

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04504

研究課題名(和文) インターフェロン- β による小腸から全身への抗炎症機構

研究課題名(英文) Anti-inflammatory mechanism from small intestine to whole body via interferon-beta

研究代表者

辻 典子 (Tsuji, Noriko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：30343990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌二本鎖RNAを認識してIFN- β を産生する消化管細胞群として、TLR3を高発現する小腸パイエル板樹状細胞を同定した。乳酸菌の経口投与により同樹状細胞画分においてTLR3およびIFN- β の発現増強が認められたのに対し、二本鎖RNAを酵素反応により除去した菌体成分を経口投与した動物ではそれらの増強が認められなかったことから、in vivoにおける同画分の重要性が示された。乳酸菌により樹状細胞に誘導されるIFN- β がT細胞免疫応答に及ぼす影響を解析したところ、IL-12の発現増強にともなうIFN- β 産生細胞の増加および経口投与後のTh1応答の増強を認めた。

研究成果の概要(英文)： Double-stranded RNA of lactic acid bacteria (LAB) is recognized by dendritic cells (DCs) via endosomal-TLR3 and benefits the anti-inflammatory response through induction of interferon- β (IFN- β). However, how such IFN- β impacts T cell immune responses, and how immune homeostasis is better maintained in the presence of commensal or food-derived LAB was unknown. Here we show that LAB enhances interleukin-12 (IL-12) secretion by DCs and differentiation of IFN- β -producing T cells in an IFN- β -dependent manner. We demonstrated that IFN- β secreted in response to LAB increased IFN regulatory factor 1 (IRF1) and IRF7 mRNA, which contribute to I112p35 expression. We clarified the DC subset in Peyer's patches that induce Th1 cell differentiation through IFN- β production in response to LAB. Th1 polarization and maintenance of Foxp3 expression by CD4+ T cells due to TLR3-mediated IFN- β production may thus confer anti-allergic or anti-inflammatory activity by commensal or probiotic LAB.

研究分野：Mucosal Immunology

キーワード：lactic acid bacteria intreferon-beta small intestine anti-inflammation dendritic cell Peyer's patch Th1 oral tolerance

1. 研究開始当初の背景

腸内に常在している乳酸菌やヨーグルト、漬物などの食物に含まれるプロバイオティクス乳酸菌は人々の健康維持・増進に効果があることが知られている。その安全性の高さ、さらには発酵食品への応用の観点から、乳酸菌は食品・医薬品業界から非常に注目されている。そのようななか我々は、乳酸菌内にある二本鎖 RNA が小腸の樹状細胞を活性化してインターフェロン- β (IFN- β) を産生させることにより抗炎症効果を発揮すること、腸炎の予防など腸管の免疫レベルの維持に直接関与することを見出していた。二本鎖 RNA は、乳酸菌が樹状細胞に貪食された後、エンドソーム内の核酸レセプター（トル様レセプター 3 : TLR3) を刺激して IFN- β を産生誘導することを報告している (*Immunity* 2013 Kawashima T, *Tsuji NM *et al.*)。この性質はほかの細菌にはみられず、乳酸菌に“特有の”健康維持・増進効果が初めて分子レベルで明らかになったことで、予防医学分野における活用が期待された。また、二本鎖 RNA を豊富に含む乳酸菌群が、腸管の免疫を活性化する機能性食品成分として有効であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではまず乳酸菌二本鎖 RNA を認識して IFN- β を産生する消化管細胞群を明らかにすることを目的とした。そのような細胞を解析し、数や質を安定化させる技術を開発することにより、乳酸菌が効率よく認識され、より高い健康増進効果を発揮する消化管免疫組織を構築できると考えられる。腸内 IFN- β で TLR3 依存性を示すのは小腸であるため、小腸に存在する樹状細胞の解析を重点的に行なうこととした。また、IFN- β 産生細胞のモニタリングには IFN- β レポーターマウスを作成し、活用することを計画した。

微生物成分が免疫系を活性化するしくみについては近年飛躍的に理解が深まってきており、動物実験を活用すると腸管の常在細菌やプロバイオティクスのはたらきも明確に示すことができる。最も顕著な例としては、微生物との相互作用が無くなった無菌マウスでは身体全体でも免疫応答が減弱することが知られている。また、無菌マウスに一部の常在細菌を定着させる（ノトバイオオートマウス）とこれが回復することも報告されている。無菌マウスにおいては消化管樹状細胞の発達や機能も未熟であることが知られており、標的細胞群の機能成熟の過程を明らかにするために無菌マウス、および乳酸菌のみで細菌叢を構築したノトバイオオートマウスを用いて解析を進めることを計画した。

