

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成20年度博士課程 入学
氏名 吉田 綾子
指導教員名 清水 誠

論文題目 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 の免疫調節機能に関する研究

緒言

乳酸菌のアレルギー疾患の予防・治療に対する有効性は多くの研究者により報告されている。その抑制メカニズムとしては、①I型ヘルパーT細胞（T helper 1; Th1）を活性化させることで、アレルギー疾患に深く関与しているII型Th細胞（Th2）を抑制すること、②T細胞の増殖を抑制する作用を有する制御性T細胞を活性化させることで、過剰な免疫反応を抑制し症状を緩和させることが考えられている。*Lactobacillus gasseri* OLL2809（LG2809）は、ヒト糞便から単離された乳酸菌であり、経口投与することでマウスにおける血清中 Immunoglobulin（Ig）E抗体の増加を抑制する効果や、ヒトの花粉症の症状を緩和する効果を有するなど、抗アレルギー作用があることが明らかにされている。

乳幼児における食物アレルギーが大きな問題になって久しい。これに対し以前から、経口免疫寛容を誘導させることで食物アレルギーを予防しようとする考え方があ

る。経口免疫寛容は抗原の経口投与により、抗原特異的な免疫応答が抑制される現象

のことであり、食物アレルギーは経口免疫寛容の破綻と捉えることもできる。つまり経口免疫寛容の機能を強化することができれば、食物アレルギーの予防、あるいは寛解を維持、促進することができると考えられる。また、T 細胞は獲得免疫系における司令塔としての役割を果たしているがアレルギー等の免疫疾患にも深く関与している。そのため T 細胞の増殖を制御することができれば T 細胞を原因とする免疫疾患を予防・治療することができる可能性がある。しかしながら、乳酸菌による経口免疫寛容の強化およびその作用機構、また乳酸菌による T 細胞の増殖応答の抑制に関する知見は限られたものに過ぎない。そこで本研究では、LG2809 の免疫調節機能を検討するため、経口免疫寛容に対する効果、T 細胞の増殖応答に対する抑制効果について検討した。

第1章 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 の強制経口投与による経口免疫寛容誘導の強化

DO11.10 マウスは、オボアルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的な T 細胞受容体遺伝子を導入した、BALB/c マウスと遺伝背景を同じくするトランスジェニックマウスである。DO11.10 マウスに 20%OVA 水を 5 日間自由摂取させ経口免疫寛容を誘導すると、脾臓 CD4⁺ T 細胞は、抗原刺激に対する増殖応答および Interleukin (IL) -2 産生応答が抑制され、CD4⁺ T 細胞の抗原刺激に対する増殖応答を抑制する活性が誘導される。本研究ではまず、この経口免疫寛容誘導系に対する LG2809 の投与効果を調べた。その結果、LG2809 生菌体の強制経口投与により、経口免疫寛容により誘導される上記の効果が強化されることを見出した。フローサイトメトリ解析の結果、LG2809 の投与は、経口免疫寛容誘導時の脾臓での CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T 細胞集団の割合を増加させることが明らかになり、その細胞集団の増加と相関して脾臓 CD4⁺ T 細胞の IL-10 産生が増強されることを見出した。CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T 細胞集団は低応答化した、抑制活性の強い細胞集団である。セルソーターを用いて当該細胞集団を精製し抑制活性を測定したところ、LG2809 投与により抑制活性が強化されていることも明らかにした。これらのことから、LG2809 の投与は経口免疫寛容誘導時の脾臓での CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T 細胞集団の割合を増加させ、その細胞集団自身の抑制活性を強化することで全身性の経口免疫寛容の誘導を強化していることが示唆された。

次に腸管免疫系における LG2809 生菌体の強制経口投与の効果を検討した。LG2809 または生理食塩水投与中の DO11.10 マウスに、20%OVA 水を 0、3、5 日間自由摂取させたときの小腸粘膜固有層 (lamina propria; LP) に存在する T 細胞による、CD4⁺ T 細胞の増殖応答および IL-2 産生の抑制活性を測定したところ、OVA 水投与日数の増加と共に強い抑制活性が誘導され、生理食塩水投与群と比べて LG2809 投与群ではその抑制活性がより早い段階で獲得されていた。しかし、

OVA 水投与の 5 日目には LP の T 細胞による抑制活性には、差は認められなくなった。フローサイトメトリー解析を行ったところ、LP の CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T 細胞集団の割合は、OVA 水の投与日数の増加と共に増加するが、LG2809 生菌体を投与した方がより早く増加することを見出した。しかし、この差も OVA 水投与 5 日目には認められなくなった。これらの結果から、LG2809 投与により、LP での経口免疫寛容の誘導が促進されていることが示唆された。

