

博士論文

乳酸菌代謝物および菌体の抗炎症作用・

免疫調節作用に関する研究

青 木 玲 二

## 目次

要旨	2
略語一覧	8
序論	10
本論	
第1章 UVB 照射による HaCaT 細胞の損傷および炎症反応に対する ピルビン酸の防御作用	28
第2章 UVB 照射による皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用	39
第3章 インドール-3-ピルビン酸の腸管炎症抑制作用	57
第4章 卵白リゾチームの加熱凝集による <i>Lactococcus</i> 属乳酸菌体の IL-12 誘導能の増強	89
第5章 総合討論	106
参考文献	114
原著論文	144
謝辞	145

## 論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌代謝物および菌体の抗炎症作用・免疫調節作用に関する研究

氏名 青木 玲二

### 緒言

近年、乳酸菌に様々な健康機能があることが明らかになり、乳酸菌の活用が進められている。本研究では、乳酸菌の健康面での活用をさらに進めるため、乳酸菌代謝物の一つである芳香族ピルビン酸の新規機能を調べるとともに、乳酸菌体の免疫調節作用の強化について検討した。一部の乳酸菌が産生する芳香族ピルビン酸(フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸)には強い抗酸化作用があることが知られていたが、皮膚や腸管において抗炎症作用を示すかどうかはわかっていなかった。そこで、本研究では第1章および第2章において、紫外線B波(UVB)照射による角化細胞および皮膚の炎症モデルを用いて、ピルビン酸と芳香族ピルビン酸の抗炎症作用を検討し、第3章において、T細胞移入大腸炎モデルを用いて、芳香族ピルビン酸の腸管炎症抑制作用を検討した。また、第4章では乳酸菌体の免疫調節作用としてマクロファージに対する Interleukin (IL)-12 誘導に着目し、卵白リゾチームの加熱凝集による IL-12 誘導能の増強作用について解析した。

### 第1章 UVB 照射による HaCaT 細胞の損傷および炎症反応に対するピルビン酸の防御作用

ヒト不死化角化細胞である HaCaT 細胞を用いて、UVB 照射に対するピルビン酸の防御作用を調べた。HaCaT 細胞に UVB を照射後、ピルビン酸を含有する培地で培養した結果、ピルビン酸は UVB 照射後の細胞の生存を有意に向上させた。さらに、ピルビン酸は UVB により誘導される炎症性メディエーターであ

る、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Cyclooxygenase-2 (**Cox-2**)の発現を遺伝子およびタンパク質レベルで抑制した。UVB 照射による角化細胞の損傷には DNA への直接的なダメージと、活性酸素(ROS)による間接的なものがあり、ROS は mitogen-activated protein kinase (**MAPK**)を介して炎症反応やアポトーシスなどの一連のカスケードを誘導する。そこで、UVB により誘導される ROS および MAPK の活性化に対するピルビン酸の効果を検討した。その結果、ピルビン酸は ROS の産生を阻害せずに、p38 MAPK のリン酸化を抑制することがわかった。p38 MAPK は UVB 照射による角化細胞の炎症応答において重要な役割をはたしていることから、ピルビン酸は p38 MAPK の活性化を阻害することで炎症性メディエーターの産生を抑制している可能性が考えられた。

## 第 2 章 UVB 照射による皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用

UVB により誘導される皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用を HaCaT 細胞および HR-1 ヘアレスマウスの UVB 照射炎症モデルを用いて調べた。HaCaT 細胞に UVB を照射後、芳香族ピルビン酸を含有する培地で培養した結果、芳香族ピルビン酸はピルビン酸よりも強く、細胞の生存を高めることがわかった。芳香族ピルビン酸は UVB により誘導される IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現を遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで抑制した。また、UVB 照射により誘導される Cox-2 の遺伝子発現およびタンパク質発現は、芳香族ピルビン酸の中でも特にインドール-3-ピルビン酸の添加により強く抑制された。芳香族ピルビン酸は、UVB 照射により誘導される ROS の産生を阻害しなかったが、p38 MAPK のリン酸化を抑制した。このことから芳香族ピルビン酸はピルビン酸と同様に p38 MAPK の活性化を阻害することで、炎症性メディエーターを抑制している可能性が考えられた。HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚に芳香族ピルビン酸を塗布し、UVB を 1 日おきに 2 回照射した。その結果、インドール-3-ピルビン酸の塗布は、皮膚の炎症を抑制し、表皮の壊死を抑制するとともに、経皮水分蒸散

量の上昇を抑制することがわかった。以上から、芳香族ピルビン酸の中でも特にインドール-3-ピルビン酸は、UVB 照射による皮膚の損傷を軽減する薬剤として利用できる可能性があることが明らかになった。

### 第3章 インドール-3-ピルビン酸の腸管炎症抑制作用

いくつかの芳香族炭化水素受容体(AhR)アゴニストは腸管炎症を抑制することが報告されている。また、インドール-3-ピルビン酸や 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は AhR を活性化することが報告されていた。そこで、本研究では芳香族ピルビン酸の AhR 活性化能を調べるとともに、T 細胞移入大腸炎モデルを用いて芳香族ピルビン酸の抗炎症作用と腸管免疫に与える影響を評価した。芳香族ピルビン酸の AhR 活性化能を比較した結果、*in vitro*、*in vivo* ともに、インドール-3-ピルビン酸に最も強い AhR 活性化能を認めた。この結果から想定されたとおり、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取でのみ T 細胞移入大腸炎モデルの腸管炎症が抑制された。T 細胞移入大腸炎モデルでは、interferon (IFN)- $\gamma$  産生を特徴とする T helper type 1 (Th1)細胞が炎症の誘導に関わる一方で、T 細胞由来の IL-10 が炎症を抑制することが報告されている。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は、T 細胞移入大腸炎モデルの大腸において Th1 細胞関連サイトカインの遺伝子発現を抑制し、*Ilio* の遺伝子発現を増加させた。この結果と一致して、インドール-3-ピルビン酸は、大腸粘膜固有層リンパ(LPL)において IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-10<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を減少させる一方で、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を増加させた。インドール-3-ピルビン酸は、IL-10 産生を特徴とする type 1 regulatory T (Tr1)細胞の分化を直接促進する作用を有していたことから、この作用により、IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加した可能性が考えられた。腸管免疫において樹状細胞は、外来の抗原を粘膜固有層から腸間膜リンパ節(MLN)に輸送し、そこで抗原特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答を誘導する。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は、MLN 樹状細胞の CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する IFN- $\gamma$  産生誘導を減弱させ

たことから、大腸 LPL の IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の減少は、この作用により引き起こされた可能性が考えられた。腸管粘膜の樹状細胞は CD103 と CD11b の発現の違いによりサブセットが区別される。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は、MLN 樹状細胞のサブセット構成に影響を与え、CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞を減少させる一方で、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞を増加させた。増加した CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は腸管炎症を改善する作用を有していたことから、インドール-3-ピルビン酸の腸管炎症抑制機構には、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の増加が関係している可能性が考えられた。続いて、インドール-3-ピルビン酸の抗炎症作用における AhR の関与を調べた。AhR アンタゴニストの処理により、インドール-3-ピルビン酸の Tr1 細胞分化の促進作用、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の増加作用、大腸炎抑制作用が解除されることがわかった。以上から、インドール-3-ピルビン酸は AhR を活性化し、腸管免疫を修飾することで、大腸炎症を抑制する能力があることが示された。効果的な AhR 活性化剤であるインドール-3-ピルビン酸は、大腸炎に対する有望な治療薬として利用できる可能性がある。

#### 第 4 章 卵白リゾチームの加熱凝集による *Lactococcus* 属乳酸菌体の IL-12 誘導能の増強

乳酸菌による IL-12 産生の誘導は、生体の T 細胞バランスを改善することでアレルギーを予防できる可能性があることから、重要な指標として利用されている。*Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導における細胞壁の役割を調べる過程で、菌体を卵白リゾチームとともに加熱することで菌体の IL-12 誘導能が増強されることを見出したことから、本研究ではその機構について解析した。免疫蛍光染色の結果から、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体では、卵白リゾチームが菌体周囲を覆うように凝集していることがわかった。*Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株を用い、J774.1 細胞とマウス脾臓細胞の IL-12 産生を調べた結果、J774.1 細胞では 46 菌株中 41 菌株で、マウス脾臓細胞ではすべての菌株で、卵白リゾチ

ームの加熱凝集により IL-12 産生誘導が増強されることがわかった。続いて、卵白リゾチームに加え、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、オボアルブミンの加熱凝集が菌体に与える影響を、J774.1 細胞を用いて検討した。その結果、卵白リゾチームの加熱凝集が最も強く菌体の IL-12 誘導能を高めたが、他のタンパク質の加熱凝集は一部の菌株を除いて IL-12 誘導能を増強できなかった。一方で、卵白リゾチームを含め、タンパク質の菌体への加熱凝集は、菌体の疎水性を高めることで、J774.1 細胞の菌体貪食率を増加させる可能性があることがわかった。J774.1 細胞の *Lactococcus* 属乳酸菌に対する IL-12 産生は貪食阻害剤により劇的に抑制されたことから、IL-12 誘導において貪食は必要不可欠な要素であることが示唆された。タンパク質の加熱凝集が菌体のリゾチーム耐性、マクロファージ消化耐性に与える影響をギムザ染色により調べたところ、卵白リゾチーム特異的にリゾチーム耐性、マクロファージ消化耐性が強化された。リゾチーム阻害剤の添加により J774.1 細胞の加熱死菌体に対する IL-12 産生が増加したことから、卵白リゾチームの加熱凝集による菌体の IL-12 誘導能の増強には、リゾチーム耐性の強化が関係していることが示唆された。以上から、卵白リゾチームの加熱凝集は菌株に関係なく IL-12 を増強できること、さらにこの作用は卵白リゾチーム特異的であることが明らかになった。また、その機構には、菌体の疎水性の増加によるマクロファージ貪食の促進と菌体リゾチーム耐性の強化によるマクロファージ消化耐性の強化が関係している可能性があることが示唆された。

## 第5章 総合討論

本研究では、乳酸菌代謝物である芳香族ピルビン酸のうち、特にインドール-3-ピルビン酸に、皮膚および腸管の炎症を抑制する作用があることを明らかにした。インドール-3-ピルビン酸は化学合成に加え、アミノ酸オキシダーゼやアミノトランスフェラーゼを用いた生合成法が確立されており、薬剤として利用

することができる。一方、食品含量は高くないため、食品成分として機能を期待する場合には乳酸菌による発酵などにより含量を高める必要がある。本研究ではまた、卵白リゾチームの加熱凝集により *Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導能が増強されること、この作用には菌体の疎水性の増加とリゾチーム耐性の強化が関係している可能性があることを明らかにした。本研究で得られた知見は乳酸菌の健康機能を高めることにつながると期待される。

## 略語一覧

<b>AhR</b>	芳香族炭化水素受容体
<b>ARNT</b>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
<b>Bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>Cox-2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>Cyp1A1</b>	シトクロム P450 1A1
<b>DAPI</b>	4',6-diamindino-2-phenylindole
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>DSS</b>	デキストラン硫酸ナトリウム
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EMEM</b>	Eagle's minimal essential medium
<b>FCS</b>	fetal calf serum
<b>FCM buffer</b>	0.05% NaN <sub>3</sub> 、1% FCS phosphate-buffered saline
<b>FICZ</b>	6-ホルミルインドロ[3,2-b]カルバゾール
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate isomer-1
<b>Foxp3</b>	forkhead-box-P3
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>GNF-351</b>	<i>N</i> -(2-(3H-Indol-3-yl)ethyl)-9-isopropyl-2-(5-methyl-3-pyridyl)-7H-purin-6-amine, <i>N</i> -(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-9-isopropyl-2-(5-methylpyridin-3-yl)-9H-purin-6-amine
<b>HBSS</b>	Hanks balanced salt solution
<b>HE</b>	ヘマトキシリン・エオジン
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
<b>IBD</b>	炎症性腸疾患
<b>IFN</b>	interferon

<b>IL</b>	interleukin
<b>ITE</b>	2-(1'H-インドール-3'-カルボニル)-チアゾール-4-カルボン酸 メチルエステル
<b>LPL</b>	粘膜固有層リンパ
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide O55:B5
<b>MAPK</b>	mitogen activated protein kinase
<b>MLN</b>	腸間膜リンパ節
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PGE<sub>2</sub></b>	プロスタグランジン E <sub>2</sub>
<b>ROS</b>	活性酸素
<b>SCID</b>	重症複合免疫不全症
<b>TBST</b>	tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>Th1</b>	T helper type 1
<b>Th17</b>	T helper 17
<b>Th2</b>	T helper type 2
<b>TNBS</b>	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>Tr1</b>	type 1 regulatory T
<b>Treg</b>	regulatory T cell
<b>UV</b>	紫外線

## 序論

### 乳酸菌の健康機能

乳酸菌はグラム陽性細菌で、消費した糖類から 50%以上の乳酸を生産する菌の総称である。乳酸菌はチーズやヨーグルト、漬物などの多くの発酵食品で利用されている(1)。近年、乳酸菌のもつ健康機能に注目が集まってきており、乳酸菌を用いた機能性食品やサプリメントの開発が進められている(2-4)。乳酸菌の健康機能に関わる因子としては、菌体それ自体といくつかの代謝産物が報告されている。

乳酸菌の菌体や菌体成分に関わる機能としては免疫調節作用がよく知られており、抗アレルギー作用や免疫賦活作用などが報告されている(5, 6)。乳酸菌の抗アレルギー作用に関してはいくつかの作用機構が提案されているが、代表的な仮説は interleukin (IL)-12 の産生誘導による T 細胞バランスの改善である(7)。この仮説は次のような機序により説明される。乳酸菌はマクロファージなどに対して IL-12 の産生を誘導する。IL-12 は T helper type 1 (Th1)細胞を強力に分化誘導し、アレルギーの誘導に関わる T helper type 2 (Th2)細胞の応答を抑制するため、アレルギー応答が抑制される。この仮説に従って多くの研究で強い IL-12 誘導能をもつ乳酸菌が選抜されており、実際に選抜された乳酸菌が抗アレルギー作用を示すことが報告されている(8-10)。

一方、乳酸菌の代謝産物に関わる機能としては、抗菌作用や血圧降下作用、抗酸化作用などが報告されている(11-15)。抗菌作用があるものとして、乳酸、バクテリオシン(11)、ロイテリン(12)などがあり、血圧降下作用があるものとしては、ラクトトリペプチド(13)や  $\gamma$ -アミノ酪酸(14)などが報告されている。乳酸菌の抗酸化物質としてはスーパーオキシドジスムターゼなどタンパク質性のものが報告されていたが(16-19)、鈴木らは、乳酸菌の代謝産物である芳香族乳酸に抗酸化作用があることを報告した(15)。芳香族乳酸には角化細胞の炎症反応を抑制する

作用があることもわかっている(20)。

### 芳香族ピルビン酸

芳香族ピルビン酸は構造に芳香環とピルビン酸を有する物質であり、芳香族乳酸よりも強い抗酸化作用を有している(15)。芳香族ピルビン酸は生体では芳香族アミノ酸からアミノ酸オキシダーゼやアミノトランスフェラーゼの反応によって生合成される。フェニルアラニンからフェニルピルビン酸、チロシンから4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、トリプトファンからインドール-3-ピルビン酸がそれぞれ生合成される(図 0-1)。アミノ酸オキシダーゼは、アミノ酸を酸化し  $\alpha$ -ケト酸を産生する酵素であり、副産物として過酸化水素とアンモニアが産生される(21)(図 0-2A)。アミノトランスフェラーゼは、基質となるアミノ酸のアミノ基を  $\alpha$ -ケト酸に移し、別の  $\alpha$ -ケト酸とアミノ酸を生成する酵素群である (図 0-2B)。

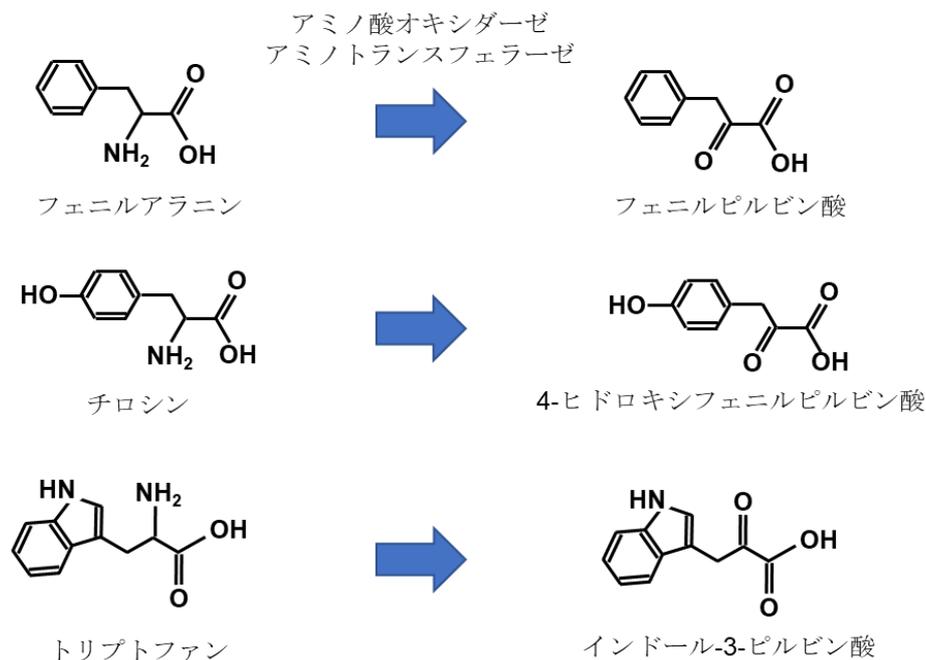


図 0-1 芳香族ピルビン酸

芳香族ピルビン酸は、芳香族アミノ酸からアミノ酸オキシダーゼやアミノトランスフェラーゼにより生合成される。

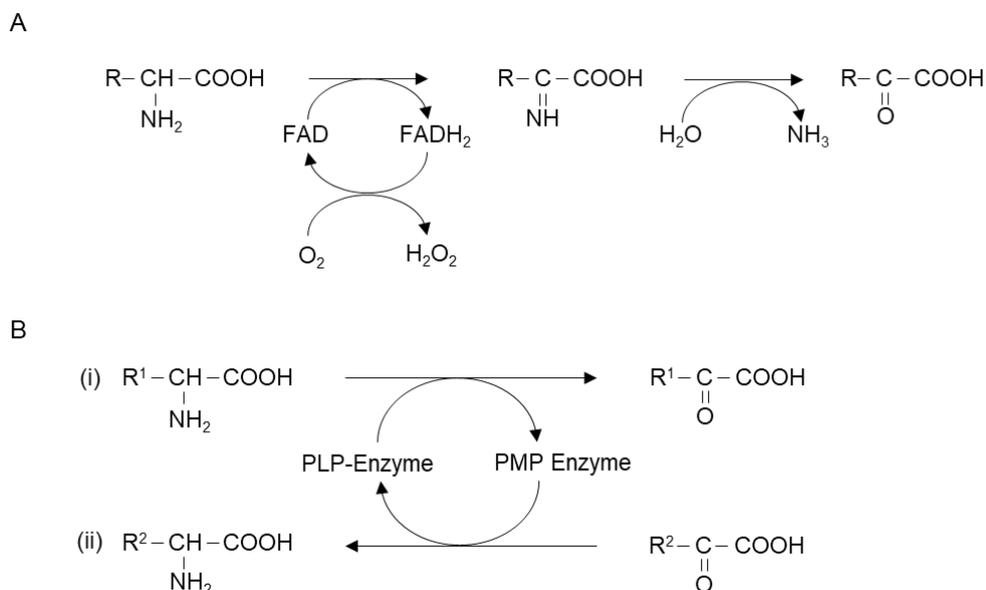


図 0-2 アミノ酸オキシダーゼとアミノトランスフェラーゼの反応スキーム

(A) アミノ酸オキシダーゼは、フラビンアデニンヌクレオチド(FAD)を補酵素とし、L-アミノ酸を酸化する酵素である。L-アミノ酸から $\alpha$ -イミノ酸を反応中間体として $\alpha$ -ケト酸を産生し、副産物として過酸化水素およびアンモニアを産生する。図は文献 21 を参考に改変。(B) アミノトランスフェラーゼはアミノ酸のアミノ基を $\alpha$ -ケト酸に移し、別の $\alpha$ -ケト酸とアミノ酸を生成する酵素である。酵素反応はピンポンバイバイ機構で行われ、2 段階の反応で構成される。最初の反応(i)では、酵素はピリドキサルリン酸(PLP)と複合体を形成し、アミノ酸( $R^1CHNH_2COOH$ )と反応して、 $\alpha$ -ケト酸( $R^1COCO$ )とピリドキサミンリン酸(PMP)を生成する。後半の反応(ii)では、別の $\alpha$ -ケト酸( $R^2COCO$ )と PMP から(i)と逆向きの反応により、アミノ酸( $R^2CHNH_2COOH$ )を生成し、元の PLP と酵素の複合体を再生する。

乳酸菌は芳香族ピルビン酸を経由して、芳香族アミノ酸から芳香族乳酸を生合成していると考えられている(15, 22, 23)。チーズに用いられる乳酸菌の破碎液は、アミノトランスフェラーゼの反応により芳香族アミノ酸から芳香族ピルビン酸を生合成すること、乳酸菌が芳香族ピルビン酸から芳香族乳酸を産生することが報告されている(22)。また実際に、チーズ中に芳香族乳酸が含まれること、パルメザンチーズには芳香族乳酸に加え、芳香族ピルビン酸が多く含まれることがわかっている(24)。加えて、一部の乳酸菌は芳香族ピルビン酸を培地中に産生することもわかっている(24)。乳酸菌によるこのような芳香族アミノ酸の代謝はチーズフレーバーの生成に寄与していると考えられている。

フェニルピルビン酸は、ヒトでは脳の発達障害を引き起こすフェニルケトン尿症のマーカーとして知られる。フェニルケトン尿症はフェニルアラニンの代謝異常疾患であり、フェニルアラニン水酸化酵素の遺伝子異常などによりフェニルアラニンからチロシンへの代謝が障害され、フェニルアラニンが体内に蓄積し障害を引き起こすとともに、尿中にフェニルピルビン酸などが大量に排出される(25)。フェニルピルビン酸の病態における役割は不明であるものの、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの阻害や、ピルビン酸キナーゼおよびヘキソキナーゼの阻害など、いくつか病態に関わると考えられる生理作用が報告されている(26)。一方で、フェニルピルビン酸の健康機能に関してはこれまでのところ報告がない。

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は、ヒトでは III 型高チロシン血症のマーカーとして知られる。III 型高チロシン血症はチロシンの代謝異常疾患であり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼの遺伝子異常により、チロシンの代謝が阻害され体内のチロシンが増加するとともに、尿中に 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸やその代謝物質が大量に排出される(27)。III 型高チロシン血症は、精神遅滞などに関連する可能性があるものの臨床症状は明確になっていない。病態があいまいであることから、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸が生体に悪影響をあたえているかどうかは不明である。一方で 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の健康機能に関する研究についてはいくつか報告がある。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は出血性ショック状態のラットの生存期間を延長すること、ミトコンドリアの呼吸を促進するとともにミトコンドリアにおける活性酸素の産生を抑制することが報告されている(28)。また、マクロファージの炎症応答を抑制する作用があることも報告されている(29)。加えて、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は水溶液中で反応して芳香族炭化水素受容体(AhR)のアゴニストを形成することが報告されている(30)。

インドール-3-ピルビン酸はトリプトファンから脱アミノ反応により生合成される。生体におけるトリプトファンの代謝経路は複数知られており、他にキヌレ

ニン経路やセロトニン経路などが存在するが、これらは免疫系や神経系において重要な役割をはたしていることがわかっている(31)。一方でインドール-3-ピルビン酸の健康機能に関する研究も複数行われている。インドール-3-ピルビン酸は脳における酸化的な細胞傷害に対して保護作用があることが報告されており(32)、ラットの一過性前脳虚血後の線条体の損傷を減少させる作用があることが報告されている(33)。また、インドール-3-ピルビン酸は睡眠障害を改善し(34)、ヒトの不安を抑える作用があることも示唆されている(35)。加えて、インドール-3-ピルビン酸は4-ヒドロキシフェニルピルビン酸と同じく、水溶液中で反応してAhR アゴニストを生成することが報告されている(30)。

## 皮膚と紫外線

皮膚は表皮と真皮から構成される(図 0-3A)。表皮は皮膚においてバリアの役割をはたしており、皮膚からの水分の蒸散を防いでいる。表皮のほとんどは角化細胞から形成されており、真皮と接する基底層で分裂し、皮膚表面に向かうにつれ分化が進む構造になっている。角化細胞は分化が進む過程で細胞間脂質により強固な集合体となって皮膚表面で角質層を形成する。皮膚のバリア機能はこの角質層の完全性により保たれている。一方、真皮は、その大部分が線維芽細胞とそれが産生するコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸からなる。これらの線維により皮膚の弾力や保水力が保たれている。

紫外線(UV)はその波長により UVA (315-400 nm)、UVB (280-315 nm)、UVC (280 nm 未満)に分類される。太陽光に含まれる UV のうち UVC はオゾン層により大気を通過できないが、UVA および UVB は地表に到達する。UVA は真皮まで届きしわやシミの原因となる一方、UVB は表皮に深刻な損傷を引き起こし、紅斑や水疱の形成を伴う日焼け(サンバーン)の主要な原因となる。UVB は表皮角化細胞の DNA にダメージを与え、アポトーシスを誘導するとともに、炎症反応を誘導する(36-38) (図 0-3B)。また、UVB は表皮角化細胞の増殖と表皮の肥厚を誘導

し、表皮のバリア機能を低下させる(37, 39) (図 0-3B)。UVB に対する慢性的な暴露は皮膚の光老化を促進するだけでなく、皮膚がんとなるリスクを高める(40, 41)。

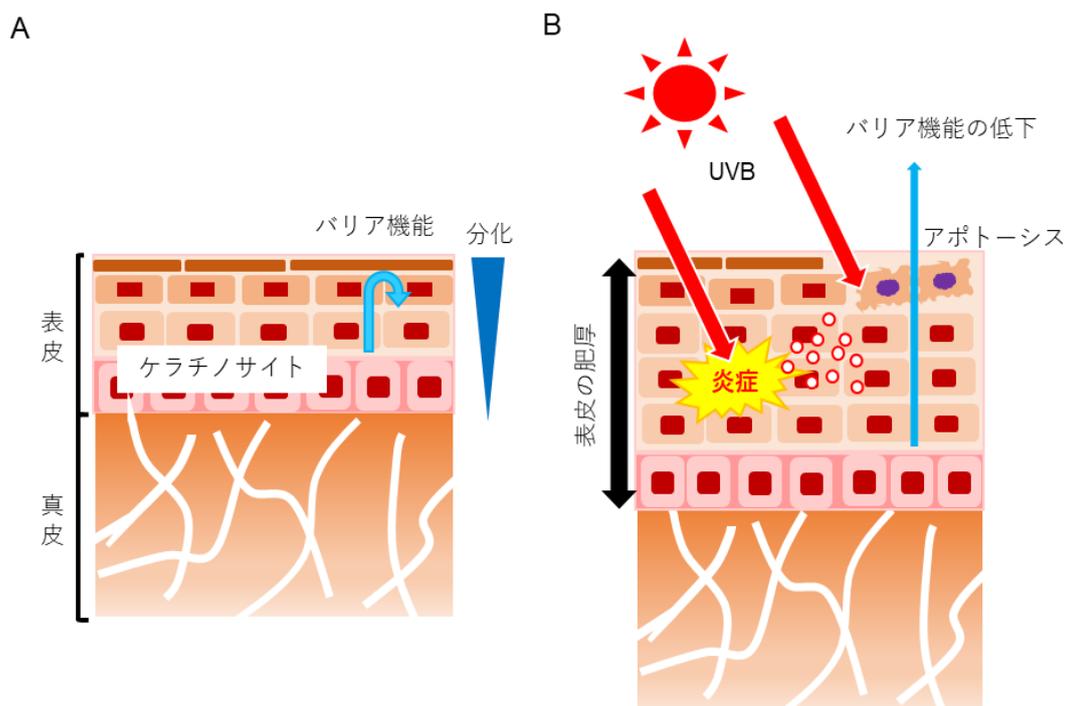


図 0-3 皮膚と UV

(A) 皮膚は表皮と真皮から構成される。表皮は角化細胞から形成されており、真皮と接する基底層で分裂し、皮膚表面に向かうにつれ分化が進む。表皮はバリアの役割をはたしており、水分の蒸散を防いでいる。(B) UVB 照射は表皮角化細胞の DNA にダメージを与え、アポトーシスを誘導し、表皮のバリア機能を低下させるとともに、炎症反応を誘導し、表皮角化細胞の増殖と表皮の肥厚を誘導する。

### UVB に対する角化細胞の応答

UVB による表皮角化細胞の損傷には、DNA ダメージによる直接的なものと活性酸素(ROS)の発生による間接的なものがある(図 0-4)。UVB により誘導される ROS は mitogen activated protein kinase (MAPK)シグナルパスウェイを活性化することで皮膚のアポトーシスや炎症反応などの一連のカスケードを誘導する(36,

40, 42, 43) (図 0-4)。このため、抗酸化剤や ROS 産生を阻害する薬剤は、UVB により誘導される組織的な損傷を減少させることができる。皮膚にはスーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼなどの抗酸化酵素、また、 $\alpha$ -トコフェロール、コエンザイム Q10、アスコルビン酸、カロテノイドなどの非酵素的抗酸化剤が含まれているが、高レベルの UVB 照射は皮膚の抗酸化能力を超えてしまうため、皮膚組織に損傷が生じると考えられる。抗酸化物質であるカロテノイド、グルタチオン、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールなどは UVB による皮膚傷害を予防または軽減する(42, 44, 45)。抗酸化剤の投与は UVB により誘導される皮膚の損傷を減らし、最終的に皮膚がんを予防できることが示されている(46, 47)。

UVB により誘導される炎症性サイトカインやプロスタグランジンなどの炎症性メディエーターは炎症、紅斑、過剰増殖、発がんなどの皮膚反応を引き起こす。炎症性サイトカインの一つである IL-6 は UVB 照射により角化細胞から分泌され、角化細胞の過剰な増殖を引き起こす(48)。また、IL-1 $\beta$  は角化細胞において不活性前駆体として恒常的に発現しているが、UV 照射により発現が上昇するとともに、caspase-1 の切断によって活性化型に変換される(49)。活性化型の IL-1 $\beta$  は IL-6 の強力な誘導物質であることが知られている。Cyclooxygenase-2 (Cox-2)は皮膚に存在する主要なプロスタグランジンであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の生合成に関わる律速酵素であり、UVB による皮膚の炎症反応や発がんにおいて非常に重要な役割をはたしている(50)。Cox-2 の選択的阻害剤は、UVB 照射により誘導される表皮角化細胞の DNA の酸化的なダメージを減らし、皮膚の紅斑、炎症反応を抑制するとともに、皮膚のがん化を抑制することが報告されている(51-53)。加えて、Cox-2 のヘテロノックアウトマウスでは UVB 照射による表皮角化細胞の増殖が抑制されるとともに、皮膚のがん化が抑制されることが報告されている(54)。また逆に、Cox-2 を過剰発現するマウスでは UVB 照射により誘導される皮膚のがん化が促進されることが示されている(54)。

MAPK はセリン/スレオニンキナーゼファミリーに属し、様々な細胞外のシグナルに対して、保存されているスレオニン残基およびチロシン残基の両方をリン酸化することで、シグナルカスケードを活性化する。このうち、p38 MAPK は主にストレスシグナルに対する細胞応答に関与しており、UVB 照射により誘導される角化細胞の炎症反応やアポトーシスにおいて重要な役割をはたしている(図 0-4)。UVB 照射は角化細胞の p38 MAPK を強力にかつ持続的に活性化し、Cox-2 をはじめとする炎症性メディエーターを誘導する(42, 55, 56)。また、p38 MAPK は、UVB 照射時にアポトーシス誘導因子である Bcl-2-associated X protein (**Bax**) を介して、角化細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている(57)。p38 MAPK 阻害剤は、UVB 照射によるマウス表皮のアポトーシスや炎症を抑制することが示されている(58, 59)。

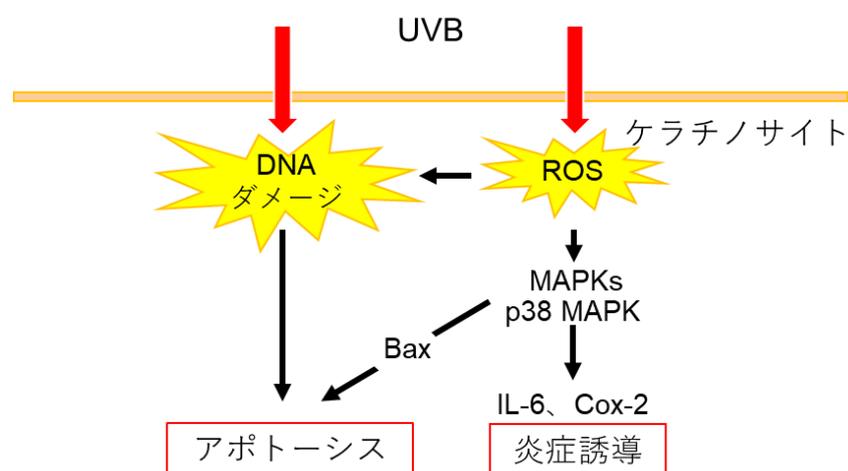


図 0-4 UVB 照射に対する表皮角化細胞の応答

UVB は角化細胞の DNA に直接ダメージを与えると同時に、細胞内に ROS を発生させる。UVB により生成した ROS は MAPKs を活性化することで皮膚のアポトーシスや炎症反応などの一連のカスケードを誘導する。MAPK の中でも p38 MAPK は特に重要な役割をはたしており、角化細胞に対して IL-6、Cox-2 などの炎症性メディエーターの産生を誘導するとともに、Bax を介してアポトーシスを誘導する。図は文献 36 を参考に改変。

## 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患(**IBD**)はクローン病および潰瘍性大腸炎からなる疾患であり、遺伝的感受性、腸内細菌叢、そのほかの環境要因、および免疫系に依存する複雑な多因性疾患である(60)。近年の研究により、**IBD**は腸内細菌叢の成分に対する過剰な免疫反応の結果生じることが示唆されている(60-62)。国内において潰瘍性大腸炎の患者は、1970年代まで殆ど報告がなかったが、ここ20年で急増し、2008年には特定疾患医療受給者証交付人数が10万人を突破している。**IBD**は、寛解と再燃を繰り返すことが多い慢性的な疾患であり、根治療法は確立されていない。このため、**IBD**に対する一般的な治療戦略は、腸管における異常な免疫応答を抑制し寛解を導入すること、そして、長期に寛解を維持することである。寛解導入の第1選択薬としては5-アミノサリチル酸が用いられる。5-アミノサリチル酸は活性酸素除去作用や、抗炎症作用を有するため寛解導入だけでなく寛解維持薬としても用いられる。しかし、5%程度のヒトに副作用が発現することや、寛解維持治療を行っていても炎症が再燃する症例がある。コルチコステロイドは、免疫を強力に抑制するため、5-アミノサリチル酸で改善しない場合や炎症が中程度以上の場合に用いられることが多い。コルチコステロイドは寛解導入に対しては有効であるが、重篤な副作用が多く、長期の寛解維持効果が乏しいため、寛解導入後は減量して最終的に中止することが基本となる。免疫抑制剤(6-メルカプトプリン、アザチオプリン)はコルチコステロイド依存的な症状、つまりコルチコステロイドの減量に伴って炎症が再燃する場合に用いられる。難治性の症例に比較的高い効果を示すが、これらを使用しても炎症が再燃することがある。また、副作用として血液障害や感染症などのおそれがある。最近では、抗体医薬品が開発されており、**IBD**患者にとって大きな臨床的利益をもたらしている(63)。しかしながら、抗体医薬品は免疫原性を有するため、その使用が制限される可能性がある(64)。このため、**IBD**に対しては、毒性がなく持続的に寛容状態を維持することができる治療法が必要とされている。

## IBD と免疫系

動物モデルを用いた検討などから、IBD では、腸内細菌に対する自然免疫系の不適切な応答により炎症性サイトカインなどが産生され、獲得免疫系による炎症反応が促進されることで、大腸炎症が誘導されると考えられている(図 0-5)。実際、獲得免疫系において司令塔の役割をはたしている helper T 細胞(CD4<sup>+</sup> T 細胞)が腸管炎症において重要な役割を担っていることが判明している。IBD の動物モデルとしては、T 細胞移入大腸炎モデル、IL-10 欠損マウスを用いた大腸炎モデル、2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)の経直腸投与により誘導される大腸炎モデル、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の経口投与により誘導される大腸炎モデルなどが用いられている。T 細胞移入大腸炎モデルは、重症複合免疫不全症(SCID)マウスや RAG2 欠損マウスといった免疫不全マウスに、CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞または naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入することにより大腸炎症が誘導されるモデルである。これらの大腸炎モデルでは細胞性免疫を司る Th1 細胞が腸管炎症の誘導に深く関わっていることがわかっている。例えば、T 細胞移入大腸炎モデルでは、大腸の粘膜固有層リンパ(LPL)において Th1 細胞が増加すること、さらに Th1 細胞が産生する interferon (IFN)- $\gamma$  や tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  に対する中和抗体の投与により腸管炎症が抑制されることが報告されている(65)。IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の中和抗体の同時投与は、DSS 誘導性の腸管炎症に対しても効果を発揮する(66)。加えて IFN- $\gamma$  欠損マウス由来の T 細胞の移入は免疫不全マウスに腸管炎症を誘導しないこと(67)、IFN- $\gamma$  欠損マウスでは DSS を投与しても腸管炎症が誘導されないことが報告されている(68)。さらに、Th1 細胞分化を誘導するサイトカインである IL-12 に対する中和抗体の投与は、TNBS 誘導性大腸炎モデルや IL-10 欠損マウスにおいて、LPL における Th1 細胞の増加を抑え、腸管炎症を抑制することが報告されている(69, 70)。ヒトの IBD 患者においては、クローン病患者の LPL 細胞の IFN- $\gamma$  産生が高いことがわかっており(71)、クローン病患者に対する IL-12 や IFN- $\gamma$  の中和抗体を用い

