

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008-2009
 課題番号：20780191
 研究課題名（和文） 乳発酵微生物のマスト細胞における Toll 様受容体 2 を介した抗アレルギー作用の解明
 研究課題名（英文） Clarification of the Toll-like receptor 2-mediated anti-allergic function of fermented milk-derived microorganisms
 研究代表者：河原 岳志（KAWAHARA TAKESHI）
 信州大学・農学研究科・助教
 研究者番号：30345764

研究成果の概要（和文）: Toll 様受容体 2 のリガンドとして作用する乳発酵微生物（酵母、乳酸菌）を対象に、マスト細胞の脱顆粒反応抑制効果を検討した。選抜により強い脱顆粒反応抑制効果を持つ乳酸菌（*Lactobacillus reuteri* NBRC15892 株）の存在が明らかになり、それを用いた解析により即時型アレルギーの遅延相応答（炎症性サイトカイン発現誘導、脂質メディエーター産生）に対する抑制効果が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）: This study investigated the suppressive function of fermented milk-derived microorganisms that work as the ligand of Toll-like receptor 2. The strong suppressive effect of lactic acid bacterial strain (*Lactobacillus reuteri* NBRC15892) on both degranulation and subsequent late-phase reactions (induction of proinflammatory cytokines and production of lipid mediators) of mast cells are elucidated by the screening and investigation using this strain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：食品機能学・畜産学

科研費の分科・細目：「畜産学・獣医学」・「畜産学・草地学」

キーワード：マスト細胞、アレルギー、乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

発酵乳の生成に貢献する微生物として乳酸菌と酵母が知られており、特に乳酸菌は免疫機能の活性化を中心に多様な生理機能を持つことから、今日ではプロバイオティクスの名称で広く親しまれている。その免疫機能活性化の機構については免疫担

当細胞のもつ Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる一連の受容体が重要な役割を持つことが報告され、乳酸菌の機能における TLR の重要性について多くの報告が成されている。

近年、粘膜組織において 型アレルギー反応のエフェクター機能を担う粘膜型マ

ト細胞の性質を持つマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) においても一部の TLR の存在が確認され、自然免疫応答におけるマスト細胞の役割について注目が集まっている。

BMMC を TLR2 のリガンドとして知られる *Staphylococcus aureus* 由来ペプチドグリカンで刺激することで脱顆粒反応が誘導されるという報告が成され、マスト細胞における TLR2 の役割の全体像は明らかでないが、少なくとも TLR2 とリガンドの作用の種類または条件によってはマスト細胞の脱顆粒反応を抑制しうる可能性が示された。

申請者は、平成 17 ~ 19 年度にかけて「脱顆粒反応を指標にした卵黄タンパク質のアレルゲン性評価システムの構築」を目指し、その検討の中でマウス IgE を介した脱顆粒応答を定量的に評価できるマウスマスト細胞株の樹立を試み、分化誘導後の BMMC をマウス由来マスト細胞腫の P815 細胞株と融合することにより、BMMC の脱顆粒応答能と P815 の無限増殖能を併せ持つマスト細胞ハイブリドーマの樹立に成功した。

以上に述べたような背景から、マスト細胞ハイブリドーマの株化細胞としての特性を利用し、TLR2 リガンドを有する酵母と乳酸菌のマスト細胞における Fc RI 発現抑制機能を詳細に解析し、抗アレルギー食品素材としての可能性を追求するという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

発酵乳の生成に貢献する微生物として乳酸菌と酵母が知られており、特に乳酸菌は免疫機能の活性化を中心に多様な生理機能を持つことから、今日ではプロバイオティクスの名称で広く親しまれている。その免疫機能活性化の機構については免疫担当細胞のもつ TLR と呼ばれる一連の受容体が重要な役割を持つことが報告され、乳酸菌の機能における TLR の重要性について多くの報告が成されている。本研究は、I 型アレルギー反応のエフェクター細胞であるマスト細胞が TLR2 を発現し、さらにそのリガンドによる処理がその後のマスト細胞の脱顆粒反応を抑制するという知見をもとに、これを応用した発酵乳由来微生物の抗アレルギー作用についての基礎的な検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

