

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 677 号	氏名	小坂 聡太郎
審査委員会委員	主査氏名	猶股 雅史	
	副査氏名	石崎 敏理	
	副査氏名	小宮 孝一	
<p>論文題目                  Protease inhibitory activity of secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier                  (分泌型好中球プロテアーゼ阻害因子のプロテアーゼ阻害活性は腸管上皮バリアを保護することでマウス実験腸炎を軽減する)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Genes to Cells</p> <p>論文要旨                  炎症性腸疾患 (IBD) は、腸管上皮のバリア破綻が病態の一つとされ、secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) は、好中球プロテアーゼを阻害し、組織損傷に対し保護作用を示すことが知られている。今回、SLPI 欠損マウスに実験腸炎を誘導し、結腸腸管上皮における SLPI の組織保護作用を検討した。                  マウス大腸癌細胞株 (CMT93) をリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、誘導される遺伝子群をマイクロアレイで解析した。SLPI 欠損マウスおよび野生型マウスを用い、DSS 大腸炎を誘導した後、各群の SLPI の発現量をウエスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法にて解析した。次に体重変化、臨床症状、病理組織、炎症性サイトカインについて評価した。また好中球浸潤と上皮細胞増殖能を免疫染色にて、腸管上皮細胞のアポトーシスは TUNEL 染色で評価した。腸管上皮バリア機能は膜透過性試験にて、NE 活性は基質分解アッセイで評価した。16S rRNA T-RFLP 法にて両群の腸内細菌叢を解析した。さらにプロテアーゼインヒビター (SSR69071) またはリコンビナント SLPI (rSLPI) 投与にて腸炎改善効果を解析した。                  LPS 刺激を加えた CMT93 細胞において、SLPI 発現は無刺激群と比較し有意に上昇した。DSS 腸炎を誘導した野生型マウスでは、結腸上皮の SLPI 発現が有意に増強した。DSS 腸炎を誘導した SLPI 欠損マウス群は対照群と比較し、体重減少が高度で、腸炎症状の重症化、組織学的評価では好中球浸潤を伴う高度の炎症所見と線維化を認め、炎症性サイトカインの発現増加を認めた。腸管上皮細胞のアポトーシスは亢進し、腸管粘膜の NE 活性が有意に増加した。腸内細菌解析では SLPI 欠損マウス群で有意 <i>Lactobacillales</i> の割合が減少し <i>Bacteroides</i> が増加した。さらに SSR69071 および rSLPI の投与により、DSS 腸炎が軽症化した。                  以上より、SLPI は結腸において炎症性刺激により誘導され、抗プロテアーゼ作用を介して腸管上皮バリアを保護し、腸炎に対し保護的に働くことが明らかになった。</p> <p>本研究では、病態に不明な点が多い IBD において、SLPI 欠損マウスおよび実験腸炎モデルを用い、SLPI の腸管上皮における組織保護作用を明らかにするとともに、SLPI 製剤を用いた IBD の新規治療薬の可能性を示すことができた。従って、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第 677 号	氏 名	小 坂 聡太郎
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	猪 股 雅 史	
	副査氏名	阪 崎 妖 理	
	副査氏名	小 宮 孝 作	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 炎症性腸疾患における今回の研究において、DSSモデルを用いた妥当性を述べよ。</li> <li>2. マイクロアレイで同定できたSLPIより発現の高い遺伝子の検討について述べよ。</li> <li>3. 結腸上皮細胞の働きを検討するため、大腸がん細胞株を利用しているが、その妥当性を述べよ。</li> <li>4. 論文タイトルにmurineと入れた理由を述べよ。</li> <li>5. この研究を計画する時点で、腸管粘膜におけるSLPIに関する知見はどこまで判明していたか。</li> <li>6. DSSを7日間投与して3-7日間通常の水を飲ませているが、3-7日と実際幅を持たせた理由を述べよ。</li> <li>7. Fig2aにおいて、Induction phaseにてSLPI欠損モデルはWTに比較して有意差はないが体重が増加している。これについて考えられる理由は？</li> <li>8. Figure 3aにおいて、DSS刺激にてSLPI欠損モデルおよびWTのいずれもMUC2発現を著明に低下させており、両群間で有意差がない。SLPIは粘液産生に関しては、あまり影響しないのか。</li> <li>9. Figure 3bにおいて、Histological scoreでは有意差を認めるが、この差を解釈するための考察を述べよ。</li> <li>10. SLPI欠損モデルで<i>Bacteroides</i>が増加し、<i>Lactobacillales</i>が低下している。この機序はSLPIの直接作用なのか、あるいは過剰な炎症の結果なのかを述べよ。</li> <li>11. DSSに加えTNBS（クローン病を想定）で刺激しているが、小腸病変について評価したか。</li> <li>12. LPSによる細胞刺激の条件（濃度・時間の根拠）を述べよ。</li> <li>13. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) へのSLPIの関与は知られているのか。</li> <li>14. Neutrophil Elastaseは、DSS腸炎モデルにおいてどのような役割を担っているのか。</li> <li>15. TSLPにより誘導されるSLPIが腸炎症の回復に関与するとの報告があるが、今回の実験におけるTSLPとSLPIとの関連性を検討したのか。</li> <li>16. ヘテロマウスでは今回見られた表現型は確認できるか。</li> <li>17. 今回の研究を通じて、今後の炎症性腸疾患およびNETへの臨床応用や治療戦略を述べよ。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 小坂 聡太郎