た臨床試験が進められている(72-75)。

炎症性サイトカインは IBD の病原性において中心的な役割をはたしており、IBD の治療においても重要なターゲットとなっている。現在のところ IBD に対する最も効果的な治療薬は TNF- $\alpha$  に対する中和抗体である(76)。Th1 細胞だけでなくマクロファージなどの自然免疫系の細胞も TNF- $\alpha$  の産生源であり(77)、潰瘍性大腸炎ではマクロファージに、クローン病では粘膜固有層の細胞全体に TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞が分布する(78)。TNF- $\alpha$  の中和抗体の投与は T 細胞移入大腸炎モデルだけでなく(65)、TNBS 誘導性大腸炎や IL-10 欠損マウスの腸管炎症に対しても抑制効果を発揮する(79, 80)。TNF- $\alpha$  中和抗体が IBD に対して治療効果を示す機序としては、腸管上皮細胞のアポトーシス抑制や、T 細胞や活性化単球に対するアポトーシス誘導が関係していると考えられている(81, 82)。

IL-6 は IL-6R と gp130 を介して細胞にシグナルを伝達する炎症性サイトカインである。IBD 患者の粘膜では IL-6 産生が増加していることがわかっている(83)。DSS 誘導性大腸炎モデルでは IL-6 の欠損により腸管炎症が軽減されることが報告されている(84)。また、IL-6R に対する抗体や gp130-Fc デコイによる IL-6 シグナリングの阻害は、T 細胞移入大腸炎や、IL-10 欠損マウス、TNBS 誘導性大腸炎モデルの腸管炎症を抑制することが報告されており(83, 85)、これらは T 細胞の生存や活性化を阻害することで腸管炎症を抑制すると考えられている(83, 85)。これらのことから、クローン病患者に対する IL-6R に対する抗体を用いた臨床試験が進められている(86, 87)。

IL-1 $\beta$  は IL-6 を強力に誘導する作用があるサイトカインであり、炎症において重要な役割をはたしていると考えられている(88)。IBD 患者の粘膜由来の単核球は高い IL-1 $\beta$  産生能を有することが報告されている(89)。また、IL-1 は好中球を遊走させる IL-8 を誘導する作用があるが(90)、IBD 患者の大腸では IL-1 $\beta$  と IL-8 の高い相関が報告されており(91)、IBD において IL-1 $\beta$  が IL-8 の発現誘導を介して好中球の浸潤を促進し、炎症を誘導する可能性が示唆されている。

T helper 17 (Th17)細胞は自己免疫疾患の病態に深く関わっている helper T 細胞である。Th17 細胞は IL-17 の産生を特徴とし、IL-1 $\beta$  や IL-6 および transforming growth factor (TGF)- $\beta$  存在下で分化が誘導され、IL-23 により維持される(92-94)。Th17 細胞は腸管粘膜においては感染防御を担っており(95)、腸管免疫における主要なプレーヤーであると考えられているが、IBD の病態における役割についてははっきりしていない。Th17 細胞の維持・増殖に関わる IL-23 は大腸炎の増悪因子であることを示す報告が複数ある一方で(96-98)、逆に大腸炎の抑制に関わっていることを示す報告もある(99)。また、Th17 が産生する IL-17 については、大腸炎を促進するという報告と抑制するという報告の両方が混在している(100-104)。Th17 細胞は、生体内で Th1 細胞に変換されることで大腸炎症を誘導することを示唆する報告もある(105, 106)。

抗炎症性のサイトカインである IL-10 は大腸の恒常性に重要な役割をはたしていることが良く知られている。例えば、前述した IBD モデルの IL-10 欠損マウスでは、自発的に大腸に慢性的な炎症が生じる(107)。また、IL-10 レセプターを欠損するマウスでも慢性的な大腸炎が生じることが報告されている(108)。このため、IL-10 は IBD に対する治療剤として利用できる可能性がある。実際、ヒトへの応用には至っていないものの、IL-10 を産生するよう設計された *Lactococcus lactis* の投与が、DSS 誘導性大腸炎モデルや IL-10 欠損マウスの腸管炎症を抑制することが報告されている(109)。さまざまな免疫細胞が IL-10 を産生するが、腸管炎症においては特に T 細胞由来の IL-10 の重要性が示唆されている。SCID マウスに CD45RB<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入する T 細胞移入大腸モデルでは、CD45RB<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を同時移入することによりその発症が予防されるが、その効果は IL-10 欠損マウス由来の CD45RB<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の移入では認められないことが報告されている(110)。また、T 細胞特異的に IL-10 を欠損するマウスでは、IL-10 欠損マウスと同じように自然に大腸炎を発症するが(111)、マクロファージ特異的に IL-10 を欠損するマウスでは大腸炎は自然発症しない

ことが報告されている(112)。腸管は IL-10 産生 T 細胞を誘導するユニークな部位であり(113)、forkhead-box-P3 (**Foxp3**)<sup>+</sup> regulatory T cell (**Treg**)や type 1 regulatory T (**Tr1**)細胞が IL-10 を産生している(114)。Foxp3<sup>+</sup> Treg 由来の IL-10 については、Foxp3<sup>+</sup> Treg 特異的に IL-10 を欠損するマウスで大腸炎が自然に発症することから、その重要性が示されている(115)。一方、Tr1 細胞については、その移入により T 細胞移入大腸炎モデルの腸管炎症を抑制できることが示され(116)、Tr1 細胞を用いた IBD 患者に対する臨床試験が進められている(117)。また、*Bifidobacterium breve* はマウスの大腸粘膜において Tr1 細胞を誘導することで大腸炎を予防することが報告されている(118)。したがって、大腸粘膜において IL-10 産生 T 細胞を誘導するような食品成分は、炎症性腸疾患の予防や治療に利用できる可能性がある。

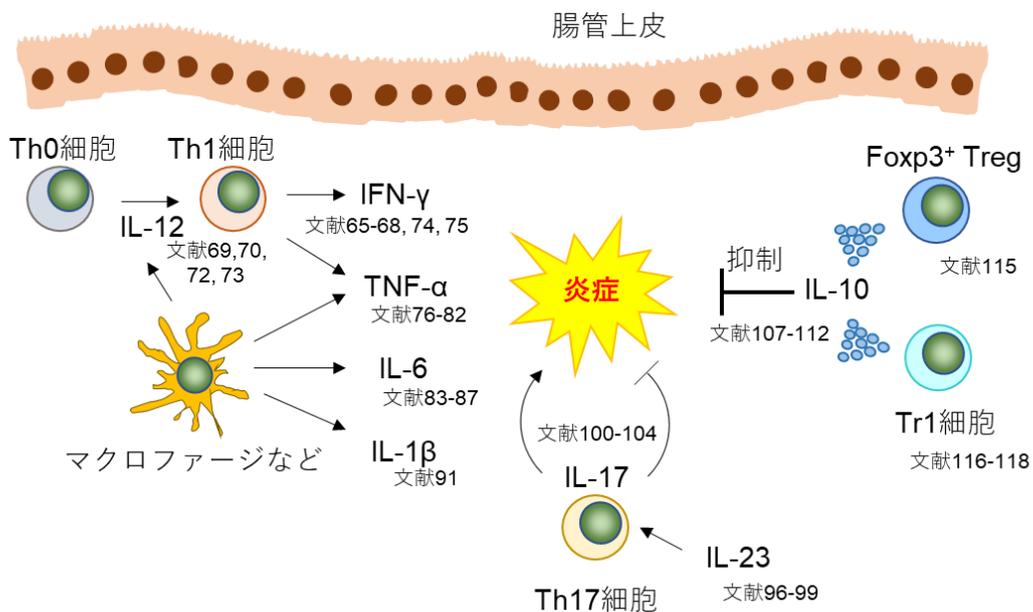


図 0-5 腸管炎症とサイトカイン

Th1 細胞は腸管炎症の誘導に深く関わっており、Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$ 、Th1 細胞分化を誘導する IL-12 は腸管炎症の誘導に関わる重要なサイトカインである。また、マクロファージなどから産生される炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  や IL-6 も炎症の誘導に関わっている。Th17 細胞は腸管炎症を促進するという報告と抑制するという報告の両方が混在している。一方、Foxp3<sup>+</sup> Treg や Tr1 細胞から産生される IL-10 は腸管炎症を抑制する作用がある。

## 腸管粘膜の樹状細胞

抗原提示細胞は自己の細胞表面の MHC クラス II 分子に外来抗原を提示することで、CD4<sup>+</sup> T 細胞を活性化することができる細胞である。抗原提示細胞の一つである樹状細胞は、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞からエフェクターT 細胞への分化を促すことができる細胞であり、CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化誘導を介して免疫反応と免疫寛容のバランスを決めている。腸管粘膜における樹状細胞の主要な役割は、外来の抗原を粘膜固有層から腸間膜リンパ節(MLN)に輸送し、抗原特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答を誘導することである(図 0-6A)。腸管粘膜の樹状細胞は定常状態では低応答性であり、腸内細菌由来の抗原や食餌抗原に対して免疫寛容を誘導している。樹状細胞はマウスでは CD11c の発現をマーカーとして識別される。腸管免疫の樹状細胞はさらに CD103 と CD11b の発現の違いによりサブセットが区別され、それぞれ異なるタイプの免疫応答を誘導すると考えられている(図 0-6B)。CD103<sup>-</sup>樹状細胞は高い炎症性を有していることがわかっている(119, 120)。腸管免疫における CD103<sup>-</sup>樹状細胞は主に CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞で構成され、Th1 細胞と Th17 細胞の分化誘導に関わっている(121-123)。一方、CD103<sup>+</sup>樹状細胞は、T 細胞に免疫寛容や腸管へのホーミングを誘導することで腸管免疫の恒常性維持に関わっていると考えられている(124)。CD103<sup>+</sup>樹状細胞は CD11b の発現の違いにより、さらに 2 つのサブセットに分けられ、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞は Th17 細胞や Foxp3<sup>+</sup> Treg の発生に関係していることがわかっている(125-128)。CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は CD8<sup>+</sup> T 細胞に抗原をクロスプレゼンテーションするユニークな細胞であり(129)、Th1 細胞分化を誘導することが報告されている。また、MLN の CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の一部のサブセットは Foxp3<sup>+</sup> Treg を誘導する作用があることが報告されている(130)。樹状細胞サブセットと腸管炎症の関係も研究されており、急性の大腸炎を誘導したマウスの MLN では、CD103<sup>-</sup>樹状細胞が増加し、CD103<sup>+</sup>樹状細胞が減少すること、さらに、MLN CD103<sup>-</sup>樹状細胞の移入は大腸炎を悪化させるが、MLN CD103<sup>+</sup>樹状細胞の移入は悪化させないことが報告されて

いる(131)。また、 $CD103^+ CD11b^+$ 樹状細胞を欠く組換えマウスでは DSS 誘導性大腸炎の悪化は認められない一方で、 $CD103^+ CD11b^-$ 樹状細胞を欠く組換えマウスでは DSS 誘導性大腸炎が悪化することが報告されている(132)。これらの知見は、樹状細胞サブセットの構成の違いが腸管炎症の進展に大きく影響することを示唆している。

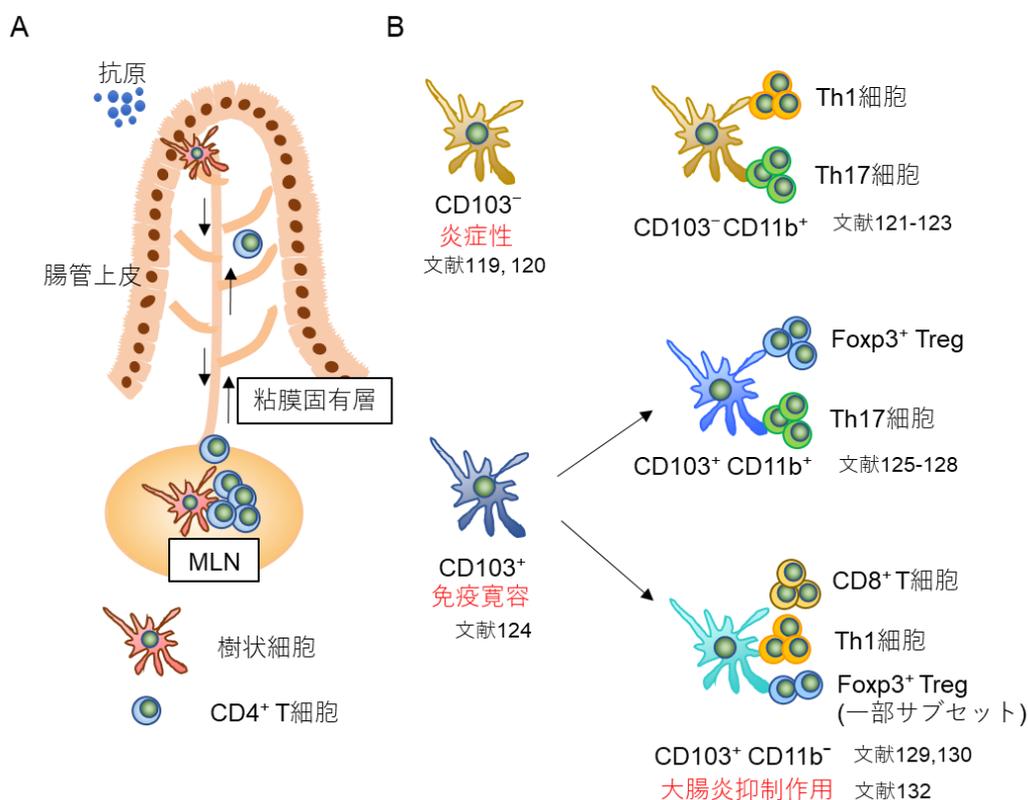


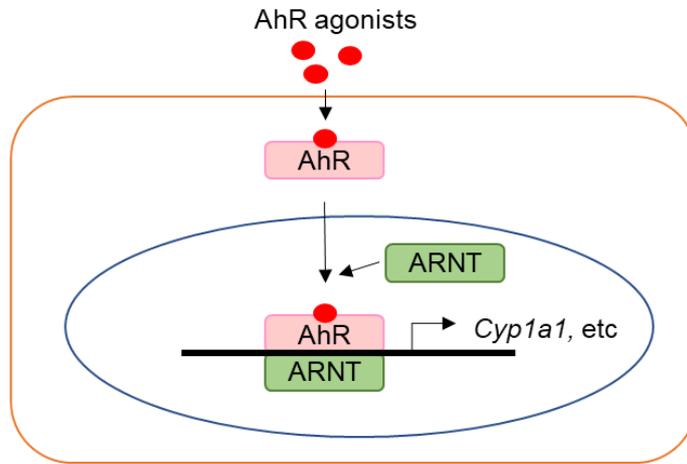
図 0-6 腸管免疫の樹状細胞

(A) 腸管粘膜の樹状細胞は、外来の抗原を粘膜固有層から MLN に輸送し、抗原特異的な  $CD4^+$  T 細胞の応答を誘導する。(B) 腸管免疫の樹状細胞は  $CD103$  と  $CD11b$  の発現の違いによりサブセットが区別される。 $CD103^-$ 樹状細胞は高い炎症性を有していると考えられている。 $CD103^-$ 樹状細胞は主に  $CD103^- CD11b^+$ 樹状細胞で構成され、Th1 細胞と Th17 細胞を分化誘導する作用がある。 $CD103^+$ 樹状細胞は免疫寛容を誘導すると考えられている。 $CD103^+$ 樹状細胞は  $CD11b$  の発現の違いにより、2 つのサブセットに分けられる。 $CD103^+ CD11b^+$ 樹状細胞は Th17 細胞や Foxp3<sup>+</sup> Treg を誘導する作用がある。 $CD103^+ CD11b^-$ 樹状細胞は  $CD8^+$  T 細胞に抗原をクロスプレゼンテーションするとともに、Th1 細胞分化を誘導する。 $CD103^+ CD11b^-$ 樹状細胞の一部のサブセットは Foxp3<sup>+</sup> Treg を誘導する作用がある。 $CD103^+ CD11b^-$ 樹状細胞は大腸炎を抑制する作用があることが示唆されている。

## AhR アゴニストの腸管保護作用

AhR はシトクロム P450 1A1 (Cyp1A1)などの解毒酵素を強く誘導するリガンド活性化転写因子であり、有害物質の代謝において重要な役割をはたしている(図 0-7A)。AhR は、当初、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)結合タンパク質として同定されたが(133)、その後の研究により食品および微生物由来の芳香族化合物を含む多くの分子により活性化されることが明らかになってきている(134)。また、近年、いくつかの AhR アゴニストが IBD モデルの腸管炎症を抑制することが報告されており(135-138)、AhR が腸粘膜の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていることもわかってきている(139) (図 0-7B)。TCDD の投与は、Foxp3<sup>+</sup> Treg を増加させることによって、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘発性のマウス大腸炎モデルにおける腸管炎症を抑えることが報告されている(135)。また、毒性が無い AhR アゴニストである 2-(1'-インドール-3'-カルボニル) -チアゾール-4 -カルボン酸メチルエステル(ITE)の投与は、Foxp3<sup>+</sup> Treg を増加させ、さらに CD39、グランザイム B、および IL-10 産生を増加させることでヒト化マウスにおける大腸炎を改善することが報告されている(136)。さらに、トリプトファン由来の AhR アゴニストであるインドール-3-アルデヒドおよび 6-ホルミルインドロ[3,2-b]カルバゾール(FICZ)は、IL-22 の誘導を介してマウスの腸管粘膜を保護することが報告されている(137, 138)。このように、腸管における AhR アゴニストの保護作用については、使用するアゴニストの種類や動物モデルの違いによって異なる作用機構が提唱されている。

A



B

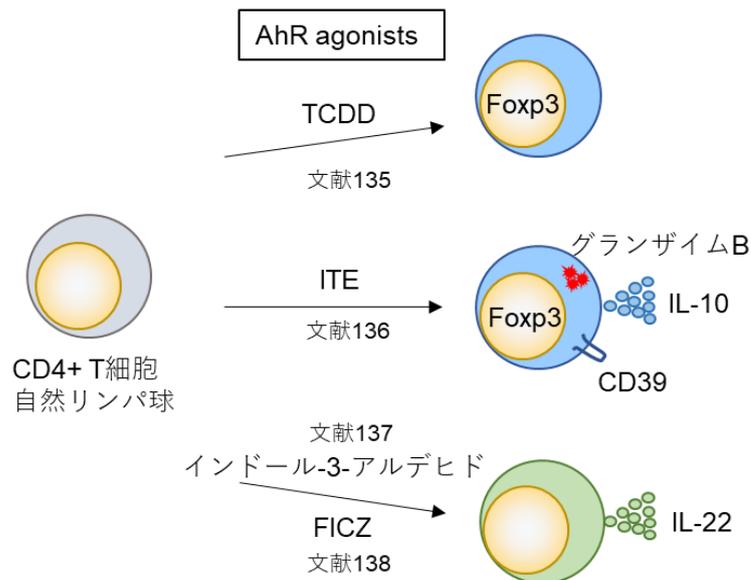


図 0-7 AhR アゴニストの腸管保護作用

(A) AhR はリガンド活性化転写因子であり、アゴニストが結合すると核内移行し、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) とヘテロ 2 量体を形成し、Cyp1A1 などの遺伝子発現を誘導する。図は文献 134 を参考に改変。(B) いくつかの AhR アゴニストの投与は腸管炎症を抑制することが報告されている。TCDD は、Foxp3<sup>+</sup>Treg を増加させることで腸管炎症を抑える。ITE は、Foxp3<sup>+</sup>Treg を増加させ、CD39、グランザイム B、IL-10 産生を増加させることで腸管炎症を抑制する。インドール-3-アルデヒドおよび FICZ は、CD4<sup>+</sup>T 細胞や自然リンパ球の IL-22 の誘導を介して腸管粘膜を保護する。

## 本研究の目的

近年、乳酸菌に様々な健康機能があることが明らかになり、乳酸菌はヨーグルトやチーズといった発酵食品だけでなく、サプリメントや食品への添加など、様々な形で活用されるようになってきた。本研究では乳酸菌の活用をさらに進めるため、乳酸菌代謝物の一つである芳香族ピルビン酸に着目し、その新規機能について検討を行った。また、乳酸菌の免疫調節作用に着目し、その作用の強化機構についても検討を行った。

乳酸菌が産生する芳香族乳酸は抗酸化作用や抗炎症作用があることがわかっている。芳香族乳酸は芳香族アミノ酸から芳香族ピルビン酸を経由して生合成されるが、一部の乳酸菌は芳香族乳酸だけでなく、芳香族ピルビン酸を産生する。芳香族ピルビン酸は芳香族乳酸よりも強い抗酸化作用があり、また、インドール-3-ピルビン酸や 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は AhR を活性化する作用があることがわかっているが、これまでのところ皮膚や腸管において抗炎症作用があるかどうかについてはわかっていなかった。そこで本研究では、第 1 章および第 2 章において、UVB 照射による角化細胞および皮膚の炎症モデルを用いてピルビン酸と芳香族ピルビン酸の抗炎症作用の検討を行った。また、第 3 章では芳香族ピルビン酸の AhR を介した抗炎症作用について、大腸炎症モデルを用いて検討を行った。

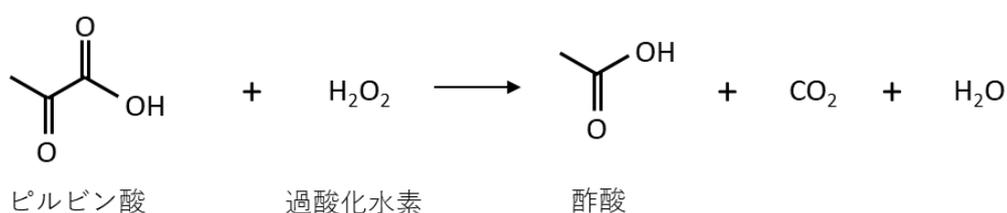
第 4 章では乳酸菌の免疫調節作用として、マクロファージに対する IL-12 誘導に着目した。IL-12 は helper T 細胞のバランスを改善することでアレルギーを予防できる可能性があることから、重要な指標として利用されている。*Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導における細胞壁の役割を調べる過程で、菌体を卵白リゾチームとともに加熱することで、菌体の IL-12 誘導能が増強されることを見出したことから、本研究ではその機構について解析を行った。

## 本論

### 第 1 章 UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞の損傷および炎症反応に対するピルビン酸の防御作用

#### 1-1. 緒言

ピルビン酸は脱炭酸により非酵素的に過酸化水素を還元するため、抗酸化作用があると考えられている(補足図 1-1)。実際、ピルビン酸は骨芽細胞および human umbilical vein endothelial cells における ROS 誘導性の損傷を抑えることが報告されている(140, 141)。加えて、ピルビン酸は *in vitro* および *in vivo* の酸化ストレスモデルにおいて神経保護作用を示すこと(142)、過酸化水素によって誘導される損傷から神経細胞を保護する作用があることが報告されている(143)。これらのことから、ピルビン酸は、酸化的ストレスを減少させることにより、UVB 照射の有害な影響から角化細胞を保護できる可能性がある。本章では、ヒト不死化角化細胞である HaCaT 細胞を用いて、UVB により誘導される角化細胞の応答に対するピルビン酸の効果を調べた。HaCaT 細胞をピルビン酸で処理し、UVB 照射時の細胞生存率、IL-1 $\beta$ 、IL-6 および PGE<sub>2</sub> 産生、Cox-2 発現に対する効果を調べるとともに、UVB により誘導される ROS の産生や p38 MAPK の活性化に対するピルビン酸の効果を調べた。



補足図 1-1 ピルビン酸の抗酸化作用

ピルビン酸は脱炭酸により、非酵素的に過酸化水素を還元する。

## 1-2. 材料および方法

### (1) 試薬類

ピルビン酸は和光純薬(大阪)から購入した。アスコルビン酸ナトリウムはナカライテスク(京都)より購入した。anti-p38 MAPK、anti-phospho p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、horseradish peroxidase (**HRP**)-conjugated anti-rabbit IgG、および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**)に対する抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)から購入した。anti-Cox-2 は BD Biosciences (San Jose, CA, USA) から購入した。HRP-conjugated anti-mouse IgG は Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)から購入した。

### (2) 細胞

HaCaT 細胞は Cell Lines Service (Eppelheim, Germany) から購入した。HaCaT 細胞は 10% fetal calf serum (**FCS**) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、2 mM L-glutamine (Life Technologies)、100 U/ml ペニシリン(Life Technologies)、100 µg/ml ストレプトマイシン(Life Technologies)を含有する high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (**DMEM**)培地(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)で、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。

### (3) ピルビン酸含有培地の調製

ピルビン酸は培地に溶解した後、2 N NaOH で pH を 7.5 に調整した。

### (4) 紫外線照射

HaCaT 細胞を 6 ウェルプレート(BD Biosciences)で培養した。コンフルエントに達したところで培地を除去し、Hanks balanced salt solution (**HBSS**) (Life Technologies)に交換した。培養プレートを、UVB ランプ(三共電気, 神奈川)を取り付けた UV クロスリンカー-CL-1000 (UVP, Upland, CA)に入れ、306 nm をピーク

とする紫外線を 60 mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。紫外線量は UV 計測器 UV-340A (Lutron, aipei, Taiwan)で測定した。照射後、HBSS を除去し、サンプルを含有する新しい培地と交換した。

#### (5) 細胞数の測定

培養後の HaCaT 細胞を 3.5%パラホルムアルデヒド PBS で 10 min 固定した。PBS で洗浄後、0.1%クリスタルバイオレット PBS で染色した。PBS で 2 回洗浄後、細胞に取り込まれた色素を 2 ml の 10%酢酸で溶出し、595 nm の吸光度を測定した。

#### (6) 細胞内 ROS の検出

HaCaT 細胞を 10 μM CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Life Technologies)入りの HBSS で 30 min 処理した。HBSS で 2 回洗浄後、UVB を照射した。DMEM 培地で 37°C、60 min 培養後、トリプシン処理を行い、細胞を回収した。細胞の蛍光(excitation : 488 nm, emission : 525 nm)をフローサイトメーターGallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)により解析した。

#### (7) サイトカインの測定

培養後に培地に産生されたサイトカイン量(IL-1β、IL-6)を enzyme-linked immunosorbent assay (**ELISA**)により測定した。IL-1β、IL-6 は Opt EIA ELISA kit (BD Biosciences)を用いて測定した。

#### (8) プロスタグランジン E<sub>2</sub> の測定

培養後に培地に産生されたプロスタグランジン E<sub>2</sub> は Luminex Prostaglandin E<sub>2</sub> kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)を用いて測定した。

#### (9) Real-time PCR 解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて培養後の HaCaT 細胞から Total RNA を抽出した。Total RNA 1 µg を QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen)を用いて逆転写した。Real-time PCR はライトサイクラーファストスタート DNA マスターSYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland)を用いて、LightCycler 1.5 (Roche)により行った。*Il1b*、*Il6*、*Cox2*、*Gapdh* の発現解析に用いたプライマー配列は表 1 に示す。*Il1b*、*Cox2*、*Gapdh* の PCR は、95°C、10 min で処理した後、変性(95°C、10 sec)、アニーリング(53°C、10 sec)、伸長(72°C、30 sec)を 40 サイクル回すことで行った。*Il6* の PCR は、アニーリングおよび伸長をあわせて 68°C、30 sec で行った。各遺伝子の発現は *Gapdh* の発現により正規化した。

表 1 第 1 章で用いたプライマーリスト

<i>hGapdh</i> forward	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
<i>hGapdh</i> reverse	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>hIl1b</i> forward	AAGCTGATGGCCCTAACAG
<i>hIl1b</i> reverse	AGGTGCATCGTGCACATAAG
<i>hIl6</i> forward	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
<i>hIl6</i> reverse	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
<i>hCox2</i> forward	TGAGCATCTACGGTTTGCTG
<i>hCox2</i> reverse	TGCTTGTCTGGAACAACACTGC

#### (10) ウェスタンブロッティング

培養後の細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、1% NP-40, 5 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液に溶解した。15,000 × g、15 min 遠心後、上清を回収した。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) により測定した。タンパク質 10 µg 分を SDS-PAGE により泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを 5% スキムミルク (和光純薬) 入りの tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST) で 2 hr、室温でブロッッキングした。TBST で洗浄後、一次抗体と反応させた。TBST で洗浄後、HRP で標識した二次抗体と反応させた。TBST で洗浄後、ECL Prime Western blotting detection reagents (GE Healthcare Lifesciences, Buckinghamshire, UK) によりバンドを検出した。

#### (11) 統計解析

2 群間の比較を Student's *t* test により行った。

### 1-3. 結果

#### (1) ピルビン酸は UVB 照射時の HaCaT 細胞の生存率を高める

ピルビン酸の UVB に対する防御作用を調べるため、HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) を照射後、ピルビン酸 (100 mM) を添加した培地で培養した。位相差顕微鏡による観察の結果、UVB 照射 24 hr 後には HaCaT 細胞の多くが培養プレートから剥がれたが、ピルビン酸の添加はそれを抑制した(図 1-1A)。クリスタルバイオレット染色による評価の結果、ピルビン酸の添加は UVB 未照射時の細胞数をわずかに減少させたが、UVB 照射時には細胞生存率を有意に高めることがわかった(図 1-1B)。これらの結果からピルビン酸は UVB により誘導される細胞の損傷に対して防御作用を有していることが明らかになった。

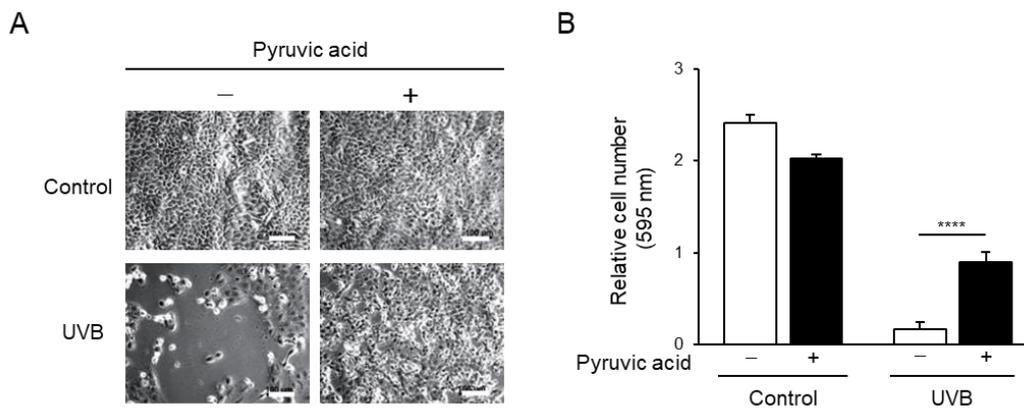


図 1-1 ピルビン酸は UVB 照射時の HaCaT 細胞の生存率を高める

(A, B) HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射後、ピルビン酸(100 mM)存在下、または非存在下で培養した。コントロールとして UVB を照射しない細胞を用意した (Control)。(A) UVB 照射 24 hr 後の HaCaT 細胞の顕微鏡写真。(B) UVB 照射 24 hr 後に、培養プレートに接着する生細胞数をクリスタルバイオレット染色法で測定した。データは平均値±SD で示した。\*\*\*\* $p < 0.0001$  (Student's  $t$  test)。

## (2) UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞内の ROS 産生に対するピルビン酸の効果

ピルビン酸がその抗酸化作用により、UVB 照射による細胞の損傷を防御しているかどうかを調べるため、ROS に反応して蛍光を発する CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いて細胞内の ROS 産生を評価した。その結果、UVB 照射 1 hr 後に HaCa T 細胞内において ROS の顕著な増加を確認したが、ピルビン酸の培地への添加は ROS の産生を抑制しないことがわかった(図 1-2)。このことから、ピルビン酸の紫外線照射に対する防御効果は、ピルビン酸の抗酸化作用を介したものではないことが示唆された。

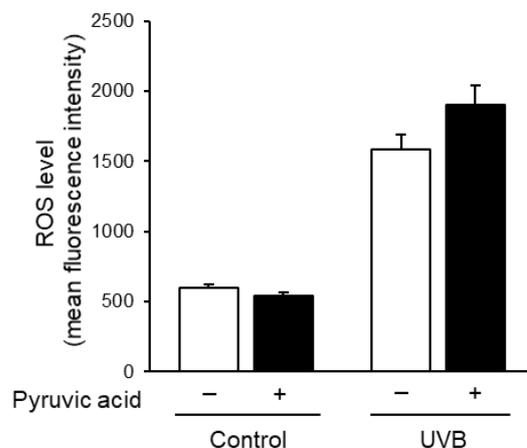


図 1-2 UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞内の ROS に対するピルビン酸の効果

HaCaT 細胞を 10  $\mu$ M の ROS 検出試薬(CM-H<sub>2</sub>DCFDA)を含む HBSS で 30 min 処理した。UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射後、ピルビン酸(100 mM)存在下、または非存在下で 60 min 培養した。コントロールとして UVB を照射しない細胞を用意した(Control)。細胞内 ROS レベルをフローサイトメトリーにより解析した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。

(3) ピルビン酸は UVB 照射により HaCaT 細胞内に誘導される炎症性メディエーターを抑制する

UVB 照射により誘導される炎症性メディエーターに対するピルビン酸の添加効果を調べるため、*Il1b*、*Il6*、*Cox2* の遺伝子発現を Real-time PCR により解析した。*Il1b*、*Il6*、*Cox2* の遺伝子発現は UVB 照射後 6 hr で評価した。その結果、UVB 照射により上昇した *Il1b*、*Il6*、*Cox2* の遺伝子発現が、ピルビン酸の添加により有意に抑制されることが明らかになった(図 1-3)。一方で、UVB 未照射時においてピルビン酸の添加は *Cox2* の遺伝子発現を上昇させた(図 1-3)。

次に、これらの作用がタンパク質レベルでも認められるかどうか確認した。ELISA による測定の結果、UVB 照射 24 hr 後に培地中に産生される IL-1 $\beta$ 、IL-6 はピルビン酸の添加により濃度依存的に抑制されることがわかった(図 1-4)。ピルビン酸の抑制作用は、他の抗酸化物質であるアスコルビン酸に比べて、IL-1 $\beta$  では同程度であったが、IL-6 に関しては少し弱かった(図 1-4)。

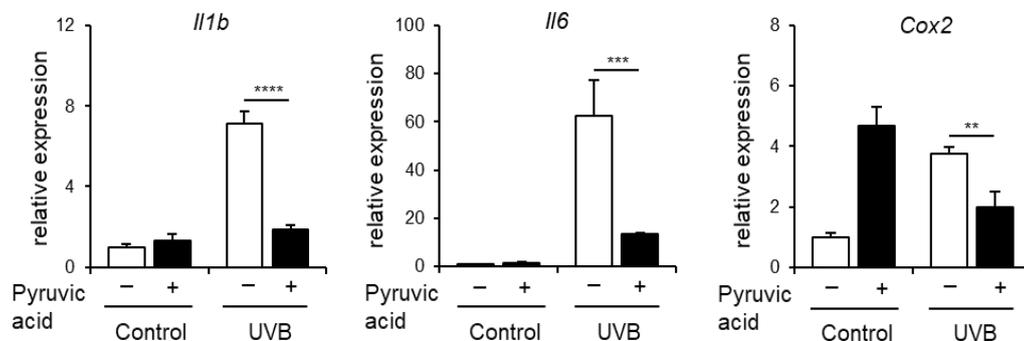


図 1-3 ピルビン酸は UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞の *IL1b*、*IL6*、*Cox2* の遺伝子発現を抑制する

HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射後、ピルビン酸(100 mM)存在下、または非存在下で 6 hr 培養した。コントロールとして UVB を照射しない細胞を用意した (Control)。細胞を回収し、*IL1b*、*IL6*、*Cox2* の遺伝子発現レベルを real-time PCR により解析し、*Gapdh* の発現により正規化した。各細胞の遺伝子発現は、UVB 非照射かつピルビン酸未処理の細胞の遺伝子発現に対する比で示した。また、データは平均値±SD で示した。\*\**p* < 0.01、\*\*\**p* < 0.001、\*\*\*\**p* < 0.0001 (Student's *t* test)。

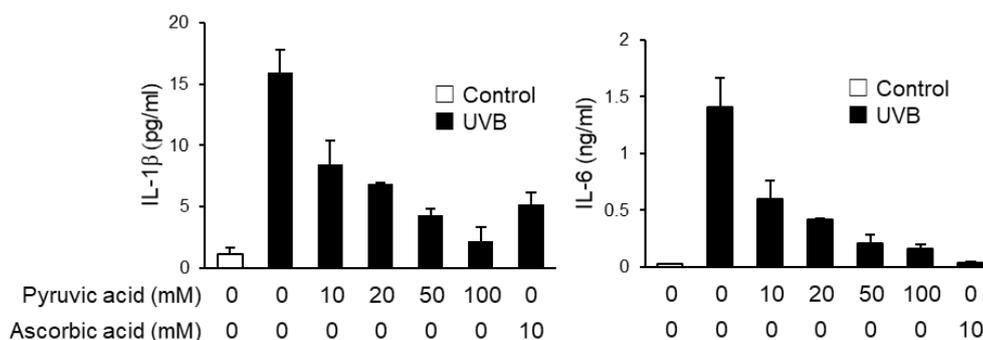


図 1-4 ピルビン酸は UVB 照射により誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制する

HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射後、ピルビン酸を各濃度(0-100 mM)で含有する培地またはアスコルビン酸を 10 mM 含有する培地で 24 hr 培養した。コントロールとして UVB を照射しない細胞を用意した (Control)。培養上清中に産生される IL-1β 量(A)、IL-6 量(B)を ELISA により測定した。データは平均値±SD で示した。

