

平成30年 5月25日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18703

研究課題名(和文) 腸管樹状細胞評価系による腸管炎症抑制乳酸菌の機能成分探索

研究課題名(英文) Search on the functional components on lactic acid bacterium that alleviate intestinal inflammation with dendritic cell evaluation system

研究代表者

島津 朋之(Shimazu, Tomoyuki)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：20616437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus murinusは腸管樹状細胞に作用し制御性T細胞(Treg)を増加させる。本研究では、その抗炎症作用機構を明らかにする事を目的とした。無菌マウスに死菌体を投与したところ、Tregの増加が認められ、菌体成分が誘導に関わることが明らかになった。また、Tregの増加に関与するIL-10の発現量が増加した。そこで、in vitroにおいてIL-10の産生に関わる受容体探索を行ったところ、TLR2の関与が示唆された。また、C型レクチンの関与も示唆され、具体的なC型レクチン受容体の探索を行っている。本研究を進展させることで、乳酸菌の疾病予防・制御に向けた応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lactobacillus murinus acts on an intestinal dendritic cell and increases regulatory T cells (Treg). In this study, the mechanism underneath this anti-inflammatory action was examined. After giving heat killed bacterium to germfree mice, increased Treg was observed, indicating that cellular components on L.murinus is responsible for the induction of Tregs. In addition, expression of IL-10 which participate in the induction of Treg also increased. Therefore a receptor related to the production of IL-10 by L.murinus was investigated. It was found that TLR2 is involved for the recognition. In addition, the participation of the C type lectin receptor family is suggested and searches for the concrete C type lectin receptor is being conducted. This study will bring us a new therapeutic methods using lactic acid bacterium to prevent or cure certain illness.

研究分野：食品免疫

キーワード：Treg 乳酸菌 TLR CLR

1. 研究開始当初の背景

現在、炎症性腸疾患や食物アレルギーなどの現代病が急増しており、大きな社会問題となっている。特に、食生活の変化や抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れが疾病に関与すると報告され、腸内細菌叢の重要性が示唆されている。このような背景から、腸内共生細菌と腸管免疫機構に焦点をあてた研究が急速に発展し、炎症性腸疾患に関与する Th17 細胞や、炎症を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) を惹起する特定の細菌が報告された。中でも腸管は腸内細菌叢や食物抗原などの非自己抗原に常時暴露されていることから、Treg を代表とする免疫寛容システムが発達しており、無害な外来物質に対する免疫応答を抑制することで腸管の恒常性を維持している。この腸管における Treg を分化、誘導する原因物質として短鎖脂肪酸などが特定された例はあるが、未発見の有用細菌や機能性成分はまだまだ多数存在すると考えられている。今後、これら有用細菌による作用機構を明らかにすることで、疾病機構の解明のみならず、その細菌や成分の疾病制御への応用が期待される。

乳酸菌は食経験が豊富であることから一般的に安全・安心と認知されている。そのため、機能性食品等、応用へ向けた研究が盛んに行われている。我々は *Lactobacillus murinus* が Treg の誘導からマウス DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) 誘導大腸炎を軽減すること、そして腸管樹状細胞において Treg 分化誘導に必須な TGF- β や IL-10 を強く誘導することを明らかにした (Tang et al., *Cell host & Microbe*, 2015)。しかしながら、*L. murinus* の作用分子、宿主の細胞受容体ともに未解明であり、分子レベルでの作用機序解明や、それに基づく乳酸菌の高度有効利用へ向けた課題は非常に多く残っている。

2. 研究の目的

樹状細胞は Treg を始め、高度な免疫応答である T 細胞介在性免疫応答への橋渡しと、免疫応答の方向性決定に最も重要な細胞として知られる。中でも腸管樹状細胞は特殊な樹状細胞として知られ、Treg への分化誘導能が強く、他の器官で得られる樹状細胞とは異なる性質・機能を持つことが知られる。事実、本研究で使用する *L. murinus* は腸管樹状細胞における強い IL-10 や TGF- β 誘導能を持つが脾臓由来樹状細胞に対しては誘導しない。

