

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21362

研究課題名(和文) 乳酸桿菌による自然免疫賦活化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism to augment host innate immunity by *Lactobacillus casei*

研究代表者

伊藤 雅洋 (ITO, MASAHIRO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：90596727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus casei ATCC 27139の加熱死菌体およびマウス脾細胞を共培養し、TNF- α 発現量を指標に自然免疫賦活化に関わる菌体因子を推測し、菌体表面因子であるラムノースの関与が示唆された。

また、マウス脾細胞溶解液においてラムノース-ビオチンプローブおよび抗マウスCD14抗体を用いたウェスタンブロットングによる解析を行い、宿主ラムノースレセプターとしてCD14の関与が推察された。すなわち、自然免疫賦活化には菌体表面因子のラムノースがラムノース結合性C型レクチンとしてCD14を介し、宿主の自然免疫賦活化に関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：To clarify bacterial components associated with augmentation of host innate immunity, TNF- α expression was measured after infection of heat killed *Lactobacillus casei* ATCC 27139 to mouse spleen cell. The data indicates that the rhamnose, which is its surface component, is associated with augmentation of host innate immunity. Western blotting analysis of mouse spleen cell lysate with the rhamnose-biotin probe and mouse CD14 antibody suggests that CD14 serves as rhamnose binding C-type lectin. Taken together, it suggests that *Lactobacillus casei* ATCC 27139 augments host innate immunity by interacting its surface rhamnose with host CD14.

研究分野：細菌学

キーワード：プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化や衛生環境の改善などにより、生活習慣病やアレルギー疾患は増加の一途を辿っている。また、世界でも類を見ない程の急激な高齢化は現在年間40兆円にも及ぶ医療費のさらなる増加をも示唆している。したがって、今後はいかに疾病予防、再発防止をするか、国民一人一人による「セルフメディケーション」の重要性が増すことは明らかである。

ヨーグルトなどに含まれるプロバイオティクス（宿主に有益な作用を示す乳酸桿菌・ビフィズス菌の一部）は、それ自身が非常に安価で、かつ安全性が実証されており、さらに近年医学的にもその有用性が証明された代表的な機能性食品のひとつである。特に免疫賦活化による抗感染症、抗腫瘍作用およびアレルギー抑制作用はその需要と医学的有用性から多くの製品でその作用が謳われているが、宿主側、菌体側を含めた体系的なメカニズムの解明はなされておらず、未だ不明な点が多い。

当研究室では自然免疫賦活化作用を有する *L. casei* ATCC 27139 を用いて、図1に示すように免疫賦活化作用の体系的なメカニズム解明を行ってきた。宿主側の免疫賦活化メカニズムの解析では、

- パターン認識受容体 TLR2 および Nod2 を介した NF- κ B および p38 MAPK 両経路の活性化
- 炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-12、IL-18 および IFN- γ タンパク質の産生亢進
- NK 細胞、マクロファージの活性化により抗感染症および抗腫瘍作用

を示すことを明らかにしている (Kim et al., *Microbes Infect.* 2006, 図1. -)。

一方、申請者は菌体側の免疫賦活化メカニズムの解析のため、

- 乳酸桿菌において初めて実用的な変異株作製法を構築し、変異株ライブラリー約 10,000 株を作製
- 上記変異株ライブラリーを用いた解析により、免疫賦活化を規定する遺伝子 *asnH* (アスパラギン合成酵素) を同定
- 本遺伝子変異株の SEM および TEM 撮影像から、*L. casei* ATCC 27139 の自然免疫賦活化には菌体表層構造が関与する

ことを明らかにしている (Ito et al., *J. Appl. Microbiol.* 2010, Ito et al., *PLOS ONE* 2014, 図1. -)。

