

博士論文

海藻・乳酸菌由来成分の
抗炎症・生体防御作用に関する研究

川島 忠臣

目次

略語表	-----	3
バッファー・培地組成表	-----	5
第1章 序論	-----	7
第2章 海藻由来カロテノイド・フコキサンチンの制御性 T 細胞誘導作用	-----	14
第1節 緒言	-----	14
第2節 材料と方法	-----	17
第3節 結果	-----	20
第4節 考察	-----	25
第3章 メカブ由来フコイダンによる乳酸菌 <i>Tetragenococcus halophilus</i> KK221 株の 免疫調節作用増強効果	-----	27
第1節 緒言	-----	27
第2節 材料と方法	-----	30
第3節 結果	-----	33
第4節 考察	-----	42
第4章 漬け物由来乳酸菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> YU 株のプロバイオティクス効果	-----	44
第1節 緒言	-----	44
第2節 材料と方法	-----	46
第3節 結果	-----	51

第 4 節 考察	-----	62
第 5 章 乳酸菌の 2 本鎖 RNA による Interferon- β を介した抗炎症効果		
	-----	64
第 1 節 緒言	-----	64
第 2 節 材料と方法	-----	66
第 3 節 結果	-----	73
第 4 節 考察	-----	93
第 6 章 総合考察	-----	95
引用文献	-----	100
原著論文リスト	-----	119
要旨	-----	120
謝辞	-----	124

略語表

ATRA	all-trans retinoic acid
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSS	dextran sodium sulfate
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp3	forkhead box P3
GALT	gut-associated lymphoid tissue
IEC	intestinal epithelial cell
IFN	interferon
IFV	influenza virus
IgA	immunoglobulin A
IL	interleukin
IPS-1	IFN- β promoter stimulator 1
IRF	interferon regulatory factor
LP	lamina propria
LPS	lipopolysaccharide
M cell	microfold cell
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5
MLN	mesenteric lymph node
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NK cell	natural killer cell
OVA	ovalbumin
PE	phycoerythrin
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate

PP	Peyer's patch
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
ROR	retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SFB	segmented filamentous bacteria
SP	spleen
SPF	specific pathogen-free
TGF- β	transforming growth factor- β
Th cell	T helper cell
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Tr1 cell	type I regulatory cell
Treg cell	regulatory T cell
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
VSV	vesicular stomatitis virus
3d mice	<i>Unc93b1</i> ^{3d} mice

バッファー・培地組成表

特に断りのない限り、以下のバッファー・培地を用いた

リン酸バッファー (PBS)

	Volume
NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	14.6 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	1 g
H ₂ O	
Total volume	500 ml (pH7.3に調整)

※試薬は全て和光純薬工業より購入

細胞分離用培地 (脾臓、腸間膜リンパ節)

	Volume	conc.
Fetal Bovine Serum (FBS、ニチレイ社)	50 ml	10%
1 M HEPES (和光純薬工業)	10 ml	20 mM
10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin (Sigma)	5 ml	
4000 U/ml Collagenase D (Roche)	50 ml	400 U/ml
RPMI 1640 (Sigma)	385 ml	
Total volume	500 ml	

※FBS は 56°Cで 30 分間インキュベートし、非動化したものを用いた。

細胞分離用培地（パイエル板、腸管粘膜固有層）

	Volume	conc.
FBS	50 ml	10%
1 M HEPES	10 ml	20 mM
10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	5 ml	
4000 U/ml Collagenase D	50 ml	400 U/ml
1mg/ml DNase I (Roche)	50 ml	100 µg/ml
RPMI 1640	335 ml	
Total volume	500 ml	

上皮細胞分離用培地（小腸）

	Volume	conc.
FBS	50 ml	10%
500 mM EDTA (和光純薬工業)	10 ml	10 mM
1 M HEPES	10 ml	20 mM
25 mg/ml Polymyxin B (Sigma)	0.2 ml	10 µg/ml
10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	5 ml	
100 mM sodium pyruvate (Gibco)	5 ml	1 mM
PBS	419.8 ml	
Total volume	500 ml	

細胞培養用培地

	Volume	conc.
FBS	50 ml	10%
1 M HEPES	10 ml	20 mM
10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	5 ml	
0.1 M 2-Mercaptoethanol (和光純薬工業)	0.25 ml	50 µM
RPMI 1640	434.75 ml	
Total volume	500 ml	

第1章 序論

近年、免疫機能に関わる疾患患者数の増加が深刻な社会問題となっている。アレルギー疾患では、スギ花粉症推定患者数 3300 万人（2013 年版アレルギー性鼻炎ガイド）であり、増加の一途をたどっている。また、小児で有病率が高い食物アレルギーについては乳児で約 5～10%、幼児で約 5%、学童期以降が 1.5～3%となっている（食物アレルギー診療ガイドライン 2012）。気管支喘息は成人・小児で増加しており、その患者数は 800 万人以上と推定されている（2011 年厚生労働省リウマチ・アレルギー対策委員会報告書）。アトピー性皮膚炎については 2000～2002 年度に実施された厚生労働科学研究による全国調査で、小学生以下の有病率が 10%以上であることが報告されている。また、アレルギー疾患以外にも関節リウマチ（推定 70～80 万人、2011 年厚生労働省リウマチ・アレルギー対策委員会報告書）などの自己免疫疾患、潰瘍性大腸炎（約 11 万人、2008 年 難病情報センターより）やクローン病（約 3 万人、2009 年 難病情報センターより）などの炎症性腸疾患も患者数の増加が指摘されている。さらに、ノロウイルスやインフルエンザなどのウイルス感染症の世界的な爆発的流行が指摘されている。これらの疾患は免疫機能を正常に保つことで、発症を未然に防いだり、症状の悪化を防いだりすることができると考えられている。普段から摂取している食品が我々の免疫系にどのような効果をもたらしているかについて理解を深め、さらには免疫機能を正常に保つ食品因子を見出し、それらを有効に食生活に組み込むことが重要である。

食品として摂取したものには、吸収されて作用するものと腸管内にとどまり腸管免疫を介して効果をもたらすものがある。発酵食品などに含まれる乳酸菌などの微生物は腸管において認識され、自然免疫系を活性化する。腸管は外来物質と接する最も大きな組織であり、そこには多くの免疫細胞が存在し、食物抗原や食物と共に摂取される細菌、ウイルス、さらに腸内常在菌に対し常に応答している。このような免疫細胞が集まる場所は腸管関連リンパ組織（GALT）と呼ばれる。そして GALT の一つである小腸のパイエル板や絨毛には M 細胞（Microfold cells）と呼ばれる腸管内の抗原や微生物を取り込む上皮細胞が存在する（Krahenbuhl et al., 2000）。腸内常在菌や口から摂取した食物

抗原・細菌はこの M 細胞を介して取り込まれ、M 細胞直下に存在する樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に認識される。そして、樹状細胞やマクロファージが様々なサイトカインを出すことで T 細胞や B 細胞を活性化し、さらに抗原を提示することでこれらの細胞に抗原特異的な応答を誘導する。このように自然免疫を活性化することが、獲得免疫にも影響を与えることが知られている (Akira et al., 2006)。

自然免疫

自然免疫は外来抗原、細菌、ウィルスの体内侵入に対して最初に起こる免疫応答である。抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージはこれらの構成成分のパターンを認識するトル様受容体 (Toll-like receptor, TLR) を発現している (Akira et al., 2001)。TLR から刺激が入ることで抗原提示細胞は活性化し、各種サイトカインを産生することで他の免疫細胞に影響を与える。また、抗原提示細胞が認識した抗原は他の細胞に提示され、その抗原に対する免疫応答を誘導する。細菌の構成成分の認識には TLR2 や TLR4、TLR9 が知られており、TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポテイコ酸を、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) を、TLR9 は細菌の持つ非メチル化 DNA (CpG DNA) を認識することが知られている。また、TLR3 は 2 本鎖 RNA ウィルスを、TLR7 は 1 本鎖 RNA ウィルスを認識する。そして TLR の発見に続いて、TLR からのシグナル伝達に関わる分子が次々と報告され、自然免疫の活性化機構が明らかとなってきた (Fig. 1-1, O'Neill et al., 2013)。TLR2 や TLR4 は Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する。TLR7 や TLR9 は MyD88 と Interferon regulatory factor 7 (IRF7) のリン酸化を介して Interferon- α (IFN- α) の産生を誘導する。TLR3 と TLR4 は TIR domain-containing adapter inducing IFN- β (TRIF) と IRF3 のリン酸化を介して IFN- β を誘導する。乳酸菌の認識に関わる TLR については報告が出てきているものの (Grangette et al., 2005; Hisbergues et al., 2007; Koizumi et al., 2008; Rigaux et al., 2009; Asong et al., 2009)、まだ不明な点は多い。

獲得免疫

一方で獲得免疫に関わる T 細胞については、細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の役割が古くより研究されているが、特にヘルパー T 細胞については近年多くのサブセットが発見されている。細胞性免疫に関わる Th1 細胞、液性免疫に関わる Th2 細胞に加え、最近では炎症性の Th17 細胞や強い抑制作用を持つ制御性 T 細胞 (Treg 細胞) についての報告が増加している (Fig. 1-2)。自己免疫疾患やアトピー性皮膚炎などの炎症性の疾患には Th17 細胞が関与することが知られるが (Louten et al., 2009; Hemdan et al., 2010; Souwer et al., 2010; Geremia et al., 2011; Zepp et al., 2011)、感染性腸炎の抑制など腸管の感染防御にも働く (Ivanov et al., 2009)。また、抑制性の作用を持つ T 細胞については、Treg 細胞以外にも interleukin-10 (IL-10) を強く産生する Type I regulatory (Tr1) 細胞が知られており、この細胞は IL-27 により分化誘導され、自己免疫疾患の炎症抑制にも関わっている (Apetoh et al., 2010)。

腸内常在菌と T 細胞分化

腸内常在菌と免疫系の相互作用に関する研究においては、近年、特定の微生物群が特定の細胞群を誘導することが明らかとなってきた。マウスの小腸においては Segmented filamentous bacteria (SFB) が Th17 細胞の誘導に関わっており、*Citrobacter rodentium* により引き起こされる感染性腸炎に対する抵抗性を高めることが明らかとなった (Ivanov et al., 2009)。一方で Wu ら (2010) は SFB により誘導される Th17 細胞が自己免疫疾患の悪化に関わっている可能性を示している。そして、この SFB による Th17 細胞の誘導のメカニズムとして、小腸の樹状細胞による SFB の抗原提示が必須であることが示された (Goto et al., 2014)。また、常在菌の中の *Clostridium* 属が大腸における Treg 細胞の誘導に関わっていることが Atarashi ら (2010) により報告された。そして、*Clostridium* 属の代謝により産生される酪酸が Treg 細胞の誘導に関与していることが明らかとなった (Furusawa et al., 2013)。*Bacteroides fragilis* についても、それらが分泌する糖質分子の Polysaccharide A が TLR2 を介して Treg 細胞を誘導し、一方で Th17 細胞の分化を抑制していることが示

された (Round et al., 2011)。また、Jeon ら (2012) は *Bifidobacterium breve* が IL-10 を強く産生する Tr1 細胞の誘導に関わることを報告した。このように、腸内常在菌により誘導される T 細胞サブセットが明らかとなり、さらにはそれが疾患の誘導・抑制にも関わっていることが示されてきている。

乳酸菌の免疫調節作用

特定の腸内常在菌が誘導する T 細胞サブセットが明らかになってきているが、消化管内には経口摂取した微生物も多く存在する。口から摂取する微生物で代表的なものとしては、発酵食品やヨーグルトから摂取する乳酸菌やビフィズス菌が挙げられる。Mitsuoka (1974) は、経口摂取する *Lactobacillus* 属や *Streptococcus* 属が小腸において主要な構成細菌群を形成していることを報告している。そして前述したように小腸にはパイエル板が存在し、免疫応答に関わる細胞が多く存在することから、経口的に摂取した乳酸菌などが小腸の免疫細胞を介して腸管免疫に影響を与えていることが考えられる。生体にいい効果をもたらす微生物はプロバイオティクスと呼ばれているが、プロバイオティクス乳酸菌の機能の中でも感染防御作用や抗アレルギー作用など免疫機能に与える影響については日本でも積極的に行われている (Fujiwara et al., 2004; Yasui et al., 2004; Masuda et al., 2008; Nonaka et al., 2008; Kawase et al., 2010)。プロバイオティクス乳酸菌が獲得免疫系に与える効果としては、Th1 免疫を増強することによるアレルギーの抑制が多い (Fujiwara et al., 2004; Masuda et al., 2008)。また、乳酸菌やビフィズス菌などを増やす糖 (オリゴ糖など) はプレバイオティクスと呼ばれており、プレバイオティクスも免疫機能に影響を与えることが報告されている。例えばフラクトオリゴ糖を摂取すると感染防御に重要な immunoglobulin A (IgA) の産生が増強することがマウスで確認されている (Nakamura et al., 2004)。

食品成分の免疫調節作用

プロバイオティクス、プレバイオティクス以外の食品成分でも免疫系に影響を与える物質は多く発見されており、例えば一部のフラボノイドやカロテノイド、多糖について

は抗アレルギー作用や抗腫瘍作用、感染防御作用などが報告されている。例えばイソフラボンの一種であるゲニステインをマウスに摂取させることで、喘息の症状が軽減されることが確認されている (Gao et al., 2012)。また、リコピンの摂取が喘息を抑えることがマウスで確認されている (Hazlewood et al., 2011)。多糖では海藻由来の硫酸基を有する多糖であるフコイダンに関する報告が非常に多い (Maruyama et al., 2005; Hayashi et al., 2008; Hu et al., 2010)。それ以外にも、ビタミン A は CD103⁺ 樹状細胞によってレチノイン酸に代謝され、それが Treg 細胞の誘導に関わることが知られているが、ビタミン A が欠乏している状態においては IL-13 を強く産生する Th2 細胞が誘導されることでアレルギーが悪化することが報告されている (Yokota-Nakatsuma et al., 2013)。このように普段から摂取する食品の中にも免疫系に影響を与える成分や物質が含まれており、それらの効果を明らかにすることも近年のアレルギー疾患の増加の観点から重要であると考えられる。

古くから日本において摂取されてきた海藻の中にも機能性食品成分が複数見つかってきており、海藻に含まれる非プロビタミン A カロテノイドであるフコキサンチンや硫酸化多糖のフコイダンが注目されている。フコキサンチンにおいては脂質代謝に及ぶ効果が盛んに研究されているが、第 2 章では免疫系、特に T 細胞分化に及ぼす影響を検証した。第 3 章においては、免疫賦活作用について多く報告されているメカブ由来フコイダンと乳酸菌を同時に摂取したときの効果を検証した。第 4 章では日本人が古くから食べている発酵食品・漬け物の中から有用なプロバイオティクス乳酸菌を選抜することを試みた。実際に選抜した乳酸菌の摂取が免疫機能に及ぼす影響を評価した。第 5 章では、発酵食品由来の乳酸菌や常在乳酸菌が腸管の免疫恒常性維持に関わるメカニズムについて調べた。細菌の認識に関わる TLR が明らかとなってきたことから、TLR 遺伝子欠損マウスを用いることで、乳酸菌の構成成分の中で重要な因子の特定を試みた。

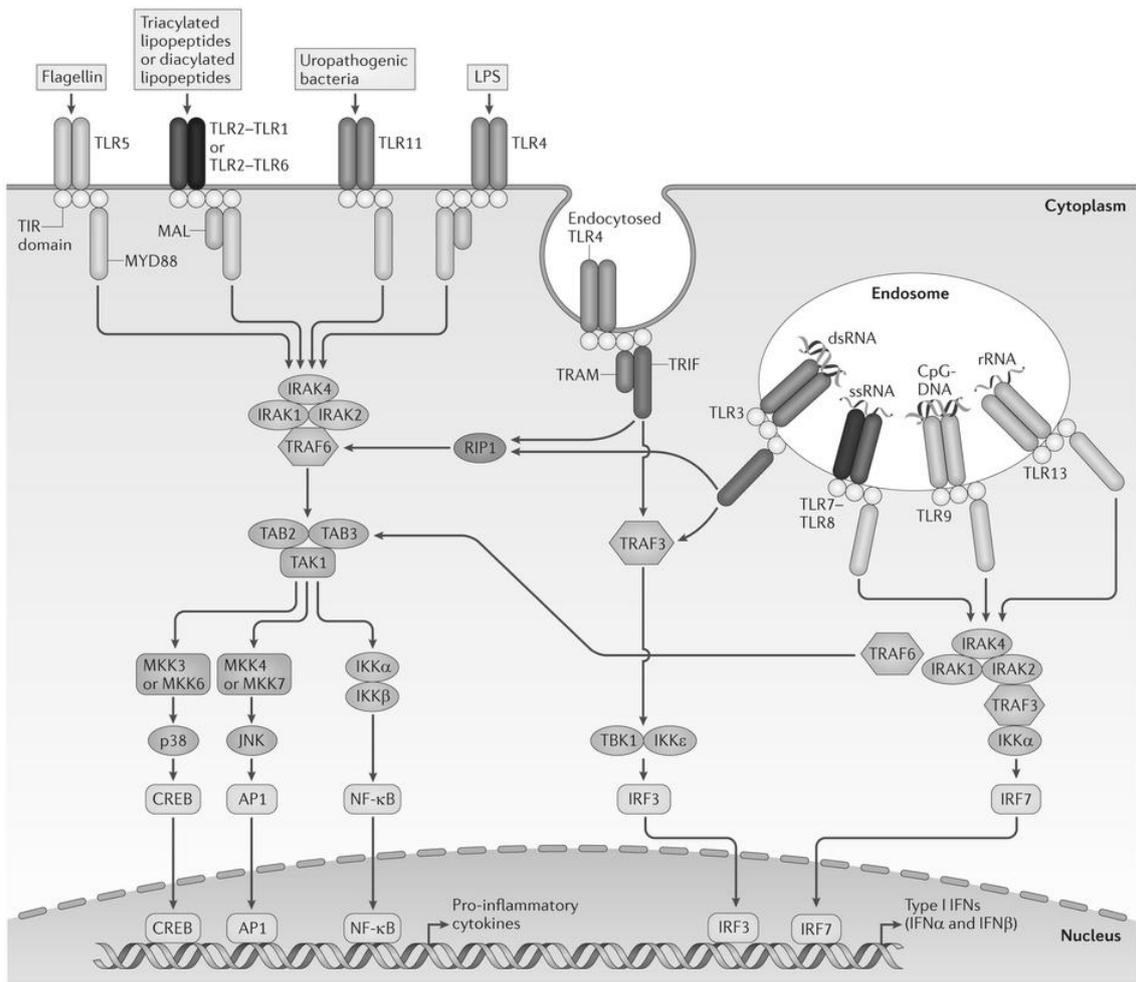


Fig. 1-1. TLR signaling pathway (O'Neill et al., 2013)

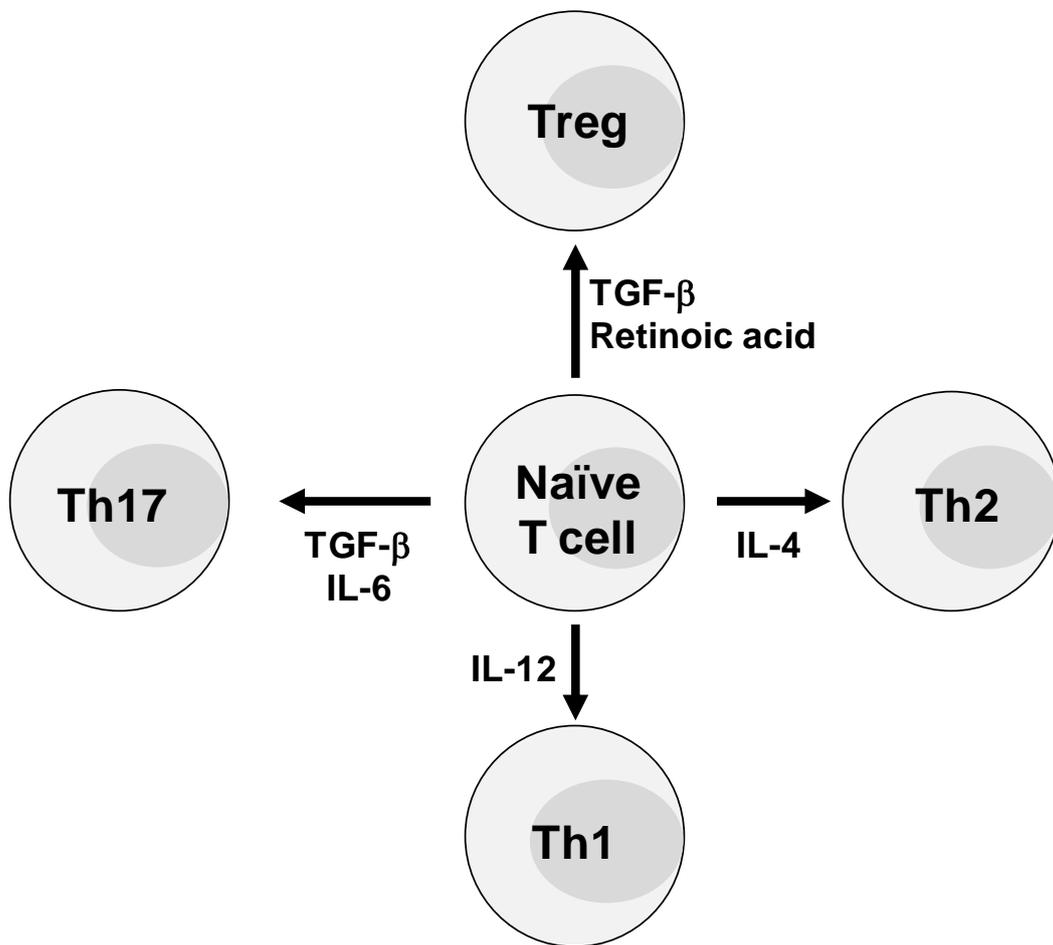


Fig. 1-2. T細胞の分化

第2章

海藻由来カロテノイド・フコキサンチンの制御性 T 細胞誘導作用

第1節 緒言

フコキサンチンは海藻に含まれる非プロビタミン A カロテノイドであり (Fig. 2-1, Sangeetha et al., 2010)、フコキサンチンの代謝改善効果については多く報告されている。その中でも、抗肥満作用、脂質代謝改善作用が多くを占めている (Maeda et al., 2007; Matsumoto et al., 2010)。また、最近では Urikura ら (2011) により、フコキサンチンの抗酸化作用が、紫外線による皮膚のダメージを軽減することが報告されている。このように、様々な機能性を有するフコキサンチンであるが、我々はフコキサンチンの新たな機能性として、免疫機能に与える影響に着目した。免疫機能に関しては、LPS により誘発される眼の炎症をフコキサンチンが抑制することが、ラットで示されている (Shiratori et al., 2005)。また、フコキサンチンの抗腫瘍作用については、細胞実験を中心に報告されている (Tanaka et al., 2012)。しかし、アレルギー疾患や炎症性疾患に深く関わる T 細胞の分化に関しては未だ報告が少ない。第1章でも述べたように、T 細胞には様々な役割・性質を持つサブセットが存在し、各 T 細胞サブセットがバランスを取り合って生体の恒常性を維持している (Fig. 1-2)。例えば花粉症などのアレルギーは Th2 細胞が優位になり発症する。この Th2 細胞は Th1 細胞と互いにバランスを取りながら免疫の恒常性を維持している。

免疫抑制の役割を持つ制御性 T 細胞 (Treg 細胞) については近年報告が非常に多くなっている。ビタミン A 誘導体の一種であるレチノイン酸は Treg 細胞の誘導に関わることが知られている。細胞を用いた実験系において、Treg 細胞は TGF- β (Transforming growth factor- β) とレチノイン酸により分化が誘導されるのに対し、Th17 細胞は IL-6 と TGF- β により分化誘導されることが明らかとなっている (Elias et al., 2008; Xiao et al., 2008)。Treg 細胞は Th17 細胞と拮抗し、バランスが Th17 細胞優位に偏ってしまうと自己免疫疾患、炎症性腸疾患、喘息、アトピー性疾患に陥ることが報告されている

(Louten et al., 2009)。そのため IL-17 の産生抑制や Th17 細胞の分化抑制は、様々な薬や機能性食品のターゲットとなっている。

フコキサンチンは生体内でビタミン A へと変換されない非プロビタミン A カロテノイドである一方、構造はビタミン A に似ている。そこで我々はビタミン A に代謝されないフコキサンチンが、ビタミン A 誘導体のレチノイン酸と同様に T 細胞の分化に影響を与えるかについて検討した。

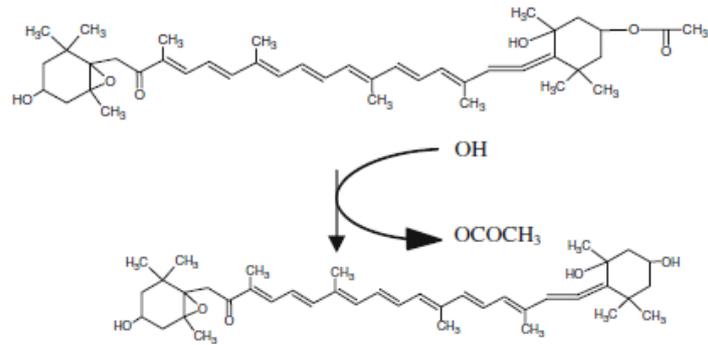


Fig. 2-1. フコキサンチンからフコキサンチノールへの代謝と構造式
(Sangeetha et al., 2010)

第2節 材料と方法

カロテノイドの調製

試験には非プロビタミン A のフコキサンチン、フコキサンチノール、アスタキサンチン、リコペン、ルテイン（和光純薬工業）を用いた。ポジティブコントロールとして all-trans retinoic acid (ATRA, 和光純薬工業) を用いた。各カロテノイド、ATRA をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、DMSO の終濃度が 0.04% となるように添加した。なお、この DMSO 濃度で細胞毒性やサイトカイン産生への影響がないことを確認した。各カロテノイドは終濃度 1-4 μM 、ATRA は終濃度 10^{-3} - 10 μM で添加した。

CD4⁺ T 細胞の調製・培養

C57BL/6 マウス（日本クレア）より脾臓を採取後、細胞分離用培地中で 30 分間攪拌し、脾臓細胞を得た。その後、CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec)、MACS (Miltenyi Biotec) を用いることで CD4⁺ T 細胞を採取した。抗 CD3 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, eBioscience) でコーティングをした 96 ウェル平底マイクロプレートを用いて、採取した CD4⁺ T 細胞 (5 × 10⁵ cells/well) を抗 CD28 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, eBioscience)、IL-6 (20 ng/ml, R&D Systems)、TGF- β (2 ng/ml, R&D Systems)、及び各サンプル存在下で 3 日間培養した。

Naïve T 細胞の調製・培養

C57BL/6 マウスより脾臓を採取後、細胞分離用培地中で 30 分間攪拌し、脾臓細胞を得た。その後、CD4⁺ T 細胞を CD4⁺ T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて分離後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD62L 抗体 (eBioscience)、及び FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、Naïve T 細胞 (CD4⁺CD62L⁺ T 細胞) を分離した。抗 CD3 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でコーティングをした 96 ウェル平底マイクロプレートを用いて、採取した Naïve T 細胞 (5 × 10⁵ cells/well) を抗 CD28 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、IL-6 (20 ng/ml)、TGF- β (2 ng/ml)、及び各サンプル存在下で 3 日間

培養した。

ELISA

CD4⁺ T 細胞の培養 3 日後の上清中の IL-17 濃度を、Mouse IL-17A ELISA Set (eBioscience) を用いて測定した。

定量的 RT-PCR

CD4⁺ T 細胞の培養 3 日後の細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出後、Primescript RT Reagent (Takara) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。その後、SYBR premix Ex Taq (Takara) と各種プライマー (Table 2-1) を用いて定量的 RT-PCR を行った。各 mRNA 発現量はβ-actin の mRNA 発現量で標準化し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体の刺激のみの細胞における発現量に対する相対値で表した。

フローサイトメーター解析

Naïve T 細胞の培養 3 日後の細胞を 100 ng/ml の phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, シグマ)、500 ng/ml の Ionomycin (シグマ)、0.2% (v/v) の GolgiStop (BD Bioscience) 存在下で 4 時間培養した。その後、Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて固定後、FITC 標識抗 IL-17 抗体 (eBioscience)、及び Phycoerythrin (PE) 標識抗 Foxp3 抗体 (eBioscience) で染色した。そして、FACSCalibur を用いて Treg 細胞及び Th17 細胞の割合を測定した。

Tabel 2-1 プライマー配列

Oligonucleotides, 5'-3'	
ROR γ t	
Forward	TGTCCTGGGCTACCCTACTG
Reverse	GTGCAGGAGTAGGCCACATT
Foxp3	
Forward	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
Reverse	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
β -actin	
Forward	GCTACAGCTTCACCACCACAG
Reverse	GGTCTTTACGGATGTCAA

第3節 結果

3-1. フコキサンチンによる IL-17 産生抑制作用

フコキサンチンを含む非プロビタミン A のカロテノイドが IL-17 の産生を抑制するかについて、マウス脾臓由来の CD4⁺ T 細胞を用いて評価した。Th17 細胞誘導因子 (IL-6, TGF- β) を添加する条件において各カロテノイド (フコキサンチン、アスタキサンチン、リコペン、ルテイン) を添加することで、各カロテノイドが IL-17 産生に及ぼす影響を調べた。すると、フコキサンチンを添加した場合のみレチノイン酸と同様に IL-17 の産生が抑制されることが明らかとなった (Fig. 2-2)。IL-17 の産生が抑制されたことから、フコキサンチンに Th17 細胞の分化を抑制する作用、もしくは Th17 細胞と拮抗する Treg 細胞の分化を促進する作用があることが考えられた。

3-2. フコキサンチンによる ROR γ t mRNA 発現量の抑制と Foxp3 mRNA 発現量の亢進

Th17 細胞誘導因子 (IL-6, TGF- β) を添加した条件における Th17 細胞に特徴的な転写因子 ROR (Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor) γ t の mRNA 発現量を調べた。すると、ATRA と同様にフコキサンチン添加により濃度依存的に ROR γ t mRNA 発現量が抑制されることが示された (Fig. 2-3A)。一方、TGF- β のみを添加する条件において Treg 細胞に特徴的な転写因子 Foxp3 (Forkhead box P3) の mRNA 発現量を調べた。このとき、ATRA と同様にフコキサンチンの濃度依存的に Foxp3 mRNA 発現量が増加することが示された (Fig. 2-3B)。以上の結果より、フコキサンチンによって Th17 細胞の分化が抑制され、Treg 細胞の誘導されることが示唆された。

3-3. フコキサンチンによる Th17 細胞分化抑制と Treg 細胞分化誘導

フコキサンチンが T 細胞の分化に与える影響を評価するために、Th17 細胞誘導因子 (IL-6, TGF- β) を添加した条件でマウス脾臓細胞由来の Naïve T 細胞を培養し、Treg 細胞、もしくは Th17 細胞への分化を調べた。するとフコキサンチンの添加濃度依存的

