

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05539

研究課題名（和文）乳酸菌のC型レクチン受容体を介した抗炎症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of anti-inflammatory mechanism mediated by C-type lectin receptor of lactic acid bacteria

研究代表者

島津 朋之（shimazu, tomoyuki）

宮城大学・食産業学群・准教授

研究者番号：20616437

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）：乳酸菌の健康機能性はよく知られるようになったが、その原因物質については不明な点が多い。本提案では、乳酸菌と宿主の接触において、これを最も初期に感知する宿主微生物センサーの一つ、C型レクチン受容体に焦点を絞り研究を行った。その結果、C型レクチン受容体の一つであるMincle受容体と反応する乳酸菌が認められ、この乳酸菌を摂取したマウスでは炎症を抑制するTregが増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康への関心が高まっている現在、乳酸菌への興味関心は非常に高い。腸内細菌叢の人体に与える多大な影響が明らかになるにつれ、食素材として比較的利用しやすい乳酸菌の健康増進効果への期待は、今後もますます高まっていくと考えられる。本研究は、免疫応答の最も初期層に位置する、「乳酸菌のどの成分が、宿主のどの受容体に認識されるのか」を明らかにすることで乳酸菌のより高度な有効利用に繋げるものである。

研究成果の概要（英文）：Although the health-promoting effects of lactic acid bacteria (LAB) have been well recognized, the mechanism underlying these effects is still obscure. Therefore, it is important to clarify the relationship between LAB and innate immune receptors that mediate the initial response. In this study, we focused on C-type lectin receptors (CLRs), one of the innate immune receptors, and eventually found that Mincle can recognize certain LAB. Moreover, feeding this LAB led to the increase of Treg in the intestine, which is the cell known to have an anti-inflammatory effect.

研究分野：食品免疫

キーワード：乳酸菌 CLR Treg

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

健康への関心が高まっている現在、乳酸菌への興味関心は非常に高い。腸内細菌叢の人体に与える多大な影響が明らかになるにつれ、食素材として比較的に利用しやすい乳酸菌の健康増進効果への期待は、今後もますます高まっていくと考えられる。一方、乳酸菌は食品や動物の腸など、自然界に幅広く存在し、また、分離が容易であることから機能性食品資源としてよく利用されている。

近年、風邪予防やアレルギー症状軽減など、免疫に働きかけることを主体とする商品が数多く認められるようになった。これに関連して、様々な免疫細胞の活性化が症状軽減の作用メカニズムとして報告されている。しかし、免疫応答の最も初期層に位置する、「乳酸菌のどの成分が、宿主のどの受容体に認識されるのか」についてはほぼ未解明なままであり、結果的な免疫細胞の活性化がどのように起こるのか明らかになっていない。菌体は複合体であり、様々な成分が強弱をともなって反応するが、この初期反応を評価することが乳酸菌のより高度な有効利用に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

乳酸菌を含めた細菌、そして真菌などの微生物には、それぞれ普遍的に保有された成分が存在し、免疫はこれらを認識する受容体を持つことで初期免疫応答を惹起し、その後続く免疫応答を決定する。C型レクチン受容体ファミリー分子(CLR: c-type lectin receptor)は微生物認識受容体の一つとして知られており、一般的に糖鎖成分の認識に関与することが知られている。しかし、その研究史は浅く、乳酸菌との関わりは未解明な点が多い。

これまで、乳酸菌の抗炎症作用についての研究を行う中で、ある種の乳酸菌が炎症を抑制する制御性T細胞(Treg)を惹起し、結果的にマウス大腸炎が軽減する事を認めている。その中で、乳酸菌がCLRに認識されること、そしてこの認識が抗炎症活性に必須であることを示唆する結果を得ている。そこで、本研究ではCLRを介する免疫応答を評価し、Tregとの関わりを明らかにすることを目的とした。これにより、抗炎症作用を持つ乳酸菌の選抜指標が得られるものと期待している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳酸菌の培養

Treg誘導能を認めている *L. murinus* のほか、研究室で保有する乳酸菌をMRS培地で培養後、オートクレーブ処理し凍結乾燥した。

#### (2) 乳酸菌と反応するCLR受容体の探索

##### ・CLR-Fcの作成

各CLR分子の細胞外領域をコードするDNA配列を、IgG抗体のFc部分の遺伝子を含むプラスミドに挿入した。これをタンパク質発現用細胞であるExp1CHO-S™に導入し、CLR-Fcを発現させた。培養上清を精製後、ウェスタンブロットで目的タンパクの存在を確認した。作成した12種類のCLR-Fcを用いて、乳酸菌の熱殺菌菌体または生菌、凍結融解した菌への結合をFACS法により解析した。

