

NewsLetter Vol.19 No.1

奨励賞受賞 | 第54回日本消化器免疫学会総会

乳酸菌由来フェリクロームによる抗腫瘍メカニズムの解析^{1,2)}

井尻 学見 藤谷 幹浩 上野 伸典 奥村 利勝

旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

背景：プロバイオティクスとは健康上有益な効果を持つ微生物の総称であり、乳酸菌やビフィズス菌が含まれる。これらプロバイオティクスには大腸癌細胞株やマウス発癌モデルに対して抗腫瘍作用があることが報告されている。そのメカニズムとしては主に腸内細菌叢の改善や抗酸化作用などの間接的な機序が知られているが、特異的な菌由来抗腫瘍物質を介した抗腫瘍作用についての報告は少ない。そこで本研究では *Lactobacillus casei* (*L. casei*) の抗腫瘍作用を仲介する菌由来分子の同定と、炎症発癌モデルに対する癌抑制効果および抗腫瘍作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法：(1) *L. casei* の培養上清を各種カラムにて分離し、抗腫瘍効果を持つ分画を精製した。質量分析によって分画内の物質を解析し、抗腫瘍分子フェリクロームを同定した。(2) 各種消化器癌細胞株(大腸癌、胃癌、膵癌)にフェリクロームを添加し、SRB assay, DSS-AOM 炎症発癌マウスモデルにて抗腫瘍効果を評価した。(3) 鉄飽和フェリクロームと非鉄飽和フェリクロームによる抗腫瘍効果をSRB assayで検討した。また、フェリクロームによる細胞内鉄含量の変化を原子吸光分光法で評価した。(4) 分子立体配座解析によりフェリクロームの標的分子を探索した。

結果：(1) *L. casei* の培養上清が大腸癌細胞株SW620の発育抑制効果を有することを明らかにした。*L. casei* の培養上清中に抗腫瘍活性を有する物質が含まれていると考え、各種カラムを用いて抗腫瘍効果を有する分画を精製した。最終的に

単一成分へ絞り込み、質量分析によりこの単一成分がフェリクロームであることを同定した。(2) フェリクロームとは細菌が産生する金属キレート分子の一種であり、細菌から分泌され鉄などの金属と結合し、再度菌体内に取り込まれ鉄を獲得することに用いられる物質である。フェリクロームは大腸癌細胞株であるSW620に抗腫瘍作用を示し、フェリクロームの50%阻害濃度は73 ng/mlであった。これは、既存の殺細胞性の抗癌剤である5-FU (162 ng/ml) やシスプラチン (1313 ng/ml) よりも高い抗腫瘍活性を示していた(図1)。また、胃癌、膵癌細胞株にも同様に抗腫瘍作用を示したが、比較的低濃度 (1 µg/ml) で抗腫瘍効果を示す細胞株 (MKN-45, Suit2) と、高濃度 (100 µg/ml) で効果を示す細胞株 (MKN-74, KP1N) が存在した。DSS-AOM 炎症発癌マウスによる実験では、フェリク

ロームの連日腹腔内投与 (100 µg/mouse) 群は、PBS投与のコントロール群と比較し有意に腫瘍量が減少した ($p<0.01$)。 (3) SRB assayの結果より、胃癌細胞株であるMKN-45, MKN-74において鉄飽和フェリクロームは抗腫瘍作用を示さず、非鉄飽和フェリクロームのみが抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。非鉄飽和フェリクロームが、癌細胞株の鉄を奪って抗腫瘍効果を発揮すると仮定し、細胞内鉄含有量変化について検討した。抗腫瘍効果はフェリクローム投与濃度により細胞株によって大きな差があったが、細胞鉄含有量はフェリクロームの1 µg/ml投与でも100 µg/ml投与でも、胃癌細胞株MKN-45とMKN-74では均一に鉄含有量が低下した。すなわち、鉄含有量の低下と抗腫瘍効果は相関しなかった(図2)。このことから、フェリクロームの抗腫瘍作用のメカニズムが細胞内の鉄