に Th17 細胞の分化が抑制され、同時に Treg 細胞の分化が誘導されることが明らかとなった (Fig. 2-4)。

また、フコキサンチンは消化管内でリパーゼ等の消化酵素によりフコキサンチノールへと変換され体内に吸収されることが報告されている (Asai et al., 2004; Sangeetha et al., 2010)。そこでフコキサンチノールが Naïve T 細胞の分化に及ぼす影響についても調べたところ、フコキサンチノールについてもフコキサンチンと同様の作用があることが明らかとなった (Fig. 2-4)。このことから、フコキサンチンを摂取後、フコキサンチノールへと代謝されたとしても、同様の効果を発揮することが示唆された。

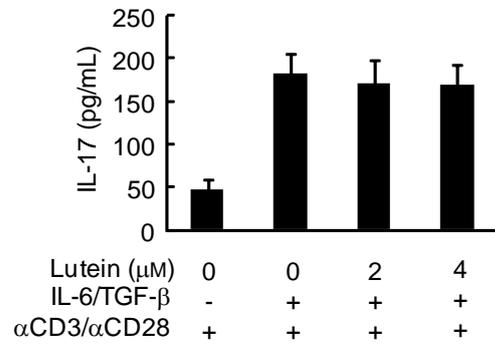
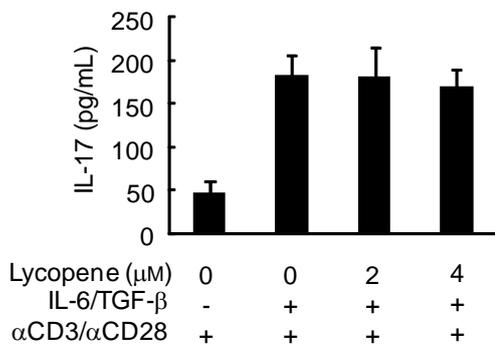
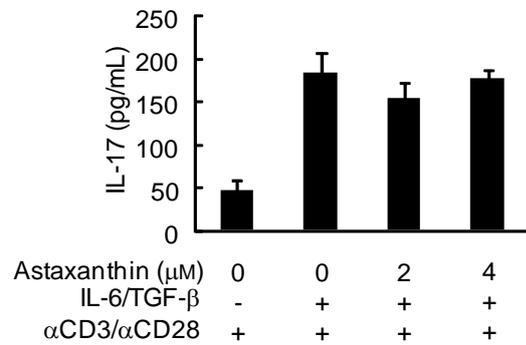
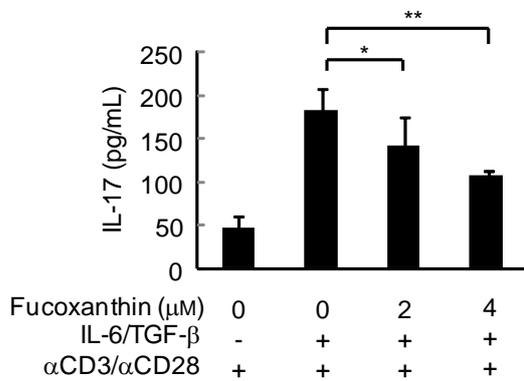
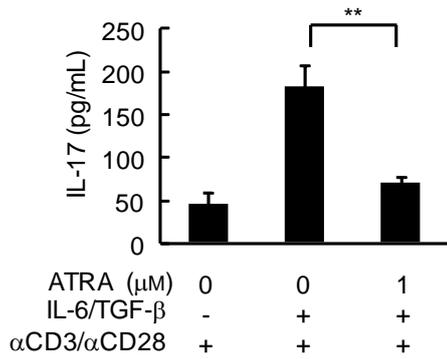


Fig. 2-2. 各カロテノイドが IL-17 産生に与える影響

マウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 抗体 (αCD3)、抗 CD28 抗体 (αCD28)、IL-6、TGF-β存在下で培養するとき ATRA、各カロテノイドを添加し、IL-17 産生量を測定した。エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

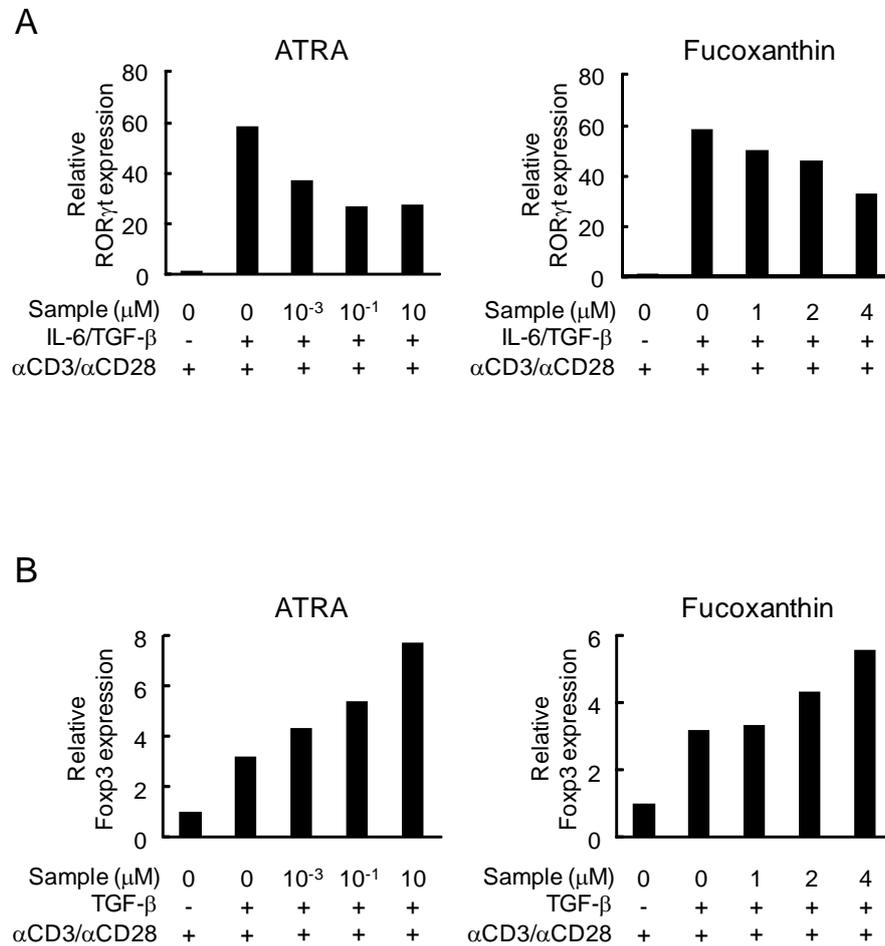


Fig. 2-3. フコキサンチンが ROR γ t mRNA、Foxp3 mRNA 発現量に与える影響
 マウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を Th17 細胞誘導条件下 (A)、Treg 細胞誘導条件下 (B)
 で培養するとき ATRA、各カロテノイドを添加し、各 mRNA 発現量を測定した。結
 果は 3 実験行い、そのうちの 1 実験の結果を示した。

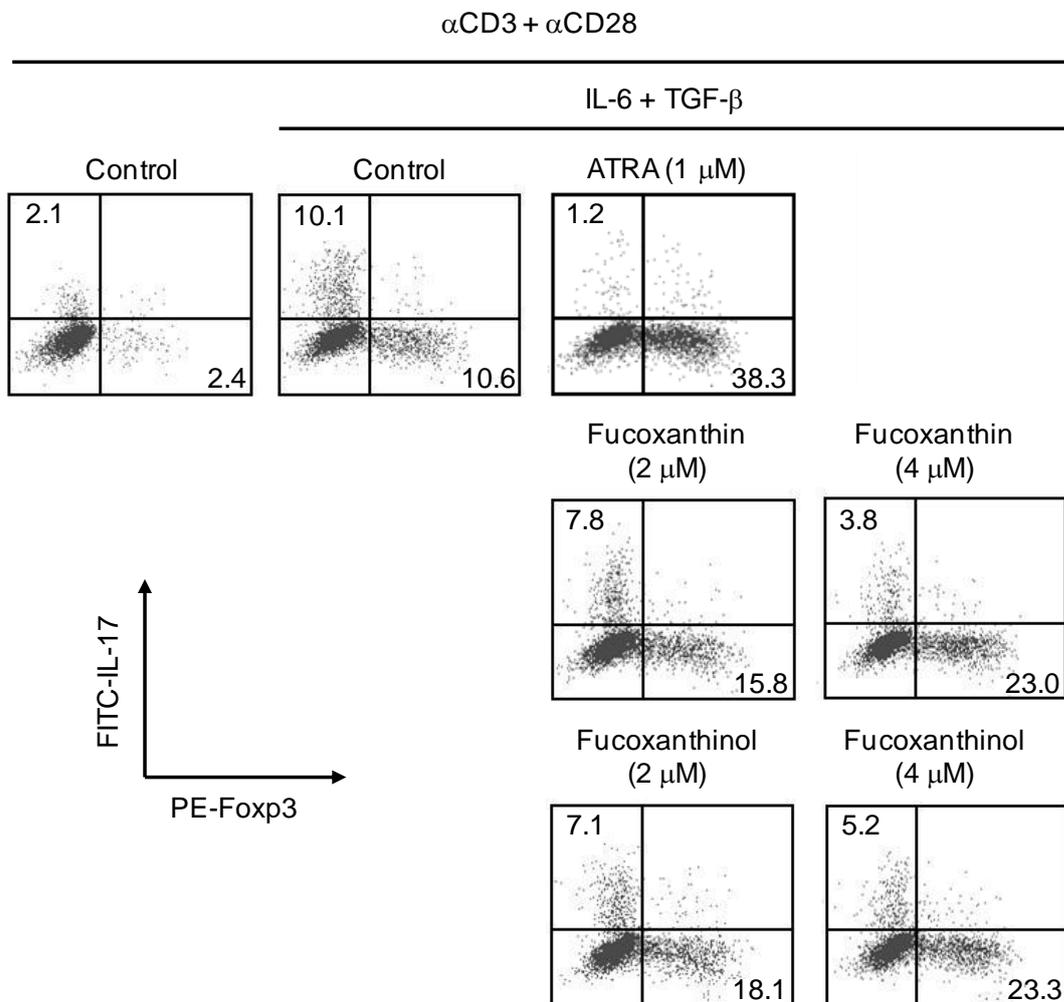


Fig. 2-4. フコキサンチン、フコキサンチノールが T 細胞分化に与える影響

マウス脾臓由来 Naïve T 細胞を抗 CD3 抗体 (α CD3)、抗 CD28 抗体 (α CD28)、IL-6、TGF- β 存在下で培養するとき ATRA、フコキサンチン、フコキサンチノールを添加し、T 細胞の分化を調べた。数値は各領域中の細胞の割合 (%) を表す。結果は 3 実験行い、そのうちの 1 実験の結果を示した。

第4節 考察

本研究において、非プロビタミン A のフコキサンチン、及びフコキサンチノールに Th17 細胞の分化抑制作用、Treg 細胞の分化誘導作用が確認された。自己免疫疾患や炎症性腸疾患、喘息、アトピー性皮膚炎などの多くの炎症性疾患に Th17 細胞や Th17 細胞から産生される IL-17 が関わっていることが報告されており (Hemdan et al., 2010; Souwer et al., 2010; Geremia et al., 2011; Zepp et al., 2011)、Treg 細胞を誘導し Th17 細胞分化を抑制する物質はこれらの疾患に対する予防効果・治療効果が期待される。フコキサンチンは今回の細胞実験において、Treg 細胞が誘導される一方で Th17 細胞の分化が抑制されるという、レチノイン酸と同様の現象が観察された。レチノイン酸はレチノイン酸レセプターを介して Treg 細胞を誘導していることが知られている。Klemann ら (2009) の研究においては、このレチノイン酸レセプターのアゴニストをターゲットとして合成された合成レチノイド Am80 をマウスに対して経口投与した際に、実験的自己免疫性脳脊髄炎が抑制されることを示している。フコキサンチン、フコキサンチノールがこのような合成レチノイドと同様にレチノイン酸レセプターを介して効果を発揮しているかは、現在のところ不明である。レチノイン酸レセプターのアンタゴニストである LE540 を今回用いた細胞試験系に添加する実験も行ったが、LE540 を添加したときに Th17 細胞の分化が強く誘導されてしまうため、フコキサンチンの効果を LE540 が消失させるかは判断できなかった。レチノイン酸レセプターの関与を調べるためには、動物実験によりフコキサンチンの抗炎症効果を示す際に LE540 を静脈投与し、フコキサンチンの効果に与える影響を評価する必要がある。また合成レチノイドについてはその構造によりレチノイン酸レセプターとの親和性が大きく異なることが報告されている (Mailfait et al., 2000)。フコキサンチンやフコキサンチノールと他のカロテノイドで活性が異なることに、レチノイン酸レセプターとの親和性が関与していることが考えられる。

一方で最近、様々な Treg 細胞誘導物質が明らかとなっている。その中で、Atarashi ら (2011) により腸内細菌の *Clostridium* 属が Treg 細胞を誘導していることが報告さ

れたが、さらに Furusawa ら (2013) は *Clostridium* 属の代謝により産生される酪酸が Treg 細胞の誘導に関わっていることを示した。酪酸については、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害して Foxp3 の転写を促進するというエピジェネティクスな制御により、Treg 細胞の分化を誘導していることが明らかとなった。しかし、このエピジェネティクスな制御では Treg 細胞が誘導される一方で、その他の T 細胞サブセット (Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞) の分化には影響を与えないことが細胞実験により示されている。つまり、今回のフコキサンチンにみられるような Treg 細胞の誘導と Th17 細胞の分化抑制が同時に観察される現象は、酪酸のようなエピジェネティクスな制御によるものではないことが推察される。

フコキサンチンがレチノイン酸様活性を有していることが示唆される一方で、ビタミン A 代謝に関わる副作用を引き起こさずに自己免疫疾患や炎症性疾患に効果を発揮することを確認する必要がある。現在のところフコキサンチンについては、1000 mg/kg BW で 30 日以上摂取しても肝臓や腎臓、脾臓、生殖器に異常は観察されず、安全性に問題がないことが確認されている (Beppu et al., 2009)。このような報告からも今後の疾患への応用が期待される。

第3章

メカブ由来フコイダンによる乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 株の免疫調節作用増強効果

第1節 緒言

ワカメのメカブにはフコイダンと呼ばれる硫酸基を含む多糖が含まれている (Fig. 3-1, Ale et al., 2011)。フコイダンについては抗炎症効果、抗ウイルス効果、抗腫瘍効果など様々な作用が報告されている (Maruyama et al., 2003; Matsumoto et al., 2004; Maruyama et al., 2005; Maruyama et al., 2006; Hayashi et al., 2008; Hidari et al., 2008; Hu et al., 2010)。細胞実験においては、フコイダンはマクロファージの NO 産生には影響を与えずに貪食作用を活性化し、それによりナチュラルキラー (NK) 細胞や細胞傷害性 T 細胞を活性化させることで、抗ウイルス作用が発揮されることが報告されている (Hayashi et al., 2008)。また、フコイダンの経口投与が Th1 免疫を増強し、NK 細胞を活性化することで抗腫瘍効果を誘導することが報告されている (Maruyama et al., 2006)。また、樹状細胞をフコイダンで処理することにより、CD8⁺ T 細胞による IFN- γ 産生を促進し、ヒト腫瘍細胞に対する T 細胞の細胞傷害活性が高まることが報告されている (Hu et al., 2010)。このように、フコイダンは樹状細胞やマクロファージのような抗原提示細胞に作用し、抗原提示細胞が T 細胞や NK 細胞の細胞傷害活性を高め、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を発揮していることが明らかとなっている。

一方で近年、乳酸菌の抗アレルギー・抗ウイルス効果についての報告が増えてきている (Fujiwara et al., 2004; Yasui et al., 2004; Nonaka et al., 2008; Kawase et al., 2010)。ヘルパーT細胞は獲得免疫系において重要な役割を担っており、第2章でも述べたように役割に応じていくつかの T 細胞サブセットに分類される。Th2 細胞はアレルギー反応に関わっており、Th1 細胞と互いに拮抗する性質を持つため、Th1 免疫を増強する食品には抗アレルギー効果が期待される (Romagnani et al., 2000)。乳酸菌の刺激により IL-12 を含む様々なサイトカインが樹状細胞やマクロファージから産生

される (Morita et al., 2002; Cross et al., 2004)。そして、乳酸菌が抗原提示細胞に対し IL-12 を誘導することで Th1 免疫が増強し、その一方で Th2 免疫が抑制されることにより抗原特異的 IgE 産生を抑制することでアレルギー反応が抑制されることがいくつかの乳酸菌で示されている (Fujiwara et al., 2004)。我々はこれまでにしょうゆ諸味由来の乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 についてもこのような効果を確認しており (Masuda et al., 2008)、さらに臨床試験においても KK221 を摂取することでアレルギー症状を緩和することが確認された (Nishimura et al., 2009)。

以上のようにフコイダンは抗原提示細胞のサイトカイン産生を介さずに NK 細胞活性や細胞傷害性 T 細胞に作用する一方で、乳酸菌はサイトカイン産生を介してヘルパー T 細胞に変化を与える。このようにフコイタンと乳酸菌は異なるメカニズムにより抗原提示細胞を活性化し、効果を発揮していることが考えられることから、同時に摂取した際に相乗的に免疫機能に影響を与えることが期待される。そこで本研究では、乳酸菌 KK221 をフコイタンと共に摂取した際に、Th1 免疫の増強や Th2 免疫の抑制に与える影響を評価した。

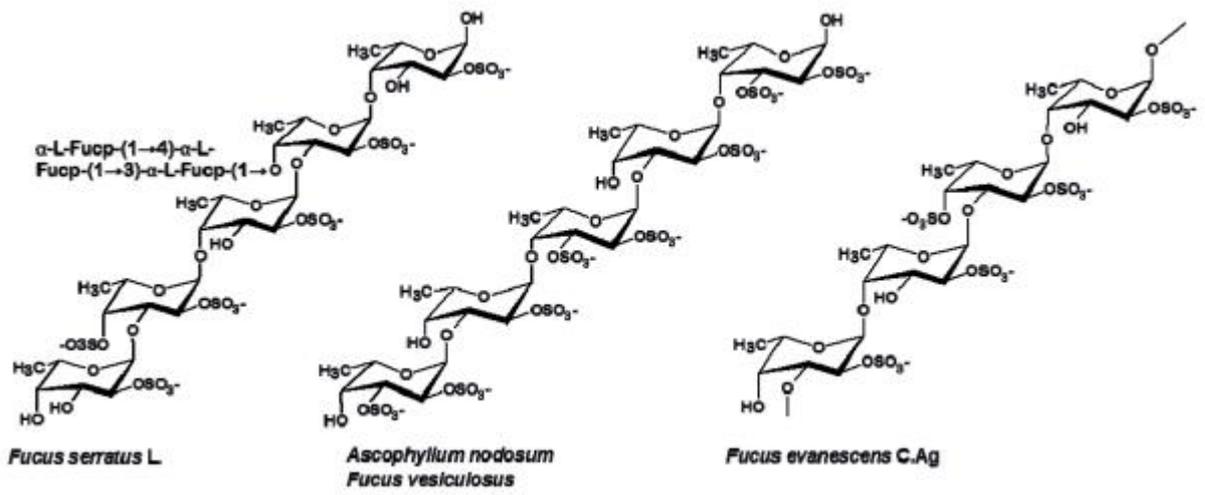


Fig. 3-1. フコイダンの構造 (Ale et al., 2011)

第2節 材料と方法

乳酸菌体の調製

Tetragenococcus halophilus KK221 を 10% NaCl 含有 MRS 培地 (BD Bioscience) で 30°C、24-48 時間培養した。その後、生理食塩水で 2 回洗浄を行い、95°C で 10 分間加熱処理を行った。マクロファージの貪食を調べる実験においては、KK221 菌体を 100 µg/ml の FITC isomer-I (同仁化学研究所) と 30 分間インキュベートし、その後生理食塩水で 3 回洗浄を行い、菌体の FITC 標識を行った。

フコイダンの調製

フコイタンは乾燥ワカメのメカブより、Lee ら (2004) の方法に従い精製した。フコイダンの脱硫酸化は Maruyama ら (2007) の方法に従い行った。低分子化フコイダンの調製には、まず 10 g のフコイタンを 2 mM HCl 溶液 1000 ml に溶解し、120°C で 3 時間処理して酸加水分解を行った。その後、1 M NaOH 溶液で中和し、膜処理により 3-50 kDa の分子量のフコイタンを分離し、凍結乾燥を行った。低分子化フコイタンは Toyoperl HW-65F (8 mm × 1000 mm) カラムと Toyoperl HW-40F (8 mm × 1000 mm) カラムを用いてゲル濾過により確認した。

試薬・抗体

フコイタンを構成するフコースは和光純薬工業より購入した。抗 IL-12 中和抗体、ラット IgG2a (コントロール抗体) は eBioscience より購入した。卵白アルブミン (Ovalbumin, OVA, Grade V) は Sigma より購入した。

マウス

細胞実験、及び動物実験にはチャールズリバー社の BALB/c マウスを用いた。これらの実験はキッコーマン動物実験委員会の承認を得ており、日本動物実験学会ガイドライン、及びキッコーマン動物実験ガイドラインに従い実施した。

細胞調製

マウス腹腔浸出マクロファージは、BALB/c マウス腹腔内にチオグリコレート溶液 (BD Diagnostics) を 2 ml 投与し、4 日後に腹腔内から回収した。各組織の細胞は、BALB/c マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の各組織を採取後、細胞分離用培地中で撹拌することにより調製した。

サイトカイン産生誘導試験

マウス腹腔浸出マクロファージ (2×10^5 cells/well) を KK221 (2×10^5 個/well) と共に 37°C で 24 時間培養した。脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から調製した各臓器細胞 (5×10^5 cells/well) は KK221 (5×10^5 個/well) と共に 37°C で 48 時間培養した。培養後の培養上清中のサイトカイン濃度は ELISA 法により測定した。

菌体貪食試験

マウス腹腔浸出マクロファージ (2×10^5 cells/well) をフコイダン存在下で 2 時間前培養を行い、その後 FITC 標識 KK221 を添加し 4 時間培養を行った。マクロファージはトリプシン (Sigma) で処理し回収し、FITC⁺細胞の割合をフローサイトメーターで測定した。

動物試験

BALB/c マウス (6 週齢、雄、n=6) の腹腔内に OVA (20 µg) を 0.1 ml の Alum (Sigma) と共に試験開始 0 日目、14 日目に投与することで OVA 感作を行った。生理食塩水投与群 (200 µl/day)、フコイダン投与群 (5 mg/day)、KK221 投与群 (4×10^8 /day)、フコイダン/KK221 投与群 (それぞれ 1 mg/day、 4×10^8 /day) に対し、各サンプルを試験開始 0 日目から 21 日間投与した。血清を試験開始 21 日目に採取し、OVA 特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。OVA で感作していないマウス (n=3) からも血清を採取した。また、脾臓細胞を平底 24 ウェルプレートにおいて 100 µg/ml OVA 存在

下で 37°C、72 時間培養した。培養後の上清中の IFN- γ 、IL-4 濃度を ELISA 法により測定した。

ELISA

IL-12p70、IFN- γ 、IL-4、IL-6、TNF- α (tumor necrosis factor- α) の濃度は Mouse OptEIA™ ELISA Set (BD Biosciences) を用いて測定した。また、OVA 特異的 IgE の測定は Tsuji ら (2003) の方法に従い測定した。

第3節 結果

3-1. マクロファージのフコイダン、KK221 に対するサイトカイン応答

これまでに我々は KK221 がマクロファージからの IL-12 産生を誘導することを確認している (Masuda et al., 2008)。そこで、フコイダンが KK221 の IL-12 産生誘導活性に与える影響を評価した。マクロファージをフコイダンで刺激した際には IL-12 が産生されないのに対し、KK221 存在下でフコイダンを添加すると、フコイダンの濃度依存的に IL-12 産生が亢進した (Fig. 3-2A)。同様の現象が IL-6 や TNF- α においても観察された (Fig. 3-2B, C)。一方でフコイダンの構成糖であるフコースに関してはこのような現象は観察されなかった (Fig. 3-2A-C)。これらの結果から、KK221 とフコイダンで同時に刺激することにより、相乗的にサイトカイン産生が亢進することが示された。また、FITC 標識 KK221 菌体を用いてマクロファージの菌体貪食について調べたところ、フコイダンで刺激したマクロファージで KK221 菌体の貪食が促進されていた (Fig. 3-2D)。このことから、フコイダンによる相乗的なサイトカイン産生増強に菌体貪食の促進が関わっていることが示唆された。

3-2. 脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板細胞のフコイダン、KK221 に対するサイトカイン応答

マクロファージ以外の細胞においても同様な現象が観察されるかを調べるために、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から調製した細胞を用いてサイトカイン応答を評価した。フコイダンのみの刺激において弱い IFN- γ 産生が確認された一方で、KK221 存在下ではフコイダンの添加濃度依存的に相乗的に IFN- γ 産生が増加した (Fig. 3-3)。このことから、フコイダンはマクロファージだけではなく、臓器中に存在する樹状細胞に対しても KK221 の効果を高め、結果として T 細胞等の IFN- γ 産生を増強していることが示された。

3-3. 抗 IL-12 中和抗体を用いた評価

各臓器細胞から産生された IFN- γ が、抗原提示細胞から産生された IL-12 により誘導されていることを確認するため、抗 IL-12 中和抗体を用いて同様の実験を行った。フコイダンで刺激した際の IFN- γ 産生誘導も抗 IL-12 中和抗体の添加により消失することから、フコイダンにより誘導される微弱な IFN- γ も IL-12 産生を介していることが示された (Fig. 3-4)。また、KK221 とフコイダンの両方で刺激した際の相乗的な IFN- γ 産生誘導についても抗 IL-12 中和抗体により消失したことから、相乗的な IFN- γ 産生に IL-12 が関わっていることが示された (Fig. 3-4)。

3-4. フコイダンの硫酸基、分子量がサイトカイン応答に与える影響

フコイダンは硫酸基を含む多糖のため、硫酸基、及び分子量がフコイダンのサイトカイン産生増強作用に与える影響を評価した。フコイダンは 26.7% (w/w) の硫酸基を含むのに対し、脱硫酸化フコイダンは 1.2% (w/w) に低下していることを確認した (Table 3-1)。また、低分子化フコイダンは通常のフコイダン (分子量 3-400 kDa、ピーク多糖の分子量 67 kDa) に比べ、分子量 2-206 kDa、ピーク多糖の分子量 20 kDa に低下していた (Fig. 3-5A)。低分子化フコイダンの硫酸基が 12.6% (w/w) に減少していたが (Table 3-1)、これは低分子化処理の際の酸加水分解によるもとと考えられる。脾臓細胞、及びパイエル板細胞を用いて KK221 添加時の各フコイダンの IFN- γ 産生増強作用を確認したところ、脱硫酸化フコイダンではその作用が消失した一方で、低分子化フコイダンでは未処理のフコイダンと同程度か、パイエル板細胞の一部のフコイダン濃度 (10 μ g/ml) では高い活性を示した (Fig. 3-5B, C)。このことから、フコイダンのサイトカイン産生増強作用には硫酸基が必須であり、分子量については低分子化を行っても活性は低下しないことが明らかとなった。

3-5. フコイダンと KK221 の同時接種が Th1/Th2 バランスに与える影響

これまでに KK221 とフコイダンの相乗的なサイトカイン産生誘導について示してきたが、実際に動物試験で Th1/Th2 バランスに影響を与えるか評価した。OVA で感作したマウスにフコイダン、KK221、もしくはその両方を投与したときの、血清中 OVA 特

異的 IgE と脾臓細胞の OVA 特異的サイトカイン産生について調べた。血清中 OVA 特異的 IgE 量は OVA/Alum で感作することにより大きく上昇した (Fig. 3-6A)。そして、フコイダン投与群では OVA 特異的 IgE が抑制されなかったが、KK221 投与群、フコイダン/KK221 投与群では有意に抑制された (Fig. 3-6A)。また、脾臓細胞の OVA 特異的サイトカイン産生については、Th1 細胞より産生される IFN- γ がフコイダン/KK221 投与群でのみ生理食塩水群に比べ有意に高く産生された (Fig. 3-6B)。一方で Th2 細胞より産生される IL-4 はフコイダン/KK221 投与群で生理食塩水群に比べ有意に抑制された (Fig. 3-6B)。以上の結果より、フコイダンと KK221 を同時に摂取することで強く Th1 免疫が亢進し、アレルギー反応が抑制されることが示された。

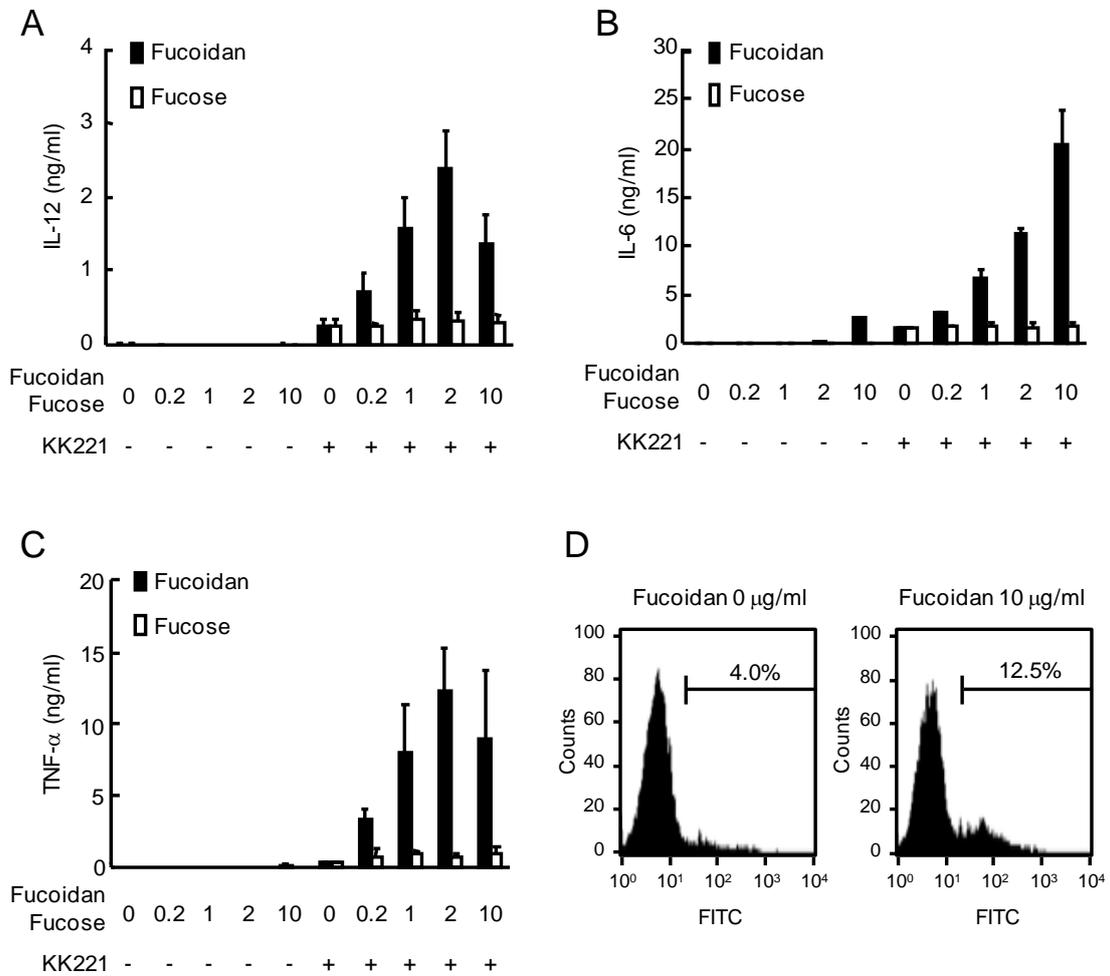


Fig. 3-2. マクロファージのフコイダン、KK221 に対する応答

(A-C) BALB/c マウスより調製したマクロファージを KK221 とフコイダン (0-10 μg/ml) もしくはフコース (0-10 μg/ml) 存在下で 24 時間培養した (n=3)。培養後の上清中の IL-12 (A)、IL-6 (B)、TNF-α (C) を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を表す (n=3)。(D) FITC 標識 KK221 を用いてマクロファージの菌体貪食について測定した。数値は FITC⁺の細胞の割合を表す。

