

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380158  
 研究課題名（和文） イムノバイオティクスによる炎症性腸疾患予防・改善機構の解明と戦略的防御食品の開発  
 研究課題名（英文） Basic studies on the prevention and improvement of intestinal bowel disease by immunobiotics and their advanced application  
 研究代表者  
 北澤 春樹（KITAZAWA HARUKI）  
 東北大学・大学院農学研究科・准教授  
 研究者番号：10204885

## 研究成果の概要：

本研究は、炎症性腸疾患の予防に有効な、新規「イムノバイオティック食品」の開発基盤を築くことを目的とし、ヒトモデルとして期待されるブタ腸管上皮細胞株(PIE 細胞)を用いて、イムノバイオティクスの抗炎症活性について解析した。その結果、パターン認識受容体を介して抗炎症性を発揮するイムノバイオティクスの選抜が可能となり、その機構解明が飛躍的に進むことが大いに期待され、「イムノバイオティック食品」の創製に向けた開発基礎が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：プロバイオティクス、イムノバイオティクス、乳酸菌、炎症性腸疾患、抗炎症性、パターン認識受容体、ブタ

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患(IBD)は、欧米はもとより日本でも若年層を中心にその患者数は年々激増し続けており、Quality of Life (QOL)を著しく低下させることから、大きな社会問題に発展している。その主たる原因として、遺伝的問題の他、サイトカインを介する腸管上皮細胞の異常応答と腸管免疫機能の低下が指摘されている。一方、21世紀は予防医学の時代とも言われ、治療とは異なる観点から疾

病の予防・改善を食品の生理機能に求め、QOLの向上に貢献する機能性食品の開発が大いに期待されている。

我々はこれまでに、食経験の豊富なプロバイオティクスの中でも特に腸管免疫調節作用を発揮するイムノバイオティクスに特有なDNA配列や細胞壁成分が、DNA認識レセプター(TLR9)や細胞壁成分認識レセプター(TLR2, TLR4, Nods)による認識から、サイトカインを介して腸管免疫調節作用を発揮することを見出した。さらに、ヒトモデル系として期待されるブタ腸管から、世界に先

駆けて腸管上皮細胞株 (PIE細胞) の樹立に成功し、IBD研究への有用性が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの我々の知見を基礎として、イムノバイオティクスによる腸管免疫調節作用から炎症性腸疾患の発症防御機構の解明につなげるため、PIE細胞における特異的受容体介在性のサイトカイン発現調節の観点から総合的に解明し、新規“イムノバイオティック食品”の開発基礎を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) ブタにおいて Nod1、Nod2 をクローニングし、腸管における発現を解析した。
- (2) IBD に有効なイムノバイオティクスのスクリーニング系細胞株を構築するため、Nod1、Nod2 のトランスフェクタントを HEK293 細胞株で構築し、免疫応答性を検討した。
- (3) ブタパターン認識受容体強制発現細胞株により、イムノバイオティクスを選抜した。
- (4) PIE細胞におけるパターン認識受容体の発現とリガンド応答性を解析した。
- (5) PIE細胞における下痢原性大腸菌刺激による抗炎症評価系の構築を試みた。
- (6) PIE細胞共培養系による分子免疫評価系の構築を試みた。
- (7) イムノバイオティクスの抗炎症機構について解析した。

