

氏 名 杉谷 義彦

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 870 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 令和 2 年 3 月 1 0 日

学位論文題目 Sodium absorption stimulator prostaticin (PRSS8) has an anti-inflammatory effect via downregulation of TLR4 signaling in inflammatory bowel disease in inflammatory bowel disease.

(炎症性腸疾患患者における TLR4 シグナル抑制を介した Na 吸収を刺激するプロスタシン (PRSS8) の抗炎症作用の解析)

審査委員 主査 教授 平田 多佳子

副査 教授 伊藤 靖

副査 教授 寺田 智祐

論 文 内 容 要 旨

※整理番号	879	(ふりがな) 氏 名	すぎたに よしひこ 杉谷 義彦
学位論文題目	Sodium absorption stimulator prostasin (PRSS8) has an anti-inflammatory effect via downregulation of TLR4 signaling in inflammatory bowel disease in inflammatory bowel disease.(炎症性腸疾患患者における TLR4 シグナル抑制を介した Na 吸収を刺激するプロスタシン(PRSS8)の抗炎症作用の解析)		
<p>【目的】</p> <p>潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患は、再燃と寛解を繰り返す慢性炎症性疾患である。炎症性腸疾患の病態については、遺伝的素因や食事などの環境素因が関与すると考えられており、腸内細菌叢や消化管の過剰な免疫応答が発症の要因と考えられている。プロスタシン(PRSS8)は、1994 年に米国の Julie Chao らのグループがヒト精液より精製した分子量 40kDa のトリプシン様酵素活性をもつセリンプロテアーゼであり、皮膚、膀胱、および肝臓などで抗炎症作用があることが報告されている。大腸において PRSS8 は、上皮 Na チャネルの活性化に関与すると報告されている。Keppner らの報告では、PRSS8 変異ラットを用いた検討では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎が、対照群と比較して PRSS8 変異マウスで腸炎の増悪を認めた。しかしながら、大腸上皮 Na チャネルの活性化については、PRSS8 変異群と対照群で有意差は認められず、その機序は不明であった。そこで、我々は、実験腸炎モデルを用いて、腸炎に対する PRSS8 の効果とその機序を解析し、炎症性腸疾患の病態における PRSS8 の関与について検討することを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>健常人と炎症性腸疾患患者の大腸粘膜における PRSS8 mRNA の発現を real-time PCR 法で検討した。次に大腸組織における PRSS8 の発現を免疫組織化学染色法を用いて検討した。腸炎における PRSS8 の機能を解析するため、PRSS8^{fllox/fllox} マウスと Villin-Cre マウスを交配させ腸管上皮特異的 PRSS8 欠損マウス(PRSS8^{ΔIEC}) を作製し、DSS を用いて腸炎を誘導した。腸炎の重症度を体重変化、腸管長、組織学的所見を用いて評価した。ヒト大腸上皮細胞株 HT-29 細胞を用いて、大腸上皮細胞における PRSS8 の機能を検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>大腸粘膜における PRSS8 mRNA の発現は、健常人と比較して活動期潰瘍性大腸炎および活動期クローン病で有意な低下が認められた。免疫組織化学染色法を用いた検討では、健常人では、PRSS8 の発現は大腸上皮細胞の apical 側に強く認められた。さらに、活動期潰瘍性大腸炎及び活動期クローン病患者では、健常人と比較して大腸上皮細胞における PRSS8 の発現の低下が認められた。DSS 腸炎の重症度の比較では、体重減少率、Disease activity index、および腸管重量/腸管長</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。

比は、コントロールマウスと比較して、*PRSS8*^{ΔIEC} マウスでは有意に高い結果であった。また、組織学的所見と Histological score においても、*PRSS8*^{ΔIEC} マウスは、コントロールマウスと比較して、腸炎の増悪が認められた。*PRSS8*^{ΔIEC} マウスの腸炎増悪の機序を解析するにあたり、Toll-like receptor(TLR)4 が炎症性腸疾患と DSS 腸炎と深く関連していること、肝臓において *PRSS8* は、Toll-like receptor(TLR)4 の発現を抑制し、門脈から肝臓へ流入する lipopolysaccharide(LPS)や飽和脂肪酸などのリガンドによって惹起される過剰な炎症反応を予防している報告があることから、大腸上皮細胞における TLR4 の発現を検討した。コントロールマウスと比較して *PRSS8*^{ΔIEC} マウスにおいて、大腸上皮細胞における TLR4 の発現が増強していた。また、DSS 腸炎においても、コントロールマウスと比較して *PRSS8*^{ΔIEC} マウスで TLR4 の発現上昇が認められた。TLR4-NF-κB 経路の下流の細胞内シグナル分子である phospho-IκBα の発現および核内転写因子である NF-κBp65 の核内移行を immunoblot 法を用いて検討したところ、いずれも DSS 腸炎において、コントロールマウスと比較して、*PRSS8*^{ΔIEC} マウスでは、その発現上昇が認められた。炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6) 及びケモカイン(CXCL1)においても有意な発現上昇が認められた。HT-29 細胞を用いて、TLR4 と *PRSS8* について *in vitro* の検討を行った。immunoblot 法では、*PRSS8* siRNA 導入細胞では、control siRNA 導入細胞と比較して、TLR4 mRNA の発現は変わらなかったが、TLR4 の蛋白発現上昇が認められた。また、*PRSS8* siRNA 導入細胞では control siRNA 導入細胞と比較して、LPS 刺激による phospho-IκBα および核内転写因子である NF-κBp65 の核内移行を immunoblot 法にて検討したところ、発現上昇が認められた。これを支持するように、炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6) 及びケモカイン(CXCL1)においても有意な発現上昇が認められた。

【考察】

炎症性腸疾患患者の大腸粘膜で *PRSS8* の発現低下が認められた。腸内細菌、特にグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分である LPS を認識する TLR4 は、TLR4-NF-κB 経路において、大腸の炎症に深く関わっているが、今回の検討において、大腸上皮細胞の *PRSS8* 発現の低下が、TLR4 を介した局所的な抗炎症活性の低下と関連しており、炎症性腸疾患の病態への関与が考えられた。

【結論】

炎症性腸疾患患者の大腸粘膜における *PRSS8* の発現低下が、TLR4 経路を介した局所の炎症活性と関わっており、その病態への関与が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	879	氏名	杉谷 義彦
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>本論文では、潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患の病態への関与が報告されている上皮 Na チャネルを活性化するプロスタシン (PRSS8) に着目し、炎症性腸疾患患者の大腸粘膜組織、腸管上皮特異的 PRSS8 欠損マウス、およびヒト大腸上皮細胞株を用いて、炎症性腸疾患の病態における PRSS8 の関与について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 活動期炎症性腸疾患患者では、大腸上皮細胞の PRSS8 の発現の低下が認められた。2) 腸管上皮特異的 PRSS8 欠損マウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎の増悪が認められた。3) 腸管上皮特異的 PRSS8 欠損マウスの大腸上皮細胞では、腸炎誘発時および非誘発時ともに TLR4 の発現が上昇し、その下流シグナルが活性化した。4) PRSS8 siRNA を導入したヒト大腸上皮細胞株では、LPS 刺激時および非刺激時ともに TLR4 の発現が上昇し、その下流シグナルが活性化した。5) 腸管上皮特異的 PRSS8 欠損マウスを抗生剤処理すると、腸炎の重症度が対照マウスと同等となり、腸内細菌の LPS と TLR4 の作用の重要性が示唆された。 <p>本論文は、炎症性腸疾患の病態において、PRSS8 の関与とその機序について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 596 字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 2 年 1 月 29 日)</p>			