本課題では、腸管樹状細胞と同様な反応性を見せる評価系を構築し、*L. murinus* の抗炎症機構の解析や機能成分の探索を行い炎症性腸疾患軽減に向けた有効成分を明らかにすることを目的とする。将来的には、乳酸菌やその有効成分を利用し、制御性 Treg を普段摂取する食から効率的に誘導し、様々な疾患を予防・軽減することを目指している。本

研究は *L. murinus* による炎症性腸疾患の予防・改善機構の一端を明らかにすることとなるが、最近の研究では関節炎やぶどう膜炎、腎臓疾患など、腸管外でおこる疾患が腸内細菌に影響を受けていることが示唆されており、本研究結果による抗炎症効果は多様な現代病制御への発展的応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 無菌マウスへの *L. murinus* 投与による Treg への影響

これまで、*L. murinus* 生菌の投与が Treg を増加させることが明らかとなっていた。しかし、この増加が代謝産物によるものか、菌体成分によるものかが明らかになっていない。そこで、オートクレブした *L. murinus* を連続的に無菌マウス (C57BL/6) に投与し (2×10^9 cfu/200 μ l, 4 週間) 大腸粘膜固有層中の Treg への影響を検討した。また、Treg 誘導に関わることが知られる樹状細胞についてもフローサイトメーターを用いて解析した。さらに組織におけるサイトカイン発現量について、Real-time PCR を用いて解析を行った。

(2) 抗炎症性乳酸菌評価系の確立

腸管樹状細胞、もしくはそれに機能的に類似した *in vitro* の系の樹立を目指した。まず、温度感受性変異 SV40 largeT 抗原トランスジェニックマウス (SV40 Tg) を用いて、生体から腸管樹状細胞をクローニングすることを試みた。また、GM-CSF や Flt3L などを用いた一般的な骨髄由来樹状細胞にレチノイン酸等の添加物を加えることで、腸管樹状細胞と同様なサイトカイン産生パターンを示す分化誘導法の検討を行った。また、ATCC より骨髄樹状細胞由来細胞株である Jaws-II を購入し、同様の評価を行った。

(3) *L. murinus* 認識受容体の探索

(1) の試験から菌体成分が Treg の誘導に関わることが示唆された。そこで、*L. murinus* の認識に関わる微生物成分パターン認識受容体の探索を行った。具体的には、野生型マウスや遺伝子欠損マウスから (3) で最適と考えられた樹状細胞を作り、シグナルに関わる経路の検討を行った。また、中和抗体、阻害剤やノックダウンを用い受容体の経路の探索を行った。

(4) 生化学的分離による抗炎症成分同定の試み

(3) における受容体の探索と共に、*L. murinus* 上に存在する成分の探索を行った。リゾチームやムタノリシンにより細胞壁を分解し、分解前後の沈殿物と上清に分け評価を行った。

4. 研究成果

(1) 無菌マウスへの *L. murinus* 投与による Treg への影響

微生物成分を認識するパターン認識受容体として著名な TLR が腸管 Treg の誘導に関与することが、下流分子 MyD88 欠損マウスのノトバイオームを用いた試験において明らかにされている (Geuking et al., *Immunity*, 2011)。一方、代謝産物も重要な役割を果たすことが知られており、その代表として *Clostridium* 菌混合投与における酪酸の効果が報告されている (Furusawa et al., *Nature*, 2013)。*L. murinus* に関してはこれまで、無菌マウスへの生菌投与により腸管 Treg が増加することが報告されている (Tang et al., *Cell host & Microbe*, 2015)、この作用が代謝産物によるものなのか、菌体のみでも Treg 増加を促すのかが明らかになっていなかった。そこで、無菌マウスに死菌体の *L. murinus* の投与を行い、菌体成分の Treg 誘導能を検討した。また、予備的な実験において 4-5 日の投与では有意な Treg 増加が認められず、生菌での定着のようにある程度の乳酸菌との接触が必要と考え、およそ1か月の連続投与を行った。その結果、*L. murinus* を投与したマウスにおいて Treg (CD4+, CD25+, Foxp3+) の増加が認められた (図 1)。また、近年明らかとなった腸内細菌叢依存的な誘導性 Treg (inducible Treg; iTregs) は Helios 陰性であるが、特にこの iTreg が有意に増加していた。一方、胸腺由来 Treg (Helios+ Treg; nTreg) に関しては、まったく差が認められなかった。以上のことから、*L. murinus* の菌体成分が Treg を誘導することが明らかとなった。