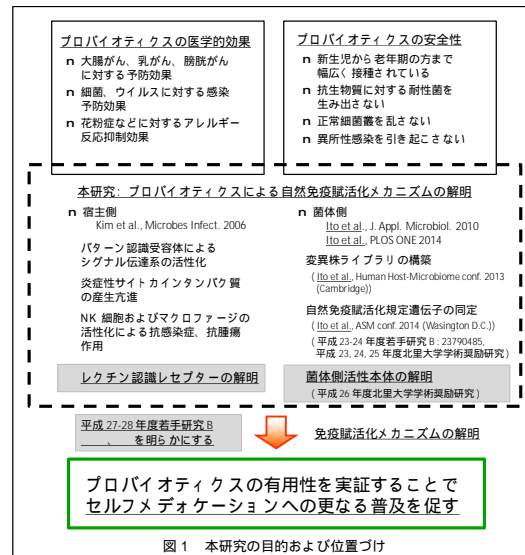


図1 本研究の目的および位置づけ

2. 研究の目的

本研究では自然免疫賦活化作用を有する乳酸桿菌 *Lactobacillus casei* ATCC 27139 野生株および免疫賦活化欠失株 *asnH* 変異株:MT-77 を用いた菌体表層構造の比較解析および菌体表層糖成分による競合阻害解析を行い、免疫賦活に不可欠な菌体表層因子を解明する (図1.)。また、免疫賦活化能と菌体因子との結合性に関する解析から、乳酸桿菌の自然免疫賦活化に関わる新規宿主レセプター分子 (レクチン) を明らかにし (図1.)、乳酸桿菌による自然免疫賦活化機構の詳細な解明を試みる。

3. 研究の方法

使用菌株と使用培地

Lactobacillus casei ATCC27139 を American Type Culture Collection (ATCC) より得た。免疫賦活化欠失株 *asnH* (アスパラギン合成酵素) 変異株 (MT-77) を *Lactobacillus casei* ATCC27139 のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーより取得した (Ito et al., *PLOS ONE* 2014)。乳酸桿菌を ILS 培地 (Ito et al., *J. Appl. Microbiol.* 2010, Ito et al., *PLOS ONE* 2014) にて 37°C, 24 時間培養後、培養液 50 ml を遠心分離し (7,500 rpm, 4°C, 10 分間)、滅菌精製水 20 ml に懸濁した。遠心洗浄を 3 回繰り返し、滅菌精製水 20 ml に再懸濁後、30 分間煮沸した。再度滅菌精製水にて 3 回遠心洗浄し、得られた菌体を滅菌精製水 10 ml に再懸濁後、凍結乾燥機 (EYELA, FDU-2110) にて凍結乾燥させた (ATCC27139-ICW, MT77-ICW)。培養細胞に用いる培地には非働化した 10% fetal bovine serum (FBS: Biological Industries)、ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) 含有 RPMI-1640 培地 (SIGMA) を使用した。

マウス

マウスには SPF の C57BL/6N (雌、日本エスエルシー) を用いた。マウスは自動調整された温度 ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 5\%$)、明るさ (14 時間点灯、10 時間消灯) の条件に設定された飼育室内において、ポリプロピレンケージ (日本クレア) 内にて飼育した。なお、本動物実験は北里大学薬学部にて承認され (承認番号: J10-1)、北里大学における実験動物等に関する規定および米国 National Research Council の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に基づき行われた。

菌体表層多糖 (多糖-ペプチドグリカン複合体) の精製

定常期の乳酸桿菌加熱死菌体 (500 mg) を 5 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.4) 30 ml に懸濁し、この懸濁液に Mutanolysin (SIGMA, 5 mg) を加え、 37°C にて 20 時間処理した。この反応液を遠心分離し ($10,000 \times g$, 20 分間)、細胞質を除いた後、上清を透析した (10 mM リン酸緩衝液 [pH 6.0] / 0.25 M NaCl, 4°C , 16 時間)。透析後の溶液を凍結乾燥することにより粗標品を得た。この粗標品 1 mg を 1 ml の 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ に溶解し、セファクリル S-200 HR (1.1 x 95 cm) によるゲル濾過を行い精製した。ゲル濾過による分子量決定は分子量既知のデキストラン標準品 T-40 (40 kDa) および T-10 (10 kDa) を用いて行った。

ペプチドグリカンの精製

定常期まで培養した培養液 50 ml を遠心分離し ($7,500 \text{ rpm}$, 4°C , 15 分間)、得られた菌体を滅菌精製水 30 ml に懸濁し、15 分間煮沸した。遠心分離し、沈殿を 5% (w/v) SDS 10 ml に再懸濁し、30 分間煮沸した。遠心分離後、沈殿を 4% (w/v) SDS 10 ml に再懸濁し、20 分間煮沸した。遠心分離後、沈殿を滅菌精製水 20 ml に懸濁し、遠心洗浄を 6 回繰り返した。遠心分離し、沈殿を Protease (2 mg/ml) 3.6 ml に再懸濁し、 60°C にて 90 分間恒温した。Trypsin (600 $\mu\text{g/ml}$) 1.8 ml を加え、 37°C にて 16 時間恒温した。遠心分離し、沈殿を 48% Hydrofluoric acid 5 ml に懸濁し、 4°C にて 24 時間恒温した。遠心分離し、沈殿を 0.25 M Tris/HCl (pH 8.0) 20 ml に懸濁した。遠心分離し、沈殿を滅菌精製水 30 ml に再懸濁し、遠心洗浄を 2 回繰り返した。遠心分離し、沈殿を滅菌精製水 5 ml に懸濁し、凍結乾燥機 (EYELA, FDU-2110) にて凍結乾燥させた (ATCC27139-PG)。

