

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02336

研究課題名（和文）樹状細胞の抗原識別能力を利用した抗アレルギー効果を有する酒粕由来有用菌の同定

研究課題名（英文）Identification of the effective microorganism groups from sake lees by using the antigen presentation ability of dendritic cells

研究代表者

今井 純（Jun, Imai）

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：30342918

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）：本研究では、アザミグリーン・ユビキチンとクサビラオレンジ・ユビキチンの2種類の蛍光ユビキチンを安定に発現する樹状細胞由来の培養細胞株を作成し、この株を用いて、酒粕などの各種発酵食品から抗アレルギー効果を持つ有用菌種を同定する手法を探索した。その結果、酒粕、ヨーグルトなどの各種の発酵食品から、効率的にTh1誘導能力を持つ有用菌（主に乳酸菌）を単離する手法を確立した。同定された有用菌は各種の樹状細胞の自然免疫のセンサー分子によって識別され、樹状細胞をTh1に分化、誘導することで抗アレルギー効果を発揮した。これらの有用菌は自己免疫疾患モデルマウスに対して、症状を緩和する効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫学的に抗アレルギー効果を発揮する発酵食品の種類とそこに含まれる菌の種類は膨大であるが、免疫系に対する効果が確認され、分子メカニズムまでが明らかになっているものは非常に少ない。また、有用菌を直接的、網羅的に解析することは極めて難しい。これに対して、本研究では、多様な菌を含む酒粕などの発酵食品から抗アレルギー効果を示す菌を分離、同定する手法を確立した。食品に含まれる菌種は、食品由来であるために安全性は確保されている。抗アレルギー効果を示す菌を継続的に摂取するSymbiosis療法は低い副作用で長期間継続することが可能であり、薬物治療を補完する治療法として確立できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated cultured cell lines, which stably express two types of fluorescent ubiquitin, Azami-green-ubiquitin and Kusabira-orange-ubiquitin from the dendritic cells (DC) line, DC2.4. Using these stable cell lines, we searched for a method to identify useful bacterial strains with anti-allergic effects from fermented foods. As a result, we established a method to efficiently isolate useful bacteria (mainly lactic acid bacteria) with Th1-inducing ability from various fermented foods such as sake lees or yogurt. The identified useful bacteria were distinguished by the innate immune sensor molecules of various DCs, and exhibited anti-allergic effects by differentiating and inducing DCs into Th1. These useful bacteria exerted the effect of relieving symptoms in autoimmune disease model mice.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 有用細菌 発酵食品 免疫バランス アレルギー 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

先進国では 21 世紀までに、アレルギー疾患・自己免疫疾患の有病率が 5 倍近くに増加している。これらの疾患の発症は遺伝性が高いと考えられてきたが、患者数の増加を遺伝のみで説明することは難しく、非アレルギー性の因子として、ストレス、環境汚染、過度の清潔志向(衛生仮説)などが提唱され、これらの因子による免疫の過度な活性化がアレルギー性疾患の原因となっていることは確実とされる。この仮説に基づき現代のアレルギー疾患・自己免疫疾患の治療薬には、ステロイド薬や免疫抑制剤などの従来型の免疫抑制作用を発揮する医薬品に加えて、より特異的、強力な免疫反応抑制効果を持つ抗体医薬品などの生物製剤や特異的なキナーゼ阻害剤などの分子標的薬に属する薬品が適用されている。これらの医薬品はいずれも、短期的には高い治療効果を発揮するものの、患者の状態に合わせた投薬管理が必須で、強い免疫抑制効果に基づく、強い副作用が出現するものも含まれている。従って、投薬のみによって、長期間にわたって増悪と寛解を繰り返す多くのアレルギー疾患・自己免疫疾患を根治することは困難である。このように強い副作用を伴う免疫抑制剤に対して、近年、免疫のリバランスによるアレルギーの症状の緩和が注目を集めている。免疫は細胞性免疫(Th-1; T helper cell type-1)、体液性免疫(Th-2; T helper cell type-2)と免疫寛容の間でバランス(免疫バランス)を保つことで、過剰な活性化を抑制、適正化なレベルの反応が維持されている。アレルギー性疾患は、この免疫バランスの崩れた結果、過度に活性化され免疫が自己に不利益な反応を生じて、発症する。従って、この免疫バランスを回復されることでアレルギー性疾患を抑制することが可能となると考えられている。

