

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。