

学位論文

腸内細菌由来の生理活性物質ポリリン酸による腸管炎症と  
線維化の改善効果に関する研究

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

嘉 島 伸

論文の種類 学位論文

表題 腸内細菌由来の生理活性物質ポリリン酸による腸管炎症  
と線維化の改善効果に関する研究

ランニングタイトル ポリリン酸による腸管炎症と線維化の改善

著者 嘉島 伸

所属機関 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

原稿総頁数 33

図及び表の総数 8

連絡者氏名宛先 嘉島 伸  
〒078-8510 北海道旭川市緑ヶ丘東2条1丁目1-1

電話番号 0166-68-2462

FAX 番号 0166-68-2469

電子メールアドレス shin1014@asahikawa-med.ac.jp

学位論文

腸内細菌由来の生理活性物質ポリリン酸による腸管炎症と線維化の改善効果に  
関する研究

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

嘉島 伸

主任：高後裕教授

## 諸言

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases ; IBDs) は原因不明の慢性、反復性炎症をきたす疾患であり、現在まで根治治療は確立されていない。IBD 患者の多くは、重篤な潰瘍性病変が反復することにより高度の線維化をきたし、その結果、高頻度に腸管狭窄を生じる。腸管狭窄が進展すると腸閉塞などの重篤な合併症をきたすが、この線維化を改善する有効な予防法や治療法はなく、腸管切除や腸管形成術といった外科手術が施行されている。

臓器の線維化の進展には、トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor beta 1 ; TGF- $\beta$ 1)や結合組織増殖因子(connective tissue growth factor ; CTGF), v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (erbb2) や Akt などの細胞内シグナル伝達系の異常活性化が関与している<sup>1-5</sup>。なかでも TGF- $\beta$ 1 の過剰産生は腸管線維化の主役をなすものであり、その下流の Smad 2/3 はリン酸化により Smad 4 との複合体を形成し、核内へと移行することでコラーゲン mRNA の発現を誘導し、腸管線維化を引き起こす<sup>1-3</sup>。最近になって、CD 患者での腸管狭窄症例で TGF- $\beta$ 1 遺伝子 codon25 に高頻度に変異がみられること<sup>6</sup>, UC 患者では TGF- $\beta$ 1 遺伝子のプロモーター領域 position-800 に高頻度に変異がみられること

が明らかにされ<sup>7</sup>, TGF- $\beta$ 1 の異常が IBD における過剰な腸管線維化に関与していることが示唆された. 一方, CTGF は創傷治癒過程において腸管線維化を促進するとともに, 線維化の維持にも関与しており, 難治性の腸管線維化の発生の要因となっている<sup>8</sup>.

IBD を含む腸炎患者では, 健常人と異なった腸内細菌叢を呈しており<sup>9</sup>, その病態への関与が示唆されている. 宿主に有益な効果をもたらす微生物, いわゆるプロバイオティックスの投与は腸炎疾患に対して改善効果があることが報告されており<sup>10</sup>, さまざまな臨床試験により *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E. coli Nissle* や *Clostridium* などが抗生剤起因性腸炎<sup>11, 12</sup>や壊死性腸炎<sup>13, 14</sup>に対して有効性が示されている. 一方, IBD<sup>15-20</sup>に対するプロバイオティクス治療の効果は, 使用菌種や対象症例の背景によって大きく異なり, 一定の見解が得られていない. また, プロバイオティックスの作用機序については, 病原菌に対する直接作用, 菌自体が腸管粘膜に接触することによる作用に加え, 菌由来成分を介した腸管保護作用が知られている. 我々の研究室では, *Bacillus subtilis* の培養上清から菌由来の腸管保護活性物質 competence and sporulation factor (CSF)を同定し, 引き続いて, *Lactobacillus brevis* SBL88 (*L. brevis* SBL88) の培養上清から腸管保護活性物質ポリリン酸を同定した. これら二つの分子は腸管のバリア機能を増強し, デキストラン硫酸ナトリウム(dextran sodium

sulfate ; DSS)誘発急性腸炎モデルにおける腸管障害を改善することを報告した<sup>21-24</sup>. Yan F らは *Lactobacillus rhamnosus GG*により産生される p40, p75 という 2 種類の生理活性物質を発見し<sup>25</sup>, p40 がオキサゾロン誘発腸炎モデルにおいて腸管上皮の障害と炎症に対する保護作用を有することを報告した<sup>26</sup>. これらの研究成果から, プロバイオティクスは菌特異的な生理活性物質を分泌することで腸管障害を改善させる作用を持つことが明らかにされた. しかし慢性炎症に伴う腸管障害や線維化がこれらの菌由来活性物質により, 改善されるか否かについてはいまだ不明である. 本研究では, *L. brevis* SBL88 由来の生理活性物質であるポリリン酸のマウス慢性腸炎モデルにおける腸管炎症と線維化の改善効果を検討し, さらにポリリン酸が腸管組織のどのような細胞を標的とするかについて, 腸管上皮細胞, 単球系細胞, 腸管線維芽細胞の細胞株を用いて明らかにする.

## 材料と方法

### 1. ポリリン酸の作成

ポリリン酸を作成するため, 1mlの混合反応液(50mMのトリス塩酸バッファー (pH7.4), 40mMのアンモニア硫酸塩, 4mMの塩化マグネシウム, 40mMのクレアチンリン酸, 20ng/mlのクレアチンキナーゼ, 1mMのATP(pH7.2), 1Uの

*Propionibacterium shermanii* 由来のポリリン酸キナーゼ(polyphosphate kinase ;PPK) を37°Cで3時間反応させた。反応混合液に50mMの塩化カルシウム100mlを加え、合成ポリリン酸を凝集させ、5000Xgで10分間遠心分離した。その沈殿物に50mMのエチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA)溶液を加えて溶解し、3kDa MWCO膜を装着したチューブを用いて透析して、低分子量の成分を除外した。

## 2. マウス

本研究は、旭川医科大学教育研究推進センター動物実験支援部門の承認をうけて行った。C57Bl/6 マウスは Sankyo Labo Service(Tokyo, Japan)より購入した。

