

博士論文

乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* L-92 株の
腸管免疫系への作用と関連分子の解析

柳原 沙恵

目次

第1章 緒言	1
第2章 L-92株の小腸パイエル板からの取り込みと関連分子の解析	12
第3章 L-92株の免疫細胞への作用の解明	51
第4章 L-92株の腸管上皮への作用の解明	65
第5章 総合討論	77
略語	83
参考論文	85
論文の内容の要旨	94
謝辞	98

第1章 緒言

1. 1. 乳酸菌について

乳酸菌は、広義には糖を発酵して多量の乳酸を生産する細菌の総称であり、古くから人間の生活に深く結びついた有用な微生物である。グラム陽性の桿菌または球菌であり、カタラーゼ陰性、ビタミン B 群のうちナイアシンを必須要求するなどの特徴がある。自然界では、乳酸菌は乳や植物を原料とした発酵食品、腸管内などに分布している。近年、我々は、ヨーグルト、チーズ、バターなどの発酵乳や漬物、醸造酒などに乳酸菌を利用しておいしさを享受するばかりでなく、整腸作用、抗腫瘍性、血圧降下作用、血糖値の上昇抑制など乳酸菌によって健康も享受してきた¹⁾。

乳酸菌の保健効果に関する着目は、1908年にノーベル賞受賞者であるメチニコフが「不老長寿説」を唱えたことに始まる。これは、発酵乳を多く摂取しているコーカサス地方の人々が長寿であることから、ヨーグルトの中に含まれる乳酸菌により腐敗菌の作用を抑制するという考え方を提案し、現在の乳酸菌研究の先駆けとなる考え方であるとされている。乳酸菌の保健効果は、乳酸菌が腸内細菌や病原菌と相互作用することや、乳酸菌が宿主細胞とクロストークすることなどによると考えられている。腸内細菌や病原菌などと相互作用するには、栄養の競合による排除や抗菌物質の産生、他の微生物の生育に必要な物質の産生が重要であるため、乳酸菌が生きていることが必要と考えられる。一方、宿主細胞に作用するには、宿主の細胞が乳酸菌を認識することによるため、乳酸菌の生死にかかわらず、乳酸菌の保有する菌体成分が重要であると考えられている²⁾。

1. 2. 乳酸菌の免疫調節作用

乳酸菌の様々な保健効果の中でも最も多く研究されている機能は免疫調節作用であ

り、様々な機能性乳酸菌が世界中で開発され、食品やサプリメントとして利用されている（表 1.1）。本研究で対象とする、*Lactobacillus acidophilus* L-92 株（以下、L-92 株）は、花粉症や通年性アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などアレルギー症状への改善効果や冬季の感染防御効果が確認されている免疫調節機能を有する乳酸菌である。L-92 株は、Ovalbumin (OVA)感作によるアレルギーモデルマウスに各種乳酸菌の発酵乳を経口投与し、血中 Immunoglobulin (Ig) E 抗体価の上昇抑制効果を比較した結果、IgE 産生抑制効果の高い乳酸菌として選別された³。その後、様々な症例試験においてアレルギー症状の改善効果が実証されている。例えば、花粉症や通年性アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などアレルギー症状の緩和効果が確認されている。花粉症への効果については、スギ花粉飛散時期に、花粉症の症状をもつ被験者を対象に試験をした結果、L-92 株を含む飲料を摂取した群では L-92 株を含まない飲料を摂取した群と比較して、眼の症状スコアが有意に改善した⁴。通年性アレルギー性鼻炎をもつ患者を対象に行った試験では、L-92 株を含む飲料を摂取した群では L-92 株を含まない飲料を摂取した群と比較して、鼻の症状が有意に改善し、眼の症状は改善傾向が示された⁵。アトピー性皮膚炎については、小児と成人においてそれぞれ有用性が確認され、小児を対象とした試験では、L-92 株を摂取した群では L-92 株を摂取しない群と比較して、症状の緩和の程度が大きいことが示され、また血中のヘルパーT細胞 (Th) のサブセットである Th2 マーカーである Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) 値の上昇も抑制された⁶。成人を対象とした試験では、L-92 株を摂取した群では L-92 株を摂取しない群と比較して、皮膚炎スコアが有意に改善し、アレルギー性の炎症に伴って増加する血中の好酸球数が減少し、制御性 T 細胞 (Treg) 誘導因子の一つである Transforming growth factor β (TGF- β) が増加した⁷。近年では、L-92 株の感染防御効果も確認されており、L-92 株を摂取した群では L-92 株を摂取しない群と比較して、唾液中から A 型インフルエンザウイルスが検出された人の割合が有意に少ないことも確認されてい

る⁸ (表 1.2)。

1. 3. アレルギー性疾患について

アレルギーとは、特定の異物に対して起こる過剰な免疫応答であり、日本や先進諸国ではアレルギー性疾患の罹患者数は増加している。アレルギーには様々な型があるが、花粉症や鼻アレルギー、アレルギー性喘息、蕁麻疹、アナフィラキシーなどはI型アレルギーとして分類され、即時型アレルギーとも呼ばれる。アレルゲン（抗原）に暴露されるとB細胞からIgE抗体が産生され、マスト細胞や好塩基球上の受容体にIgEが結合するとヒスタミンなどが放出されて、血管拡張や気管支収縮が起こり、皮膚の紅斑やかゆみ、鼻づまりやくしゃみなどのアレルギー症状を示す⁹。

アレルギー性疾患の発症には、主に生活習慣や遺伝的素因などの内的要因と、大気環境汚染や居住環境などの外的要因が深く関わっているとされる。さらに、その原因の一つとして「衛生仮説」が提唱されており、これは、公衆・衛生環境が改善されて成長期に微生物に接触する機会が減ることで、免疫系の発達が不十分になるというものである¹⁰。ヘルパーT細胞のうちTh1細胞は、主に細胞性免疫のなかでマクロファージや樹状細胞などの貪食作用を活性化させ、Th2細胞は主に液性免疫のなかでB細胞を刺激して抗体産生を活性化させるが、相対的にTh1細胞よりTh2細胞が優位であれば、アレルギー性疾患が増大する⁹。つまり、衛生仮説は、Th2優位である出生時の状態から、成長とともに微生物に接触してTh1が発達する機会が不十分になることで、Th1細胞とTh2細胞のバランス（Th1/Th2バランス）が乱れてアレルギー性疾患の発症に関与するとされている。

1. 4. 一般的な乳酸菌の宿主免疫系への作用

乳酸菌の有効性を検証するための臨床試験については世界中で数多く報告されてお

り、ロタウイルス感染による急性下痢、過敏性腸症候群、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、アトピー性湿疹などのアレルギー性疾患に対する有効性が示されている¹¹。このような臨床試験の結果、乳酸菌は生体に対して免疫調節作用を有することが示唆されるが、その詳細な作用メカニズムは明らかとなっておらず、またその効果が乳酸菌株毎に異なっている点に関しても理由は不明である。経口摂取された乳酸菌は腸管へ到達し、腸管の様々な部位において宿主細胞による乳酸菌の菌体成分が認識されると考えられている。腸管上皮細胞による乳酸菌の菌体成分の認識により、上皮細胞からのサイトカインの産生やβディフェンシンの産生、タイトジャンクション保護や抗アポトーシスなどが報告されている¹²。また、外部から病原体を含む様々な抗原が侵入する腸管では、主に小腸のパイエル板や腸間膜リンパ節に免疫細胞が集合しており、体内最大の免疫機能を担っている。腸管免疫系において、貪食細胞である樹状細胞により乳酸菌の菌体成分が認識されると、樹状細胞からのサイトカインの産生や抗原提示の補助刺激分子の発現が促進され、その後の免疫応答につながるとされている¹²。

一方、L-92株をはじめとして、免疫系に作用すると考えられている多くの機能性乳酸菌の作用メカニズムに関しては必ずしも統一された説明がなされていない。その理由の一つに、乳酸菌といっても菌種や菌株によって、遺伝子や菌体の特徴上の違いなどにより宿主への作用が大きく異なることによると考えられる。また、評価法が統一されておらず、用いる評価方法によって得られる結果が異なるということも考えられる。メカニズムの研究に関しては、経口摂取により乳酸菌菌体が腸管に到達して腸管免疫系に作用するものと考えられ、主にパイエル板に存在する免疫細胞への直接作用に着目した研究が主流となっている。

1. 5. L-92株の作用メカニズムのまとめと課題

ヒト試験で明らかとなったL-92株の免疫調節効果について、その作用メカニズムの

解明を目的として、*in vivo*、*in vitro* の様々な試験が報告されている。Cluster of differentiation (CD) 4⁺ ナイーブ T 細胞、抗原提示細胞、OVA と L-92 株を共培養すると、L-92 株を添加しない場合と比較して Interferon γ (IFN- γ) の産生が増加し、Interleukin (IL) -4 の産生が減少したことから、L-92 株は Th1 細胞を活性化させて Th2 細胞を抑制し、Th1/Th2 バランスの崩れを改善することが示唆された¹³。さらに、Th1 細胞と Th2 細胞を抗原提示細胞、OVA に L-92 株を添加して培養すると、L-92 株を添加しない場合と比較して Th1 細胞、Th2 細胞にアポトーシスを誘導し、その割合は Th2 細胞の方がより高いことも示された。さらに、L-92 株の添加により樹状細胞に補助刺激分子である Human B7 Homolog 1 (B7-H1)、Human B7 Homolog 2 (B7-H2) が発現上昇し、T 細胞にアポトーシスを誘導することで L-92 株が Th1/Th2 バランスを調節することが示唆された¹³。さらに、アトピー性皮膚炎マウスに L-92 株を経口投与した場合と投与していない場合において、脾臓および頸部リンパ節の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 細胞の割合を調べた結果、L-92 株を投与したマウスでは投与していないマウスに比べ、脾臓、頸部リンパ節ともに Treg の割合が増加していた。また、炎症部位である耳の組織において、Treg のマーカーである Foxp3、Treg 誘導因子である TGF- β や IL-10 の mRNA 発現量が増加していたことから、アレルギー状態においては L-92 株が Treg を誘導して炎症を抑えることが示唆された¹⁴。また、L-92 株を経口投与したマウスと投与していないマウスにおいて、インフルエンザウイルスを経鼻感染させた結果、L-92 株を投与したマウスでは L-92 株を投与していないマウスに比べて症状が軽く、肺中のウイルス価も有意に低かった。また、L-92 株の投与で肺の Natural Killer (NK) 細胞活性が上昇しており、L-92 株は NK 細胞を活性化させ、インフルエンザウイルスを予防することが示唆された¹⁵。これらの知見を元に推察される作用メカニズムを図 1.1 にまとめた。

このように、L-92 株は免疫系に作用し、樹状細胞などの抗原提示細胞を介して

Th1/Th2 バランスの調節、Treg の誘導を引き起こすことでアレルギー症状を改善することが、また、NK 細胞の活性を上昇させることで感染防御に関与することが示唆されている。しかしながら、L-92 株が腸管に到達して樹状細胞に接触するまでの過程は不明であるとともに、様々な乳酸菌の中で L-92 株がなぜ免疫調節能を有するのかなどは未だ解明されていない。

1. 6. 本研究の目的とアプローチ

本研究の目的は、他の乳酸菌においてもまだ確認されていない乳酸菌の樹状細胞への取り込み、すなわち経口摂取により腸管に到達した L-92 株が腸管免疫系へ作用する経路の解明と、それによって起こる生体応答を評価することにある。小腸パイエル板の上皮に存在する“M 細胞”と呼ばれる細胞に取り込まれることで体内に存在する樹状細胞へと接触し、以降の宿主腸管免疫応答を引き起こすことの実証を試みた。その際に、関与する分子を宿主側と乳酸菌側で特定し、その関与を排除した場合に免疫応答が起こるのかどうかについても評価した。またその結果、L-92 株の菌体が免疫系に作用するための分子的特徴を明らかにし、腸管免疫系に作用するための乳酸菌としての特徴を考察し、さらには、樹状細胞に取り込まれた L-92 株の菌体がどのような初期の免疫刺激をするのかを理解することも目的とした。また、経口的に摂取した L-92 株の菌体が腸管上皮細胞にどのように作用するのかについても理解を深めるために検討を行った。腸管におけるパイエル板の割合は少なく、L-92 株が免疫系以外の腸管全体への上皮細胞への作用に関しても重要な役割を持つと考え、その意義性に関して理解することを目的とした。これらの研究を通して、機能性乳酸菌として開発された L-92 株が、乳酸菌の中で腸管への刺激においてどのような利点があり、今後どのような機能開発への期待が持てるものかについても考察を加えたい。

より具体的には、図 1.2 に示すように、3 ステップに分けて研究を行った。第 2 章に

示す研究においては、経口摂取された L-92 株が宿主に対して免疫調節作用を発揮するために、L-92 株の菌体が M 細胞から取り込まれて樹状細胞に取り込まれることを、蛍光標識した L-92 株を用いて共焦点顕微鏡観察することで検証した。さらに、宿主の M 細胞と L-92 株の両方において M 細胞からの取り込みに関与する分子の解明を、M 細胞特異的に発現する分子への結合性評価および、プロテオーム解析による分子比較によってそれぞれ行った。その結果から、L-92 株の免疫調節作用における特徴付けに関して考察を加えた。また、宿主側の重要分子の欠損により L-92 株の刺激を排除された状態における、生体側の応答に関しても評価を行った。

第 3 章の研究では、L-92 株の菌体が樹状細胞に取り込まれた後の細胞内での免疫応答について調べた。*In vitro* において L-92 株が樹状細胞に接触した際の遺伝子発現変化を解析するため、マクロファージ様に分化させた樹立細胞をモデルとして L-92 株に対する応答をマイクロアレイによって解析した。L-92 株への接触初期と後期に分けて解析し、L-92 株への応答パターンを分析することで Th1/Th2 バランスの改善や制御性 T 細胞の誘導などに至る細胞内の応答に関する一連の流れを推定した。

一方、第 4 章においては、L-92 株の腸管上皮細胞に対する影響を推察するために、小腸上皮細胞様の樹立細胞を用いた細胞応答に関して評価した。L-92 株に接触した細胞の応答を解析するためにマイクロアレイ解析を行い、さらに、複数の *L. acidophilus* 株を用いて上皮細胞への接着性を比較することで、上皮細胞への接着性に関与する乳酸菌分子についても推察した。

これらの結果をもとに、5 章では L-92 株の腸管免疫系への作用機序をまとめ、腸管への影響における利点や菌体としての特徴的な性質を考察した。さらに、課題を整理し今後の応用展開についても議論した。

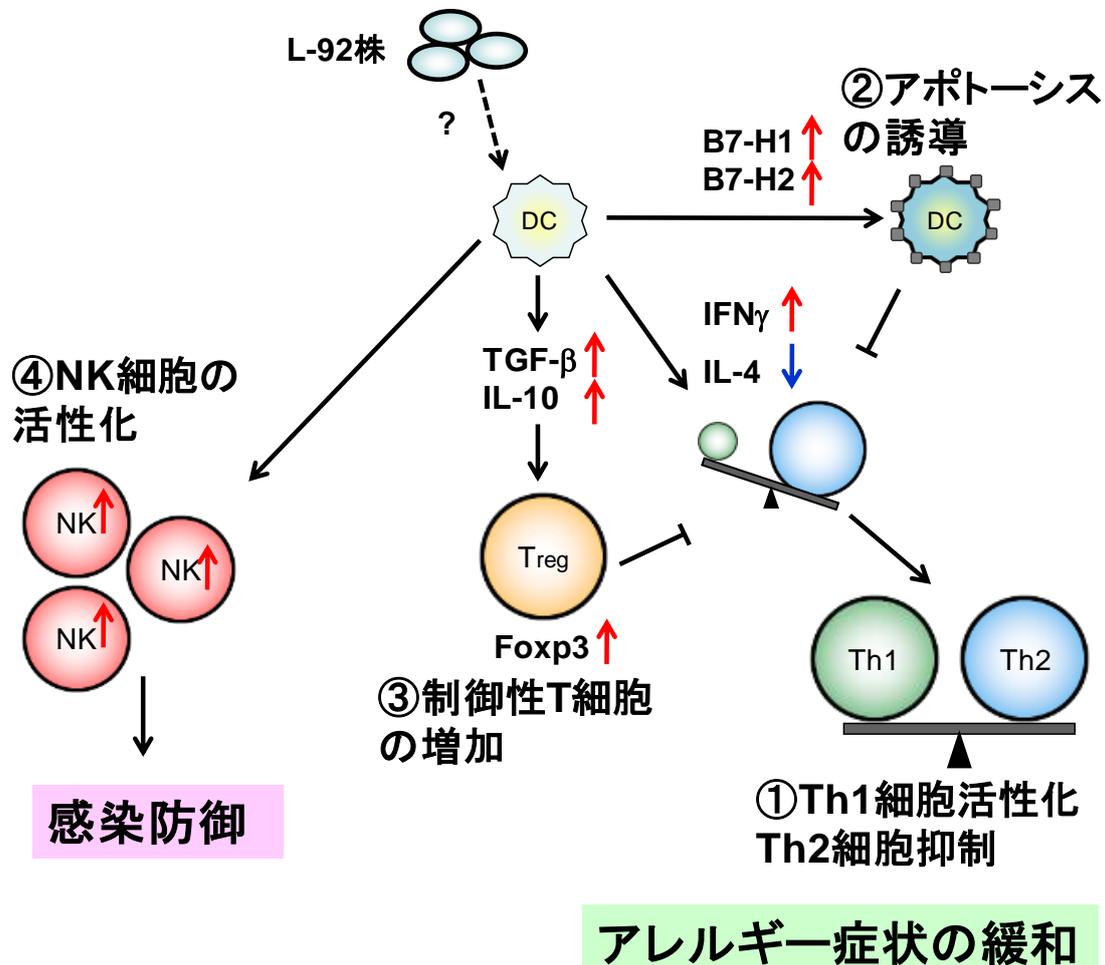
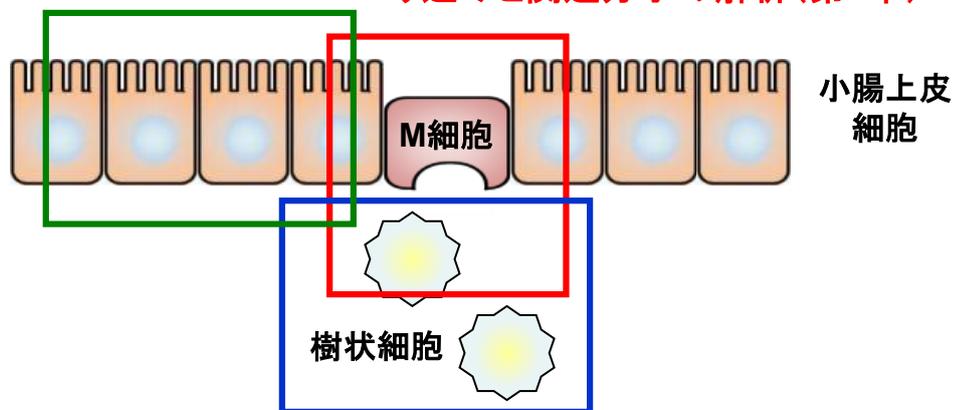


図1.1 これまでの研究から示唆されるL-92株の免疫調節の作用メカニズム

L-92株が樹状細胞(DC)などの抗原提示細胞に貪食され、① $\text{IFN-}\gamma$ 産生誘導および IL-4 産生抑制によりTh1細胞活性化/Th2細胞抑制、② $\text{TGF-}\beta$ および IL-10 産生誘導により制御性T細胞が増加して過剰なT細胞を抑制し、③DC表面にB7-H1, B7-H2補助刺激分子発現上昇により過剰なT細胞にアポトーシスを誘導によってTh1/Th2バランスを改善し、アレルギー症状を緩和する。また、④NK細胞の活性化により感染防御にはたらく。

③L-92株の腸管上皮への作用の解明(第4章)

①L-92株の小腸パイエル板からの取り込みと関連分子の解析(第2章)



②L-92株の免疫細胞への作用の解明(第3章)

図1.2 本研究のアプローチまとめ

①第2章では、腸管に到達したL-92株が体内に存在する樹状細胞に認識される経路を、M細胞に着目して解明を試みた。②第3章では、L-92株に対する樹状細胞の免疫応答の解明を目的として、細胞株を用いた検討を行った。③第4章では、L-92株に対する腸管上皮細胞の応答と、腸管上皮細胞への接着性に関与する分子について調べた。

表1.1 食品やサプリメントとして利用されている乳酸菌

菌株	主な機能	メーカー
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	子供のアトピー性皮膚炎の予防 花粉症の症状抑制	バリオ
<i>Lactobacillus johnsonii</i> Lj-1	サルモネラワクチンの効果増強	ネスレ
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	下痢の抑制	ダニスコ
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	下痢の抑制 花粉症の症状抑制 がん予防	ヤクルト
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> OLL1073R-1	インフルエンザ感染抑制 NK細胞活性化	明治
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	花粉症の症状抑制	森永
<i>Lactobacillus pentosus</i> S-PT84	インフルエンザ感染抑制 NK細胞活性化	サントリー

表1.2 L-92株を用いた症例試験

症例	人数:試験群	期間	結果 (プラセボ群と比べてL-92群において)	参考文献
花粉症	12:L-92株(殺菌発酵乳)群 11:プラセボ群	6週間	眼の症状スコアが改善	4
通年性アレルギー性鼻炎	20:L-92株(殺菌発酵乳)群 20:プラセボ群	8週間	鼻の症状スコアが改善 眼の症状スコアが改善傾向	5
小児アトピー	26:L-92株(殺菌粉末)群 24:プラセボ群	8週間	症状の緩和の程度が大きかった 血中TARC値の上昇抑制	6
成人アトピー	24:L-92株(タブレット)群 25:プラセボ群	8週間	皮膚炎スコアが改善 血中好酸球数が減少 血中TGF-βが増加	7
インフルエンザ	111:L-92株(ヨーグルト)群 110:非摂取群	8週間	唾液からA型インフルエンザウイルスが検出された人の割合減少	8

第2章 L-92 株の小腸パイエル板からの取り込みと関連分子の解析

2. 1. 緒言

過去の動物試験やヒトに対する様々な試験成績から、L-92 株は生体の免疫調節能を有する乳酸菌であると考えられ、経口摂取により各種サイトカインの誘導により宿主の免疫を調節することが示唆されているものの、腸管免疫系への直接的作用や関連分子などに関しては、全く明らかにされていない。そこで、本章では腸管免疫系を主に担っている小腸パイエル板における M 細胞を介した樹状細胞へのアクセスに着目して、腸管免疫系への作用に至るルート探索と関連分子の解析を行った。

経口摂取された乳酸菌が腸管免疫系に作用するためには、小腸上皮に存在する、1) ”M 細胞” と呼ばれる特殊な細胞から取り込まれて、免疫組織である樹状細胞に取り込まれるとする説と、2) 上皮細胞間から触手を伸ばした樹状細胞に直接サンプリングされる、とする説などが提案されている¹²。近年、RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) という M 細胞の分化に関係する分子を上皮特異的に欠損させて、M 細胞を欠損させたマウスでは、糞便中の分泌型 IgA が産生されないことが明らかにされた¹⁶。すなわち、M 細胞が微生物の取り込みや、それに続く生体免疫システムの作動において主要な役割を担うことが示された。そこでまず本研究では、L-92 株が腸管免疫系に作用するための免疫系へのアクセス経路として、M 細胞が重要な役割を担うのではないかと仮説を立て、M 細胞からの L-92 株の取り込みと、関連する特徴的分子の探索を行った。

M 細胞とは、小腸パイエル板の濾胞上皮に存在する抗原の取り込みに重要な細胞であり、微絨毛が未発達で細胞表面が膜状 (membranous) あるいは小さなひだ状 (microfold) をしていることから、その頭文字をとって M 細胞と呼ばれている。形態学的には、M 細胞は微絨毛が未発達なことから、電子顕微鏡で観察すると周りの細胞

と比べて少し窪んで観測され、M 細胞は基底膜側にポケット構造を有しており、そこに樹状細胞などの免疫細胞が入り込むことが報告されている¹⁷⁻¹⁸。

菌やウイルスなどの取り込みを担う M 細胞を標的とした経口ワクチンの開発に向けて、M 細胞表層に特徴的に発現される分子について最近報告がなされている。M 細胞に発現する分子と、それに結合する微生物側のリガンドが明らかになっているものもある¹⁹。例えば、大腸菌やサルモネラ菌の繊毛を構成する FimH は M 細胞に特徴的に発現する Glycoprotein 2 (GP2) に²⁰、ブルセラ菌の Heatshock protein (Hsp) 60 は Cellular prion protein (PrP^c) に²¹、エルシニア菌の Invasion が β 1 integrin に²²それぞれ結合することで、M 細胞内へ侵入することが明らかとなっている。GP2 や PrP^c は、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーという糖脂質により、細胞膜に繋ぎ止められた GPI アンカー型タンパク質である。

