4</sup>, 高橋恭子<sup>1</sup>, 上野川修一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>日本大学生物資源科学部食品生命学科, <sup>2</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センター,  
<sup>3</sup>国立感染研究所免疫部, <sup>4</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

【目的】 腸内共生菌の多くは大腸部位に存在し、腸管関連リンパ組織の形成やIgA産生に影響を与えている。その一方で、本来であれば生体にとっての異物である腸内共生菌は、免疫によって完全に排除されることがなく大腸内に共生できる。大腸部位には小腸パイエル板と類似した構造を持つリンパ組織が存在するが、その発生や機能についてはパイエル板ほど詳細な研究は行われておらず、不明な点も多い。そのため、大腸における免疫系と腸内共生菌の相互作用を解明することは非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、通常マウス及び無菌マウスの大腸リンパ組織に注目し、腸内共生菌がIgA産生に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】 BALB/cマウスについて、通常マウス及び無菌マウスより小腸パイエル板、盲腸リンパ節、結腸リンパ節を採取し、それぞれ細胞を調製した。これらの細胞は、マウス腸内細菌から分離されたグラム陰性菌 *Bacteroides acidifaciens* type A43, グラム陽性菌 *Lactobacillus johnsonii* 129 の加熱死菌体との共培養を行った (7日間)。そして、培養上清中の総IgA量をELISAで測定した。また、通常マウス及び無菌マウスを4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で還流固定し、結腸リンパ節凍結切片を作製し、免疫組織学的な検討を行った。

【結果】 腸内共生菌の存在しない無菌マウス由来の結腸リンパ組織は、通常マウスのものと比較して組織のサイズや、細胞数に大きな差はみられなかった。小腸パイエル板細胞は *ex vivo* 菌体刺激によって産生される総IgA量が通常マウスと無菌マウスとではあまり差がみられなかったのに対し、結腸リンパ節細胞は無菌マウスの方が通常マウスに比べて低応答性を示す特徴がみられた。

【考察】 無菌マウスにも結腸リンパ節の形成が十分に観察されることから、この組織の免疫系応答は腸内共生菌の影響をあまり受けないように予想されたが、IgA産生については腸内共生菌によって感作されていない無菌マウスの結腸リンパ節細胞の反応性が通常マウスの同細胞に比べて低応答性であり、結腸リンパ節細胞の免疫応答は腸内共生菌の影響を強く受けていることが推察された。

## 一般演題 A-6

腸管のオートファジーによる *Citrobacter rodentium* 感染の制御Autophagy in the Intestinal Epithelium Regulates *Citrobacter rodentium* Infection

○井上 潤<sup>1</sup>, 西海 信<sup>1</sup>, 藤島佳未<sup>1</sup>, 増田充弘<sup>1</sup>,  
塩見英之<sup>1</sup>, 吉田 優<sup>1-3</sup>, 東 健<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野

<sup>2</sup>神戸大学大学院医学研究科内科系講座病因病態解析学分野

<sup>3</sup>神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センター

【目的】 オートファジーは細胞内のタンパク質を分解する仕組みのひとつである。オートファジーは細胞の飢餓状態に反応して誘導されるほか、通常の栄養条件下でも低いレベルで働いており、細胞の恒常性維持において重要な働きをしていると考えられている。近年、オートファジーの異常が発がんや神経疾患、心疾患などの発病に関わっていると報告されている。また、ゲノムの網羅的解析において、クローン病の感受性遺伝子のひとつとしてオートファジー関連遺伝子が同定され、オートファジーは腸管免疫においても重要な役割を担っている可能性が示された。しかし、腸管細菌感染における腸管オートファジーの機能ははまだ明らかになっていない。そこで、我々は、感染性腸炎の制御におけるオートファジーの役割を、*Citrobacter rodentium* 感染マウスモデルにおいて検討した。

【方法】 cre/loxP システムを用いることで、腸管特異的オートファジー欠損マウスを作製した。このマウスにリポ多糖 (LPS) を経口、および、腹腔内投与、あるいは、*Citrobacter rodentium* を経口感染させ、腸管上皮におけるサイトカインの発現量の検討や病理学的評価などを実施し、腸炎制御におけるオートファジーの役割を解析した。

【結果】 オートファジー欠損マウスに LPS を経口、あるいは、腹腔内投与した結果、その対照マウスと比較して、腸管上皮における TNF- $\alpha$ 、ならびに、IL-1 $\beta$  の発現の亢進、および NF- $\kappa$ B の活性化を認めた。また、オートファジー欠損マウスに *Citrobacter rodentium* を経口感染させた場合も、腸管上皮の TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインの発現の亢進、ならびに、病理学的に感染性腸炎の増悪を認めた。さらに、*Citrobacter rodentium* を感染させたオートファジー欠損マウスにおいて菌の排除が低下することも確認できた。

【考察】 これらの結果により、腸管上皮におけるオートファジーは、菌由来抗原の腸管上皮への作用や、腸における細菌感染を抑制的に制御できることが明らかとなった。これは、腸管における恒常性維持にオートファジーが重要な役割を担っている可能性を示している。