SRB assay (n=5)、SW620(大腸癌細胞株)

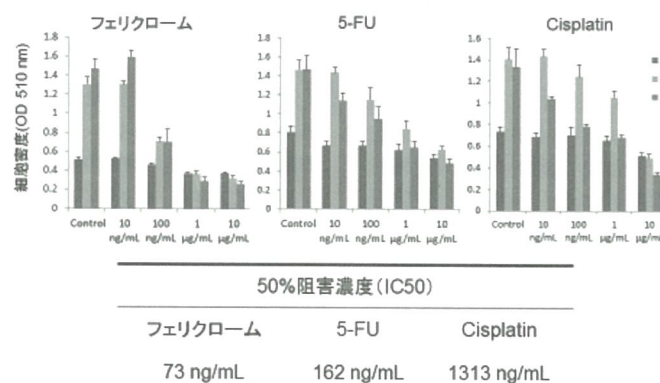
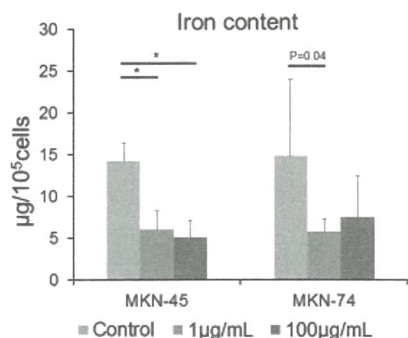


図1 フェリクロームと既存抗がん剤との抗腫瘍効果の比較検討

原子吸光分光法 (n=6, *P < 0.017 [Bonferroni補正])

フェリクロームを投与した細胞内の鉄含有量を原子吸光分光計により評価した。



SRB assay

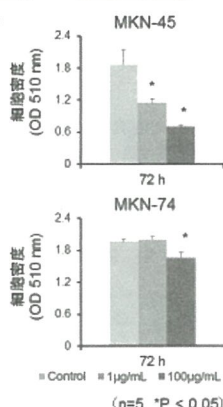


図2 フェリクローム投与による細胞鉄含有量変化の検討

を奪うことではないことが明らかとなった。(4) 鉄以外の非鉄飽和フェリクロームと結合可能な分子について、立体配座解析を用いて網羅的に検索した。この結果、34495種のヒトタンパク質の中からフェリクロームと安定配座をとる30個を選別した。この中には、HRASの作用を介したアポトーシス抑制に関連するSon of sevenless homolog 1や、JNK、DDIT3経路を介したアポトーシス抑制に関連するMethylthioribulose-1-phosphate dehy-

drataseなど増殖や細胞死に関連する分子が複数含まれており、フェリクローム標的分子である可能性が示唆された。また、鉄飽和フェリクロームについても検索したところ、これら30個の候補タンパク質を含め安定配座をとるヒトタンパク質はなかった。

結論：L. caseiの抗腫瘍作用は菌由来フェリクロームに仲介されると考えられた。その作用メカニズムとして、フェリクロームの鉄結合部位が癌細胞内の標的分子

子と結合し、細胞死を誘導するものと考えられた。今後、この標的分子を絞り込み、作用機序を明らかにしていきたい。

- 1) Konishi H, Fujiya M, Ueno N, et al. Nature Commun, 2016
- 2) Ijiri M, Fujiya M, Ueno N, et al. Tumour Biol, 2017

この度、第54回日本消化器免疫学会総会におきまして、当研究発表が奨励賞というとても喜ばしい賞を受賞いたしましたことは誠に光栄に存じます。また、会長の渡辺守先生をはじめ、審査していただきました先生方に、再度感謝申し上げます。この消化器免疫学会では本庄佑先生の特別講演、渡辺守先生の会長講演をはじめ、各種シンポジウムや演題内容の質が非常に高く、免疫の様々な分野からの演題内容であり、いずれも私にとって新しい知見を得ることのできた貴重な機会となりました。そのような中、自身の研究内容である「乳酸菌由来フェリクロームによる抗腫瘍メカニズムの解析」について、プレゼンテーションさせていただき、多くの先生方と質疑応答を通してディスカッションできたことは得難い経験となっております。

