

受賞講演 2

In vitro 腸炎モデルを用いた *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC の 抗炎症作用機序の解明

西谷洋輔

神戸大学自然科学系先端融合研究環

近年、炎症性腸疾患（IBD）と呼ばれる大腸および小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍を引き起こす原因不明の疾患が、本邦でも増加傾向にある。一方、プロバイオティクスは、IBDを含むヒトの胃腸の炎症を緩和または寛解を維持するのに使用されてきた。しかしながら、プロバイオティクスが腸炎に対してどのようなメカニズムで抑制的に働くのかは、未だ完全に解明されていない。我々は、食品因子によりこれらの炎症を予防・緩和することを最終目的に、腸上皮様Caco-2細胞およびマクロファージ様RAW264.7細胞から成る共培養系を用いて、食品因子の抗炎症効果を評価するシステム（*in vitro* 腸炎モデル）の確立を試みた。さらに、この *in vitro* モデルおよび既報の *in vivo* 腸炎モデルを用いることで、便通改善などの効果が既に報告されている *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC（FC株）について抗炎症効果を調べた。

トランズウェルメンブレン上に腸上皮様に分化させたCaco-2細胞を、基底膜側にマクロファージ様RAW264.7細胞を配置し、RAW264.7細胞をリポ多糖（LPS）で刺激し、炎症状態を誘導した。その結果、Caco-2細胞単層膜の損傷を示す経上皮電気抵抗値の低下、RAW264.7細胞からのTNF- α 産生およびCaco-2細胞中のIL-8 mRNA発現の増加が確認された。抗TNF- α 抗体もしくはIBDの臨床治療薬として欧米で実際に用いられているブデソニドの処理によって、LPS刺激後のTNF- α 産生の増加およびIL-8 mRNA発現は有意に抑制された。これらの結果から、この共培養系が生体内における腸管の炎症を模倣できる可能性が示された。

次にFC株の腸炎に対する影響を、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性マウス腸炎モデルを用いて評価した。C57BL/6マウスに3% DSSを飲水に混ぜ自由摂取させたところ、FC株の投与により、DSSによって引き起こされる大腸長の短縮、大腸炎症部位における上皮の損傷および炎症細胞浸潤は有意に抑制された。また、FC株の投与は、大腸炎症部位におけるTNF- α ($p < 0.05$)、IFN- γ ($p < 0.05$)、IL-6、iNOS、およびMIP-2 mRNAの発現をDSS非投与群のレベルにまで抑制した。これらの結果から、FC株は腸炎を抑制する可能性が示唆されたため、その機序について *in vitro* 腸炎モデルを用いて検討した。FC株を管腔側に処理し3時間後にLPS刺激を行ったところ、未処理区と比較しCaco-2細胞中のIL-8 mRNA発現およびRAW264.7細胞におけるNF- κ B核内移行の有意な抑制が認められた。以上の結果から、FC株は炎症細胞浸潤を抑制することにより、DSSによって誘導された腸炎を改善することが明らかとなった。また、*in vitro* 腸炎モデルより得られた結果が *in vivo* においても同様に認められたことから、本モデルが抗炎症効果を有する因子の探索に有用であることが示された。

Anti-inflammatory Activities of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC in *in vitro* and *in vivo* Gut Inflammation Model

Yosuke Nishitani

Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, whose etiology still remains unknown, is increasing gradually in Japan. Many food factors such as probiotics have been used to treat human gastrointestinal inflammations including IBD. However, the exact mechanisms by which probiotics act to protect against intestinal inflammation have not yet been fully elucidated. Therefore, in this study, we tried to establish novel *in vitro* gut inflammation model for evaluating anti-inflammatory activity of food factors. Then we assessed anti-inflammatory activities of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC using *in vivo* and *in vitro* inflammation models.

A system for assessing the anti-inflammatory activity of food factors was developed by establishing a co-culture system with intestinal epithelial Caco-2 cells (apical side) and macrophage RAW264.7 cells (basolateral side). In this system, the stimulation of RAW264.7 cells with lipopolysaccharide was followed by a decrease in transepithelial electrical resistance, which is a marker of the integrity of the Caco-2 monolayer and an increase in TNF- α production from RAW264.7 cells and IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells. Treatment with anti-TNF- α antibodies or budesonide suppressed increase in TNF- α production and IL-8 mRNA expression. These results indicated that this novel co-culture model could imitate the gut inflammation *in vivo*.

In the assessment for anti-inflammatory activity of *L. lactis* subsp. *cremoris* FC, colitis was induced in C57BL/6 mice by administration of 3% dextran sulfate sodium (DSS) to drinking water. Administration of *L. lactis* subsp. *cremoris* FC significantly ameliorated shortening of colon length and histological score of the colon in DSS-induced colitis mice. In addition, the treatment of *L. lactis* subsp. *cremoris* FC improved the aberrant mRNA expression in inflamed tissue near to control level through notable suppression of TNF- α ($p < 0.05$), IFN- γ ($p < 0.05$), IL-6, iNOS, and MIP-2 mRNA expression. Furthermore, in a newly established *in vitro* gut inflammation model, treatment with *L. lactis* subsp. *cremoris* FC resulted in significant down-regulation of IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells and inhibition of NF- κ B nuclear translocation in RAW264.7 cells. Our findings indicate that an oral administration of *L. lactis* subsp. *cremoris* FC improves negative effects of DSS-induced colitis in mice through the inhibition of inflammatory cell infiltration.