

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AYA の免疫賦活効果と作用機序解析

氏名 菊池 洋介

ヒトの体表面は、腸管、肺などの粘膜や皮膚に保護されている。腸管粘膜は、ウイルス、病原細菌やそれらが分泌する毒素等の外界因子を排除する免疫組織として、重要な役割を果たしている。その免疫機能を司っているのが、腸管関連リンパ組織 (GALT: gut associated lymphoid tissue) の中心器官であるパイエル板である。パイエル板では、腸管内腔から腸管上皮のM細胞を介して取り込まれた抗原が、樹状細胞等に提示される。その結果、immunoglobulin A (IgA) を産生するIgA陽性B細胞が産生され、粘膜組織への移行、形質細胞への分化を経て、IgAが産生される。それが腸管へ分泌され、ウイルス等の抗原と結合し、中和することで免疫機能が発揮される。また、気道の免疫組織である気管支随伴リンパ組織 (BALT: bronchus-associated lymphoid tissue) でも、IgAが分泌されている。GALTで活性化されたIgA陽性B細胞は、体内を循環後にBALTへも伝達され、気道粘膜におけるIgAの分泌にも貢献していることが報告されている。

近年、粘膜免疫を亢進する食品素材として、IgA分泌を亢進する乳酸菌が注目されている。IgA分泌の亢進は、ウイルス等感染症の原因となる抗原の中和を促進し、症状の緩和が期待される。例えば、複数の乳酸菌株の死菌がインフルエンザに対して緩和効果を示すことが報告されている。しかし、詳細な作用機序は明らかにされていない。よって、インフルエンザの症状を緩和させる効果を有し、その作用機序が明らかな乳酸菌株を見出せると、食品開発の面から非常に価値が高い。本研究は、食を通じた健康で豊かな生活づくりへの貢献を最終目的とし、乳酸菌株を利用した機能性食品の開発を目指して開始した。IgA分泌亢進作用を有する乳酸菌株を見出し、その作用機序を明らかにすること、およびインフルエンザ罹病症状の緩和効果を示すことを目的とした。

1. IgA分泌を亢進する乳酸菌株の選抜と必要な用量

パイエル板からのIgA分泌亢進能を持つ乳酸菌株を探索するため、*ex vivo*試験によってスクリーニングを実施した。BALB/cマウスパイエル板細胞の初代培養系に、発酵食品（パンの発酵種、漬物他）由来の140種類の乳酸菌株の死菌を添加し、上清のIgA分泌濃度を測定した。その結果、IgA分泌亢進作用を示す乳酸菌株を複数見出した。次に、IgA分泌亢進能が高い上位3菌株を選抜し、マウスに各乳酸菌株粉末を5%含む混餌食を4週間摂餌させ、パイエル板を摘出してその初代培養を行い、IgA分泌亢進効果を評価した。この試験で、IgA分泌量を有意に高めた乳酸菌株を1種特定し、*Lactobacillus plantarum* AYAと命名した。

IgA 分泌量亢進効果の必要用量を決定する為、*L. plantarum* AYA 粉末を重量比で 0.3%、および 0.03% 加えた餌を調製してマウスに 4 週間摂取させると、いずれの群でも腸管での IgA 分泌量が有意に増加した。0.03% 含有餌について 1 日当たりの平均摂取量から換算した結果、*L. plantarum* AYA 粉末を 1 日あたり 0.72 mg で 4 週間経口摂取すると、マウス腸管の IgA 分泌量が有意に増加することを明らかにした。

2. *L. plantarum* AYA の IgA 分泌亢進効果の作用機序の解析

L. plantarum AYA の摂取にて IgA の分泌が亢進する作用機序の解明を目指し、各種パイエル板初代培養細胞の培養に、*L. plantarum* AYA 粉末を加え、相互作用を解析した。IgA 陽性 B 細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を加えて培養したが、IgA 分泌量に差は見られなかった。しかし、これらに樹状細胞を加えて培養すると、IgA 分泌量が有意に増加した。よって、*L. plantarum* AYA と樹状細胞の作用が重要であることが示唆された。そこで、樹状細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を添加して培養したところ、interleukin-6 の遺伝子発現 (*IL6*)、並びにタンパク質分泌 (*IL-6*) が有意に亢進された。樹状細胞と IgA 陽性 B 細胞の共培養系に、*L. plantarum* AYA 粉末とともに *IL-6* 抗体を加えると、IgA 分泌量の亢進効果がキャンセルされた。よって IgA 分泌亢進には、パイエル板における *IL-6* の分泌亢進が必須であることが示唆された。

