

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌によるコラーゲン誘導性関節炎の抑制

氏名 狩野 宏

非常に多数の患者が罹患する慢性関節リウマチの一部には、自己免疫性のものがある。近年有効な症状緩和剤が上市されているにもかかわらず、その発症機構は依然として不明のため根本的な治療法は確立していない。また予防法の確立がより容易であると予想されるにもかかわらず、ヒトでは試されていない。本研究は、自己免疫性慢性関節リウマチの予防法の開発を最終目的として行った。慢性関節リウマチにおける関節部の炎症には様々な種類のサイトカインが関与しており、代表的なものとしてインターフェロン γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子 (TNF- α) およびインターロイキン 6 (IL-6) などの炎症性サイトカインや、単球遊走タンパク質 (MCP-1) などの走化性因子がある。これらサイトカインの産生抑制は、慢性関節リウマチの予防において重要であるが、*Lactobacillus* 属をはじめとする乳酸菌は菌種、菌株の違いにより上記サイトカインの産生を増強も抑制もし得ることが明らかとなっている。本研究では、慢性関節リウマチの予防法として投与の負担の少ない経口摂取法を採用し、安全性が確認されておりヨーグルト製造に用いられる *Lactobacillus* 属細菌の経口投

与により、慢性関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン誘導性関節炎（CIA）の発症が抑制されるか否かを調べた。また T 細胞株を用いた *in vitro* の系で様々な乳酸菌株による CIA 抑制能を簡便に評価できるか否かを検討するため、CIA 発症への関与が知られている T 細胞を株化し、IL-2 応答を解析した。

はじめに、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1102（OLL1102）および *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1（OLL1073R-1）の経口投与が慢性関節リウマチの発症を予防できるかどうかについて、CIA の系で調べた。CIA は、DBA/1 マウスをウシ II 型コラーゲン（bCII）で免疫することによって誘導した。OLL1073R-1 の脱脂乳培養物の経口投与により CIA の発症が強く抑制された。OLL1102 の脱脂乳培養物あるいは脱脂乳の経口投与でも CIA は抑制された。しかし、抑制程度は OLL1073R-1 の脱脂乳培養物と比べると弱かった。合成培地である deMan Rogosa Sharpe（MRS）培地は脱脂乳の主要成分を含有していないにもかかわらず、OLL1073R-1 の MRS 培養物は OLL1073R-1 の脱脂乳培養物と同様に CIA を抑制した。この結果は、OLL1073R-1 の脱脂乳培養物による CIA 抑制効果は脱脂乳の成分のみならず OLL1073R-1 菌体または代謝産物によることを示す。さらに、OLL1073R-1 の MRS 培養物から得られた洗浄菌体では CIA が抑制されなかった一方、OLL1073R-1 の脱脂乳培養物から得られた菌体外産生多糖画分で CIA が抑制された。この結果から、OLL1073R-1 の培養物による CIA 抑制には、菌体ではなく菌体外産生多糖などの代謝産物が関与している可能性が示唆された。OLL1073R-1 の脱脂乳培養物と脱脂乳は、bCII と培養したリンパ節細胞における IFN- γ の産生を抑制した。しかし、OLL1102 の脱脂乳培養物では IFN- γ の産生が抑制されなかった。OLL1073R-1 の MRS 培養物および菌体外産生多糖画分によっても IFN- γ 産生が抑制された。以上の結果から、OLL1073R-1 による CIA 抑制は、IFN- γ 産生抑制を介している可能性が示唆された。また、OLL1102 脱脂乳培養物でも程度は弱いながら CIA が抑制された点と、OLL1102 ではリンパ節細胞による IFN- γ の産生が抑制されなかった点、OLL1102 の脱脂乳培養物と OLL1073R-1 脱脂乳培養

物で共通の成分が含まれている点から、OLL1073R-1 脱脂乳培養物による CIA 抑制には、OLL1102 脱脂乳培養物と共通で、IFN- γ 産生抑制を介さない機構も関与していると考えられた。

