

# 博 士 論 文

## 樹状細胞を活性化する食品由来の素材探索と 用途開発に関する研究

辻 亮平

目次

略語一覧	4
第1章<諸言>	6
第2章<植物由来免疫賦活物質の探索と作用メカニズム解明>	15
第1節 序論	15
第2節 材料と実験手法	18
第3節 結果	27
1. 大麦搗精粕からのリグニン画分の分画と BM-DC 活性化	27
2. 各種植物由来 LREL の BM-DC 活性化	30
3. リグニン画分の化学的特徴と BM-DC 活性化との関係	32
4. LREL の BM-DC 活性化作用メカニズム解明	37
第4節 考察	44
第5節 小括	47
第3章<LREL の <i>in vivo</i> での作用と応用開発>	48
第1節 序論	48
第2節 材料と実験手法	49
第3節 結果	56
1. LREL を腹腔内に単回投与した時の全身性免疫系に対する作用	56
2. 酸処理と LREL の樹状細胞活性化作用との関係	61
3. LREL を経口で単回投与した時の腸管免疫系に対する作用	63
4. LREL を経口で継続的に投与した時の腸管免疫系に対する作用	63
5. LREL の経口ワクチンアジュバントとしての作用検討	66
第4節 考察	68
第5節 小括	70
第4章< <i>Lactococcus lactis</i> strain Plasma の抗老化機能の検証>	71
第1節 序論	71

第2節 材料と実験手法.....	77
第3節 結果 .....	82
1. SAMP1 系統における免疫老化に対する作用検討.....	82
2. SAMP10 系統における長期投与した時の免疫老化に対する作用検討.....	84
3. SAMP10 系統における個体の老化形質に対する作用検討 .....	86
第4節 考察 .....	91
第5節 小括 .....	93
第5章 <総括> .....	94
参照論文.....	101
発表論文・総説 .....	118
謝辞 .....	119

## 略語一覧

Abbreviation	English name	和名
AP-1	Activator protein-1	アクチベータータンパク質 1
BM-DC	bone marrow derived dendritic cell	骨髄細胞由来樹状細胞
CD	cluster of differentiation	表面抗原分類
cDC	classic dendritic cell	古典的樹状細胞
HRML	hemicellulose rich milled lignin	(リグニン画分名)
IFN	interferon	インターフェロン
IL-12	interleukin 12	インターロイキン 12
IRF	interferon regulatory factor	インターフェロン制御因子
ISG	interferon stimulated gene	インターフェロン応答遺伝子
LC-Plasma	<i>Lactococcus lactis</i> strain Plasma	プラズマ乳酸菌
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
LREL	lignin rich enzyme lignin	(リグニン画分名)
LTA	lipoteichoic acid	リポテイコ酸
mDC	myeloid dendritic cell	ミエロイド樹状細胞
MFI	median fluorescent intensity	中央値蛍光強度
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MLN	mesenteric lymph node	腸間膜リンパ節
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	(遺伝子名)
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B	(遺伝子名)
NK cell	natural killer cell	ナチュラルキラー細胞
PAMPs	pathogen associated molecular patterns	病原体関連分子パターン
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
pDC	plasmacytoid dendritic cell	形質細胞様樹状細胞
PEL	pure enzyme lignin	(リグニン画分名)
PML	pure milled lignin	(リグニン画分名)
PP	peyer's patches	パイエル板
PRR	pattern recognition receptor	パターン認識受容体
SAM	Senescence-accelerated mouse	老化促進マウス

SPN	spleen	SPN
TLR	toll-like receptor	トール様受容体
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$	(遺伝子名)

## 第1章<諸言>

免疫系は、微生物、ウイルスなどの外来抗原から生体を守るために、自己と非自己を識別し、外来抗原を速やかに分解して、体外へ排除するするために発達したシステムである。哺乳動物では免疫反応を大きく分けて自然免疫と獲得免疫とに大別される。獲得免疫は遺伝子再構成という方法で、一度体内に侵入してきた抗原に対して、B細胞やT細胞上に無数の個々に異なる抗原特異性を持つ受容体を作製し、あらゆる外来抗原に対処するために、短時間で抗原特異的な反応をすることができる。一方で、自然免疫は主にマクロファージや樹状細胞、NK細胞、好中球などによって担われ、初めて体内に侵入した抗原に対しても反応が生じて、外来抗原を処理する。

免疫系が正常に働いていると、外来抗原である微生物を効率的に体外に排出することができ、風邪などの疾病にかかることなく、健康な生活を送ることができる。しかしながら、ひとたび免疫系が崩壊し、弱ってしまうと、微生物を体外に排出することができず、感染症に罹患することになる。このような感染症と人類は長きに渡って闘ってきた。罹患した感染症に対しては、抗生物質の開発により、多くの恩恵を受けることとなった。古くは1928年にFleming博士によって発見されたペニシリンに始まり(1)、病原性微生物に効果のある抗生物質が多く開発され、1970~80年代をピークに多くの抗菌薬が開発されてきた。しかしながら、抗菌薬が世の中に普及し始めた1940年代から抗生物質の過剰な使用によって、薬剤耐性菌が次々と見つかるようになり、その後急速に拡大した(2)。例えば、*Staphylococcus aureus*は上皮組織を始めとした柔らかい組織に感染する微生物であり、皮膚や腸など多くの部位で感染するが(3)、近年メチシリンに耐性のある株(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)が出現し、病院内感染などで多くの人命を奪っている(4)。さらに、*Clostridium difficile*は主に腸に感染する微生物であるが、やはり多剤耐性菌が出現し、薬剤が効かないことによって、治療もままならず死亡する患者もいる(5)。近年のグローバル化社会において、ヒトの移動も含めた物流が進化しているが、デング熱(6)、ジカ熱(7)、エボラ出血熱(8)と言った、新興感染症も世界中で拡がりを見せている。これらのような薬剤耐性菌や新規で遭遇するような新興感染症については、薬剤はもちろんのこと、ワクチンも存在しない。そのため、これらの病原性微生物に対しては、抗原非特異的な反応をする、自然免疫系からのアプローチが有効であると考えられる。

樹状細胞は1973年にSteinman博士らによって発見された自然免疫系に属する細胞で、樹状突起を持っていることが特徴の細胞である(9)。外界と隣接している皮下組織や消化管や気道などの粘膜下組織やリンパ組織だけでなく、我々の体のあらゆるところに存在し(10)、

外来から侵入してくる細菌や真菌、ウイルスなどの異物に対して速やかに反応し、貪食することができる。外来異物などを取り込んだ樹状細胞はリンパ管を通り、所属リンパ節へと移動していく。この過程で樹状細胞は活性化され、CD40 や CD80、CD86 などの補助シグナル分子や抗原を提示するための主要組織適応複合体(Major Histocompatibility Complex; MHC) class II などの分子の発現量が上昇すると共に炎症性サイトカインやケモカインも産生される。所属リンパ節において、樹状細胞は naive T 細胞へと抗原を提示し、抗原特異的な獲得免疫系の反応を惹起する(11)。すなわち、樹状細胞は自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しの役割も担う非常に重要な細胞であることがわかっている(12)。

樹状細胞は、その機能的な特性により分類されるさまざまなサブセットから構成されているが(13-15)、主に CD11b および CD11c が発現しているミエロイド樹状細胞(myeloid dendritic cell; mDC)と CD8 $\alpha$ および CD11c が発現している CD8+ DC が所属する古典的樹状細胞(classic dendritic cell; cDC)と形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell; pDC)にわかれている。pDC は発見当初は形質細胞様単球と呼ばれていたが、ヒト末梢血において、ウイルス感染時に大量の I 型インターフェロンを産生すること(16,17)、ウイルス感染によって活性化した後に抗原提示能の上昇を示すとともに、樹状細胞に特徴的な樹状突起を伸ばした形状と変化することから、樹状細胞に分類された(18)。

自然免疫系は外部抗原に対する特別な認識機構がないと考えられてきたが、1996 年に Hoffmann 博士らがショウジョウバエにおいて真菌感染に反応する *toll* 遺伝子を発見し(19)、ヒトでも同様に *toll* 遺伝子のオーソログである *toll-like receptor* (TLR)が存在することが発見されたことにより(20)、哺乳動物などの高等動物でも自然免疫系の免疫細胞が微生物の認識には微生物抗原の特定のパターン(Pathogen Associated Molecular Patterns; PAMPs)を認識していることが明らかとなった。その後の研究により、TLR 以外にも PAMPs を認識するパターン認識受容体(Pattern Recognition Receptor; PRR)が存在することがわかった。細胞膜に存在する受容体として C-type lectin receptor (CLR)がある。また、細胞質に存在する受容体としては、NOD-like receptor (NLR)、Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I like receptor (RLR)などがあり、それぞれ TLR 同様に微生物抗原の特定のパターンを認識していることが明らかとなっている(21)。

TLR にはマウスでは 12 種、ヒトでは 10 種あることが示されており、受容体の存在している細胞内の場所やそのリガンドが同定された(22,23)。マウスとヒトでは TLR1~9 は共通して保有している受容体であることが確認されている。TLR1, 2, 4-6 は細胞表面に存在し、グラム陽性細菌の細胞膜成分であるリポテイコ酸(lipoteichoic acid; LTA)、グラム陰性細菌

の細胞膜成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)や鞭毛の成分であるフラジェリンを認識する(Table 1-1) (21,24)。TLR3, 7-9 は NLR や RLR などと同様にエンドソームなどの細胞質内のオルガネラに存在し、一本鎖 RNA、二本鎖 RNA、非メチル化 CpG など細菌やウイルス由来の核酸を認識する(Table 1-1) (21)。TLR は自然免疫に関わる免疫細胞のみならず、上皮細胞など多くの組織においても発現しており、それぞれ特徴的なプロファイルで発現している(25)。樹状細胞もサブセットによって TLR の発現パターンと発現量が異なっており、ヒトの樹状細胞において、mDC では TLR9 を除くすべての TLR が発現しており、主として細菌由来の成分に反応して、抗細菌反応を示すことが知られている。一方で、pDC では TLR7 と TLR9 しか発現しておらず、ウイルス由来核酸を認識することが特徴となっており、抗ウイルス反応を示すことが知られている(Figure.1-1)(26)。

TLR は I 型膜貫通タンパク質で、細胞外には PAMPs との相互作用を示すロイシンリッチリピートを、細胞内には TIR (TLR/IL-1R)ドメインを持っている(24,27)。TLR の細胞外領域にリガンドが結合すると、ホモ二量体、または他の TLR とのヘテロ二量体を形成し、TIR ドメインを介して下流へとシグナルが伝わる(24)。細胞内では TIR ドメインを持った MyD88 や TRIF、TIRAP や TRAM といった細胞内アダプター分子が選択的に TLR と相互作用する(24,27)。TLR1, 2, 5-9 は細胞内アダプター分子として MyD88 を用い、TLR3 は TRIF を用いる。そして、TLR4 は TLR の中で唯一、MyD88 と TRIF の両方を用いる(Figure. 1-2)(Table 1-1) (21,22,24,27)。

細胞膜にある TLR より MyD88 にシグナルが伝わると、IKK $\alpha$ 複合体が活性化し、転写因子である NF- $\kappa$ B が活性化し核内移行する。さらに MAPK シグナルも活性化され、Activator Protein-1 (AP-1)も活性化して核内移行する。これらの転写因子の作用により、炎症性サイトカインやケモカインの産生が促進される(28)。TRIF にシグナルが伝わったとき、あるいは細胞質内にある TLR より MyD88 にシグナルが伝わったときには、NF- $\kappa$ B も活性化するが、IKK $\beta$  複合体の活性化を介した IRF-3 や IRF-7 などの IRF ファミリーのリン酸化の方がより促進され、IRF ファミリーの核内移行による I 型インターフェロン(IFN) 遺伝子の転写が促進される(Figure. 1-2) (28)。このように TLR を介して PAMPs が認識されると、そのシグナルが細胞内に伝達され、炎症性サイトカインや type I IFN などの産生が促され、体内に侵入してきた病原体を排除するような生理反応が起こる。

ワクチンは感染症の予防に用いる医薬品であり、体内に罹患の可能性のある病原体に対する抗体産生を促し、感染症に対する抵抗性を獲得させるものである。一般的に不活化または弱毒化した病原体や病原体由来の抗原タンパク質とアジュバントと呼ばれる自然免疫

系を活性化するものを組み合わせて使用し、特定の病原体に対する抗原特異的な獲得免疫系を成立させる効果があることが知られている。ワクチンに使用される病原体や抗原タンパク質は樹状細胞によって取り込まれ、naïve T 細胞に抗原提示がされることによって、獲得免疫系が成立することが抗原特異的な反応を示すことができる。すなわち、ワクチンとしての効果には、樹状細胞が非常に重要な役割を果たしている。

現在、主に商業的に使用されているワクチンは注射で皮下または筋肉内に投与する全身性ワクチンであるが、安全性、効果、利便性の観点で改善が望まれている。特にほとんどの感染症は病原体の侵入経路が気道や腸管などの粘膜を経由していることから、近年では粘膜ワクチンが注目を集めている。粘膜ワクチンは、経口、経鼻、経膣、経肛門、舌下からの接種が研究されている(29)。粘膜ワクチンのメリットは主に2つある。1つ目は実際の病原体の侵入経路に投与することで、粘膜防御を行うIgAが誘導され、体内への侵入の前に病原体の排除が期待できることである。これにより、より効果の高いワクチンとなることが期待されている(30)。2つ目は針を用いないことである。ワクチン接種時に患者が痛みを伴わないことはもちろんのこと、ワクチンの接種に特別な医療訓練の必要がなくなり、法令が遵守しやすくなり、利便性が向上する。また、特に開発途上国においては、注射筒や注射針の十分な量の確保が困難であるが故の注射針の使いまわしなどに起因する、血液を媒介とする感染症の蔓延リスクを低減でき、安全性が向上すると考えられる(31,32)。粘膜ワクチンは体内に直接注入するものではないため、ワクチンに含まれる物質の規制が通常のワクチンよりも厳格にしなくても安全性が高いことが示唆されている(33,34)。粘膜ワクチンの中でも、経口ワクチンは、腸の環境は投与された抗原が消化酵素などによって分解されやすいことと、抗原に対して不必要な免疫反応を示さないような免疫寛容の仕組みが備わっていることから、最も難しいワクチンであるとされている。そのため、ワクチンの働きを補助するアジュバントが非常に重要な役割を示す(35)。ワクチンのアジュバントの作用は、主として、①ワクチン抗原を組織に長く留めさせて、少しずつ放出させる作用、②抗原を粒子などに吸着させることで樹状細胞などの抗原提示細胞の食作用を容易にする作用、③自然免疫系を活性化させる作用の3つに分類される。TLRのリガンドは抗原提示細胞に対して非常に強い活性化作用を持っていることから、自然免疫系を活性化させる作用のワクチンアジュバントとして適しているものと考えられており、いくつかのTLRリガンドは、臨床試験などにおいて、ワクチンのアジュバントとしての効果を示している(Table 1-2)(35-37)。例えば、TLR4アゴニストであるMonophosphoryl Lipid A (MPL)はアジュバント効果を得ながら、LPSとは異なり、毒性が低いことが確認されており、全身性ワクチ

ンの HPV ワクチンにおいて、Alum と混合することでアジュバントとして用いることが承認されている(38)。

免疫力は加齢に伴って衰えることが知られており、その現象は免疫老化と呼ばれる(39)。免疫老化によって、高齢者は急性の感染症やガンに罹患しやすくなる(40,41)。免疫老化は自然免疫系も獲得免疫系も起こることが知られている。獲得免疫系の細胞である T 細胞は加齢に伴い、胸腺からの naïve T 細胞の産生が減少し、全 T 細胞の中での naïve T 細胞の比率が減少する(42,43)。さらに末梢の T 細胞において、一度感染したことがある抗原に対して抗原特異的な反応をする clonal expansion が減弱することが知られており(44)、ワクチンの効果も低くなる。また、加齢とともに老化した T 細胞が増えることも知られている (Figure. 1-4)(45)。同じく獲得免疫系の細胞である B 細胞も前駆細胞が減少することにより、細胞数が減少することに加え(46)、B 細胞のクラススイッチも起こりにくくなり、特定の抗原に対する抗体量が減るという報告がある(47,48)。ほとんどの免疫細胞が加齢に伴って機能低下するが、獲得免疫系の機能低下、特に T 細胞の機能低下が感染症などの罹患率を高めていると報告されている(49-51)。さらに、獲得免疫系の細胞に加えて、自然免疫系の細胞である樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞も加齢に伴って、機能低下することが知られている(52)。樹状細胞の 1 つのサブセットである pDC は加齢によって、血液中の数や herpes simplex virus に対する IFN- $\alpha$  産生能が減少することが認められている(53)。そして、pDC の機能が加齢によって低下すると、T 細胞の機能も低下することが知られている(54)。それゆえに、pDC は抗ウイルス免疫のみならず、免疫老化に対しても非常に重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、pDC の活性を維持することができれば、免疫老化を制御することが可能となる可能性がある。

本論文では TLR を介して、樹状細胞を活性化する素材の探索およびその応用方法に関する研究を行った。第 2、3 章では大麦搗精粕を酵素処理したあとに得られた画分より TLR4 を介して mDC を活性化させる素材を発見し、その分子特徴を明らかにすると共に、経口ワクチンのアジュバントとしての使用の可能性について検証した。第 4 章では TLR9 を介して pDC を活性化する乳酸菌としてスクリーニングされた LC-Plasma の新規機能としての抗老化効果の検証を行った。

Table 1-1. Toll-like receptors とリガンドおよびアダプター分子

	Localization	Ligand	Adaptor molecule
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	MyD88
TLR2	Plasma membrane	Lipoteichoic acid, peptideglycan	MyD88
TLR3	Endolysosome	Double strand RNA	TRIF
TLR4	Plasma membrane	Lipopolysaccharide	MyD88/ TRIF
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	MyD88
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	MyD88
TLR7	Endolysosome	Single strand RNA	MyD88
TLR8	Endolysosome	Single strand RNA	MyD88
TLR9	Endolysosome	Unmethylated CpG DNA	MyD88

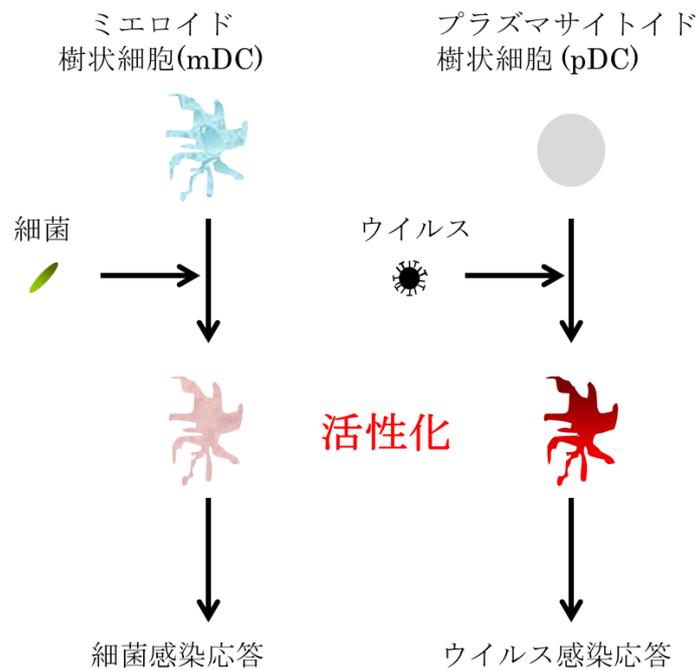


Figure.1-1 樹状細胞のサブセットと反応する病原体との関係

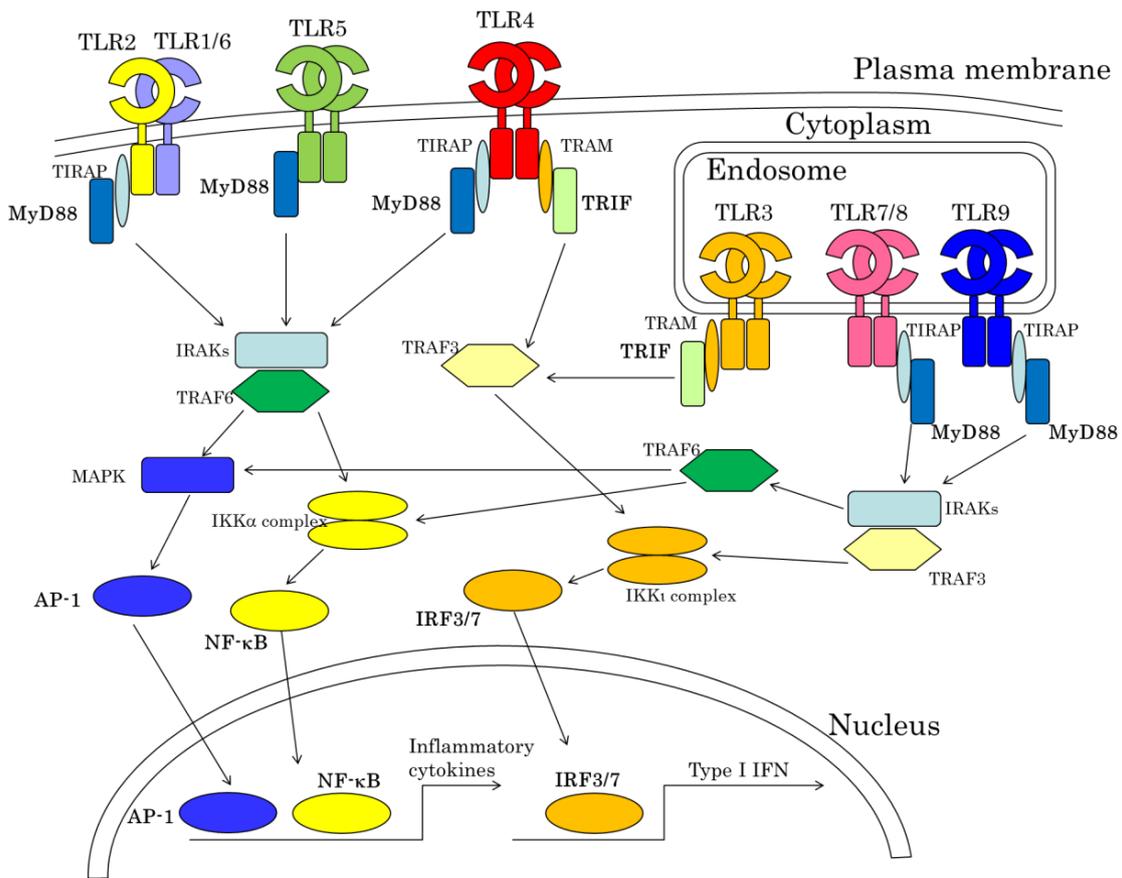
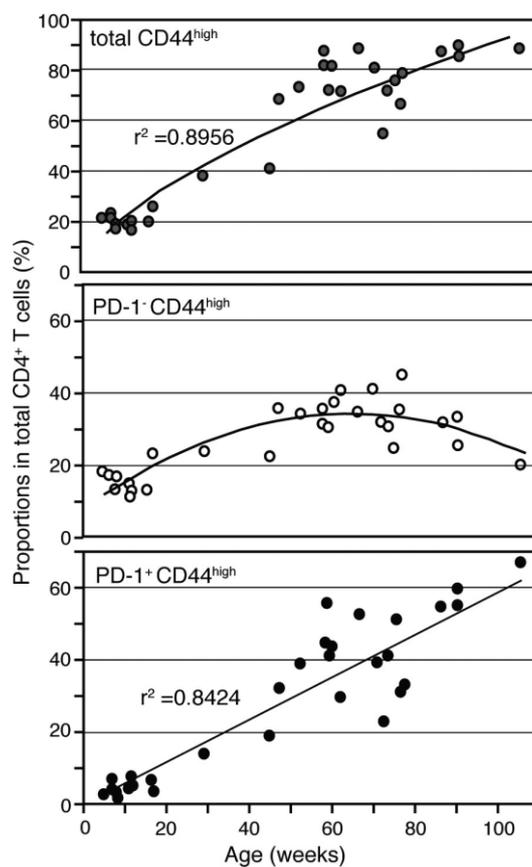


Figure. 1-2 TLR シグナル経路模式図

**Table 1-2. ワクチンアジュバントとして開発される TLR リガンド一覧  
(Gutjahr 博士の論文より引用) (37)**

<i>Licensed or Candidates of Product name</i>	<b>Components</b>	<b>Target Receptor</b>	<b>Vaccine name or Clinical Phase</b>
RC529	RC529	TLR4	SuperVax
AS04	MPL	TLR4	Fendrix etc
AS01	MPL	TLR4	Mosquirix
AS02	MPL	TLR4	Phase III
AS15	MPL and CpG	TLR4 and TLR9	Phase II
CpG	CpG oligonucleotides	TLR9	Phase III
Flagellin	Flagellin	TLR5	Phase II
GLA-SE, MPL-SE	GLA/MPL	TLR4	Phase II
IC31	Oligonucleotide	TLR9	Phase II
Imiquimod, Resiquimod	Imidazoquinolines	TLR7, TLR8	Phase III
Poly(I:C), poly(IC:LC)	dsRNA analogs	TLR3	Phase III



**Figure. 1-3** 加齢と老化 T 細胞の比率の関係

加齢とともに PD-1+ T 細胞が増加しており、老化 T 細胞が増えている(島谷博士の論文(45)より引用)。

## 第2章<植物由来免疫賦活物質の探索と作用メカニズム解明>

本章では植物組織由来の免疫賦活物質である、リグニン・多糖結合体の発見とその活性メカニズムについて述べる。

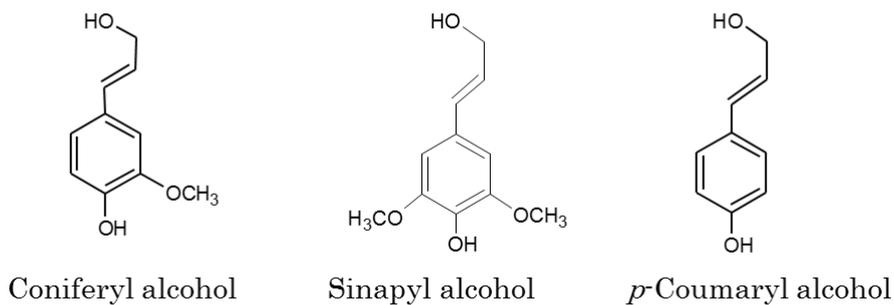
### 第1節 序論

リグニンはセルロースやヘミセルロースなどの多糖類と共に、ほとんどの植物で認められる植物の植物体細胞壁を構成する主要成分である(55)。リグニンはモノリグノールと呼ばれる芳香族化合物が酵素によってランダムに酸化重合を起こして生じる三次元的に連なった構造を持った天然物である(56)。モノリグノールは、基本骨格がフェニルプロパン単位である *p*-ヒドロキシケイ皮アルコールであり、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコールの3種類がある(Figure.2-1A)。また、各モノリグノールに由来するリグニンの芳香核単位は、グアイアシル核(G核)、シリングル核(S核)、*p*-ヒドロキシフェニル核(H核)と呼ばれている(Figure. 2-1B) (57)。一口にリグニンと言っても、リグニンの含有率や構成は植物の種類や組織、発生学的な観点や環境要因によって大きく異なっている(58)。例えば、針葉樹植物ではG核のみで構成されており、双子葉植物では主にG核とS核で構成され、H核はほとんど含まれない。また、単子葉植物ではH核も含め、3つ全ての核から構成されていることが知られている(59)。植物の細胞壁には多糖も多く含まれており、リグニンとはヒドロキシシナム酸を介して、エステル結合及びエーテル結合によって結合しており、非常に複雑な構造のリグニン・多糖結合体が構成される(Figure. 2-2)(60-62)。このようにリグニンは複雑な構造をしており、安定的に植物組織から抽出することが困難であった。そのため、リグニンは産業上、不要の物として扱われることが多く、例えば、製紙産業などでは、木材からパルプを作成するときに、植物組織からいかにリグニンを除くか、という観点での研究や技術開発が行われることが多かった。また、リグニンの分析方法や抽出方法も確立されていなかったことから、リグニンを生理活性を伴うものとして高付加価値に利用することについて、ほとんど着目されてこなかった。

リグニンの生理活性に関する研究では、ポリフェノールとしての抗酸化活性(63)のほか、シイタケや松かさに含まれるリグニン配糖体のマクロファージに対する免疫賦活活性やウイルスの増殖阻害などの機能が報告されている(64-67)。しかしながら、これらの報告で記載されている分析手法はあいまいであり、かつ、リグニンの抽出が強アルカリ条件下で熱抽出するなど、かなり化学的に強力な方法を用いていることから、本当にリグニン構造を含む成分が免疫賦活作用を持つのかは議論の余地があった。

大麦搗精粕は発泡酒の製造のときに副産物として生じる、大麦の穀皮である。大麦穀皮は大麦の実の中で特にリグニンが約 23%と豊富に含まれていることが知られている(68)。そこで、我々は大麦搗精粕の再利用研究としてその重要性を示すために、リグニンの生理活性を探索することを目的として、樹状細胞活性化能に着目して、研究を実施した。

(A) Monolignol (p-hydroxycinnamyl alcohol)



