

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04857

研究課題名(和文)免疫賦活作用を有する乳酸菌由来膜小胞の産生の制御とその機能性の設計

研究課題名(英文) Regulation of lactic acid bacteria-derived membrane vesicle production with immunostimulatory activity and their functionality design

研究代表者

山崎 思乃 (YAMASAKI, Shino)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：50602182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌 *Lactobacillus sakei* が産生する膜小胞(膜小胞メンブランベシクル(MV))は粘膜面での感染防御に重要な免疫グロブリン(Ig)Aの産生を増強することから、粘膜アジュバントへの応用を目指して研究を進めた。まず、MVによるパイエル板細胞からのIgA産生増強メカニズムを解析し、MVがToll様受容体2を介して樹状細胞を活性化してB細胞のクラススイッチ組換えや形質細胞への分化を促進することを明らかにした。さらに、乳酸菌の培養時間や温度などの培養因子がMVの産生量のみならずその免疫賦活活性にも影響することを見出し、MVの実用化には「量」と「質」の両者を考慮する必要があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの乳酸菌の機能性研究は菌体構成成分や代謝物の作用に着目してきたのに対し、本研究はこれらを「積み荷」として乳酸菌が産生するMVを介した新たな免疫調節機構を明らかにした。また、宿主の腸管に共生する膨大な数の腸内細菌もMVを産生していると考えられ、免疫調節成分を搭載したMVが宿主の腸管免疫系に直接作用するという本研究の知見は、腸内細菌研究に新たな視点をもたらすものである。さらに、乳酸菌のMVを介した腸管免疫系の活性化に関する知見は、MVの粘膜アジュバントとしての応用のみならず、健康の維持増進や感染症予防に向けた機能性食品としての応用にもつながるものであり、社会的な意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Immunoglobulin A (IgA) plays an important role in defense mechanisms against pathogens on mucosal surfaces. Membrane vesicles (MVs) produced by a lactic acid bacterium, *Lactobacillus sakei* enhanced IgA production in Peyer's patch cells isolated from the murine small intestine. To apply MVs as safe mucosal vaccine adjuvants, we analyzed the mechanisms of MV-mediated IgA production enhancement in Peyer's patch cells. It was excluded that MVs activated dendritic cells via Toll-like receptor 2 and induced the production of several factors involved in the class switch recombination of B cells and their differentiation into plasma cells. In addition, we found that culture factors such as culture period and temperature affected not only the amount of MVs produced by lactic acid bacteria but also the immunostimulatory effect, indicating the need to consider both the amount and the quality of MV.

研究分野：生物工学

キーワード：乳酸菌 膜小胞 腸管免疫 免疫グロブリンA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病原体の多くは粘膜面から体内に侵入し、感染症を引き起こす。感染症の予防にはワクチン接種が有効であるが、従来の皮下接種型ワクチンは血中に免疫グロブリン (Ig) G を主とする抗体産生を誘導するものの、粘膜面での感染予防に重要な IgA 産生は誘導されない。粘膜から投与する粘膜ワクチンは粘膜面に IgA を誘導できると期待されているが、十分な効果を得るためにはアジュバント (免疫賦活剤) の併用が必要である。

一方、多くの細菌はメンブランベシクル (MV) と呼ばれるナノメートルサイズの膜小胞を産生する。MV はタンパク質や核酸、細胞壁成分などを包接し、菌体間の情報伝達を担うが、近年、宿主の生体調節作用を有することが報告されている。我々も乳酸菌 *Latilactobacillus* (旧属名 *Lactobacillus*) *sakei* subsp. *sakei* NBRC 15893 の産生する MV がパイエル板細胞からの IgA 産生を増強することを見出し、MV の粘膜アジュバントへの応用を目指している。しかし、MV 研究は病原性グラム陰性菌で先行しており、乳酸菌のような有用グラム陽性菌の MV の機能や産生機構に関する知見はいまだ少ない。また、MV を粘膜アジュバントとして応用するには、MV を一定量確保する必要があるが、厚い細胞壁をもつグラム陽性菌の MV 産生量はグラム陰性菌と比較して少ないという問題がある。