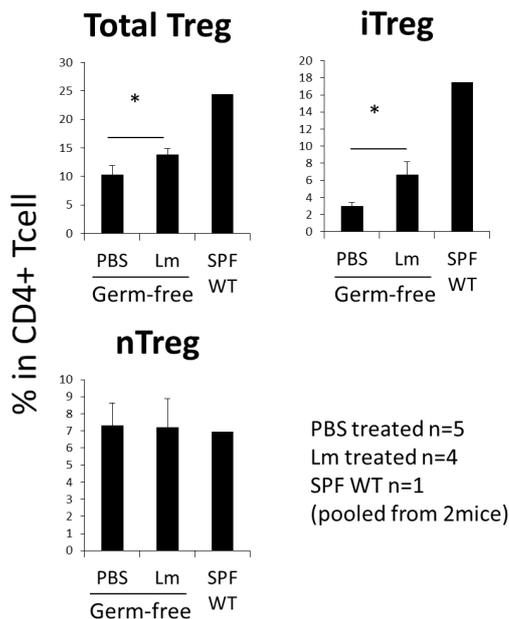


図1. 無菌マウスへの死菌体 *L. murinus* 投与は Treg を増加させる。

次に、腸管 Treg を増加させることが知ら

れる樹状細胞についての解析を行った。MHC-IIhi, CD11c+, F4/80-細胞を CD103 と CD11b で展開し解析を行ったが、これらの細胞数に群間での差は認められず、また、マクロファージに関しても差が認められなかった。機能的な違いについては検討していないが、少なくとも樹状細胞の量が Treg 細胞数と比例するわけではないことが示唆された。一方、大腸組織を採取しサイトカイン等の発現量解析を行ったところ、Treg 誘導に関わると考えられるタンパク質の中で唯一 IL-10 においてのみ差が認められた。TGF- β に関しては、平均値としては投与群において高い発現量が認められたが、有意な差は認められなかった。そこで、粘膜固有層中の CD11c+細胞を分取し、死菌体の *L. murinus* で刺激したところ、IL-10 の強い発現増加が認められ、TGF- β についても有意な発現増加が認められた。これらの結果から、*L. murinus* が腸管樹状細胞に働きかけ、TGF- β や IL-10 を増加させることにより、Treg を増加させる可能性が示唆された。

本試験は代謝産物の可能性を完全に否定できるものではないが、乳酸菌に関しては少なくとも酪酸は関与しないと考えられること、また、無菌マウスにおける生菌 *L. murinus* 投与時における Treg の増加量と本結果に大きな差が認められないことから、菌体成分が重要なのではないかと考えられた。

(2) 抗炎症性乳酸菌評価系の確立

SV40 Tg マウスは温度感受性の SV40 large T 抗原が遺伝子導入されており、ある一定温度以下での培養において SV40 遺伝子が働き増殖するが、37 °C の培養ではこのタンパク質が変性する。よって、37 °C 培養条件においては正常な機能性を持つ細胞株として扱えることが期待される。しかし、細胞分取や様々な添加物などについて検討したが、腸管粘膜固有層からは血球系の細胞の増加が認められず、また、交配に IVF が必要であることから非常に困難を伴うと判断し、この試みは途中で断念した。

そこで、代替の方法として、マーカー発現など、腸管樹状細胞に近似した細胞の分化誘導を試みている過去の報告を参考として、一般的に用いられる骨髓細胞からの GF-DC や Flt3L-DC にレチノイン酸や IL-4、および GM-CSF と Flt3L を添加したコンビネーションを試みた。評価は、死菌体の *L. murinus* を加え、IL-10 や TGF- β の産生・発現量の高いものを選択した。その結果、IL-4 の添加が格段に IL-10 の発現量を減少させること、レチノイン酸添加は IL-10、TGF- β 、IL-6、TNF といったサイトカインに大きく影響を与えないことが明らかになった。そこで、GM-CSF を用いて分化誘導させた一般的な GMDC を評価に用いる事とした。また、全ての上記試験において TGF- β の発現増強は微弱、もしくはほぼ認められず、TGF- β は評価に不適と考え、