## 3. DSS 慢性腸炎モデルの作成

6週齢の C57Bl/6 マウスに分子量 2500Da の DSS 溶液(3%)を 5 日間自由飲水させ、その後 20 日間通常の水を飲水させることで DSS 慢性腸炎モデルを作成した<sup>27</sup>。このモデルでは、19 日目以降に線維化が完成されることが示されている<sup>28</sup>。実験開始後 25 日目より 10 日間連日 100 µg/ml の ポリリン酸溶液 100µl または 100µl のリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline; PBS)を経肛門的に注腸投与し、35 日目で蛋白と RNA 抽出のため大腸粘膜を採取した。また切除した大腸切片をホルマリン固定し、ヘマトキシリン-エオジン(Hematoxylin-Eosin; HE)染色と蛍光免疫染色の標本とした。

#### 4. 細胞株

ヒト腸管上皮細胞として Caco2bbe 細胞, ヒトのマクロファージ様細胞として THP-1 細胞, ヒト腸管筋線維芽細胞として CCD18-co 細胞を用いた(ATCC, Manassas, Virginia). 培養液は, high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Caco2bbe 細胞), Roswell Park Memorial Institute(RPMI) (THP-1 細胞), Minimum Essential Medium(MEM)(CCD18-co 細胞)を用い, 10%(vol/vol) fetal bovine serum (FBS), 2mM L-グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンと 10  $\mu$ g/ml トランスフェリンを添加した (Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY). 培養環境は 5% CO<sub>2</sub> 下, 37°Cの湿潤状態とし, 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>の濃度で細胞を 6 穴プレートに撒いた.

THP-1 細胞は, 200nMのPhorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を3日間投与したのち, PMAを含む培地を除去し, 上記の培養液で5日間培養し, マクロファージへと分化させた<sup>29</sup>.

#### 5. 細胞株へのリポポリリサッカライド(Lipopolysaccharide ; LPS)および TGF- $\beta$ 1の投与

ヒト腸管上皮細胞の Caco2bbe 細胞とヒトマクロファージ様細胞の THP-1 細胞に, *Escherichia coli* 由来 LPS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) (1 $\mu$ g/ml), ポリリン酸(20 $\mu$ g/ml)を投与し, 24 時間後に RNA を抽出し, Real time-PCR に



て炎症関連サイトカインや線維関連分子の発現を評価した。またポリリン酸が線維芽細胞に対する作用が有しているのか否かを検討するため、ヒト筋線維芽細胞である CCD18-co 細胞を 100ng/ml の TGF- $\beta$ 1 (Human Latent Transforming Growth Factor  $\beta$  1; hLatent TGF- $\beta$  1) (Cell signaling technology, Beverly, MA) で刺激してコラーゲンの発現を誘導した。この細胞にポリリン酸(20 $\mu$ g/ml)を投与して 24 時間後に RNA を抽出し、Real time -PCR を用いてコラーゲン mRNA の発現を評価した。

## 6. Western blotting

マウス大腸腸管上皮より Mammalian Cell Extraction Kit (BioVision, Mountain View, CA) を用いて細胞を可溶化した。吸光度計を用いてこの可溶化物内の蛋白質濃度を測定して、5-30  $\mu$ g の濃度になるように調整し、Laemmli を加え沸騰させた。これを 12.5% sodium dodecyl sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)にて泳動し、バッファー(25 mM Tris, pH 8.8, 192 mM グリシン, 20% (vol/vol)メタノール)中でニトロセルロース膜に転写した。その後、1% (wt / vol) bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を添加した 0.05% (vol/vol) Tween 20 (T-PBS) を用いて、ニトロセルロース膜の非特異的反応をブロックし、各種一次抗体[抗リン酸化 Akt 単クローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.), 抗 CTGF 多クローナル抗体 (Abcam,

Cambridge, England), 抗 TGF  $\beta$ 1 単クローナル抗体 (Abcam), 抗 Smad 4 単クローナル抗体 antibody (Abcam), 抗コラーゲン IV 多クローナル抗体 (Abcam), 抗 erbb2 多クローナル抗体 (Abcam)]と 4°Cで16時間反応させた. T-PBS で 3 回洗浄後, それぞれの特異的二次抗体 [horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (R&D systems, Minneapolis, MN)]で1時間反応させ, Super-Signal West Pico (Thermo science)を用いて発色させた. アクチン(BD Transduction Laboratories, Lexington, KY)の発現量を内部コントロールとして, それぞれの蛋白発現量を標準化した.

## 7. Real-time PCR

マウス慢性腸管モデルの腸管上皮および細胞株から RNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて RNA を抽出した. 腫瘍壊死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ; TNF $\alpha$ ), インターロイキン 1 $\beta$ , インターフェロン $\gamma$ , インターロイキン 4, インターロイキン 6, インターロイキン 10, TGF $\beta$ 1, コラーゲン I, コラーゲン IV の発現は high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて cDNA を作製し, 特異的プライマー(Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて, real-time PCR にて検出した. 18S rRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA)の発現量を内部コントロールとして標準化した.

## 8. 病理学的重症度評価

DSS 慢性腸炎モデルにおける病理学的重症度は Berg's score を用いて評価した

<sup>30</sup>. 腸管炎症の重症度は、腸管の部位に応じて変化するため、それぞれの大腸サンプルにおける 3 か所の代表的な部位で評価した. 表 1 に示す criteria に従い、0 から 4 の間でスコア化した.

腸管の線維化はマッソントリクローム染色を用いて評価した. 1 視野(200 倍)で マッソントリクロームにより染色された部位の面積を、NIH imaging (image J)を用いて計測した.

## 9. 蛍光免疫染色

コラーゲン IV の蛍光免疫染色は 抗コラーゲンIV多クローナル抗体 (Abcam) を用いて行った. 脱パラフィン, 再水和した後, 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加のメタノールでペルオキシダーゼブロックした. スライドは 10 mM citrate buffer (pH 6.0) をマイクロウェーブ で加熱し, 抗原賦活した. 室温で冷却後, 10% ヤギ血清を用いて非特異的反応をブロックし, 1 次抗体と 4°C で反応させた. 2 次抗体には Alexa 594 2 次抗体 (Invitrogen-Molecular Probes)を用い, 核の染色には DAPI (Lonza)を用いた. 共焦点顕微鏡を用いて画像イメージを取得し, 染色部位の蛍光強度を分析ソフトウェアで測定した.

