

氏名	王 洋		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第	5 9 9 0	号
学位授与の日付	平成31年 3月25日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学 専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Studies on biological effects of mulberry fruits against microbial composition and intestinal inflammation (腸内細菌構成と腸管炎症に対するクワの実の機能的効果に関する研究)		
論文審査委員	教授 齋藤 昇	准教授 畑生 俊光	教授 舟橋 弘晃
学位論文内容の要旨			
<p>The cases of inflammatory bowel disease which characterized chronic inflammation and the ulcerative colitis increase worldwide. The disease pathogenesis widely accepted consists of the disruption of the epithelial barrier, triggering an invasion of bacteria into the mucosal layer, which then activates the inflammatory immune response. However, the etiology of this disease is unclear. I have focused on the mulberry because this medicinal plant was used as traditional medicine and has a beneficial character such as anti-inflammation. Mulberry contains rich beneficial ingredients such as polyphenols which have reported many biological functions such as anti-inflammation and antioxidant. The aims of this study are as follows: 1) to evaluate the microbial composition after feeding with mulberry juice freeze-dried powder (MFP) supplementation. 2) to evaluate the mitigative effect of MFP against the intestinal inflammation and its mode of action in the Dextran Sodium Sulfate (DSS)-induced acute colitis model.</p> <p>1) To evaluate the microbial compositions, mice were fed with or without MFP. The microbial compositions in the feces were determined by denaturing gradient gel electrophoresis and DNA sequence. The results of denaturing gradient gel electrophoresis showed that the number of band in MFP diet group was decreased compared with the normal diet group. The results of DNA sequence analysis showed that MFP diet decreased the bands of <i>Lactobacillus plantarum</i>. These results indicated that mulberry supplementation modified the composition of gut microbiota. 2) To evaluate the effect by MFP supplementation against the intestinal inflammation, mice were supplied the diet with or without MFP. In the last 1 week, the water containing with or without 5% (w/v) DSS were supplied to induce the acute colitis. The body weight and fecal condition in mice were daily checked. The disease activity index (DAI) score was calculated according to the body weight loss and the symptoms of this disease. The mRNA expressions of both cytokines and NLRPs were evaluated by RT-qPCR using the proximal colon tissue. The middle and distal colons were fixed with 10% formaldehyde for histopathological observation. Furthermore, the compositions of feces bacteria were determined by qPCR. The severe body weight loss and tissue damages were not observed in mice fed with MFP. DAI score in mice fed with MFP was significantly decreased. The significantly decrease was observed for <i>Bifidobacterium spp.</i> and <i>Clostridium perfringens</i> subgroup in mice fed without MFP. The increase was observed for the number of goblet cell and NLRP6 expression in mice fed diet with MFP compared with mice fed without MFP. These results may suggest that mulberry mitigates the severity of DSS-induced acute colitis by a change of gut microbiota and improving mucosal conditions.</p>			

論文審査結果の要旨

クワの実は、ポリフェノールを豊富に含有するため、抗炎症等の生物学的活性を有する。本研究は、クワの実凍結乾燥粉末（MFP）が腸内細菌叢に及ぼす影響と従来提唱されている抗炎症作用機構以外に MFP の持つ粘膜保護効果に着目し、1) MFP 摂取による腸内細菌叢構成、2) MFP 含有飼料摂取による潰瘍性大腸炎の症状緩和効果とその機構について検討した。

MFP 投与による腸内細菌叢構成の検討は、DGGE 法により検討した。その結果、MFP 投与マウスではバンドパターンが減少し、MFP が少なからず腸内細菌叢構成を修飾することが明らかとなった。

そこで、MFP 投与による腸管炎症抑制効果を検討するために Balb/c 雄マウス 7 週齢を実験に用い、MFP 含有飼料で 3 週間飼育した後、5%デキストラン硫酸塩（DSS）含有飲水で 1 週間飼育することで急性大腸炎を誘発させた。この実験飼育期間中、体重変化、糞便の状態および飼料摂取量を毎日測定・観察した。大腸は、実験飼育終了時に採取し、大腸長を測定後、サイトカイン等の遺伝子発現解析および HE 染色の後病理組織学的観察・解析を行った。また、腸内細菌叢は、採取糞便から DNA を回収後、定量的 PCR 法にて解析を行った。炎症性サイトカイン、NLRP3 および NLRP6 遺伝子発現は、定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。

MFP 摂取マウス群では、体重減少が DSS のみ投与マウス群と比較して遅れて始まり、大腸炎活動指数が有意に低下した。病理組織学的解析では、MFP 摂取マウス群で、炎症性細胞浸潤は DSS 投与マウス群と比較して明らかに少なく、杯細胞数は有意に多く維持されていた。腸内細菌叢解析では、ビフィバクテリウム属細菌とウエルシュ菌類は、MFP 摂取マウス群と比較して DSS のみ投与マウス群で有意に低下した。NLRP6 遺伝子発現は、MFP 摂取マウスにて有意に上昇した。これらのことは、MFP が腸内細菌叢を変化させ大腸粘膜の状態を改善維持することで大腸炎を緩和することを示唆した。

学位論文は、クワの実の消化管炎症に対する効果が、従来報告されている抗炎症作用に加え、クワの実が腸管細菌叢を修飾すること腸管上皮細胞の保護作用を誘導することを新しく証明したものである。論文提出者は、関連文献の検索を含めた本研究論文についてよく理解し、発表会における質疑等も十分なものであると考えられた。よって本論文は最終試験に合格するに値すると結論付けた。