今回の、この受賞を励みにますます研鑽に力を注ぎ、より良い研究ができるよう一層の努力をしてみたいと思います。今後とも、ご指導・ご鞭撻のほど何卒よろしくお願い申し上げます。(井尻学見)

奨励賞受賞 | 第54回日本消化器免疫学会総会

ヒト大腸オルガノイドを用いた炎症性腸疾患擬似モデルの構築による薬効評価システムへの応用

西村 龍
日比谷秀爾

土屋輝一郎
岡本 隆一

白崎 友彬
中村 哲也

渡辺 翔
渡辺 守

東京医科歯科大学 消化器内科

目的：炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎は本邦で患者が増加している難治性疾患である。寛解と再燃を繰り返し、罹患期間が数十年にわたることで病状が悪化していき、最終的には大腸切除に至ることがあり、炎症を抑制することで病状を改善させるだけでは不十分であった。そんな中、抗TNFα抗体が登場した結果、炎症により損傷した粘膜が再生する粘膜治癒症例が報告されるようになり、粘膜治癒症例では手術率が有意に低下することが判明した。そのため最近では治療目標が症状改善から粘膜治癒となってきており、上皮再生の有無が予後を決定すると考えられている。しかしながら、粘膜治癒を直接標的とした薬は現在存在せず、また慢性腸炎を模倣したモデルがなく、

上皮細胞への粘膜治癒効果を評価する方法がないため、粘膜治癒を直接標的とした新薬の創薬は難しいのが現状であった。

これまでに当教室では、独自に構築したマウス大腸オルガノイド培養技術を発展させ、炎症刺激を長期間行うことにより慢性炎症の病態を模倣した体外擬似モデルの構築し(図1)、1年以上にわたる長期炎症刺激をマウス大腸上皮細胞に行うことに成功している(J Crohns Colitis, 2017)。その結果、上皮細胞における炎症刺激期間が長くなることで発現が誘導される遺伝子が初めて明らかとなり、それは潰瘍性大腸炎患者において増加する遺伝子と一致していた(図2a)。さらに、炎症シグナルが上皮細胞に蓄積していく経過を観察することに成功した(図2b)。

この研究により潰瘍性大腸炎における大腸上皮細胞の病態の一部が明らかとなった。

そこで本研究では、この技術を基盤として、マウス大腸オルガノイドと同様に炎症刺激の系をヒト大腸オルガノイドにおいて再構築し、ヒトの細胞における体外炎症性腸疾患(IBD)擬似モデルを確立させるとともに、上皮細胞機能評価システムを構築することにより、新規治療候補薬の評価系の確立を目的とした。

方法：本学倫理審査委員会承認のもと、クローン病非病変部の大腸より内視鏡生検検体からヒト大腸オルガノイドを樹立した。ヒト大腸オルガノイドにおける炎症応答関連レセプター発現をRT-PCRにて検証した。炎症刺激による上皮細胞炎

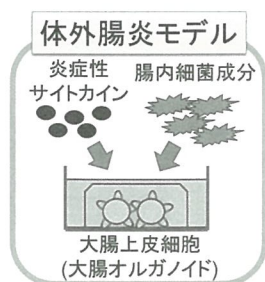


図1 体外腸炎モデルの模式図
潰瘍性大腸炎を模倣した環境を体外で再現した。

症応答はIL-8, Duoxa2の発現をRT-PCRにて検証した。また、マイクロアレイ及びGSEAにより網羅的な上皮炎症応答を評価した。酸化ストレスはCellROX®を用いて蛍光強度を測定し評価した。

