

## 論文の内容の要旨

論文題目： プラズマサイトイド樹状細胞を活性化する乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 の免疫賦活効果および老化抑制効果に関する研究  
氏名： 杉村 哲

### 第1章：序論

免疫システムは、非自己の病原体を認識し排除することによって、日常的な風邪症候群や季節性インフルエンザから新興感染症まで、生体を感染症から保護する極めて重要な機構である。また、がん細胞等の異常細胞や炎症・老化といった自己生体機能とも密接に関与していることが知られている。医学の進歩によって、これらの病気に対する免疫学的な治療法は劇的な発展を遂げているが、一方で、人々の生活の質（Quality of life）を高めるためには、日常的な食生活で予防し、未病を改善できることがより好ましい。

乳酸菌は、ヨーグルトに限らず飲料やタブレットとして日常的に摂取可能な安全な食品として広く受け入れられており、その生体に及ぼす機能性、特に免疫賦活能に関する研究は多数報告されている。また、近年ウイルス感染防御の中核を担う免疫サブセットとしてプラズマサイトイド樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell; pDC）が発見され大きな注目を集めているが、pDCを活性化する乳酸菌は知られていなかった。

我々はこれまでに、マウスを対象とした試験によって、pDCを活性化する希少な乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 (*L. lactis* JCM 5805) を見出している。*L. lactis* JCM 5805 の活性本体はDNAであり、TLR9/MyD88経路を介してpDCを活性化させ、I型インターフェロン（IFN）産生を誘導することができる。本研究では、ヒトにおける免疫賦活効果の検証に加え、環境ストレスや老化ストレスとpDC活性の相互影響、および当該乳酸菌摂取による効果の検証を行った。

### 第2章：*L. lactis* JCM 5805 によるヒト由来 pDC 活性化作用の検証

*L. lactis* JCM 5805 について、ヒト由来 pDC に対しても同様の作用があるのか検証を行った。ヒト由来末梢血単核細胞より pDC を単離し、*in vitro* において *L. lactis* JCM 5805 を添加培養したところ、pDC による *L. lactis* JCM 5805 の貪食が認められ、pDC 活性が上昇することを確認した。また、IFN 遺伝子群および IRF 遺伝子群の転写解析を行ったところ、これらの遺伝子の転写レベルが上昇していた。マウスと異なり、タンパク質レベルでの IFN 類の産生誘導は確認されなかったことから、ヒト由来 pDC に対してはマイルドな刺激であると考えられるものの、ウイルス感染時の応答性を高めている可能性が示唆された。

続いて、*L. lactis* JCM 5805 摂取時の生体内 pDC の活性を検証するために、38名の健康成人男女を対象に4週間摂取の二重盲検群間比較試験を実施した。その結果、プラセボグ

ループの pDC 活性が摂取期間前後で有意に低下するのに対し、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取グループ (*L. lactis* JCM 5805 グループ) では pDC 活性の低下がなく、摂取期間後の pDC 活性の比較において、*L. lactis* JCM 5805 グループが有意に高いという結果であった。また、摂取期間前の pDC 活性を基に高 pDC 活性層と低 pDC 活性層に分けて層別解析を行ったところ、低 pDC 活性層において効果が顕著であった。加えて、低 pDC 活性層においては、摂取期間前後の *IFN- $\alpha$*  遺伝子の転写量や、TLR9 リガンドである CpG 刺激に対する *IFN- $\alpha$*  産生量が、*L. lactis* JCM 5805 グループにおいてのみ有意に上昇することも確認された。これらの結果から、ヒトにおける *L. lactis* JCM 5805 摂取による免疫賦活効果は、特に pDC 活性が低い際に有効的であると考えられた。さらに、摂取期間中の風邪様症状の主観的評価の解析により、摂取期間の最終週 (第 4 週) において *L. lactis* JCM 5805 グループの累積発症日数が有意に低くなり、感染防御効果がある可能性が示唆された。

### 第 3 章 : *L. lactis* JCM 5805 摂取によるインフルエンザウイルスに対する効果の検証

インフルエンザ様症状の発症に対する効果、およびインフルエンザウイルスに対する応答性の検証を目的に、213 名の健常成人男女を対象に冬期 10 週間摂取の二重盲検群間比較試験を実施した。まず、インフルエンザ様症状の主観的評価の解析により、インフルエンザ様症状の代表的症状である発熱と咳の累積発症日数において、*L. lactis* JCM 5805 グループがプラセボグループに対して有意に低いという結果が得られた。さらに、被験者の末梢血単核細胞に対して不活化したヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) を添加培養し、*IFN- $\alpha$*  遺伝子の転写レベルを評価した結果、摂取期間後において *L. lactis* JCM 5805 グループの *IFN- $\alpha$*  遺伝子の転写レベルがプラセボグループよりも高い傾向にあった。さらに、*IFN* 類によって発現誘導されてインフルエンザウイルスの複製や増殖を抑制することが知られる *ISG15* に関して、摂取期間後における *L. lactis* JCM 5805 グループの *ISG15* 遺伝子の転写レベルがプラセボグループよりも有意に高かった。

以上の結果から、*L. lactis* JCM 5805 を摂取することによって、インフルエンザウイルスをはじめとするウイルスの感染時における *IFN* 類や *IFN* によって発現誘導される抗ウイルス因子の発現の応答性が高まり、そのことによって咳や発熱といったインフルエンザ様疾患の症状の発症や重症化が抑制されるものと考えられた。

### 第 4 章 : 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響と *L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証