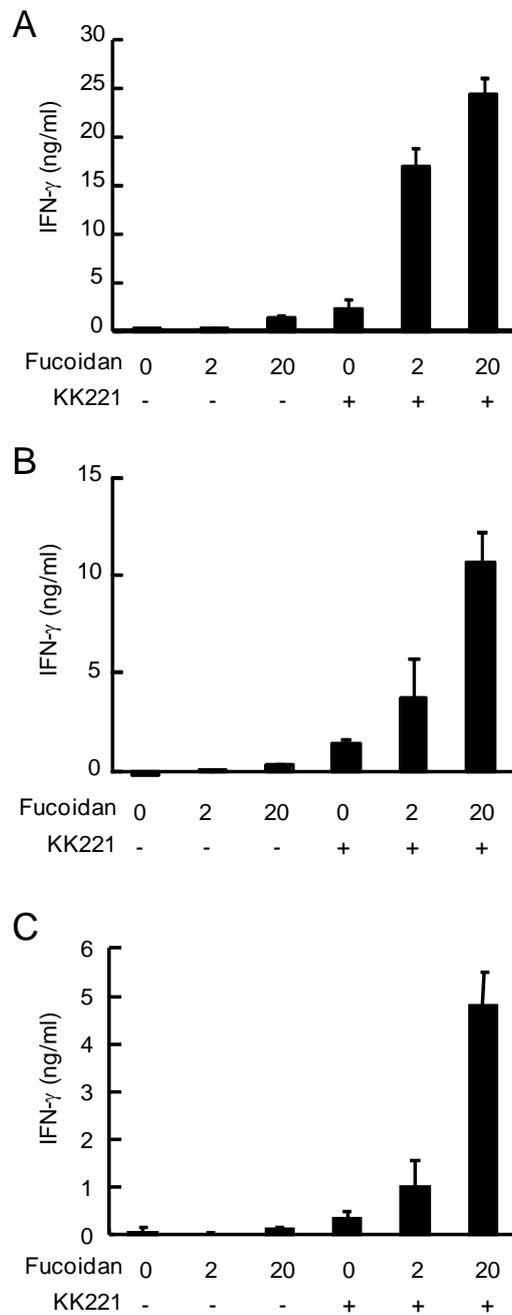


Fig. 3-3. 脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板細胞の KK221、フコイダンに対する応答
BALB/c マウスより脾臓細胞 (A)、腸間膜リンパ節細胞 (B)、パイエル板細胞 (C) を調製し、KK221、フコイダン (0-20 μg/ml) 存在下で 48 時間培養した。培養後の上清中の IFN-γ濃度を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を表す (n=3)。

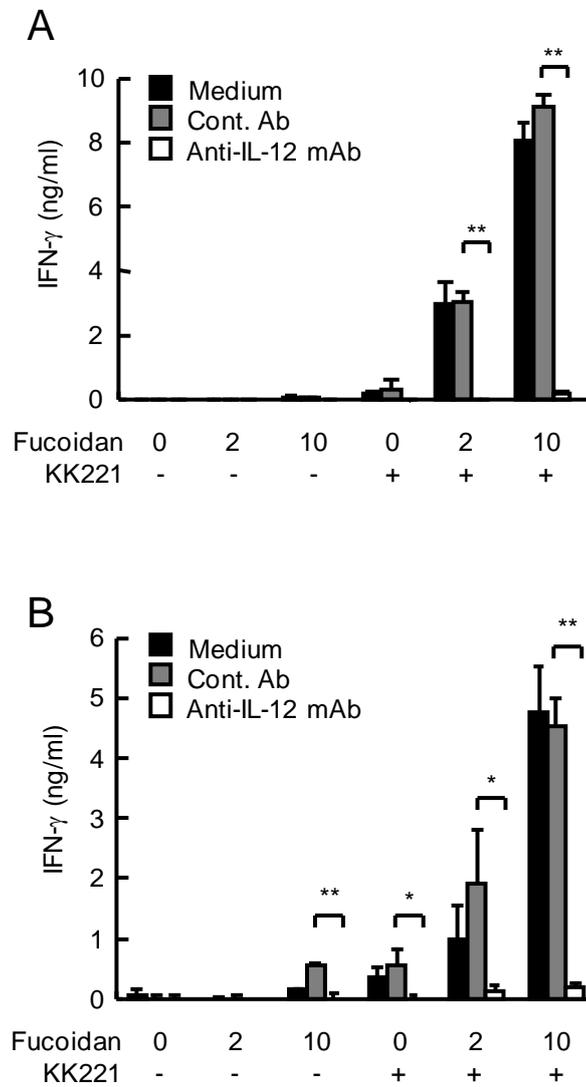


Fig. 3-4. フコイダン、KK221 の IFN- γ 産生誘導に対する IL-12 の関与

BALB/c マウスより調製した脾臓細胞 (A)、パイエル板細胞 (B) を KK221、フコイダン (0-10 $\mu\text{g/ml}$) と共に 48 時間培養する際に、50 $\mu\text{g/ml}$ のコントロール抗体、または抗 IL-12 中和抗体を添加した。培養後の上清中の IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

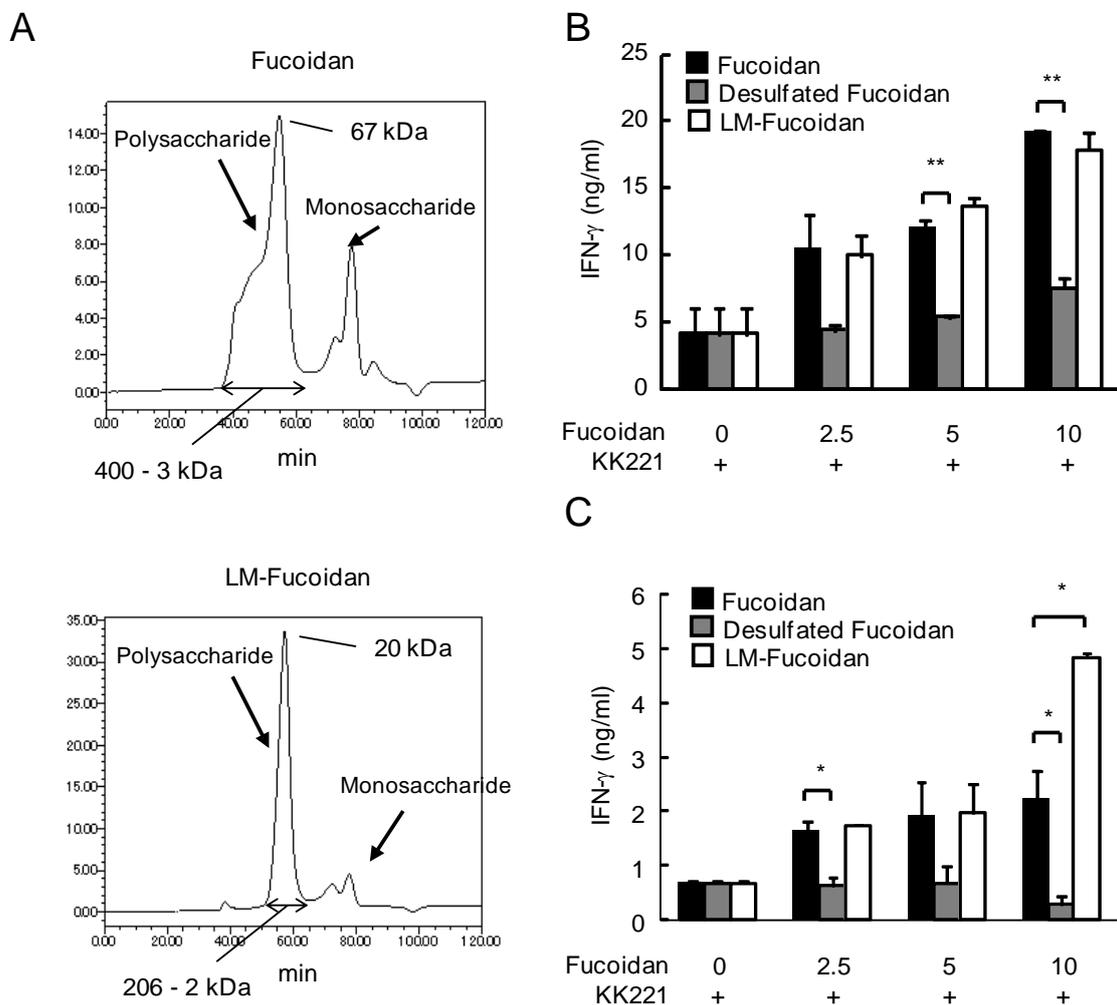


Fig. 3-5. フコイダンの脱硫酸化、低分子化がサイトカイン応答に与える影響

(A) 低分子化 (LM) フコイダンのクロマトグラムを示す。(B-C) BALB/c マウスから採取した脾臓細胞 (B)、パイエル板細胞 (C) を KK221 とフコイダン、脱硫酸化フコイダン、低分子化 (LM) フコイダン (0-10 μg/ml) と共に 48 時間培養した。培養後の上清中の IFN-γ 濃度を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

Table 3-1. フコイダン、脱硫酸化フコイダン、低分子化 (LM) フコイダン中の硫黄、及び硫酸基の含有量

Sample name	Sulfur (% , w/w)	Sulfate group (% , w/w)
Fucoidan	8.9	26.7
Desulfated fucoidan	0.4	1.2
LM-fucoidan	4.2	12.6

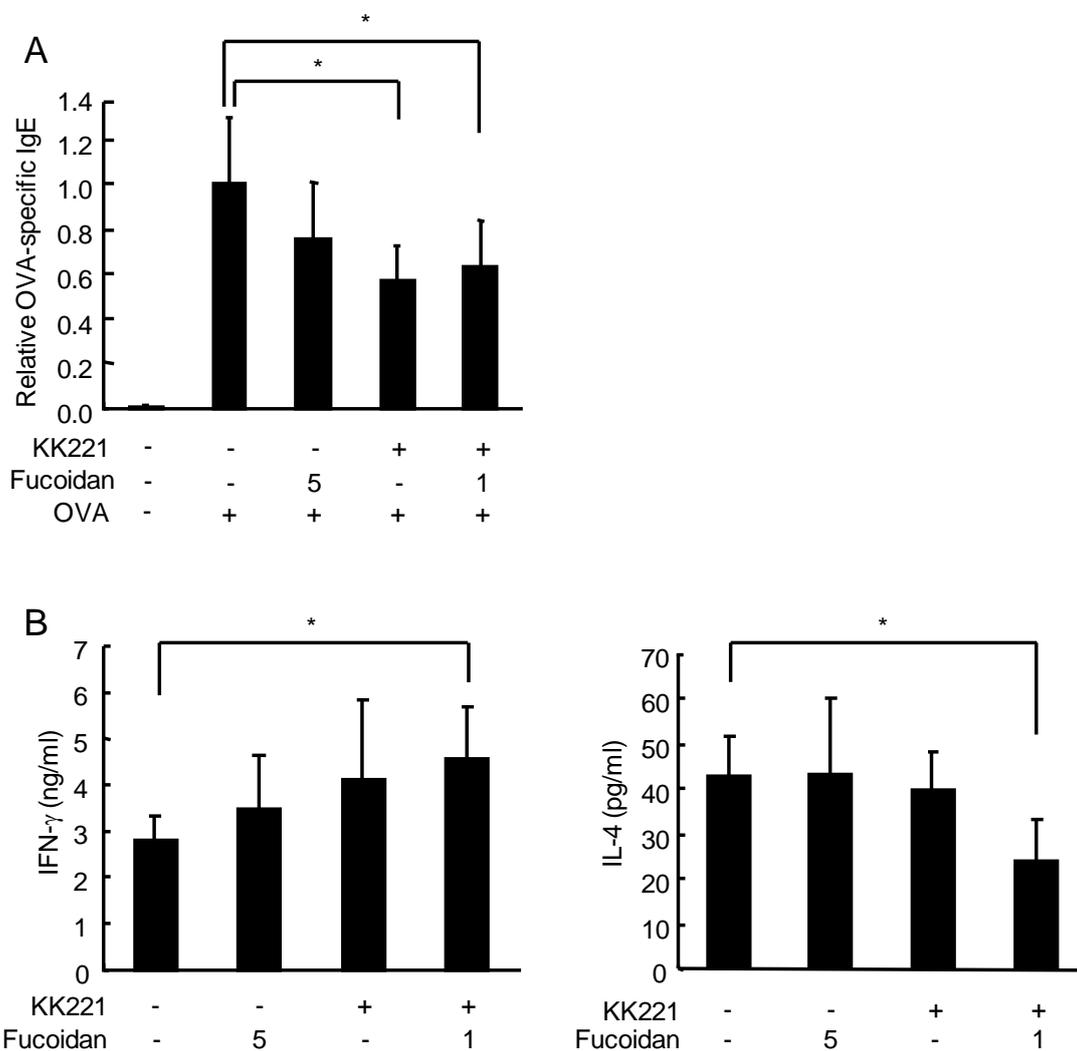


Fig. 3-6. KK221 とフコイダンが血清中 OVA 特異的 IgE 及び Th1/Th2 バランスに与える影響

(A) OVA で感作したマウスに生理食塩水、フコイダン (5 mg/day)、KK221、KK221/フコイダン (1 mg/day) を経口投与した (n=5)。その後、血清中の OVA 特異的 IgE を ELISA 法により測定した。OVA 感作を行った生理食塩水投与群に対する相対値で示した。(B) 脾臓細胞を OVA 存在下で 72 時間培養し、培養後の上清中の IFN- γ 、IL-4 濃度を ELISA 法により測定した。(A,B) エラーバーは標準誤差を表す。(ANOVA, Duncan multiple-comparison test, *p<0.05)

第4節 考察

本研究ではワカメメカブ由来のフコイダンが乳酸菌 KK221 の免疫調節作用を増強することが明らかとなった。そのメカニズムの一つとして、フコイダンが抗原提示細胞の KK221 貪食を促進し、抗原提示細胞のサイトカイン産生を増強することが示唆された。また、このフコイダンの活性には多糖の長さよりも硫酸基が重要であることが分かった。フコイダンに含まれる硫酸含量が、その抗腫瘍作用、抗ウィルス作用に関与することが報告されている (Adhikari et al., 2006; Cho et al., 2010)。また、Nie ら (2006) は多糖の一種である *Grifola frondosa mycelia* を化学的に硫酸化することにより、抗腫瘍効果やマクロファージの貪食活性が高まることを報告している。さらに、*Laminaria digitata* のメカブ由来のβグルカンを硫酸化することにより、貪食活性や NK 細胞の活性を高めることについても報告されている (Vetvicka et al., 2008)。我々は *Lentinula edodes* や *Saccharomyces cerevisiae* 由来のβグルカンが KK221 のサイトカイン誘導活性に影響を与えないことを確認している (data not shown)。これらの知見は、多糖が有する硫酸基が免疫機能に及ぼす効果に必須であることを示唆している。また、本研究ではフコイダンの低分子化は乳酸菌のサイトカイン産生に影響を与えなかったが、一方でフコイダンの低分子化がその抗腫瘍活性を上昇させるという報告もある (Yang et al., 2008)。この報告では低分子化を 5 分間の煮沸という緩やかな条件で行っているのに対し、我々は 120°C で 3 時間行い、それにより約半分まで硫酸基が減少した。活性に大きく寄与する硫酸基が減少した中で通常のフコイダンと同等以上の活性を有していることから、脱硫酸化が起こらないように低分子化を行うことで、通常のフコイダンよりも高い活性を維持した低分子化フコイダンが得られることが考えられる。フコイダンは血液凝固作用についても知られており、Zhang ら (2014) はフコイダンの分子量と硫酸基量が血液凝固作用に影響を与えることを報告している。フコイダンの構造が 0.5 硫酸基/糖で硫酸基を含有し、70 糖程度の大きさのときに電荷密度が最少となり、強い血液凝固作用が得られる。免疫機能に与える影響についてもこのような構造に伴う電荷密度が影響している可能性が示唆される。

自然免疫の活性化は獲得免疫系に大きな影響を与えることが知られており (Fearon and Locksley, 1996)、細菌・ウイルスによる自然免疫の活性化には TLR が関わる (Akira et al., 2001)。特に乳酸菌の認識に関わる TLR はこれまでも多く報告されており、細胞壁成分のペプチドグリカンを認識する TLR2、リポテイコ酸を認識する TLR4 に関するものが多い (Hisbergues et al., 2007; Koizumi et al., 2008; Rigaux et al., 2009)。TLR2 や TLR4 は抗原提示細胞の細胞表面に発現しているのに対し、TLR9 は細胞内のエンドソームに発現している。Rigaux ら (2009) は、*Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 の刺激により樹状細胞から産生される IL-12p40 は TLR2 及び TLR9 を介していることを示した。また、乳酸菌由来の CpG DNA が TLR9 により認識されることも Shimosato ら (2005) により報告されている。これらの報告から、乳酸菌の細胞壁成分以外に核酸成分が TLR9 により認識され、サイトカイン産生が誘導されることが示唆される。TLR9 は細胞内のエンドソームに発現するため乳酸菌の貪食が関わっていることが示唆される。以上から、フコイダンが KK221 のサイトカイン産生を増強し、Th1/Th2 バランスを改善する効果には、フコイダンによる貪食の活性化とエンドソームに発現する TLR による核酸成分の認識が関わっていることが推察される。TLR9 の関与と貪食の重要性については第 5 章でも述べる。

本研究においては KK221 の抗原特異的応答に着目し動物実験を行ったが、乳酸菌は他にも抗炎症作用や感染防御作用を有することが報告されている。我々の実験においても、乳酸菌の認識の場となるパイエル板から調製した細胞の応答にも影響を与えていたことから、フコイダンは抗アレルギー作用以外の乳酸菌の効果も高める可能性が考えられる。

第4章

漬け物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* YU 株のプロバイオティクス効果

第1節 緒言

乳酸菌は古くから食品の保存のために利用されてきた。一方で近年、発酵食品や発酵食品由来の乳酸菌の摂取が健康機能に与える影響について盛んに研究が行われている (Gorbach, 1990; Drouault and Corthier, 2001; Parvez et al., 2006; Nova et al., 2007)。多くの乳酸菌は発酵食品中で低 pH・高食塩濃度の過酷な環境下で生育している (Nomura et al., 2006)。このような乳酸菌は胃酸・胆汁酸に対する耐性を有している場合が多く、ヒトの消化管においても生育・増殖することで腸内細菌叢に影響を与える可能性がある (Dunne et al., 2001)。そのため、発酵食品はプロバイオティクス乳酸菌の分離に適していると考えられる。

近年、マウスやヒトに対する乳酸菌の投与が免疫機能に与える効果について報告されている (Nagao et al., 2000; Fujiwara et al., 2004; Masuda et al., 2008; Nishimura et al., 2009)。第3章でも述べたように、このような乳酸菌は樹状細胞やマクロファージからの IL-12 産生を誘導し、Th1 免疫を増強することで抗アレルギー効果を発揮していることが考えられる。抗アレルギー作用以外にも、乳酸菌摂取がインフルエンザウィルスに対する感染防御作用を高めることが報告されている (Maeda et al., 2009; Kawase et al., 2010; Kobayashi et al., 2011)。これらの研究では、乳酸菌の経口摂取が粘膜面におけるウィルス特異的 IgA や血中におけるウィルス特異的 IgG の産生を促進することで、ウィルスの排除を促進し、感染を防いでいることが示されている。IgA は粘膜面において病原菌やウィルスの定着・侵入を防いでいることが知られている (Mestecky and Russell, 2009)。最近ではある種の常在菌がパイエル板のような腸管関連リンパ組織に定着し、抗原特異的な抗体の産生を誘導していることが確認された (Obata et al., 2010)。さらに、腸内細菌と免疫細胞の相互作用が定常状態における IgA 産生に関わっていることが報告されている (Fagarasan and Honjo, 2004; Tsuji et al., 2008)。この

ような報告から、常在菌や経口摂取したプロバイオティクス乳酸菌はウイルスや病原菌に対する感染防御に働くことが考えられる。感染防御に関わる重要なメカニズムとして、IgA の分泌促進以外にも NK 細胞の活性化が挙げられる。NK 細胞は IL-12 により活性化され、perforin や granzyme を放出することで感染細胞を破壊する (Lowin et al., 1995; Arnon et al., 2001; Takeda et al., 2006)。乳酸菌を経口摂取することでこの NK 細胞が活性化されることが報告されており (Hori et al., 2003)、乳酸菌摂取による感染防御作用にも関与するメカニズムであると考えられる。

本研究においては幅広い発酵食品から乳酸菌を分離し、IL-12 産生誘導を指標に最も優れた乳酸菌株 (*Lactobacillus plantarum* YU, LpYU) を選抜し、抗アレルギー作用やインフルエンザウイルスに対する感染防御作用について評価を行った。

第2節 材料と方法

乳酸菌体の調製

日本の発酵食品（糠床、漬け物）より 203 株の乳酸菌を分離し、試験に用いた。また、東京農業大学菌株保存室で保存されている乳酸菌 5 株を用いた（Table 4-1）。*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRIC1688 以外の乳酸菌は MRS 培地（BD Bioscience）で 30°C、24-48 時間培養した。NRIC1688 は 37°C、24-48 時間培養した。その後、生理食塩水で 2 回洗浄を行い、95°C で 10 分間加熱処理を行った。マウスに対する投与では加熱処理を行わずに用いた。

マウス

細胞実験、及びウイルス感染実験以外の動物実験にはチャールズリバー社の BALB/c マウス（雄）を用いた。野生型及び TLR 欠損の C57BL/6 マウスは兵庫医科大学より供与していただいた。ウイルス感染実験では日本 SLC の BALB/c マウス（雌）を用いた。これらの実験はキッコーマン動物実験委員会の承認を得ており、日本動物実験学会ガイドライン、及びキッコーマン動物実験ガイドラインに従い実施した。ウイルス感染実験については富山大学のガイドラインに従い実施された。

細胞調製

マウス腹腔浸出マクロファージ、脾臓細胞、腸間膜リンパ節細胞、パイエル板細胞は、第3章と同様の方法で採取した。骨髄由来樹状細胞（bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs）の調製は以下の通り行った。まずマウス大腿骨の骨髄細胞を採取後、Red blood cell lysis buffer (Sigma)により溶血後、PE 標識抗 CD4 抗体 (eBioscience)、PE 標識抗 CD8 抗体 (eBioscience)、PE 標識抗 I-A/I-E 抗体 (eBioscience) と共に 4°C 30 分インキュベートした。その後抗 PE マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて MACS によりネガティブフラクションを回収した。回収した細胞を 6 ウェル平底プレートにおいて 3×10^6 cell/ml の細胞濃度で 10% GM-CSF 含有細胞培養用培地で培養

した。培養 3 日目、6 日目に培地を半量交換し、培養 8 日目に浮遊細胞を回収した。FITC 標識抗 CD11c 抗体 (eBioscience) を用いて FACSCalibur で確認したところ、CD11c⁺ 細胞の割合は 80-85%であった。

胃酸耐性、胆汁酸耐性の評価

胃酸耐性試験は pH 2.5 の PBS に MRS 培地で培養した各乳酸菌を接種し、37°C で 3 時間インキュベートを行った。処理前後の菌数から各乳酸菌の生存率を算出した。胆汁酸耐性試験は 0.5%胆汁末 (Sigma) を含有する PBS に MRS で培養した各乳酸菌を接種した。37°C で 24 時間インキュベートし、処理前後の菌数から各乳酸菌の増殖率を算出した。

IL-12 産生誘導試験

マウス腹腔浸出マクロファージ (2×10^5 cells/well) を乳酸菌 ($1-10 \times 10^6$ 個/well) と共に 37°C で 24 時間培養した。菌体濃度の中で最も高い IL-12 産生量の値を IL-12 産生誘導活性とした。BMDCs (2×10^5 cells/well) は乳酸菌 (1×10^7 個/well) と共に 37°C で 24 時間培養した。菌体濃度の中で最も高い IL-12 産生量の値を IL-12 産生誘導活性とした。脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から調製した各臓器細胞 (5×10^5 cells/well) は乳酸菌 (5×10^6 個/well) と共に 37°C で 48 時間培養した。培養後の培養上清中の IL-12 濃度は ELISA 法により測定した。

IgA 産生誘導試験

腸間膜リンパ節、パイエル板から調製した各臓器細胞 (5×10^5 cells/well) を乳酸菌 (5×10^6 個/well) と共に 37°C で 4 日間、7 日間培養した。培養上清中の IgA 濃度を ELISA 法により測定した。

動物試験

BALB/c マウス (6 週齢、雄、n=5) の腹腔内に OVA (20 µg) を 0.1 ml の Alum (Sigma)

と共に試験開始 0 日目、14 日目、28 日目に投与することで OVA 感作を行った。生理食塩水投与群 (200 μ l/day)、LpYU 投与群 (2×10^8 /day) に対し、各サンプルを試験開始 0 日目から 35 日間投与した。血清を試験開始 35 日目に採取し、OVA 特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。また、脾臓細胞 (5×10^5 cells/well) を平底 96 ウェルプレートにおいて 100 μ g/ml OVA 存在下で 37°C、72 時間培養した。培養後の上清中の IFN- γ 、IL-4 濃度を ELISA 法により測定した。

NK 細胞活性、IgA 産生の評価においては、BALB/c マウス (6 週齢、雄、n=5) に対し生理食塩水 (200 μ l/day)、LpYU (2×10^8 /day) を 14 日間投与した。試験開始 14 日目に脾臓とパイエル板を採取した。脾臓細胞 (5×10^5 cells/well) を Round-bottom 96 ウェルプレートにおいて 5×10^3 cells/well の YAC-1 細胞 (DS ファーマバイオメディカル) と共に 37°C、4 時間培養した。培養後に Cytotoxicity Detection Kit (Roche) を用いて LDH 活性を測定し、NK 細胞活性を評価した。パイエル板細胞 (5×10^5 cells/well) は平底 96 ウェルプレートにおいて 37°C、7 日間培養した。培養後の上清中の IgA 濃度を ELISA 法により測定した。また、試験開始 0 日目、7 日目、14 日目の糞便を採取し、PBS に分散後、遠心して上清を回収し、IgA 濃度を ELISA 法により測定した。

インフルエンザウイルス感染実験では BALB/c マウス (6 週齢、雌、n=10) に対し生理食塩水 (200 μ l/day)、Oseltamivir (0.2 mg/day, Roche)、LpYU (0.011, 0.21, 2.1 mg/day) をウイルス感染 7 日前から 14 日間投与した。サンプル投与開始 7 日目にインフルエンザ A ウィルス (IFV; A/NWS/33, H1N1; 2×10^4 PFU/mouse) を経鼻接種した。IFV 感染後に体重を毎日測定した。感染後 3 日目に肺と肺洗浄液中のウイルス量を測定した。感染後 14 日目に肺洗浄液と糞便中の IFV 特異的 IgA 量を測定した。また、肺洗浄液と血清中の IFV 特異的中和抗体価も測定した。肺サンプルと肺洗浄液は感染後 3 日目に各群 5 匹ずつから採取した。感染後 14 日目に残りの各群 5 匹から血清、肺洗浄液、糞便を採取した。肺サンプルは 1 mg 当たり 1 μ l の PBS を加え、破碎処理を行い、その後遠心、上清回収を行った。肺洗浄液は気管カニューレにより 0.8 ml の PBS で 4 回洗浄し、回収した。その後遠心し、上清を回収した。ウイルス量は MDCK cell

monolayer におけるプラークアッセイにより測定した。糞便は PBS 中で懸濁した後に遠心を行い、上清を回収した。

ELISA

IL-12p70、IFN- γ 、IL-4、IL-10 の濃度は Mouse OptEIA™ ELISA Set (BD Biosciences) を用いて測定した。また、OVA 特異的 IgE の測定は Tsuji ら (2003) の方法に従い測定した。IFV 特異的 IgA 濃度はウイルス抗原と HRP 標識抗マウス IgA 抗体を用いて測定した。

中和抗体価の測定

希釈した血清、肺洗浄液 (0.1 ml) もしくは PBS を約 200 PFU のウイルス (0.1 ml) と混ぜ、37°C 1 時間インキュベートした。0.1 ml の各混合物を 35 mm ディッシュで MDCK cell monolayer の上加え、室温で 1 時間インキュベートした。その後 2 ml の寒天を重層し、37°C で 2 日間インキュベートした。中和抗体価は PBS に対し 50% プラーク数を減少させる希釈倍率から算出した。

腸内細菌叢の解析

Lactobacillus 属については盲腸内容物を PBS で希釈後、Rogosa SL 寒天培地 (Difco) に塗布後、37°C 72 時間嫌気培養を行い、コロニー数を測定した。*Bifidobacterium* 属については TOS プロピオン酸寒天培地 (栄研化学) に塗布後、37°C 72 時間嫌気培養を行い、コロニー数を測定した。

Table 2-1. 試験に用いた乳酸菌

Organism Name	Strain No.
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	NRIC0644
<i>Lactobacillus brevis</i>	NRIC1038
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRIC1067, NRIC1554 NRIC1558, NRIC1592 NRIC1761, NRIC1919 NRIC1928
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NRIC1545
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NRIC1688