結果：ヒト大腸オルガノイドにおける炎症性サイトカイン, Toll like receptor (TLR) の発現をRT-PCRにて同定した。発現を認めたレセプターに対応するリガンドにて3時間の刺激を行い, IL-8の発現上昇を認めた。さらに, 1週間刺激することにより酸化ストレス関連遺伝子であり, マウスの体外炎症モデルにおいて刺激期間の増加により発現が亢進するDuoxa2の発現上昇を認めた。炎症応答を認めたりガンドを混合して刺激を行ったところ, 各単剤での刺激の場合と比較し, 最も大きい炎症応答であることを認めた。そこで, 炎症応答が最大であったリガンド混合条件で刺激を5週間行い, 炎症応答をマイクロアレイにて解析した

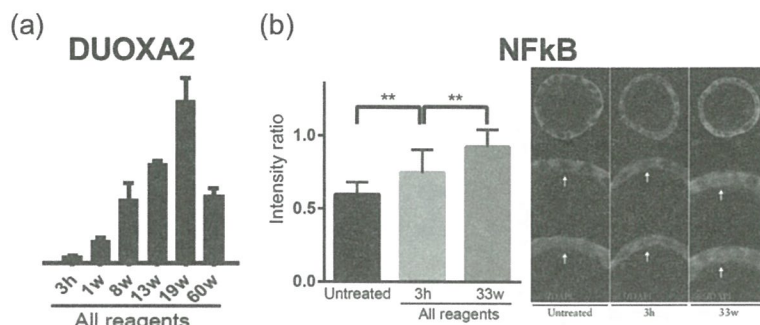


図2 大腸上皮細胞の長期炎症による影響の解明
(a) 炎症応答遺伝子の段階的増加, (b) 炎症シグナルの蓄積

ところ, 炎症関連遺伝子の上昇及び粘液形質の減少を認めた。また, 活動性の潰瘍性大腸炎患者の粘膜において発現が亢進している遺伝子群は5週間炎症刺激を加えたオルガノイドにおいても発現が亢進していることを確認した。酸化ストレス可視化及び定量化により炎症刺激により酸化ストレスが上昇することを認めた。さらに, 新規治療候補薬を添加した場合には, 炎症環境においても炎症関連遺伝子の低下, 粘液形質の上昇, 酸化ストレスの改善を認めたことから, 候補薬の抗炎症作用, 粘膜再生作用への効果を確認することができた。

結論：ヒト大腸オルガノイドにおいても炎症刺激により, IBDの炎症環境を模倣していることが示唆された。この系に新規治療候補薬を投与し, マイクロアレイにより炎症応答拮抗遺伝子数を評価することで候補薬の作用を確認することができる。さらに変動遺伝子を抽出するこ

とで候補薬の標的分子機構を同定し得る。IBDモデルの構築及び上皮評価系の確立により新規候補薬物のスクリーニングに有用であることが示唆された。

このたびは奨励賞を頂き大変光栄に存じます。私の実力というよりも, 渡辺守教授, 土屋輝一郎先生によるご指導と, 素晴らしい研究環境のおかげだと思っております。今回の受賞を励みに, 慢心することなくこれからも研究に精進していきますので, 今後も変わらぬご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

(西村 龍)