近年、酒粕が抗アレルギー効果を示すことが発見された。酒粕乾燥粉末をアレルギー性疾患モデルマウスである BALB/c や、アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga に投与するとアレルギー反応が抑制される。そこで、酒粕から抗アレルギー作用を持つ成分の探索が行われ、乳酸菌(K71 株)が、免疫系の細胞に働きかけ免疫バランスを回復することで、抗アレルギー効果を発揮することが明らかとなった。しかし、K71 株を含まない酒粕乾燥粉末にも、抗アレルギー効果があることから、酒粕の中には K71 株の他にも抗アレルギー効果を示す有用菌が存在することが強く示唆された。さらに、酒粕から同定された K71 株に触発されて、酒粕以外の同様な効果を発揮する有用菌の同定、有用な代謝産物の同定が試みられた。その結果、菌体成分そのものに加えて、腸内共生細菌によって生産される酪酸や酢酸などのような低分子脂肪酸にも免疫制御機能が見出された。しかし、これらの研究はいずれも、酒粕など様々な発酵食品から単離、純粋培養を行った菌体成分、代謝産物の効果を解析した結果であり、様々な菌体成分や代謝産物を含む発酵食品から、直接、有用菌を単離する手法は開発されていない。その理由として、酒粕などの発酵食品は多くの菌類を含み、この中から抗アレルギー効果を示す有用菌を同定するには、膨大な数の菌類を純粋培養し、個々に抗アレルギー効果を解析しなければならないため、極めて多くの時間と労力が必要であることが考えられる。これに加えて、抗アレルギー効果を持つ食品の探索は統計的な解析から有効な食品を選別し、選別された食品の効果を実験動物によって解析する手法に基づくため、抗アレルギー効果を持つ食品の効率的な探索方法は未だ知られていない。またこれらに加えて、免疫学的な理論に立脚した効率的な探索方法は未だ確立されていない。従って、様々な発酵食品から直接的に有用細菌を効率的に単離同定する手法、および免疫学的な証拠に理論に基づいて抗アレルギー効果を持つ食品を効率的に同定する手法を確立することは、現代病とも言われる様々なアレルギー疾患の治療に新たな選択肢を提供することを可能とする。また、食品であるために安全性も確保されており、同定された食品は抗アレルギー効果を発揮する機能食品として、菌株は機能食品と同じ効果を持つプロバイオティクスとして応用することができる。死菌で効果がある場合は食品添加物としても利用可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は酒粕から、樹状細胞(DC:Dendritic Cell)の抗原識別能力を利用して抗アレルギー効果を発揮する菌を同定することである。酒粕などの発酵食品は酪酸菌、出芽酵母、麹菌などの多様な菌を含み、K71 株以外にも抗アレルギー効果を有する菌が含まれている可能性が強く示唆された。しかし、従来の方法で抗アレルギー効果を有する菌を同定するためには酒粕に含まれる菌を純粋培養し、純粋培養された菌を樹状細胞などの免疫細胞に加えて、これらの細胞が分泌するサイトカインを検証し、炎症性サイトカインの抑制効果などを個々に確認する。その結果、膨大な数の菌を単離する必要があるほか、菌によって培養条件が大きく異なる、単独では培養できない菌がある、培養条件で代謝物などが変化する菌が存在するなど様々な理由から、多種類の菌を網羅的に解析することは困難であった。本研究では申請者が考案した、蛍光タンパク質融合ユビキチンを利用する新規スクリーニング法により、分化した樹状細胞を分離する。この方法は、酒粕に含まれる抗アレルギー効果を有する細菌類を直接、広範囲に同定することが可能であり、酒粕などの発酵食品から直接的、網羅的に有用菌を単離、同定することを可能とした。また、Th 分化を引き起こす菌を多く含む食品は、高い抗アレルギー効果を期待することができるため、抗アレルギー効果を発揮する機能食品として応用することが期待され、このような機能食品の同定も目標に加えた。