### 2. 研究の目的

乳酸菌 *L. sakei* NBRC 15893 が産生する MV が粘膜免疫系を活性化して IgA 産生を増強すること、また、乳酸菌は食経験に基づく安全性が高いことから、本菌株の MV を粘膜アジュバントとして利用することを目指す。そこで本研究では、まず *L. sakei* NBRC 15893 の MV がマウスパイエル板細胞において IgA 産生を増強するメカニズムを解明し、粘膜アジュバントとしての有効性を明らかにする。さらに、厚い細胞壁をもつグラム陽性菌の乳酸菌が MV を産生する機構を理解し、それに基づいて乳酸菌の MV 産生を制御することで、MV が量産できる条件を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳酸菌の培養

*L. sakei* NBRC 15893 は MRS 液体培地中、嫌気条件下にて 30°C で 24 時間培養した。

#### (2) MV の精製

本培養液を遠心分離し、上清をフィルターろ過 (0.2  $\mu$ m) して菌体を除去した後、超遠心分離 (100,000  $\times$  g, 1 h) した。沈殿を 10~45% (w/v) イオジキサノールの密度勾配で超遠心分離 (100,000  $\times$  g, 6 h) し、透過型電子顕微鏡にて MV が観察されたフラクションを回収した。また、タンパク質濃度を BCA 法で、脂質濃度を蛍光色素 FM4-64 による蛍光染色 (励起波長 515 nm、蛍光波長 640 nm) で測定し、MV を定量した。

#### (3) 細胞培養と抗体・サイトカインの定量

細胞培養には 10% (v/v) ウシ胎児血清および抗生物質を含む RPMI1640 培地を使用し、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 37 °C で培養した。BALB/c マウスの小腸からパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理によりパイエル板細胞を調製して 4 日間培養した。また、BALB/c マウスの大腿骨および脛骨より採取した骨髓細胞を 20 ng/mL GM-CSF を含む培地で 7 日間培養し、CD11c 陽性細胞を骨髓由来樹状細胞 (BMDC) として用いた。上清中の IgA は ELISA 法で定量した。

#### (4) リアルタイム PCRs

BMDC から抽出した RNA を鋳型として cDNA を合成した。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS), BAFF, APRIL, レチナル脱水素酵素 (RALDH) 1 および 2, interleukin (IL) -4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-, TGF-, IFN- をコードする遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。遺伝子の発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準遺伝子とし、Ct 法で解析した。

#### (5) マウスを用いた腸管ループアッセイ

BALB/c マウスの小腸にパイエル板を含むループを作製し、蛍光色素 FM4-64 で標識した MV を投与した。2 時間後、パイエル板を摘出して凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いて組織学的に分析した。

## 4. 研究成果

### (1) MV の IgA 産生増強のメカニズム

*L. sakei* NBRC 15893 は直径が 30~400 nm の MV を産生し、マウスパイエル板細胞からの IgA 産生を増強する<sup>1)</sup>。この MV を介した IgA 産生増強メカニズムを解明するため、まずは樹状細胞の役割について解析した。CD11c を樹状細胞のマーカーとして、パイエル板細胞から CD11c 陽性細胞を除去したところ、MV によって促進された IgA 産生が顕著に抑制された。これより、MV は樹状細胞を活性化し、産生される因子を介して IgA 産生を増強していると推定した。