第3節 結果

3-1. 高い IL-12 産生誘導活性を有する乳酸菌の選抜

発酵食品由来の乳酸菌 203 株について腹腔浸出マクロファージを用いて IL-12 産生誘導活性を評価し、*Lactobacillus plantarum* YU (LpYU) を選抜した (Fig. 4-1A)。また、脾臓細胞、腸間膜リンパ節細胞、パイエル板細胞を用いた評価においても LpYU は強く IL-12 産生を誘導した (Fig. 4-1B)。この乳酸菌は糠床から分離された。他の *Lactobacillus plantarum* の乳酸菌株と胃酸耐性、胆汁酸耐性を比較したところ、どちらについても他の乳酸菌株に比べ強い耐性を有していた (Fig. 4-1C, D)。

3-2. TLR2 を介した IL-12 産生誘導

次に LpYU の IL-12 産生誘導に関わる TLR を特定するため、TLR2、TLR4、TLR9 をそれぞれ欠損したマウスから BMDCs を誘導して LpYU による IL-12 産生誘導を調べた。その結果、TLR2 を欠損した場合のみ有意に IL-12 産生量が減少した (Fig. 4-2)。LpYU の IL-12 産生誘導には TLR2 による認識が関わっていることから、ペプチドグリカンなどの細胞壁成分の関与が示唆された。

3-3. LpYU の経口摂取による抗原特異的 IgE 上昇抑制

アレルギー反応は Th2 免疫の亢進と、それによる抗原特異的 IgE の過剰産生により引き起こされることが知られている (Romagnani, 2006)。LpYU は IL-12 を強く誘導することから、Th1 免疫を増強し Th2 免疫を抑制することで抗原特異的 IgE の産生を抑制することが期待される。そこで、OVA で感作したマウスに LpYU を投与することで OVA 特異的 IgE の産生に与える影響を評価した。すると、LpYU の投与により OVA 特異的 IgE の産生が抑制されることが確認された (Fig. 4-3A)。

同時に脾臓細胞を各マウスより調製し、OVA で再刺激を行った際のサイトカイン産生について評価した。LpYU 摂取により IFN- γ 産生が増加した一方で、IL-4、IL-10 の

産生量については変化がなかった (Fig. 4-3B)。以上より LpYU 摂取による OVA 特異的 IgE の抑制は、Th1 免疫を増強することにより引き起こされていることが示唆された。

3-4. LpYU によるパイエル板細胞からの IgA 産生促進

感染防御には腸管における IgA 産生が重要であることから、パイエル板細胞を用いて LpYU を含むラクトバチルス属について IgA 産生促進作用を評価した。すると、LpYU と *Lactobacillus plantarum* NRIC1067 が IgA 産生を強く誘導することが確認された (Fig. 4-4)。この結果から、LpYU は粘膜面における感染防御作用にも効果がある可能性が示された。

3-5. LpYU の経口摂取による IgA 産生促進と NK 細胞活性化

LpYU がパイエル板細胞からの IgA 産生を増強することが確認されたため、実際にマウスに LpYU を経口投与した際に糞便中の IgA 量に与える影響を評価した。14 日間 LpYU を投与したところ、14 日目の糞便において LpYU 摂取群で生理食塩水群に比べ IgA 量が有意に高かった (Fig. 4-5A)。また、0 日目からの糞便中 IgA 増加量についても LpYU 摂取群の方が有意に高かった (Fig. 4-5B)。さらにパイエル板細胞を各マウスより調製し、7 日間培養を行い産生される IgA 量を調べたところ、LpYU 摂取群で有意に高いことが確認された (Fig. 4-5C)。以上より、LpYU 摂取により腸管における IgA 産生が増強されることが確認された。

次に、感染防御には NK 細胞活性が関わることから、このときの脾臓細胞を用いて NK 細胞活性を測定した。すると、生理食塩水群に比べ LpYU 摂取群で有意に活性が高いことが確認された (Fig. 4-5D)。

さらにこのときの盲腸内容物中のラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属の菌数を調べたところ、両菌種の菌数が LpYU 摂取により増加していた (Table 4-2)。このことから、LpYU 摂取により腸内細菌叢も改善することが示唆された。

3-6. LpYU の経口摂取によるインフルエンザウイルス感染抑制

以上のように LpYU 摂取により IgA 産生増強や NK 細胞活性化が確認されたことから、ウイルスに対する感染防御作用が期待される。そこで、インフルエンザ A ウィルス (IFV) 感染に対する LpYU 摂取の影響を評価した。体重の減少については 0.011 mg/day、2.1 mg/day の LpYU 摂取群で有意に抑制されていた (Table 4-3)。そして、肺と肺洗浄液中のウィルス量については摂取した LpYU の用量依存的に抑制した (Fig. 4-6A)。また、肺洗浄液と糞便中の IFV 特異的 IgA 量は LpYU 摂取により増加することが確認された (Fig. 4-6B)。肺洗浄液、血清中の IFV 特異的中和抗体価についても LpYU 摂取により増加していた (Fig. 4-6C)。一方、Oseltamivir はウイルス増殖自体を抑制することから、その作用により肺洗浄液や肺中のウィルス量についても強く抑制し (Fig. 4-6A)、体重減少も抑制する (Table 4-3) ことが示唆された。そのため、IFV 特異的 IgA 産生や IFV 特異的中和抗体価も強く抑制していたと考えられる (Fig. 4-6B, C)。つまり、LpYU は肺や粘膜面における IFV 特異的 IgA 産生や IFV 特異的中和抗体の産生を増強することでウイルスの排除を促進し、感染によるダメージを軽減していることが示唆された。

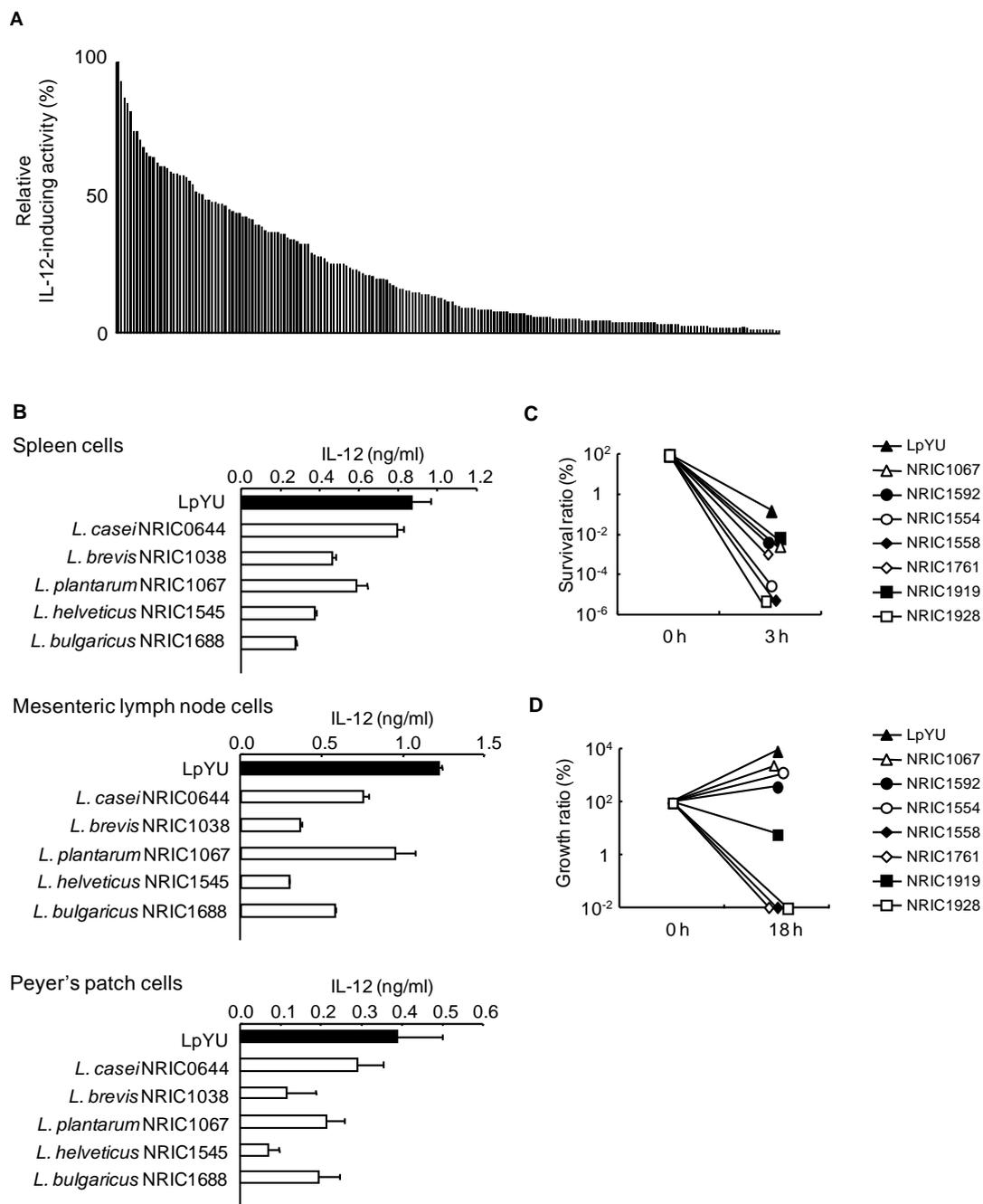


Fig. 4-1. IL-12 産生誘導活性の高い乳酸菌の選抜と胃酸・胆汁酸耐性

(A) 発酵食品から分離した 203 株の乳酸菌について、マクロファージからの IL-12 産生誘導活性を測定した (Cell : Bacteria = 1 : 5-50)。値は LpYU の活性に対する相対値で表した。(B) 脾臓細胞、腸間膜リンパ節細胞、パイエル板細胞を用いて IL-12 産生誘導活性を測定した (Cell : Bacteria = 1 : 10)。エラーバーは標準誤差を表す (n=3)。(C) pH 2.5 における胃酸耐性を調べた。(D) 0.5%胆汁酸で胆汁酸耐性を測定した。

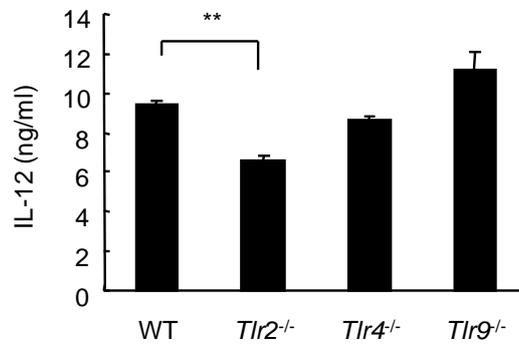


Fig. 4-2. LpYU による IL-12 産生誘導に対する TLR の関与

WT、各 TLR 遺伝子欠損マウスより BMDCs を誘導し、LpYU で刺激した時の IL-12 産生量を測定した。エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, **p<0.01)

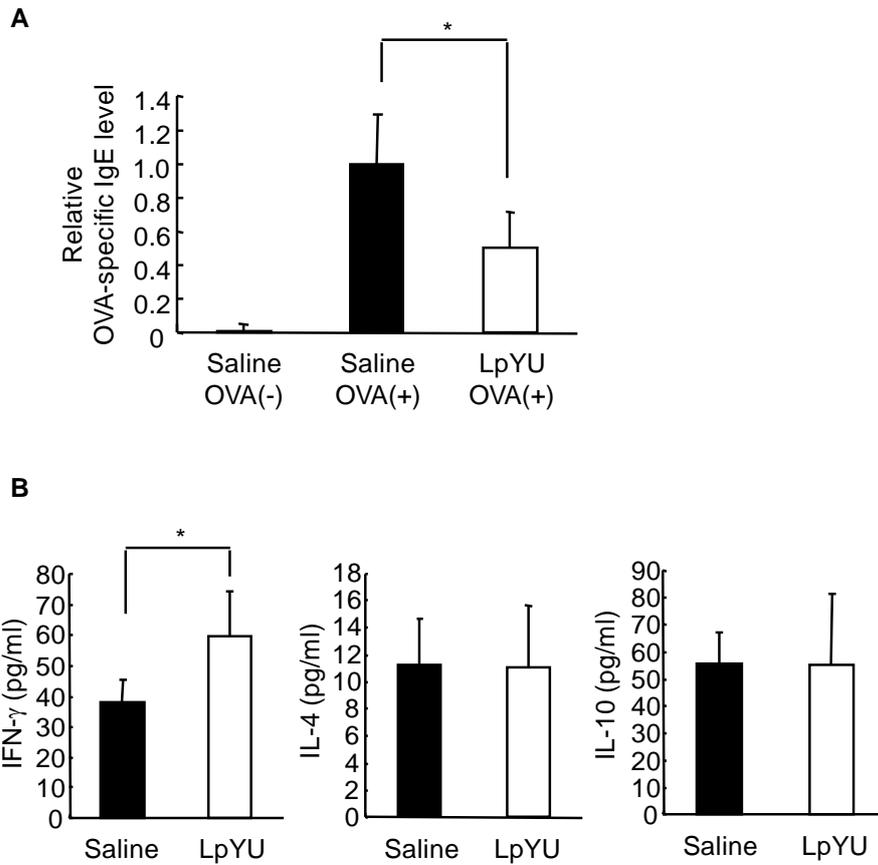


Fig. 4-3. LpYU 摂取による抗原特異的 IgE 上昇の抑制と Th1 免疫の増強

(A) OVA で感作したマウスに生理食塩水、LpYU を経口投与した (n=5)。血清中の OVA 特異的 IgE を ELISA 法により測定した。OVA 感作を行った生理食塩水投与群に対する相対値で示した。エラーバーは標準誤差を示す。(B) 脾臓細胞を OVA 存在下で 72 時間培養し、培養後の上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-10 濃度を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を示す。(Student's t-test, *p<0.05)

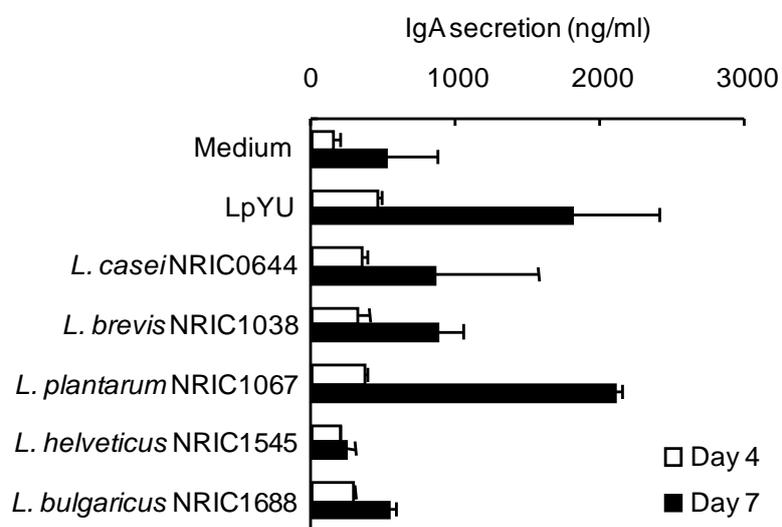


Fig. 4-4. LpYU によるパイエル板細胞からの IgA 産生誘導

パイエル板細胞を各乳酸菌株存在下で 4 日間、7 日間培養し、産生された IgA 量を ELISA 法により測定した。エラーバーは標準誤差を表す (n=3)。

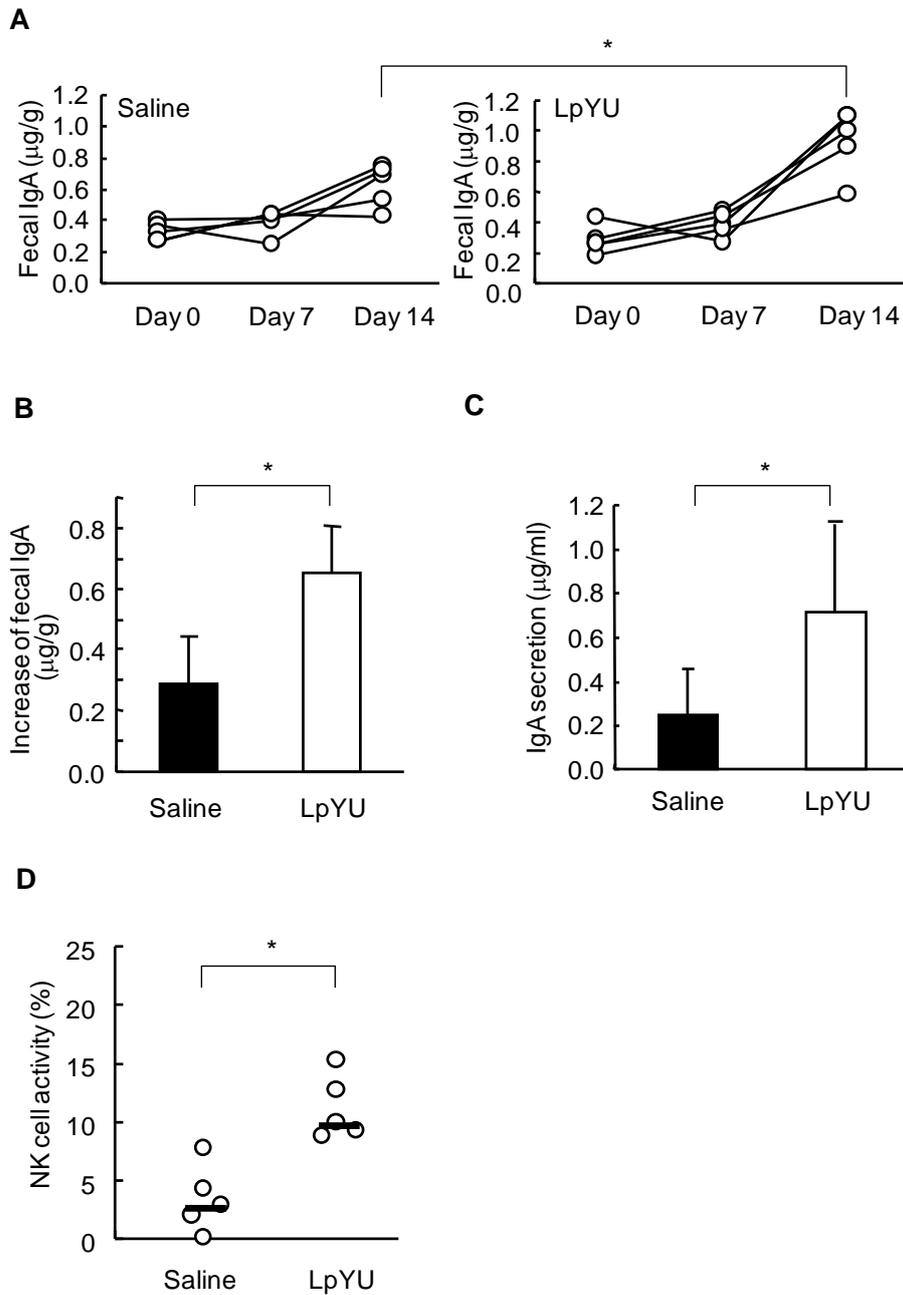


Fig. 4-5. LpYU 摂取による IgA 産生促進と NK 細胞の活性化

(A) 生理食塩水、LpYU を 14 日間摂取したときの糞便中 IgA 量を測定した。(B) 各群の糞便中 IgA の変化量を示した。エラーバーは標準誤差を示す。(C) パイエル板細胞を採取し、7 日間培養した時の IgA 産生量を測定した。エラーバーは標準誤差を表す。

(D) 脾臓細胞を採取し、NK 細胞の活性を測定した。バーは平均値を示す。(n=5, Student's t-test, *p<0.05)

Table 4-2. 生理食塩水、LpYU を 14 日間摂取したときの盲腸中の *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属の菌数 (平均値±標準誤差)

	Count (log cfu/g)	
	Saline	LpYU
<i>Lactobacillus</i>	7.19 ± 0.71	8.25 ± 0.36**
<i>Bifidobacterium</i>	8.66 ± 0.23	8.99 ± 0.27*

(n=5, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

Table 4-3.インフルエンザウイルス感染時の体重変化（平均値±標準誤差）

Days after infection	Sample				
	Saline	Oseltamivir (0.2 mg/day)	LpYU (0.011 mg/day)	LpYU (0.21 mg/day)	LpYU (2.1 mg/day)
0	100 ± 4.0	100 ± 4.7	100 ± 5.1	100 ± 4.9	100 ± 1.7
1	96.3 ± 4.4	100.6 ± 3.3	98.8 ± 4.0	98.8 ± 3.7	100 ± 1.9
2	95.6 ± 4.6	99.4 ± 3.0	97.6 ± 4.1	97.6 ± 3.7	99.4 ± 1.9
3	86.9 ± 4.6	99.4 ± 4.1***	94.5 ± 4.9*	90.4 ± 4.8	92.7 ± 2.7*
4	87.8 ± 5.2	100 ± 4.7**	92.7 ± 5.6	89.8 ± 4.4	92.1 ± 1.8
5	86.9 ± 6.9	100.6 ± 4.7**	93.3 ± 5.6	91.0 ± 4.5	92.1 ± 2.5
6	84.4 ± 6.7	100 ± 3.8***	93.3 ± 6.0*	90.4 ± 4.8	90.2 ± 3.0
7	80.6 ± 7.9	100 ± 3.9***	92.1 ± 7.6*	88.9 ± 6.1	90.2 ± 4.0*
8	80.6 ± 10.5	97.5 ± 4.3**	94.5 ± 7.4*	92.2 ± 6.2	93.9 ± 4.1*
9	83.1 ± 11.0	98.8 ± 4.3*	95.7 ± 7.7	94.6 ± 4.6	97.0 ± 3.8*
10	86.3 ± 9.7	99.4 ± 4.4*	98.2 ± 5.2*	97.0 ± 5.1	99.4 ± 3.0**
11	90.0 ± 8.5	101.2 ± 4.1*	98.2 ± 5.3	96.4 ± 5.7	98.2 ± 2.4*
12	90.6 ± 8.3	102.5 ± 3.7*	101.2 ± 5.1*	98.2 ± 6.5	100.6 ± 2.1*
14	97.5 ± 6.8	105.5 ± 3.3*	103.7 ± 5.6	104.2 ± 6.2	103.7 ± 1.0*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs saline

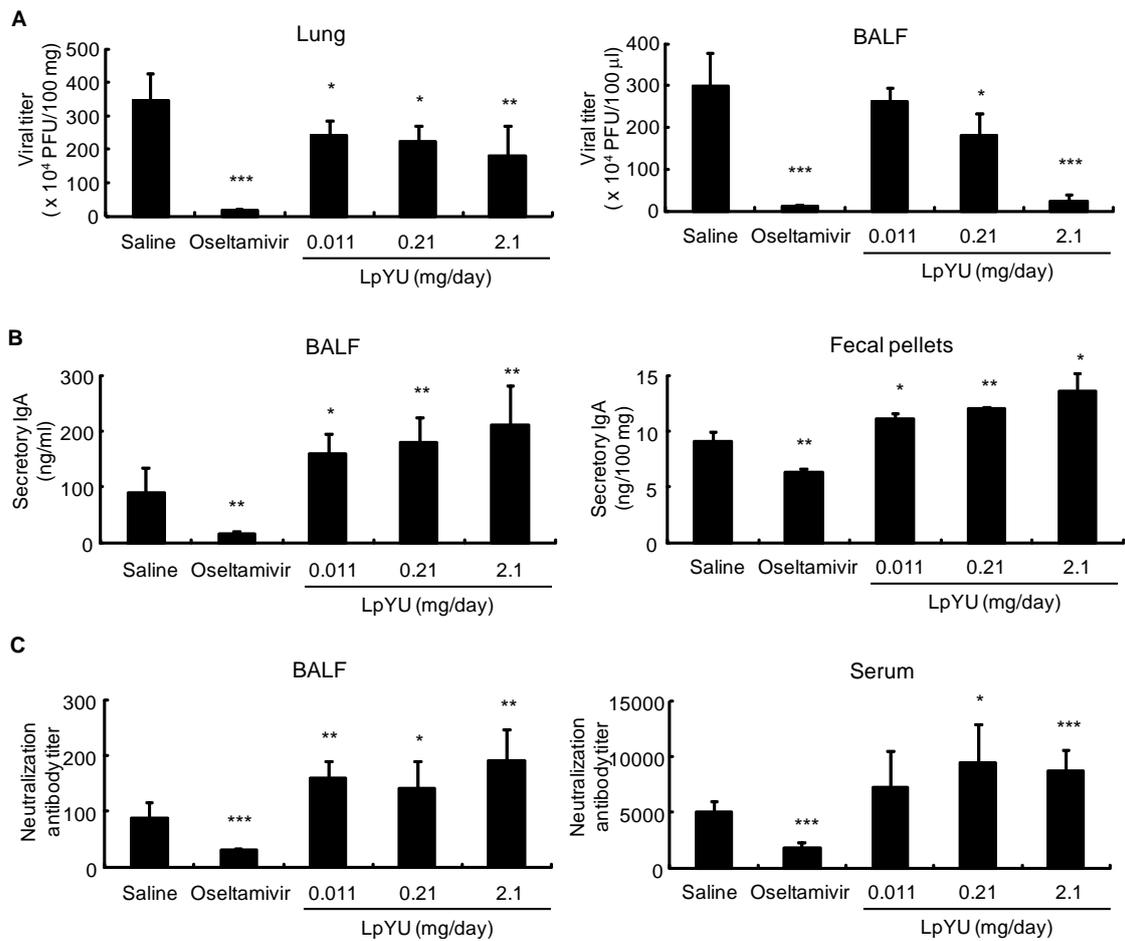


Fig. 4-6. LpYU のインフルエンザウイルス (IFV) に対する感染防御作用

生理食塩水、Oseltamivir、LpYU を IFV 感染 7 日前から 14 日後まで経口投与した。

(A) IFV 感染 3 日後の肺と肺洗浄液 (BALF) 中のインフルエンザウイルス量を測定した。(B) IFV 感染 14 日後の BALF と糞便中の IFV 特異的 IgA 量を測定した。(C) IFV 感染 14 日後の BALF と血清中の IFV 特異的中和抗体価を測定した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=5, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01, vs saline)

第4節 考察

本研究においては日本の発酵食品より新規なプロバイオティクス乳酸菌 LpYU を分離し、その抗アレルギー作用、抗ウイルス作用について確認した。乳酸菌の IL-12 の産生誘導による Th1/Th2 バランスの改善については多く報告されているが、本研究においても IL-12 産生誘導を指標として、効率的に乳酸菌のスクリーニングを実施することができた。乳酸菌の認識、及び IL-12 の産生誘導には樹状細胞の TLR2 や TLR4、TLR9 が関与することが報告されている。TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポテイコ酸を認識することが知られており、*Lactobacillus plantarum* 由来のリポテイコ酸が乳酸菌の免疫調節作用に関わることが報告されている (Grangette et al., 2005; Hisbergues et al., 2007; Rigaux et al., 2009; Asong et al., 2009)。LpYU についても TLR2 の関与が見られたことから、これらの細胞壁成分が IL-12 産生誘導や免疫調節作用に関与していることが示唆される。また、Rigaux ら (2009) は *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 が TLR2 以外に TLR9 を介した IL-12p40 誘導を報告しているが、我々の研究においては TLR9 の関与は見られなかった。このことから、TLR のサイトカイン産生に対する関与は属・種ではなく株によって異なることが考えられる。様々な TLR が関与することによりサイトカイン産生が相乗的に変化することが知られており (Gautier et al., 2005; Vanhoutte et al., 2008)、また乳酸菌を取り込んだ後のエンドソームにおける分解に対する耐性もサイトカイン産生に関わっていることが報告されている (Shida et al., 2006)。以上より、TLR2 のみの関与ではなく、他の TLR の関与、もしくはエンドソームにおける分解耐性も、LpYU の高い IL-12 産生に寄与していることが示唆される。

インフルエンザウイルスによる感染実験においては IFV 特異的 IgA、及び中和抗体の産生増強が LpYU の抗ウイルス作用に関与していることが示された。一方で LpYU 摂取により NK 細胞活性が上昇することが確認されていることから、このような効果も抗ウイルス作用に関わっていることが考えられる。また、幅広い LpYU の摂取量 (0.011 - 2.1 mg/day) で効果が見られていることから、LpYU が強い胃酸耐性、胆汁酸耐性を

有していることにより小腸に到達、増殖することで腸管免疫に影響を与えていることが考えられる。最近、Kikuchi ら (2014) はインフルエンザ感染実験において *L. plantarum* AYA 株の経口摂取が IgA 産生を増強し、感染を抑制することを報告している。その IgA 産生増強メカニズムとしてパイエル板樹状細胞より産生される IL-6 が関与することを示しており、同じ *L. plantarum* である LpYU の摂取においても同様な現象が起こっていることが考えられる。

腸内細菌叢とアレルギーの関係についてはこれまで多く報告されており、摂取した乳酸菌自体の腸管免疫に対する効果以外に、腸内細菌叢の改善を介した効果も期待される。例えば、腸内細菌叢における嫌気性菌の割合がアレルギー疾患を有する小児に比べ、健康な小児で有意に高いことが報告されている (Bjorksten et al., 1999)。さらに、腸内細菌叢におけるビフィドバクテリウム属の菌数がアレルギーを有する小児では有意に低いことも報告されている (Kalliomaki et al., 2001; Watanabe et al., 2003)。Tsai ら (2008) は *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 を摂取して腸内細菌叢を変化させることで NK 細胞活性が増強し、樹状細胞等の抗原提示能が上昇することを報告している。また、Nakamura ら (2004) はフラクトオリゴ糖を投与することでパイエル板からの IgA 産生が増強することを示しており、この研究においても腸内細菌叢の改善が関与していることが推察される。このような知見からも、摂取した LpYU 自体の腸管免疫に対する影響以外に、腸内細菌叢の変化を通じた腸管免疫の増強もプロバイオティクス効果には重要であると考えられる。

第5章

乳酸菌の2本鎖RNAによる Interferon- β (IFN- β) を介した抗炎症効果

第1節 緒言

自然免疫系は様々な微生物を認識し、炎症性サイトカイン等を誘導することで迅速に応答している。その中でも TLR は微生物やウィルスの構成成分を認識しており、自然免疫系において重要な役割を果たしている (Akira et al., 2006)。抗原提示細胞の細胞表面に存在する TLR2 や TLR4 は細菌の細胞壁成分 (ペプチドグリカン、リポテイコ酸、LPS) を認識する一方で、TLR3 や TLR7、TLR9 は細胞内エンドソームに局在し、細菌やウィルスを貪食した後にその核酸成分を認識する (Akira et al., 2006)。このような TLR を発現する樹状細胞やマクロファージによる微生物の認識が、病原菌に対する迅速な応答や免疫恒常性維持に寄与している (Medzhitov and Janeway, 1998; Beutler et al., 2007)。