## 10. 統計処理

データはいずれも平均±標準誤差で示した。有意差検定には Student's t-test, Mann-Whitney U 検定を用い,  $p<0.05$  を統計学的有意差ありと判断した。

## 結果

### 1. ポリリン酸投与によるマウス DSS 慢性腸炎モデルの体重, 腸管長, 組織学的腸炎の変化

マウス DSS 慢性腸炎モデルにおいて, 実験開始後 35 日目の時点での体重は, コントロール群で  $24.75\pm 0.75(\text{g})$ , DSS+PBS 群で  $23.0\pm 0.41(\text{g})$ , DSS+ポリリン酸群で  $23.25\pm 1.11(\text{g})$ であり有意差は見られなかった (図 1 A) ( $n=4$ )。腸管長(大腸)の検討では, コントロール群で  $100\pm 1.70 (\%)$  ( $7.65\pm 0.13(\text{cm})$ ), DSS+PBS 群で  $73.53\pm 1.57 (\%)$  ( $5.625\pm 0.12(\text{cm})$ ), DSS+ポリリン酸群で  $87.25\pm 1.96 (\%)$  ( $6.675\pm 0.15(\text{cm})$ )であり, コントロール群と比べ, DSS+PBS 群では有意に腸管が短縮していた。DSS+PBS 群と比較して DSS+ポリリン酸群では腸管短縮が有意に軽減された(図 1 B) ( $n=4$ ) ( $p<0.05$ )。HE 染色では, DSS+PBS 群で粘膜から筋層にかけて強い炎症細胞の浸潤を認め, DSS+ポリリン酸群で炎症細胞の浸潤は軽減していた(図 1 C)。大腸の組織学的重症度は, コントロール群で  $0.17\pm 0.07$ , DSS+PBS 群で  $3.00\pm 0.64$ , DSS+ポリリン酸群で  $2.08\pm 0.25$  であり, コントロール群と比較し, DSS+PBS 群で有意に高値であった。

DSS+PBS 群と比較して DSS+ポリリン酸群で有意に低値であった(図 1 D) (n=4)(p<0.05). これらの結果より, ポリリン酸は DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管障害を改善させることが明らかになった.

## 2. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管線維化の変化

DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管の線維化を評価するため, マッソントリクローム染色を行い(図 2 A), 膠原線維の面積を計測した. 膠原線維の面積比は, コントロール群で  $1.00 \pm 0.31$ , DSS+PBS 群で  $2.60 \pm 0.58$ , DSS+ポリリン酸群で  $1.65 \pm 0.28$  であり, コントロール群と比較し, DSS+PBS 群で粘膜下層を中心とした線維化が有意に増加しており, この線維化はポリリン酸投与によって有意に改善した (図 2 B) (n=4) (p<0.05). 抗コラーゲン IV 抗体による蛍光免疫染色を行い(図 2 C), 染色部位の蛍光強度を測定した. 蛍光強度比はコントロール群で  $1.00 \pm 0.12$ , DSS+PBS 群で  $2.74 \pm 0.69$ , DSS+ポリリン酸群で  $1.12 \pm 0.37$  であり, コラーゲン IV は DSS+PBS 群ではコントロール群と比較して大腸粘膜および粘膜下層で有意に発現が亢進しており, DSS+ポリリン酸群では DSS+PBS 群よりも有意にコラーゲン IV の発現が減少していた(n=4) (p<0.05). Western blotting においても同様に, コラーゲン IV の発現はコントロール群と比較して DSS+PBS 群で有意に増加し, ポリリン酸の投与によっ

て有意に改善した (図 2 D). 以上より, 慢性炎症モデルにおいてポリリン酸の投与により腸管の線維化が改善することが示された.

### 3. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルの腸管組織中の炎症関連サイトカインの発現変化

DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管組織中の炎症関連サイトカインの発現を real-time PCR で評価した. コントロール群と比較し, DSS+PBS 群ではインターロイキン 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , インターフェロン $\gamma$ , インターロイキン 10 の mRNA の発現は有意に亢進し, インターロイキン 4 は変化がなかった. DSS+ポリリン酸群では, DSS+PBS 群と比較し, インターロイキン 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , インターフェロン $\gamma$ の発現が有意に抑制されていた (表 2).

### 4. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルの線維化関連分子の変化

DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管組織中の線維化関連分子の発現を Western blotting を用いて評価した. DSS+PBS 群では, コントロール群と比較して TGF- $\beta$ 1, Smad4, CTGF は有意に増加していたが, erbb2 とリン酸化 Akt では変化がなかった. DSS+ポリリン酸群では, DSS+PBS 群と比較し, 有意に TGF- $\beta$ 1, Smad4, CTGF が低下していた (図 3). 以上よりポリリン酸は, この

腸炎モデルで過剰発現していた TGF- $\beta$ 1, CTGF などの線維化関連分子を有意に減少させることが明らかになった。

## 5. 腸管上皮, 単球系細胞, 線維芽細胞における LPS および TGF- $\beta$ 1 投与下の炎症・線維化関連メディエーターの発現とポリリン酸投与の影響

ポリリン酸による線維化抑制作用の標的細胞を明らかにする目的で, 腸管組織を構成し, 線維化に関与する腸管上皮細胞, 単球系細胞, 線維芽細胞に対するポリリン酸の作用について *in vitro* で検討した。

腸管上皮由来 Caco2bbe 細胞を LPS で刺激したところ, コントロール群と比較し, TGF- $\beta$ 1, インターロイキン 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ の発現が有意に亢進した。LPS+ポリリン酸群では, LPS 単独群に比べ, TGF- $\beta$ 1, インターロイキン 1 $\beta$ の発現が有意に低下していた (表 3)。

PMA を用いてマクロファージへ分化させた THP-1 細胞を LPS で刺激したところ, コントロール群と比較して, インターロイキン 1 $\beta$ , インターロイキン 6, インターロイキン 10, TNF $\alpha$ の発現は有意に亢進したが, TGF- $\beta$ 1 の発現に変化は無かった。LPS+ポリリン酸群では, LPS 単独群と比較し, TNF $\alpha$ の発現が有意に低下した(表 4)。

腸管線維芽細胞の細胞株として CCD18-co 細胞を用い, TGF- $\beta$ 1の刺激により

増加するコラーゲン産生へのポリリン酸の作用を検討した。TGF- $\beta$ 1刺激により、コントロール群と比較して有意にコラーゲンの発現は亢進していたが、TGF- $\beta$ 1+ポリリン酸群では TGF- $\beta$ 1単独群と比較して変化はみられなかった(表 5)。以上から、ポリリン酸の線維芽細胞への直接作用は無く、腸管上皮細胞に作用して、上皮由来 TGF- $\beta$ 1産生を抑制することで、線維芽細胞からのコラーゲン産生を制御することが明らかになった。