新型インフルエンザやデング熱といった新興ウイルスは季節を選ばず、むしろ熱帯・亜熱帯地域といった高温環境下において猛威をふるう。また、日本国内の夏季においても、室内外の急激な温度変化等が一因となって体調を落とすこともあり、温度ストレスと免疫機能の関連性は非常に興味深い。本章では、マウスを対象に高温ストレスを負荷した際の pDC

活性への影響とともに、*L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証を行った。

まず、マウスを 37°C の高温環境下で飼育したところ、24 時間の高温ストレス負荷によって脾臓の pDC 活性が有意に低下した。一方で、ミエロイド樹状細胞 (mDC) 活性に変化はなく、また腸間膜リンパ節の pDC 活性にも変化は見られなかった。続いて、2 週間の *L. lactis* JCM 5805 混餌投与後に同様に 24 時間の高温ストレス負荷をかけた結果、*L. lactis* JCM 5805 群の脾臓の pDC 活性はコントロール群の pDC 活性よりも有意に高くなった。さらに、TLR9 リガンドである CpG で脾臓由来細胞を刺激した際の IFN- $\alpha$  産生量も、*L. lactis* JCM 5805 群が有意に高いという結果であった。これらの結果より、高温ストレスは pDC 活性の低下をもたらすが、*L. lactis* JCM 5805 を摂取することによって pDC 活性の低下を防ぐことができ、さらにウイルス感染時の応答性が高まる可能性も示唆された。外的なストレス因子が免疫機能に影響を及ぼし、それに対する *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果を示すことができたと言える。

#### 第 5 章：*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果の検証

老化によって引き起こされる免疫機能の低下は、感染症、腫瘍形成、慢性炎症のリスクを高め、老化を加速させると考えられる。pDC や mDC は自然免疫系と獲得免疫系の両方に作用し、免疫機能全般に大きく寄与する重要な免疫細胞である。そこで、pDC を活性化できる乳酸菌 *L. lactis* JCM 5805 を生涯にわたって長期的に摂取することにより、老化に伴う免疫機能の低下、あるいは老化の進行そのものを抑制できる可能性がある。本試験では、老化促進モデルマウス (SAM) を用いて、*L. lactis* JCM 5805 の長期経口投与試験を実施し、生存率、老化形質、および pDC 活性を含む免疫機能の評価を行った。

SAMP6 系統を *L. lactis* JCM 5805 群とコントロール群の 2 群に分け、82 週令まで経口投与を継続した結果、*L. lactis* JCM 5805 群の生存率と老化スコアが、コントロール群と比較して顕著に改善された。解剖時の病理解析により、*L. lactis* JCM 5805 群では肝細胞病巣変化の頻度が有意に低く、肝臓および肺における他の病理学的所見の発生率も低い傾向であった。また、肺の *Il-1 $\beta$*  遺伝子の転写レベルも *L. lactis* JCM 5805 群で低い傾向にあった。さらに、加齢による皮膚の薄化と筋肉量の低下が、*L. lactis* JCM 5805 群で有意に抑制されていた。これらの表現型と一致して、pDC 活性および mDC 活性はコントロール群よりも *L. lactis* JCM 5805 群で有意に高かった。pDC 活性および mDC 活性の維持は、日常的な日和見感染の抑制、Treg 細胞の誘導、創傷治癒効果等を介して、慢性的な炎症を抑制できると考えられる。*L. lactis* JCM 5805 を長期的に摂取することで、慢性炎症に起因する腫瘍形成や老化形質の発現が抑制され、老化抑制・寿命延長させられる可能性が示唆された。

#### 第 6 章：総括

本研究によって、*L. lactis* JCM 5805 の摂取がマウスだけでなくヒトにおいても pDC を活性化させ、ウイルス感染防御効果を発揮することが示唆された。特に、pDC 活性が低下

している条件において効果が顕著である点や、無為に血中の I 型 IFN 類を増加させるのではなく、ウイルス刺激に対する応答性を高められる点は、過度な免疫亢進を誘導することにならず、日常的に摂取する食品として適した特性であると考えられる。

また、動物試験において、高温ストレスにより pDC 活性が低下し、それに対して *L. lactis* JCM 5805 摂取が改善効果を示すことを明らかにした。さらに、老化促進マウスを用いた試験において、生涯にわたる *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が pDC 活性の維持に寄与し、その結果、顕著な老化抑制と寿命延長をもたらすという新たな知見を得ている。これらの結果は、温度ストレスのような外的因子や老化のような内的因子が、免疫機能の中樞を担う pDC にネガティブな影響を与え、それに対して *L. lactis* JCM 5805 摂取が pDC 活性の維持に効果を有することで、感染防御や慢性炎症を介した老化の抑制に寄与できる可能性を示している。

乳酸菌および乳酸菌を用いて発酵させたヨーグルトは、多くの健康機能性が報告されており、一般の消費者の中でも健康機能性食品として広く認知されている。その中で、pDC を直接活性化できる *L. lactis* JCM 5805 は稀有な乳酸菌である。pDC 活性を高める、あるいはその活性低下を維持することで、免疫機能全般の恒常性に寄与でき、短期的な感染防御効果だけではなく、長期的に老化抑制効果も発揮できることを示した。pDC は比較的近年になって注目されるようになった免疫サブセットであるが、*L. lactis* JCM 5805 を介してその機能の研究を深耕することにより、現代の人々の予防・未病の可能性を高め、さらに今後の食品免疫学や医学の発展にも寄与しうるものと考えられる。