続いて、Cox-2 のタンパク量をウェスタンブロッティング法により評価した。その結果、ピルビン酸は UVB 照射により誘導される Cox-2 の発現を、タンパク質レベルでも抑制することがわかった(図 1-5A)。これらの結果と一致して、ピルビン酸の添加は、UVB 照射時の HaCaT 細胞から産生される PGE<sub>2</sub> 量を有意に抑制した(図 1-5B)。

以上の結果からピルビン酸は UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞の炎症反応を抑制する作用があることがわかった。なお、遺伝子発現の結果とは異なり、UVB 未照射時におけるピルビン酸の添加は、Cox-2 のタンパク質レベルの発現をほとんど誘導せず、PGE<sub>2</sub> の産生も誘導しなかった(図 1-5A, B)。

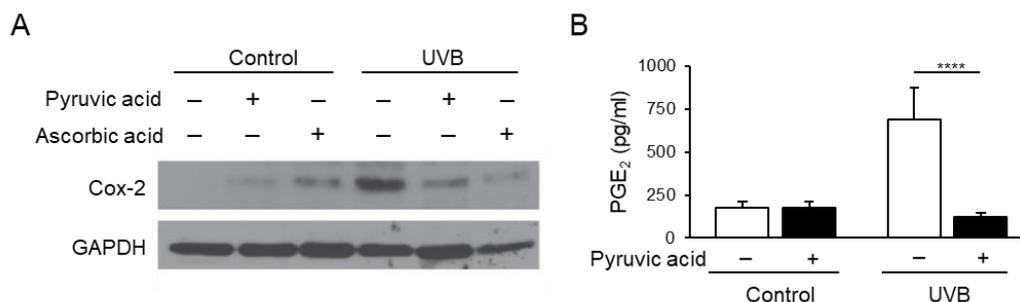


図 1-5 ピルビン酸は UVB 照射により誘導される Cox-2 の発現と PGE<sub>2</sub> 産生を抑制する

(A, B) HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) を照射後、培地、ピルビン酸(100 mM)を含有する培地、またはアスコルビン酸(10 mM)を含有する培地で 24 hr 培養した。コントロールとして UVB を照射しない細胞を用意した(Control)。(A) HaCaT 細胞における Cox-2 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。また、ローディングコントロールとして GAPDH の発現量を調べた。(B) 培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量を Luminex Prostaglandin E2 kit により測定した。データは平均値±SD で示した。\*\*\*\**p* < 0.0001 (Student's *t* test)。

(4) ピルビン酸は UVB 照射により誘導される p38 MAPK の活性化を抑制する

UVB 照射は角化細胞に対して p38 MAPK シグナルパスウェイを活性化することが知られており、p38 MAPK は UVB 照射により誘導される炎症サイトカインや Cox-2 の発現に重要な役割をはたしている。そこで芳香族ピルビン酸の抑制作用における p38 MAPK の関与を調べるため、UVB 照射時の p38 MAPK のリン酸化に与えるピルビン酸の添加効果を調べた。図 1-6 に示すように、UVB 照射により p38 MAPK のリン酸化が誘導されたが、ピルビン酸の添加により p38 MAPK のリン酸化は抑制されることが明らかになった(図 1-6)。

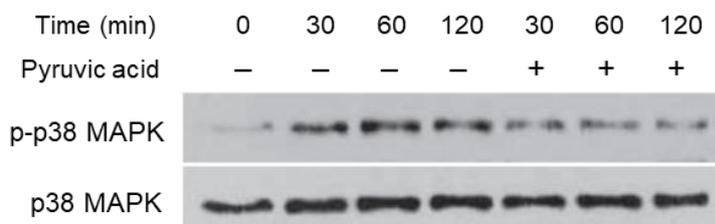


図 1-6 ピルビン酸は UVB 照射による HaCaT 細胞内の p38 MAPK のリン酸化を抑制する

HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) を照射後、ピルビン酸(100 mM)存在下、または非存在下で培養した。HaCaT 細胞における p38 MAPK のリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析した。また、ローディングコントロールとして p38 MAPK の発現量を調べた

#### 1-4. 考察

これまでの研究ではピルビン酸は ROS の除去剤として働き、酸化ストレスにより誘導される細胞死を抑制すると報告されていた(140-142)。しかし、本研究の結果では、予想外に、ピルビン酸は UVB により誘導される細胞内の ROS を抑制しなかった。ROS は UVB により誘導される皮膚の反応において重要な役割を果たしているが、本研究の結果は、UVB による誘導される角化細胞の応答に対して ROS 以外のターゲットがあることを示している。UVB 照射は細胞に対して様々なシグナルを活性化するが、本研究では、ピルビン酸が IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub>

といった炎症性のメディエーターを抑制することを見出した。

UVB 照射により角化細胞で誘導される Cox-2 や IL-6 の発現は p38 MAPK に依存的であることが知られている(36, 55, 56)。本研究ではピルビン酸が UVB 照射時の p38 MAPK の活性化を減弱することを明らかにしたことから、ピルビン酸は p38 MAPK のシグナルパスウェイを不活性化することで炎症性メディエーターの誘導を阻害している可能性が考えられた。p38 MAPK は UVB 照射により誘導される表皮の炎症反応だけでなく、発がんにも関わっていることが示されていることから(144)、ピルビン酸は UVB 照射により誘導される皮膚傷害を予防できる可能性がある。

本研究ではまた、ピルビン酸の添加が UVB 照射時の HaCaT 細胞の生存率を高めることを明らかにした。UVB 照射による HaCaT 細胞のアポトーシスには p38 MAPK が関与しているとの報告があることから(145)、ピルビン酸は p38 MAPK を阻害することで HaCaT 細胞の生存を高めた可能性がある。一方で、UVB 照射による角化細胞のアポトーシス誘導における p38 MAPK の役割に関しては少し論争がある。HaCaT 細胞の場合とは異なり、正常ヒト角化細胞の単層培養では、p38 MAPK は UVB 照射による細胞の損傷に対して保護的な役割を担っていることが報告されている(146)。一方で、正常ヒト角化細胞を用いた 3 次元培養モデルやマウス生体を用いた実験では、p38 MAPK シグナルの抑制により UVB 照射時の角化細胞のアポトーシスが抑制されることが示されている(57, 58, 144)。このため、生体や、より生体に近い状態では、p38 MAPK は UVB 照射による表皮角化細胞のアポトーシス誘導に関わっていると考えられる。

結論として、本研究ではピルビン酸が UVB 照射時の HaCaT 細胞の細胞死や炎症反応を抑制することを明らかにした。ピルビン酸は p38 MAPK のシグナルパスウェイを阻害することにより、UVB による反応を抑制している可能性がある。p38 MAPK は UVB による皮膚の損傷や炎症反応に関わっていることから、ピルビン酸は UVB による皮膚傷害に対する予防剤として利用できる可能性がある。

## 第2章 UVB 照射による皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用

### 2-1. 緒言

前章ではピルビン酸が、UVB により誘導される HaCaT 細胞の細胞死や炎症性メディエーターの産生を抑制することを明らかにした。ピルビン酸の抗炎症作用に関する報告は複数あるが、ピルビン酸の誘導體に関しても抗炎症作用が報告されている。例えば、エチルピルビン酸は抗炎症作用により、腸間膜虚血、急性腹膜炎、腫瘍血管形成などの多くの病態に対して防御的な作用を示すことが知られている(147, 148)。したがって、ピルビン酸を構造に有するものは同様に抗炎症作用を示す可能性がある。本章では、インドール-3-ピルビン酸、フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸といった芳香族ピルビン酸が、ピルビン酸と同様に、UVB 照射により誘導される皮膚の炎症反応および傷害を予防できるかどうかについて検討した。

### 2-2. 材料および方法

#### (1) 試薬類

ピルビン酸、フェニルピルビン酸は和光純薬(大阪)から購入した。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸は Sigma-Aldrich から購入した。使用した抗体類は 1-2 (1)に記載した。

#### (2) 細胞

HaCaT 細胞の培養は 1-2 (2)の方法に従った。

#### (3) ピルビン酸、芳香族ピルビン酸含有培地の調製

ピルビン酸、芳香族ピルビン酸は培地に溶解した後、等モル量の NaOH を添加して中和した。

#### (4) 紫外線照射

HaCaT 細胞に対する紫外線照射は 1-2 (4)の方法に従った。

#### (5) 細胞数の測定

HaCaT 細胞の細胞数の測定は 1-2 (5)のクリスタルバイオレットによる染色法により行った。

#### (6) サイトカインの測定

培養後に培地に産生されたサイトカイン量(IL-1 $\beta$ 、IL-6)を ELISA により測定した。方法は 1-2 (7)に従った。

#### (7) Real-time PCR 解析

培養後の HaCaT 細胞およびマウスの背部の皮膚から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA 1  $\mu$ g を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡、大阪)を用いて逆転写した。Real-time PCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡)を用いて、C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)により行った。HaCaT 細胞の *Il1b*、*Il6*、*Cox2*、*Gapdh* の発現解析では表 1 に示したプライマーを用いた。マウス皮膚の *Il1b*、*Il6*、*Cox2*、*Bax*、*Gapdh* の発現解析に用いたプライマー配列は表 2 に示した。各遺伝子の発現は *Gapdh* の発現により正規化した。

#### (8) ウェスタンブロッティング

培養後の細胞を PBS で 2 回洗浄し RIPA buffer (ナカライテスク)に溶解した。15,000  $\times$  g、15 min 遠心後、上清を回収した。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific)により測定した。タンパク質 10  $\mu$ g 分を SDS-PAGE により泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを 5%スキムミルク(和光

表 2 第 2 章で用いたプライマーリスト

<i>hGapdh</i> forward	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
<i>hGapdh</i> reverse	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>hI11b</i> forward	AAGCTGATGGCCCTAACAG
<i>hI11b</i> reverse	AGGTGCATCGTGCACATAAG
<i>hI16</i> forward	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
<i>hI16</i> reverse	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
<i>hCox2</i> forward	TGAGCATCTACGGTTTGCTG
<i>hCox2</i> reverse	TGCTTGTCTGGAACAACACTGC
<i>mGapdh</i> forward	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC
<i>mGapdh</i> reverse	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
<i>mI11b</i> forward	CCTTCCAGGATGAGGACATGA
<i>mI11b</i> reverse	TGAGTCACAGAGGATGGGCTC
<i>mI16</i> forward	GAGGATAACACTCCCAACAGACC
<i>mI16</i> reverse	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>mCox2</i> forward	CAGACAACATAAACTGCGCCTT
<i>mCox2</i> reverse	GATACACCTCTCCACCAATGACC
<i>mBax</i> forward	CCCGAGAGGTCTTTTCC
<i>mBax</i> reverse	GCCTTGAGCACCAGTTTG

純薬)入りの Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST)で 2 hr、室温でブロッッキングした。TBST で洗浄後、一次抗体と反応させた。TBST で洗浄後、HRP で標識した二次抗体と反応させた。TBST で洗浄後、ECL Prime Western blotting detection reagents (GE Healthcare Lifesciences)によりバンドを検出した。

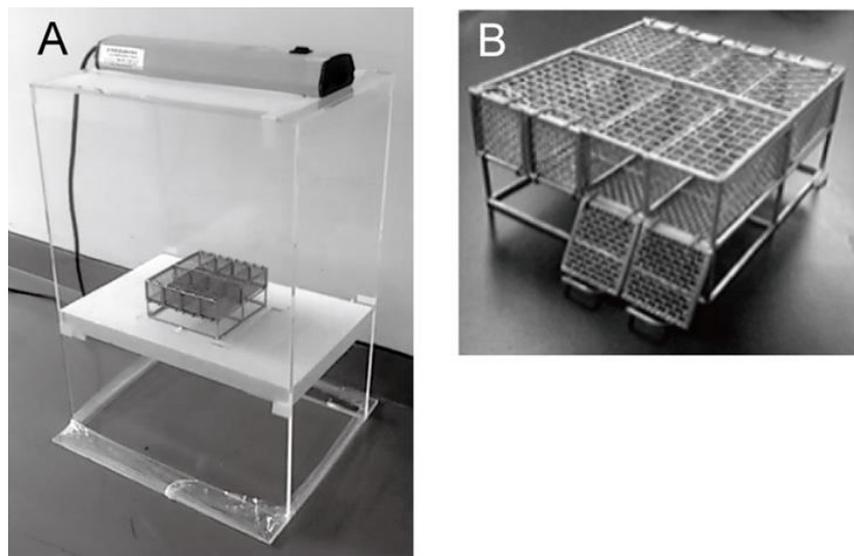
#### (9) 細胞内 ROS の検出

HaCaT 細胞を 20  $\mu\text{M}$  CellROX Green (Life Technologies) 入りの HBSS で 30 min 処理した。HBSS で 2 回洗浄後、UVB を照射した。DMEM 培地で 37°C、30 min 培養後、PBS で細胞を洗浄した。細胞を 1% Triton X-100 に溶解し、蛍光マイクロプレートリーダーにより 520 nm の蛍光を測定した。

#### (10) HR-1 ヘアレスマウスを用いた UVB 照射実験

HR-1 ヘアレスマウス、オスを日本 SLC (静岡) から購入した。マウスは MM-3 飼料(フナバシファーム、千葉)を自由摂取させ、実験開始まで 1 週間馴致した。動物実験は農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験ガイドラインに従い、動物実験委員会の承認(承認番号: 13033154)のもと行った。HR-1 ヘアレスマウスに対する UVB 照射実験は次のように行った。HR-1 ヘアレスマウスをランダムに 8 匹  $\times$  5 群(UVB 未照射対照群、UVB 照射対照群、フェニルピルビン酸塗布群、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸塗布群、インドール-3-ピルビン酸塗布群)に分けた。フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸をそれぞれ 0.05 M のリン酸緩衝液に溶解し 2N NaOH で中和後、プロピレングリコール(終濃度 30%)、エタノール(終濃度 20%)を加え、塗布用の混合液を作製した。各マウスの背部に 10  $\mu\text{mol}$  の芳香族ピルビン酸溶液または溶媒(対照)を塗布後、UVB ランプ(Model UVLM-28, UVP, Upland, CA, USA)を用いてマウス背部に UVB を 1000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  で 1000 sec、1  $\text{J}/\text{cm}^2$  照射した(補足図 2-1A)。UVB 照射の間、マウスは特注のステンレスケージに個別に収容した(補足図 2-1B)。サンプルの塗布と UVB の照射は実験 1 日目と 3 日目に行った。実験 5 日目に経表皮水分蒸散量をテヴァメーター(M-300MP, Courage and Khazaka, Köln, Germany)を用いて測定した。その後、マウスを頸椎脱臼によりと殺し、背部の皮膚を採取した。Real time PCR 解析用の皮膚サンプルは RNA later (Life Technologies) で保存した。顕微鏡観察用の皮膚サンプルは 3.7% パラホルムアルデヒド PBS で固定し、パラ

フィン包埋後、5  $\mu\text{m}$  の厚さに切断し、スライドガラス上でヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。HE 染色切片を正立型顕微鏡(Axioplan 2, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)で観察し、Axiocam digital camera (Carl Zeiss)により写真を撮影した。



補足図 2-1 UVB 照射装置とマウスケージ

(A) UVB 照射装置。UV ランプを透明アクリルパネルの上に置いた。(B) UVB 照射用のマウスケージ。マウスは特注のステンレスケージに收容した。

#### (11) 統計解析

多重比較は Tukey's multiple comparison test により行った。2 群間比較は Student's *t* test により行った。

#### 2-3. 結果

##### (1) 芳香族ピルビン酸は UVB 照射時の HaCaT 細胞の生存率を高める

UVB 照射による HaCaT 細胞の損傷に対する芳香族ピルビン酸(フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸)の防御効果

を調べるため、HaCaT 細胞に UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射後、各芳香族ピルビン酸を 1, 5, 25 mM 含有する培地で培養した。UVB 照射から 24 hr 後、クリスタルバイオレット染色により細胞の生存数を評価した。その結果、UVB 照射により 24 hr 後の培養プレートに接着する HaCaT 細胞の数は顕著に減少したが、ピルビン酸や芳香族ピルビン酸はその減少を有意に抑制した(図 2-1)。本試験に用いたすべての芳香族ピルビン酸が、ピルビン酸よりも高い防御効果を示し、特にインドール-3-ピルビン酸は 1 mM という比較的低濃度で有意な防御効果を示した(図 2-1)。

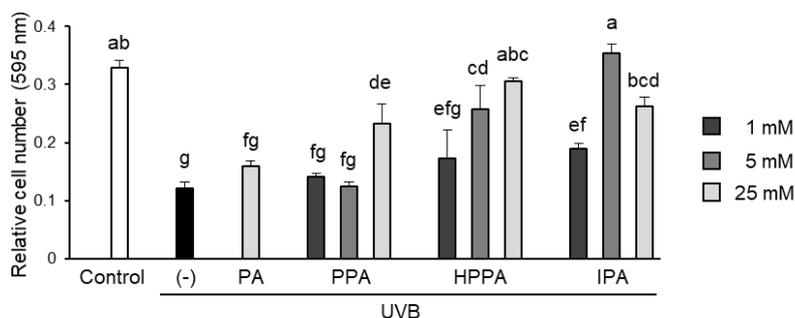


図 2-1 芳香族ピルビン酸は UVB 照射時の HaCaT 細胞の生存率を高める

HaCaT 細胞に UVB を 60 mJ/cm<sup>2</sup> 照射後、培地(-)、またはピルビン酸(PA)、フェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を各濃度で含む培地で 24 hr 培養した。また、コントロールとして UVB 未照射の細胞を用意した。プレートに付着している細胞をクリスタルバイオレットにより染色し、595 nm の吸光度を測定することで生細胞数を評価した。データは平均値 ± SD で示した。異符号間に有意差あり(Tukey's multiple comparison test,  $p < 0.05$ )。

(2) 芳香族ピルビン酸は UVB 照射により誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制する

芳香族ピルビン酸が UVB 照射により誘導される炎症反応を阻害できるかどうか調べるため、UVB 照射により HaCaT 細胞から産生される IL-1 $\beta$ 、IL-6 量を ELISA により測定した。その結果、UVB 照射により産生が誘導される IL-1 $\beta$ 、IL-6 は、芳香族ピルビン酸の添加により濃度依存的に抑制されることが明らかになった(図 2-2A, B)。インドール-3-ピルビン酸は 5 mM で、フェニルピルビン酸、4-

ヒドロキシフェニルピルビン酸それぞれ 25 mM の場合と同程度の IL-1 $\beta$  および IL-6 の抑制作用を有していたことから(図 2-2A, B)、インドール-3-ピルビン酸は他の芳香族ピルビン酸に比べ、より効果的に炎症性サイトカインの産生を抑制できることがわかった。続いて、mRNA 発現レベルでの芳香族ピルビン酸の効果を調べた。UVB 照射は 6 hr 後に *Il1b* および *Il6* の遺伝子発現を有意に増加させたが、芳香族ピルビン酸(25 mM)の添加は、その増加を有意に抑制した(図 2-3A, B)。

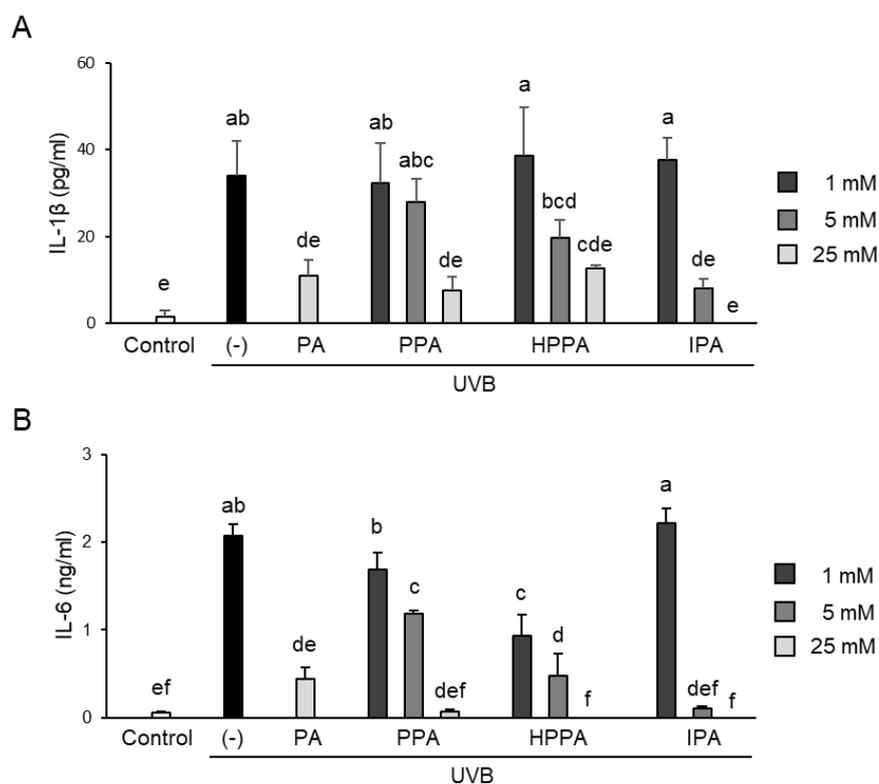


図 2-2 芳香族ピルビン酸は UVB 照射により誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制する

HaCaT 細胞に UVB を 60 mJ/cm<sup>2</sup> 照射後、培地(-)、またはピルビン酸(PA)、フェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を各濃度で含む培地で 24 hr 培養した。また、コントロールとして UVB 未照射の細胞を用意した。培養上清中に産生される IL-1 $\beta$  量(A)、IL-6 量(B)を ELISA により測定した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。異符号間に有意差あり(Tukey's multiple comparison test,  $p < 0.05$ )。

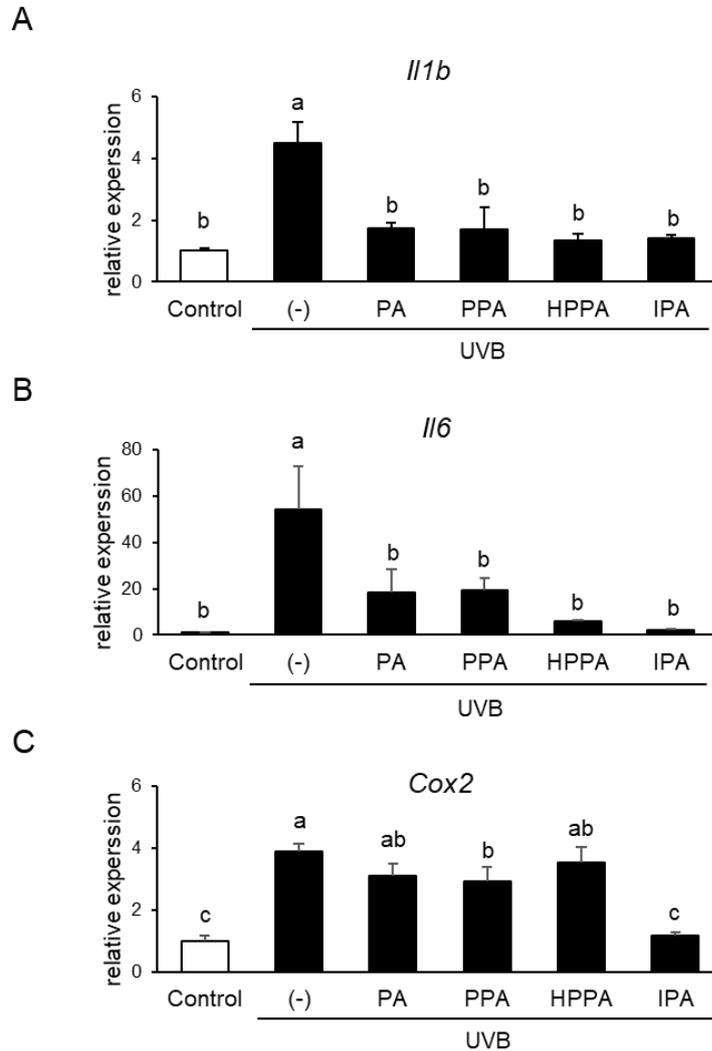


図 2-3 芳香族ピルビン酸は UVB 照射により誘導される *Il1b*、*Il6*、*Cox2* の遺伝子発現を抑制する

HaCaT 細胞に UVB を 60 mJ/cm<sup>2</sup> 照射後、培地(-)、またはピルビン酸(PA)、フェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を 25 mM 含む培地で 6 hr 培養した。また、対照(Control)として UVB 未照射の細胞を用意した。*Il1b* (A)、*Il6* (B)、*Cox2* (C)の遺伝子発現レベルを real-time PCR により解析し、*Gapdh* の発現により正規化した。遺伝子発現は Control に対する比で示した。データは平均値±SD で示した。異符号間に有意差あり (Tukey's multiple comparison test,  $p < 0.05$ )。

(3) インドール-3-ピルビン酸は UVB 照射により誘導される Cox-2 の発現を抑制する

Cox-2 は UVB 照射時の角化細胞の炎症反応において重要な役割をはたしている。芳香族ピルビン酸の抗炎症作用をさらに調べるため、UVB 照射により誘導される Cox-2 の遺伝子発現およびタンパク質発現に対する芳香族ピルビン酸の抑制効果を調べた。UVB 照射により HaCaT 細胞において有意に Cox2 遺伝子発現が誘導されたが、フェニルピルビン酸(25 mM)およびインドール-3-ピルビン酸(25 mM)の添加により、その誘導は有意に抑制された(図 2-3C)。特に、インドール-3-ピルビン酸はフェニルピルビン酸よりも強い抑制効果を示した(図 2-3C)。一方、Cox-2 のタンパク質発現に関しては、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(25 mM)およびインドール-3-ピルビン酸(25 mM)の添加によりその誘導が抑制され、インドール-3-ピルビン酸に比較的強い抑制効果が認められた(図 2-4)。以上の結果から、インドール-3-ピルビン酸は、UVB 照射により誘導される Cox-2 の発現に対して遺伝子およびタンパク質レベルの両方で、他の芳香族ピルビン酸に比べ相対的に強い抑制効果を有していることが明らかになった。

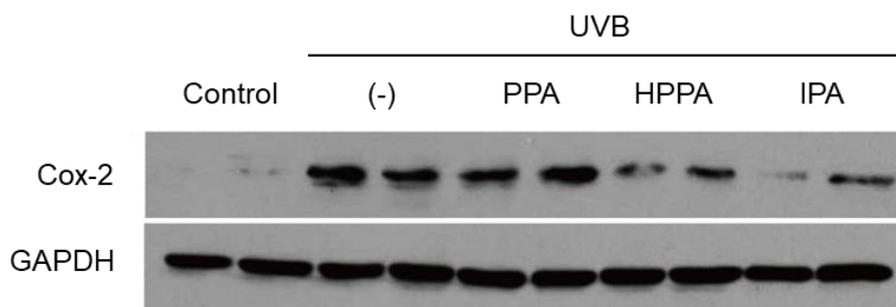


図 2-4

芳香族ピルビン酸は UVB 照射により誘導される Cox-2 の発現を抑制する

HaCaT 細胞に UVB を 60 mJ/cm<sup>2</sup> 照射後、培地(-)、またはフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を 5 mM 含む培地で培養した。また、対照(Control)として UVB 未照射の細胞を用意した。細胞中の Cox-2 の発現をウェスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとして GAPDH の量を調べた。

#### (4) UVB 照射により誘導される ROS の産生に対する芳香族ピルビン酸の効果

ROS は角化細胞の UVB に対する反応において重要な役割をはたしている。そこで、芳香族ピルビン酸が抗酸化作用を介して、UVB により誘導される HaCaT 細胞の損傷や炎症反応を抑制しているかどうか調べるため、細胞内の ROS 産生に対する芳香族ピルビン酸の添加効果を調べた。蛍光性の ROS インジケータを用いた解析の結果、UVB 照射 30 min 後に HaCaT 細胞内に ROS の産生を認めしたが、芳香族ピルビン酸は ROS の産生を抑制しないことがわかった(図 2-5)。このことから、芳香族ピルビン酸は抗酸化作用とは別の作用により、UVB による細胞の損傷や炎症反応を抑制していることが示唆された。

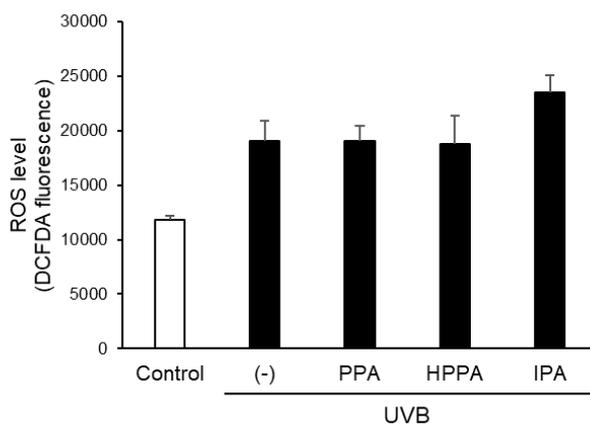


図 2-5 UVB 照射により HaCaT 細胞内に誘導される ROS に対する芳香族ピルビン酸の効果

HaCaT 細胞を 20  $\mu\text{M}$  CellROX Green で 30 min 処理した。HBSS で洗浄後、UVB を 60  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射した。細胞を培地(-)、またはピルビン酸(PA)、フェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を 5 mM 含む培地で 30 min 培養した。また、対照(Control)として UVB 未照射の細胞を用意した。PBS で洗浄後、細胞を 1% Triton X-100 に溶解し、蛍光マイクロプレートリーダーにより 520 nm の蛍光を測定し、細胞内の ROS レベルを評価した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。

(5) 芳香族ピルビン酸は p38 MAPK の活性化を抑制する

UVB 照射は角化細胞に対して p38 MAPK シグナルパスウェイを活性化することが知られており、p38 MAPK は UVB 照射により誘導される炎症サイトカインや Cox-2 の発現に重要な役割をはたしている(42, 55, 149)。そこで芳香族ピルビン酸の抑制作用における p38 MAPK の関与を調べるため、UVB 照射時の p38 MAPK のリン酸化に与える芳香族ピルビン酸の添加効果を調べた。ウェスタンブロッティングによる解析の結果、UVB 照射 1 hr 後に HaCaT 細胞において誘導される p38 MAPK のリン酸化は、芳香族ピルビン酸の添加により抑制されることがわかった(図 2-6)。その抑制は 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸が最も強く、インドール-3-ピルビン酸、フェニルピルビン酸の順で強かった(図 2-6)。

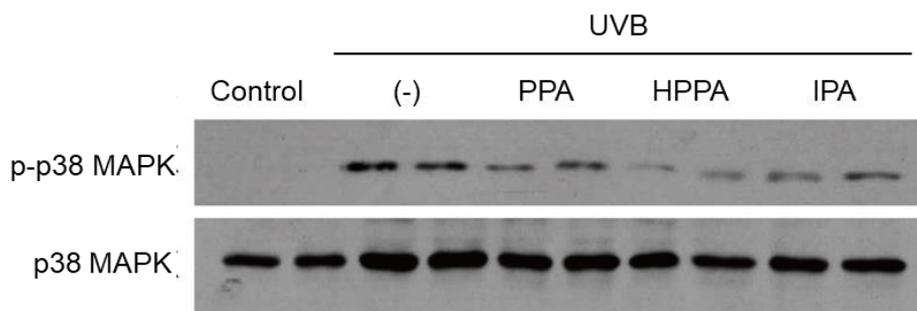


図 2-6 芳香族ピルビン酸は UVB 照射により HaCaT 細胞内に誘導される p38 MAPK のリン酸化を抑制する

HaCaT 細胞に UVB を 60 mJ/cm<sup>2</sup> で照射後、培地(-)、またはフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を 5 mM 含む培地で 1 hr 培養した。また、対照(Control)として UVB 未照射の細胞を用意した。細胞中の p38 MAPK のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとして p38 MAPK の量を調べた。

(6) インドール-3-ピルビン酸は UVB 照射による HR-1 ヘアレスマウスの皮膚傷害を抑制する

次に、HR-1 ヘアレスマウスを用いて、UVB により誘導される皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用を調べた。実験 1 日目と 3 日目にマウスに UVB (1 J/cm<sup>2</sup>)を照射することにより、実験 5 日目にはマウス背部の皮膚に紅斑が観察された(図 2-7)。芳香族ピルビン酸の塗布は、皮膚症状を緩和し、中でもインドール-3-ピルビン酸がもっとも効果的な作用を有していることがわかった(図 2-7)。



図 2-7 芳香族ピルビン酸は UVB 照射により誘導される HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚の紅斑を抑制する

HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚表面に、溶媒(Solvent)、または 10 μmol のフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を塗布し、UVB を 1 J/cm<sup>2</sup>照射した。サンプルの塗布と UVB 照射を実験 1 日目と 3 日目に行った。また、対照として UVB 未照射のマウスを用意した(Control)。写真は実験終了後(5 日目)の HR-1 ヘアレスマウス。

UVB は皮膚構造に影響を与え、皮膚バリア機能を低下させることが知られている。そこで皮膚のバリア機能の指標として経表皮水分蒸散量を測定することで、皮膚バリア機能に対する芳香族ピルビン酸の塗布効果を確認した。実験5日目においてUVBの照射は、マウス背部の経表皮水分蒸散量を顕著に増加させた(図2-8)。フェニルピルビン酸の塗布は経表皮水分蒸散量に有意な効果を示さなかったが、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸およびインドール-3-ピルビン酸の塗布はUVBによる経表皮水分蒸散量の増加を有意に抑制し、特にインドール-3-ピルビン酸は強い抑制作用を示した(図2-8)。

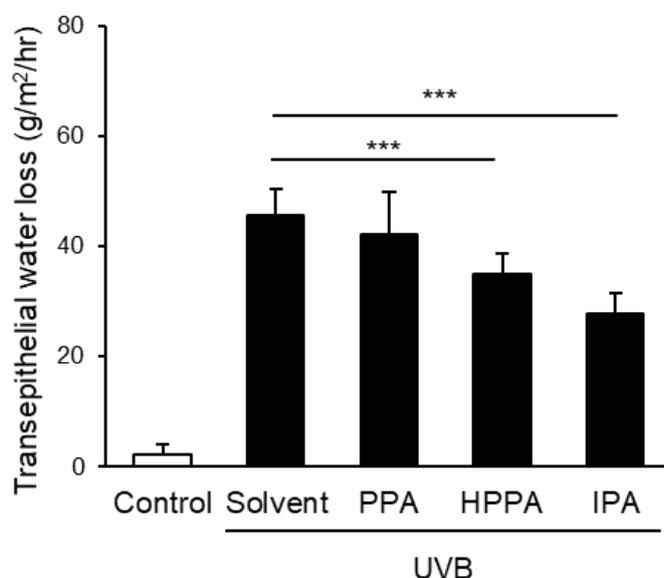


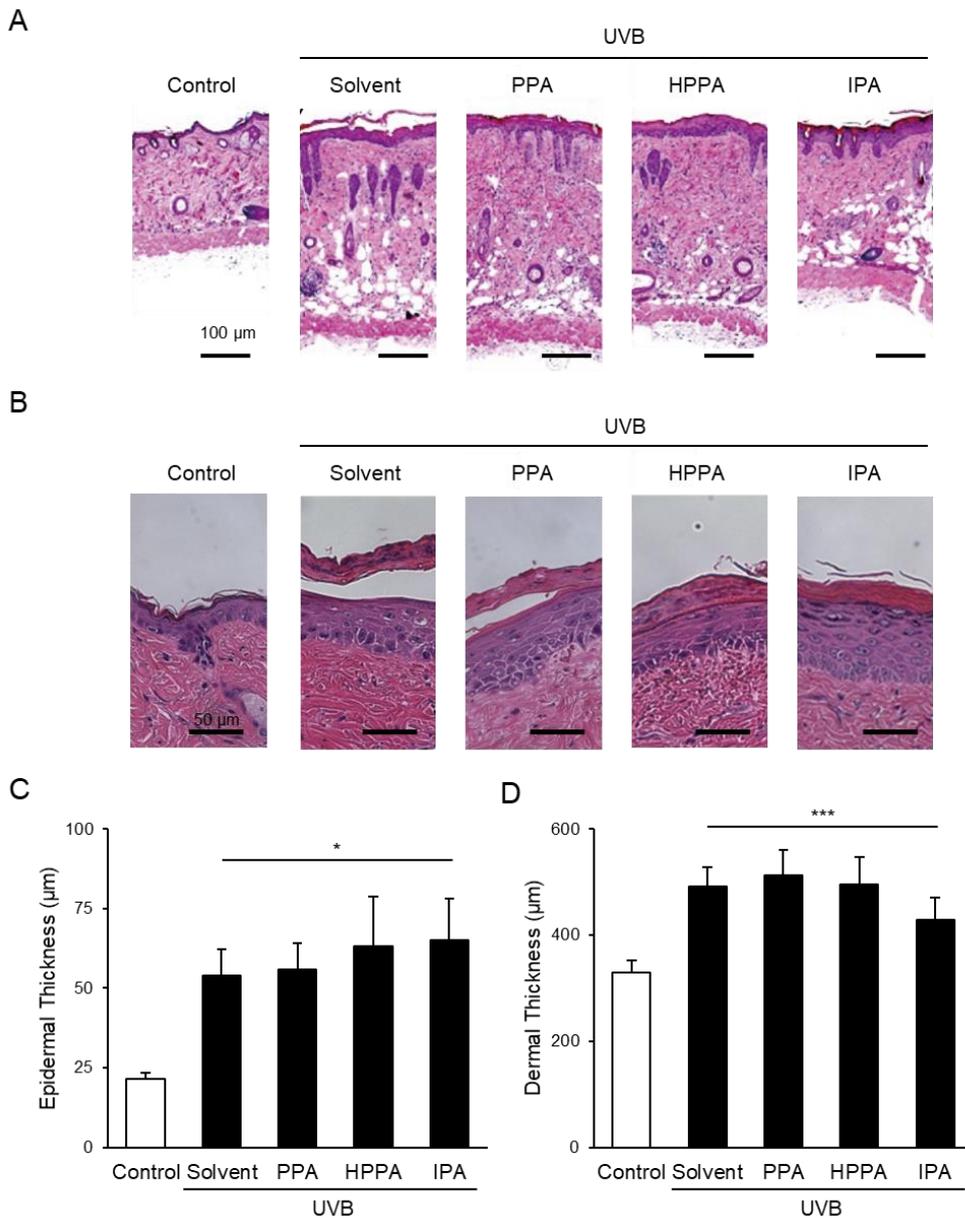
図2-8 UVB照射により誘導されるHR-1ヘアレスマウスの経表皮水分蒸散量の上昇に対する芳香族ピルビン酸の塗布効果