## 考察

本研究では、プロバイオティクスである *Lactobacillus brevis* 由来のポリリン酸が腸管炎症とともに線維化をも改善させることを初めて報告した。これまで、*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli Nissle* や *VSL#3* は抗生剤起因性腸炎や壊死性腸炎などの腸炎による腸管障害を改善することが知られている<sup>10-14, 15, 17-20, 31-33</sup>。しかし、プロバイオティクスやプロバイオティクス由来の生理活性物質の線維化改善作用については、これまで明らかにされていなかった。本研究で用いた慢性腸炎モデルは DSS 投与開始 19 日後には線維化が形成されており<sup>28</sup>、このモデルでポリリン酸の抗線維化作用が証明されたことから、ポリリン酸は線維化の形成過程のみならず、すでに完成された線維化に対する改善作用をも有することが証明された。したがって、ポ



ポリリン酸は腸炎による線維化に起因する腸管通過障害や腸閉塞の予防や改善に有効な新規治療薬となることが期待される。

ポリリン酸の抗線維化作用の機序について、線維化関連分子の発現解析から検討した結果、ポリリン酸はコラーゲンの発現を減少させ、TGFβ1-smad 系と CTGF の発現を抑制することが明らかになった。TGF-β1 は TGFβ レセプターと結合し、Smad 2/3-Smad 4 複合体を形成し、腸管線維化を促進するコラーゲンなどの線維化関連分子を増加させる<sup>3</sup>。また、CTGF は線維化の維持に主要な役割を果たしていることが知られている<sup>34</sup>。したがって、ポリリン酸は腸管線維化の亢進と維持の両者を阻害するものと考えられる。UC 患者では TGF-β1 の血清濃度および mRNA 発現が増加していること<sup>35</sup>、また TGF-β1 の遺伝子多型が CD および UC における腸管狭窄と関連があることが明らかにされており<sup>6,7</sup>、IBD における腸管線維化は、TGF-β1 の過剰発現と密接に関連することが示唆される。TGFβ1 の過剰発現を抑制するポリリン酸は、IBD 患者の腸管線維化治療に有用であると考えられる。

急性腸炎モデルにおけるプロバイオティクスと、プロバイオティクス由来生理活性物質の有効性は報告されているが<sup>21-25, 36-40</sup>、慢性腸炎モデルにおけるプロバイオティクス由来生理活性物質の有効性は明らかにされていない。本研究では、*Lactobacillus brevis* 由来のポリリン酸がマウス慢性腸炎モデルにおいて、

大腸の腸管長の短縮と病理学的重症度を改善することを明らかにした。ポリリン酸を投与したマウスではインターロイキン 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , インターフェロン $\gamma$ などの炎症性サイトカインの発現レベルが劇的に減少していた。ポリリン酸は抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 の発現レベルには変化を与えておらず、マウス慢性腸炎モデルにおけるポリリン酸の腸管炎症の改善は、炎症性サイトカインの発現低下に起因するものと思われた。炎症性サイトカインをターゲットとした生物学的製剤はクローン病患者の寛解導入、維持に有用であるが、20~50%のクローン病患者において薬剤の反応性低下が起こるとされており<sup>41-43</sup>、ポリリン酸がそのような生物学的製剤への反応性が低下した症例の寛解導入、維持の補助となりうるかもしれない。

ポリリン酸が腸管組織のどの細胞を標的として線維化改善作用を発揮するかについて明らかにする目的で、腸管組織を構成する線維化関連の細胞である<sup>44</sup>、腸管上皮由来 Caco2bbe 細胞、単球系由来 THP-1 細胞に対しては LPS 刺激をし、線維芽細胞由来 CCD18-co 細胞に対しては TGF- $\beta$ 1 刺激をすることにより、線維化関連分子の発現を検討した。その結果、Caco2bbe 細胞では LPS の刺激により過剰な TGF- $\beta$ 1 産生が誘導され、ポリリン酸の投与により、その発現は有意に低下した。一方、PMA によりマクロファージに分化した THP-1 細胞では、LPS を投与しても TGF- $\beta$ 1 の発現には変化が見られなかった。また、腸管線維

芽細胞である CCD18-co 細胞では TGF- $\beta$ 1 の刺激によりコラーゲン I および IV の過剰発現が認められ、ポリリン酸の投与にても発現レベルに変化がみられなかった。以上から、ポリリン酸には腸管線維芽細胞への作用はなく、腸管上皮細胞の TGF- $\beta$ 1 産生を抑制することで、腸管線維芽細胞からのコラーゲン産生を低下させ腸管線維化を改善するものと考えられた。

また、ポリリン酸の抗炎症作用の標的細胞についても検討した。腸管上皮由来 Caco2bbe 細胞および単球系由来 THP-1 細胞を用いて、LPS 刺激による炎症関連サイトカインの発現を解析した結果、Caco2bbe 細胞では、LPS 刺激によって TNF $\alpha$ 、インターロイキン 1 $\beta$  の過剰発現を認め、ポリリン酸投与によってインターロイキン 1 $\beta$  の発現が抑制された。一方、マクロファージに分化させた THP-1 細胞では、LPS 刺激により TNF $\alpha$ 、インターロイキン 1 $\beta$ 、インターロイキン 6、インターロイキン 10 が過剰発現し、ポリリン酸の投与により TNF $\alpha$  の発現が低下した。また、マウス慢性腸炎モデルにおいて、DSS+PBS 群でインターフェロン $\gamma$  は有意に発現が亢進し、ポリリン酸の投与により、有意に減少していた。インターフェロン $\gamma$  は、CD4+T 細胞や NK 細胞で多く産生される<sup>45</sup>。CD4+T 細胞や NK 細胞におけるインターフェロン $\gamma$  の産生に対するポリリン酸の作用については、今後、検討していく必要がある。

ポリリン酸は腸管上皮細胞におけるインターロイキン 1 $\beta$  の発現亢進を抑制し、

マクロファージでは  $\text{TNF}\alpha$  の発現亢進を抑制したことから、ポリリン酸は細胞の種類によって異なる作用を発揮する可能性が示された。今後そのメカニズムについて明らかにしていくことで、ポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発が期待される。