次に、産生された IFN- β のシグナルを受け

て作動する抗炎症機構と獲得免疫への影響を明らかにすることを目的とした。乳酸菌が IFN- β を介して腸炎を予防するメカニズムは未知のため、IFN- β により安定化する T 細胞機能と抗炎症細胞の挙動の解明を試みた。

3. 研究の方法

乳酸菌の二本鎖 RNA は樹状細胞の TLR3 で認識され、IFN- β を誘導するため、消化管樹状細胞のうち TLR3 を高発現する細胞群を同定する。またそれらを乳酸菌と共培養した際の IFN- β 、TLR3 の発現変動を解析する。

IFN- β 産生細胞の観察を容易にする IFN- β レポーターマウスを開発する。IFN- β 産生に伴い蛍光を発する遺伝子導入マウスを作成してレポーターマウスとし、*in vitro* での蛍光解析、あるいは乳酸菌の経口投与後の *in vivo* IFN- β 発現のモニターに活用する。

同様の解析を、無菌マウスについても行い SPF マウスと比較する（細胞数、分布、IFN- β 、TLR3 の発現強度など）。動物はほぼ無菌状態で生まれてくるため、無菌マウスは新生児のモデルとも考えられる。これら乳酸菌に応答する細胞群が生後どのように発達し、機能成熟するかの理解につながる実験となる。文献的にも経口免疫寛容の成立など、消化管免疫の基盤となる機能も無菌マウスでは損なわれているが、離乳期頃までに乳酸菌と接触させることにより回復することが報告されている (Sudo N *et al. J Immunol* 1997)。こうした乳酸菌の効果が核酸および IFN- β を介して成立しているのかについて解析を進める。また、無菌状態からどのようなタイミングでこれら免疫担当細胞群が発達してくるのかを解析し、ヒトが生後離乳期を経て成長する過程での乳酸菌との共生関係、健全な免疫応答能を獲得して行くための免疫細胞の条件について、小腸の重要性を示す。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌二本鎖 RNA を認識して IFN- β を産生する樹状細胞群の同定

乳酸菌二本鎖 RNA を認識して IFN- β を産生する消化管細胞群（特にパイエル板細胞群）を同定するため、小腸免疫細胞のうち TLR3 を発現し、乳酸菌に応答する画分を同定した。その画分は DC1 細胞と表現型が一致し、抗原提示や細胞性免疫においても特に有用な働きをする細胞群であると考えられた。また、乳酸菌の経口投与が各種自然免疫関連分子の発現に及ぼす影響を解析したところ、上記パイエル板樹状細胞群において TLR3 および IFN- β の発現増強が認められたのに対し、二本鎖 RNA を酵素反応により除去した菌体成分

を経口投与した動物ではそれらの増強が認められなかったことから、in vivoにおける同樹状細胞の重要性が示された。

(2) 同樹状細胞群が乳酸菌二本鎖RNAを介して抗原特異的T細胞機能に与える影響

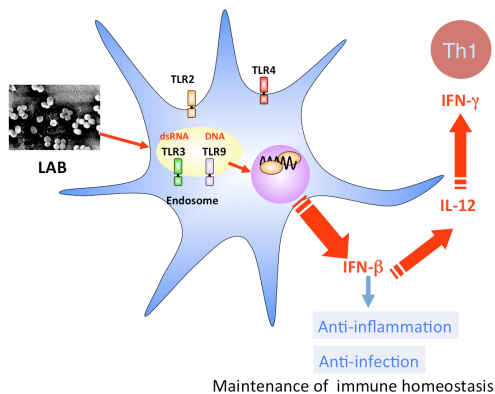
乳酸菌の核酸成分により小腸で誘導された IFN-β が T 細胞免疫応答に及ぼす影響を解析したところ、樹状細胞における IL-12 の発現増強にともなう IFN-γ 産生細胞の増加および経口投与後の Th1 応答の増強を認めた。

乳酸菌核酸による Th1 細胞の分化誘導メカニズムについてさらに検討したところ、骨髄由来樹状細胞において IFN-β 依存的に Irf1 及び Irf7 の発現増強にともない、IL-12 構成コンポーネントのうち特に IL-12p35 の産生増強が観察された。小腸パイエル板 DC 1 画分においても乳酸菌により IFN-β の発現が誘導されるとともに、Irf1 及び Irf7 など制御因子の発現も高いことから、定常状態において乳酸菌を取り込み、TLR3 のシグナルを介して Th1 分化誘導を行っていることが示唆された。

