

論文（要約）

腸管免疫系を介した慢性炎症の制御に関する研究

高野 智弘

目次

略語一覧	2
緒言	4
第一章 加齢に伴う制御性 T 細胞誘導の低下のメカニズムの解析	14
第二章 乳酸菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> 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	15
序	15
方法	16
結果	19
考察	22
総合討論	35
参考文献	36
謝辞	49

略語一覽

ADH:	alcohol dehydrogenase
ALDH:	aldehyde dehydrogenase
BAA:	Bodipy-aminoacetaldehyde
BAAA:	Bodipy-aminoacetate
BSA:	bovine serum albumin
CCR:	C-C chemokine receptor
CD:	cluster differentiation
cDNA:	complementary DNA
CN:	casein
CTLA-4:	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC:	dendritic cell
DEAB:	N, N-dimethylaminobenzaldehyde
DMSO:	dimethyl sulfoxide
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EW:	egg-white
FACS:	fluorescence-activated cell sorting
FAE:	follicle associated epithelium
FCS:	fetal calf serum
FITC:	fluorescein isocyanate
Flt3-L:	fms-like tyrosine kinase 3 ligand
Foxp3:	forkhead box P3
GALT:	gut-associated lymphoid tissue
GAPDH:	glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GITR:	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF:	granulocyte -macrophage colony-stimulating factor
HBSS:	Hank's balanced salt solution
Ig:	immunoglobulin
IL:	interleukin
IPTG:	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
iTreg:	induced regulatory T cells
LP:	lamina propria

MACS:	magnetic-activated cell sorting
MLN:	mesenteric lymph node
MODC:	monocyte-derived dendritic cell
nTreg:	naturally occurring regulatory T cells
OVA:	ovalbumin
PBS:	phosphate-buffered saline
PD-1:	programmed death 1
PI:	propidium iodide
PI3K:	phosphoinositide 3-kinase
PP:	Peyer's patch
qRT-PCR:	quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RAG2:	recombination activating gene 2
RALDH:	retinaldehyde dehydrogenase
RAR:	retinoic acid receptor
RARE:	retinoic acid response element
RegIII γ :	regenerating islet-derived protein III-gamma
RXR:	retinoid X receptor
SED:	subepithelial dome
Sp1:	Specificity protein 1
SPL:	spleen
TCR:	T cell antigen receptor
TGF- β :	transforming growth factor- β
Th:	T helper
TLR:	Toll-like receptor
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
Tr1:	type 1 regulatory T cells
Treg:	regulatory T cells
X-gal:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside

緒言

腸管免疫系

我々は日ごろから食物とともに微生物や化学物質など様々な物質を経口的に摂取しており、それに伴い腸管では常に外界から摂取されたものに曝されることになる。免疫系は基本的には自己の細胞以外を異物とみなし、排除するシステムであるが、栄養吸収の場である腸管においては食物や無害な微生物等に対しては免疫反応を起こさず、有害な物質、病原体に対してのみ免疫反応を起こす高度な仕組みを備えている。全身の免疫担当細胞の約60%が腸管に集積していることは、腸管免疫系の重要性を物語っている。腸管では、後述する腸管上皮細胞によるバリア機能や、上皮下に存在する粘膜固有層の免疫細胞の働きにより有害な微生物の侵入を防ぎ、パイエル板や腸間膜リンパ節といったリンパ組織で適切な免疫反応が誘導されることにより恒常性を維持している。これらの組織は総称して腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue; GALT) と呼ばれている。

・腸管上皮細胞

腸管上皮細胞間はタイトジャンクションにより結合されており、異物は容易に侵入できない。腸管上皮に点在するゴブレット細胞はムチンと呼ばれる粘液を産生し、腸管上皮は厚いムチン層に覆われている。そのため多くの微生物等はムチン層に阻まれ、上皮に近づけない。また小腸陰窩の最基底部に存在する Paneth 細胞は Regenerating islet-derived protein III-gamma (RegIII γ)などの抗菌ペプチドを産生し、細菌やウイルスの感染を阻止している。

・パイエル板 (Peyer's patch; PP)

PPは1677年にPeyerによって発見された、小腸に存在するリンパ小節の集合体で、マウスの小腸では6-12個、ヒトでは180-240個程度が小腸に沿って見られる[1]。PPは円柱上皮 (follicle associated epithelium; FAE) により上皮細胞層が形成されており、管腔側と隔てられている。FAEには積極的に抗原を取り込む microfold cell (M細胞) と呼ばれる細胞が点在している[2]。M細胞表面は、周囲の上皮細胞と比べて粘膜層が薄いことや細菌の細胞膜に発現するレクチンと結合する糖鎖構造が存在するため、抗原物質や微生物が近づきやすい環境になっている[3]。このため、腸内の抗原物質はM細胞を通じてPP内に取り込まれることになる。また、FAE直下にはドーム領域 (subepithelial dome; SED) と呼ばれる領域があり、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が多く存在している。

・粘膜固有層 (lamina propria; LP)

LP は、上皮と粘膜筋板の間に存在する層であり、多くの免疫担当細胞が存在している。腸管で大量に分泌される immunoglobulin A (IgA) は、病原体の感染防御や炎症性の抗原の中和、腸内共生菌の制御など恒常性維持に重要な働きをしている[4]。また免疫応答の制御に関わる制御性 T 細胞が多く存在することが明らかとなっている[5]・[6]。近年、CD4⁺T 細胞サブセットで interleukin (IL) -17 を産生し、細胞外病原体に対する感染防御や自己免疫疾患と関わる Th17 の存在が明らかになり、LP に多く存在していることが報告されている[7]。

・腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node; MLN)

MLN は腸間膜動脈の根元に位置しており、生体内で最大のリンパ節である。GALT の所属リンパ節として粘膜免疫系の恒常性維持に重要な役割を担っている。LP や PP に存在する樹状細胞は抗原を捕捉した後、ケモカインレセプター CCR7 を発現し、一部は MLN に遊走する[8]。小腸および大腸において抗原を取り込んだ抗原提示細胞は MLN に流れ込み、T 細胞へ抗原を提示する。また、血流から MLN に直接流入する樹状細胞も存在する。MLN では全身を循環する T 細胞が流入しており、樹状細胞等による抗原提示が行われる。抗原提示により活性化された T 細胞は、腸管指向性ホーミングレセプター CCR9 を発現し、主に LP へとホーミングする。経口抗原に対して過剰な免疫応答を起こさないように免疫応答能を低下させることを経口免疫寛容というが、この経口免疫寛容は MLN で成立することが報告されている。

腸管免疫系の組織についての概要を図 i に示した。

・樹状細胞 (dendritic cells; DC)

樹状細胞 (DC) は抗原提示細胞の一つであり、名前の由来は樹枝状に突起を伸ばす形態から来ている[9]。特徴として、抗原を取り込みナイーブ T 細胞への抗原提示を行うことが知られている。DC は単一の細胞群ではなく、細胞表面上のマーカーや成熟度により様々なサブセットが存在する。生体内における局在も、リンパ組織のみならず全身に広く存在する。樹状細胞は、骨髄の造血幹細胞から分化した骨髄系細胞の単球に由来し、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) や Flt3-L の刺激によって DC に分化するという報告がなされている[10,11]。腸管における DC の特徴として、細胞表面上に CD103 (α E インテグリン) を発現するサブセットの存在が挙げられる。CD103⁺ DC はレチノイン酸産生能が高く、また後述する制御性 T 細胞の分化誘導能が高いことが報告されている[12]。腸管において DC は種々の免疫応答に関わっており、重要な役目を担っている。

・制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg)

免疫応答を抑制する働きのある T 細胞サブセットの存在について長く議論が続いていたが、1995 年に坂口らによって CD25⁺CD4⁺T 細胞が自己免疫疾患や炎症性腸疾患に対する抑制作用を有することが示された[13]。その後 Treg のマスター遺伝子として forkhead box p3 (Foxp3) 遺伝子が発見された[14-16]。Treg は glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR)、cytotoxic T-lymphocyte associated antigen (CTLA) -4 や PD (programmed death) -1 など免疫抑制的に働く分子を発現しており、抑制メカニズムとして以下が知られている[17]。

- i) CTLA-4 等の免疫抑制分子による T 細胞の活性化の直接的な阻害
- ii) 抗原提示細胞の抗炎症物質産生誘導による T 細胞活性化の間接的な阻害
- iii) エフェクター細胞や抗原提示細胞の直接的または間接的な細胞傷害
- iv) TGF- β や IL-10 等の免疫抑制作用を有するサイトカインの産生

また Treg は、胸腺で分化する内在性制御性 T 細胞 (naturally occurring regulatory T cells; nTreg) と、末梢で分化誘導される iTreg (induced regulatory T cells; iTreg) の 2 種類が存在すると考えられている[18]。nTreg は、胸腺において未成熟 T 細胞が自己抗原と反応し Foxp3 遺伝子を発現することで生じることと考えられており、iTreg は末梢にて transforming growth factor-beta (TGF- β)、IL-2、レチノイン酸の存在下で抗原刺激を受けることにより誘導されることが知られている[19]。

腸管免疫系における免疫細胞の概要について図 ii に示した。

・レチノイン酸の作用と合成酵素

レチノイン酸はビタミン A 代謝産物であり、様々な生理活性を有する。食物由来のビタミン A (レチノール) は、体内においてレチノール→レチナール→レチノイン酸と代謝される。レチノイン酸は all-trans レチノイン酸、9-cis レチノイン酸、13-cis レチノイン酸など複数の構造異性体が存在するが、主に生理活性を有するのは all-trans レチノイン酸である[20]。本研究で議論するレチノイン酸は all-trans レチノイン酸を想定している。レチノールをレチナールに代謝する酵素は複数存在し、多くの細胞で発現が知られているが、レチナールをレチノイン酸に代謝する酵素は腸管で高発現している[21]。

レチノイン酸は脂溶性物質であり細胞膜を拡散により通過できるため、細胞内への取り込みにレセプターやチャネルは必要ない。細胞質内で RAR (retinoic acid receptor; レチノイン酸受容体) と結合すると、RXR (retinoid X receptor; レチノイド X 受容体) とヘテロ二量体を形成し核内に移行する。核内に移行した RAR/RXR ヘテロ二量体は、RARE (retinoic acid response element; レチノイン酸応答配列) と呼ばれる領域に結合することでエンハンサーとして機能し、標的遺伝子の発現を調節する[20]。

レチノイン酸は腸管の免疫反応の制御に重要であると考えられている[22]。レチノイン

酸は T 細胞に作用することで T 細胞表面上に腸管への遊走に必要な $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンや、ケモカインレセプター CCR9 の発現を誘導することが知られている [23]。定常状態ではレチノイン酸は Th1 や Th17 への分化を抑制し [24–26]、IgA の産生を促進することが報告されている [27]。レチノイン酸の T 細胞への作用について図 iii に示した。

上述した通り、レチノイン酸はビタミン A からレチナールを経由して合成される。代謝の過程は二段階存在しており、ビタミン A からレチナールに可逆的に変換される反応と、レチナールから不可逆的にレチノイン酸へ変換される反応がある [21]。ビタミン A からレチナールに変換する際に働く酵素は alcohol dehydrogenase (ADH) であり、多くの種類の細胞で発現することが知られている [21]。一方、レチナールからレチノイン酸へ変換する際に働く酵素である retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) は、限られた種類の細胞においてその発現が認められ、中でも腸管においてその発現が高いことが知られている。RALDH は少なくとも 4 つのアイソザイムの存在がマウスにおいて確認されており、その中で 3 つが 2 次リンパ組織に存在することが知られている。PP DC では RALDH1 (*Aldh1a1*) の遺伝子発現が、MLN DC では RALDH2 (*Aldh1a2*) の遺伝子発現が報告されている [23]。RALDH3 (*Aldh1a3*) の遺伝子は MLN、PP おいて弱く発現している [23]。

RALDH の発現誘導に重要な因子の一つとして GM-CSF が挙げられ、GM-CSF と IL-4 の共存下で DC の RALDH2 発現が誘導されることが報告されている [28]。また、Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L) の刺激により分化した DC において、レチノイン酸単独刺激では RALDH2 が弱く発現誘導されるが、GM-CSF の存在下ではレチノイン酸により RALDH2 発現誘導が促進されることが報告されている [29]。RALDH2 発現を誘導するメカニズムとして次のことが知られている。RAR /RXR 複合体は転写因子 Specificity protein 1 (Sp1) と結合し協調的に作用することで、RALDH2 遺伝子のプロモーター内の TATA ボックスの近位に存在する RARE 配列の一部に結合し、転写活性が亢進すると考えられている [29]。