### 3. 研究の方法

DC は抗原提示細胞として、周囲の抗原(外来抗原)を取り込み、抗原ペプチドに分解後、抗原ペプチドをMHC(Major Histocompatibility Complex、別名はHLA:Human Leukocyte Antigen)に結合し、細胞表面に発現、他の免疫細胞に抗原の種類や量などの情報を伝えている。また、病原体に特有な分子を検出するセンサー分子群を発現、その反応パターンによって、病原体の種類を特定すると、病原体の種類に応じたサイトカインを分泌し、ヘルパーT細胞の活性を制御することで、最適な免疫応答を誘導する(免疫制御能力)。DC はセンサー分子に反応が無い時は、抑制性のサイトカインを分泌し、自らのMHCに提示した抗原ペプチドと反応する免疫細胞の活動を抑制すると共に、免疫活動を負に制御する制御性T細胞を活性化する。これに対して、がん細胞やウイルスのように細胞内に潜む病原体を検出すると、細胞傷害性T細胞を主体とするTh-1を活性化する。一方、細菌などの細胞外の病原体を検出すると、抗体を主体とするTh-2を活性化する。Th-1とTh-2はどちらか一方のみが選択されるのではなく、相互に機能を制御し、バランスをとることで平衡を保っている(免疫バランス)、免疫バランスが崩れることは、アレルギー性疾患などの様々な免疫疾患の原因となる。Th-1に傾いたDCでは外来抗原はユビキチン(Ub; Ubiquitin)が4分子以上連なったUb鎖で標識(Ub鎖修飾)された後に、Ub鎖を目標としてプロテアソームで分解される。逆にTh-2に傾いた細胞では、外来抗原はリソソームで分解されるためにUb鎖修飾を受ける割合は低い。そこで我々は蛍光タンパク質を融合したUbを発現するDCを用いて、このTh-1に分化したDCを光学的に分離した。2種類の蛍光タンパク質(Azg; Azami greenとKuo; Kusabira orange)を融合させたUb(Azg-UbとKuo-Ub)を発現するDCを用いて、Ub鎖をAzgとKuoの間での蛍光共鳴エネルギー移動(FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer)によって光学的に検出、定量化する。DCがTh-1に傾くと、Ub鎖修飾を受ける外来抗原は増加し、細胞内のUb鎖は増加する。Ub鎖には2種類の蛍光Ubが取り込まれるので、AzgとKuoは近接、Azgの蛍光の一部がKuoの励起光として捕捉され、Azgの励起光によってKuoの蛍光が生じるFRETが増加する。逆にDCがTh-2に傾くと、Ub鎖修飾を受ける外来抗原は減少し、細胞内のUb鎖は減少、AzgとKuoの分子間の距離は離れ、FRETは減少する。これら2種類の蛍光Ubを発現するDC由来の培養細胞に熱滅菌した発酵食品を加えて、DCに発酵食品に含まれる菌体を取り込ませる。菌体を取り込んだDCは分子センサーによって菌の種類を判別し、菌の種類に対応する免疫状態に分化するので、FRETを指標として、Th-1またはTh-2に分化した細胞をセルソーターによって光学

的に分離する。分離した細胞から DNA を抽出、細胞内に残存する菌類のゲノムを細菌または真菌などに特異性の高いカスタムプライマーを用いた PCR により菌類の DNA を選択的に増幅、その塩基配列を決定することで乳酸菌のゲノムに由来する DNA を同定することに成功し、純粋培養によってこれを株化、細胞レベルの実験、マウスによる個体レベルの実験を実施した。さらに各種のアレルギー疾患モデルマウスに投与し、免疫疾患の抑制に有効な発酵食品由来の菌種を同定し、抗アレルギー効果を持つ有用菌株、有用食品を探索した。

