

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	坂谷 慧
<p>学位論文題目</p> <p>Polyphosphate Derived from <i>Lactobacillus brevis</i> Inhibits Colon Cancer Progression Through Induction of Cell Apoptosis (<i>Lactobacillus brevis</i>由来ポリリン酸による アポトーシス誘導を介した大腸癌抑制作用に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>藤谷幹浩、上野伸展、嘉島伸、笹島順平、盛一健太郎、生田克哉、田邊裕貴、高後裕</p> <p>ANTICANCER RESEARCH 36: 591-598 (2016)</p> <p>研究目的</p> <p>大腸癌は発生率の高い悪性腫瘍であり粗罹患率は人口10万人あたり97.7人(2011年)にのぼる。診断時にはすでに進行癌であることが多く、外科手術や抗癌剤での治療に加え、分子標的治療薬などの新規治療法が導入され生存率は改善してきている。しかし、日本における粗死亡率は人口10万人あたり38.7人(2014年)であり、全悪性新生物死亡者数の第2位と相変わらず上位を占めている。予後改善へ向けて、新しい抗腫瘍薬の開発が望まれている。</p> <p>一方、宿主の健康に良い影響を与える微生物と定義されるプロバイオティクスには、抗腫瘍作用を持つという疫学的、基礎的研究が報告されている。プロバイオティクスは機能性食品として使用されており毒性は低いと考えられるため、有害事象の少ない新規治療として期待される。しかし、これまで臨床的に抗癌作用が証明されたプロバイオティクスはない。これは生菌を投与した場合、その効果が宿主の腸内環境によって大きく左右されるためと考えられる。プロバイオティクスが産生する抗腫瘍物質を同定することができれば、腸内環境に左右されない新しい抗癌剤の開発につながると考えた。</p> <p>プロバイオティクス的一种である<i>Lactobacillus brevis</i> SBL8803 (<i>L. brevis</i> 8803)は、大麦に由来する植物性乳酸菌の一つである。これまでに我々は、この菌が腸管粘膜のDNAを障害する酸化ストレスを制御することにより腸管の恒常性を維持することを報告している<sup>(1)</sup>。<i>L. brevis</i> 8803は抗腫瘍作用を有するのではないかと考えた。そこで、この研究では<i>L. brevis</i> 8803の培養上清の抗腫瘍作用を検討し、菌由来の抗腫瘍活性物質を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 細胞株

SW620細胞（ヒト大腸癌細胞株）を用いた。初代培養細胞はマウスの小腸上皮より作製した。

### 2. 細菌培養および培養上清の調整

*L. brevis* 8803をMRS broth培地で培養した後に遠心分離し、そのペレットにDMEM培地を加えて一晚培養し、遠心分離とフィルター濾過により培養上清を調整した。

### 3. スルフォロダミンB (SRB) アッセイ

SW620細胞に試験物を投与し、24、48、72時間後に10%トリクロロ酢酸を加えて細胞を固定し、0.057%スルフォロダミンBで染色した後、乾燥させた。トリス緩衝液で溶解後、510nmの吸光度を測定し、細胞の生存率を評価した。

### 4. ポリリン酸の合成と分解

反応液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、40 mM ammonium sulfate、4 mM MgCl<sub>2</sub>、40 mM creatine phosphate、20 ng/mL creatine kinase、1 mM ATP (pH 7.2)、and 1 U of polyphosphate kinase (PPK)) を調整し、反応、凝集させポリリン酸を合成した。また、*L. brevis* 8803の培養上清に反応液 (50 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 μmol/L ADP、40 mmol/L HEPES-KOH [pH 7.5]、0.1 U/μL PPK) を加え、ポリリン酸を分解した。

### 5. Xenograftモデル

ヌードマウス (BALB/cnu/nu) に抗アジアロGM1抗体を投与後、マウスの背部にSW620細胞を移植した。腫瘍の形成を確認した5日後より連日、ポリリン酸またはATP (25 μg/ml) を100 μLずつ腫瘍部に注射し、腫瘍の大きさを計測した。腫瘍の体積は長径×幅<sup>2</sup>/2により算出した。

