

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 臨床免疫学教育研究分野 氏名 太田 真二
<p>(論文題目)</p> <p>Cyclosporine protects from intestinal epithelial injury by modulating butyrate uptake via upregulation of membrane monocarboxylate transporter 1 levels (シクロスポリンによるモノカルボン酸トランスポーター1を介した酪酸輸送の制御と腸上皮障害抑制効果)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】シクロスポリンは重症潰瘍性大腸炎に対して速やかな治療効果を発揮する。カルシニューリン阻害薬としての薬理作用が主な機序とされているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。近年、薬剤の治療効果と腸内細菌との関連性が注目されている。我々は、腸内細菌発酵産物で、抗炎症作用・免疫調節作用を有する酪酸に注目した。酪酸は腸上皮細胞(intestinal epithelial cells;IECs)へ作用し、transforming growth factor-β (TGF-β)産生や制御性 T 細胞の誘導が報告されている。本研究では、酪酸の吸収トランスポーターである monocarboxylate transporter 1 (MCT1)のシクロスポリンによる発現調節、粘膜障害抑制効果を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>① 腸炎の評価：8 週齢の C57BL/6 マウスに 4 % dextran sulfate sodium (DSS)を自由飲水させ腸炎を誘発。シクロスポリン (20 mg/kg/day)を連日腹腔内投与し、DSS 開始から 7 日目までの腸炎の評価(体重変化率、腸管長、histological score)を行った。酪酸の関与を調べるため抗菌薬カクテル(abx)を投与した群、および abx 処置後に酪酸のプロドラッグである tributyrin(TB)を連日投与した群、MCT1 阻害薬である α-cyano-4-hydroxy cinnamate(CHC)を併用した群で、腸炎の評価を行った。盲腸内酪酸濃度は LC-MS/MS で定量した。</p> <p>② MCT1 の発現評価：マウスへシクロスポリン(20 mg/kg)投与 24 時間後、EDTA 還流法により IECs を分離した。また、腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞にシクロスポリン(1 μg/ml)を投与 6 時間後、膜分画を超遠心法により抽出した。これらのサンプルで MCT1 蛋白量を western blot(WB)、MCT1 mRNA を real-time PCR 法で定量した。以後、同条件でシクロスポリンまたは vehicle を投与しサンプリングを行った。</p> <p>③ サイトカイン評価：マウス大腸を摘出してホモジネート後、TGF-β1 と IL-10 を WB と ELISA 法で定量した。</p> <p>④ 組織学的評価：ホルマリン固定したマウス大腸に対して MCT1 およびアセチル化ヒストン(AcH3)を、Caco-2 細胞では MCT1 と膜輸送機能に必要な蛋白である CD147 の蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。</p> <p>⑤ 酪酸取り込みの評価：MCT1 の基質であり、アポトーシスを誘導する 3-bromopyruvic acid (3-BrPA)を Caco-2 細胞へ投与し、24 時間後と 48 時間後に細胞培養上清中の LDH を測定した。また、酪酸の蛍光誘導體である 1-pyrenebutyric acid を投与し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。</p> <p>【結果】シクロスポリン投与群は DSS 腸炎による体重減少(88.7\pm3.3% vs 98.9\pm5.5%、P<0.01)、腸管短縮(53.4\pm3.5mm vs 64\pm5.3mm、P<0.01)、histological score の悪化(9.6\pm0.7 vs 5.3\pm1.3、P<0.01)が有意に抑制された。abx 処置により、盲腸内の便中酪酸濃度は検出感度以下となり、シクロスポリンの腸炎抑制効果は消失した。一方、TB</p>	

の補充により盲腸内の酪酸濃度が回復し、シクロスポリンの腸炎抑制効果も回復した。また、CHC 投与によりシクロスポリンの腸炎に対する効果は著明に減弱した。これらの結果から、シクロスポリンの腸炎抑制効果に酪酸吸収の関与が考えられた。シクロスポリン投与により、IECs 細胞膜における MCT1 と核内 AcH3 の増加、腸管における TGF- β 1 と IL-10 の発現上昇を認めた。Caco-2 細胞において、シクロスポリン投与により膜分画における MCT1 の発現上昇を認めた。共焦点顕微鏡の観察では、頂端側の MCT1 および CD147 の発現増加を認めた。一方、シクロスポリンを投与しても *MCT1* mRNA は変化を認めなかった。3-BrPA による LDH の上昇はシクロスポリンによって上昇し、CHC の投与により減少した。また、シクロスポリン投与により細胞内の 1-pyrenebutyric acid の蛍光強度が増加し、CHC 投与によりその増強効果は消失した。

【考察】酪酸の枯渇、MCT1 の阻害により粘膜障害抑制効果の減弱を認めたことから、シクロスポリンの効果は腸上皮細胞における酪酸吸収促進を介した経路が考えられた。また、シクロスポリン投与により、腸上皮細胞の頂端側細胞膜上での MCT1 発現増加と酪酸吸収促進が確認された。この MCT1 発現増加は、mRNA 転写制御を介しておらず、MCT1 の膜輸送の促進を含む、翻訳後調節を介したメカニズムが関与していることが示唆された。