セルバンクに寄託されている発酵乳由来

の酵母と乳酸菌を対象に、マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) およびマスト細胞ハイブリドーマ培養系を用いて、IgE 抗体+抗原によって誘導した脱顆粒反応に対する抑制活性を指標にしたスクリーニングを行った。なお、菌株は 70 で 30 分の加熱処理を行った加熱死菌を使用し、脱顆粒反応は γ -ヘキソサミニダーゼ活性測定により評価した。

選抜された脱顆粒反応の抑制作用が観察された菌株 (*Lactobacillus reuteri* NBRC15892 株) を用いて、IgE 抗体によって誘導される脱顆粒反応後のサイトカイン (IL-4、IL-13、TNF- α) 産生、脂質メディエーター (ロイコトリエン C₄、プロスタグランジン D₂) 産生およびその経路に及ぼす影響について解析を行った。

市販 TLR2 シグナル伝達阻害抗体を用いて、脱顆粒反応抑制性乳酸菌の作用がどのように影響をうけるかという点について確認を行った。

ビーズ式細胞破碎装置を用いて脱顆粒抑制性乳酸菌から 1-ブタノール-水抽出法によりリポテイコ酸含有画分を抽出し、それらの画分の作用によって抑制作用が再現されるかについて確認を行った。

脱顆粒反応抑制性乳酸菌の作用機構に関して、Fc RI 発現低下現象の関与を明らかにするため、菌体処理後の細胞に対し、経時的なフローサイトメトリー解析を行った。また、菌体処理時間が脱顆粒反応に及ぼす影響についてもあわせて検討を行い、その関連性について確認を行った。

4. 研究成果

本研究はマスト細胞における TLR2 を介した刺激が、その後に誘導される脱顆粒反応を抑制するという知見に基づいて、TLR2 リガンドを有する発酵乳由来微生物のアレルギー性応答に及ぼす影響について評価を行うことを目的とするものであり、平成 20 ~ 21 年度の 2 年間にわたって行われた。

平成 20 年度は、セルバンクに登録されている発酵乳由来または関連種の酵母や乳酸菌株を対象に、マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) の培養系を用いてスクリーニングを行った。各検体の加熱死菌体の凍結乾燥物を 100 μ g/ml の添加条件で 24 時間の添加培養を行ったところ、脱顆粒反応抑制作用は酵母ではあまり観察されず一部の乳酸菌株が強い活性を持つことを明らかにした。しかし、この処理によって TLR2 リガンド処理で観察されている高親和性 IgE 受容体 (Fc RI) 発現低下現象は観察されなかった。この点については当初の予想と異なる現象であり、乳酸菌の脱顆粒反応抑制減少における TLR2 刺激の関与という観点からのさらなる検討が必

要と判断し、来年度の重点検討項目に掲げた。

脱顆粒反応抑制性菌株として見出した *Lactobacillus reuteri* NBRC15892 株のアレルギー性応答に対するさらなる抑制作用について明らかにするため、脱顆粒誘導後の炎症性サイトカイン発現誘導や脂質メディエーター産生作用における作用について経時間的な詳細な検討を行った。その結果、脱顆粒反応誘導 1 ~ 2 時間後の Th2 型サイトカイン IL-4 ならびに IL-13、脂質メディエーターであるプロスタグランジン D2 の発現誘導が抑制されることを明らかにした。以上の研究成果に基づき、計 3 回の学会発表を行った。