一方、乳酸菌の M 細胞への取り込みに関与する因子や取り込みに関しては報告がないものの、無菌マウスに大腸菌 *Escherichia coli* O157:H7 とビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* をそれぞれ、あるいは同時に投与し、濾胞上皮にて発現上昇する遺伝子をマイクロアレイにより解析した場合、大腸菌とビフィズス菌で共通して発現上昇してくる分子と、濾胞上皮特異的に発現している分子が多く共通することが理研グループにおいて見出されている（データ未発表）。菌に反応して濾胞上皮特異的に発現する複数の分子が免疫染色法において M 細胞特異的に発現することが確認されている。その中で、GPI アンカー型タンパク質としては新たに Uromodulin が M 細胞特異的に発現していることも見出された。

そこで、まず、本研究においては、L-92 株が腸管免疫系にアクセスするための経路として、M 細胞特異的に発現する GPI アンカー型タンパク質に結合して、M 細胞に取り込まれるのではないかと仮説を立て、腸管ループアッセイを用いて M 細胞からの取り込みおよび M 細胞特異的 GPI アンカー型タンパク質への結合性を行い、関連分子の

特定を試みた。本研究を実施するにおいて、M細胞特異的に発現する遺伝子群に関する情報やM細胞からの取り込みに関するノウハウを保有する理化学研究所と共同研究を行った。

2. 2. 実験方法

2. 2. 1. 乳酸菌の調製

自社ライブラリーに保存の *L. acidophilus* L-92 株と CP23 株を、Man Rogosa Sharpe (MRS) 培地 (Difco Laboratories) で 20 時間静置培養した後、8,000 rpm, 5 分間遠心分離して PBS (Wako) で 2 回洗浄した菌体を用いて以下の実験を行った。

2. 2. 2. マウスの飼育および準備

全ての動物実験は、理研動物実験審査委員会の承認を得て行い、マウスを用いた実験については理化学研究所の SPF (Specific Pathogen Free) 環境下の動物実験施設で飼育及び、実験を行った。C57BL/6J マウスおよび Balb/c マウスを、日本クレア株式会社から購入し、最低 1 週間馴化させ各動物試験に供した。Uromodulin 欠損 (*Umod^{-/-}*) マウス²³は、ニューヨーク大学 (Xue-Ru Wu 教授)より分譲を受け、C57BL/6J マウスおよび Balb/c マウスと交配させ、腸管ループアッセイには C57BL/6J マウスとの交雑第二世代を使用し、*in vivo*でのパイエル板取り込み実験および NK 活性測定実験には Balb/cA マウスとの交雑第四世代を用いた。

2. 2. 3. 乳酸菌の M 細胞からの取り込み確認

マウスをイソフルラン (マイラン製薬) 麻酔下において、1 センチほど開腹して小腸を取り出し、パイエル板の両端を糸で縛った。そこに、Cy3 標識した乳酸菌を、 10^9 cells/ml となるように PBS に懸濁させた溶液を 100 μ l、26 1/2 G の注射針を使用して

注入した (図 2.1a)。腸管を腹内に戻し、腹部の切断箇所をクリップで止めて、1 時間室温にて放置した。麻酔下においてマウスを頸椎脱臼してパイエル板を切り出した。

パイエル板を HBSS 溶液 (GIBCO) で洗浄し、BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) で固定し、Perm/Wash™ Buffer 10x (BD Biosciences) を蒸留水で希釈し、Saponin from Quillaja bark (SIGMA) を終濃度 0.1% となるように添加した洗浄液で洗浄した。さらに、Perm/Wash™ Buffer 10x を蒸留水で希釈し、BSA (Wako) を終濃度 0.2% となるように、Saponin を終濃度 0.1% となるように添加したブロッキング溶液でブロッキングした。次に、Rat anti-mouse GP2 IgG2a (clone 2F11-C3) (1.0 mg/ml) および Biotin Hamster Anti-mouse CD11c (Clone HL3, BD Pharmingen™) (0.5 mg/ml) を、それぞれ 100 倍、50 倍となるようにブロッキング溶液に希釈した一次抗体溶液を用いて、4°C で一晩インキュベートした。洗浄液を用いて洗浄し、Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) (Invitrogen) (2.0 mg/ml) および Streptavidin Cy5 conjugated/tagged (Invitrogen) (1.0 mg/ml) を、それぞれ 200 倍となるようにブロッキング溶液に希釈した二次抗体溶液を用いて、氷上で 2 時間インキュベートした。さらに洗浄液を用いて洗浄し、Glycerol (nacalai tesque) を 30% (v/v) となるように、PBS に懸濁した溶液を用いて立体スライドグラスにマウントした。

共焦点顕微鏡は、DeltaVision Restoration deconvolution microscope (Applied Precision) または Leica SP2 AOBS Conforcal and Multiphoton 正立 紫外+可視光 (Leica) を使用して観察を行った。実験概要を図 2.1b に示す。

2. 2. 4. マウスモノクローナル抗 Surface layer protein (Slp) A 抗体の作製

マウスモノクローナル抗体は、過去の文献²⁴に従って作製した。6 週齢の BALB/c マウス (雌) に、6 日ごとに計 6 回、熱殺菌した L-92 株の菌体 10 mg を皮下注射して免

疫した。最終免疫したマウスより脾臓細胞を取り出し、ポリエチレングリコール 6000 を用いて、マウスミエローマ細胞 (NS-1) と融合させた。融合細胞は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む溶液 (HAT 培養液) 中で培養し、ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマをサブクローン化し、L-92 株に反応する細胞を抗 L-92 株モノクローナル抗体産生細胞として保存した。得られた抗 L-92 株モノクローナル抗体産生細胞を、Hybridoma-SFM (Invitrogen) に FBS (Hana-Nesco Bio) を 10% 添加した培地中で培養した。その後 RPMI-1640 (SIGMA) 中にて 1 週間培養し、培養液上清を回収した。抗体の SlpA への特異性確認のためには、L-92 株を破碎し、等量の SDS-PAGE sample buffer (Bio Rad) に懸濁して SDS-PAGE に供した。得られた培養液上清を用いてウエスタンブロット解析を行い、45 kDa 付近のバンドに反応する細胞を、抗 SlpA モノクローナル抗体産生細胞として選択した。抗 SlpA モノクローナル抗体産生細胞をタカラバイオ株式会社に送付し、腹水採取から抗体精製を委託し、抗 SlpA 抗体 (2.1 mg/ml) を得た。

2. 2. 5. *In vitro* 結合アッセイ

ヒト IgG1 の Fc フラグメント部位をマウス Uromodulin タンパク質に融合した mUmod-Fc タンパク質および、mGP2-Fc タンパク質²⁰、mPrPc-Fc タンパク質²¹ は理研から分譲を受け、コントロールとしてはヒト IgG (hIgG) を使用した。各種タンパク質を 5 µg/ml になるように PBS にて調製し、96 穴マイクロプレートに 50 µl アプライし、4°C にて一晩放置して、固定化した。各ウェルを 250 µl の PBS にて 3 回洗浄し、1% BSA (W/V) /PBS 溶液を 250 µl 添加し、室温にて 2 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去した後、10⁶ cells/50 µl となるように PBS に懸濁した菌体懸濁液を、50 µl ずつアプライし、室温にて 2 時間インキュベートした。各ウェルを 250 µl の PBS にて 5 回洗浄した後、PBS を完全に除去した。次に、抗 SlpA 抗体を PBS で

100 倍希釈した溶液中で L-92 株の菌体を 4℃、一晩インキュベートし、抗 SlpA 抗体で中和した菌体も同様にアッセイした。固相化・ブロッキング・インキュベートの間は、プレートパラフィルムで覆って乾燥しないようにした。

NucleoSpin® Tissue (Takara) を用いて付属のプロトコルに従い DNA を抽出し、プレートに結合した菌体から DNA を抽出することで、菌体量を定量化した。抽出した DNA を鋳型として、リアルタイム PCR により定量した。リアルタイム PCR の方法は、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara) に付属のプロトコルに従った。16S rDNA を標的としたユニバーサルプライマーを以下に示す。16S(forward):

5' -AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' 、16S(reverse):

5' -AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' 。

2. 2. 6. *In vivo* パイエル板取り込み実験

マウスに抗生物質を投与して腸内細菌を排除し、パイエル板への L-92 株の取り込み量の測定を試みた。各種抗生物質を水道水に溶解して、アンピシリン 1g/L, バンコマイシン 0.5g/L, ネオマイシン 1g/L, メトロニダゾール 1g/L となるように調製し、0.22 µm フィルターを用いて濾過したものを、マウスに 1 週間自由摂取にて飲水投与した。抗生物質を投与したマウスに MR ラボストックおよび MR ラボストックに L-92 粉末を 3% (W/W) となるように配合した餌 (三協ラボサービス株式会社) を与えた。この間も抗生物質は飲水により継続的に投与した。

2 週間後、パイエル板を盲腸側から順次 3 個回収し、PBS で 2 回洗浄した後、100 µg/ml となるように PBS に溶解したゲンタマイシン硫酸塩 (ナカライテスク) で 1 回洗浄し、さらに PBS で 2 回洗浄し、パイエル板を小さく刻んだ。

次に、2. 2. 4. と同様の方法にて NucleoSpin® Tissue を用いて、パイエル板から DNA (パイエル板と乳酸菌の DNA) を抽出した。抽出した全 DNA を鋳型として

L. acidophilus に特異的な DNA を、定量的リアルタイム PCR により L-92 の菌数を定量した。リアルタイム PCR は、SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) を用い、プライマーは *L. acidophilus* の 16S をターゲットとした以下のプライマーを使用した。*L.acid_16S* (forward): 5' -AGCTGAACCAACAGATTCAC-3' 、*L.acid_16S* (reverse): 5' -TACCAACTAGCTAATGCACC-3' 。

2. 2. 7. L-92 株の菌体の LiCl 処理と抽出画分の分析

乳酸菌の表層タンパク質の除去に一般的に使用される塩化リチウム (LiCl) 処理を、文献²⁵を参考に実施した。L-92 株の菌体を 5 mol/L の LiCl (Wako) に懸濁し、30 分間室温でインキュベートした。その後、8,000 rpm、5 分間遠心分離して菌体と上清に分け、菌体は PBS で 2 回洗浄して実験に使用した。

上清は 0.22 µm フィルターでろ過し、アミコン (10 k) (Millipore) を用いて溶媒を PBS に置換し、濃縮・脱塩したものを等量のサンプルバッファー (Bio Rad) に懸濁して 95°C で 5 分加熱し、5-20%ゲルを使用して Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE) に供した。泳動終了後、Comassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio Rad) にて染色、CBB (Coomassie Brilliant Blue) R-250 Destaining Solution (Bio Rad) にて脱色を行った。得られたバンドをゲルから切り出し、株式会社リバネス社に送付し、MALDI-TOF MASS SPEC Analysis によりタンパク質を同定した。

2. 2. 8. タンパク質抽出と二次元電気泳動

L-92 株と CP23 株を MRS 培地で培養後、PBS で 2 回洗浄し、0.5% SDS-PBS に懸濁して、37°C で 1 時間インキュベートし、表面のタンパク質を抽出した。15,000 rpm、15 分間遠心分離して上清を回収し、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) によって抽

出されたタンパク質を沈殿させた。フィルジエン株式会社に委託して、2次元電気泳動によるプロテオーム比較解析を実施し、L-92株とCP23株でスポット強度が高いものから順に20種のタンパク質を同定した。

2. 2. 9. 蛍光ビーズを用いたパイエル板取り込み評価

L-92株の菌体をPBSにて洗浄した後、元の培養液の半量の5 mol/L LiCl溶液に懸濁して、室温にて30分ゆっくり攪拌した。菌体を8,000 rpm、5分間遠心分離して上清を回収し、透析用セルロースチューブ（20/32吋）（株式会社日本メディカルサイエンス）を用い、PBSにて4℃、一晩透析し、SlpAを得た。

25 mlの20 mM MES buffer（pH 6.0）（同仁化学研究所）に0.3 mg/ml PBSとなるように調製したSlpAまたはBSAを10 ml加え、さらに蛍光ビーズ（FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres 1.0 mm, orange または yellow-green（Invitrogen））を500 µl添加し、vortexにてよく攪拌した。さらに、EDAC（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride（同仁化学研究所））を10 mg加えてvortexにてよく攪拌した後、暗所にて緩やかに攪拌しながら2時間、室温にてインキュベートした。インキュベート後、グリシン（nacalai tesque）を終濃度100 mMとなるように加えて攪拌して反応を止めた。手順はメーカーの推奨プロトコルに従った。13,000 rpm、15分間の遠心分離によりビーズを回収、さらにPBSにて3回洗浄後、400 µlのPBSに懸濁した。

蛍光ビーズのパイエル板取り込み量を評価するため、2. 2. 2. に示した腸管ループアッセイを実施した。タンパク質結合ビーズと非結合ビーズを混合して用い、濃度を各 2×10^9 beads / 100 µlとして、2時間インキュベートした。

パイエル板を切り出し、1 x HBSS（GIBCO）にて洗浄した後、O. C. T. compound（Sakura Fintek USA）を用いて凍結ブロックを作製した。クリオスタット LEICA

CM1850 を用いて 5 μm 厚さの凍結切片を作製し、パイエル板内部に取り込まれているビーズの数を蛍光顕微鏡にて観察・測定した。1 マウスあたり 6~12 切片を観察し、平均値を求めた。

2. 2. 10. 脾臓細胞の NK 活性測定

Umod^{+/+}マウスと *Umod*^{-/-}マウスは、*Umod*^{-/-}マウス²³を Balb/c マウスと交配した交雑第四世代を用いた。マウスに L-92 殺菌体、LiCl-L92 殺菌体を 300 mg/kg となるように、2 週間のうち 10 日強制経口投与した。14 日目最終日の投与 3 時間後に脾臓を回収し、氷冷 PBS 中にて 40 μm 径のセルストレイナー (FALCON) を使用して、細胞を単離した。4°C、1,500 rpm、5 分間、遠心分離して上清を除去した後、0.17 M Tris-HCl と 0.16 M NH₄Cl を 1:9 の割合で混合し、フィルター滅菌した溶血バッファーを 2 ml 添加して、細胞を懸濁させた。室温で数分静置した後、不活化した 10% FBS、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ペニシリン (100 U/ml) を添加した RPMI-1640 培地を 8 ml 添加した後、1,500 rpm、5 分間遠心分離して、上清を除去した。同培地に再懸濁し、細胞数を計測して 5 x 10⁶ cells/ml に調製し、エフェクター細胞とした。

YAC-1 細胞を、不活化した Fetal bovine serum (FBS) (ハナ・ネスコバイオ) を終濃度 10%、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ペニシリン (100 U/ml) を添加した RPMI-1640 培地で、37°C、5% CO₂/95% air 条件下で培養した。YAC-1 細胞を Cell-mediated Cytotoxicity Assay: Basic Cytotoxicity Test (ImmunoChemistry Technologies) を用いて、付属のプロトコルに従い CFSE 標識し、同上の培地に 10⁵ cells/ml となるように調製し、ターゲット細胞とした。

24 well プレートに、エフェクター細胞とターゲット細胞を 50:1 の割合になるように、それぞれ 200 μl ずつ添加し、24 時間共培養した。キットに付属の 7-AAD を添加して、死細胞を標識し、総細胞数に対する割合を BD FACS CantoTMII にて測定し、NK 活性

を求めた。

2. 2. 1 1. 抗 SlpA 抗体を用いた蛍光免疫染色

L-92 株および CP23 株、および LiCl 処理した L-92 株 (LiCl-L92)、LiCl 処理した CP23 株 (LiCl-CP23) の各菌体を PBS にて洗浄し、PBS へ再懸濁した各菌体懸濁液 10 μ l をスライドガラスに滴下し、乾燥させ、アルコールランプにて火炎固定した。PBS にて 100 倍希釈したマウスモノクローナル抗 SlpA 抗体溶液をスライドガラスに 1 滴滴下し、乾燥しないように 4°C にて、一晩インキュベートした。スライドガラスを PBS で 3 回洗浄した後、ビオチン化ラット抗マウス抗体 (BD) を室温にて、2 時間反応させた。さらに、そのスライドガラスを PBS で 3 回洗浄した後、Cy3-ストレプトアビジン (ImmunoResearch Laboratories) を室温にて 2 時間反応させ、蛍光顕微鏡 (OLIMPUS BX51) にて抗体特異的反応を観察した。

2. 2. 1 2. *slpA* 遺伝子の配列解析とアミノ酸配列からの二次構造予測

RNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて、L-92 株および CP23 株の菌体から DNA を抽出し、SlpA 増幅のために、過去に *L. acidophilus* で報告されている該当遺伝子に対応するプライマーを設計して、*slpA* 遺伝子の増幅と DNA 配列解析を行った。プライマーは、F1: 5'-TGAGCTAGCGTTTTTAGCAT-3'、F2: 5'-AAGCGGTAGG TGAAATATTACAAATAGTAT-3'、F3: 5'-CTACTGATAACAGTAACG-3'、R1: 5'-CAG CAGCGCTAACGATTC-3'、R2: 5'-TTTACCACAGTTTGAGTCTAAATTCTTTTC-3' を使用した。得られた DNA 配列解析には、DNASIS Pro (Hitachi Solutions, Ltd.) を、アミノ酸配列からの二次構造予測には、PHD program (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html) を用いた。

2. 2. 1 3. RNA 抽出と *slpA* 遺伝子を標的とした qRT-PCR

L-92 株および CP23 株の培養液 2 ml に対し、4 ml の RNA protect bacteria reagent (QIAGEN) を添加して攪拌後、室温で 5 分間インキュベートした。遠心分離後に上清を除去し、RNA を抽出するまで -30°C にて保存した。β-メルカプトエタノール (Wako) を添加した Buffer RLT を 1.4 ml を添加し、攪拌して菌体懸濁液を作製した。滅菌した 0.1 mm Zirconia/Silica Beads (Bio spec products, Inc) を 1/3 程度入れた 2 mL 反応チューブに菌体懸濁液を 700 μl ずつ添加し、ShakeMaster NEO (BMS) を用いて 1,500 rpm、5 分間細胞破碎した。室温で遠心分離した上清 500 μl を新しいチューブに移し、70%エタノール 500 μl を添加し、ピペッティングした。その後の RNA 抽出作業を、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) に記載のプロトコールに従って行った。続いて、SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。Random Primer (hexamer) を使用し、500 ng の RNA を鋳型に付属のプロトコールに従って cDNA を合成した。さらに、逆転写反応によって得られた cDNA を鋳型として、上記 primer、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を用いて PCR 反応液を調製し、リアルタイム PCR を行った。*slpA* 遺伝子の発現量は、*LBA0383* (DNA polymerase III, delta subunit) 遺伝子を対照として、その発現量で補正した。使用したプライマーを以下に示す。*slpA* (forward): 5' -TGCTAACAACTCCAGCTA-3'、*slpA* (reverse): 5' -TGCTACCAGCAGCAGTAATA-3'、*LBA0383* (forward): 5' -GCAAATCCTATCAGGTAATC-3'、*LBA0383* (reverse): 5' -ACCGTCTACTACTTTCAAC-3'。

2. 2. 1 4. SlpA の菌体への局在性評価

L-92 株または CP23 株の菌体を Cy3 Mono-Reactive Dye Pack (GE Healthcare) を用いて Cy3-標識し、2. 2. 7. に示した方法で SlpA を調整し、Cy3 標識 SlpA

(Cy3-SlpA) を得た。 10^7 cells の LiCl-L92 または LiCl-CP23 を、30 μ g の L-92 由来または CP23 由来の Cy3-SlpA に懸濁し、室温にて 2 時間インキュベートした。蛍光顕微鏡にて菌体表層に局在した Cy3-SlpA 由来の蛍光強度を観察し、菌体への Cy3-SlpA の結合を評価した。

2. 3. 結果

2. 3. 1. L-92 株の M 細胞からの取り込み

L-92 株の菌体が M 細胞から取り込まれるかどうかを検証するため、L-92 株の菌体を Cy3 で蛍光標識して腸管ループアッセイを実施し、共焦点顕微鏡を用いて M 細胞への侵入の可能性を評価した。M 細胞の識別には、M 細胞特異的マーカーである GP2 を Alexa Fluor 480 標識した抗体で、樹状細胞の識別には樹状細胞特異的マーカーである CD11c を Cy5 標識した抗体を用いて免疫染色して共焦点顕微鏡により局在性を比較観察した。その観察結果、小腸パイエル板の濾胞領域には、GP2 により免疫染色された M 細胞が多数観察された (図 2.2a、緑色染色部)。一方、その一部には、Cy3 標識された L-92 株菌体 (図 2.2a 下図、赤色部) と、さらに L-92 が M 細胞と重なる部分は黄色 (矢印) として観察された。さらに L-92 株菌体と M 細胞がマージした領域を観察した結果、Cy3 標識された L-92 株の菌体 (赤色) が M 細胞 (緑色) とさらに下部の CD11c により免疫染色された樹状細胞(青色)に取り込まれる様子が観察された (図 2.2b)。図 2.2c (イ〜リ) は管腔側から基底膜側へと順に断面を示すが、管腔側 (イ〜ハ) では M 細胞 (緑色) と L-92 株菌体 (赤色) が重なっており、さらに基底膜側へ進むと樹状細胞 (青色) と L-92 株菌体 (赤色) が重なっており (ニ〜ヘ)、管腔側から M 細胞によって取り込まれた L-92 株は、M 細胞の下部に存在する樹状細胞に受け渡される様子が観察された (ト〜リ)。

2. 3. 2. L-92 株の様々な GPI アンカー型タンパク質への結合性評価

M 細胞上に特徴的に発現し、微生物菌体の取り込みに関与することが示唆されている GPI アンカー型タンパク質である GP2 と PrP^c、また新たに M 細胞特異的に発現が示唆されている Uromodulin を用いて、L-92 株の結合性を評価した。それぞれのタンパク質にヒト IgG1 の Fc フラグメント部位を融合させた mGP2-Fc、mUmod-Fc、mPrP^c-Fc、そして、コントロールとして hIgG タンパク質に対する結合性を、方法に記載のマイクロプレートを用いた結合アッセイにて比較した結果、L-92 株は mGP2-Fc、mPrP^c-Fc タンパク質へはコントロールタンパク質である hIgG と同等の結合性を示したが、mUmod-Fc タンパク質に対しては hIgG タンパク質と比較して有意に高い結合性を示した($p < 0.05$) (図 2.3)。以上のことから、過去に報告のある微生物結合性に関与するとされる、M 細胞上の GPI アンカー型タンパク質の中でも特に Uromodulin に対して特異的結合性を示すことが確認された。

2. 3. 3. L-92 株の取り込みにおける Uromodulin の重要性

In vitro 評価において L-92 株が Uromodulin に結合することが示されたため、次に、*in vivo* 評価として、Uromodulin 欠損マウスを用いて L-92 の取り込みを調べた。パイエル板における Uromodulin の発現を共焦点顕微鏡を用いて観察した結果、*Umod*^{+/+}マウスにおいては、M 細胞特異的に発現するとされる GP2 の蛍光と Uromodulin 特異的な蛍光が重なることから、Uromodulin が GP2 と同様に M 細胞上に発現することが確認された (図 2.4 上)。一方、*Umod*^{-/-}マウスでは、Uromodulin の発現は見られなかったが GP2 は野生型マウスと同等に発現していた (図 2.4 下)。腸管ループアッセイにより L-92 株の M 細胞からの取り込みを共焦点顕微鏡にて観察した結果、*Umod*^{+/+}マウスと比較して *Umod*^{-/-}マウスでは、L-92 株の M 細胞からの取り込み量が有意に ($p < 0.05$) 減少していた (図 2.5)。この腸管ループアッセイの利点は、パイエル板周辺に乳酸菌を

確実に到達させ、パイエル板周辺の菌体濃度を高めることが可能な点である。しかしながら、パイエル板周辺の腸管に直接乳酸菌を注入し、しばらく高濃度の乳酸菌と接触するという条件は、生体条件とは異なる極端な条件でもある。そこで次に、抗生物質投与により腸内細菌を減らしたマウスを用いて、経口摂取した L-92 株をパイエル板から検出することで、実際の生理的条件下における L-92 株のパイエル板への取り込みを評価した。その結果、*Umod^{+/+}*マウスでは通常餌を与えた場合と比較して L-92 株を混餌投与した場合、パイエル板組織内の L-92 株が多く検出されたが、*Umod^{-/-}*マウスでは L-92 株を混餌投与した場合も通常餌を与えた場合と差が見られなかった (図 2.6)。腸管ルーブアッセイおよび抗生物質投与マウスの実験により、Uromodulin 欠損マウスでは L-92 株の取り込み量が減少することが示され、L-92 株のパイエル板の取り込みには M 細胞に発現する Uromodulin が重要であることが示唆された。

