

氏名 (生年月日)	なほら もはめつど さら いぶらひむ もうさ はもうだ Nahla Mohamed Salah Ibrahim Mousa Hamouda (1985年1月1日)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第181号
学位授与の日付	2019年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Study on the elucidation of pathogenic mechanism underlying 5-flourouracil-induced intestinal mucositis in relation to the composition of “intestinal microbiota” (5-フルオロウラシル誘起腸炎の病態解明と腸内細菌の関与に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 加藤 伸一 (副査) 教授 田中 智之 (副査) 教授 高田 和幸

論文内容の要旨

Introduction

Chemotherapy has greatly improved the overall survival rate in cancer patients, but the gastrointestinal (GI) side-effects remain a major obstacle which greatly impact the patients' quality of life. Currently, there is no satisfactory strategy for the management of intestinal mucositis during cancer chemotherapy. Although 5-fluorouracil (5-FU) is a widely used anti-cancer agent, approximately 50-80% of the patients receiving 5-FU developed severe diarrhea due to intestinal mucositis. The imbalance and malfunction of intestinal flora has been implicated in the pathogenesis of chemotherapy-induced intestinal mucositis but the precise mechanism is not fully understood. In the present study, first I aimed to elucidate the pathogenic mechanisms underlying 5-FU-induced intestinal mucositis. And secondly, the author investigated the effect of probiotics on 5-FU-induced intestinal mucositis from the insight of “intestinal microbiota”.

Chapter I: Apoptosis, dysbiosis and expression of inflammatory cytokines are sequential events in the pathogenesis of 5-FU-induced intestinal mucositis in mice.

In this chapter, the author investigated the pathogenic mechanisms underlying intestinal mucositis induced in mice by 5-FU, especially in relation to apoptosis, intestinal microbiota, and inflammatory cytokines. Repeated intraperitoneal administration of 5-FU (50 mg/kg) once daily for 6 days caused severe intestinal mucositis in C57BL/6 mice, characterized by shortening of villi and destruction of crypts, accompanied by body weight loss and diarrhea. These responses were evidently observed from day 4. Tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression in intestinal cells has been increased on day 1, and further augmented on day 4, simultaneously with increase in interleukin (IL)-1 β mRNA expression and myeloperoxidase (MPO) activity, a marker of neutrophil infiltration in the mucosa. TUNEL-positive apoptotic cells and Ki-67-positive proliferative cells were significantly increased and decreased in intestinal crypts on day 1, respectively. Daily administration of ampicillin, a broad spectrum of antibiotic, and aztreonam, a gram-negative bacteria-specific antibiotic, significantly reduced the severity of 5-FU-induced intestinal mucositis with body weight loss and diarrhea. The upregulation of TNF- α and IL-1 β mRNA expression together with MPO activity on day 4 were also significantly abrogated by ampicillin and

aztreonam. However, these antibiotics neither had any suppressive effects on the increase in TUNEL-positive apoptotic cells nor on the upregulation of TNF- α mRNA expression on day 1. The analysis of intestinal microbiota via a next-generation sequencer revealed a disruption of its composition, resulting in “dysbiosis”; decrease in the relative abundance of *Firmicutes* and *Actinobacteria* while increase in the relative abundance of *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, and *Verrocomicrobia*. Daily administration of ampicillin counteracted intestinal dysbiosis via potent decrease in the number of intestinal microbiotas determined by quantitative PCR on day 6. In cultured mouse intestinal epithelial cells, the exposure to 5-FU upregulated TNF- α but not IL-1 β mRNA expression, in a concentration-dependent manner. These findings suggest that crypt apoptosis, gram-negative bacteria, and inflammatory cytokines are sequentially involved in the occurrence of 5-FU-induced intestinal mucositis. Intestinal dysbiosis resulting from the destruction of epithelial barrier induces secondary inflammation with upregulation of inflammatory cytokines and neutrophil infiltration in the mucosa, resulting in severe intestinal mucositis.

Chapter II: Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses.