## 論 文 題 目

Protease inhibitory activity of secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier

(分泌型好中球プロテアーゼ阻害因子のプロテアーゼ阻害活性は腸管上皮バリアを保護することでマウス実験腸炎を軽減する)

## 要 旨

ア. 緒言 (目的): 炎症性腸疾患 (IBD) の病態には不明な点が多いが、その病因には腸管上皮バリアの破綻が関与している。IBD では腸管の過剰な免疫応答により好中球が腸管粘膜へと誘導、活性化され、好中球から分泌されるプロテアーゼ (好中球エラスターゼ: NE) は腸管上皮バリアを破壊する。secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) は、肺や皮膚で分泌される低分子タンパクである。SLPI は好中球プロテアーゼを阻害し、組織損傷に対し保護作用を示すと考えられているが、結腸における SLPI の機能は不明である。今回われわれは、SLPI 欠損マウスに実験腸炎を誘導することで、SLPI の組織保護作用を明らかにし、さらに SLPI の IBD の新規治療薬としての可能性を見出すことを目的とした。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む): ①マウス大腸癌細胞株 (CMT93) を腸内細菌の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、誘導される遺伝子群をマイクロアレイで解析した。②SLPI 欠損マウス (以下 KO 群) に 5~7 日間 2.5% デキストラン硫酸 (DSS) を投与し大腸炎を誘導した後、水

に切り替え回復させた。対照群は野生型マウスを用いた。まず各群の SLPI の発現量をウェスタンブロット法とリアルタイム PCR 法で解析した。次に腸炎の重症度を体重変化、臨床症状、病理組織、炎症性サイトカインの遺伝子発現量測定(qRT-PCR)等で評価した。好中球の浸潤と上皮細胞増殖能を免疫染色で、腸管上皮細胞のアポトーシスは TUNEL 染色で評価した。また腸管上皮バリア機能は FITC-dextran による膜透過性試験で、NE 活性は基質分解アッセイで評価し、16S rRNA T-RFLP 法で両群の腸内細菌叢を解析した。さらにプロテアーゼインヒビター (SSR69071) またはリコンビナント SLPI (rSLPI) を DSS 誘導マウスに投与し、前述の評価項目を用いて腸炎改善効果を解析した。

ウ. 結果：① LPS 刺激を加えた CMT93 細胞の SLPI の発現が無刺激群と比較し有意に上昇した。② DSS 腸炎を誘導した野生型マウス (対照群) の結腸において SLPI の発現が有意に増強した。DSS 腸炎を誘導した KO 群は対照群と比較し、体重減少が高度であり、腸炎症状が重症化した。組織学的評価では好中球浸潤を伴う高度の炎症所見と線維化を認め、炎症性サイトカインの発現が有意に増加した。腸管上皮細胞のアポトーシスは亢進し、血中 FITC-dextran 濃度も有意に増加していた。さらに腸管粘膜の NE 活性が有意に増加した。腸内細菌解析では KO 群で *Lactobacillales* の割合が有意に減少し、*Bacteroides* が有意に増加した。さらに SSR69071 および rSLPI の投与により、DSS 腸炎が軽症化した。

エ. 考察：SLPI はマウスの結腸において、炎症性刺激により誘導された。また、SLPI 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、腸管上皮バリア機能の低下を伴い DSS 腸炎が重症化した。一方で、DSS 腸炎を誘導したマウスにプロテアーゼインヒビターを投与することで腸炎の重症化がキャンセルされた。このことより SLPI は腸炎に対し抗プロテアーゼ活性を発揮することで、腸管上皮保護効果を示すと考えられた。また rSLPI が DSS 腸炎を改善したことより、SLPI の IBD 新規治療法として可能性が示唆された。

オ. 結語 (まとめ)： SLPI は結腸において炎症性刺激により誘導され、抗プロテアーゼ作用を介して腸管上皮バリアを保護することで腸炎に対し保護的に働くことが判明した。SLPI は IBD の新規治療薬となる可能性が示唆された。