##### ・CLRレポーター細胞の作成

プラチナムレトロウイルス発現システムを用いてウイルス産生し、NFAT-GFP 2B4細胞へ感染させることでMincle強制発現レポーター細胞を構築した。これらを用いて、研究室で保有している乳酸菌の評価を行なった。評価は、刺激後のGFP発現量をFACSにより解析することで転写因子NFATの活性化を評価している。

#### (3) 樹状細胞を用いたCLR介在性の検討

C57BL/6マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取し、GM-CSFを用いて骨髓由来樹状細胞を作成した。この樹状細胞に様々なCLRのシグナル伝達に関わるsykに対する抑制剤を使用することで、CLR介在性について検討を行った。具体的には、骨髓樹状細胞にsyk抑制剤を添加後、乳酸菌で刺激し培養上清中のサイトカイン(IL-6、TNF、IL-10)を測定した。

#### (4) 抗生物質投与により無菌化したマウスへの乳酸菌投与が腸管T細胞分化に与える影響

5週齢のC57/BL6マウスに、アンピシリン、バンコマイシン、ネオマイシン、メトロニダゾール、フルコナゾール、ゲンタマイシンを添加した飲料水を自由飲水で与えた。6週齢目から、このマウスにゾンデを使用して熱殺菌菌体を200µLずつ、1日1回、4週間連続投与した。10週齢目に解剖して大腸粘膜固有層から細胞を採取した。T細胞分化にTregはFoxp3、Th1、Th2、Th17はPMA/イオノマイシン刺激後にIFN-、IL-4、IL-17をFACSを用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳酸菌と CLR-Fc の反応性について

これまで *L. murinus* の Treg 反応性について検討を行い、CLR 関与の可能性を認めていた。本研究ではまず、*L. murinus* と具体的な CLR との関わりを明らかにするため、計 12 種類の CLR-Fc を作成し、これらが *L. murinus* に結合するかどうかで評価を行っている。しかし、残念ながら現時点で *L. murinus* に結合を示す CLR は得られておらず、他の CLR 受容体を検討中である。

その一方、独自に保有している乳酸菌について検討したところ、*Lactobacillus brevis* La37 という株に関して、CLR の一つである Mincle が結合することを見出した(図 1A)。さらに、EDTA を用いて  $Ca^{2+}$  への依存性について検討したところ、EDTA 添加により結合が抑制されたことから、非特異的な結合ではないと考えられる。

この結合についてさらに Mincle を強制発現させた 2B4 レポーター細胞を用いて検討を行った(図 1B)。ここにおいても転写因子 NFAT の乳酸菌添加量依存的な NFAT の活性化が認められ、結合のみではなく、細胞内へのシグナル伝達も可能であることが明らかとなった。このことから、*L. brevis* La37 は確かに Mincle に対するリガンドを持つことが明らかとなった。

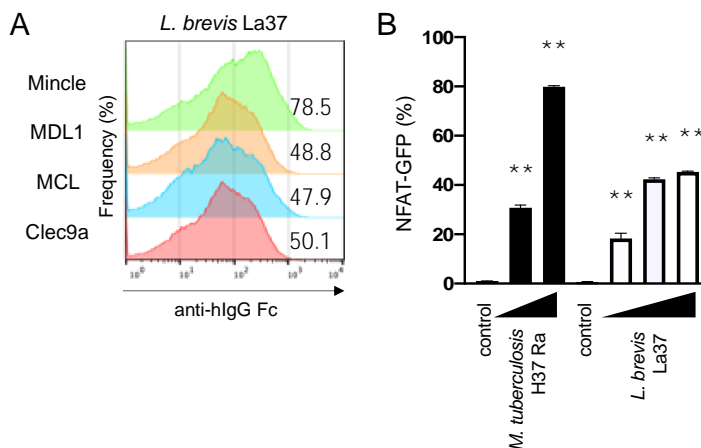


図1 *L. brevis* La37 (0.1, 1, 10 $\mu$ g)のMincle反応性。(A)様々なCLR-Fcを作成後、乳酸菌への結合性について検討した。(B)Mincleレポーター細胞への刺激活性。Mincleのリガンドを持つ *M. tuberculosis* (1, 10 $\mu$ g)も転写因子(NFAT)を活性化している。

