

論文内容の要旨

氏 名 辻 亮平

論文題目：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

第1章 序論

免疫とは外敵からの侵入に対して、速やかに排除する高等生物に広く備わった高度なシステムである。近年の研究で多くの免疫細胞が多岐に渡った機能を有していることが分かっているが、これらの細胞の機能が何らかの原因で弱くなると、外敵の排除ができなくなり、感染症に罹患する。これまで人類は非常に多くの感染症と闘ってきている。抗生物質の発見やワクチン技術の開発により、感染症を克服してきた。しかしながら、抗生物質の多用による MRSA や *C. difficile* などの多剤耐性細菌の出現や、人の移動を含めたグローバルな物流の進化によるデング熱やジカ熱・エボラ出血熱といった新型感染症の発生や蔓延が起きており、感染症の完全な克服はできていない。

哺乳動物の免疫は自然免疫系と獲得免疫系に大別される。獲得免疫系は特定の抗原に対して速やかに強い反応を示す一方で、新しい外敵に対しては自然免疫を介した学習が必要である。そのため、多剤耐性細菌や新型感染症の対策・予防には自然免疫からのアプローチが有効である。そこで本研究では、普遍的に存在する植物組織からの新規免疫賦活素材を探索し、その作用メカニズムと新しい切り口でのワクチンアジュバントとしての応用に向けた詳細な検討を行った。さらに IFN- α の産生誘導ができる乳酸菌を用いて、新規用途検討として獲得免疫系も含めた免疫老化やその他の老化表現型に対する抗老化効果の詳細な検討を行った。

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

リグニンは植物の細胞壁を強固にし、外敵からの侵入を防ぐ構造を構成しているものであり、セルロースに次いで2番目に多いバイオマスである。しかしながら、生理活性はあまり知られておらず、また生理機能に着目した商業化の例も乏しい。我々は、発泡酒の製造のときに副産物として生じる大麦穀皮にリグニンが豊富に含まれることに着目し、自然免疫系を活性化するものの探索を行った。過去の知見を参考に、大麦穀皮を4つの画分に分画し、マウス骨髄細胞由来樹状細胞(以下、BM-DC)に添加したところ、Lignin-Rich Enzyme Lignin 画分(以下、LREL)と Pure Enzyme Lignin 画分(以下、PEL)において活性化が起こり、さら

に LREL のほうが PEL よりもその活性が強かった。大麦穀皮以外の食品として食される植物組織より抽出した LREL 画分も同様の活性があることを明らかにしたが、大麦穀皮由来の LREL が最も強い生理活性を有していた。

次に LREL および PEL 画分の化学的な特徴を調べることを目的として、リグニン構造、糖組成の分析を行った。さらにリグニンと糖の結合と免疫賦活活性との関係を、アルカリ加水分解したサンプルを用いて評価した。その結果、リグニンに特有な β -O-4 型構造を構成するモノマー化合物が検出でき、さらに LREL のほうが PEL よりもリグニンの含有量が多い、という結果が得られ、分析的にリグニン構造が含まれる免疫賦活物質であることを世界で初めて見出した。また、糖組成分析の結果、通常の大麦穀皮と比較して、LREL および PEL はガラクトース及びマンノースが濃縮されていることを明らかにした。さらにリグニンと多糖のエステル結合を分解したところ、BM-DC に対する免疫賦活作用が消失した。これらの結果から、LREL および PEL は、ガラクトースとマンノースが濃縮された特徴的な組成の多糖とリグニンがエステル結合していることで生理活性が生じるリグニン・多糖結合体である化学的特徴を見出した。

最後に LREL の免疫賦活活性の作用メカニズムを TLR ファミリーのノックアウトマウスを用いて作用機構の解析を行った。その結果、LPS が天然リガンドとして知られる TLR4 のノックアウトマウス由来の BM-DC で活性化が完全に消失した。また、多糖類の受容体のブロッキング抗体などを使用し、TLR4 以外の受容体が LREL の免疫賦活作用に関わっていないこと、LPS 阻害剤であるポリミキシン D により、微生物由来 LPS のコンタミではないことを明らかにした。これらの結果より、LREL は新規の TLR4 リガンドであることが示された。

第 3 章 - LREL の *in vivo* での作用と応用開発 -

LREL の *in vivo* における免疫賦活能を検証することを目的として、C57BL/6J マウスに LREL を腹腔内投与した。すると、LREL 投与により、一過的に血中 IL-12p40 濃度の上昇が確認された。また、投与 24 時間後の脾臓細胞において、ミエロイド樹状細胞(mDC)および NK 細胞の活性化が認められた。これらの結果から、LREL は *in vivo* においても、免疫賦活作用を有することを明らかにした。