奨励賞受賞 | 第54回日本消化器免疫学会総会

症性腸疾患の mucosa-associated microbiota の検討

西野 恭平¹

今枝 広丞¹

西田 淳史¹

馬場 重樹¹

井上 亮²

稲富 理¹

酒井 滋企¹

杉本 光繁³

大野 将司¹

内藤 裕二⁴

高橋憲一郎¹

安藤 朗¹

¹滋賀医科大学 消化器内科 / ²京都府立大学 生命環境科学研究科

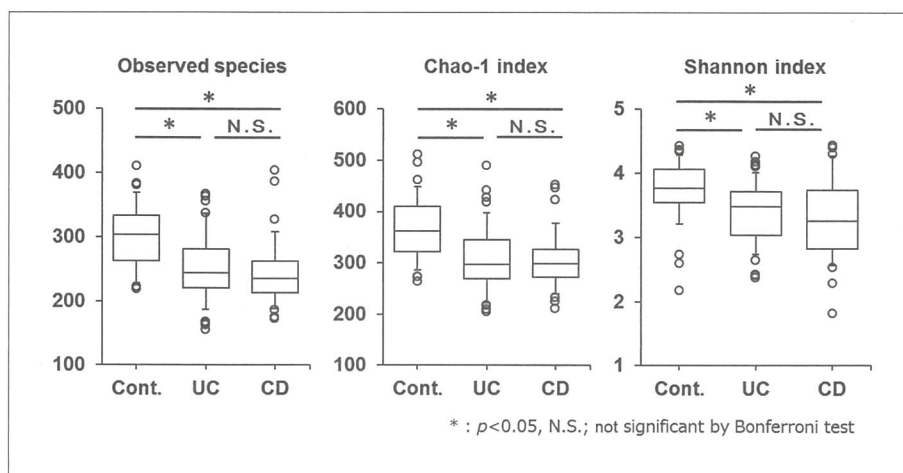
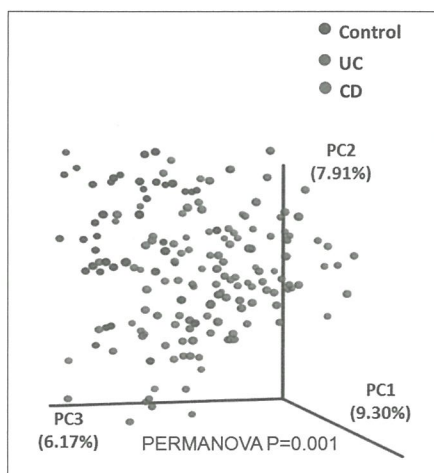
³滋賀医科大学 光学医療診療部 / ⁴京都府立医科大学 消化器内科

背景・目的：近年のDNAシーケンシング技術の革新的進歩により, 数百兆個の細菌から構成されるヒト腸内細菌叢の集合ゲノムの網羅的で高速な解析が可能となった。それによって, ヒト腸内細菌叢の基本的な全体構造や機能, 食事などの環境因子による影響や様々な疾患における腸内細菌叢の異常“dysbiosis”が明らかとなってきた。炎症性腸疾患

(IBD)においても dysbiosisがその病態に関与していると考えられている。これまでの多くの研究では, 糞便中の細菌叢を対象として解析が行われてきた。しかしながら, 糞便中の細菌叢よりも腸管粘液, 粘膜内に潜む細菌叢である mucosa-associated microbiota が宿主免疫により大きな影響を与えることが示唆されている。今回我々は, 内視鏡下に消化管ブラシを

用いて腸管粘液を採取し, IBDにおける mucosa-associated microbiota の解析を行った。

方法：当院で下部消化管内視鏡検査を行った潰瘍性大腸炎 (UC) 患者43例, クロウン病 (CD) 患者26例, 健常人14例を対象とした。下部消化管内視鏡施行時に, 消化管ブラシ (CCB-7-240-3-S, COOK社) を用いて粘液 (合計174サンプル) を



採取した。採取部位は、回腸末端、盲腸およびS状結腸とした。DNA抽出はQIAamp UCP Pathogen Mini Kit (QIAGEN社)を用い、ビーズ法を併用して抽出した。細菌叢の解析は、次世代シーケンサーを用いて16S rRNA遺伝子領域のシーケンスにより行った。

結果：まず、採取部位別での検討を行ったところ、健常人、UC、CDとも採取部位（回腸末端、盲腸およびS状結腸）による細菌構成に有意な違いは認められなかった。一方で、同一患者では採取部位に関わらず細菌構成が近く、個人ごとに個人を特徴づける細菌構成を持つと考えられた。 α 多様性については健常人、UC、CDとも採取部位による明らかな違いは認められなかった。

次に疾患別に検討を行ったところ、健常人、UCおよびCDの間では、細菌構成に有意な違いが認められた。また、CDと健常人の細菌構成の違いより著明であった。 α 多様性についてはUCおよびCDでは、健常人と比較して有意に低下していた。