腸管関連リンパ組織 (Gut-associated lymphoid tissues, GALT) は外来抗原や病原菌に常に応答しており、全身の免疫系にも大きな影響を与える。常在細菌が存在しない無菌マウスにおいては免疫応答が十分に起こらず、GALT における常在菌との相互作用が全身性の免疫応答も制御していることが明らかとなっている (Wu et al., 2010; Schwarzer et al., 2011)。さらに現在では無菌マウスに特定の常在細菌を棲みつかせることで、その常在細菌がどのような細胞群を誘導するかも検証されている。例えば、Atarashi ら (2011) は *Clostridium* 属が Foxp3⁺ Treg 細胞を、Jeon ら (2012) は *Bifidobacterium breve* が IL-10 産生性の Type I regulatory (Tr1) 細胞を誘導することを報告している。このように腸内常在菌と腸管免疫の相互作用、さらには腸管免疫が全身免疫に与える影響が明らかになってきており、経口的に摂取する微生物が免疫系に及ぼす影響についても注目されている。

乳酸菌は好気条件でも生育でき、自然環境や食品中に豊富に存在している。古くからヒトは発酵食品等により乳酸菌を経口的に摂取しており、乳酸菌が小腸フローラの主要

な構成微生物群となっている (Suzuki et al., 2004; Hao and Lee, 2004)。そのため乳酸菌は定常状態において宿主免疫細胞の成熟や小腸免疫の恒常性維持に関わっていると考えられている (Shida and Nanno, 2008)。ある種の乳酸菌を経口摂取することで粘膜面における自然免疫系を刺激し、病原菌やウイルスに対する免疫応答を高めることが報告されている (Corr et al., 2007; Kosaka et al., 2012)。しかし、乳酸菌が感染防御や抗炎症の免疫応答を誘導するメカニズムや、さらにはこのような有益な常在菌、乳酸菌と病原菌に対する免疫応答の違いについては不明な点が多く、未だ明らかとなっていない。

そこで我々は宿主免疫系において乳酸菌の認識に TLR がどのように関わっているかを検討した。TLR は病原菌の認識だけでなく、常在乳酸菌と宿主免疫細胞の相互作用においても重要な役割を果たしている (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2008)。*Salmonella Typhimurium* や *Escherichia coli* のような病原菌は、それらが持つ LPS が TLR4 を刺激することが知られているが (Weiss et al., 2004)、乳酸菌やその他の常在菌が宿主免疫細胞によってどのように認識されているかはほとんど知られていない。*Bacteroides fragilis* は大腸フローラにおける主要な構成細菌であるが、この細菌の細胞壁を構成するポリサッカライド A (PSA) が TLR2 により認識され、Foxp3⁺ Treg 細胞を誘導することが報告されている (Round et al., 2011)。乳酸菌においても細胞壁を構成するペプチドグリカンやリポテイコ酸の認識に TLR2 が関与することが報告されているが (Grangette et al., 2005; Asong et al., 2009)、その他の TLR の働きについては報告が少ない。本研究においては、乳酸菌の認識に関わる TLR を明確にし、さらにその TLR により誘導される免疫応答の効果について検証し、Dextran sodium sulfate (DSS) 誘導潰瘍性大腸炎モデルを用いて乳酸菌の抗炎症効果に対する寄与を調べた。

第2節 材料と方法

乳酸菌、病原菌の調製

乳酸菌の調製は第3章、第4章と同様に行った。また、加熱殺菌を行った病原菌は兵庫医科大学において調製後、供与いただいた。用いた菌株は Table 5-1 に示す。乳酸菌、病原菌の RNase A 処理は、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液、もしくは 0.3 M NaCl 含有 Tris-HCl (pH 8.0) 溶液を用い、RNase A (シグマ) を 10 µg/ml となるように添加し、37°C で 2 時間インキュベートを行った。S1 nuclease (Takara) 処理は、付属のバッファーを用いて行った。その後、それぞれのバッファーで菌体の洗浄を行い、試験に用いた。マウス小腸からの乳酸菌の分離については、マウス小腸内容物を MRS (Difco) 寒天培地に塗布後、37°C 72 時間インキュベートを行った。その後、コロニーを回収し、それぞれ MRS 培地で培養を行った。各コロニーについてはグラム染色、16S rRNA 配列から菌種を同定した。Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法により重複して採取した乳酸菌は除いた。マウス小腸由来の乳酸菌は Table 5-2 に示す。

マウス

マウスは日本 SLC 社もしくは日本クレア社の BALB/c マウス、C57BL/6 マウス(雌、6-10 週齢)を用いた。TLR 遺伝子欠損 C57BL/6 マウスは兵庫医科大学、理化学研究所、東京大学医科学研究所より供与いただくか、オリエンタルバイオサービスより購入した。*Unc93b1*^{3d} C57BL/6 マウス(3d マウス)は B. Beutler 先生 (Southwestern University) より供与いただいた。マウスは各施設においてガイドラインに従い飼育された。動物実験は産総研動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

細胞の調製

BMDCs、脾臓細胞、腸間膜リンパ節細胞、パイエル板細胞の調製は第4章と同様の方法で行った。また、CD11c⁺細胞は、CD11c マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) と MACS を用いて分離した。小腸粘膜固有層 (Lamina propria) と小腸上皮細胞

(Intestinal epithelial cells, IECs) については、まず採取した小腸を 1 cm 程度に切り、上皮細胞分離用培地で 30 分間攪拌した。その後、分離した細胞を回収し、上皮細胞として回収した。上皮細胞を除いた小腸は細かく切断し、腸管粘膜固有層の細胞分離用培地で 1 時間攪拌し、細胞を回収した。回収した細胞を 75% Percoll 溶液 (Percoll は GE Healthcare より購入し、上皮細胞分離用培地で希釈) に懸濁し、その上に 40% Percoll 溶液を重層して遠心し、中間層に集まった細胞を小腸粘膜固有層細胞として回収した。

試薬

抗 IFN- β 中和抗体は Yamasa 社より購入した。Rat IgG1 抗体 (eBioscience) をコントロール抗体として用いた。Poly(I:C)、LPS、CpG DNA (ODN 1826) は Invivogen 社のものを用いた。

細胞培養

96 ウェル平底プレートにおいて BMDCs (2×10^5 cells/well/200 μ l) を各細菌 (1×10^7 個/well) と共に 37°C で 6 時間培養した。エンドソーム酸性化阻害においては、BMDCs を 1 mM もしくは 5 mM の NH_4Cl 存在下で前培養した後に、各細菌と 6 時間培養を行った。空腸、回腸、盲腸、結腸の内容物は、それぞれ部位別に採取した後に 600 nm の吸光度が 0.25 となるように調製し、細胞に添加した。TLR リガンドとして Poly(I:C) は 50 μ g/ml、LPS は 10 μ g/ml、CpG DNA は 10 μ g/ml となるように添加した。

Vesicular stomatitis virus (VSV) 感染実験は、BMDCs (1×10^6 cells) を KK221 (5×10^7 個) と共に 24 ウェル平底プレートにおいて 8 時間培養を行った。その後、VSV (moi = 1 PFU/cell) を添加し、12 時間培養を行った。培養後の BMDCs を回収し、細胞に感染した VSV 量を定量的 RT-PCR により測定した。

サイトカイン、IFN- β の測定

サイトカイン濃度については OptEIA ELISA Set (BD Bioscience) を用いて測定した。IFN- β 濃度については Mouse IFN- β ELISA Kit (PBL Biomedical Laboratories) を用いて測定した。

動物試験

DSS 誘導潰瘍性大腸炎モデルにおいては、WT マウス、TLR 遺伝子欠損マウス、3d マウスに対し、3% (w/v) DSS を含有する飲用水を 7 日間自由摂取させることで腸炎を誘導した。生理食塩水もしくは加熱殺菌 KK221 菌体 (1×10^9 個/day) を DSS 摂取 7 日前から 14 日間経口投与した。コントロール抗体もしくは抗 IFN- β 中和抗体は 1 匹当たり 50 μ g を 2 日ごとに静脈投与した。DSS 摂取 7 日後に各マウスより結腸を採取した。

組織解析

結腸組織については H&E 染色を行った。倍率 200 倍で Olympus BX53 Biological Microscope (オリンパス社) とデジタルイメージングシステム (Ventana iScan Coreo AW v.3.3.1, Image Viewer v.3.1, Ventana Medical Systems) を用いて、結腸の粘膜固有層における炎症箇所を定量化し、その割合を算出した。

Myeloperoxidase (MPO) 活性評価

結腸組織を 0.5% の Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (和光純薬工業) を含有する 50 mM リン酸バッファー (pH 6.0) 中で破碎し、凍結融解を 3 回行った。遠心を行って上清を回収し、Vijay-Kumar ら (2007) の方法に従い酵素活性の測定を行った。

定量的 RT-PCR

RNA は TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。その後、PrimeScript RT reagent (Takara) を用いて cDNA を作製後、SYBR Premix Ex Taq (Takara) と各

プライマーを用いて PCR を行った。各 mRNA 発現量は β -actin 発現量に対して標準化した。プライマーは Table 5-3 に示す。

VSV 量の定量は、RNA を TRIzol Reagent により抽出後、Superscript II (Invitrogen) を用いて cDNA を作製した。定量的 RT-PCR は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、7700 sequence detector (Applied Biosystems) を用いて行った。標準化のための 18s rRNA に対するプライマーとプローブは Applied Biosystems より購入した。VSV に対するプライマーとプローブは以下の配列を用いた。

Forward primer: CATGAATGTGCCTCGTTCAGA

Reverse primer: CCAATGCAGCACAAATCTTTGA

TaqMan probe: ACGGAACTATTGTTTCCAG.

細菌中の 2 本鎖 RNA 量の測定

加熱殺菌した細菌から核酸を抽出した後、2 本鎖 RNA に対する 2 種類の抗体、K1 抗体、J2 抗体 (English and Scientific Consulting) と、Streptavidin peroxidase (Zymed) を用いて sandwich ELISA 法により測定した。J2 抗体は Biotin Labeling Kit-NH₂ (同仁化学研究所) を用いてビオチン標識をして用いた。検量線の作成には Poly(I:C)を用い、2 本鎖 RNA 量を算出した。

Table 5-1. 試験に用いた細菌

(A) 乳酸菌

Strain No.	Abbreviation	Organism name
KK221	Tc	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
NRIC 0099	Pc	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
NRIC 0122	Pc	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
NRIC 0391	Lb	<i>Lactobacillus pentosus</i>
NRIC 1038	Lb	<i>Lactobacillus brevis</i>
NRIC 1067	Lb	<i>Lactobacillus plantarum</i>
NRIC 1688	Lb	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
NRIC 1836	Lb	<i>Lactobacillus pentosus</i>
NRIC: The collections of Tokyo University of Agriculture, Japan.		

(B) 病原菌

Organism name	Abbreviation	Strain No.
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM	43251
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ST	IID1000
<i>Clostridium perfringens</i>	CP	Type A, NCTC8239
<i>Helicobacter pylori</i>	HP	SS1
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	DSM346

Table 5-2. マウス小腸より分離した乳酸菌株

Strain No.	Organism name
No. 1-11	<i>Lactobacillus reuteri</i>
No. 1-14	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
No. 1-17	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
No. 1-19	<i>Lactobacillus reuteri</i>
No. 2-13	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
No. 2-14	<i>Lactobacillus reuteri</i>
No. 3-2	<i>Lactococcus lactis</i>
No. 3-5	<i>Lactobacillus murinus</i>
No. 3-8	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
No. 4-1	<i>Lactobacillus murinus</i>
No. 4-4	<i>Lactococcus lactis</i>

Table 5-3. 定量的 RT-PCR に用いたプライマー

Oligonucleotides, 5'-3'	
IFN- β	
Forward	GCACTGGGTGGAATGAGACT
Reverse	AGTGGAGAGCAGTTGAGGACA
IL-6	
Forward	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA
Reverse	TCCACGATTTCCAGAGAAC
TNF- α	
Forward	CTGGGACAGTGACCTGGACT
Reverse	GCACCTCAGGGAAGAGTCTG
Cxcl1 (KC)	
Forward	CTGCACCCAAACCGAAGTC
Reverse	AGCTTCAGGGTCAAGGCAAG
IL-17	
Forward	GCTCCAGAAGGCCCTCAG
Reverse	CTTCCCTCGCATTGACA
TLR2	
Forward	GCCACCATTTCCACGGACT
Reverse	GGCTTCCTCTTGGCCTGG
TLR3	
Forward	GAGGGCTGGATGTCAACGTC
Reverse	CCGTTCTTTCTGAACTGGCCA
TLR4	
Forward	TGTGGAAGCCTTCCTGGATG
Reverse	CCTCTGCCTTCACTACAGAGACTTT
TLR7	
Forward	CTGGAGTTCAGAGGCAACCATT
Reverse	GTTATCACCGGCTCTCCATAGAA
TLR9	
Forward	GGGCCATTGTGATGAACC
Reverse	GCTGCCACACTTCACACCAT
IRF3	
Forward	AGGAATTTCCGGTCAGCCCT
Reverse	CGCCCCTGGAGTCACAAAC
IRF7	
Forward	ACAGGGCGTTTTATCTTGCG
Reverse	TCCAAGCTCCCGGCTAAGT
β -actin	
Forward	GCTACAGCTTACCACCACAG
Reverse	GGTCTTTACGGATGTCAACGTC

第3節 結果

3-1. 乳酸菌の樹状細胞に対する IFN- β 産生誘導

乳酸菌は食品からも摂取され、小腸フローラの主要な構成細菌となることから、まず発酵食品等より分離された乳酸菌と病原菌に対する BMDCs の免疫応答から調べた。すると、病原菌に比べ乳酸菌が BMDCs からの IFN- β 産生を強く誘導することが明らかとなった (Fig. 5-1A)。IFN- β はウイルスに対する感染防御において重要な役割を果たしていることから、*Tetragenococcus halophilus* KK221 を用いて BMDCs から誘導される IFN- β の効果を検証した。まず、KK221 に対する BMDCs の応答においては IFN- β は産生される一方で、IFN- α は産生されないことを確認した (Fig. 5-1B)。次に、I 型 IFNs (IFN- α , IFN- β) により感染が抑制されることが知られている VSV を用いて (Obuchi et al., 2003)、BMDCs を感染させた際の KK221 の効果について調べた。KK221 添加により BMDCs の VSV 感染が抑制されることが示された (Fig. 5-1C)。さらに抗 IFN- β 中和抗体によりウイルス増殖の抑制効果が消失したことから、KK221 により誘導された IFN- β により VSV の増殖が抑制されることが明らかとなった (Fig. 5-1C)。

3-2. 乳酸菌の IFN- β 産生誘導を介した抗炎症効果

IFN- β は抗炎症にも関わっており、DSS 誘導潰瘍性大腸炎モデルにおいてもその抗炎症に対する効果が示されている (Katakura et al., 2005)。そこで我々は DSS 誘導潰瘍性大腸炎に対する KK221 摂取の効果を調べた。DSS 誘導潰瘍性大腸炎を誘導する際に KK221 を摂取したとき、組織学的解析においては好中球、好酸球、マクロファージなどの炎症細胞の結腸粘膜固有層への浸潤が抑制されていた (Fig. 5-2A, B)。また、DSS 誘導潰瘍性大腸炎においては大腸の長さの縮小や、好中球浸潤の指標となる MPO 活性の上昇が観察されるが、KK221 摂取はそれらを抑制した (Fig. 5-2C, D)。結腸の mRNA を抽出し、定量 PCR を行ったところ、TNF- α 、IL-6、Cxcl1、IL-17 のような炎症マーカーの発現量が腸炎誘導により上昇したが、KK221 を摂取することで有意に低下した

(Fig. 5-2E)。さらに抗 IFN- β 中和抗体を静脈より投与することでこれらの KK221 摂取による効果が消失することが確認された (Fig. 5-2A-E)。以上より、乳酸菌摂取による腸炎の抑制には IFN- β が関わっていることが明らかとなった。

3-3. 乳酸菌による TLR3、TLR9 を介した IFN- β 産生誘導

次に、各 TLR 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs を用いて、乳酸菌の IFN- β 誘導に関与する乳酸菌成分及び TLR の特定を試みた。KK221 に対する各 TLR 遺伝子欠損マウスの IFN- β 産生を調べたところ、TLR3 及び TLR9 を欠損した際に IFN- β 産生量が有意に低下した一方で、TLR2、TLR4、TLR7 の関与は認められなかった (Fig. 5-3A)。また、IL-6 や TNF- α 産生はいずれの TLR の遺伝子を欠損した場合でも変化がなかった (Fig. 5-3A)。以上の結果より、エンドソームに局在する TLR3、TLR9 は乳酸菌に対する応答において、IFN- β 産生に特異的に関与していることが示された。

KK221 以外の乳酸菌、及び病原菌について TLR3 と TLR9 の IFN- β 誘導に対する関与を調べた。すると、乳酸菌 8 株中 5 株において IFN- β 誘導に対する TLR3 の関与が確認されたが、病原菌においては TLR3 の関与はみられなかった (Fig. 5-3B)。TLR9 については乳酸菌の全ての菌株で IFN- β 誘導に対する関与が確認されたが、病原菌では関与はみられなかった (Fig. 5-3C)。以上より、乳酸菌は病原菌に比べて多量の IFN- β 産生を誘導し、その産生誘導には TLR3 と TLR9 が関与していることが示された。

3-4. 乳酸菌の IFN- β 産生誘導に対するエンドソーム酸性化の関与

乳酸菌と病原菌でエンドソームの TLR の関与に違いがみられたことから、エンドソームの酸性化阻害が IFN- β 産生誘導に与える影響を評価した。細菌は樹状細胞やマクロファージにより貪食され、エンドソーム内で加水分解されることで TLR に認識される。NH₄Cl で細胞を処理することで酸性状態のエンドソームを中和し、エンドソームにおける細菌の加水分解を阻害することができる (Hotta et al., 2006)。乳酸菌により誘導される IFN- β 産生量は、添加した NH₄Cl の濃度依存的に減少した (Fig. 5-4A)。NH₄Cl 存在下で KK221 刺激時に産生される IL-6 や TNF- α 量を調べたところ、NH₄Cl 添加の

影響はなかった (Fig. 5-4B)。また、病原菌により誘導される IFN- β 産生については NH₄Cl の添加による影響はみられなかった (Fig. 5-4A)。*Salmonella Typhimurium* については TLR4 を欠損することで IFN- β 産生誘導が消失し、その他の炎症性サイトカインについても産生の大部分が消失することから、TLR4 が応答に大きく関与していることを確認している (Fig. 5-4C)。TLR リガンドを用いた評価においても、Poly(I:C)や CpG DNA のようなエンドソームの TLR に対するリガンドで刺激したときに、NH₄Cl 添加による IFN- β 産生量の減少がみられる一方で、TLR4 のリガンドである LPS による IFN- β 産生誘導には変化がなかった (Fig. 5-4D)。以上より、エンドソームの TLR が関与している乳酸菌では NH₄Cl 添加の影響があるのに対し、関与しない病原菌では NH₄Cl 添加が影響しないことから、樹状細胞による乳酸菌と病原菌の認識の違いが確認された。

さらに TLR3 や TLR9 の関与をより明確にするために、*Unc93b1*^{3d} マウス (3d マウス)由来の BMDCs を用いて評価した。UNC93B1 は小胞体で合成された TLR3、TLR7、TLR9 をエンドソームへ輸送するのに必要なタンパク質であり、この UNC93B1 の機能欠損マウスでは TLR3、TLR7、TLR9 が働かないことが分かっている (Tabeta et al., 2006)。そして、3d マウス由来の BMDCs を乳酸菌で刺激したとき、IFN- β 産生が完全に消失した (Fig. 5-4E)。このことから、乳酸菌による IFN- β 産生誘導には、エンドソームにおける菌体の加水分解と、エンドソームに局在する TLR による認識が必須であることが確認された。

3-5. 乳酸菌の IFN- β 産生誘導に対する菌体内 2 本鎖 RNA の関与

TLR3 と TLR9 については核酸を認識する受容体であることが知られているが、一方で細菌の認識に TLR3 が関与することはほとんど報告がない。乳酸菌の 2 本鎖 RNA が TLR3 により認識され、IFN- β を誘導することが示唆されていることから、KK221 菌体中の 2 本鎖 RNA の IFN- β 産生誘導に対する寄与を調べた。RNase A は 0.3 M の NaCl 存在下では 1 本鎖 RNA のみを分解し、NaCl が存在しない条件では 1 本鎖 RNA と 2 本鎖 RNA を分解することが知られている (Ausubel et al., 1994)。また、S1 Nuclease

は 1 本鎖 DNA と 1 本鎖 RNA を分解する。これらの酵素、及び基質特異性を利用して、各条件で酵素処理した KK221 菌体の BMDCs に対する IFN- β 産生誘導を調べた。KK221 菌体を NaCl 非存在下で RNase A 処理したとき、IFN- β 産生が有意に減少した (Fig. 5-5A, B)。一方で 0.3 M NaCl 存在下で RNase A 処理した菌体と、S1 Nuclease 処理した菌体は変化しなかった (Fig. 5-5B)。このことから 1 本鎖 RNA ではなく 2 本鎖 RNA が IFN- β 産生誘導に関与することが確認された。この結果は TLR7 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs で IFN- β 産生に影響がない結果 (Fig. 5-3A) と一致していた。次に、NaCl 非存在下で RNase A 処理した KK221 菌体について、WT マウス、TLR3 遺伝子欠損マウス、TLR9 遺伝子欠損マウス、3d マウス由来の BMDCs の応答を調べた。すると、WT と TLR3 遺伝子欠損 BMDCs からの IFN- β 産生量は同程度なのに対し、TLR9 遺伝子欠損 BMDCs では 3d マウス由来の BMDCs と同程度まで産生量が低下した (Fig. 5-5C)。このことから、TLR3 からのシグナルと TLR9 からのシグナルにより IFN- β の産生が誘導されていることが示された。また、*Salmonella Typhimurium* と *Helicobacter pylori* は RNase A 処理による IFN- β 産生誘導の低下はみられなかった (Fig. 5-5D)。

次に、細菌中の 2 本鎖 RNA 量を定量し、乳酸菌と病原菌における 2 本鎖 RNA 量の比較を試みた。定量には 2 本鎖 RNA に特異的な抗体を用い、sandwich ELISA 法により測定した (Schönborn et al., 1991)。すると、乳酸菌は病原菌に比べ多量の 2 本鎖 RNA を保有することが明らかとなった (Fig. 5-5E)。また、2 本鎖 RNA を分解する RNase III を用いて各細菌から抽出した核酸の酵素処理を行ったところ、その検出が完全に消失することから、この sandwich ELISA 法により検出されているものが 2 本鎖 RNA であることを確認した (Fig. 5-5E)。さらに、95°C 10 分間の加熱処理が 2 本鎖 RNA 量に与える影響を調べたところ、RNA の多くが分解される一方で (Fig. 5-5F)、2 本鎖 RNA 量は変化しないことが確認された (Fig. 5-5G)。しかし、KK221 菌体の加熱処理により IFN- β 、IL-6、TNF- α の産生量が同程度低下することから (Fig. 5-5H)、加熱処理の影響が TLR3 のリガンドである 2 本鎖 RNA 以外に出ていることが示唆された。また、KK221 は高濃度の NaCl 存在下でも生育できる乳酸菌であるが、KK221 を

NaCl 存在下で培養することで IFN- β 産生誘導が強くなり (Fig. 5-5I)、さらに菌体中の 2 本鎖 RNA 量も増加し (Fig. 5-5J)、IFN- β 産生と 2 本鎖 RNA 量の間に関係がみられた。

3-6. 小腸内容物、腸内常在乳酸菌の IFN- β 産生誘導に対する TLR3 の関与

腸内菌叢に対する応答における TLR3 の関与について調べるために、Specific pathogen-free (SPF) マウスから常在菌を含む腸内容物を回収し、BMDCs に対する応答を調べた。すると、回腸内容物において TLR3 依存的な IFN- β 産生誘導が確認され、産生量も最も高かった (Fig. 5-6A)。一方で IL-6 や TNF- α 産生誘導に TLR3 依存性は確認されなかった (Fig. 5-6A)。同時に 2 本鎖 RNA 量も定量したところ、回腸において最も高く検出された (Fig. 5-6B)。

乳酸菌が主要な菌叢を形成する小腸において TLR3 依存性が確認されたことから、マウス小腸より乳酸菌を分離し、分離した乳酸菌で BMDCs の刺激を行った。すると、小腸より分離した乳酸菌 11 株のうち 8 株において高い IFN- β 産生誘導が確認され、そのうちの 5 株において TLR3 依存性が確認された (Fig. 5-6C)。さらにこれらの乳酸菌で 3d マウス由来の BMDCs を刺激したところ、IFN- β 産生誘導は消失した (Fig. 5-6D)。

以上の結果より、定常状態においても常在乳酸菌により TLR3 を介した IFN- β 産生が誘導されていることが示された。

3-7. 乳酸菌の TLR3 を介した抗炎症効果

小腸の上皮細胞 (Intestinal epithelial cells, IECs) と腸管粘膜固有層 (Lamina propria, LP) における IFN- β の mRNA 発現量を比較したところ、上皮細胞に比べ粘膜固有層で非常に強く発現しており、さらに TLR3 遺伝子欠損マウスにおいては腸管粘膜固有層における IFN- β mRNA 発現レベルが低下することが確認された (Fig. 5-7A)。WT マウスと TLR3 遺伝子欠損マウスの腸管粘膜固有層において、TLR3 以外の TLR の発現は同程度であった (Fig. 5-7B)。この結果は小腸内容物の BMDCs に対する応答 (Fig. 5-6A) と一致していた。さらに、WT マウスに KK221 を投与したところ、パイ

エル板、腸間膜リンパ節、脾臓中の CD11c⁺細胞の IFN- β mRNA 発現量が上昇したが、TLR3 遺伝子欠損マウスでは上昇していなかった (Fig. 5-7C)。このことから、生体においても TLR3 が CD11c⁺細胞の IFN- β 発現亢進に寄与していることが明らかとなった。

これまでに乳酸菌により誘導される IFN- β が DSS 誘導潰瘍性大腸炎の抑制に関わっていることを示してきたが、TLR3 遺伝子欠損マウスに対する効果についても検証した。すると、生理食塩水を投与した TLR3 遺伝子欠損マウスが WT マウスに比べ症状が悪化していた (Fig. 5-7D, E)。このことは、TLR3 遺伝子欠損マウスにおいて小腸の IFN- β 発現レベルの低下が関与していた (Fig. 5-7A) 可能性が考えられる。さらに、TLR3 遺伝子欠損マウスに KK221 を投与したとき、WT マウスで観察された炎症細胞の浸潤の抑制は確認されなかった (Fig. 5-7D, E)。その他に、体重減少 (Fig. 5-7F)、大腸の長さ (Fig. 5-7G)、MPO 活性 (Fig. 5-7H)、炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現量 (Fig. 5-7I) についても、TLR3 遺伝子欠損マウスにおける KK221 投与の効果はみられなかった。

3-8. 乳酸菌の 2 本鎖 RNA による抗炎症効果

これまでに乳酸菌による TLR3、TLR9 を介した IFN- β 産生誘導が BMDCs を用いた試験により確認されたことから、乳酸菌の 2 本鎖 RNA と DNA が主要な活性成分であると考えられる。一方で DSS 誘導潰瘍性大腸炎モデルにおいては TLR3 遺伝子欠損マウスで KK221 の効果がすべて消失していた。そこで、乳酸菌の抗炎症効果における 2 本鎖 RNA と DNA の関与を明確にすることを試みた。NaCl 非存在下での RNase A 処理により 2 本鎖 RNA を分解した菌体を調製し、マウスに投与したところ、KK221 の抗炎症効果が消失した (Fig. 5-8A-E)。このことから、菌体の持つ 2 本鎖 RNA が抗炎症に必須であることが示された。また、TLR9 遺伝子欠損マウスに KK221 を投与したところ、大腸の長さや結腸の IL-6 mRNA 発現量など一部で効果がみられた (Fig. 5-8A-E)。3d マウスにおいては TLR3 遺伝子欠損マウスと同様に KK221 の効果がすべて消失していた (Fig. 5-8A-E)。

BMDCs の試験においては、TLR9 からの刺激による IFN- β 産生に必要な IRF7 の

mRNA 発現量が KK221 により上昇し、RNase A 処理菌体ではその上昇が低下することが観察された (Fig. 5-8F)。このことは BMDCs を用いた試験における TLR9 の関与の可能性を物語っている。しかし、TLR9 の関与は完全に排除できないものの、TLR3 が乳酸菌の抗炎症効果に強くかかわっていることが示された。

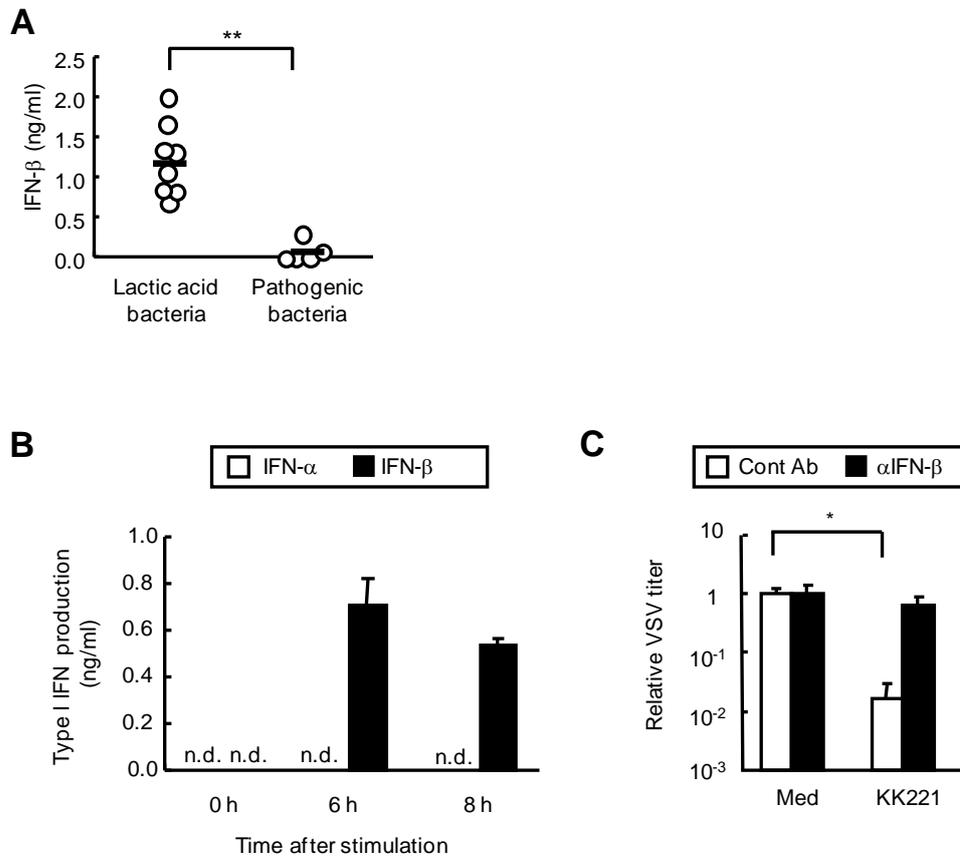


Fig. 5-1. BMDCs を用いた乳酸菌の IFN-β 産生誘導の評価

(A) 各種乳酸菌、病原菌 (Table 5-1) で BMDCs を刺激した際の IFN-β 産生量を測定した。バーは平均値を示す。(B) KK221 で BMDCs を刺激した際の IFN-α と IFN-β の産生量を測定した。エラーバーは標準誤差を表す (n=3)。(C) BMDCs を KK221 と共に共培養した後に VSV 感染を行ったときの VSV 量を測定した。KK221 と共培養する際にコントロール抗体 (Cont Ab) もしくは抗 IFN-β 中和抗体 (αIFN-β) を添加した。エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