平成 21 年度は、前年度の研究成果によって得られた脱顆粒反応抑制性乳酸菌である NBRC15892 株の作用について、TLR2 リガンドによる脱顆粒反応抑制作用との関連性を評価した。TLR2 阻害抗体を用いて抗体存在下における本菌株の脱顆粒反応抑制活性について評価を行ったところ、抑制作用の有意な減少が確認された。そこで活性に關与する菌体成分が TLR2 リガンドである可能性を考慮し、リポテイコ酸を視野に入れた活性画分の特性付けを行った。ガラスビーズによる細胞破碎を行った菌体を 1-ブタノール・水抽出系により分画し、透析により分子量 1,000 以上相当の 1-ブタノール溶性・水溶性画分を回収した。これらの画分の脱顆粒反応に及ぼす影響を評価したところ、リポテイコ酸が含まれると予想される水抽出物に顕著な抑制活性がみられることが明らかとなった。これまで知られている黄色ブドウ球菌由来リポテイコ酸にみられる脱顆粒反応抑制活性は、マスト細胞上の高親和性 IgE 受容体である Fc RI 発現低下を伴うことが報告されている。しかし我々の昨年度の検討では脱顆粒反応抑制に伴った Fc RI 発現低下が観察されなかったため、この点について確認を行った。NBRC15892 株ならびに菌体画分添加後の Fc RI の経時的な変化をみたところ、従来報告されている添加 2 4 時間後ではなく 6 時間後に発現低下が起こっていた。しかしこの Fc RI 発現低下は 2 4 時間後には消失し、これまで 2 4 時間処理後に観察された脱顆粒反応抑制の持続性と大きな相違があることが明らかとなった。以上のことから本年度の検討により、NBRC15892 株ならびに菌体画分による脱顆粒反応抑制作用に関する新たな知見が得られるとともに、Fc RI 発現低下とは異なる持続的な抑制機構が働いている可能性が示唆されるとする研究成果を得た。

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 4 件)

Kawahara, T. *Animal Science Journal*, (in press), 2010, 査読有, Inhibitory effect of heat-killed *Lactobacillus* strain on immunoglobulin E-mediated degranulation and late-phase immune reactions of mouse bone marrow-derived mast cells.

Kawahara, T., Iida, A., Toyama, Y., and Fukuda, K. (論文名) *Food Science and Technology Research*, **16**, 253-262, 2010, 査読有, Bacteriocinogenic lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus* strain Y108 isolated from Nozawana-zuke pickles

Shinomiya, F., Hamauzu, Y., and Kawahara T. (論文名) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**, 1773-1778, 2009, 査読有, Anti-Allergic Effect of a Hot-Water Extract of Quince (*Cydonia oblonga*)

Ye, J., Li, Y., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Komatsu, T., Kashiwagi, T., Teruya, K., Nishikawa, R., Kawahara, T., (他 9 名、9 番目)(論文名) *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 19-26, 2008, 査読有, Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis

[学会発表](計 6 件)

河原岳志、戸田圭亮(発表表題) 脱顆粒反応抑制性乳酸菌の TLR2 依存性と活性画分の作用に関する特性付け、日本畜産学会第 110 回大会、2010.3.29、東京

山崎浩史、河原岳志(発表表題) 脱顆粒反応抑制性乳酸菌の機能解析におけるマウスマスト細胞ハイブリドームの利用性、日本畜産学会第 110 回大会、2010.3.29、東京

戸田圭亮、河原岳志(発表表題) 野沢菜漬由来乳酸菌のマウス骨髄由来マスト細胞に対する脱顆粒反応抑制効果、日本畜産学会第 110 回大会、2010.3.29、東京

河原岳志、大谷 元(発表表題) 脱顆粒反応抑制性乳酸菌のマウス骨髄由来マスト細胞遅延相応答に対する抑制効果、日本畜産学会第 112 回大会、2009.3.29、神奈川

河原岳志、大谷 元(発表表題) 発酵乳由来微生物のマウスマスト細胞に及ぼす影響の評価、平成 20 年度北信越畜産学会、2009.11.6-7、石川

河原岳志、大谷 元(発表表題) 発酵乳由来微生物のマウスマスト細胞に及ぼす影響の評価、平成 20 年度日本酪農科学会、2008.8.29、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 岳志 (KAWAHARA TAKESHI)

信州大学・農学研究科・助教

研究者番号：30345764