HR-1ヘアレスマウスの背部皮膚表面に、溶媒(Solvent)、または10 μmolのフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を塗布し、UVBを1 J/cm<sup>2</sup>照射した。サンプルの塗布とUVB照射を実験1日目と3日目に行った。また、対照としてUVB未照射のマウスを用意した(Control)。実験5日目にマウス背部の経表皮水分蒸散量を測定した。シンボルは各マウス個体の経表皮水分蒸散量を示す。\*\*\* $p < 0.001$  (Student's *t* test)。

続いて、UVB 照射により誘導される表皮および真皮の形態変化に対する芳香族ピルビン酸の塗布効果を確認した。実験 5 日目のマウス背部の皮膚組織の HE 染色切片を顕微鏡で観察した結果、UVB を照射したマウスでは、表皮および真皮の両方で肥厚が確認された(図 2-9A-D)。フェニルピルビン酸および 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の塗布は表皮や真皮の肥厚に有意な影響を与えなかったが、インドール-3-ピルビン酸の塗布は表皮の肥厚を促進する一方で、真皮の肥厚を有意に抑制した(図 2-9A-D)。高レベルの UVB は細胞に損傷を与え皮膚組織に壊死を引き起こすが、インドール-3-ピルビン酸の塗布は UVB 照射により誘導される皮膚表層の壊死を顕著に抑制することも明らかになった(図 2-9B)。

最後に、芳香族ピルビン酸の塗布がマウス皮膚の炎症性メディエーターである *Il1b*、*Il6*、*Cox2* の遺伝子発現、およびアポトーシス促進作用がある *Bax* の遺伝子発現に与える影響を調べた。Real-time PCR による解析の結果、インドール-3-ピルビン酸を塗布した場合にのみ、UVB 照射により発現が誘導される *Il1b*、*Il6* が有意に抑制されることが確認できた(図 2-10)。*Cox2* の遺伝子発現に対しては、いずれの芳香族ピルビン酸も有意な効果を示さなかったものの、インドール-3-ピルビン酸の塗布において発現が抑制される傾向が認められた(図 2-10)。これらの結果から、インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* と同様に *in vivo* においても、UVB により誘導される炎症性メディエーターの発現を抑制できることが明らかになった。加えて、インドール-3-ピルビン酸の塗布は *Bax* の遺伝子発現を有意に抑制した。UVB による角化細胞のアポトーシス誘導には *Bax* が関与していることが報告されていることから(57)、インドール-3-ピルビン酸は *Bax* の発現を抑制することで表皮角化細胞のアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。

以上の結果から、芳香族ピルビン酸の中でも特にインドール-3-ピルビン酸に、UVB による皮膚傷害を抑制する作用があることが明らかになった。



**図 2-9 芳香族ピルビン酸の塗布が UVB 照射により誘導される HR-1 ヘアレスマウスの皮膚の肥厚に与える影響**

(A-D) HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚表面に、溶媒(Solvent)、または 10  $\mu\text{mol}$  のフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を塗布し、UVB を 1  $\text{J}/\text{cm}^2$  照射した。サンプルの塗布と UVB 照射を実験 1 日目と 3 日目に行った。また、対照として UVB 未照射のマウスを用意した (Control)。実験終了時(5 日目)の HE 染色皮膚切片の顕微鏡写真、光学倍率 100 倍(A)と光学倍率 200 倍(B)。表皮厚(C)および真皮厚(D)を平均値 $\pm$ SD で示した。 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$  (Student's  $t$  test)。

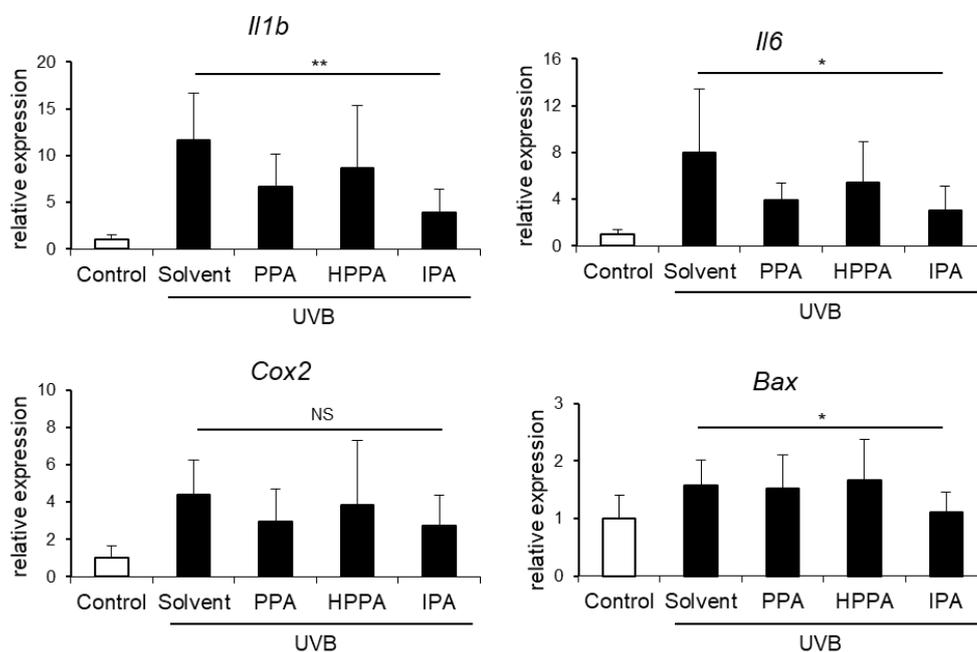


図 2-10 UVB 照射により誘導される HR-1 ヘアレスマウスの皮膚の *Il1b*、*Il6*、*Cox2*、*Bax* の遺伝子発現に対する芳香族ピルビン酸の塗布効果

HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚表面に、溶媒(Solvent)、または 10  $\mu\text{mol}$  のフェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)を塗布し、UVB を 1 J/cm<sup>2</sup> 照射した。サンプルの塗布と UVB 照射を実験 1 日目と 3 日目に行った。また、対照として UVB 未照射のマウスを用意した(Control)。実験終了時(5 日目)の HR-1 ヘアレスマウス皮膚を採取し、*Il1b*、*Il6*、*Cox2*、*Bax* の遺伝子発現を real-time PCR により解析し、*Gapdh* の発現により正規化した。遺伝子発現は UVB 未照射群(Control)に対する比で求め、平均値 $\pm$ SD で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test)。NS は有意差なし。

#### 1-2-4. 考察

本章では、調べたすべての芳香族ピルビン酸にピルビン酸と同様の作用があることを明らかにし、さらに、芳香族ピルビン酸の方がピルビン酸よりも効果が強いことを明らかにした。芳香族ピルビン酸はピルビン酸と同様に、UVB により誘導される HaCaT 細胞内の ROS 産生を抑制しなかった。このため、芳香族ピルビン酸の UVB に対する防御作用は抗酸化作用とは別の作用により発揮されている可能性があることが示唆された。前章におけるピルビン酸の検討では、その作

用機構に p38 MAPK シグナルパスウェイの抑制が関与している可能性が示唆された。ヒト角化細胞において p38 MAPK は UVB 照射時に Cox-2 のプロモーター活性を上昇させることが報告されている(149)。また、p38 MAPK の阻害剤は UVB 照射により誘導される角化細胞の炎症反応を抑制する(150)。このため、p38 MAPK は UVB 照射に対する角化細胞の炎症応答において重要な役割をはたしていることがわかっている(55)。本章での検討の結果、芳香族ピルビン酸は、UVB 照射により誘導される p38 MAPK のリン酸化を阻害することがわかった。したがって、芳香族ピルビン酸はピルビン酸と同様に、p38 MAPK の活性化を抑制することで UVB に対する HaCaT 細胞の炎症反応を抑制している可能性がある。

UVB により誘導される皮膚傷害は、表皮角化細胞における炎症性メディエーターの産生と相関することが知られている(151, 152)。本研究で調べた芳香族ピルビン酸の中では、インドール-3-ピルビン酸が最も強く HaCaT 細胞の炎症性メディエーターの発現を抑制した。インドール-3-ピルビン酸の生理的な活性の強さに関しては、HR-1 ヘアレスマウスを用いた UVB 照射モデルの解析の結果からも確認できた。フェニルピルビン酸や 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の防御作用があまり効果的ではない一方で、インドール-3-ピルビン酸の塗布は、UVB 照射により誘導されるマウス背部皮膚の紅斑、炎症性メディエーターの発現上昇を顕著に抑制した。加えて、インドール-3-ピルビン酸の塗布は UVB 照射による経表皮水分蒸散量の上昇を抑制したが、これには表皮の壊死の抑制が関係しているかもしれない。

インドール-3-ピルビン酸の塗布は UVB 照射により誘導される真皮の肥厚を抑制する一方で、意外なことに、表皮に関してはその肥厚を促進することがわかった。表皮の肥厚は UVB のさらなる暴露を防ぐのに有効である(153)。一方で、しわを形成する原因となるため、光老化の症状に関与すると考えられている。UVB により誘導される表皮の肥厚は p38 MAPK シグナルパスウェイを介した応答であることが報告されている(58)。このため、インドール-3-ピルビン酸の UVB に

対する防御作用に関しては、p38 MAPK シグナルパスウェイの抑制だけでは説明できない可能性がある。インドール-3-ピルビン酸の作用機構についてはさらなる検討が必要である。

結論として、本章では芳香族ピルビン酸に UVB 照射により誘導される HaCaT 細胞の損傷や炎症反応を抑制する作用があることを明らかにした。芳香族ピルビン酸はピルビン酸より強い活性を有し、その作用機構にはピルビン酸と同様に p38 MAPK シグナルパスウェイが関係している可能性が考えられた。UVB 照射による皮膚傷害のマウスモデルを用いた検討の結果、芳香族ピルビン酸の中ではインドール-3-ピルビン酸に最も効果的な防御作用があることが明らかになった。

### 第3章 インドール-3-ピルビン酸の腸管炎症抑制作用

#### 3-1. 緒言

前章ではインドール-3-ピルビン酸が、UVB 照射による HaCaT 細胞および HR-1 ヘアレスマウスの皮膚の損傷を予防することを明らかにした。インドール-3-ピルビン酸には様々な生物学的機能が報告されているが、これまでのところ、大腸炎症に対するインドール-3-ピルビン酸の効果は調べられていない。インドール-3-ピルビン酸は、インドール-3-アセトアルデヒド、インドール-3-アルデヒド、およびインドール-3-酢酸などの微生物由来 AhR アゴニストの前駆体であり、それ自体も水溶液中で反応してさまざまな AhR アゴニストを形成する(30)。AhR アゴニストには腸管粘膜を保護する作用があることが報告されていることから、インドール-3-ピルビン酸は大腸炎症を抑制できる可能性がある。

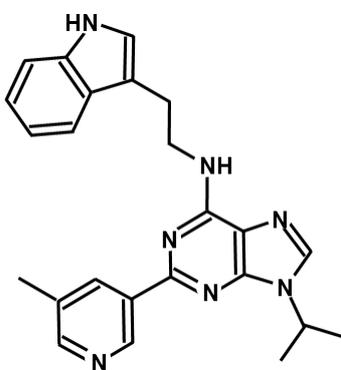
そこで本研究では、*in vitro* および *in vivo* で、インドール-3-ピルビン酸の AhR を活性化する能力を調べ、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞の SCID マウスへの移入によって誘導される慢性大腸炎に対するインドール-3-ピルビン酸の抗炎症作用を調べた。また、インドール-3-ピルビン酸を他の芳香族ピルビン酸と比較するために、フェニルピルビン酸、および4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の効果も調べた。さらに、腸管免疫恒常性に対するインドール-3-ピルビン酸の効果を明らかにするために、腸管免疫系の T 細胞および樹状細胞に与える影響を調べた。本研究ではまた、インドール-3-ピルビン酸で観察された効果が AhR を介しているかどうか確認するため、AhR アンタゴニストを用いた阻害実験も行った。

#### 3-2. 材料および方法

##### (1) 試薬類

フェニルピルビン酸は和光純薬から購入した。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸、RPMI1640 培地は Sigma-Aldrich から購入した。

AhR アンタゴニスト *N*-(2-(3H-Indol-3-yl)ethyl)-9-isopropyl-2-(5-methyl-3-pyridyl)-7H-purin-6-amine, *N*-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-9-isopropyl-2-(5-methylpyridin-3-yl)-9H-purin-6-amine (**GNF-351**, 補足図 3-1)は MilliporeSigma (Billerica, MA, USA)から購入し、20 mg/ml の濃度で DMSO に溶解し、-20°Cで保存した。anti-mouse CD3e および anti-mouse CD28 は eBioscience (San Diego, CA, USA)から購入した。murine rIL-12、human recombinant TGF- $\beta$ 、および murine rIL-27 は R&D から購入した。



補足図 3-1 GNF-351 の化学構造

GNF-351 は膜透過性の AhR アンタゴニストであり、高濃度でもアゴニスト活性は示さない。

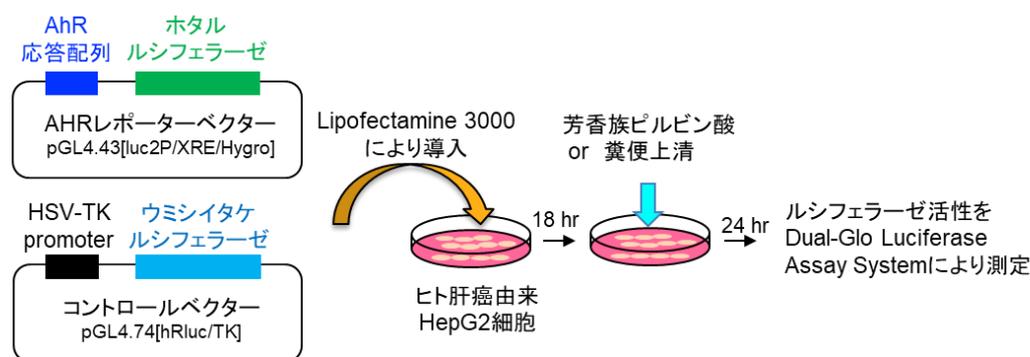
## (2) マウス

BALB/c マウス(メス)は日本チャールズリバー(神奈川)から購入した。CB17-SCID マウス(メス)は日本 CLEA (東京)から購入した。動物実験は農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験ガイドラインに従い、動物実験委員会の承認(承認番号：14113018-2、1511303、1611D65-2、1711D018、1811D039)のもと行った。

## (3) AhR レポーターアッセイ(補足図 3-2)

HepG2 細胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells で播種し、10% FCS、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、非必須アミノ酸溶液、2 mM L-グルタミン溶液を含有する

Eagle's minimal essential medium (EMEM)培地 100  $\mu$ l で 24 時間培養した。細胞に 90 ng の pGL4.43[luc2P/XRE/Hygro]ベクター(Promega, Madison, WI, USA)と 9 ng の pGL4.74[hRluc/TK] ベクター (Promega) を Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いてトランスフェクションした。18 hr 後に培地を除去し、細胞をフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸を溶解させた 0.5% FCS EMEM 培地、または、糞便上清を 1/20 希釈で加えた 0.5% FCS EMEM 培地で培養した。24 hr 後、各ウェルのホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)により、GloMax Discover (Promega)を用いて測定した。



補足図 3-2 AhR レポーターアッセイ

AhR レポーターベクターとコントロールベクターを HepG2 細胞に導入し、芳香族ピルビン酸またはマウス糞便上清を添加後、Dual-Glo Luciferase Assay System により、誘導されるホタルルシフェラーゼとコントロールのウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定した。ホタルルシフェラーゼの活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正することで、AhR 活性化能を求めた。

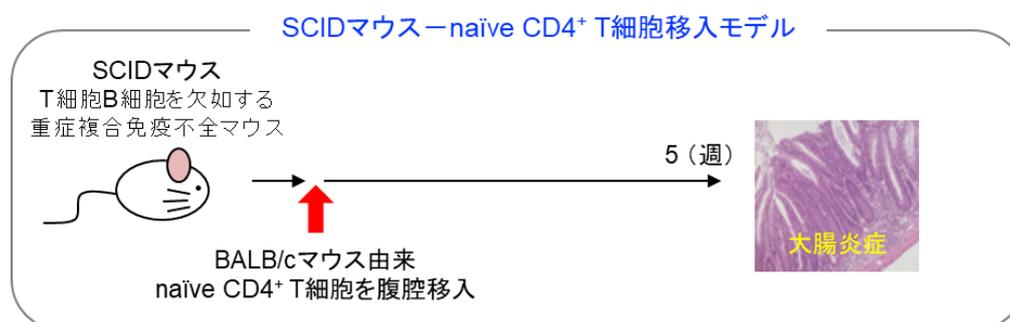
#### (4) マウスを用いた AhR 活性化能の評価

BALB/c マウス(6 週齢)に MF 飼料(オリエンタル酵母、東京)またはフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸を 0.1% 含有する MF 飼料を自由摂取させた。5 日後、マウスから新鮮糞便を採取し、100 mg/ml となるように PBS に懸濁した。遠心(4°C、5000  $\times$  g、15 min)により上清を回収し、0.2- $\mu$ m のフィルターに通した後、上述の AhR レポーターアッセイに供

した。マウスは頸椎脱臼によりと殺した後、大腸を採取し、Real-time PCR 解析に供した。

### (5) T 細胞移入大腸炎モデル(補足図 3-3)

6 週齢の BALB/c マウスから脾臓を摘出し、CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cell isolation kit II (Miltenyi biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)を用いて naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を精製した。6 週齢の SCID マウスに、精製した naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞( $1 \times 10^6$  cells /匹)を腹腔に移入した。対照の SCID マウスには naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞の代わりに PBS を注入した。樹状細胞の移入実験では、精製した CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞( $5 \times 10^4$  cells /匹)を naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞とともに腹腔に注入した。これらのマウスに MF 飼料または、フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸をそれぞれ 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間投与した。AhR アンタゴニスト投与実験では、マウスに GNF-351 (10 µg/匹、1 日 2 回)または溶媒対照(0.5% DMSO)を腹腔内投与した。毎週体重を測定し、5 週目に下痢スコアを測定した。下痢スコアは正常便を 0、軟便を 1、下痢便を 2、水様便を 3 として評価した。マウスを頸椎脱臼によりと殺し、大腸を摘出した。大腸は組織学的解析および Real-time PCR 解析に供した。また、一部の実験では大腸 LPL について後述の細胞内サイトカイン染色による解析を実施した。



### 補足図 3-3 T 細胞移入大腸炎モデル

本研究で使用した大腸炎モデルは、SCID マウスの腹腔に BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入するモデルである。このモデルでは、T 細胞移入後に慢性的な大腸炎症を発症することが知られている。

#### (6) 組織学的解析

大腸を 10%ホルマリン PBS で 24 hr 以上固定した。パラフィン包埋後、切断し、スライドガラス上で HE 染色を行った。HE 染色切片を正立型顕微鏡(Axioplan 2)で観察し、Axiocam digital camera により写真を撮影した。画像を基に組織学的に炎症スコアを測定した。炎症スコアは、炎症所見なしを 0、軽度の炎症を 1、中程度の炎症を 2、腸管の肥厚を伴う重度の炎症を 3、腸管の肥厚に加えゴブレット細胞の消失、全層性の細胞浸潤を伴う重度の炎症を 4 として評価した。

#### (7) Real-time PCR 解析

RNAlater (Ambion, Austin , TX, USA)で保存した大腸サンプルから Total RNA を RNeasy mini kit により抽出した。RNA 0.5 µg を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写した。Real-time PCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて、C1000 Thermal Cycler により行った。発現解析に用いた各プライマーの配列は表 3 に示めす。PCR 反応条件は 95°C で 60 sec の初期変性の後、変性(95°C、15 sec)、アニーリングおよび伸長反応(60°C、30 sec)を 40 サイクル実施した。各遺伝子の発現は *Gapdh* の発現により正規化した。

#### (8) 大腸からの LPL の調製

大腸を縦方向に切り開き、PBS で洗浄後、3~4 cm にカットした。大腸片を 30 ml の 5 mM EDTA、0.04% NaHCO<sub>3</sub>、5% FCS を含有する HBSS (カルシウム、マグネシウム不含)で満たしたチューブに入れ、37°C の恒温槽にて 150 rpm、20 min 振盪した。チューブを激しく振り、ガーゼで濾過した。この処理を計 3 回繰り返す、大腸から腸管上皮細胞を除去した。大腸を 2 mm 程度に細かく断片化し、100 µg/ml DNase I (Roche)、100 U/ml collagenase type I (Invitrogen, Carlsbad, GA)、10% FCS を含有する RPMI1640 培地 10 ml が入った三角フラスコに入れた。37°C、60 分間スターラーで攪拌し、細胞を組織から分離した。ガーゼで組織を濾過した後、遠

表3 第3章で用いたプライマーリスト

<i>mGapdh</i> forward	TCATCAACGGGAAGCCCATCAC
<i>mGapdh</i> reverse	AGACTCCACGACATACTCAGCAC
<i>mCyp1a1</i> forward	GGTTAACCATGACCGGGA ACT
<i>mCyp1a1</i> reverse	TGCCCAAACCAAAGAGAGTGA
<i>mI12a</i> forward	CCCTTGCCCTCCTAAACCAC
<i>mI12a</i> reverse	TAGTAGCCAGGCAACTCTCG
<i>mI12b</i> forward	GGAAGCACGGCAGCAGAATAAAT
<i>mI12b</i> reverse	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
<i>mIfng</i> forward	GGATGCATTCATGAGTATTGC
<i>mIfng</i> reverse	CCTTTTCCGCTTCCTGAGG
<i>mTnfa</i> forward	CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA
<i>mTnfa</i> reverse	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>mI1b</i> forward	CCTTCCAGGATGAGGACATGA
<i>mI1b</i> reverse	TGAGTCACAGAGGATGGGCTC
<i>mI16</i> forward	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
<i>mI16</i> reverse	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>mI122</i> forward	GGCCAGCCTTG CAGATAACA
<i>mI122</i> reverse	GCTGATGTGACAGGAGCTGA
<i>mFoxp3</i> forward	TACTTCAAGTTCCACAACATGCGACC
<i>mFoxp3</i> reverse	CGCACAAAGCACTTGTGCAGACTCAG
<i>mI110</i> forward	ATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG
<i>mI110</i> reverse	CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTGC

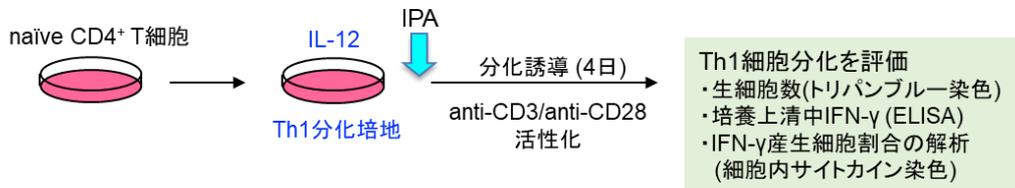
心操(300 × g、10 min)により細胞を回収した。細胞を 40% percoll に懸濁し、2 ml の 63% percoll 上に重層した。遠心後(580 × g、20 min)、界層のリンパ球をスポイトで回収し、大腸 LPL とした。

#### (9) *In vitro* T 細胞分化アッセイ(補足図 3-4)

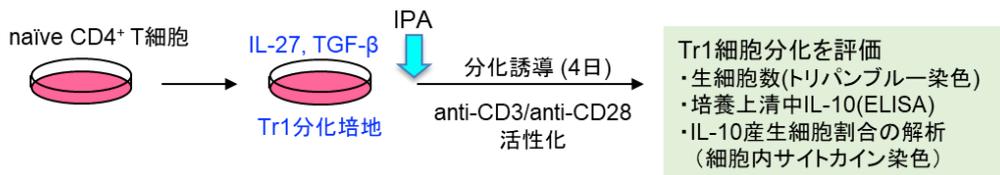
BALB/c マウス脾臓より CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cell isolation kit II を用いて naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を精製した。調製した naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞( $1 \times 10^6$  cells)は、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10 mM HEPES、50 µM 2-メルカプトエタノール、10% FCS を含有する RPMI1640 培地(complete RPMI 培地) 500 µl に懸濁し、5 µg/ml の anti-mouse CD3e でコーティングした 24 ウェルプレートに加え、anti-mouse CD28 (終濃度 2 µg/ml)で活性化した。Th1 分化誘導条件では murine rIL-12 (終濃度 12.5 ng/ml)を、Tr1 分化誘導条件では human rTGF-β (終濃度 2 ng/ml)と murine rIL-27 (終濃度 50 ng/ml)を活性化と同時に培地に加え、インドール-3-ピルビン酸(終濃度 50 µM)存在下、または非存在下で 37°C、4 日間培養した。AhR アンタゴニストの添加実験では、GNF-351 (終濃度 1 µM)を培地に添加した。培養後、培養上清中の IFN-γ および IL-10 濃度を ELISA (eBioscience)により測定した。細胞は一部をトリパンブルーで染色し生細胞数をカウントするとともに、後述の細胞内サイトカイン染色による解析を行った。

MLN 樹状細胞の T 細胞分化誘導能を調べることを目的とした実験では、マウスの MLN から CD11c microbeads (Miltenyi biotec)を用いて樹状細胞を精製した。BALB/c マウス脾臓より調製した naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞( $1 \times 10^5$  cells)を、精製した樹状細胞( $1 \times 10^5$  cells)と混合し、anti-mouse CD3e (終濃度 1 µg/ml)で刺激した。37°Cで 4 日間培養後、培養上清を回収し、IFN-γ および IL-10 濃度を ELISA により測定した。

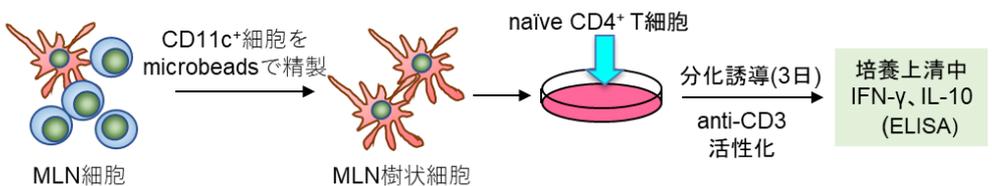
・Th1細胞の分化誘導に対するIPAの効果の評価



・Tr1細胞分化誘導に対するIPAの効果の評価



・MLN樹状細胞のT細胞分化誘導能の評価



補足図 3-4 *In vitro* T細胞分化アッセイ

Th1細胞分化およびTr1細胞分化に与えるインドール-3-ピルビン酸(IPA)の効果の評価方法と、MLN樹状細胞のT細胞分化誘導能の評価方法の概略を図に示した。

(10) 細胞内サイトカイン染色による解析

LPL または *in vitro* で分化誘導した CD4<sup>+</sup> T細胞における IFN- $\gamma$ 、IL-10 産生細胞の割合を細胞内サイトカイン染色法により解析した。細胞を cell stimulation cocktail (ebioscience)を含む complete RPMI 培地で 4~12 時間培養した。PBS で洗浄後、死細胞を Fixable Viability Dye (ebioscience)で 15 min、氷上で染色した。細胞を 0.05% NaN<sub>3</sub>、1% FCS phosphate-buffered saline (FCM buffer)で洗浄後、10  $\mu$ g/ml anti-CD16/32 (BD pharMingen)で 10 min 処理し、allophycocyanine-eFour 780-conjugated anti-CD4 (ebioscience)で 20 min 染色した。FCM buffer で洗浄後、IC Fixation Buffer (ebioscience)で固定し、Permeabilization Buffer (ebioscience)で洗浄した。その後、Alexa Fluor 488-conjugated anti-IFN- $\gamma$  (ebioscience)および PE-conjugated

anti-IL-10 (ebioscience)を含む Permeabilization Buffer に細胞を懸濁し、室温で細胞内のサイトカインを染色した。Permeabilization Buffer と FCM buffer で1回ずつ洗浄後、細胞を Gallios フローサイトメーターで測定し、FlowJo により解析した。

#### (11) MLN 細胞のフローサイトメーター解析と MLN 樹状細胞の精製

BALB/c マウスに MF 飼料または 0.1%インドール-3-ピルビン酸含有 MF 飼料を摂取させた。AhR アンタゴニスト投与実験では、マウスに GNF-351 (10 µg /匹、1日2回)または溶媒対照(0.5% DMSO)を腹腔内投与した。2週間後、マウスをと殺し、MLN を採取した。MLN から細胞を調製後、anti-CD16/32 存在下、PE-conjugated anti-CD11b (eBioscience) 、 allophycocyanin-conjugated anti-CD103 (eBioscience)、PE-Cy7-conjugated anti-CD11c (eBioscience)で 20 min、4°C、染色した。FCM buffer で洗浄後、細胞を Gallios フローサイトメーターで測定し、FlowJo により解析した。

0.1%インドール-3-ピルビン酸含有 MF 飼料を摂取させたマウス MLN から CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞を精製するため、CD90.2 microbeads (Miltenyi Biotec)を用いたネガティブセレクションにより、MLN 細胞から T 細胞を除去した。CD90.2<sup>-</sup> MLN 細胞を anti-CD16/32 存在下、PE-conjugated anti-CD11b、allophycocyanin-conjugated anti-CD103、PE-Cy7-conjugated anti-CD11c で 20 min、4°C、染色した。洗浄後、細胞を MoFlo (Beckman Coulter)にかけ、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞を精製した。精製した細胞は上述の樹状細胞の移入実験に用いた。

#### (12) 統計解析

下痢スコアおよび炎症スコアは Mann-Whitney U test または Steel-Dwass test により解析した。AhR レポーターアッセイ、Real-time PCR 解析、フローサイトメーター解析から得られたデータおよび体重データは、Student's *t* test または Tukey's multiple comparison test により解析した。

### 3-3. 結果

#### (1) インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* および *in vivo* で AhR を活性化する

芳香族ピルビン酸(フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸)の AhR 活性化能を AhR レポーターアッセイにより調べた。これまでの報告(30)のとおり、インドール-3-ピルビン酸(50  $\mu\text{M}$  および 250  $\mu\text{M}$ )と 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(50  $\mu\text{M}$ )に AhR 活性化能を認めた(図 3-1A)。そこで次に、芳香族ピルビン酸の経口摂取が大腸において AhR を活性化するかどうか確認した。BALB/c マウスに芳香族ピルビン酸をそれぞれ 0.1% 含有する MF 飼料を 5 日間摂取させ、それらマウスの糞便の AhR 活性化能を調べた。その結果、インドール-3-ピルビン酸を経口摂取したマウスの糞便上清に AhR 活性化能の有意な上昇を認めたが、フェニルピルビン酸および 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を摂取したマウスの糞便では認められなかった(図 3-1B)。この結果と一致して、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取はマウス大腸において、AhR 活性化マーカーである *Cyp1a1* の遺伝子発現を顕著に増加させた(図 3-1C)。これらの結果から、経口摂取したインドール-3-ピルビン酸は消化管においても AhR 活性化剤として働くことが示唆された。

#### (2) インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入大腸炎モデルにおける腸管の慢性炎症の発生を抑制する

次に、T 細胞移入大腸炎モデルに対する芳香族ピルビン酸の投与効果を調べた。SCID マウスの腹腔に naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入することで大腸炎を誘導し、芳香族ピルビン酸を自由摂取させた。SCID マウスに対する naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞の移入は、5 週目においてマウスの増体を抑制するとともに(図 3-2A)、下痢を引き起こし(図 3-2B)、腸管の肥厚、ゴブレット細胞の消失、全層性の細胞浸潤を伴う重度の大腸炎を誘導した(図 3-2C, D)。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は、増体に対しては有意な改善効果を示さなかったものの(図 3-2A)、AhR ア

ゴニストが IBD マウスモデルの腸管炎症を抑制するという複数の報告(135-138)と同様に、T 細胞移入大腸炎モデルの下痢症状を抑え(図 3-2B)、腸管の慢性炎症の発生を顕著に抑制した(図 3-2C, D)。一方で、フェニルピルビン酸や 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の摂取ではそのような効果は認められなかった。

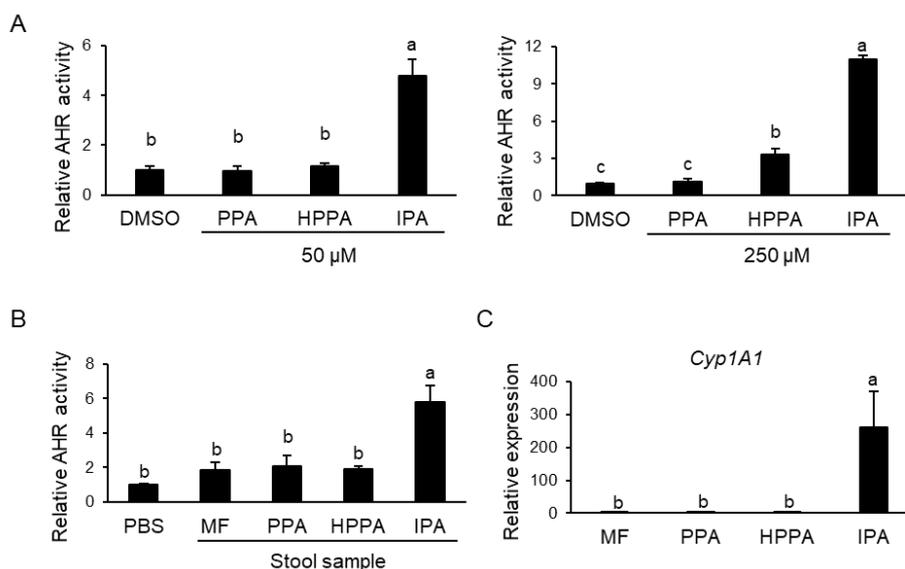


図 3-1

インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* および *in vivo* で AhR を活性化する

(A) フェニルピルビン酸(PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPPA)、インドール-3-ピルビン酸(IPA)、各 50 μM (上)および 250 μM (下)濃度での AhR 活性化能を、HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。AhR の活性化は溶媒対照(DMSO)に対する比で示した。(B, C) MF 飼料、またはフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸をそれぞれ 0.1%含有する MF 飼料を BALB/c マウス(n=4/群)に経口摂取させた(順に MF 群、PPA 群、HPPA 群、IPA 群)。5 日後、新鮮糞便と大腸を採取した。(B) 糞便を PBS に懸濁後、遠心操作を行い、上清を回収した。糞便上清による AhR 活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。AhR の活性化は溶媒対照(PBS)に対する比で示した。(C) 大腸における *Cyp1A1* の発現を real-time PCR により解析し、*Gapdh* の発現で正規化した。遺伝子発現は対照群(MF)に対する比で示した。データは平均値±SD で示した。異符号間に有意差あり(Tukey's multiple comparison test,  $p < 0.05$ )。

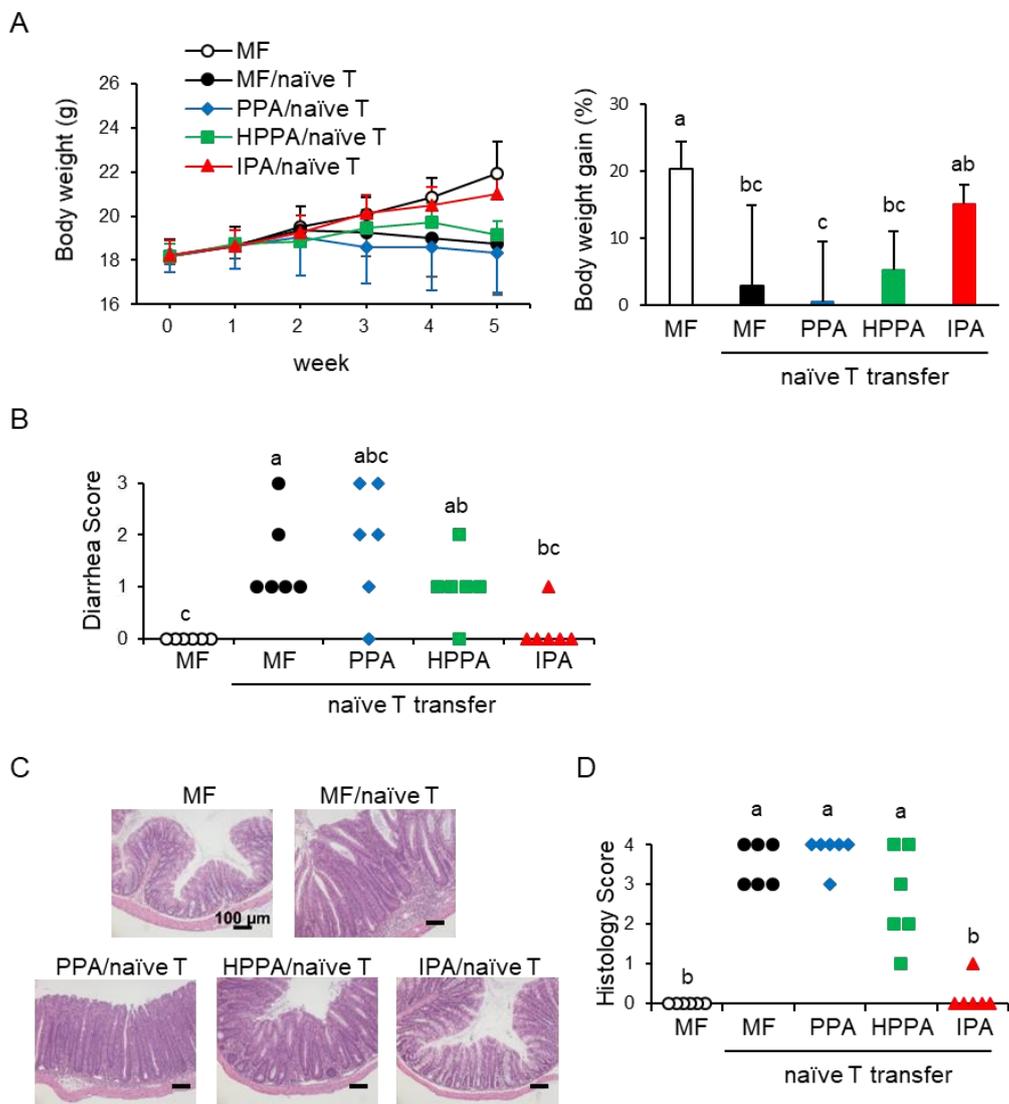


図 3-2

インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入大腸炎モデルの慢性炎症を抑制する (A-D) SCID マウス(n=6/群)に BALB/c マウス由来 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞(1 × 10<sup>6</sup> cells)を腹腔投与し、MF 飼料または、フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、インドール-3-ピルビン酸をそれぞれ 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間経口摂取させた(順に MF 群、PPA 群、HPPA 群、IPA 群)。(A) 体重変化(左)と増体(右)を平均値±SD で示した。異符号間に有意差あり(Tukey's multiple comparison test, *p* < 0.05)。(B) 5 週間後の下痢スコアを示した。シンボルは各マウス個体の下痢スコアを示す。異符号間に有意差あり(Steel-Dwss test, *p* < 0.05)。(C) HE 染色大腸切片の顕微鏡写真。(D) 大腸切片の炎症スコア。シンボルは各マウス個体の炎症スコアを示す。異符号間に有意差あり(Steel-Dwss test, *p* < 0.05)。

