

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 28 年度博士課程進学  
氏名 高野 智弘  
指導教員 八村 敏志

### 論文題目

腸管免疫系を介した慢性炎症の制御に関する研究

#### 背景と目的

慢性炎症は様々な生体の異常と密接な関係があることが報告されている。例えば、加齢に伴い全身で慢性炎症状態になることが報告されており、慢性炎症は加齢性疾患の原因となりうる。慢性炎症が生じるメカニズムや、抑制する手段を明らかにすることは、加齢誘発性慢性炎症のみならず生活習慣病の改善にも寄与する可能性がある。

免疫組織は全身のいたるところに存在するが、特に腸管では全身の 60%以上の免疫細胞が集積し、人体最大の免疫器官と言われる。腸管は常に外界から摂取されたものに曝され、食物や無害なものに対しては免疫反応を起こさず、有害な物質や病原体に対してのみ免疫反応を起こす高度な仕組みを発達させている。そのために腸管免疫系には特徴的な炎症抑制機構が存在し、その機能不全が慢性炎症の亢進にはたらく一方で、その抑制機構を利用して炎症を抑制することができると考えられる。

そこで本研究では、加齢に伴う慢性炎症の生じるメカニズムを腸管免疫系の観点から明らかとすることを目的とした。また慢性炎症の抑制手段の一つとして、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株と腸管免疫系との相互作用を明らかにすることで、食品成分による抗炎症作用を検討することを目的とした。

## 第一章 加齢に伴う制御性 T 細胞分化誘導の低下メカニズムの解析

腸管免疫系における重要な炎症抑制機構のひとつに過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) の誘導が挙げられる。加齢に伴い Treg の分化誘導は低下することが報告されているが、腸管免疫系における Treg 誘導に関する加齢の影響についてはこれまで報告されていない。当研究室の過去の研究から、卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的 T 細胞レセプターを有するトランスジェニックマウス RAG2KO/DO11.10 マウスに OVA を含有する食餌 (卵白食) を 7 日間自由摂食させることで、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node; MLN) において OVA 特異的な Treg を誘導できることを報告済みである。本研究では、この実験系を用いて経口抗原の投与による Treg 誘導における加齢の影響を検討した。RAG2KO/DO11.10 マウスの若齢および加齢マウスに卵白食を 7 日間自由摂食させ、MLN における Treg の割合を測定したところ、加齢マウスにおいて Treg の誘導が低下していることが観察された。

腸管免疫系において樹状細胞 (dendritic cell; DC) は Treg の分化を誘導する主要な細胞の一つである。Treg の分化誘導を促進する方法の一つに、ビタミン A 代謝産物であるレチノイン酸を産生することが挙げられる。加齢に伴い、DC のレチノイン酸産生能が低下することで Treg 誘導が減少する可能性が考えられた。

そこで若齢 BALB/c マウスおよび加齢マウスの MLN DC に発現するレチノイン酸合成酵素 (retinaldehyde dehydrogenase 2; RALDH2) の mRNA 発現量を測定したところ、若齢マウスと比較して、加齢マウスにおいてその発現量が低下していることが確認された。

当研究室の研究から MLN DC は表面分子として発現する CD11b、CD103 および PD-L1 により 4 つのサブセットに分けられることを明らかとしており、その中でも CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> サブセットにおいて RALDH2 の mRNA 相対発現量および酵素活性が高いことが明らかとなっている。そこで加齢により MLN DC 中の 4 つのサブセットの割合および酵素活性に変化があるかを調べた。その結果若齢マウスと比較して加齢マウスにおいて CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> サブセットの割合および酵素活性の低下が見られた。よって加齢に伴い MLN DC によるレチノイン酸産生能が低下していることが考えられた。

次に、加齢に伴い、MLN DC のレチノイン酸産生能が低下していることを、その影響をより観察しやすい *in vitro* の実験系を用いて検討した。若齢マウスおよび加齢マウス由来の MLN DC と OVA 特異的 T 細胞を抗原の存在下で共培養し、Treg の分化を誘導する能力に変化があるかを検討した。その結果、若齢マウス由来の MLN DC と比較して、加齢マウス由来の MLN DC と共培養した T 細胞では誘導された Treg の割合が低いことが観察された。このことから、*in vitro* の結果からも加齢に伴い MLN DC のレチノイン酸産生能が低下していることが示唆された。

近年、遺伝子のエピジェネティックな変化によりその発現が調節されることが報告されている。そこで、加齢に伴い RALDH2 遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランド領域がメチル化されることにより遺伝子発現が抑制される可能性を検討した。若齢および加齢マウス由来の MLN DC を精製し、RALDH2 遺伝子プロモーター領域における CpG アイランド領域

のメチル化度を解析した。その結果、若齢マウスと比較して加齢マウス由来 MLN DC の RALDH2 遺伝子プロモーター領域では CpG 配列のメチル化が有意に亢進していることが明らかとなった。この結果から、加齢に伴うエピジェネティックな遺伝子発現抑制により、MLN DC におけるレチノイン酸産生が低下している可能性が示された。