2. 3. 4. L-92 株の表層分子の関与評価

L-92 株のパイエル板からの取り込みには、生体側の分子としては M 細胞に発現する Uromodulin が重要な役割を担うことが明らかとなった。次に、L-92 株の M 細胞を介したパイエル板からの取り込みに必要な分子について探索を試みた。L-92 株の全ゲノム解析の結果、総遺伝子数は約 2000 種類存在すると推定されるが、その中でも L-92 株の菌体表面のタンパク質が Uromodulin への結合に関与するものと推察し、表面タンパク質を除去するための方法として報告されている LiCl 処理法を行って、Uromodulin 結合性への影響を調べた。その結果、LiCl 処理した菌体は処理していない菌体と比較して Uromodulin 結合性が有意 ($p < 0.05$) に減少し (図 2.7a)、さらには M 細胞からの取り込み量も有意 ($p < 0.05$) 減少した (図 2.7b)。これらの結果から、LiCl 処理で除去される L-92 株菌体表面の分子が Uromodulin 結合および M 細胞からの取り込みに関与することが推察された。

2. 3. 5. LiCl 処理で L-92 株菌体から抽出される分子の同定

LiCl 処理で除去される L-92 菌体表層分子が Uromodulin 結合および M 細胞からの取り込みに関与することが示されたため、LiCl 処理で菌体から抽出されるタンパク質成分について同定した。その結果、Serine protease や SlpA、SlpX、Dihydrodipicolinate synthase (DapA) など 6 種類のタンパク質が同定された (図 2.8)。DapA 以外のタンパク質はシグナルペプチドを有しており、細胞外に局在することが示唆された。

2. 3. 6. Uromodulin 結合性の L-92 表層タンパク質の推定

L-92 株が Uromodulin 結合性を示したことから、同じ *L. acidophilus* 種で Uromodulin 結合性の異なる乳酸菌を見出して比較することで、Uromodulin 結合に関与する L-92 株の分子を推定できると考え、5 種類の *L. acidophilus* を使用して Uromodulin への結合性を評価した。Uromodulin への結合性比較に用いた 5 株の中で、L-92 株は最も高い結合性を示し、CP23 株は最も弱い結合性を示した (図 2.9)。比較した *L. acidophilus* の中で、Uromodulin 結合性が最も低かった *L. acidophilus* CP23 株を用いて、L-92 株との二次元 SDS-PAGE によるプロテオーム比較解析を行った。より広く菌体の表面付近のタンパク質を抽出するために、0.5% SDS での抽出物を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、1000 種類以上のスポットが観察されたが (図 2.10)、スポット強度の比較において、L-92 株 > CP23 株となるもの上位 18 種類について、タンパク質の同定を行った。その結果、最も大きな強度の違いを示したものとして、Serine protease が確認された (表 2.1)、スポット No.1 と No.2 は、どちらも同じ成分と同定されたため、より高分子である、スポット No.2 の分解物がスポット No.1 と考えられた。スポット No.3 のタンパク質については、SlpA と同定されたが、スポットの強度としては同定されたタンパク質の中では最も高く、L-92 株と CP23 株の菌体において違いが

大きい表層成分と考えられた。一方、スポット No.4-18 に関しては、いずれも菌体内成分であることが確認された (表 2.1)。

2. 3. 9. Uromodulin 結合および腸管取り込みにおける SlpA の重要性

Uromodulin 結合性に関与する L-92 の表層タンパク質の候補として、SlpA と serine protease が候補として見出されたが、SlpA の菌体における量が圧倒的に多いことから (表 2.1)、まずは SlpA に着目して、Uromodulin 結合に SlpA が関与するかどうかについて評価した。抗 SlpA モノクローナル抗体を L-92 株の菌体に事前に結合させて SlpA を中和した菌体は、通常の菌体と比較して Uromodulin 結合性が減少傾向にあった ($p < 0.1$) (図 2.11a)。また、SlpA を表面配位した粒子のパイエル板への取り込み能の増加を評価すると、ビーズ表面に SlpA を結合させた蛍光ビーズのパイエル板への取り込み量は、SlpA を結合させていないビーズに比べて有意に増加した (図 2.11b 左)。一方、BSA をビーズに結合させた場合では、ビーズのみの場合に比べて、取り込み量には大きな変化がなかった (図 2.11b 右)。これらの結果から、表層タンパク質 SlpA は乳酸菌などの巨大分子の Uromodulin 結合および腸管取り込みにおいて、極めて重要であることが示唆された。

2. 3. 10. Uromodulin と SlpA の NK 活性上昇に与える影響性評価

Umod^{-/-}マウスと *Umod*^{+/+}マウスを用いて、L-92 群、LiCl-L92 群、PBS 群でそれぞれ NK 活性を調べた結果、WT マウスにおいては L-92 群は PBS 群および LiCl-L92 群と比較して有意に NK 活性が上昇していた (図 2.12)。LiCl-L92 群は PBS 群よりやや NK 活性が上昇していたが、有意差は見られなかった。一方、*Umod*^{-/-}マウスでは PBS 群、LiCl-L92 群、L-92 群で NK 活性に差は見られなかった。これらの結果から、L-92 株の M 細胞からの取り込みには Uromodulin と L-92 の表層タンパク質 SlpA が *in vivo*

において免疫応答を引き起こす上でも重要であることが確認された。

2. 3. 1 1. 免疫染色による SlpA の局在解析

0.5%SDS による表層タンパク質の抽出結果において (図 2.10)、CP23 菌体表層には SlpA が少ないことが示唆されたため、抗 SlpA 抗体を用いた免疫染色により確認した結果、L-92 株は菌体表層に SlpA が多量に存在していたが (図 2.13a)、CP23 株は菌体表面の SlpA 量が少ないことが確認された (図 2.13b)。一方、L-92 株と CP23 株をそれぞれ LiCl 処理した場合には、菌体表面の SlpA 量は両者ともにほぼ除去された (図 2.13c,d)。

2. 3. 1 2. CP23 株において菌体表面の SlpA 量が少ない理由の推定

L-92 株と比べて、CP23 株では菌体表層の SlpA 量が少ないことの理由を調べるために、*slpA* 遺伝子上流約 1000 bp から下流約 300 bp までの配列を比較解析した。その結果、SlpA 構造領域は、N 末端から 60 アミノ酸部位 (中間部分の推定機能領域) に、CP23 株では 3 アミノ酸 (アラニン・バリン・アラニン) 配列 (AVA) が挿入されていたものの、N 末端側のシグナルペプチド配列と C 末端側の細胞壁結合領域においては、全く違いがなかった (図 2.14a)。PHD プログラムを用いて二次構造を推定した結果、AVA の挿入により α ヘリックス構造が形成されている可能性が示唆された (図 2.14b)。一方、プロモーター領域を含む上流領域の遺伝子配列および下流領域の違いは見られず、*slpA* 遺伝子の mRNA 発現量にも差が見られなかった (データ未掲載)。

slpA 遺伝子の mRNA 発現量に差が見られなかったため、L-92 株と CP23 株の菌体表面の SlpA 量の違いは遺伝子レベルでの発現制御に起因するものではないことが示唆された。そこで次に、SlpA の菌体における局在性に違いがあるかどうかを検証した。

まず、LiCl 処理して表面の SlpA を除去した L-92 株と CP23 株の菌体を、蛍光標識した SlpA と混合して、それぞれの菌体から抽出した SlpA が各菌体表面にどのように再構成されるのかを評価した。その結果、LiCl-L92 には、L-92 株の菌体から LiCl にて抽出した SlpA (L92-SlpA) と CP23 株の菌体から抽出した SlpA (CP23-SlpA) とともに再構成されることが確認された (図 2.15 上)。一方、LiCl-CP23 に対しては、L-92 株と CP23 株菌体のどちらから抽出した SlpA も部分的にしか再構成されなかった (図 2.15 下)。これらの結果から、CP23 株の菌体表面に SlpA が少ない理由は、CP23 株における *slpA* 遺伝子の欠損や発現制御のためではなく、CP23 株の菌体表層構造が L-92 株と比較して、SlpA を保持しにくい構造を有しているためと推測された。L-92 株と CP23 株の培養上清中の SlpA 量を比較した結果、CP23 株の培養上清中の SlpA 量が多く、CP23 株により分泌された SlpA は少量しか菌体に局在せず、培地中に放出されている可能性が推察された (データ未掲載)。

2. 4. 考察

本研究では、免疫調節機能を有する *L. acidophilus* L-92 株の腸管免疫作用における宿主への初期作用として、菌体が M 細胞から取り込まれて樹状細胞に接触して貪食されることが必要と考え、L-92 株の M 細胞からの取り込みについて評価した。乳酸菌が免疫調節能を発揮するためには、体内に存在する樹状細胞などと乳酸菌が接触することで、腸管免疫系に作用するということが最も一般的な考え方であるが、乳酸菌が直接 M 細胞を通過して樹状細胞に到達することに関しては、未だ詳細な報告が行われていなかった。本研究では、M 細胞、樹状細胞、乳酸菌を特異的に蛍光染色して識別し、同時に共焦点顕微鏡観察することで、L-92 株が M 細胞からとりこまれ、その下部に存在する樹状細胞に取り込まれる様子を、世界に先駆けて可視化することに成功した。つまり、乳酸菌による特異的蛍光と、M 細胞特異的蛍光が重なって観察されるパイエル板濾胞

上の領域に着目し、共焦点顕微鏡で深部の蛍光を観察することで、樹状細胞への L-92 株の取り込みも効率的に確認できたと考える。

さらに、M 細胞に特異的に発現する因子に着目して乳酸菌の M 細胞からの取り込みへの関与を調べることで、M 細胞からの取り込みに必要な宿主側因子と乳酸菌側の因子として、Uromodulin と SlpA の重要性を初めて示すことができた。最近の研究で、M 細胞に特異的に発現する分子が微生物の表面分子と結合することで、微生物を M 細胞内に取り込むことが示されている¹⁹。従って、今回の検討では蛍光染色した L-92 株を用いて確認された菌体の M 細胞への取り込みには、最近の報告にあるように M 細胞に特徴的な分子が関与するものと仮説を立てて研究をおこなった。さらに、M 細胞に特徴的に発現する分子に関して既に情報を蓄積していた理化学研究所と共同研究を行うことで、M 細胞特異的な分子と L-92 株の結合性評価を、効率的に実施できた点が大きな強みとなった。

今回得られた知見から、過去に多くの乳酸菌において報告されている様々な免疫調節作用に関して、評価に供する菌株により全く生体の免疫応答性が異なる理由の一つとして、Uromodulin 結合性の乳酸菌因子としての SlpA の有無が考えられた。SlpA は Surface layer protein (S-layer protein) の 1 種であるが、S-layer protein を有する微生物として、*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter fetus*, *Rickettsia rickettsii* などが挙げられる²⁶。乳酸菌においても、*L. acidophilus* 以外にも *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii* などが Slp を有する²⁷。Slp 保有の微生物の中で、経口的に摂取される可能性が高い微生物種は決して多くはないが、L-92 株の SlpA と相同性の高い分子としては、*L. crispatus* の表層タンパク質 CbsA、CbsB や、*L. helveticus* の表層タンパク質 SlpH などが報告されており²⁷、Slp を有する乳酸菌、その中でも特に *L.*

crispatus や *L. helveticus* は Uromodulin への結合を介して M 細胞から取り込まれる可能性が高いのではないかと考える。実際に、*in vivo* の動物実験の結果と照らし合わせてみると、アレルギーモデルマウスによる IgE 産生抑制作用評価において、Avall-Jääskeläinen S. ら²⁷によって表層タンパク質を有するとされる *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. fermentum* が IgE 産生抑制作用を示し、表層タンパク質を有さない *L. rhamnosus* は IgE 産生抑制作用を示さなかった³。SlpA と相同性の高い分子を有する、あるいは表層タンパク質を有する乳酸菌を選択することで、より効果的に免疫調節作用を得ることができると考えられた。

Slp のアミノ酸配列は、種によって異なることが報告されており、今後、L-92 株の SlpA の Uromodulin 結合に関与する領域を明らかにできれば、ホモロジー検索などにより効率的に Uromodulin 結合性の高い乳酸菌の選択できると考える。しかし、今回の知見は Slp を保有しない乳酸菌の M 細胞からの取り込みを否定するものではない。つまり、Slp を保有しない乳酸菌は、Slp 以外の分子または Uromodulin 以外の M 細胞上の分子を介して M 細胞に取り込まれる可能性に関しては、今後の課題である。

近年、Uromodulin は M 細胞に発現することも遺伝子レベルで報告されていたが、その機能は全くの不明であった²⁸。Uromodulin は、尿中に豊富に含まれるタンパク質として 1950 年代に Tamm と Horsfall が発見し、Tamm-Horsfall protein の名称としても知られるタンパク質であり、ネフロン（腎単位）で産生されて尿中に分泌される GPI アンカー型タンパク質である²⁹。Uromodulin 欠損マウスを用いた研究によると、Uromodulin 欠損マウスではタイプ I 型繊毛を有する *E. coli* への感受性が高まることが示され、尿中に放出された可溶性の Uromodulin が *E. coli* と競合的に働いて尿管への接着を抑制することで、尿路感染症の防御などに関与するタンパク質であることが報告されている²³。また、Uromodulin は、尿路病原菌である *E. coli* や *Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella pneumoniae* に結合することが明らかとなっている^{23, 30}。従っ

て、大腸菌なども腸管内に到達した場合、Uromodulin の結合を介して M 細胞から取り込まれる可能性があり、Uromodulin は乳酸菌以外にも複数の腸内細菌の取り込みに関与することも推察される。Uromodulin の結合性において乳酸菌と大腸菌が競合するのであれば、L-92 株の摂取により病原性大腸菌の排除や予防なども可能となるかもしれない。病原菌と L-92 株を同時に投与した場合の Uromodulin による選択性や、その後の生体応答性への影響に関しては、極めて興味深い点である。

Uromodulin は、マウス以外にも、ラット、イヌ、ウシ、ヒトなどの哺乳類、そして鳥類にも幅広く存在する分子である。ヒトとマウスの Uromodulin のアミノ酸相同性は 73% であるが、ヒトの Uromodulin タンパク質についても L-92 株が結合性を示すことも確認している（データ未掲載）。また、M 細胞への Uromodulin の発現はマウスのみで報告されているが、ヒトパイエル板においても周辺の腸管組織と比較して Uromodulin 遺伝子の発現量が多いことを確認しており（データ未掲載）、ヒトにおいてもマウスと同様に L-92 株がパイエル板の M 細胞を介して取り込まれると考えている。

Uromodulin は、N 末端側にカルシウムイオンに結合性を示す 3 つの EGF (Epidermal growth factor) -like 領域、中間部分には 8 つのシステインが保存された D8C 領域、C 末端側には糖タンパク質のマトリクスである ZP (Zona Pellucida) 領域から構成される²⁹。ヒト Uromodulin については三次構造も解明されており、ZP 領域の N 末端側 (ZP-N) と ZP 領域の C 末端側 (ZP-C) が隣接した三次構造を形成していることが報告されている³¹。しかしながら、この構造は分泌型の Uromodulin の三次構造であり、M 細胞上の Uromodulin とは三次構造が異なる可能性も考えられるため、M 細胞上に発現する Uromodulin の構造解析については今後の課題であると考えられる。

Uromodulin と GP2 は ZP 領域を有する GPI アンカー型タンパク質であり、アミノ酸相同性は約 50% であるが、GP2 は EGF-like 領域を有していない³²。L-92 株が GP2 には結合せず Uromodulin に結合した理由や、その結合様式などは明らかになっていな

いが、Uromodulin と GP2 の構造の違いに着目することで、今後解明できる可能性があると考えられる。

M 細胞の分化には、転写因子 Spi-B が関与することが報告されており、Spi-B の発現に伴って Marcksl1 遺伝子、CCL9 遺伝子、GP2 遺伝子が経時的に発現することが明らかになっている³³。図 2.4 で M 細胞を GP2 と Uromodulin 特異的抗体で免疫染色した結果、多くの M 細胞で GP2 と Uromodulin の発現が観察されたが、全ての細胞で両方のタンパク質が発現しているわけではない。その理由としては、M 細胞の分化の過程が異なるために、細胞によって分子の発現パターンが異なっているのではないかと推察している。

表層タンパク質は、特定の乳酸菌群の表層に高発現するタンパク質性の細胞外皮構造であり、その機能としては保護被膜、細胞形態の決定、分子やイオンの吸着、酵素、外部環境への接着に関与するなどの報告がある³⁴が、表層タンパク質の欠損株は生育性が低くなることなどから分離が難しいとされ、その生理的意義については不明な点が多い。一方、腸管への接着性に関しては、乳酸菌の表層タンパク質が Caco-2 細胞への接着性³⁵や腸管のムチン³⁶、細胞外基質^{37, 38}への結合に関与するという報告などからその重要性が指摘されている。Uromodulin 結合性とこれらの細胞接着性、ムチン結合性などが SlpA のどのような構造やアミノ酸配列によるものなのか、SlpA の高次構造解析に関する報告がないことから明らかではなく、SlpA の共通の配列が関与するのかわかも不明である。SlpA の多様な役割の解析のためにも、SlpA の Uromodulin 結合性領域の特定を現在検討中であるが、免疫系に及ぼす影響の評価などと合わせて今後評価や考察を行う必要があると考えられる。

最後に、SlpA が菌体表面に局在するためには、菌体構造が重要であることを報告した。乳酸菌の表層タンパク質の保持に関与する菌体構造に関する報告は少ないが、*L. acidophilus* ATCC 4356 の SlpA に関する報告では、SlpA がフッ化水素酸処理された

細胞壁に結合しなくなるが、フェノール処理された細胞壁には結合するという結果が報告されており³⁹、また、*L. brevis* ATCC 8287 株と *Lactobacillus hilgardii* においては、Slp がフッ化水素酸処理された細胞壁には結合しなくなるが、4℃においてトリクロロ酢酸処理された細胞壁には結合するという結果が報告されている^{40,41}。これらの報告から、乳酸菌の表層タンパク質の局在には、リポテイコ酸ではなくテイコ酸か細胞壁修飾糖鎖の関与が示唆されており、L-92 株と CP23 株の SlpA 保持に関わる菌体構造の違いも、テイコ酸または細胞壁修飾糖鎖かもしれない。*Bacillus anthracis* の表層タンパク質の局在に関わる分子に関しては研究がすすんでおり、細胞壁修飾糖鎖のピルビル化またはアセチル化が Slp の局在に関与することが報告されている^{42,43}。L-92 株の SlpA の局在に関与する分子は明らかとなっていないが、CP23 株とさらなる比較解析により、解明できるのではないかと考える。また、乳酸菌の培養条件によって SlpA 発現に影響があるという報告もあり^{44,45}、培養条件による菌体構造の変化や SlpA 局在にも着目していきたい。

a



b

蛍光ラベルした
L-92株

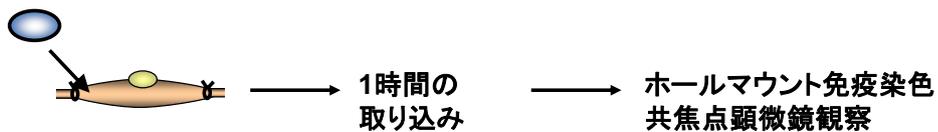


図2.1 L-92株菌体のM細胞から取り込み検証実験の方法

a: 腸管ループアッセイの様子。麻酔下のマウスを1センチほど開腹して小腸を取り出し、パイエル板の両端を糸で縛り、Cy3標識した乳酸菌を注射針で注入した様子。

b: 実験の流れ。腸管ループアッセイ後、パイエル板を切り出してホルマウント免疫染色後、共焦点顕微鏡にて観察を行った。

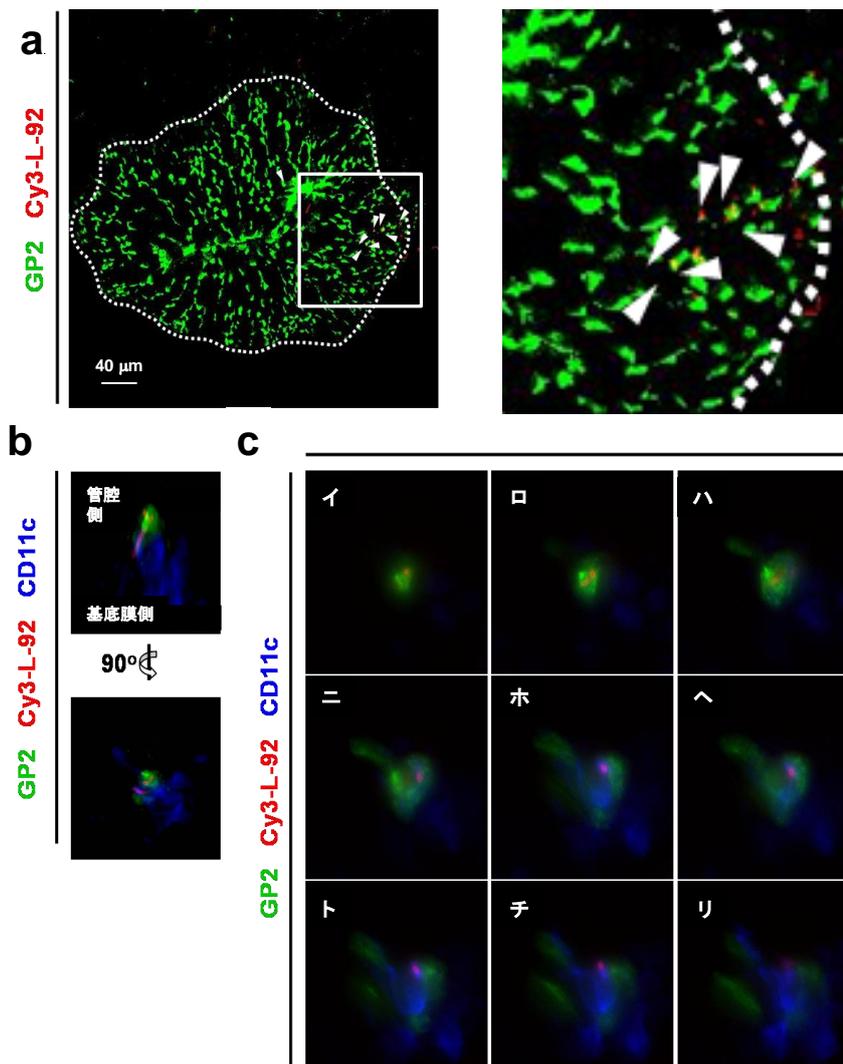


図2.2 L-92株菌体がM細胞から取り込まれて樹状細胞に受け渡される様子の可視化

a: パイエル板のホールマウント免疫染色により、濾胞上皮(点線)内にGP2(緑)で染色されたM細胞が多数確認でき、Cy3標識したL-92株の菌体(赤)と重なっている箇所が見られた(矢印部分)。

b: GP2(緑)で染色されたM細胞の内部にCy3標識したL-92株菌体(赤)が取り込まれ、さらにその下に存在するCD11cで染色された樹状細胞(青)に貪食されている様子。B上図を90度回転させたものがb下図。

c: b図を管腔側から基底膜側への段階的な切断面(イ~リ)を示す。

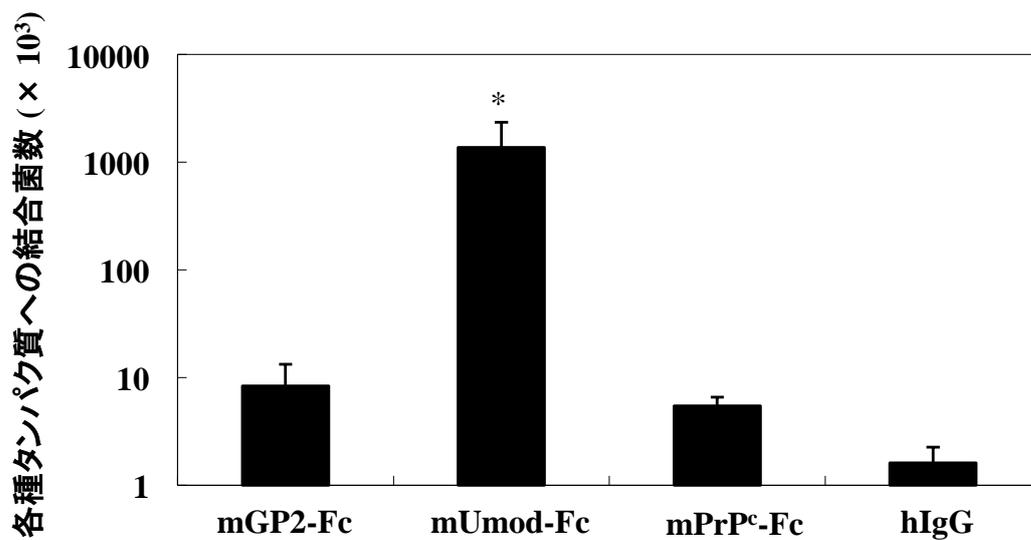


図2.3 L-92株菌体のGPIアンカー型タンパク質に対する*in vitro*結合性の比較

mGP2-Fc, mUmod-Fc, mPrP^c-Fcタンパク質およびコントロールhIgGタンパク質に対するL-92株の結合性を示す。

Dunnett t-test; n = 6 (mGP2-Fc, mUmod-Fc, mPrP^c-Fcタンパク質), n = 12 (hIgGタンパク質), **p* < 0.05, エラーバーはSEを示す。