IL-10 に着目することにした。さらに、GMDC を用いることから、C57BL/6 p53 欠損マウス由来の骨髄樹状細胞株である Jaws-11 を購入し試験したところ、IL-10 産生量は骨髄樹状細胞由来の GMDC と異なり検出限界以下であったが、発現量は非常に高くなることから、以下のノックダウン試験に用いる事とした。

(3) *L. murinus* 認識受容体の探索

過去の報告において TLR シグナル (MyD88 欠損マウス) が生体において Treg 誘導に関与することが示唆されている。そこで、MyD88 欠損マウスより GMDC を分化誘導し、*L. murinus* に対する反応性を試験した。その結果、IL-10 のみならず、他の炎症性サイトカインに関してもその反応性が認められなくなり、TLR 受容体が *L. murinus* の認識に関与することが考えられた。乳酸菌はグラム陽性菌でありペプチドグリカン層に覆われている。そして、TLR2 はペプチドグリカンを認識することが知られている。そこで、TLR2 中和抗体を用いて、TLR2 の介在性を検討した。結果、IL-6 の産生が減少する一方、IL-10 に関しては影響を受けないことが明らかになった。このことから、少なくとも TLR2 が何かしら刺激を GMDC に与えるが、肝心の IL-10 には影響を与えない、もしくは寄与が非常に低い可能性が示された (図 2)。また、興味深いことに TLR2 を刺激する純粋なリガンドである Pam3CSK4 単独では IL-10 の産生が微弱に増える程度であった。このことから、TLR2 刺激単独では IL-10 の産生が誘導されにくいことが考えられた。

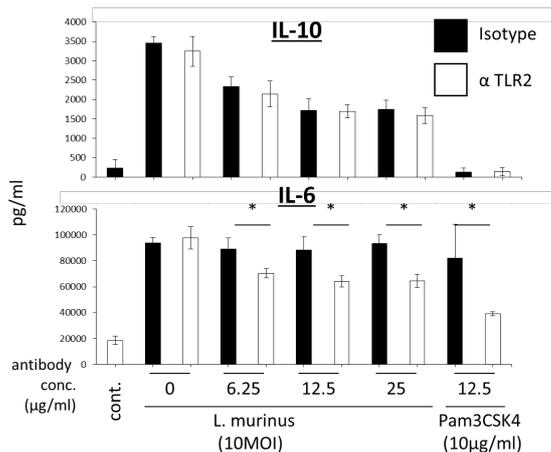


図2. TLR2中和抗体により*L. murinus*刺激によるサイトカイン産生が減少する。

これらの結果から、全ての TLR の刺激について検討することとした。そのため、Jaws-11 を用いてウイルススペースのノックダウンを行った。結果、TLR3、4、5、6、7、8、12 に関しては、*L. murinus* の認識に関与しない、もしくは弱くしか反応しないであろうことが示唆された。一方、TLR1、2、そして TLR9 の関与が示唆された。しかし、残念ながら非常に強い反応性が認められるものはなく、これらの受容体が相互に作用しあい相乗的な

反応を見せている可能性がある。または、本実験はノックダウンであるため、反応自身は弱まるものの完全に受容体を欠損するわけではないため、これが MyD88 欠損マウスで認められたほぼ完全な反応の消失とは違う結果を見せている可能性がある。

一方、IL-10 の発現に関しては TLR リガンドの刺激のみでは、*L. murinus* ほどの強い IL-10 産生能が認められなかった。すなわち、TLR とは異なる経路が IL-10 の産生に関与することが考えられた。そこで、他の微生物成分のパターン認識受容体ファミリーである C 型レクチン受容体ファミリーについて検討を加えた。このファミリー分子による認識は Syk を介することが知られているため、Syk に対する阻害剤 (R406) を用いた検討を行った (図 3)。その結果、濃度依存的に特に IL-10 の産生量が影響を受けることが明らかになった。また、Syk と同様にシグナルに関与することが考えられる Src についても阻害剤 (PP2) を用いたところ、IL-10 の産生が IL-6 に比べ強く影響を受けることが明らかとなった。これらの結果から、C 型レクチンが *L. murinus* の認識に関わり、さらに IL-10 の産生に強く影響を与えることが示唆された。そこで、具体的な C 型レクチン受容体を明らかにするために、アダプター分子の FcRγ についてノックダウンを行ったところ、IL-10 の減少が認められた。このことから、C 型レクチン受容体ファミリーの中でも特定のグループが関与することが示唆された。