加齢による免疫系への影響

加齢に伴い、細胞レベルおよび個体レベルで様々な生体機能が低下することが知られている。加齢による免疫系の変化として、感染症の罹患率が増加

する、ワクチンの効果が弱まる、自己免疫疾患やガンの罹患率が高くなることが知られている [30,31]。免疫系は大きく分けると、マクロファージなどによる抗原非特異的な貪食作用、炎症作用による自然免疫系と、T 細胞や B 細胞による抗原特異的な反応による獲得免疫とに分けられるが、獲得免疫の機能は、加齢により低下することが知られている [32]。一方加齢に伴い、IL-6、IL-1 β 、tumor necrosis factor- α (TNF- α) といった炎症性サイトカインの産生が上昇し、加齢に伴う慢性的な炎症状態 (inflamm-aging と称される) となり、この持続的な炎症状態が様々な機能低下の原因につながると考えられている

[33]。

・加齢による T 細胞、B 細胞への影響

加齢の影響を大きく受ける臓器の一つに胸腺が挙げられる。胸腺はナイーブ T 細胞を新生する臓器であるが、ヒトの場合思春期を過ぎたあたりから萎縮が始まり、脂肪組織へと徐々に転換すると言われている[34]。40~50 歳を過ぎるころには完全にその機能は失われ、新たなナイーブ T 細胞の産生はされなくなるが、末梢の成熟 T 細胞が分裂することで免疫機能は保たれる。しかしながら長期間ナイーブ T 細胞が新生されないことによりさまざまな変化が生じる。例えば、T 細胞レパートリー(T 細胞レセプターの多様性)の縮小、IL-2 産生の低下、エフェクター T 細胞の増殖や分化の異常などが知られており[35-37]、これらの機能の低下により新たな抗原に対する免疫反応が低下すると考えられる。ナイーブ T 細胞が減少することにより相対的にメモリー T 細胞が増加するが、近年加齢に伴い免疫機能が低下するメモリー T 細胞について報告されている。CD62L^{low}CD44^{high} で定義されるメモリー T 細胞の中で、加齢に伴い PD-1 分子を発現するものが生じ、それらのメモリー T 細胞は、抗原刺激に対して反応性が著しく低下していることが確認されている[38]。また、加齢により CD4⁺T 細胞におけるケモカインレセプターの発現が変化することが報告されている[39]。

加齢に伴う Treg の変化は次のことが知られている。Treg は胸腺から生じる nTreg と末梢で誘導される iTreg が存在するが、加齢に伴い nTreg は蓄積し、iTreg はその分化が減少すると考えられている[40]。加齢に伴う nTreg の蓄積により免疫応答が抑制され、易感染性に陥ったり、ワクチンの効果が弱まると考えられている。実際、加齢マウスにおける抗腫瘍反応の低下が、CD25⁺細胞の除去により改善される例が報告されている[41]。また Treg の免疫抑制機能の低下も報告されており、加齢マウス由来 Treg が若齢マウス由来のものと比較して増殖抑制能が低下すること[42]、IL-17 産生抑制能が低下することなどが報告されている[43]。また、ヒトでは高齢者由来の Treg において増殖抑制能は変化しない一方で IL-10 産生が低下することが報告されている[44]。

抗体の産生を担う B 細胞においても加齢の影響は大きい。T 細胞と同様 B 細胞においてもナイーブ B 細胞の数は減少し、B 細胞レセプターの多様性が減少する。それに伴いメモリー B 細胞の数が増加する[45]。加齢に伴い、血清中の免疫グロブリンの量に大きな変化は見られないが、IgG よりも IgM の割合が増加し、抗原に対する抗体の親和性が低下する[46]。また高齢者由来の CD4⁺T 細胞は IL-2 の産生が低下し、CD40L の発現が低下しているため、T 細胞と B 細胞の相互作用が低下し、そのことにより抗体産生が低下すると考えられる。

・加齢による DC への影響

DC における加齢の影響についても次のことが明らかとなっている。高齢者由来の末梢

血中の単球由来 DC (monocyte-derived DC; MODC) は分化や成熟の点では機能低下は認められないが[47,48]、fluorescein isocyanate (FITC) デキストランの取り込みの減少が見られたことから微飲作用 (micropinocytosis) が低下していることが考えられ[49]、抗原のプロセッシングや抗原提示にも影響がある可能性が考えられる。また高齢者由来 MODC は、アポトーシスの誘導された細胞の食作用 (phagocytosis) が低下していることが確認されている[49]。また、加齢マウス由来の骨髄由来 DC では CCR7 による走化性が低下していることが明らかとなっている[50]。ヒトにおいては、ケモカインレセプター群の発現レベルは変化しないが、遊走能が低下することから[49]、シグナル伝達系における機能低下の可能性が考えられている。実際、高齢者の MODC では食作用や遊走に重要である phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の活性化が低下していることが知られている[49,51,52]。

プロバイオティクスによる免疫調節機能

近年、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が注目されており、免疫系への影響が多く報告されている。*Bifidobacterium longum* JCM1217^T は酢酸の産生を介して腸管上皮細胞の腸管出血性大腸菌 O157 に対する防御機能を向上させたことが報告されている[53]。*Lactobacillus jensenii* TL2937 は腸管上皮細胞株を用いた実験で TLR (Toll-like receptor; Toll 様受容体) シグナリングを負に調節することにより炎症反応を抑制することが報告された[54]。*Lactobacillus plantarum* strain AYA は PP DC の IL-6 産生を誘導し、B 細胞の IgA 産生増強に寄与することが報告されている[55]。*Lactobacillus pentosus* strain b240 は PP DC の TLR2 を刺激し IL-6 産生を誘導することで IgA 産生増強作用がある[56]。*Lactobacillus gasseri* SBT2055 は骨髄 DC の TGF- β 産生を誘導し、TLR2 を刺激して IgA 産生を促進することが報告されている[57]。*Lactobacillus casei* Shirota は IL-12 産生を促進し、NK 活性を増強することが報告されている[58]。*Lactobacillus plantarum* NRIC1832 は in vitro の実験系で CD4⁺T 細胞の IL-10 産生を増強し、抗炎症作用を発揮することが示唆されている[59]。*Lactobacillus plantarum* NRIC0380 は腸管 DC の RALDH 活性を増強し、Treg を誘導することが報告されている[60]。*Bifidobacterium longum* BB536 は Th2 細胞誘引ケモカインの産生を抑制することで抗アレルギー作用を発揮することが示唆されている[61]。

本研究の目的

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。

免疫組織は全身のいたるところに存在するが、特に腸管では多数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。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性作用を検討することを目的とした。