(B) Lignin aromatic units

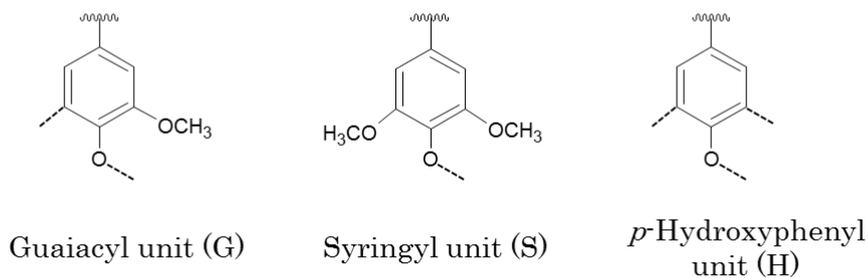


Figure. 2-1 モノリグノールとリグニン芳香核ユニットの化学構造式

(A) モノリグノールの構造式 (B) リグニン芳香核の構造式

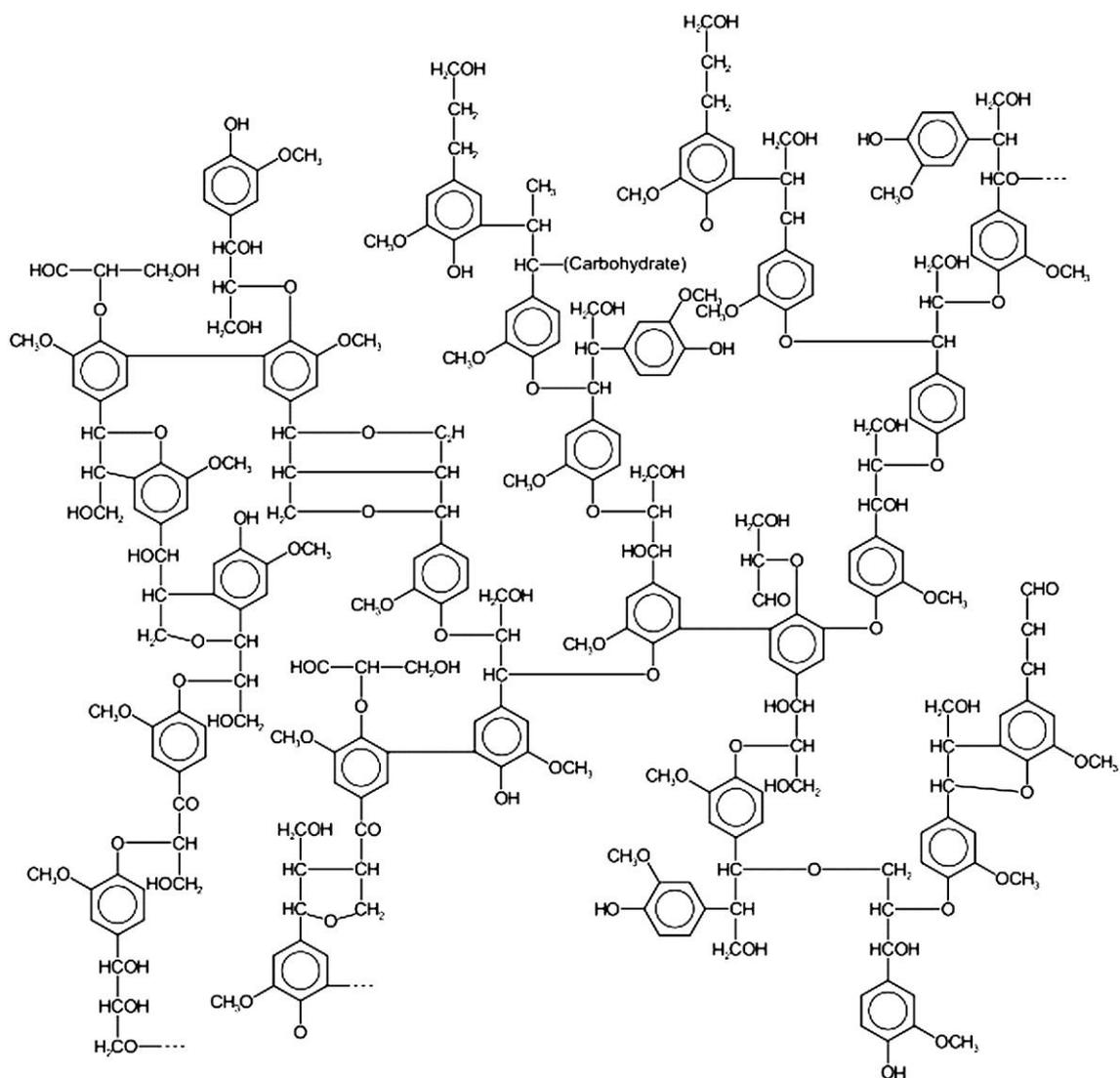


Figure. 2-2 リグニン・多糖結合体の模式図

リグニンの G 核、S 核、H 核がランダムにエーテル結合しており、リグニンと多糖との間はヒドロキシシナナム酸を介してエステル結合で繋がっている(坂上博士の論文より引用)

(65)

## 第2節 材料と実験手法

### 1. 植物材料

大麦搗精粕はキリンビール株式会社より提供を受けた。小麦ふすまは日清製粉株式会社より購入し、イネ籾殻、シナモン樹皮、ゴマ種子、緑茶葉、ターメリック地下茎は日本のスーパーマーケットで購入した。

### 2. 使用動物

6~10週齢の野生型のC57BL/6N系統のマウスをチャールズリバー社より購入した。また、TLR2<sup>-/-</sup>、TLR4<sup>-/-</sup>、TLR7<sup>-/-</sup>、TLR9<sup>-/-</sup>、MyD88<sup>-/-</sup>マウスはオリエンタルバイオサービス社より購入した。全ての動物試験はキリン株式会社の実験動物使用および愛護に関するガイドラインに従い、同社の動物実験委員会の倫理審査の承認を得た後に実施した。

### 3. 抗体

本検討で使用した抗体の抗原、クローン番号、標識された蛍光色素および購入先を以下のTable. 2-1にまとめた。

### 4. ELISA

本検討で使用したELISAのキットを以下のTable. 2-2に示した。ELISAはキットに付属のプロトコールに従って実施した。

**Table 2-1. 本試験でを使用した抗体一覧**

Antigen	Clone	Fluorescence	Supplier
CD11b	M1/70	APC-cy7	BD Pharmingen
CD11c	N418	PE-cy7	eBioscience
CD40	HM40-3	FITC	
CD80	16-10A1	APC	
CD86	GL-1	APC	
dectin-1	2A-11	-	
mannose receptor	15-2	-	Abcam
MHC class II	M5/114.5.2	FITC	eBioscience

**Table 2-2. 本試験でを使用した ELISA キット一覧**

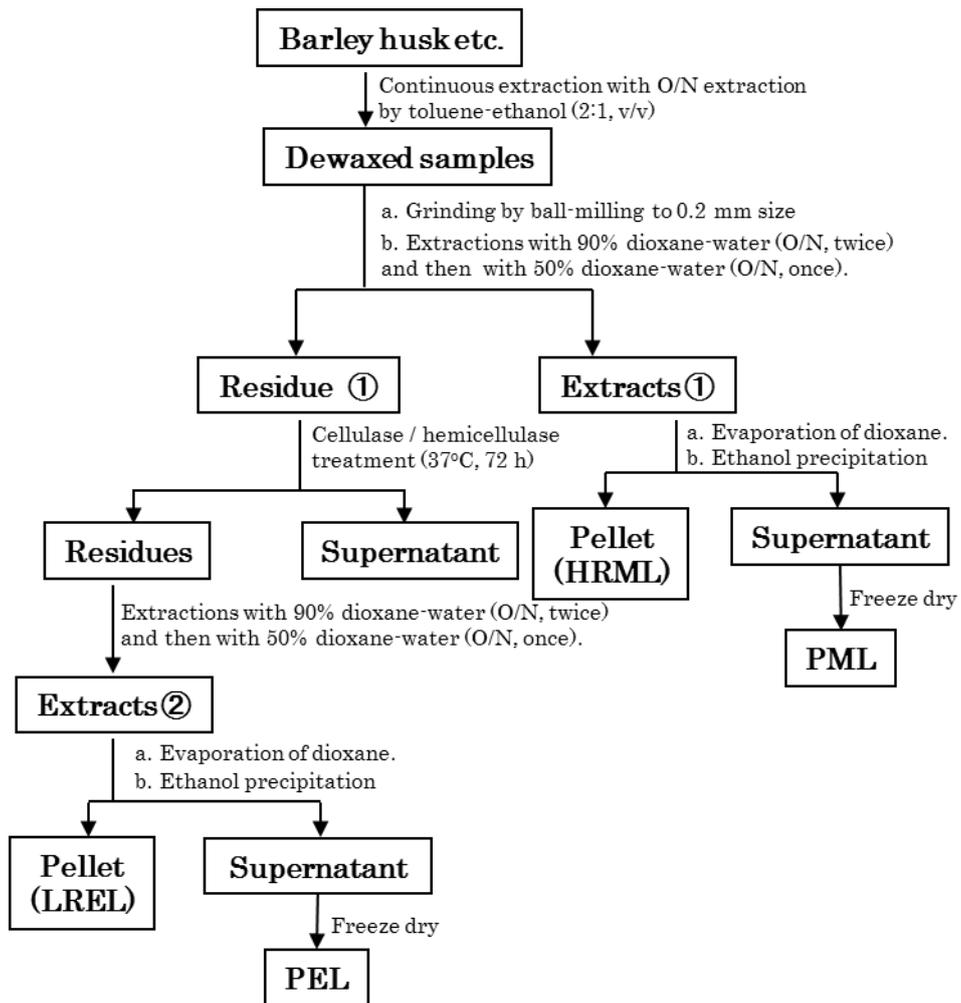
Antigen	Kit	Supplier	Samples
IL-12p40	OptEIA™ ELISA kit	BD Pharmingen	BM-DC culture supernatant
TNF- $\alpha$	Ready-SET-GO kit	eBioscience	
NF- $\kappa$ Bp65	TransAM transcription factor ELISA kit	ActiveMotif	Nucler extracts from mDC
AP-1			
IRF-3			
IRF-7			

## 5. リグニン画分の分画

植物材料からのリグニン画分の分画は Sun らが報告した方法を少し改変し、Figure. 2-3 に従って行った(69)。具体的には、大麦搗精粕を含む植物材料を風乾させたのち、容量比 2:1 で混合したトルエン/エタノールで一晩反応させることで、脂質を除去した。脂質を除去したサンプルを 200  $\mu\text{m}$  の目開きのフィルターに通せるくらいまでマルチビーズショッカー(安井機械社)で細かく粉砕した。さらに 90%ジオキササン溶液で 2 度、暗所で 12 時間反応させ、その後、50%ジオキササン溶液で 1 度、暗所で 12 時間反応させ、抽出液①と残渣①に分けた。抽出液①は 3 度のジオキササン抽出液を全て混合させた。

抽出液①は、まずロータリーエバポレーター(EYELA 社)でジオキササンを取り除いた。ジオキササン除去後の抽出液①に対して、4 倍量のエタノールを添加して、エタノール沈殿を起こした。沈殿してきた物質を回収し、hemicellulose-rich milled lignin (以下、HRML)画分とした。また、エタノール沈殿させた溶液の上清を凍結乾燥して得られた物質を pure milled lignin(以下、PML)画分とした(Figure. 2-3)。

残渣①は超純水で十分洗った後、pH 4.8 に調整した 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液中で 32 mg/ml の濃度で *Aspergillus niger* cellulase (Sigma 社)および *A. niger* hemicellulase (Sigma 社)を添加し、37°C で 72 時間酵素処理した。酵素処理をしても溶解しなかった非溶解残渣を回収し、90%ジオキササン溶液で 2 度、50%ジオキササン溶液で 1 度、暗所で 12 時間反応させ、全ての抽出液を混合することで抽出液②とした。抽出液②はロータリーエバポレーター(EYELA 社)でジオキササンを取り除いた。ジオキササン除去後の抽出液②に対して、4 倍量のエタノールを添加して、エタノール沈殿を起こした。沈殿してきた物質を回収し、lignin-rich enzyme lignin (以下、LREL)画分とした。エタノールを添加しても沈殿してこなかったものを凍結乾燥して得られた物質を pure enzyme lignin(以下、PEL)画分とした(Figure. 2-3)。



**Figure. 2-3** 植物組織からのリグニン画分の分画スキーム

リグニン画分はボールミルで粉碎または酵素処理した植物組織をジオキサン・水混合溶液で抽出した後、エタノール沈殿で分画することによって、4つの画分に分けた。

## 6. 骨髄細胞由来樹状細胞(BM-DC)の誘導とリグニン画分の BM-DC 活性化効果検証

Flt-3L を用いた BM-DC は過去の知見に従って誘導した(70)。具体的には、マウスの四肢より骨髄より細胞を採取し、0.168 M に調製した塩化アンモニウムに常温で 2 分程度曝露して赤血球を溶血することで骨髄細胞を得た。培地は RPMI-1640 培地(Sigma 社)に 1 mM ピルビン酸ナトリウム(Invitrogen 社)、2.5 mM HEPES (Invitrogen 社)、50 unit/ml ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen 社)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール(Invitrogen 社)、10% ウシ血清(FBS, Hyclone 社)を添加したもの(以下、DC 培地)を用いた。骨髄細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml となるように DC 培地に懸濁し、終濃度 100 ng/ml となるように Flt-3L(R&D systems 社)を添加し、5%二酸化炭素、37°C の条件下で 7 日間培養することで BM-DC を誘導した。

本節 5 項で得たリグニン画分は BM-DC 誘導後に 1 ng/ml から 100  $\mu$ g/ml の濃度で添加し、さらに 24 時間培養した。リグニン画分に BM-DC 活性化能があるかどうかは、FACS 法による細胞表面の活性化マーカーの発現強度(本節 7 項)と、ELISA 法による培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定する(本節 4 項)ことで測定した。また、ポジティブコントロールとしては LPS (Sigma 社)を使用した。

## 7. FACS 分析

リグニン画分などで刺激した BM-DC を培養液ごと回収し、3,000 rpm、5 分の条件で遠心分離後に培養上清を除去し、0.5% BSA 含有 PBS (以下、FACS バッファー)で BM-DC を 1 度洗浄した。その後、遠心分離で細胞を再度回収し、適切な組み合わせで蛍光標識された抗体を混合した抗体溶液を細胞に懸濁し、4°C で 30 分間保持することで、抗体を反応させた。抗体でラベルした細胞は FACS バッファーで余剰の抗体を洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業社)で固定した後、FACS Canto II (BD Bioscience 社)に供してデータを得た。得られたデータは FCS express 解析ソフト (De Novo Software 社)を用いて解析した。活性化マーカーの発現強度は Median Fluorescent Intensity (MFI)で評価した。

## 8. リグニン画分に含まれるクラーソンリグニン含量測定

クラーソン法によるクラーソンリグニンの定量を過去の報告の方法に少し修正を加えて実施した(71)。具体的には、各リグニン画分の試料 10-20 mg を 0.5 ml の 72 wt% 硫酸に浸漬し、20°C で 12 時間振盪した。振盪後の溶液に蒸留水を 14.17 ml 加えて 4

wt% 硫酸とした後、120℃湯浴を用いて2時間煮沸した。不溶物をろ集して60℃で真空乾燥し、定量してクラソンリグニン量を算出した。本方法で得られた硫酸加水分解物の可溶性成分は本節第10項<リグニン画分に含まれる単糖構成の分析>で示す中性糖の分析に用いた。

クラソンリグニンは別名硫酸リグニンとも呼ばれ、古くから利用され、かつ簡易に測定できる指標の一つである。一方でリグニン以外の成分も含まれていること、強酸処理によってリグニン構造も大きく変性していることから、構造解析には用いることが出来ず、本方法で算出されても「分析的に明らかなリグニン構造を持つ」とは言い難いという欠点も持つ。

#### 9. リグニン画分に含まれるモノリグノール含有量測定(チオアシドリシス法)

リグニン画分に含まれるモノリグノールを過去の報告に従って、チオアシドリシス法によって分析、定量を行った(72)。具体的には、十分に乾燥させた10 mgのリグニン画分試料に対して、10 mlの反応溶液(2.5% boron trifluoride etherate および10% ethanethiol となるようにジオキサンで溶解したものを)を添加し、オイルバスを用いて、100℃で4時間、間歇攪拌をしながらチオアシドリシス反応をさせたのち、-20℃で5分間冷やすことで、反応を停止させた。十分量の0.4M 炭酸ナトリウム水溶液を添加してpHが3~4となるように調製した後、水と塩化メチレンを容量比2:1の割合で添加して十分攪拌し、しばらく静置して、水層と有機溶媒層に分けた。有機溶媒層のみを分取して、以下のTable 2-3の条件でGC/MSに供して、リグニンモノマーを検出し、定量した。

#### 10. リグニン画分に含まれる単糖構成の分析

本節第8項<リグニン画分に含まれるクラソンリグニン含量測定>で得られたリグニン画分の硫酸加水分解水溶液に対して、超純水を加えて25 mlにメスアップした後、硫酸イオン除去フィルターを通した。試料をTable 2-4に示す条件でイオンクロマトグラフィーに供して、各画分に含まれる単糖およびウロン酸を検出し、定量した。

#### 11. アルカリ加水分解によるエステル結合分解

終濃度10 mg/mlとなるようにリグニンサンプルを1 M水酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、常温下で攪拌して反応させた。反応時間は1分、1時間、3時間、24時間と

した。反応が終了した後に同量の 1 M 塩酸を添加することで中和した。アルカリ加水分解したリグニンサンプルは PBS で適宜希釈して、BM-DC 活性化能を評価した。

## 12. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定

リグニン画分の分子量分布をゲル濾過クロマトグラフィー測定により評価した。リグニン試料を約 0.5 mg/ml となるように 10 mM LiCl/DMF 溶液に懸濁し、室温・暗所で 2 日間静置したのち、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを通して可溶部のみを、以下の Table 2-5 に示す条件でゲル濾過クロマトグラフィー測定に供した。

**Table 2-3. リグニンモノマー定量のための  
ガスクロマトグラフィー質量分析計の測定条件**

Instrument	GCMS-QP2010, Shimadzu Co. Ltd.
Column	Rtx-1, RESTEK Corp.
Internal control	docosane

**Table 2-4. 中性糖およびウロン酸定量のための  
イオンクロマトグラフィー測定条件**

Instrument	DIONEX ICS-3000, Thermo-Fisher Inc.
Column	CarboPac PA1 (2.0 mm diameter x 250 mm length) Thermo-Fisher Inc.
Column temperature	30°C
Solution A	water
Solution B	100 mM NaOH
Solution C	100 mM NaOH + 1 M CH <sub>3</sub> COONa
Programmed Flow Sequence	0-45 min : 99.5% Sol A + 0.5% Sol B 45-55 min : 100% Sol C 55-65 min : 100% Sol B 65-85 min : 99.5% Sol A + 0.5% Sol B
Flow rate	0.3 ml/min

**Table 2-5. 平均分子量測定のための  
ゲル濾過クロマトグラフィー測定条件**

Instrument	HPLC with SPD-20A, Shimadzu Co. Ltd
Column	TSKgel α-6000, α-4000, α-2500, Tosoh Inc.
Column temperature	40°C
Detector	UV 272 nm
Flow rate	0.3 ml/min
Calibration	Polystyrene standard

### 13. 薬剤および中和抗体を添加することによる BM-DC 活性化への影響の解析

BM-DC の誘導は本節 6 項に記載した通りである。

#### 13.1 LPS 阻害剤検討

Polymyxin B(和光純薬工業社)を BM-DC に 5 mg/ml の濃度で添加し、1 時間後に LREL 画分または LPS を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、FACS 分析を用い、BM-DC 活性化に及ぼす影響を調べた。

#### 13.2 食害阻害剤検討

Cytochalasin D (Sigma 社)を BM-DC に 2  $\mu$ M の濃度で添加し、1 時間後に LREL 画分または LPS を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、FACS 分析を用い、BM-DC 活性化に及ぼす影響を調べた。

#### 13.3 CLR ブロッキング抗体添加検討

抗 mannose receptor ブロッキング抗体を 10  $\mu$ g/ml または抗 dectin-1 ブロッキング抗体を 20  $\mu$ g/ml の濃度で BM-DC に添加し、2 時間後に LREL 画分を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、FACS 分析および ELISA を用い、BM-DC 活性化に及ぼす影響を調べた。

### 14. 核内の転写因子の発現量解析

FACS aria (BD Bioscience 社)を用いて、BM-DC より mDC のみを分取した。その後、LREL 画分または LPS で 3~8 時間刺激した。mDC の核内タンパク質抽出液を NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent (Pierce 社)を用い、プロトコールに従って調製した。タンパク質の濃度を BCA protein assay kit (Pierce 社)を用いて測定した。タンパク質抽出液中の NF- $\kappa$ Bp65、c-Jun、IRF-3、IRF-7 の濃度を ELISA で測定し、単位タンパク質濃度あたりの各転写因子量を算出した。

### 15. 統計処理

得られたデータは Student's *t* 検定を用いて、有意差検定を行った。

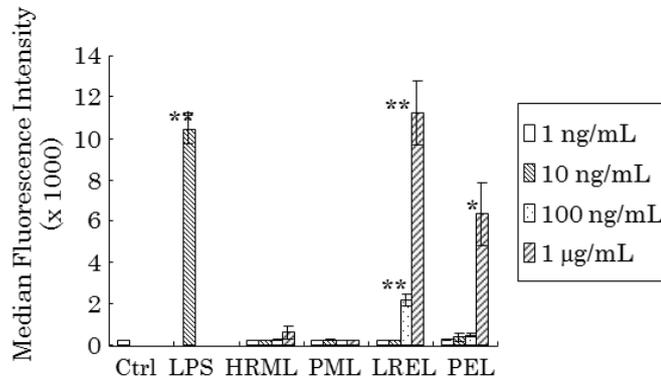
### 第3節 結果

#### 1. 大麦搗精粕からのリグニン画分の分画と BM-DC 活性化

Sun らの方法(69)に従って調製した大麦搗精粕の HRML、PML、LREL、PEL 画分を分画した。それぞれの画分の歩留まりは HRML が 2.5 %、PML が 6 %、LREL が 0.13 %、PEL が 3 %であった。また、これらの画分がリグニン含有画分であることを確認することを目的として、クラーソンリグニン量を測定したところ、HRML が 37.3 %、PML が 50.8 %、LREL が 55.2 %、PEL が 62.8 %であった。

これらのリグニン画分の BM-DC 活性化能を調べることを目的として、マウス BM-DC に 1 ng/ml から 1 µg/ml の濃度でリグニン画分を添加して、BM-DC の活性に与える影響を評価した。すると、LREL および PEL において、濃度依存的に CD86 の活性化マーカーの発現量および培養上清中の IL-12p40 の濃度が上昇することが明らかとなった。さらに、それらの効果は LREL のほうが PEL よりも強いことが明らかとなった(Figure. 2-4)。次に LREL と PEL の BM-DC 活性化能を裏付けることを目的として、BM-DC にリグニン画分を 100 ng/ml の濃度で添加し、BM-DC の活性化マーカーである CD40、CD80、CD86、MHC class II (以下、MHCII)の発現量および炎症性サイトカインである IL-12p40 および TNF-αの濃度を測定した。すると、LREL において、コントロールと比較して CD40 発現量が 10 倍、CD80 発現量が 4 倍、CD86 発現量が 10 倍、MHCII 発現量が 4 倍になり、かつ IL-12p40 産生量が 5 倍、TNF-α産生量が 20 倍になることが明らかとなった(Figure. 2-5)。PEL においても、それぞれの活性化マーカーの発現量の増加や炎症性サイトカインの産生量の増加が認められたが、LREL と比較すると、その効果は非常に弱かった。一方で、HRML および PML では活性化マーカー発現量及び炎症性サイトカイン産生量に差は認められなかった。これらの結果から、大麦搗精粕より得られた LREL および PEL には BM-DC 活性化能があり、その活性は PEL に比して、LREL の方が高いことが示唆された。

(A) CD86 expression



(B) IL-12p40

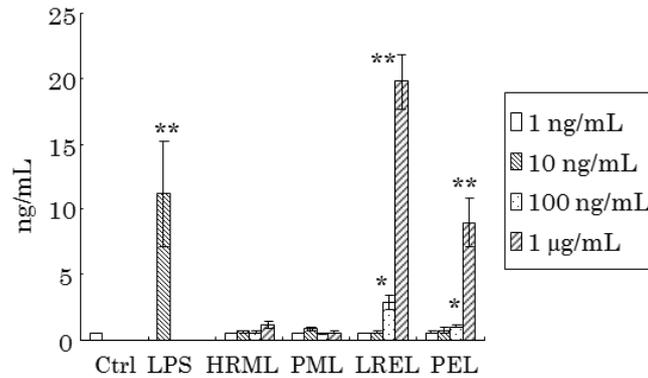
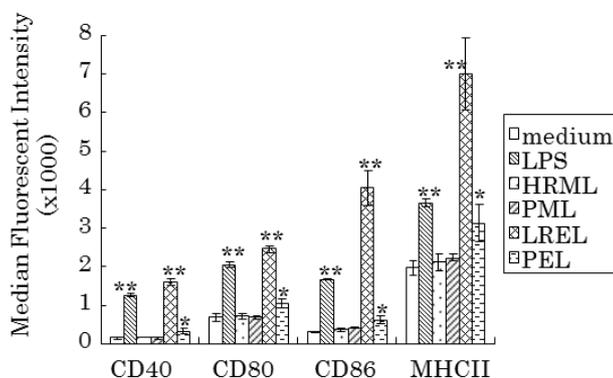


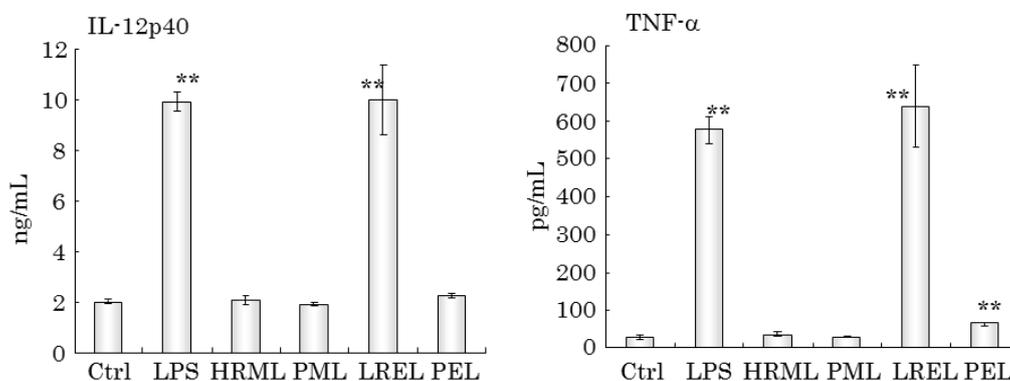
Figure. 2-4 濃度依存的なリグニン画分による mDC の活性化効果

BM-DC に対して様々な濃度でリグニン画分を添加し、細胞表面の CD86 の発現量を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。10 ng/mL の LPS をポジティブコントロールとした。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。(A) mDC の CD86 発現強度(MFI で表記した)。(B) 培養上清中の IL-12p40 濃度。棒グラフは平均値±標準偏差 (n=3) で表記した。BM-DC に何も添加しなかったコントロール(Ctrl)を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

(A) Expression level of cell surface marker



(B) Concentration of cytokines

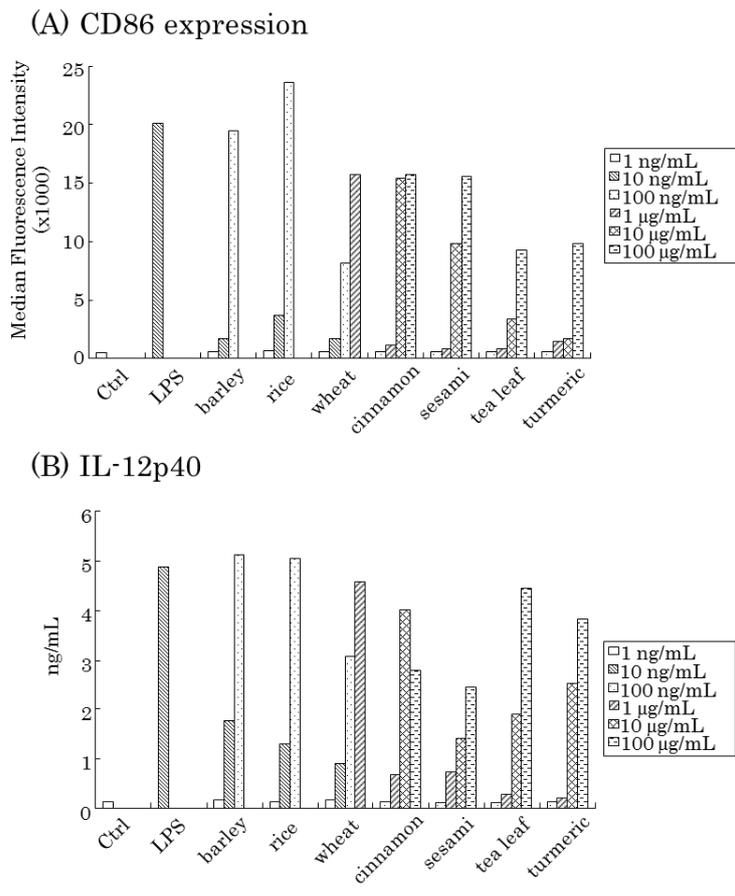


**Figure. 2-5** リグニン画分による mDC 活性化の比較分析

BM-DC に 100 ng/mL の濃度でリグニン画分を添加、または 10 ng/mL の濃度で LPS (ポジティブコントロール) 添加し、細胞表面の活性化マーカーの発現強度は FACS で、培養上清中の炎症性サイトカインの濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。(A) mDC の細胞表面マーカーである CD40, CD80, CD86 and MHCII の発現強度。MFI で表記した。(B) 培養上清中の IL-12p40 (左) および TNF- $\alpha$  (右) 濃度。棒グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)で表記した。BM-DC に何も添加しなかったコントロール(Ctrl)を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

## 2. 各種植物由来 LREL の BM-DC 活性化

リグニンは大麦搗精粕のような穀物穀皮のみではなく、ほぼ全ての植物種、植物組織にも広く分布している。BM-DC 活性化能を持つリグニン画分に種特異性や植物組織特異性があるかどうかを検討することを目的として、様々な植物組織より、LREL 画分を抽出し、BM-DC 活性化効果を比較した。穀物穀皮の代表として、小麦ふすまとイネの籾殻を選択した。葉として緑茶葉を、樹皮としてシナモンを、種子としてゴマを、根としてウコンを選択した。それぞれのサンプルの LREL を BM-DC に 1 ng/ml から 100 µg/ml の濃度で添加して、BM-DC 活性化能を評価した。すると、全ての植物由来 LREL において、BM-DC 活性化効果が得られた。その中でも穀物穀皮由来のサンプルの活性が強く、さらにイネ籾殻由来の LREL の活性は大麦搗精粕に匹敵するほど高かった(Figure. 2-6)。すなわち、LREL の BM-DC 活性化能には、種特異性や組織特異性はないが、その活性に強弱があり、特に穀物穀皮で高い活性が得られることが確認された。



**Figure. 2-6** 様々な植物組織から得られた LREL 画分による mDC 活性化効果

BM-DC に対して、大麦搗精粕、イネ籾殻、小麦ふすま、シナモン樹皮、ゴマ種子、茶葉、ターメリック根茎より抽出した LREL 画分を様々な濃度で添加し、24 時間後に細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。(A) mDC の CD86 発現強度(MFI で表記した)。(B) 培養上清中の IL-12p40 濃度。

### 3. リグニン画分の化学的特徴と BM-DC 活性化との関係

#### ➤ チオアシドリシスによるリグニンモノマーの定量

チオアシドリシスは、リグニンの構造中でもっとも多量に存在する、 $\beta$ -O-4 結合を選択的に開裂する反応であり(73)、リグニンの構造分析に広く用いられる。モノマー分析では $\beta$ -O-4 結合された末端モノマーおよび $\beta$ -O-4 結合 2 つに挟まれたモノマーが検出され、Figure.2-1 で示した G 核・S 核・H 核の量・比率を評価することができる(74)。大麦搗精粕由来のリグニン画分に含まれるリグニンモノマーの量を測定した結果を Table 2-6 に示す。BM-DC 活性化能のある LREL と PEL にはリグニンモノマーが検出されたため、分析的にも明らかにリグニン構造が含まれていることが明らかとなった。しかしながら、HRML と PML にはリグニンモノマーが検出できなかった(data not shown)。これらの結果から、BM-DC を活性化するためには、リグニン構造が含まれていることが必要であると考えられた。

