

論文の内容の要旨

論文題目 海藻・乳酸菌由来成分の抗炎症・生体防御作用に関する研究

氏名 川島忠臣

近年アレルギー疾患を初めとする免疫機能恒常性の破綻に起因する疾病の患者数が増加している。これらの疾病は発症前から薬で予防することは難しい。むしろ、免疫機能を正常に保つ機能を有する食品を日常的に摂取することで、そのような疾患に罹患するリスクを低減することが可能となる。本研究では乳酸菌と海藻由来成分に着目し、それらが免疫機能を改善し、これらの疾患の症状軽減に寄与することを明らかにした。

まず海藻に含まれる非プロビタミン A のカロテノイドであるフコキサンチンが T 細胞の分化に及ぼす影響を評価した。フコキサンチン存在下で Naïve T 細胞の分化を調べたところ、制御性 T 細胞 (Treg 細胞) を誘導する一方で、炎症性サイトカインである Interleukin-17 (IL-17) 産生性の Th17 細胞の分化を抑制した。また、フコキサンチンは摂取後に腸内細菌によりフコキサンチノールへと代謝されるが、フコキサンチノールについても Treg 細胞の分化誘導と Th17 細胞の分化抑制が観察された。ビタミン A 誘導体のレチノイン酸は生体において Treg 細胞を誘導することが知られているが、非プロビタミン A カロテノイドであるフコキサンチンも同様の効果を有することが明らかとなった。このことから、フコキサンチンを摂取することで Th17 細胞が原因となる自己免疫疾患やアトピー性皮膚炎等の炎症性疾患の予防に役立つ可能性が示された。

次に海藻に含まれる多糖であるフコイダンの効果について調べた。本研究では免疫調節作用を有する乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 (以下、KK221) とフコイダンを併用したときの効果について検証した。まず、マウス腹腔浸出マクロファージやマウスパイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓由来の細胞を用いた試験においては、フコイダン単独では IL-12 や IFN- γ などのサイトカイン産生が微弱であるのに対し、KK221 存在下でフコイダンを添加すると、フコイダンの濃度依存的にサイトカイン産生誘導が増強することが確認された。マクロファージを用いた試験において、フコイダンを添加

したときに **KK221** を貪食する細胞の割合が増加したことから、フコイダンの貪食促進作用が関与することが示唆された。また、フコイダンを脱硫酸化するとこの作用が消失する一方で、酸加水分解により低分子化したフコイダンでは、活性の消失は確認されなかった。このことから、フコイダンの分子量ではなく硫酸基がこの作用に必須であることが示された。

実際にマウスに経口投与を行い、抗原特異的応答を調べたところ、乳酸菌とフコイダンを同時に摂取したときに最も **Th1** 免疫が増強し、**Th2** 免疫が抑制された。以上より、フコイダンを乳酸菌と同時に摂取することで、乳酸菌の免疫調節作用が増強されることが示された。

近年、プロバイオティクス乳酸菌の免疫機能改善効果が注目されているが、日本人が古くから摂取している漬物や発酵食品の中から有用なプロバイオティクス乳酸菌を分離することを試みた。アレルギーの抑制には **Th1** 細胞の誘導、もしくは **Th2** 細胞の抑制が関与することが知られているが、本研究では **Th1** 細胞の分化誘導に関わる **IL-12** に着目した。そしてマウス腹腔浸出マクロファージを用いた試験により、最も **IL-12** 産生を誘導する乳酸菌として *Lactobacillus plantarum* YU (**LpYU**) を選抜した。そして、**LpYU** 摂取が抗原特異的応答に与える影響を調べたところ、**Th1** 免疫を増強し、抗原特異的 **IgE** の上昇を抑制することが確認された。