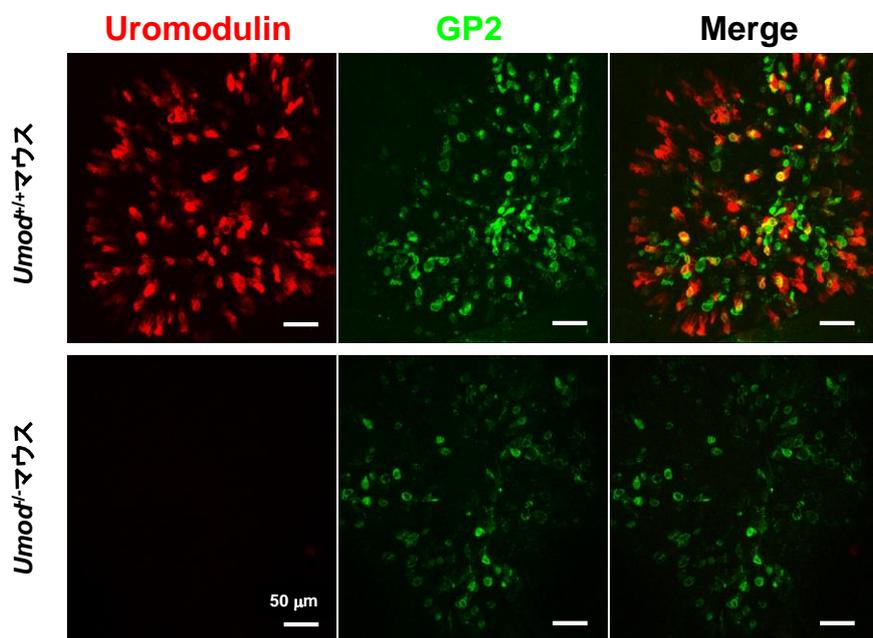


図2.4 パイエル板濾胞上皮におけるUromodulinの発現確認
 上:野生型マウス(*Umod*^{+/+})と下:Uromodulin欠損マウス(*Umod*^{-/-})の
 パイエル板をホルマウント免疫染色し、Uromodulin(赤)とGP2(緑)
 の発現を確認した。

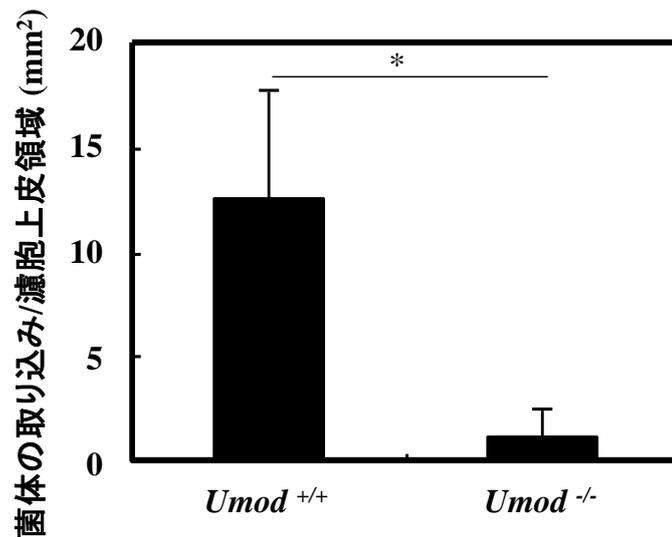


図2.5 腸管ループアッセイによるUromodulin欠損マウスによるL-92株の菌体取り込み量評価

Umod^{+/+}および*Umod*^{-/-}マウスにおける、腸管ループアッセイによるM細胞からのCy3標識L-92株菌体の取り込み量比較

Mann-Whitney U test; n = 6 (*Umod*^{+/+}), n = 5 (*Umod*^{-/-}), **p* < 0.05, エラーバーはSEを示す。

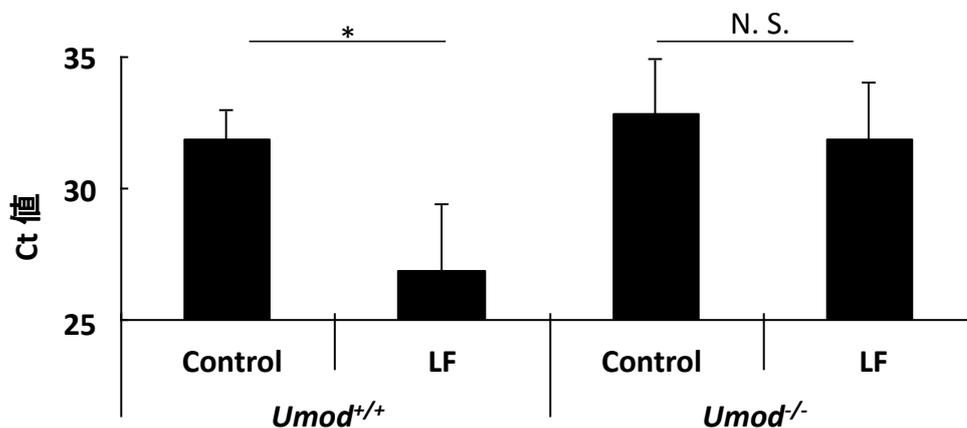


図2.6 抗生物質投与マウスのパイエル板内部のL-92株検出比較
 抗生物質を飲水投与した*Umod*^{+/+}および*Umod*^{-/-}マウスにL-92株含有餌(LF)または通常餌(Control)を与え、2週間後にパイエル板組織内部のDNAを抽出し、*L. acidophilus*特異的プライマーを用いてパイエル板内部のL-92株をqPCRにて検出した。パイエル板内部のL-92株菌体が多いほど、Ct値が低い。
t-test; *n* = 4 (*Umod*^{+/+}, LF), *n* = 5 (*Umod*^{+/+}, Control), *n* = 5 (*Umod*^{-/-}, LF), *n* = 3 (*Umod*^{-/-}, Control) **p* < 0.05, エラーバーはSDを示す。

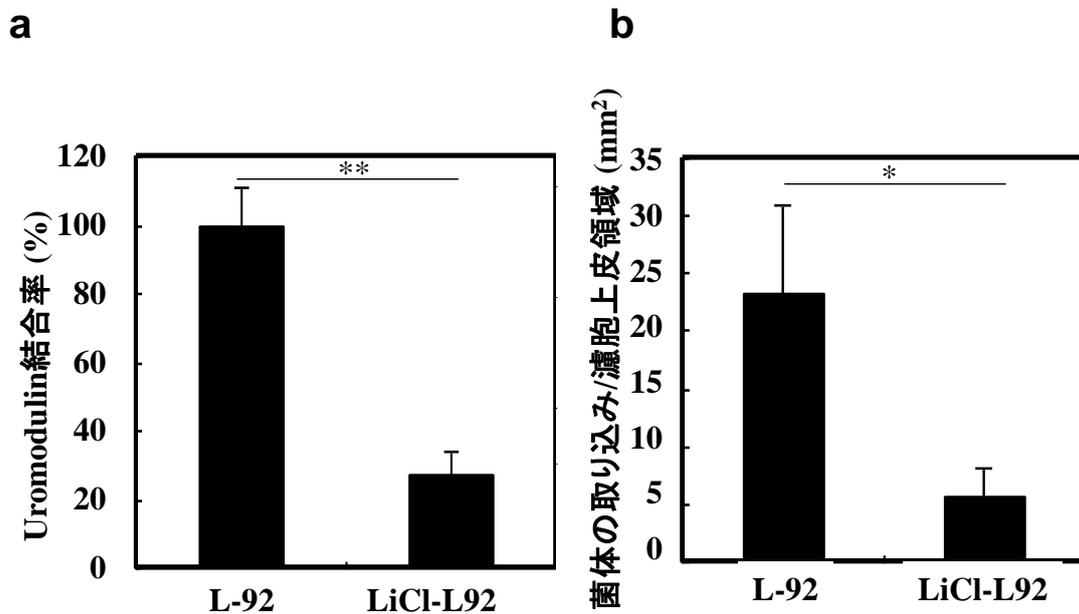


図2.7 LiCl処理したL-92株菌体のUromodulin結合性およびM細胞からの取り込み量評価

a: 通常のL-92株菌体(L-92)のUromodulin結合数を100%とした場合の、LiCl処理により表層タンパク質を除去したL-92株菌体(LiCl-L92)のUromodulin結合率を示した。

Mann-Whitney U test; n = 12 (L-92), n = 9 (LiCl-L92), ** $p < 0.01$, エラーバーはSEを示す。

b: Umod+/+マウスの腸管ループアッセイにおける、L-92およびLiCl-L92のM細胞からの取り込み量比較

Mann-Whitney U test; n = 4, * $p < 0.05$, エラーバーはSEを示す。

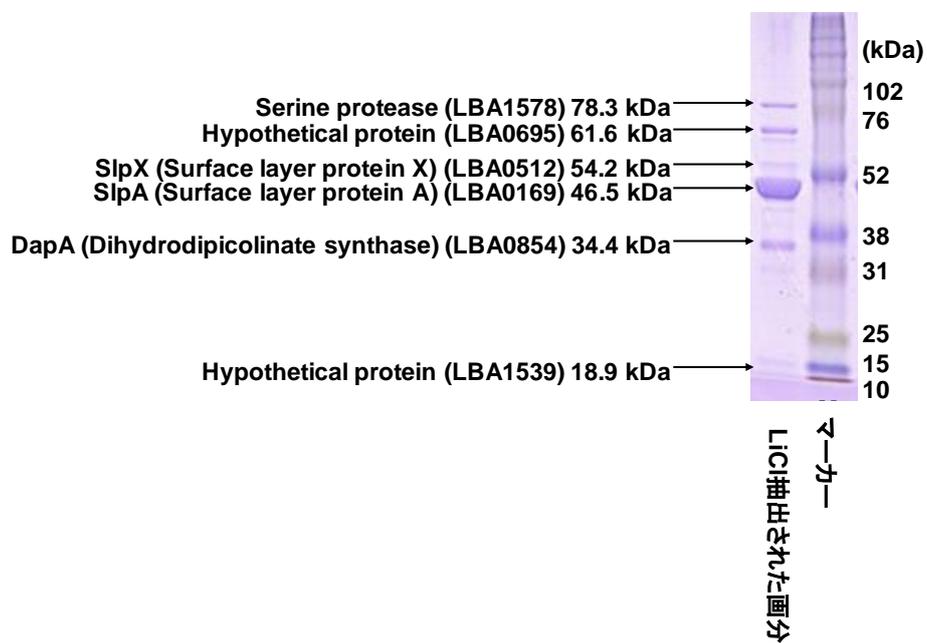


図2.8 L-92株の菌体からLiCl処理によって分離される画分の同定結果

L-92株の菌体からLiCl抽出された画分をアミコンにて脱塩し、5-15% SDS-PAGEによる電気泳動後CBB染色したバンド。

各バンドを切り出し、質量分析によるタンパク質同定結果をそれぞれ示す。

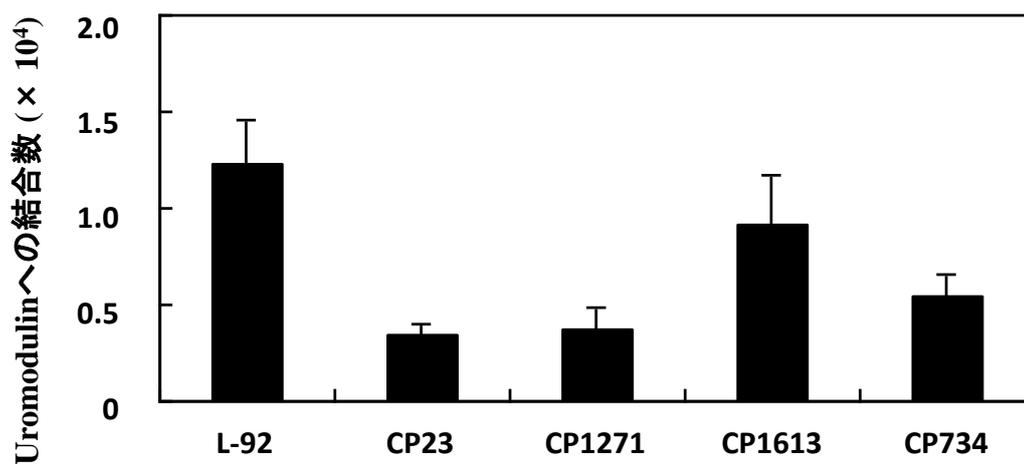


図2.9 5種類の*L. acidophilus*のUromodulin結合性比較

L. acidophilus L-92株、CP23株、CP1271株、CP1613株、CP734株のUromodulin結合数を比較した。Uromodulin結合数は、mUmod-Fcタンパク質への結合数からコントロールhIgGタンパク質への結合数を差し引いた値として算出した。エラーバーはSEを示す。

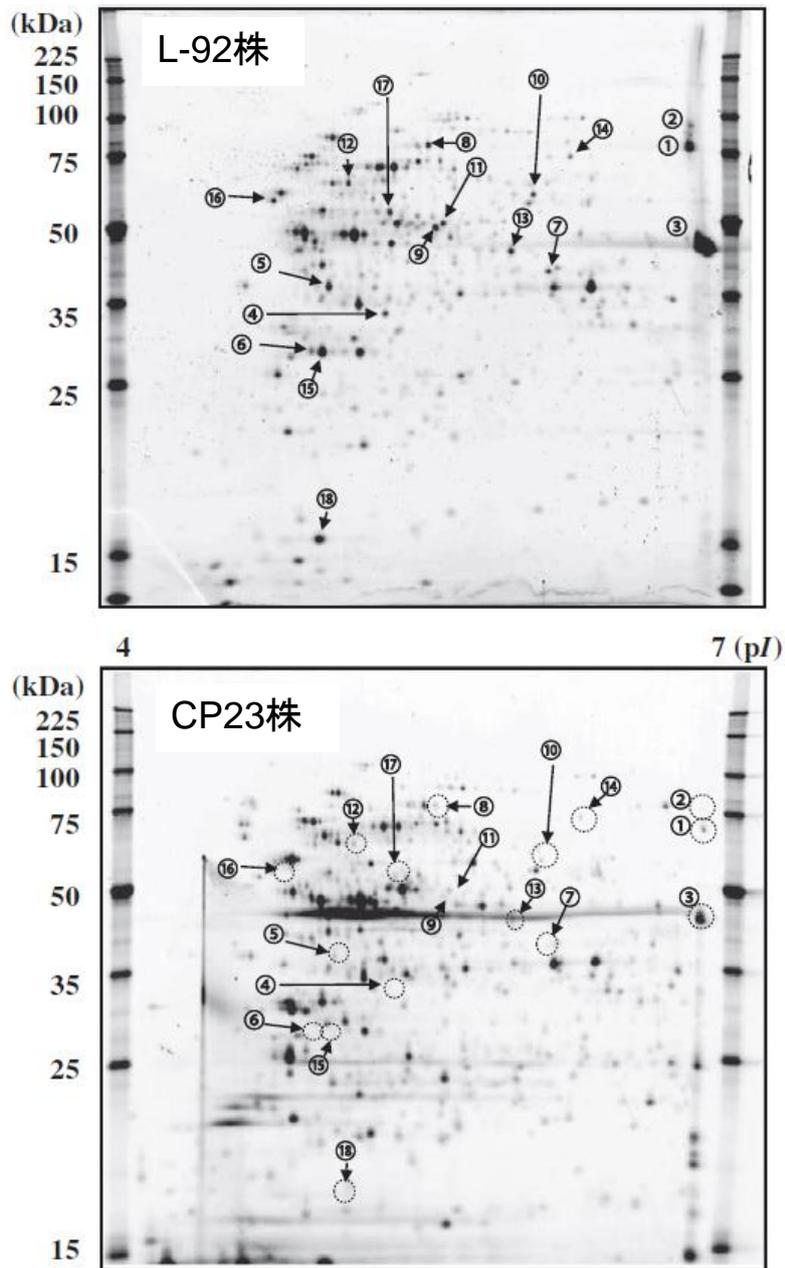


図2.10 *L. acidophilus* L-92株、CP23株菌体の表面タンパク質の二次元電気泳動図

L. acidophilus L-92株(上)、CP23株(下)菌体から0.5% SDSによって抽出されたタンパク質を、pH 4.0~7.0、9~18% ゲルにて展開し、銀染色を行った。

①~⑱はスポット強度比でCP23に比べて5倍以上L-92で高かったものを示す。

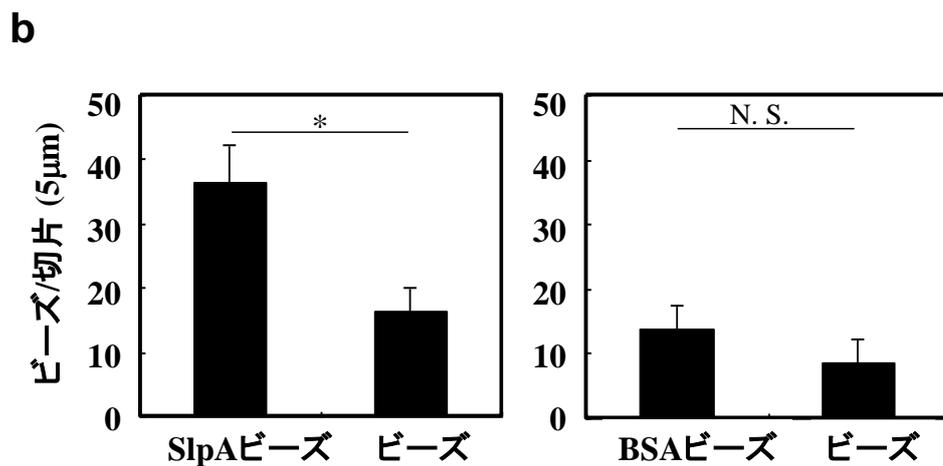
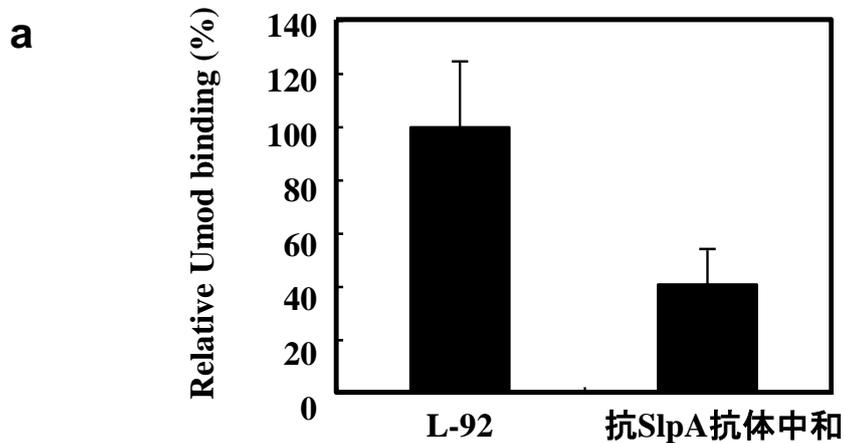


図2.11 Uromodulin結合性およびM細胞からの取り込みにおけるSlpAの関与

a: 通常のL-92株菌体のUromodulin結合数を100%とした場合の、抗SlpA抗体で中和した菌体のUromodulin結合率を示した。

Mann-Whitney U test; n = 9, エラーバーはSEを示す。

b: SlpAを結合させた蛍光ビーズ (SlpAビーズ)、BSAを結合させた蛍光ビーズ (BSAビーズ)、タンパク質を結合させないビーズのパイエル板内部への取り込み量比較

Mann-Whitney U test; n = 4, * $p < 0.05$, エラーバーはSEを示す。

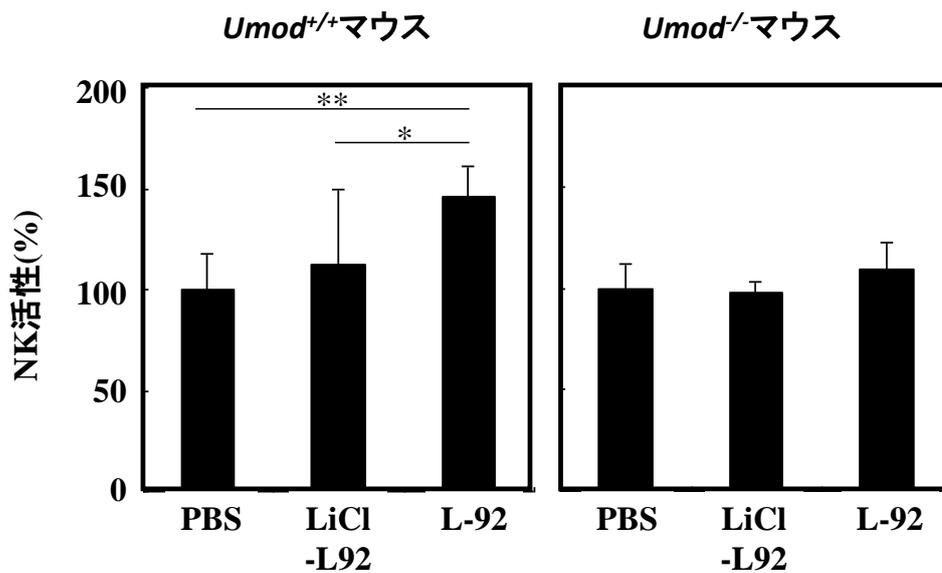


図2.12 *Umod*^{+/+}マウス、*Umod*^{-/-}マウスにおけるL-92株菌体、LiCl処理したL-92株菌体投与による脾臓のNK活性上昇比較

Umod^{+/+}マウス(左)および*Umod*^{-/-}マウス(右)に、PBS, LiCl処理したL-92株菌体(LiCl-L92)、L-92株菌体(L-92)を300 mg/mlとなるように投与し、2週間後に脾臓細胞のNK活性を測定した。

tukey test, n = 5, *Umod*^{-/-}のPBS群のみ n = 3. ***p* < 0.01 and **p* < 0.05, エラーバーはSDを示す。