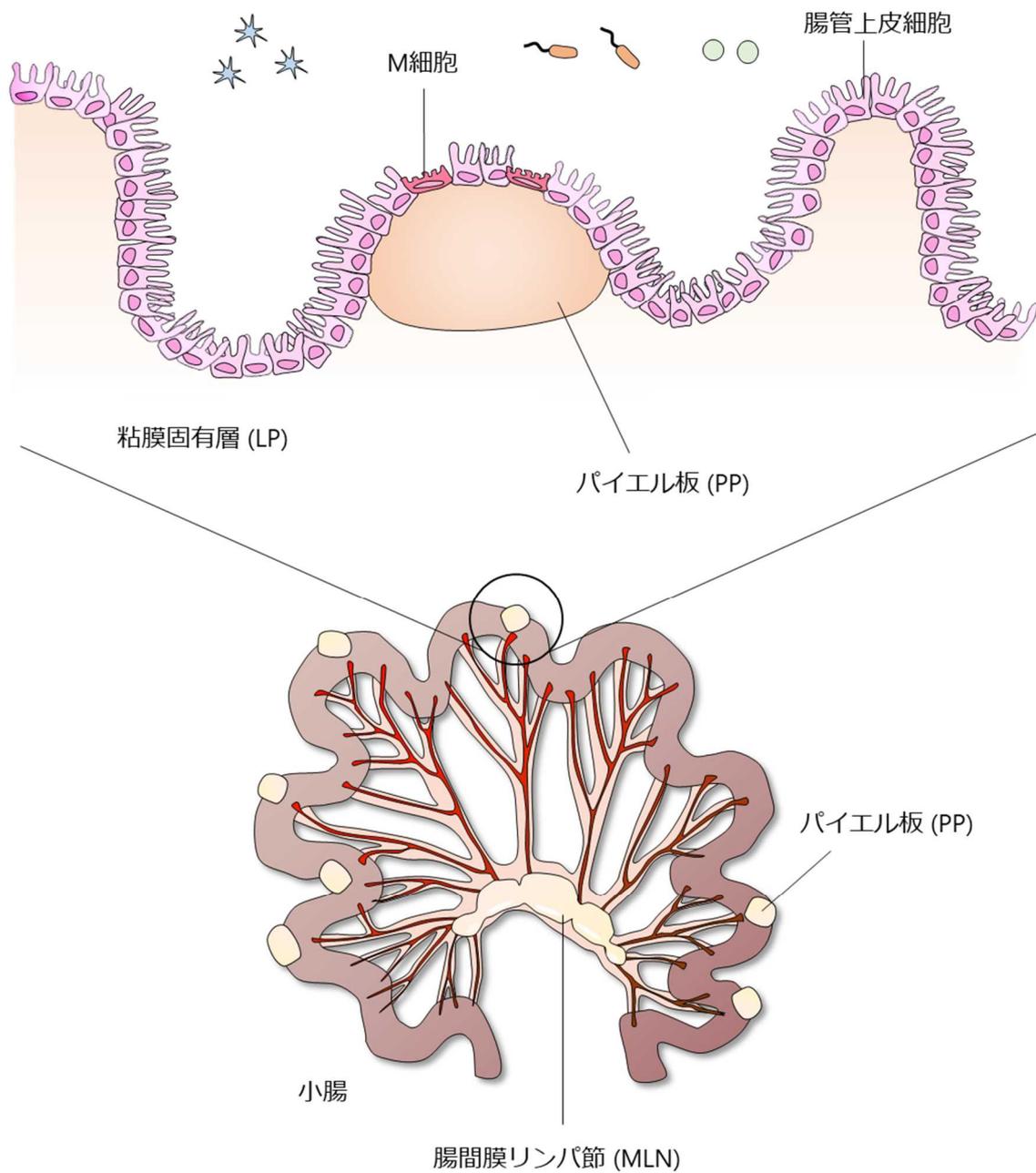


図 i 腸管免疫系の組織の概要

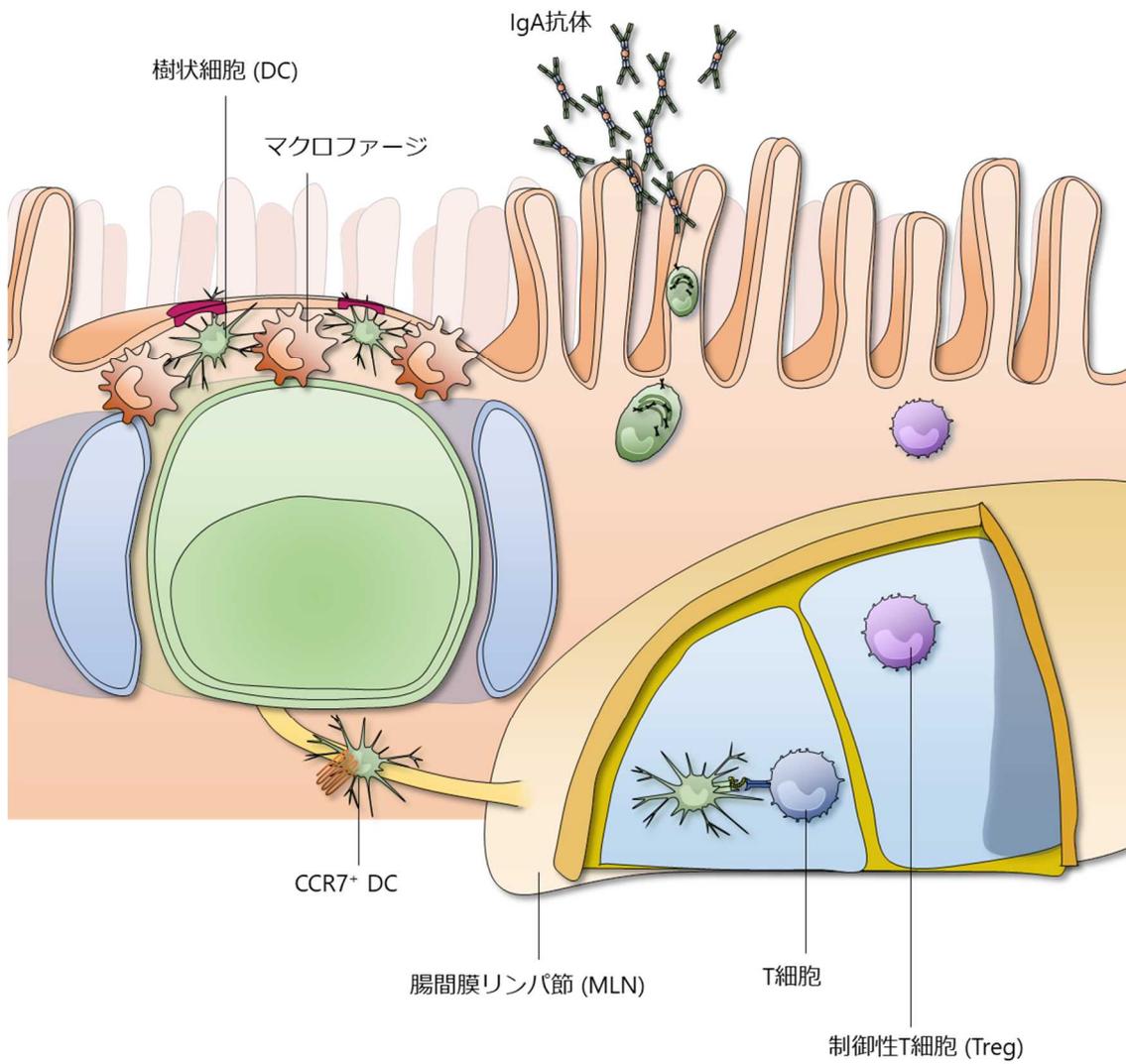
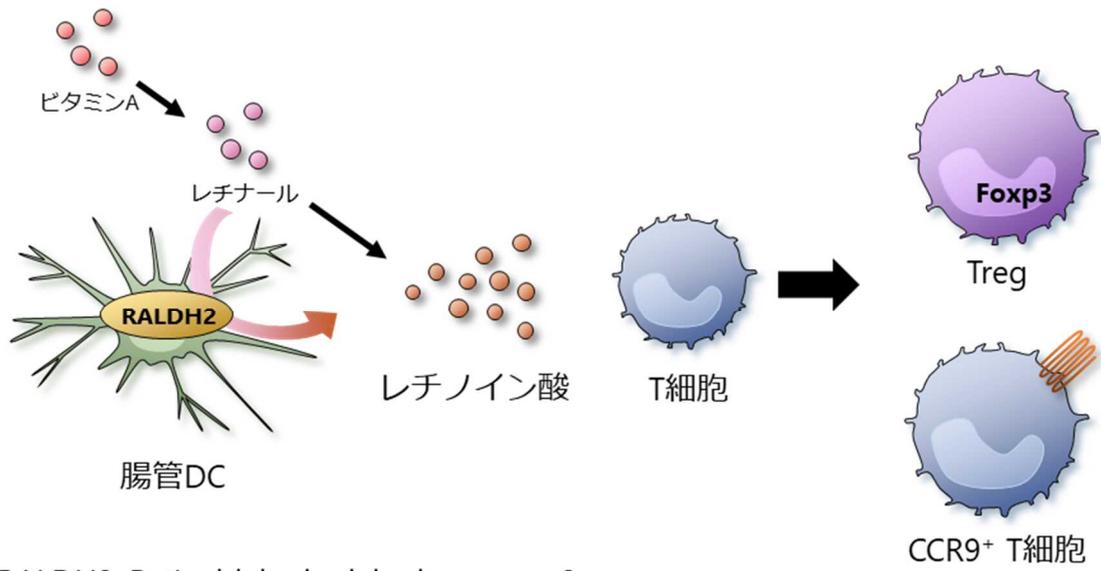


図 ii 腸管免疫系の概要

腸間膜リンパ節(MLN)は実際には腸管とは離れているリンパ組織であるが、本図では便宜上パイエル板に近い位置に MLN を置いた。



RALDH2; Retinaldehyde dehydrogenase 2

図 ii レチノイン酸の T 細胞への作用

第一章 加齢に伴う制御性 T 細胞誘導の低下の メカニズムの解析

本文の内容は学術論文雑誌として出版する計画があるため交響できない。5 年以内に出版予定。

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

序

慢性炎症を抑制する手段として、抗炎症性を発揮する成分の摂取が有効であると考えられる。近年、宿主に有益な影響を与える微生物として定義されるプロバイオティクスの持つ免疫賦活作用が数多く報告され、その作用および作用メカニズムが注目されている。

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 IL-10 の高い誘導能を持つことで選抜された菌株であり、II 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 [83]。

DC による IL-10 産生を誘導する乳酸菌株についてはいくつかすでに報告がなされているが、それらの報告では骨髄や末梢血の細胞から培養により分化させた DC を評価に使用している。しかし、乳酸菌を経口で摂取した際には、PP や LP に存在する DC が管腔内の乳酸菌を取り込み、MLN へと遊走し、ナイーブ T 細胞へ抗原を提示することで免疫反応を誘導するという一連の反応が生じることが考えられる。腸管では TGF- β や IL-10 が他の組織より豊富に存在しているため、免疫抑制性の DC が多く存在する。腸管 DC は他の組織の DC と比較してレチノイン酸の産生を高効率に行うことで Treg の誘導や IgA 産生をより効率よく行っている [84]。乳酸菌に対する DC のより正確な反応を評価するには腸管に存在する DC を使用することが重要であると考えられるにも関わらず、腸管の DC を使用して乳酸菌の IL-10 産生を評価した報告はこれまで行われていない。

本研究では、腸管のリンパ組織から DC を精製し、*L. plantarum* OLL2712 株が DC に与える影響について検討を行った。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。

方法

実験動物

BALB/c マウスは日本チャールズ・リバー(東京)より購入した。マウスはオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 min) した脱イオン水と餌として γ 線 10 kGy 照射飼料 CE-2 (日本クレア) により維持した。全ての動物実験は東京大学動物実験実施規則に則って行った。

培地

RPMI 培地

第一章と同様に調製した。

コラゲナーゼ溶液

第一章と同様に調製した。

PBS (-)溶液

第一章と同様に調製した。

MACS buffer

第一章と同様に調製した。

FACS buffer

第一章と同様に調製した。

MLN 細胞の調製

第一章と同様の方法で行った。

PP 細胞の調製

腸管を摘出し、PP を摘出した。摘出した PP 組織をマウス 1 匹あたり 2 mL の 0.5 mg/mL のコラゲナーゼ溶液に入れ、37°C 恒温槽内で 60-90 分攪拌子により攪拌した後、細胞懸濁液を 70 μ m セルストレーター(Corning)により濾過し、遠心 (4°C, 1400 rpm, 5 min) することにより PP 細胞を調製した。

CD11c⁺ DC の調製

第一章と同様の方法で行った。

L. plantarum OLL2712 の経口投与

L. plantarum OLL2712 株の加熱死菌体をオートクレーブ滅菌水に 20 mg/mL となるように懸濁した。この乳酸菌懸濁液を 1 mL シリンジ(テルモ) とデイスポーザブルフィーディングニードル (エグゼック, 奈良) を使用し、マウスに胃ゾンデにより 1 日に 0.2 mL 強制経口投与を行った。投与を行う時間は、実験毎に統一し、誤差 4 時間以内となるようにした。対照群にはオートクレーブ滅菌水を同様に胃ゾンデにより 1 日 0.2 mL 投与を行った。

微生物菌体

Lactobacillus plantarum OLL2712、*L. amylovorus* MEP222812、*L. brevis* MEP222815、*L. crispatus* MEP222805 および *L. plantarum* ATCC14917T の加熱殺菌凍結乾燥菌体は株式会社明治から供与された。細胞との共培養実験に使用する際には PBS に懸濁し、マウスに経口投与する際にはオートクレーブ滅菌水に懸濁して使用した。

培養

DC と乳酸菌との共培養においては、 1×10^5 個の DC と乳酸菌(終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を 96 well 平底プレート(Corning) に総液量 200 μL として混合し、37°C 5% CO₂ インキュベーター内で培養を行った。遺伝子発現量を測定する実験においては 18 時間培養を行い、上清中のサイトカインタンパク質を測定する実験においては 24 時間培養を行った。

DC と T 細胞と乳酸菌との共培養においては、 2×10^4 個の DC、 2×10^5 個の T 細胞、乳酸菌(終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および OVA323-339 残基ペプチド(終濃度 100 μM)を 96well 平底プレートに総量 200 μL として混合し、37°C 5% CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養を行った。

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法

IL-10 測定

ラット抗マウス IL-10 抗体(JES5-2A5, BD Pharmingen)を一次抗体とし、0.2 M リン酸ナトリウム溶液で適切な濃度に希釈した。これを 96well ポリスチレン製マイクロタイタープレート(Thermofisher scientific)に 1well あたり 50 μL 添加し 4°Cで一晩静置した。PBS-0.05% Tween で 3 回洗浄した後、10% FCS/PBS を 1well あたり 100 μL 添加し、室温で 1 時間静置した。同様に洗浄した後、10% FCS/PBS で適切な濃度になるように希釈した培養上清と標準溶液(当研究室で精製したもの)を 1well に 50 μL 添加し、4°Cで一晩または室温で 2 時間静置した。PBS-0.05% Tween で 5 回洗浄した後、10% FCS/PBS で適切な濃度になるように希釈した二次抗体であるビオチン化ラット抗マウス IL-10 抗体(JES5-16E3, BD Pharmingen)と HRP 標識ストレプトアビジンを 1well に 50 μL 添加し、室温で 2 時間静置した。PBS-0.05% Tween で 7 回洗浄後(1 回の洗浄ごとに 30 秒静置した)、TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™)の Substrate Reagent A と Substrate Reagent B を等量混合した

溶液を 1well に 50 μ L 添加し、室温・暗所で 30 分以上静置した。2N H₂SO₄ を 1well に 20 μ L 添加して酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad) により 450 nm (reference 570 nm) で吸光値を測定した。

MLN DC と *L. plantarum* OLL2712 の共培養後の上清中 IL-10 タンパク質の測定には MESO QuikPlex SQ 120 (MESO Scale Diagnostics, Rockville, MD, USA) によるイムノアッセイを行い、解析を行った。

qRT-PCR 法

第一章と同様の方法で行った。以下に使用したプライマーを記載する。

・ *Gapdh* (x=56)

Forward: 5'- TGT CCG TCG TGG ATC TGA C-3'

Reverse: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'

・ *I110*

Forward: 5'-CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG -3'

Reverse: 5'-CATGTATGCTTCTATGCAGTTG -3'

・ *I112a*

Forward: 5'-TGGCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAA -3'

Reverse: 5'-GCACAGGGTCATCAAAGAC -3'

・ *I112b*

Forward: 5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA -3'

Reverse: 5'-AAAGCCAACCAAGCAGAAGA -3'

フローサイトメトリー

第一章と同様の方法で行った。

Foxp3 染色

第一章と同様の方法で行った。

統計処理

2 群間の検定は Student の t 検定により行った。対照群との 2 群間の比較を複数回行う際の検定は Dunnett の検定により行った。3 群以上の群間比較は Turkey の HSD test により検定を行った。p<0.05 以下を有意な差とした。

結果

L. plantarum OLL2712 の腸管免疫細胞に対する IL-10 産生誘導能

まず、*L. plantarum* OLL2712 が腸管の免疫細胞に対して IL-10 産生を誘導するかを検討した。BALB/c マウスの MLN 細胞および PP 細胞を調製し、それぞれを *L. plantarum* OLL2712 加熱死菌体の存在下で培養した。培養後の細胞における IL-10 遺伝子発現量と、上清中の IL-10 タンパク質量をそれぞれ qPCR および ELISA 法で解析した。その結果、乳酸菌無添加と比較して、乳酸菌を添加した MLN 細胞および PP 細胞において IL-10 遺伝子発現の増加が観察された(データ不掲載)。また、乳酸菌を添加することで培養上清中の IL-10 タンパク質量が増加した(図 2-1)。

L. plantarum OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 産生誘導能

過去の報告から *L. plantarum* OLL2712 は骨髄由来 DC による IL-10 産生誘導能が高いことが知られている。また、当乳酸菌を経口的に摂取した際には腸管に到達し、免疫細胞に認識される可能性が高いと考えられる。管腔内の抗原は PP 表面上の M 細胞を介して PP 内の DC に取り込まれるか、腸管上皮のタイトジャンクション間から樹状突起を伸ばし、直接管腔内の抗原を捕捉する DC によって取り込まれると考えられる。そこで続いて、当該乳酸菌が腸管 DC における IL-10 産生を誘導するかを検討した。

