

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 市川晋太郎

Lactobacillus paracasei KW3110 株は 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であり、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が報告されている。しかしながら、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。本論文は *in vivo* での KW3110 株の作用機序の解明、および *in vitro* での IL-12 産生誘導機構の解明に取り組んだものであり、3 章より構成される。

第一章では、*Lactobacillus paracasei* 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 産生誘導機序について述べている。マウスに KW3110 株を経口投与し免疫応答を解析したところ、パイエル板において IL-12 遺伝子発現が上昇することが示された。また、組織化学的観察から、経口投与した KW3110 株がパイエル板に取り込まれ、IL-12p40 タンパク質産生を誘導することが示された。腸間膜リンパ節 (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 濃度の解析から、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示され、経口投与した KW3110 株は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になった。

第二章では、*in vitro* 系を用いて *Lactobacillus paracasei* KW3110 株による IL-12 産生誘導メカニズムの解明に取り組み、菌体の認識に重要な役割を果たす Toll 様受容体 (TLR) の関与について述べている。KW3110 株による IL-12 産生誘導への各 TLR の関与を、TLR2、4 および 9 欠損マウスを用いて解析した結果、いずれの TLR 欠損も IL-12 産生を抑制しないことが示された。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 刺激成分の種類を評価した結果、KW3110 株は TLR2 のリガンドのみを保有していると考えられた。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示唆された。

第三章では、*Lactobacillus paracasei* KW3110 株による活性酸素種 (ROS) を介した IL-12 産生誘導機構について述べている。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貪食され、NADPH oxidase 依存的な ROS 産生を誘導することが示された。また、IL-12 産生誘導能と貪食頻度、IL-12 産生誘導能と ROS 産生には正の相関が認められた。ROS の産生を 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示唆された。次に、MyD88 欠損マウス由来のマクロファージを用いて KW3110 株の貪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貪食が観察された一方で、MyD88 欠損マクロファージでは KW3110 株貪食後の ROS 産生が顕著に抑制されていた。このように、MyD88 を介した ROS 産生が、KW3110 株による IL-12 産生誘導において重要な役割を果たしていることが示された。

以上、本論文はこれまで作用機構が不明だった *Lactobacillus paracasei* KW3110 株の免疫調節作用について、IL-12 産生への影響という視点から解析を進め、乳酸菌の示す免疫調節の分子メカニズムの一端を明らかにしたもので、学術上、応用上で貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。