## 結語

*Lactobacillus brevis* 由来の生理活性物質であるポリリン酸はマウス慢性腸炎モデルにおいて、腸管短縮の改善、組織学的線維化および炎症の改善作用があることを明らかにした。その機序として、炎症により過剰発現した  $\text{TGF-}\beta 1$ , Smad 4, CTGF などの線維化関連分子の産生抑制および炎症性サイトカイン(インターロイキン  $1\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$  , インターフェロン $\gamma$ )の発現抑制が関与していると考えられた。

腸管組織を構成する、上皮細胞、単球系細胞、線維芽細胞を用いて、ポリリン酸の標的細胞を検討した結果、ポリリン酸は腸管上皮からの  $\text{TGF-}\beta 1$  の発現を抑制することで、 $\text{TGF-}\beta 1$  刺激による腸管線維芽細胞からのコラーゲン産生を抑制することが明らかになった。また、腸管上皮細胞に対してはインターロイキン  $1\beta$  の発現抑制作用を、マクロファージに対しては  $\text{TNF}\alpha$  の発現抑制作用を発揮することが明らかになり、標的細胞によって異なる作用をもつことが示さ

れた。今後その作用メカニズムについてさらに詳しく解明していくことで、ポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発が期待される。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、終始御指導を賜りました旭川医科大学医学部内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後 裕教授に深謝しますとともに、実験に関する御助言を頂きました同分野 藤谷幹浩准教授、小西弘晃研究助手に感謝します。

## 文献

1. Padgett RW, Das P, Krishna S. TGF-beta signaling, Smads, and tumor suppressors. *Bioessays* 1998; **20**: 382-390.
2. Kretschmar M, Massague J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 103-111.
3. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Varga J. Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* 2000; **19**: 3546-3555.

4. Fares JA, Nethery DE, Kern EF, Eisenberg R, Jacono FJ, Allen CL, Kern JA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated by a monoclonal antibody targeting HER2. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 2077-2083.
5. Xia H, Diebold D, Nho R, Perlman D, Kleidon J, Kahm J, Avdulov S, Peterson M, Nerva J, Bitterman P, Henke C. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2008; **205**: 1659-1672.
6. Hume GE, Fowler EV, Lincoln D, Eri R, Templeton D, Florin TH, Cavanaugh JA, Radford-Smith GL. Angiotensinogen and transforming growth factor beta1: novel genes in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Med Genet* 2006 ;**43**: e51.
7. Tamizifar B, Lankarani KB, Naeimi S, Rismankar Zadeh M, Taghavi A, Ghaderi A. Promoter polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 243-247.
8. Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner

- S.Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 909-922
9. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; **464**: 59-65.
  10. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, Antonopoulos DA, Jabri B, Chang EB. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*<sup>-/-</sup> mice. *Nature* 2012; **487**: 104-108.
  11. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in

- prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002; **324**: 1361.
12. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**: 812-22.
  13. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, Hammerman C. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005; **147**: 192-196.
  14. Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005; **115**: 1-4.
  15. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; **354**: 635-639.
  16. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis



onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial.

Gastroenterology 2003; **124**: 1202-1209.

17. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut 2004; **53**: 1617-1623.
18. Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther 2004; **20**: 1133-1141.
19. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. Am J Gastroenterol 2005; **100**: 1539-1546.
20. Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A,

- Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **23**: 1567-1574.
21. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind O, Jabri B, Chang EB. The Bacillus subtilis quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 2007; **1**: 299-308.
22. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 2011; **6**: e23278.
23. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-killed body of lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 2011; **17**: 2235-2250.
24. Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T,

- Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y . Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Dis* 2012; **27**: 1039-1046.
25. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007; **132**: 562-575.
26. Yan F, Cao H, Cover TL, Washington MK, Shi Y, Liu L, Chaturvedi R, Peek RM Jr, Wilson KT, Polk DB. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2011; **121**: 2242-2253
27. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; **288**: 1328-1338.

28. Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawauchi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H, Takagi R. Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol* 2012; **45**: 140-151.
29. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Plos one* 2010; **13**; **5(1)**: e8668.
30. Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996; **15**; **98(4)**: 1010-1020.
31. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD003048.

32. Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: CD004827.
33. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm M. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; **53**: 108-114.
34. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; **181**: 153-159
35. Stadnicki A, Machnik G, Klimacka-Nawrot E, Wolanska-Karut A, Labuzek K. Transforming growth factor-b1 and its receptors in patients with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 2009; **9**: 761-766.
36. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in

- murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2005; **140**: 417-426.
37. Hoffmann M, Messlik A, Kim SC, Sartor RB, Haller D. Impact of a probiotic *Enterococcus faecalis* in a gnotobiotic mouse model of experimental colitis. *Mol Nutr Food Res* 2011; **55**: 703-713.
38. Kamada N, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Matsuoka K, Sato T, Chinen H, Hong KS, Yamada T, Suzuki Y, Suzuki T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Hibi T. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 455-463.
39. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; **8**: 71-80.
40. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999; **116**: 1107-1114.

41. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P; ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; **359**: 1541-1549.
42. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; **350**: 876-885.
43. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; **132**: 52-65.
44. Satoshi Ueha, Francis H. W. Shand and Kouji Matsushima. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Frony Immunol* 2012; **10**; **3**: 71.
45. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during

innate and adaptive immune responses. Adv Immunol 2007;  
96:41-101.

## 図表の説明

### 図 1. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管炎症の変化

**A** は実験開始後 35 日目の体重であり、各群で有意な変化はみられなかった (**n=4**). **B** は摘出した大腸の腸管長であり、コントロール群に比べ、DSS+PBS 投与群で有意に腸管長が短縮しており、ポリリン酸の投与により有意に短縮が改善した (**n=4**). \*;  $p < 0.05$  **C-1** はコントロール, **C-2** が DSS + PBS 投与, **C-3** が DSS+ポリリン酸投与の HE 染色像である. **D** は組織学的重症度を評価したグラフであり、コントロール群に比べ、DSS+PBS 投与群で有意にスコアが増加し、ポリリン酸の投与で有意に改善した (**n=4**). \*;  $p < 0.05$

### 図 2. ポリリン酸の投与による DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管線維化の変化

DSS 慢性腸炎モデルにおける腸管の線維化を評価するため、マッソントリクローム染色を行った. **A-1** はコントロール, **A-2** は DSS + PBS 投与, **A-3** は DSS +ポリリン酸投与のマッソントリクローム染色像である. **B** は 1 視野あたりの膠原繊維の面積を評価したグラフであり、コントロールに比べ、DSS+PBS 投与群で有意に増加し、ポリリン酸の投与により、有意に減少していた (**n=4**).