BALB/c マウスの MLN および PP から MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、*L. plantarum* OLL2712 加熱死菌体の存在下で 18 時間培養後、IL-10 mRNA 発現量を qPCR 法により解析した。その結果、PP DC および MLN DC において、*L. plantarum* OLL2712 を添加することにより有意に IL-10 遺伝子発現量が増加した(図 2-2)。また IL-10 遺伝子発現量は *L. plantarum* OLL2712 の濃度依存的に増加する傾向が観察された(図 2-2)。さらに BALB/c マウス由来の MLN DC および PP DC と *L. plantarum* OLL2712 加熱死菌体を共培養し、72 時間後の培養上清中の IL-10 タンパク質産生量を ELISA 法または高感度イムノアッセイにより解析した。その結果、*L. plantarum* OLL2712 の添加により MLN DC および PP DC における IL-10 産生量の有意な増加が見られた(図 2-3)。

L. plantarum OLL2712 の腸管 DC に対するサイトカイン産生誘導の他菌株との比較

乳酸菌の免疫細胞に対する抗炎症作用を評価する際、抗炎症性サイトカインである IL-10 と、Th1 型の反応を誘導する IL-12 との産生誘導バランスをひとつの指標として用いられることが多い。そこで、*L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 および IL-12 の遺伝子発現を他の菌株と比較した。比較対象として、*L. amylovorus* MEP222812, *L. brevis* MEP222815, *L. crispatus* MEP222805, および *L. plantarum* ATCC14917^T の 4 株を使用し

た。その結果、IL-10 遺伝子発現については MLN DC では *L. plantarum* OLL2712 を添加した細胞で他の菌株と比較して有意に遺伝子発現が高かった(図 2-4)。PP DC においては、*L. plantarum* OLL2712 および *L. plantarum* の標準株である *L. plantarum* ATCC14917^T において、IL-10 遺伝子の高発現が観察された(図 2-4)。その一方で、*L. plantarum* OLL2712 は *I12a* (IL-12p35) および *I12b* (IL-12p40) の発現レベルは他の菌株と比較して高くなかった(図 2-5)。PP DC においては、*I12a* の発現レベルは他の菌株と比較して高くなかった(図 2-5) 一方で、*I12b* の発現レベルについては *L. amylovorus* MEP222812 および *L. brevis* MEP222815 より高い結果となった(図 2-5)。これらの結果を総じて判断すると、*L. plantarum* OLL2712 は IL-12 産生と比較して IL-10 産生を誘導する能力が高いことが示唆された。

L. plantarum OLL2712 の経口投与による IL-10 産生誘導効果

上述の *in vitro* の実験結果から、*L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 産生誘導効果が示唆された。続いて *L. plantarum* OLL2712 を経口投与することにより、腸管 DC の IL-10 産生誘導効果があるかを検討した。BALB/c マウスに、オートクレーブ滅菌した脱イオン水に懸濁した *L. plantarum* OLL2712 加熱死菌体を 1 日 4 mg 胃ゾンデにより強制経口投与を 6 日間行った。対照群には同量のオートクレーブ滅菌した脱イオン水を経口投与した。実験スケジュールを図 2-6A に示す。6 回目の投与終了後、PP および MLN から CD11c⁺ 細胞を MACS 法により精製し、IL-10 遺伝子発現量を解析した。その結果、*L. plantarum* OLL2712 を経口投与した群では対照群と比較して MLN DC において IL-10 遺伝子発現レベルが増加しているのが観察された(図 2-6B)。

L. plantarum OLL2712 の経口投与後、PP DC は MLN へ遊走を開始するため、6 日目には IL-10 遺伝子発現レベルの増加がみられなかった可能性が考えられた。そこで、*L. plantarum* OLL2712 を 1 回経口投与し、投与から 12 時間後の PP DC における IL-10 遺伝子発現を解析した。その結果、対照群と比較して乳酸菌を投与した群では PP DC における IL-10 遺伝子発現が増加していることが観察された(図 2-7)。

IL-10 は Treg の分化誘導する因子のひとつであるため、当乳酸菌の経口投与後 Treg 誘導が行われる可能性について検討した。経口投与期間終了後、MLN、PP 細胞における CD4⁺ T 細胞中の Foxp3 発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。しかしながら、いずれの臓器についても Foxp3 発現レベルの増加は見られなかった(図 2-8)。

L. plantarum OLL2712 の DC-T 細胞共培養系における IL-10 産生誘導能の検討

DC は T 細胞との相互作用により、T 細胞の分化や免疫反応を方向付けると考えられる。そこで、DC と T 細胞の共培養系において *L. plantarum* OLL2712 の添加により T 細胞の IL-10 産生能が変化するかを検討した。BALB/c マウス由来 MLN DC と、DO11.10 マウス由来の SPL CD4⁺ T 細胞を *L. plantarum* OLL2712 の存在下で OVA ペプチドにより刺激し

て共培養し、72 時間後の培養上清中の IL-10 タンパク質量を解析した。その結果、乳酸菌無添加と比較して、*L. plantarum* OLL2712 の添加により上清中の IL-10 タンパク質量の増加が観察された(図 2-9)。

考察

第二章では、*L. plantarum* OLL2712 が腸管 DC に対して IL-10 産生を誘導することを示し、本乳酸菌の経口投与により実際に腸管免疫系に作用することを観察した。また T 細胞による IL-10 産生を促進することを示した。

これまでにいくつかの乳酸菌株が DC に対して IL-10 産生を誘導することが報告されている。Ratajczak らは、*L. casei* ATCC393 がヒト血中単球由来 DC に対して IL-10 および IL-12 の産生を増加したことを報告している[85]。Konstantinov らは *L. acidophilus* NCFM が単球由来 DC の IL-10 産生を誘導したことを報告した[86]。Gad らによると *L. salivarius* Ls-33 と *Bifidobacterium infantis* 35624 が末梢血単球由来 DC に対して IL-12p70 と比較して IL-10 を高産生したことを示している[87]。松崎らは *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 がマウス骨髄由来 DC の IL-10 遺伝子発現を増強したことを報告している[88]。これらの報告では、DC の前駆体である単球を GM-CSF と IL-4 の存在下で培養することで DC を誘導して使用している[89]。しかしながら、DC の生成や成熟は多くの因子に左右されている[90]。過去の研究では、DC の前駆体は TLR リガンドやレチノイン酸の刺激を受けて成熟することが報告されている[91,92]。腸管 DC は他の組織の DC と比較して特徴的な性質を有していることが報告されている[93]。経口的に摂取されるであろう乳酸菌の IL-10 産生誘導能を評価する上で、培養によって得られた DC を使用せず、腸管の DC を使用して IL-10 産生能を評価した報告は少なく、本研究の特徴的な点であると言える。

乳酸菌は免疫細胞に対して様々なサイトカイン産生を誘導し得る。Th1 反応を誘導するサイトカインである IL-12 と抗炎症性サイトカインである IL-10 との産生誘導を比較することは、乳酸菌の抗炎症性を評価する上で一つの指標となることが報告されている[94]。本研究では *L. plantarum* OLL2712 が IL-12 を強く誘導しない一方で IL-10 産生を強く誘導し、このことは腸管における抗炎症性を示唆している。利光らによると、*L. plantarum* OLL2712 は TLR2KO マウス由来の骨髄由来 DC に対しては IL-10 産生を誘導しなかったことが報告されている[95]。このことから TLR2 の代表的なリガンドである細胞壁成分が IL-10 産生誘導に関わっている可能性が考えられる。細胞壁構成成分のひとつとして知られるテイコ酸は IL-10 産生を誘導することが報告されていることから[94]、*L. plantarum* OLL2712 の細胞壁に含まれるテイコ酸が腸管 DC の TLR2 を刺激し、IL-10 産生を誘導したことが示唆される[95]。

PP や粘膜固有層の DC が管腔内の抗原を捕捉した後、MLN などのリンパ節へ遊走し、T 細胞へ抗原提示することが知られている[96]。それゆえ経口的に摂取された *L. plantarum*

OLL2712 は T 細胞の機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。*L. plantarum* OLL2712 を DC と T 細胞の共培養系に添加することで、抗原特異的 T 細胞の反応において IL-10 産生が促進された。この培養系では、DO11.10 マウス由来の T 細胞は OVA 特異的であり、抗原提示された乳酸菌に対しては反応しないと考えられる。培養上清中の IL-10 は DC と T 細胞の両方が産生したものが含まれているが、OVA の濃度依存的に IL-10 が増加したことを考慮すると、*L. plantarum* OLL2712 は T 細胞の機能にも何らかの形で影響を及ぼしていることが示唆される。乳酸菌は DC を介して T 細胞による IL-10 産生の促進が行われたと考えるのが自然であるが、乳酸菌が直接 T 細胞を刺激した可能性や、抗原提示により活性化した T 細胞がさらに DC の機能に影響を与えた可能性は否定できない。例えば TLR は微生物成分のセンサーとして自然免疫系の細胞にその発現が多く認められるが、近年 T 細胞にも TLR が発現していることが報告され[97]、T 細胞レセプターと TLR2 の共刺激により IL-10 産生を誘導することが報告されている[98]。過去の報告によると、IL-10 を産生する CD4⁺T 細胞は少なくとも Foxp3⁺である Treg と Foxp3⁻である Tr1 (type 1 regulatory T) 細胞の 2 種類に分かれる[99]。本研究において本乳酸菌の Treg 誘導能を検討したが、乳酸菌による Foxp3⁺ Treg の有意な誘導は観察されなかった。このことから、*L. plantarum* OLL2712 は Tr1 細胞を誘導して IL-10 産生を促進していると考えられる。Tr1 細胞の分化を誘導する因子として、IL-10 および IL-27 が報告されている[100,101]。本研究の結果から、*L. plantarum* OLL2712 は DC の IL-10 産生を促進し、増加した IL-10 により Tr1 細胞が誘導されたことが示唆された。本乳酸菌が DC や他の細胞による IL-27 を誘導するかについてもさらなる検討が必要である。

共培養の実験の結果と一致して、乳酸菌の 6 日間の経口投与は MLN DC における IL-10 産生を促進した。この結果から *L. plantarum* OLL2712 の摂取によって、MLN へ遊走する DC に影響が及ぼされたことが示唆された。しかしながら、6 日間の経口投与は PP DC において IL-10 遺伝子発現を増強しなかった。その一方で投与 12 時間後において PP DC での IL-10 遺伝子発現増加が観察された。Macpherson らの研究から経口的に投与された共生菌 *Enterobacter cloacae* が 5 時間の時点では MLN でほとんど検出されなかった一方で 12 時間後には共生菌を運ぶ DC が MLN で多数検出されたことが報告されている[102]ことから、12 時間の時点で *L. plantarum* OLL2712 は PP DC を活性化し、MLN への遊走を促していると考えられる。DC が遊走したあとには、新たな DC や DC 前駆体が PP へと供給されると考えられるが、DC の供給と、PP から遊走によって出ていく DC のバランスが遊走に偏ることで、結果的に PP での IL-10 遺伝子発現増強を検出することが難しくなった可能性が考えられる。過去の研究から PP における CD11b⁺DC が IL-10 を高産生することが報告されている[103]。CD11b⁺の遊走性の DC が MLN における IL-10 遺伝子発現増強に関与しているかもしれない。

本菌株は、骨髄 DC や腹腔マクロファージの IL-10 産生を高く誘導する菌株としてスクリーニングされた菌株であり、糖尿病モデルマウスである KKA_y マウスに経口投与することにより、血清中の炎症性サイトカインや、トリグリセリドの減少といった炎症・代謝パラメーターの改善作用が報告されている[83,104]。しかしながら、この *in vivo* のモデルにおいて IL-10 産生誘導効果は検出されなかった。可能性のひとつとして、肥満に伴う炎症の発症により、炎症に対抗するために IL-10 レベルが増加し[105]、結果として乳酸菌による IL-10 増強効果が観察されなかったことが考えられる。本研究において、炎症性ではない定常状態のマウスを使用して *in vivo* の実験系で IL-10 遺伝子増強効果を示したことは、KKA_y マウスを用いた過去の研究においても、*L. plantarum* OLL2712 が腸管 DC の IL-10 産生を増強していたことを示唆する。

本研究の乳酸菌 *L. plantarum* OLL2712 の経口投与実験において、比較対照群として水を投与した群を設定した。複数の乳酸菌株を比較した共培養の実験結果から、乳酸菌が腸管の DC と直接相互作用する場合には本菌株が他の菌株と比較して IL-10 産生誘導能が高いことを示したが、経口的に摂取された場合において他の菌株と比較して IL-10 産生誘導能が高いかは厳密に示せていない。共培養の実験結果から、乳酸菌が DC と直接相互作用する場合は本菌株がより IL-10 の産生を誘導できると予想されるが、たとえば腸管上皮細胞に最初に認識され、腸管上皮細胞と PP DC との相互作用により PP DC の IL-10 産生能が上昇した可能性も考えられ、その場合、乳酸菌株と腸管上皮細胞との反応について検討・比較する必要があると考えられる。引き続き、乳酸菌が腸管免疫系に認識される過程について明らかにすることが必要であると考えられる。