## 4. 研究成果

- (1) ブタ Nod1 および Nod2 の遺伝子配列を解析し、全構造遺伝子のクローンを得た。定量的 RT-PCR 法により、初生仔ブタおよび成熟ブタの各種組織において、それら遺伝子の発現を解析することができた。
- (2) ブタ Nod1 および Nod2 の遺伝子導入細胞系の構築に成功し、細胞内タンパク発現を確認した。発現細胞は、Nod1 および Nod2 のポジティブリガンドに対する免疫応答性を発揮することが確認された。試験したイムノバイオティクスのほとんどは、Nod2 を介して免疫応答を亢進することがわかった。
- (3) ブタパターン認識受容体 (PRR) の強制発現細胞を用いて、NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを指標として、乳酸菌ライブラリーから有用なイムノバイオティクスの候補を選抜することができた。
- (4) ブタ腸管上皮細胞株 (PIE細胞) における PRR の発現を解析した結果、TLR1~9 の発現が認められ、中でも TLR4/MD-2 の発現が極めて高かった。PIE細胞の炎症応答に関わるリガンド応答性についてサイトカイン発現から解析することができた (図 1)。
- (5) PIE細胞において、下痢原性大腸菌 (ETEC) による TLR4/MD-2 を介した炎症応答の誘導が認められ、免疫評価パラメータを決定した。

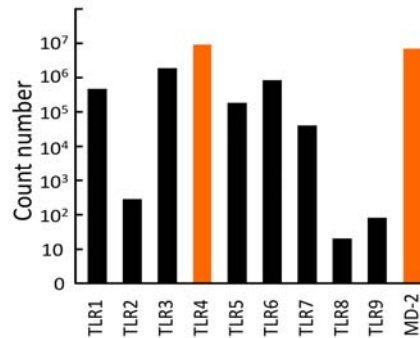


図 1 PIE細胞におけるTLRファミリーの発現

イムノバイオティクス候補菌株中で、ETEC による炎症応答を軽減する菌株が選抜された。(6) PIE細胞とブタ腸管パイエル板免疫担当細胞との共培養系を確立し、イムノバイオティクスの分子免疫評価系としての発展的応用性が期待された (図 2)。

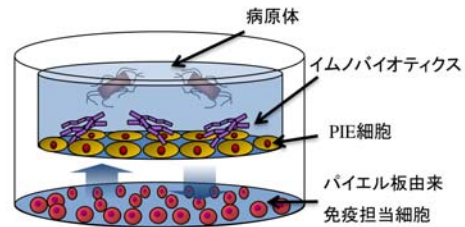


図 2 PIE細胞による共培養系の確立

(7) PIE細胞をイムノバイオティクスで前刺激することにより、ETEC による炎症誘導が顕著に抑制された。イムノバイオティクスによる抗炎症性発揮の機構について、受容体と細胞内シグナル伝達の側面から解析し、炎症性サイトカインやケモカインの誘導阻害機構が考えられた。

以上の研究により、抗炎症性のイムノバイオティクスの選抜とその評価が可能となり、その機構解明が飛躍的に進むものと期待される。今後、本研究を基礎として、より生体を反映させた評価系の構築とともに、機構解明を進め、炎症性腸疾患予防のための「イムノバイオティック食品」の創製に向けた研究のさらなる発展が期待される。

## 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 13 件)

- ① Shimazu, T., M. Tohno, S. Katoh, T. Shimosato, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Utilization of the porcine system to study lymphotoxin- $\beta$  regulation in intestinal lymphoid tissue. Biochem.

Genet., 47, 126-136 (2009). 査読有

② 遠野雅徳、齋藤忠夫、北澤春樹、ヒトモデルとしてのブタにおけるTLRファミリーの解析と乳業界における発展的利用性、*ミルクサイエンス*、57、79-85 (2009). 査読有

③ Kanaya, T., K. Miyazawa, I. Takakura, W. Itani, K. Watanabe, S. Ohwada, H. Kitazawa, M. T. Rose, H. R. McConochie, H. Okano, T. Yamaguchi, H. Aso. *Am. J. Physiol-Gastrointest. Liver Phys.*, 295, G273-284 (2008). 査読有

④ Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, A. Uehara, H. Takada, A. Kawasaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Saito, H. Kitazawa. Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine. *Mol. Immunol.*, 45 1807-1817 (2008). 査読有

⑤ Iliev, I. D., M. Tohno, D. Kurosaki, T. Shimosato, F. He, M. Hosoda, T. Saito, H. Kitazawa. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand. J. Immunol.*, 67, 370-376 (2008). 査読有