次に、OLL1073R-1 による CIA 抑制機構の解明を目的とし、OLL1073R-1 脱脂乳培養物の経口投与がリンパ節細胞におけるサイトカインの産生に及ぼす影響についてさらに詳細に解析した。OLL1073R-1 脱脂乳培養物の経口投与により炎症性サイトカインである IFN- γ 、IL-6、TNF- α および走化性因子である MCP-1 の産生が抑制された。その中で特に、TNF- α の産生抑制が顕著であった。IL-2 と IL-4 の産生は影響を受けなかった。マクロファージは IFN- γ 、IL-6、TNF- α および MCP-1 を産生する一方、IL-2 と IL-4 を産生しない。また、IL-2 と IL-4 は T 細胞により産生される。これらの知見を考慮すると、OLL1073R-1 脱脂乳培養物の経口投与は、T 細胞ではなく、マクロファージなどのアクセサリ細胞による炎症性サイトカインの産生を抑制したと考えられた。また、OLL1073R-1 脱脂乳培養物の経口投与による CIA 抑制は、IFN- γ 、IL-6、TNF- α および MCP-1 の産生抑制を介していると考えられた。

慢性関節リウマチの発症には前述のアクセサリ細胞だけではなく T 細胞応答も関与する。乳酸菌が bCII 特異的な T 細胞応答を制御し、CIA 抑制ができれば、より安全性の高い慢性関節リウマチの予防手段を講じることができる。そこで、乳酸菌による CIA 抑制を評価する際に T 細胞株を用いた *in vitro* の系が利用できるか否かを検討するため、bCII の 245 残基から 270 残基領域の部分に特異的な T 細胞を株化 (T 細胞株の名称は B245/270D) し、IL-2 応答を解析した。なお、この T 細胞は、*in vivo* において CIA の発症に関与していると言われている。株化開始後 4 から 8 週間の継代培養を施して得られた細胞株 (B245/270D9.1) は抗原特異的に増殖応答した一方、12 週間以上の継代培養を施した細胞株 (B245/270D4.3) では、抗原特異的な増殖応答が消失していた。B245/270D9.1 は、活性化後に IL-2 受容体 α 鎖 (CD25) を発現した。一方、B245/270D4.3 は、抗原存在下で継代

を行った培養条件下（刺激培養条件下）では CD25 を発現しなかった。しかし、抗原を添加しないで1回継代を施した培養条件下（休止培養条件下）では、B245/270D9.1と同様、活性化後に CD25 を発現した。以上の結果から、B245/270D は、長期間の抗原存在下での培養の間に CD25 の発現量低下に伴い、増殖応答が低下すると考えられた。継続的な刺激培養後の CD25 発現量の低下は、*in vivo* での CIA における T 細胞応答を反映している可能性がある。従って、培養期間の異なる B245/270D9.1 および B245/270D4.3 を用いることにより各々 CIA 発症初期および慢性期における乳酸菌の効果を *in vitro* で評価できるかもしれない。ただし、評価系の確立には、IL-2 以外のサイトカイン応答など B245/270D の性質を更に詳細に解析する必要がある。

以上より、OLL1073R-1 培養物の経口投与がアクセサリー細胞のサイトカイン産生抑制を介して、CIA の発症抑制に有効であることが示された。つまりこの菌株を用いた乳製品によって慢性関節リウマチの発症も抑制できる可能性が示され、免疫応答の修飾により疾患の発症を予防する食品の開発を期待できる。また T 細胞株を用いた *in vitro* の系で乳酸菌による CIA 抑制を評価できる可能性が示唆された。今後、OLL1073R-1 が T 細胞応答に及ぼす影響の有無確認や、OLL1073R-1 以外で CIA 抑制能を持った乳酸菌株の選出に T 細胞株を用いた *in vitro* の系が利用できることが期待される。