#### ➤ 中性糖およびウロン酸の定量

クラークソン法により得られたリグニン画分の硫酸加水分解溶液中に含まれる中性糖およびウロン酸の量をイオンクロマトグラフィー法で測定した結果を Table 2-7 に示した。LREL と PEL で比較すると、LREL には PEL よりも 3 倍多く中性糖が含まれていることが分かった。それぞれの糖の全体に対する構成比については、LREL と PEL で大きな差は見られず、キシロースが最も多く、次いで、アラビノースの含量が多かった。ガラクトース、グルコース、マンノースはアラビノースと同等の量が含まれていたが、ウロン酸についてはごく少量しか含まれていないことが明らかとなった。

#### ➤ 分子内エステル結合の BM-DC 活性化能に与える影響

これまでの報告でリグニンはヒドロキシシナム酸とはエーテル結合で結合しており、ヒドロキシシナム酸は多糖類とエステル結合で結合することで、リグニンと多糖が結合し、複雑な化合物構造をしていることが明らかとなっている(60-62)。すなわち、リグニンと多糖類のヒドロキシシナム酸を介した結合にはエステル結合が重要であることが知られている。LREL において、リグニンと多糖類の BM-DC 活性化能に与える影響を調べることを目的として、分子内エステル結合と BM-DC 活性化能との関係を調べた。LREL を、1N 水酸化ナトリウム水

溶液を用いて中程度のアルカリ加水分解を行い、BM-DC が活性化するかどうかを評価した。すると、アルカリ加水分解の時間が長くなるほど、LREL の BM-DC 活性化能が弱くなり、3 時間以上アルカリ加水分解処理をすると、BM-DC 活性化能が完全に消失した(Figure. 2-7)。これらの結果から、LREL の BM-DC 活性化能には分子内エステル結合が重要な役割を果たしており、リグニンと多糖類が結合していることが BM-DC 活性化に必要であることが示唆された。

▶ リグニン画分の分子量測定結果

LREL および PEL をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、そこで得られたクロマトグラムを元に、重量平均分子量( $M_w$ )を算出した(Figure. 2-8)。40 分以降に検出されたピークについては、分子量が数千以下のオリゴマー領域であり、複数のピークが重複していたため、それぞれ主要な高分子量ピークのみを算出した。すると、LREL の  $M_w$  が 70,640、PEL の  $M_w$  が 23,922 となり、LREL のほうが約 3 倍大きな分子量であることが明らかとなった。これまでの検討で、モノリグノールの構成比や中性糖の構成比が大きく変わらない結果が得られていること、BM-DC 活性化能は LREL のほうが PEL と比較して数倍高いことから、分子量と BM-DC 活性化能との間には正の相関関係があると考えられた。

**Table 2-6. LREL および PEL に含まれるリグニンモノマー含量**

Sample	G unit ( $\mu\text{mol/g}$ )	S unit ( $\mu\text{mol/g}$ )	H unit ( $\mu\text{mol/g}$ )	S/G ratio
LREL	63.93	45.63	9.66	0.71
PEL	16.15	10.02	2.81	0.62

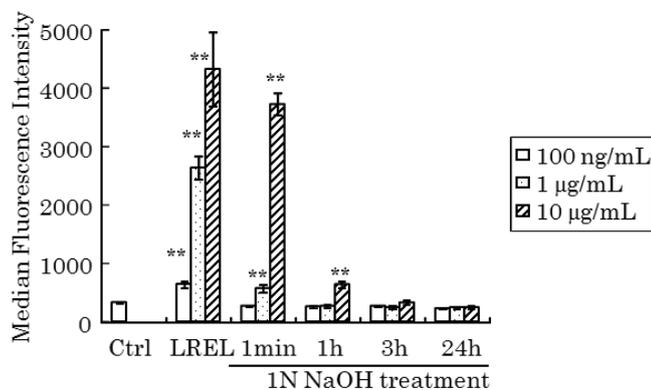
G unit はコニフェリルアルコール由来の、S unit はシナピルアルコール由来の、H unit は p-クマリルアルコール由来のリグニン構造体を表す。

**Table 2-7. LREL および PEL に含まれる中性糖およびウロン酸(% , w/w)含量**

カッコ内の数字は中性糖およびウロン酸の合計から算出した各成分の含有率を示す。

Sugar	LREL	PEL
Arabinose	3.22% (18.4%)	1.00% (19.1%)
Galactose	2.38% (13.6%)	0.96% (18.4%)
Glucose	3.18% (18.1%)	0.90% (17.2%)
Xylose	6.43% (36.7%)	1.62% (31.0%)
Mannose	2.24% (12.8%)	0.65% (12.4%)
Galacturonic acid	0.02% (0.11%)	0.03% (0.57%)
Glucuronic acid	0.06% (0.34%)	0.08% (1.53%)
Total	17.54% (100%)	5.23% (100%)

(A) CD86 expression



(B) Concentration of cytokines

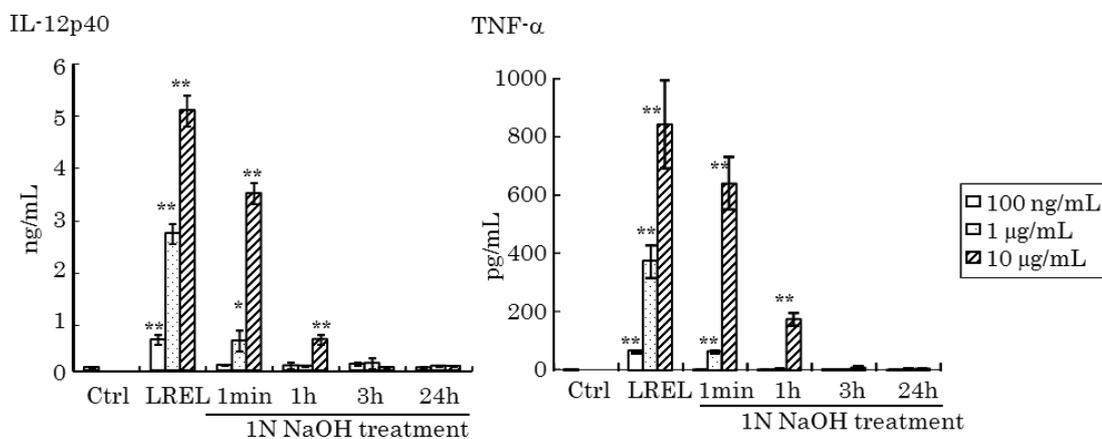
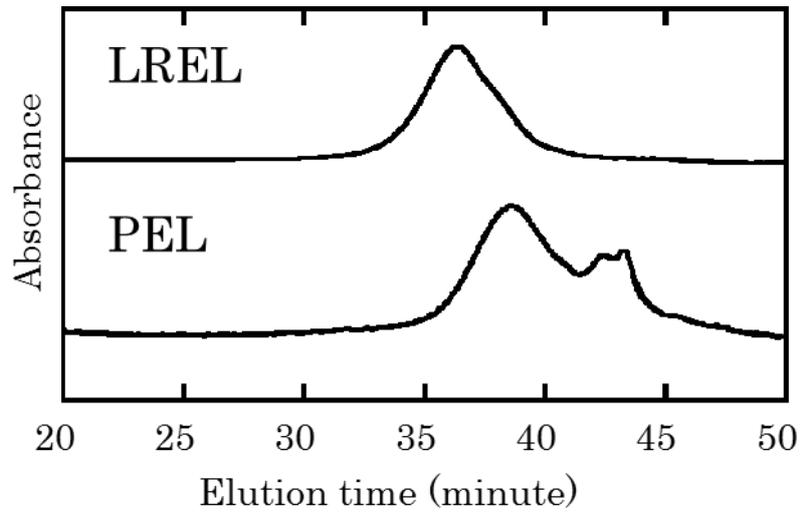


Figure. 2-7 アルカリ加水分解による LREL の mDC 活性に与える影響

LREL を 1N NaOH でいくつかの異なる時間でアルカリ加水分解を行ったあと、1N HCl で中和した。アルカリ加水分解した LREL を異なる濃度で BM-DC に添加し、24 時間後に細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。非処理の LREL をポジティブコントロールとした。(A) mDC の細胞表面 CD86 の発現強度。MFI で表記した。(B) 培養上清中の IL-12p40 (左) および TNF- $\alpha$  (右) 濃度。棒グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)で表記した。BM-DC に何も添加しなかったコントロール(Ctrl)を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。



**Figure. 2-8** LREL および PEL の分子量測定用ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラム

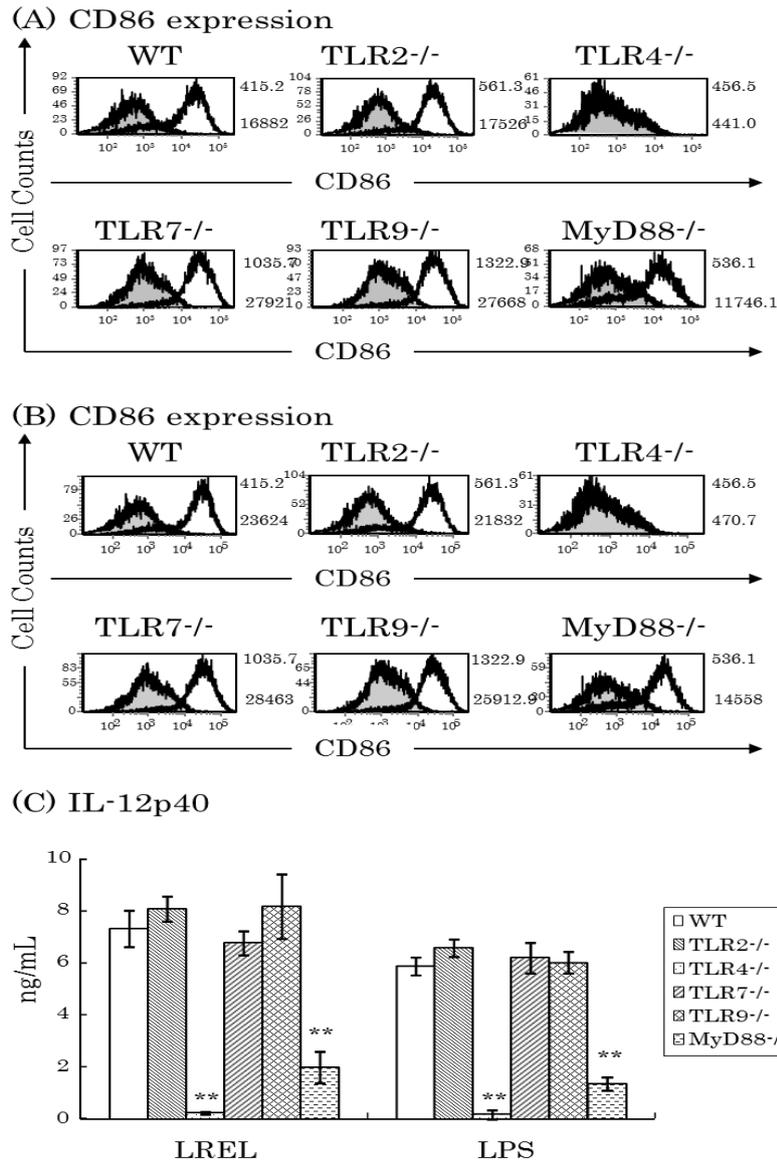
LREL のほうが PEL よりも早く溶出していることから、LREL のほうが分子量が大きいことがわかる。また、LREL のほうが PEL よりもピークの数が少ないため、より分子量が揃った複合体を形成している可能性が考えられる。40 分以降に検出されたピークについては、分子量が数千以下のオリゴマー領域であり、複数のピークが重複しているため、主要な高分子量ピークのみを用いて分子量を算出した。

#### 4. LREL の BM-DC 活性化作用メカニズム解明

➤ TLR ノックアウトマウス由来 BM-DC 活性化能に与える影響

LREL の BM-DC 活性化の作用メカニズムを調べることを目的として PRR である TLR およびその分子内アダプタータンパクである MyD88 のノックアウトマウスを用い、BM-DC 活性化能に与える影響を評価した。すると、TLR4 をノックアウトしたマウス由来の BM-DC において、LREL で刺激をしても、BM-DC の活性化マーカーである CD86 の発現亢進が起こらなかった(Figure. 2-9A)。また、CD86 の他の活性化マーカーである CD40、CD80、MHCII の発現でも同様の効果が認められた(data not shown)。培養上清中の IL-12p40 の濃度も変化が見られなかった(Figure. 2-9C)。しかしながら、その他の TLR である TLR2、TLR7、TLR9 のノックアウトマウス由来の BM-DC では、野生型の BM-DC と同程度の活性化が認められた。TLR 分子内アダプターである MyD88 ノックアウトマウス由来の BM-DC では、LREL 画分による活性化は消失しなかったが、野生型と比較して CD86 の発現も炎症性サイトカインの産生も減弱した。

また、TLR4 リガンドであることが知られている LPS で刺激した場合においても、TLR4 ノックアウトマウスおよび MyD88 ノックアウトマウスで同様の反応が確認された(Figure. 2-9B)。これらのデータから、LREL による BM-DC 活性化効果は TLR4 を介した反応であると考えられた。



**Figure. 2-9 TLR4 を介した LREL の mDC 活性化効果**

BM-DC を野生型(WT), TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>および MyD88<sup>-/-</sup>のマウスから調製し、LREL または LPS で 24 時間刺激した後、細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> と定義した。(A) LREL で刺激した mDC の CD86 発現強度。Gray scale: 未刺激、white scale: LREL 刺激。(B) LPS で刺激した mDC の CD86 発現強度。Gray scale: 未刺激、white scale: LPS 刺激。(C) 培養上清中の IL-12p40 濃度。棒グラフは平均値±標準偏差(n=3) で表記した。野生型由来の BM-DC(WT)を基準に Student *t* 検定を行い、*p*<0.01 を\*\*と表記した。

➤ LPS inhibitor 添加による LREL の BM-DC 活性化能に与える影響

TLR4 は LPS などに代表される病原性微生物のセンサーとしての機能があるとされている受容体である。LPS はグラム陰性細菌の細胞壁成分であり(75)、エンドトキシンとも呼ばれる成分である。エンドトキシンの混入の可能性の有無を検証することを目的として、Lipid A の部位に結合して LPS の生理活性を抑制するカチオン性の抗生物質である polymyxin B を使用して(76)、BM-DC の活性化能に与える影響を評価した。すると、LPS で BM-DC を刺激した時には polymyxin B 存在下で BM-DC の活性化が全く見られなくなったのに対し、LREL 画分で BM-DC を刺激した時には polymyxin B 存在下で活性が残存することが明らかとなった (Figure. 2-10A)。この結果により、LREL は LPS のコンタミによって BM-DC を活性化しているわけではないことが明らかとなった。

➤ 食食阻害剤添加による LREL の BM-DC 活性化能に与える影響

樹状細胞は抗原の食食能が強いことが知られているが、食食や細胞質内の PRR と LREL による BM-DC 活性化能との関係を調べることを目的として、食食阻害剤である Cytochalasin D(以下、Cyto D)で処理した BM-DC を用いて、LREL 刺激時の BM-DC の活性を測定した。すると、Cyto D を処理して、Cyto D 処理を行わなかった BM-DC と比較して、BM-DC の活性化の程度に変化はなかった。また、TLR4 リガンドである LPS でも同様に Cyto D 処理による、CD86 発現亢進効果に差は見られなかった(Figure. 2-10B)。これらの結果は、LREL による BM-DC の活性化に食食は無関係であり、活性化を司る受容体は細胞表面に存在する受容体であることが考えられた。先の結果において LREL による BM-DC の活性化に影響を与えると示唆された TLR4 も細胞表面に存在する受容体であることから(21,24)、これまでのデータと矛盾しない結果が得られたと考えられる。

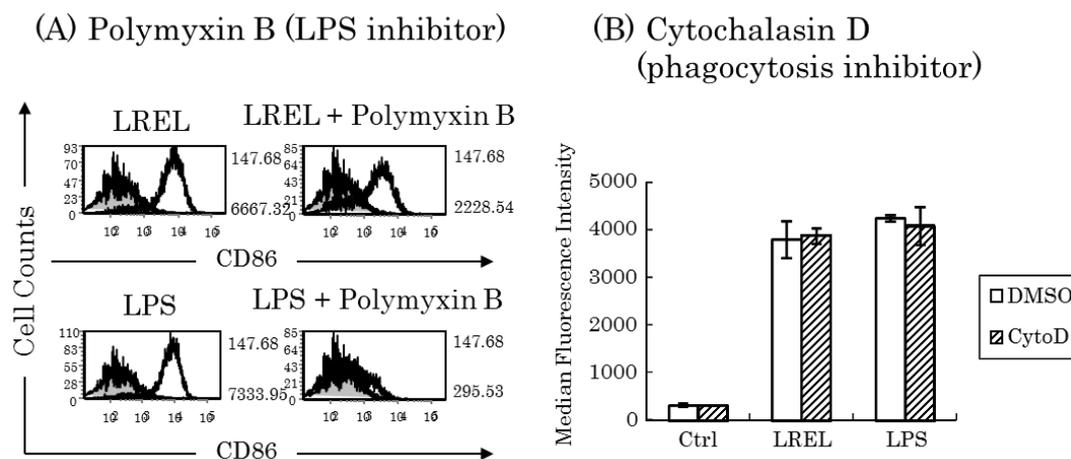
➤ C-type lectin 受容体ブロック時の BM-DC 活性化能に与える影響

LREL にはリグニン構造以外にも多糖が含まれていた。多糖を認識して活性化する BM-DC の PRR として、CLR がある(24,77)。CLR も細胞膜の PRR であることが知られていることから、LREL の BM-DC 活性化効果と CLR との関係を調べた。BM-DC に mannose receptor または dectin-1 のブロッキング抗体を 10 µg/ml または 20 µg/ml の濃度で添加した。その後、LREL を添加し、さらに 24

時間培養した後の BM-DC の活性をアイソタイプコントロールの抗体添加時と比較した。すると、いずれのブロッキング抗体を添加しても、LREL の BM-DC 活性化の程度に変化がないことが明らかとなった(Figure. 2-11)。これらの結果から、LREL 画分は代表的な CLR には結合しないことが考えられ、LREL が TLR4 リガンドであることの裏付けを強めることができた。

➤ LREL 刺激による核内転写因子濃度に対する影響

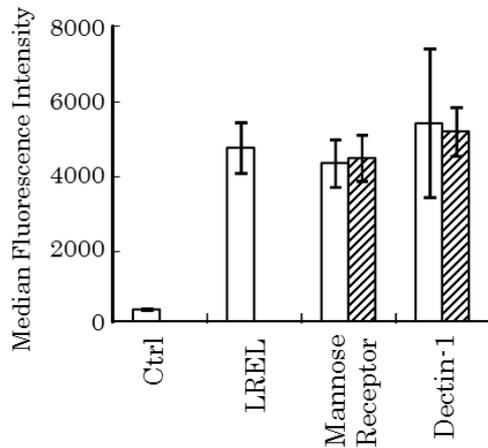
諸言にも記載した通り、TLR に刺激が入ると、MyD88 および/または TRIF を介して、細胞質に存在する転写因子が活性化し、核内に移行して、炎症性サイトカインを始めとした、様々な遺伝子の発現を亢進することが知られている(78)。LREL は TLR4 のリガンドであることから、Table. 1-1 に示したように、細胞内アダプター分子として、MyD88 も TRIF も使用していると考えられる。LREL の刺激によって、炎症性サイトカイン産生に寄与する転写因子の核内移行を調べることを目的として、BM-DC より mDC のみを分取し、LREL による刺激を行った後、核内タンパク質を抽出して、刺激の有無による転写因子のタンパク量の変化を比較した。その結果、LREL 刺激 3 時間後において、NF- $\kappa$ Bp65、c-Jun の核内のタンパク量が統計的に有意に増加しており、IRF-3 は増加傾向にあることが明らかとなった(Figure. 2-12A)。また、IRF-7 については、刺激 3 時間後には変化が認められなかったが、刺激 7 時間後には核内タンパク量が統計的に有意に増加していた(Figure. 2-12B)。ポジティブコントロールとして添加した LPS でも同様の傾向が認められ、確かに LREL の刺激により、mDC が活性化して、NF- $\kappa$ B、AP-1、IRF ファミリーが関与するシグナル経路が活性化していることが確認された。



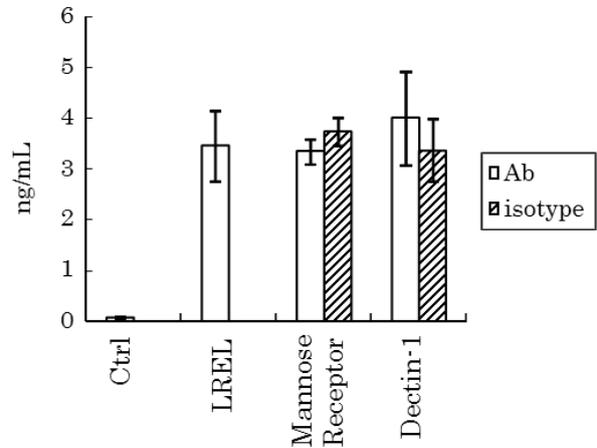
**Figure.2-10 LREL による mDC 活性化能に対する polymyxin B および cytochalasin D の効果**

BM-DC に対して LPS 阻害剤である polymyxin B または食食阻害剤である cytochalasin D を添加し、100 ng/mL LREL または 10 ng/mL LPS 存在下で 24 時間培養した。細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で測定した。mDC は CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> と定義した。(A) 樹状細胞の CD86 発現強度。LREL または LPS 刺激の前に 5 mg/mL polymyxin B を添加した。Gray scale: 未添加; white scale; LREL 刺激(上段)、LPS 刺激(下段) (B) 樹状細胞の CD86 発現強度。LREL または LPS 刺激の前に 2 μM cytochalasin D (図中の表記は Cyto D) を添加した。棒グラフは平均値±標準偏差(n=3)で表記した。Cytochalasin D 添加試験では、添加しなかった試験区を基準に Student *t* 検定を行い、Cytochalasin D 添加の影響を調べたが、統計的な差は認められなかった。

(A) CD86 expression



(B) IL-12p40

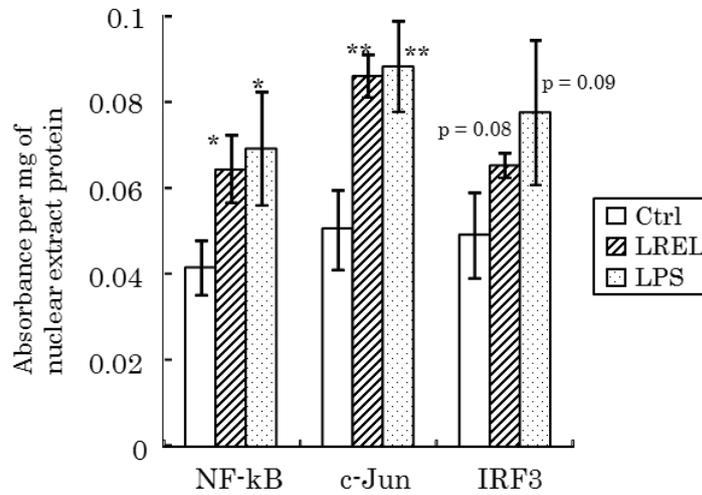


**Figure. 2-11 LREL による mDC 活性化能に対する PRR 中和抗体の効果**

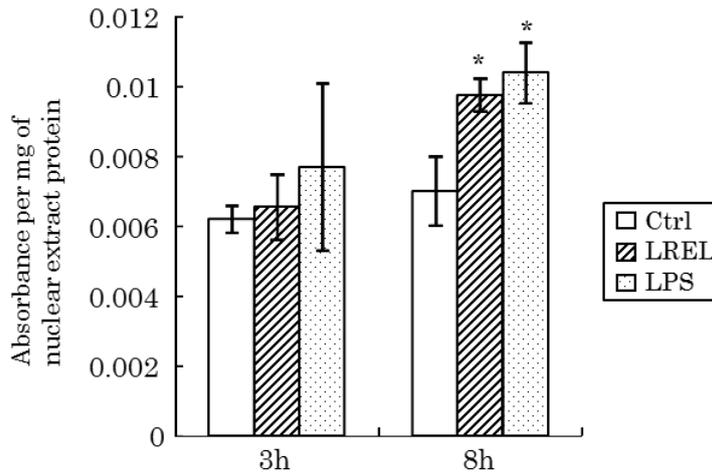
BM-DC に対して、mannose receptor、dectin-1 または isotype control 抗体を添加し、100 ng/mL LREL と共に 24 時間培養した。細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。

**(A)** mDC の細胞表面 CD86 の発現強度。MFI で表記した。**(B)** 培養上清中の IL-12p40 の濃度。棒グラフは平均値±標準偏差(n=3)で表記した。Isotype control 抗体を添加した試験区を基準に Student *t* 検定を行い、中和抗体添加の効果調べたが、統計的な差は認められなかった。

(A) Expression level of transcription factors



(B) Expression level of activated nuclear IRF-7



**Figure. 2-12** LREL による核内転写因子の活性化

BM-DC から mDC を単離し、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LREL または 100  $\text{ng}/\text{mL}$  LPS (ポジティブコントロール) で 3 時間または 8 時間刺激した。(A) 3 時間刺激後の核内タンパク質に含まれる活性型の NF- $\kappa$ Bp65, c-Jun および IRF-3 の量。(B) 3 時間または 8 時間刺激後の核内タンパク質に含まれる活性型の IRF-7 の量。棒グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)で表記した。mDC に何も添加しなかったコントロール(Ctrl)を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

#### 第4節 考察

大麦はビールや発泡酒を製造するのに大量に使用される原料である。一般的にビールには大麦を発芽させた麦芽が主な原料として用いられるが、日本の酒税において、ビールよりも課税額が低い、発泡酒やその他発泡性酒類に規定される酒類(79)には、麦芽ではなく大麦が原料として用いられる。大麦を原料として使用するためには、大麦種子を搗精し、穀皮を除去する必要がある。すなわち、発泡酒やその他発泡性酒類を製造するとき、大麦搗精粕が副産物として大量に発生する。その副産物の有効的な再利用の可能性を検討することを目的として、大麦穀皮に多く含まれており、かつ生理活性にこれまであまり注目されていなかったリグニンに着目し、本検討を行った。

大麦搗精粕からリグニンを含む画分を得るために、Sunらの方法を用いて、HRML、PML、LREL、PELの4つの画分を得たが、分画工程でCellulase/Hemicellulaseの酵素を反応させた画分である、LRELおよびPELの画分において、マウスBM-DCを活性化させる活性を見出すことができた。また、そのBM-DC活性化能もngオーダーという、極めて低濃度で見られることが明らかとなった。酵素処理を行わずに得られる画分である、HRMLとPMLにおいてはBM-DC活性化能が見られなかったことから、Cellulase/Hemicellulase処理がBM-DC活性化能を持つ画分を得るために必須であることが考えられた。

リグニンは大麦搗精粕のみならず、ほとんどの植物組織に広く分布していることから、植物種および組織特異性の有無を調べたところ、葉、樹皮、種子、根茎より抽出されたLREL画分すべてにBM-DC活性化能が見られることが明らかとなった。中でも、穀類の穀皮である、小麦ふすまとイネ籾殻には緑茶葉、シナモン樹皮、ゴマ種子、ターメリック根茎と比較してBM-DC活性化能が高かったことから、穀物穀皮から得られるLREL画分にはBM-DCを活性化する分子がより多く含まれているか、より比活性の高い分子構造を取る物質が含まれている可能性が考えられた。また、穀物穀皮の中でも、イネ籾殻と大麦搗精粕は小麦ふすまと比較して、BM-DC活性化能が高かった。イネの籾殻と大麦搗精粕には穀物の外皮のみが含まれている一方で、小麦ふすまには外皮と内皮が含まれていることが知られているため、解剖学的には、内皮の有無がBM-DC活性化能に影響を与える可能性がある。さらに、過去の知見において、大麦搗精粕およびイネの籾殻には20%以上のリグニンが含まれている一方で(68,80)、小麦ふすまには3~10%程度のリグニンしか含まれていないことが報告されている(81)。すなわち、穀物穀皮由来のLRELにおけるBM-DC活性化の強度は元々の原料に含まれるリグニン含量に影響を受ける可能性が考えられた。

次にLRELとPELの化学的な特徴を調べたところ、4つの大きな特徴がBM-DC活性化

能に関与している可能性が考えられた。1つ目はリグニンモノマーの存在である。チオアシドリシス法によって得られたリグニンモノマーの含量を測定したところ、LRELとPELにおいて、G、S、H核いずれのリグニンモノマーも検出された。これらの結果より、分析的に明らかなリグニンが含まれている免疫賦活物質を世界で初めて分画することに成功したと言える。リグニンモノマーの含量はLRELのほうがPELよりも多いことが明らかとなった。また、3種類のリグニンモノマーの構成比を比較したところ、LRELとPELの間に大きな差は見られなかった。また、BM-DC活性化能はPELと比較してLRELのほうが高いことから、リグニン含量が多いほどBM-DC活性化能が高いことが示唆された。HRMLとPMLはチオアシドリシス法によるリグニンモノマーを検出することはできなかったため、これらの画分にはリグニン構造が含まれていないことが明らかとなった。クラーソン法は簡便にリグニン量を推定できるものの、得られた画分にはリグニン以外の物質も含まれていることが知られている(82)。ゆえにHRMLおよびPMLに関しては、リグニンとは異なる、硫酸に不溶性の夾雑物質がクラーソンリグニンとして検出されたのではないかと示唆される。

2つ目の特徴は中性糖の含有量と構成比である。LRELとPELに含まれる中性糖を分析した結果、いずれも中性糖やウロン酸を含有する画分であることがわかった。含有量はLRELのほうがPELと比較して非常に多かったが、構成比についてはリグニンモノマーと同様にLRELとPELでは似た結果となっていた。すなわち、リグニンモノマーと同様に、中性糖の含量が多いほど、BM-DC活性化能が高くなる相関があると考えられる。大麦搗精粕に含まれる主な食物繊維は $\beta$ -glucan または arabinoxylan であり、単糖としてはキシロース、アラビノース、グルコースが主たる構成要素であることが知られている(83,84)。一方でLRELとPELにはキシロースやアラビノースに加え、ガラクトースやマンノースが多く含まれており、グルコースの含量が少ない、という構成をしていた。ガラクトースやマンノースが多く検出されたということは、LRELやPELには arabinogalactan や glucomannan が多く含まれている可能性が考えられる(85,86)。過去の知見では、カラマツ由来の arabinogalactan には *in vitro* および *in vivo* において免疫賦活作用があることが示されている(87,88)。別の論文において、アロエ多糖の研究において、多糖分子中のマンノースの含量が上がれば、免疫賦活活性が上がる、という知見も報告されている(89)。これらの結果を踏まえると、ガラクトースやマンノースがLRELとPELに多く含まれる、という糖組成がBM-DC活性化能と関連している可能性が考えられる。

3つ目の特徴は分子内エステル結合の存在である。これまでの報告により、リグニンと多

糖が結合した Lignin-Carbohydrate Complexes (LCC)と呼ばれる分子は、弱アルカリである 1N 水酸化ナトリウム水溶液で加水分解反応をさせることでエステル結合を加水分解でできることが知られている(90)。本試験では、過去の知見にならって、LREL を弱アルカリで処理すると、処理時間が長くなるにつれて、BM-DC 活性化能が弱くなった。本結果は、LREL の BM-DC 活性化能は分子内エステル結合によってリグニンと多糖が結合していることによって生じていることを示すものと考えられる。