\*; p<0.05

**C-1** はコントロール, **C-2** が DSS + PBS 投与, **C-3** が DSS +ポリリン酸投与の抗コラーゲン IV 抗体による蛍光免疫染色像である(マゼンタで示される部位が抗コラーゲンIV抗体で標識されている).

コラーゲン IV の発現を Western blotting で評価したところ, DSS+PBS 群ではコントロールと比較し, 有意に増加していた. DSS+PBS 群と比較し, DSS+ポリリン酸群では有意に減少していた(**D**) (**n= 4**). \*; p<0.05

### 図 3. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルの線維化関連分子の変化

ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルの線維化関連分子の変化を, Western blotting にて評価した.

DSS+ PBS 群では, コントロール群と比較して TGF- $\beta$ 1, Smad4 ,CTGF は有意に増加していたが, erbb2 とリン酸化 Akt では変化がなかった. ポリリン酸投与により, DSS+PBS 群と比較し, 有意に TGF- $\beta$ 1, Smad4,CTGF が低下していた(**n=4**). \*; p<0.05

### 表 1. 組織学的重症度スコア

### 表 2. ポリリン酸投与による DSS 慢性腸炎モデルの腸管組織中の炎症関連サイ

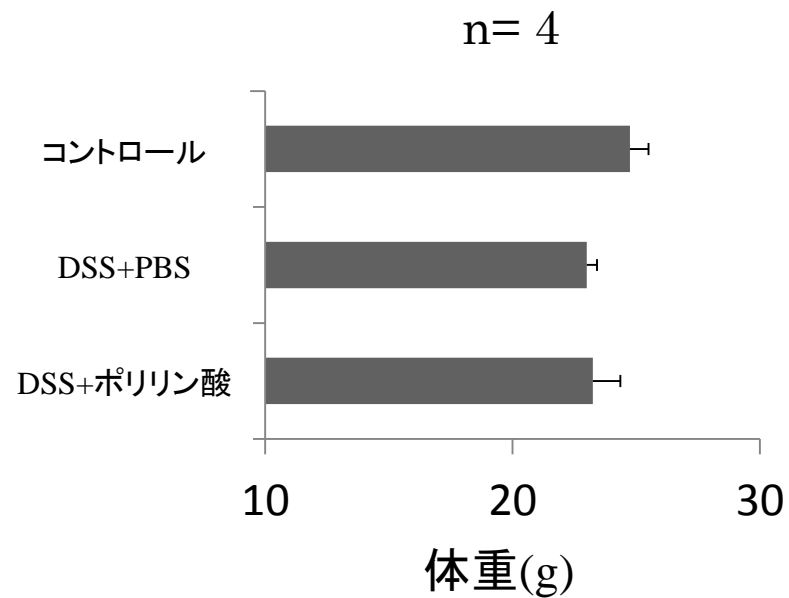
トカインの発現変化

表 3. 腸管上皮細胞における LPS 刺激下炎症関連サイトカイン産生に対するポリリン酸の作用

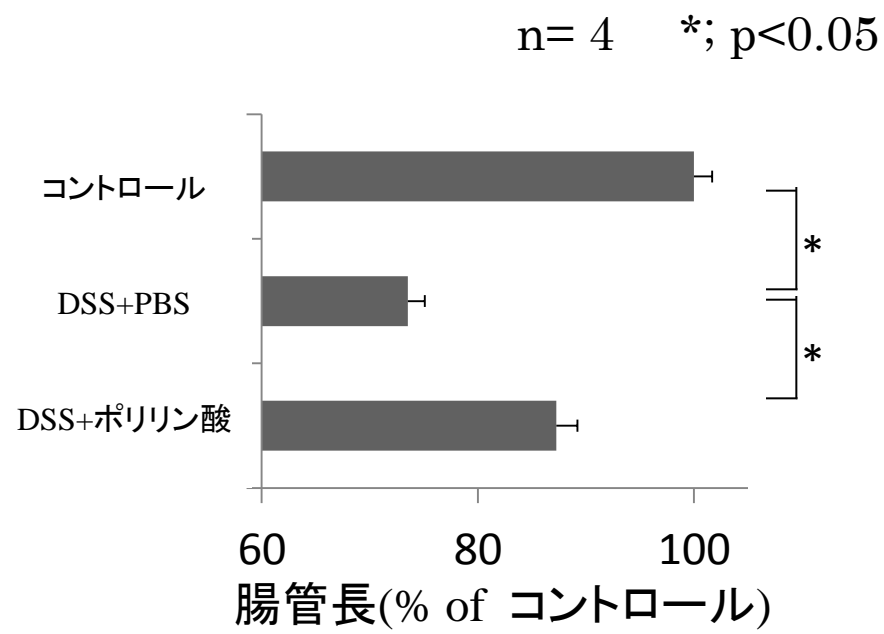
表 4. 単球系細胞における LPS 刺激下炎症関連サイトカイン産生に対するポリリン酸の作用

表 5. 腸管線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 刺激下コラーゲン産生に対するポリリン酸の作用