そこで、樹状細胞が産生し、IgA 産生を増強する因子を特定するため、BMDC を MV で刺激し、炎症性サイトカインや IgA 産生に関わる遺伝子の発現をリアルタイム PCR で調べた。MV は IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , iNOS および RALDH2 の遺伝子発現を増加させた。また、組換え IL-6, IL-10, IL-12 および TNF- $\alpha$  をパイエル板細胞に添加すると、rIL-6 のみが IgA 産生を増強した。さらに、iNOS 阻害剤 (1400W)、RALDH2 阻害剤 (DEAB) および抗 IL-6 抗体存在下にて、パイエル板細胞を MV で刺激すると、IgA 産生は 1400W 添加群では 69%、DEAB 添加群では 57%、抗 IL-6 抗体添加群では 78%抑制された。以上より、MV 刺激により樹状細胞が産生した NO とレチノイン酸が IgA クラススイッチ組換えを、IL-6 が形質細胞への分化を促進した結果、パイエル板細胞における IgA 産生が増強したことが示唆された<sup>2)</sup>。

### (2) MV の認識に関わる受容体の特定

ToII 様受容体 (TLR) 2 はグラム陽性菌の細胞壁成分の認識に関わる。パイエル板細胞の TLR2 を中和抗体で中和すると、MV による IgA 産生の増強作用は消失した。また、BMDC においても NO 産生を指標とし、同様に TLR2 の関与を調べたところ、MV によって誘導された NO 産生は中和抗体により抑制された。また、上述の BMDC の MV 刺激に対する応答は菌体に対する応答と類似していたことから、MV は細胞壁成分を包接することで TLR2 を介して DC を活性化することが示唆された<sup>2)</sup>。

### (3) MV の生体内での挙動

MV の腸管管腔からパイエル板内への移行をループアッセイにより調べたところ、パイエル板内に MV の蛍光シグナルを検出した。特に、樹状細胞が多く存在する上皮領域に顕著に検出されたことから、本菌株の MV は管腔からパイエル板内に取り込まれ、標的細胞である樹状細胞に直接作用する可能性が示された<sup>2)</sup>。

### (4) 乳酸菌の MV 産生条件の検討

厚い細胞壁をもつグラム陽性菌の乳酸菌が MV を産生するためには、細胞膜が細胞壁を超えて菌体外に放出される、すなわち、細胞壁に小孔や局所的に脆弱な部分が形成される必要があると考えられる。*L. sakei* NBRC 15893 の各培養フェーズにおける MV 産生量を調べたところ、定常期以降、MV 産生量が徐々に増加し、死滅期において顕著に増加することがわかった。これは、溶菌によって細胞壁の構造が脆弱になり、細胞膜が菌体外に放出されやすくなったためであると考えられる。また、培養温度に関しても、至適温度よりも高温で培養すると MV 産生量が增大することがわかった。一方で、得られた MV の免疫賦活活性も変化したことから、粘膜アジュバントとしての MV の応用を考える場合、MV の「量」のみならず「質」についても考慮する必要があることがわかった。

## 5. 今後の展望

本研究では、乳酸菌が産生する MV が粘膜免疫系において重要な IgA 産生を増強するメカニズムを明らかにした。これまでの乳酸菌研究は、菌体そのものや有機酸などの代謝物の機能に焦点を当てており、MV を介した宿主の生体調節作用については見過ごされてきた。我々は、本菌株に限らず、乳酸菌の多くが MV を産生すること、また、乳酸菌の MV が免疫賦活以外にも多様な生理活性を有する可能性を見出している。本研究で得られた知見は、乳酸菌研究に MV という新たな視点をもたらすとともに、いまだ不明な点が多い MV の機能性やその産生機構の理解につながるものである。