4 つ目の特徴は分子量である。Figure. 2-1 で示したリグニンモノマー分子や Table 2-5 で示した中性糖の分子量は 1 分子あたり 150~200 程度である。一方でゲル濾過クロマトグラフィーによって得られた平均分子量は PEL で 20,000 以上、LREL で 70,000 以上であったことから、これらの分子はリグニンモノマーや中性糖が多量体となったリグニン・多糖結合体であると考えられる。LREL のほうが PEL よりも分子量が大きかったことから、BM-DC 活性化能と分子量は相関していると考えられた。これらの特徴から考えて、BM-DC 活性化能を持つ画分にはリグニン構造と多糖がエステル結合で結合して多量体化したリグニン・多糖結合体であると考えられた。

本研究において、*TLR* および *MyD88* のノックアウトマウス由来の BM-DC を用いた試験によって、LREL は新たな TLR4 リガンドであることが明らかとなった。TLR4 シグナルは *MyD88* 依存性シグナル経路と *TRIF* 依存性シグナル経路が存在していることが知られており(91,92)、*MyD88* ノックアウトマウスでは *TRIF* 依存的シグナル経路のみが反応したために活性化が一部減弱したと考えられた。代表的な TLR4 リガンドとしては、グラム陰性細菌の細胞壁の構成要素である LPS が知られている。LPS は Lipid A と呼ばれる疎水性の脂質で構成された分子と親水性の多糖類が結合した分子であることが知られている(75,93)。LPS の阻害物質を使用した試験でも LREL の BM-DC が維持されていたこと、LREL を分画する際に大麦搗精粕を Toluene-ethanol で脱脂反応させており、LREL には脂質が含まれていないことから、LREL の BM-DC 活性化能は LPS のコンタミではないと考えられる。一方で、LREL は疎水性のリグニンと親水性の多糖で構成されており、分子骨格は異なるものの、疎水性分子と親水性分子が繋がった LPS と似た構造を持った分子だと考えられることから、TLR4 を刺激することは十分にありうると考えられる。

LREL には多糖が含まれていることから、LREL の BM-DC 活性化能と多糖を認識する PRR である CLR の関係を調べる検討を実施したが、CLR を阻害しても BM-DC 活性化を阻害することはできなかったため、CLR を介した活性化ではないことが示唆された。さらに、BM-DC の貪食作用を止める Cytochalasin D で処理をしても、LREL 画分の BM-DC

活性化能が減弱しなかったことから、LREL は細胞膜に存在する受容体を介して活性化しており、他の代表的な PRR である NLR や RLR を介した活性化でもないことが考えられる。すなわち、LREL が TLR4 のリガンドであり、その他の PRR は活性化しない可能性が高いことを示すことができたと考えられる。

また、LREL で mDC を刺激すると、刺激 3 時間後には NF- $\kappa$ B、c-Jun、IRF-3 が活性化して核内に移行すること、刺激 7 時間後には IRF-7 が活性化して核内に移行することが明らかとなった。これらの分子は転写因子として炎症性サイトカインの発現などに寄与する分子であるが、TLR の刺激によって活性化が誘導されることが知られている(78)。TLR4 の刺激は MyD88 依存的経路を介して NF- $\kappa$ B や AP-1 を活性化するだけでなく、TRIF 依存的な経路で IRF-3 を活性化して、IFN- $\beta$  の産生を促すことが知られている(94,95)。一度 IFN- $\beta$  の産生が誘導されると、ポジティブフィードバック制御が作動し、IRF-7 の発現誘導と活性化が起こることが報告されている(96,97)。すなわち、短時間刺激での MyD88 依存的経路および TRIF 依存的経路の活性化と長時間刺激での IRF-7 活性化は TLR4 刺激の特徴であり、同様の反応が LPS 刺激でも確認できたことから、やはり LREL は TLR4 リガンドであると考えられる。

## 第 5 節 小括

本章では、大麦搗精粕より LREL 画分を抽出し、*in vitro* で BM-DC 活性化能のある分析的に明らかなリグニン・多糖結合体を世界で初めて発見した。LREL 画分の特徴は①分析的に明確なリグニン構造を持ち、②ガラクトースとマンノースが濃縮された多糖を構成し、③リグニンと多糖がエステル結合した、④多量体のリグニン・多糖結合体であることが明らかとなった。また、BM-DC を活性化する分子メカニズムを調べたところ、TLR4 のリガンドであることが明らかとなった。

### 第3章<LRELの *in vivo*での作用と応用開発>

本章では、LREL画分の *in vivo*での作用とその応用開発の例として、経口ワクチンのアジュバントとしての効果について述べる。

#### 第1節 序論

諸言でも述べたとおり樹状細胞は、抗原提示細胞と呼ばれる細胞であり、自然免疫系と獲得免疫系を繋ぐ重要な役割を果たす細胞であることが知られている(12)。抗原提示細胞は食作用によって病原体を細胞内に取り込み、病原体由来の抗原を未成熟なT細胞(naïve T細胞)に提示するが、同時に細胞膜にある共刺激分子が高発現となると共に、炎症性サイトカインが誘導されることによって、抗原特異的な獲得免疫系が成立する(11,98)。前章において、大麦搗精粕より Cellulase/Hemicellulase 処理をした後に得られるリグニン・多糖結合体を含む LREL には *in vitro*において、樹状細胞活性化能があり、その活性化は TLR4 を介して起こるといふ知見を得た(99)。本章では、LREL が *in vivo*でも樹状細胞を活性化させる効果があるかどうかを調べることにした。また、リグニンは消化酵素による消化を受けにくいことが知られていることから(100)、LREL は経口摂取でも生体に免疫賦活作用があると仮説を立て、経口ワクチンのアジュバントとしての効果の有無を検証することを目的とした。

## 第2節 材料と実験手法

### 1. 大麦搗精粕由来 LREL 画分の抽出および加熱・酸処理

第2章第2節1項<リグニン抽出>参照。LRELの加熱は10 mg/mLの濃度となるようにLRELをPBSに懸濁した後、80°Cで5分、1時間、3時間、24時間反応させた。LRELの酸処理は10 mg/mLの濃度となるようにLRELを0.1 N HCl溶液に懸濁し、80°Cで5分、1時間、3時間、24時間反応させた。酸処理後はHClと同量の0.1 N 吸いサイン化ナトリウム水溶液を添加することで中和した。

### 2. 抗体

本検討で使用した抗体の抗原、クローン番号、標識された蛍光色素および購入先を以下のTable. 3-1にまとめた。

### 3. ELISA

本検討で使用したELISAのキットを以下のTable. 3-2に示した。ELISAはキットに付属のプロトコールに従って実施した。

**Table. 3-1 本試験でを使用した抗体一覧**

antigen	clone	Fluorescent	Supplier	antigen	clone	Fluorescent	Supplier
B220	RA3-6B2	PerCP APC-cy7	BD	IFN- $\gamma$	XMG1.2	PE	BD
CD11b	M1/70	APC-cy7	BD	IgA	mA-6E1	FITC	eBio
CD11c	N418	APC PE-cy7	eBio	IgM	II/41	APC	eBio
CD3 $\epsilon$	145-2C11	APC-cy7	BD	IL-12p40 /p70	C15.6	PE	BD
CD4	L3T4	APC	eBio	MHC class II	M5/114.5.2	FITC	eBio
CD44	IM7	PE	eBio	NK1.1	PK136	PE-cy7	eBio
CD86	GL-1	APC	eBio	PDCA-1	JF05-1C2.4.1	APC	Mil
CD8 $\alpha$	53-6.7	PerCP	BD	TNF- $\alpha$	MP6-XT22	FITC	BD

表中の BD は BD Pharmingen、eBio は eBioscience、Mil は Miltenyi Biotec を表す。

**Table. 3-2 本試験でを使用した ELISA キット一覧**

antigen	kit	supplier
IgA	IgA Quantitation kit	Bethyl Laboratories
IgG	IgG Quantitation kit	
IL-12p40	OptEIATM ELISA kit	BD Pharmingen

#### 4. 使用動物

6~10週齢の野生型のC57BL/6J系統およびBALB/C系統のマウスをチャールズリバー社より購入した。全ての動物試験はキリン株式会社の実験動物使用および愛護に関するガイドラインに従い、同社の動物実験委員会の倫理審査の承認を得た後に実施した。マウスは12時間の明期と暗期のサイクルで1ケージに1匹ずつ飼育した。室温は $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $60\pm 15\%$ となるように調整した。

##### 4.1 LRELの単回腹腔内投与

C57BL/6Jマウスを体重および血漿中IL-12p40の濃度を指標に、LREL群とCtrl群の2群に分けた。マウスの血漿は眼底下静脈叢より採取した。LREL群にはLRELを1匹あたり200mg腹腔内投与した。Ctrl群はPBSを投与した。血漿は投与前、投与6時間後、投与24時間後に採取した。投与24時間後にマウスを安楽死させ、脾臓(SPN)を採材した。LREL投与に対するリンパ球の活性の変化をFACS分析(本節7項参照)で、NK細胞の活性を細胞傷害アッセイ(本節8項参照)で評価した。

##### 4.2 LRELの経口投与

C57BL/6Jマウスを体重および血漿中IL-12p40の濃度を指標に、LREL群とCtrl群の2群に分けた。単回投与試験ではマウスを12時間絶食させたのち、LRELをPBSに懸濁させ、10mg強制経口投与した。Ctrl群のマウスはPBSを投与した。投与24時間後に全てのマウスを安楽死させ、腸間膜リンパ節(MLN)を採材して、リンパ球の活性をFACS分析で評価した。

LRELの長期投与試験では、LREL群のマウスはAIN93G(オリエンタル酵母社)にLRELが1日あたり10mgの摂取量となるように混餌して投与した。Ctrl群のマウスはLRELが入っていないAIN93Gを食べさせた。LRELを2週間投与した後、全てのマウスを安楽死させ、MLNを採材して、リンパ球の活性をFACS分析で評価した。

##### 4.3 経口免疫による抗原特異的な抗体産生効果

経口免疫の方法は過去の知見に倣って実施した(101)。具体的には、BALB/cマウスを、体重を指標にLREL群とCtrl群の2群に分けた。経口免疫はFigure. 3-1に示すプロセスで実施した。マウスを12時間絶食させた後、500 $\mu\text{L}$ の0.1M炭酸水

素ナトリウム溶液を強制経口投与することで、胃酸を中和した。さらに 30 分後、1 mg ovalbumin (OVA、生化学工業社)と 1 mg LREL をゾンデで経口投与した。経口免疫を群分け後 0, 7, 14, 21 日目の計 4 回実施し、最後の経口免疫から 2 週間後にマウスを安楽死させ、血漿、小腸洗浄液、パイエル板(PP)を採材した。小腸洗浄液は小腸の盲腸より 10 cm の部分を切除し、小腸間腔側に Protease inhibitor cocktail (BioVision 社)を混ぜた PBS を 4 mL 通過させることで得た。血漿および小腸洗浄液は抗体価を ELISA で評価し、PP は B 細胞の活性を FACS 分析で評価した。

OVA 特異的な抗体価は既報の方法を改変して測定した(102)。具体的には、Maxisorb ELISA plate (NUNC 社)に 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の OVA 溶液を 100  $\mu\text{L}$  添加し、室温で一晩静置して、コーティングした。ブロッキングを行った後、血漿や小腸洗浄液などのサンプルを添加し、室温で 2 時間静置した。検出用の抗体として、HRP 結合抗マウス IgG 抗体(Bethyl Laboratories 社)または HRP 結合抗マウス IgA 抗体 (Bethyl Laboratories 社)を用い、常温で 1 時間反応させた。抗体を十分に洗浄した後、TMB substrate (e-Bioscience 社)で反応させ、発色後は 1 M リン酸で反応を停止させ、405 nm の波長の吸光度を測定した。

#### 5. 細胞の調製と低密度細胞の分画

SPN および MLN リンパ球および低密度細胞の分画は過去の知見に従って調製した(70)。具体的には SPN または MLN を裁断した後、 $\text{Mg}^{2+}$ および  $\text{Ca}^{2+}$ 非含有 HBSS に入れ、1 mg/mL の Collagenase IV (Sigma 社)、0.2 mg/mL の DNase I (Roche 社)を添加し、スターラーで攪拌しながら 37°C で 20 分間酵素処理した。酵素処理は EDTA を終濃度 30 mM となるように添加して止めた。SPN については、0.164 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液に常温で 2 分間曝露することで、赤血球を溶血させた。最後にセルストレーナー(BD 社)に通すことで、全リンパ球を得た。低密度の細胞は全リンパ球を HBSS で再懸濁した後、終濃度 15%で Histodenz (Sigma-Aldrich 社)を溶解させた RPMI-1640 培地に重層し、450 x  $g$  で 20 分間遠心したあと、RPMI 層と HBSS 層の中間層を回収することで得た。

#### 6. 骨髄細胞由来樹状細胞(BM-DC)の誘導と活性測定

第 2 章第 2 節 6 項<骨髄細胞由来樹状細胞(BM-DC)の誘導とリグニン画分の樹状細胞活性化効果検証>参照。

## 7. 細胞内サイトカイン染色と FACS 分析

樹状細胞のサイトカイン産生細胞は、まず低密度細胞を Leukocyte Activation Cocktails (BD Biosciences 社)と共に DC 培地で一晩培養した。培養した細胞を回収し、樹状細胞の細胞表面マーカーを染色した後、細胞を Cytofix/ Cytoperm (BD Biosciences 社)で固定し、抗 IL-12p40 抗体および抗 TNF- $\alpha$ 抗体で染色した。T 細胞と NK 細胞のサイトカイン産生細胞については、全リンパ球を Leukocyte Activation Cocktails と共に DC 培地で 4 時間培養した後、上記の方法と同様に Cytofix/Cytoperm をを使用して染色した。染色した細胞の FACS 分析方法については、第 2 章第 2 節 7 項<FACS 分析>参照。BM-DC の mDC は CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> と定義した。SPN および MLN の mDC は CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> PDCA-1<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup> DC は CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> PDCA-1<sup>-</sup>、pDC は CD11c<sup>int</sup> PDCA-1<sup>+</sup>と定義した。また、NK 細胞は CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>、T 細胞は CD3  $\epsilon$ <sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>、B 細胞は CD19<sup>+</sup> CD3  $\epsilon$ <sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>と定義した (Figure. 3-2)。



## 8. 細胞傷害アッセイ

SPN の NK 細胞の細胞傷害活性は過去に報告された方法に改変を加えて測定した(103)。具体的には、SPN リンパ球を Effector 細胞、Yac-1 細胞(理研 BRC)を Target 細胞とし、Effector 細胞と Target 細胞の比率(E:T ratio)を 100:1 から 12.5:1 まで条件を変えて共培養した。Yac-1 細胞は  $1 \times 10^6$  cells/mL の濃度で RPMI-1640 培地に懸濁した後、Calcein-AM (Molecular Probe 社)を終濃度  $15 \mu\text{M}$  となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分混合させて、細胞を染色した。丸底の 96-well plate に Calcein-AM 染色した Yac-1 細胞を  $1 \times 10^4$  cells、SPN 細胞を  $1 \times 10^6$  cells から  $1.25 \times 10^5$  cells の間で播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーターで 4 時間培養した。培養終了後、培養上清を別のプレートに取り分け、Spectra Gemini microplate spectrofluorimeter (Molecular Devices 社)を用いて、蛍光励起波長を  $485 \pm 9 \text{ nm}$ 、蛍光検出波長を  $530 \pm 9 \text{ nm}$  として培養上清中の蛍光強度を測定した(test release)。自発的な蛍光強度(spontaneous release)については培養時に Yac-1 細胞のみを添加し、SPN 細胞を入れなかったものを測定した。また、Yac-1 細胞が全て傷害を受けたときの蛍光強度(maximum release)は Yac-1 細胞を 2% Triton X-100 で溶解させたものを測定した。これらを元に、SPN 細胞の細胞傷害割合を以下に示す式で算出した。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100 (\%)$$

### Yac-1 細胞に対する細胞傷害割合の計算式

## 9. 統計処理

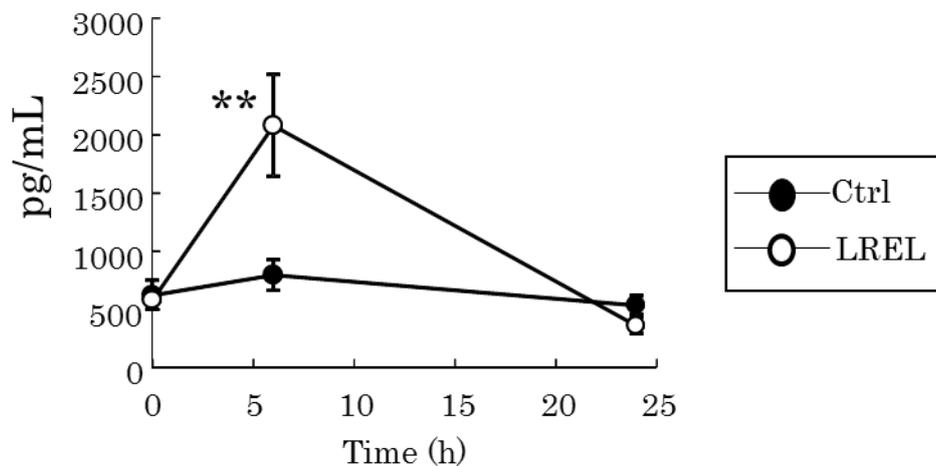
得られたデータは全て平均値±標準偏差で示した。*in vivo* の研究については、全て unpaired Student's *t* test で統計解析し、有意水準を 5%とした。また、*in vitro* の検討については、一元配置分散分析(one-way ANOVA)を実施し、多重比較検定として、Bonferroni 補正を実施し、有意水準を 5%とした。全ての統計解析は Excel 統計 2015 を用いて実施した。

### 第3節 結果

#### 1. LREL を腹腔内に単回投与した時の全身性免疫系に対する作用

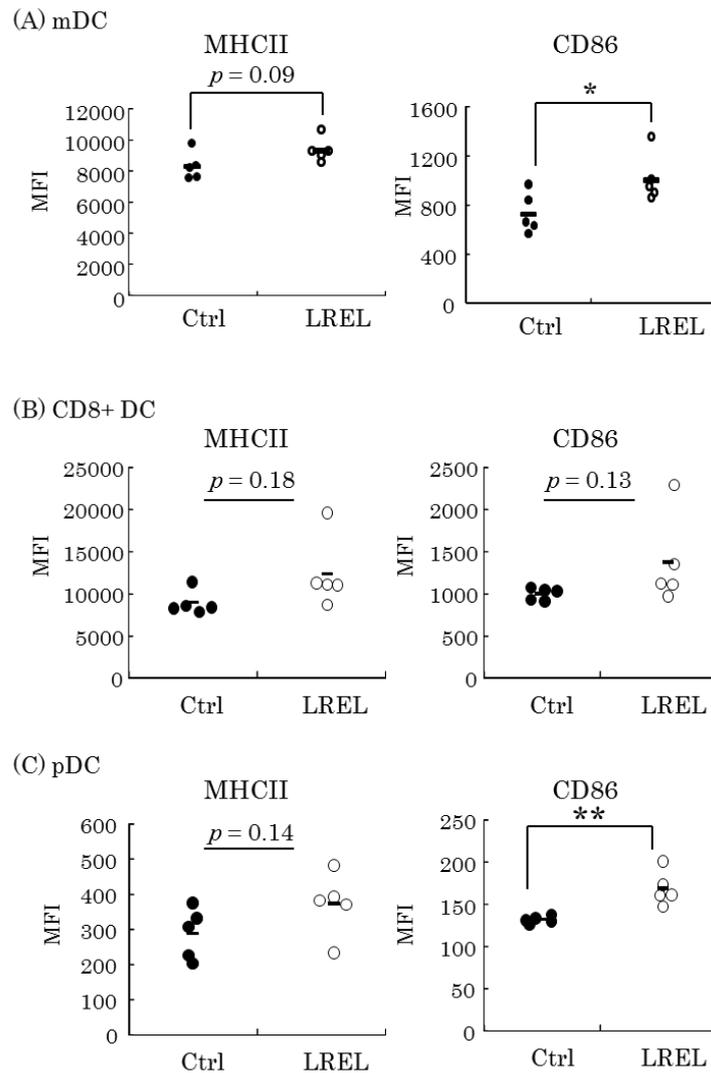
前章で証明した LREL の樹状細胞活性化能に関して、*in vivo* でも同様の効果が認められるかどうかを検証することを目的として、マウスに 200 µg/head となるように腹腔内投与した経時的な血漿中の炎症性サイトカインの濃度を測定したところ、IL-12p40 の濃度が投与 6 時間後に一過的に上昇し、投与 24 時間後には元の濃度に戻っていた(Figure. 3-3A)。また、SPN 中の樹状細胞の活性を調べたところ、mDC において、活性化マーカーである CD86 の発現が統計的に有意に上昇しており、MHCII の発現が有意傾向に上昇していたことから、mDC の活性化が確認できた(Figure. 3-4 A)。CD8+ DC については、CD86、MHC II 共に発現量の平均値は上昇していたが、いずれも統計的に有意な差は認められなかった(CD86:  $p = 0.13$ , MHC II:  $p = 0.18$ )(Figure. 3-4 B)。また、pDC の CD86 の発現は統計的に有意に上昇していたが、MHC II の発現は有意ではなかった( $p = 0.14$ )(Figure. 3-4 C)。これらの結果から、LREL は *in vivo* でも樹状細胞を活性化する効果があることが示唆されたが、中でも mDC が一番反応しやすい樹状細胞のサブセットであると考えられた。そのため、今後の研究では mDC に着目して研究を実施した。また、炎症性サイトカインを産生している mDC の比率を比較したところ、IL-12p40 産生性 mDC の比率は LREL 投与によって有意に上昇していたが、TNF- $\alpha$ 産生性の mDC の比率には変化がなかった(Figure. 3-5 A~C)。

NK 細胞は自然免疫系を代表する免疫細胞の 1 つであり、これまでの研究より、TLR4 リガンドによって、直接的にも(104)間接的にも(105)活性化されることが知られている。そこで、LREL の NK 細胞に対する作用を FACS 分析で解析したところ、活性化マーカーである CD44 の発現が統計的に有意に上昇していた(Figure. 3-6A)。さらに、IFN- $\gamma$ 産生性 NK 細胞の比率が LREL 群の SPN の NK 細胞でコントロール群と比較して有意に上昇したことから(Figure. 3-6 B,C)、NK 細胞の活性化が起こったと考えられた。そこで、Yac-1 細胞を用い SPN 細胞の細胞傷害活性を調べたところ、LREL 投与群において、Yac-1 細胞に対する細胞傷害活性の有意な上昇が確認された(Figure. 3-6 D)。以上の結果より、LREL の腹腔内投与によって、樹状細胞のみならず、NK 細胞も活性化していることが確認できた。すなわち、LREL は *in vitro* のみならず(99)、*in vivo* でも自然免疫系を活性化できることが確認された。



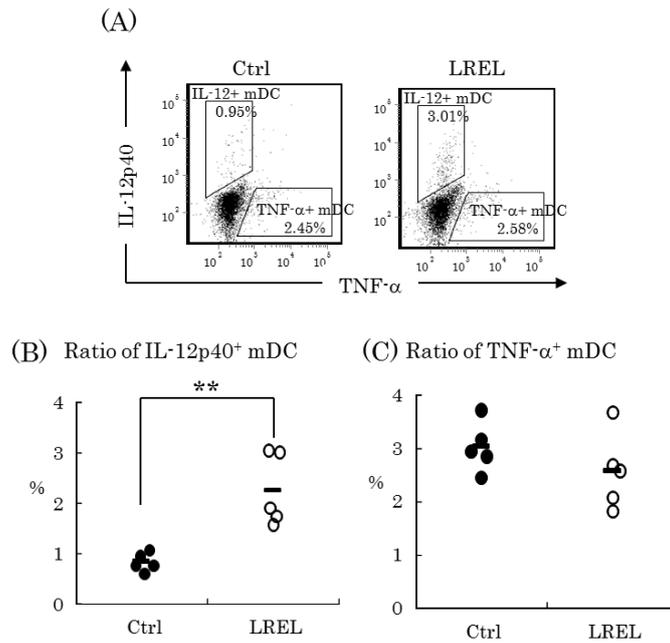
**Figure. 3-3** LREL を腹腔内投与したときの血漿中 IL-12p40 濃度の経時的変化

健常な C57BL/6J マウスに 200  $\mu$ g の LREL を腹腔内投与し、経時的な血漿中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した(n=5)。コントロール群を基準に LREL 群の変化を Student *t* 検定で解析し、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。



**Figure. 3-4 LREL を腹腔内投与したときの脾臓中の DC の細胞表面マーカーの発現**

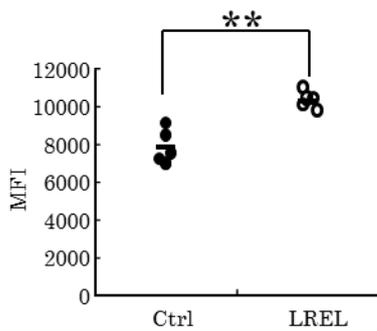
LREL を腹腔内投与して 24 時間後の脾臓の DC 活性を測定した。細胞表面における活性化マーカーの発現強度を、FACS を用いて測定し、MFI で表記した。 **(A)** mDC の MHCII および CD86 発現強度。 **(B)** CD8+ DCs の MHCII および CD86 発現強度。 **(C)** pDC の MHCII および CD86 発現強度。 mDC は CD11c+ CD11b+ CD8α- PDCA-1-, CD8+ DCs は CD11c+ CD11b- CD8α+ PDCA-1-, pDCs は CD11c<sup>int</sup> PDCA-1+ と定義した。グラフ中の短線は平均値を表記した(n=5)。コントロール群を基準に Student *t* 検定を実施し、 $p < 0.05$  を\*と、 $p < 0.01$  を\*\* と表記した。



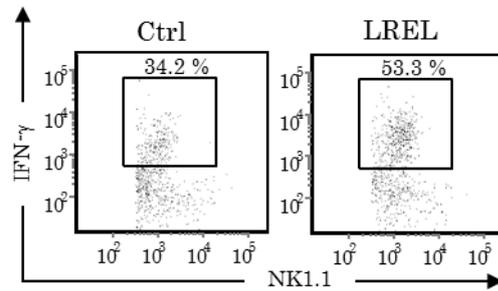
**Figure. 3-5 LREL 腹腔内投与による脾臓におけるサイトカイン産生性 mDC の比率**

LREL を腹腔内投与して 24 時間後の脾臓の DC 活性を測定するため、IL-12p40 産生および TNF- $\alpha$  産生性 mDC の比率を FACS で測定した。(A) IL-12p40 産生および TNF- $\alpha$  産生性 mDC を測定した代表的なプロット図。(B) IL-12p40 産生 mDC の比率。(C) TNF- $\alpha$  産生 mDC の比率。グラフ中の短線は平均値を表記した(n=5)。コントロール群を基準に Student *t* 検定を実施し、 $p < 0.05$  を\*と、 $p < 0.01$  を\*\* と表記した。

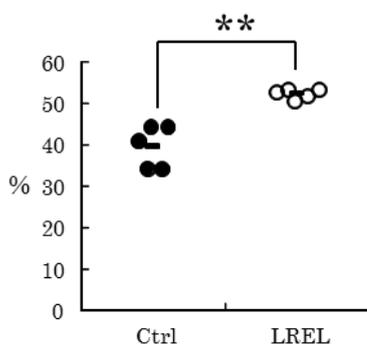
(A) CD44 expression on NK cells



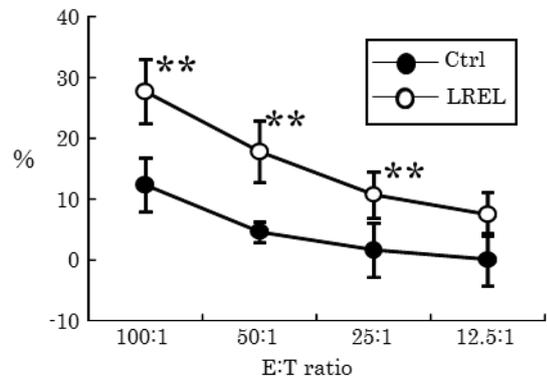
(B)



(C) Ratio of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells



(D) Cytotoxicity against Yac-1 cells



Effector cell: splenocytes

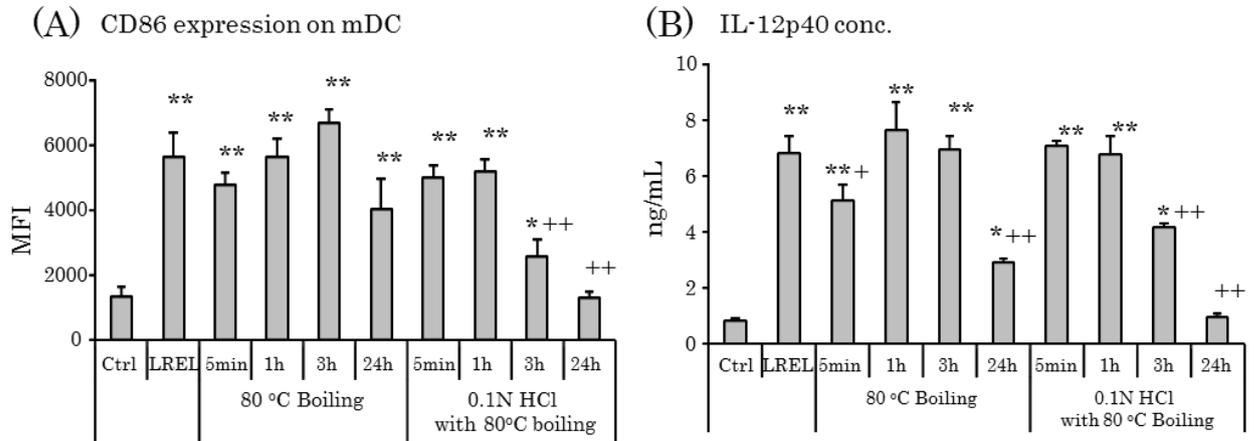
Target cell: Yac-1 (mouse lymphoma)

**Figure. 3-6 LREL 腹腔内投与による脾臓 NK 細胞の活性化効果**

LREL を腹腔内投与して 24 時間後の脾臓 NK 細胞の活性を調べた。細胞表面マーカーの発現や IFN- $\gamma$  産生細胞の比率は FACS を用いて測定した。NK 細胞は NK1.1<sup>+</sup> CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup> と定義し、発現強度は MFI で表記した。(A) NK 細胞の CD44 発現強度の比較。(B) IFN- $\gamma$  産生 NK 細胞の解析を行った代表的なプロット図。(C) IFN- $\gamma$  産生 NK 細胞の比率の比較。(D) Yac-1 細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性の比較。全脾臓リンパ球と Calcein-AM でラベルした Yac-1 細胞を様々な E:T 比で共培養し、4 時間後の Yac-1 の死滅率を算出した。(A) および(C)の短線は平均値を表し、(D)のデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した(n=5)。コントロール群を基準に LREL 群の変化を Student *t* 検定で解析し、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