(3) インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入大腸炎モデルにおいて Th1 細胞を減少させ Tr1 細胞を増加させる

T 細胞移入大腸炎モデルにおいて、Th1 細胞関連のサイトカインや炎症性サイトカインは慢性炎症の誘導に重要な役割を担っている(65, 85, 154, 155)。そこで、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取により Th1 細胞関連のサイトカイン(*Il12a*, *Il12b*, *Ifng*, *Tnfa*)や炎症性サイトカイン(*Il1b*, *Il6*)の発現が抑制されるかどうか確認した。その結果、インドール-3-ピルビン酸を経口摂取したマウスの大腸において、*IL12b*、*Ifng*、*Tnfa*、*Il1b* の遺伝子発現が有意に抑制されることがわかった(図 3-3)。また、*Il12a* はインドール-3-ピルビン酸摂取群の中に発現が検出できない個体がでたため統計解析を実施できなかったが、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取によりその発現が顕著に抑制されていた。一方、*Il6* に関してはインドール-3-ピルビン酸による有意な抑制効果は認められなかった(図 3-3)。続いて、抗炎症性因子に対するインドール-3-ピルビン酸の効果を調べるため、*Il22*、*Foxp3*、*Il10* の遺伝子発現を調べた。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は *Il22* や *Foxp3* の発現を上昇させなかったが、*Il10* の発現を有意に上昇させた(図 3-3)。以上の結果からインドール-3-ピルビン酸の経口摂取は、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入した SCID マウスの大腸において、炎症に関わる Th1 細胞関連のサイトカインを抑制し、抗炎症性サイトカインである IL-10 を増加させることが示唆された。続いて、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入した SCID マウスの大腸 LPL に対して細胞内サイトカイン解析を実施した。naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入してから 5 週間後、マウスから大腸を採取し、大腸 LPL を調製した。その結果、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取により大腸 LPL の細胞数は有意に抑えられていることがわかった(図 3-4A)。大腸 LPL に対する細胞内サイトカイン解析の結果、インドール-3-ピルビン酸は IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を有意に減少させる一方で、IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を有意に増加させることがわかった(図 3-4B, C)。一方、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は IL-22<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T

細胞や Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合に対しては、有意な影響を示さなかった(補足図 3-5A-D)。したがって、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取はマウス大腸 LPL において Th1 細胞を減少させ、Tr1 細胞を増加させることが示唆された。大腸 LPL CD4<sup>+</sup> T 細胞の細胞内サイトカイン解析の結果は、大腸遺伝子発現解析の結果と非常によく一致していたことから、大腸におけるサイトカイン遺伝子の発現の差は大腸 LPL の CD4<sup>+</sup> T 細胞サブセットの変化を反映しているものと考えられた。

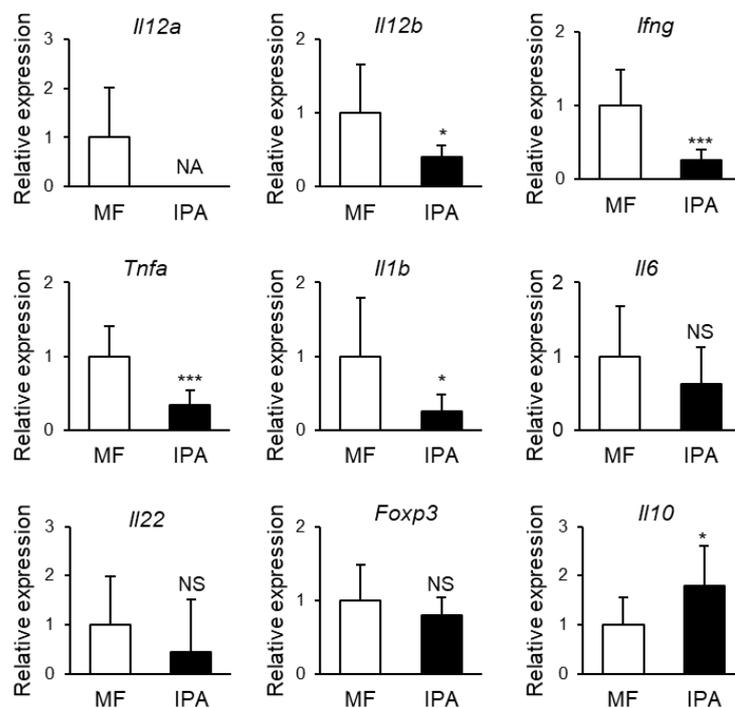
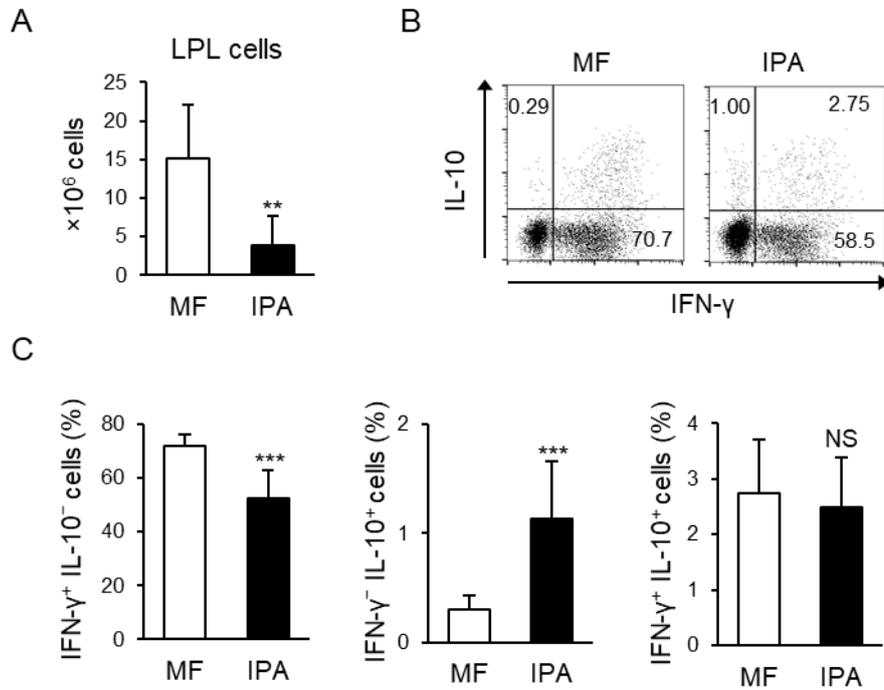


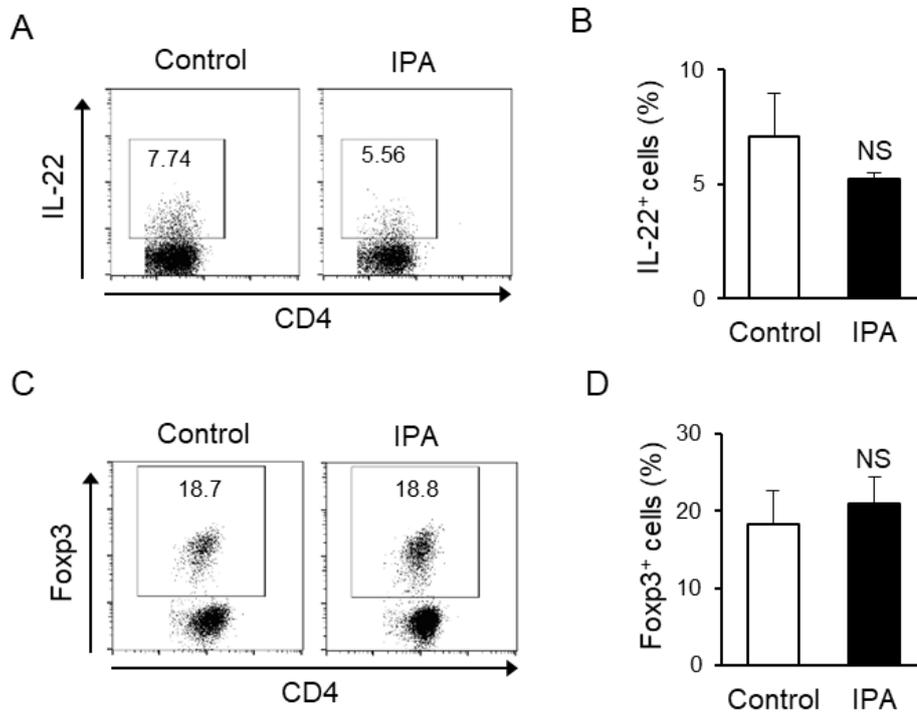
図 3-3 インドール-3-ピルビン酸は大腸における Th1 細胞関連サイトカインおよび炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制する

SCID マウス(n=9/群)に BALB/c マウス由来 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞( $1 \times 10^6$  cells)を腹腔投与した。MF 飼料または、インドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間経口摂取させた(順に MF 群、IPA 群)。大腸における Th1 細胞関連サイトカイン(*Il12a*、*Il12b*、*Ifnγ*、*Tnfa*)、炎症性サイトカイン(*Il1b*、*Il6*)、および *Il22*、*Foxp3*、*Il10* の遺伝子発現を real-time PCR により解析し、*Gapdh* の発現により正規化した。遺伝子発現は対照群(MF)に対する比で示した。データは平均値±SD で示した。統計処理は Student's *t* test により行った。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。NA は統計処理が適用できないデータ。NS は有意差なし。



**図 3-4** インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入大腸炎モデルの大腸 LPL において Th1 細胞の割合を減少させ Tr1 細胞の割合を増加させる

SCID マウス(n=9群)に BALB/c マウス由来 naïve CD4 $^+$  T 細胞( $1 \times 10^6$  cells)を腹腔投与した。MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間経口摂取させた(順に MF 群、IPA 群)。(A) 大腸 LPL の細胞数を示した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。\*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test)。(B) 大腸 LPL の viable CD4 $^+$  T 細胞における IFN- $\gamma$ 、IL-10 の発現をドットプロットで示した。(C) CD4 $^+$  T 細胞における IFN- $\gamma^+$  IL-10 $^-$ 細胞、IFN- $\gamma^-$  IL-10 $^+$ 細胞、IFN- $\gamma^+$  IL-10 $^+$ 細胞の割合(%)を平均値 $\pm$ SD で示した。\*\*\* $p < 0.001$  (Student's *t* test)。NS は有意差なし。



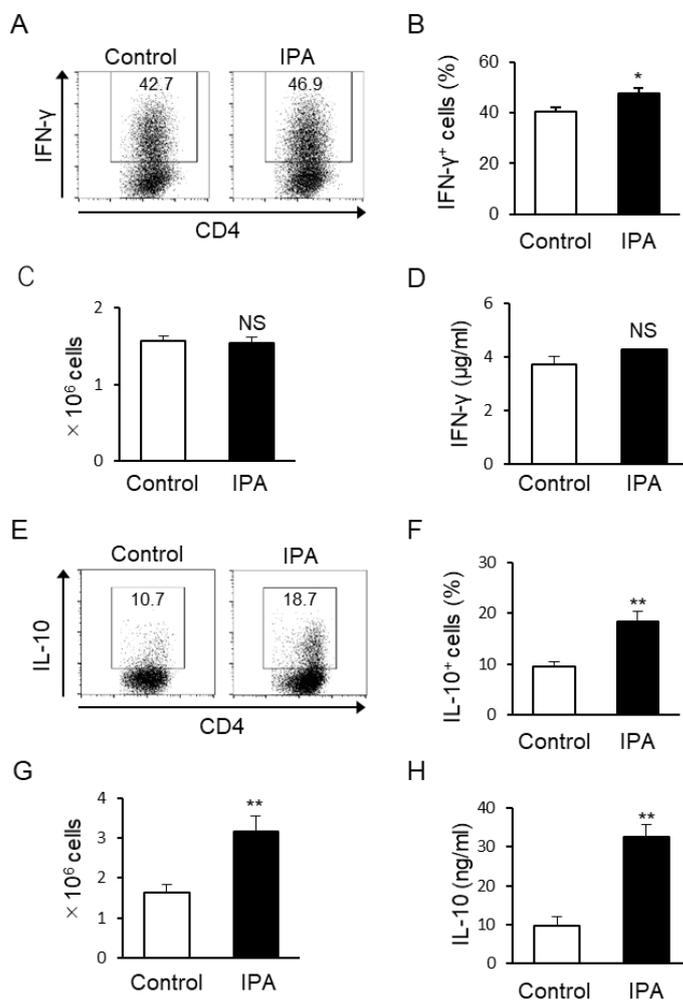
補足図 3-5

インドール-3-ピルビン酸は T 細胞媒介大腸炎モデルの大腸 LPL CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-22<sup>+</sup>細胞および Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合に影響をおよぼさない

SCID マウス(n=5/群)に BALB/c マウス由来 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞( $1 \times 10^6$  cells)を腹腔投与した。MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間経口摂取させた(順に MF 群、IPA 群)。大腸 LPL について細胞内の Foxp3 発現および細胞内の IL-22 発現を解析した。Foxp3 の細胞内染色は以下のようにして行った。LPL を Fixable Viability Dye で氷上、15 min 染色した。洗浄後、細胞表面を anti-CD16/32 存在下、allophycocyanine-eFour 780-conjugated anti-CD4 で 4°C、20 min 染色した。細胞を洗浄し、Fixation/Permeabilization buffer (eBioscience)で、室温、1 hr 固定した。Permeabilization buffer (eBioscience)で洗浄後、細胞を anti-Foxp3-PE (eBioscience)で、室温、30 min 染色した。細胞を Permeabilization buffer で 2 回洗浄し、Gallios フローサイトメーターで解析した。細胞内 IL-22 染色は、anti-IL-22-PE を用い、3-2 (10) 細胞内サイトカイン染色による解析の方法に準じて行った。サンプルは Gallios フローサイトメーターにより解析した。(A) 大腸 LPL の viable CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-22 の発現をドットプロットで示した。(B) CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-22<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。NS は有意差なし(Student's *t* test)。(C) 大腸 LPL の viable CD4<sup>+</sup> T 細胞における Foxp3 の発現をドットプロットで示した。(D) CD4<sup>+</sup> T 細胞における Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。NS は有意差なし(Student's *t* test)。

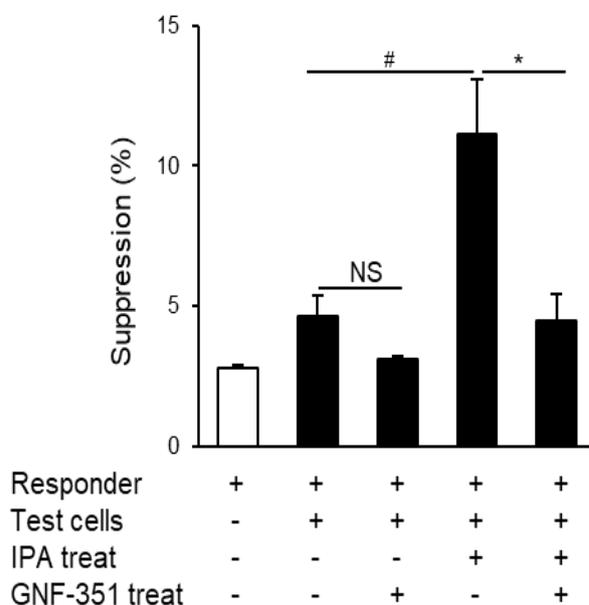
(4) インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* において Th1 細胞分化を阻害しないが Tr1 細胞分化を誘導する

インドール-3-ピルビン酸の経口摂取により大腸 LPL において Th1 細胞が抑制され、Tr1 細胞が増加することが示唆されたことから、その機構を解析することを目的に、インドール-3-ピルビン酸が Th1 細胞分化や Tr1 細胞分化に与える直接的な影響を調べた。Th1 細胞分化は IL-12 により誘導されるが(156)、Tr1 細胞分化は IL-27 と TGF- $\beta$  により誘導されることが報告されている(157)。そこで、BALB/c マウスから調製した naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を murine rIL-12 (Th1 分化誘導条件)または murine rIL-27、human rTGF- $\beta$  (Tr1 分化誘導条件)を含有する培地で、インドール-3-ピルビン酸の存在下または非存在下、anti-CD3 と anti-CD28 で活性化した。Th1 分化誘導条件では、インドール-3-ピルビン酸の添加はわずかに IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞を増加させたが(図 3-5A, B)、生細胞数や培地中に産生される IFN- $\gamma$  量には影響を与えなかった(図 3-5C, D)。一方、Tr1 分化誘導条件では、インドール-3-ピルビン酸の処理は、IL-10<sup>+</sup>細胞の割合を有意に増加させ(図 3-5E, F)、生細胞数および培地中に産生される IL-10 量を有意に増加させた(図 3-5G, H)。また、インドール-3-ピルビン酸の処理により Tr1 細胞の抑制活性も有意に高まった(補足図 3-6)。なお、TGF- $\beta$ 、IL-27 の非存在下では、インドール-3-ピルビン酸は CD4<sup>+</sup> T 細胞の IL-10 産生を増強できなかった(data not shown)。以上より、インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* では Th1 細胞分化を阻害せず、Tr1 細胞分化を促進することが示された。



**図 3-5 インドール-3-ピルビン酸は *in vitro* では Th1 細胞分化を抑制せず Tr1 細胞分化を促進する**

(A-D) Th1 細胞分化におけるインドール-3-ピルビン酸の効果を調べた。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を、rIL-12 を含有する培地でインドール-3-ピルビン酸の存在下(IPA)または非存在下(Control)、anti-CD3 と anti-CD28 で活性化した。(A) viable CD4<sup>+</sup> T 細胞における IFN-γ の発現をドットプロットで示した。(B) CD4<sup>+</sup> T 細胞における IFN-γ<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。(C) 培養後の生細胞数を平均値±SD で示した。(D) 培養上清中の IFN-γ 量を平均値±SD で示した。(E-H) Tr1 細胞分化におけるインドール-3-ピルビン酸(IPA)の効果を調べた。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を、rIL-27 および rTGF-β を含有する培地でインドール-3-ピルビン酸の存在下(IPA)または非存在下(Control)、anti-CD3 と anti-CD28 で活性化した。(E) viable CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-10 の発現をドットプロットで示した。(F) CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-10<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。(G) 培養後の生細胞数を平均値±SD で示した。(H) 培養上清中の IL-10 量を平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01 (Student's *t* test)。NS は有意差なし。



補足図 3-6

インドール-3-ピルビン酸は AhR を介して Tr1 細胞の抑制活性を増強する

Tr1 分化誘導条件下で培養した CD4<sup>+</sup> T 細胞の抑制活性に対するインドール-3-ピルビン酸および AhR アンタゴニストの効果を調べた。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を rIL-27 および rTGF-β を含有する培地で anti-CD3 および anti-CD28 で活性化し、インドール-3-ピルビン酸(50 μM)および GNF-351 (1 μM)の存在下または非存在下で 4 日間培養し、抑制活性を測定するためのテスト細胞とした。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を 5 μM の CFSE で 37°C、15 min 染色し、レスポンド細胞として使用した。CD90.2 マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)を用いたネガティブセレクションによって BALB/c マウス脾臓から CD90.2<sup>-</sup>細胞を調製し、抗原提示細胞として使用した。テスト細胞(Tr1 分化誘導条件下インドール-3-ピルビン酸または GNF-351 存在下で培養した CD4<sup>+</sup> T 細胞、1 × 10<sup>5</sup>)を、レスポンド細胞(CFSE 標識 CD4<sup>+</sup> T 細胞、1 × 10<sup>5</sup>)および抗原提示細胞(CD90.2<sup>-</sup>細胞、2 × 10<sup>5</sup>)と混合し、anti-CD3 (1 μg/ml)で刺激し、3 日間培養した。細胞を回収し、死細胞を Fixable Viability Dye で氷上、15 min 染色した。洗浄後、細胞表面を anti-CD16/32 存在下、allophycocyanine-eFour 780-conjugated anti-CD4 で 4°C、20 min 染色した。細胞を 2 回洗浄し、Gallios フローサイトメーターにより CFSE 標識レスポンド細胞を解析した。テスト細胞の抑制活性は、CFSE 標識レスポンド細胞における非増殖細胞の割合を算出することで評価した。データは平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、#*p* < 0.05 (Student's *t* test)。NS は有意差なし。

(5) インドール-3-ピルビン酸は MLN 樹状細胞の Th1 細胞分化誘導能を抑制し、MLN において抗炎症作用のある CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞を増加させる

腸管の樹状細胞は継続的に腸管から MLN へ移動しており(158-160)、T 細胞の分化誘導において中心的な役割をはたすとともに、腸管免疫の恒常性維持において重要な役割を担っている(161-163)。そこで、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取が MLN 樹状細胞の T 細胞分化誘導能に与える影響を調べた。インドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 2 週間摂取した BALB/c マウスから MLN CD11c<sup>+</sup>細胞を調製し、anti-CD3 存在下で、脾臓由来 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞と共培養した。インドール-3-ピルビン酸を摂取したマウス MLN 樹状細胞と共培養した CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  量は、対照マウス由来の樹状細胞と培養した場合に比べ有意に少なかった(図 3-6A)。一方、IL-10 量に関しては有意な差は認められなかった(図 3-6B)。この結果から、インドール-3-ピルビン酸の摂取により、MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能が抑制されていることが示唆された。この知見に一致して、インドール-3-ピルビン酸を経口摂取した BALB/c マウスの大腸 LPL および MLN の Th1 細胞の割合は対照マウスに比べ有意に抑制されていた(図 3-6 C, D, E, F)。

MLN 樹状細胞は CD103 および CD11b の発現の違いにより 3 つのサブセット、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞に分けられる。MLN 樹状細胞のサブセットに与えるインドール-3-ピルビン酸の効果を調べるため、インドール-3-ピルビン酸を経口摂取した BALB/c マウスから MLN 細胞を調製し、CD11c、CD103、CD11b の発現をフローサイトメトリーにより解析した。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は MLN における樹状細胞数には影響を与えなかったが(図 3-7A, B)、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の割合を有意に増加させ、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞の割合を有意に減少させた(図 3-7A, C)。

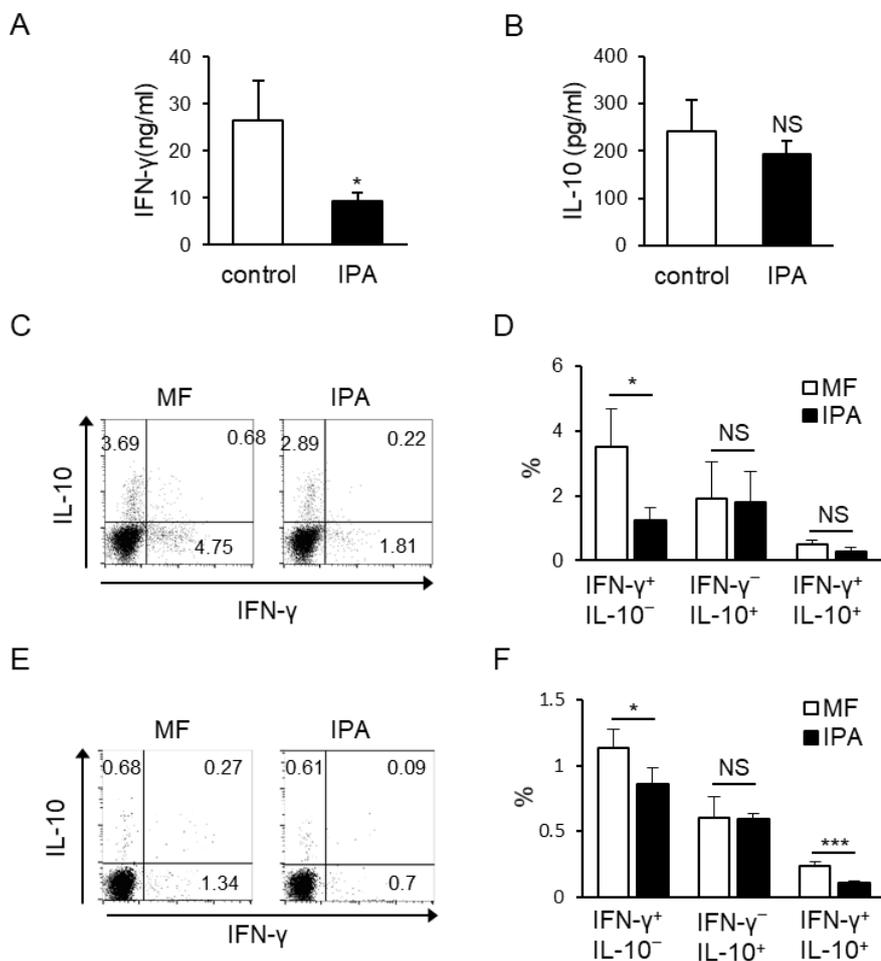


図 3-6

インドール-3-ピルビン酸は MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能を減弱させる

BALB/c マウス(n=4/群)に MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 2 週間経口摂取させた(順に control 群、IPA 群)。(A, B) CD11c マイクロビーズを用いて BALB/c マウスの MLN から樹状細胞として CD11c<sup>+</sup>細胞を精製した。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞と MLN の CD11c<sup>+</sup>細胞を共培養し、anti-CD3 で活性化した。培養上清中に産生される IFN-γ 量(A)と IL-10 量(B)を平均値±SD で示した。(C-F) 大腸 LPL および MLN 細胞の IFN-γ および IL-10 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。(C) 大腸 LPL の viable CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN-γ、IL-10 の発現をドットプロットで示した。(D) 大腸 LPL の CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN-γ<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup>細胞、IFN-γ<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup>細胞、IFN-γ<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。(E) MLN の viable CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN-γ、IL-10 の発現をドットプロットで示した。(F)MLN の CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN-γ<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup>細胞、IFN-γ<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup>細胞、IFN-γ<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、\*\*\**p* < 0.001 (Student's *t* test)。NS は有意差なし。

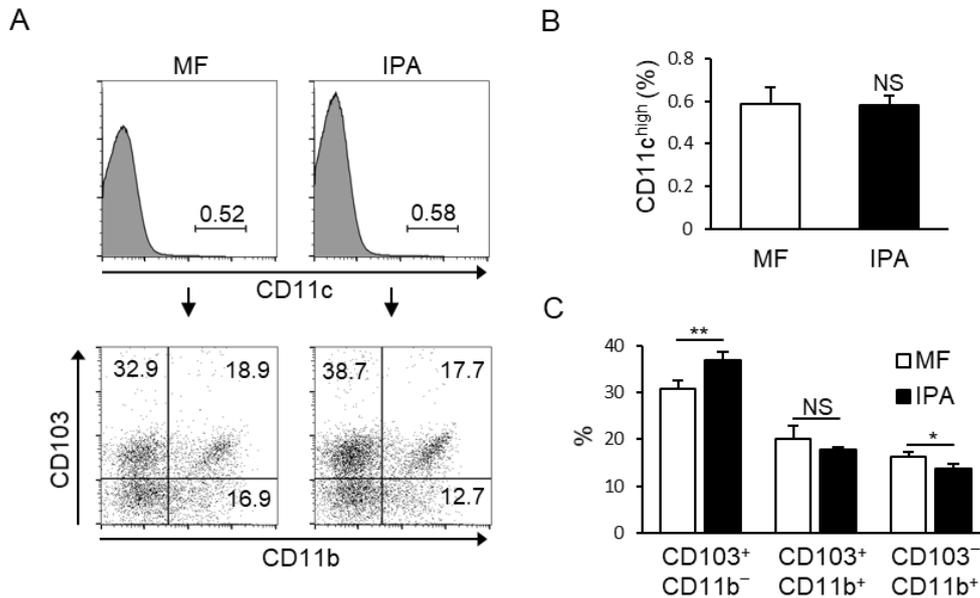
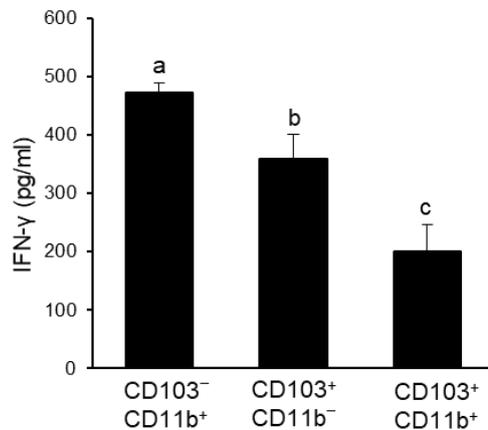


図 3-7 インドール-3-ピルビン酸は MLN において CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 樹状細胞を増加させる

(A-C) BALB/c マウス(n=4/群)に MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1% 含有する MF 飼料を 2 週間経口摂取させた (順に MF 群、IPA 群)。MLN 細胞の CD11c、CD103、CD11b の発現をフローサイトメトリーにより解析した。(A) MLN 細胞における CD11c 発現をヒストグラムで示し、MLN の CD11c<sup>high</sup> 細胞における CD103 および CD11b の発現をドットプロットで示した。(B) MLN における CD11c<sup>high</sup> 細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。(C) CD11c<sup>high</sup> 細胞における CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 細胞および CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> 細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01 (Student's *t* test)。NS は有意差なし。

次に、インドール-3-ピルビン酸によるこの MLN 樹状細胞サブセットの構成の変化が、MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能の減弱に関係しているかどうか調べるため、これらの樹状細胞サブセットそれぞれについて Th1 分化誘導能を調べた。インドール-3-ピルビン酸を経口摂取した BALB/c マウスから CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞を MoFlo によりソーティングし、それぞれ別々に naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞と anti-CD3 存在下で共培養した。その結果、CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  量は、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞と共培養した時に最も高くなることがわかった



**補足図 3-7 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞それぞれと共培養した時に培地中に産生される IFN-γ 量**

インドール-3-ピルビン酸を 0.1% 含有する MF 飼料を 2 週間経口摂取させた BALB/c マウスの MLN から、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> 細胞を FACS により精製した。精製した細胞 ( $1 \times 10^5$ ) と、BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を共培養し、anti-CD3 で 4 日間活性化した。培養上清中に産生される IFN-γ 量を ELISA により測定した。データは平均値 ± SD で示した。異符号間に有意差あり (Tukey's test,  $p < 0.05$ )。

(補足図 3-7)。これまでの研究でも、菌体成分による刺激のような明らかな刺激がない場合、IFN-γ の産生誘導は CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞に限定されることが報告されている(121)。このため、インドール-3-ピルビン酸摂取による MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能の低下には、CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞の減少が関係していることが示唆された。

続いて、インドール-3-ピルビン酸により誘導される CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 樹状細胞が大腸炎を抑制できるかどうか調べた。CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 樹状細胞を、インドール-3-ピルビン酸を経口摂取した BALB/c マウスの MLN から調製し、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞とともに SCID マウスの腹腔に移入した。CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 樹状細胞の移入は増体に有意な改善効果を示さなかったものの(図 3-8A)、大腸炎症の症状を有意に改善した(図 3-8B-D)。これらの結果からインドール-3-ピルビン酸により誘導される MLN の CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> 樹状細胞は腸管免疫の恒常性を維持する制御性の細胞であることが示唆された。

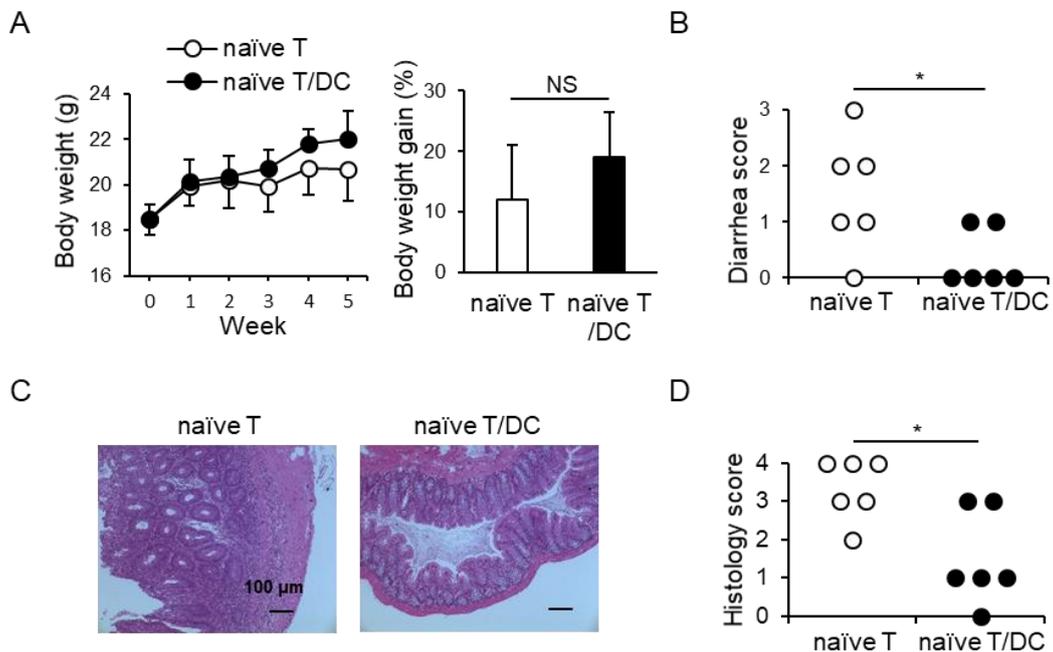


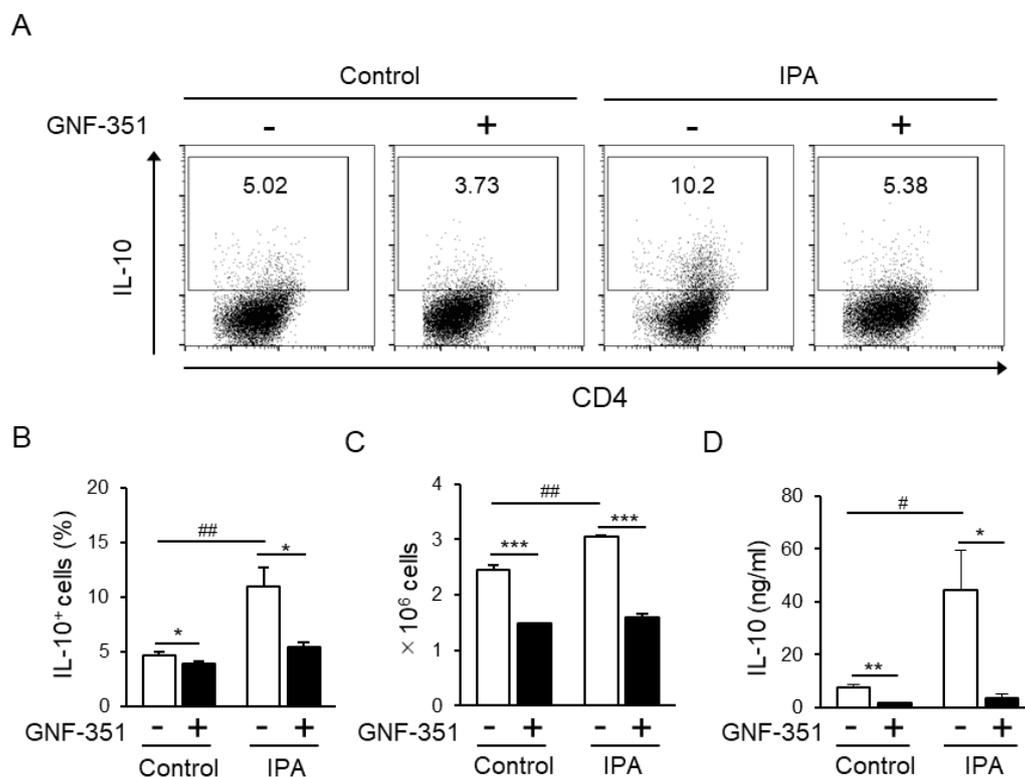
図 3-8 インドール-3-ピルビン酸により増加する  $CD103^+ CD11b^-$  樹状細胞は抗炎症性の細胞である

(A-D)インドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を経口摂取させた BALB/c マウスから MLN 細胞を調製し、 $CD103^+ CD11b^- CD11c^{high}$  細胞を FACS により精製した。SCID マウス(n=6/群)に BALB/c マウス由来 naïve  $CD4^+$  T 細胞( $1 \times 10^6$  cells)を単独、または精製した  $CD103^+ CD11b^- CD11c^{high}$  細胞( $1 \times 10^5$  cells)とともに腹腔投与した(順に naïve T 群、naïve T/DC 群)。(A) 体重変化(左)と増体(右)を平均値 $\pm$ SD で示した。(B) 5 週間後の下痢スコアを示した。\* $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test)。(C) HE 染色大腸切片の顕微鏡写真。(D) 大腸切片の炎症スコア。\* $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test)。

