

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

**Exploring the intestinal bacteria involved in the regulation of farnesoid X receptor**

**Farnesoid X receptor の制御に関わる腸内細菌の探索**

申請者

Xianqin

ZHANG

張

先琴

生命医科学専攻

環境生命科学研究

2016年2月

## 1. 論文内容の要旨

核内受容体はきわめて多くの生体機能に関わる遺伝子転写を調節し、疾患に関与する遺伝子も多く見出されていることから、核内受容体をターゲットとした医薬品が多く開発されてきた。脂質代謝・糖代謝・炎症応答などに関与する Farnesoid X 受容体 (FXR) は、肥満や代謝性疾患の治療・予防の重要な標的分子である。近年、脂肪やコレステロールの吸収を抑える働きを有することで注目されている茶カテキンの成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) は FXR のアゴニストとして作用することが報告されてきた。つまり、食事成分や腸内細菌などの腸内環境因子と核内受容体との相互作用を活用することで、ヒトの健康増進および疾患予防を実践できる可能性が高い。そこで本研究では、FXR の刺激能を定量的に評価するバイオアッセイ系を確立するとともに、FXR アゴニスト活性を有する有用細菌の探索を目的として研究を行った。

ヒトおよびマウス糞便、乳製品から分離した細菌株 (*Bacteroides* 属、*Bifidobacterium* 属、*Clostridium* 属、*Enterococcus* 属、*Eubacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Parabacteroides* 属、*Ruminococcus* 属 ; 38 菌株) を用いて、FXR を直接刺激することが可能な細菌をスクリーニングした。スクリーニング方法としては、SW480 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞株) に FXR 発現ベクターおよび FXR レポーターベクターをトランスフェクションして構築した FXR レポーター細胞株を用いて、生菌、菌体成分、培養上清の FXR 刺激能を評価した。スクリーニングの結果、*Bacteroides dorei* と *Eubacterium limosum* の培養上清中に FXR アゴニスト活性を見出した。また、qRT-PCR によって、FXR 関連遺伝子の発現が誘導されていることを確認し、腸内細菌が直接的に FXR と相互作用することを明らかにした。さらに、細菌培養上清による FXR 刺激能は、腸上皮細胞株 (Caco-2 細胞および SW480 細胞) のみで確認されたことから、FXR 刺激性細菌をスクリーニングするためには細胞株の選定が重要であることが示唆された。一方、高脂肪食を用いた食事誘導性肥満マウスモデルを用いて、2つの細菌培養上清が抗肥満効果を有するかを検証したところ、*B. dorei* 由来の細菌培養上清の投与 (経胃投与) は、体重増加の抑制や肝機能マーカー (ALT, AST) の値が改善することが確認され、プロバイオティクスが生活習慣病の予防などに貢献する可能性が示唆された。

## 2. 論文審査結果

2015 年 12 月 8 日に行われた公聴会では、論文内容および関連する事項について質疑応答が行われた。その概要を以下に示す。

1. 本研究で用いた安定発現株の作製方法 (ベクター、抗生物質選択) について質問があった。それに対して、腸上皮細胞株である SW480 細胞 (FXR 非発現株) に FXR 発現ベクター (Gencopeia 社 EX-T060-M02、ネオマイシン耐性遺伝子) および FXR レポーター遺伝子 (人工合成した FXRE 配列とプロメガ社 pGL4.27 で作製、ハイ