上記の試験においては、細胞と乳酸菌の共培養を行うことから基本的に熱処理を行った死菌体を用いている。興味深いことに、熱殺菌菌体で認められた Mincle 反応性は、生菌体では認められなかった。生菌を用いた試験は Mincle-Fc でのみ行っているが、Mincle に反応するリガンドがどのように死菌体表面に出てくるのか依然不明である。しかし、死菌体の Proteinase K 処理により Mincle 反応性は完全に失われることから、タンパク質そのものか、タンパク質が足場となっているのではと考えている。

##### (2) 樹状細胞における CLR シグナル関与の可能性の検討について

*Lactobacillus brevis* La37 の CLR シグナルを介した免疫応答を明らかにするため、Mincle シグナルによっても活性化されることが知られる syk に対する抑制剤を用いて、サイトカイン産生量(IL-6、TNF、IL-10)への影響について検討をおこなった。その結果、全てのサイトカインの減少が認められたが特に IL-10 に対する影響が大きかった(図 2)。これまで、CLR の代表的受容体である Dectin-1 に関する研究として、パターン認識受容体として代表的な TLR との協調作用が、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生量を相乗的に増加することが報告されている。La37 株においても Mincle もしくは他の CLR と TLR との協調作用があるのではないかと考えられる。

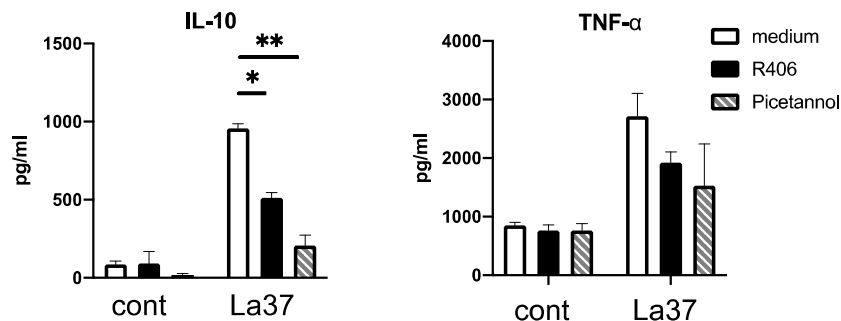


図2 syk抑制剤(R406、Picetannol)添加がLa37のサイトカイン産生に及ぼす影響

##### (3) *L. brevis* La37 株のマウス投与が腸管 T 細胞分化へ与える影響の解析

*L. brevis* La37 株の生体での影響を検討するため、マウスを用いて腸管 T 細胞分化への影響を検討した。抗生物質の投与は内在の腸内細菌叢の影響をできるだけ減少させるためである。およそ 1 ヶ月の La37 株死菌体投与ののち、大腸粘膜固有層中の Treg 割合について検討した。その結果、Treg の増加が認められた(図 3)。しかし、Th1、Th2、Th17 といった細胞に関しては増加が認められなかった。Mincle に反応しなかった他の乳酸菌を用いた同様の試験においては、Treg の増加が認められておらず、Mincle が Treg の分化に直接的に関わるのか非常に興味深い。

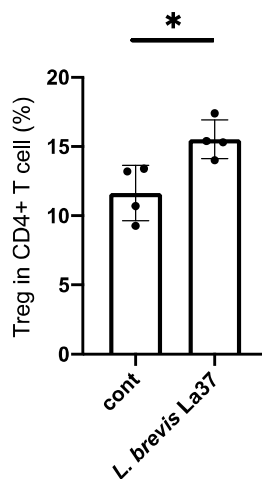


図3 抗生物質投与により無菌化したマウスに対するLa37株投与の影響。死菌体を1ヶ月連続投与後に大腸粘膜固有層中のTreg割合を計測した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Han Wei、Tang Ce、Baba Seiya、Hamada Tomofumi、Shimazu Tomoyuki、Iwakura Yoichiro	4. 巻 206
2. 論文標題 Ovalbumin-Induced Airway Inflammation Is Ameliorated in Dectin-1 <sup>-</sup> Deficient Mice, in Which Pulmonary Regulatory T Cells Are Expanded through Modification of Intestinal Commensal Bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1991 ~ 2000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001337	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島津朋之、岩倉洋一郎
2. 発表標題 腸管Tregを誘導するLactobacillus murinusのTreg誘導成分探索
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島津 朋之、鈴木優奈、斎藤芽依、橘内唯
2. 発表標題 樹状細胞で免疫刺激能を選抜した乳酸菌の腸管Treg誘導能の検討
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木下英樹、井越敬司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 205
3. 書名 乳酸菌の機能と産業利用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://researchmap.jp/7000000446/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------