

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三枝 静江

酵母は機能性食品やサプリメントの素材、プロバイオティクスとして幅広く利用されているが、腸管における酵母の自然免疫応答様式に関しては未解明な面が多く残されている。本研究は、腸管内において食餌由来性の高い *Saccharomyces cerevisiae* および常在性が高く病原性も有す *Candida albicans* を中心に、ヒト腸管上皮由来の Caco-2 細胞とヒト由来好中球様細胞である HL-60 細胞を用いて、インターロキンなどのサイトカインの誘導性や酵母菌に対する抗原認識性を明らかにしたものである。

Saccharomyces cerevisiae および *Candida albicans* に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の各種サイトカイン産生応答

15% FBS 含有 DMEM 培地で培養した Caco-2 細胞は、10 mM 酪酸を加えた4日間の前培養により、酪酸無添加時と比較して、IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, SCF, TGF- β 1, TGF- β 3, TNF- α , COX-1, 及び COX-2 の mRNA 発現量が増加したが、GM-CSF と TGF- β 2mRNA 発現量には変化がみられなかった。タンパク質レベルでは、IL-8 分泌促進が ELISA により確認された。また、10 mM 酪酸添加培地で前培養した Caco-2 細胞をさらに *S. cerevisiae* 及び *C. albicans* 生菌体と共培養したところ、IL-6, IL-8, MCP-1, SCF, TNF- α のうち、IL-8 の mRNA 発現と分泌のみがさらに促進された。

種々の酵母および菌体成分に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の応答

Caco-2 細胞からの IL-8 分泌量は、菌体濃度依存的に、*S. cerevisiae* あるいは *C. albicans* 生菌体との共培養により増加した。*S. cerevisiae* による IL-8 産生の増強の程度は、*C.*

albicans によるものより小さく、同時に測定した Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗 (TER) 値の減少も、*S. cerevisiae* のほうが緩慢であった。また、マンナンを除くザイモサンとグルカンが同様に IL-8 の分泌を濃度依存的に促進した。種々の酵母、*Candida kefyr*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* は、いずれも Caco-2 細胞からの IL-8 分泌を促進した。以上の結果から、実際の腸管において、管腔内の酵母は腸管上皮細胞を刺激して IL-8 産生を増強し、さらに広範な腸管免疫機能への作用を及ぼす可能性があると考えられた。

Saccharomyces cerevisiae および *Candida albicans* に対するヒト好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン産生応答

1 μ M レチノイン酸または 1.25% DMSO で分化誘導したヒト好中球様 HL-60 細胞と、*S. cerevisiae* または *C. albicans* を共培養し、HL-60 細胞のサイトカイン応答を検討した。その結果、*S. cerevisiae* 生菌体および加熱死菌体による刺激は、レチノイン酸で処理した好中球様 HL-60 細胞からの IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1, TNF- α の分泌および遺伝子発現を促進した。一方、*C. albicans* 生菌体は IL-1 β , IL-8, IL-18 の分泌のみを促進したが、その活性は *S. cerevisiae* よりも弱かった。*C. albicans* 加熱死菌体は、IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, TNF- α の分泌を促進した。これらの結果から、*S. cerevisiae* は、好中球のサイトカイン産生応答を *C. albicans* とは異なる様式で誘導して、生体の免疫系に作用することが示唆された。

ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞または好中球様 HL-60 細胞と酵母を共培養した際の酵母菌体成分認識受容体の遺伝子発現変化

酵母菌体による刺激を行わない状態について、Caco-2 細胞では、10mM 酪酸添加培地で、TLR1, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量が増加、HL-60 細胞においては、1 μ M レチノイン酸含有培地で TLR1, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加、1.25% DMSO 含有培地では、TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量が増加した。しかしながら、酵母細胞と各ヒト細胞の共培養時には、Caco-2 細胞については、酵母細胞共存による明瞭な変化は認められなかった。一方、HL-60 細胞については、レチノイン酸または DMSO で処理した HL-60 細胞で、*S. cerevisiae* 加熱死菌体との共培養により TLR2 mRNA の発現量が増加した。この受容体の遺伝子発現の変化により、Caco-2 細胞および HL-60 細胞の酵母認識機構と、それに続くサイトカイン産生等の応答が変化した可能性が考えられた。

以上を要するに、本研究は酵母がヒトの腸管免疫機能に及ぼす作用に関する基本的な機序を明らかにしたものであり、学術上、応用上寄与する面が少なくない。よって審査委員一同は本論文が学位 (獣医学) を授与するにふさわしいものと認めた。