図 1 A



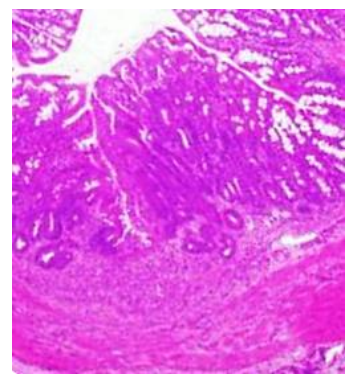
B



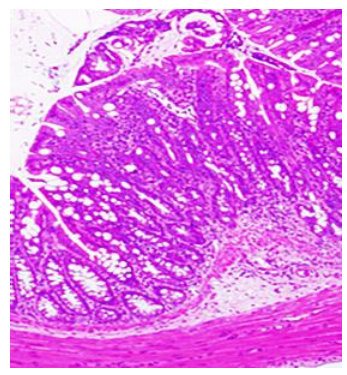
C-1



C-2



C-3



D

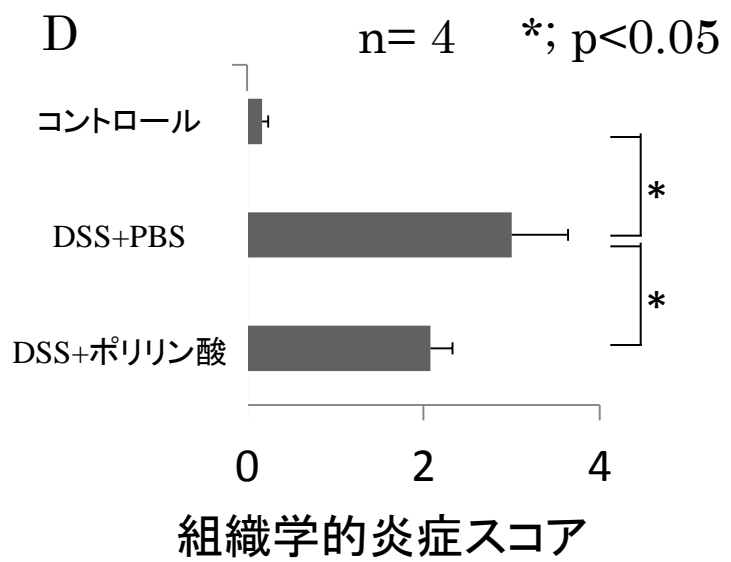
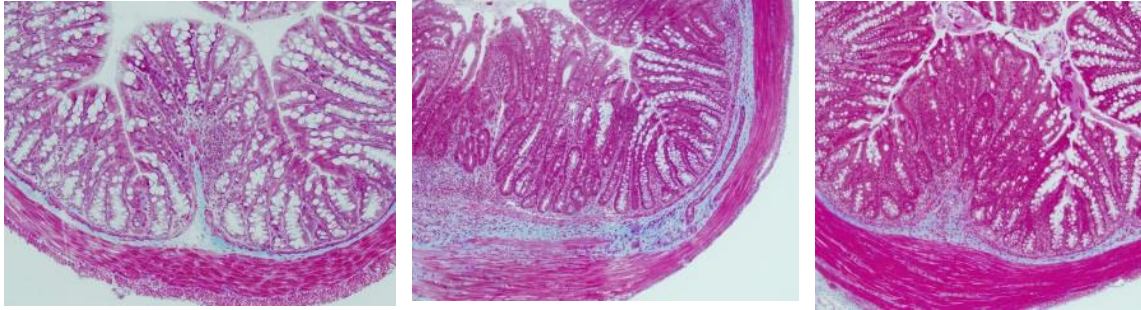