Probiotics are viable bacteria with well-known beneficial effects on human health. It is still unknown whether probiotics are useful in treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis. In this chapter, the author investigated the effect of probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) on 5-FU-induced intestinal mucositis in mice. Repeated intraperitoneal administration of 5-FU (50 mg/kg) produced severe intestinal mucositis in ICR mice, characterized by shortening of villi and destruction of crypts, accompanied by increase in MPO activity and inflammatory cytokine expressions. Daily administration of BBG9-1 significantly attenuated intestinal mucositis with decrease in MPO activity and inflammatory cytokine expression on day 6 following the onset of 5-FU treatment. In contrast, BBG9-1 revealed no effect on crypt apoptosis and initial TNF- α upregulation on day 1. The structure of the intestinal microbiota on the phylum level via weighted UniFrac analysis on a next-generation sequencer was largely altered by daily administration of 5-FU, but this response was significantly inhibited by BBG9-1. These findings suggest that BBG9-1 exhibits an ameliorative effect against 5-FU-induced intestinal mucositis through attenuation of secondary inflammation by improving intestinal dysbiosis.

Conclusion

Apoptosis, suggested to be mediated by TNF- α , and hypoproliferation in intestinal crypt cells are the initial pathogenic events in the occurrence of 5-FU-induced intestinal mucositis. The disruption of epithelial barrier paves the way for intestinal dysbiosis with upregulation of inflammatory cytokines in a sequential manner resulting in intestinal mucositis. The correction of dysbiosis can thus, be a useful approach for proper prevention and treatment of intestinal mucositis during cancer chemotherapy.

審査の結果の要旨

抗がん剤の多くは、副作用として重度の下痢を主徴とする腸炎を引き起こすことが知られており、安全かつ効果的ながん化学療法を行う上で大きな問題となっている。抗がん剤誘起腸炎の病態については未だ不明な部分が多く、有効な予防および治療法が存在しないのが現状である。近年、種々の消

化管疾患の病態と腸内細菌叢の異常との関連が注目されている。抗がん剤誘起腸炎の病態においても、腸内細菌の異常が関与している可能性が指摘されているが、その詳細については不明である。申請者は、代表的な抗がん剤の1つである5-フルオロウラシル (5-FU) により誘起される腸炎の病態について、マウスモデルを用いて、特に腸内細菌叢の異常との関連を中心に検討した。

第1章では、5-FU 誘起腸炎の病態におけるアポトーシス、炎症性サイトカインおよび腸内細菌の関与について検討した。5-FU の連続投与は、4日目以降から顕著な下痢を伴う腸炎を誘起し、腸炎の進展は炎症性サイトカイン発現および好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の増大と相関していた。一方、腸腺窩のアポトーシスの誘導は、5-FU の初回投与24時間後において最も顕著に観察された。抗生物質の投与は、アポトーシス誘導に影響を与えることなく、炎症性サイトカイン発現およびMPO活性の増大、さらには腸炎の発生を有意に抑制した。また、5-FU の投与は、*Firmicutes* の減少および *Bacteroidetes* の増加を特徴とする腸内細菌叢の異常を誘起したが、抗生物質の投与は腸内細菌数を減少させることで、腸内細菌叢の異常を是正した。以上より、5-FU の投与は、元来の細胞増殖抑制に加えて、初期に腸上皮のアポトーシスを誘導することで腸上皮バリアの破綻を誘起し、その結果、腸内細菌叢の異常を介した二次的炎症により腸炎を惹起することが判明した。

第2章では、腸内細菌の異常に着目し、5-FU 誘起腸炎に対するプロバイオティクスの効果について検討した。代表的なプロバイオティクスであるビフィズス菌の投与は、初期のアポトーシス誘導に影響を与えることなく、5-FU 投与による炎症性サイトカイン発現およびMPO活性の増大、さらには腸炎を有意に抑制した。また、ビフィズス菌製剤の投与は、5-FU 投与による腸内細菌叢の異常も是正した。以上より、ビフィズス菌製剤は、5-FU 誘起腸炎に対して、腸内細菌叢の異常を是正することで、抑制効果を発揮することが判明した。

これらの研究成果は、国際学術雑誌2編に掲載されており、抗がん剤誘起腸炎の病態における腸内細菌叢の異常を中心とした一連の病態発生・進展過程を明らかにしたものであり、5-FU 誘起腸炎の病態解明ならびに予防・治療理論の提案に繋がるものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士(薬学)の学位論文としての価値を有するものと判断する。