

氏 名 大野 将司

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第808号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成30年 3月 9日

学 位 論 文 題 目 Nanoparticle curcumin ameliorates exoerimental colitis  
via modulation of gut microbiota and induction of  
regulatory T cells

(ナノ化クルクミンは腸内細菌叢の調節と制御性 T 細胞の誘導により実験的腸炎を改善させる)

審 査 委 員 主査 教授 後藤 敏

副査 教授 谷 眞 至

副査 教授 村田喜代史

## 論文内容要旨

※整理番号	815	(ふりがな) 氏名	おおの まさし 大野 将司
学位論文題目	Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. (ナノ化クルクミンは腸内細菌叢の調節と制御性T細胞の誘導により実験的腸炎を改善させる)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) は消化管に炎症を起こす原因不明の慢性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎やクローン病が含まれる。近年、腸内細菌のバランスの乱れがその発症に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。大腸において Segmented filamentous bacteria などの細菌は Th17 細胞を誘導し、一方で <i>Clostridium</i> cluster IV や XIVa、<i>Bacteroides fragilis</i> などの細菌は短鎖脂肪酸などの産生を通じて過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞を誘導することで腸管のホメオスタシスを維持している (Nat Rev Immunol 2013;12(5):321-335)。炎症性腸疾患患者では、これらの腸内細菌叢のバランスが乱れることで、免疫システムに異常をきたしていると考えられている。</p> <p>クルクミンはターメリックの黄色成分で、転写因子 NF-<math>\kappa</math>B を抑制することにより抗炎症作用や抗癌作用を有するとされ、潰瘍性大腸炎において 5 アミノサリチル酸製剤との併用で寛解導入効果とその安全性が確認されている (Clin Gastroenterol Hepatol 2015;13(8):1444-9)。しかし、クルクミンは水溶性が低いために吸収性が非常に悪いという問題があり、クルクミンの吸収性を高める製剤の開発が進んでいる。そこで本研究では、吸収性を高めたナノ化クルクミンの大腸炎に対する効果を腸内細菌叢への影響を含めて解析することを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>8 週齢の Balb/c マウスに 3% のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を自由飲水させて大腸炎モデルを作製した。ナノ化クルクミンはセラヴァリューズ社より供与されたセラクルミンを使用し、DSS 投与 1 週間前より 0.2% の割合で通常飼料に混合して与え、DSS 大腸炎に対する効果を検討した。体重変化率、Disease activity index (DAI)、腸管長・重量を比較検討した。組織学的な検討をヘマトキシリンエオジン染色で行い、大腸透過性を FITC-dextran 法で測定した。大腸組織のサイトカインの mRNA の発現を定量 PCR 法で行った。大腸組織の核内 NF-<math>\kappa</math>B の発現をウエスタンブロット法及び免疫組織化学染色法で行った。<i>In vitro</i> において大腸上皮細胞での NF-<math>\kappa</math>B の抑制効果</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

を大腸上皮細胞株 HT-29 に TNF- $\alpha$  とナノ化クルクミンで刺激し検討した。腸内細菌叢の解析は糞便中の DNA を Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法と定量 PCR 法を用いて解析した。便中の短鎖脂肪酸濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で解析した。大腸粘膜固有層の CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞や CD103<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> 制御性樹状細胞、Gr-1<sup>+</sup> 好中球の割合をフローサイトメトリーで解析した。

#### 【結果】

DSS 投与群に比べて DSS+ナノ化クルクミン群では有意に体重減少を抑制し、DAI や腸管重量/腸管長比は有意に低下した。また、組織学的スコアも有意に低下し、腸管透過性も低下した。これらの結果からナノ化クルクミンは DSS 腸炎を抑制することが示唆された。次に、ウエスタンブロット法及び免疫組織化学染色法で大腸組織中の核内 NF- $\kappa$ B の発現は、DSS 群に比べて DSS+ナノ化クルクミン群で低下した。In vitro においても、大腸上皮細胞で TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の発現増強をナノ化クルクミンが抑制した。大腸組織のサイトカインの発現を定量 PCR 法で解析したところ、DSS 群に比べ DSS+ナノ化クルクミン群では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL1、CXCL2 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が有意に低下していた。CXCL1、CXCL2 は好中球の遊走にかかわるケモカインであるため、大腸粘膜固有層の好中球の割合をフローサイトメトリーで解析したところ、好中球の割合が有意に低下していた。さらに、T-RFLP による腸内細菌叢の解析では、ナノ化クルクミンの投与により *Clostridium* cluster IV や *Clostridium* cluster XIVa の割合が増加しており、定量 PCR 法でこれらの細菌は DSS 群に比べ、DSS+ナノ化クルクミン群で有意に増加していた。HPLC による便中の短鎖脂肪酸濃度の解析では、酪酸濃度がナノ化クルクミンの投与により増加していた。さらにこれと対応するように大腸粘膜固有層の CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞の割合がナノ化クルクミンの投与により増加し、CD103<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> 制御性樹状細胞の割合も DSS 群に比べて DSS+ナノ化クルクミン群で増加していた。

#### 【考察】

本研究ではナノ化クルクミンは DSS 大腸炎を抑制することが示唆された。その機序として、既にクルクミンで報告されているように NF- $\kappa$ B の抑制とそれによる炎症性サイトカインの抑制が考えられた。さらに、腸内細菌叢を解析すると *Clostridium* cluster IV や *Clostridium* cluster XIVa といった酪酸産生菌が増加することが示唆された。実際に便中の酪酸濃度は上昇しており、さらに酪酸により誘導されるとされる制御性 T 細胞や制御性樹状細胞も増加していたため、これらの免疫細胞に影響を与えることによる炎症抑制効果も考えられた。

【結論】 ナノ化クルクミンによる腸炎抑制効果が認められた。その機序としては、NF- $\kappa$ B の抑制以外に、酪酸産生菌の増加と制御性 T 細胞の誘導が考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	815	氏名	大野 将司
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>ターメリックの成分であるクルクミンは抗炎症作用を有し、潰瘍性大腸炎における寛解導入効果とその安全性が確認されている。本論文では、マウスモデルを用いて、吸収性を高めたナノ化クルクミンの腸炎抑制効果とその作用機序を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ナノ化クルクミンは、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発腸炎を抑制する。</li> <li>2) ナノ化クルクミンは、大腸組織における NF-<math>\kappa</math>B の活性化を抑制する。この結果に一致して、TNF-<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math>、好中球遊走に関わる CXCL1、CXCL2 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの発現の抑制、大腸粘膜固有層における好中球割合の低下が見られた。</li> <li>3) ナノ化クルクミン投与群では、便中酪酸濃度の増加と酪酸産生菌割合の増加が見られた。非投与群に比べて制御性 T 細胞や制御性樹状細胞の割合も増加していた。</li> <li>4) 以上から、ナノ化クルクミンは、NF-<math>\kappa</math>B の活性化抑制の他、酪酸産生菌の増加、制御性 T 細胞の増加を通じて、腸炎を抑制すると考えられた。</li> </ol> <p>本論文は、ナノ化クルクミンによる腸炎抑制に酪酸産生菌の関与を示唆する新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 545 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 30 年 1 月 30 日)</p>			