⑥ Moue, M., M. Tohno, T. Shimazu, T. Kido, H. Aso, T. Saito, H. Kitazawa. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *BBA-Gen. Subjects*, 1780, 134-144 (2008). 査読有

⑦ Tohno, M., W. Ueda, Y. Azuma, T. Shimazu, S. Katoh, J. M. Wang, H. Aso, H. Takada, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa. Molecular cloning and functional characterization of porcine Nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2). *Mol. Immunol.*, 45, 194-203 (2008). 査読有

⑧ Kitazawa, H., M. Tohno, T. Shimosato, T. Saito. Development of molecular immunoassay system for probiotics via Toll-like receptors based on food immunology. *Anim. Sci. J.*, 79, 11-21 (2008). 査読有

⑨ Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa. Molecular cloning and functional characterization of porcine MyD88 essential for TLR signaling. *Cell. Mol. Immunol.*, 4, 369-376 (2007). 査読有

⑩ Tohno, M., T. Shimosato, Y. Kawai, H. Aso, S. Ikegami, N. Taketomo, T. Saito, H.

Kitazawa. An advanced molecular immunoassay system for immunobiotic lactic acid bacteria using a transfectant of Toll-like receptor 2. *Anim. Sci. J.* 78, 195-205 (2007). 査読有

⑪ Tohno, M., T. Shimazu, W. Ueda, D. Anzawa, H. Aso, J. Nishimura, Y. Kawai, Y. Saito, T. Saito, H. Kitazawa. Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.*, 44, 2566-2577 (2007). 査読有

⑫ Tohno, M., T. Shimosato, M. Moue, H. Aso, K. Watanabe, Y. Kawai, T. Yamaguchi, T. Saito, H. Kitazawa. Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Vet. Res.*, 37, 791-812 (2006). 査読有

⑬ 北澤春樹、遠野雅徳、下里剛士、齋藤忠夫、豚腸管におけるToll様受容体の機能発現と食品免疫学への応用、*獣医畜産新報*、59、559-561 (2006). 査読無

[学会発表] (計 16 件)

① 島津朋之、遠野雅徳、下里剛士、麻生 久、川井 泰、齋藤忠夫、北澤春樹、イムノバイオティクスのブタ腸管上皮細胞における抗炎症作用、日本畜産学会第110回大会、日本大学、藤沢市、3月27-29日(2009).

② 下里剛士、遠野雅徳、西村順子、川井 泰、齋藤忠夫、北澤春樹、*Streptococcus thermophilus lacZ*からの強免疫刺激性DNAモチーフの発見、日本畜産学会第110回大会、日本大学、藤沢市、3月27-29日(2009).

③ Kitazawa, H., H. Aso, Development of evaluation system for immunobiotics, Multilateral Workshop, "Challenge for the reduction of antimicrobial use in animal production." つくば国際会議場、つくば、11月11日(2008).

④ Shimazu, T., M. Tohno, M. Moue, H. Aso, T. Saito, H. Kitazawa, An immuno-evaluation system for anti-inflammatory probiotics using originally established porcine epitheliocyte (PIE) cells. ADSA-ASAS Joint Meeting, Indianapolis, USA, 7月7-11日(2008).

⑤ Shimosato, T., M. Tohno, T. Sato, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Immuno-stimulatory AT oligodeoxynucleotide from *Lactobacillus gasseri* requires a specific self-stabilized structure. ADSA-ASAS Joint Meeting, Indianapolis, USA, 7月7-11

日 (2008).

⑥ 島津朋之、遠野雅徳、馬上真之、藤江 瞳、川井 泰、麻生 久、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタ腸管上皮細胞によるプロバイオティクスの新規ヒトモデル腸管抗炎症評価系の構築、日本畜産学会第 109 回大会、水戸市、3 月 27-29 日 (2008).