続いて、*L. plantarum* AYA を認識する樹状細胞の受容体同定を目指した。パイエル板細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を添加した培養系に、toll-like receptor 2 (*TLR-2*) の抗体を加えると、IgA 分泌亢進効果が有意に抑制された。よって、*L. plantarum* AYA は樹状細胞に認識され、そこからの *IL-6* 分泌が亢進されることで、パイエル板からの IgA 分泌を亢進していると考えられた。また、*L. plantarum* AYA が樹状細胞の *TLR-2* に認識されている可能性を示した。

3. IgA 分泌亢進以外の免疫調節機能の検討

L. plantarum AYA が有する IgA 分泌亢進以外の免疫機能の推定を目的に、トランスクリプトーム解析を行った。*L. plantarum* AYA 粉末をマウスに 4 週間摂取させ、パイエル板細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ試験を実施した。distribution-free weighted method (DFW 法) で正規化した遺伝子発現情報を用いて Rank Product 法による群間比較を行った結果、*L. plantarum* AYA 粉末の摂取で、発現が上昇する遺伝子 124 個、抑制される遺伝子 144 個を抽出した (FDR < 0.05)。

Gene Ontology 解析にて、発現が有意に亢進した遺伝子群に濃縮された機能の推定を行った (FDR < 0.1)。その結果、immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide) などの抗体産生の亢進、および B 細胞の活性化が推測され、獲得免疫の活性化が示唆された。また、補体を誘導する mannose-binding lectin (protein C) 2、および炎症反応を

誘導する serum amyloid A1 等の遺伝子発現も亢進されており、自然免疫の活性化も示唆された。一方、発現が抑制された遺伝子群では濃縮された機能はみられなかった。

次に、Ingenuity Pathway Analysis を実施し、発現が亢進した遺伝子群のパスウェイ上流の活性を予測した結果、IL-6、tumor necrosis factor- α (TNF) 等の発現亢進が示唆された。IL-6 の発現亢進は、*L. plantarum* AYA 粉末の添加で、パイエル板樹状細胞からの IL-6 の分泌が有意に亢進した *ex vivo* 試験のデータを支持する結果であった。また、TNF はパイエル板の B 細胞から分泌され、獲得免疫に重要な樹状細胞の発達に寄与する因子であることが知られている。

以上の結果から、*L. plantarum* AYA を摂取すると炎症、補体の誘導を介した自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫の活性を高めることが示唆された。

4. *L. plantarum* AYA のインフルエンザウイルス感染試験

L. plantarum AYA 粉末の摂取が、ウイルス等の外敵を中和しうるか評価する為、インフルエンザウイルス (X31 株) の感染試験を実施した。マウスを通常餌を摂取する群と 5% *L. plantarum* AYA 混合餌を摂取する群の 2 つに分け、4 週間飼育し、各群 5 匹ずつ解剖すると、空腸、回腸、および、肺で IgA の分泌が有意に亢進した。残りのマウスに、致死量のインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、10 匹/群について感染後生存確認試験を実施した。その際、感染時の体重から 20%減を安楽死の指標 (人道的エンドポイント) とした。感染 10 日後まで生存率を測定した結果、通常食摂取群はすべてのマウスが人道的エンドポイントに達した一方、*L. plantarum* AYA 摂取群は 5 匹が人道的エンドポイントに達しておらず、群間で有意な差があった。以上のように、*L. plantarum* AYA 粉末を摂取すると、腸管や肺などの粘膜で IgA の産生が亢進し、インフルエンザに罹病したときの症状を緩和する効果が示唆された。

まとめ

パンの発酵種由来の乳酸菌株である *L. plantarum* AYA 粉末を経口摂取すると、腸管および肺粘膜での IgA 分泌が亢進することが示された。その作用機序として *L. plantarum* AYA が樹状細胞に認識されて IL-6 の分泌を亢進し、IgA 陽性細胞から形質細胞への分化を亢進することが重要であることを明らかにした。そして、*L. plantarum* AYA の成分が樹状細胞の TLR-2 に認識されている可能性を示した。また、それ以外にも獲得免疫、自然免疫を高めていることを示した。そして、*L. plantarum* AYA 粉末摂取はインフルエンザ罹病時の症状緩和作用を有することを示した。

以上のように、乳酸菌株の死菌の摂取が IgA 分泌を亢進し、インフルエンザの症状を緩和すること、およびその詳細な作用機序を、他の研究に先駆けて見出し、新しい機能性食品の素材となりうる候補を見出した。この素材を活かすことで、「食を通じた健康で豊かな生活づくり」に貢献できるようさらに研究が発展していくことを期待する。