(6) AhR アンタゴニストはインドール-3-ピルビン酸の Tr1 分化誘導促進作用や  $CD103^+ CD11b^-$  樹状細胞誘導作用を阻害し、大腸炎症抑制作用を減弱する

これまでに観察されたインドール-3-ピルビン酸の作用が AhR を介しているかどうか不明だったため、続いて、これを明らかにすることを目的に検討を行った。まず、AhR アンタゴニストがインドール-3-ピルビン酸の Tr1 分化誘導促進作用を阻害するかどうか調べた。AhR アンタゴニストとしては、アゴニスト

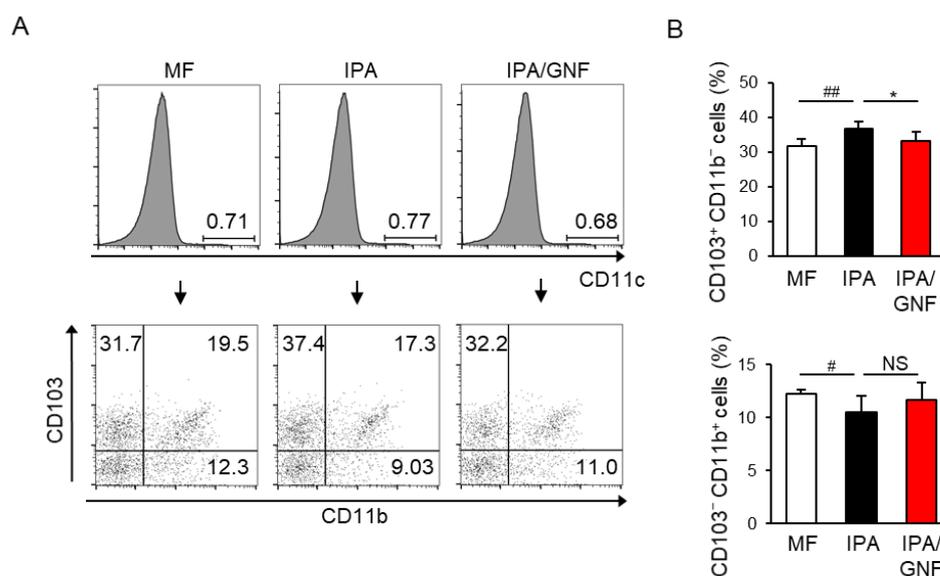
活性がないことが示されている GNF-351 を用いた(164)。GNF-351 の添加は、Tr1 分化誘導時におけるインドール-3-ピルビン酸の IL-10<sup>+</sup>細胞の割合の増加作用、生細胞数の増加作用、および培養上清中に産生される IL-10 量の増加作用をすべて阻害した(図 3-9A-D)。さらに GNF-351 の添加はインドール-3-ピルビン酸の Tr1 細胞の抑制活性の増強を有意に阻害した(補足図 3-6)。



**図 3-9 AhR アンタゴニストは  
インドール-3-ピルビン酸の Tr1 分化誘導能を阻害する**

(A-D) インドール-3-ピルビン酸の Tr1 細胞分化促進作用に対する AhR アンタゴニストの効果を調べた。BALB/c マウス由来の naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を、rIL-27 および rTGF-β を含有する培地で、インドール-3-ピルビン酸、GNF-351 の存在下または非存在下、anti-CD3 と anti-CD28 で活性化した。(A) viable CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-10 の発現をドットプロットで示した。(B) CD4<sup>+</sup> T 細胞における IL-10<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。(C) 培養後の生細胞数を平均値±SD で示した。(D) 培養上清中の IL-10 量を平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01、\*\*\**p* < 0.001、#*p* < 0.05、##*p* < 0.01 (Student's *t* test)。

続いて、インドール-3-ピルビン酸により誘導される MLN 樹状細胞サブセットの構成割合の変化が GNF-351 により阻害されるかどうか調べた。GNF-351 が AhR アンタゴニストとして作用できるのは 12 hr であると報告されている(164)。そこで、BALB/c マウスに GNF-351 を 1 日 2 回腹腔投与し、インドール-3-ピルビン酸を 2 週間経口摂取させた。その後、MLN 細胞の CD11c、CD103、CD11b の発現をフローサイトメトリー解析した。その結果、インドール-3-ピルビン酸により誘導される MLN の CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の割合の増加は、GNF-351 処理により有意に阻害されることがわかった(図 3-10A, B)。一方、インドール-3-ピルビン酸により誘導される CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>樹状細胞の減少に対しては、GNF-351 処理による有意な阻害作用は認められなかった(図 3-10A, B)。



**図 3-10 AhR アンタゴニストはインドール-3-ピルビン酸による CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の増加を抑制する**

(A-B) BALB/c マウス(n=6/群)に MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1% 含有する MF 飼料を 2 週間経口摂取させ、溶媒コントロールおよび GNF-351 を 1 日 2 回、腹腔投与した(順に MF 群、IPA 群、IPA/GNF 群)。MLN 細胞の CD11c、CD103、CD11b の発現をフローサイトメトリーにより解析した。(A) MLN 細胞における CD11c 発現をヒストグラムで示し、MLN の CD11c<sup>high</sup> 細胞における CD103 および CD11b の発現をドットプロットで示した。(B) CD11c<sup>high</sup> 細胞における CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>細胞、CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>細胞および CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>細胞の割合(%)を平均値±SD で示した。\**p* < 0.05、#*p* < 0.05、##*p* < 0.01 (Student's *t* test)。NS は有意差なし。

最後に、GNF-351 がインドール-3-ピルビン酸の抗炎症作用を阻害するかどうか調べた。大腸炎症を誘導するために SCID マウスの腹腔に naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入した後、GNF-351 を 1 日 2 回、5 週間腹腔投与した。GNF-351 の投与はマウスの増体に対しては有意な影響を与えなかったものの(図 3-11A)、インドール-3-ピルビン酸の抗炎症作用を有意に阻害した(図 3-11B-D)。

以上の結果から、インドール-3-ピルビン酸による Tr1 分化誘導促進、MLN 樹状細胞のサブセットの構成変化、大腸炎症の抑制には AhR が関与していることが示された。

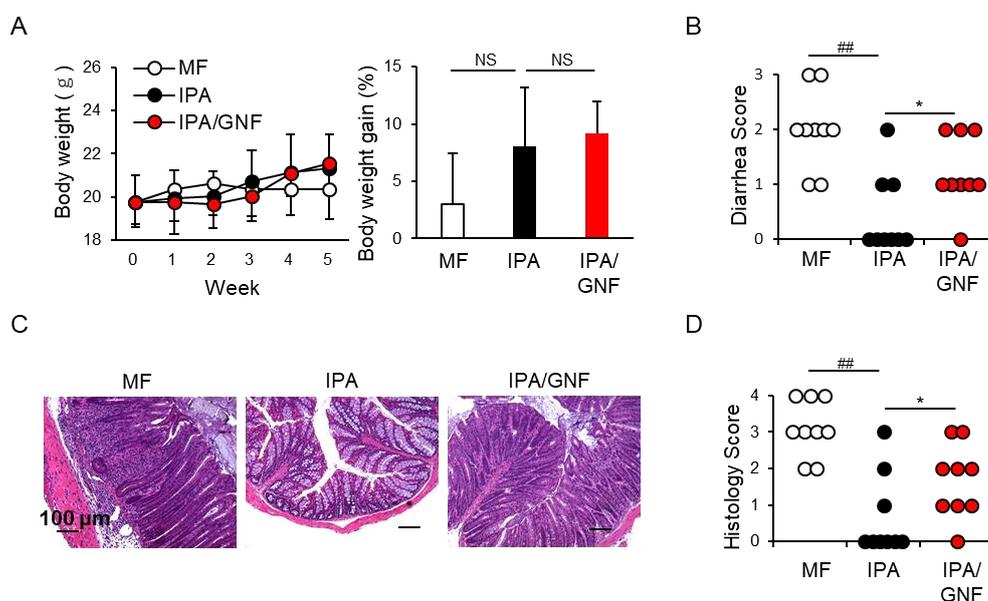


図 3-11

**AhR アンタゴニストはインドール-3-ピルビン酸の抗炎症作用を阻害する**

(A-D) SCID マウス(n=6/群)に BALB/c マウス由来 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞(1 × 10<sup>6</sup> cells)を腹腔投与した。MF 飼料、またはインドール-3-ピルビン酸を 0.1%含有する MF 飼料を 5 週間経口摂取させ、溶媒コントロールおよび GNF-351 を 1 日 2 回、腹腔投与した(順に MF 群、IPA 群、IPA/GNF 群)。(A) 体重変化(左)と増体(右)を平均値 ± SD で示した。統計処理は Student's *t* test で行った。NS は有意差なし。(B) 5 週間後の下痢スコアを示した。\**p* < 0.05、##*p* < 0.01 (Mann-Whitney U test)。(C) HE 染色大腸切片の顕微鏡写真。(D) 大腸切片の炎症スコア。\**p* < 0.05、##*p* < 0.01 (Mann-Whitney U test)。

### 3-4. 考察

本研究では、調べた芳香族ピルビン酸のうちインドール-3-ピルビン酸にのみ IBD モデルの大腸炎症を抑制する作用があることを明らかにした。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸はインドール-3-ピルビン酸と同様に AhR アゴニスト活性を有するが、大腸炎症に対しては抑制作用を示さなかった。これは、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸が大腸において AhR 活性化能を失ってしまうためであると考えられる。実際、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を経口摂取したマウスの大腸では、AhR 活性化マーカーである *Cyp1a1* の発現の上昇は認められず、糞便上清の AhR 活性化能もインドール-3-ピルビン酸と違い上昇を認めなかった。インドール-3-ピルビン酸は 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸よりも強い AhR 活性化能を有しており、また、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸とは異なり腸管において AhR アゴニストに変換される可能性がある。これらのことからインドール-3-ピルビン酸は、消化管に効果的に AhR アゴニストを届けることができる有望な薬剤であると考えられる。IBD 患者の糞便では、微生物由来の AhR アゴニストであるインドール-3-酢酸が減少しており、健常人より糞便の AhR 活性化能が低下していることが報告されている(165)。さらに、IBD の感受性遺伝子である *Card9* を欠損するマウスでは、腸内細菌叢の変動により腸内の AhR アゴニスト生産能が低下しており、それにより大腸炎症に対して感受性が高まっていることが報告されている(165)。これらのことから、消化管に適切な AhR アゴニストを届けることは、IBD の治療において魅力的な戦略になると考えられる。本章ではデータを示さなかったが、インドール-3-ピルビン酸は上述のインドール-3-酢酸よりも高い AhR 活性化能を有していることもわかっている。効果的な AhR 活性化剤であるインドール-3-ピルビン酸は、IBD 患者に対する強力な免疫調節療法になるかもしれない。

いくつかの AhR アゴニストは IL-22 の誘導を介して粘膜のバリア機能を高めることが知られている(137, 138)。しかしながら、本研究では、インドール-3-ピル

ビン酸の経口摂取は、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入した SCID マウスの大腸において、IL-22 の遺伝子発現や IL-22<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を増加させなかった。このことから、インドール-3-ピルビン酸は IL-22 の誘導とは別の機構により大腸炎症を抑制している可能性がある。本研究では、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取により大腸 LPL の T 細胞サブセットの構成が変動すること、および MLN の樹状細胞サブセットの構成が変動することを明らかにした。

近年の研究により、AhR アゴニストは T 細胞サブセットの分化や活性化を制御することがわかってきている(166-169)。TCDD は Foxp3<sup>+</sup> Treg の分化を誘導する一方で、FICZ は Th17 の分化を誘導する(166)。さらに、AhR は c-MAF と相乗的に働いて Tr1 の分化を促進する(169)。したがって、AhR は実験条件や使用する AhR アゴニストの種類によって、T 細胞に対する影響が異なると考えられている。本研究では、インドール-3-ピルビン酸は、T 細胞移入大腸炎モデルの大腸 LPL において、IL-10 生産性の T 細胞を増加させることを明らかにした。AhR アゴニストの一つである ITE は、LPL の T 細胞に対して IL-10 だけでなく Foxp3 の発現を上昇させることが報告されているが(136)、インドール-3-ピルビン酸は Foxp3 の遺伝子発現は上昇させず、Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合も増加させなかった。これらの知見は、インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入の大腸炎モデルにおいて Foxp3<sup>+</sup> Treg ではなく Tr1 細胞の分化を促進することを示唆している。実際、本研究ではインドール-3-ピルビン酸が *in vitro* において Tr1 分化誘導を促進することを明らかにした。Tr1 細胞は高い IL-10 産生によって特徴付けられ、腸管免疫の恒常性において重要な役割を担っていることが知られている(170)。Tr1 細胞は大腸炎を抑制することから(116)、大腸 LPL において Tr1 細胞を増加させる作用は、インドール-3-ピルビン酸の抗炎症効果の作用機構の一つであるかもしれない。

インドール-3-ピルビン酸は T 細胞移入大腸炎モデルの大腸 LPL において Th1 細胞の割合を低下させた。Th1 細胞はこのモデルにおける炎症発症の要因であるため(65)、Th1 細胞の増加を阻害することはインドール-3-ピルビン酸による大腸

炎症抑制において重要な作用機構であるように見える。本研究では、正常 BALB/c マウスの大腸 LPL および MLN における Th1 細胞数がインドール-3-ピルビン酸の投与により減少することも明らかにした。さらに、インドール-3-ピルビン酸は Th1 分化を直接阻害する作用は有してはいないこと、一方で、MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能を低下させる作用があることを明らかにした。これらのことから、インドール-3-ピルビン酸による大腸 LPL における Th1 細胞の減少の原因の一部は、MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能の低下によるものと考えられた。

本研究では、インドール-3-ピルビン酸の経口摂取により MLN において CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞が減少する一方、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞が増加することを見出した。加えて、本研究ではこの MLN 樹状細胞のサブセット構成変化が MLN 樹状細胞の Th1 分化誘導能の低下に関係している可能性があること、また、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞が T 細胞移入大腸炎モデルの腸管炎症を抑制することを明らかにした。これらの結果は MLN における樹状細胞サブセット構成の変化がインドール-3-ピルビン酸による大腸炎症の抑制に関係していることを示唆する。樹状細胞サブセットの構成の変化がどのような機構によって生じるかについては不明であるが、本研究は、AhR 活性化剤によって CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞が増加することを明らかにした初めての研究である。これまでに、いくつかの研究が CD103 と AhR の関係を示唆している。Chng らは、CD11c<sup>+</sup>細胞特異的に AhR を欠損するマウスは、CD103<sup>+</sup>樹状細胞が少ないことを報告している(171)。興味深いことにこのマウスは DSS 誘導性大腸炎に対して高い感受性を示すことがわかっており、樹状細胞における AhR の発現が粘膜免疫の恒常性において重要な役割をはたしていることが示唆されている(171)。加えて、TCDD の投与により、TNBS で処理したマウスの MLN および大腸において CD103<sup>+</sup>樹状細胞の割合が増加することも報告されている(135)。インドール-3-ピルビン酸がどのように MLN の CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞を増加させるのかは、今後の興味深い研究テーマである。

Muzaki らは CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞が腸管 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を介して、腸

管上皮細胞に対して可逆的な早期の抗炎症反応を誘導することで大腸炎を抑制することを明らかにした(132)。この知見は、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は Th1 誘導能が低いという本研究の結果と一見異なっているように見える。しかしながら、この食い違いはCD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞の定常状態と炎症状態における機能の違いで説明できるかもしれない。Muzaki らが明らかにした CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞による腸管の T 細胞を介した IFN- $\gamma$  の誘導は DSS 処理によって誘導されるものであり、定常状態では誘導されない(132)。また、腸管が炎症状態にある樹状細胞特異的 A20 欠損マウスでは、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞が強力に Th1 分化を誘導する一方で、定常状態にある野生型マウスでは、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は非常に弱い Th1 分化誘導能しかもたないことが報告されている(123)。Muzaki らは CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は定常状態においては腸管の T 細胞のバランスをとることで恒常性の維持に寄与している可能性があるとして述べている(132)。実際、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞を欠損するマウスでは、大腸において Th1 細胞の減少と Foxp3<sup>+</sup>Treg のわずかな減少が認められる(172)。また、programmed death-ligand 1 を高発現する CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は Foxp3<sup>+</sup>Treg 誘導能を有していることが報告されている(130)。したがって、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は定常状態においては Th1 細胞と Foxp3<sup>+</sup>Treg のバランスをとることで腸管の恒常性を維持しているかもしれない。DSS モデルとは異なり T 細胞移入大腸炎モデルは、病原性の T 細胞の増加を伴って定常状態から徐々に炎症状態に移行する炎症モデルである。そのため、本研究で用いたモデルでは、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>樹状細胞は急性の IFN- $\gamma$  誘導応答ではなく定常状態において働く恒常性維持機構を介して炎症の発生を抑制している可能性がある。

インドール-3-ピルビン酸が樹状細胞の機能に直接影響を与える可能性も存在する。AhR アゴニストは樹状細胞の自然免疫や免疫調節作用を変化させることが知られている(173-176)。FICZ や ITE といった AhR アゴニストは、ヒト単球から誘導した樹状細胞の Th1 分化誘導能および Th17 分化誘導能を阻害することが報

告されている(175)。一方、TCDD やインドール-3-カルバノール、インジルビン-3'-オキシムといった AhR アゴニストは、骨髄細胞から誘導した樹状細胞の Foxp3<sup>+</sup> Treg 分化誘導能を高めることが報告されている(174, 176)。インドール-3-ピルビン酸は FICZ を産生することが報告されているため(177)、インドール-3-ピルビン酸は樹状細胞に直接働いて Th1 分化誘導能を阻害する可能性もある。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取が樹状細胞の機能に影響を与えるかどうかについては今後検討する必要がある。

結論として、本研究は、インドール-3-ピルビン酸が IL-10 産生 T 細胞の増加と Th1 細胞の減少を誘導し、大腸炎症を抑制することを明らかにした。インドール-3-ピルビン酸の経口摂取は T 細胞および MLN 樹状細胞の構成を変化させることで抗炎症作用を発揮している可能性がある。効果的な AhR 活性化剤であるインドール-3-ピルビン酸は、IBD に対する有望な治療薬となるかもしれない。

## 第4章 卵白リゾチームの加熱凝集による *Lactococcus* 属乳酸菌体の IL-12 誘導能の増強

### 4-1. 緒言

*Lactococcus* 属乳酸菌はグラム陽性菌であり、チーズやヨーグルト、漬物などの発酵食品に含まれる。*Lactococcus* 属乳酸菌には免疫調節作用(10, 178)や抗老化作用(179)などの健康機能が報告されている。

IL-12 は樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞が産生するサイトカインであり、Th1 細胞分化を強力に誘導する。Th1 細胞は Th2 細胞の反応を抑制することでアレルギーのリスクを抑えると考えられている。乳酸菌は樹状細胞やマクロファージに対して IL-12 産生を誘導するが、その作用は菌株ごとで異なる(8)。このため、多くの研究で抗アレルギーを期待して IL-12 誘導能の強い乳酸菌株が選抜されている(8-10)。

卵白リゾチームは *N*-アセチルムラミダーゼとして知られ、細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン溶解する活性がある(180)。*Lactobacillus* 属乳酸菌の IL-12 誘導能において細胞壁の重要性が報告されていたことから(9, 181)、*Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導における細胞壁の重要性について卵白リゾチームを用いて検討していたところ、予想外に、卵白リゾチームと菌体を加熱することで菌体の IL-12 誘導能が増強することを見出した。このときの菌体の状態を確認すると、卵白リゾチームが菌体に加熱凝集していることがわかった。菌体の IL-12 誘導能を増強する方法は、乳酸菌に抗アレルギー機能を付与できる可能性があるため、非常に有用である。そこで本研究では、卵白リゾチームの菌体への加熱凝集が IL-12 産生を増強する機構を明らかにすることを目的とした。卵白リゾチームの加熱凝集による IL-12 誘導能の増強が菌株特異的かどうか調べるため、*Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株を用い、J774.1 細胞や脾臓細胞に対する応答を調べた。さらに、この作用が卵白リゾチーム特異的かどうか、また、どのように IL-12 誘導能を増強するのかを調べるため、卵白リゾチーム

の加熱凝集に加え、他の食品タンパク質の加熱凝集が菌体に与える影響についても検討した。

## 4-2. 材料および方法

### (1) 試薬類

卵白リゾチームは **Sigma-Aldrich** から購入した。オボアルブミンは白色レグホンの新鮮卵から文献の方法に従い粗精製後(182)、イオンカラムクロマトグラフィーにより精製した。 $\beta$ -ラクトグロブリンおよび $\alpha$ -ラクトアルブミンは **Aschaffenburg** らの方法に従い(183)、新鮮生乳から調製後、イオンクロマトグラフィーにより精製した。これらの純度は電気泳動により確認した。**Cytochalasin D** と lipopolysaccharide O55:B5 (**LPS**)は **Sigma-Aldrich** から購入した。リゾチーム阻害剤である **Chitotriose** は生化学バイオビジネス(東京)から購入した。**fluorescein isothiocyanate isomer-1 (FITC)**は同仁化学研究所(熊本)から購入し、**4',6-diamindino-2-phenylindole (DAPI)**は和光純薬から購入した。

### (2) マウス

**BALB/c** マウス(メス)は日本チャールズリバーから購入し、6週齢から8週齢を使用した。動物実験は農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験ガイドラインに従い、動物実験委員会の承認のもと行った。

### (3) 乳酸菌の調製

本章で使用した *Lactococcus* 属乳酸菌株は表 4 に示した。乳酸菌株はラクトーシの代わりに 0.5%グルコースを加えた **M17** 培地(**BD Difco, Detroit, MI**)で培養し、48 hr、30°Cで増殖させた。培養した乳酸菌は生理食塩水で2回洗浄し、620 nmの光学濃度(**OD<sub>620</sub>**)が 1.0 となるように生理食塩水に懸濁した。

表 4 第 4 章で使用した *Lactococcus* 属乳酸菌の菌株リスト

Species and strains	References
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
341, C60, C68, J50, O21, O29, S19	(184)
H-17, Hc-1, HP	Laboratory collection
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
342, 1175, 1256, 1257, 1260, 1263, C13, G50, H45,	(184)
H46, J44, J53, O06, O11, O19, O31, O52, O59, O62,	
P17, P79, Q14, Q20, S01	
S63	(185)
ATCC19435	ATCC
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
772, C59, C61, C66, H59, O07, O09, O10, O17, O20	(184)

#### (4) タンパク質加熱凝集死菌体の調製

乳酸菌( $1.0 \text{ OD}_{620}$ )をそれぞれ、生理食塩水、 $1 \text{ mg/ml}$ の卵白リゾチーム生理食塩水溶液、オボアルブミン生理食塩水溶液、 $\alpha$ -ラクトアルブミン生理食塩水溶液、 $\beta$ -ラクトグロブリン生理食塩水溶液に懸濁し、すぐに、 $50 \text{ min}$ 、 $100^\circ\text{C}$ で加熱処理した。これにより乳酸菌の加熱死菌体および、タンパク質が加熱凝集した死菌体を調製した。

卵白リゾチームの乳酸菌体への加熱凝集は免疫蛍光染色により確認した。加熱死菌体と卵白リゾチーム凝集加熱死菌体をウサギ抗卵白リゾチーム IgG 抗体 (Nordic Immunology, Tiburg, the Netherlands) で  $60 \text{ min}$ 、 $20^\circ\text{C}$  処理した。PBS で 3 回洗浄後、Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) で染色した。乳酸菌は DAPI ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) で  $60 \text{ min}$ 、室温で染色した。PBS で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (Axioplan2) で観察した。

#### (5) 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞である J774.1 細胞は American Type Culture Collection から購入した。マウス脾臓細胞は木元らの方法(10)に従い調製した。脾臓を BALB/c マウスから摘出後、すりつぶし、細胞をセルストレイナー (BD Biosciences) に通した。次に、細胞を ACK buffer ( $0.15 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ ,  $10 \text{ mM KHCO}_3$ ,  $0.1 \text{ mM EDTA}$ ,  $\text{pH}7.2$ ) で処理し、赤血球を溶血させた。J774.1 細胞とマウス脾臓細胞は complete RPMI 培地で、 $5\% \text{ CO}_2$  下、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。

#### (6) IL-12 の産生誘導試験

J774.1 細胞( $1 \times 10^5$ )を 96 ウェルプレートに播種し、加熱死菌体(終濃度  $0.01 \text{ OD}_{620}$ )またはタンパク質加熱凝集死菌体(同等量)と  $200 \mu\text{l}$  の complete RPMI 培地で培養した。24 hr 後、培養上清を回収し、上清中の IL-12p40 量を ELISA (BD PharMingen)により測定した。いくつかの実験では、J774.1 細胞を cytochalasin D

(5 µg/ml)または chitotriose (1 mM)で 30 min、前処理した。マウス脾臓細胞( $8 \times 10^5$ )は 96 ウェルプレートに播種し、加熱死菌体(終濃度 0.001 OD<sub>620</sub>)またはタンパク質加熱凝集死菌体(同等量)と 200 µl の complete RPMI 培地で培養した。96 hr 後、培養上清を回収し、上清中の IL-12p70 量を ELISA (BD PharMingen)により測定した。

#### (7) マクロファージ細胞による乳酸菌体貪食の評価

乳酸菌(1.0 OD<sub>620</sub>)を 0.1 mg/ml FITC, 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液(pH 9.0)に懸濁し、4°Cで一晩処理した。生理食塩水で 3 回洗浄後、生理食塩水またはタンパク質溶液に懸濁後、100°C、50 min、加熱処理することで FITC ラベル化サンプルを調製した。J774.1 細胞( $1 \times 10^5$ )を 96 ウェルプレートに播種し、FITC ラベル加熱死菌体(終濃度 0.01 OD<sub>620</sub>)またはタンパク質加熱凝集 FITC ラベル死菌体(同等量)と 1 hr、complete RPMI 培地で培養した。細胞を 3 回 PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドに懸濁し、氷上で 15 min、固定した。PBS で洗浄後、細胞の平均蛍光強度と菌体貪食率をフローサイトメーター(FACSort, BD Biosciences)を用いて解析した。

#### (8) 菌体の疎水性度の評価

菌体の疎水性度の評価は Roseberg らの方法(186)を一部改変して行った。生理食塩水に懸濁してある加熱死菌体またはタンパク質加熱凝集死菌体 1.2 ml を蒸留水で洗浄し、等量の蒸留水に懸濁した後、OD<sub>620</sub> を測定した(OD<sub>620before</sub>)。菌体懸濁液を試験管に入れ、1 ml の *n*-hexadecane (ナカライテスク)を加えた。30°Cで 10 min 処理後、120 sec ボルテックスした。15 min 放置し、水層と *n*-hexadecane 層を分離させた。水層を別の試験官に移し、OD<sub>620</sub> を測定した(OD<sub>620after</sub>)。菌体の疎水性度は次式で求めた。

$$\text{菌体の疎水性度(\%)} = (\text{OD}_{620\text{before}} - \text{OD}_{620\text{after}}) / \text{OD}_{620\text{before}} \times 100$$

#### (9) 乳酸菌細胞壁の分解度の評価

乳酸菌細胞壁のリゾチーム耐性を調べるため、加熱死菌体とタンパク質加熱凝集死菌体を 100 µg/ml リゾチーム、リン酸緩衝液(pH 6.2)で 24 hr、37°C処理した。PBS で 3 回洗浄後、菌体をメタノールで 10 min 固定し、ギムザ染色(ナカライテスク)後、光学顕微鏡で菌体の状態を観察した。

菌体のマクロファージ分解に対する耐性を調べるため、J774.1 細胞( $5 \times 10^5$ )と加熱死菌体またはタンパク質加熱凝集死菌体(終濃度 0.001 OD<sub>620</sub>)を、24 ウェルプレート内直径 13-mm のカバーガラス上で、24 hr 培養した。PBS で 3 回洗浄後、メタノールで 10 min 固定し、ギムザ染色を行い、マクロファージ内の菌体の状態を光学顕微鏡で観察した。

#### (10) 統計処理

菌体の疎水性度と食食率または IL-12 量と食食率に関して相関関係を調べ、ピアソン相関係数(r)を求めた。 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### 4-3. 結果

#### (1) 卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の観察

*Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株を培養後、生理食塩水で洗浄し、1 mg/ml の卵白リゾチーム生理食塩水に懸濁し、100°C、50 min 加熱処理し、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を調製した。代表菌株として C59 株を用い、抗卵白リゾチーム抗体により免疫蛍光染色を行った。染色した菌体を蛍光顕微鏡で観察したところ、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体では、卵白リゾチームが菌体を個別に覆っていることがわかった(図 4-1)。また、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体は細胞壁が分解されておらず、J774.1 細胞に対する IL-12p40 誘導能も数週間安定して認められたことから(data not shown)、菌体周囲の卵白リゾチームは細胞壁溶解活性を失っていると考えられた。

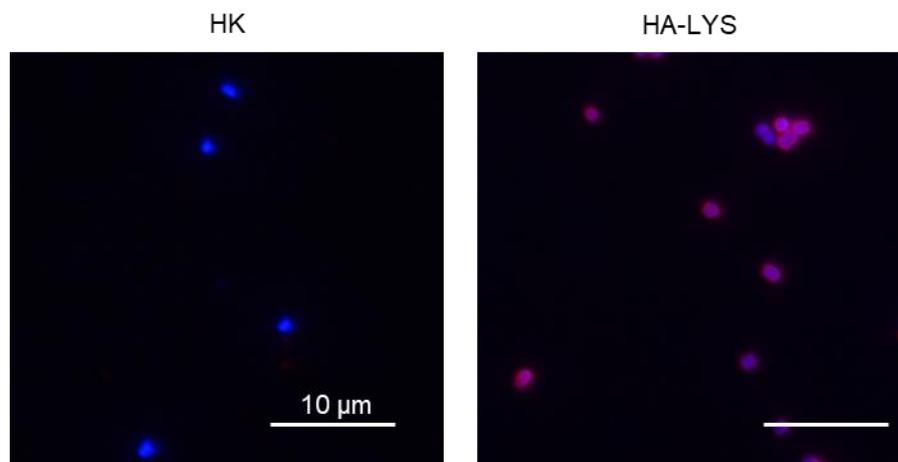


図 4-1 加熱死菌体と卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の免疫蛍光染色写真

C59 株の加熱死菌体(HK)と卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)をそれぞれ、DAPI(青)と抗卵白リゾチーム抗体(赤)で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。卵白リゾチーム加熱凝集死菌体では卵白リゾチームが菌体周囲を覆っているのがわかる。

## (2) J774.1 細胞と脾臓細胞に対する卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の IL-12 誘導能

続いて、*Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株の加熱死菌体および卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の J774.1 細胞と脾臓細胞に対する IL-12 誘導能を調べた。その結果、H-17、Hc-1、J50、O21、O17 の 5 菌株を除くすべての菌株で、加熱死菌体より卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の方が IL-12p40 誘導能が高いことがわかった(図 4-2A)。脾臓細胞では、すべての菌株で卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の方が IL-12p70 誘導能が高かった(図 4-2B)。これらのことから、卵白リゾチームの加熱凝集による IL-12 誘導能の増強は菌株に依存しないことがわかった。一方、加熱処理した卵白リゾチームの添加は加熱死菌体に対する J774.1 細胞の IL-12p40 産生を高めなかったことから(data not shown)、IL-12 産生の増強には卵白リゾチームが菌体周囲に凝集することが重要であると考えられた。

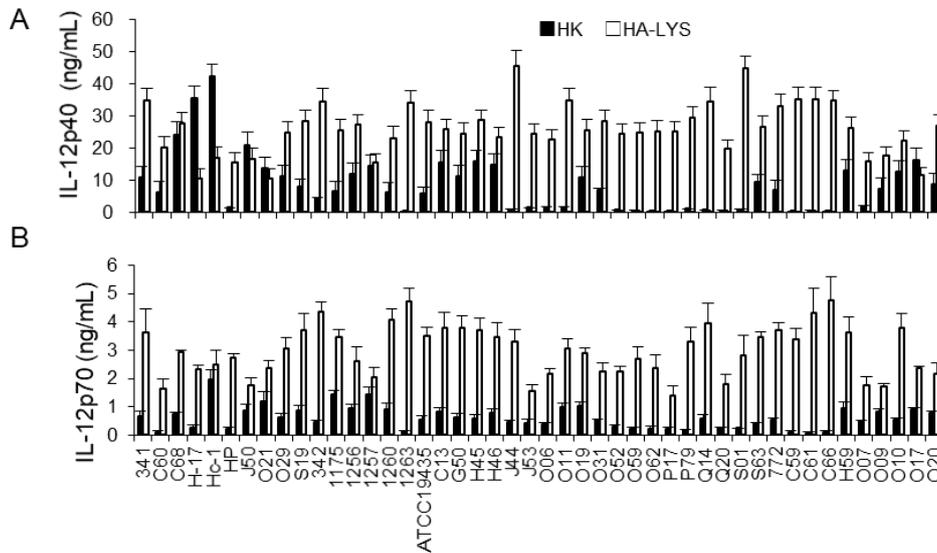


図 4-2 卵白リゾチームの加熱凝集が菌体の IL-12 誘導能に与える影響

*Lactococcus* 属 46 菌株の加熱死菌体(HK)と卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)をそれぞれ J774.1 細胞(A)と脾臓細胞(B)に添加した。培養後に産生される IL-12 を ELISA により測定した。データは平均値±SD で示した。

### (3) J774.1 細胞の貪食に対する卵白リゾチーム加熱凝集の効果

次に、卵白リゾチームの菌体への加熱凝集がマクロファージの貪食に与える影響を、J774.1 細胞を用いて調べた。*Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株の FITC ラベル加熱死菌体、または FITC ラベル卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を J774.1 細胞と 1 hr 共培養し、洗浄後、細胞をフローサイトメーターで測定した。細胞の平均蛍光強度を解析したところ、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を貪食した J774.1 細胞の平均蛍光強度は、加熱死菌体を貪食した J774.1 細胞のものよりすべての菌株で高くなることがわかった (図 4-3)。細胞の平均蛍光強度は細胞が取り込んだ FITC ラベル化菌体の数の平均値と相関する。このため、J774.1 細胞は、加熱死菌体よりも卵白リゾチーム加熱凝集死菌体をより多く貪食していることがわかった。一方で、加熱処理卵白リゾチームの添加は J774.1 細胞の菌体貪食を高めなかった(data not shown)。これらのことから、卵白リゾチームが乳酸菌体に加熱凝集することが、菌体の貪食の促進に重要であると示唆された。

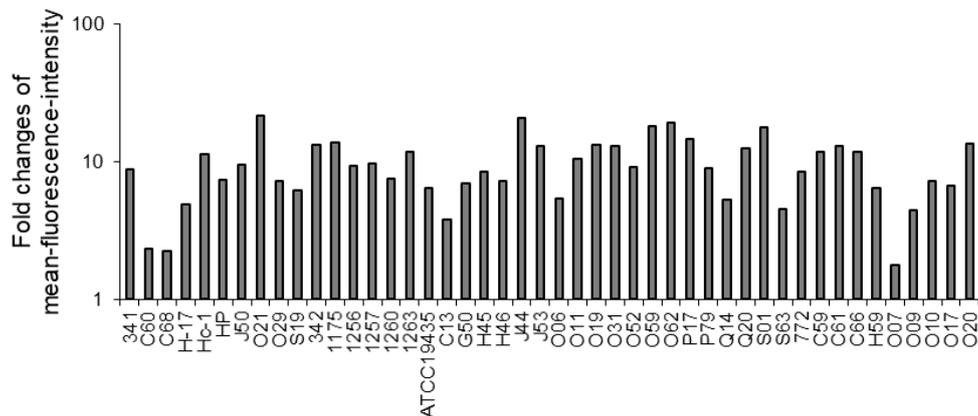


図 4-3  
菌体への卵白リゾチームの加熱凝集が J774.1 細胞の食食に与える影響

FITC で標識した *Lactococcus* 属乳酸菌 46 菌株の加熱死菌体と卵白リゾチーム加熱凝集死菌体をそれぞれ J774.1 細胞に添加した。培養 1 hr 後に細胞を回収し、フローサイトメーターで細胞の平均蛍光強度を測定した。加熱死菌体を添加した細胞の平均蛍光強度に対する、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を添加した細胞の平均蛍光強度の相対比を求めた。2 回の独立した実験で同様の結果が得られており、そのうちの 1 回のデータを示した。

#### (4) 菌体の IL-12 誘導能の増強・食食率の増加における卵白リゾチームの特異性

乳酸菌体の IL-12 誘導能の増強が卵白リゾチーム特異的なのかどうかを調べるため、無作為に 5 菌株(HP, 1263, H45, C59, O07)を選抜し、5 菌株それぞれについて、加熱死菌体、 $\alpha$ -ラクトアルブミン加熱凝集死菌体、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体、オボアルブミン加熱凝集死菌体、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を調製した。調製した菌体について、J774.1 細胞を用いて IL-12p40 誘導能と食食のされやすさを調べたところ、用いたすべての 5 菌株で卵白リゾチーム加熱凝集死菌体が最も強い IL-12p40 誘導能を有していることが明らかになった(図 4-4A)。卵白リゾチーム以外のタンパク質は 1263 株の IL-12p40 誘導能を増強したものの、他の 4 菌株については増強できなかった(図 4-4A)。一方、食食に関しては、 $\beta$ -ラクトグロブリン、オボアルブミンは、卵白リゾチームの場合と同様に J774.1 細胞の菌体食食率を高めたが、 $\alpha$ -ラクトアルブミンは食食率を高めなかった(図 4-4B)。