## 2. 酸処理と LREL の樹状細胞活性化作用との関係

前章でも示したように、LREL 画分は特徴的な分子構造のリグニン・多糖結合体を含んでいる。リグニンは一般的に難消化性物質であるとされていることから(100)、経口で投与しても樹状細胞の活性化能を失わないことが考えられる。そこで、LREL 画分の活性の安定性を調べることを目的として、LREL 画分を熱処理または酸処理して、BM-DC の活性化に与える影響を CD86 の発現および IL-12p40 の産生量を測定することで評価した。すると、熱処理に関しては、CD86 発現の観点でも、IL-12p40 産生量の観点でも、3 時間の処理までは BM-DC 活性化能の減弱は認められなかった。一方で、0.1N 塩酸処理については、1 時間の処理までは BM-DC 活性化能の減弱は認められなかったが、3 時間処理からは減弱が認められ、24 時間処理ではその減弱幅が大きくなった(Figure. 3-7)。経口で食された食物繊維が胃で滞留する時間は一般的に 2~3 時間程度と知られていることから、本結果は LREL を経口で摂取しても、胃酸に耐性を示し、樹状細胞活性化能を維持した状態で消化管を通ることが可能であり、経口投与時に生体の樹状細胞を活性化する効果が認められる可能性が示唆された。



**Figure. 3-7 LREL の樹状細胞活性化能に対する熱および酸処理の影響**

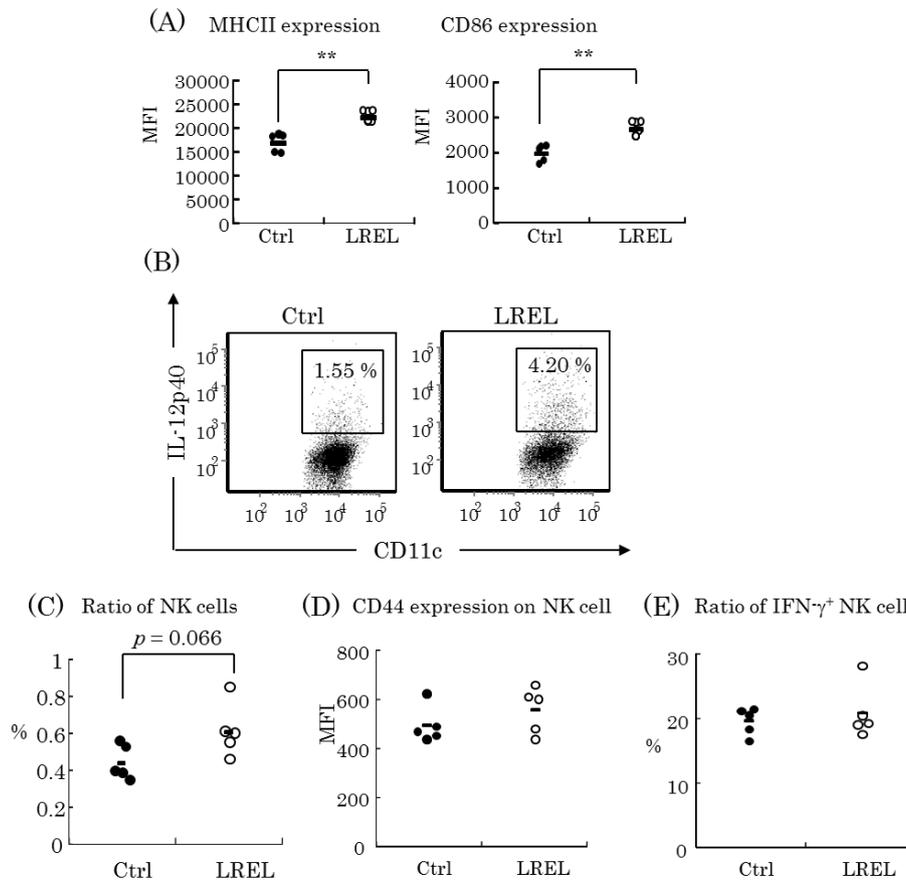
LREL をいくつかの異なる条件で加熱または酸処理を行った後、BM-DC に添加し、24 時間後に細胞表面の CD86 の発現強度を FACS で、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA で測定した。mDC は CD11b+ CD11c+ B220- と定義した。非処理の LREL をポジティブコントロールとした。(A) mDC の細胞表面 CD86 の発現強度。MFI で表記した。(B) 培養上清中の IL-12p40 濃度。棒グラフは n=3 で測定した時の平均値を表し、エラーバーは標準偏差で表した。多重比較検定を行い、post hoc test として Bonferroni 補正を行った。BM-DC に何も添加しなかったコントロール(Ctrl)を基準に  $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。また、加熱または酸処理を行っていない LREL(LREL)を基準に  $p < 0.05$  を+、 $p < 0.01$  を++ と表記した。

### 3. LREL を経口で単回投与した時の腸管免疫系に対する作用

LREL を経口で投与した時の樹状細胞に与える影響を評価することを目的として、マウスに 10 mg/head となるように、LREL をゾンデで経口投与し、投与 24 時間後の MLN の mDC の活性を評価した。すると、MLN の mDC において、CD86 および MHC II の発現量が有意に上昇し(Figure. 3-8 A)、IL-12p40 産生性 mDC の比率が上昇した(Figure. 3-8 B)。また、MLN において、NK 細胞の比率が LREL を投与することによって、有意傾向に上昇したが( $p = 0.066$ ) (Figure. 3-8 A)、活性化マーカーである CD44 の発現量や IFN- $\gamma$ 産生性 NK 細胞の割合に変化は認められなかった(Figure. 3-8 B, C)。

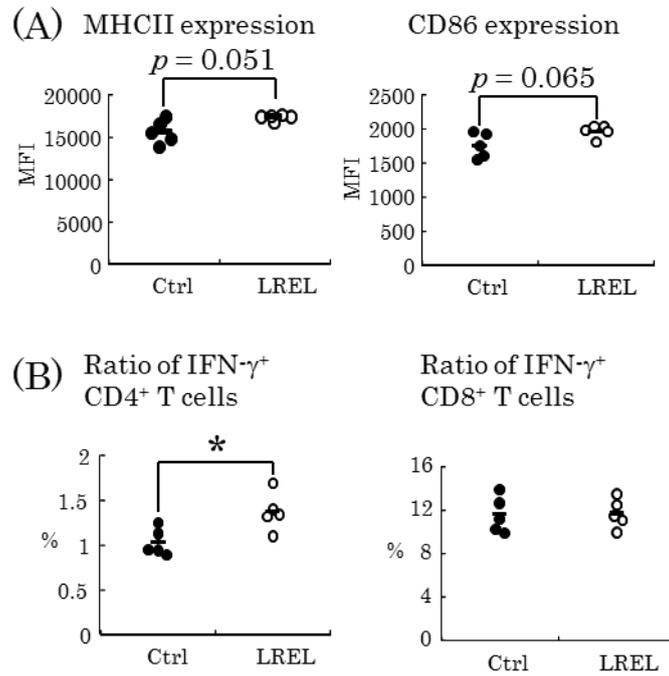
### 4. LREL を経口で継続的に投与した時の腸管免疫系に対する作用

次に、LREL を長期で経口投与した時の免疫系に対する作用を検討することを目的として、マウスに LREL が 10 mg/head/day となるように混餌で 2 週間投与した。2 週間の混餌投与の間に両群間で体重に差は見られなかった。MLN の mDC の活性を比較したところ、LREL 群において、CD86、MHC II 共に有意傾向に発現が上昇していた(CD86:  $p = 0.065$ , MHC II:  $p = 0.051$ ) (Figure. 3-9 A)。また、IFN- $\gamma$ 産生 CD4+ T 細胞の比率が LREL 群で有意に増加していたが、IFN- $\gamma$ 産生 CD8+ T 細胞の比率は両群間で差が認められなかった(Figure. 3-9 B)。これらの結果から、LREL を 2 週間経口投与することで、腸管の自然免疫系だけではなく、獲得免疫系の細胞も活性化することが考えられた。



**Figure. 3-8** LREL を経口で単回投与したときの粘膜面の樹状細胞およびNK細胞の活性に与える影響

健常な C57BL/6J マウスに 10 mg の LREL を経口で投与し、24 時間後に MLN の mDC およびNK細胞の活性を、FACS を用いて測定した。mDCs は CD11c+ PDCA-1- CD11b+、NK細胞は NK1.1+ CD3ε- と定義した。(A) mDC の MHCII (左)および CD86 (右)の発現強度(MFI で表記)。(B) IL-12p40 産生 mDCs の代表的なプロット図。同一グループ内の MLN より得られた低密度細胞を全て合わせたあと、FACS で測定した。(C) NK細胞比率の比較。(D) NK細胞の細胞表面の CD44 発現強度(MFI で表記)。(E) IFN-γ産生NK細胞の比率の比較。(A), (C)-(E)のグラフ中の短線は平均値を表す(n = 5)。コントロール群を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

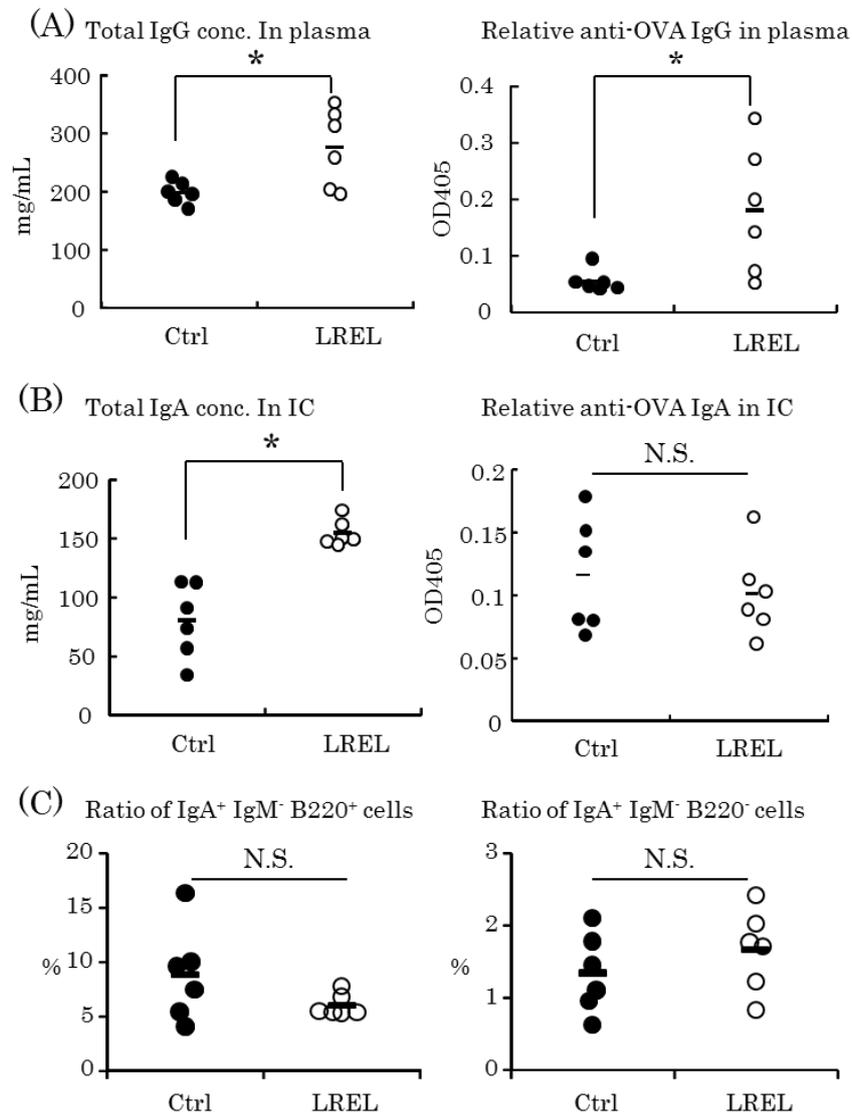


**Figure. 3-9** 継続的な LREL の経口投与が腸管の免疫系に与える効果

健常な C57BL/6J マウスに対して、10mg/head/day となるように LREL を AIN93G に混餌して 2 週間投与した。コントロール群は LREL を混ぜない AIN93G を投与した。その後、MLN の mDC および T 細胞の活性を、FACS を用いて測定した。mDC は CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> PDCA-1<sup>-</sup>、T 細胞は CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> と定義した。(A) mDC 細胞表面の MHCII (左) および CD86 (右) の発現強度 (MFI で表記)。(B) IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup> T 細胞 (左) および CD8<sup>+</sup> T 細胞 (右) の比率の比較。グラフ中の短線は平均値を表す。コントロール群を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*と表記した。

## 5. LREL の経口ワクチンアジュバントとしての作用検討

LREL の経口投与により、獲得免疫系である CD4+ T 細胞の活性化が確認できたことから、LREL を抗原と一緒に投与することで抗原特異的な獲得免疫が誘導され、ワクチンアジュバント効果が発揮される可能性が示唆された。その仮説を検証することを目的として、Figure. 3-1 に示したようなスキームで、OVA を抗原として LREL の同時投与が抗原特異的な抗体価およびトータルの抗体価に与える影響を調べた。BALB/C マウスに OVA が 1 mg/head、LREL が 1 mg/head となるように週に一度、合計で 4 度経口免疫し、最後の経口免疫から 2 週間後の血漿中の抗体価および小腸洗浄液中の抗体価を測定した。すると、血漿中のトータル IgG 抗体価および OVA 特異的 IgG 抗体価が LREL 群において有意に増加した(Figure. 3-10 A)。また、小腸洗浄液中のトータル IgA 抗体価が LREL 群において有意に増加した。一方で、OVA 特異的 IgA 抗体価は両群間で差が認められなかった(Figure. 3-10 B)。腸管における B 細胞のクラススイッチの機構を調べるために、PP の B 細胞を FACS 分析で調べたところ、IgA にクラススイッチした IgA+ IgM- B220+ B 細胞も、IgA 産生細胞に分化する直前の細胞である IgA+ IgM- B220- B 細胞も両群間で差が認められなかった(Figure. 3-10 C)。すなわち、LREL を抗原と共に経口で投与すると、全身の免疫系において抗原特異的な獲得免疫系が活性化されて、トータル IgG および抗原特異的 IgG の産生が誘導される。一方で、粘膜免疫系は自然抗体として機能するトータル IgA の産生のみが誘導されるが、抗原特異的な獲得免疫系の誘導が起こっていない可能性が示唆された。



**Figure. 3-10 LREL と OVA の同時経口投与時の血液中の IgG および粘膜面の IgA 産生に与える影響**

Figure. 3-1 に示す通りのスキームで健常な BALB/C マウスに LREL および OVA を断続的に経口投与し、血漿および小腸洗浄液中の抗体価を ELISA で、PP における B 細胞の比率を FACS で測定した。(A) 血漿中のトータル IgG 濃度(左)と相対的な anti-OVA IgG 濃度(右)。(B) 小腸洗浄液中のトータル IgA 濃度(左)と相対的な anti-OVA IgA 濃度(右)。(C) PP における IgA<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> B 細胞の比率(左)と IgA<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> B 細胞の比率(右)。B 細胞は CD19<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> と定義した。グラフ中の短線は平均値を表す(n = 6)。コントロール群を基準に Student *t* 検定を行い、*p* < 0.05 を\*と表記した。

#### 第4節 考察

本章では、第2章で新規TLR4リガンドとして単離した大麦搗精粕由来のLRELが *in vivo* で樹状細胞活性化能を示すかどうかを腹腔内投与と経口投与の2つの投与経路から検証した。LRELを腹腔内投与すると、LRELを投与することによって、炎症性サイトカインであるIL-12p40の血漿中の濃度が一時的に上昇することが確認された。また、FACS分析によって、mDCのCD86およびMHCIIの発現が上昇し、かつIL-12p40産生性mDCの割合が増加していたことから、mDCが活性化していることが確認された。すなわち、LRELの腹腔内投与により、*in vivo* でも樹状細胞が活性化することが明らかとなった。

LRELが *in vivo* で樹状細胞を活性化できたため、樹状細胞と同じ自然免疫系の他の免疫細胞も活性化できる可能性を考え、NK細胞の活性を測定した。CD44はNK細胞の細胞傷害活性のトリガーとなる分子であるため、NK細胞が活性化すると発現が上昇することが知られているが(106,107)、NK細胞細胞表面のCD44の発現に有意な上昇が確認された。また、IFN- $\gamma$ はNK細胞が産生する、最も主要なサイトカインであり、活性化すると産生されることが知られているが(108,109)、IFN- $\gamma$ 産生NK細胞の割合が有意に上昇することが確認された。Yac-1細胞はマウスリンパ腫由来の細胞株であり、NK細胞のターゲット細胞として知られている細胞であるが(110)、Yac-1細胞に対するSPNリンパ球の細胞傷害活性が有意に上昇していることが確認された。これらの結果から、LRELの腹腔内投与は樹状細胞だけではなく、NK細胞も活性化することが明らかとなった。NK細胞にはTLR4が発現しており、TLRリガンドによって直接的に活性化されることが知られているが(104)、樹状細胞が活性化したときに産生するサイトカインであるIL-12やIL-15によっても活性化することが知られている(111,112)。TLR4リガンドであるLRELを腹腔内投与すると、樹状細胞が活性化され、血漿中のIL-12p40の濃度が上がるデータもあることから、LREL投与によるNK細胞の活性化は直接的なメカニズムだけではなく、間接的なメカニズムでも起こっていると考えられた。

今回の試験でLRELを熱や酸で処理をしても、樹状細胞活性化能が3時間以上消失しないことが明らかとなり、高温条件やpHの低い環境に耐性があることが示された。さらに、リグニン・多糖結合体はこれまでの研究から、消化酵素による消化を受けにくいことが示唆されていることから(100)、経口投与でも樹状細胞活性化能が消失しないと考えられた。実際に、マウスに単回でLRELを経口投与すると、MLNのmDCにおいて、CD86およびMHCIIの発現量の上昇に加え、IL-12p40産生性mDCの比率の上昇が確認され、経口投与でも樹状細胞の活性化能があることが明らかとなった。さらに、MLNのNK細胞の比率の

上昇を確認することができ、経口投与でも腸管免疫系において、樹状細胞だけではなく自然免疫が活性化できることが示された。NK 細胞は樹状細胞が活性化したリンパ節に遊走されて、自身が活性化して自然免疫系の細胞として、細胞傷害活性を持つことに加えて、獲得免疫系を誘導する作用があることが示されている(113)。そのため、LREL の継続的な経口摂取は自然免疫系の活性化のみならず、獲得免疫系の活性化にも繋がる可能性が示唆された。そこで、LREL を 2 週間継続的に混餌で摂取させたところ、MLN における IFN- $\gamma$  産生性 CD4+ T 細胞の比率の上昇が確認でき、獲得免疫系も誘導されていることが確認された。この検討において、mDC の活性化マーカーである MHCII と CD86 の発現上昇は有意傾向となり、単回投与の試験よりも活性化度が低くなったような結果となったが、免疫系は恒常性の観点で常に活性化状態を維持することがないことに起因すると考えられる。以上の結果から、LREL は自然免疫系だけではなく、獲得免疫系を活性化させる素材であることが示唆された。

LREL の経口投与が獲得免疫系の活性化に寄与する可能性が示唆されたことから、抗原特異的な獲得免疫系の誘導の可否を検証することとし、OVA を抗原として、LREL をアジュバントとして断続的に経口で投与した。すると、血漿中において、トータル IgG および anti-OVA IgG の濃度がコントロール群と比較して有意に上昇し、全身免疫において、抗原特異的な獲得免疫系が誘導されていることが明らかとなった。さらには小腸洗浄液中のトータル IgA の濃度も上昇した。しかしながら、anti-OVA IgA 濃度の上昇は確認できなかった。腸管における IgA のクラススイッチは T 細胞依存的なクラススイッチと T 細胞非依存的なクラススイッチの 2 つの異なるメカニズムで起こることが知られている(114)。T 細胞依存的なクラススイッチは主に PP で起こる(115)。一方で、T 細胞非依存的なクラススイッチは粘膜固有層や孤立性リンパ濾胞で起こることが知られている(116,117)。本試験では、PP において、IgA にクラススイッチした細胞であることを示す IgA+ IgM- B220+ B 細胞や IgA+ IgM- B220- B 細胞の比率が Ctrl 群と LREL 群との間で差が認められなかったことから、PP で起こる T 細胞依存的なクラススイッチではなく、T 細胞非依存的なクラススイッチが起こったと考えられる。実際に、B-1 B 細胞は、粘膜固有層において、T 細胞非依存的なクラススイッチによる IgA の産生に寄与していることが報告されているが(118)、さらに TLR4 リガンドである LPS を経口で投与することによって活性化することが報告されている(119)。さらに、小腸上皮は TLR4 の刺激を受けると、IgA のクラススイッチに関わる APRIL や BAFF と言った遺伝子の発現を亢進し、粘膜固有層に B 細胞を遊走させることが示されている(116)。LREL も TLR4 リガンドであることから(99)、これらの反応が生体内

で生じ、T細胞非依存的なクラススイッチが起こって、トータルIgAの濃度を上昇させたと考えられる。小腸洗浄液中にanti-OVA IgAの濃度が上昇しなかったのも、このT細胞非依存的なクラススイッチが起こったとすれば説明がつけられる。IgAやIgMは自然抗体と呼ばれ、IgGと比較して抗原に対するアフィニティが低いことが知られている(120,121)。一方で、粘膜では抗原を捉え、体内に侵入するのを防ぐことができれば十分であるため、トータルIgAが上昇しただけでも、粘膜における生体防御効果は十分に見込めると考えられる。

経口で投与された抗原は主に2つの方法で腸管の樹状細胞に取り込まれる。1つ目は抗原が腸上皮に存在するM細胞を通過して、PPの上皮層に存在する樹状細胞が取り込む方法である(122)。2つ目は粘膜固有層の上皮層にいる樹状細胞が樹状突起を間腔側に伸ばし、間腔側より直接抗原を取り込む方法である(123,124)。抗原が樹状細胞に貪食された後は、樹状細胞は腸管より最も近いMLNに移動し、naïve CD4+ T細胞に抗原を提示することが報告されている(125,126)。これまでの結果から、LRELを経口で摂取するとMLNの樹状細胞は活性化することが確認されていることから、この樹状細胞の活性化を通じて、全身性の液性免疫系が誘導され、結果として、total IgGとanti-OVA IgGがLREL群において、Ctrl群と比較して増加したものと考えられ、LRELが経口ワクチンのアジュバントとして使用できる可能性を見出すことができた。

## 第5節 小括

本章では大麦搗精粕由来のLREL画分が*in vitro*だけではなく*in vivo*でも樹状細胞活性化能があることを示し、LRELが免疫調節機能をもつ新規の機能性食品素材として使用できる可能性を見出すことができた。さらに、LREL画分が経口ワクチンのアジュバントとして使用できる可能性を見出す基盤となるような結果を得た。ヒトのワクチンのアジュバント開発には、効果、安全性、安定性の観点で非常に厳密なデータの取得が必要だとされているが(127)、本試験で必要最小限のデータを取得できたと考えられる。

## 第4章 < *Lactococcus lactis* strain Plasma の抗老化機能の検証 >

本章ではプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)を活性化し、IFN- $\alpha$ 産生を誘導する乳酸菌(128)の抗老化機能に関する検証結果を報告する。

### 第1節 序論

老化とは加齢依存的にまたは加齢によって進行する臓器や組織において生理機能を失う現象である(129,130)。個体レベルでは、そのときの体の状態や機能が、生物として生存可能であるかどうかや、生殖して子孫を残すことができるかどうかで老化しているかが決定する(131)。また、組織レベルでは、加齢に伴って、例えば筋肉の減少によるサルコペニアや皮膚萎縮、骨粗鬆症や脊柱後弯など老化形質が生じる。一方で、老化に伴う機能不全は免疫機能でも例外はなく、免疫老化と呼ばれている(39)。IFN- $\alpha$ は、type I IFN の1つであり、ウイルス感染などに反応して、pDC から多く産生されるサイトカインである(132)。IFN- $\alpha$ は pDC 以外の細胞に働きかけて、インターフェロン応答遺伝子(interferon stimulated gene, ISG)と呼ばれる抗ウイルス作用のある遺伝子の発現を亢進するなど、抗ウイルス反応を誘導することが知られている(133,134)。pDC および pDC より産生される IFN- $\alpha$ は自然免疫系である NK 細胞だけではなく(135)、獲得免疫系の細胞である T 細胞(136-138)や B 細胞(139,140)の機能にも影響を与えることが報告されている。すなわち、pDC は抗ウイルス免疫系において、司令塔的な役割をしている(Figure. 4-1)。

*Lactococcus lactis* strain Plasma(以下、LC-Plasma)は *Lactococcus lactis* supsp *lactis* JCM 5805 の別称である。マウス骨髄細胞から誘導した pDC を活性化させ(Figure. 4-2)、IFN- $\alpha$ 産生を誘導する乳酸菌として、120 株以上の乳酸菌の中から選抜された(128)。また、LC-Plasma は TLR9 を刺激して IFN- $\alpha$ 産生を誘導することがわかっており、IFN- $\beta$ や IFN- $\lambda$  など、抗ウイルス反応を誘導することが知られている IFN の産生も同時に誘導することが示されている(128)。LC-Plasma の IFN- $\alpha$ 産生をもたらす活性本体は genome DNA であることが示されており、pDC 活性化効果は LC-Plasma が生菌であろうと死菌であろうと発揮されることも確認されている(128)。また、LC-Plasma 刺激によって産生された液性因子により、Type I IFN シグナル経路を介して、*in vitro* でデングウイルスに対する増殖抑制効果が得られている(141)。

LC-Plasma の pDC 活性化能は *in vitro* だけではなく、*in vivo* でも示されている。正常なマウスに 2 週間 LC-Plasma を投与すると、MLN において、pDC が活性化することが示されている(128)。さらには、上気道に感染するパラインフルエンザウイルスの感染に対し

ては、死亡率の低減や肺炎症状の改善効果が認められている(142)。腸管に感染するロタウイルスの離乳前マウスへの感染に対しては、体重の増加率の回復、糞便の下痢スコアの改善、糞便中のウイルス量低減効果が認められている(143)。さらには蚊を媒介して、血液中に直接感染するデングウイルスの感染に対してはSPN中のウイルス量の低減や血液中のウイルス分子であるNS-1抗原の低減効果が認められている(144)。これらのデータはLC-Plasma投与により、pDCの活性化を介して、抗ウイルス効果が発揮されていることを示している。

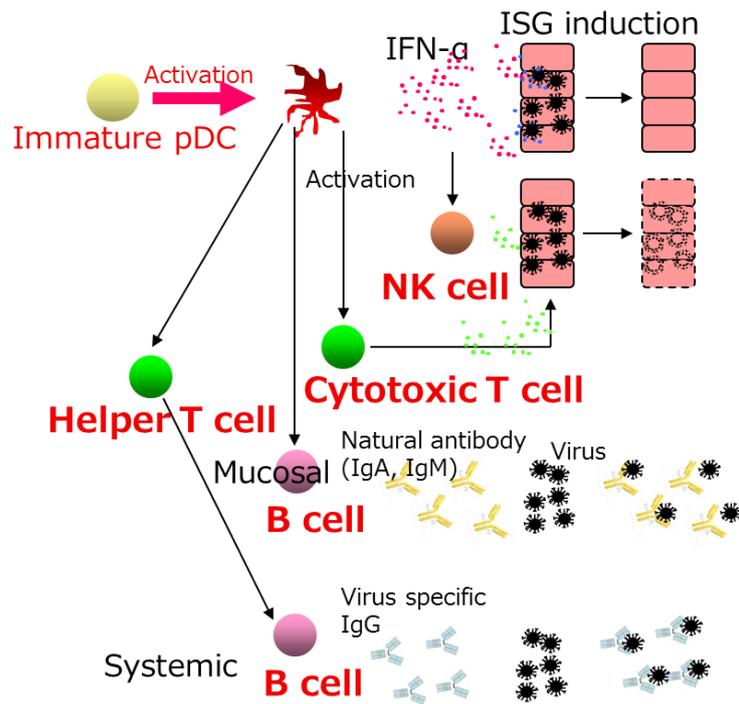
これまでにLC-Plasmaを用いた臨床試験も実施されており、生菌においても死菌において、4~8週間摂取することによって、末梢血単核球(Peripheral blood mononuclear cells; PBMC)のpDCを活性化させ、PBMCの不活化インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス反応が向上し、風邪様症状である喉の痛み、咳などの症状が改善する効果が認められている(145-147)。さらには、LC-Plasma含有ヨーグルトを岩手県雫石町の小・中学校に配布し、近隣の市町とインフルエンザの罹患率を比較したところ、雫石町の小中学生のインフルエンザによる累積欠席率が有意に減少した、という結果が得られている(148)。これらの結果から、LC-Plasmaはヒトにおいても、pDCを活性化させ、抗ウイルス効果を発揮すると考えられる(149)。

また、LC-PlasmaはpDCの活性化を介して、NK細胞のみならず(150)、T細胞、B細胞の抗原特異的な反応も活性化することが示されている(151)。このようにLC-Plasmaは*in vitro*、*in vivo*、臨床試験と広範に渡る、免疫系に対する研究が行われてきており(Table 4-1)、強い生理活性を持っていることが分かっている。諸言にも記載した通り、一般的に加齢に伴い、免疫老化が起き、免疫力が低下する。免疫老化はpDCの機能維持により、調節できる可能性を述べた。すなわち、LC-Plasmaを長期に渡って投与し続けることによってpDCの機能を維持することが、免疫老化を抑制できる可能性があるという仮説を立てた。

老化促進マウス(Senescence Accelerated Mouse; SAM)は老化が通常のマウスと比較して早く進み、ヒトが老化に伴って生じる表現型や疾患と非常に似た症状が生じるマウスモデルである(152,153)。SAMはAKR/J系統のマウスを掛け合わせることで自然発生したマウスである。SAMには老化が促進されて短寿命となるprone系統(SAMP)と、正常老化を示すresistant系統(SAMR)が存在し、その遺伝的な系統樹がSAM学会によって作られている(Figure. 4-3)(154)。SAMPの系統の間でも、アミロイドーシスや骨粗鬆症、記憶障害や学習障害など、生じる老化形質が異なっており(Table 4-2)(154-156)、主要なSAMP系統である、SAMP1、SAMP6、SAMP8、SAMP10は世界中に提供され、老化に関する研究