第二章において、マウス由来の MLN および PP DC を使用して乳酸菌 *L. plantarum* OLL2712 が DC に対する IL-10 産生誘導能を有することを示した。第二章のまとめを図 2-10 に示した。この結果は、乳酸菌などの食品成分を利用することで炎症状態を改善できる可能性を示している。乳酸菌が IL-10 を誘導するメカニズムをより詳細に明らかにすることで、炎症を予防・治療できる食品成分の開発等に应用できると考えられる。

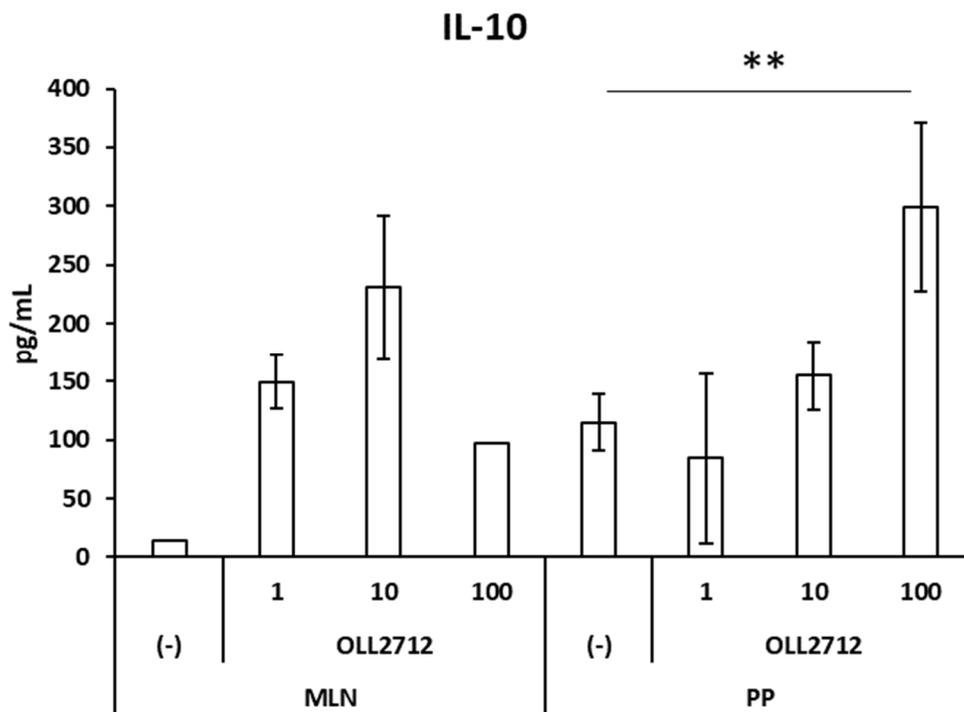


図 2-1 *L. plantarum* OLL2712 の腸管免疫細胞に対する IL-10 産生誘導

BALB/c 若齢マウスより MLN 細胞, PP 細胞を調製した。各細胞(1×10^6 個)と *L. plantarum* OLL2712 菌体 (終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を共培養した。本実験にはマウスを 2 匹使用し、細胞をプールして使用した。72 時間後の培養上清中の IL-10 タンパク質量を ELISA 法により定量した。培養は 3 well 行い、各 well の値の平均値 \pm SD を示した。測定限界以下であった well の値は除外して算出した。本実験は 2 回行い、代表的な結果を示した。有意差検定は Dunnett の検定で行い、乳酸菌無添加条件と各濃度の乳酸菌添加条件とを比較した。(p**<0.01)

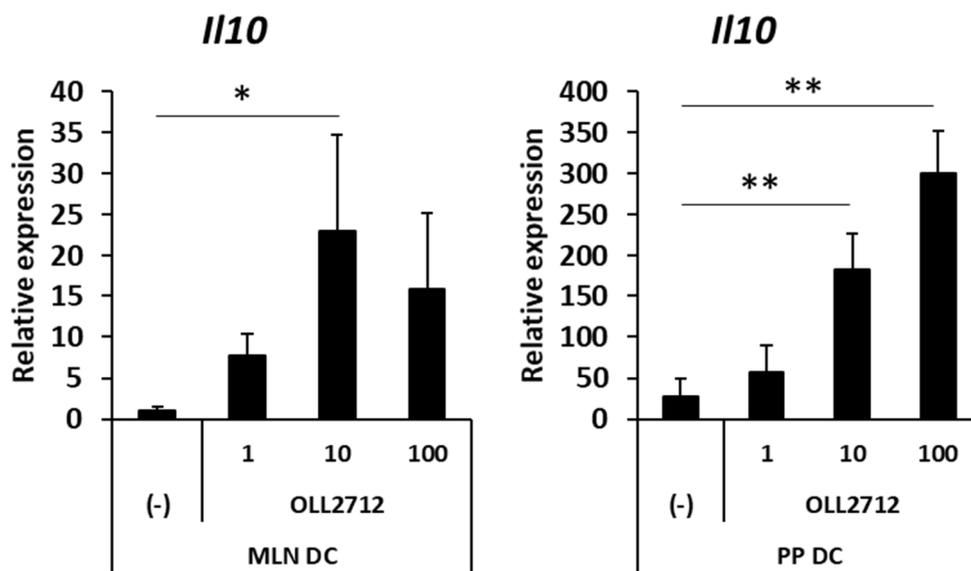


図 2-2 *L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 遺伝子発現誘導

BALB/c 若齢マウスより MLN 細胞, PP 細胞を調製した。得られた細胞から MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、それぞれ MLN DC, PP DC として用いた。各 DC (1×10⁵ 個) と *L. plantarum* OLL2712 菌体 (終濃度 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) を 18 時間共培養した。本実験にはマウスを 11 匹使用し、細胞をプールして使用した。培養は各条件 2 well で行い、培養後は 2 well の細胞をプールした。各条件における IL-10 遺伝子相対発現量を測定した。この実験を 3 回行い、代表的な実験における MLN DC 乳酸菌無添加条件の IL-10 遺伝子発現量を 1 とし、実験 3 回分の値を算出し、平均±SD を示した。有意差検定は Dunnett の検定で行い、各 DC の乳酸菌無添加と、各濃度の乳酸菌添加条件とを比較した。(p* $<$ 0.05, p** $<$ 0.01)

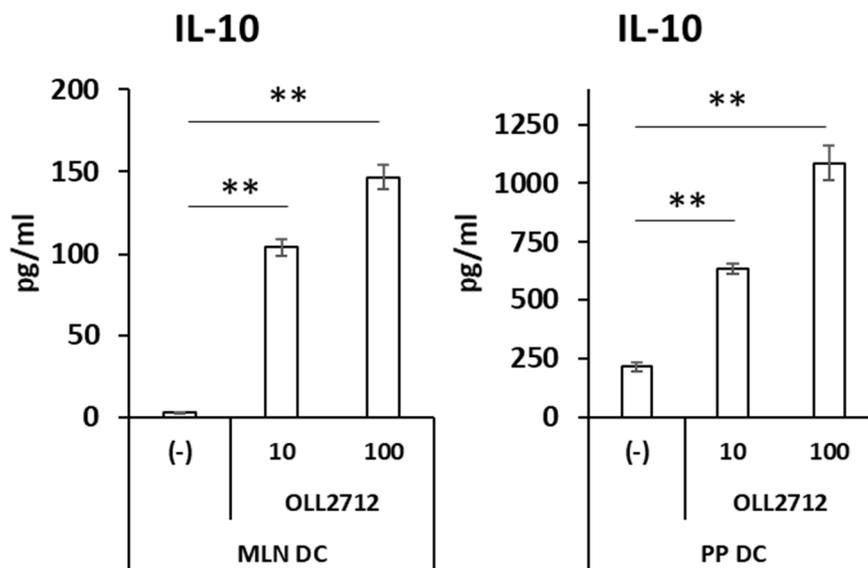


図 2-3 *L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 産生誘導

BALB/c 若齢マウスより MLN 細胞, PP 細胞を調製した。得られた細胞から MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、それぞれ MLN DC, PP DC として用いた。各 DC (2×10⁵ 個)と *L. plantarum* OLL2712 菌体 (終濃度 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) を共培養した。本実験にはマウスを 17 匹使用し、細胞はプールして使用した。培養は各条件 3 well ずつ行った。72 時間後の培養上清中の IL-10 タンパク質量を ELISA 法またはイムノアッセイにより定量した。各 well における値を算出し、平均値±SD を示した。本実験を 2 回行い、代表的な結果を示した。有意差検定は Dunnett の検定で行い、各 DC の乳酸菌無添加と、各濃度の乳酸菌添加条件とを比較した。(p**<0.01)

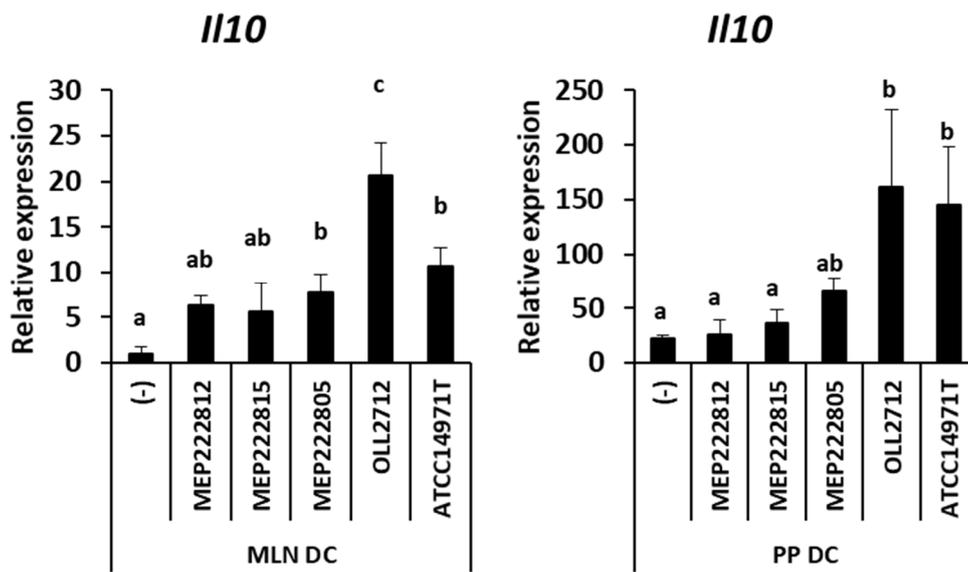


図 2-4 *L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-10 遺伝子発現誘導の他菌株との比較

BALB/c 若齢マウスより MLN 細胞, PP 細胞から MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、それぞれ MLN DC, PP DC として用いた。各 DC (1×10⁵ 個)と各乳酸菌 (終濃度 10 µg/mL) を 18 時間共培養した。各条件における IL-10 遺伝子相対発現量を測定した。本実験にはマウスを 20 匹使用し、細胞はプールして使用した。培養は各条件 6 well 行い、培養後は 2 well をプールしたものを 3 つ作製した。MLN DC における乳酸菌無添加条件の平均値を 1 とし、各条件の IL-10 遺伝子相対発現量を平均±SD で示した。本実験は 2 回行い、代表的な実験を示した。有意差検定は Tukey の HSD 検定で行い、p<0.05 を有意差ありとし、異なるアルファベットで示した。