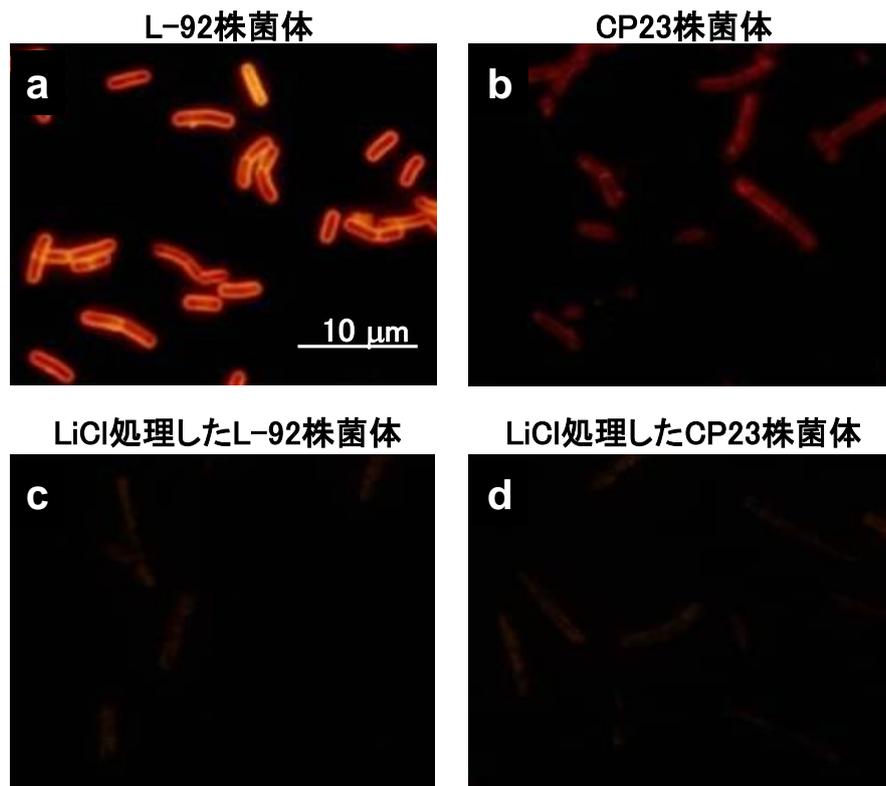


図2.13 L-92株、CP23株とLiCl処理した菌体の免疫染色

L-92株の菌体(a)、CP23株の菌体(b)、LiCl処理したL-92株の菌体(c)、LiCl処理したCP23株の菌体(d)をスライドグラスに塗布し、抗SlpAモノクローナル抗体を使用して免疫染色を行い、Cy3蛍光強度を確認することでSlpAの局在を調べた。

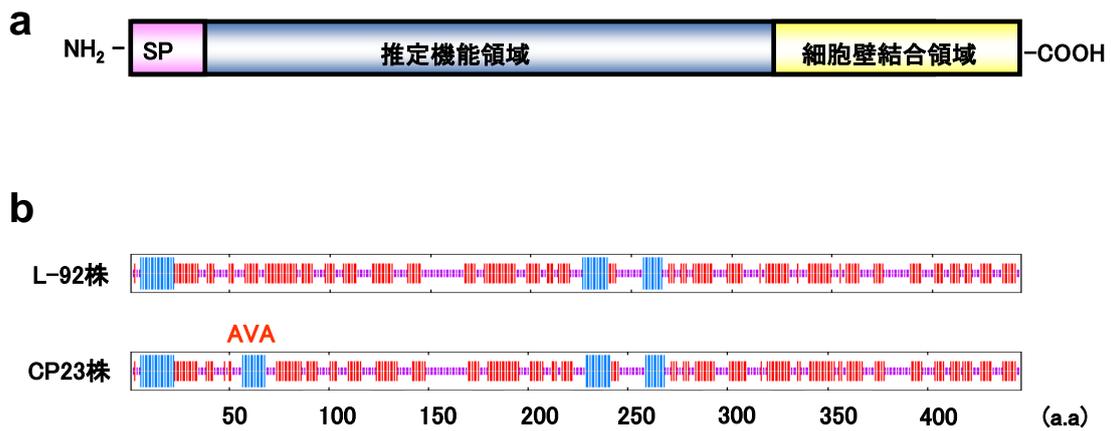


図2.14 L-92株とCP23株のSlpA配列解析

a: SlpAの推定構造模式図。N末端にシグナルペプチド(SP)を有し、C末端側は細胞壁結合領域、中間部位は機能領域。

b: L-92株(上)、CP23株(下)のSlpAアミノ酸配列より二次構造予測結果を示す。青: α ヘリカル構造、赤: 延長ストランド、桃: ランダムコイル構造を示す。CP23株では、推定昨日領域のN末端側にAVA挿入配列が見られ、挿入配列によりヘリカル構造を形成することが予測された。

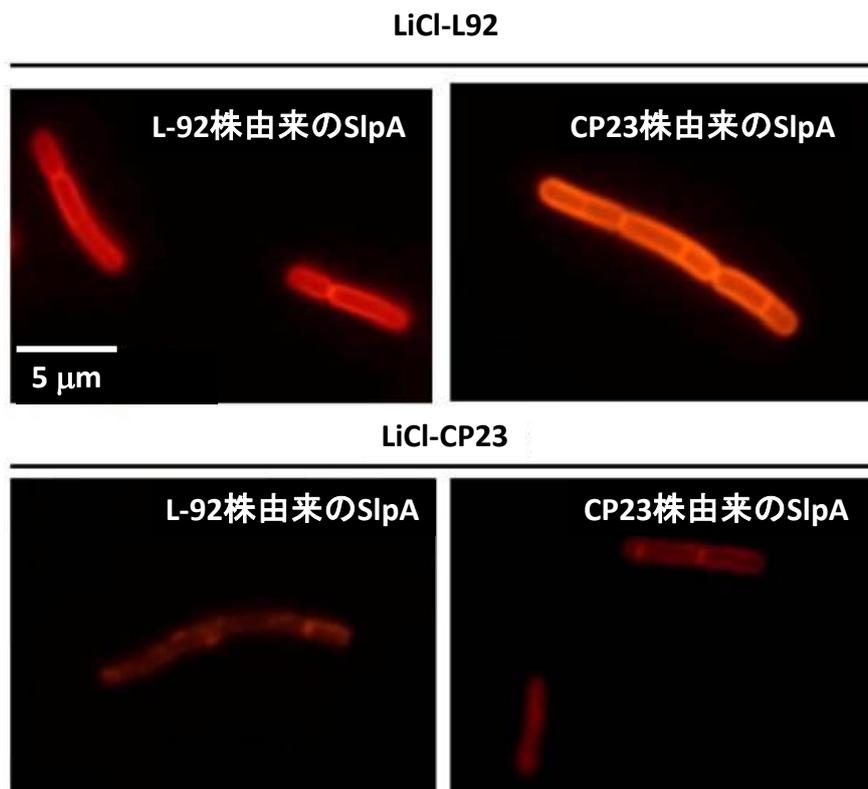


図2.15 L-92株とCP23株菌体へのSlpA結合性評価

上段: LiCl処理したL-92株菌体へのL-92株由来(左)、CP23株由来(右)のSlpAの再構成

下段: LiCl処理したCP23株菌体へのL-92株由来(左)、CP23株由来(右)のSlpAの再構成

L-92株菌体にはSlpAが菌体周囲に再構成されたが、CP23株菌体へのSlpAの再構成は部分的であった。

表2.1 CP23株と比較してL-92株で発現量の多いタンパク質
(スポット強度とその比、同定されたタンパク質)

Spot No	L-92株	CP23株	L-92/CP23比	同定されたタンパク質
1	1.854	>0.01	>185.31	Serine protease
2	0.495	>0.01	>49.52	Serine protease
3	24.085	0.638	37.76	Surface layer protein A
4	0.299	0.012	25.20	Phosphofructokinase
5	0.687	0.038	18.03	D-lactate dehydrogenase
6	1.612	0.099	16.33	Fucose bisphosphoatase aldolase
7	0.279	0.020	14.10	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
8	0.399	0.030	13.49	BipAEFTU family GTP binding protein
9	0.504	0.038	13.37	adenylosuccinate synthetase
10	0.222	0.019	11.91	Glutamyl-tRNA synthetase
11	0.417	0.039	10.64	formyl-coenzyme A transferase
12	0.366	0.041	9.00	putative oxalyl-CoA decarboxylase
13	0.260	0.029	8.82	adenylosuccinate lyase
14	0.140	0.016	8.81	Methionyl-tRNA synthetase
15	0.402	0.047	8.46	fructose-bisphosphate aldolase
16	0.133	0.016	8.36	F0F1 ATP synthase subunit beta
17	0.430	0.056	7.73	Glutamine synthetase
18	1.145	0.210	5.44	phosphotransferase system enzyme II

第3章 L-92株の免疫細胞への作用の解明

3. 1. 緒言

第2章では、L-92株菌体が小腸パイエル板のM細胞から取り込まれ、樹状細胞へ受け渡されること、さらにそのためにはL-92株菌体の表層タンパク質であるSlpAがM細胞上のUromodulinに結合することが重要であることを報告した。M細胞から取り込まれたL-92株の菌体が樹状細胞にも取り込まれることを確認し、これが腸管免疫系における初期の刺激を引き起こすことが推測されるが、樹状細胞に取り込まれたL-92株がどのように細胞を刺激するのかについては全く不明である。そこで本章では、まず、L-92株の菌体が樹状細胞に取り込まれた後の生体免疫応答について解析することを目的とした。乳酸菌に対する生体の免疫応答を調べるために、過去に、様々なアプローチが用いられている。特に生体における免疫応答を調べるためには、生体試料の選択がポイントとなると考えられる。例えば、ヒトの血液から分離した単球を用いた評価系や⁴⁶、マウスのパイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓細胞などから分離した樹状細胞を用いた評価系や⁴⁷、THP-1細胞などの樹立細胞株を用いた評価系⁴⁸⁻⁵⁰などの試験成績が報告されている。

本章では、L-92株がM細胞から取り込まれた後の樹状細胞における免疫応答を推測するために、簡便な方法としてTHP-1細胞を用いた方法にて、L-92株の菌体と接触したTHP-1細胞においてどのような遺伝子発現応答が認められるかをマイクロアレイを用いて解析した。THP-1細胞はヒト単球性白血病細胞株であり、刺激を与えることによりマクロファージ様に分化することが知られており、貪食や免疫応答の解析に多用されている。その刺激の方法も様々なものが報告されているが、今回、Dimethyl sulfoxide (DMSO) とIFN- γ により刺激を与える方法を用いた文献⁵¹を参考に本実験を行った。

3. 2. 実験方法

3. 2. 1. 乳酸菌の培養と殺菌処理

L-92 株を MRS 培地で 20 時間、静置培養し、その菌体を 8,000 rpm、5 分間の遠心分離により集菌した。菌体を PBS に懸濁した後、100°C で 10 分間熱湯中に放置して殺菌し、THP-1 細胞との共培養試験に用いた。菌体の構成成分が THP-1 細胞に与える影響を評価するため、殺菌体を用いて実験を行った。

3. 2. 2. L-92 菌体と THP-1 細胞の共培養

THP-1 細胞を、HS 研究資源バンクより入手し、不活化した FBS を 10%、ストレプトマイシン (100 µg/ml) (GIBCO)、ペニシリン (100 U/ml) を添加した RPMI-1640 (シグマ) 培地で、37°C、5% CO₂/95% air 条件下で培養した。培養した THP-1 細胞を 5 x 10⁶ cells/ml となるように 6 穴プレートに 2 ml 添加し、DMSO (シグマ) を 1.2% (V/V) となるように加えて 24 時間培養した後、IFN-γ (R&D system) を 5000 U/ml となるように加えてさらに 16 時間培養した。続いて、L-92 の菌体を、5 x 10⁹ cells/ml となるように RPMI-1610 培地に懸濁した懸濁液を 200 µl 添加し、共培養した。乳酸菌懸濁液を非添加の THP-1 細胞をコントロールとして調製した。乳酸菌菌体と共培養した THP-1 を、4 時間後、または 20 時間後に回収して、各群 n = 3 にてマイクロアレイ解析用試料とした。腹腔内マクロファージに乳酸菌を接触させた研究で、乳酸菌種により 4 時間と 24 時間後の腹腔内マクロファージでの分解されやすさと、それに伴うサイトカイン産生プロファイルが異なることが報告されている⁵²ことから、本知見を参考に 4 時間後と 24 時間後の 2 時点における応答解析を実施した。

3. 2. 3. RNA 抽出とマイクロアレイ解析

乳酸菌と共培養した THP-1 細胞を 4℃、1,500 rpm、10 分間、遠心分離して回収し、PBS で 2 回洗浄した後、RNAlater (Thermofisher) 中で保存した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコルに従い、全 RNA を抽出した。抽出した RNA をそれぞれ 5 µg 用い、ヒトの遺伝子約 28,869 種の全配列遺伝子がプローブとしてセットされている GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affimetrix) にてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析は、理化学研究所の中央支援にて実施した。

3. 2. 4. 統計解析と機能解析

マイクロアレイのデータ解析は、GeneSpring software version 6.1 (Silicon Genetics) を用いて行った。発現データはコントロールと比較して 2 倍以上の差があるもので、unpaired t-test with the Benjamini-Hochberg post test 検定で P 値が 0.05 より小さいものを有意な差として以降の解析に用いた。さらに、遺伝子群の生物学的ネットワーク相互作用を知るために、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて解析を実施した。

3. 2. 5. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) による発現解析

マイクロアレイ解析で得られた結果の定量性を検証するために、一部の遺伝子に関して、qPCR による定量を行った。1 µg の全 RNA を鋳型として、Superscript III First strand cDNA Synthesis System (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を蒸留水で 3 倍希釈して鋳型として用い、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を使用して、付属のプロトコルに従い qPCR を行った。

qPCR に用いたプライマーを以下に示す。

TNF(forward) : 5' -AGATGATCTGACTGCCTGGG-3'

TNF(reverse) : 5' -CTGCTGCACTTTGGAGTGAT-3'

CRLF2 (forward) : 5' -CTGATGCCACGAAAATCTCA-3'
CRLF2 (reverse) : 5' -TTCTCCATCAGGAATGGGAC-3' ,
GAPDH (forward) : 5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
GAPDH (reverse) : 5' -TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3'
CD86 (forward) : 5' -AGAGGAGCAGCACCAGAGAG-3'
CD86 (reverse) : 5' -CAGAAGCAGCCAAAATGGAT-3'
STAT4 (forward) : 5' -CACAGCTACATGCATTGGATT- 3'
STAT4 (reverse) : 5' -CGTGTTCCTCAAAGAGAAAAACC-3'
IL8 (forward) : 5' -CTGGCCGTGGCTCTCTTG-3'
IL8 (reverse) : 5' -CCTTGGCAAAACTGCACCTT-3'
IDO1 (forward) : 5' -CTACCATCTGCAAATCGTGACTAAGT-3'
IDO1 (reverse) : 5' -GAAGGGTCTTCAGAGGTCTTATTCTC-3'

3. 3. 結果

3. 3. 1. L-92 株の刺激により変動した遺伝子群の解析

L-92 株の菌体添加 4 時間後（初期）、24 時間後（後期）に THP-1 細胞において、コントロールと比較して、それぞれ有意に発現上昇または発現低下した遺伝子は、初期で 282 遺伝子、後期で 2411 遺伝子であった。これらの遺伝子を IPA 解析に供し、対象とする遺伝子に統計的に最も有意に関わる生物学的機能を推定した結果、今回最も変動した遺伝子群が関連するのは「Hematological process」というネットワークであり、初期で変動した遺伝子は 66 個、後期で変動した遺伝子は 253 個が含まれていた。より詳細に変動遺伝子を分析すると、初期で変動した遺伝子群は転写因子やサイトカインなどが主であり、後期で変動した遺伝子群は転写因子やサイトカインに加えて酵素、細胞膜

受容体、キナーゼなどが多く含まれていた（表 3.1）。

3. 3. 2. L-92 株の刺激による遺伝子の変動パターンの解析

変動した遺伝子群をより詳細に理解するため、L-92 株の刺激によって変動する THP-1 遺伝子の変動をパターン分類した。4 時間後に未刺激の細胞に比べて 4 倍以上変動し、4 時間後から 24 時間後では 4 倍以下の変動を示した遺伝子を「初期変動型遺伝子」として、4 時間後には 4 倍以下の変動で、4 時間後から 24 時間後では 4 倍以上変動した遺伝子を「後期変動型遺伝子」として、4 時間後および 4 時間後から 24 時間後の両方で 4 倍以上変動した遺伝子を「継続的変動型遺伝子」として分類した。その結果、「初期変動型遺伝子」には *NFkB* や *JUN* を初めとする転写因子や *TNF*、*CCL4* や *CCL3* などのサイトカインやケモカイン、*SOD2* や *HMOX* といった抗酸化関連遺伝子が含まれていた（表 3.2）。「後期変動型遺伝子」には、細胞外から取り込んだ抗原をヘルパー T 細胞に提示するクラス II 抗原提示分子（MHCII）（*HLA-DQA1*）や、ナイーブ T 細胞の活性化に必要な *CD80* や *CD86* などの補助刺激分子の発現が上昇していた。さらに、インターロイキン受容体などの膜貫通型受容体や、*IL12*、*IL6* や *CCL22* などのサイトカイン、そして転写因子や酵素などが含まれていた。「継続的変動型遺伝子」には、*IL1*、*IL8* などのサイトカインや酵素 *IDO1*（indoleamine 2,3-dioxygenase 1）が含まれていた。

3. 3. 3. qPCR による定量性の確認

「初期変動型遺伝子」として、*TNF* を、「後期変動型遺伝子」として、*CRLF2*、*CD86*、*STAT4* を、「継続的変動型遺伝子」として、*IL8* と *IDO1* を選んで、マイクロアレイによる遺伝子変動の解析結果を、qPCR 法により定量的に解析した。その結果、「初期変動型遺伝子」である *TNF* は、応答初期（黒棒グラフ）は 4 倍以上発現上昇したが、応

応答後期（白棒グラフ）は発現があまり変動しておらず、応答初期のみに発現上昇したというマイクロアレイ解析による分類通りの結果が得られた（図 3.1）。「後期変動型遺伝子」である *CRLF2*, *CD86*, *STAT4* は、応答初期の発現変動は 4 倍以下であったが、応答後期は 4 倍以上の発現上昇しており、こちらも応答後期に著しく発現上昇したというマイクロアレイ解析による分類通りの結果が得られた。「継続的変動型遺伝子」である *IL8* と *IDO1* は、応答初期も応答後期も 4 倍以上発現上昇しており、応答初期から後期にかけて継続的に発現上昇したという分類通りの結果が得られた。マイクロアレイ解析より定量性の高い qRT-PCR においても、先の分類通りの結果が得られたことから、これまでの解析が正確に行われたことが推察された。

3. 3. 4. THP-1 細胞における L-92 株に対する応答遺伝子応答経路の解析

これまでの解析結果を元に、L-92 株に対する初期応答と後期応答についてそれぞれまとめた結果を図 3.2、図 3.3 に示す。初期応答としては、転写因子の活性化とサイトカインの産生などが主な応答であり、細胞表面受容体から転写因子のシグナル伝達を介するマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）細胞シグナル経路や、細胞質内パターン認識受容体である NOD 様受容体を介した経路などが活性化されていることが示唆された（図 3.2）。また、応答初期には抗酸化関連遺伝子群も発現上昇していることが示唆された。後期応答としては膜貫通受容体の発現、転写因子の活性化、サイトカインの産生などが主な応答であり、細胞表面受容体である Toll 様受容体を介した経路の活性化により、炎症促進性のサイトカインやケモカインなどの転写が開始されると推察された（図 3.3）。

3. 4. 考察

第2章に示すように、L-92株は小腸パイエル板のM細胞から取り込まれた後、樹状細胞にさらに取り込まれ、腸管免疫における初期応答の引き金となることが推察された。本章では、樹状細胞に到達したL-92株の菌体がどのように免疫系に作用するのかに関して、THP-1細胞をマクロファージ様に分化させて解析した。THP-1を用いた評価においては、動物試験にみられるようなバラツキが少なく簡便な方法である点が大きな利点である。また、THP-1に代表される培養細胞系での詳細解析結果は、一般的に、*in vivo*試験結果における結果と相関すると考えられている。本章では、THP-1培養細胞を用いたL-92株に対する生体応答を、L-92株菌体の接触時間で初期応答と後期応答に分けて発現変動した遺伝子群を分類した。応答初期では*NFκB*などの転写因子の活性化を引き金として、サイトカインやケモカインが産生されることが示唆された。後期応答においては、転写因子とサイトカインの応答に加えて、抗原提示分子や補助刺激分子の発現が上昇しており、また各種インターロイキン受容体の発現も上昇していたことから、L-92株菌体の刺激を受けてナイーブT細胞を活性化したりT細胞にシグナルを伝えたり、サイトカインの情報をより効率的に受け取るように変化するものと推察された。また、初期と後期共に発現上昇した*IDO1*はトリプトファンをキヌレニンに代謝する酵素であり、局所的なトリプトファン枯渇と細胞毒性を有するキヌレニンにより、Tregの誘導やT細胞の増殖抑制、T細胞へのアポトーシス誘導など免疫を抑制的に作用させるとの報告があり⁵³⁻⁵⁵、L-92株によって引き起こされるTreg誘導やT細胞のアポトーシス誘導に関与することが示唆された。L-92株菌体が樹状細胞に取り込まれた後の、腸管免疫系に与える影響について、これまでに推察されたL-92株の作用メカニズムと合わせて推定して図3.4に示す。L-92株の菌体が樹状細胞に取り込まれると、樹状細胞の表面に抗原提示分子MHCIIや、補助刺激分子CD80やCD86が発現し、ナイーブT細胞の活性化やT細胞への情報伝達を行うことが推察された。さらに、各種サイトカインや抗酸化関連やアミノ酸代謝関連酵素が放出され、その中でもIL-12がTh0から

の Th1 細胞の分化に、IDO1 が Treg の分化に関与することが示唆された。また、IL-12 は NK 細胞の活性化にも関与すると推察した。L-92 株菌体が樹状細胞に取り込まれることにより、T 細胞の Th1/Th2 バランスを Th1 側に傾けて調整することでアレルギー症状の抑制や感染防御に関与することを、Treg を誘導することでも T 細胞を抑制して炎症を抑えたり、アレルギー症状を抑制することが示唆された。

今回、最初に IPA 解析に供することで最も有意に変動した遺伝子群である「Hematological process」に着目したが、これまでに報告されている L-92 株の作用メカニズムに関与する分子を個別に確認したところ、L-92 株の刺激により樹状細胞に発現して T 細胞へのアポトーシスを誘導することが示唆されている補助刺激分子である B7-H1 と B7-H2¹¹ は、「Hematological process」には分類されなかったが、それぞれ L-92 株の刺激により THP-1 細胞において発現上昇していた。よって、L-92 株菌体の刺激により樹状細胞表面の B7-H1, B7-H2 分子を発現誘導することによっても、T 細胞を抑制的に作用することも改めて示唆された。

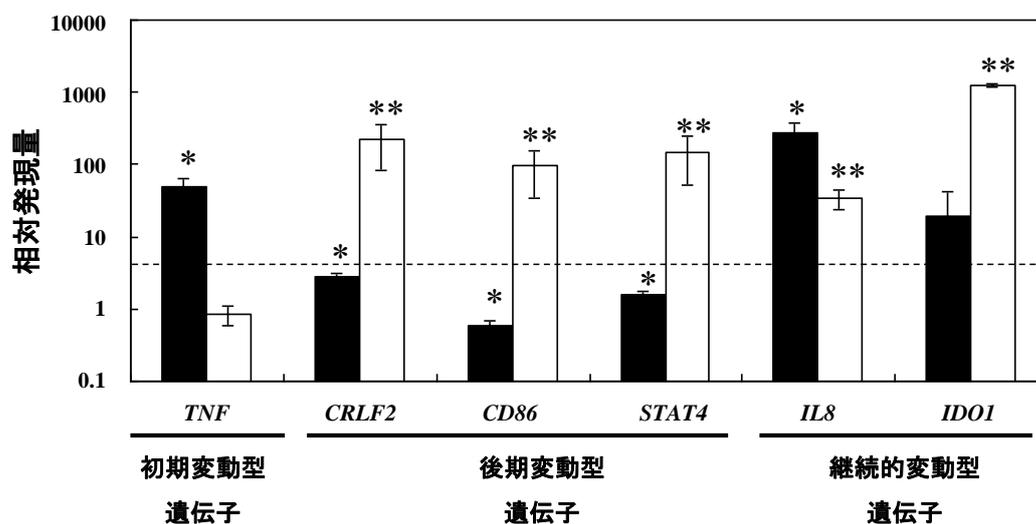


図3.1 qPCRによるL-92株に対するTHP-1細胞の変動遺伝子の確認
 THP-1細胞におけるL-92株の刺激に対して、応答初期に発現が上昇した*TNF*、応答後期に発現が上昇した*CRLF*、*CD86*、*STAT4*、連続的に発現が上昇した*IL8*、*IDO1*について、qPCRで確認した。4時間後の発現比（黒）、4時間後から24時間後の発現比（白）を示した。
 Student's t-test; n = 3, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, エラーバーはSDを示す。