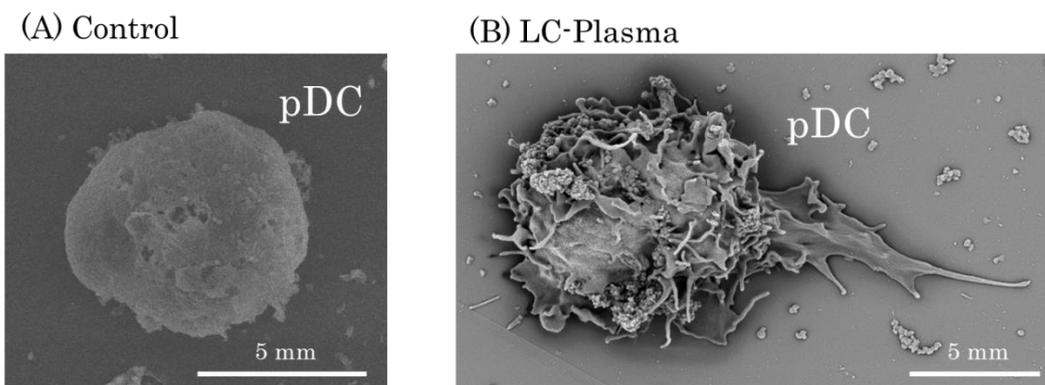
に用いられている。

そこで、本章では LC-Plasma の老化に対する効果を検証することを目的として、LC-Plasma を長期投与した時の IFN- $\alpha$  産生誘導能、T 細胞の老化、その他加齢に伴う形質に対する効果を、SAM を用いて検討することとした。LC-Plasma の SPN 細胞の TLR9 リガンド(CpG)に対する IFN- $\alpha$  産生能や T 細胞の老化に関する検討を、免疫系の機能低下が知られている SAMP1 で、個体レベルでの老化形質に対する検討を免疫系の機能低下が報告されていない SAMP10 で行った。



**Figure. 4-1** 抗ウイルス免疫における pDC 関連の免疫反応模式図

これまでの研究結果より、pDC が活性化し、IFN- $\alpha$  の産生が誘導されると、抗ウイルス遺伝子の発現が誘導されると共に、NK 細胞が活性化することが示されている。さらに、活性化 pDC は抗原提示細胞としても機能し、獲得免疫系である細胞性免疫および液性免疫を活性化する。



**Figure. 4-2** LC-Plasma 刺激による pDC の形態変化

未成熟な pDC は丸い形状をしているが(左)、LC-Plasma で刺激して活性化すると、無数の樹状突起を出して、形態を変化させる(右)。

Table 4-1. LC-Plasma に関する主な研究成果一覧

Category	Contents	Ref
<i>In vitro</i>	Screening of lactic acid bacteria (LAB), which can activate pDC and induce IFN- $\alpha$ via TLR9 signaling pathway.	(128)
	Preventive effects of LC-Plasma induced humoral factors on dengue virus proliferation via type I IFN signaling pathway <i>in vitro</i>	(141)
<i>In vivo</i>	Activation of MLN pDC and preventive effects of LC-Plasma on respiratory, gastrointestinal and systemic virus infection.	(128,142-144)
	Activation of NK cells and antigen specific immune responses via pDC activation.	(150,151)
	Prolongation of lifespan by life-long administration of LC-Plasma in SAMP6 mice.	(157)
Clinical trial	Activation of systemic pDC and decrease of flu-like symptoms by oral administration of LC-Plasma in live form.	(145,146)
	Activation of systemic pDC and decrease of flu-like symptoms by oral administration of LC-Plasma in heat-killed form.	(147,158)
	Decrease of incident ratio of influenza by intake of LC-Plasma containing yogurt in schoolchildren.	(148)
	Relief of morbidity and symptoms of illness and decrease of fatigue accumulation during consecutive exercise in athletes by oral intake of LC-Plasma in heat-killed form	(159)

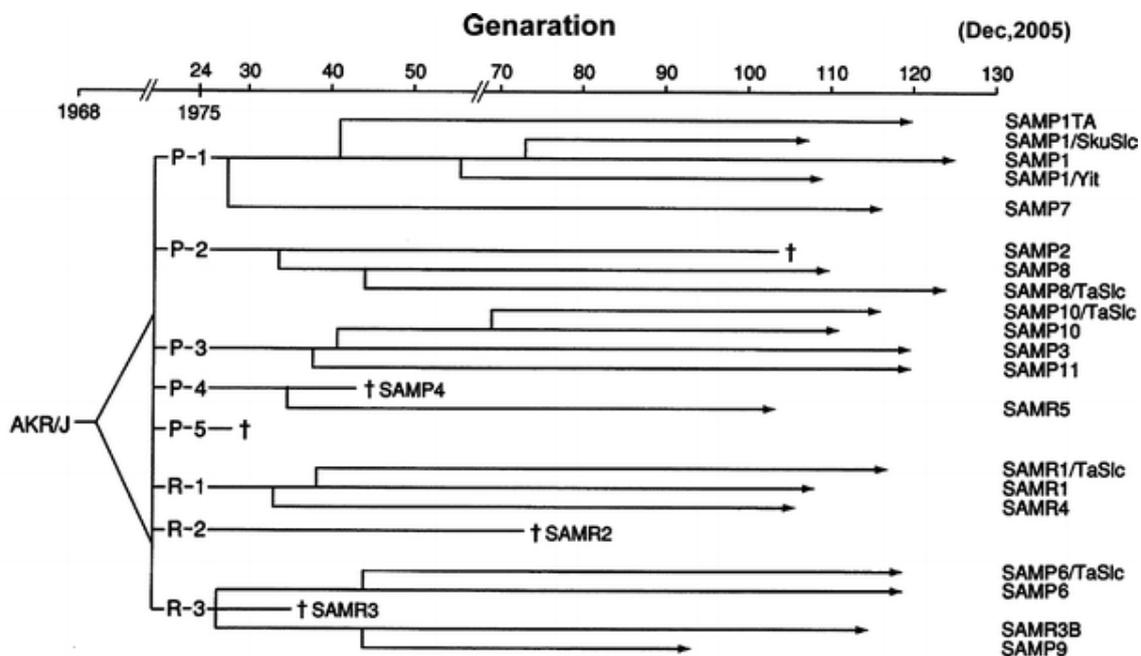


Figure. 4-3 老化促進マウス(SAM)の系統樹

この樹形図は竹田博士の論文より引用した(154)。

Table 4-2. 主要な SAM 系統の病態の表現型

Strains	Phenotype
SAMP1	Senile amyloidosis (apo-AII type), Contracted kidney, Impaired immune response, Hearing impairment, Hyperinflation of lungs
SAMP6	Senile osteoporosis, Secondary amyloidosis (amyloid A type)
SAMP8	Deficits in learning and memory, Impaired immune response, Emotional disorders (reduced anxiety-like behavior)
SAMP10	Deficits in learning and memory, Brain atrophy, Emotional disorders (depressive behavior),

## 第2節 材料と実験手法

### 1. 乳酸菌の調製

LC-Plasma は過去の報告に倣って調製した(128)。具体的には国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターより *Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM 5805 を購入し、1%ラクトース(和光純薬工業社)を混ぜた M-17 培地(Oxoid 社)で作成したプレートでコロニーを形成させた。単一コロニーを LC-Plasma の生育に適した液体培地で前培養した後、さらに新しい培地に入れ替えて 30°C、24 時間培養した。その後、滅菌水で 2 度洗浄した後、105°C で 30 分間加熱殺菌を行い、スプレードライで乾燥させることで得た。

### 2. 抗体

本検討で使用した抗体の抗原、クローン番号、標識された蛍光色素および購入先を以下の Table 4-2 にまとめた。

### 3. 使用動物

7 週齢の SAMP1 マウスの雄および 27 週齢の SAMR1 マウスまたは SAMP10 マウスの雄を日本エスエルシー株式会社より購入した。全ての動物試験はキリン株式会社の実験動物使用および愛護に関するガイドラインに従い、同社の動物実験委員会の倫理審査の承認を得た後に実施した。マウスは 12 時間の明期と暗期のサイクルで 1 ケージに 1 匹ずつ飼育した。室温は  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は  $60 \pm 15\%$  となるように調整した。動物実験は動物の苦痛や不快感が最小限になるように人道的エンドポイントを設定し、十分に配慮して遂行した。また、飼育を始める前に、人道的エンドポイントを、餌の摂取を拒んだり、激しい苦痛や長期間に渡る取り返しのつかない病状が発現したりしたときと定義した。

#### 3.1 実験 1

SAMP1 マウスを 1 週間の馴化の後、体重を基準にコントロール群と LC-Plasma 群の 2 群に分け、8 週齢のときから試験を開始した(N=8)。コントロール群には AIN93M(オリエンタル酵母工業社)を、LC-Plasma 群には LC-Plasma 加熱死菌体が 1 日当たり 1 mg 摂取できるように、AIN93M に 0.029%混ぜた餌を 15 週間摂取させた。飼育期間終了後にマウスを安楽死させ、SPN を採材して、CpG に対する IFN- $\alpha$  産生能評価および T 細胞の老化を評価した。飼育期間中に LC-Plasma

群の 2 匹が人道的エンドポイントに達したため、飼育期間終了前に安楽死させ、分析対象から除外した。そのため、コントロール群 8 匹と LC-Plasma 群の 6 匹から得られたサンプルを用いて、データ解析を行った。

### 3.2 実験 2

SAMP10 マウスを 1 週間の馴化の後、体重を基準にコントロール群と LC-Plasma 群の 2 群に分け、28 週齢により試験を開始した。通常の老化を示すマウスとして SAMR1 マウスを用いた(N=10)。コントロール群(N=20)および SAMR1 群のマウスには AIN93M をコントロール食として与え、LC-Plasma 群(N=15)には 1 日当たりの LC-Plasma 加熱死菌体の摂取量が 1 mg となるように AIN93M に 0.029%混ぜた餌を 20 週間摂取させた。飼育期間終了後に安楽死させ、SPN、背部皮膚、後肢のヒラメ筋と腓腹筋を採材した。本実験ではコントロール群と LC-Plasma 群を 15 匹ずつ準備し、5 匹をコントロール群と同じ飼育環境として、老化等の評価の事前検討を行う予定であったが、想定以上にコントロール群のマウスが人道的エンドポイントに到達したため、統計上十分な解析を実施できるように、事前検討を行うマウスを急遽コントロール群として扱うこととした。この実験内容の変更はキリン株式会社動物実験委員会に報告し、倫理審査の承認を受けて行った。飼育期間中にコントロール群の 11 匹と LC-Plasma 群の 4 匹が人道的エンドポイントに達したため、飼育期間終了前に安楽死させ、分析対象から除外した。そのため、SAMR1 群 10 匹、コントロール群 9 匹、LC-Plasma 群の 11 匹から得られたサンプルを用いて、データ解析を行った。

### 4. 細胞の調製

第 3 章第 2 節 5 項<細胞の調製と低密度細胞の分画>参照。

### 5. SPN 細胞の IFN- $\alpha$ 産生誘導能解析

SPN リンパ球を RPMI-1640 培地に  $1 \times 10^6$  cells/mL の濃度となるように調製し、0.2  $\mu$ M の CpG ODN1585 (invivogen 社)で刺激後、37°C で 24 時間培養した。培養上清中の IFN- $\alpha$  の濃度を Verikine™ Interferon- $\alpha$  ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories 社)を用いて測定した。

## 6. FACS 解析

第 2 章第 2 節 7 項<FACS 分析>参照。

## 7. 皮膚の厚さの測定

背部の皮膚を採取し、10%ホルマリン(和光純薬工業)で固定した。脱水後にパラフィンで包埋し、4  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切したあと、一般的な方法で HE 染色を行った。皮膚が直角に切断できている切片を選択し、マウス 1 匹につき、4 枚ずつ顕微鏡下で写真を撮影した。ランダムに 1 枚の写真から観察する場所を決め、10 ヶ所の表皮の厚さを測定し、平均値を算出することで皮膚の厚さとした。

## 8. 相対筋重量測定

両後肢のヒラメ筋と腓腹筋を採取し、重量を測定した。体重あたりの筋重量を算出し、相対筋重量をした。

## 9. 遺伝子発現解析

皮膚および筋肉を液体窒素で冷凍させた状態で保ちながら、マルチビーズショッカー(安井機械社)を用いて粉碎した後、TRIzol (Thermo Scientific 社)および RNeasy キット (Qiagen 社)を用いて、RNA の抽出および精製を行った。cDNA 合成は iScript cDNA synthesis kit (BioRad 社)を用い、キットに付属のマニュアルに沿って合成した。定量的リアルタイム PCR(qRT-PCR)は TaKaRa 社の SYBR Premix Ex Taq を使用し、LightCycler 480 (Roche 社)で検出した。*Gapdh* 遺伝子を内在性コントロールとし、SAMR1 群と比較したときのコントロール群および LC-Plasma 群の遺伝子発現強度を 2-delta CT 法で算出した。本試験で使用したプライマーの配列を Table 4-3 に示す。

## 10. 老化度評価

SAM の老化度の評価は過去に報告された評点方法に従って行った(153)。具体的には、行動の観点で①探索行動と②逃避行動、皮膚及び体毛の観点で③毛のつや、④毛のごわつき、⑤被毛の薄くなった状態またはハゲ、⑥潰瘍の有無、脊椎の観点で⑦首のひっかかりの状態を確認し、0 点から 4 点までの範囲で評点した。スコアの評点基準を統一するため、同一の実験内では、同じ研究員が同じ部屋で評価を行い、それぞれの評点の合計点を老化度評点とした。

## 11. 統計解析

結果は全て平均値±標準偏差で表した。SAMP1の試験では2群間の比較をStudent *t* testで行った。SAMP10の試験では3群間の比較を分散分析で行い、多重比較として、Tukey-Kramer testを選択した。また、老化度評点の比較については、Mann-Whitney U testを実施した。P値が0.05未満となったときを統計的に有意な差があると設定した。全ての統計解析はExcel統計を用いて算出した。

**Table 4-2. 本試験で用いた抗体リスト**

antigen	clone	fluorescent	supplier
CD3ε	17A2	APC-cy7	BD
CD4	RM4-5	APC	eBio
CD8α	53-6.7	PerCP	BD
CD62-L	MEL-14 RUO	PE	BD
PD-1	J43	FITC	BD

表中の BD は BD Pharmingen を eBio は eBioscience を意味する。

**Table 4-3 本試験の定量 PCR で使用したプライマー配列一覧**

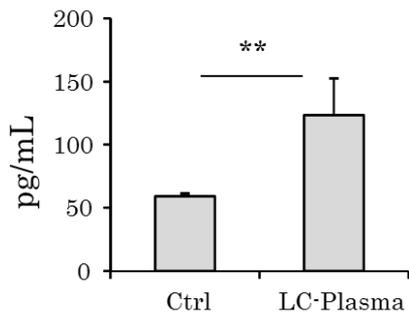
Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC
<i>Claudin-1</i>	TCTACGAGGGACTGTGGATG	TCAGATTCAGCAAGGAGTCG
<i>Zo-1</i>	AGGACACCAAAGCATGTGAG	GGCATTCTGCTGGTTACA
<i>Foxo-1</i>	TAAGGGCGACAGCAACAGCTC	CTGCACTCGAATAAACTTGCTGTGA

### 第3節 結果

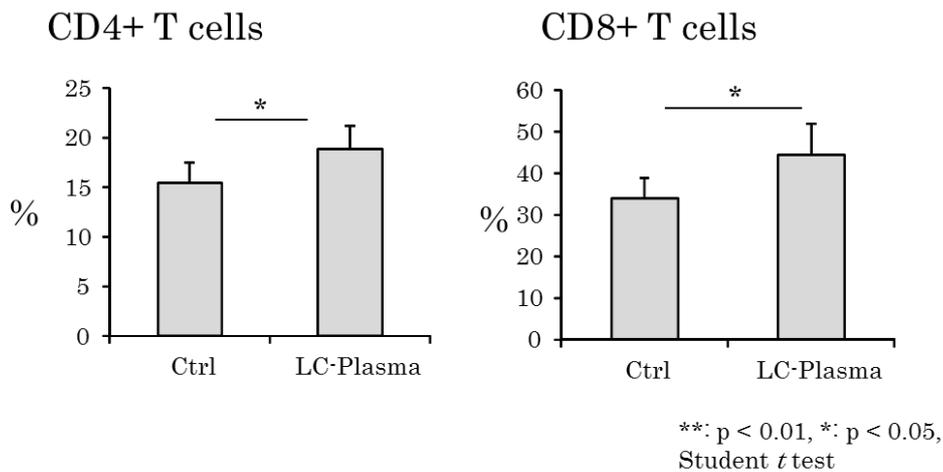
#### 1. SAMP1 系統における免疫老化に対する作用検討

これまでの研究において、LC-Plasma を経口投与すると、生体内の pDC の活性化マーカーの発現が上昇することが示されている(128)。一方で老化に伴い、pDC のウイルス刺激に対する IFN- $\alpha$  産生能が減弱する報告があることから(53)、LC-Plasma 投与による老化したマウスにおける pDC の IFN- $\alpha$  産生能に与える影響を評価した。胸腺萎縮など免疫系の老化が促進されている SAMP1 マウスに対し、8 週齢から 15 週間、LC-Plasma を混餌投与し、SPN リンパ球を TLR9 リガンドである CpG で刺激したときの IFN- $\alpha$  産生量を比較した。すると、LC-Plasma 群において、IFN- $\alpha$  産生能が有意に高いことが示され、pDC の活性が高く維持されていることが示唆された(Figure. 4-4 A)。さらに、T 細胞の老化度を FACS で評価したところ、naïve T 細胞のマーカーである CD62L が発現している CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞の割合が上昇しており、LC-Plasma 投与により、T 細胞の老化も抑制されている可能性が示された(Figure. 4-4 B)。これらのデータから、免疫機能に障害のある SAMP1 マウスにおいて、LC-Plasma を経口投与することで、免疫老化が抑制できている可能性が示唆された。

(A) IFN- $\alpha$  production in response to CpG



(B) Ratio of CD62L+ T cells

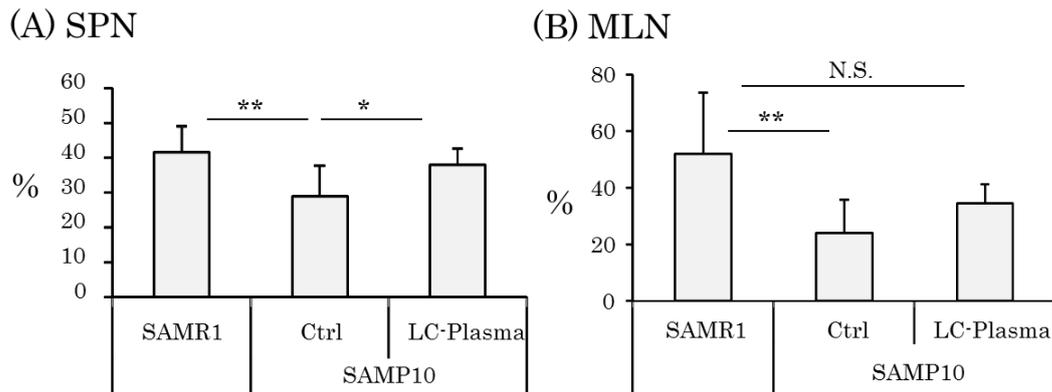


**Figure. 4-4 SAMP1 系統における LC-Plasma 摂取時の脾臓細胞の IFN- $\alpha$  産生能および naive T 細胞の比率の変化**

SAMP1 マウスに対して 1 mg/day/head となるように LC-Plasma を AIN93M に混ぜて 15 週間混餌投与し、脾臓中の pDC の活性を 0.2  $\mu$ M CpG ODN1585 に対する IFN- $\alpha$  産生能で、naive T 細胞の比率を FACS で測定した。(A) 培養上清中の IFN- $\alpha$  濃度。(B) CD62L 陽性 CD4+ T 細胞(左)および CD8+ T 細胞の比率(右)。CD4+ T 細胞を CD4+ CD8 $\alpha$ - CD3 $\epsilon$ +, CD8+ T 細胞を CD4- CD8 $\alpha$ + CD3 $\epsilon$ + と定義した。棒グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。コントロール群(Ctrl)を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。

## 2. SAMP10 系統における長期投与した時の免疫老化に対する作用検討

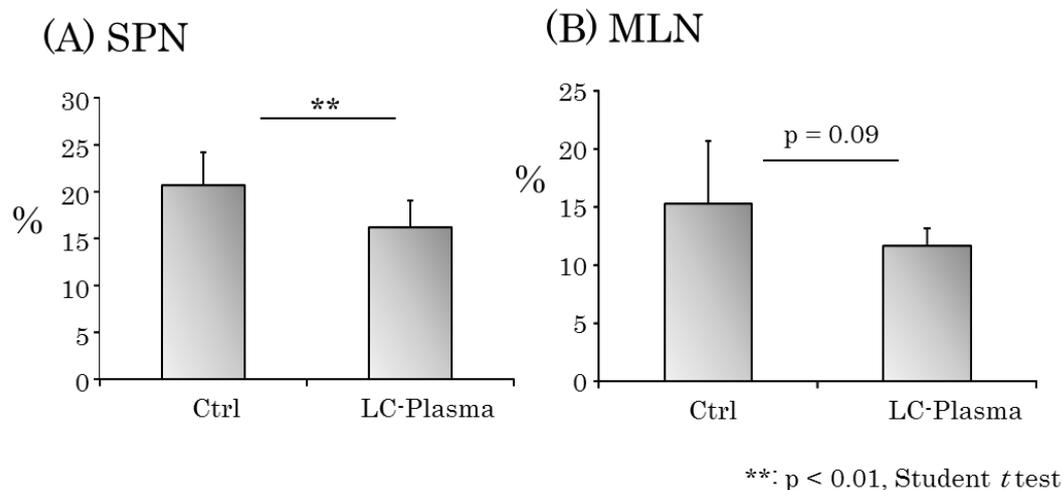
次に、免疫系の障害が報告されていない SAMP10 における LC-Plasma の抗免疫老化効果を調べた。老年初期にあたる 28 週齢より SAMP10 マウスに 20 週に渡り、LC-Plasma を摂取させたあと、SPN および MLN における T 細胞の老化を、FACS を用いて評価した。SAMR1 マウスは通常の老化をするマウスとして対照比較した。すると、SPN において、SAMP10 マウスのコントロール群では通常老化を示す SAMR1 群と比較して、CD4+ T 細胞の中で CD62L を発現している naïve T 細胞の比率が有意に減少した。一方で、LC-Plasma 群ではコントロール群と比較して CD62L+ CD4+ T 細胞の比率が増加し、SAMR1 群と比較しても同細胞の比率に変化が認められなかった (Figure. 4-5 左)。さらに MLN においても同様に、SAMP10 マウスのコントロール群では通常老化を示す SAMR1 群と比較して、CD62L+ CD4+ T 細胞の比率が減少したが、LC-Plasma 群では SAMR1 群と比較して、統計的に有意な減少が認められなかった (Figure. 4-5 右)。さらに、T 細胞の老化マーカーである PD-1 の発現をコントロール群と LC-Plasma 群との間で比較したところ、SPN においては LC-Plasma 群のほうが PD-1+ CD4+ T 細胞の比率が低かった。MLN においては、LC-Plasma 群において、有意傾向をもって PD-1+ CD4+ T 細胞の比率が減少していた (Figure. 4-6)。以上の結果から、LC-Plasma の経口投与によって、SAMP10 マウスでの検討と同様に、SAMP10 マウスにおいても T 細胞の老化が抑制されていることが示唆された。



\*\* :  $p < 0.01$  \* :  $p < 0.05$ , ANOVA Tukey Kramer's test

**Figure. 4-5 SAMP10 系統における LC-Plasma 摂取時の naïve CD4+ T 細胞の比率**

SAMP10 マウスまたは SAMR1 マウスに対して、1 mg/day/head となるように LC-Plasma を AIN93M に混ぜて 18 週間混餌投与し、CD62L+ CD4+ T 細胞の比率を FACS で測定した。(A) 脾臓中の CD62L+ CD4+ T 細胞の比率。(B) MLN の CD62L+ CD4+ T 細胞の比率。棒グラフは平均値±標準偏差で表記した。3 群間の多重検定を行い、post hoc test として、Tukey Kramer's 検定を行った。 $p < 0.05$  を\*、 $p < 0.01$  を\*\*と表記した。N.S.は有意差がないことを表す。



\*\* :  $p < 0.01$ , Student *t* test

**Figure. 4-6 SAMP10 系統における LC-Plasma 摂取時の老化 CD4+ T 細胞の比率**

PD-1 陽性の CD4+ T 細胞の比率を FACS で測定し、SAMP10 系統のコントロール群と LC-Plasma 群との間で比較した。(A) 脾臓中の PD-1+ CD4+ T 細胞の比率。(B) MLN 中の PD-1+ CD4+ T 細胞の比率。棒グラフは平均値±標準偏差で表記した。コントロール群を基準に Student *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を\*と表記した。

### 3. SAMP10 系統における個体の老化形質に対する作用検討

#### ➤ 皮膚の老化に対する作用

老年初期の SAMP10 マウスに LC-Plasma を投与することで、免疫老化を抑制する効果が得られたことから、今度は個体の老化形質に対する作用を調べることを目的として、まずは皮膚に着目して評価した。背部皮膚のパラフィン切片を作成し、HE 染色をしたのち、表皮層の厚さを測定した。すると、SAMR1 群と比較して、コントロール群では表皮層が統計的に有意に薄くなっていたが、LC-Plasma 群では SAMR1 群およびコントロール群と比較して、皮膚の厚さに有意な差は認められなかった(Figure. 4-7A, B)。さらに、皮膚の物理的バリアの機能を担うタイトジャンクション遺伝子群のうち、主要な遺伝子である *Claudin-1* と *Zo-1* の発現を定量 PCR で評価した。すると、*Claudin-1* については、SAMR1 群と比較して、コントロール群で統計的に有意に発現量が低下していたが、LC-Plasma 群では SAMR1 群およびコントロール群と比較して、有意な差は認められなかった。また、*Zo-1* については、コントロール群と比較して、LC-Plasma 群で統計的に有意に発現量が上昇しており、さらに SAMR1 群と比較しても、有意傾向を持って発現量が増加していた( $p=0.082$ )(Figure. 4-7 C)。一方で、SAMR1 群とコントロール群との間に発現量の変化は認められなかった。これらの結果から、LC-Plasma 経口投与は老化に伴って起こる皮膚の薄化およびタイトジャンクション遺伝子の発現低下の抑制または発現量の亢進ができる可能性が示唆された。

#### ➤ 筋肉の老化に対する作用

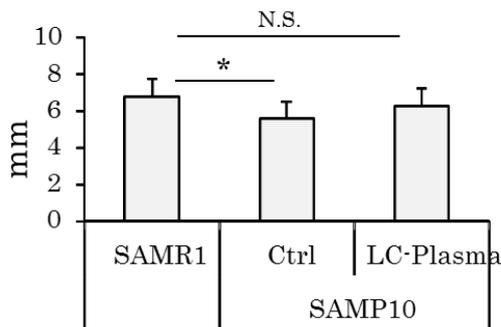
次に筋肉の老化に対する効果を比較した。ヒラメ筋の体重あたりの相対重量を測定したところ、コントロール群において、SAMR1 群と比較して統計的に有意ではなかったが、相対重量の平均値が低下傾向を示した( $p=0.14$ )。一方で、LC-Plasma 群において、コントロール群と比較して、統計的に有意にヒラメ筋の相対重量が増加していた(Figure. 4-8 A)。SAMR1 群と LC-Plasma 群との間で筋肉量に差はなかった。腓腹筋について同様に相対重量を測定したが、3 群間で変化が認められなかった。この筋重量の変化のメカニズムを調べることを目的として、筋分解遺伝子である *FoxO-1* の発現を定量 PCR で測定したところ、筋重量で得られた結果と正反対の結果となり、コントロール群と比較して、LC-Plasma 群において、遺伝子発現が統計的に有意に低下している結果が得られた(Figure. 4-8 B)。SAMR1

群の *FoxO-1* の発現量はコントロール群および LC-Plasma 群と差はなかった。これらの結果から、LC-Plasma の経口投与によって、筋分解遺伝子の発現が抑制され、結果として老化によって起こる筋重量の低下を抑制できる可能性が示唆された。

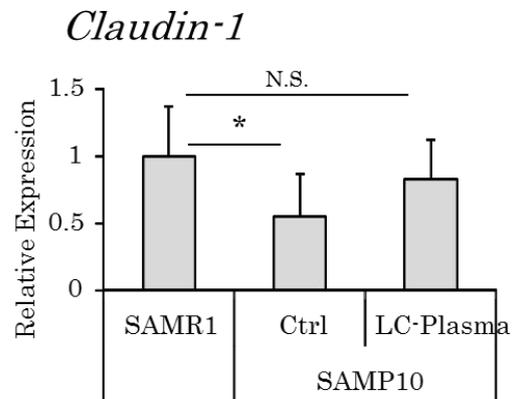
➤ 老化度スコアおよび生存率に与える作用

LC-Plasma が個体レベルでの老化に与える影響を調べることを目的として、過去の報告で示された基準に従って(153)、29 週齢から 45 週齢まで 4 週に一度の頻度で経時的にコントロール群と LC-Plasma 群の個体の老化度を調べた。すると、45 週齢のときにコントロール群と比較して、LC-Plasma 群において老化スコアが低下した(Figure. 4-9)。老化スコアは行動、皮膚および被毛、脊椎の 3 つのカテゴリーで評点したが、これら個別のカテゴリーでは両群間で差が認められなかった(data not shown)。これらの結果から、LC-Plasma を摂取すると、老年初期から摂取し始めた場合、特定のカテゴリーの老化形質の発現を抑制することは困難であるが、総合的に老化形質の発現を抑制することができる可能性が示唆された。

