

審査の結果の要旨

氏名 渡辺栄一郎

本研究は、健康なヒト便検体に存在し、大腸のトリプシン活性を消失させる腸内細菌の同定、さらに、トリプシン活性を消失させる腸内細菌が宿主免疫系に与える影響の検討とトリプシン活性消失のメカニズムの解明を試みた研究であり、下記の結果を得ている。

1. 著者は、理化学研究所で維持された SPF マウスと無菌マウスの盲腸内容物の網羅的タンパク質解析の実験系(糞便プロテオーム解析技術)を共同研究者と共に立ち上げた。そして、無菌マウスの盲腸内容物中に多く存在していた 45 種のタンパク質の中から、炎症性腸疾患との関連が示唆されているタンパク分解酵素のトリプシン(Anionic trypsin-2: PRSS2)に着目した。著者は、便中のトリプシン活性測定、ウエスタンブロットティング、免疫組織化学染色の結果を総合的に検討し、無菌マウスの盲腸以遠では、トリプシンが活性を保つ状態で、残存することを示した。
2. 著者は、本邦の潰瘍性大腸炎、及びクローン病に罹患する炎症性腸疾患患者の便検体について、トリプシン活性測定及びウエスタンブロットティングを用いたトリプシンのタンパク質量の評価を行った。炎症性腸疾患患者の便検体には、健常者の便検体と比較して、トリプシンが活性を保つ状態で残存することを示し、健常なヒト便検体中に、トリプシン活性消失に働く腸内細菌が存在する可能性を示した。
3. 著者は、ヒト菌叢模倣マウス技術を利用して、健常なヒト便検体の多くが、マウス便中のトリプシン活性を低下させることを示した。さらに、嫌気培養技術とノトバイオオート技術を駆使して、特定の健常ヒト便検体(Donor C)から、マウス及びヒトトリプシンを分解する機能をもつ腸内細菌(*Paraprevotella clara*:以下、*P. clara*)の単離に成功した。
4. 著者は、*P. clara* 1C4 株の培養液と、トリプシンを含む無菌マウスの盲腸内容物を混合し、トリプシンのタンパク質量及びそのタンパク質断片を経時的に解析した。ウエスタンブロットティングによるトリプシンのタンパク質量の評価では、トリプシンのタンパク質量の経時的減少が認められ、ペプチドーム解析によるタンパク質断片の検出では、トリプシンに由来するペプチド断片数の経時的増加が認められた。以上、*P. clara* 1C4 株によるトリプシン活性消失機構は、*P. clara* 1C4 株がトリプシンを分解

することで、その活性を消失させていることを示した。

5. 著者は、*P. clara* 1C4 株の培養液のフィルター処理を行い、その濾液をトリプシンが含まれる無菌マウスの盲腸内容物と混合し、トリプシンのタンパク質量をウエスタンブロッティングで測定した。菌体を除去できるフィルター処理後の濾液は、トリプシンの分解は認められなかったが、菌体が通過できるフィルター処理後の濾液は、トリプシンの分解が認められた。以上、*P. clara* 1C4 株によるトリプシン分解機構には、*P. clara* からの分泌物のみでは不十分で、少なくとも *P. clara* の菌体自体が必要であることを示した。
6. 著者は、本邦の健常者の便検体から単離された *Paraprevotella* に帰属する 2 菌種、*P. clara* (JCM14859 株) 及び *Paraprevotella xylaniphila* (JCM14860 株) が、*in vitro* において、マウストリプシンを分解する機能をもつことを実証し、*Paraprevotella* 属に分類される全ての菌種は、マウストリプシンを分解する機能をもつ事を示した。
7. 著者は、無菌化した IL10<sup>-/-</sup>マウスに腸炎誘導菌として知られる *Enterobacter aerogenes* を感染させた IL10<sup>-/-</sup>腸炎発症モデルマウスにおいて、便中のトリプシン活性を低下させ *P. clara* 1C4 株を構成要素にもつ細菌投与群(3-mix)が、便中のトリプシン活性の低下に関与しない細菌投与群(6-mix)に比較して、大腸組織の炎症を抑制する可能性を、便中リポカリン濃度及び組織学的炎症スコアを用いて示した。
8. 著者は、メタゲノム解析技術を利用して、本邦の健常者と炎症性腸疾患患者の便検体に存在する *P. clara* の相対組成比を検討し、健常者に比べて、クローン病患者の便検体中には、*P. clara* が有意に減少していることを示した。

以上、本論文は、ヒト便由来の腸内細菌として知られる *P. clara* が、マウス及びヒトのトリプシンを分解できる機能を有する事を明らかにした。また、IL10<sup>-/-</sup>腸炎発症モデルマウスにおいて、*P. clara* 1C4 株の投与に伴う大腸でのトリプシンの消失が、大腸組織の炎症の抑制に関与する可能性を示した。本研究は、未だ明らかにされていない炎症性腸疾患の病態解明と新たな治療戦略の創出に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。