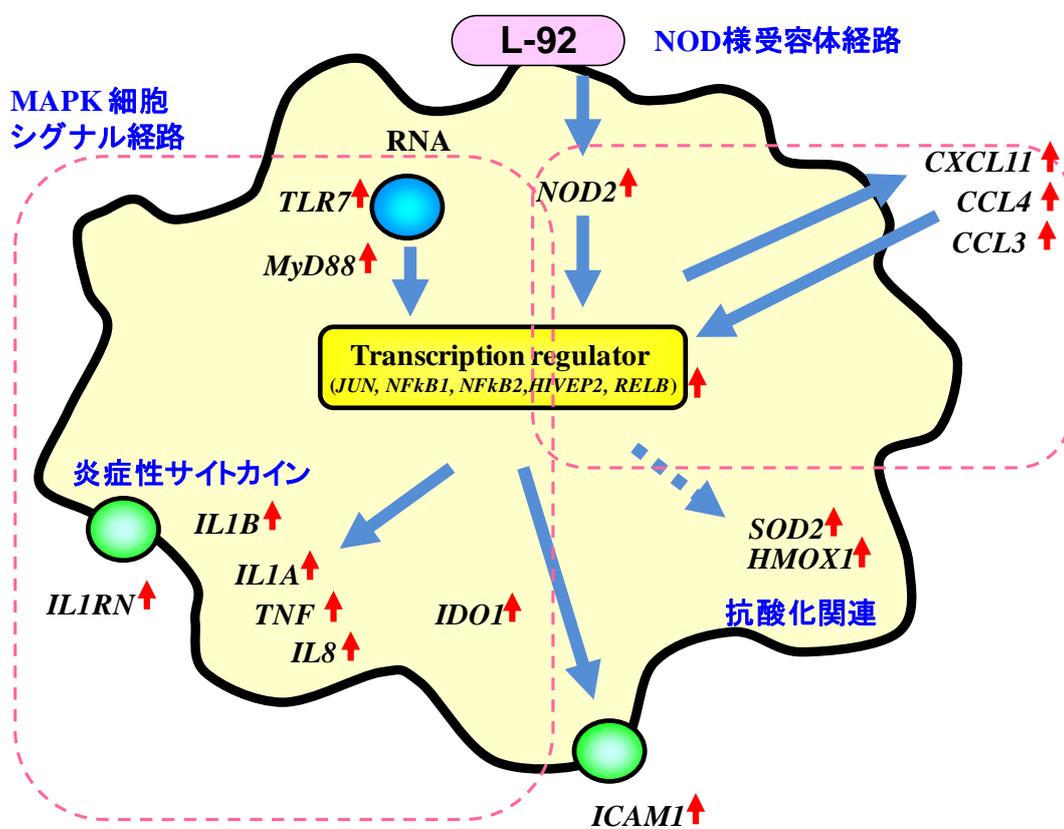


図3.2 L-92株に対するTHP-1細胞の初期応答

L-92株との接触4時間後に発現上昇したTHP-1細胞の特徴的な分子を示す。KEGG解析によりグループ化される遺伝子を点線で囲んだ。

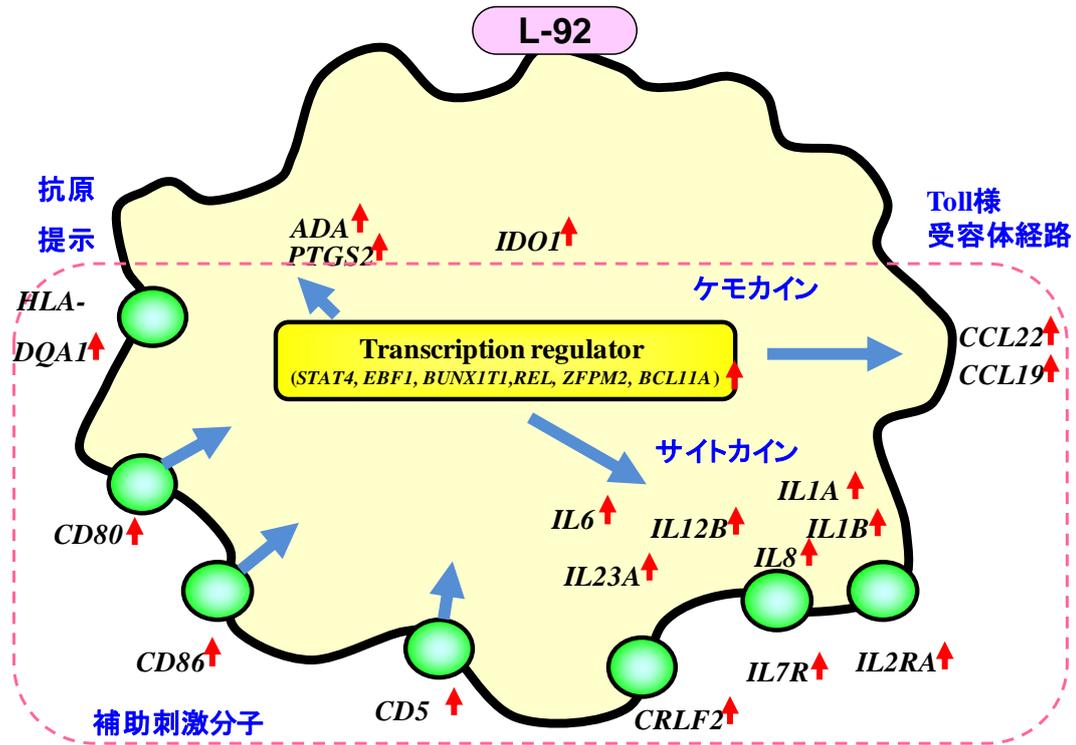


図3.3 L-92株に対するTHP-1細胞の後期応答

L-92株との接触24時間後に発現上昇したTHP-1細胞の特徴的な分子を示す。KEGG解析によりグループ化される遺伝子を点線で囲んだ。

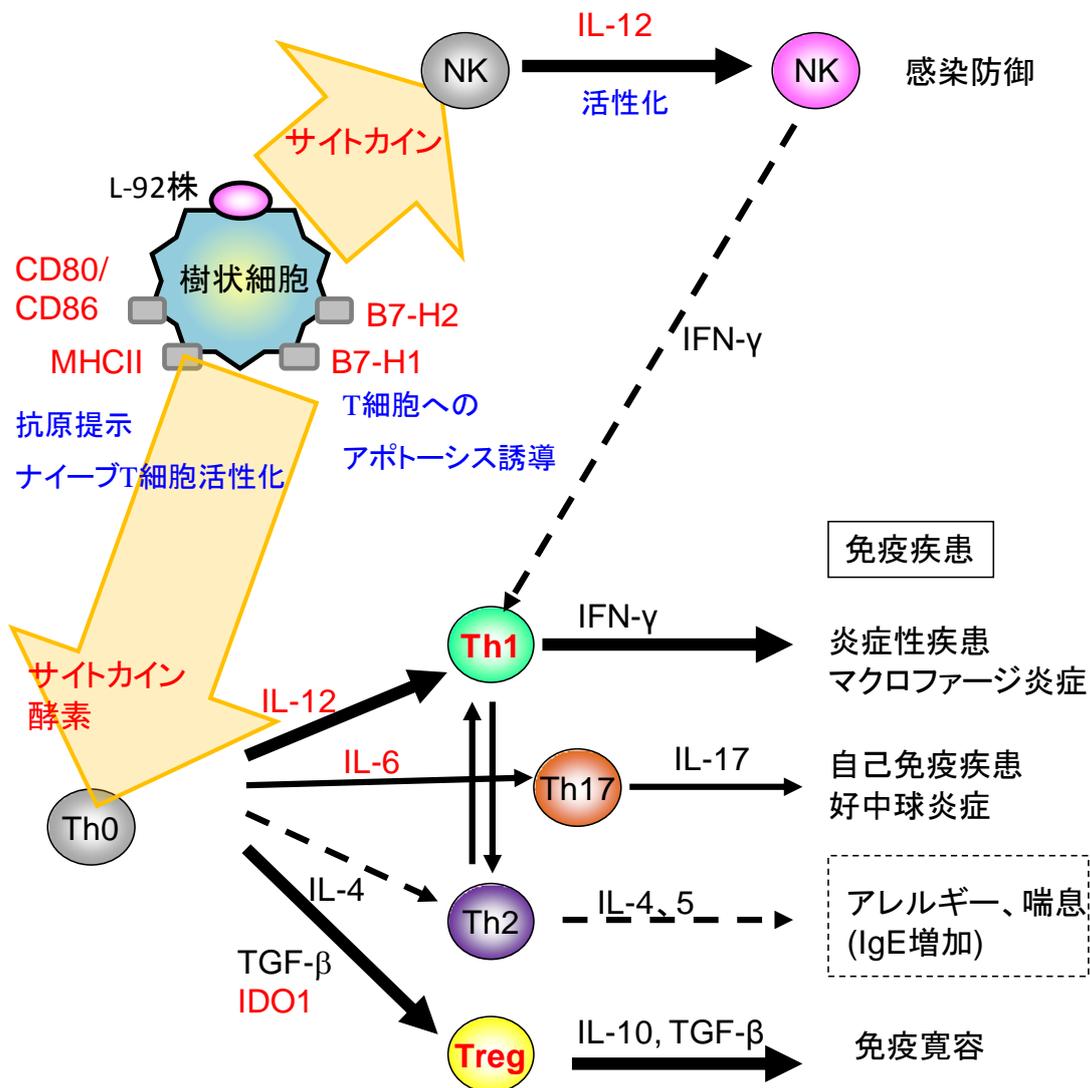


図3.4 L-92株が樹状細胞に取り込まれた後の、腸管免疫系に与える影響の推定

L-92株の菌体が樹状細胞に取り込まれると、樹状細胞においてサイトカインや酵素の発現が上昇し、T細胞の分化やNK細胞の活性化に影響を与えると推測した。赤字で示した分子が、今回THP-1細胞を用いた検討によって確認された。

**表3.1 IPA解析により、最も有意に関わる生物学的機能として推定された
"Hematological process"に関連する遺伝子群の分類**

分類	4 時間	24 時間
Transcription regulator	19	53
Enzyme	5	31
Transmembrane receptor	7	28
Cytokine	14	24
Kinase	4	22
G-protein coupled receptor	2	10
Phosphatase	2	7
Growth factor	1	5
Peptidase	0	4
Ion channel	0	3
Ligand-dependent nuclear receptor	0	3
Transporter	0	1
Other	12	62
	66	253

表3.2 L-92株の刺激による、THP-1細胞の遺伝子変動のパターン分類

分類	Entrez 遺伝子名	シンボル	変化(倍)	
			0-4時間	4-24時間
<初期変動型遺伝子>			> 4.0	4.0 >
Cytokine				
	chemokine (C-C motif) ligand 4	<i>CCL4</i>	58.29	2.02
	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	<i>CXCL11</i>	27.97	2.28
	chemokine (C-C motif) ligand 3	<i>CCL3</i>	20.04	2.77
	tumor necrosis factor	<i>TNF</i>	14.57	1.15
	interleukin 1 receptor antagonist	<i>IL1RN</i>	5.11	1.95
Transmembrane receptor				
	intercellular adhesion molecule 1	<i>ICAM1</i>	10.01	2.33
	toll-like receptor 7	<i>TLR7</i>	6.63	0.32
Enzyme				
	superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>SOD2</i>	10.04	2.50
	heme oxygenase (decycling) 1	<i>HMOX1</i>	4.26	2.21
Transcription regulator				
	jun proto-oncogene	<i>JUN</i>	4.99	2.72
	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	<i>NFKB1</i>	5.18	2.21
	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	<i>NFKB2</i>	6.10	1.85
	human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 2	<i>HIVEP2</i>	4.18	2.29
	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	<i>RELB</i>	4.34	1.04
<後期変動型遺伝子>			0-4 hr	4-24 hr
Transmembrane receptor			4.0 >	> 4.0
	interleukin 7 receptor	<i>IL7R</i>	1.83	63.99
	CD80 molecule	<i>CD80</i>	1.74	61.40
	cytokine receptor-like factor 2	<i>CRLF2</i>	2.02	52.00
	CD86 molecule	<i>CD86</i>	0.86	30.10
	CD5 molecule	<i>CD5</i>	1.10	16.20
	interleukin 15 receptor, alpha	<i>IL15RA</i>	2.06	4.37
	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	<i>HLA-DQA1</i>	0.94	5.93
	interleukin 2 receptor, alpha	<i>IL2RA</i>	1.00	4.98
	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	<i>CSF2RA</i>	0.85	4.15
Cytokine				
	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, p40)	<i>IL12B</i>	3.39	18.10
	interleukin 6 (interferon, beta 2)	<i>IL6</i>	1.08	54.45
	interleukin 23, alpha subunit p19	<i>IL23A</i>	1.29	28.01
	secreted phosphoprotein 1	<i>SPP1</i>	2.73	11.06
	chemokine (C-C motif) ligand 22	<i>CCL22</i>	1.07	17.16
	chemokine (C-C motif) ligand 19	<i>CCL19</i>	1.13	9.65
Transcription regulator				
	early B-cell factor 1	<i>EBF1</i>	1.12	41.89
	signal transducer and activator of transcription 4	<i>STAT4</i>	1.42	23.28
	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	<i>RUNX1T1</i>	0.97	8.18
	zinc finger protein, multitype 2	<i>ZFPM2</i>	1.05	5.65
	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	<i>BCL11A</i>	0.85	6.92
	growth factor independent 1 transcription repressor	<i>GFI1</i>	-2.21	-5.00
Enzyme				
	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	<i>PTGS2</i>	2.58	14.29
	adenosine deaminase	<i>ADA</i>	1.07	9.62
	sphingosine-1-phosphate lyase 1	<i>SGPL1</i>	1.06	5.90
	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	<i>PAPSS2</i>	1.05	5.47
	fibronectin 1	<i>FNI</i>	0.95	5.84
	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	<i>F13A1</i>	-1.33	-12.62
<継続的変動型遺伝子>			0-4 hr	4-24 hr
Cytokine			>4.0	>4.0
	interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	26.00	4.09
	interleukin 8	<i>IL8</i>	16.28	4.84
	interleukin 1, alpha	<i>IL1A</i>	4.32	16.48
	Epstein-Barr virus induced 3	<i>EBI3</i>	6.64	7.44
Enzyme				
	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>IDO1</i>	5.67	30.67

第4章 L-92株の腸管上皮への作用の解明

4. 1. 緒言

第2章、第3章での検討において、免疫調節作用を有するL-92株はM細胞を介して、その後の樹状細胞への取り込まれることを明らかにし、また、表層タンパク質SlpAを有するL-92株は効果的にM細胞から取り込まれることで腸管免疫系に作用することが推察された。その際に、L-92株のSlpAがM細胞上のUromodulin結合性することが極めて重要なイベントであることを示すとともに、樹状細胞がL-92株を貪食した際の免疫応答についても推察した。

M細胞以外の腸管上皮細胞へのL-92株の作用は明らかとなっていないが、乳酸菌の開発において、上皮細胞への親和性を重視したスクリーニングが多用されていることから、L-92株においても腸管上皮細胞に接着することで、宿主側に何らかのシグナルが伝達され、何らかの応答を引き起こしている可能性もある。そこで本章では、腸管上皮細胞へのL-92株の菌体の作用を網羅的に解析するため、腸管上皮細胞にL-92株の菌体が接触することで変動する遺伝子に着目して詳細解析を行った。

腸管上皮細胞と乳酸菌の宿主 - 乳酸菌の相互作用に関する研究は多数報告されており、近年、乳酸菌に応答して腸管上皮細胞で起こるイベントの解析例に対する報告が行われている。例えば、ヒトの生検サンプル⁵⁶や、マウス腸管⁵⁷、そしてCaco-2細胞などの樹立細胞株⁵⁸を用いた研究が報告されている。Caco-2細胞は、実験条件が良く確立されたヒト上皮樹立細胞株であり、輸送や代謝、栄養吸収など様々な実験系に用いられている⁵⁹⁻⁶¹。また、近年では宿主応答解析として、マイクロアレイ解析にも用いられている⁶²⁻⁶⁴。

そこで今回は、「L-92乳酸菌」の腸管上皮への作用を解明するために、ヒト結腸癌由来細胞株であり、条件よく培養すると小腸上皮様になることが知られている、Caco-2

細胞を用いて実験を行うこととした。

4. 2. 実験材料および方法

4. 2. 1. 乳酸菌と培地、培養方法

Caco-2 細胞における乳酸菌からの刺激に対する応答解析のための乳酸菌の調製は、3. 2. 1. の方法に従った。Caco-2 細胞の接着性には、前述の L-92 株と CP23 株に加えて、自社保有の CP734 株、CP1400 株、CP1553 株、CP1554 株、CP1613 株、CP2418 株の合計 8 種類の *L. acidophilus* の菌体を使用した。乳酸菌は全て MRS 培地で 37°C、20 時間静置培養し、PBS にて 2 回洗浄して実験に使用した。

4. 2. 2. Caco-2 細胞培養

ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 細胞を、RIKEN Cell Bank より取り寄せ、DMEM 培地 (Sigma) に 10% FBS (Hana-Nesco Bio)、1% 非必須アミノ酸 (Sigma)、ストレプトアビジン (100 µg/ml) およびペニシリン (100 U/ml) (Gibco) を添加し、37°C、5% CO₂/95% air 条件下で培養した。培地を 1 日おきに交換し、単層となった細胞は 0.25% トリプシン (Sigma) を 5 分間作用させて回収し、4.5 × 10⁵ cells/well となるように 6 穴プレートに添加して培養した。培地を 1 日おきに交換しながら 21 日間培養し、小腸上皮様に分化させたものを用いた。

4. 2. 3. L-92 株との共培養と Caco-2 細胞の遺伝子発現解析

6 穴プレートに培養した Caco-2 細胞に、L-92 株の殺菌体を 10¹⁰ cells 添加し、4 時間または 20 時間共培養した。乳酸菌非添加の Caco-2 細胞をコントロールとして準備して、上記と同条件にて培養した。乳酸菌と共培養した Caco-2 細胞をスプレッダーに

よりはがして、4°C、1,500 rpm、10 分間遠心分離して回収し、PBS で 2 回洗浄した後、RNAlater 中で保存した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてキットに添付されているプロトコルに従い全 RNA を抽出した。抽出した 5 mg の全 RNA を用い、ヒトの全遺伝子 28,869 個に対応したプローブがセットされている GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affimetrix) を用いてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイのデータ解析は、GeneSpring software version 6.1 (Silicon Genetics) を用いて行った。マイクロアレイの解析においては、遺伝子発現の強度をコントロール群のデータと比較して、L-92 添加群で 2 倍以上の差があるものに対して、unpaired t-test with the Benjamini-Hochberg post test 検定で *P* 値が 0.05 より小さいものを有意な差として以降の解析に用いた。

4. 2. 4. 乳酸菌の Caco-2 細胞接着性評価

乳酸菌の Caco-2 細胞接着性評価は、文献⁶⁵を参考に実験を実施した。21 日間培養した Caco-2 細胞を PBS (pH 7.4) にて 2 回洗浄した。乳酸菌を PBS で 2 回洗浄し、 10^8 cells/ml となるように 10% FBS および 1% 非必須アミノ酸を添加した DMEM 培地に懸濁し、乳酸菌懸濁液 3 ml を Caco-2 細胞に添加して 37°C で 1 時間インキュベートした。Caco-2 細胞を PBS にて 3 回洗浄し、その後 0.5 M の NaCl を含むように調整した PBS にて 3 回洗浄した。最後に、0.05% Triton X-100 を添加した PBS にて Caco-2 細胞に接着した乳酸菌を回収し、回収した溶液を MRS プレートに播種して 37°C、48 時間微好気培養して、プレートでカウントされた生菌数を回収された乳酸菌数とした。L-92 株において回収された乳酸菌数を 100%とした場合の回収率を、Caco-2 接着性として計算した。

4. 2. 5. 乳酸菌の表層タンパク質抽出と SDS-PAGE

各 *L. acidophilus* の表層タンパク質は、5.5 M LiCl (Sigma) に菌体を懸濁して室温にて 30 分インキュベートして抽出し、10 mM Tris-HCl (pH 7.0) を用いて透析して調製した。抽出したタンパク質を解析するために 5-15% グラジエントゲル (BioRad) を用いて SDS-PAGE を行った。CBB 染色して得られた SlpA のバンドを Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) により解析し、各種 *L. acidophilus* 株の SlpA 量を数値化した。L-92 株から抽出された SlpA の量を 100%とした場合の SlpA 量 (%) を計算した。

4. 3. 結果

4. 3. 1. L-92 株の刺激により変動した遺伝子群の解析

Caco-2 細胞に L-92 株を添加した場合には、未添加群の場合に比べて有意に ($p < 0.05$) 遺伝子の発現が変動しているものを見出した。さらに、L-92 株の刺激により 1.25 倍以上変動した遺伝子群について、図 4.1 にまとめた。L-92 株の菌体と共培養 4 時間後においては、コントロール群に比べて約 180 遺伝子の発現が減少し、12 遺伝子の発現が上昇した (図 4.1、表 4.1)。具体的に、発現減少したのは、RNA スプライシング、転写因子、接着、細胞分裂に関与する遺伝子群などであった。また、L-92 株を添加して 20 時間に Caco-2 細胞で発現上昇したのは、約 40 遺伝子であった (図 4.1、表 4.2)。発現上昇した遺伝子群は、細胞接着に関与するものが最も多く、続いて MAP キナーゼに関与する遺伝子群、膜貫通型タンパク質の構成遺伝子群、免疫関連遺伝子群などであった。20 時間で最も多く変動した細胞接着に関与する遺伝子群としては、細胞の増殖に関係する上皮成長因子であるアンフィレグリン、細胞接着因子であるインテグリン、髪を構成するケラチン様タンパク質、マンノース結合型レクチンなどであった。L-92 株の菌体と 20 時間共培養することで、Caco-2 細胞において発現上昇する遺伝子の中で、多くが細胞表層に存在する遺伝子群であることは大変興味深い。

4. 3. 2. 8種類の *L. acidophilus* の Caco-2 接着性と SlpA 量の評価

他の乳酸菌における報告において、菌体表層の SlpA が Caco-2 細胞への接着性に関与するという結果が示されている³⁰。そこで、8種類の *L. acidophilus* を用いて SlpA の量と Caco-2 細胞への接着性に関連性があるかどうか評価した。

L-92 株の Caco-2 接着性と SlpA 量をそれぞれ 100%とした場合において、縦軸に Caco-2 接着性を、横軸に SlpA 量をとったプロット図を図 4.2 に示す。L-92 株よりも Caco-2 接着性の低い株は L-92 株よりも SlpA 量が少なく、L-92 株よりも SlpA 量が多い株は L-92 株よりも Caco-2 接着性が高いことが示された。第 2 章で M 細胞上の Uromodulin への結合性分子として着目した SlpA は、腸管上皮細胞への接着にも関与する可能性が示唆された。

4. 4. 考察

本章の検討では、経口摂取により腸管に接着した L-92 株菌体が宿主の腸管上皮細胞に与える刺激が、生体にどのような影響をもたらすかを探る目的で、腸管上皮細胞に見立てた Caco-2 細胞を用いて、L-92 株が腸管上皮細胞に接触することで新たに引き起こされる遺伝子の発現についてマイクロアレイ解析によって解析した。Caco-2 細胞への接触後の初期応答と後期応答を調べるため、今回は L-92 株を添加して 4 時間後と 20 時間後の 2 点において解析を行った。

L-92 株の添加 4 時間後では特に RNA スプライシングや転写因子で発現減少した遺伝子群が多かった。4 時間後においては、添加された L-92 株の菌体が細胞へ接着するものと考えられるが、Caco-2 細胞においてはこのプロセスがストレスとなり、各種の遺伝子発現の抑制が起こった可能性がある。一方、20 時間後では、その後 L-92 株との接触が続いたことにより、Caco-2 細胞がさらなる応答として、様々な遺伝子の発現を

高めたと推測される。近年 *L. salivarius* UCC118 株を用いて、Caco-2 細胞への刺激における発現遺伝子の解析結果が報告されている⁶⁶。この報告によれば、Caco-2 細胞との共培養によって、炎症誘導抑制因子や、いくつかのケモカインの誘導などが観察されている。興味深いことに、UCC118 株の表層タンパク質のアンカリングに必要な酵素遺伝子である *srtA* 遺伝子を欠損させた株の刺激では、乳酸菌の細胞接着に重要と考えられるムチン遺伝子の発現が減少することが報告されている。すなわち、乳酸菌の Caco-2 接着が刺激となり、乳酸菌と宿主細胞の親和性が高まる方向に Caco-2 遺伝子の発現が強化される報告が行われている。本試験においても、L-92 株に応答して上昇した遺伝子群には、細胞接着に関与する遺伝子群が多く見出された(表 4.2)。コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンなどの細胞接着に関与する分子が乳酸菌の接着に関与するという報告があるが^{37,38}、今回見出された細胞接着に関与する分子は乳酸菌の接着に関与するという報告はまだなく、L-92 株の腸管上皮細胞への接着に関与する分子の候補となり得るとも考える。