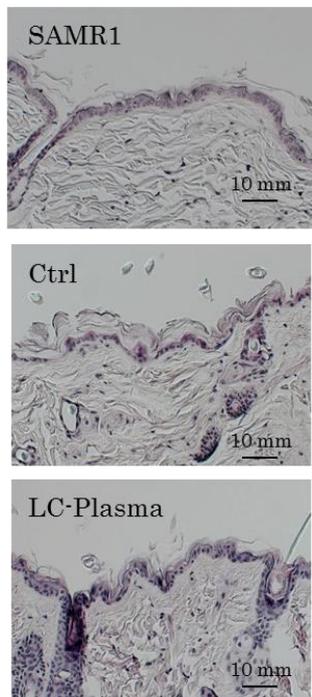
(A) Skin thickness



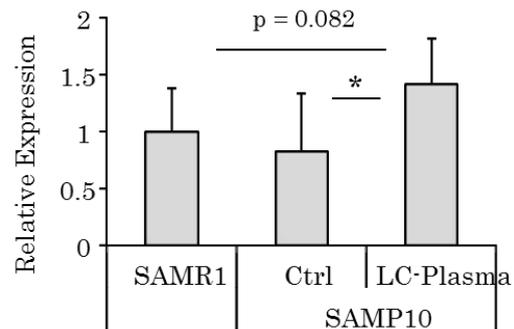
(C) Tj gene expression in skin



(B) Representative skin sections



*Zo-1*

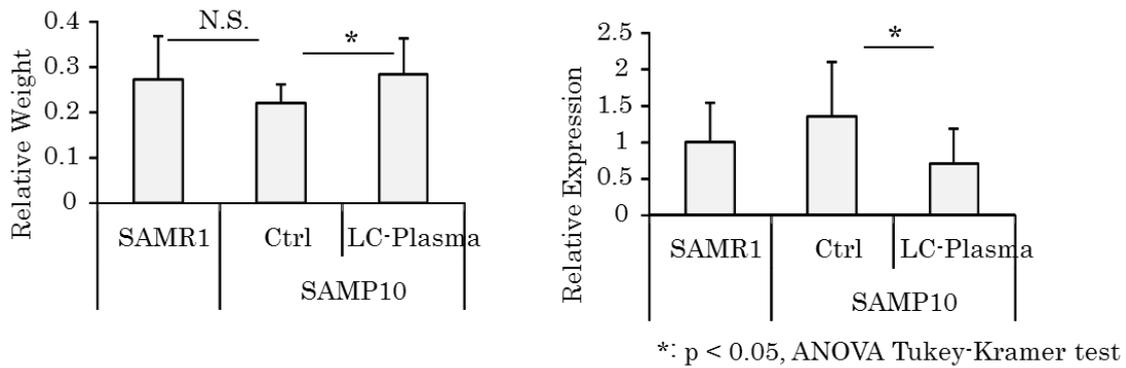


\*:  $p < 0.05$ , ANOVA Tukey-Kramer's test

**Figure. 4-7 LC-Plasma 摂取による皮膚の薄化の抑制効果**

皮膚の切片を Hematoxylin-Eosin 染色し、表皮の厚さを測定することで、背部皮膚の厚さを評価した。また、背部皮膚より RNA を抽出し、タイトジャンクション遺伝子の遺伝子発現を定量 PCR で評価した。(A) 背部皮膚の表皮の厚さ。(B) 皮膚切片の代表的な顕微鏡写真。(C) *Claudin-1* (上) および *Zo-1* (下) の相対的な遺伝子発現量比較。棒グラフは平均値±標準偏差で表記した。3 群間の多重検定を行い、post hoc test として、Tukey Kramer's 検定を行った。 $p < 0.05$  を\*と表記した。N.S.は有意差がないことを表す。

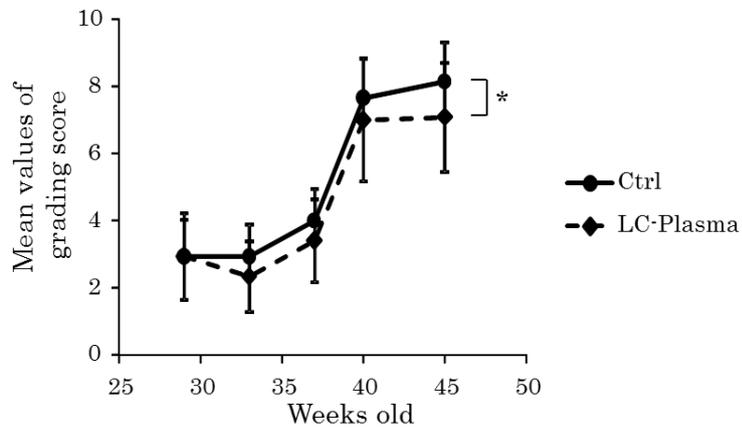
(A) Relative weights of muscle (B) *FoxO1* expression in muscle



**Figure. 4-8 LC-Plasma 摂取による筋肉分解の抑制効果**

体重を基準としてヒラメ筋の相対重量を算出した。さらに筋肉より RNA を抽出し、代表的な筋分解遺伝子の発現を定量 PCR で評価した。(A) ヒラメ筋の相対重量。(B) *FoxO-1* 遺伝子相対発現量。棒グラフは平均値±標準偏差で表記した。3 群間の多重検定を行い、post hoc test として、Tukey Kramer's 検定を行った。 $p < 0.05$  を\*と表記した。N.S.は有意差がないことを表す。

## Chronological Change of Senescence score



\*:  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test

### Figure. 4-9 個体の老化スコアの経時的変化

老化スコアは過去の知見に記された評価方法(153)に従い、4週間に一度の頻度でコントロール群(n=9)およびLC-Plasma群(n=11)のマウスを評価した。毛のツヤ、毛玉、被毛の薄さ、潰瘍の状態のスコアの合計点を皮膚および被毛カテゴリーとして算出し、探索行動および逃避行動の状態のスコアの合計点を行動カテゴリーとし、2つのカテゴリーの合計点を老化スコアとした。老化スコアの群内の平均値でコントロール群とLC-Plasma群を比較した。グラフは平均値±標準偏差で表記した。コントロール群を基準として、Mann-Whitney U検定を実施し、 $p < 0.05$ を\*と表記した。

#### 第4節 考察

本章では、pDCを活性化させ、TLR9を介してIFN- $\alpha$ の産生を誘導する乳酸菌であるLC-PlasmaのSAMに対する抗老化効果を検証した。一般的に高齢者は若年者と比較して、免疫系が老化し、特に外部の抗原やワクチンに対する反応性が低くなることが原因となっており、様々なウイルス感染症および細菌感染症に対して感染しやすくなる。その結果、感染症への罹患率や致死率が増加することが報告されている(160)。pDCはウイルス感染に対する抗ウイルス作用を示す非常に重要な細胞であり、かつtype I IFNを大量に放出することによって、NK細胞やT細胞など他の免疫細胞を活性化することが知られている(161)。さらには、老化に伴って、体内のpDCの数が減少したり、外部のウイルス抗原の刺激に対するIFN- $\alpha$ 産生誘導能が低下したりすること(53)、CD4+ T細胞やCD8+ T細胞に対する抗原提示能が低下することも示されている(54)。一般的な風邪の70%以上がウイルス感染に起因するという報告もあることから(162)、pDCの活性を維持することが免疫老化を抑制し、老化に伴う免疫反応の低下を抑制できるのではないかと仮説を立てた。そして、実際にSAMP1マウスにおいて、LC-Plasmaを摂取することによって、CpG刺激に対するIFN- $\alpha$ 産生誘導能が促進され、naïve CD4+ T細胞とnaïve CD8+ T細胞の比率が上昇することが確認することができ、pDCを活性化できる本素材が免疫老化を抑制できる可能性を見出すことができた。

また、SAMP10マウスを用いた実験においても、SAMP1マウスを用いた実験と同様に、LC-Plasmaを投与することによって、naïve CD4+ T細胞の比率が高く維持され、PD-1+ CD4+ T細胞の比率がコントロール群と比較して低くなっていた。前述の通り、PD-1はT細胞の老化マーカーであることが知られているが、年を取ることによって、慢性的に抗原の曝露を受け、PD-1を発現している老化T細胞の比率が上昇すること、naïve T細胞が減っていくことはよく知られている(163,164)。我々の過去の報告において、LC-Plasmaは急性のウイルス感染症を予防すること(142)、そして生涯に渡るLC-Plasmaの投与によって飼育期間中に起こったであろう慢性的な日和見の細菌感染を抑制すること(157)が示されている。そのため、我々の結果は、LC-Plasmaの摂取によって、pDCの活性が高く維持され、不顕性ウイルス感染などに対して抗ウイルス反応を起こすことで、慢性的な日和見感染を防ぐことができたのではないかと考えられた。慢性的な抗原曝露が抑制された結果として、免疫老化を遅らせたのではないかと考えられた。

さらに、本試験では免疫老化に加えて、組織の老化に対する効果を検証した。皮膚の表皮層は加齢に伴って薄くなっていくことが報告されている(165,166)。通常老化を示す

SAMR1 群と比較してコントロール群で皮膚の厚さが薄くなっていたため、SAMP10 でも皮膚の老化が起きていることが確認されたが、LC-Plasma を投与すると皮膚の薄化が抑えられていたことから、LC-Plasma 摂取によって、老化に伴う皮膚の薄化を抑制する効果があることが示唆された。

タイトジャンクション遺伝子は細胞膜を越えて発現し、細胞同士を接着させるバリア機能や、上皮細胞や内皮細胞の細胞シートの膜同士を接着させるフェンス機能に寄与することが知られている。タイトジャンクション遺伝子は体内の上皮組織の至るところに発現していることが知られているが、特に皮膚の表皮層においては、*Claudin-1* 遺伝子の寄与が大きいことが報告されている(167,168)。*Claudin-1* ノックアウトマウスは皮膚の水分が過剰に失われることによって、致死を示すことが知られている(168,169)。また、アトピー性皮膚炎の病変部では *Claudin-1* の発現が減少しているという報告もある(170)。さらに *Claudin-1* は加齢に伴って、発現量が減少する、という報告もあることから(171)、*Claudin-1* は皮膚のバリア機能に非常に重要な役割を果たしていることと考えられる。*Zo-1* 遺伝子は細胞膜裏打タンパク質として知られ、タイトジャンクションの形成に非常に重要な役割を示している(172)。本検討において、LC-Plasma 摂取により、皮膚において、*Claudin-1* 遺伝子と *Zo-1* 遺伝子の発現量がコントロール群と比較して上昇していた。タイトジャンクション遺伝子の発現は様々なサイトカインによって制御されることが知られており(173)、本試験のような結果が得られたのは LC-Plasma が皮膚に直接作用したのではなく、pDC を介して活性化された免疫細胞から産生された液性因子が関与していると考えられる。すなわち、LC-Plasma を摂取することによって、病理学的な観点のみならず、遺伝学的な観点でも皮膚の老化を抑制できることが示唆された。

筋肉量の減少は、筋肉組織における最も顕著に表れる老化の表現型である(174)。筋肉量は筋合成と筋分解の厳密なバランスによって決まることが示されており、このバランスが崩れることによって、筋肉量が減少していくことが知られている(175)。本試験では、LC-Plasma を摂取することによって、ヒラメ筋の筋肉の減少が有意に抑制された。さらに筋分解に関わる遺伝子の1つである *FoxO-1* 遺伝子の発現が LC-Plasma 摂取によって抑制されていた。以上の結果から、LC-Plasma を長期に渡って摂取することによって、*FoxO-1* 遺伝子の発現抑制を介して、老化によって起こる筋重量の減少を抑制できる可能性が示唆された。我々のグループの過去の報告では、離乳直後から生涯に渡って LC-Plasma を摂取したことによって、ヒラメ筋のみならず、腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋といった、後肢の主要な筋肉の減少も抑制できていた(157)。本試験では老年初期より摂取させ始めており、

以前の報告よりも短い期間しか摂取させていなかったことから、全ての筋肉で同様の結果が得られたわけではなかったが、筋肉の老化を抑制する効果が再現性良く発揮されていたと考えられる。

このように、皮膚や筋肉のように、免疫系とは異なる組織においても老化を抑制できていた。様々な組織の老化を抑制できていたことから、個体レベルでの老化度をスコア化して評価した結果、LC-Plasma 群でコントロール群と比較して有意に低くなっていた。以上の結果から、LC-Plasma 摂取によって、抗老化効果があったことが示唆された。

## 第5節 小括

本章では、pDC を活性化し、IFN- $\alpha$  産生を誘導する乳酸菌としてスクリーニングされた LC-Plasma の新しい効果として、免疫系では外部刺激に対する IFN- $\alpha$  産生能の維持と T 細胞の老化抑制効果を、臓器レベルでは皮膚の薄化や筋重量の減少を抑制するなど、抗老化効果を見出すことができた。pDC は外部刺激によって、多量のサイトカインを産生し、免疫細胞のみならず、様々な組織に影響を与えることが示されている。また、タイトジャンクションによるバリア機能や筋肉の代謝は多くのサイトカインによって影響を受けることが報告されていることから、LC-Plasma の摂取によって、pDC の活性化を介して、抗老化効果が現れたと考えられる。

## 第5章 <総括>

免疫は外敵から身を守るために発達してきたシステムである。免疫と言えば、2018年の10月にノーベル医学・生理学賞を受賞した本庶博士のガン免疫療法が記憶に新しい。免疫系は非常に複雑なシステムを兼ね備えており、また免疫に関わる細胞も多岐に渡っている。その中でも、特に重要な機能を有する細胞は樹状細胞である。樹状細胞は自然免疫系の細胞として、外来抗原を貪食して排除する反応をするだけではなく、抗原をT細胞に提示して、抗原特異的な反応を誘導することができる細胞であり、自然免疫系と獲得免疫系をつなぐ架橋のような役割もしている(11,12)。

自然免疫系では非特異的に外来抗原を認識して処理すると思われてきたが、1996年の *toll-like receptor* (TLR)の発見から、PAMPsを認識するPRRが生体に多く備わっていることがわかった(22)。PRRにはTLRのみならず、CLRやNLR、RLRなどの種類が存在している。細胞膜にある受容体(TLRの一部とCLR)は主に細菌や真菌の細胞壁の成分を認識して炎症反応を起こす一方で、細胞質にある受容体(TLRの一部とNLR、RLR)は主にウイルスや細菌の核酸を認識して炎症反応を起こす(21)。さらにPRRはPAMPsだけではなく、自己の細胞が傷害を受けたときなどに放出される、ダメージ関連分子パターン(DAMPs)にも反応し(176)、生体に侵入している不要な抗原を体外に排出する反応が行われている。樹状細胞や樹状細胞が非自己の分子を認識する機構を見つけた功績により、Steinman博士やHoffman博士は2011年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。

免疫系がうまく機能せず、外部抗原の排除がうまくできなくなると、感染症に罹患しやすくなる。ペニシリンを始めとする抗生物質により、細菌感染症に対する治癒効果が認められてきたが、抗生物質に耐性を持つ細菌も出現し、罹患者数の増加と症状の重篤化を招いている。さらにはウイルスには抗生物質が効かないため、感染症に罹患しないためには、普段から予防することが重要である。グローバルな交通手段や物流の進化により、全世界の都市間はわずか十数時間で繋がることができるようになり、これまででは考えられないような病原性微生物が大陸間を移動し、新たな土地のヒトに曝される機会が多くなっている。そのような病原性微生物に起因する感染症を予防するためには、不特定の外来抗原に反応することが可能な自然免疫へのアプローチが重要である。本研究では、自然免疫系と獲得免疫系の両方に影響を与えうる樹状細胞をターゲットとして、免疫賦活物質の探索と応用開発を行った。

まず第2章において、発泡酒の副産物として生じてくる大麦搗精粕を用いてmDCを活性化しうる素材を探索した研究成果を述べた。植物組織のバイオマスの中で、セルロースに

次いで多いリグニンであるが、構造的な複雑さゆえに、産業的には有効活用されているとは言い難く、特に生理活性についてもほとんど着目されていなかった。Sun らの方法に従って、大麦搗精粕より4つの画分を分画し、マウス BM-DC に対する活性化効果を検討した。BM-DC の活性化を細胞表面分子である MHC II や CD86 などの発現強度を FACS 法で測定すると共に、BM-DC より産生される炎症性サイトカインである IL-12p40 や TNF- $\alpha$  の濃度を ELISA で測定することで評価した。そして、分析的に明らかにリグニン構造を保有しているリグニン・多糖結合体である LREL に、ng オーダーという極めて低濃度にも関わらず、mDC 活性化能があることを見出した。さらにはノックアウトマウスや中和抗体を用いた検討により、LREL の mDC 活性化は、PRR である TLR4 を介して起こることも見出し、TLR4 シグナル経路に関連する、NF- $\kappa$ B や AP-1、IRF3/7 などの転写因子はいずれも活性化していることが確認できた。植物組織からの免疫賦活成分の抽出にはセルラーゼ処理を行うことが必要であることも見出した。さらには、大麦搗精粕のみならず、他の穀皮や植物組織由来の LREL でも樹状細胞活性化能を見出せたことから、リグニンを生理活性物質として産業利用する道筋を開くことができた(99,177)。

LREL がどのようにして TLR4 に結合するのかはまだ明らかとなっていない。TLR4 リガンドである LPS はグラム陰性菌の細胞膜に存在し、疎水性の脂肪酸と親水性の多糖が結合した化合物である(75,93)。LREL も疎水性のリグニン部分と親水性の多糖部分が存在することが明らかとなったことから、分子構造が LPS と似たようなものである可能性が考えられた。しかしながら、本検討で検出され、リグニン構造を示す G 核、S 核、H 核の3種類のユニットがどのように結合しているのか、LREL がどのような立体構造をしているのかについてはまだ明らかとなっていない。発達してきているリグニンの分析技術などを使用して、その分子構造を解くことによって、より効果的なリグニン・多糖結合体の抽出ができる可能性もある。

LPS が TLR4 を介して樹状細胞を活性化するためには、TLR4 が二量体を形成することに加え、MD-2 分子や CD14 分子、血清中の LPS binding protein (LBP) が必要であることがわかっている (178)。植物由来の TLR4 リガンドとして同定されているナンバンギセル由来の AILb-A は活性本体がタンパク質であるため、これらの分子が必要ないと論じられている。そして、細胞培養中に血清を除いたり、CD14 分子の中和抗体を添加したりしても、細胞の活性化が認められる、という結果を得ている (179)。LREL が TLR4 を介して樹状細胞を活性化する際に、これらの分子が必要となるかどうかを調べることによって、LREL が TLR4 とどのように結合しているのかを解明する手がかりとなると考えられる。ヤマイ

モノ一種であるダイジョ由来の糖タンパク質である Discorin も TLR4 を介してマクロファージを活性化する、という作用が見つかっているが(180)、細胞の活性化に $\mu\text{g}$  オーダーの濃度が必要であり、活性は LREL と比較して強くない。AILb-A も Discorin もタンパク質が含まれた物質であることから、経口で投与すると消化液によって分解され、活性が消失する可能性がある。投与方法が限定されることは産業応用する上で、大きな不利益であると考えられる。

第3章では、第2章で発見した樹状細胞活性化能を持つリグニン・多糖結合体が *in vivo* でも免疫賦活効果が認められるかどうかを検証し、腹腔内投与でも経口投与でも樹状細胞を活性化させる効果があることを見出した。また、樹状細胞のみならず、同じく TLR4 を発現していることが知られている NK 細胞(104)も活性化することが認められた。Yac-1 細胞に対する細胞傷害活性の増加も確認できたことから、LREL による NK 細胞の活性化は、遺伝子レベルのみならず、生理的にも強いことが示唆された。さらに2週間継続的に LREL を投与すると自然免疫系だけではなく、獲得免疫系も活性化することが、FACS による T 細胞の分析によって明らかとなった。もともとリグニンが難消化性物質であることから(100)、*in vitro* のみならず、*in vivo* で経口投与をしても免疫賦活効果が確認できたと考えられる(181)。

これまでの結果を踏まえ、LREL が経口ワクチンのアジュバントとして利用できる可能性を考え、抗原タンパクとして OVA と共に LREL を経口で断続的に投与した。すると、粘膜面ではトータル IgA が、全身ではトータル IgG および抗原特異的な IgG の濃度が上昇する効果が見られた。粘膜面でトータル IgA のみが増加し、抗原特異的な IgA が増加しなかったのは、腸管の粘膜固有層において、T 細胞非依存的なクラススイッチが起こったからだと考えられる。IgA は自然抗体と呼ばれ、抗原に対する特異性が低く、IgG と比較して非特異的に外来抗原に結合することが知られている(120,121)。そのため、粘膜面でトータル IgA が増加することは外来抗原が体内に侵入することを防ぐ効果があるため、本結果により、経口ワクチンのアジュバント効果が認められたと考えられる(181)。

これまで LREL 刺激によって産生される炎症性サイトカインは IL-12 や TNF- $\alpha$  を測定していたが、腸管において IgA のクラススイッチに関わるサイトカインは IL-6 が代表的である(182,183)。そのため、LREL 刺激によって、IL-6 が誘導されるかどうかを調べることで、さらにエビデンスが深まると考えられる。また、IgA のクラススイッチに必須だと言われている、APRIL や BAFF についても、LREL の経口投与で発現が上昇しているかを調べる必要があると考えられる。今回のワクチンの試験では、免疫系を活性化することが報

告されていない抗原である OVA を用いた。一方で、ワクチンとしての性能を評価するのであれば、例えばインフルエンザウイルスやコレラ菌、肺炎双球菌など、ヒトが罹患する病原体の抗原を用いて、抗原特異的な抗体が誘導されることを確認する必要があると考えられる。さらにはこれらの抗体に中和活性があるかどうかを感染実験等で確かめることができれば、効果を確実のものとする。液性免疫を誘導する効果というのは、アレルギーを誘導する可能性も考えられる。すなわち、血液中の抗原特異的な IgE の濃度を測定することによって、LREL の経口ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する必要がある。

第 4 章では樹状細胞の中でもウイルス免疫に重要な役割を持つ pDC を活性化できる乳酸菌(LC-Plasma)の抗老化効果について検証した。pDC は未熟状態において、抗原提示能が低い。しかしながら、細菌やウイルス由来の核酸を感知して活性化すると、IFN- $\alpha$ を大量に産生し、NK 細胞や T 細胞のみならず、組織の細胞においても炎症反応が惹起される (133)。LC-Plasma はこれまでの研究において、pDC の TLR9 を刺激し、IFN- $\alpha$ の産生を促すことで、ウイルス感染症に対する効果が認められてきた(149)。老化に伴い、免疫系の活性が低くなること、pDC のウイルス刺激に対する IFN- $\alpha$ 産生能が下がるなど、免疫老化が起こることが知られている (39)。また、老化に伴い、PD-1 を発現した老化 T 細胞が増加し、CD62L を発現した naïve T 細胞が減少することが知られている (43,44)。老化 T 細胞の増加と naïve T 細胞の減少は普段からの日和見感染や不顕性感染など、明確な臨床症状が出ない感染症によって促進されることも知られている (184,185)。そのため、LC-Plasma の継続的な摂取で pDC を活性化しておくことで、免疫老化を抑制できると仮説を立てて、老化促進マウスである SAMP1 と SAMP10 を用いて検証した。すると、CpG に対する IFN- $\alpha$ 産生能があがっていただけでなく、naïve T 細胞の減少が抑制されていた。また、老化 T 細胞の増加も抑制されていた。これらの結果は LC-Plasma の継続投与により、免疫老化が抑制されていることを示すものである。

次に免疫以外の老化形質に対する影響を調べ、老化の表現型である皮膚の薄化や筋肉重量の減少が抑制されることも見出した。そのメカニズムとして、皮膚においてはタイトジャンクション遺伝子の発現が高い状態で維持されること、筋肉においては筋分解遺伝子の発現が抑制されることが定量 PCR の結果から明らかとなった。これらの結果から、老年初期にあたる 28 週齢から LC-Plasma を摂取させても抗老化効果が認められることがわかり、成人してから LC-Plasma の摂取を開始しても、十分に抗老化効果が得られるものと考えられる(186)。タイトジャンクション遺伝子の発現亢進がどのようなメカニズムで起こっているのかは本検討では解明できていない。一般的にタイトジャンクション遺伝子は炎症性サ

イトカインにより発現量が減少し、抗炎症サイトカインで発現量を増加させることが報告されている(173)。LC-Plasma は pDC を刺激して、IFN- $\alpha$ の産生を亢進する乳酸菌であり、これまでの研究でも炎症性サイトカインを誘導して、免疫系を活性化する作用が確認されているため、抗炎症サイトカインよりは炎症性サイトカインの発現を誘導していると考えられる。ゆえに、タイトジャンクション遺伝子発現の結果は、一見矛盾した反応のように思える。しかしながら、過去の知見では、炎症性サイトカインの中で、IL-17A に関しては、タイトジャンクション遺伝子の発現を亢進し、腸上皮細胞のバリア機能を亢進するデータが得られている(187)。離乳前のマウスに LC-Plasma を経口摂取させたときには腸管において IL-17A 産生 T 細胞の比率が増えた、という結果もある(143)。そのため、皮膚における IL-17A の発現などを調べることで、タイトジャンクションに関するエビデンスを強化できると考えられる。

LC-Plasma 投与による筋分解遺伝子の発現抑制についても、まだメカニズムが解明できていない。筋肉の合成と分解には、関わる遺伝子が既に多く知られている。本検討で調べた *FoxO-1* は、発現が亢進することにより、*Atrogin-1* や *MuRF-1* など、筋タンパク質の分解関わる遺伝子の発現を亢進することが知られている(188)。そのため、これらの遺伝子発現を調べ、筋タンパク質の分解が抑制されているかどうかを確認する必要がある。また、*FoxO-1* 遺伝子発現に影響のある上流のシグナルも調べる必要がある。

本検討では SAM を用いた研究を実施した。元来 SAM は AKR/J マウスを飼育し続けた結果として、自然発生してきた系統である(152)。老化研究は一般的に非常に時間がかかるが、SAM が一般的に使用できるようになったことによって、老化研究にかかる時間が短縮され、老化研究が大きく進展した。一方で、SAM のいずれの系統においても、どのような遺伝的な変異があるか、についての報告がなく、多くの研究において、遺伝的な背景がきちんと解明できないまま、老化や抗老化効果が現象論で語られることも多い。LC-Plasma の抗老化効果に関しても、SAM だけではなく、野生型のマウスを自然加齢させた検討も必要になると考えられる。

そもそもなぜ LC-Plasma のみが実用化された乳酸菌の中で pDC を活性化し、IFN- $\alpha$ を産生誘導できるのか、については過去の論文で議論がされている(128)。LC-Plasma の活性は、論文では *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103(以下、ATCC53103)と比較されることが多い。LC-Plasma は DNA が活性本体であり、TLR9 を介して IFN- $\alpha$ の産生を誘導することが示されているが、ATCC53103 由来の DNA でも IFN- $\alpha$ の産生誘導がみとめられている(128)。一方で、pDC に貪食されるのは LC-Plasma のみであることから、pDC に貪

食されることは IFN- $\alpha$  産生誘導に必須である。乳酸菌の DNA であれば株に関係なく IFN- $\alpha$  を産生できる、というわけでもないことは非公表データとして保有しており、DNA の配列は重要である可能性が議論されている。現在、GC 含量に着目したデータの蓄積がされている。以上により、IFN- $\alpha$  の産生誘導には、pDC への貪食と DNA 配列が重要だと考えられる。

本論文では、細胞膜に存在する受容体である TLR4 のリガンドと細胞質内に存在する受容体である TLR9 のリガンドの探索と応用開発に関わる検討を行ってきた。TLR4 は mDC、TLR9 は pDC に発現しており、同じ樹状細胞でも機能や役割が異なっていることから、それぞれキャラクターが異なっているように思える。しかしながら、TLR4 はリガンドが結合すると、早期には MyD88 を介して、NF- $\kappa$ B や AP-1 を活性化するが、その後 TRIF を介したシグナル経路が動き、IRF3 を活性化することが知られている (189)。IRF3 は type I IFN の誘導に関わっている転写因子であり、TLR9 がリガンドと結合した時にも活性化する転写因子である。つまり、TLR4 と TLR9 はリガンドと結合すると、IRF3 や IRF7 を介して、type I IFN を誘導する、という点で共通点がある。樹状細胞は TLR を介して、多くのサイトカインやケモカインを産生することが知られているが、中でも type I IFN の生理活性は特に強いことが知られており、そのために、これらの素材が両方とも経口投与という消化管を通り、最も生理活性が認められにくいルートで検討を行っても明確な差が認められたのではないかと考えている。

これらの検討結果を踏まえて、産業応用するための今後の展望を述べたい。まずは LREL についてであるが、上述のように LREL は Cellulase/Hemicellulase 処理を始めとして、複雑な工程を経て抽出される画分である(99)。そのため、現在の方法だと、抽出コストも高価なものになり、ワクチンのアジュバントなどの医薬品用途で使用するとしても費用対効果が合わない可能性が高い。商業的に LREL を開発するためには、抽出工程の見直しが必要であろう。上述のように、LREL よりも PEL のほうが活性は低いものの、収率は高い、という結果が得られた。本試験では Cellulase/Hemicellulase 処理後にエタノール沈殿を行い、2つの画分に分けたが、産業応用するためには、エタノール沈殿は必要ないかもしれない。また、リグニンは非常に複雑な化合物であり、構造が決定できない、という欠点もある。そのため、活性がある成分の品質評価にも課題が生じる可能性がある。本検討により、分子量という観点で活性の強弱を見分けることができたため、分子量を活性の規格とするのも一案である。

LREL のその他の応用の可能性として、産業動物への利用も考えられている。反芻動物は解剖学的には 4 つの胃が存在しており、第 1 胃であるルーメンは一般的なヒトやげっ歯

類の胃とは異なり、非常に多くの微生物が棲息し、飼料として摂取した植物を発酵・消化する器官であることが知られている。そして、ルーメン微生物にはセルラーゼ生成菌がいることも知られている (190-192)。つまり、LREL 画分を抽出せずに、大麦搗精粕を直接摂取させるだけでも、ルーメンにおける発酵で免疫賦活作用のあるリグニン・多糖結合体を抽出できる可能性が考えられている。実際にホルスタインを使用して、大麦搗精粕を摂取させた試験において、唾液中の抗体価が上がるような現象が学会等で発表されているが (data not shown)、今後のさらなる研究に期待したい。

次に LC-Plasma の抗老化研究であるが、ヒトにおいて抗老化効果を検証することは非常に難しい。長期に渡って摂取した効果が必要であるが、自社のみで実施するには時間の面でも費用の面からも不可能である。近年、弘前大学が主導となった弘前 COI や内閣府が主導となった戦略的イノベーションプログラム(SIP)などで大規模疫学研究が実施されており、産官学連携して大規模の疫学研究を行える環境ができてきている。そのようなプログラムに参加して、LC-Plasma の抗老化研究をヒトに応用することが可能かもしれない。

また、今回の試験で、LC-Plasma が食品として摂取した際に消化・吸収される腸管から少し離れた組織である皮膚や筋肉にも影響を与えることが確認できた。一般的な食品成分と異なり、LC-Plasma 自体が乳酸菌の形状を保ったまま消化・吸収されて、血流に乗って、他の器官に影響を与えることは考えづらいことから、腸管の、例えばパイエル板などで LC-Plasma が取り込まれ、pDC などの免疫細胞を介して、皮膚や筋肉にも影響を与えたと考えられる。皮膚や筋肉はヒトの見た目にも大きく影響する組織であり、これらを若く健康に保つことは QOL (quality of life) を高めることが期待できるため、今後の研究の進展が待たれる。すなわち、我々が見出した知見が食品成分を介して免疫系を調節し、人々や産業動物の健康維持に貢献できることを期待して結びとしたい。

## 参照論文

1. Fleming, A. (1944) The discovery of penicillin. *British Medical Bulletin* **2**, 4-5
2. Zhu, Y.-G., Zhao, Y., Li, B., Huang, C.-L., Zhang, S.-Y., Yu, S., Chen, Y.-S., Zhang, T., Gillings, M. R., and Su, J.-Q. (2017) Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology* **2**, 16270
3. McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S., and Jernigan, D., B. (2006) *Staphylococcus aureus*-associated Skin and Soft Tissue Infections in Ambulatory Care. *Emerging Infectious Disease journal* **12**, 1715
4. DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., and Chambers, H. F. (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* **375**, 1557-1568
5. Hookman, P., and Barkin, J. S. (2009) *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World journal of gastroenterology* **15**, 1554-1580
6. Gubler, D. J. (1998) Epidemic Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: a Global Public Health Problem in the 21st Century. in *Emerging Infections 1*, American Society of Microbiology. pp
7. Lucey, D. R., and Gostin, L. O. (2016) The emerging zika pandemic: Enhancing preparedness. *JAMA* **315**, 865-866
8. Team, W. E. R. (2014) Ebola Virus Disease in West Africa — The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. *New England Journal of Medicine* **371**, 1481-1495
9. Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. . *The Journal of Experimental Medicine* **137**, 1142-1162
10. Hart, D. N., and Fabre, J. W. (1981) Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *The Journal of Experimental Medicine* **154**, 347-361
11. Villadangos, J. A., and Schnorrer, P. (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology* **7**, 543-555
12. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252
13. Belz, G. T., and Nutt, S. L. (2012) Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature Reviews Immunology* **12**, 101-113
14. Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011) Dendritic Cell and Macrophage

- Heterogeneity *In Vivo*. *Immunity* **35**, 323-335
15. Steinman, R. M., and Banchereau, J. (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-426
  16. Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine* **5**, 919-923
  17. Facchetti, F., and Vergoni, F. (2000) The plasmacytoid monocyte: from morphology to function. *Advances in Clinical Pathology* **4**, 187-190
  18. Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* **5**, 1219-1226
  19. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J. A. (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* **86**, 973-983
  20. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway Jr, C. A. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397
  21. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805-820
  22. Kawai, T., and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384
  23. O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013) The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **13**, 453-460
  24. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783-801
  25. Zarembek, K. A., and Godowski, P. J. (2002) Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *The Journal of Immunology* **168**, 554-561
  26. Schreiberl, G., Tel, J., Sliepen, K. H. E. W. J., Benitez-Ribas, D., Figdor, C. G., Adema, G. J., and de Vries, I. J. M. (2010) Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **59**, 1573-1582
  27. Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014) Toll-Like Receptor Signaling Pathways.

