

審査の結果の要旨

氏名 王 蓉

アトピー性皮膚炎は、罹患者の多い重要な免疫疾患であり、生体中、食品中の種々の免疫調節物質による緩和作用が期待されている。本論文では、まず生体内調節物質である Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF)の新たな調製法を確立し、その後、アトピー性皮膚炎マウスモデルを構築し、それを用いて、GcMAF を含む4種の免疫調節物質について、皮膚炎緩和作用について検討している。さらに、これらの免疫調節物質のうち *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 およびアンセリンについて皮膚炎抑制機構の解明を進めたもので、序論と、本論の三章、および総合討論からなる。

第1章では、GcMAF の新しい調製法について検討している。ヒト血清より、25-hydroxy vitamin D₃ 結合カラム、ゲル滲過カラム、および陰イオン交換カラムを用いてヒト GcMAF の前駆体タンパク質である Gc protein を精製し、さらに sialidase、mannosidase、および β -galactosidase を固定化したカラムを使用して GcMAF を調製している。また、得られた Gc protein および GcMAF については LC-MS/MS 解析により確認している。以上より従来の方法と比べて純度が高い Gc protein を得ることにより、優れた GcMAF 調製法を確立している。

第2章では、dinitrochlorobenzene (DNCB)を用いたマウス皮膚炎モデルを作製し、GcMAF、フェルラ酸、*L. cremoris* およびアンセリンの緩和作用について検討している。まず、BALB/c マウス皮膚への DNCB 塗布による皮膚炎モデルの作製について検討し、耳に DNCB を塗布して感作を行い、さらに、背中に DNCB を塗布するチャレンジを行うことにより、有効な皮膚炎モデルが構築できることを示した。次に、4種の免疫調節物質による皮膚炎緩和作用について検討したところ、GcMAF については緩和作用が認められなかったが、フェルラ酸、アンセリンおよび *L. cremoris* については、耳の厚さが有意に低下し、皮膚炎を緩和する作用が認められた。この中で、アンセリンおよび *L. cremoris* は、インターフェロン (IFN)- γ の発現を上昇する傾向が認められた。

第3章では、アンセリンおよび *L. cremoris* のアトピー性皮膚炎抑制機構についてさらに解析を進めている。まず、in vitro の細胞培養系について、両免疫調節物質の作用について検討している。卵白アルブミン特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスである RAG23-3/BALB マウス由来脾臓細胞培養では、*L. cremoris* の添加によりインターロイキン (IL) -4 産生が抑制され、IFN- γ および IL-12 産生の増強が認められている。一方で、

アンセリンでは明確な変化は認められなかった。続いて、作用を受ける細胞についてより詳細に明らかにするため、抗原提示細胞と CD4⁺T 細胞の培養系を用いて、検討を進めている。腸間膜リンパ節樹状細胞を用いた培養では、*L. cremoris*、アンセリンともに、IFN- γ および IL-12 産生を増強し、パリエル板樹状細胞を用いた培養系では、IL-4 発現を抑制した。また、Th1, Th2 への分化過程における作用を検討したところ、アンセリンでは効果が認められず、*L. cremoris* 添加により、Th1 細胞では IFN- γ 産生が、Th2 細胞では、IL-4 産生が抑制された。以上の結果から、*L. cremoris* は複数の細胞に作用するのに対し、アンセリンは特定の抗原提示細胞に作用する可能性が示された。

続いて、経口投与・感作期間を 3 週間に延長した場合の緩和作用について検討している。その結果、この場合も *L. cremoris* およびアンセリンによって耳の厚さを指標とした緩和作用が認められた。*L. cremoris* により腸間膜リンパ節 Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の誘導が認められ、一方、アンセリン投与により、皮膚炎誘導により変化した腸内細菌叢が回復する傾向が認められている。また、経口投与期間を 11 日間と短くした場合においては、*L. cremoris*、アンセリン経口投与により、血中 IgE 抗体量および耳組織における IL-4 発現が低下した。

最後の総合討論では、*L. cremoris*、アンセリンの皮膚炎緩和機構について主に考察している。本研究の結果から、皮膚炎初期においては、*L. cremoris* およびアンセリンによるパリエル板における応答の制御により耳局所の IL-4 発現が低下し、血中 IgE 応答が抑制されることが示唆された。また、皮膚炎中期においては、*L. cremoris*、アンセリン経口投与による免疫調節作用は主に局所の IFN- γ の産生増強によるものであり、後期では、*L. cremoris* による制御性 T 細胞の誘導、アンセリンによる腸内細菌叢の調節により皮膚炎が緩和される可能性が示された。

以上、本論文は、免疫調節物質 GcMAF の調製法を確立し、皮膚炎モデルマウスを用いて *L. cremoris* およびアンセリンが、皮膚炎の経過において異なる作用で皮膚炎を緩和することを示したもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。