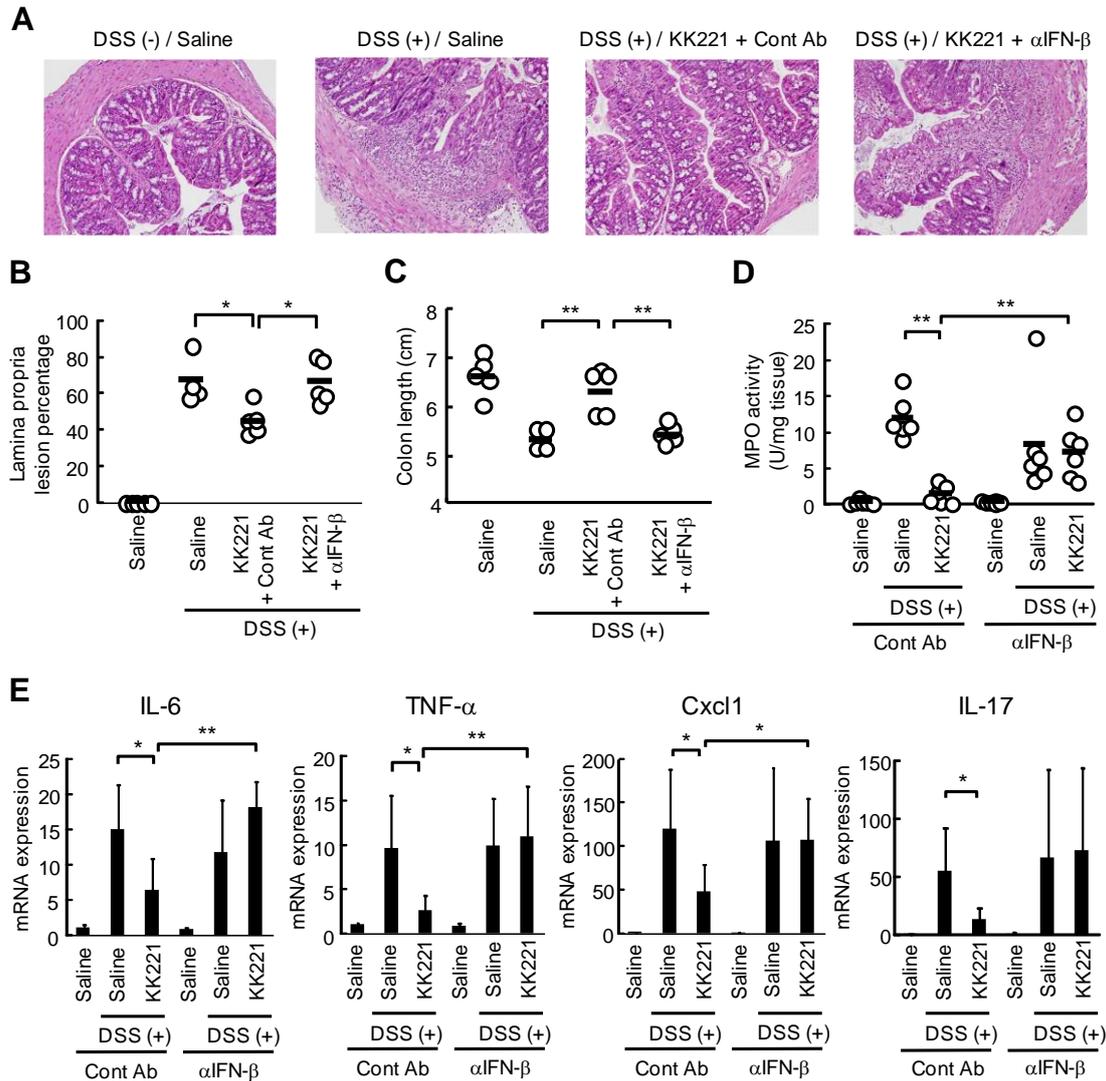


Fig. 5-2. KK221 による IFN- β を介した DSS 誘導潰瘍性大腸炎の抑制

生理食塩水、KK221 を経口投与し、さらにコントロール抗体 (Cont Ab) もしくは抗 IFN- β 中和抗体 (α IFN- β) を静脈より投与した (n=4-5)。そして、3% DSS 水を 7 日間自由摂取させ、腸炎を発症させた。結腸組織を H&E 染色した切片を倍率 200 倍で観察し (A)、結腸組織の粘膜固有層における炎症の割合を算出した (B)。さらに、大腸の長さ (C)、結腸の MPO 活性 (D)、結腸の炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現量 (E) を測定した。(B-D) バーは平均値を示す。(E) エラーバーは標準誤差を表す。(Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

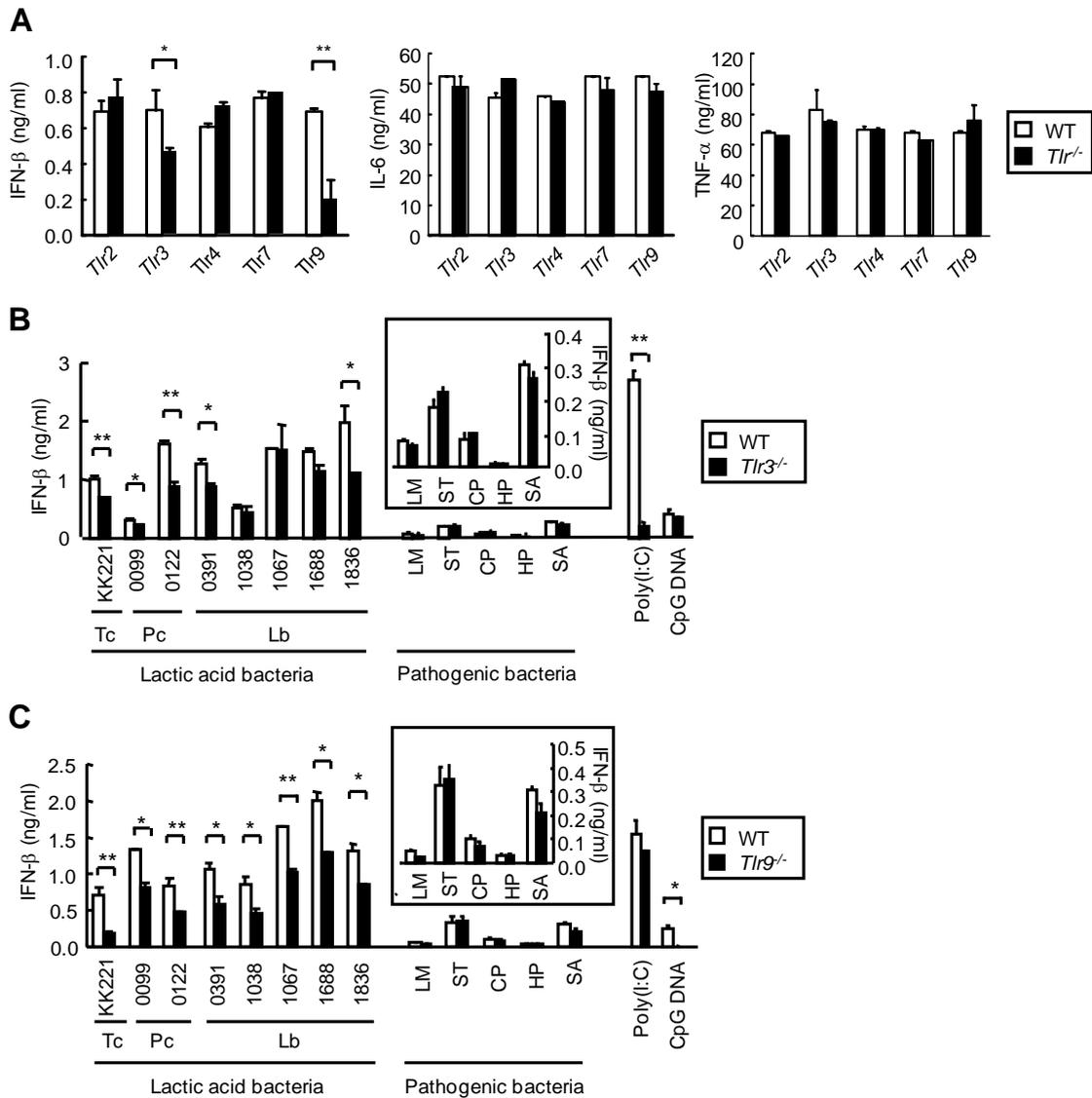


Fig. 5-3. 乳酸菌による TLR3、TLR9 を介した IFN-β 産生誘導

(A) WT 及び各 TLR 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs を KK221 で 6 時間刺激した際の IFN-β、IL-6、TNF-α 産生量を測定した。(B) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs を各乳酸菌、病原菌 (Table 5-1) で 6 時間刺激した際の IFN-β 産生量を測定した。(C) WT 及び TLR9 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs を各乳酸菌、病原菌 (Table 5-1) で 6 時間刺激した際の IFN-β 産生量を測定した。(A-C) エラーバーは標準誤差を表す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

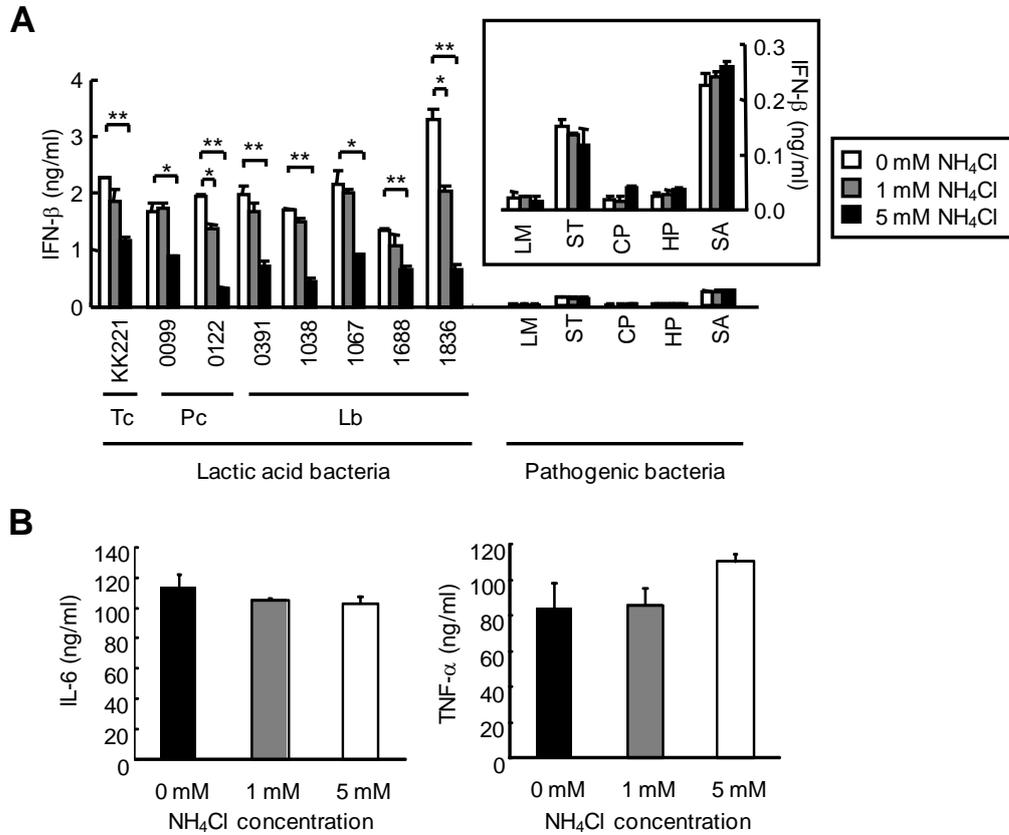
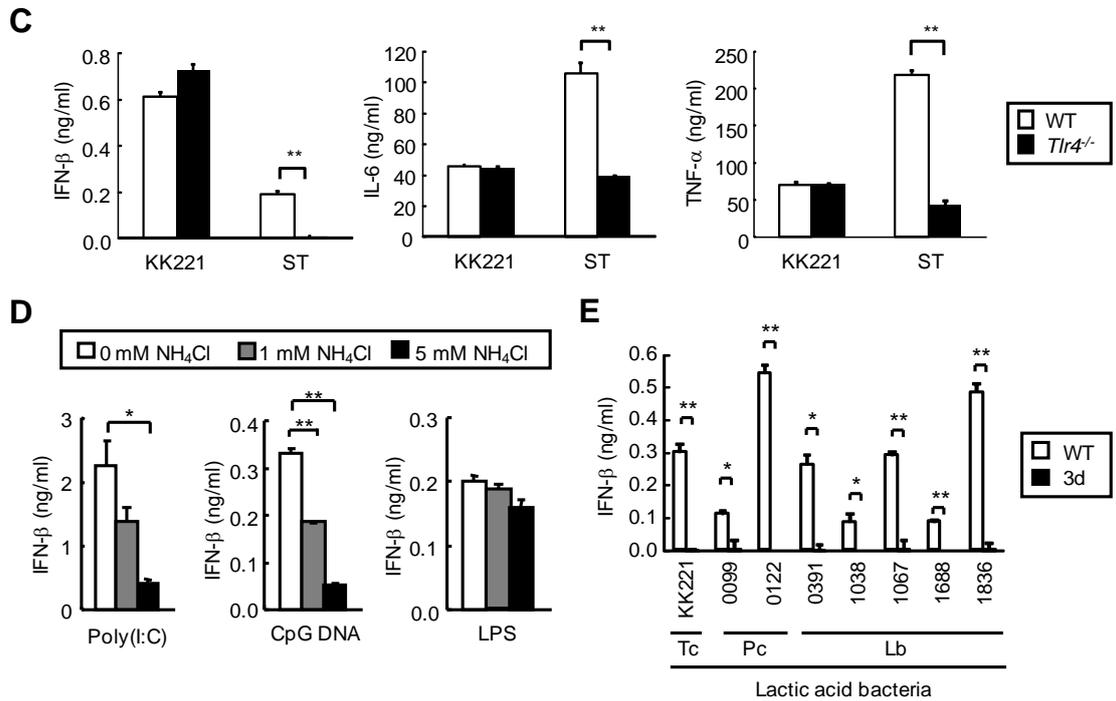


Fig. 5-4. 乳酸菌によるエンドソームを介した IFN-β 産生誘導

(A) BMDCs を NH₄Cl 存在下で各乳酸菌、病原菌 (Table 5-1) と共に 6 時間培養した際の IFN-β 産生量を測定した。(B) BMDCs を NH₄Cl 存在下で KK221 と 6 時間共培養した際の IL-6、TNF-α 産生量を測定した。(A,B) エラーバーは標準誤差を表す。

(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)



(C) WT 及び TLR4 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs を KK221、*Salmonella Typhimurium* で 6 時間刺激した際の IFN-β、IL-6、TNF-α 産生量を測定した。(D) BMDCs を NH₄Cl 存在下で各 TLR リガンドにより 6 時間刺激した際の IFN-β 産生量を測定した。(E) WT 及び 3d マウスより誘導した BMDCs を各乳酸菌 (Table 5-1A) で 6 時間刺激した際の IFN-β 産生量を測定した。(C-E) エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

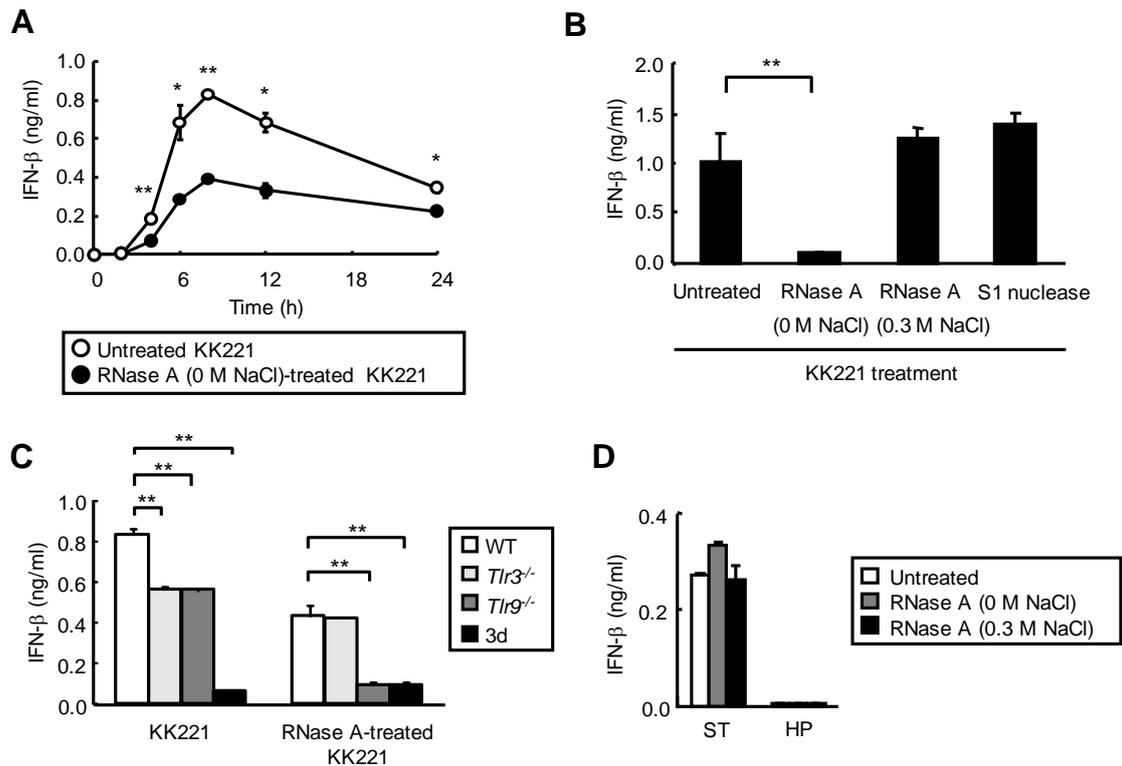
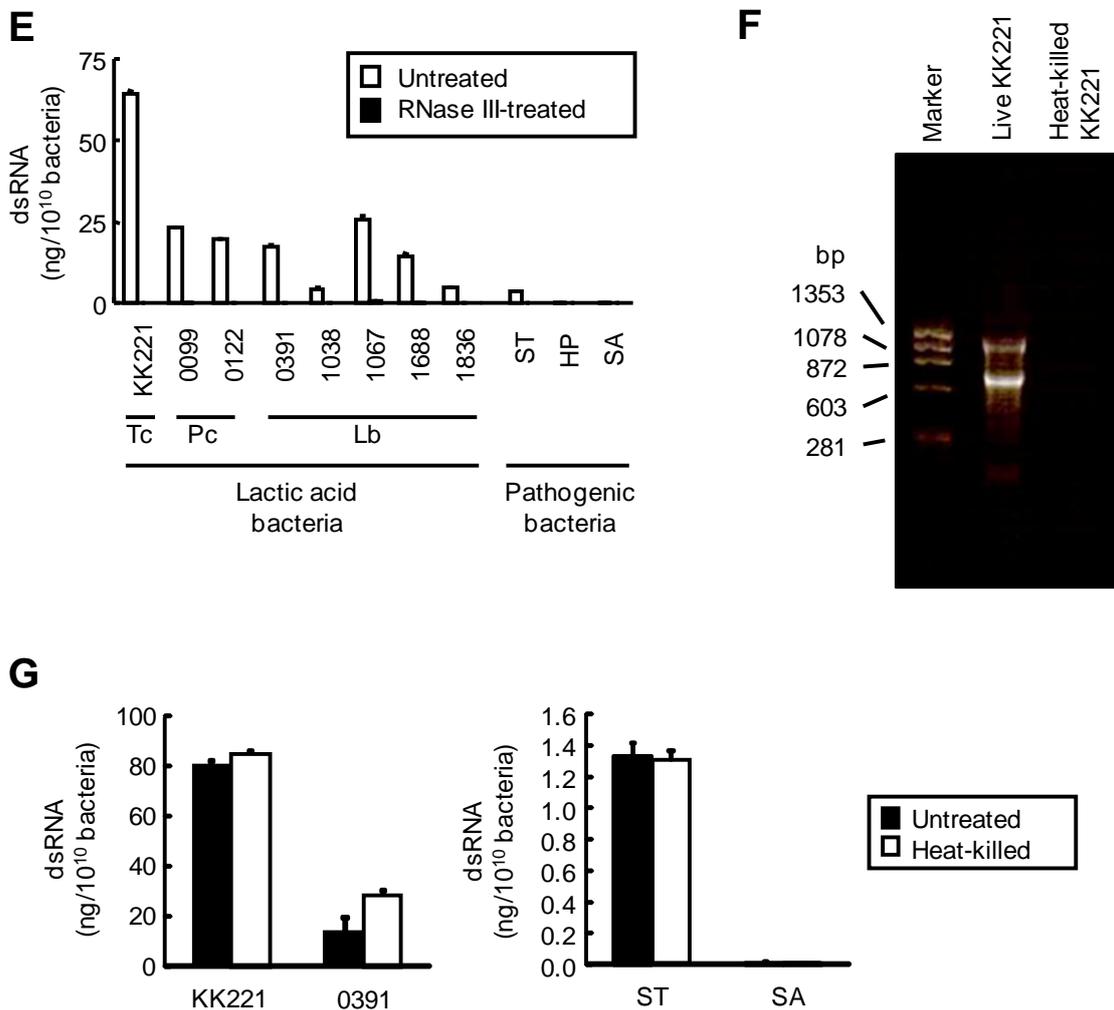
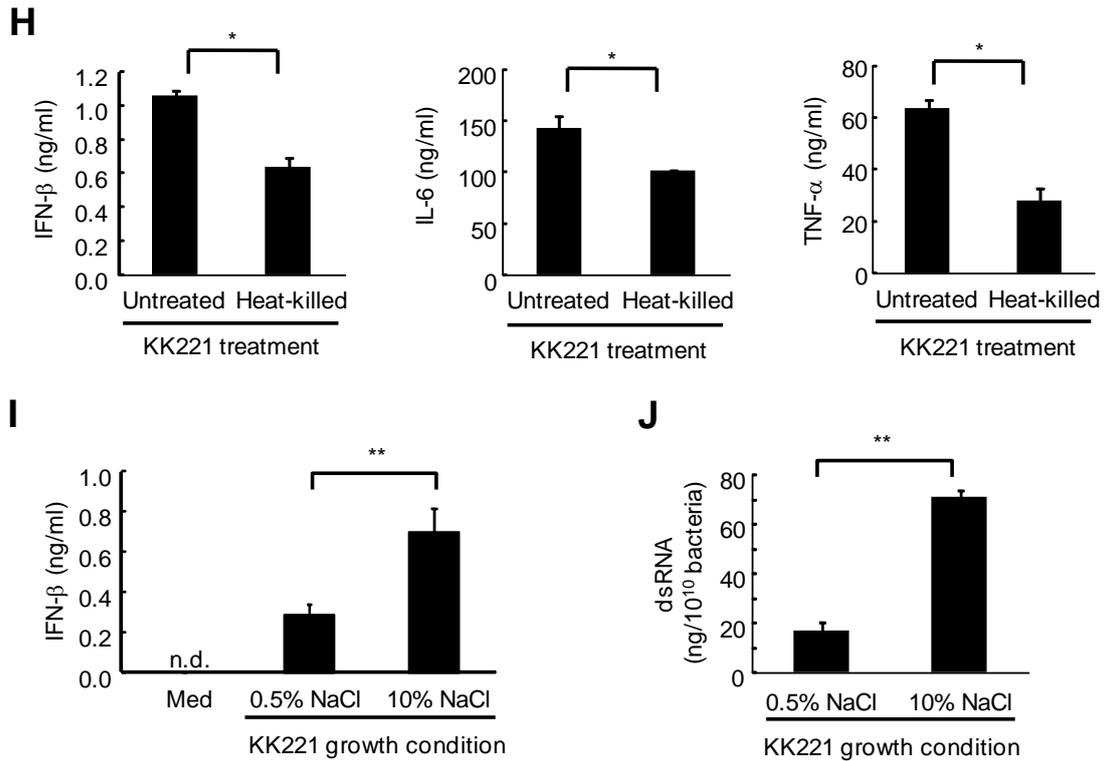


Fig. 5-5. 乳酸菌の2本鎖RNAによるIFN-β産生誘導

(A) BMDCsをKK221、及びRNase A処理(0 M NaCl)したKK221と共に培養した際のIFN-β産生量を測定した。(B) BMDCsをKK221、RNase A処理(0 M NaCl、0.3 M NaCl)したKK221、及びS1 nuclease処理したKK221と共に6時間培養した際のIFN-β産生量を測定した。(C) WTマウス、TLR3遺伝子欠損マウス、TLR9遺伝子欠損マウス、3dマウスより誘導したBMDCsをKK221、RNase A処理(0 M NaCl)したKK221で6時間刺激した際のIFN-β産生量を測定した。(D) *Salmonella Typhimurium*と*Helicobacter pylori*についてRNase A処理(0 M NaCl、0.3 M NaCl)を行い、BMDCsをそれぞれの未処理菌体、RNase A処理菌体と共に6時間培養し、IFN-β産生量を測定した。(A-D) エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)



(E) 各乳酸菌、病原菌について、菌体中の2本鎖RNA (dsRNA) 量を sandwich ELISA 法により測定した。また、2本鎖RNAであることを確認するために、核酸抽出サンプルを RNase III 処理したものについても測定した。(F) KK221 の非加熱菌体 (Live KK221) と加熱菌体 (Heat-killed KK221) から核酸を抽出、DNase I 処理後に電気泳動を行った。マーカーは ϕ X174/HaeIII を用いた。(G) 乳酸菌 (KK221、0391) と病原菌 (*Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*) について、非加熱菌体、加熱菌体から抽出した核酸中の2本鎖RNA量の定量を行った。(E,G) エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。



(H) BMDCs を非加熱の KK221、加熱処理した KK221 と共に 6 時間培養した際の IFN- β 、IL-6、TNF- α 産生量を測定した。(I) 0.5% NaCl 含有 MRS 培地、または 10% NaCl 含有 MRS 培地で KK221 を培養、調製した。そして、BMDCs を各菌体で 6 時間刺激した際の IFN- β 産生量を測定した。(J) 各 NaCl 濃度で培養した KK221 加熱処理菌体中に含まれる 2 本鎖 RNA 量を測定した。(H-J) エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

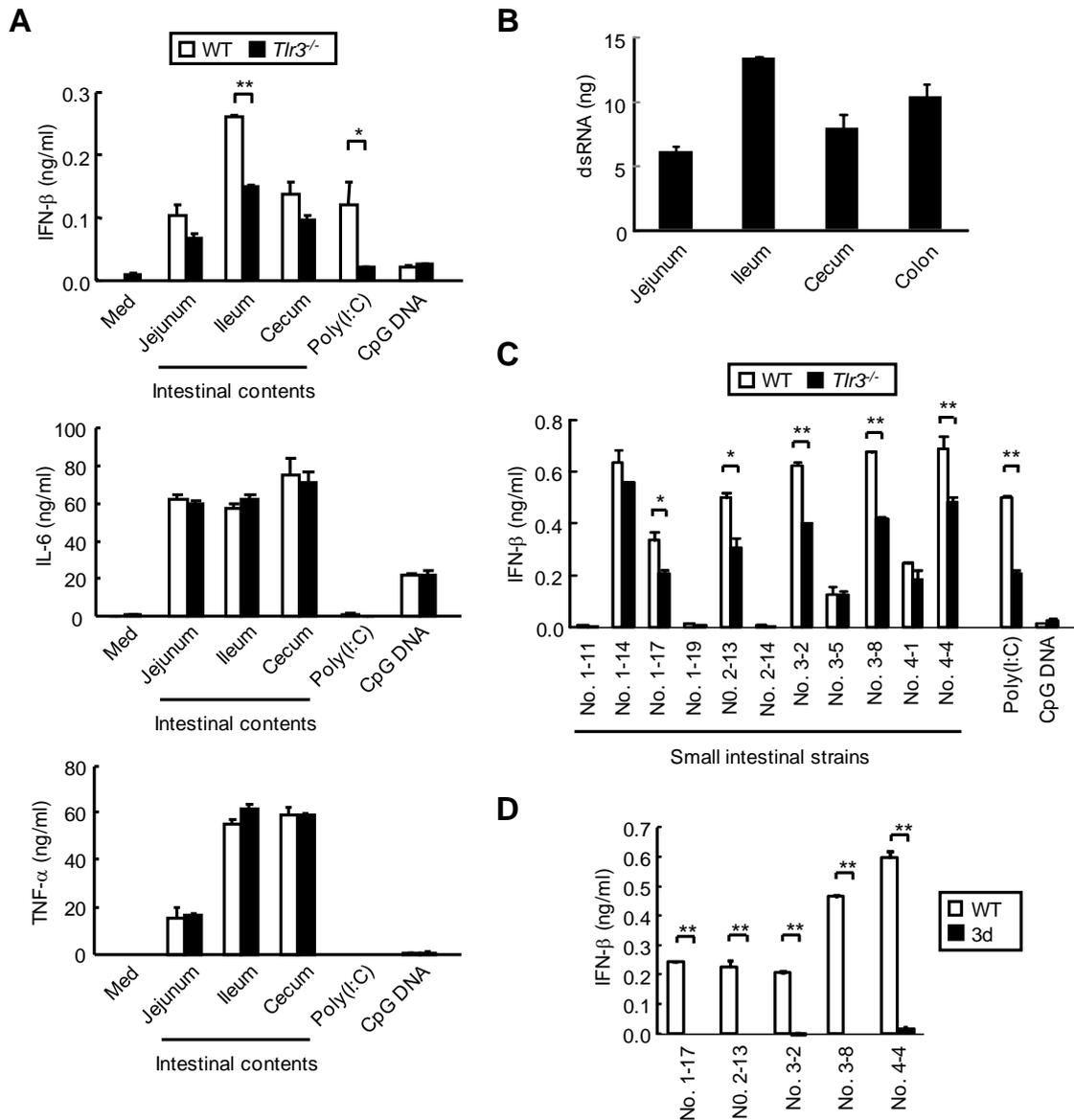


Fig. 5-6. マウス小腸内容物、マウス小腸由来乳酸菌の TLR3 を介した IFN- β 産生誘導 (A) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスより誘導した BMDCs をマウス空腸 (Jejunum)、回腸 (Ileum)、盲腸 (Cecum) 内容物で刺激した際の IFN- β 産生量を測定した。(B) マウス空腸 (Jejunum)、回腸 (Ileum)、盲腸 (Cecum)、結腸 (Colon) 内容物中の 2 本鎖 RNA 量を測定した。(C) WT 及び TLR3 遺伝子欠損 BMDCs をマウス小腸由来乳酸菌 (Table 5-2) で刺激した際の IFN- β 産生量を測定した。(D) WT 及び 3d マウス由来 BMDCs をマウス小腸由来乳酸菌 (Table 5-2) で刺激した際の IFN- β 産生量を測定した。(A-D) エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