図 2

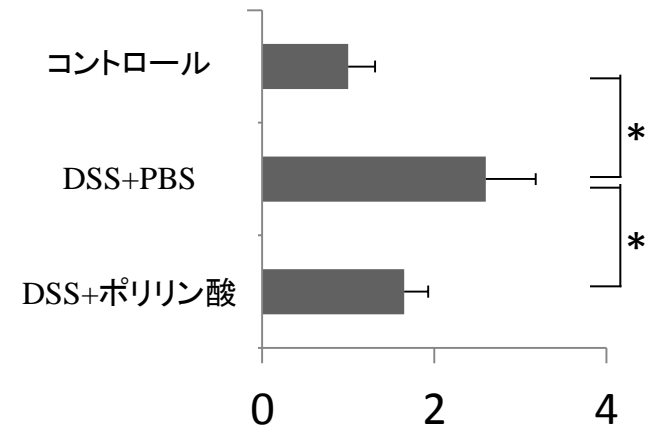
A-1

A-2

A-3



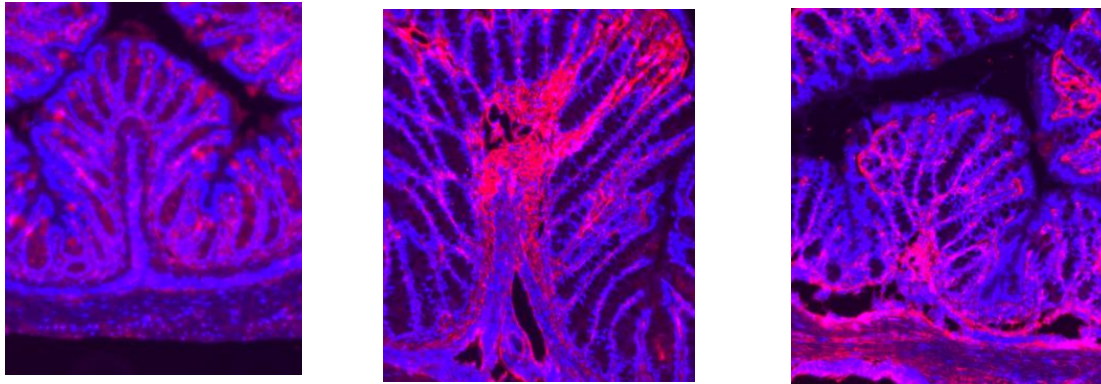
B



C-1

C-2

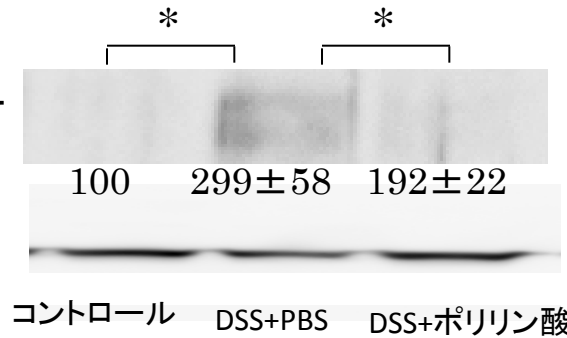
C-3



D

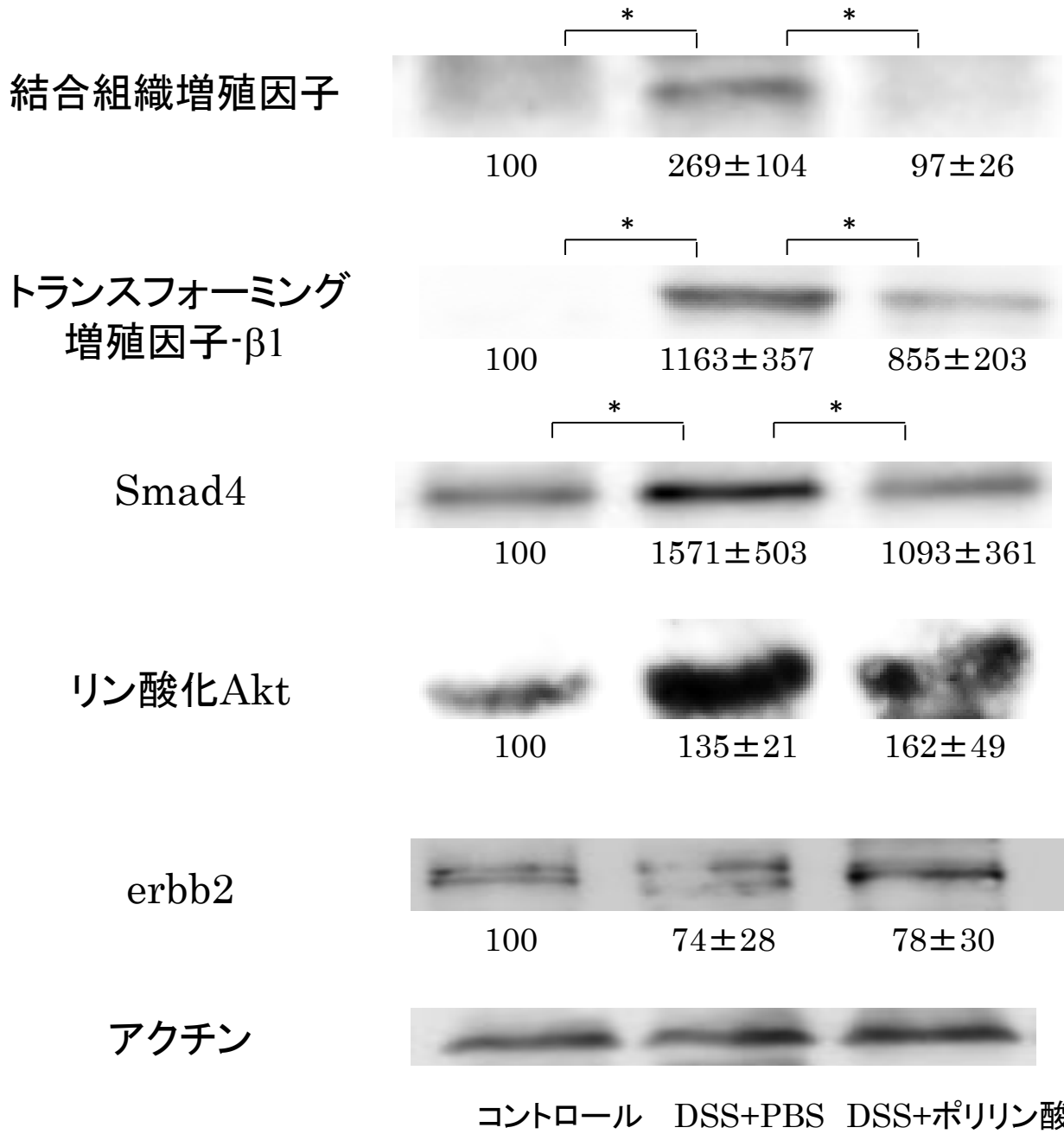
コラーゲンIV

アクチン



n=4 \*; p<0.05

図3



n = 4 \*; p < 0.05

## Histological Score ( Berg ら)

Grade 0: 正常組織

Grade 1: 1つあるいは数個の単核球が粘膜上皮内に浸潤し, 杯細胞からのムチン産生の低下は認めない.

Grade 2: 粘膜上皮内に単核球優位の軽度の炎症細胞浸潤を認める.

Grade 3: しばしば粘膜下層にまで炎症細胞浸潤を認め、ムチン産生低下が認められる.

Grade 4: 筋層まで炎症細胞浸潤が及び,ムチン産生はほぼ消失する.陰窩膿瘍や潰瘍形成が認められる.

表2

mRNA発現比

	コントロール	DSS+PBS	DSS+ポリリン酸
インターロイキン1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.38	108.84 $\pm$ 32.26	71.02 $\pm$ 19.11
インターロイキン4	1.00 $\pm$ 0.35	2.64 $\pm$ 1.58	3.50 $\pm$ 2.30
インターロイキン10	1.00 $\pm$ 0.14	8.14 $\pm$ 3.90	7.56 $\pm$ 5.76
腫瘍壊死因子 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.38	18.93 $\pm$ 7.82	5.38 $\pm$ 3.32
インターフェロン- $\gamma$	1.00 $\pm$ 0.21	82.95 $\pm$ 43.09	8.41 $\pm$ 4.58

n= 4

\*; p<0.05

表3

	mRNA発現比		
	コントロール	リポポリサッカライド	リポポリサッカライド +ポリリン酸
トランスフォーミング 増殖因子- $\beta$	1.00 $\pm$ 0.10	1.82 $\pm$ 0.58	0.92 $\pm$ 0.25
インターロイキン1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.13	2.62 $\pm$ 0.45	1.02 $\pm$ 0.24
腫瘍壊死因子 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.39	3.72 $\pm$ 1.28	3.77 $\pm$ 2.41
インターロイキン6	1.00 $\pm$ 0.59	1.42 $\pm$ 0.66	1.61 $\pm$ 0.17

n= 4

\*; p&lt;0.05



表4

## mRNA発現比

	コントロール	リポポリサッカライド	リポポリサッカライド +ポリリン酸
トランスフォーミング 増殖因子β1	1.00±0.08	1.02±0.04	0.88±0.07
インターロイキン1β	1.00±0.13	12.88±2.43	13.476±1.324
腫瘍壊死因子α	1.00±0.06	1.86±0.20	1.27±0.34
インターロイキン4	1.00±0.12	1.17±0.68	1.17±0.70
インターロイキン6	1.00±0.21	4.10±1.34	4.02±2.42
インターロイキン10	1.00±0.32	2.88±0.90	2.68±1.32
インターフェロンγ	1.00±0.02	1.03±0.36	0.98±0.23

n= 4

\*; p&lt;0.05

表5

## mRNA発現比

	コントロール	トランスフォーミング 増殖因子β1	トランスフォーミング 増殖因子β1+ポリリン酸
コラーゲン I	1.00±0.03	1.67±0.11	1.68±0.17
コラーゲン IV	1.00±0.15	2.71±0.36	2.93±0.29

n= 4

\*; p&lt;0.05