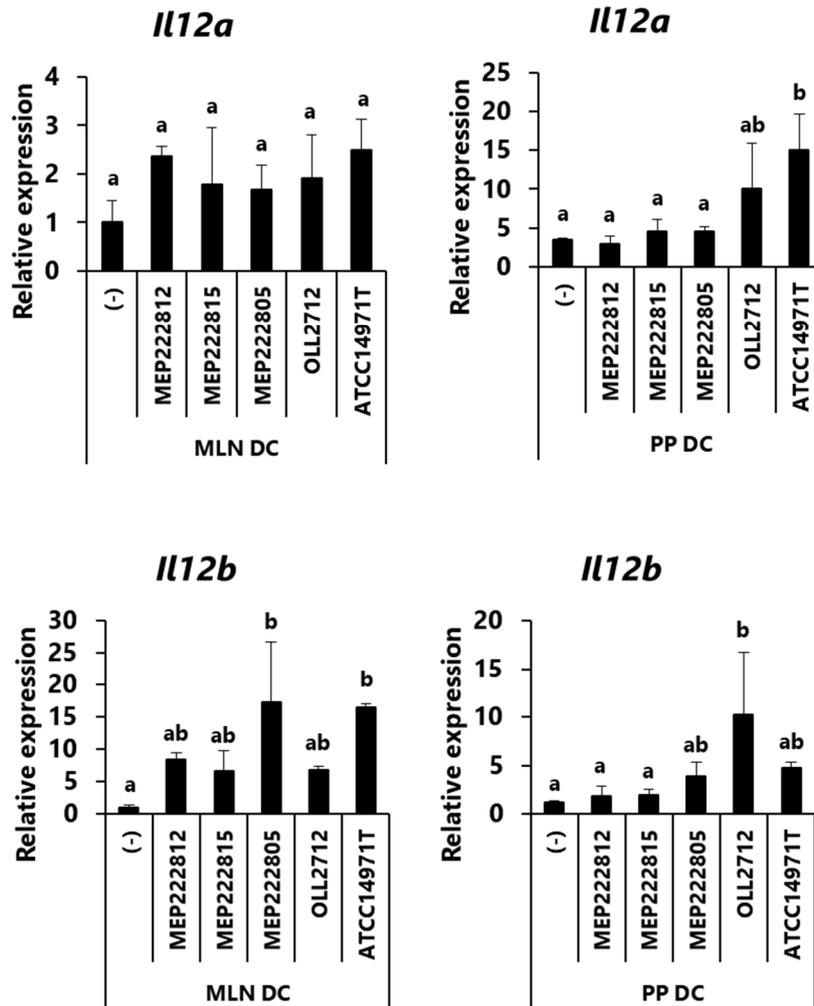


図 2-5 *L. plantarum* OLL2712 の腸管 DC に対する IL-12 遺伝子発現誘導の他菌株との比較

BALB/c 若齢マウスより MLN 細胞, PP 細胞から MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、それぞれ MLN DC, PP DC として用いた。各 DC (1×10⁵ 個)と各乳酸菌 (終濃度 10 μg/mL) を 18 時間共培養した。各条件における IL-12p35 (*Il12a*)および IL-12p40 (*Il12b*)遺伝子の相対発現量を測定した。本実験にはマウスを 20 匹使用し、細胞はプールして使用した。培養は各条件 6 well 行い、培養後は 2 well をプールしたものを 3 つ作製した。各遺伝子における MLN DC の乳酸菌無添加条件の平均値を 1 とし、各条件の各遺伝子相対発現量を平均±SD で示した。本実験は 2 回行い、代表的な実験を示した。有意差検定は Tukey の HSD 検定で行い、p<0.05 を有意差ありとし、異なるアルファベットで示した。

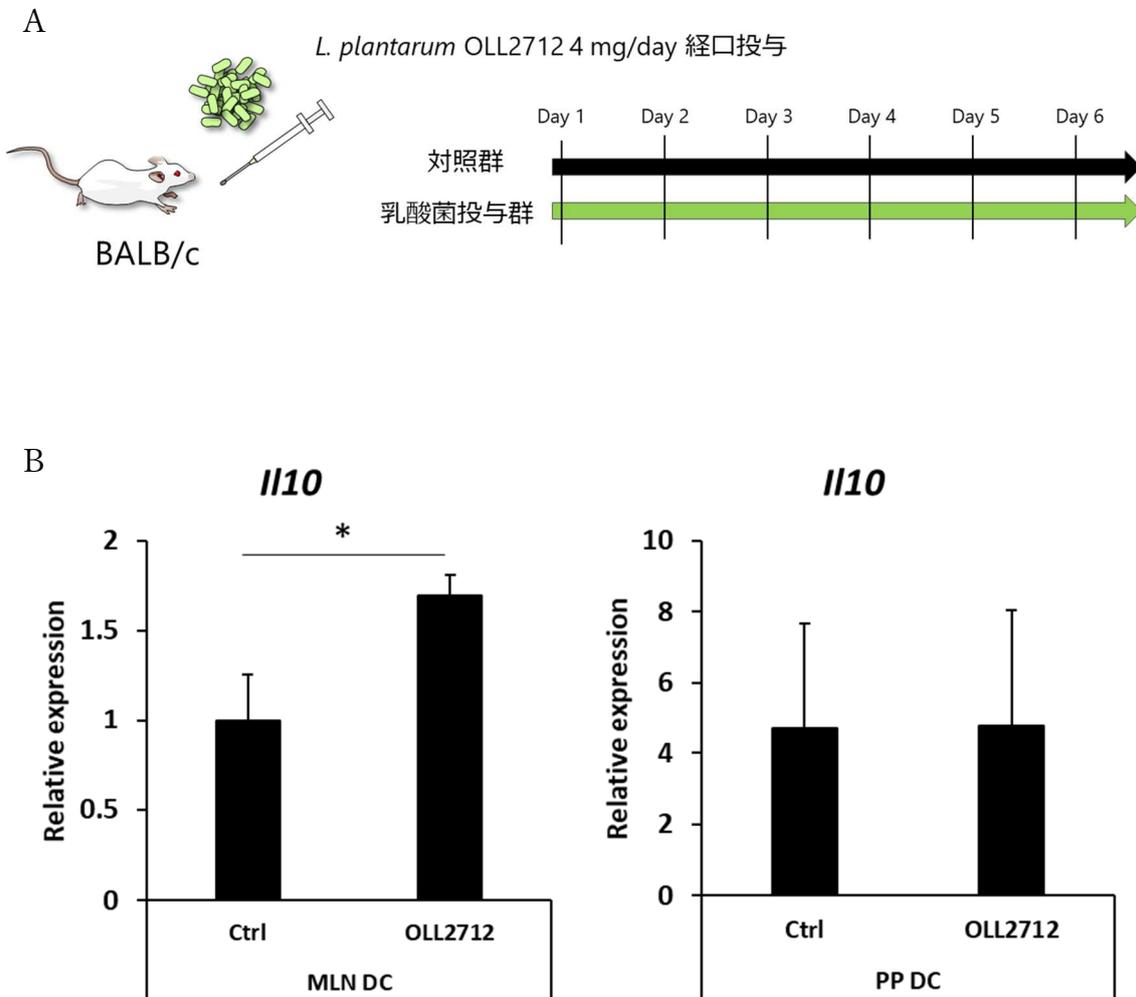


図 2-6 *L. plantarum* OLL2712 の経口投与 6 日後における腸管 DC の IL-10 遺伝子発現量

(A) BALB/c マウスを対照群、乳酸菌投与群 (各群 3-6 匹) に分け、乳酸菌投与群には *L. plantarum* OLL2712 の凍結乾燥菌体をオートクレーブした脱イオン水で希釈した菌体懸濁液 (10 mg/mL) を胃ゾンデによる経口投与により 1 日 200 μ L 投与した。これと並行し、対照群にはオートクレーブ脱イオン水を 1 日 200 μ L 投与した。6 日目の投与から 4 時間後、MLN および PP 細胞を調製した。(B) 乳酸菌を投与したマウスから MLN および PP 細胞を調製し、MACS 法により CD11c⁺ 細胞を精製し、それぞれ MLN DC、PP DC として扱った。各マウスから得られた細胞をプールして使用した。各細胞から抽出した Total RNA から cDNA を調製し、qPCR 法により IL-10 遺伝子の相対発現量を測定した。本実験を 3 回行い、対照群の MLN DC における IL-10 相対遺伝子発現量の平均を 1 とし、各群の相対遺伝子発現量を求め、平均 \pm SD で示した。有意差検定は Student の t 検定で行った (*p < 0.05)。

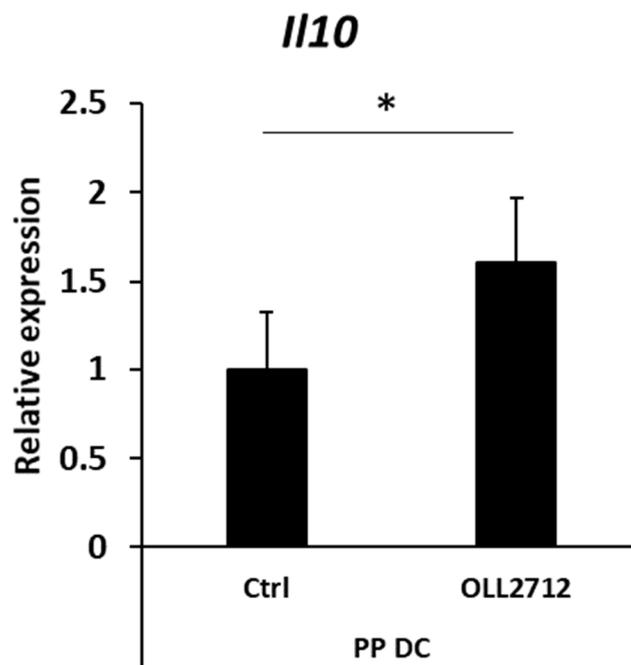


図 2-7 *L. plantarum* OLL2712 の経口投与 12 時間後における PP DC の IL-10 遺伝子発現量

BALB/c マウスを対照群、乳酸菌投与群に分け(n=6)、乳酸菌投与群には *L. plantarum* OLL2712 の凍結乾燥菌体をオートクレーブ滅菌脱イオン水で希釈した菌体懸濁液 (10 mg/mL) を胃ゾンデによる経口投与により 200 μ L 投与した。対照群にはオートクレーブ滅菌脱イオン水を 200 μ L 投与した。投与から 12 時間後 PP DC を調製し、細胞から抽出した Total RNA から cDNA を調製し、qPCR 法により遺伝子の相対発現量を測定した。各マウスにおける遺伝子発現量を求め、対照群の平均を 1 とし、乳酸菌投与群の IL-10 遺伝子相対発現量を求めた。本実験は 2 回行い、代表的な結果を示した。有意差検定は Student の t 検定で行った(*p<0.05)。

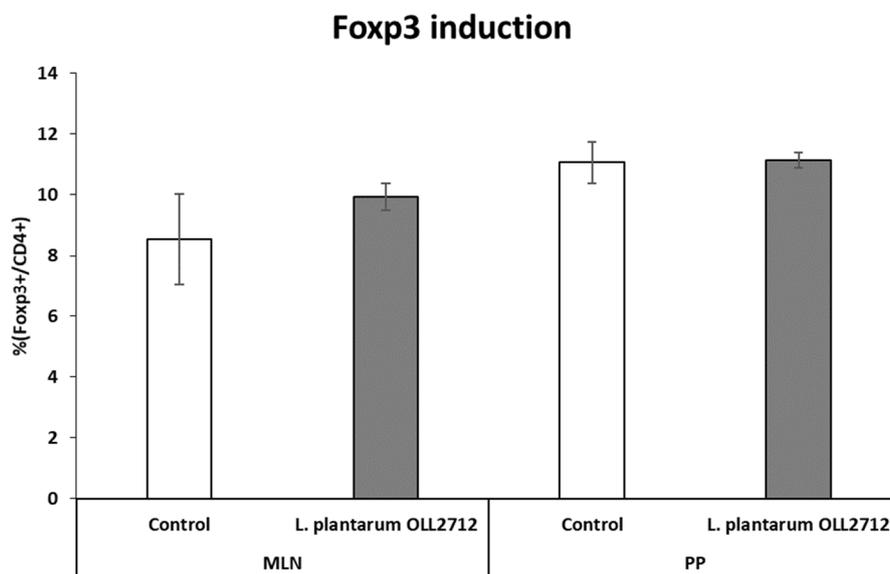


図 2-8 *L. plantarum* OLL2712 の経口投与 6 日後の MLN および PP における Foxp3⁺細胞の割合

図 2-6A のスケジュールに従い乳酸菌および脱イオン水を投与したマウスから MLN および PP 細胞を調製し、それぞれにおける Foxp3⁺CD4⁺細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。本実験は 2 回行い、代表的な結果を示した。各マウスの値の平均±SD を示した。