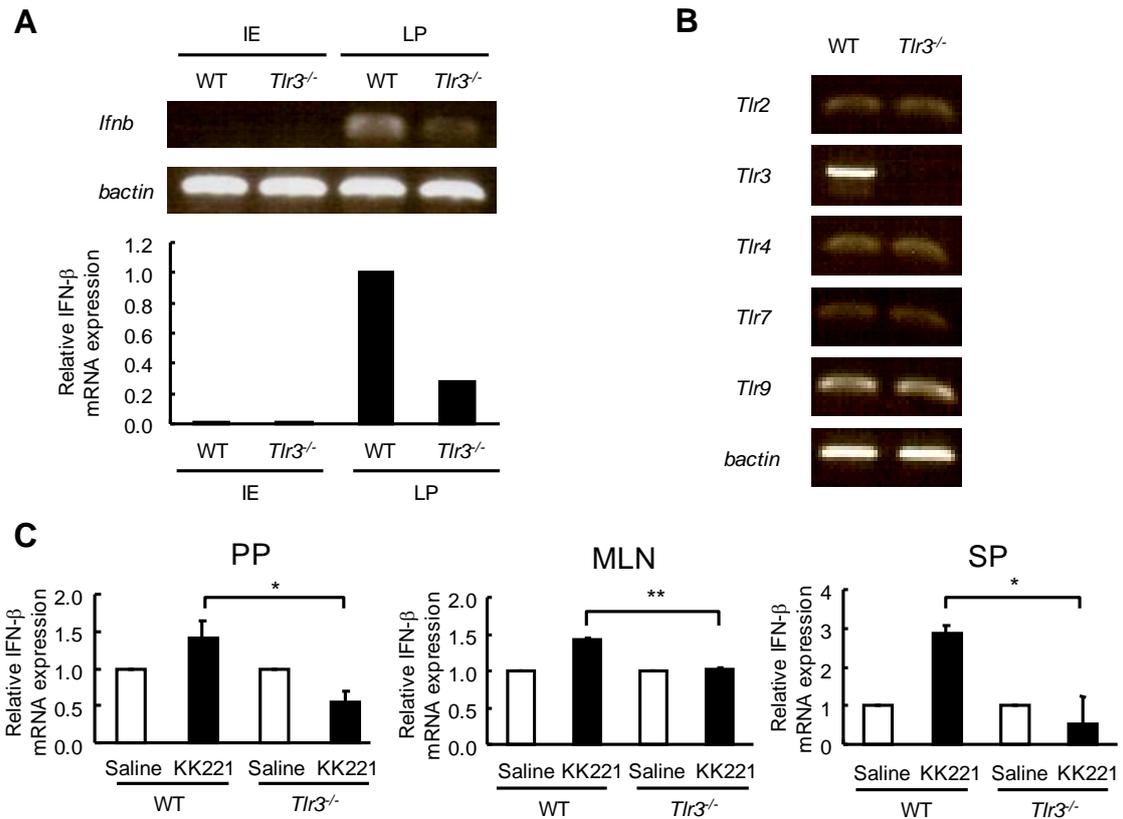
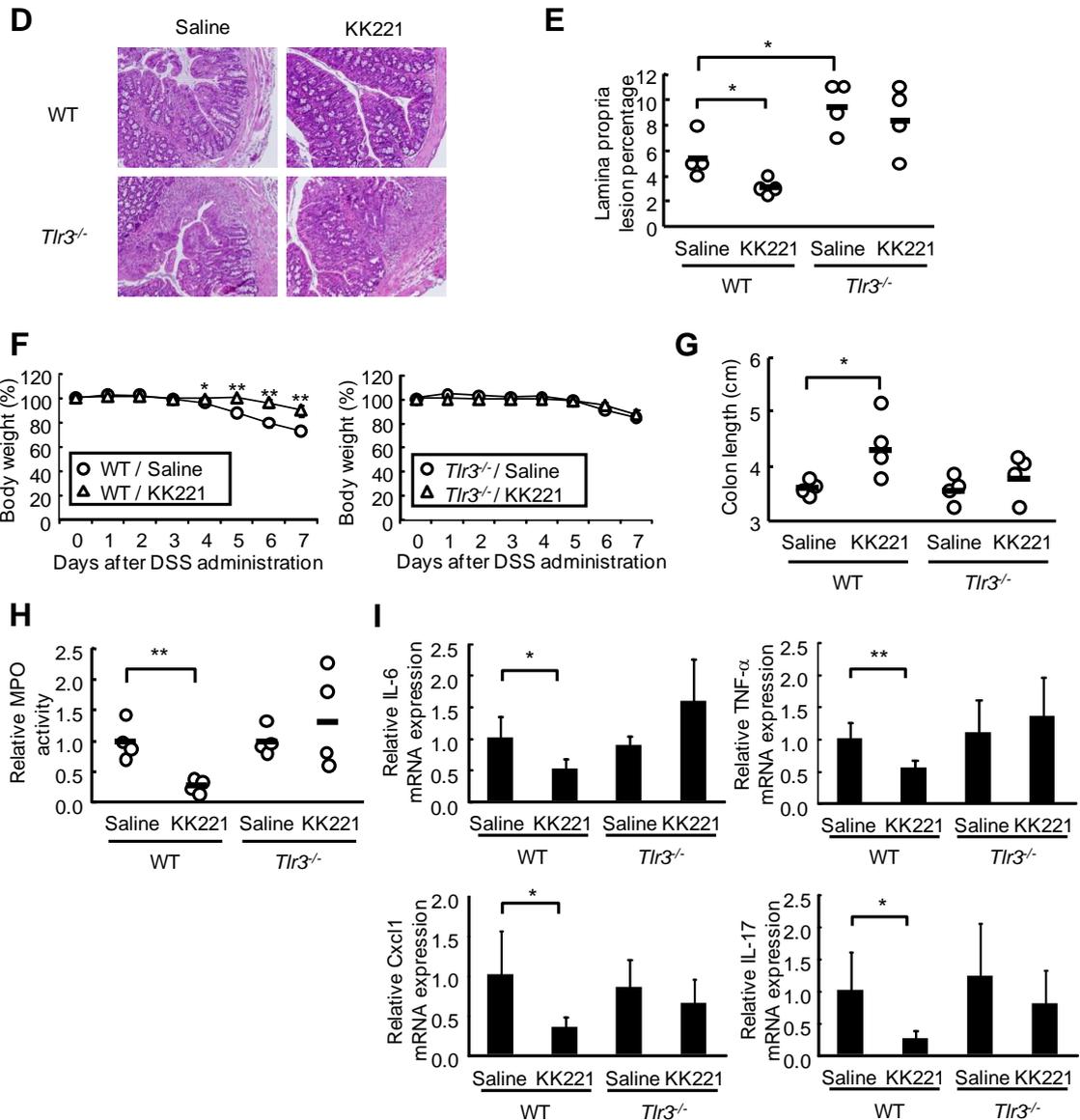


Fig. 5-7. 乳酸菌による TLR3 を介した抗炎症作用

(A) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスより小腸上皮 (IE) と粘膜固有層 (LP) の各細胞を回収し、IFN-β の mRNA 発現量を測定した。(B) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスの小腸粘膜固有層について、各 TLR の発現量を測定した。(A,B) 3 実験行ったうちの 1 実験について結果を示した。(C) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスに生理食塩水もしくは KK221 の経口投与を行った。パイエル板細胞 (PP) と腸間膜リンパ節細胞 (MLN) は投与 1 日後に回収し、CD11c⁺細胞を回収した。脾臓細胞 (SP) は投与 14 日後に回収し、CD11c⁺細胞を回収した。それぞれの細胞について IFN-β mRNA 発現量を測定した。値は生理食塩水投与群に対する相対値で示した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=2, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)



(D-I) WT 及び TLR3 遺伝子欠損マウスに KK221 を経口投与し、DSS 誘導潰瘍性大腸炎を発症させた (n=4)。(D) 結腸の組織切片を作製後、H&E 染色を行い、倍率 200 倍で観察した。TLR3 遺伝子欠損マウスにおいては KK221 の投与を行っても好中球、好酸球、マクロファージの浸潤がみられた。(E) H&E 染色を行った結腸の組織切片について、粘膜固有層の炎症の割合を算出した。(F) 体重の減少を測定した。(G) 大腸の長さを測定した。(H) 結腸の MPO 活性を測定した。(I) 結腸の炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を測定した。(E,G,H) バーは平均値を示す。(F,I) エラーバーは標準誤差を示す。(Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)

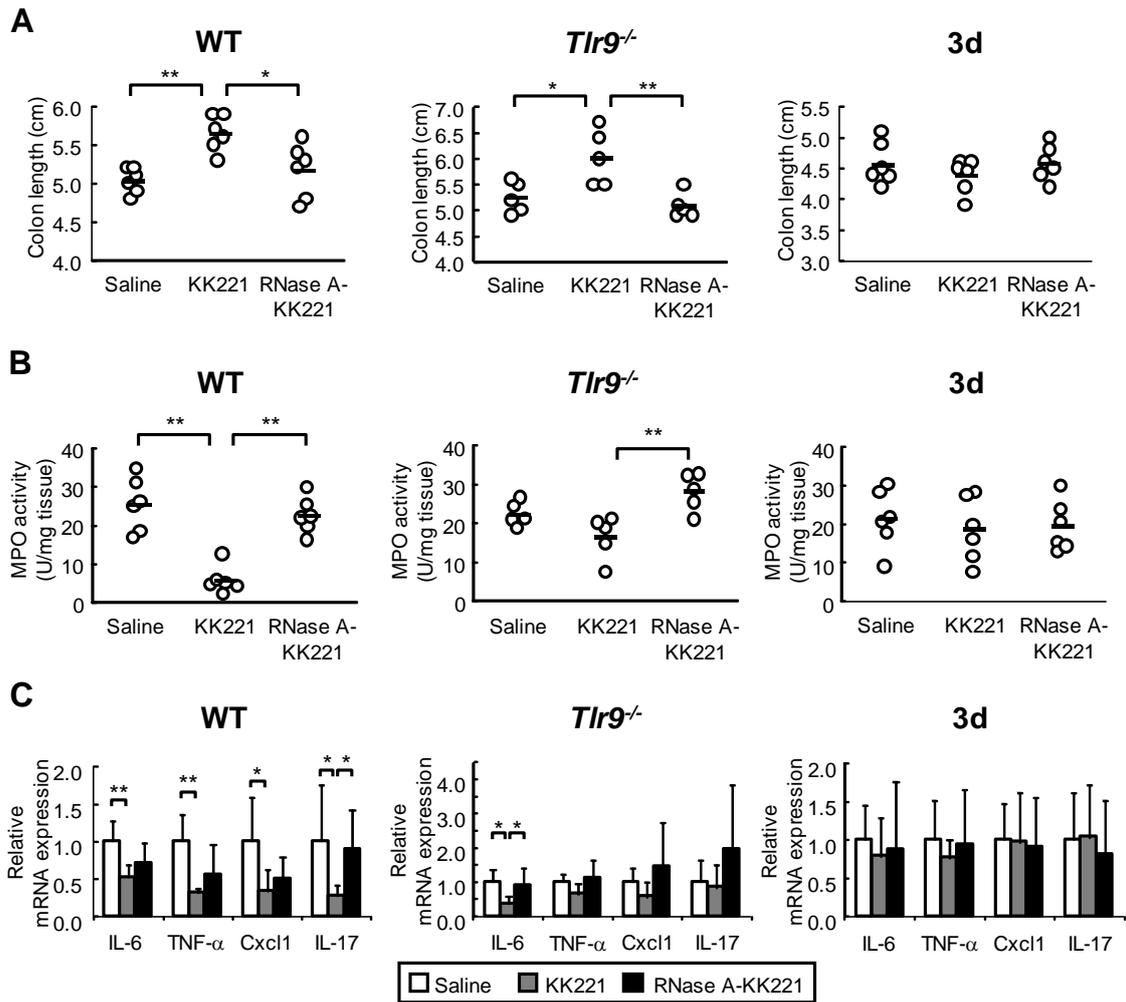
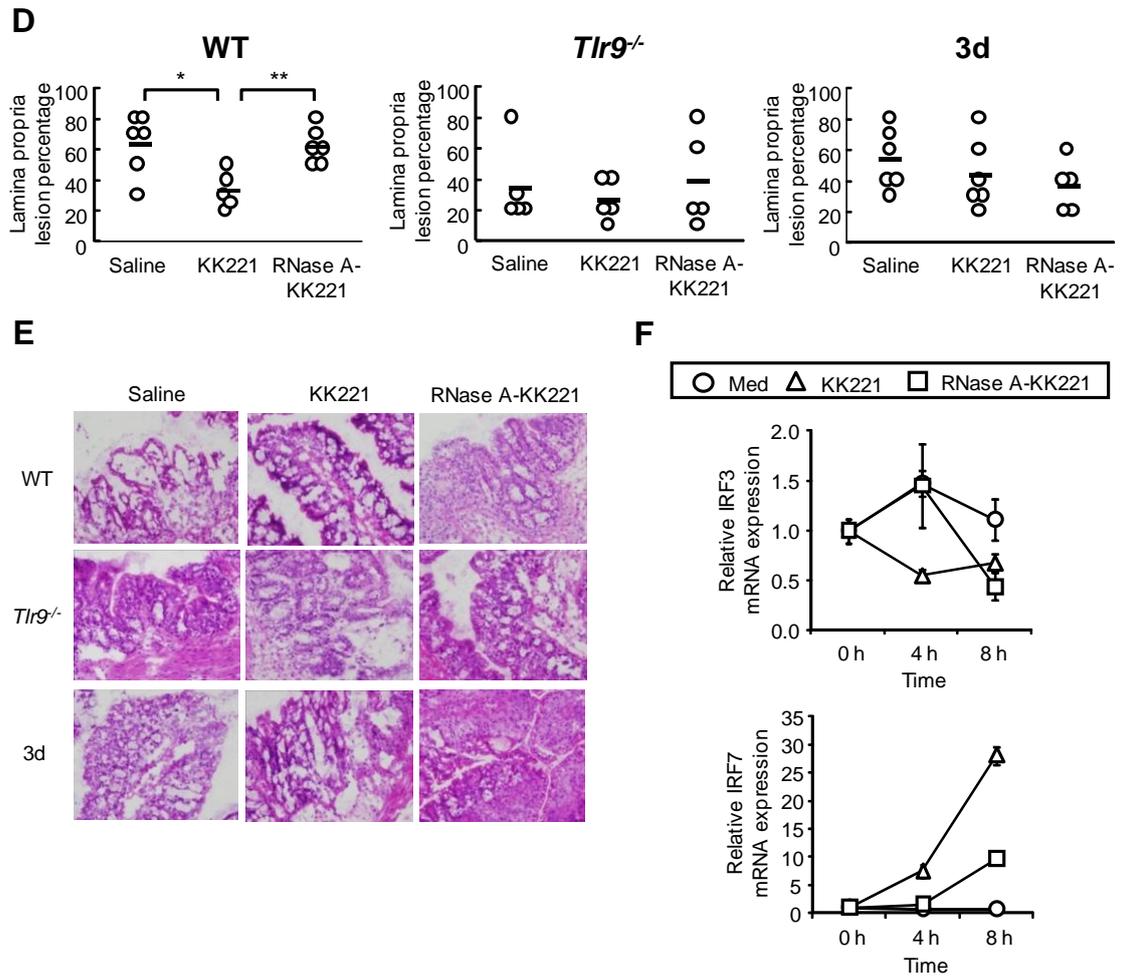


Fig. 5-8. 乳酸菌の2本鎖RNAによるDSS誘導潰瘍性大腸炎抑制

生理食塩水、KK221、RNase A 処理 (0 M NaCl) した KK221 (RNaseA-KK221) を WT マウス、TLR9 遺伝子欠損マウス、3d マウスに対し投与し、DSS 誘導潰瘍性大腸炎を発症させた (n=5-6)。(A) 大腸の長さを測定した。(B) 結腸の MPO 活性を測定した。(C) 結腸の炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を測定した。(A,B) バーは平均値を示す。(C) エラーバーは標準誤差を示す。(n=5-6, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)



(D) H&E 染色を行った結腸の組織切片について、粘膜固有層の炎症の割合を算出した (n=5-6, Student's t-test, *p<0.05, **p<0.01)。(E) H&E 染色した結腸の組織切片を倍率 200 倍で観察した。TLR9 遺伝子欠損マウス及び 3d マウスにおいては KK221 を投与しても好中球、好酸球、マクロファージの浸潤がみられた。RNase A 処理 KK221 の投与では全てのマウス系統で炎症細胞の浸潤が確認された。バーは平均値を示す。

(F) BMDCs を KK221、RNase A 処理 KK221 で刺激した際の IRF3、IRF7 の mRNA 発現量を測定した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

第4節 考察

本研究において乳酸菌の2本鎖RNAが腸管の樹状細胞のTLR3を介してIFN- β 産生を誘導することを明らかにした。また、TLR3が回腸内容物や常在乳酸菌の認識に関与しており、それが小腸のIFN- β 発現に関わっていることを示した。そして、乳酸菌により誘導されるIFN- β の生理学的意義として我々は抗炎症作用に着目し、DSS誘導潰瘍性大腸炎を抑制することを示した。

BMDCsを用いた細胞試験においてはTLR3とTLR9のIFN- β 誘導に対する関与が認められ、さらに3dマウスを用いることでエンドソームに存在するTLR (TLR3, TLR7, TLR9)がIFN- β 誘導に必須であることが確認された。TLR3依存的なIFN- β 産生誘導は*Tetragenococcus*属, *Pediococcus*属, *Lactobacillus*属で確認され、*Lactobacillus*属においては*Lactobacillus pentosus*の2株で確認された。一方、マウス小腸由来の乳酸菌においては*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactococcus lactis*でTLR3依存的なIFN- β 産生誘導が確認され、*Lactobacillus murinus*では確認されなかった。*Lactobacillus reuteri*はIFN- β 産生誘導が非常に弱かった。以上の結果からTLR3依存性が菌種特異的であることが示唆されるものの、*Lactobacillus johnsonii*においてはTLR3依存性が低い株も存在したことから、株による違いも影響していることが考えられる。

細胞試験においてはBMDCsが産生したIFN- β が自らのIFN- α/β 受容体に結合することでIRF7等のIRFファミリーを誘導することを確認した。Gautierら(2005)もTLR刺激により産生されたType I IFNsがIFN- α/β 受容体に結合することで様々なIRFファミリーの発現を誘導し、それがさらなるIL-12産生誘導の増強に関わっていることを示している。我々が発現上昇を確認したIRF7はTLR7やTLR9からのシグナル伝達に関わっているため、TLR9刺激によるIFN- β 誘導をさらに促進することが考えられる(Honda et al., 2005)。このようにBMDCsを用いた評価においてはTLR3とTLR9が協調してIFN- β 誘導を引き起こしていると考えられる。一方でDSS潰瘍性大腸炎モデルにおいては菌体の2本鎖RNA及び宿主のTLR3の重要性が示された。Obermeier

ら (2005) は TLR9 が炎症を悪化させることを報告しており、我々の試験においても TLR9 遺伝子欠損マウスにおいては WT マウスに比べ大腸粘膜固有層の炎症が軽度であった。TLR9 のこのような働きからも、腸管における乳酸菌の認識と炎症抑制において TLR3 が重要であることが考えられる。

細菌の 2 本鎖 RNA においては、ストレスに応じて複数の small RNA が転写後制御に関わることが報告されている。例えば Massé and Gottesman (2002) は *Escherichia coli* は鉄を制限された条件で RyhB という small RNA を合成し、標的となる RNA に結合し 2 本鎖 RNA を構成することを報告している。また、CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) と呼ばれる 50 bps 程度の配列がウィルスやプラスミドに対する細菌の獲得免疫の制御にかかわっていることが報告されている (Horvath and Barrangou, 2010)。乳酸菌においても *Lactobacillus* 属を含めた複数の種で CRISPR ファミリーが見つまっている (Horvath et al., 2009)。TLR3 は 40-50 bp の長さの 2 本鎖 RNA を認識するため (Leonard et al., 2008; Liu et al., 2008)、CRISPR を認識する可能性も十分に考えられる。一方で、乳酸菌と病原菌で菌体内の 2 本鎖 RNA 量が異なる点についてはさらなる検証が必要となる。乳酸菌は自ら乳酸を生成するため、低い pH の条件においても生育することが可能である (Williams, 2010)。また、自然環境においては限られた栄養条件で生育、発酵している種も多い。*Tetragenococcus halophilus* KK221 については高塩濃度 (10%以上) でも生育することができ、実際に塩濃度が高い条件で培養した乳酸菌で 2 本鎖 RNA 含量が高くなることも確認している (Fig. 5-5J)。このように生育する環境因子が菌体内の 2 本鎖 RNA 量に影響を与え、TLR3 の応答や樹状細胞等の活性化に関わっていることが考えられる。本研究により腸管の TLR3 や菌体の 2 本鎖 RNA の重要性が示されたことから、食品に用いる乳酸菌の選択や、乳酸菌による発酵を行う条件の新たな指標となることが期待される。

総合考察

海藻由来成分が免疫機能に及ぼす影響

本研究ではまず、古くから日本人が摂取してきた海藻に含まれるフコキサンチンとフコイダンの免疫系に与える影響を明らかにした。フコキサンチンは免疫系を抑制する Treg 細胞を誘導し、一方で炎症性の Th17 細胞の分化を抑制することが確認された (Fig. 2-4)。 *in vivo* 試験において Treg 細胞は大腸に関する報告が多く、無菌マウスに *Clostridium* 属を定着させることで、大腸の Treg 細胞が増加することが確認されている (Atarashi et al., 2010; Furusawa et al., 2013)。また、*Bacteroides fragilis* が大腸の Treg 細胞の誘導に関わっていることも示されている (Round et al., 2011)。一方で Th17 細胞については小腸での報告が多く、実際に Segmented filamentous bacteria (SFB) を定着させることで Th17 細胞を誘導することが感染性腸炎を抑制し (Ivanov et al., 2009)、一方で自己免疫疾患を悪化させることが示されている (Wu et al., 2010)。フコキサンチンを摂取することで大腸での Treg 細胞を増やすことが可能なのか、もしくは小腸での Th17 細胞を減らすことが可能なのかは今後検討しなければいけない。また、フコキサンチンの Treg 細胞の分化を誘導し Th17 細胞の分化を抑制するという作用はレチノイン酸と類似しており、ビタミン A 欠乏マウスにおける IL-13 産生性の Th2 細胞によるアレルギー症状の悪化がレチノイン酸投与により防げることから (Yokota-Nakatsuma et al., 2013)、フコキサンチンについてもこのようなアレルギーの抑制効果が期待できる。また、Treg 細胞については細胞数の変化だけでなく、その機能についても着目していかなければいけない。例えば、Rag1 遺伝子欠損マウスに対する CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞の移入による腸炎やその他の炎症性腸疾患の抑制においては Treg 細胞の数が十分に誘導されていることが重要である一方で (Furusawa et al., 2013)、経口免疫寛容の誘導やアレルギー性腸炎のような抗原特異的な応答については抗原に暴露された際に IL-10 の産生や他の T 細胞の過剰な応答の抑制などの抗原特異的な機能が備わっていることが重要であると考えられる。無菌マウスの大腸では Treg 細胞数が非常に少なくなっており、*Clostridium* 属を定着させることで大きく上昇する

が、小腸においては元々ある程度の Treg 細胞が存在する (Atarashi et al., 2010)。しかし、無菌マウスの小腸の Treg 細胞は機能が備わっていないことが考えられる。小腸において Treg 細胞の数について論じている報告は非常に少ないが、その機能に変化が起こっているかに着目して解析する必要がある。

フコイダンについては乳酸菌の貪食を促進することで乳酸菌の効果を高めることが確認された (Fig. 3-2D)。フコイダン摂取による Th1 免疫の増強や NK 細胞の活性化が報告されているが (Maruyama et al., 2006)、フコイダンを摂取することで腸内細菌に対する応答が高まっていることも考えられる。特にサイトカイン産生については相乗的に上昇することからも、フコイダンが抗原提示細胞に単独で作用する以外に、他の細菌との複合的な効果が表れている可能性が考えられる。フコイダン単独の効果については細胞試験が数多く行われているため明らかとなっているが (Hayashi et al., 2008; Hu et al., 2010)、小腸内フローラが異なる状況のマウスに対して作用したときに、フコイダンの効果も異なると非常に興味深い。例えば、SFB は小腸の樹状細胞により抗原提示が行われることで Th17 細胞が誘導されることが明らかとなったが (Goto et al., 2014)、このときにフコイダンが存在することでより強く Th17 細胞が誘導される可能性も考えられる。さらにはヒトが摂取する場合、腸内フローラの環境を良好に保っておくことがフコイダンの効果を高めることにも繋がる可能性がある。また、今回の我々の研究では IL-12 産生を抗原提示細胞に対し誘導し、Th1 免疫を増強することが分かっている *Tetragenococcus halophilus* KK221 を用いたが (Masuda et al., 2008; Nishimura et al., 2009)、IL-10 産生を樹状細胞に強く誘導する乳酸菌と一緒に摂取した場合、炎症抑制作用が強まることも考えられる。KK221 とフコイダンを同時に BMDCs の培養に添加した場合においては、IL-12 だけでなく IL-10 産生量についてもフコイダンの濃度依存的な上昇が確認された (data not shown)。フコイダンの幅広い効果を示すために、Th1 免疫の増強以外にも効果の増強作用があるかを検討していく必要がある。

腸管の樹状細胞と乳酸菌

乳酸菌の効果について、今回我々は *Lactobacillus plantarum* YU (LpYU) の IL-12

産生誘導やKK221を含む様々な乳酸菌のIFN- β 産生誘導に着目して示してきた。LpYUのIL-12産生誘導についてはTLR2の関与が見られた一方で、TLR4とTLR9の関与は確認されなかった (Fig. 4-2)。IL-12はIL-12p35とIL-12p40の2つのサブユニットからなり、IL-12p70になることで生理活性を持つ。我々の実験においてはIL-12p70をELISA法により測定しているが、IL-12p35とIL-12p40が異なる様々なシグナル伝達経路で誘導されることから、IL-12の誘導に関わるTLRを特定することは困難であると考えられる。一方でIFN- β の産生誘導に関しては、TLRの中ではTLR3/4-IRF3の経路とTLR7/9-IRF7の経路に限られるため、各TLR遺伝子欠損の影響が見やすかったことが考えられる。

今回の我々の研究において、実際に乳酸菌が腸管においてどのような細胞に認識され、どのように全身に影響を及ぼしているかは明らかにできていない。近年、腸管における樹状細胞の解析が進んできている。Uematsuら(2008)は小腸の粘膜固有層の細胞を調べ、その中に2つの樹状細胞サブセット(CD11c^{high}CD11b^{low}, CD11c^{high}CD11b^{high})、マクロファージ(CD11c^{int}CD11b^{int})、好酸球(CD11c^{int}CD11b^{high})を確認した。そして、樹状細胞として特定した細胞群がCD103とCD8 α をマーカーにすることで、さらに細かく分けられることを見出した(Fujimoto et al., 2011)。そして、CD103⁺CD8 α ⁺樹状細胞がTLR3、TLR7、TLR9を発現していることを確かめた。CD103⁺樹状細胞は元々腸間膜リンパ節に存在する樹状細胞として知られており、ビタミンAをレチノイン酸に代謝し、Treg細胞の誘導にも関わることが知られていたが、Fujimotoら(2011)により腸管で確認されたこの細胞群についてはTh1免疫の増強や細胞傷害性T細胞の活性化に関わっていた。今回我々は乳酸菌の多くがTLR3及びTLR9によって認識されることを示した(Fig. 5-3B, C)。つまり、このCD103⁺CD8 α ⁺樹状細胞は乳酸菌に対する応答やその後のTh1免疫の増強などに関わっている可能性が考えられる。また、CD103⁺樹状細胞については経口免疫寛容への関与も明らかとなった(Mazzini et al., 2014)。Mazziniら(2014)らはケモカインレセプターのCX3CR1を発現するマクロファージが小腸に届いた食物抗原を捕らえ、速やかにCD103⁺樹状細胞に提示し、その食物抗原に対するTreg細胞を誘導することで経口免疫寛容を誘導することを実証した。

近年、急速に樹状細胞の様々な機能や TLR の発現パターンが明らかとなってきたため、乳酸菌の認識に関わる樹状細胞を特定することも可能となる。Uematsu ら (2008) の研究においては腸管粘膜固有層の樹状細胞について調べているが、乳酸菌の認識にはパイエル板の樹状細胞も関わることも考えられることから、パイエル板の樹状細胞の機能解析も重要となる。さらに我々の研究において *in vivo* 試験により KK221 の 2 本鎖 RNA 及び宿主の TLR3 が DSS 誘導潰瘍性大腸炎の抑制に必須であることが示されたことから (Fig. 5-7, 5-8)、TLR3 を発現した樹状細胞に着目していく必要がある。

TLR3 の役割

TLR3 についてはこれまでは細菌の核酸を認識するものとしては知られていなかった。TLR3 はウイルスやネクロシスを起こした細胞を認識する受容体として知られていたが (Karikó et al., 2004; Kawai and Akira, 2009)、本研究により細菌の認識においても TLR3 が重要な役割を担っていることが示された。エンドソームの TLR3 以外にも、2 本鎖 RNA の認識に関わる分子として細胞質に存在する 2 つの RNA ヘリカーゼ、Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) と Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) が知られている (Kato et al., 2006)。ある種のウイルスや 2 本鎖 RNA が RIG-I や MDA5 により認識され、ミトコンドリア膜上の IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1) を介して IRF3 や IRF7 のリン酸化を誘導し、IFN- β が産生される (Kumar et al., 2006)。我々の実験でも TLR3 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs において Poly(I:C) 刺激時の IFN- β 産生が完全に消失しなかったが、これは IPS-1 を介した経路による IFN- β 産生によるものと考えられる。我々は IPS-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs を用いて乳酸菌による IFN- β 産生誘導についても評価を行ったが、WT の BMDCs と同程度の産生量であったことから、乳酸菌による IFN- β 産生誘導には IPS-1 を介した経路は関与していないと考えられる (data not shown)。我々は BMDCs を乳酸菌で刺激する際にエンドソームの酸性化を阻害したとき、IFN- β 産生誘導が減弱することを確認した (Fig. 5-4A)。この結果は IFN- β 産生誘導に関わる乳酸菌の認識が細胞質においてではなく、エンドソームにおいて起こっていることを示している。

今回我々は樹状細胞の TLR3 について論じてきたが、腸管の上皮細胞も TLR3 を高く発現している (data not shown)。しかし、上皮細胞では IFN- β の発現レベルは非常に低く (Fig. 5-7A)、上皮細胞の TLR3 は IFN- β の発現には関与しないことが示唆される。上皮細胞の TLR3 は炎症に関わることが知られており、ロタウィルスの 2 本鎖 RNA や Poly(I:C) が腸管の粘膜を損傷されることが報告されている (Zhou et al., 2007)。一方で乳酸菌などの細菌は 2 本鎖 RNA を菌体内に保持しており、上皮細胞を刺激せずに M 細胞から取り込まれることが推察される。つまり、菌体としての形を保持しているために、上皮細胞での炎症を引き起こすことなく、GALT の樹状細胞やマクロファージに認識されていることが考えられる。実際に KK221 を投与したマウスのパイエル板細胞や腸間膜リンパ節細胞から採取した CD11c⁺ 細胞で IFN- β 発現量が上昇していることから (Fig. 5-7C)、パイエル板に KK221 が届いていることが示唆される。ヒトに対して無害な乳酸菌は 2 本鎖 RNA という免疫活性化物質を保持して、炎症を起こさずに上皮を通過することから、非常に優れた免疫調節剤であると言える。

今後の展望

今回、乳酸菌と海藻由来の成分について免疫機能に与える影響の一端が明らかとなった。乳酸菌についてはこれまでの蓄積された報告もあり、徐々にその免疫調節メカニズムが明らかとなりつつあるが、フコキサンチンやフコイダンについては作用する細胞や受容体が未だに解明できていない。腸管の樹状細胞の機能が明らかとなることで乳酸菌研究についてはさらなる進展が期待できるが、海藻由来成分についても腸管の細胞との相互作用についてさらに詳細に検討する必要がある。食品成分が作用する細胞、効果を発揮するメカニズムが明らかとなることで、疾病の予防に効率的に利用できるようになることが期待できる。

引用文献

Adhikari, U., Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Damonte, E.B., and Ray, B. (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* *67*, 2474–2482.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* *2*, 675–680.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* *124*, 783–801.

Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar. Drugs.* *9*, 2106–2130.

Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* *11*, 854–861.

Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2680–2689.

Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., and Nagao, A. (2004). Biotransformation of

fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metab. Dispos.* *32*, 205–211.

Asong, J., Wolfert, M.A., Maiti, K.K., Miller, D., and Boons, G.J. (2009). Binding and cellular activation studies reveal that Toll-like receptor 2 can differentially recognize peptidoglycan from gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* *284*, 8643–8653.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2010). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* *331*, 337–341.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. *1*, 3.13.1 (New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).

Beppu, F., Niwano, Y., Tsukui, T., Hosokawa, M., and Miyashita, K. (2009). Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *J. Toxicol. Sci.* *34*, 501–510.

Beutler, B., Eidenschenk, C., Crozat, K., Imler, J.L., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., and Akira, S. (2007). Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 753–766.

Bjorksten, B., Naaber, P., Sepp, E., and Mikelsaar, M. (1999). The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy* *29*, 342–346.

Cho, M.L., Lee, B.Y., and You, S.G. (2010). Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their *in vitro* anticancer activity. *Molecules* *16*, 291–297.

Corr, S.C., Gahan, C.G., and Hill, C. (2007). Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *50*, 380–388.

Cross, M.L., Ganner, A., Teilab, D., and Fray, L.M. (2004). Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *42*, 173–180.

Drouault, S., and Corthier, G. (2001). Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Vet. Res.* *32*, 101–117.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., et al. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* *73*, 386S–392S.

Elias, K.M., Laurence, A., Davidson, T.S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E.M., and O'Shea, J.J. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances Foxp3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* *111*, 1013–1020.

Fagarasan, S., and Honjo, T. (2004). Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces.

Curr. Opin. Immunol. *16*, 277–283.

Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50–53.

Fujimoto, K., Karuppuchamy, T., Takemura, N., Shimohigoshi, M., Machida, T., Haseda, Y., Aoshi, T., Ishii, K.J., Akira, S., and Uematsu, S. (2011). A new subset of CD103⁺CD8a⁺ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J. Immunol.* *186*, 6287–6295

Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T. (2004). The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *135*, 205–215.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.

Gao, F., Wei, D., Bian, T., Xie, P., Zou, J., Mu, H., Zhang, B., and Zhou, X. (2012). Genistein attenuated allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet, GATA-3 and STAT-6 in a murine model of asthma. *Pharmacology* *89*, 229–236

Gautier, G., Humbert, M., Deauvieux, F., Sculler, M., Hiscott, J., Bates, E.E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005). A type I interferon

autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* *201*, 1435–1446.

Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *208*, 1127–1133.

Gorbach, S.L. (1990). Lactic acid bacteria and human health. *Ann. Med.* *22*, 37–41.

Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M.G., Laufer, T.M., Ignatowicz, L., and Ivanov, I.I. (2014). Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity in pres.*

Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., and Mercenier, A. (2005). Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 10321–10326.

Hao, W.L., and Lee, Y.K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol. Biol.* *268*, 491–502.

Hayashi, K., Nakano, T., Hashimoto, M., Kanekiyo, K., and Hayashi, T. (2008). Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *Int. Immunopharmacol.* *8*, 109–116.

Hazlewood, L.C., Wood, L.G., Hansbro, P.M., and Foster, P.S. (2011). Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J. Nutr. Biochem.* *22*, 95-100

Hemdan, N.Y., Birkenmeier, G., Wichmann, G., Abu El-Saad, A.M., Krieger, T., Conrad, K., and Sack, U. (2010). Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* *9*, 785–792.

Hidari, K.I., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., and Suzuki, T. (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 91–95.

Hisbergues, M., Magi, M., Rigaux, P., Steuve, J., Garcia, L., Goudercourt, D., Pot, B., Pestel, J., and Jacquet, A. (2007). *In vivo* and *in vitro* immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria. *Clin. Exp. Allergy* *37*, 1286–1295.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772–777.

Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food Microbiol.* *131*, 62–70.

Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* *327*, 167–170.

Hotta, C., Fujimaki, H., Yoshinari, M., Nakazawa, M., and Minami, M. (2006). The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* 117, 97–107.

Hu, Y., Cheng, S.C., Chan, K.T., Ke, Y., Xue, B., Sin, F.W., Zeng, C., and Xie, Y. (2010). Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 329–334.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485–498.

Jeon, S.G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N.M., Kiyono, H., Ma, J.S., Kusu, T., et al. (2012). Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 8, e1002714.

Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., and Weissman, D. (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 12542–12550.

Kalliomaki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., and Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 129–134.

Katakura, K., Lee, J., Rachmilewitz, D., Li, G., Eckmann, L., and Raz, E. (2005).

Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* *115*, 695–702.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.

Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* *21*, 317–337.

Kawase, M., He, F., Kubota, A., Harata, G., and Hiramatsu, M. (2010). Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. *Lett. Appl. Microbiol.* *51*, 6–10.

Kikuchi, Y., Kunitoh-Asari, A., Hayakawa, K., Imai, S., Kasuya, K., Abe, K., Adachi, Y., Fukudome, S., Takahashi, Y., and Hachimura, S. (2014). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain AYA enhances IgA secretion and provides survival protection against influenza virus infection in mice. *PLoS One* *9*, e86416.

Klemann, C., Raveney, B.J., Klemann, A.K., Ozawa, T., von Hörsten, S., Shudo, K., Oki, S., and Yamamura, T. (2009). Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* *174*, 2234–2245.

Kobayashi, N., Saito, T., Uematsu, T., Kishi, K., Toba, M., Kohda, N., and Suzuki, T. (2011). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice. *Int.*

Immunopharmacol. *11*, 199–203.

Koizumi, S., Wakita, D., Sato, T., Mitamura, R., Izumo, T., Shibata, H., Kiso, Y., Chamoto, K., Togashi, Y., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2008). Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1⁺ cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. *Immunol. Lett.* *120*, 14–19.

Kosaka, A., Yan, H., Ohashi, S., Gotoh, Y., Sato, A., Tsutsui, H., Kaisho, T., Toda, T., Tsuji, N.M. (2012). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC triggers IFN- γ production from NK and T cells *via* IL-12 and IL-18. *Int. Immunopharmacol.* *14*, 729–733.

Krahenbuhl, J.P., and Neutra, M.R. (2000). Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *16*, 301–332.

Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K.J., Takeuchi, O., et al. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* *203*, 1795–1803.

Lee, J-B., Hayashi, K., Hashimoto, M., Nakano, T., and Hayashi, T. (2004). Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem. Pharm. Bull.* *52*, 1091–1094.

Leonard, J.N., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J.K., Margulies, D.H., Davies, D.R., and Segal, D.M. (2008). The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 258–263.

Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., and Davies, D.R.

(2008). Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* *320*, 379–381.

Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of Th17 cells in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 1004–1011.

Lowin, B., and Peitsch, M.C., and Tschopp, J. (1995). Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *198*, 1–24.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., and Miyashita, K. (2007). Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 7701–7706.

Maeda, N., Nakamura, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Kase, T., and Yoshikai, Y. (2009). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 1122–1125.

Mailfait, S., Thoreau, E., Belaiche, D., and Formstecher And B Sablonniè, P. (2000). Critical role of the H6-H7 loop in the conformational adaptation of all-trans retinoic acid and synthetic retinoids within the ligand-binding site of RARalpha. *J. Mol. Endocrinol.* *24*, 353–364.

Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M., and Nakano, T. (2003). Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from sporophyll of

Undaria pinnatifida. In Vivo 17, 245–249.

Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M., and Nakano, T. (2005). Suppression of Th2 immune responses by mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. Int. Arch. Allergy Immunol. 137, 289–294.

Maruyama, H., Tamauchi, H., Iizuka, M., and Nakano, T. (2006). The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). Planta Med. 72, 1415–1417.

Maruyama, H., Tanaka, M., Hashimoto, M., Inoue, M., and Sasahara, T. (2007). The suppressive effect of Mekabu fucoidan on an attachment of *Cryptosporidium parvum* oocysts to the intestinal epithelial cells in neonatal mice. Life Sci. 80, 775–781.

Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4620–4625.

Masuda, S., Yamaguchi, H., Kurokawa, T., Shirakami, T., Tsuji, R.F., and Nishimura, I. (2008). Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. Int. J. Food Microbiol. 121, 245–252.

Matsumoto, M., Hosokawa, M., Matsukawa, N., Hagio, M., Shinoki, A., Nishimukai, M., Miyashita, K., Yajima, T., and Hara, H. (2010). Suppressive effects of the marine carotenoids, fucoxanthin and fucoxanthinol on triglyceride absorption in lymph

duct-cannulated rats. *Eur. J. Nutr.* *49*, 243–249.

Matsumoto, S., Nagaoka, M., Hara, T., Kimura-Takagi, I., Mistuyama, K., and Ueyama, S. (2004). Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *136*, 432–439.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. *Immunity* *40*, 248–261.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* *10*, 351–353.

Mestecky, J., and Russell, M.W. (2009). Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. *Immunol. Lett.* *124*, 57–62.

Mitsuoka T. (1974). Recent advances in the research on the intestinal flora with special references to the anaerobic flora. *Jpn. J. Bacteriol.* *29*, 773–788.

Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K., and Kurisaki, J. (2002). Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *66*, 1963–1966.

Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T., and Okumura, K. (2000). Effects of a fermented

milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *64*, 2706–2708.

Nakamura, Y., Nosaka, S., Suzuki, M., Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., Takenouchi-Ohkubo, N., Iwase, T., and Moro, I. (2004). Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin. Exp. Immunol.* *137*, 52–58.

Nie, X., Shi, B., Ding, Y., and Tao, W. (2006). Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. *Int. J. Biol. Macromol.* *39*, 228–233.

Nishimura, I., Igarashi, T., Enomoto, T., Dake, Y., Okuno, Y., and Obata, A. Clinical efficacy of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi for perennial allergic rhinitis. *Allergol. Int.* *58*, 179–185.

Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., and Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J. Appl. Microbiol.* *101*, 396–405.

Nonaka, Y., Izumo, T., Izumi, F., Maekawa, T., Shibata, H., Nakano, A., Kishi, A., Akatani, K., and Kiso, Y. (2008). Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *145*, 249–257.

Nova, E., Wörnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L.E., Romeo, J., and Marcos, A.

(2007). Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br. J. Nutr.* *98*, S90–95.

Obata, T., Goto, Y., Kunisawa, J., Sato, S., Sakamoto, M., Setoyama, H., Matsuki, T., Nonaka, K., Shibata, N., Gohda, M., et al. (2010). Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 7419–7424.

Obermeier, F., Dunger, N., Strauch, U.G., Hofmann, C., Bleich, A., Grunwald, N., Hedrich, H.J., Aschenbrenner, E., Schlegelberger, B., Rogler, G., et al. (2005). CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* *129*, 913–927.

Obuchi, M., Fernandez, M., and Barber, G.N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J. Virol.* *77*, 8843–8856.

O'Neill, L.A., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., and Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 1171–1185.

Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2008). Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol. Suppl. 1*, S10–14.

- Rigaux, P., Daniel, C., Hisbergues, M., Muraille, E., Hols, P., Pot, B., Pestel, J., Jacquet, A. (2009). Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* *64*, 406–414.
- Romagnani, S. (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 399–408.
- Romagnani, S. (2006). Regulation of the T cell response. *Clin. Exp. Allergy* *36*, 1357–1366.
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., and Mazmanian, S.K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* *332*, 974–977.
- Sangeetha, R.K., Bhaskar, N., Divakar, S., and Baskaran, V. (2010). Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol. Cell. Biochem.* *333*, 299–310.
- Schönborn, J., Oberstrass, J., Breyel, E., Tittgen, J., Schumacher, J., and Lukacs, N. (1991). Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acid Res.* *19*, 2993–3000.
- Schwarzer, M., Repa, A., Daniel, C., Schabussova, I., Hrcir, T., Pot, B., Stepankova, R., Hudcovic, T., Pollak, A., Tlaskalova-Hogenova, H., et al. (2011). Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy* *66*, 368–375.

Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K., and Nanno, M. (2006). Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J. Dairy Sci.* *89*, 3306–3317.

Shida, K., and Nanno, M. (2008). Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.* *29*, 565–573.

Shiratori, K., Ohgami, K., Ilieva, I., Jin, X.H., Koyama, Y., Miyashita, K., Yoshida, K., Kase, S., and Ohno, S. (2005). Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Eye Res.* *81*, 422–428.

Souwer, Y., Szegedi, K., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2010). IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 821–826.

Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., and Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 1981–1986.

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. (2006). The *Unc93b1* mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* *7*, 156–164.

Takeda, K., Suzuki, T., Shimada, S.I., Shida, K., Nanno, M., and Okumura, K. (2006). Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell

activity by *Lactobacillus casei* Shirota. Clin. Exp. Immunol. *146*, 109–115.

Tanaka, T., Shnimizu, M., and Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. Molecules *17*, 3202–3242.

Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Fan, C.K., and Pan, T.M. (2008). Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. Int. J. Food Microbiol. *128*, 219–225.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kinoshita, K., and Fagarasan, S. (2008). Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. Semin Immunol. *20*, 59–66.

Tsuji, R.F., Hoshino, K., Noro, Y., Tsuji, N.M., Kurokawa, T., Masuda, T., Akira, S., and Nowak, B. (2003). Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: Toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. Clin. Exp. Allergy *33*, 249–258.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. Nat. Immunol. *9*, 769–776.

Urikura, I., Sugawara, T., and Hirata, T. (2011). Protective effect of fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. *75*, 757–760.

Vanhoutte, F., Paget, C., Breuilh, L., Fontaine, J., Vendeville, C., Goriely, S., Ryffel, B., Faveeuw, C., and Trottein, F. (2008). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR3 synergy and cross-inhibition in murine myeloid dendritic cells. *Immunol. Lett.* *116*, 86–94.

Vetvicka, V., Vetvickova, J., Frank, J., and Yvin, J.C. (2008). Enhancing effects of new biological response modifier beta-1,3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. *Biomed. Pharmacother.* *62*, 283–288.

Vijay-Kumar, M., Wu, H., Aitken, J., Kolachala, V.L., Neish, A.S., Sitaraman, S.V., and Gewirtz, A.T. (2007). Activation of Toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 856–864.

Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y., and Kumemura, M. (2003). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J. Allergy. Clin. Immunol.* *111*, 587–591.

Weiss, D.S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A. (2004). Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* *172*, 4463–4469.

Williams, N.T. (2010). Probiotics. *Am. J. Health Syst. Pharm.* *67*, 449–458.

Wu, H.J., Ivanov, I.I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D.R., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* *32*, 815–827.

Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B., and Kuchroo, V.K. (2008).

Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.* *181*, 2277–2284.

Yang, C., Chung, D., Shin, I.S., Lee, H., Kim, J., Lee, Y., and You, S. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int. J. Biol. Macromol.* *43*, 433–437.

Yasui, H., Kiyoshima, J., and Hori, T. (2004). Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *11*, 675–679.

Yokota-Nakatsuma, A., Takeuchi, H., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.Y., Hoshino, T., Yagita, H., Ohteki, T., and Iwata, M. (2013). Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. *Mucosal Immunol.* *in press*.

Zepp, J., Wu, L., and Li, X. (2011). IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends Immunol.* *32*, 232–239.

Zhang, Z., Till, S., Jiang, C., Knappe, S., Reutterer, S., Scheiflinger, F., Szabo, C.M., and Dockal, M. (2014). Structure-activity relationship of the pro- and anticoagulant effects of *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Thromb. Haemost.* *111*, 429–437.

Zhou, R., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2007). Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice. *J. Immunol.* *178*, 4548–4556.

原著論文

- 1) Kawashima, T. (2011). A marine carotenoid, fucoxanthin, induces regulatory T cells and inhibits Th17 cell differentiation *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *75*, 2066–2069.
- 2) Kawashima, T., Hayashi, K., Kosaka, A., Kawashima, M., Igarashi, T., Tsutsui, H., Tsuji, N.M., Nishimura, I., Hayashi, T., and Obata, A. (2011). *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. *Int. Immunopharmacol.* *11*, 2017–2024.
- 3) Kawashima, T., Murakami, K., Nishimura, I., Nakano, T., and Obata, A. (2012). A sulfated polysaccharide, fucoidan, enhances the immunomodulatory effects of lactic acid bacteria. *Int. J. Mol. Med.* *29*, 447–453.
- 4) Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D.J., Carreras, J., Uematsu, S., Jang, M.H., Takeuchi, O., Kaisho, T., Akira, S., Miyake, K., Tsutsui, H., Saito, T., Nishimura, I., and Tsuji, N.M. (2013). Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity* *38*, 1187–1197.

海藻・乳酸菌由来成分の抗炎症・生体防御作用に関する研究

要旨

近年アレルギー疾患を初めとする免疫機能恒常性の破綻に起因する疾病の患者数が増加している。これらの疾病は発症前から薬で予防することは難しい。むしろ、免疫機能を正常に保つ機能を有する食品を日常的に摂取することで、そのような疾患に罹患するリスクを低減することが可能となる。本研究では乳酸菌と海藻由来成分に着目し、それらが免疫機能を改善し、これらの疾患の症状軽減に寄与することを明らかにした。

まず海藻に含まれる非プロビタミン A のカロテノイドであるフコキサンチンが T 細胞の分化に及ぼす影響を評価した。フコキサンチン存在下で Naïve T 細胞の分化を調べたところ、制御性 T 細胞 (Treg 細胞) を誘導する一方で、炎症性サイトカインである Interleukin-17 (IL-17) 産生性の Th17 細胞の分化を抑制した。また、フコキサンチンは摂取後に腸内細菌によりフコキサンチノールへと代謝されるが、フコキサンチノールについても Treg 細胞の分化誘導と Th17 細胞の分化抑制が観察された。ビタミン A 誘導体のレチノイン酸は生体において Treg 細胞を誘導することが知られているが、非プロビタミン A カロテノイドであるフコキサンチンも同様の効果を有することが明らかとなった。このことから、フコキサンチンを摂取することで Th17 細胞が原因となる自己免疫疾患やアトピー性皮膚炎等の炎症性疾患の予防に役立つ可能性が示された。

次に海藻に含まれる多糖であるフコイダンの効果について調べた。本研究では免疫調節作用を有する乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 (以下、KK221) とフコイダンを併用したときの効果について検証した。まず、マウス腹腔浸出マクロファージやマウスパイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓由来の細胞を用いた試験においては、フコイダン単独では IL-12 や IFN- γ などのサイトカイン産生が微弱であるのに対し、KK221 存在下でフコイダンを添加すると、フコイダンの濃度依存的にサイトカイン産生誘導が増強することが確認された。マクロファージを用いた試験において、フコイダンを添加したときに KK221 を貪食する細胞の割合が増加したことから、フコイダンの貪食促進

作用が関与することが示唆された。また、フコイダンを脱硫酸化するとこの作用が消失する一方で、酸加水分解により低分子化したフコイダンでは、活性の消失は確認されなかった。このことから、フコイダンの分子量ではなく硫酸基がこの作用に必須であることが示された。

実際にマウスに経口投与を行い、抗原特異的応答を調べたところ、乳酸菌とフコイダンを同時に摂取したときに最も Th1 免疫が増強し、Th2 免疫が抑制された。以上より、フコイダンを乳酸菌と同時に摂取することで、乳酸菌の免疫調節作用が増強されることが示された。

近年、プロバイオティクス乳酸菌の免疫機能改善効果が注目されているが、日本人が古くから摂取している漬物や発酵食品の中から有用なプロバイオティクス乳酸菌を分離することを試みた。アレルギーの抑制には Th1 細胞の誘導、もしくは Th2 細胞の抑制が関与することが知られているが、本研究では Th1 細胞の分化誘導に関わる IL-12 に着目した。そしてマウス腹腔浸出マクロファージを用いた試験により、最も IL-12 産生を誘導する乳酸菌として *Lactobacillus plantarum* YU (LpYU) を選抜した。そして、LpYU 摂取が抗原特異的応答に与える影響を調べたところ、Th1 免疫を増強し、抗原特異的 IgE の上昇を抑制することが確認された。

また、LpYU は IL-12 を強く誘導するだけでなく、パイエル板からの IgA 産生増強と脾臓における Natural killer (NK) 細胞の活性化も促した。IgA 産生増強や NK 細胞の活性化が確認されたことからウイルス感染に対する抵抗性が増強することが期待されるため、インフルエンザ感染実験を行った。すると、LpYU を摂取したマウスにおいては肺洗浄液や糞便中のインフルエンザ特異的 IgA の産生が増強し、肺や肺洗浄液のインフルエンザウイルス量が減少することが判明した。以上より、漬物や発酵食品の中にインフルエンザ感染やアレルギーに対し効果のある乳酸菌が存在することが明らかとなった。

最後に乳酸菌の免疫恒常性維持のメカニズムについて検証した。小腸には多くの常在菌や病原菌、経口摂取された細菌が存在する。我々は腸内常在菌の中でも小腸において主要なフローラを形成する乳酸菌が腸管の免疫恒常性に与える影響を評価した。

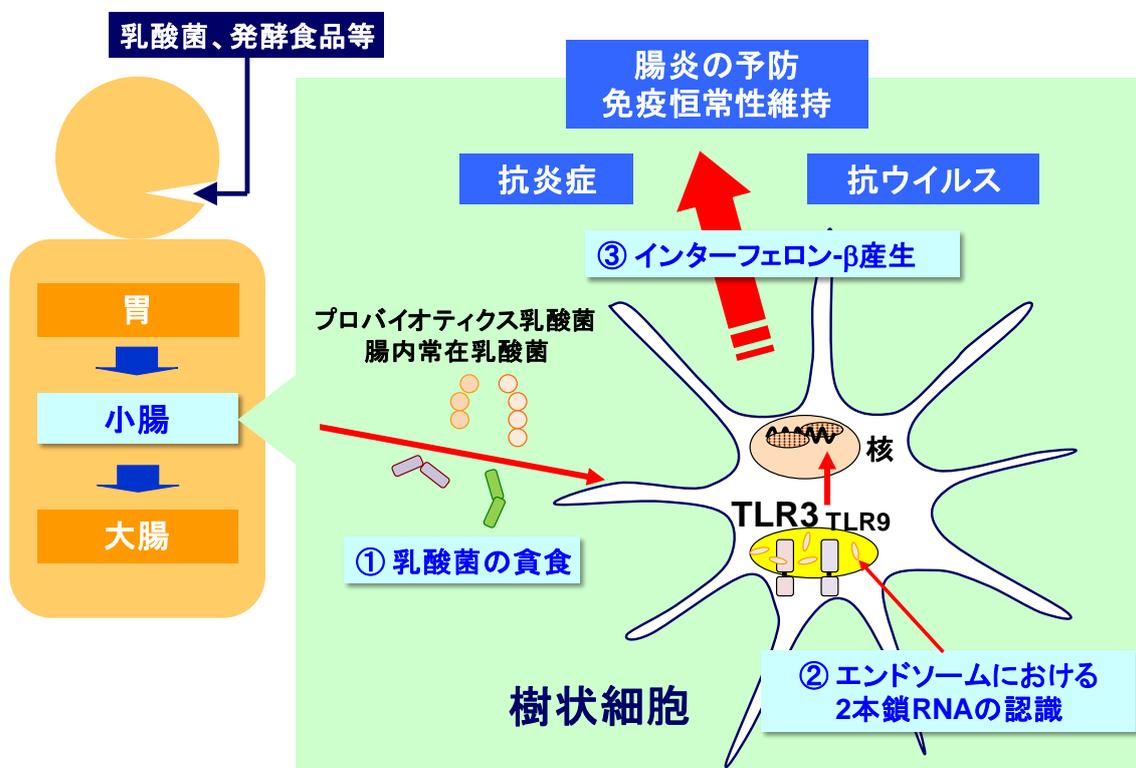
まず、マウス骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs) を用いた評価により、乳酸菌の認識に 2 本鎖 RNA を認識する Toll-like receptor 3 (TLR3) が関与しており、さらにその刺激により Interferon- β (IFN- β) が誘導されることを示した。複数の乳酸菌株で IFN- β 産生誘導に対する TLR3 依存性が確認されたが、一方で *Listeria monocytogenes*、*Salmonella Typhimurium* 等の病原菌では TLR3 依存性は確認されなかった。乳酸菌と病原菌で菌体内の 2 本鎖 RNA 量を比較したところ、乳酸菌により多くの 2 本鎖 RNA が見出された。また、BMDCs を用いた試験においては、TLR3 以外にも DNA を認識する TLR9 が乳酸菌による IFN- β 産生誘導に関与することが示された。

乳酸菌により誘導される IFN- β の効果を評価するため、Dextran sodium sulfate (DSS) 誘導潰瘍性大腸炎に対する KK221 摂取の影響を調べた。すると、KK221 摂取により腸炎の症状が軽減するのに対し、抗 IFN- β 中和抗体を静脈より投与すると KK221 の効果が減弱することが明らかとなった。このことから KK221 摂取により誘導される IFN- β が腸炎の抑制に関わることが示された。さらに、TLR3 遺伝子欠損マウスを用いて DSS 誘導潰瘍性大腸炎に対する KK221 摂取の効果を調べたところ、腸炎は抑制されなかった。TLR9 遺伝子欠損マウスでは大腸の長さの縮小抑制など一部の項目で KK221 摂取の効果がみられたが、細胞内エンドソームに局在する TLR (TLR3、TLR7、TLR9) の機能を欠損した *Unc93b1^{3d}* マウスでは KK221 の抗炎症効果は消失していた。また、RNA を分解した KK221 を投与したときも抗炎症作用は確認されなかった。

BMDCs を用いた細胞試験では KK221 の刺激に対して TLR3 と TLR9 を介した協調的な IFN- β 産生誘導が観察されたが、DSS 潰瘍性大腸炎モデルにおいては宿主の TLR3、及び乳酸菌体の 2 本鎖 RNA が KK221 の抗炎症作用に必須であることが明らかとなった。このように、乳酸菌は病原菌と異なり、TLR3 を介して IFN- β を誘導することで腸管の免疫恒常性を維持していることが示された。

以上のように、免疫機能を改善する海藻由来成分として免疫応答を抑制するフコキサンチン、乳酸菌の免疫調節作用を増強するフコイタンを見出した。また、日本で古くか

ら食されている発酵食品から分離した乳酸菌が強い抗アレルギー作用、感染防御作用を有することを示した。さらに常在乳酸菌を含めた乳酸菌による IFN- β 産生誘導が抗炎症・免疫恒常性維持に寄与しており、その関与成分が菌体内の 2 本鎖 RNA であることを明らかにした。それぞれの食品成分が特徴的な作用を有していることから、目的に合わせて日常の食生活に組み込むことでアレルギー性疾患や感染症、炎症性疾患を予防することができると思われる。



謝辞

本博士論文を作製するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学農学生命科学研究科教授 佐藤隆一郎先生、准教授 三坂巧先生、准教授 戸塚護先生、准教授 八村敏志先生、准教授 井上順先生に深く感謝いたします。

私が免疫学の研究を始めた当初から多くの指導をしていただいた産業技術総合研究所 辻典子先生に深く感謝いたします。

様々な遺伝子欠損マウスの供与や病原菌の調製を快諾いただいた兵庫医科大学 筒井ひろ子先生、内山良介先生、実験に伺った際に快く受け入れていただき、実験指導やディスカッションをしていただいた大阪大学 審良静雄先生、竹内理先生（現・京都大学）、熊谷雄太郎先生、張明浩先生、植松智先生（現・東京大学医科学研究所）、劉東周博士、理化学研究所 斉藤隆先生、改正恒康先生（現・大阪大学）、郭子進博士、3d マウスの供与と実験の受け入れを快くしていただいた東京大学医科学研究所 三宅健介先生、福井竜太郎先生に深く感謝申し上げます。また、インフルエンザ感染実験を実施していただいた富山大学 林利光先生、林京子先生（現・中部大学）に厚く御礼申し上げます。

産総研においては小坂朱博士、Huimin Yan 博士に多大な協力をいただきました。また、フコイダンの調製に関しましては理研ビタミン株式会社 仲野隆久博士、村上桂氏に大変お世話になりました。現東海大学講師 Joaquim Carreras 博士には多くの組織切片の解析をやっていただきました。皆様に深く感謝申し上げます。

食品免疫学に関する研究を9年間続けてきましたが、その間研究の推進にご配慮、ご協力いただきましたキッコーマン株式会社 松山旭博士、小山泰二博士、小幡明雄博士、梶山直樹博士に深く感謝申し上げます。また、研究を開始した当初から共に実験を行い、多くのご助言をいただいたキッコーマン株式会社 西村郁子博士（現・野田産業科学研究所）、五十嵐俊教氏（現・キッコーマン食品株式会社）、金子大輔氏（現・キッコーマン食品株式会社）に御礼申し上げます。

大学在学時にご指導いただいた東京大学農学生命科学研究科教授 大杉立先生、当時

准教授の山岸徹先生、当時助手の故・佐々木治人先生に深く感謝いたします。

最後に、研究に対し深い理解を示してくれた家族に感謝いたします。