小腸パイエル板 DC 1 画分をフローサイトメーターで分取し、OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現する DO11.10 あるいは OTII マウス由来 T 細胞と共培養する実験系においては、乳酸菌および抗原存在下で IFN-γ 産生性 T 細胞の顕著な誘導効果が認められた。他の樹状細胞画分ではそのような効果は認められなかった。

さらに Type I IFN レセプター遺伝子欠損マウス由来樹状細胞を同様に in vitro 培養し、乳酸菌存在下で遺伝子発現の変化を野生型マウスと比較したところ、IFN-β、Irf1 及び Irf7 についていずれも発現が低く、T 細胞と共培養した際の Th1 細胞の増加も見られなかったことから、樹状細胞上の Type I IFN レセプターが、乳酸菌存在下で TLR 3 を介する Th1 分化誘導に必須であることが明らかとなった。

Fig.1: Scheme of the enhancement of Th1



immunity by lactic acid bacteria

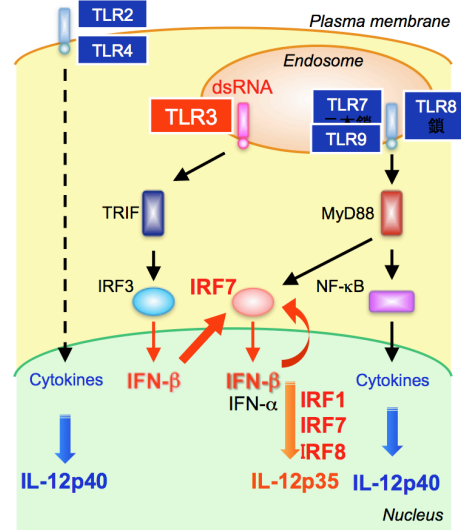


Fig.2: Induction of IL-12p35 by dsRNA of lactic acid bacteria

一方で、IFN-β 中和抗体存在下では、乳酸菌により誘導される Foxp3 分子の発現増強も低減し、微小環境で産生される IFN-β が制御性 T 細胞の維持に働く可能性も示唆された。CD103 陽性樹状細胞の特徴とされるレチノイン酸の産生についても検討したが、パイエル板 CD103 陽性樹状細胞ではレチノールデヒドロゲナーゼの発現に CD103 陰性樹状細胞との差異を認めなかった。粘膜固有層の CD103 陽性樹状細胞は、レチノイン酸および TGF-β を産生することにより Foxp3 を発現する制御性 T 細胞を誘導すると報告されているが、同経路のパイエル板内での直接の関与は小さいと考えられた。

(3) IFN-レポーターマウス作成の試み

IFN-β レポーターマウスを作出するため、Ifnb1-IRES-tdTomato アリルを考案した。すなわち、Ifnb1 遺伝子の終止コドンを含む 3' -UTR 部位に IRES-tdTomato 配列を挿入し、IFN-β と赤色蛍光タンパク tdTomato の両方を同時に発現するバイシストロニック RNA を作りだすコンストラクトを作製した。

CRISPR/Cas 法を用いて、IFN-β -IRES-tdTomato ノックインマウスの作出を試み、2 ラインのマウスを得ることができた。このノックインマウスに乳酸菌刺激を行い、赤色蛍光により IFN-β の発現をモニターすることを試みたが、予想された明らかな蛍光シグナルを検出することができなかった。

IRES-tdTomato 発現カセットと Ifnb1 遺伝子座の相性が悪く、tdTomato 遺伝子の翻訳効率が低い可能性が考えられたが、その原因は不明である。そこで現在 IRES-hCD2/CD52 発現カセットあるいは T2A リンカー配列などを利用することにより、IRES-tdTomato と異なる

るモニターシステムを持つノックインマウスの作出を検討している。

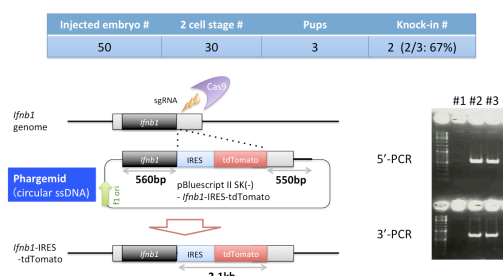


Fig.3: Generation of IFN β -IRES-tdTomato Knock-in mice by Phagemid-based CRISPR/Cas9 method (First trial)

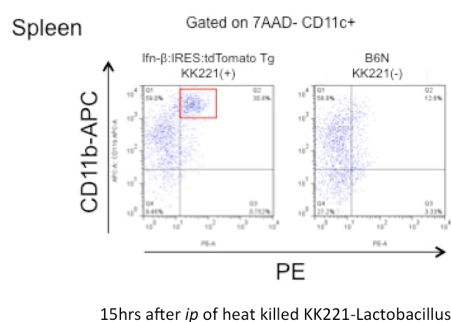


Fig.4: Validation of reporter activity of IFN β -IRES-tdTomato knock-in mice

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 29 件)