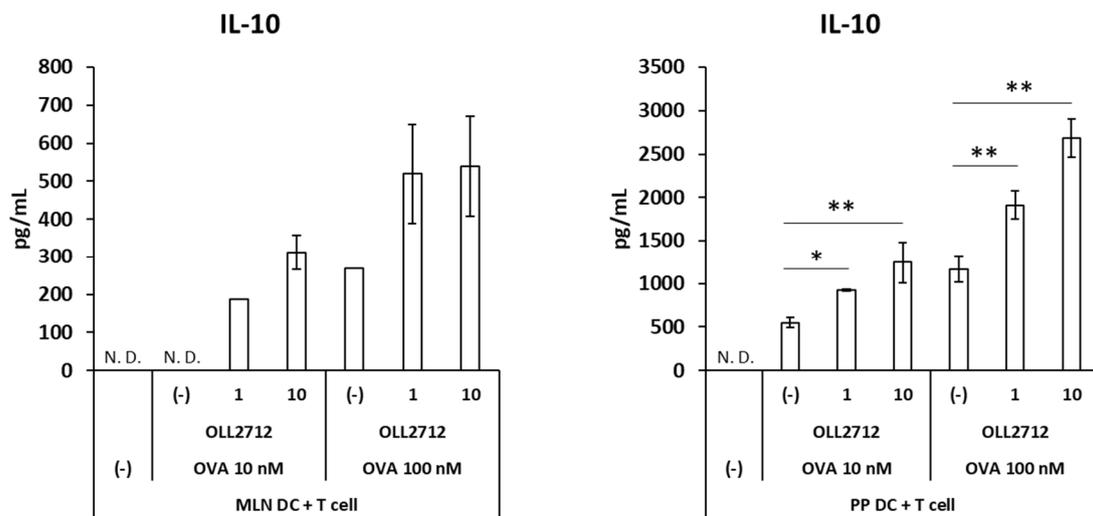


図 2-9 *L. plantarum* OLL2712 の DC-T 細胞共培養系における IL-10 産生量誘導

BALB/c 若齢マウスより MLNDC, PP DC を調製した。DO11.10 マウスの脾臓細胞から CD4⁺T 細胞を調製した。各 DC(2×10⁴ 個)と CD4⁺T 細胞(2×10⁵ 個)を *L. plantarum* OLL2712 菌体 (終濃度 1 μg/mL, 10 μg/mL) および OVA ペプチド(終濃度 10 nM, 100nM)の存在下で共培養した。72 時間後の培養上清中のタンパク質量を ELISA 法により定量した。本実験には BALB/c マウス 8 匹、DO11.10 マウス 2 匹を使用し、得られた細胞をプールして使用した。培養は各条件 3 well ずつ行い、各 well の値を算出し、平均±SD を示した。検出限界以下を示した well の値は除外した。3 well とも検出限界以下を示した条件に N.D.を示した。有意差検定は、OVAp の濃度ごとに Dunnett の検定で行い、乳酸菌無添加の条件と乳酸菌添加の各濃度とをそれぞれ比較した(*p<0.05, **p<0.01)。ただし、比較する条件の中に 3 well とも測定値を算出できなかった条件がある場合には検定を行わなかった。本実験は 2 回行い、代表的な結果を示した。

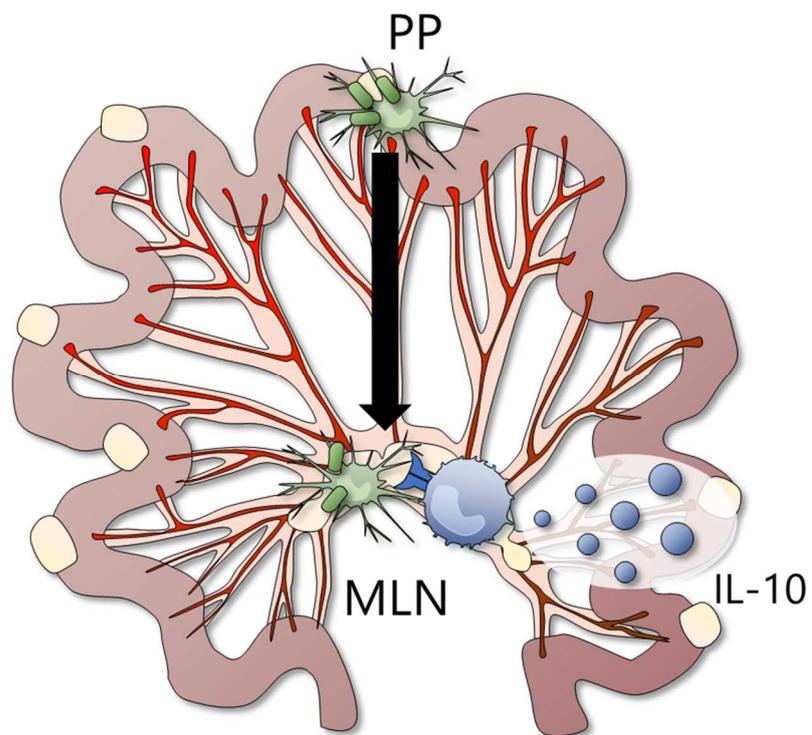
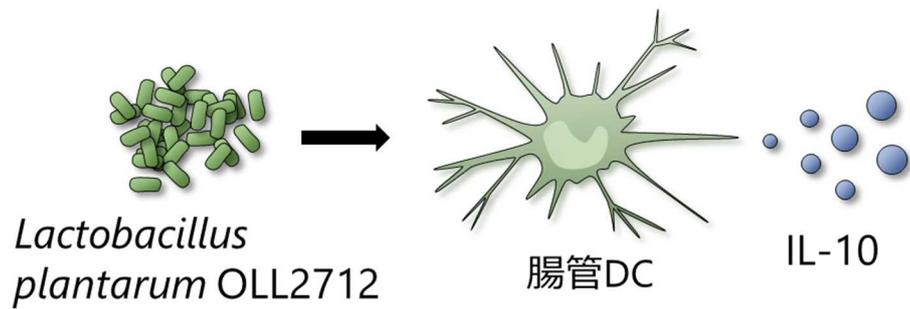


図 2-10 第二章のまとめ

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 は腸管 DC に対して IL-10 産生を強く誘導した。また本乳酸菌が経口的に摂取された場合、パイエル板 DC により認識され IL-10 産生を増強し、MLN への移動を伴い MLN DC における IL-10 産生を増強する。その一方で本乳酸菌が T 細胞における IL-10 産生を増強する可能性が示された。

総合討論

本文の内容は学術論文雑誌として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

参考文献

1. Griebel P J, Hein W R. 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today* 17: 30–39.
2. McGhee J, Mestecky J, Elson C, Kiyono H. 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 9: 175-199 LA-English.
3. Neutra M R, Mantis N J, Kraehenbuhl J P. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2: 1004–9.
4. Fagarasan S. 2008. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr Opin Immunol* 20: 170–177.
5. Hall J A, Bouladoux N, Sun C M, Wohlfert E A, Blank R B, Zhu Q, Grigg M E, Berzofsky J A, Belkaid Y. 2008. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity* 29: 637–649.
6. Macpherson A J, Gatto D, Sainsbury E, Harriman G R, Hengartner H, Zinkernagel R M. 2000. A Primitive T Cell-Independent Mechanism of Intestinal Mucosal IgA Responses to Commensal Bacteria. *Science (80-)* 288: 2222–2226.
7. Uematsu S, Fujimoto K, Jang M H, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii K J, Akira S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9: 769–776.
8. Jang M H, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Yang B-G, Seoh J-Y, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. 2006. CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes. *J Immunol* 176: 803–810.
9. Steinman R M, Cohn Z A. 2007. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice J. *Exp. Med.*1973. 137: 1142-1162. *J Immunol* 178: 5–25.
10. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman R M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693–702.
11. Brasel K, De Smedt T, Smith J L, Maliszewski C R. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96: 3029–39.
12. Fujimoto K, Karuppuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii K J, Akira S, Uematsu S. 2011. A New Subset of CD103+CD8 + Dendritic Cells in the Small Intestine Expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and Induces Th1

- Response and CTL Activity. *J Immunol* 186: 6287–6295.
13. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151–64.
 14. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057–61.
 15. Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330–6.
 16. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337–342.
 17. Fessler J, Ficjan A, Duftner C, Dejaco C. 2013. The Impact of Aging on Regulatory T-Cells. *Front Immunol* 4: 1–6.
 18. Shevach E M. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 50: 2721–2724.
 19. Benson M J, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle R J. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204: 1765–1774.
 20. Erkelens M N, Mebius R E. 2017. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. *Trends Immunol* 38: 168–180.
 21. Iwata M. 2009. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol* 21: 8–13.
 22. Guo Y, Brown C, Ortiz C, Noelle R J. 2015. Leukocyte Homing, Fate, and Function Are Controlled by Retinoic Acid. *Physiol Rev* 95: 125–148.
 23. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21: 527–38.
 24. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. 2007. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science* (80-) 317: 256–260.
 25. Xiao S, Jin H, Korn T, Liu S M, Oukka M, Lim B, Kuchroo V K. 2008. Retinoic Acid Increases Foxp3+ Regulatory T Cells and Inhibits Development of Th17 Cells by Enhancing TGF- β -Driven Smad3 Signaling and Inhibiting IL-6 and IL-23 Receptor Expression. *J Immunol* 181: 2277–2284.
 26. Iwata M. 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* 15: 1017–1025.
 27. Mora J R, Iwata M, Eksteen B, Song S-Y, Junt T, Senman B, Otipoby K L, Yokota A,

- Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P, Rajewsky K, Adams D H, von Andrian U H. 2006. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* (80-) 314: 1157–60.
28. Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, Ohoka Y, Kato C, Song S-Y, Iwata M. 2009. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *Int Immunol* 21: 361–377.
 29. Ohoka Y, Yokota-Nakatsuma A, Maeda N, Takeuchi H, Iwata M. 2014. Retinoic Acid and GM-CSF Coordinately Induce Retinal Dehydrogenase 2 (RALDH2) Expression through Cooperation between the RAR/RXR Complex and Sp1 in Dendritic Cells. *PLoS One* 9: e96512.
 30. Pawelec G. 1999. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech Ageing Dev* 108: 1–7.
 31. Targonski P V, Jacobson R M, Poland G A. 2007. Immunosenescence: Role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine* 25: 3066–3069.
 32. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. 2000. Human immunosenescence: The prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18: 1717–1720.
 33. Baylis D, Bartlett D B, Patel H P, Roberts H C. 2013. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev Heal* 2: 8.
 34. Steinmann G G, Klaus B, Müller-Hermelink H K. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 22: 563–575.
 35. PFISTER G. 2006. Naive T Cells in the Elderly: Are They Still There? *Ann N Y Acad Sci* 1067: 152–157.
 36. Kohler S, Wagner U, Pierer M, Kimmig S, Oppmann B, Möwes B, Jülke K, Romagnani C, Thiel A. 2005. Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol* 35: 1987–1994.
 37. Haynes L, Eaton S M, Burns E M, Randall T D, Swain S L. 2003. CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15053–15058.
 38. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N. 2009. PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBP underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 106: 15807–15812.
 39. Mo R, Chen J, Han Y, Bueno-Cannizares C, Misek D E, Lescure P A, Hanash S, Yung R L. 2003. T Cell Chemokine Receptor Expression in Aging. *J Immunol* 170: 895–904.
 40. Jagger A, Shimojima Y, Goronzy J J, Weyand C M. 2014. Regulatory T Cells and the

- Immune Aging Process: A Mini-Review. *Gerontology* 60: 130–137.
41. Sharma S, Dominguez A L, Lustgarten J. 2006. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)* 177: 8348–8355.
 42. Zhao L, Sun L, Wang H, Ma H, Liu G, Zhao Y. 2007. Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *J Leukoc Biol* 81: 1386–1394.
 43. Sun L, Hurez V J, Thibodeaux S R, Kious M J, Liu A, Lin P, Murthy K, Pandeswara S, Shin T, Curiel T J. 2012. Aged regulatory T cells protect from autoimmune inflammation despite reduced STAT3 activation and decreased constraint of IL-17 producing T cells. *Aging Cell* 11: 509–519.
 44. Hwang K-A, Kim H-R, Kang I. 2009. Aging and human CD4+ regulatory T cells. *Mech Ageing Dev* 130: 509–517.
 45. Marc E W. 2000. The effect of age on B-cell repertoire. *J Clin Immunol* 20: 240.
 46. Johnson S a, Cambier J C. 2004. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. *Arthritis Res Ther* 6: 131–9.
 47. Steger M M, Maczek C, Grubeck-Loebenstien B. 1996. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clin Exp Immunol* 105: 544–550.
 48. Lung T ., Saurwein-Teissl M, Parson W, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstien B. 2000. Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. *Vaccine* 18: 1606–1612.
 49. Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. 2007. Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 42: 421–426.
 50. Grolleau-Julius A, Harning E K, Abernathy L M, Yung R L. 2008. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res* 68: 6341–9.
 51. Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann M P, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S. 2004. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3K γ -deficient mice. *EMBO J* 23: 3505–3515.
 52. Stephens L, Ellson C, Hawkins P. 2002. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14: 203–213.
 53. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke J M, Topping D L, Suzuki T, Taylor T D, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469: 543–549.
 54. Shimazu T, Villena J, Tohno M, Fujie H, Hosoya S, Shimosato T, Aso H, Suda Y, Kawai