### <引用文献>

- 1) S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, T. Nakayama, J. Kunisawa, Y. Katakura: IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC15893, *Biosci. Microbiota Food Health*, **38**, 23-29 (2019)
- 2) Y. Miyoshi, A. Saika, T. Ngatake, A. Matsunaga, J. Kunisawa, Y. Katakura, S. Yamasaki-Yashiki: Mechanisms underlying enhanced IgA production in Peyer's patch cells by membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **85**, 1536-1545 (2021)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Miyoshi, A. Saika, T. Ngatake, A. Matsunaga, J. Kunisawa, Y. Katakura, S. Yamasaki-Yashiki	4. 巻 85
2. 論文標題 Mechanisms underlying enhanced IgA production in Peyer's patch cells by membrane vesicles derived from <i>Lactobacillus sakei</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1536-1545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Taniguchi, M. Nanbo, Y. Katakura, S. Yamasaki-Yashiki	4. 巻 40
2. 論文標題 Adhesion mechanisms of <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 10602 to dietary fiber	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2020-003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Kawai, A. Tsuchiya, J. Ishida, N. Yoda, S. Yamasaki-Yashiki, Y. Katakura	4. 巻 129
2. 論文標題 Suppression of lactate production in fed-batch culture of some lactic acid bacteria with sucrose as the carbon source	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 535-540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 山崎（屋敷）思乃	4. 巻 84
2. 論文標題 細菌がつくる膜小胞メンブランベシクル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, T. Nakayama, J. Kunisawa, Y. Katakura	4. 巻 38
2. 論文標題 IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> NBRC15893.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.18-015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山崎 思乃
2. 発表標題 プロバイオティクスの膜小胞を介した腸内環境制御の可能性
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, A. Saika, T. Nagatake, A. Matsunaga, J. Kunisawa, Y. Katakura
2. 発表標題 Enhancement of intestinal IgA production via Peyer's patch dendritic cells by membrane vesicles derived from lactic acid bacteria ( <i>Lactobacillus sakei</i> )
3. 学会等名 ISEV2020 Virtual Meeting(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 思乃, 三好 柚紀, 雑賀 あずさ, 長竹 貴広, 松永 安由, 國澤 純, 片倉 啓雄
2. 発表標題 乳酸菌 <i>Lactobacillus sakei</i> のメンブランベシクルによる腸管IgA産生増強メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 晴菜, 仲田 真穂, 前田 新一, 雑賀 あずさ, 國澤 純, 片倉 啓雄, 山崎 思乃
2. 発表標題 Lactobacillus antri が産生するメンブランベシクルのIgA産生促進作用の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好 柚紀, 井谷 彩乃, 雑賀 あずさ, 長竹 貴広, 松永 安由, 國澤 純, 片倉 啓雄, 山崎 思乃
2. 発表標題 Lactobacillus sakei 由来メンブランベシクルによるIgA産生促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井 瑞季, 倉田 淳志, 三好 柚紀, 山崎 思乃, 今井 友也, 栗原 達夫, 上垣 浩一
2. 発表標題 相模湾由来単離株51-CS のメンブランベシクルの特性の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好 柚紀, 山崎 思乃, 仲田 真穂, 中山 知哉, 國澤 純, 片倉 啓雄
2. 発表標題 乳酸菌Lactobacillus sakeiが産生するメンブランベシクルの免疫調節作用の解析
3. 学会等名 2018年度 日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好 柚紀, 山崎 思乃, 中山 知哉, 國澤 純, 片倉 啓雄
2. 発表標題 Lactobacillus sakei由来メンブランベシクルを介するIgA産生促進作用の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉田 淳志, 清原 昇悟, 宮崎 綾乃, 三好 柚紀, 山崎 思乃, 今井 友也, 上垣 浩一
2. 発表標題 発酵食品に関する微生物のメンブランベシクルの特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 瑞季, 倉田 淳志, 三好 柚紀, 山崎 思乃, 今井 友也, 上垣 浩一
2. 発表標題 深海底泥由来単離株51-CSのメンブランベシクルの特性解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, J. Kunisawa, Y. Katakura
2. 発表標題 Enhancement of intestinal IgA production by membrane vesicles derived from Lactobacillus sakei
3. 学会等名 The 13th International Symposium in Science and Technology at Cheng Shiu University 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	片倉 啓雄  (KATAKURA Yoshio)  (50263207)	関西大学・化学生命工学部・教授    (34416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------