1. Kawashima T, Ikari N, Watanabe Y, Kubota Y, Yoshio S, Kanto T, Motohashi S, Shimojo N, Tsuji NM. Double-Stranded RNA Derived from Lactic Acid Bacteria Augments Th1 Immunity via Interferon- β from Human Dendritic Cells. *Frontiers Immunol.* 9(27) doi:10.3389/fimmu.2018.00027. (2018) 査読あり
2. Kawashima T, Ikari N, Kouchi T, Kowatari Y, Kubota Y, Shimojo N, Tsuji NM. The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici* K15 and the clinical impact in a randomized trial. *Sci. Reports* 8(1) 5065 doi:10.1038/s41598-018-23404-4. (2018) 査読あり
3. Adachi T, Kakuta S, Aihara Y, Kamiya T, Watanabe Y, Osakabe N, Hazato N, Miyawaki A, Yoshikawa S, Usami T, Karasuyama H, Kimoto-Nira H, *Hirayama K, Tsuji NM. Visualization of Probiotic-Mediated Ca₂₊

Signaling in Intestinal Epithelial Cells *In Vivo*. *Front Immunol.* 7:601.(2016)
doi: 10.3389/fimmu.2016.00601. (査読あり)

4. Kamiya T, Watanabe Y, Makino S, Kano H, Tsuji NM. Improvement of Intestinal Immune Cell Function by Lactic Acid Bacteria for Dairy Products. *Microorganisms.* 5(1). (2016) doi: 10.3390/microorganisms5010001 (査読あり)

5. 辻典子, 平山和宏, 安達貴弘, 乳酸菌と免疫恒常性. 炎症と免疫. 25(1): 34-41 (2017)

6. 辻典子 腸内細菌による炎症制御機構. アレルギーの臨床. 36, 2. (2016)

7. 辻典子, 閻会敏, 渡邊要平. 自然免疫シグナル腸管からの身体恒常性維持機構. 日本臨床免疫学会会誌 38(6):448-56, (2016)

[学会発表] (計 21 件)

1. 辻典子 食と共生微生物による免疫恒常性の維持機構 炎症・免疫 研究の明日を語る (マクロファージ細胞生物学研究会、日本インターフェロン・サイトカイン共済シンポジウム、東京) 2018. 3. 9
 2. 辻典子 小腸と身体に優しい発酵食品「和食と健康」～食と腸内細菌研究の新展開～ (和食文化国民会議、キヤノン財団共催シンポジウム、東京) 2018. 2. 6
 3. 辻典子 日本の発酵食品の腸管および腸内細菌叢を介する機能性について. アグリ技術シーズセミナーin北陸 (農林水産・食品産業技術振興協会、金沢) 2017. 12. 19
 4. N Ikari, T Kawashima, S Motohashi, N Shimojo, Tsuji NM Double-stranded RNA in lactic acid bacteria augments Th1 immunity via IFN- β secretion by human dendritic cells 第 46 回日本免疫学会 (仙台) 2017. 12. 14
 5. Tsuji NM. Double-Stranded RNA in Lactic Acid Bacteria Prime Protective Immunity via interferon-beta Cytokine 2017 (金沢) 2017. 10. 30
 6. Tsuji NM. Double-Stranded RNA in Commensal and Probiotic Lactic Acid Bacteria Boost Protective Immunity via Interferon- β Production 第 8 回アジア細胞治療学会 (東京) 2017. 10. 28
- [図書] (計 2 件)
1. 辻典子 粘膜免疫と食品の免疫賦活機

能. β グルカンの基礎研究と応用・利用の動向. シーエムシー出版 大野尚仁 監修 (2018 印刷中)

2. 辻 典子、発酵食品による腸内環境の最適化とアレルギー予防. ヒトマイクロバイオーム研究最前線(服部正平 監修)405-13 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：免疫賦活用組成物及びサイトカイン産生促進用組成

発明者：川島 忠臣、碓 菜穂、下条直樹、菱木はるか、辻 典子

権利者：キッコーマン株式会社、産業技術総合研究所、国立大学法人千葉大学

種類：

番号：特願 2018-099088

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 典子 (TSUJI NORIKO) 産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：30343990

(2) 研究分担者

平山 和宏 (HIRAYAMA KAZUHIRO) 東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60208858

(3) 研究分担者

角田 茂 (KAKUTA SHIGERU) 東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80345032