### 6. ウェスタンブロット

ポリリン酸 (25 μg/ml) 投与後のSW620細胞または初代培養細胞よりタンパクを回収し、ウェスタンブロットを行った。一次抗体には抗cleaved PARP抗体、抗phospho-ERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体を用いた。ActinとGAPDHを内部コントロールとした。

### 7. TUNEL染色

ポリリン酸投与後のSW620細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、TUNEL染色を行った。蛍光顕微鏡にて撮影し (200倍)、TUNEL陽性細胞と総細胞数を各ウェル3視野ずつそれぞれ計測した。

### 8. Phospho-MAPK タンパク質アレイ

ポリリン酸投与後のSW620細胞のタンパクを回収した後、Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems) を用いて解析した。

## 成 績

### 1. *L. brevis* 8803の培養上清投与後のSW620細胞の細胞生存率の変化

SW620細胞に*L. brevis* 8803の培養上清を投与すると、24、48、72時間後の細胞生存率がコントロールと比較して有意に低下した。

### 2. *L. brevis* 8803由来の抗腫瘍作用活性物質の同定

我々はこれまでに、*L. brevis* 8803由来のポリリン酸が腸管の酸化ストレス制御に寄与していることを報告しており<sup>(2)</sup>、ポリリン酸に着目して検討を行った。*L. brevis* 8803の培養上清にPPKを加えてポリリン酸を分解すると、SW620細胞の細胞生存率は培養上清と比べて有意に高く、*L. brevis* 8803由来の抗腫瘍作用活性物質がポリリン酸であると考えられた。

### 3. ポリリン酸の抗腫瘍作用の検討

SW620細胞に合成したポリリン酸を投与すると、24、48、72時間後の細胞生存率がコントロールと比較して有意に低下した。Xenograftモデルでもポリリン酸投与群はコントロール群と比較して有意に腫瘍の成長抑制が認められた。

### 4. ポリリン酸投与後のアポトーシスの検討

SW620細胞にポリリン酸を投与しTUNEL染色を行った結果、ポリリン酸投与群ではコントロール群と比較してTUNEL陽性細胞が有意に多かった。ウェスタンブロットではポリリン酸群でcleaved PARPが増加していた。

### 5. マウス腸管初代培養細胞へのポリリン酸投与後の変化

マウス腸管より初代培養細胞を作製し、ポリリン酸投与後にSRBアッセイを施行したところ、24、48時間後の細胞生存率はわずかに低下したが72時間後には回復がみられた。また、TUNEL染色ではTUNEL陽性細胞は増加せず、ウェスタンブロットでもcleaved PARPは増加していなかったため初代培養細胞にはアポトーシスは誘導されていないと考えられた。

### 6. ポリリン酸の作用メカニズムの検討

MAPK経路のタンパク質アレイを行うと、SW620細胞ではポリリン酸投与後30分以内にERKのリン酸化が見られた。ウェスタンブロットでもERKのリン酸化は有意に増加していた。MEK阻害剤であるU0126で前処置を行うと、ポリリン酸によるcleaved PARPの増加は阻害された。SRBアッセイでも、U0126にて前処置を行うとポリリン酸による細胞生存率の低下が阻害された。

## 考 案

本研究によって、麦芽乳酸菌*L. brevis* 8803の培養上清が大腸癌細胞の増殖を阻害することを明らかにした。その効果はポリリン酸を分解することにより減少することから、*L. brevis* 8803の抗腫瘍効果は菌由来のポリリン酸によるものと考え、*in vitro*、*in vivo*での検討を行い、その両者でポリリン酸の抗腫瘍作用を確認した。さらに、TUNEL染色とウェスタンブロットの結果から、ポリリン酸が大腸癌細胞をアポトーシスへ誘導することを証明した。一方で、マウスの小腸上皮から作製した初代培養細胞に対してはポリリン酸によるアポトーシス誘導作用は認められず、ポリリン酸は正常腸管に対しての毒性が少ないと考えられた。

また、ポリリン酸による抗腫瘍効果にERK経路の活性化が関与していることを明らかにした。ERKシグナルは細胞増殖にも、アポトーシス誘導にも働くシグナル経路である。この相反する作用のメカニズムとして、ERK活性化のシグナル頻度による制御システムが明らかにされた<sup>(3)</sup>。すなわち、ERK活性化のシグナル頻度が低ければ細胞増殖を抑制し、高ければ細胞増殖を促進することが証明された。今回の研究では、ポリリン酸投与後15分、30分、60分でERKシグナルが活性化しており、活性化状態を維持することでシグナルの頻度を低下させ、癌細胞の増殖を抑制しているのではないかと推測された。今後、作用メカニズムなどをさらに解明することで、ポリリン酸が有害事象の少ない新規抗腫瘍薬となることが期待される。