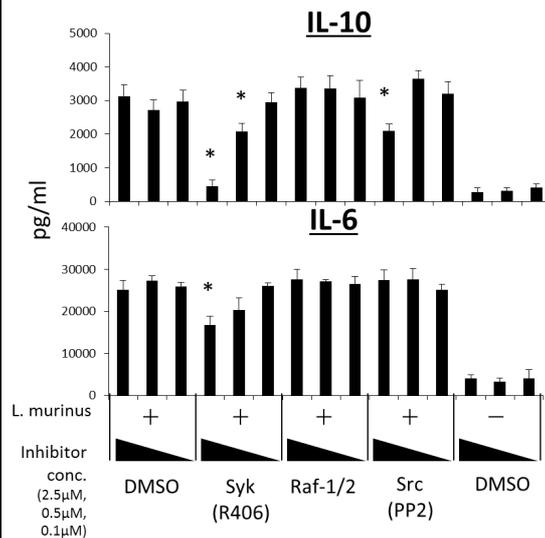


図3. *L. murinus*刺激において Syk, Src 阻害剤がサイトカイン産生を減少させる。

これらの結果は、TLR と C 型レクチン受容体の協調作用が *L. murinus* による IL-10 産生に関与する可能性を示唆している。今後、レポーター細胞などを構築し、具体的な C 型レクチン受容体の同定を行っていく予定である。

(4) 生化学的分離による抗炎症成分同定の試み

上記の実験は宿主受容体の探索に焦点を置いているが、同時に乳酸菌上の成分を探す検討も行った。そのため、ライソザイムやムタノリシンなどのペプチドグリカン分解酵素を用いて、分解産物(上清)と沈殿物に分け、IL-10の産生量を検討した。その結果、分解産物と沈殿物の両方において単独刺激ではGMDCからのIL-10産生が全く認められなくなった。しかし、上記の結果から2つ以上の物質が相互に関与した時にIL-10産生が認められると考え、分解産物とTLRのリガンド(Pam3CSK4 (TLR2)、LPS (TLR4))を同時に入れ刺激したところ、同時刺激によりIL-10の産生が増加することが明らかとなった。このことから、分解上清中にはC型レクチン受容体に対するリガンドが存在しているのではないかと考えている。

以上の結果から、*L. murinus*がTLRとC型レクチン受容体を刺激することにより、IL-10やTreg誘導を含めた抗炎症作用を発揮することが示唆された。しかし、これらを直接結びつけるエビデンスはまだ不足しており、今後これらを明確に繋げる実験を行っていく。また、C型レクチンと乳酸菌との関連は未だ報告が少なく、今後、具体的な受容体の発見、もしくはリガンドの同定を行うことにより、科学的根拠に立脚した食品開発に繋がりたいと考えている。将来的にはこれらを応用し、任意にTregを誘導することで様々な疾患軽減に結びつけたいと考えているが、大きな問題として例えばT細胞の抗原特異性等が残されており、これらの解決が必須となってくると考えられる。

本研究では*L. murinus*に焦点を当てているがこの現象が*L. murinus*に非常に特異的であるのかも非常に興味深い。特に自然免疫を介する反応である場合、反応の多少はあるものの同じような現象が他の菌でも認められる可能性が高い。今後、*L. murinus*を使用した解析からその詳細な機構を明らかにすることで、菌株レベルを含めると多岐に渡る乳酸菌の中でより良い乳酸菌の選抜が可能となることが期待される。

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 1 件)

1) Y. Murofushi, J. Villena, K. Morie, P. Kanmani, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, K. Hashiguchi, T. Saito, H. Kitazawa., The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14., *Mol Immunol.*, 査読有 64, 63-75, (2015)
doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.027.

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 島津朋之、馬場誠也、唐策、岩倉洋一郎 腸管Tregを誘導する*Lactobacillus murinus*のTreg誘導成分探索. 第6回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2018.3.17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.myu.ac.jp/teacher/syokusan-teacher/shimadut.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

島津 朋之 (SHIMAZU Tomoyuki)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：20616437