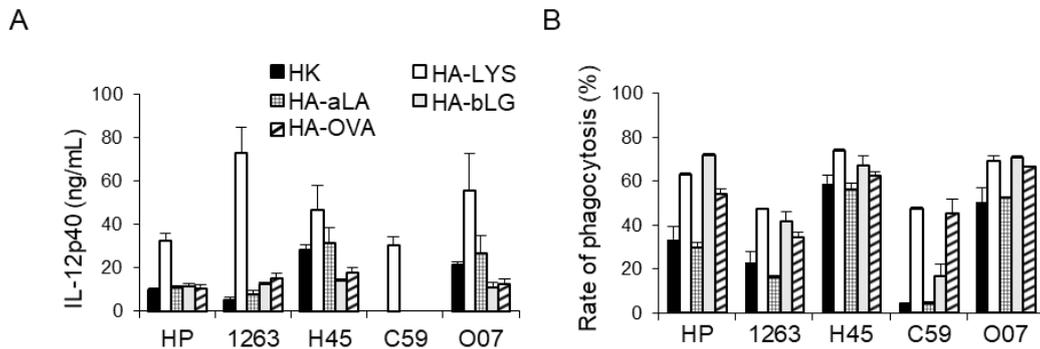


図 4-4 菌体へのタンパク質の加熱凝集が J774.1 細胞の IL-12p40 応答と食食に与える影響

(A) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株(HP、1263、H45、C59、O07)について加熱死菌体(HK)、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン加熱凝集死菌体(HA-aLA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体(HA-bLG)、オボアルブミン加熱凝集死菌体(HA-OVA)を調製した。それぞれ J774.1 細胞に添加し、培養後 24 hr に産生される IL-12p40 を ELISA により測定した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。(B) FITC で標識した *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株の加熱死菌体とタンパク質加熱凝集死菌体を調製した。それぞれを J774.1 細胞に添加し、1 hr 後に細胞をフローサイトメーターで解析した。FITC の蛍光が認められる細胞を、菌体を食食した細胞とみなし、その割合(%)を求めた。データは平均値 $\pm$ SD で示した。

#### (5) 菌体の疎水性度と食食の関係

マクロファージは親水性の microsphere より、疎水性の microsphere をより食食しやすいことが報告されている(187)。そのため、菌体の疎水性度はマクロファージの食食において重要な要素になると考えられる。そこで、加熱死菌体とタンパク質加熱凝集死菌体それぞれについて、菌体の疎水性度を調べた。その結果、菌体の疎水性度は、5 菌株すべてでタンパク質の加熱凝集により増加することがわかった。菌体の疎水性度と J774.1 細胞の菌体食食率の相関関係を調べたところ、5 菌株中 4 菌株で強い相関( $r > 0.7$ )が認められ(図 4-5A)、全体としても菌体の疎水性度と食食率には強い相関関係があることがわかった( $r = 0.744$ ,  $p < 0.05$ ) (図 4-5B)。したがってタンパク質加熱凝集死菌体では、菌体表層の疎水性が高まることによりマクロファージに食食されやすくなっていると考えられた。

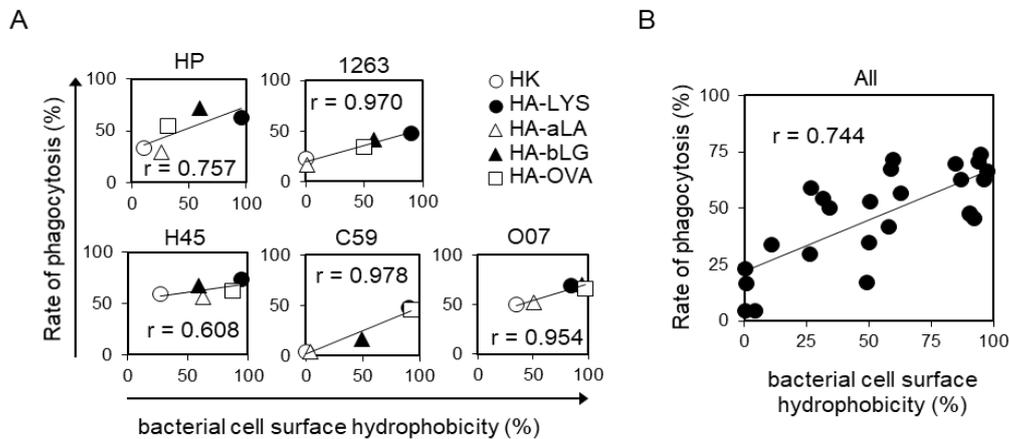


図 4-5 菌体の疎水性度と J774.1 細胞の菌体貪食率との関係

(A, B) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株(HP、1263、H45、C59、O07)について加熱死菌体 (HK)、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン加熱凝集死菌体(HA-aLA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体(HA-bLG)、オボアルブミン加熱凝集死菌体(HA-OVA)を調製した。各菌体の疎水性度を測定し、J774.1 細胞の菌体貪食率との関係を菌株ごと(A)、または 5 菌株あわせて(B)プロットした。それぞれのプロットに相関係数を示した。

#### (6) 貪食と IL-12 産生の関係

貪食が IL-12 産生におよぼす影響を調べるため、貪食の阻害剤である cytochalasin D を用い、加熱死菌体、タンパク質加熱凝集死菌体に対する J774.1 細胞の IL-12 産生に与える影響を調べた。細胞を cytochalasin D 処理し、貪食を阻害したところ、すべての菌体サンプルで IL-12 産生が劇的に阻害されることがわかった (図 4-6A)。このことから貪食は、*Lactococcus* 属乳酸菌に対するマクロファージの IL-12 産生において重要な要因であることが明らかになった。続いて、5 菌株の加熱死菌体、タンパク質凝集加熱凝集死菌体について IL-12 誘導能と菌体貪食率の相関関係を調べた。その結果、1263 株に関しては IL-12 産生と菌体貪食率の間に強い相関を認めたものの、他の菌株では強い相関は認められず(図 4-6B)、全体としても、中程度の相関しか確認できなかった( $r = 0.505, p < 0.05$ )(図 4-6C)。このため、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体の IL-12 誘導能の増強には貪食以外の要素が関係している可能性があることが示唆された。

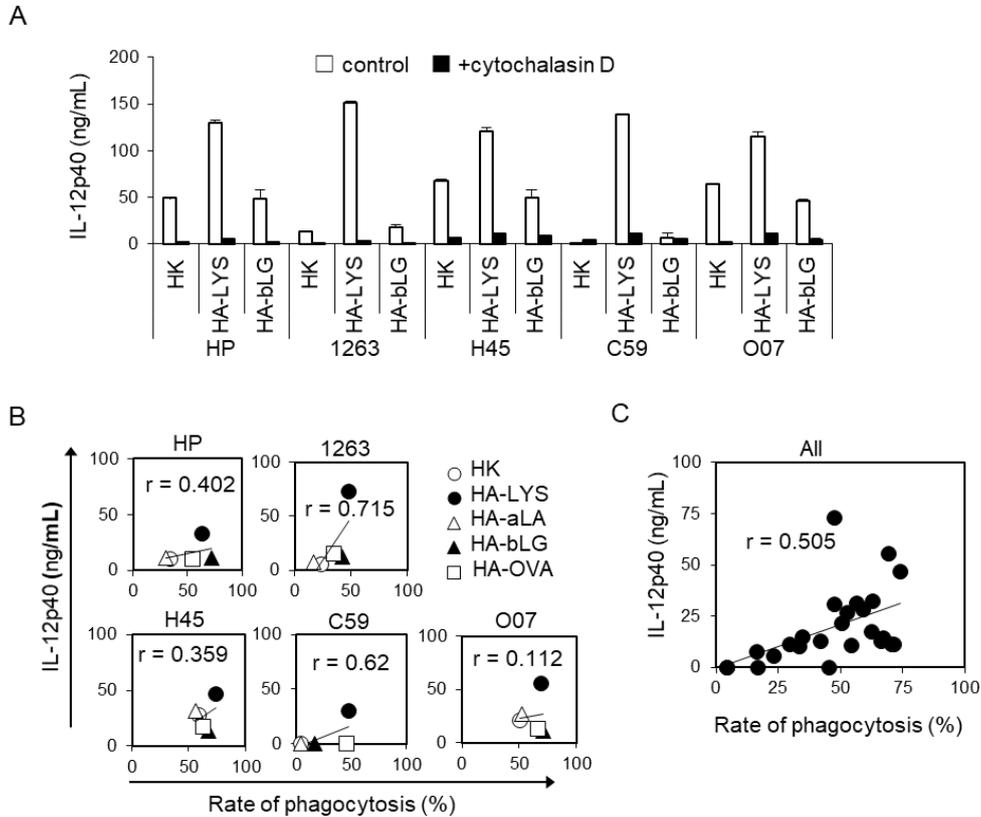


図 4-6 J774.1 細胞の菌体食食と IL-12p40 産生の関係

(A-C) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株(HP、1263、H45、C59、O07)について加熱死菌体(HK)、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン加熱凝集死菌体(HA-aLA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体(HA-bLG)、オボアルブミン加熱凝集死菌体(HA-OVA)を調製した。(A) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株の加熱死菌体、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体を、未処理の J774.1 細胞(control)または、食食阻害剤である cytochalasin D で処理した J774.1 細胞(+cytochalasin D)に添加し、培養 24 hr 後に産生される IL-12p40 を測定した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。(B, C) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株の加熱死菌体と各タンパク質加熱凝集死菌体について J774.1 細胞の菌体食食率と IL-12p40 産生を菌株ごと(B)、または 5 菌株あわせて(C)プロットした。それぞれのプロットに相関係数を示した。

#### (7) リゾチームおよびマクロファージ消化に対する耐性

卵白リゾチーム加熱凝集による菌体の IL-12 誘導能の増強に関わる要因を調べるため、5 菌株についてタンパク質加熱凝集が菌体のリゾチーム感受性に与える影響を調べた。加熱死菌体およびタンパク質加熱凝集死菌体をリゾチームで 24 hr 処理後、ギムザ染色を行った。その結果、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体のみがリゾチーム処理 24 hr 後もギムザ染色に対する反応性を保持していること、また、加熱死菌体やほかのタンパク質加熱凝集死菌体はギムザ染色に対する反応性を消失していることがわかった(図 4-7A)。このことから、卵白リゾチームの加熱凝集は菌体のリゾチーム耐性を強化していることがわかった。続いて、菌体へのタンパク質の加熱凝集がマクロファージの消化におよぼす影響を調べた。J774.1 細胞と菌体を 24 hr 共培養し、細胞をギムザ染色した。細胞を顕微鏡した結果、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体は培養後 24 hr でも、J774.1 細胞中に存在することが確認できたが、加熱死菌体や他のタンパク質加熱凝集死菌体は確認できなかった(図 4-7B)。このことから、菌体に対する卵白リゾチームの加熱凝集は、菌体のマクロファージの消化に対する耐性を高めていることがわかった。

次に、マクロファージの内在性リゾチームによる菌体消化と IL-12 産生の関係を調べるため、リゾチーム阻害剤である chitotriose の添加実験を行った。J774.1 細胞を chitotriose で処理し、加熱死菌体を加えた時に産生される IL-12p40 を測定した。chitotriose の添加は、用いた 5 菌株すべてに対して、J774.1 細胞の IL-12p40 産生を増強することがわかった(図 4-7C)。一方で、グラム陰性菌の菌体成分である LPS に対しては増強効果を示さなかった(図 4-7C)。これらのことから菌体に対するマクロファージの IL-12 産生は、内在性リゾチームによる菌体消化が阻害されることによって高まることが示唆された。

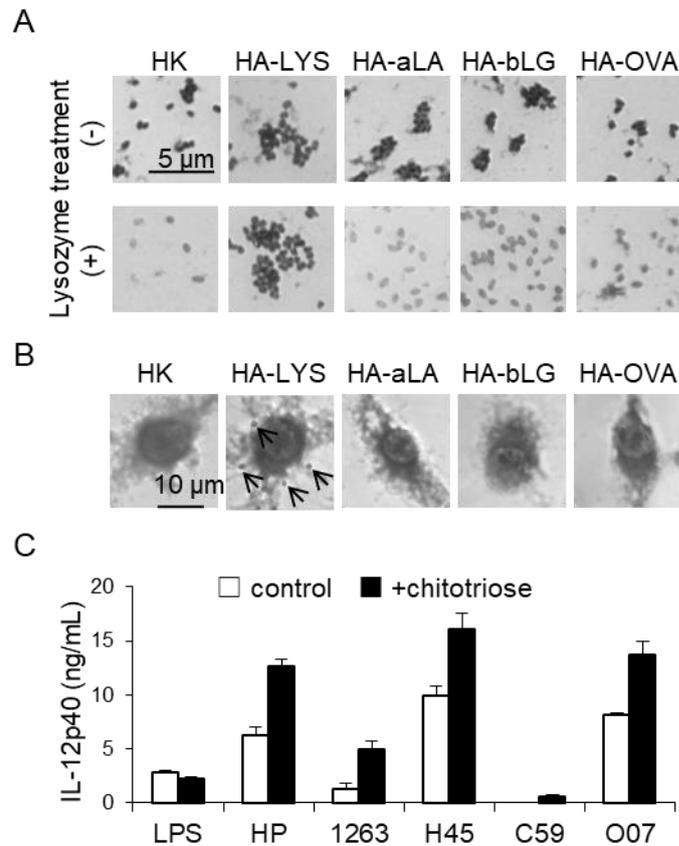


図 4-7 リゾチーム耐性、マクロファージ消化耐性と IL-12

(A, B) *Lactococcus* 属乳酸菌 C59 株について加熱死菌体(HK)、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体(HA-LYS)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン加熱凝集死菌体(HA-aLA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン加熱凝集死菌体(HA-bLG)、オボアルブミン加熱凝集死菌体(HA-OVA)を調製した。(A) C59 株の加熱死菌体と各タンパク質加熱凝集死菌体を 100  $\mu$ g/ml のリゾチームで 24 hr 処理後、ギムザ染色した。(B) C59 株の加熱死菌体と各タンパク質加熱凝集死菌体を J774.1 細胞と 24 hr 培養し、ギムザ染色した。矢印は未消化の菌体を示す。(C) *Lactococcus* 属乳酸菌 5 菌株(HP、1263、H45、C59、O07)の加熱死菌体を未処理の J774.1 細胞(control)または、chitotriose で処理した J774.1 細胞(+ chitotriose)に添加し、培養 24 hr 後に産生される IL-12p40 を測定した。データは平均値 $\pm$ SD で示した。

#### 4-4. 考察

乳酸菌の IL-12 誘導能は、アレルギーの予防や治療に有望と考えられる菌株を選抜する際に、重要な指標として利用されている(8-10)。本研究では、卵白リゾチームの加熱凝集により、*Lactococcus* 属乳酸菌のマクロファージに対する IL-12 誘導能が増強されることを明らかにした。微生物によるマクロファージの活性化は、トール様受容体といった特定の微生物成分を認識するパターン認識システムを介して行われる。リポテイコ酸、ペプチドグリカン、CpG DNA といった菌体成分が活性化成分の候補である(188, 189)。本研究では同じ菌体から加熱死菌体と卵白リゾチーム加熱凝集死菌体を調製しており、それらは同じ菌体成分を有している。このため、菌体成分それ自体は、卵白リゾチーム加熱凝集による IL-12 誘導能の増強の要因ではないと考えられる。

本研究では、卵白リゾチームの加熱凝集が菌体の疎水性を増加させ、それによりマクロファージによる菌体貪食を促進している可能性があることを明らかにした。菌体の疎水性の増加や貪食の増加は、卵白リゾチームだけでなく $\beta$ -ラクトグロブリンやオボアルブミンの加熱凝集によっても認められた。卵白リゾチームや $\beta$ -ラクトグロブリン、オボアルブミンは熱変性により表面の疎水性が増加することが報告されている(190, 191)。このため、タンパク質加熱凝集死菌体では、加熱により菌体表層でタンパク質が変性することで、菌体表層の疎水性を高めている可能性が高いと考えられる。一方、 $\alpha$ -ラクトアルブミンの加熱凝集は菌体表層の疎水性をあまり高めず、菌体貪食をほとんど増加させなかった。本章ではデータを示さなかったが、 $\alpha$ -ラクトアルブミンの菌体への加熱凝集は部分的であることがわかっており、菌体全体の性質を変化させるには至らなかったためであると考えられる。

貪食阻害の実験から、マクロファージの *Lactococcus* 属乳酸菌に対する IL-12 産生において貪食が重要な役割をはたしていることを明らかにした。この知見は、*Lactobacillus* 属乳酸菌に対するマクロファージの IL-12 産生が貪食の阻害に

より抑制されるという報告と一致するものであり(181)、マクロファージの乳酸菌体に対する IL-12 産生において貪食が必要不可欠な要因であることが示唆される。一方で、本研究では、菌体貪食率と IL-12 産生の相関関係に関しては、一部の菌株(1263 株)を除き強い相関を確認できなかった。このことは、卵白リゾチームの加熱凝集による IL-12 産生増強は、単に貪食が増加したことによってもたらされたわけではないことを示唆する。しかしながら、貪食が乳酸菌体に対するマクロファージの IL-12 産生に必要な不可欠な要因であることを考慮すると、マクロファージに貪食されにくい性質を有する菌株の場合には、貪食されやすくすることで菌体の IL-12 誘導能を増強できる可能性がある。実際、本研究で、貪食の促進と IL-12 の誘導の増強に相関を認めた 1263 株は貪食されにくい性質の菌株であり、逆に相関が低い菌株は貪食されやすい性質の菌株だった。

卵白リゾチームの加熱凝集は、菌体のリゾチーム耐性とマクロファージの消化に対する耐性を強化することを明らかにした。卵白リゾチーム加熱凝集死菌体では、卵白リゾチームが不活化した状態で、基質である菌体表層のペプチドグリカン層を覆うように凝集していると考えられる。これにより、菌体のペプチドグリカン層がリゾチームの攻撃を受けにくい状態になっていると考えられ、他のタンパク質加熱凝集死菌体とは異なり、リゾチーム耐性が強化された可能性が高い。マクロファージの内在性リゾチームは菌体の消化において重要な役割をはたしていることから(192)、菌体のリゾチーム耐性の強化は、マクロファージの消化に対する耐性の強化につながったと考えられる。本研究では、リゾチーム阻害剤の添加実験から、マクロファージによる菌体消化が抑制されることで IL-12 産生が高まることが示唆された。このことから、マクロファージに消化されにくい菌体は、マクロファージに対して IL-12 産生を強く誘導する可能性が高いと考えられた。実際、*Lactobacillus* 属乳酸菌においてマクロファージの消化に耐性をもつ菌体が強い IL-12 誘導能をもつことが報告されている

(181)。このため、卵白リゾチーム加熱凝集死菌体では、マクロファージ消化に対する耐性が強化されたことで IL-12 誘導能が増強された可能性が高い。

乳酸菌はチーズをはじめとする発酵乳製品のスターターとして広く利用されている。これらのうちの一部に健康機能があることが報告されているが、それらの多くは菌株特異的な作用であると考えられている。卵白リゾチームの加熱凝集による菌体の IL-12 誘導能の増強は、菌株に関係なく適用できる方法である。このため、この知見を応用すれば、菌株の特徴を残しながらも簡便に抗アレルギーなどの機能を付加できる可能性がある。したがって、将来的には、既に製造に利用されている乳酸菌株に対して新たに免疫調節作用を付与することができるようになる可能性がある。

まとめとして、本研究では卵白リゾチームの加熱凝集による *Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導能の増強には、2つの菌体の性質の変化が関係している可能性があることを明らかにした。1つは菌体の疎水性度の増加である。卵白リゾチームや他のタンパク質の加熱凝集は、菌体表層の疎水性を増加させ、マクロファージによる貪食を促進すると考えられる。マクロファージの IL-12 産生において菌体貪食は必要不可欠な要素であるため、貪食されにくい乳酸菌に関しては菌体の疎水性度を増加させることで、IL-12 誘導能を高めることにつながると考えられる。もう1つは、リゾチームとマクロファージの消化に対する耐性の強化である。この強化は卵白リゾチーム特異的な作用であり、他のタンパク質の加熱凝集では認められない。マクロファージ消化耐性が強い菌体は高い IL-12 誘導能をもつと考えられ、菌体のマクロファージ消化耐性の強化は IL-12 誘導能の増強につながると考えられる。この2つの性質変化を菌体に誘導することができれば、多くの乳酸菌の IL-12 誘導能を増強できる可能性がある。本研究は乳酸菌の IL-12 誘導能の増強について新たな知見を与えるものであり、免疫調節作用を有する乳製品の開発に資すると期待される。

## 第5章 総合討論

### ピルビン酸、芳香族ピルビン酸による p38 MAPK 活性化の阻害について

本研究では、抗酸化作用を有するピルビン酸および芳香族ピルビン酸が UVB 照射による角化細胞の炎症反応を抑制することを明らかにしたが、意外なことに、これらの物質は UVB 照射時に細胞内に発生する ROS の発生を抑制しなかった。一方で、ピルビン酸および芳香族ピルビン酸は、UVB 照射により誘導される p38 MAPK の活性化を阻害することがわかった。p38 MAPK は UVB に対する角化細胞の炎症反応において重要な役割を担っており、p38 MAPK の阻害剤は、UVB により誘導される HaCaT 細胞の Cox-2 の発現を抑制することが報告されているほか(150)、p38 MAPK 阻害剤の投与により、UVB 照射により誘導されるマウス皮膚の IL-6 や Cox-2 の発現が完全に抑制されることが報告されている(59)。このため、p38 MAPK の阻害は、ピルビン酸および芳香族ピルビン酸の炎症抑制作用において重要な作用機序である可能性が高い。ヒト内皮細胞において過酸化水素により誘導される p38 MAPK のリン酸化がピルビン酸により阻害されると報告されており(193)、ピルビン酸による p38 MAPK の抑制には共通した分子機構が存在する可能性がある。

UVB による p38 MAPK の活性化には ROS が関与していることが報告されている(194-196)。ROS は、p38 MAPK 活性化因子である Apoptosis signal-regulating kinase 1 を活性化することが報告されており(197)、UVB による p38 MAPK の活性化には Apoptosis signal-regulating kinase 1 を介した経路が関与している可能性がある。これに加えて、G タンパク質が UV 照射による p38 MAPK の活性化に関与していることも示唆されている。G タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニットの過剰発現は UV 照射による p38 MAPK の活性化を増幅すること、逆に、 $G_{\beta\gamma}$  サブユニットを捕捉すると UV 照射による p38 MAPK の活性化が抑制されることが報告されている(198)。 $G_{\beta\gamma}$  サブユニットを介した p38 MAPK の活性化は Cdc42 依存的であること

が示されており、Rho ファミリータンパク質の重要性が示唆されている(199)。ピルビン酸および芳香族ピルビン酸の p38 MAPK シグナルパスウェイの抑制機構を明らかにするためには、これら UV による p38 MAPK の活性化経路について詳しく検討する必要があるだろう。

また、ピルビン酸および芳香族ピルビン酸が p38 MAPK を直接阻害しているかどうかについては議論の必要がある。ピルビン酸および芳香族ピルビン酸は強い抗酸化作用を有しているため、細胞にすぐに取り込まれ作用するのであれば、UVB により発生する ROS を除去できるはずである。しかし、本研究で示したように、これらの物質の添加は UVB による角化細胞内の ROS の生成を抑制しなかった。このため、これらの物質は角化細胞内では直接作用していないかもしれない。角化細胞は UVB 照射により乳酸脱水素酵素を細胞外に放出することが知られているが(200)、乳酸脱水素酵素はピルビン酸を乳酸に変換する酵素である。筋芽細胞では乳酸が p38 MAPK を阻害すると報告されており(201)、ピルビン酸は乳酸に変換されることで、UVB 照射により誘導される角化細胞の炎症反応を抑制している可能性があるかもしれない。芳香族ピルビン酸から乳酸脱水素酵素により変換されて生じる芳香族乳酸に、UVB 照射時の角化細胞の炎症反応を抑制する作用があることは注目すべき点である(20)。乳酸や芳香族乳酸が UVB 照射時の角化細胞の p38 MAPK の活性化を阻害するかどうか、また、これらの物質がピルビン酸や芳香族ピルビン酸添加時に実際に細胞内で働いているかどうかについては、今後検討する必要があるだろう。

#### **UVB 照射による皮膚傷害に対するインドール-3-ピルビン酸の防御機構について**

本研究では、芳香族ピルビン酸の中でも特にインドール-3-ピルビン酸に、UVB 照射による皮膚の炎症を抑制し、表皮の損傷を軽減する作用があることを明らかにした。一方で、インドール-3-ピルビン酸の塗布ではむしろ表皮の肥厚が認められるなど、p38 MAPK の阻害では説明がつかない現象が確認された。本研究で検

証した通り、インドール-3-ピルビン酸は使用した芳香族ピルビン酸の中では最も強い AhR 活性化能を有している。そこで、インドール-3-ピルビン酸の皮膚防御作用における AhR の関与の可能性について考察する。マウスの表皮角化細胞や HaCaT 細胞では AhR が定常的に発現していることが報告されている(202, 203)。表皮のバリア機能における AhR の役割が多くの研究から明らかになっており、例えば TCDD は角化細胞のフィラグリン、インボルクリンなどの発現を上昇させるなど、角化細胞の最終分化を促進する作用があることが報告されている(204-206)。また、古くからアトピー性皮膚炎などの治療に用いられているコールタールは、AhR を活性化することで表皮の分化を促進し、表皮の肥厚を誘導し、表皮バリア機能を高めることが報告されている(207)。加えて、AhR と結合し核内移行する ARNT を角化細胞特異的に欠損するマウスでは、重度の脱水症が生じ、新生児期に死亡することがわかっており、ARNT が表皮バリア機能の維持に重要な役割をはたしていることが示されている(208)。本研究では、フェニルピルビン酸の塗布は皮膚のバリア機能に対して効果を示さなかったが、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸およびインドール-3-ピルビン酸の塗布は UVB による皮膚バリア機能の低下を抑制し、中でもインドール-3-ピルビン酸の塗布は強い抑制作用を示した。フェニルピルビン酸には AhR 活性化能が認められない一方で、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸およびインドール-3-ピルビン酸には AhR 活性化能が認められること、特に、インドール-3-ピルビン酸は強い AhR 活性化能を有していることを考慮すると、UVB による皮膚バリア機能の低下に対する芳香族ピルビン酸の抑制作用には AhR が関係しているように見える。AhR は UVB 照射により誘導される角化細胞のアポトーシスを抑制する作用があることが報告されていることから(209, 210)、インドール-3-ピルビン酸の塗布による表皮の壊死の抑制にも AhR が関与している可能性がある。一方で、AhR は角化細胞の UVB に対する炎症応答において重要な役割をはたしていることが近年明らかになってきている。AhR は UVB 照射により活性化され、Epidermal Growth Factor Receptor とその下流

の MAPK の活性化を引き起こし、Cox-2 などの発現を誘導する(203)。また、UVB 照射によりトリプトファンから生成する FICZ は AhR を介して角化細胞に ROS の産生を促し、炎症性メディエーターを誘導する(211)。加えて、角化細胞特異的に活性化型 AhR を発現するトランスジェニックマウスは重度の炎症性皮膚病変を発症することが報告されている(212)。これらの知見は、インドール-3-ピルビン酸の塗布が UVB 照射による皮膚の炎症を抑制した結果と矛盾するよう見える。しかし、HaCaT 細胞を用いた実験で明らかにしたように、インドール-3-ピルビン酸は p38 MAPK を阻害することで炎症性メディエーターの発現を抑制していると考えられる。インドール-3-ピルビン酸は AhR を介した作用と p38 MAPK の阻害を介した作用の 2 つの作用により、皮膚の防御機能を高めるのかもしれない。

#### インドール-3-ピルビン酸の利用について

本研究では、インドール-3-ピルビン酸が、UVB 照射による皮膚の損傷を軽減する薬剤として利用できる可能性があること、また、IBD に対する有望な治療薬として利用できる可能性があることを示した。インドール-3-ピルビン酸は、一部の乳酸菌が産生することがわかっているが産生量は多くない。インドール-3-ピルビン酸は、化学的にはジメチルホルムアミド中のトリプトファンをイソニコチンアルデヒドと反応させる方法などにより合成できる(213)。しかしながら、この方法は原材料や収率の面で製造コストが高いことが指摘されており、酵素を利用したインドール-3-ピルビン酸の生合成が研究されている。酵素による生産方法としてはアミノ酸オキシダーゼまたはアミノトランスフェラーゼを用いたものが提案されている。

アミノ酸オキシダーゼを利用した方法としては、これまでに、ヘビ毒由来のアミノ酸オキシダーゼにより、トリプトファンからインドール-3-ピルビン酸を生合成する方法が報告されている(214)。アミノ酸オキシダーゼの反応の副産物として生成する過酸化水素はインドール-3-ピルビン酸をインドール酢酸に分解するた

め、この反応系ではカタラーゼを添加して、過酸化水素による分解を抑制することが提案されている(214)。また、*Providencia* 属由来のアミノ酸オキシダーゼを大腸菌に高発現させることで、より高効率にトリプトファンからインドール-3-ピルビン酸を合成する方法が確立されている(215)。

一方、アミノトランスフェラーゼを利用した方法としては、*Sinorhizobium meliloti* や *Rhodobacter sphaeroides* 由来のチロシンアミノトランスフェラーゼ、*Leishmania major* 由来のアミノトランスフェラーゼ、*Escherichia coli* 由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどの組換えタンパク質を用いて、トリプトファンからインドール-3-ピルビン酸を生合成する方法が報告されている(216)。また、*Aspergillus nidulans* のトリプトファン・フェニルピルビン酸アミノトランスフェラーゼを大腸菌に高発現させ、代謝工学により高効率にインドール-3-ピルビン酸を生合成する方法が報告されている(217)。この方法では、芳香族アミノ酸の生合成に関わる代謝遺伝子の破壊や導入により、フェニルピルビン酸とトリプトファンの生合成能を高めることで、インドール-3-ピルビン酸とフェニルアラニンの高生産を実現している(217)。また近年、異なる触媒特性をもつ2種類の芳香族アミノトランスフェラーゼの立体構造が解かれるなど(218)、酵素の基質認識に関する研究も進められている。

インドール-3-ピルビン酸を薬剤として利用する際には、上述の方法により合成されたものが利用できる。一方、IBD では寛容状態を継続することが重要であるため、日常的に摂取する食品によって炎症の再燃を抑えることが望ましいと考えられる。食品成分としてインドール-3-ピルビン酸の機能を期待する場合には、食品中のインドール-3-ピルビン酸の含量が問題となる。食品中に含まれるインドール-3-ピルビン酸の含量はあまり高くないが、その中で、パルメザンチーズは比較的含量が高いことがわかっている(24)。パルメザンチーズは芳香族アミノ酸代謝物を多く含むが、特にトリプトファン代謝物の含量が多い(24)。パルメザンチーズに芳香族アミノ酸代謝物が多く含まれる理由の一つは、長い熟成期間により分

解が進み、アミノ酸含量が増加していることが関係していると考えられる。また、トリプトファン代謝物が多く含まれる原因には、パルメザンチーズ内の乳酸菌の芳香族アミノ酸の代謝特性が関係している可能性がある。一方、パルメザンチーズ以外のチーズやヨーグルトでは、インドール-3-ピルビン酸の含量は低い。これは、これら食品中ではトリプトファン代謝物自体がそれほど多くないことと、乳酸菌によってインドール-3-ピルビン酸がインドール-3-乳酸に変換されてしまっていることが原因であると考えられる。このため、乳酸菌を用いた発酵食品中のインドール-3-ピルビン酸含量を高めるには、乳酸菌のトリプトファン代謝を活性化すること、および、インドール-3-ピルビン酸からインドール-3-乳酸の変換を抑制することが重要になると考えられる。乳酸菌のトリプトファン代謝を高める方法としては、上述の *Aspergillus nidulans* のアミノトランスフェラーゼと代謝工学を利用したインドール-3-ピルビン酸の生合成方法(217)が参考になる。また、パルメザンチーズの芳香族アミノ酸の代謝特性を解明することも、乳酸菌のトリプトファン代謝を活性化する方法の発見につながる可能性がある。一方、インドール-3-ピルビン酸からインドール-3-乳酸の変換を抑制するには、この変換に関わると考えられる乳酸脱水素酵素について調べる必要がある。インドール-3-ピルビン酸に対する基質認識が低い乳酸脱水素酵素を探索することや、遺伝子変異や阻害物質などにより乳酸脱水素酵素のインドール-3-ピルビン酸認識を阻害することなどにより、乳酸菌のインドール-3-ピルビン酸産生を高めることができるかもしれない。

#### 乳酸菌の IL-12 産生誘導能の強化について

本研究では卵白リゾチームの加熱凝集により、乳酸菌の菌体の疎水性度が増加し、リゾチーム消化に対する耐性が強化されることで IL-12 誘導能が増強される可能性があることを明らかにした。卵白リゾチームの加熱凝集による IL-12 の増強は、卵白リゾチームを添加する必要があること、また加熱処理を行う必要があ

ることから、そのまま乳製品に応用することはできない。しかし、本研究の知見を利用し、菌体の特徴を遺伝子変異などにより変換することで IL-12 産生誘導能を増強できる可能性がある。たとえば、目的の菌株にランダム変異を入れ、疎水性の高い変異株やリゾチームに抵抗性のある変異株を取得する方法が考えられる。また、プラスミドなどの導入により、菌体の特徴を変換する方法も考えられる。細胞表面ポリペプチドをコードする *Streptococcus gordonii* 由来の *csaA* 遺伝子や(219)、凝集物質 Asc10 をコードする *Enterococcus faecalis* 由来の *prgB* 遺伝子(220)、*Lactobacillus paracasei* の auto-aggregation-promoting protein をコードする *aggLB* 遺伝子(221)などは、菌体表層の疎水性を高めることが報告されている。また、*Enterococcus faecalis* を用いた研究から、ペプチドグリカン O-アセチルトランスフェラーゼをコードする *oatA* 遺伝子、リポテイコ酸の D-アラニル化に関わる *dltA* 遺伝子、転写因子 SigV をコードする *sigV* 遺伝子がリゾチーム耐性に関わっていることが報告されている(222)。遺伝子変異や遺伝子導入により、菌体の疎水性やリゾチーム耐性を増強することで乳酸菌の IL-12 誘導能が増強できるかどうかを明らかにすることは、今後の重要な研究課題である。

## 総括(図 5-1)

本研究では、乳酸菌の健康面での利用を促進することを目的に、乳酸菌代謝物および乳酸菌体の機能性についてそれぞれ検討を行った。乳酸菌代謝物としては芳香族ピルビン酸に着目し、第 1 章および第 2 章において、ピルビン酸および芳香族ピルビン酸が、UVB 照射により誘導される角化細胞の炎症反応、細胞死を抑制すること、またこれらの物質が p38 MAPK の活性化を阻害することを明らかにした。加えて第 2 章では、UVB 照射によるマウスの皮膚炎症モデルを用いて、芳香族ピルビン酸の中でもインドール-3-ピルビン酸が最も効果的に UVB による皮膚傷害を抑制できることを明らかにした。第 3 章では、芳香族ピルビン酸の腸管炎症抑制作用を検討し、インドール-3-ピルビン酸にのみ腸管炎

症を抑制する作用があることを明らかにした。インドール-3-ピルビン酸が腸管免疫に与える影響を解析した結果、インドール-3-ピルビン酸は AhR を介して腸管免疫系の T 細胞や樹状細胞を変動させることで大腸炎症を抑制していることが示唆された。第 4 章では、乳酸菌体の免疫調節作用に着目し、卵白リゾチームの加熱凝集により、*Lactococcus* 属乳酸菌の IL-12 誘導能が増強されることを明らかにした。さらに、この作用には菌体の疎水性の増加とリゾチーム耐性の強化が関係している可能性があることを明らかにした。本研究は、乳酸菌代謝物および菌体による免疫炎症応答調節の新たな機構を明らかにしたものであり、本研究で得られた知見は乳酸菌の健康機能性をさらに高めることにつながると期待される。

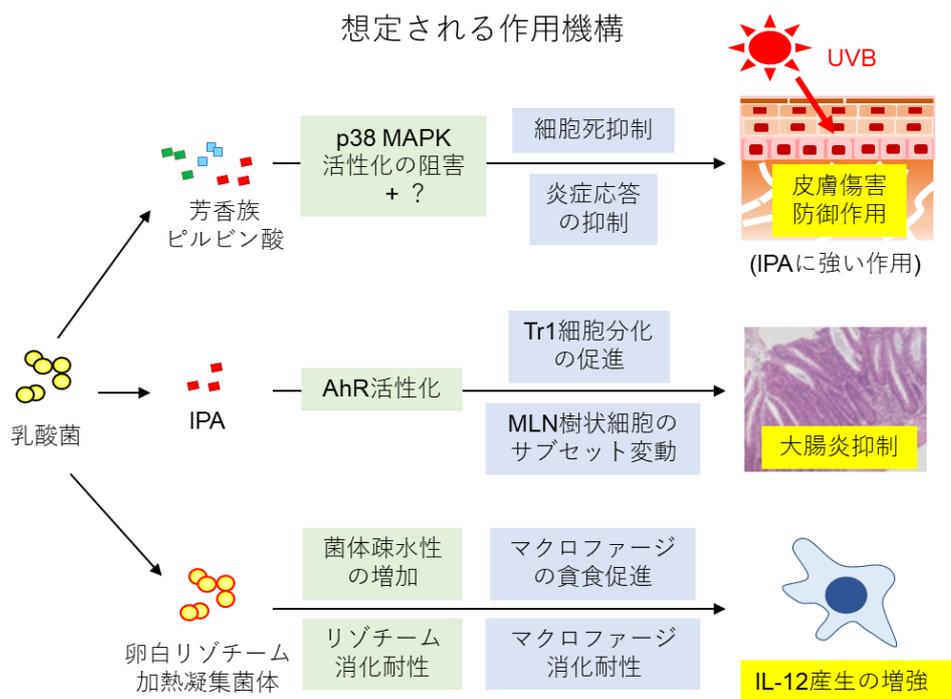


図 5-1 本研究の総括

本研究で得られた知見を図にまとめた。IPA はインドール-3-ピルビン酸。

### 参考文献

1. Azam, M., Mohsin, M., Ijaz, H., Tulain, U. R., Ashraf, M. A., Fayyaz, A., Abadeen, Z., and Kamran, Q. (2017) Review - Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pak J Pharm Sci* **30**, 1803-1814
2. Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Ronhave Laursen, R., and Ouwehand, A. C. (2019) The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms* **7**
3. Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. M., and Ahmed, G. (2016) Probiotics - the versatile functional food ingredients. *J Food Sci Technol* **53**, 921-933
4. Mitsuoka, T. (2014) Development of functional foods. *Biosci Microbiota Food Health* **33**, 117-128
5. Riaz Rajoka, M. S., Shi, J., Zhu, J., Shao, D., Huang, Q., Yang, H., and Jin, M. (2017) Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 35-45
6. Cross, M. L., Stevenson, L. M., and Gill, H. S. (2001) Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol* **1**, 891-901
7. Hachimura, S. (2015) Regulation of allergy by probiotics. *Inflammation and Regeneration* **35**, 137-139
8. Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T. (2004) The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol* **135**, 205-215
9. Sashihara, T., Sueki, N., and Ikegami, S. (2006) An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J Dairy Sci* **89**,