マウス脾細胞の調製

マウス (C57BL/6N) より脾臓を摘出し、5 ml の Ca^{2+} , Mg^{2+} フリーの冷 Hank's balanced salt 溶液 (HBSS) に保存した。スライドガラスのプロスト部分にて各脾臓をすり潰し

た後、70 μm ナイロンメッシュに通し、組織塊を取り除いた。 4°C , $700 \times g$, 7 分間遠心分離を行い、上清を吸引除去した。細胞ペレットをほぐし、BD Pharm Lyse™ (BD Biosciences) を 5 ml 加えて懸濁後、遮光条件下室温にて 15 分間放置し、赤血球を溶血させた。 4°C , $700 \times g$, 7 分間遠心分離を行い、上清を吸引除去し、HBSS 10 ml で再度遠心洗浄後、RPMI 1640 培地にて懸濁し、血球計算板を用いて細胞数をカウントした。

乳酸桿菌加熱死菌体およびマウス脾細胞との共培養

調製したマウス脾細胞を 24 穴プレートに添加した (7.5×10^5 cells/ウェル)。さらに、乳酸桿菌加熱死菌体 (ATCC27139-ICW, ATCC27139-PG, MT77-ICW: 15 $\mu\text{g/ml}$) を加え、 37°C にて 72 時間培養した後、上清を回収し、培養上清中の TNF- を ELISA にて測定した。その際、食害阻害剤 (Latrunculin B, 2.5 μM) または Ca^{2+} キレート剤 (EGTA, 20 mM) を添加し、あらかじめ 5% CO_2 存在下 37°C , 30 分間恒温した細胞についても同様に計測した。また、ガラクトース、ラムノースまたはグルコース (20, 40 mM) 含有 RPMI-1640 培地における培養上清中の TNF- 産生量も同様に計測した。

ELISA

TNF- は BD Pharmingen 社製の ELISA キットを用いて定量した。96 穴プレートにリン酸緩衝液にて希釈した捕獲抗体溶液 100 μl を添加し、 4°C にて一晩コーティングした。PBS/0.05% Tween 20 にて洗浄し、10% BSA/PBS を用いて 1 時間ブロッキングを行った後、再度 0.05% Tween 20/PBS にて洗浄した。スタンダードおよびサンプルを添加 (100 $\mu\text{l/well}$) し、室温にて 2 時間恒温した。プレートを洗浄し、ビオチン化された検出抗体およびアビジン-HRP (10% BSA/PBS にて希釈) を各ウェルに 100 μl ずつ添加し 37°C にて 1 時間放置した。再度プレートを洗浄後、基質溶液 TMB を 50 μl 加え、30 分発色させた後、2 M H_2SO_4 にて反応を停止させた。各ウェルの吸光度 (OD_{450}) をプレートリーダーにて測定した。各サンプルの値は Microplate Manager Software (BioRad) を用いて算出した。各ウェルの吸光度 (OD_{450}) を iMark™ Microplate Reader (Bio-Lad) を用いて測定した。

ウェスタンブロッティング

調製したマウス脾細胞 4.0×10^7 cells に 1 ml RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz) を加え懸濁後、氷上にて 30 分間恒温した。 $14,000 \times g$, 4°C , 10 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清を PAGE Clean up kit (ナカライテスク) を用いて精製した後、EZ Apply (ATTO) にて懸濁した。5 分間

沸騰水浴中で加熱し、室温にて 14,000 x g、5 分間遠心した。サンプルの上清を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動 (20 mA) した後、PVDF 膜にたん白質を転写した (80 mA)。PVDF 膜を EzBlock Chemi (ATTO) を用いて室温にて 1 時間ブロッキングした後、TBS/0.02% Tween 20 で 3 回、それぞれ 5 分間ずつ洗浄した。洗浄した PVDF 膜は Rhamnose-biotin (GlycoTech) またはラット抗マウス CD14 抗体 (BD Pharmingen) を含む抗体溶液 (抗体を Signal Enhancer HIKARI: ナカライテスクで希釈) に 4°C にて一晩浸した。PVDF 膜を TBS/0.02% Tween 20 で 3 回、それぞれ 5 分間ずつ洗浄し、室温にて 1 時間 HRP 標識ストレプトアビジンまたはラット IgG 抗体と反応させた後、上記と同様に PVDF 膜を洗浄した。目的のたん白質は 1-Step Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher Scientific) により検出した。なお、RPMI1640 培地に加えている血清についても同様に Rhamnose-biotin によるタンパク質検出の有無を確認した。