次に経口投与でも免疫賦活作用が見られるのかを検証した。LREL の単回経口投与試験において、腸間膜リンパ節中の mDC の活性化が確認された。また、LREL の反復経口投与試験において、腸間膜リンパ節の mDC の有意傾向の活性化に加え、IFN- γ 陽性の CD4+ T 細

胞の比率が上昇することを見出した。これらの結果から、LREL は経口投与でも免疫賦活能があることに加え、2 週間投与し続けることで、自然免疫系だけではなく獲得免疫にも影響を与えることができる素材であることが示された。

最後に LREL の経口ワクチンのアジュバントとしての可能性を検証した。ワクチンアジュバントは抗原提示細胞に抗原を取り込ませて抗体産生等に繋げるために、非常に重要な役割を持っており、既存のワクチンにも使用される不可欠なものである。BALB/C マウスに OVA と LREL を週に 1 度、5 回反復して経口で投与したところ、血液中の総 IgG および抗 OVA IgG の量が LREL 群で有意に増加した。また、小腸洗浄液において、総 IgA の濃度は LREL 群で有意に増加したが、抗 OVA IgA の濃度は増加しなかった。IgA は一般的に IgG よりも抗原に対する特異性が低く、広範な抗原に反応することが知られていることから、これらのデータにより、LREL には経口ワクチンのアジュバントとして、一定の効果があることが示唆された。

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

生体内に存在する樹状細胞には mDC のほかにプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)がある。pDC は非常にレアなサブセットではあるが、生体内に広く存在し、ウイルスの感染を感知して IFN- α を産生する。*Lactococcus lactis* strain Plasma (以下、LC-Plasma)は pDC を活性化し、TLR9 を介して IFN- α 産生を誘導する乳酸菌として単離された。様々な非臨床試験および臨床試験において、ウイルス感染症に対する効果が見出されている。

免疫系は他の臓器と同じく、経年的に老化することが知られている。免疫系が老化すると pDC の IFN- α 誘導能が落ちることに加え、NK 細胞や T 細胞の機能も低下し、感染症やガンへの罹患率が高くなることが知られている。本章では LC-Plasma の新たな機能を見出すことを目的として、免疫老化や個体の老化に対する影響を、老化促進マウス(SAM)を使用して検証した。

免疫系の老化が促進することが知られている SAMP1 マウスにおいて、LC-Plasma の免疫老化に対する抗老化効果を検証した。8 週齢の SAMP1 マウスに LC-Plasma を 1 mg/head となるように 15 週間混餌投与したところ、脾臓リンパ球の TLR9 リガンド(CpG)に対する IFN- α 産生促進能が LC-Plasma 群で有意に増加していた。また、CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞において、ナイーブマーカーである CD62L の陽性細胞の割合が有意に増加していた。これらの結果から、LC-Plasma を経口摂取することで、pDC の活性低下が抑制され、T 細胞の老化が抑制される可能性が示唆された。

そして、免疫系の老化が報告されていない系統である SAMP10 マウスを使用して、個体レベルでの老化に対する効果を検証した。老年初期にあたる 28 週齢の SAMP10 マウスを 2 群に分け、LC-Plasma を 1 mg/head となるように 20 週間混餌投与した。すると、脾臓リンパ球の CD4+ T 細胞において、SAMP1 マウスと同様に CD62L 陽性 CD4+ T 細胞の比率が LC-Plasma 群で高くなる、免疫老化抑制効果を再現できた。また、皮膚老化に対する影響を評価したところ、LC-Plasma 群で老化時に見られる表皮の薄化が抑制されていることが確認された。さらに筋肉の老化に対する影響を評価したところ、ヒラメ筋の全体重に対する比重量が LC-Plasma 群で増加していた。最後に個体レベルでの老化度を評価したところ、LC-Plasma 群で老化度が統計的に有意に減少していた。

これらの結果から、LC-Plasma の長期経口摂取によって、免疫老化のみならず、個体レベルでの老化を抑制することができるという、抗老化効果があることが示唆された。

第 5 章 - 総括 -

本研究では自然免疫と獲得免疫系の懸け橋となっている樹状細胞の活性化に着目し、TLR シグナルを活性化する素材の探索とその応用開発に関わる検討を実施してきた。穀物穀皮を用いた検討において、TLR4 を活性化する画分を抽出することに成功し、経口ワクチンのアジュバントとしての可能性を見出した。また TLR9 リガンドを有する LC-Plasma の検討において、新規に抗老化効果を見出した。

これらの新たな樹状細胞活性化素材が生体防御作用、さらには老化制御などの機能性食品素材として活用され、多くの人々の健康維持に貢献できることを今後に期待したい。

以上