#### 4. 研究成果

市販の数種類の酒粕を低温滅菌し、2 種類の蛍光タンパク質(Azg;Azami green と Kuo;Kusabira orange)を融合させた Ub(Azg-Ub と Kuo-Ub)を発現する DC(単球由来の DC2.4)に取り込ませたのち、経時的に DC を回収し、FRET 強度を比較した。その結果、滅菌した酒粕を取りこませてから、12～24 時間後の DC2.4 が強い FRET を示す細胞の割合が高かったため、実験条件として菌体取り込み後、12 時間、18 時間、24 時間を設定した。続いて、実験計画に基づき、滅菌した酒粕を取りこませた DC をセルソーターによって光学的に分離、分離した細胞から DNA を抽出、細胞内に残存する菌類のゲノムを細菌または真菌などの rRNA に対して、高い特異性を持つカスタムプライマーを用いた PCR によって菌類の DNA を選択的に増幅、その塩基配列を決定した。塩基配列の類似性から、乳酸菌などの真正細菌と麹かびなどの真菌に特異的な DNA が検出された。また、対照実験として市販の各種ヨーグルトなどの複数の発酵食品からも FRET を誘導する菌類として、乳酸菌の DNA が検出された。さらに、実験計画に基づき、決定された菌種をゲノム情報に基づいて単離し、純粋培養を行い株化、DC から単離した DNA と純粋培養した菌類の DNA が一致することを確認した(有為水準、0.1%)。株化した乳酸菌、麹かびは、樹状細胞由来の培養細胞(単球由来の DC2.4 と cDC1 由来の mutuDC)、マウスの骨髄由来の樹状細胞(BMDC; bone marrow derived DC)に投与、IFN- $\gamma$  と IL-12 に対する抗体を使用した ELISA 法、サイトカインの転写を確認する RT-PCR 法、抗体を用いた細胞内染色後の FACS などによって、同定した菌が Th 分化に与える影響を細胞レベルで確認した。その結果、酒粕とヨーグルト由来の乳酸菌は、DC2.4 に投与すると FRET を引き起こし、DC2.4 と BMDC に対して IFN- $\gamma$  と IL-12 などの Th-1 サイトカインを誘導する能力を示したが、mutuDC では再現性のある結果を得ることはできなかった。この FRET 誘導能力、サイトカイン誘導能力は、株化した乳酸菌を含む商品に特異的であるが、菌株の間で大きな差異が認められた。これに対して、麹かびの FRET 誘導能力、サイトカイン誘導能力は乳酸菌に比べて相対的に低いいため、以降の解析には使用できなかった。麹かびは、酒粕から FRET で分離を行った際には、高い FRET 誘導能力を示すので、培養条件、投与条件などに問題があった可能性があるものと考えている。最後に我々は、株化した乳酸菌の抗アレルギー効果をマウスを用いて検証した。*in vitro* で DC に対して Th-1 サイトカインを誘導する能力を有する食品、乳酸菌菌株はいずれも、マウスに経口投与することで、血中に Th-1 サイトカインを誘導、免疫バランスを Th-1 方向に変更させた。また、炎症性腸炎などの自己免疫疾患モデルマスの症状を緩和する能力を有していた。現在、これらの個体レベルの実験の再現性、定量性を検証すると共に長期的な効果を検証している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imai J, Koike E, Sakai T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Detection of beneficial anti-allergy microbes by dendritic cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Allergy in Practice.	6. 最初と最後の頁 1787-1792
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 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 Imai J, Koike E, Sakai T	4. 巻 40
2. 論文標題 Detection of beneficial anti-allergy microbes by dendritic cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Allergy in Practice	6. 最初と最後の頁 829-834
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 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 Imai J, Koganezawa Y, Sakai T	4. 巻 40
2. 論文標題 Dendritic cells as a detecting unit for beneficial anti-allergy microbes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Allergy in Practice	6. 最初と最後の頁 13-17
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 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 Imai J, Koganezawa Y, Tuzuki H, Ishikawa I, Sakai T.	4. 巻 43
2. 論文標題 An optical and non-invasive method to detect the accumulation of ubiquitin chains. Imai J, Koganezawa Y, Tuzuki H, Ishikawa I, Sakai T.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biol Int.	6. 最初と最後の頁 1393-1406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.11186.	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 該当する

1. 著者名 Imai J, Otani M, Sakai T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct Subcellular Compartments of Dendritic Cells Used for Cross-Presentation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E5606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225606.	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 該当する

1. 著者名 Imai J, Ohashi S, Sakai T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation-Dependent Processing in Cross-Presentation and Its Potential for Dendritic Cell Vaccinations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics.	6. 最初と最後の頁 E153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12020153.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	坂井 隆浩  (Sakai Takahiro)  (10418618)	高崎健康福祉大学・薬学部・助教    (32305)	

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