統計

それぞれの値は平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。有意差検定は Student's t 検定を適用した。エラーバーは標準偏差を示している。

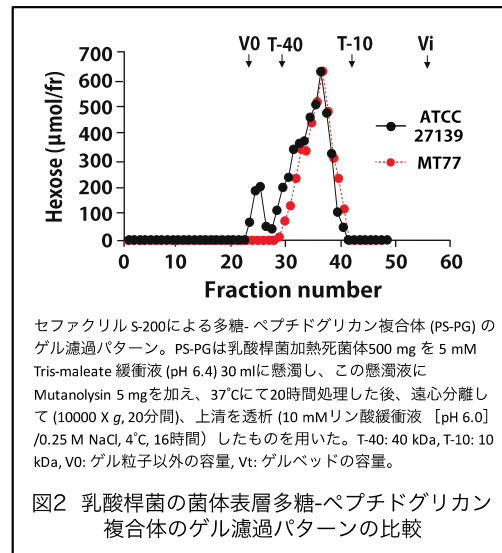
4. 研究成果

菌体表層多糖 (多糖-ペプチドグリカン複合体) ゲルろ過パターンと比較

野生株の菌体表層多糖をゲルクロマトグラフィーにより解析したところ、溶出位置により分子量が約 100 kDa 以上の画分 (画分 A) と分子量約 30 kDa の画分 (画分 B) とに分画された (図 2)。一方、MT77 の菌体表層多糖には画分 A は認められず、画分 B のみが溶出され、これまでに得られていた *asnH* 変異株と同様の溶出パターンを示した (図 2)。すなわち、自然免疫賦活化作用を規定する菌体成分は多糖-ペプチドグリカン複合体画分 A に存在することが示唆された。

画分 A には長岡らの報告からグルコース、ラムノース、ガラクトースなどの単糖が豊富に存在することが推察された (Nagaoka et al., J. Biochem. 1989)。野生株はラムノースもしくはガラクトサミンをレセプターとする J1 ファージに対し感受性を示す一方、MT77 は耐性を獲得した菌株であり (Ito et al., PLOS ONE 2014)、安田らのレクチンマイクロアレーの結果から本菌株はラムノース結合性レクチンとのみ結合性を有することが示唆されている (Yasuda et al., AEM 2011)。以上のことから、本菌株の有する自然免疫賦活化能には菌体表層の画分 A

に含まれるラムノースが関与することが推察された。



マウス脾細胞における菌体表層糖成分を用いた競合阻害解析

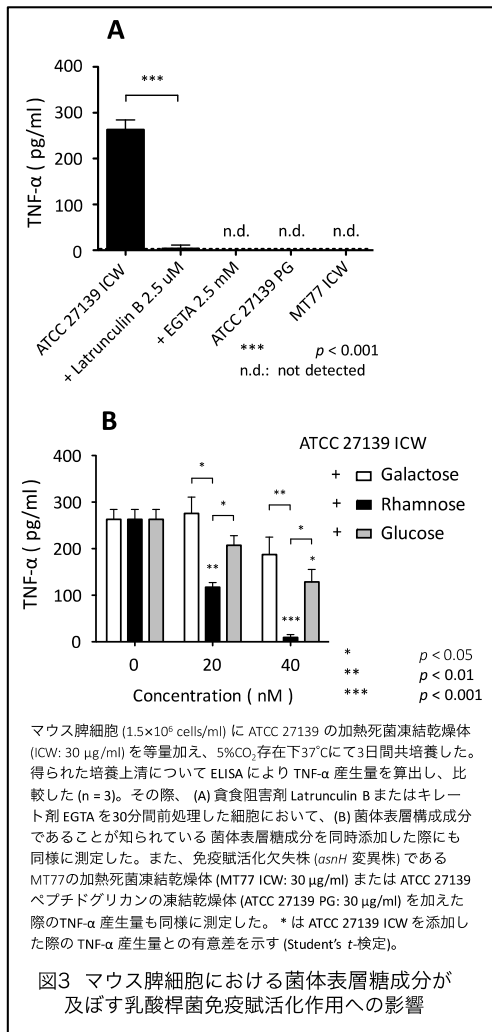
マウス脾細胞と乳酸桿菌との共培養時に産生される TNF- α 産生量を指標に、画分 A に存在すると考えられるラムノースが自然免疫賦活化能に与える影響を調べた。まず、野生株のみを添加した際に認められた TNF- α 産生亢進は、食餌阻害剤および Ca^{2+} キレート剤を添加した際には認められなかった (図 3A)。また、野生株の菌体表層構造を取り除いたペプチドグリカン (ATCC27139-PG) または免疫賦活化欠失株の加熱死菌体 (MT77-ICW) と共培養した際にも TNF- α 産生亢進は認められなかった (図 3A)。