また、**LpYU** は **IL-12** を強く誘導するだけでなく、パイエル板からの **IgA** 産生増強と脾臓における **Natural killer (NK)** 細胞の活性化も促した。**IgA** 産生増強や **NK** 細胞の活性化が確認されたことからウイルス感染に対する抵抗性が増強することが期待されるため、インフルエンザ感染実験を行った。すると、**LpYU** を摂取したマウスにおいては肺洗浄液や糞便中のインフルエンザ特異的 **IgA** の産生が増強し、肺や肺洗浄液のインフルエンザウイルス量が減少することが判明した。以上より、漬物や発酵食品の中にインフルエンザ感染やアレルギーに対し効果のある乳酸菌が存在することが明らかとなった。

最後に乳酸菌の免疫恒常性維持のメカニズムについて検証した。小腸には多くの常在菌や病原菌、経口摂取された細菌が存在する。我々は腸内常在菌の中でも小腸において

主要なフローラを形成する乳酸菌が腸管の免疫恒常性に与える影響を評価した。

まず、マウス骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs) を用いた評価により、乳酸菌の認識に 2 本鎖 RNA を認識する Toll-like receptor 3 (TLR3) が関与しており、さらにその刺激により Interferon- β (IFN- β) が誘導されることを示した。複数の乳酸菌株で IFN- β 産生誘導に対する TLR3 依存性が確認されたが、一方で *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* 等の病原菌では TLR3 依存性は確認されなかった。乳酸菌と病原菌で菌体内の 2 本鎖 RNA 量を比較したところ、乳酸菌により多くの 2 本鎖 RNA が見出された。また、BMDCs を用いた試験においては、TLR3 以外にも DNA を認識する TLR9 が乳酸菌による IFN- β 産生誘導に関与することが示された。

乳酸菌により誘導される IFN- β の効果を評価するため、Dextran sodium sulfate (DSS) 誘導潰瘍性大腸炎に対する KK221 摂取の影響を調べた。すると、KK221 摂取により腸炎の症状が軽減するのに対し、抗 IFN- β 中和抗体を静脈より投与すると KK221 の効果が減弱することが明らかとなった。このことから KK221 摂取により誘導される IFN- β が腸炎の抑制に関わることが示された。さらに、TLR3 遺伝子欠損マウスを用いて DSS 誘導潰瘍性大腸炎に対する KK221 摂取の効果を調べたところ、腸炎は抑制されなかった。TLR9 遺伝子欠損マウスでは大腸の長さの縮小抑制など一部の項目で KK221 摂取の効果がみられたが、細胞内エンドソームに局在する TLR (TLR3、TLR7、TLR9) の機能を欠損した *Unc93b1^{kd}* マウスでは KK221 の抗炎症効果は消失していた。また、RNA を分解した KK221 を投与したときも抗炎症作用は確認されなかった。

BMDCs を用いた細胞試験では KK221 の刺激に対して TLR3 と TLR9 を介した協調的な IFN- β 産生誘導が観察されたが、DSS 潰瘍性大腸炎モデルにおいては宿主の TLR3、及び乳酸菌体の 2 本鎖 RNA が KK221 の抗炎症作用に必須であることが明らかとなった。このように、乳酸菌は病原菌と異なり、TLR3 を介して IFN- β を誘導することで腸管の免疫恒常性を維持していることが示された。

以上のように、免疫機能を改善する海藻由来成分として免疫応答を抑制するフコキサン

チン、乳酸菌の免疫調節作用を増強するフコイタンを見出した。また、日本で古くから食されている発酵食品から分離した乳酸菌が強い抗アレルギー作用、感染防御作用を有することを示した。さらに常在乳酸菌を含めた乳酸菌による IFN- β 産生誘導が抗炎症・免疫恒常性維持に寄与しており、その関与成分が菌体内の 2 本鎖 RNA であることを明らかにした。それぞれの食品成分が特徴的な作用を有していることから、目的に合わせて日常の食生活に組み込むことでアレルギー性疾患や感染症、炎症性疾患を予防することができると考えられる。