2846-2855

10. Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T., and Kurisaki, J. (2004) New Lactococcus strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol Immunol* **48**, 75-82
11. Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., and Drider, D. (2019) Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front Microbiol* **10**, 57
12. Talarico, T. L., and Dobrogosz, W. J. (1989) Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 674-679
13. Boelsma, E., and Kloek, J. (2009) Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *Br J Nutr* **101**, 776-786
14. Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., and Yamori, Y. (2004) Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br J Nutr* **92**, 411-417
15. Suzuki, Y., Kosaka, M., Shindo, K., Kawasumi, T., Kimoto-Nira, H., and Suzuki, C. (2013) Identification of antioxidants produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**, 1299-1302
16. Yamamoto, Y., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Kamio, Y. (2002) An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J Bacteriol* **184**, 2931-2939
17. Gibson, C. M., and Caparon, M. G. (1996) Insertional inactivation of *Streptococcus pyogenes* sod suggests that prtF is regulated in response to a superoxide signal. *J Bacteriol* **178**, 4688-4695

18. Sanders, J. W., Leenhouts, K. J., Haandrikman, A. J., Venema, G., and Kok, J. (1995) Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol* **177**, 5254-5260
19. Kono, Y., and Fridovich, I. (1983) Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **155**, 742-746
20. Aoki-Yoshida, A., Ichida, K., Aoki, R., Kawasumi, T., Suzuki, C., and Takayama, Y. (2013) Prevention of UVB-induced production of the inflammatory mediator in human keratinocytes by lactic acid derivatives generated from aromatic amino acids. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**, 1766-1768
21. Castellano, F., and Molinier-Frenkel, V. (2017) An Overview of l-Amino Acid Oxidase Functions from Bacteria to Mammals: Focus on the Immunoregulatory Phenylalanine Oxidase IL4I1. *Molecules* **22**
22. Gummalla, S., and Broadbent, J. R. (2001) Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *J Dairy Sci* **84**, 1011-1019
23. Dallagnol, A. M., Catalan, C. A., Mercado, M. I., Font de Valdez, G., and Rollan, G. C. (2011) Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778. *J Appl Microbiol* **111**, 1447-1455
24. Kimura, Y., Aoki, R., Takayama, Y., Suzuki, C., and Suzuki, Y. (2020) Quantification of Functional Aromatic Amino Acid Metabolites in Fermented Foods and Their Production by Food Microorganisms. *Food Science and Technology Research* **26**, 79-92
25. Williams, R. A., Mamotte, C. D., and Burnett, J. R. (2008) Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* **29**, 31-41
26. Schuck, P. F., Malgarin, F., Cararo, J. H., Cardoso, F., Streck, E. L., and Ferreira,

- G. C. (2015) Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging Dis* **6**, 390-399
27. Scott, C. R. (2006) The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **142C**, 121-126
28. Cotoia, A., Scrima, R., Gefter, J. V., Piccoli, C., Cinnella, G., Dambrosio, M., Fink, M. P., and Capitanio, N. (2014) p-Hydroxyphenylpyruvate, an Intermediate of the Phe/Tyr Catabolism, Improves Mitochondrial Oxidative Metabolism under Stressing Conditions and Prolongs Survival in Rats Subjected to Profound Hemorrhagic Shock. *Plos One* **9**
29. Scrima, R., Menga, M., Pacelli, C., Agriesti, F., Cela, O., Piccoli, C., Cotoia, A., De Gregorio, A., Gefter, J. V., Cinnella, G., and Capitanio, N. (2017) Para-hydroxyphenylpyruvate inhibits the pro-inflammatory stimulation of macrophage preventing LPS-mediated nitro-oxidative unbalance and immunometabolic shift. *Plos One* **12**
30. Bittinger, M. A., Nguyen, L. P., and Bradfield, C. A. (2003) Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **64**, 550-556
31. Badawy, A. A. (2019) Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention. *Egypt J Basic Clin Pharmacol* **9**
32. Politi, V., D'Alessio, S., Di Stazio, G., and De Luca, G. (1996) Antioxidant properties of indole-3-pyruvic acid. *Adv Exp Med Biol* **398**, 291-298
33. Zoli, M., Merlo Pich, E., Ferraguti, F., Biagini, G., Fuxe, K., and Agnati, L. F. (1993) Indole-pyruvic acid treatment reduces damage in striatum but not in hippocampus after transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Int* **23**, 139-148

34. Silvestri, R., Mento, G., Raffaele, M., De Luca, G., Buttini, G., Casella, C., Tisano, A., De Domenico, P., Di Rosa, A. E., and Di Perri, R. (1991) Indole-3-pyruvic acid as a possible hypnotic agent in insomniac subjects. *J Int Med Res* **19**, 403-409
35. Politi, V., De Luca, G., Gallai, V., Puca, and Comin, M. (1999) Clinical experiences with the use of indole-3-pyruvic acid. *Adv Exp Med Biol* **467**, 227-232
36. Assefa, Z., Van Laethem, A., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2005) Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta* **1755**, 90-106
37. Lu, Y. P., Lou, Y. R., Yen, P., Mitchell, D., Huang, M. T., and Conney, A. H. (1999) Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. *Cancer Res* **59**, 4591-4602
38. Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., and Muller, H. K. (2001) Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* **79**, 547-568
39. Haratake, A., Uchida, Y., Schmuth, M., Tanno, O., Yasuda, R., Epstein, J. H., Elias, P. M., and Holleran, W. M. (1997) UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J Invest Dermatol* **108**, 769-775
40. Yaar, M., and Gilchrist, B. A. (2007) Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* **157**, 874-887
41. Armstrong, B. K., and Krickler, A. (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **63**, 8-18
42. Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and Horikawa, T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39

43. Bickers, D. R., and Athar, M. (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* **126**, 2565-2575
44. Kang, J. S., Kim, H. N., Jung, D. J., Kim, J. E., Mun, G. H., Kim, Y. S., Cho, D., Shin, D. H., Hwang, Y. I., and Lee, W. J. (2007) Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J Invest Dermatol* **127**, 698-706
45. Stahl, W., and Sies, H. (2012) beta-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr* **96**, 1179S-1184S
46. Fuchs, J., and Kern, H. (1998) Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation. *Free Radic Biol Med* **25**, 1006-1012
47. Placzek, M., Gaube, S., Kerkmann, U., Gilbertz, K. P., Herzinger, T., Haen, E., and Przybilla, B. (2005) Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D-alpha-tocopherol. *J Invest Dermatol* **124**, 304-307
48. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989) Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6367-6371
49. Dinarello, C. A. (1998) Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 1-11
50. Rundhaug, J. E., Mikulec, C., Pavone, A., and Fischer, S. M. (2007) A role for cyclooxygenase-2 in ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* **46**, 692-698
51. Wilgus, T. A., Ross, M. S., Parrett, M. L., and Oberyszyn, T. M. (2000) Topical

- application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**, 367-384
52. Wilgus, T. A., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Kusewitt, D. F., Rubal, P. A., and Oberszyn, T. M. (2003) Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol Carcinog* **38**, 49-58
  53. Fischer, S. M., Lo, H. H., Gordon, G. B., Seibert, K., Kelloff, G., Lubet, R. A., and Conti, C. J. (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* **25**, 231-240
  54. Fischer, S. M., Pavone, A., Mikulec, C., Langenbach, R., and Rundhaug, J. E. (2007) Cyclooxygenase-2 expression is critical for chronic UV-induced murine skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* **46**, 363-371
  55. Jinlian, L., Yingbin, Z., and Chunbo, W. (2007) p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *J Biomed Sci* **14**, 303-312
  56. Muthusamy, V., and Piva, T. J. (2010) The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res* **302**, 5-17
  57. Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J. R., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2004) Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J* **18**, 1946-1948
  58. Hildesheim, J., Awwad, R. T., and Fornace, A. J., Jr. (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J*

*Invest Dermatol* **122**, 497-502

59. Kim, A. L., Labasi, J. M., Zhu, Y., Tang, X., McClure, K., Gabel, C. A., Athar, M., and Bickers, D. R. (2005) Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol* **124**, 1318-1325
60. Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R. S. (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* **28**, 573-621
61. Wirtz, S., and Neurath, M. F. (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1073-1083
62. Kaistha, A., and Levine, J. (2014) Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **44**, 328-334
63. Ben-Horin, S., Kopylov, U., and Chowers, Y. (2014) Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* **13**, 24-30
64. Baert, F., De Vos, M., Louis, E., Vermeire, S., and Belgian, I. B. D. R. G. (2007) Immunogenicity of infliximab: how to handle the problem? *Acta Gastroenterol Belg* **70**, 163-170
65. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* **1**, 553-562
66. Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (1999) Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* **116**, 238-245
67. Ito, H., and Fathman, C. G. (1997) CD45RBhigh CD4+ T cells from IFN-gamma knockout mice do not induce wasting disease. *J Autoimmun* **10**, 455-459
68. Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi,

- J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., Kataoka, K., Okanoue, T., and Mazda, O. (2006) Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* **146**, 330-338
69. Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., and Strober, W. (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* **182**, 1281-1290
70. Davidson, N. J., Hudak, S. A., Lesley, R. E., Menon, S., Leach, M. W., and Rennick, D. M. (1998) IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **161**, 3143-3149
71. Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996) Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* **157**, 1261-1270
72. Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Fedorak, R. N., Scherl, E., Fleisher, M. R., Katz, S., Johanns, J., Blank, M., Rutgeerts, P., and Ustekinumab Crohn's Disease Study, G. (2008) A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **135**, 1130-1141
73. Sandborn, W. J., Gasink, C., Gao, L. L., Blank, M. A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B. E., Hanauer, S. B., Targan, S., Rutgeerts, P., Ghosh, S., de Villiers, W. J., Panaccione, R., Greenberg, G., Schreiber, S., Lichtiger, S., Feagan, B. G., and Group, C. S. (2012) Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* **367**, 1519-1528
74. Reinisch, W., Hommes, D. W., Van Assche, G., Colombel, J. F., Gendre, J. P., Oldenburg, B., Teml, A., Geboes, K., Ding, H., Zhang, L., Tang, M., Cheng, M.,

- van Deventer, S. J., Rutgeerts, P., and Pearce, T. (2006) A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **55**, 1138-1144
75. Reinisch, W., de Villiers, W., Bene, L., Simon, L., Racz, I., Katz, S., Altorjay, I., Feagan, B., Riff, D., Bernstein, C. N., Hommes, D., Rutgeerts, P., Cortot, A., Gaspari, M., Cheng, M., Pearce, T., and Sands, B. E. (2010) Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 233-242
76. Baumgart, D. C., and Sandborn, W. J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641-1657
77. Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., Kotlyarov, A., Forster, I., Flavell, R., Gaestel, M., Tschlis, P., Cominelli, F., and Kollias, G. (2002) Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* **196**, 1563-1574
78. Murch, S. H., Braegger, C. P., Walker-Smith, J. A., and MacDonald, T. T. (1993) Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **34**, 1705-1709
79. Gratz, R., Becker, S., Sokolowski, N., Schumann, M., Bass, D., and Malnick, S. D. (2002) Murine monoclonal anti-tNF antibody administration has a beneficial effect on inflammatory bowel disease that develops in IL-10 knockout mice. *Dig Dis Sci* **47**, 1723-1727
80. Shen, C., de Hertogh, G., Bullens, D. M., Van Assche, G., Geboes, K., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J. L. (2007) Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization? *Inflamm Bowel Dis*

**13**, 308-316

81. Zeissig, S., Bojarski, C., Buergel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2004) Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* **53**, 1295-1302
82. Lugerling, A., Lebiecz, P., Koch, S., and Kucharzik, T. (2006) Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann N Y Acad Sci* **1072**, 62-77
83. Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S., and Neurath, M. F. (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* **6**, 583-588
84. Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo, M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga, A., Sata, M., and Yoshimura, A. (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* **193**, 471-481
85. Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., and Ito, H. (2000) IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* **164**, 4878-4882
86. Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., Matsumoto, T., Yamamura, T., Azuma, J., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Shimoyama, T., and Kishimoto, T. (2004) A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**,

989-996; discussion 947

87. Ito, H. (2005) Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol* **40 Suppl 16**, 32-34
88. Dinarello, C. A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-550
89. Mahida, Y. R., Wu, K., and Jewell, D. P. (1989) Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* **30**, 835-838
90. Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J., and Oppenheim, J. J. (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **167**, 1883-1893
91. Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Watanabe, K., Tateishi, H., Nishiyama, T., Saiki, T., Ikeda, H., Tsuruta, O., and Tanikawa, K. (1994) IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* **96**, 432-436
92. McGeachy, M. J., and Cua, D. J. (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**, 445-453
93. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517
94. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E. (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**, 821-852
95. Peck, A., and Mellins, E. D. (2010) Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect Immun* **78**, 32-38

96. Elson, C. O., Cong, Y., Weaver, C. T., Schoeb, T. R., McClanahan, T. K., Fick, R. B., and Kastelein, R. A. (2007) Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* **132**, 2359-2370
97. Kullberg, M. C., Jankovic, D., Feng, C. G., Hue, S., Gorelick, P. L., McKenzie, B. S., Cua, D. J., Powrie, F., Cheever, A. W., Maloy, K. J., and Sher, A. (2006) IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* **203**, 2485-2494
98. Izcue, A., Hue, S., Buonocore, S., Arancibia-Carcamo, C. V., Ahern, P. P., Iwakura, Y., Maloy, K. J., and Powrie, F. (2008) Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* **28**, 559-570
99. Becker, C., Dornhoff, H., Neufert, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Huebner, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Galle, P. R., Karow, M., and Neurath, M. F. (2006) Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* **177**, 2760-2764
100. Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, II, Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Becher, B., Littman, D. R., and Neurath, M. F. (2009) RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* **136**, 257-267
101. Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P., and Kolls, J. K. (2006) Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 382-388
102. Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004) Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* **110**, 55-62

103. Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., Yoshikawa, T., Kataoka, K., and Mazda, O. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 12-16
104. O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C. J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J. K., and Flavell, R. A. (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* **10**, 603-609
105. Sujino, T., Kanai, T., Ono, Y., Mikami, Y., Hayashi, A., Doi, T., Matsuoka, K., Hisamatsu, T., Takaishi, H., Ogata, H., Yoshimura, A., Littman, D. R., and Hibi, T. (2011) Regulatory T cells suppress development of colitis, blocking differentiation of T-helper 17 into alternative T-helper 1 cells. *Gastroenterology* **141**, 1014-1023
106. Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., and Weaver, C. T. (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **30**, 92-107
107. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274
108. Spencer, S. D., Di Marco, F., Hooley, J., Pitts-Meek, S., Bauer, M., Ryan, A. M., Sordat, B., Gibbs, V. C., and Aguet, M. (1998) The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* **187**, 571-578
109. Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-1355
110. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995-1004

111. Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W., Gruber, A. D., Krieg, T., Rajewsky, K., and Muller, W. (2004) T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* **200**, 1289-1297
112. Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K. W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Muller, W., and Jung, S. (2014) Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* **40**, 720-733
113. Kamanaka, M., Kim, S. T., Wan, Y. Y., Sutterwala, F. S., Lara-Tejero, M., Galan, J. E., Harhaj, E., and Flavell, R. A. (2006) Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* **25**, 941-952
114. Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y., and Weaver, C. T. (2007) Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* **8**, 931-941
115. Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Jr., Muller, W., and Rudensky, A. Y. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558
116. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997) A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742
117. Desreumaux, P., Foussat, A., Allez, M., Beaugerie, L., Hebuterne, X., Bouhnik, Y., Nachury, M., Brun, V., Bastian, H., Belmonte, N., Ticchioni, M., Duchange,

- A., Morel-Mandrino, P., Neveu, V., Clerget-Chossat, N., Forte, M., and Colombel, J. F. (2012) Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* **143**, 1207-1217 e1202
118. Jeon, S. G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N. M., Kiyono, H., Ma, J. S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K., and Takeda, K. (2012) Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog* **8**, e1002714
119. Fortin, G., Raymond, M., Van, V. Q., Rubio, M., Gautier, P., Sarfati, M., and Franchimont, D. (2009) A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *J Exp Med* **206**, 1995-2011
120. Siddiqui, K. R., Laffont, S., and Powrie, F. (2010) E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* **32**, 557-567
121. Cerovic, V., Houston, S. A., Scott, C. L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A. M., and Milling, S. W. (2013) Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* **6**, 104-113
122. Wenzel, U. A., Jonstrand, C., Hansson, G. C., and Wick, M. J. (2015) CD103+ CD11b+ Dendritic Cells Induce Th17 T Cells in Muc2-Deficient Mice with Extensively Spread Colitis. *PLoS One* **10**, e0130750
123. Liang, J., Huang, H. I., Benzatti, F. P., Karlsson, A. B., Zhang, J. J., Youssef, N., Ma, A., Hale, L. P., and Hammer, G. E. (2016) Inflammatory Th1 and Th17 in the Intestine Are Each Driven by Functionally Specialized Dendritic Cells with Distinct Requirements for MyD88. *Cell Rep* **17**, 1330-1343
124. Ruane, D. T., and Lavelle, E. C. (2011) The role of CD103(+) dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. *Front Immunol* **2**, 25

125. Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., and Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* **204**, 1775-1785
126. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**, 1757-1764
127. Persson, E. K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hagerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Hakansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., and Agace, W. W. (2013) IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 958-969
128. Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M., Tam, J., Poidinger, M., Stanley, E. R., Krug, A. B., Renia, L., Sivasankar, B., Ng, L. G., Collin, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Honda, K., Haniffa, M., and Ginhoux, F. (2013) IRF4 transcription factor-dependent CD11b<sup>+</sup> dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* **38**, 970-983
129. Cerovic, V., Houston, S. A., Westlund, J., Utriainen, L., Davison, E. S., Scott, C. L., Bain, C. C., Joeris, T., Agace, W. W., Kroczeck, R. A., Mowat, A. M., Yrlid, U., and Milling, S. W. (2015) Lymph-borne CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8<sup>+</sup> T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol* **8**, 38-48
130. Shiokawa, A., Kotaki, R., Takano, T., Nakajima-Adachi, H., and Hachimura, S. (2017) Mesenteric lymph node CD11b(-) CD103(+) PD-L1(High) dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* **152**, 52-64

131. Kourepini, E., Aggelakopoulou, M., Alissafi, T., Paschalidis, N., Simoes, D. C., and Panoutsakopoulou, V. (2014) Osteopontin expression by CD103- dendritic cells drives intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E856-865
132. Muzaki, A. R., Tetlak, P., Sheng, J., Loh, S. C., Setiagani, Y. A., Poidinger, M., Zolezzi, F., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2016) Intestinal CD103(+)CD11b(-) dendritic cells restrain colitis via IFN-gamma-induced anti-inflammatory response in epithelial cells. *Mucosal Immunol* **9**, 336-351
133. Poland, A., Glover, E., and Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* **251**, 4936-4946
134. Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2017) The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim* **66**, 75-89
135. Benson, J. M., and Shepherd, D. M. (2011) Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol Sci* **120**, 68-78
136. Goettel, J. A., Gandhi, R., Kenison, J. E., Yeste, A., Murugaiyan, G., Sambanthamoorthy, S., Griffith, A. E., Patel, B., Shouval, D. S., Weiner, H. L., Snapper, S. B., and Quintana, F. J. (2016) AHR Activation Is Protective against Colitis Driven by T Cells in Humanized Mice. *Cell Rep* **17**, 1318-1329
137. Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., Carvalho, A., Puccetti, P., and Romani, L. (2013) Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372-385

138. Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **141**, 237-248, 248 e231
139. Murray, I. A., and Perdew, G. H. (2017) Ligand activation of the Ah receptor contributes to gastrointestinal homeostasis. *Curr Opin Toxicol* **2**, 15-23
140. Hinoi, E., Takarada, T., Tsuchihashi, Y., Fujimori, S., Moriguchi, N., Wang, L., Uno, K., and Yoneda, Y. (2006) A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. *Mol Pharmacol* **70**, 925-935
141. Moriguchi, N., Hinoi, E., Tsuchihashi, Y., Fujimori, S., Iemata, M., Takarada, T., and Yoneda, Y. (2006) Cytoprotection by pyruvate through an anti-oxidative mechanism in cultured rat calvarial osteoblasts. *Histol Histopathol* **21**, 969-977
142. Desagher, S., Glowinski, J., and Premont, J. (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* **17**, 9060-9067
143. Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L. J., Mallet, R. T., and Yang, S. H. (2007) Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* **1132**, 1-9
144. Dickinson, S. E., Olson, E. R., Zhang, J., Cooper, S. J., Melton, T., Criswell, P. J., Casanova, A., Dong, Z., Hu, C., Saboda, K., Jacobs, E. T., Alberts, D. S., and Bowden, G. T. (2011) p38 MAP kinase plays a functional role in UVB-induced mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* **50**, 469-478
145. Shimizu, H., Banno, Y., Sumi, N., Naganawa, T., Kitajima, Y., and Nozawa, Y. (1999) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *J Invest Dermatol* **112**, 769-774

146. Chouinard, N., Valerie, K., Rouabhia, M., and Huot, J. (2002) UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53. *Biochem J* **365**, 133-145
147. Fink, M. P. (2007) Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med* **261**, 349-362
148. Kao, K. K., and Fink, M. P. (2010) The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol* **80**, 151-159
149. Fernau, N. S., Fugmann, D., Leyendecker, M., Reimann, K., Grether-Beck, S., Galban, S., Ale-Agha, N., Krutmann, J., and Klotz, L. O. (2010) Role of HuR and p38MAPK in ultraviolet B-induced post-transcriptional regulation of COX-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Biol Chem* **285**, 3896-3904
150. Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M. S., and Bowden, G. T. (2001) Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* **20**, 3921-3926
151. Kondo, S., Sauder, D. N., Kono, T., Galley, K. A., and McKenzie, R. C. (1994) Differential modulation of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human epidermal keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol* **3**, 29-39
152. Kirnbauer, R., Kock, A., Neuner, P., Forster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J. C., Schwarz, T., and Luger, T. A. (1991) Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* **96**, 484-489
153. Martin, J., Duncan, F. J., Keiser, T., Shin, S., Kusewitt, D. F., Oberyszyn, T., Satoskar, A. R., and VanBuskirk, A. M. (2009) Macrophage migration inhibitory

- factor (MIF) plays a critical role in pathogenesis of ultraviolet-B (UVB) -induced nonmelanoma skin cancer (NMSC). *FASEB J* **23**, 720-730
154. Liu, Z., Geboes, K., Heremans, H., Overbergh, L., Mathieu, C., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J. L. (2001) Role of interleukin-12 in the induction of mucosal inflammation and abrogation of regulatory T cell function in chronic experimental colitis. *Eur J Immunol* **31**, 1550-1560
155. Coccia, M., Harrison, O. J., Schiering, C., Asquith, M. J., Becher, B., Powrie, F., and Maloy, K. J. (2012) IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med* **209**, 1595-1609
156. Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L. (2000) Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* **18**, 451-494
157. Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Kuchroo, V. K., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2007) A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* **8**, 1380-1389
158. Pugh, C. W., MacPherson, G. G., and Steer, H. W. (1983) Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* **157**, 1758-1779
159. Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* **191**, 435-444
160. 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., and 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
161. Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006) Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* **203**, 519-527
162. Voedisch, S., Koenecke, C., David, S., Herbrand, H., Forster, R., Rhen, M., and Pabst, O. (2009) Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* **77**, 3170-3180
163. Hinterleitner, R., and Jabri, B. (2016) A dendritic cell subset designed for oral tolerance. *Nat Immunol* **17**, 474-476
164. Smith, K. J., Murray, I. A., Tanos, R., Tellew, J., Boitano, A. E., Bisson, W. H., Kolluri, S. K., Cooke, M. P., and Perdew, G. H. (2011) Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* **338**, 318-327
165. Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H. P., Michel, M. L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T. W., Natividad, J. M., Brot, L., Taleb, S., Couturier-Maillard, A., Nion-Larmurier, I., Merabtene, F., Seksik, P., Bourrier, A., Cosnes, J., Ryffel, B., Beaugerie, L., Launay, J. M., Langella, P., Xavier, R. J., and Sokol, H. (2016) CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* **22**, 598-605
166. Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453**, 65-71
167. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2008) Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9721-9726

168. Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* **11**, 846-853
169. Apetoh, L., Quintana, F. J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E. J., Sherr, D. H., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2010) The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* **11**, 854-861
170. Barnes, M. J., and Powrie, F. (2009) Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* **31**, 401-411
171. Chng, S. H., Kundu, P., Dominguez-Brauer, C., Teo, W. L., Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., Mak, T. W., and Pettersson, S. (2016) Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity. *Sci Rep* **6**, 23820
172. Luda, K. M., Joeris, T., Persson, E. K., Rivollier, A., Demiri, M., Sitnik, K. M., Pool, L., Holm, J. B., Melo-Gonzalez, F., Richter, L., Lambrecht, B. N., Kristiansen, K., Travis, M. A., Svensson-Frej, M., Kotarsky, K., and Agace, W. W. (2016) IRF8 Transcription-Factor-Dependent Classical Dendritic Cells Are Essential for Intestinal T Cell Homeostasis. *Immunity* **44**, 860-874
173. Bankoti, J., Rase, B., Simones, T., and Shepherd, D. M. (2010) Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **246**, 18-28
174. Simones, T., and Shepherd, D. M. (2011) Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. *Toxicol Sci* **119**, 293-307
175. Wang, C., Ye, Z., Kijlstra, A., Zhou, Y., and Yang, P. (2014) Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived

- dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **177**, 521-530
176. Benson, J. M., and Shepherd, D. M. (2011) Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol Sci* **124**, 327-338
177. Smirnova, A., Wincent, E., Vikstrom Bergander, L., Alsberg, T., Bergman, J., Rannug, A., and Rannug, U. (2016) Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ. *Chem Res Toxicol* **29**, 75-86
178. Suzuki, C., Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., and Mizumachi, K. (2008) Immunomodulatory and cytotoxic effects of various Lactococcus strains on the murine macrophage cell line J774.1. *Int J Food Microbiol* **123**, 159-165
179. Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Kobayashi, M., Sasaki, K., Kurisaki, J., and Mizumachi, K. (2007) Anti-ageing effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *Br J Nutr* **98**, 1178-1186
180. Stevens, L. (1991) Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol B* **100**, 1-9
181. Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K., and Nanno, M. (2006) Induction of interleukin-12 by Lactobacillus strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci* **89**, 3306-3317
182. Marshall, R. D., and Neuberger. (1972) In *Glycoproteins* (Gottshalk, A., ed) pp. 732-761, Elsevier
183. Aschaffenburg, R., and Drewry, J. (1957) Improved method for the preparation of crystalline beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow's milk. *Biochem J* **65**, 273-277
184. Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., and Okamoto, T. (2006) Phenotypic and molecular characterization of Lactococcus lactis from milk and

- plants. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 396-405
185. Suzuki, C., Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., and Mizumachi, K. (2008) Immunomodulatory and cytotoxic effects of various Lactococcus strains on the murine macrophage cell line J774.1. *Int. J. Food Microbiol.* **123**, 159-165
186. Rosenberg, M. (1984) Bacterial Adherence to Hydrocarbons - a Useful Technique for Studying Cell-Surface Hydrophobicity. *Fems Microbiology Letters* **22**, 289-295
187. Tabata, Y., and Ikada, Y. (1988) Effect of the Size and Surface-Charge of Polymer Microspheres on Their Phagocytosis by Macrophage. *Biomaterials* **9**, 356-362
188. Michelsen, K. S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C. J., and Schumann, R. R. (2001) The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs) - Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 25680-25686
189. Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A. (2005) TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1715-1724
190. Sugahara, T., Yamada, Y., Yano, S., and Sasaki, T. (2002) Heat denaturation enhanced immunoglobulin production stimulating activity of lysozyme from hen egg white. *Bba-Gen Subjects* **1572**, 19-24
191. Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N., and Kobayashi, K. (1983) Changes in the Emulsifying and Foaming Properties of Proteins during Heat Denaturation. *Agr Biol Chem Tokyo* **47**, 33-37
192. Ganz, T., Gabayan, V., Liao, H. I., Liu, L. D., Oren, A., Graf, T., and Cole, A. M.

- (2003) Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan. *Blood* **101**, 2388-2392
193. Lee, Y. J., Kang, I. J., Bunger, R., and Kang, Y. H. (2004) Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *J Appl Physiol (1985)* **96**, 793-801; discussion 792
194. Peus, D., Vasa, R. A., Beyerle, A., Meves, A., Krautmacher, C., and Pittelkow, M. R. (1999) UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **112**, 751-756
195. Kabuyama, Y., Homma, M. K., Sekimata, M., and Homma, Y. (2001) Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem Photobiol* **73**, 147-152
196. Ding, M., Li, J., Leonard, S. S., Shi, X., Costa, M., Castranova, V., Vallyathan, V., and Huang, C. (2002) Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 81-90
197. Gotoh, Y., and Cooper, J. A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* **273**, 17477-17482
198. Seo, M., Lee, Y. I., Cho, C. H., Bae, C. D., Kim, I. H., and Juhn, Y. S. (2002) Bidirectional regulation of UV-induced activation of p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase by G protein beta gamma-subunits. *J Biol Chem* **277**, 24197-24203
199. Seo, M., Cho, C. H., Lee, Y. I., Shin, E. Y., Park, D., Bae, C. D., Lee, J. W., Lee, E. S., and Juhn, Y. S. (2004) Cdc42-dependent mediation of UV-induced p38 activation by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem* **279**, 17366-17375
200. Khalil, C., and Shebawy, W. (2017) UVB damage onset and progression 24 h post

- exposure in human-derived skin cells. *Toxicol Rep* **4**, 441-449
201. Willkomm, L., Gehlert, S., Jacko, D., Schiffer, T., and Bloch, W. (2017) p38 MAPK activation and H3K4 trimethylation is decreased by lactate in vitro and high intensity resistance training in human skeletal muscle. *PLoS One* **12**, e0176609
202. Jux, B., Kadow, S., and Esser, C. (2009) Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol* **182**, 6709-6717
203. Fritsche, E., Schafer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hubenthal, U., Cline, J. E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L. O., Rannug, A., Furst, P., Hanenberg, H., Abel, J., and Krutmann, J. (2007) Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8851-8856
204. Loertscher, J. A., Sattler, C. A., and Allen-Hoffmann, B. L. (2001) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the differentiation pattern of human keratinocytes in organotypic culture. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 121-129
205. Loertscher, J. A., Lin, T. M., Peterson, R. E., and Allen-Hoffmann, B. L. (2002) In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes accelerated terminal differentiation in fetal mouse skin. *Toxicol Sci* **68**, 465-472
206. Sutter, C. H., Bodreddigari, S., Campion, C., Wible, R. S., and Sutter, T. R. (2011) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the expression of genes in the human epidermal differentiation complex and accelerates epidermal barrier formation. *Toxicol Sci* **124**, 128-137
207. van den Bogaard, E. H., Bergboer, J. G., Vonk-Bergers, M., van Vlijmen-Willems, I. M., Hato, S. V., van der Valk, P. G., Schroder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L., and Schalkwijk, J. (2013) Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in

- atopic dermatitis. *J Clin Invest* **123**, 917-927
208. Takagi, S., Tojo, H., Tomita, S., Sano, S., Itami, S., Hara, M., Inoue, S., Horie, K., Kondoh, G., Hosokawa, K., Gonzalez, F. J., and Takeda, J. (2003) Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest* **112**, 1372-1382
209. Pollet, M., Shaik, S., Mescher, M., Frauenstein, K., Tigges, J., Braun, S. A., Sondenheimer, K., Kaveh, M., Bruhs, A., Meller, S., Homey, B., Schwarz, A., Esser, C., Douki, T., Vogel, C. F. A., Krutmann, J., and Haarmann-Stemann, T. (2018) The AHR represses nucleotide excision repair and apoptosis and contributes to UV-induced skin carcinogenesis. *Cell Death Differ* **25**, 1823-1836
210. Frauenstein, K., Sydlík, U., Tigges, J., Majora, M., Wiek, C., Hanenberg, H., Abel, J., Esser, C., Fritsche, E., Krutmann, J., and Haarmann-Stemann, T. (2013) Evidence for a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes involving the aryl hydrocarbon receptor, E2F1, and checkpoint kinase 1. *Cell Death Differ* **20**, 1425-1434
211. Tanaka, Y., Uchi, H., Hashimoto-Hachiya, A., and Furue, M. (2018) Tryptophan Photoproduct FICZ Upregulates IL1A, IL1B, and IL6 Expression via Oxidative Stress in Keratinocytes. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 9298052
212. Tauchi, M., Hida, A., Negishi, T., Katsuoka, F., Noda, S., Mimura, J., Hosoya, T., Yanaka, A., Aburatani, H., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2005) Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol* **25**, 9360-9368
213. De Luca, G., Di Stazio, G., Margonelli, A., Materazzi, M., and Politi, V. (1987) Production of indole alpha-ketoacids from alpha-aminoacid, particularly of indolepyruvic acid. WO/1987/000169
214. De Luca, G., Di Stazio, G., Margonelli, A., Materazzi, M., and Politi, V. (1988) 3-

- indolepyruvic acid derivatives and pharmaceutical use thereof., WO88/09789
215. Takaura, Y., Hara, S., Taba, T., Suzuki, S., Sugiyama, M., Watanabe, K., and Yokozeki, K. (2013) Novel oxidase gene and method of producing 3-indolepyruvic acid using the gene. US 2013/0084610 A1, United States
  216. Abraham, T. W., Cameron, D. C., Dalluge, J., Hicks, P. M., Hobson, R. J., Mcfaran, S. C., Millis, J., Rosazza, J., Weiner, D. P., and Zhao, L. (2003) Polypeptides and biosynthetic pathways. WO/2003/091396
  217. Zhu, Y., Hua, Y., Zhang, B., Sun, L., Li, W., Kong, X., and Hong, J. (2017) Metabolic engineering of indole pyruvic acid biosynthesis in *Escherichia coli* with *tdiD*. *Microb Cell Fact* **16**, 2
  218. Kiliszek, A., Rypniewski, W., Rząd, K., Milewski, S., and Gabriel, I. (2019) Crystal structures of aminotransferases Aro8 and Aro9 from *Candida albicans* and structural insights into their properties. *J Struct Biol* **205**, 26-33
  219. McNab, R., Forbes, H., Handley, P. S., Loach, D. M., Tannock, G. W., and Jenkinson, H. F. (1999) Cell wall-anchored CshA polypeptide (259 kilodaltons) in *Streptococcus gordonii* forms surface fibrils that confer hydrophobic and adhesive properties. *J Bacteriol* **181**, 3087-3095
  220. Hirt, H., Erlandsen, S. L., and Dunny, G. M. (2000) Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance *asc10* in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. *J Bacteriol* **182**, 2299-2306
  221. Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., and Kojic, M. (2015) AggLb Is the Largest Cell-Aggregation Factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* BGNJ1-64, Functions in Collagen Adhesion, and Pathogen Exclusion In Vitro. *PLoS One* **10**, e0126387
  222. Le Jeune, A., Torelli, R., Sanguinetti, M., Giard, J. C., Hartke, A., Auffray, Y., and

Benachour, A. (2010) The extracytoplasmic function sigma factor SigV plays a key role in the original model of lysozyme resistance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* **5**, e9658

## 原著論文

第1章 UVB 照射による HaCaT 細胞の損傷および炎症反応に対する  
ピルビン酸の防御作用

Aoki-Yoshida A, Aoki R, and Takayama Y. “Protective effect of pyruvate against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2013) Vol. 115, No. 4, pp. 442-448. © [2012] The Society for Biotechnology, Japan. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.004>

第2章 UVB 照射による皮膚傷害に対する芳香族ピルビン酸の防御作用

Aoki R, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, and Takayama Y. “Protective effect of indole-3-pyruvate against ultraviolet B-induced damage to cultured HaCaT keratinocytes and the skin of hairless mice.” *PLoS One* (2014) Vol 9, No. 5, e96804. © [2014] Aoki et al. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096804>

第3章 インドール-3-ピルビン酸の腸管炎症抑制作用

Aoki R, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, and Takayama Y. “Indole-3-pyruvic acid, an aryl hydrocarbon receptor activator, suppresses experimental colitis in mice.” *Journal of Immunology* (2018) Vol. 201, No. 12, pp. 3683-3693. © [2018] The American Association of Immunologists, Inc. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701734>

第4章 卵白リゾチームの加熱凝集による *Lactococcus* 属乳酸菌体の IL-12  
誘導能の増強

Aoki R, Suzuki C, Kimoto H, Nomura M, and Mizumachi K. “*Lactococcus* strains treated with heat and hen-egg-white lysozyme induce abundant interleukin-12 production by J774.1 macrophages and murine spleen cells.” *Journal of Dairy Science* (2011) Vol. 94, No. 7, pp. 3262-3270. © [2011] American Dairy Science Association®. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3847>

## 謝辞

本研究を進める上でご助言およびご指導いただいた鈴木チセ博士、高山喜晴博士、水町功子博士に、深く感謝いたします。また、実験の遂行において大変なご協力をいただいた青木綾子博士に、深く感謝いたします。

マウスの飼育管理をしていただいた黒澤有子氏、小板橋千恵氏、MoFloの実験操作をご指導いただいた古澤軌博士、組織切片の作成にご協力いただいた小林勝氏に感謝いたします。

本研究をまとめる上でご助言およびご指導いただいた伏信進矢教授に深く感謝いたします。