



Title	Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1 β -induced NF- κ B signaling in human intestinal cells.
Author(s)	峯川, 亮子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46168
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ^{みね} 峯 ^{かわ} 川 ^{りょう} 亮 ^こ 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20543 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1 β -induced NF- κ B signaling in human intestinal cells.
(ヒト腸管細胞における母乳の抗炎症効果の検討)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 村 田 雄 二

(副査)

教 授 大 藁 恵 一 教 授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

近年、妊婦、新生児管理の進歩や各地域の周産期医療システムの整備により、新生児医療は飛躍的な進歩を遂げている。しかしながら基礎的研究の立ち遅れから未だに病態不明の疾患群が多数存在しているのが現状であり、今後の周産期医療の予後改善の限界が危惧される。特にそのなかで新生児壊死性腸炎（以下 NEC と省略）は未熟児における発症頻度の高さと経腸栄養の確立障害から来る予後の悪さから、新生児医療において非常に重要な位置を占める疾患群である。

実地臨床において、未熟児に対する出生早期からの母乳投与により人工乳投与と比較して NEC の発症頻度の減少、感染症の減少、神経学的予後の改善といった母乳特有の新生児に対する防御的效果が知られている。しかしながら NEC に対する分子生物学的研究はほとんどなされていない。また母乳独自の新生児に対する防御的效果についても臨床的事象だけで、そのメカニズムに対する基礎的研究は未知の領域である。

インターロイキン-8 (IL-8) は炎症性サイトカインの代表的なものであり、各種細胞において LPS や IL-1 β などの炎症刺激により反応性に増加することが知られている。腸管細胞における IL-1 β シグナル伝達による IL-8 活性化機構には、転写因子である NF- κ B が重要な役割を果たすことが 1997 年に発表された。2003 年には腸管細胞における IL-1 β シグナル伝達による IL-8 活性化機構に対して、TGF- β (transforming growth factor- β)、erythropoietin、IL-10、EGF (epidermal growth factor) といった母乳中に含まれる各種物質により抑制されることが示された。

そこで本研究では母乳の腸管保護作用に着目し、とくに NEC 発症予防機構の分子生物学的手法を用いた解明を通じて、最終的には NEC 発症の病態解明に迫ることを目的とした。

〔方法〕

ヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いて、以下の検討を行った。母乳は産褥 2-4 日目の患者よりインフォームドコンセントを得た上で提供を受け、乳清のみを実験に用いた。

1. Caco-2 細胞において、IL-1 β 刺激による IL-8 分泌増加に対する母乳の抑制効果を、ELISA 法を用いて検討した。
また母乳中でその抑制効果に寄与する成分を検討するため、加熱処理を加えた母乳を用いた場合や、IL-10、EGF、erythropoietin の各中和抗体を添加した場合との比較検討を行った。
2. NF- κ B、C/EBP、AP-1 の各転写因子結合部位を有する IL-8 プロモーターシフェラーゼ遺伝子を Caco-2 細胞

に遺伝子導入し、IL-1 β 刺激によるIL-8プロモーター活性化に対する母乳の抑制効果を、ルシフェラーゼアッセイ法により検討した。また各転写因子結合部位の変異遺伝子を導入した場合との比較検討を行った。

3. 腸管細胞におけるIL-1 β 刺激によるIL-8活性化には、NF- κ Bを介したシグナル伝達経路が関与するとされている。この伝達経路において、母乳による抑制効果に関与する部位を同定するため、ウェスタンブロット法を用いた検討を行った。まずIL-1 β 刺激を加えたCaco-2細胞に対して母乳を添加した場合のIKK α 、IKK β 蛋白量の変動をそれぞれ比較検討した。次にIL-1 β 刺激によるI κ Bの発現およびリン酸化に対する母乳の影響を検討した。
4. 母乳単独による蛋白発現に対する影響を調べるため、Caco-2細胞に対して母乳を添加した場合のIL-1R、I κ Bの各蛋白量の変動を、ウェスタンブロット法を用いて検討した。

〔成績〕

1. IL-1 β 刺激によるIL-8分泌増加は、母乳添加により抑制された。LPS添加によるIL-8分泌増加に対しても、母乳は抑制効果を示した。加熱処理を加えた母乳を用いた場合ではその抑制効果は減弱した。IL-10、EGF、erythropoietinの各中和抗体を添加した場合には、母乳単独の場合と比較してIL-8分泌抑制効果は減弱したが、有意差を認めなかった。
2. IL-1 β 刺激によるIL-8プロモーター活性化は、母乳により抑制された。またNF- κ B、C/EBP、AP-1の各転写因子結合部位の変異遺伝子を用いた検討では、NF- κ B結合部位変異の条件でのみ抑制効果の消失を認めた。
3. 母乳添加はIKK α 、IKK β 蛋白量に影響を与えることなく、IL-1 β 添加により増加したリン酸化IKK α /IKK β 蛋白量に対する抑制効果を示さなかった。一方、IL-1 β 刺激によってI κ B蛋白量は減少するが、母乳添加によりその減少は抑えられた。また母乳添加により、IL-1 β 刺激によるリン酸化I κ B蛋白量の増加は抑制された。
4. 母乳単独添加によりIL-1R蛋白量の変動は認められなかったが、I κ B蛋白量の増加を認めた。

〔総括〕

母乳は、腸管細胞における炎症性サイトカインであるIL-1 β によるI κ B活性化を抑制し、IL-8産生を抑制し、その抗炎症効果を発現する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

未熟児に対する出生早期からの母乳投与により人工乳投与と比較してNECの発症頻度が減少するなど、母乳特有の新生児に対する防御的効果が知られている。本研究では母乳の腸管保護作用に着目し、とくにNEC発症予防機構の分子生物学的解明を目的とした。ELISA法を用いた検討により、Caco-2細胞培養上清IL-8分泌のIL-1 β 刺激による増加は、母乳添加により抑制されることが示された。IL-8プロモータールシフェラーゼ遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイ法による検討では、母乳によるIL-1 β 刺激によるIL-8プロモーター活性上昇に対する母乳の抑制効果には転写因子NF- κ Bが関与することが示唆された。ウェスタンブロット法の結果と総合し、母乳はIL-1 β によるI κ Bのリン酸化およびdegradationを抑制し、同時にI κ B蛋白量を増加させることにより、腸管における抗炎症効果を発現することが示された。以上の発表内容を評価し、学位の授与に値すると考えられる。