経口免疫寛容の誘導には LP の樹状細胞 (dendritic cell; DC) が関与していることが知られている。そこで LP における DC の状態をフローサイトメトリー解析したところ、LG2809 投与により DC のうち特に形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC; pDC) が増加していることが明らかになった。LG2809 投与群での pDC の割合の増加は、OVA 水投与 5 日目には生理食塩水投与群と比べて差が認められなくなった。LG2809 投与による LP での pDC の増加は BALB/c マウスにおいても認められ、また、その LP 細胞による抗原提示で分化誘導させた DO11.10 由来 CD4⁺ T 細胞は、生理食塩水投与群の LP 細胞で提示された T 細胞よりも、強い抑制活性を有することも明らかにした。以上のことから、LG2809 投与は LP の pDC を増加させ、抗原提示によって抑制能の強い CD4⁺ T 細胞の分化誘導を促進し、経口免疫寛容の誘導を促進しているのではないかと考えられた。

第2章 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 および Toll-like receptor リガンドによる脾臓 CD4⁺ T 細胞の増殖応答の抑制効果

次に、CD4⁺ T 細胞の増殖に与える LG2809 の効果を検討した。抗原および抗原提示細胞と、DO11.10 マウスから調製した脾臓 CD4⁺ T 細胞との共培養系における LG2809 の添加効果を検討したところ、生菌体、加熱死菌体共に CD4⁺ T 細胞の増殖応答に対して抑制効果があることを見出した。次に LG2809 菌体の破砕処理や酵素処理を行うことで、菌体のどの成分が増殖応答を抑制するかについて検討を行ったところ、その RNA に CD4⁺ T 細胞の増殖応答を抑制する効果があることが判明した。anti-CD3ε/CD28 抗体刺激による BALB/c マウス脾臓 CD4⁺ T 細胞の増殖応答に対しても、LG2809 加熱死菌体およびその RNA は抑制効果を示し、CD4⁺ T 細胞の増殖を直接抑制していることが明らかになった。MyD88 欠損マウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞について同様の検討を行ったところ、その抑制効果は解除され、LG2809 加熱死菌体およびその RNA の抑制効果には MyD88 を介したシグナル伝達系が関与していることが明らかになった。また、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) 処理によってもこれらの抑制効果が阻害されることが明らかになり、その抑制には酸化ストレスが関与していることが示唆された。

生体における LG2809 由来の RNA の効果を検討するため、IV 型アレルギーの一つである遅延型過敏反応 (delayed-type hypersensitivity; DTH) への効果を検討し

た。DO11.10 マウスに OVA を完全フロイントアジュバントと共に免疫し、足せきに OVA を含む生理食塩水を注射することで DTH 反応を誘導した。その結果、LG2809 由来の RNA は DTH 反応を抑制できること、また、この効果は NAC の投与により解除されることが明らかになった。

MyD88 が LG2809 加熱死菌体およびその RNA の CD4⁺ T 細胞の増殖抑制効果に関与していることが示されたことから、そのメカニズムを詳しく調べるために、次に各種 Toll-like receptor (TLR) リガンドを用いた検討を行った。その結果、TLR7 のリガンドである Imiquimod が、CD4⁺ T 細胞の増殖に対して強い抑制活性をもつことが明らかになった。Imiquimod は CD4⁺ T 細胞に DNA の断片化などアポトーシスを誘導していた。またフローサイトメトリー解析の結果、G0/G1 期に cell cycle arrest していることも判明した。アポトーシスの誘導は NAC 処理で解除されたことから、酸化ストレスがアポトーシスの誘導に関与していることが示唆された。MyD88 欠損マウスを用いた検討を行ったところ、Imiquimod による CD4⁺ T 細胞のアポトーシス誘導は解除されたが、興味深いことに cell cycle arrest は MyD88 欠損マウスにおいても解除されなかった。CD4⁺ T 細胞の増殖因子である IL-2 産生の抑制も MyD88 欠損マウスで解除されなかったことから、Imiquimod による IL-2 産生の抑制が cell cycle arrest の原因であると考えられた。マウス生体での効果を調べたところ、Imiquimod の投与により DO11.10 マウスの足せきに誘導した DTH 反応が顕著に抑制された。

本研究では LG2809 由来の RNA および Imiquimod に CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制する効果があることを明らかにし、その抑制メカニズムには MyD88 と酸化ストレスが関与していることを示した。また、DTH 反応を抑制できることから、これらの成分が IV 型アレルギーの治療に利用できる可能性が示された。

総括

本研究では、LG2809 生菌体に経口免疫寛容の誘導強化効果があることを明らかにした。この効果は LP における pDC の増加により引き起こされていることが示唆された。また、LG2809 生菌体および加熱死菌体共に CD4⁺ T 細胞の増殖応答を抑制する効果があることを明らかにした。LG2809 由来の RNA や Imiquimod にも同様の抑制活性があることを示し、これらの成分が DTH 反応を抑制できることを明らかにした。本研究により、LG2809 に食物アレルギーや IV 型アレルギーを予防、治療できる可能性があることと、その作用機作の一端が明らかにされ、乳酸菌体のもつ新規な免疫抑制機能を明らかにできたと考えている。