一方、Caco-2 細胞に対する L-92 株の親和分子に関しては、8 種類の *L. acidophilus* を用いて Caco-2 細胞への接着性を評価した結果、主要な表層タンパク質である SlpA 量と Caco-2 細胞への接着性との間に関連性がある可能性が示唆された。Caco-2 細胞に対する乳酸菌の刺激に対する細胞応答を評価した *L. salivarius* の研究例では、評価に用いた乳酸菌が SlpA を保有しないことから、乳酸菌表層の SlpA 以外の因子が Caco-2 細胞に対して影響を与え、L-92 株の本実験とは異なる細胞応答が起こったものと考えられるが、乳酸菌と宿主細胞が接着性を増すような方向でコミュニケーションを行っている可能性が示唆された。*L. acidophilus* NCFM 株においては *slpA* 欠損株は野生株と比較して Caco-2 接着性が低下するという報告があり³⁵、本検討と同様の報告がなされている。一方、*L. acidophilus* と近縁の *L. crispatus* においては表層タンパク質 CbsA が Caco-2 細胞への接着性に関与するという報告があり⁶⁷、今後、接着性の低い株と高

い株の比較や、異なる菌種による細胞刺激性の違いの比較、さらに、菌種に応じた応答性の体系化などを通じて、乳酸菌成分と細胞応答性の理解が進むことが期待できる。

第2章での検討により、L-92株のSlpAは、Uromodulinへの結合性およびM細胞からの取り込みに関与することが示されたが、本章での検討では腸管上皮細胞への接着にもSlpAが関与することが新たに推察された。本章のマイクロアレイ解析のデータを確認してもCaco-2細胞においてはUromodulinの発現が極めて低いことから（データ未掲載）、SlpAが結合するCaco-2因子としては、未知の成分が関与している可能性があるため、接着性に関与する細胞因子の解析が今後必要と考えられる。また、*in vivo*における細胞表層の状態と培養細胞における分子の発現状況は異なる事が予想されるため、*in vivo*におけるL-92の腸管接着関与成分の特定が今後の課題となる。

このように、SlpAは、M細胞上のUromodulinへの結合に関与するのみならず、腸管上皮細胞上の別因子にも親和性を示すが、特定分子への特異的な親和性を示すのではなく、たとえば、疎水性の強い分子や糖鎖などの類似構造などの分子群への親和性により、結合をしている可能性が考えられる。菌体表面に多量に存在するタンパク質であることから、宿主細胞や外部環境との接触機会も多く、宿主への影響に重要な役割を担っている可能性があると考えられる。

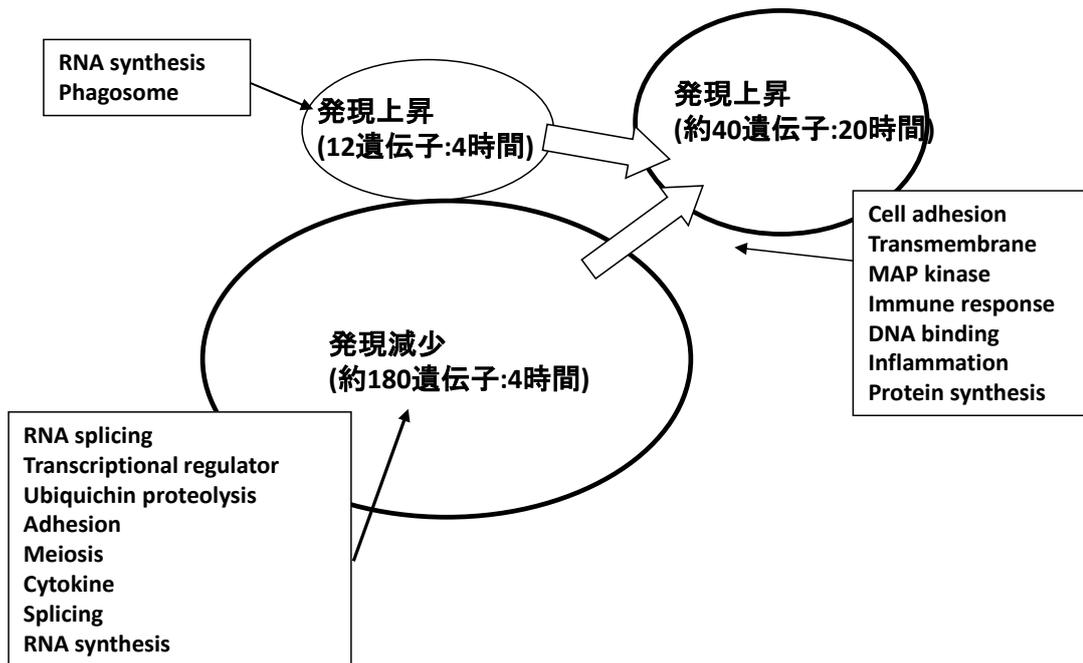


図4.1 L-92株の菌体と接触した際のCaco-2細胞の応答プロファイル
 4時間後と20時間後のL-92株に対する遺伝子発現変化をまとめた。
 L-92株の菌体添加4時間後には、約180遺伝子が発現減少し12遺伝子が発現上昇した。一方L-92株の菌体添加20時間後には、約40遺伝子が発現上昇した。

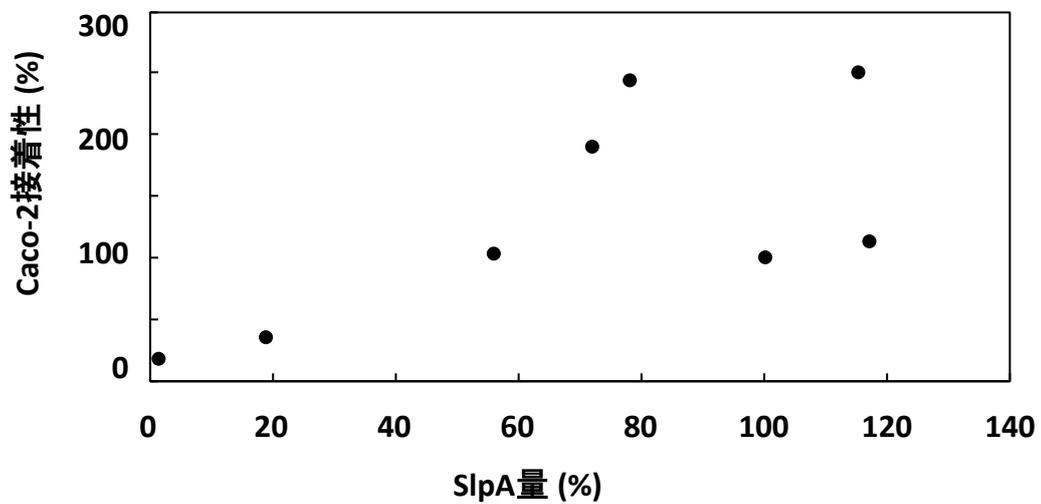


図4.2 *L. acidophilus*におけるCaco-2接着性とSlpA量の関係
 縦軸にCaco-2接着性(L-92比%)、横軸にSlpA量(L-92比%)をプロットした図を示す。L-92株よりもCaco-2接着性の低い株はL-92株よりもSlpA量が少なく、L-92株よりもSlpA量が多い株はL-92株よりもCaco-2接着性が高いことが示された。

表4.1 L-92株と接触4時間後にCaco-2細胞で発現変動した遺伝子(1/2)

分類	遺伝子名	シンボル	変化(倍)	p値	
<Up-regulated genes>					
Nucleosome structure	histone cluster 1, H2bf	BC056264	1.40	0.003	
	histone cluster 1, H2bh	BC096116	1.34	0.005	
	histone cluster 1, H1c	AK290947	1.30	0.006	
	histone cluster 1, H4d	BC128104	1.31	0.001	
	histone cluster 1, H1b	BC069101	1.31	0.010	
Metabolism	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	U03688	3.51	0.000	
	TIMP metalloproteinase inhibitor 3		1.46	0.007	
RNA synthesis	Polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa	BC001337	1.33	0.000	
Phagosome	Coronin, actin binding protein, 2A	BC011690	1.46	0.000	
MAPKK family	PDZ binding kinase	AF237709	1.34	0.000	
Transmembrane	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	AF022913	1.31	0.002	
Ubiquitination	Ubiquitin associated and SH3 domain containing B	BC007541	1.40	0.006	
<down-regulated>					
RNA spliceosome, surveillance	small nucleolar RNA, H/ACA box 16A	AK092096	-0.49	0.001	
	small nucleolar RNA, C/D box 13 pseudogene 2	X58060	-0.58	0.002	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 38B (retrotransposed)		-0.59	0.000	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 75		-0.61	0.002	
	small nucleolar RNA, C/D box 15A		-0.67	0.001	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 70	AK027197	-0.75	0.001	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 70B		-0.76	0.004	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 61	AK092096	-0.76	0.042	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 51		-0.76	0.042	
	small nucleolar RNA, H/ACA box 67	AK296664	-0.77	0.006	
	nuclear pore complex interacting protein	AK294177	-0.70	0.001	
	nuclear pore complex interacting protein	AF132984	-0.74	0.002	
	nuclear pore complex interacting protein	AK296338	-0.75	0.011	
	nuclear pore complex interacting protein	AF132984	-0.76	0.003	
	nuclear pore complex interacting protein	BC144439	-0.77	0.020	
	RNA binding motif protein 14	BC007641	-0.66	0.001	
	RNA binding motif protein 14	BC007641	-0.71	0.005	
	RNA binding motif protein 5	AF091263	-0.74	0.001	
	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase	AB061371	-0.74	0.009	
	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase	AF395444	-0.76	0.006	
	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase	AF395444	-0.77	0.009	
	coiled-coil domain containing 82	AK313893	-0.67	0.000	
	WD repeat domain 52	AK002004	-0.70	0.022	
	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 2	AK294177	-0.75	0.008	
	coiled-coil domain containing 142	BC143399	-0.75	0.001	
	Cell cycle	chromosome 12 open reading frame 27		-0.47	0.001
		chromosome 3 open reading frame 42	AF280797	-0.68	0.001
		chromosome 6 open reading frame 134	BC047303	-0.70	0.009
		chromosome 17 open reading frame 91	BX648321	-0.70	0.001
		chromosome 20 open reading frame 29	BC043344	-0.71	0.001
		chromosome 15 open reading frame 28		-0.73	0.002
		chromosome 2 open reading frame 49	AK127661	-0.73	0.004
		chromosome X open reading frame 40B	L43578	-0.73	0.005
chromosome 19 open reading frame 6		DQ005958	-0.74	0.000	
chromosome 6 open reading frame 64		BC022007	-0.75	0.004	
chromosome 2 open reading frame 14		AK093281	-0.77	0.039	
chromosome 17 open reading frame 88		AF143236	-0.76	0.016	

表4.1 L-92株と接触4時間後にCaco-2細胞で発現変動した遺伝子(2/2)

Transcriptional regulator	zinc finger protein 778	AK295122	-0.63	0.000
	zinc finger and SCAN domain containing 16	BC004255	-0.76	0.006
	zinc finger family member 767	BC047675	-0.76	0.013
	zinc finger, BED-type containing 3	BC007239	-0.77	0.005
	activating transcription factor 4	D90209	-0.76	0.000
	activating transcription factor 5	AB021663	-0.74	0.004
	ring finger protein 5 pseudogene 1	BC119741	-0.59	0.000
	ring finger protein 5 pseudogene 1	BC111392	-0.65	0.000
Taste transduction (Bitter taste)	taste receptor, type 2, member 14	BC103699	-0.62	0.017
	taste receptor, type 2, member 20	BC100915	-0.65	0.013
	taste receptor, type 2, member 31	BC117421	-0.67	0.023
	taste receptor, type 2, member 4	BC130439	-0.68	0.039
	taste receptor, type 2, member 19	BC101804	-0.74	0.031
	taste receptor, type 2, member 3	BC095523	-0.76	0.041
Adhesion pathway	mucin 12, cell surface associated		-0.74	0.026
	mucin 3B, cell surface associated	AB038783	-0.72	0.008
Peroxisome	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system)	AF252872	-0.69	0.001
	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system)	BC028216	-0.71	0.000
	solute carrier family 25, member 32	BC021893	-0.74	0.000
Meiosis	G protein-coupled receptor 21	BC066885	-0.68	0.002
	G protein-coupled receptor 75	AF072693	-0.74	0.016
Spliceosome pathway	splicing factor, arginine/serine-rich 1	BC033785	-0.77	0.001
	splicing factor, arginine/serine-rich 6	AK300411	-0.74	0.003
Cytosolic DNA sensing pathway	transmembrane protein 80	BC008671	-0.63	0.000
	transmembrane protein 88	BC057812	-0.76	0.009
Cytokine production	interleukin 17 receptor B	AF208111	-0.77	0.024
Neurone interaction	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	BC026337	-0.65	0.011
Others	protease, serine, 35	AY358661	-0.44	0.001
	FRSS1829	AY358798	-0.46	0.005
	oculomedin	AF142063	-0.51	0.003
	microRNA 221		-0.58	0.013
	nuclear receptor coactivator 5	BC140836	-0.60	0.000
	ankyrin repeat domain 36B	BC125132	-0.60	0.002
	transient receptor potential cation channel		-0.60	0.007
	family with sequence similarity 106, member A		-0.62	0.001
	IGYY565	BC040288	-0.62	0.005
	family with sequence similarity 106, member A		-0.62	0.001
	F-box protein 9	AK095307	-0.63	0.003
	family with sequence similarity 106, member C pseudogene		-0.63	0.002
	GALI1870	AY358688	-0.66	0.004
	F-box protein 17	AK021860	-0.75	0.008

表4.2 L-92株と接触20時間後にCaco-2細胞で発現変動した遺伝子

分類	遺伝子名	シンボル	変化(倍)	p値
<Up-regulated>				
Cell adhesion	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7	X98311	1.615	0.0082
	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	J03858	1.509	0.0012
	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	M29540	1.452	0.0093
	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	BC005008	1.401	0.0074
	amphiregulin	BC009799	1.567	0.0053
	amphiregulin	BC009799	1.315	0.0041
	integrin, alpha 2		1.310	0.0071
	integrin, alpha 6	BC136455	1.265	0.0119
	similar to keratin 18		1.359	0.0009
	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)	X15422	1.279	0.0069
	leucine rich repeat containing 66		1.360	0.0081
keratin 20	BC031559	1.330	0.0043	
MAP kinase pathway	dual specificity phosphatase 6	BC005047	1.309	0.0029
	dual specificity phosphatase 5	BC062545	1.304	0.0006
	small Cajal body-specific RNA 22		1.460	0.0003
	small Cajal body-specific RNA 13		1.301	0.0047
	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	BC023019	2.076	0.0003
	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	AK122672	1.266	0.0055
Transmembrane protein	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	BC137480	1.433	0.0009
	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	BC036495	1.389	0.0029
	transmembrane channel-like 7	BC036205	1.373	0.0089
	homeobox B9	BC015565	1.495	0.0004
Transmembrane protein ENSP0000340100		1.337	0.0132	
Immune related pathway	Fc fragment of IgE	M33195	1.428	0.0048
	immunoglobulin heavy constant delta	BC021276	1.356	0.0016
	immediate early response 3	BC005080	1.274	0.0140
	ERBB receptor feedback inhibitor 1	BC025337	1.272	0.0026
Metabolism	chromosome 10 open reading frame 54	AY358379	1.305	0.0119
	chromosome 17 open reading frame 78	BC034672	1.275	0.0013
	histone cluster 1, H2ai	BC112254	1.332	0.0090
DNA binding	ets variant 4	BC016623	1.325	0.0098
Inflammation	acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)	BC025698	1.311	0.0146
protein synthesis	ribosomal protein S3A	L13802	1.652	0.0099
Others	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	AY730627	1.273	0.0002
	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	BC018667	1.428	0.0065
	tescalcin	AK000614	1.255	0.0048
	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	BC005277	1.350	0.0024
	carbonic anhydrase XII	AF051882	1.328	0.0002
	WNK lysine deficient protein kinase 4	BC136664	1.392	0.0040
	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)	BC010860	1.333	0.0060
	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	M14758	1.466	0.0097
	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	AF049910875	1.285	0.0030
	similar to hCG2042717		1.565	0.0038
	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	D14041	1.279	0.0108
	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)	BC042628	1.499	0.0056
	mannosyl (beta-1,4)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase	BC113383	1.456	0.0023

第5章 総合討論

5. 1. 結果まとめ

L-92 株は免疫調節作用を有する乳酸菌で、そのアレルギー緩和作用や感染防御作用がヒト試験や動物試験によって明らかにされていたものの、L-92 株の宿主の腸管免疫系への初期の作用経路や、L-92 株が腸管免疫系において影響を与える上での重要性、さらにはその経路が乳酸菌によって異なる免疫調節作用を示すことへの説明になることなど、全く明らかされていなかった。本研究では、小腸パイエル板の抗原取り込みに特化した M 細胞に着目して、M 細胞から L-92 株が取り込まれて、上皮細胞で区切られた体内側に存在する樹状細胞に貪食されるものと考え、M 細胞を介した経路からのアクセスの可能性に関して共焦点顕微鏡にて観察し、実証することに成功した。また、M 細胞に特異的な分子がその取り込みに関与する可能性があるとの仮説を立て、関与分子として Uromodulin の重要性を実証した。また、乳酸菌側の関与因子としては、表層分子のプロテオーム解析などにより、特徴的な分子として、表層タンパク質 SlpA が重要な役割を果たしている可能性を示すことが出来た。

具体的には、まず第 2 章で L-92 株が小腸パイエル板の M 細胞から取り込まれ、その下の樹状細胞に受け渡されることを確認した。さらに、L-92 株の M 細胞からの取り込みには、M 細胞に発現する Uromodulin タンパク質が関与することを明らかにした。また、Uromodulin タンパク質への結合および M 細胞からの取り込みにおいて、L-92 株の表層タンパク質 SlpA が重要な役割を担うことも明らかとした。動物実験による免疫応答を解析した結果、Uromodulin と SlpA のそれぞれが免疫応答に必要であることも示され、Uromodulin と SlpA を介した M 細胞からの取り込みが、実際に免疫調節に関与することも明らかとした。同種の乳酸菌で比較実験を行った結果、同じ *L. acidophilus* においても株によって SlpA の量が異なることを見出し、その理由は菌体

構造により SlpA の保持しやすさが変わるためと示唆された。

続いて第 3 章では、L-92 株に対する免疫応答について、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を用いて L-92 株に対する応答をマイクロアレイ解析によって応答初期と後期に分けて解析し、Th1/Th2 バランスの調節や Treg の誘導、NK 活性の上昇を引き起こすまでの一連の応答を推察した。

第 4 章では、Caco-2 細胞を用いて、L-92 株に接触した際の応答をマイクロアレイ解析によって調べた結果、特に細胞接着に関与する分子の発現が上昇していた。さらに、小腸上皮細胞への接着に SlpA が関与することも見出し、L-92 株の表層タンパク質 SlpA は M 細胞の取り込みに関与するだけではなく、腸管全体における親和性に関与する可能性を見出した。

本研究で得られた知見のまとめを図 5.1 に示す。

5. 2. 課題と今後の展望

本研究で、L-92 株の表層タンパク質 SlpA が M 細胞上に発現する Uromodulin に結合することが、腸管免疫系への作用に重要であることを示した。SlpA を持つ乳酸菌は Uromodulin 結合を介して M 細胞から取り込まれ、樹状細胞へ貪食される機会が増えるという点で、SlpA を持たない乳酸菌と比較すると効果的に腸管免疫系に作用することができると考える。乳酸菌の菌種、菌株によって樹状細胞やマクロファージの認識やサイトカインの産生プロファイルなどが異なるという報告もあり⁶⁸、樹状細胞の応答性という面でもどのような免疫調節能を有する乳酸菌かという検証やスクリーニングは必要と考えられる。しかしながら、まずは乳酸菌が樹状細胞に到達しないとサイトカインの産生なども起こらないと考えられるため、M 細胞からの取り込まれやすい乳酸菌を選抜するという方法が有効だと考える。M 細胞から取り込まれやすい乳酸菌を選抜するために、乳酸菌毎に動物実験を行うのも一つの方法ではあるが、今回、Uromodulin

の結合性が乳酸菌の M 細胞からの取り込みに関連するというところを見出したので、本研究で行ったような *in vitro* の方法を用いて Uromodulin 結合性を比較することで、効率よく M 細胞から取り込まれやすい乳酸菌を選抜出来ると考える。この *in vitro* の Uromodulin 結合性は、96 穴プレートで比較解析が可能であることから、ハイスループレットに M 細胞から取り込まれやすい乳酸菌を選抜する方法としても有用であると考えられる。

今回、LiCl処理とプロテオーム比較解析から、重要分子として SlpA に着目したが、今後 SlpA 欠損株を作製することによって、SlpA の重要性を直接的に証明することが可能となると考える。しかしながら、*L. acidophilus* NCFM 株の報告^{69, 70}によると、SlpA の欠損株では別の表層タンパク質である SlpB が発現するため、純粋に SlpA 欠損の評価を行うのは難しい可能性もあるため、部分欠損や挿入といった手法を組み合わせる必要があるのかもしれない。

今後は、表層タンパク質を有する乳酸菌を指標とすることで、免疫調節作用を有する乳酸菌を見つけ出せる可能性もあると考える。乳酸菌の中には表層タンパク質を有するものが複数種類存在し、第 2 章の考察でも示したように、過去の動物実験と照らし合わせてみると、アレルギーモデルマウスにおける IgE 抑制に関与しているのは、表層タンパク質を有するとされる乳酸菌であり、表層タンパク質を有する乳酸菌の有用性が示唆された。しかしながら、表層タンパク質を有する乳酸菌と *in vitro*, *in vivo* の免疫応答の関連性における検討は十分ではなく、今後の課題と考える。また、今回の検討では L-92 株の SlpA のどの部分が Uromodulin 結合に関与するのかという点についても課題として残している。乳酸菌の表層タンパク質はアミノ酸配列が種によって異なるとの報告があるが²⁴、表層タンパク質を有する乳酸菌は全て M 細胞から取り込まれやすいのか、あるいは特定の配列を持つ表層タンパク質を持つ乳酸菌が M 細胞から取り込まれやすいのかなど、今後検証していきたい。SlpA は 444 アミノ酸からなるタンパク質

であるが、全長のアミノ酸配列でホモロジー検索すると、*L. acidophilus* とその近縁種が見出される。*L. acidophilus* とその近縁種については M 細胞から取り込まれやすいことが推察されるが、今後 Uromodulin に結合性を示す特定の断片配列が解明されれば、より効率的に M 細胞から取り込まれる乳酸菌を、ホモロジー検索により推察することができるかと期待できる。SlpA タンパク質は C 末端側が菌体結合に関与するとされているため、N 末端側のシグナルペプチドを除く中間部分の推定機能領域に Uromodulin 結合に関与する部分があるのではないかと考えているが、それを明らかにするためには抗体のエピトープ解析のような手法や、形質転換により SlpA 改変体を多数作出して結合性を評価する手法などを試みる必要があると考えており、今後取り組みたい。

SlpA を抽出して蛍光ビーズに結合させると、パイエル板内部へのビーズの取り込み量が上昇するという結果が得られたが、この知見を活かして、機能性食品や医薬品に SlpA を結合させることで腸管取り込みを促進できると考える。今回は蛍光ビーズを用いた実験だったので生体の免疫応答は評価しなかったが、機能性食品や医薬品などに SlpA を結合させることで効率的に生体の免疫調節が可能かどうか評価して、将来的にはドラッグデリバリーシステムなどに応用展開していきたいと考える。これまでに M 細胞の分子を標的とする病原菌のタンパク質を使用した経口ワクチンなどが開発検討されているが、乳酸菌由来の SlpA が使用できれば、より安全性の高い素材として有用である。また、SlpA は L-92 株の中でも多量に発現しているタンパク質であるため、大腸菌による異種発現系などを構築しなくても L-92 株の菌体から直接 SlpA を効率よく取得できる利点もあり、SlpA の素材としての活用も将来的には検討したいと考える。

SlpA は、Caco-2 細胞への接着性にも関与することが示唆された。表層タンパク質は、その機能として菌体保護や菌形維持、外部からの物質の吸着や取り込みに関与する一方で、生体の親和性を示すという報告もあり、その機能は様々な説が報告されている。乳酸菌にとって多くのエネルギーを使って表層タンパク質を多量に発現し、菌体表面に局