グロマイシン耐性遺伝子) をトランスフェクションし、G418 およびハイグロマイシンを用いて、FXR リポーター細胞のクローンを取得したことが説明された。

2. 第3章で使用されているFXR-null株の作製について質問があった。それに対して、SW480細胞は内在的にFXRを発現しないことが報告されている腸上皮細胞株であり、FXR レポーター用ベクターのみをトランスフェクションした細胞株(博士論文中 Fig.2.1 に記載されている Clone 10) であることが説明された。
3. 第4章の *in vivo* 実験において、各実験群の給餌量を計測したかについて問われた。それに対して、給餌量を計測した結果、体重減少が確認された *B. dorei* 投与群と PBS 投与群(対照群) で給餌量に差がないことを確認していることが説明された。給餌量の推移についての結果が博士論文に追記された。
4. 第4章の *in vivo* 実験において、FXR 欠損マウスを利用することで、投与した細菌培養上清による体重増加の抑制効果がFXR に依存しているかを検証できるのではというコメントがあった。それに対して、本研究ではFXR 欠損マウスを用いた検証を行わなかったが、*in vivo* における細菌培養上清のFXR 刺激および表現型との関連性に関するエビデンスを得るためにはFXR 欠損マウスを用いた検証が有効であることが説明され、本ディスカッションが博士論文に追記された。
5. 医薬品適用を考えた場合、本研究でスクリーニングされたFXR 刺激性の細菌性代謝産物と既存のFXR アゴニスト(例 GW4064) ではどちらの方が有効であるかという質問があった。それに対して、合成可能な化合物であるGW4064は、既に様々な動物モデルでの検証が行われているが、細菌培養上清中のFXR アゴニスト活性を示す化合物は本研究では同定できていないことから、現時点でその優劣について議論することができないとの説明があった。
6. 本研究の目的は、FXR 刺激性の細菌を同定することであったはずだが、細菌によるFXR 刺激は代謝産物であると報告している。現時点で、FXR アゴニストと細菌由来代謝産物とで、どんな違いがあると考えているのかという質問があった。それに対して、FXR アゴニストは一過性の効果であるのに対して、FXR 刺激性細菌が腸内に定着した場合は持続的な効果が期待できるとの説明があった。
7. 第4章において、対照群と各実験群の体重増加データの統計処理で、student t-検定を利用しているが、ANOVA などを用いて今回セットアップした各実験群間の比較を行っても良いのではないかとのコメントがあった。後日、コメントに従ってANOVA を用いた統計解析を行った結果、student t-検定と同様に有意差が確認され、本解析データが博士論文に追記された。
8. 本研究は、細菌由来成分からFXR アゴニストを探索しているが、化合物の同定に関する研究は進めなかったのかという質問があった。それに対して、現時点では、化合物の同定および物性などのデータは取得していないとの説明があった。
9. スクリーニングの際に、GW4064 をFXR アゴニストのポジティブコントロールと

して用いているが、化合物に関するネガティブコントロールが評価されていないとコメントがあった。それに対して、DMEM 培地や DMSO を用いたバックグラウンドの計測や FXR-null の細胞を用いた FXR 依存性の評価は行ってきたが、FXR 非刺激性化合物の評価は行っていないとの説明があった。後日、核内受容体 PPARs のアゴニストであるパルミチン酸でデータを計測した結果、FXR 刺激活性が無いことが確認され、ネガティブコントロールとして本データが博士論文に追記された。

10. 細菌培養上清には多様な化合物が混在しており、得られたレポーターアッセイの結果は FXR に特異的な刺激活性を本当に反映しているのかという質問があった。これに対して、FXR 発現株と FXR 非発現株とでルシフェラーゼの発光値に明確な差が確認されていることから、スクリーニングした 2 菌種の代謝産物中の化合物には FXR 刺激能があることは確かであるとの説明があった。

11. 今回スクリーニングした 2 菌種は、一般的にどのような細菌として知られているのかという質問があった。これに対して、*B. dorei* および *E. limosum* に関する性状および宿主（ヒト）との関わりについて報告された。

以上の質疑応答を通じ、申請者が本研究の意義と実験結果について十分な学識を有し、必要と考えられる考察を行っていることがわかった。

本研究では、ヒトおよびマウス糞便あるいは乳製品由来の細菌分離株について、ルシフェラーゼアッセイに基づいて FXR 刺激能を計測し、*B. dorei* および *E. limosum* が産生する代謝産物に FXR アゴニスト活性を見出した。さらに、2 つの細菌培養上清は、腸上皮細胞において FXR 関連遺伝子を発現誘導することも確認した。現在、FXR アゴニストの一つであるオベチコール酸は、非アルコール性脂肪肝疾患の治療薬として期待されている。そこで、食事誘導性肥満マウスモデルを用いて、*B. dorei* および *E. limosum* の細菌培養上清の抗肥満効果や肝障害などの軽減効果についての検証を行ったところ、*B. dorei* の細菌培養上清の投与に抗肥満効果や肝機能生化学マーカーの改善が認められた。本研究は、腸内細菌が直接的に FXR を刺激することを初めて報告するものであり、今後の生活習慣病に対するプロバイオティクス治療に大きく寄与するものと思われる。このように本論文は、プロバイオティクス研究領域を発展させる優れたものであり、博士（工学）の学位論文としてふさわしいと考えられる。

2016 年 1 月

主査	常田 聡	早稲田大学教授	博士（工学）東京大学	_____
	大島登志男	早稲田大学教授	医学博士（山梨医科大学）	_____
	竹山春子	早稲田大学教授	博士（工学）東京農工大学	_____