## 結 論

この研究は、プロバイオティクスである*L. brevis* 8803の培養上清が抗腫瘍作用を持ち、その抗腫瘍活性物質がポリリン酸であることを同定した。今後、ポリリン酸が有害事象の少ない新規抗腫瘍薬となることが期待される。




### 引用文献

1. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, et al. 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* 17: 2235-2250, 2011.
2. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 6: e23278, 2011.
3. Aoki K, Kumagai Y, Sakurai A, et al. Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol Cell* 52: 529-540, 2013.

### 参考文献

1. Sakatani A, Fujiya M, Ito T, et al. Infliximab extends the duration until the first surgery in patients with Crohn's disease. *Biomed Res Int* 2013:879491, 2013.
2. Fujiya M, Kashima S, Sakatani A, et al. Decreased numbers of vascular networks and irregular vessels on narrow-band imaging are useful findings for distinguishing intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia. *Gastrointest Endosc* 80:1064-1071, 2014.
3. Dokoshi T, Fujiya M, Sakatani A, et al. A randomized study on the effectiveness of prophylactic clipping during endoscopic resection of colon polyps for the prevention of delayed bleeding. *Biomed Res Int*. 2015:490272, 2015.
4. Moriichi K, Fujiya M, Sakatani A, et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 30:1639-1643, 2015.
5. Fujiya M, Sakatani A, Dokoshi T, et al. A Bamboo Joint-Like Appearance is a Characteristic Finding in the Upper Gastrointestinal Tract of Crohn's Disease Patients: A Case-Control Study. *Medicine* 94(37):e1500, 2015.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	坂谷 慧
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 谷口 隆信 </p> <p>審査委員 古川 博之 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Polyphosphate derived from <i>Lactobacillus brevis</i> inhibits colon cancer progression through induction of cell apoptosis (<i>Lactobacillus brevis</i> 由来ポリリン酸によるアポトーシス誘導を介した大腸癌抑制作用に関する研究)</p>			
<p>近年、腸内細菌叢とさまざまな疾患の関連性が示され、腸内細菌叢の改善による疾患治療の可能性について多くの研究がなされている。このようなプロバイオティクスは癌の治療においても期待されているが、まだ臨床応用には至っていない。申請者らの研究グループはこれまで、植物性乳酸菌の一種である <i>Lactobacillus brevis</i> SBL8803 の腸管の恒常性を維持する働きについて報告しているが、本研究は同菌の抗腫瘍性効果を、特に菌が産生するポリリン酸に関して詳細に検討したものである。</p> <p>申請者らは最初に、<i>L. brevis</i> の培養上清が大腸癌細胞株 SW620 の細胞生存率を低下させることを見出した。次に、この作用がポリリン酸によるものである可能性を検討するため、上清をポリリン酸キナーゼで処理する実験を行った。その結果、対照と比較し、腫瘍細胞の生存率低下作用が減弱することが明らかになった。さらに、合成ポリリン酸を培地に添加することにより、培養上清と同様の腫瘍細胞の生存率低下作用が認められた。SW620 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植する xenograft モデルでも</p>			

ポリリン酸を局所に注射すると腫瘍の成長が抑制された。

申請者らはポリリン酸の大腸癌細胞に対する作用メカニズムを検討し、少なくともその一部はアポトーシス誘導によるものであることを見出した。MAPK 経路の蛋白質アレイ実験により、ポリリン酸は ERK のリン酸化を誘導することが明らかになり、その上流の MEK を阻害することにより、ポリリン酸の作用が阻害された。これらの結果はポリリン酸による ERK の活性化がアポトーシス誘導に関連していることを示唆している。なお、ポリリン酸は正常マウス腸管上皮細胞に対しては生存率低下などの作用を示さず、癌細胞特異的な作用であることが判明した。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は大腸癌の新しい治療法の開発に示唆を与えるもので、今後が期待される。学術的にも十分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。