

氏名	遠藤 輪
学位の種類	博士（ 生物工学 ）
学位記番号	博 甲 第 9 4 7 9 号
学位授与年月日	令和2年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科

学位論文題目 微生物増殖に着目した新規腸管共生モデルの開発に関する基礎的研究

主査	筑波大学教授	博士（農学）	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士（工学）	市川 創作
副査	筑波大学教授	博士（生物工学）	楊 英男
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	野村 名可男

論 文 の 要 旨

近年、腸内微生物叢と宿主の関係が注目され、腸内微生物叢が宿主の健康状態に及ぼす影響に視点をおいた研究が活発におこなわれ、様々な知見が報告されている。その一方で、宿主の健康状態が腸内微生物叢に与える影響が存在する可能性が考えられるが、現状では適切な方法がないために、十分な解析がおこなわれていない。この現状を踏まえ著者は、微生物増殖の挙動が把握できる適切な腸管共生モデル（共培養系）を開発することができれば、宿主の健康状態が腸内微生物叢に与える影響を解析し、新たな有用知見がえられると考え、研究を展開している。はじめに著者は、微生物と腸上皮細胞を共培養した際に想定される様々な培養環境の変化を人為的に腸上皮の細胞株（Caco-2細胞）に与え、その応答を見ることで、共培養化に必要な条件の探索を試みた。種々検討した結果、特に、(1) 培養液のpH低下が腸上皮細胞に大きなダメージを与えること、(2) Caco-2細胞と微生物が接触することで、Caco-2細胞の生育に悪影響が及ぼされること、を明らかにし、両細胞の生育空間を隔てた培養系をデザインする必要性を示している。これらの知見を踏まえ、著者は微生物とCaco-2細胞の生育空間を寒天ゲルなどで隔てた独自の培養系を考案、開発し、Caco-2細胞と*Saccharomyces cerevisiae*や*Escherichia coli*とCaco-2細胞を共培養した結果、培養24時間にわたり、Caco-2細胞のバリア機能と細胞生存率が高く維持され、良好な共培養が可能となった。さらに、著者は、共培養中の微生物の増殖を経時的に測定するために、上述の共培養系を改良（アルギン酸ゲルで共培養微生物を固定化）し、Caco-2細胞と*S. cerevisiae*、*E. coli*あるいは*Lactobacillus casei*を共培養した結果、いずれも良好に共培養ができ、共培養微生物の増殖の把握や増殖期（誘導期、対数増殖期、定常期）の判別も可能であった。本培養系を

用い、

Caco-2細胞、RAW264細胞および各種微生物を共培養し、Lipopolysaccharideを作用させることで、Caco-2細胞に高炎症状態を生じさせた結果、共培養した*E. coli*の増殖は促進された一方で、*L. casei*の増殖は変化がみられず、本培養系（腸管共生モデル）により、Caco-2の生理状態が共培養微生物の増殖に影響を与えることが示された。著者は、開発した腸管共生モデルで共培養が可能な微生物種を増やすために、動物細胞の接着因子として重要な役割を示す金属イオンに着目した共培養用培地のデザイン法の提案を目指し、高い金属吸着能が知られている*Lactobacillus*属から*L. casei*を選択し、その金属吸着特性を解析した。その結果、*L. casei*は主に細胞表層の莢膜多糖で2価金属イオンを吸着しており、イオン半径の大きな金属に対して高い吸着力を示すことを明らかにした。得られた実験値に基づき、*L. casei*によるDMEM培地に含まれるカルシウムイオンの吸着量を推算した結果、*L. casei*を共培養に使用する場合、のDMEM培地のカルシウムイオンは枯渇すること無く、共培養培地として十分に使用できることが示された。

以上の結果を踏まえ著者は、腸上皮細胞の生理状態が腸内微生物に及ぼす影響の基礎的な解析において、本研究で開発した腸管共生モデルは有効であると結論づけている。

審 査 の 要 旨

本論文で著者は、宿主の健康状態が腸内微生物叢に影響を与えるのではないかと考え、その基礎として、腸上皮細胞と腸内微生物叢の相互作用を解析するために、同一の培養系内に腸上皮細胞と微生物が共存して生育でき、培養中の微生物の増殖が把握可能な、腸管共生モデル（共培養系）を独自に開発し、従来は困難であった腸上皮細胞と種々の微生物を共培養や、共培養微生物の増殖挙動の把握に成功している。腸上皮細胞と微生物の共培養において微生物の増殖挙動を簡便かつ経時的に把握できる培養系は国内外を通じてはじめてであり、新規性、独創性は評価できる。また、開発した腸管共生モデルにより、腸上皮細胞の炎症状態に応じて増殖量が異なる微生物が存在することを定量的に示すことに成功している。また、腸上皮細胞と微生物を共培養することにより生じる問題の一つとして、共培養微生物による共培養培地中に含まれる必須金属の吸着にはじめて着目し、モデルとして乳酸菌の金属吸着特性を解析し、それを考慮した培地のデザイン法を提案している。上述の様に本論文で著者は、腸上皮細胞と腸内微生物の腸管共生モデル（共培養系）を構築する際に基盤となる知見を得ている。今後、宿主の健康状態が腸内微生物叢の変化を誘発するという新しい概念の提案に展開することも期待できる。

令和2年1月16日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(生物工学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。