菌体表層多糖構成成分であるガラクトース、ラムノースまたはグルコースを同時添加し、同様に計測したところ、野生株のみを添加した際に認められた TNF- α 産生亢進はラムノースを添加した際にのみ有意に低下した (図 3B)。なお、生細胞数および代謝活性は各単糖間で同程度の値を示し、有意差は認められなかった (データ未掲載)。

以上のことから、ATCC27139 の自然免疫賦活化にはマクロファージなど貪食細胞による貪食および菌体表層構造が不可欠であることが改めて示唆された。また、免疫賦活化因子として菌体表層のラムノースが関与することが示唆され、 Ca^{2+} が ATCC27139 の自然免疫賦活化には不可欠であることから、宿主 C 型レクチン (ラムノース結合性レクチン) の関与が推察された。

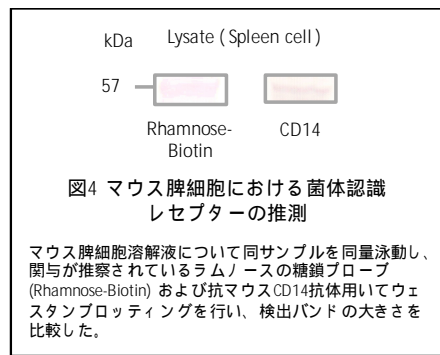
ラムノース結合性レクチンに関する報告は魚類において多くなされている一方、ヒトおよびマウスにおける報告はほとんどない。しかしながら、細菌構成因子のラムノースは宿主 CD14 と結合するとの報告もあ

り(Soell et al., J. Immunol. 1995, Oliva et al., PNAS 2009)、本宿主 C 型レクチンの候補レセプターの一つとして宿主 CD14 が推察された。



ウェスタンブロッティングによる自然免疫賦活化に関する糖結合性レクチンの推測

免疫賦活化に関わる宿主レセプター分子を推測するため、マウス脾細胞溶解液について関与が推察されているラムノース糖鎖プローブおよび抗マウス CD14 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、検出されるバンドサイズを比較した。その結果、抗マウス CD14 抗体を用いた際に認められる検出バンド (57 kDa) はラムノース糖鎖プローブを用いた際にも同サイズにて認められた (図 4)。一方、RPMI 培地中の血清にはラムノース糖鎖プローブを用いて検出されるタンパク質は認められなかった。したがって、ATCC27139 の自然免疫賦活化には菌体表層因子のラムノースがラムノース結合性 C 型レクチンとして宿主 CD14 を介し、宿主の自然免疫賦活化に関与することが推察された。



CD14 は主に単球やマクロファージ、好中球などの細胞表層に発現し、TLR2 および TLR4 の共受容体として機能することが知られており (Frey et al., J. Exp. Med. 1992, Durieux et al., J. Immunol. 1994, Labeta et al., J. Exp. Med. 2000)、TLR の細菌に対する反応には共受容体である CD14 の活性が重要であり、炎症誘導を促進することが知られている (Haziot et al., Immunity 1996, Yoshimura et al., J. Immunol. 1999, Baumann et al., J. Exp. Med. 2010, Lee et al., Immunity 2006)。本研究から ATCC27139 の自然免疫賦活化には貪食細胞による貪食が不可欠と示唆され、金らはその際の菌体認識には TLR2 および NOD2 が重要な役割を果たすことを明らかにしている (Kim et al., Microbes Infect. 2006)。以上のことから、ATCC27139 の自然免疫賦活化にはマクロファージなど貪食細胞における宿主 CD14 を介した TLR2 の反応性の亢進が重要である可能性が考えられた。今後は上述のメカニズムのさらなる解析を進めることで、乳酸桿菌による自然免疫賦活化メカニズムの詳細な解明を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅洋 (Masahiro Ito)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号: 90596727