- Y, Saito T, Makino S, Ikegami S, Itoh H, Kitazawa H. 2012. Immunobiotic lactobacillus jensenii elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect Immun* 80: 276–288.
55. Kikuchi Y, Kunitoh-Asari A, Hayakawa K, Imai S, Kasuya K, Abe K, Adachi Y, Fukudome S, Takahashi Y, Hachimura S. 2014. Oral Administration of Lactobacillus plantarum Strain AYA Enhances IgA Secretion and Provides Survival Protection against Influenza Virus Infection in Mice. *PLoS One* 9: e86416.
 56. Kotani Y, Kunisawa J, Suzuki Y, Sato I, Saito T, Toba M, Kohda N, Kiyono H. 2014. Role of Lactobacillus pentosus Strain b240 and the Toll-Like Receptor 2 Axis in Peyer's Patch Dendritic Cell-Mediated Immunoglobulin A Enhancement. *PLoS One* 9: e91857.
 57. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, Kadooka Y, Shiozaki T, Nakagawa H, Nakayama Y, Miyazaki T. 2014. Lactobacillus gasseri SBT2055 Induces TGF- β Expression in Dendritic Cells and Activates TLR2 Signal to Produce IgA in the Small Intestine. *PLoS One* 9: e105370.
 58. Takeda K, Suzuki T, Shimada S-I, Shida K, Nanno M, Okumura K. 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by Lactobacillus casei Shirota. *Clin Exp Immunol* 146: 109–115.
 59. NOGUCHI S, Hattori M, Sugiyama H, Hanaoka A, OKADA S, YOSHIDA T. 2012. Lactobacillus plantarum NRIC1832 Enhances IL-10 Production from CD4 + T Cells in Vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 1925–31.
 60. Yoshida T, Enomoto M, Nakayama S, Adachi Y, Fujiwara W, Sugiyama H, Shimojoh M, Okada S, Hattori M. 2013. Induction of ALDH Activity in Intestinal Dendritic Cells by Lactobacillus plantarum NRIC0380. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1826–1831.
 61. Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao J-Z, Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K, Hachimura S. 2009. Suppressive effects of *Bifidobacterium longum* on the production of Th2-attracting chemokines induced with T cell–antigen-presenting cell interactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55: 324–334.
 62. Bollrath J, Powrie F M. 2013. Controlling the frontier: Regulatory T-cells and intestinal homeostasis. *Semin Immunol* 25: 352–357.
 63. Coombes J L, Maloy K J. 2007. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* 19: 116–126.
 64. Abbas A K, Benoist C, Bluestone J A, Campbell D J, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo V K, Mathis D, Roncarolo M G, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach E M, Vignali D A A, Ziegler S F. 2013. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 14: 307–308.

65. Faria A M, Garcia G, Rios M J, Michalaros C L, Vaz N M. 1993. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology* 78: 147–51.
66. Chougnat C A, Tripathi P, Lages C S, Raynor J, Sholl A, Fink P, Plas D R, Hildeman D A. 2011. A Major Role for Bim in Regulatory T Cell Homeostasis. *J Immunol* 186: 156–163.
67. Carpentier M, Chappert P, Kuhn C, Lalfer M, Flament H, Burlen-Defranoux O, Lantz O, Bandeira A, Malissen B, Davoust J, Gross D-A. 2013. Extrathymic induction of Foxp3⁺ regulatory T cells declines with age in a T-cell intrinsic manner. *Eur J Immunol* 43: 2598–2604.
68. Scott C L, Aumeunier A M, Mowat A M I. 2011. Intestinal CD103⁺ dendritic cells: Master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32: 412–419.
69. Worthington J J, Czajkowska B I, Melton A C, Travis M A. 2011. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor- β and induce Foxp3⁺ regulatory T cells via integrin α v β 8. *Gastroenterology* 141: 1802–1812.
70. Païdassi H, Acharya M, Zhang A, Mukhopadhyay S, Kwon M, Chow C, Stuart L M, Savill J, Lacy-Hulbert A. 2011. Preferential expression of integrin α v β 8 promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103⁺ dendritic cells. *Gastroenterology* 141: 1813–1820.
71. Shiokawa A, Kotaki R, Takano T, Nakajima-Adachi H, Hachimura S. 2017. Mesenteric lymph node CD11b[–] CD103⁺ PD-L1^{High} dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* 152: 52–64.
72. Nakajima-Adachi H, Shibahara K, Fujimura Y, Takeyama J, Hiraide E, Kikuchi A, Murakami H, Hosono A, Nochi T, Wakatsuki Y, Shimojo N, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S. 2017. Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy. *PLoS One* 12: e0172795.
73. Molenaar R, Knippenberg M, Goverse G, Olivier B J, de Vos A F, O’Toole T, Mebius R E, Vos A F de, O’Toole T, Mebius R E. 2011. Expression of Retinaldehyde Dehydrogenase Enzymes in Mucosal Dendritic Cells and Gut-Draining Lymph Node Stromal Cells Is Controlled by Dietary Vitamin A. *J Immunol* 186: 1934–1942.
74. Darrigues J, van Meerwijk J P M, Romagnoli P. 2018. Age-Dependent Changes in Regulatory T Lymphocyte Development and Function: A Mini-Review. *Gerontology* 64: 28–35.
75. Nolting J, Daniel C, Reuter S, Stuelten C, Li P, Sucov H, Kim B-G, Letterio J J, Kretschmer K, Kim H-J, von Boehmer H. 2009. Retinoic acid can enhance conversion of

- naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *J Exp Med* 206: 2131–2139.
76. Lu L, Lan Q, Li Z, Zhou X, Gu J, Li Q, Wang J, Chen M, Liu Y, Shen Y, Brand D D, Ryffel B, Horwitz D A, Quismorio F P, Liu Z, Li B, Olsen N J, Zheng S G. 2014. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E3432-3440.
 77. Bian F, Xiao Y, Barbosa F L, de Souza R G, Hernandez H, Yu Z, Pflugfelder S C, de Paiva C S. 2019. Age-associated antigen-presenting cell alterations promote dry-eye inducing Th1 cells. *Mucosal Immunol* 12: 897–908.
 78. Schulz O, Jaensson E, Persson E K, Liu X, Worbs T, Agace W W, Pabst O. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206: 3101–3114.
 79. Jones M J, Goodman S J, Kobor M S. 2015. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14: 924–932.
 80. Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. 2000. Anatomical Origin of Dendritic Cells Determines Their Life Span in Peripheral Lymph Nodes. *J Immunol* 165: 4910–4916.
 81. Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z. 2009. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* 86: 959–969.
 82. Hong K, Zhang Y, Guo Y, Xie J, Wang J, He X, Lu N, Bai A. 2014. All-trans retinoic acid attenuates experimental colitis through inhibition of NF- κ B signaling. *Immunol Lett* 162: 34–40.
 83. Toshimitsu T, Mochizuki J, Ikegami S, Ito H. 2016. Identification of a *Lactobacillus plantarum* strain that ameliorates chronic inflammation and metabolic disorders in obese and type 2 diabetic mice. *J Dairy Sci* 99: 933–946.
 84. Coombes J L, Siddiqui K R R, Arancibia-Carcamo C V., Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, Powrie F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid dependent mechanism. *J Exp Med* 204: 1757–1764.
 85. Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel A-B B, Pestel J. 2007. Impact of lactic acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2007: 1–9.
 86. Konstantinov S R, Smidt H, de Vos W M, Bruijns S C M, Singh S K, Valence F, Molle D, Lortal S, Altermann E, Klaenhammer T R, van Kooyk Y. 2008. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions.

- Proc Natl Acad Sci 105: 19474–9.
87. Gad M, Ravn P, Søborg D A, Lund-Jensen K, Ouwehand A C, Jensen S S. 2011. Regulation of the IL-10/IL-12 axis in human dendritic cells with probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63: 93–107.
 88. Matsuzaki C, Takagaki C, Higashimura Y, Nakashima Y, Hosomi K, Kunisawa J, Yamamoto K, Hisa K. 2018. Immunostimulatory effect on dendritic cells of the adjuvant-active exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. *Biosci Biotechnol Biochem* 82: 1647–51.
 89. Son Y I, Egawa S I, Tatsumi T, Redlinger R E, Kalinski P, Kanto T. 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 262: 145–157.
 90. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. 2014. Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* 2014: 1104–1116.
 91. Beijer M R, Kraal G, den Haan J M M. 2014. Vitamin A and dendritic cell differentiation. *Immunology* 142: 39–45.
 92. Feng T, Cong Y, Qin H, Benveniste E N, Elson C O. 2010. Generation of Mucosal Dendritic Cells from Bone Marrow Reveals a Critical Role of Retinoic Acid. *J Immunol* 185: 5915–25.
 93. Coombes J L, Siddiqui K R R, Arancibia-Cárcamo C V., Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, Powrie F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204: 1757–1764.
 94. Kaji R, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Nanno M, Shida K. 2010. Bacterial Teichoic Acids Reverse Predominant IL-12 Production Induced by Certain *Lactobacillus* Strains into Predominant IL-10 Production via TLR2-Dependent ERK Activation in Macrophages. *J Immunol* 184: 3505–3513.
 95. Toshimitsu T, Ozaki S, Mochizuki J, Furuichi K, Asami Y, T. T, S. O, J. M, K. F, Y. A. 2017. Effects of *Lactobacillus plantarum* Strain OLL2712 Culture Conditions on the Anti-inflammatory Activities for Murine Immune Cells and Obese and Type 2 Diabetic Mice. *Appl Environ Microbiol* 83: e03001-16.
 96. Houston S A, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat A M, Milling S. 2016. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* 9: 468–478.
 97. MacLeod H, Wetzler L M. 2007. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE* 2007: .

98. Jun J C, Jones M B, Oswald D M, Sim E S, Jonnalagadda A R, Kreisman L S C, Cobb B A. 2017. T cell-intrinsic TLR2 stimulation promotes IL-10 expression and suppressive activity by CD45Rb^{hi} T cells. *PLoS One* 12: e0180688.
99. Gregori S, Roncarolo M G. 2018. Engineered T regulatory type 1 cells for clinical application. *Front Immunol* 9: 233.
100. Brockmann L, Gagliani N, Steglich B, Giannou A D, Kempinski J, Pelczar P, Geffken M, Mfarrej B, Huber F, Herkel J, Wan Y Y, Esplugues E, Battaglia M, Krebs C F, Flavell R A, Huber S. 2017. IL-10 Receptor Signaling Is Essential for T R 1 Cell Function In Vivo. *J Immunol* 198: 1130–41.
101. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier L M, Anderson D E, Weiner H L. 2009. IL-27 Is a Key Regulator of IL-10 and IL-17 Production by Human CD4 + T Cells. *J Immunol* 183: 2435–43.
102. Macpherson A J, Gatto D, Sainsbury E, Harriman G R, Hengartner H, Zinkernagel R M. 2004. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science* (80-) 303: 1662–1665.
103. Shiokawa A, Tanabe K, Tsuji N M, Sato R, Hachimura S. 2009. IL-10 and IL-27 producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. *Immunol Lett* 125: 7–14.
104. Toshimitsu T, Gotou A, Furuichi K, Hachimura S, Asami Y. 2019. Effects of 12-wk *Lactobacillus plantarum* OLL2712 treatment on glucose metabolism and chronic inflammation in prediabetic individuals: A single-arm pilot study. *Nutrition* 58: 175–180.
105. Cintra D E, Pauli J R, Araújo E P, Moraes J C, de Souza C T, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad M J, Velloso L A. 2008. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 48: 628–37.
106. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo T A, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda N N, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke J M, Topping D L, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446–450.

論文内容の要旨

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性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⁺CD103⁺PD-L1^{high} 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⁺CD103⁺PD-L1^{high} 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。本菌株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。

まず本菌株の腸管 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。

謝辞

本研究を進めるにあたり、常に温かいお言葉で励ましていただき、研究の場を提供していただくだけでなく、研究に対する考え方、研究の方向性、博士論文作成において懇切丁寧なご指導を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター免疫制御研究室、八村敏志准教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、ゼミでは時に厳しくも常に親身になっていただき、多くの助言を下さいました、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター免疫制御研究室、足立はるよ特任助教に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、多くのご助言、また実験面において多くのご支援を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻養生訓を科学する医食農連携研究室、田之倉優特任教授、宮川拓也特任准教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験面において多くのご支援を頂きました、日本大学生物資源科学科分子免疫学研究室、高橋恭子教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験手法について貴重なご意見を頂きました、東京農工大学大学院農学研究科応用生命化学専攻食品化学研究室、好田正准教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、乳酸菌サンプルの調製に関しまして多くのご支援を頂きました、株式会社明治研究本部乳酸菌研究所、利光孝之研究員に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、常に実験をしやすい環境を整えてくださり、実験手法や実験機器の使用法について何度も丁寧なご指導を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター免疫制御研究室の先輩、後輩の皆様に心より感謝致します。

最後に、研究生活において経済面・精神面で常に私を支えてくださった両親に深く感謝致します。

令和元年 12 月 高野 智弘