

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 β 、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 β 、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)- γ 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、*Il10* の遺伝子発現を増加させた。この結果と一致して、イ

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- γ ⁻ IL-10⁻ CD4⁺ T 細胞の割合を減少させる一方で、IFN- γ ⁺ IL-10⁺ CD4⁺ 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- γ ⁻ IL-10⁺ CD4⁺ 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⁺ 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⁺ T 細胞に対する IFN- γ 産生誘導を減弱させたことから、大腸 LPL の IFN- γ ⁺ IL-10⁻ CD4⁺ 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⁻CD11b⁺樹状細胞を減少させる一方で、CD103⁺ CD11b⁻樹状細胞を増加させた。増加した CD103⁺ CD11b⁻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⁺ CD11b⁻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⁺ CD11b⁻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、 α -ラクトアルブミン、 β -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。