加齢に伴う Treg 誘導の低下が、レチノイン酸産生の低下に起因するかを検討するために、経口抗原摂取による Treg 誘導の実験系において、レチノイン酸を投与することによる影響を検討した。RAG2KO/DO11.10 の加齢マウスに 7 日間卵白食を自由摂食させ、同期間 Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させたレチノイン酸の腹腔内投与を 1 日 1 回行った。対照群には DMSO のみの腹腔内投与を行った。その結果、対照群と比較してレチノイン酸を投与した群において、MLN 内の Treg の割合が増加する傾向が観察された。このことから、加齢に伴う Treg 誘導の低下がレチノイン酸産生の低下によるものである可能性が示唆された。

以上から、加齢に伴い腸管免疫系における炎症抑制機構の重要な担い手である Treg を分化させる機能が低下していることが示唆され、このことが慢性炎症につながる可能性が考えられる。その原因として MLN DC の RALDH2 遺伝子プロモーター領域がメチル化されていることにより、その発現が抑制され、レチノイン酸産生能が低下する可能性が示された。

## 第二章 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 による腸管免疫系を介した抗炎症作用のメカニズムの解析

慢性炎症状態を抑制する手段の一つとして、抗炎症作用のある成分の摂取が考えられる。特に生体に有益な影響を及ぼす微生物であるプロバイオティクスは免疫賦活作用が多く報告されており、その作用が注目されている。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株は、骨髄由来 DC および腹腔マクロファージに対して抗炎症性サイトカイン interleukin(IL)-10 の高い誘導能を持つことで選抜された菌株であり、2 型糖尿病モデルである KKAy マウスに *L. plantarum* OLL2712 株を経口投与することで、血清中の炎症性サイトカインおよび脂肪組織における炎症性サイトカイン遺伝子発現量が抑制されることがすでに報告されている。本菌体が抗炎症作用を及ぼす作用メカニズムを解明することは、抗炎症性を発揮する食品成分等の開発に貢献すると考えられる。乳酸菌等の食品成分は経口的に摂取されることから、腸管免疫系に作用することが考えられる。しかしながら、腸管の細胞を採取し、直接的に乳酸菌の作用を調べた報告は多くなく、特に本菌株の特徴でもある IL-10 の産生誘導能を調べた例は報告がない。本研究では、*L. plantarum* OLL2712 株の腸管免疫系、特に免疫反応の方向性を左右する DC に及ぼす影響について検討した。

まず本菌体の腸管 DC への作用について検討した。BALB/c マウスから MLN DC およびパイエル板 (Peyer's patch; PP) DC を精製し、*L. plantarum* OLL2712 株と共培養したのち IL-10 遺伝子発現量と上清中に含まれる IL-10 タンパク質量をそれぞれ測定した。その結果、乳酸菌無添加と比較して、*L. plantarum* OLL2712 株と共培養した MLN DC および PP DC の両方において IL-10 遺伝子相対発現量および IL-10 タンパク質が増加することが観察された。これらの

結果から、*L. plantarum* OLL2712 株は腸管 DC に作用して IL-10 産生を誘導することが示唆された。

そこで同株の経口投与による腸管免疫系における効果を検討した。その結果、*L. plantarum* OLL2712 株を投与したマウスでは対照群と比較して 12 時間後には PP DC で、6 日間投与したマウスでは MLN DC で IL-10 遺伝子相対発現量が増加していた。これらの結果から、*L. plantarum* OLL2712 株が生体に対して腸管 DC の IL-10 産生を誘導し、抗炎症性の作用を及ぼす可能性が示された。

以上の結果から、腸管免疫系との相互作用が示唆され、*L. plantarum* OLL2712 株が腸管免疫系を介して抗炎症性作用を示す可能性が示された。

## 総括

本研究では、腸管免疫系に着目し、慢性炎症に対する寄与について明らかとすることを目的とした。第一章では、加齢に伴う慢性炎症発症の原因として、Treg 誘導能の変化を検討した。経口抗原摂取による Treg 誘導モデルを用いて検討した結果、加齢に伴い抗原に対する Treg の誘導が低下していることが示唆された。経口抗原に対する Treg 誘導には腸管 DC の寄与が大きいため、続いて MLN DC の変化を検討した。MLN DC はビタミン A 代謝産物であるレチノイン酸の合成を介して Treg の誘導を促進することが報告されているため、その合成酵素である RALDH2 に着目した。その結果、加齢マウスの MLN DC では RALDH2 遺伝子発現が顕著に低下していた。その原因として、すでに Treg 誘導能が高いことが明らかとなっている MLN DC のサブセットの割合が減少していること、RALDH2 酵素活性が低下していることが明らかとなった。さらに加齢マウスの MLN DC では RALDH2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が亢進されており、このエピジェネティックな遺伝子発現抑制の影響を受けていることが示唆された。

第二章では、慢性炎症を抑制する食品成分の候補の一つとして、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を誘導することが報告されている乳酸菌 *L. plantarum* OLL2712 株の腸管免疫系への影響を検討した。通常の BALB/c マウスに本菌体を経口投与することで MLN DC の IL-10 遺伝子発現が増加したことから、本菌体が慢性炎症抑制に機能する食品成分として活用できる可能性が示された。

これらの結果から、腸管免疫系の免疫抑制機構を担う細胞の一つである MLN DC の機能低下が加齢における慢性炎症の原因となる可能性が考えられる。MLN DC の機能低下を食品成分等で改善することで QOL や健康寿命の改善につながる可能性がある。