在させる目的は依然謎が多いが、SlpA は M 細胞の Uromodulin のみではなく腸管上皮細胞全体にも親和性を示すことが示唆され、結果的に SlpA を保有することで L-92 株が宿主の腸管全体に作用している可能性も考えられた。L-92 株が SlpA を有する本来の目的や、SlpA を獲得した進化的な意義を明らかにできれば、L-92 株についてより知見が深まるかもしれない。

最後に、L-92 株を用いたヒト試験のデータを見ると、L-92 株による免疫調節されやすさについて個人差があることがわかる。その個人差には、遺伝的要因や環境的要因、食生活やストレスなど様々な要因が絡むと考えられるため、L-92 株の摂取による応答性にバラつきがでるのは当然であるとも考えられる。しかしながら、L-92 株に対する免疫応答の個人差について、今回の知見を元に今後考察を深めていきたい。Uromodulin をコードする遺伝子の変異が腎臓疾患に関与するとの報告もあり⁷¹、ここからは推測に過ぎないが、Uromodulin 遺伝子変異は M 細胞に発現する Uromodulin タンパク質へも反映されるため、Uromodulin の配列やあるいは発現量などにも個人で違いがあり、それが L-92 株に対する免疫応答性の違いに表れている可能性もあるのではないかと考えており、関連性を検証してみたい。関連性を見出すことができれば、個人の Uromodulin 配列や発現量、発現パターンなどに応じて L-92 株や他の乳酸菌などをオーダーメイドで調整することも、将来的に可能にできるかもしれない。

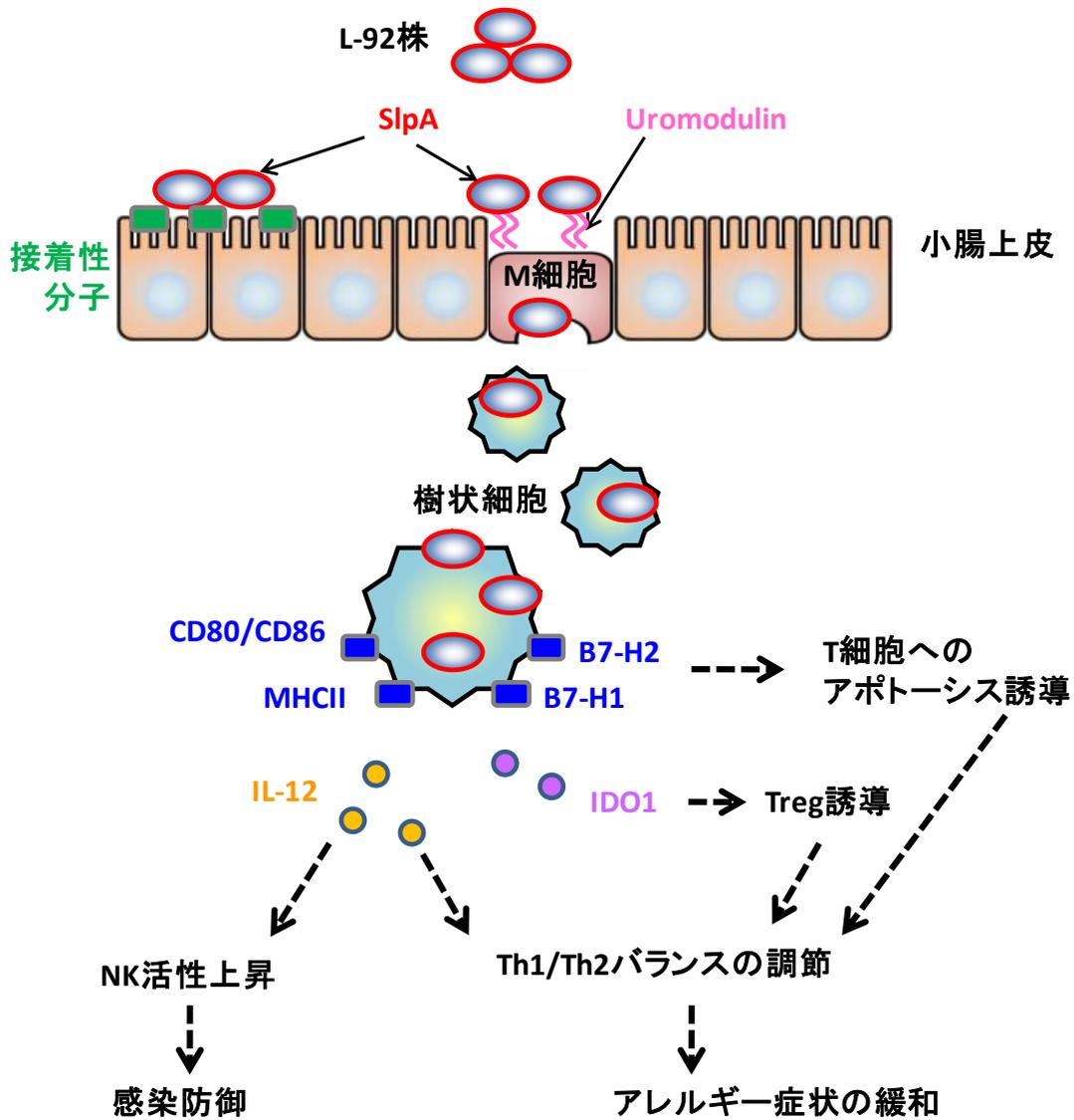


図5.1 本研究で得られた知見のまとめ

L-92株がUromodulin、SlpAを介してM細胞から取り込まれ、樹状細胞に受け渡される。樹状細胞ではL-92株の刺激により、Th1/Th2バランスの調節やTreg誘導、T細胞へのアポトーシス誘導に関連する分子が発現してアレルギー症状の緩和につながり、NK活性上昇に関連する分子が発現して感染防御につながる。小腸上皮への接着性にもSlpAが関与し、L-92株の刺激により小腸上皮において接着性分子の発現が上昇する。

略語

OVA	Ovalbumin
Ig	Immunoglobulin
Th1	1 型ヘルパーT 細胞
Th2	2 型ヘルパーT 細胞
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
Treg	制御性 T 細胞
TGF- β	Transforming growth factor β
CD	Cluster of differentiation
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
B7-H1	Human B7 Homolog 1
B7-H2	Human B7 Homolog 2
NK	Natural Killer
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
GP2	Glycoprotein 2
Hsp	Heatshock protein
PrP ^c	Cellular prion protein
GPI	glycosylphosphatidylinositol
SPF	Specific Pathogen Free
Umod ^{-/-}	Uromodulin 欠損マウス
Umod ^{+/+}	Uromodulin 保有マウス
Slp	Surface layer protein

mUmod-Fc	Fc フラグメント融合マウス Uromodulin タンパク質
mGP2-Fc	Fc フラグメント融合マウス GP2 タンパク質
mPrP ^c -Fc	Fc フラグメント融合マウス PrP ^c タンパク質
hIgG	ヒト IgG タンパク質
LiCl	塩化リチウム
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis
CBB	Coomassie Brilliant Blue
FBS	Fetal bovine serum
LiCl-L92	LiCl 処理した L-92 株
LiCl-CP23	LiCl 処理した CP23 株
Cy3-SlpA	Cy3 標識した SlpA
DapA	Dihydrodipicolinate synthase
AVA	アラニン・バリン・アラニン配列
DMSO	Dimethyl sulfoxide
IPA	Ingenuity Pathways Analysis
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction

参考文献

1. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス：京都大学学術出版会（2010）
2. Taverniti V. & Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* **6**, 261-274 (2011).
3. Ishida, Y., Bandou, I., Kanzato, H. & Yamamoto, N. Decrease in Ovalbumin Specific IgE of Mice Serum after Oral Uptake of Lactic Acid Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 951-957 (2003).
4. Ishida, Y. *et al.* Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: a randomized placebo-controlled trial. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1652-1660 (2005).
5. Ishida, Y. *et al.* Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Dairy Sci.* **88**, 527-533 (2005).
6. Torii, S. *et al.* Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum markers of atopic dermatitis in children. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **154**, 236-245 (2011).
7. Inoue, Y. *et al.* Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum cytokines of atopic dermatitis in Japanese adults: a double-blind, randomized, clinical trial. *Int Arch Allergy Immunol.* **165**, 247-254 (2014).
8. Suda, Y. *et al.* Highly sensitive detection of influenza virus in saliva by real-time PCR method using sugar chain-immobilized gold nanoparticles;

- application to clinical studies. *Biotechnology Reports*. **7**, 64-71 (2015).
9. わかりやすいアレルギー・免疫学講義：講談社 (2007).
 10. Strachan DP. Hey fever, hygiene, and household size. *BMJ*. **299**, 1259-1260 (1989).
 11. Sanders, M. E. Probiotics. *Food Technology*. **53**, 67-77. (1999).
 12. Lebeer, S., Vanderleyden, J. & de Keersmaecker, S.C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* **8**, 171-184 (2010).
 13. Kanzato, H. *et al.* *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces apoptosis of antigen-stimulated T cells by modulating dendritic cell function. *Immunobiology* **213**, 399-408 (2008).
 14. Shah M.M. *et al.* *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells and suppresses allergic contact dermatitis. *Biol Pharm Bull*. **35**, 612-616 (2012).
 15. Goto, H. *et al.* Anti-influenza virus effects of both live and non-live *Lactobacillus acidophilus* L-92 accompanied by the activation of innate immunity. *Br J Nutr*. **213**, 1810-1818 (2013).
 16. Rios, D. *et al.* Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunol*. **25**, 121 (2015).
 17. Corr, S. C., Gahan, C. C. & Hill, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **52**, 2-12 (2008).
 18. Ohno, H. Intestinal M cells (Crosstalk between the Intestinal Immune

- System and Gut Commensal Microbiota). *J. Biochem*, **159**, 151–160 (2016)
19. Wang, M., Gao, Z., Zhang, Z., Pan, L. & Zhang, Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. **10**, 3544-3551 (2014).
 20. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226-230 (2009).
 21. Nakato, G. *et al.* Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol*. **189**, 1540-1544 (2012).
 22. Clark, M. A., Hirst, B. H. & Jepson, M. A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*. **66**, 1237-1243 (1998).
 23. Mo, L. *et al.* Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, 795-802 (2004)
 24. Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. & Shishido, K. Presence of active and inactive molecules of a cell wall-associated proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 698-701 (1995).
 25. Rojas, M., Ascencio, F. & Conway, P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2330-2336 (2002).
 26. Boot, H. J. & Pouwels, P. H. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol Microbiol*. **21**, 1117-1123 (1996).

27. Avall-Jääskeläinen, S. & Palva, A. Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 511-529 (2005).
28. Sato, S. *et al.* Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol* **6**, 838-846 (2013).
29. Rampoldi, L., Scolari, F., Amoroso, A., Ghiggeri, G. & Devuyst, O. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* **80**, 338-347 (2011).
30. Kanwal, R., Harjai, H. & Sharma, S. Effect of Mouse and Human Tamm-Horsfall Protein on Adhesion of Uropathogens to Human Uroepithelial Cells. *Am. J. Biomed. Sci.* **1**, 215-225 (2009).
31. Bokhove, M. *et al.* A structured interdomain linker directs self-polymerization of human uromodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**, 1552-1557 (2016).
32. Ohno, H. & Hase, K. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes.* **6**, 407-410 (2010).
33. Kanaya, T. *et al.* The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol.* **13**, 729-736 (2012).
34. Hynönen, U. & Palva, A. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**, 5225-5243 (2013).
35. Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T. & Klaenhammer, T. R. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 8344-8351 (2005).

36. Carasi, P. *et al.* Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *J Dairy Res.* **81**, 16-23 (2014).
37. Toba, T. *et al.* A Collagen-Binding S-Layer Protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 2467-2471 (1995).
38. Lorca, G., Torino, M., Font de Valdez, G. & Ljungh, A. A. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett.* **206**, 31-37 (2002).
39. Smit, E., Pouwels, P. H., Oling, F., Demel, R. & Martinez, B. One repeat of the cell wall binding domain is sufficient for anchoring the *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein. *J Bacteriol.* **184**, 4617-4619 (2002).
40. Avall-Jaaskelainen, S. *et al.* Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiol* **8**, 165 (2008).
41. Dohm, N. *et al.* Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B706. *Arch. Microbiol.* **193**, 251-261, (2011).
42. Mesnage, S. *et al.* Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J.* **19**, 4473-4484, (2000).
43. Lunderberg, J. M. *et al.* *Bacillus anthracis* acetyltransferases PatA1 and PatA2 modify the secondary cell wall polysaccharide and affect the assembly of S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **195**, 977-989 (2012).
44. Jakava-Viljanen, M., Avall-Jaaskelainen, S. A., Messner, P., Sleytr, U. B. & Palva, A. Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from

- Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **184**, 6786–6795 (2002).
45. Khaleghi, M. *et al.* Assessment of bile salt effects on S-layer production, slp gene expression and, some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 749–756 (2010).
 46. van Hemert, S. *et al.* Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiol.* **16**, 293 (2010).
 47. Fink, L. N. & Frøkiaer, H. Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. *Scand J Immunol.* **68**, 270-279 (2008).
 48. Aparna, Sudhakaran, V. *et al.* Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli. *Genes Nutr.* **8**, 637-648 (2013).
 49. Kim, H. G. *et al.* Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* elicits both the production of interleukin-23p19 and suppression of pathogen-mediated interleukin-10 in THP-1 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **49**, 205–214 (2007).
 50. Jin, C. *et al.* Multiple signaling pathways are involved in the interleukine-4 regulated expression of DC-SIGN in THP-1 cell line. *J Biomed Biotechnol.* **2012**, 357760 (2012).
 51. Liu, J. *et al.* Triptolide suppresses CD80 and CD86 expressions and IL-12

- production in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin.* **26**, 223-227 (2005).
52. Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K. & Nanno, M. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci.* **89**, 3306-3317 (2006).
53. Mellor, A. L. & Munn, D. H. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol.* **8**, 74-80 (2008).
54. Matteoli, G. *et al.* Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut.* **5**, 595-604. (2010).
55. Fallarino, F. *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **9**, 1069-1077 (2002).
56. van Baarlen, P. *et al.* Differential NF- κ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 2371-2376 (2009).
57. Frece, J. *et al.* Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* **98**, 285-292 (2005).
58. Dimitrov, Z., Gotova, I. & Chorbadijska, E. *In vitro* characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnol Biotechnol Equip.* **28**, 1079-1083 (2014).
59. Adibi, S. A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **285**, 779-788 (2003).
60. Borrelli, F. & Izzo, A. A. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal

- tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **23**, 33–49 (2009).
61. van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. A., Groothuis, G. M. *In vitro* methods to study intestinal drug metabolism. *Curr Drug Metab.* **8**, 658–675 (2007)
 62. Anderson, R. C. *et al.* *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* **10**, 316 (2010).
 63. Panigrahi, P., Braileanu, G. T., Chen, H. & Stine, O. C. Probiotic bacteria change *Escherichia coli*-induced gene expression in cultured colonocytes: implications in intestinal pathophysiology. *World J Gastroenterol*, **13**, 6370-6378 (2007).
 64. Wang, M. *et al.* Expression profile analysis of intestinal Caco-2 cells treated with *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **49**, 1247-1252 (2009). (In Chinese.)
 65. Baccigalupi, L. *et al.* Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res Microbiol.* **156**, 830-836 (2005).
 66. O'Callaghan, J., Buttó, L. F., MacSharry, J., Nally, K. & O'Toole, P. W. Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. *Appl Environ Microbiol.* **78**, 5196-5203 (2012).
 67. Cesena, C. *et al.* *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J Dairy Sci.* **84**, 1001-1010 (2001).
 68. Dong, H., Rowland, I. & Yaqoob, P. Comparative effects of six probiotic

- strains on immune function *in vitro*. *Br J Nutr*. **108**, 459-470 (2012).
69. Konstantinov, S. R. et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 19474–19479 (2008).
70. Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M., Andreadaki, F. J., Leer, R. J. & Pouwels, P. H. The *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequences, one of which directs transcription of stable mRNA. *J. Bacteriol*. **176**, 5388–5394 (1996).
71. Kuma, A. et al. A novel UMOD gene mutation associated with uromodulin-associated kidney disease in a young woman with moderate kidney dysfunction. *Intern Med*. **54**, 631-635 (2015).

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* L-92 株の腸管免疫系への作用と関連分子の解析

氏名 柳原 沙恵

1. 背景・目的

Lactobacillus acidophilus L-92 株 (L-92 株)は、アレルギーモデルマウス実験において IgE 産生抑制作用の高い乳酸菌として選抜され、ヒトにおいても花粉症、通年性アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎に対する症状の改善効果が確認されている。また最近では、免疫賦活効果による感染防御効果も確認されている。L-92 株の作用メカニズムは、Th1/Th2 バランス改善や制御性 T 細胞 (Treg) 誘導によりアレルギー症状緩和効果を、炎症性サイトカイン産生誘導や NK 活性上昇により感染防御効果を示すものと推測されているが、生体へ作用する経路や菌体上の特徴などに関しては不明な点が多い。

そこで、本研究では、L-92 株の免疫調節作用について特に着目し、乳酸菌の免疫細胞への作用という視点で、L-92 株の腸管免疫系への作用経路を明らかにするとともに、L-92 株の重要分子を探索した。また、それらの分子が乳酸菌の免疫調節においてどのような役割を果たすのかについて解析した。さらに、L-92 株が腸管全般に対してどのような影響するのかについても、培養細胞を用いた遺伝子発現解析からの考察を試みた。

2. L-92 株の小腸パイエル板からの取り込みと関連分子の解析

経口摂取されて腸管に到達した L-92 株が免疫調節作用を発揮するためには、腸管免疫系を主に担っている小腸パイエル板へ L-92 株の菌体を取り込まれて体内の樹状細胞へ接触することが重要なのではないかと考えて、小腸パイエル板の濾胞上皮に存在する“M 細胞”と呼ばれる抗原取り込みに特化した細胞に着目をして研究を行った。その結果、L-92 株の菌体は M 細胞からパイエル板内部に取り込まれ、さらに M 細胞の下部に存在する樹状細胞へと貪食される様子を観察することに成功した。

続いて、M 細胞特異的に発現するタンパク質が様々な菌の取り込みに関与するという報告が近年なされていることから、その中でも GPI アンカー型タンパク質に着目し、L-92 株との結合性を評価した。その結果、L-92 株は Uromodulin タンパク質に結合性を示すことが明らかとなり、さらに *in vivo* においても Uromodulin が L-92 株の M 細胞からの取り込みに関与することが示された。乳酸菌側の因子では、L-92 株を塩化リチウム処理すると Uromodulin の結合性が低下することや、Uromodulin 結合性の低い CP23 株とのプロテオーム比較解析により、L-92 株の表層タンパク質 Surface layer protein A (SlpA) が M 細胞からの取り込みに関与することが示唆された。また、*in vivo* の生体応答として脾臓の NK 活性を評価した結果、Uromodulin と SlpA の両方が重要であることが示唆され、L-92 株が免疫調節作用を発揮するためには Uromodulin と SlpA を介して菌体が M 細胞から取り込まれ、樹状細胞へ貪食されることが重要であることが推察された。

さらに、菌体表層に SlpA が少ない CP23 株と L-92 株を詳細に比較し、菌体表面の SlpA 量の違いが何に起因するのかを調べた。その結果、L-92 株と CP23 株で遺伝子配列や mRNA 転写量に違いは見られなかったが、外から添加した SlpA の菌体への結合性に違いが見られ、L-92 株は CP23 株と比較して SlpA を保持しやすい構造を有していることが示唆された。

3. L-92 株の免疫細胞への作用の解明

M 細胞から取り込まれた L-92 株の菌体が樹状細胞に接触した際の免疫応答を解析し、免疫調節メカニズムを推察するために、*in vitro* でマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を用いて、L-92 株と共培養した場合にどのような遺伝子発現が起こるのかをマイクロアレイにより解析した。その結果、L-92 株との共培養初期には、サイトカインなどが主に発現上昇し、共培養 24 時間後ではそれらのサイトカインに加えて、転写因子、酵素、細胞膜受容体などが主に発現上昇した。さらに、T 細胞に情報伝達する際に重要な役割を担うとされる抗原提示分子や補助刺激分子の発現上昇もみられ、Th1/Th2 バランスの調節や Treg 誘導、感染防御に関与する分子として IL-12、IDO1 などを見出した。L-92 株が小腸パイエル板で M 細胞から取り込まれて樹状細胞に接触することで、T 細胞に効率的に刺激を伝えて Th1/Th2 バランスを調節してアレルギー症状の抑制や感染防御に関与することが、そして Treg を誘導することで T 細胞応答を抑制して炎症および、アレルギー症状を抑制することが示唆された。

4. L-92 株の腸管上皮への作用の解明

L-92 株を経口摂取した場合に、免疫系のみならず消化管に対しても様々な刺激を与えるものと考え、小腸上皮に与える影響を推測する目的で、Caco-2 細胞を用いた L-92 株の作用に関してマイクロアレイ解析により遺伝子の変動を評価した。小腸上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞に、L-92 を添加した場合の Caco-2 細胞の遺伝子発現の変化を比較した結果、L-92 株添加に対する初期応答としては、RNA スプライシングや細胞増殖に関連する遺伝子群の発現が抑制され、後期では細胞接着などに関連する細胞表面分子の発現が上昇していた。また、Caco-2 細胞への結合性を様々な *L. acidophilus* で比較した結果、M 細胞からの取り込みにおいて重要分子として見出された SlpA の量と

Caco-2 細胞への接着性には関連性が見られ、腸管上皮細胞への接着に関しても SlpA が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

5. まとめ

L-92 株は免疫調節作用を有する乳酸菌で、そのアレルギー緩和作用や感染防御作用がヒト試験や動物試験によって明らかにされていたものの、L-92 株の宿主の腸管免疫系への初期の作用経路や、L-92 株が腸管免疫系において影響を与える上での重要性などはこれまで明らかにされていなかった。本研究では、L-92 株が腸管免疫系に作用するための経路として、L-92 株が M 細胞を介して樹状細胞に貪食される経路を初めて示した。さらには、M 細胞に特異的に発現する分子 Uromodulin と、L-92 株の表層タンパク質 SlpA が M 細胞を介した腸管免疫系へのアクセスに重要な役割を果たすことを示し、乳酸菌の M 細胞からの取り込みに関する分子メカニズムを初めて明らかにした。M 細胞から取り込まれた L-92 株の菌体は樹状細胞に貪食されて、L-92 株の刺激により樹状細胞が Th1/Th2 バランスの調節や Treg の誘導に関わるような免疫応答を引き起こすことも分子レベルで推察した。L-92 株の刺激により、腸管上皮細胞に接着関連分子の発現が誘導され、M 細胞の取り込みに関与する表層タンパク質 SlpA が腸管上皮細胞への接着性に関与することを示唆し、L-92 株の腸管全体における作用についても考察するとともに、L-92 株の表層タンパク質 SlpA が腸管内での生理機能発現の違いを説明する上での重要な特徴であることを明らかにした。

本研究で得られた知見は、Uromodulin 結合性を指標とした免疫調節作用の高い乳酸菌の選抜や、SlpA を用いて腸管免疫系を標的としたドラッグデリバリーシステムへの応用も期待でき、食品・医薬品分野へ展開できる可能性からも大変意義があると考えられる。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、幅広い視点よりご指導を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科の八村敏志准教授に深く感謝します。

本研究の遂行にあたり、多大なご指導とご助力を賜りました、アサヒグループホールディングス株式会社の山本直之博士には、深く感謝いたしております。

客員研究員として受け入れていただき、特に M 細胞からの腸管取り込みとその分子機構の解明に関して研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました理化学研究所統合生命医科学研究センターの大野博司グループディレクターに深く感謝しております。M 細胞からの腸管取り込みとその分子機構の解明、マイクロアレイ解析において多くのご指導を賜りました慶応義塾大学先端生命科学研究科の福田真嗣特任准教授に深く感謝いたします。また、M 細胞からの腸管取り込みとその分子機構の解明にあたり、共同研究者として多くのご指導とアドバイスを賜りました、金谷高史博士、中藤学博士、花里美紗穂博士、マウスを提供いただいた Xue-Ru Wu 教授には深く感謝申し上げます。

特に L-92 株の腸管上皮接着性に関して多大なご指導とご支援をいただきました、アサヒカルピスウェルネス株式会社の芦田延久氏には、深く感謝いたします。また、L-92 株の応答解析において多くのご協力を頂きました、アサヒグループホールディングス株式会社の篠田直氏、弘田辰彦氏、後藤宏明氏、加藤慎二氏には深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご支援および貴重なご助言、激励を賜りました、アサヒグループホールディングス株式会社コアテクノロジー研究所の中村康則所長、加藤さやか氏、狩野智恵博士をはじめ、同研究所の皆様にご心より感謝申し上げます。