

氏名	岡田俊彦
(ふりがな)	(おかだ としひこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 号
学位審査年月日	平成25年7月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice (腸内細菌由来の乳酸が、絶食-再摂食マウスでの大腸上皮細胞回転を促す)
論文審査委員	(主) 教授 内山和久 教授 佐野浩一 教授 岡田仁克

### 学位論文内容の要旨

#### 《緒言》

消化管は恒常性を維持するために、管腔内の環境の劇的な変化に適応しなければならない。そして消化された食物に対する反応は、最も基本的で生理的な適応である。消化管の上皮細胞は素早い自己再生を続けているが、この回転率は常に一定ではなく、経口摂取によって消化管の細胞回転率は大きく変わる。ゆえに、経口摂取は細胞増殖の維持に必須であり、消化管の形態や機能に最も影響を与えるものである。しかし食事摂取がどのようにして消化管、特に大腸の上皮細胞増殖を調節しているのか、その機構は十分に解明されていない。

小腸は栄養の消化吸収の場であるのに対して、大腸は常在細菌叢生着の場である。すなわち、大腸管腔には食事由来の栄養素がほとんど存在しない代わりに、細菌の代謝物など腸内細菌叢によって産生された食物残渣の発酵産物が豊富に存在する。これら腸内細菌叢

と大腸上皮細胞との相互関係は、おそらく大腸癌を含む消化管疾患だけでなく、様々な代謝性疾患にも関係していると考えられる。

#### 《目的》

本研究で我々は、絶食と経口摂取が大腸上皮の細胞回転にどのような影響を与えるかを、腸内細菌に着目して調べ、消化管疾患、特に大腸癌の発症との因果関係についての検討を行った。

#### 《対象と方法》

5週齢の野生型 BALB/c マウスを 12～36 時間の絶食後に再摂食させ、時系列的に大腸組織を採取し、bromodeoxyuridine (BrdU) 陽性の増殖細胞数を計測した。摂食内容を elemental diet (ED) や oral rehydration solution (ORS) に変更して同様の検討を行った。経口で抗生剤を投与したり、無菌マウスでも同様の検討を行い、絶食—再摂食期間中の腸内細菌叢の解析は、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法や denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法を用いて解析した。さらに DGGE 解析の結果をもとにノトバイオトマウスを作製し、比較検討に用いた。マウス糞便のメタボローム解析から、上皮細胞回転に関わる代謝物を割り出し、それらを各マウスに注腸して上皮の増殖細胞数を計測した。大腸上皮細胞から抽出した RNA を網羅的に解析し、発現が強化していた遺伝子の経路解析を行った。発癌物質 azoxymethane (AOM) を投与し、大腸上皮内に誘導される前癌病変 aberrant crypt foci (ACF) をメチレンブルー染色で検出した。

#### 《結果》

- 1) 大腸では、絶食—再摂食 12 時間後に定常状態の 3 倍を上回る過剰増殖が起こり、76 時間後に定常状態まで戻った。
- 2) 食物繊維を含まない ED や ORS で再摂食させても過剰増殖は見られなかった。抗生剤を経口投与して腸内細菌を死滅させても過剰増殖は見られず、無菌マウスでも同様であっ

た。

3) 再摂食マウスの大腸では、細菌数が定常状態の2倍以上に増加していた。増加した細菌の主な種は *Lactobacillus murinus* (*L. murinus*) であり、*L. murinus* ノトバイオートマウスでは、大腸上皮の過剰増殖が再現できた。

4) 代謝物解析の結果に基づき、再摂食マウスで増加する有機酸の混合液を ORS 再摂食マウスに注腸すると、過剰増殖が誘導でき、乳酸のみを注腸してもほぼ同等の増殖が得られた。一方、*L. murinus* 死菌体と有機酸の混合液を注腸すると、通常食での再摂食群と同等の過剰増殖が得られた。抗生剤投与マウスでは、乳酸以外の有機酸は過剰増殖を誘導できなかった。再摂食させた *L. murinus* ノトバイオートマウスの大腸では乳酸が増加していた。

5) 再摂食マウスの大腸上皮細胞で発現が増加する遺伝子群を経路解析すると、エネルギー産生や脂質代謝に関係する経路が亢進していた。

6) 再摂食後に AOM を投与すると ACF 数は増加するのに対し、絶食—再摂食の前に AOM を投与すると ACF 数は激減した。さらに再摂食後に AOM を投与したマウスに抗生剤を経口投与すると、ACF 数は通常レベルまで減少した。

## 《結 論》

絶食—再摂食後の大腸では、上皮細胞の一過性過剰増殖が起こる。ED、ORS、抗生剤や無菌マウスを用いた検討から、この過剰増殖には食物繊維と腸内細菌が必要であることが分かった。DGGE 解析から、腸内細菌の中でも乳酸菌である *L. murinus* が重要であり、メタボローム解析や有機酸の注腸実験の結果と合わせると、*L. murinus* が食物繊維を代謝して産生する乳酸が過剰増殖を誘導する主因子である。さらにこの乳酸が上皮に働きかけて、エネルギー産生に関わる遺伝子経路を亢進させることが示唆された。絶食—再摂食の際の上皮の増殖反応は、発癌物質に曝露されるタイミングによって大腸発癌が促進されたり抑制されたりするという現象を引き起こした。このことは我々の日常的な食生活が大腸発癌に関与している可能性を示唆している。

(様式 乙9)

## 論文審査結果の要旨

消化管は緻密な調節機構を用いて生体のホメオスターシスを維持している。中でも消化管粘膜上皮細胞は、食餌と直接接触し、続いて起こる様々な反応への橋渡しをする重要な役割を果たしている。ところが、経口摂取の際に腸管上皮細胞がどのように反応するかは十分に解明されていない。一方、腸内細菌は栄養代謝・吸収に欠かせない存在であり、経口摂取に対する上皮の反応にも密接に関わっていることが予想される。本研究は、絶食－再摂取時の大腸上皮細胞の反応を、腸内細菌および腸内細菌代謝物と関連づけて解析し、さらに大腸癌発生との関連を明らかにする目的で行われた。

大腸上皮細胞は、絶食－再摂食後に一過性の過剰増殖を来した。この増殖はマウスに食物繊維を多く含む食餌を与えた時や、乳酸投与時に起こることが示された。さらに、発癌物質への曝露のタイミングが前癌病変の形成を左右することが明らかとなった。すなわち、過剰増殖が起きている時期は発癌物質により前癌病変が形成されやすいが、たとえ発癌物質によって上皮細胞に遺伝子変異が入っても、その後の絶食－再摂食で前癌病変は排除された。しかし、発癌の抑制は、絶食期間をおかない自由摂食マウスでは見られなかった。本研究は、これまで不明であった摂食刺激に対する大腸上皮細胞の応答に関する研究に新しい知見を与え、我々の日々の食生活の中に癌化のリスクが潜んでいる可能性を指摘した報告である。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Nature Communications 2013 Apr 3; 4: 1654.  
doi: 10.1038/ncomms2668.