細菌構成の違いを門レベルで比較すると、CDでは健常人と比較して *Proteobacteria* が有意に増加しており、*Firmicutes* と *Bacteroidetes* の有意な減少が認められた。その違いを属レベルで検討すると、CDでは健常人と比較して、*Escherichia*, *Ruminococcus* (*R. gnavus*), *Cetobacterium*, *Actinobacillus* および *Enterococcus* で有意な増加を認め、*Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Prevotella* および *Roseburia* で有意な減少が認められた。CDとUCの属レベルでの比較では、CDにおいて *Escherichia*, *Ruminococcus* (*R. gnavus*), *Clostridium*, *Cetobacterium*, *Peptostreptococcus* が有意に多く存在し、UCにおいては *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Roseburia* および *Citrobacter* が有意に多く存在した。

Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUST) ソフトウェアを用いて予測される細菌叢の機能解析を行うと、CDにおいて健常人と比較して lipopolysaccharide (LPS) 合成経路の発現上昇を認めた。

考察：今回、我々は内視鏡下で消化管ブラシを用いて腸管粘液を採取して、mucosa-associated microbiota の検討を行った。これまでの mucosa-associated microbiota の研究の多くは生検鉗子を用いた粘膜生検によるものである。しかし、粘膜生検には予期せぬ出血リスクがあり、また、サンプルの大部分はヒト組織であることよりシーケンスの結果に影響を与える可能性も考えられる。その点で、消化管ブラシを用いて粘液を採取することは、低侵襲であり、ヒト組織の混入を減らすことができるという利点がある。

また、下部消化管内視鏡を用いたことで同一患者の複数の部位からサンプルを採取することが可能であった。採取部位別での検討では、採取部位による細菌構成の違いは認められなかった。一方で同一患者では検体採取部位に関わらず細菌構成が近く、個人毎に個人を特徴づける細菌構成を持つことが明らかとなった。

疾患別の比較では、mucosa-associated microbiota においてもIBD患者では健常人と異なる細菌構成、多様性の低下を認め、その変化はUCよりもCDで著明であった。

CDと健常人における細菌構成の属レベルでの比較では、CDにおいて *Escherichia*, *Ruminococcus* (*R. gnavus*) などの炎症を惹起する菌の有意な増加を認め、*Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* など腸管において保護的な役割を担うと考えられる酪酸産生菌の有意な減少を認めた。

さらにCDとUCにおける細菌構成の

属レベルの比較では、CDと健常人との比較の場合と同様にCDにおいて *Escherichia*, *Ruminococcus* (*R. gnavus*) などの炎症を惹起する菌が多く存在し、UCにおいて *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Roseburia* など腸管において保護的に働くと考えられる菌が多く存在し、CDの方がUCよりも細菌叢として炎症を惹起しやすい細菌構成であると考えられた。

さらに、PICRUSTソフトウェアを用いた細菌叢の機能解析ではCDにおいて健常人と比較してLPS合成経路の発現上昇を認めた。LPSはグラム陰性桿菌に由来する宿主の免疫反応を誘導する内毒素であり、細菌叢の機能解析からもCDの細菌叢は炎症を惹起しやすい状態であることが示唆された。

結論：IBD患者では、mucosa-associated microbiota において dysbiosis が認められた。また、mucosa-associated microbiota の解析を行うことで、CDとUCの鑑別診断ができる可能性が示唆された。

このたびは第54回日本消化器免疫学会総会奨励賞を賜り大変光栄に存じます。会長の渡辺守先生をはじめ、関係者の方々に厚く御礼申し上げます。また、日頃よりご指導頂いております安藤教授、西田先生をはじめ、各先生方にこの場をお借りして感謝申し上げます。今回の受賞を励みに消化器免疫学の発展に寄与できるような研究ができるよう研鑽を積みみたいと存じます。今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

(西野恭平)