- Frontiers in Immunology* **5**, 461
28. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., and Bryant, C. E. (2014) Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology* **14**, 546-558
  29. Nizard, M., Diniz, M. O., Roussel, H., Tran, T., Ferreira, L. C. S., Badoual, C., and Tartour, E. (2014) Mucosal vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **10**, 2175-2187
  30. Boyaka, P. N. (2017) Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *The Journal of Immunology* **199**, 9
  31. Levine, M. M., and Dougan, G. (1998) Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces. *The Lancet* **351**, 1375-1376
  32. Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., and Mharandi, A. (2003) Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* **21**, S89-S95
  33. Walker, R. I. (2005) Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. *Vaccine* **23**, 3369-3385
  34. Levine, M. M. (2010) Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biology* **8**, 129
  35. Reed, S. G., Orr Mt Fau - Fox, C. B., and Fox, C. B. (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine* **19**, 1597-1608
  36. Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B., and Reed, S. G. (2011) Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological Review* **239**, 178-196
  37. Gutjahr, A., Tiraby, G., Perouzel, E., Verrier, B., and Paul, S. (2016) Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation. *Trends in Immunology* **37**, 573-587
  38. Garçon, N., Chomez, P., and Van Mechelen, M. (2007) GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines* **6**, 723-739
  39. Weiskopf, D., Weinberger, B., and Grubeck-Loebenstien, B. (2009) The aging of the immune system. *Transplant International* **22**, 1041-1050
  40. Gavazzi, G., and Krause, K.-H. (2002) Ageing and infection. *The Lancet Infectious Diseases* **2**, 659-666
  41. Finkel, T., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2007) The common biology of cancer and ageing. *Nature* **448**, 767-774

42. Walker, J. M., and Slifka, M. K. (2010) Longevity of T-Cell Memory following Acute Viral Infection. in *Memory T Cells* (Zanetti, M., and Schoenberger, S. P. eds.), Springer New York, New York, NY. pp 96-107
43. Goronzy, J. J., Fang, F., Cavanagh, M. M., Qi, Q., and Weyand, C. M. (2015) Naive T Cell Maintenance and Function in Human Aging. *The Journal of Immunology* **194**, 4073-4080
44. Maue, A. C., Yager, E. J., Swain, S. L., Woodland, D. L., Blackman, M. A., and Haynes, L. (2009) T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends in Immunology* **30**, 301-305
45. Shimatani, K., Nakashima, Y., Hattori, M., Hamazaki, Y., and Minato, N. (2009) PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBP $\alpha$  underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 15807
46. Miller, J. P., and Allman, D. (2003) The Decline in B Lymphopoiesis in Aged Mice Reflects Loss of Very Early B-Lineage Precursors. *The Journal of Immunology* **171**, 2326-2330
47. Frasca, D., and Blomberg, B. B. (2011) Aging Affects Human B Cell Responses. *Journal of Clinical Immunology* **31**, 430-435
48. Frasca, D., Riley, R. L., and Blomberg, B. B. (2004) Effect of Age on the Immunoglobulin Class Switch. *Critical Reviews in immunology* **24**, 297-320
49. Jamieson, B. D., Douek, D. C., Killian, S., Hultin, L. E., Scripture-Adams, D. D., Giorgi, J. V., Marelli, D., Koup, R. A., and Zack, J. A. (1999) Generation of Functional Thymocytes in the Human Adult. *Immunity* **10**, 569-575
50. Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez, E., and Signer, R. A. (2009) The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nature Review Immunology* **9**, 57-62
51. Simon, A. K., Hollander, G. A., and McMichael, A. (2015) Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20143085
52. Kovacs, E. J., Palmer, J. L., Fortin, C. F., Fülöp, T., Goldstein, D. R., and Linton, P.-J. (2009) Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends in Immunology* **30**, 319-324
53. Shodell, M., and Siegal, F. P. (2002) Circulating, Interferon-Producing Plasmacytoid Dendritic Cells Decline During Human Ageing. *Scandinavian Journal of Immunology* **56**, 518-521
54. Sridharan, A., Esposito, M., Kaushal, K., Tay, J., Osann, K., Agrawal, S., Gupta, S.,

- and Agrawal, A. (2011) Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. *Age* **33**, 363-376
55. 高野俊幸. (2010) リグニンの利用に向けて. *ネットワークポリマー* **31**, 213-223
56. Davin, L. B., Wang, H.-B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Martin, D. M., Sarkanen, S., and Lewis, N. G. (1997) Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. *Science* **275**, 362-366
57. Reale, S., Di Tullio, A., Spreti, N., and De Angelis, F. (2004) Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins. *Mass spectrometry reviews* **23**, 87-126
58. Campbell, M. M., and Sederoff, R. R. (1996) Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant physiology* **110**, 3
59. Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. V., and Boerjan, W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical reviews in plant sciences* **17**, 125-197
60. Iiyama, K., Lam, T. B. T., and Stone, B. A. (1990) Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* **29**, 733-737
61. Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B., and Gómez-Cordovés, C. (2001) Hydroxycinnamic Acids and Ferulic Acid Dehydrodimers in Barley and Processed Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4884-4888
62. Sun, R., Sun, X. F., Wang, S. Q., Zhu, W., and Wang, X. Y. (2002) Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products* **15**, 179-188
63. Ugartondo, V., Mitjans, M., and Vinardell, M. P. (2008) Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology* **99**, 6683-6687
64. 飯山賢治. (2012) リグニンの生理活性:免疫賦活・抗腫瘍・抗ウイルス活性. *月刊フアインケミカル* **41**, 34-37
65. Sakagami, H., Kushida T Fau - Oizumi, T., Oizumi T Fau - Nakashima, H., Nakashima H Fau - Makino, T., and Makino, T. (2010) Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. *Pharmacology and Therapeutics* **128**, 91-105
66. Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., and Fujisawa, S.-i. (2005) Molecular requirements of lignin-

- carbohydrate complexes for expression of unique biological activities.  
*Phytochemistry* **66**, 2108-2120
67. Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O., Yamazaki, S., Yamamoto, N., and Toda, S. (1990) Structural Characterization of the Immunoactive and Antiviral Water-solubilized Lignin in an Extract of the Culture Medium of *Lentinus edodes* Mycelia (LEM) (Biological Chemistry). *Agricultural and biological chemistry* **54**, 479-487
  68. Olkku, J., Kotaviita, E., Salmenkallio-Marttila, M., Sweins, H., and Home, S. (2005) Connection between Structure and Quality of Barley Husk. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **63**, 17-22
  69. Sun, R., Mott, L., and Bolton, J. (1998) Isolation and Fractional Characterization of Ball-Milled and Enzyme Lignins from Oil Palm Trunk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 718-723
  70. Fujiwara, D., Wei, B., Presley, L. L., Brewer, S., McPherson, M., Lewinski, M. A., Borneman, J., and Braun, J. (2008) Systemic control of plasmacytoid dendritic cells by CD8+ T cells and commensal microbiota. *The Journal of Immunology* **180**, 5843-5852
  71. Kishimoto, T., Chiba, W., Saito, K., Fukushima, K., Uraki, Y., and Ubukata, M. (2010) Influence of Syringyl to Guaiacyl Ratio on the Structure of Natural and Synthetic Lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 895-901
  72. Saito, K., Watanabe, Y., Shirakawa, M., Matsushita, Y., Imai, T., Koike, T., Sano, Y., Funada, R., Fukazawa, K., and Fukushima, K. (2011) Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *The Plant Journal* **69**, 542-552
  73. Rolando, C., Monties, B., and Lapierre, C. (1992) Thioacidolysis. in *Methods in Lignin Chemistry* (Lin, S. Y., and Dence, C. W. eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp 334-349
  74. Yue, F., Lu, F., Sun, R.-C., and Ralph, J. (2012) Syntheses of Lignin-Derived Thioacidolysis Monomers and Their Uses as Quantitation Standards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 922-928
  75. Raetz, C. R. H., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 635-700
  76. Srimal, S., Surolia, N., Balasubramanian, S., and Surolia, A. (1996) Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A. *Biochemical Journal* **315**, 679-686

77. Geijtenbeek, T. B. H., and Gringhuis, S. I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* **9**, 465-479
78. Zhong, B., Tien, P., and Shu, H.-B. (2006) Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology* **352**, 14-21
79. 日本国税庁. 酒税法.
80. Johar, N., Ahmad, I., and Dufresne, A. (2012) Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products* **37**, 93-99
81. Maes, C., and Delcour, J. A. (2002) Structural Characterisation of Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylans in Wheat Bran. *Journal of Cereal Science* **35**, 315-326
82. Jin, Z., Akiyama, T., Chung, B. Y., Matsumoto, Y., Iiyama, K., and Watanabe, S. (2003) Changes in lignin content of leaf litters during mulching. *Phytochemistry* **64**, 1023-1031
83. Pitkänen, L., Tuomainen, P., Virkki, L., Aseyev, V., and Tenkanen, M. (2008) Structural Comparison of Arabinoxylans from Two Barley Side-Stream Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 5069-5077
84. Oscarsson, M., Andersson, R., Salomonsson, A. C., and Åman, P. (1996) Chemical Composition of Barley Samples Focusing on Dietary Fibre Components. *Journal of Cereal Science* **24**, 161-170
85. Bacic, A., and Stone, B. (1981) Chemistry and Organization of Aleurone Cell Wall Components From Wheat and Barley. *Functional Plant Biology* **8**, 475-495
86. Fincher, G. B. (1975) Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls. *Journal of the Institute of Brewing* **81**, 116-122
87. Choi, E. M., Kim, A. J., Kim, Y. O., and Hwang, J. K. (2005) Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro. *J Med Food* **8**, 446-453
88. Kelly, G. S. (1999) Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. *Alternative Medicine Review* **4**, 96-103
89. Leung, M. Y. K., Liu, C., Zhu, L. F., Hui, Y. Z., Yu, B., and Fung, K. P. (2004) Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berg. *Glycobiology* **14**, 501-510
90. Sun, R.-C., Sun, X.-F., and Zhang, S.-H. (2001) Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5122-5129

91. Trinchieri, G., and Sher, A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology* **7**, 179-190
92. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology* **21**, 335-376
93. Miller, S. I., Ernst, R. K., and Bader, M. W. (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 36-46
94. Doyle, S. E., Vaidya, S. A., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P. W., Wu, T.-T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M. E., Modlin, R. L., and Cheng, G. (2002) IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity* **17**, 251-263
95. Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., and Taniguchi, T. (2003) Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon- $\beta$  gene expression and endotoxin shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**, 860-866
96. Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777
97. Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005) Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International immunology* **17**, 1367-1378
98. Takeda, K., and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1-14
99. Tsuji, R., Koizumi, H., Aoki, D., Watanabe, Y., Sugihara, Y., Matsushita, Y., Fukushima, K., and Fujiwara, D. (2015) Lignin-rich enzyme lignin (LREL), a cellulase-treated lignin-carbohydrate derived from plants, activates myeloid dendritic cells via Toll-like receptor 4 (TLR4). *The Journal of biological chemistry* **290**, 4410-4421
100. Vailhé, M. A., Provan, G. J., Scobbie, L., Chesson, A., Maillot, M. P., Cornu, A., and Besle, J. M. (2000) Effect of Phenolic Structures on the Degradability of Cell Walls Isolated from Newly Extended Apical Internode of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 618-623
101. Gohda, M., Kunisawa, J., Miura, F., Kagiya, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I., and Kiyono, H. (2008) Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *The Journal of Immunology* **180**, 5335-5343
102. Alignani, D., Maletto, B., Liscovsky, M., Rópolo, A., Morón, G., and

- Pistoresi-Palencia, M. C. (2005) Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *Journal of leukocyte biology* **77**, 898-905
103. Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., and Facchini, A. (2001) Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **8**, 1131-1135
104. Mian, M. F., Lauzon, N. M., Andrews, D. W., Lichty, B. D., and Ashkar, A. A. (2010) FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Molecular Therapy* **18**, 1379-1388
105. Della Chiesa, M., Sivori, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., and Moretta, A. (2005) Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends in Microbiology* **13**, 128-136
106. Galandrini, R., De Maria, R., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (1994) CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **153**, 4399-4407
107. Sconocchia, G., Titus, J. A., and Segal, D. M. (1994) CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *The Journal of Immunology* **153**, 5473-5481
108. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T. (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167-2176
109. Caligiuri, M. A. (2008) Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469
110. Wright, S. C., and Bonavida, B. (1981) Selective lysis of NK-sensitive target cells by a soluble mediator released from murine spleen cells and human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of Immunology* **126**, 1516-1521
111. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007) Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-517
112. Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y., and Carson, W. E. (2002) IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *The Journal of Clinical Investigation* **110**, 983-992
113. Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for T(H)1 priming. *Nature immunology* **5**, 1260-1265

114. Fagarasan, S., Kawamoto S Fau - Kanagawa, O., Kanagawa O Fau - Suzuki, K., and Suzuki, K. (2010) Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annual Reviews of Immunology* **28**, 243-273
115. Casola, S., Otipoby Kl Fau - Alimzhanov, M., Alimzhanov M Fau - Humme, S., Humme S Fau - Uyttersprot, N., Uyttersprot N Fau - Kutok, J. L., Kutok Jl Fau - Carroll, M. C., Carroll Mc Fau - Rajewsky, K., and Rajewsky, K. (2004) B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature Immunology* **5**, 317-327
116. He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., Knowles, D. M., Rescigno, M., and Cerutti, A. (2007) Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL. *Immunity* **26**, 812-826
117. Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I. I., Itoh, K., Littman, D. R., and Fagarasan, S. (2008) Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* **29**, 261-271
118. Bos, N. A., Bun, J. C., Popma, S. H., Cebra, E. R., Deenen, G. J., van der Cammen, M. J., Kroese, F. G., and Cebra, J. J. (1996) Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infection and Immunity* **64**, 616-623
119. Murakami, M., Tsubata, T., Shinkura, R., Nisitani, S., Okamoto, M., Yoshioka, H., Usui, T., Miyawaki, S., and Honjo, T. (1994) Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. *The Journal of Experimental Medicine* **180**, 111-121
120. Bunker, J. J., Erickson, S. A., Flynn, T. M., Henry, C., Koval, J. C., Meisel, M., Jabri, B., Antonopoulos, D. A., Wilson, P. C., and Bendelac, A. (2017) Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science* **358**, eaan6619
121. Holodick, N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N., and Hernández, A. M. (2017) Defining Natural Antibodies. *Frontiers in Immunology* **8**, 872
122. Neutra, M. R., Mantis, N. J., and Kraehenbuhl, J.-P. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature immunology* **2**, 1004-1009

123. Niedergang, F., and Kweon, M.-N. (2005) New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends in Microbiology* **13**, 485-490
124. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* **2**, 361-367
125. MacPherson, G. G., and Liu, L. M. (1999) Dendritic Cells and Langerhans Cells in the Uptake of Mucosal Antigens. in *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines* (Kraehenbuhl, J.-P., and Neutra, M. R. eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp 33-53
126. Neutra, M. R., and Kozlowski, P. A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**, 148-158
127. Marciani, D. J. (2003) Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today* **8**, 934-943
128. Jounai, K., Ikado, K., Sugimura, T., Ano, Y., Braun, J., and Fujiwara, D. (2012) Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells. *PloS one* **7**, e32588
129. Rose, M. R. (1991) *Evolutionary Biology of Aging*, Oxford University Press
130. Flatt, T. (2012) A new definition of aging? *Frontiers in Genetics* **3**, 148
131. Bronikowski, A. M., and Flatt, T. (2010) Aging and its demographic measurement. *Nat. Educ. Knowl.* **3**, 3
132. Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999) The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* **284**, 1835-1837
133. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology* **15**, 87-103
134. Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2001) A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 378-386
135. Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005) The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions. *The Journal of Immunology* **174**, 727-734
136. Takagi, H., Fukaya, T., Eizumi, K., Sato, Y., Sato, K., Shibazaki, A., Otsuka, H., Hijikata, A., Watanabe, T., Ohara, O., Kaisho, T., Malissen, B., and Sato, K.

- (2011) Plasmacytoid Dendritic Cells Are Crucial for the Initiation of Inflammation and T Cell Immunity In Vivo. *Immunity* **35**, 958-971
137. Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D. F. (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* **4**, 1009-1015
138. Le Bon, A., and Tough, D. F. (2002) Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology* **14**, 432-436
139. Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2004) Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* **103**, 3058-3064
140. Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003) Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234
141. Tsuji, R., Yamamoto, N., Yamada, S., Fujii, T., Yamamoto, N., and Kanauchi, O. (2018) Induction of anti-viral genes mediated by humoral factors upon stimulation with Lactococcus lactis strain Plasma results in repression of dengue virus replication in vitro. *Antiviral Research* **160**, 101-108
142. Jounai, K., Sugimura, T., Ohshio, K., and Fujiwara, D. (2015) Oral administration of Lactococcus lactis subsp. lactis JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection. *PloS one* **10**, e0119055
143. Jounai, K., Sugimura, T., Morita, Y., Ohshio, K., and Fujiwara, D. (2018) Administration of Lactococcus lactis strain Plasma induces maturation of plasmacytoid dendritic cells and protection from rotavirus infection in suckling mice. *International Immunopharmacology* **56**, 205-211
144. Suzuki, H., Tsuji, R., Sugamata, M., Yamamoto, N., Yamamoto, N., and Kanauchi, O. (2019) Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria is effective against dengue virus infection in mice. *International Journal of Molecular Medicine* **43**, 426-434
145. Sugimura, T., Takahashi, H., Jounai, K., Ohshio, K., Kanayama, M., Tazumi, K., Tanihata, Y., Miura, Y., Fujiwara, D., and Yamamoto, N. (2015) Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus. *British Journal of Nutrition* **114**, 727-733

146. Sugimura, T., Jounai, K., Ohshio, K., Tanaka, T., Suwa, M., and Fujiwara, D. (2013) Immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* JCM5805 on human plasmacytoid dendritic cells. *Clinical immunology* **149**, 509-518
147. Shibata, T., Kanayama, M., Haida, M., Fujimoto, S., Oroguchi, T., Sata, K., Mita, N., Kutsuzawa, T., Ikeuchi, M., Kondo, M., Naito, K., Tsuda, M., Nishizaki, Y., and Ishii, N. (2016) *Lactococcus lactis* JCM5805 activates anti-viral immunity and reduces symptoms of common cold and influenza in healthy adults in a randomized controlled trial. *Journal of Functional Foods* **24**, 492-500
148. Sakata, K., Sasaki, Y., Jounai, K., Fujii, T., and Fujiwara, D. (2017) Preventive Effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 Yogurt Intake on Influenza Infection among Schoolchildren. *Health* **9**, 756-762
149. Kanauchi, O., Andoh, A., AbuBakar, S., and Yamamoto, N. (2018) Probiotics and Paraprobiotics in Viral Infection: Clinical Application and Effects on the Innate and Acquired Immune Systems. *Current Pharmaceutical Design* **24**, 1-8
150. Suzuki, H., Ohshio, K., and Fujiwara, D. (2016) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 activates natural killer cells via dendritic cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **80**, 798-800
151. Suzuki, H., Jounai, K., Ohshio, K., Fujii, T., and Fujiwara, D. (2018) Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria enhances antigen-specific immune responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **503**, 1315-1321
152. Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M., and Yamamuro, T. (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* **17**, 183-194
153. Hosokawa, M., Kasai, R., Higuchi, K., Takeshita, S., Shimizu, K., Hamamoto, H., Honma, A., Irino, M., Toda, K., Matsumura, A., and et al. (1984) Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mechanism of Aging and Development* **26**, 91-102
154. Takeda, T. (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research* **34**, 639-659
155. 高橋良哉. (2010) 老化促進モデルマウス SAM を用いた抗老化研究. *YAKUGAKU ZASSHI* **130**, 11-18
156. Chiba, Y., Shimada, A., Kumagai, N., Yoshikawa, K., Ishii, S., Furukawa, A., Takei, S., Sakura, M., Kawamura, N., and Hosokawa, M. (2009) The

- Senescence-accelerated Mouse (SAM): A Higher Oxidative Stress and Age-dependent Degenerative Diseases Model. *Neurochemical Research* **34**, 679-687
157. Sugimura, T., Jounai, K., Ohshio, K., Suzuki, H., Kirisako, T., Sugihara, Y., and Fujiwara, D. (2018) Long-term administration of pDC-Stimulative *Lactococcus lactis* strain decelerates senescence and prolongs the lifespan of mice. *International Immunopharmacology* **58**, 166-172
  158. Fujii, T., Jounai, K., Horie, A., Takahashi, H., Suzuki, H., Ohshio, K., Fujiwara, D., and Yamamoto, N. (2017) Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study. *Journal of Functional Foods* **35**, 513-521
  159. Komano, Y., Shimada, K., Naito, H., Fukao, K., Ishihara, Y., Fujii, T., Kokubo, T., and Daida, H. (2018) Efficacy of heat-killed *Lactococcus lactis* JCM 5805 on immunity and fatigue during consecutive high intensity exercise in male athletes: a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **15**, 39
  160. Leng, J., and Goldstein, D. R. (2010) Impact of aging on viral infections. *Microbes and Infection* **12**, 1120-1124
  161. Lande, R., and Gilliet, M. (2010) Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**, 89-103
  162. Mäkelä, M. J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimäki, M., Blomqvist, S., Hyypiä, T., and Arstila, P. (1998) Viruses and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 539-542
  163. Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Le Page, A., Frost, E. H., Cohen, A. A., Witkowski, J. M., and Franceschi, C. (2018) Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology* **8**, 1960
  164. Wherry, E. J., and Kurachi, M. (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Review Immunology* **15**, 486-499
  165. Bhattacharyya, T. K., and Thomas, J. R. (2004) Histomorphologic changes in aging skin: observations in the CBA mouse model. *Archives of Facial Plastic Surgery* **6**, 21-25
  166. Wulf, H. C., Sandby-Moller, J., Kobayasi, T., and Gniadecki, R. (2004) Skin aging

- and natural photoprotection. *Micron* **35**, 185-191
167. Brandner, J. M., and Schulzke, J. D. (2015) Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine. *Cell Tissue Research* **360**, 723-748
  168. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* **156**, 1099-1111
  169. Bazzoni, G., and Dejana, E. (2002) Keratinocyte junctions and the epidermal barrier: how to make a skin-tight dress. *Journal of Cell Biology* **156**, 947-949
  170. Tokumasu, R., Yamaga, K., Yamazaki, Y., Murota, H., Suzuki, K., Tamura, A., Bando, K., Furuta, Y., Katayama, I., and Tsukita, S. (2016) Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E4061-4068
  171. Hung, C. F., Fang, C. L., Al-Suwayeh, S. A., Yang, S. Y., and Fang, J. Y. (2012) Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *Journal of Dermatological Science* **68**, 135-148
  172. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell* **126**, 741-754
  173. Capaldo, C. T., and Nusrat, A. (2009) Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 864-871
  174. Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., Schwartz, A. V., Simonsick, E. M., Tylavsky, F. A., Visser, M., and Newman, A. B. (2006) The Loss of Skeletal Muscle Strength, Mass, and Quality in Older Adults: The Health, Aging and Body Composition Study. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **61**, 1059-1064
  175. Vinciguerra, M., Musaro, A., and Rosenthal, N. (2010) Regulation of Muscle Atrophy in Aging and Disease. in *Protein Metabolism and Homeostasis in Aging* (Tavernarakis, N. ed.), Springer US, Boston, MA. pp 211-233
  176. Rubartelli, A., and Lotze, M. T. (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology* **28**, 429-436
  177. 辻亮平, 福島和彦, and 藤原大介. (2016) 発泡酒製造の副産物に含まれている宝の

- 山~免疫賦活作用のあるリグニン・多糖結合体の発見~. *化学と生物* **54**, 237-239
178. Park, B. S., and Lee, J.-O. (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* **45**, e66
179. Okamoto, M., Oh-e, G., Oshikawa, T., Furuichi, S., Tano, T., Ahmed, S. U., Akashi, S., Miyake, K., Takeuchi, O., Akira, S., Himeno, K., Sato, M., and Ohkubo, S. (2004) Toll-Like Receptor 4 Mediates the Antitumor Host Response Induced by a 55-Kilodalton Protein Isolated from *Aeginetia indica* L., a Parasitic Plant. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**, 483
180. Fu, S.-L., Hsu, Y.-H., Lee, P.-Y., Hou, W.-C., Hung, L.-C., Lin, C.-H., Chen, C.-M., and Huang, Y.-J. (2006) Dioscorin isolated from *Dioscorea alata* activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**, 137-144
181. Tsuji, R., Ikado, K., and Fujiwara, D. (2018) Modulation of Innate Immunity by lignin-Carbohydrate, a Novel TLR4 Ligand, Results in Augmentation of Mucosal IgA and Systemic IgG Production. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 64
182. Cerutti, A. (2008) The regulation of IgA class switching. *Nature Reviews Immunology* **8**, 421
183. Sato, A., Hashiguchi, M., Toda, E., Iwasaki, A., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. (2003) CD11b+ Peyer's Patch Dendritic Cells Secrete IL-6 and Induce IgA Secretion from Naive B Cells. *The Journal of Immunology* **171**, 3684
184. Brooks, D. G., Teyton, L., Oldstone, M. B. A., and McGavern, D. B. (2005) Intrinsic Functional Dysregulation of CD4 T Cells Occurs Rapidly following Persistent Viral Infection. *Journal of Virology* **79**, 10514
185. Virgin, H. W., Wherry, E. J., and Ahmed, R. (2009) Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* **138**, 30-50
186. Tsuji, R., Komano, Y., Ohshio, K., Ishii, N., and Kanauchi, O. (2018) Long-term administration of pDC stimulative lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* strain Plasma, prevents immune-senescence and decelerates individual senescence. *Experimental Gerontology* **111**, 10-16
187. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H. C. (2000) Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001-1011
188. 平坂勝也. (2014) 廃用性筋萎縮予防に関する分子栄養学的研究. *日本栄養・食糧学会誌* **67**, 291-297
189. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P. S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction

- pathway. *Cytokine* **42**, 145-151
190. Miron, J., Ben-Ghedalia, D., and Morrison, M. (2001) Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science* **84**, 1294-1309
  191. Russell, J. B., Muck, R. E., and Weimer, P. J. (2009) Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiology Ecology* **67**, 183-197
  192. Wilson, D. B. (2011) Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 259-263

## 発表論文・総説

### 原著論文

1. Tsuji R, Koizumi H, Aoki D, Watanabe Y, Sugihara Y, Matsushita Y, Fukushima K and Fujiwara D.

Lignin-rich enzyme lignin (LREL), a cellulase-treated lignin-carbohydrate derived from plants, activates myeloid dendritic cells via Toll-like receptor 4 (TLR4).

*The Journal of Biological Chemistry*, (2015) 290 (7): 4410-4421

<第2章>

2. Tsuji R, Ikado K and Fujiwara D.

Modulation of Innate Immunity by Lignin-Carbohydrate, a Novel TLR4 Ligand, Results in Augmentation of Mucosal IgA and Systemic IgG Production.

*International Journal of Molecular Sciences*, (2018) 19 (1): E64

<第3章>

3. Tsuji R, Komano Y, Ohshio K, Ishii N and Kanauchi O.

Long-term administration of pDC stimulative lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* strain Plasma, prevents immune-senescence and decelerates individual senescence.

*Experimental Gerontology*, (2018) 111: 10-16

<第4章>

### 総説

1. 辻亮平, 福島和彦, 藤原大介.

発泡酒製造の副産物に含まれている宝の山.

化学と生物 (2016) 54 (4): 237-239

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、論文の構成や内容についてご助言をいただき、さらに論文審査委員主査をお引き受けいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻教授 高橋直樹先生に対し、深く感謝の意を表します。

大麦搗精粕の LREL 画分のリグニン分析に関して、多くのご指導・ご支援を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科森林・環境資源科学専攻教授 福島和彦先生、同准教授 松下泰幸先生、同助教 青木弾先生に心より御礼申し上げます。

LC-Plasma の抗老化効果に関して、多くの有益な助言を賜りました東海大学健康学部教授 石井直明先生に深く御礼申し上げます。

本論文は筆者がキリンビール株式会社に入社後に行った研究成果をまとめたものです。筆者に研究の機会を与えて下さったキリン株式会社健康技術研究所所長 小川 俊也博士、同副所長 田嶋 修氏、同リサーチフェロー 金内 理博士、藤井 敏雄博士、事業創造部主幹 藤原 大介博士に感謝いたします。特に藤原 大介博士には、時に厳しく、時に優しく指導いただき、筆者の企業研究員としての礎を築いていただきました。また、金内 理博士には筆者の企業研究者としての矜持を尊重してくれながらも、必要に応じた厚い指導を賜りました。深く御礼申し上げます。

また、同年齢の企業研究員として藤原大介博士の下で研究活動を行い、互いに叱咤激励しながら、苦楽を共にした小岩井乳業株式会社城内健太氏に深く感謝いたします。そして、共に実験を行い、研究所での生活のイロハを教えてくださいましたキリン株式会社基盤技術研究所 故 井門 久美子氏にも厚く御礼申し上げます。明るい人柄のみならず、研究に対する優れた技術と先を見越した鋭い指摘にいつも助けられました。

さらには、筆者の会社での研究を公私ともに支えてくださいました、キリン株式会社健康技術研究所、基盤技術研究所、飲料技術研究所(旧、キリンビバレッジ株式会社コア技術研究所)の皆様にも感謝いたします。

最後に、同じ企業研究員として、音楽仲間として、切磋琢磨し、共に寄り添いながら、本論文をまとめる支えとなってくれた最愛の家族である妻 悠見子、産まれたばかりにも関わらず、夜泣きもせず、とてもいい子で論文執筆に協力的だった長男 夏絃にも深く感謝いたします。