⑦ 遠野雅徳、植田 渉、島津朋之、森江恭子、麻生 久、川井 泰、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタ腸管におけるNOD1 および 2 の発現とイムノバイオティクスによる発現増強、日本畜産学会第 108 回大会、岡山市、9 月 26-27 日 (2007).

⑧ Kitazawa, H., M. Tohno, T. Saito, Immunoregulatory Factors from Probiotics. (invited), 13th International Congress of Mucosal Immunology, Shinagawa, Tokyo, 7 月 10-11 日 (2007).

⑨ Shimazu, T., M. Tohno, S. Katoh, T. Shimosato, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Preferential expression of lymphotoxin- $\beta$  by immunobiotics in GALTs of neonatal swine. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Shinagawa, Tokyo, 7 月 10-11 日 (2007).

⑩ Tohno, M., T. Shimazu, W. Ueda, D. Anzawa, H. Aso, J. Nishimura, Y. Kawai, Y. Saito, T. Saito, H. Kitazawa, Extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* is a novel ligand for porcine RP105/MD-1 strongly expressed in gut-associated lymphoid tissues. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, 7 月 10-11 日 (2007).

⑪ 遠野雅徳、島津朋之、川井 泰、齋藤忠夫、麻生 久、北澤春樹、ブタ腸管におけるイムノバイオティクスのTLR2 を介する免疫機能発現、日本畜産学会第 107 回大会、相模原市、3 月 27-29 日 (2007).

⑫ 島津朋之、遠野雅徳、加藤真一郎、下里剛士、麻生 久、川井 泰、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタlymphotoxin- $\beta$  (LT- $\beta$ ) のクローニングと腸管における発現増強、日本畜産学会第 107 回大会、相模原市、3 月 27-29 日 (2007).

⑬ 遠野雅徳、北澤春樹、TLRの腸管における機能発現を基礎としたイムノバイオティク評価系の構築、日本食品免疫学会 第 2 回学術大会シンポジウム 1、昭和女子大学、東京、10 月 23-24 日 (2006).

⑭ 四阿祐子、遠野雅徳、下里剛士、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫、北澤春樹、プロバイオティクスの細胞内レセプターNod を介する分子免疫活性評価系の構築、第 56 回東北畜産学会大会、秋田市、8 月 31 日-9 月 1 日 (2006).

⑮ Tohno, M., T. Shimosato, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Development of a novel immunoassay system for immunobiotics that modulate intestinal immunity through Toll-like receptor 2. ADSA-ASAS Joint Meeting, Minneapolis, USA, 7 月 9-13 日 (2006).

⑯ Kitazawa, H., M. Tohno, T. Shimosato, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, Immunobiotic lactic acid bacteria induce immune responses in immature gut-associated lymphoid tissues via Toll-like receptors 2 and 9. ADSA-ASAS Joint Meeting, Minneapolis, USA, 7 月 9-13 日 (2006).

[図書] (計 1 件)

① 北澤春樹、遠野雅徳、プロバイオティクスからイムノバイオティクスへ生体認識機構の解明から期待される世界的発展性へ、「世界の発酵乳」分担、はる書房、152-171 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Drug and food composition for enhancing immune response containing AT oligonucleotide as the active ingredient.  
発明者 : Kitazawa, H, T. Saito, T. Shimosato, T. Sasaki, Y. Ito,

権利者 : 明治ホールディングス(株)

種類 : 国際特許

番号 : WO 2006/093118 A1

出願年月日 : 9 月 8 日 (2006).

国内外の別 : 国外

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号 : 1 0 2 0 4 8 8 5

(2) 研究分担者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 0 0 1 1 8 3 5 8

麻生 久 (ASO HISASHI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号 : 5 0 2 4 1 6 2 5

川井 泰 (KAWAI YASUSHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号 : 0 0 2 6 1 4 9 6

(3) 連携研究者

なし