

論文の内容の要旨

論文題目 *Lactobacillus paracasei* KW3110 株の免疫調節作用に関する研究

氏名 市川 晋太郎

乳酸菌は整腸作用を持つプロバイオティクスとして知られ、ヨーグルトなど、幅広い食品に利用されている。近年では乳酸菌の免疫調節作用に関する研究が盛んに行われ、抗アレルギー作用や抗感染症作用を持つ菌株などが発見されている。我々の研究室でも IL-12 産生を強く誘導し、Th1 優位な免疫応答を誘導する乳酸菌株、*Lactobacillus paracasei* KW3110 株を見出し、この株がマウスにおいて、IgE 産生抑制作用、アトピー症状抑制作用を持つことを報告している。

乳酸菌の免疫調節作用に関連する新たな機能が明らかになる一方で、その作用メカニズムについての研究はあまり進んでいない。KW3110 株についても、その IL-12 産生誘導メカニズムや、抗アレルギー作用メカニズムに関する知見はほとんど得られていなかった。

そこで、KW3110 株による、IL-12 を中心とした抗アレルギー作用メカニズムの解明を目的とし、*in vivo* での KW3110 株の作用機序に関する研究、および *in vitro* での IL-12 産生誘導機構に関する研究を行った。その結果、経口投与した KW3110 株が *in vivo* で IL-12 を誘導する

こと、IL-12 誘導には、TLR ではなく、食事に伴う ROS 産生が重要であることを明らかにした。得られた成果の概要は以下の通りである。

Lactobacillus paracasei KW3110 株の経口投与による *in vivo* IL-12 産生誘導

KW3110 株を経口的に摂取した場合の、*in vivo* IL-12 産生誘導の有無および IL-12 産生誘導機序を明らかにすることを目的とし、KW3110 株経口投与後のパイエル板を中心とした免疫系の応答を評価した。

その結果、パイエル板において、KW3110 株投与 2 時間後から 10 時間後までの間、IL-12 遺伝子発現が上昇することが示された。また、パイエル板切片の観察から、KW3110 株がパイエル板に取り込まれ、IL-12p40 タンパク産生を誘導することが明らかとなった。MLN においても投与 10 時間後に IL-12 遺伝子発現が上昇しており、KW3110 株を取り込んだ細胞が MLN に移動することが示唆された。KW3110 株投与後の血中 IL-12 濃度を評価したところ、投与 10 時間後に血中 IL-12p40 および IL-12p70 濃度の有意な上昇が観察され、経口投与した KW3110 株の腸管免疫系への作用に加え、全身の免疫系に対しても影響を与えることが示唆された。

以上の結果から、KW3110 株が *in vivo* で IL-12 を誘導することが明らかとなり、KW3110 株の持つ抗アレルギー作用メカニズムの一端が明らかとなった。

Lactobacillus paracasei KW3110 株による TLR2, 4, 9 非依存かつ MyD88 依存的な IL-12 産生誘導

KW3110 株による *in vitro* での IL-12 産生誘導メカニズムの解明を目的として、菌体の認識に重要な役割を果たす TLR の関与を評価した。TLR2, 4 および 9 を欠損するマウスの、脾臓、パイエル板、MLN および BM-DC を用いて、それぞれの TLR の IL-12 産生への関与を評価した。しかし、いずれの TLR 欠損も IL-12 産生を抑制しないことが明らかとなった。また、

KW3110 株以外の乳酸菌株を用いた場合でも同様の結果であった。一方で、MyD88 を欠損するマウス由来の細胞を用いて同様の実験を行った場合には、KW3110 刺激による IL-12 産生が完全に抑制された。

各種 TLR を発現する HEK-293 細胞を用いて KW3110 株が持つ TLR リガンドの種類を評価した結果、KW3110 株は TLR2 のリガンドのみ保有していたことから、TLR2, 4, 9 以外の TLR 欠損マウスでも IL-12 産生は抑制されないと予想された。また、TLR と同様に MyD88 をアダプター分子とする IL-1 および IL-18 経路をブロックしても IL-12 産生が変化しなかったことから、KW3110 株による IL-12 産生誘導には、TLR や IL-1 ファミリー以外の、未知の MyD88 を介する経路が関与していると考えられた。

Lactobacillus paracasei KW3110 株による ROS を介した IL-12 産生誘導機構

マクロファージは KW3110 株刺激に対する IL-12 産生細胞であると考えられる。マクロファージは旺盛な食食能を特徴とし、食食により ROS を産生することから、マクロファージによる乳酸菌の食食、および ROS 産生が、IL-12 産生にどのように関与するかを評価した。マクロファージと KW3110 株を共培養した結果、KW3110 株がマクロファージによって食食され、NADPH oxidase 依存的な ROS 産生を誘導することが明らかとなった。また、IL-12 産生誘導能と食食頻度、IL-12 産生誘導能と ROS 産生には正の相関が認められた。そこで、ROS を NADPH oxidase 阻害剤または ROS スカベンジャーで阻害したところ、阻害剤の濃度依存的に KW3110 株刺激による IL-12 産生が抑制された。このことから KW3110 株による IL-12 産生誘導にはマクロファージによる ROS 産生が重要であることが明らかとなった。

次に、MyD88 欠損マウス由来のマクロファージを用いて KW3110 株の食食を評価したところ、通常マウスのマクロファージと同程度の食食が観察された。一方で、MyD88 欠損マクロファージでは KW3110 株食食後の ROS 産生が顕著に抑制されていた。よって、MyD88 欠損マウスにおける IL-12 産生の抑制の一部は弱い ROS 産生に由来すると考えられた。